



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**MUTACIONES EN EGFR Y SUSCEPTIBILIDAD A LA MUERTE INMUNOGÉNICA**

**INDUCIDA POR CISPLATINO E INHIBIDORES DE TIROSINA CINASAS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**CHÁVEZ DOMÍNGUEZ RODOLFO LUIS**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**MÉXICO, CD. MX., MAYO, 2017**



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**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**MUTACIONES EN EGFR Y SUSCEPTIBILIDAD A LA MUERTE INMUNOGÉNICA**

**INDUCIDA POR CISPLATINO E INHIBIDORES DE TIROSINA CINASAS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**CHÁVEZ DOMÍNGUEZ RODOLFO LUIS**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**MÉXICO, CD. MX., MAYO, 2017**

Lic. Ivonne Ramirez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de febrero de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **CHÁVEZ DOMÍNGUEZ RODOLFO LUIS** con número de cuenta **306282827**, con la tesis titulada **"MUTACIONES EN EGFR Y SUSCEPTIBILIDAD A LA MUERTE INMUNOGENÉTICA INDUCIDA POR CISPLATINO E INHIBIDORES DE TIROSINA KINASAS"**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ**:

Presidente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA  
Vocal: DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ  
Secretario: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO  
Suplente: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA  
Suplente: DR. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.



ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 20 de abril de 2017

*M. del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la formación académica, así como por el apoyo para la realización del presente trabajo.
- Al CONACYT por el apoyo económico otorgado a través de la beca de posgrado (631047) .
- A los miembros del comité tutorial: Dr. José Sullivan López González por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y por el apoyo recibido durante la realización de este trabajo. Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por todos los comentarios y sugerencias realizados para mejorar el presente trabajo. Al Dr. Enrique Ortega Soto por la asesoría y apoyo durante la realización de este trabajo, así como por los comentarios y sugerencias para mejorar el presente trabajo.

## INDICE

INDICE DE FIGURAS.....	I
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
INTRODUCCIÓN .....	5
CÁNCER .....	5
CÁNCER DE PULMÓN .....	7
TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN .....	9
RECEPTOR PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO .....	12
MUERTE CELULAR .....	18
ANTECEDENTES .....	24
MUERTE CELULAR INMUNOGÉNICA .....	24
JUSTIFICACIÓN .....	31
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVOS.....	32
METODOLOGÍA.....	33
RESULTADOS .....	41
DISCUSIÓN.....	63
CONCLUSIONES .....	67
LITERATURA CITADA.....	68

## INDICE DE FIGURAS

Curvas dosis respuesta del Erlotinib y CDDP.....	41
Cambios morfológicos asociados a los tratamientos.....	45
Análisis de las fases del ciclo celular .....	46
Análisis de la muerte celular. ....	49
Actividad de la caspasa 3 .....	51
Cantidad relativa de ATP y ADP y relación ADP/ATP. ....	52
Cuantificación de HMGB1 en los sobrenadantes.....	53
Expresión relativa del transcrito de <i>HMGB1</i> .....	55
Distribución de la proteína HMGB1 en la línea celular A549.....	56
Distribución de la proteína HMGB1 en la línea celular HCC827. ....	57
Distribución de la proteína HMGB1 en la línea celular HCC4006 .....	58
Detección de calreticulina en membrana por citometría de flujo.....	60
Detección de calreticulina en membrana por microscopía confocal.....	62

## RESUMEN

**Introducción:** EL cáncer de pulmón es la principal causa de muertes por cáncer a nivel mundial. El adenocarcinoma es el histotipo más frecuente en donde el tratamiento convencional es a base de compuestos platinados. Diversos estudios reportan que pacientes con tumores positivos a mutaciones en el gen que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR por sus siglas en inglés) tratados con inhibidores de tirosina cinasa (TKI) presentan una mejor respuesta clínica que los pacientes tratados con quimioterapia. El Erlotinib, un TKI reversible, induce en células sensibles muerte por apoptosis y arresto en el ciclo celular. Estos efectos también son inducidos por el cisplatino (CDDP). Varios reportes indican que algunos compuestos citotóxicos inducen una nueva modalidad de muerte celular denominada muerte celular inmunogénica, la cual activa la respuesta inmune antitumoral. La muerte celular inmunogénica requiere de la expresión espacio-temporal de tres moléculas indispensables, conocidas como las marcas de la muerte celular inmunogénica, las cuales son: expresión de calreticulina en membrana y la liberación de ATP y de la proteína de alta movilidad electroforética box 1 (HMGB1). Un evento temprano es la exposición membranal de la calreticulina, la cual actúa como una señal de “cómeme”. En eventos tardíos, la liberación extracelular de ATP y de HMGB1 son requeridos. Hasta el momento, no existen reportes que indiquen si en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar el CDDP o el Erlotinib inducen muerte celular inmunogénica.

**Materiales y métodos:** Las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar HCC827, HCC4006 (deleción en el exón 19 del EGFR) y A549 (gen silvestre de *EGFR*) se obtuvieron de la ATCC. El Erlotinib se obtuvo de Sequoin Products y el CDDP de Sigma. Las células se cultivaron en placas de 96 pozos y el efecto citotóxico de los compuestos fue medido empleando el ensayo del MTT. Las líneas celulares HCC827 y HCC4006 fueron tratadas con Erlotinib por 48 h y la línea celular A549 fue tratada con CDDP por 24 h y se calculó la  $CI_{50}$ . Para estudiar si los compuestos inducen muerte celular inmunogénica, se adicionó una concentración de compuestos que causaran un 80% de inhibición del crecimiento. La muerte celular fue evaluada por análisis del ciclo celular, las células apoptóticas y

necróticas se cuantificaron por citometría de flujo y la actividad de la caspasa 3 por fluorimetría. Como marcadores de muerte inmunogénica se estudiaron la proporción ADP/ATP (evaluada por luminiscencia), HMGB1 extracelular (cuantificada por ELISA) y la calreticulina membranal (estudiada por citometría de flujo y microscopía confocal).

**Resultados:** En las líneas celulares HCC827 y HCC4006, el Erlotinib a bajas concentraciones indujo arresto en las fases Go/G1 del ciclo celular. Sin embargo, en altas concentraciones, se indujo apoptosis (20%) mediada por la activación de la caspasa 3, incremento en la relación ADP/ATP y en la HMGB1 liberada (solamente en la línea celular HCC827). No se detectó exposición de calreticulina en membrana. En la línea celular A549, el CDDP indujo apoptosis (40%) mediada por la activación de la caspasa 3, incremento de la relación ADP/ATP y de la HMGB1 liberada. La calreticulina en membrana se detectó como pequeños puntos.

**Conclusiones:** En las líneas celulares HCC827 y HCC4006, el Erlotinib indujo muerte celular que no es mediada por ICD. Sin embargo, en la línea celular A549, el CDDP indujo muerte celular mediada por ICD.

## ABSTRACT

**Background:** Lung Cancer is the leading cause of cancer-related mortalities worldwide. Adenocarcinoma is the most frequent histotype and platinum-based chemotherapy is employed as conventional treatment. Several studies have reported that EGFR mutation-positive patients treated with Tyrosine Kinase Inhibitors (TKI) have better clinical outcomes than these patients treated with chemotherapy. Erlotinib, a reversible TKI, induces in sensitive cell lines, cell cycle arrest and apoptosis. These biological events are also induced by Cisplatin (CDDP). Several reports indicate that some cytotoxic drugs induce a new modality of cell death called immunogenic cell death (ICD), which induces an antitumor immune response. The ICD requires a spatial-temporal expression of three indispensable molecules known as the hallmarks of ICD, and are: membrane exposition of calreticulin and ATP and HMGB1 release. An early event is the membrane exposition of calreticulin acting as “eat me” signal. Later, the release of cytosolic ATP to the extracellular space and the nuclear protein HMGB1 outside the cell are required. Currently, no reports exist whether Erlotinib and CDDP induces ICD in EGFR-mutated and wild type lung cancer cell lines, respectively.

**Material and methods:** Lung adenocarcinoma cell lines HCC827, HCC4006 (deletion in exon 19 of *EGFR*) and A549 (*EGFR* wild type) were obtained from the ATCC. Erlotinib was acquired from Sequoin Research Products and CDDP was obtained from Sigma. Cells cultured in 96-well plates were treated with serial dilutions of the compounds and cytostatic/cytotoxic effect was measured using MTT assay. The HCC827 and HCC4006 were treated with Erlotinib for 48 h and the A549 cell line was treated with CDDP for 24 h and the IC<sub>50</sub> was calculated. To study whether these cytotoxic drugs induce ICD, drug concentration that induced around 80% of inhibition was added to cell cultures. Cell death was evaluated by cell cycle analysis, necrotic and apoptotic cells were quantified by annexin-V/propidium iodide assay and fluorometry was used to evaluate whether apoptosis is caspase 3-mediated. As ICD markers, the intracellular ADP/ATP ratio (quantified by luminometry), HMGB1 (quantified by ELISA) and membrane-exposed calreticulin (detected by flow cytometry and immunofluorescence) were studied.

**Results:** In the HCC827 and HCC4006 cell lines, Erlotinib at low concentrations induced cell cycle arrest in G0/G1 phase. However, at high concentrations, apoptosis (20%) mediated by caspase 3 activation, increase of ADP/ATP ratio and of the HMGB1 release (only in HCC827) was induced. No membrane-exposition of calreticulin were detected. In A549 cells, CDDP induced apoptosis (40%) mediated by caspase 3 activation, increase of ADP/ATP ratio and of the HMGB1 release. Membrane-exposed calreticulin was detected as spots.

**Conclusions:** In HCC827 and HCC4006 cell lines, Erlotinib-induced cell death is not mediated by ICD. However, in the A549 cell line, CDDP induced cell death mediated by ICD.

## INTRODUCCIÓN

### CÁNCER

La célula constantemente se encuentra expuesta a una diversidad de señales que favorecen su proliferación, sobrevivencia, diferenciación y comunicación con otras células. Las señales en su conjunto permiten que las células y los tejidos funcionen adecuadamente, manteniéndose la homeostasis. Sin embargo, la continua exposición de la célula a factores genotóxicos que dañan su material genético (DNA) favorece la transformación de la célula a un fenotipo maligno.

El cáncer es un conjunto de enfermedades de etiología multifactorial que implican una desregulación en la expresión de genes que controlan la proliferación, la sobrevivencia y la diferenciación de la célula. Las mutaciones puntuales, las inserciones, las deleciones, las amplificaciones génicas y el rearreglo de los cromosomas son las principales alteraciones genéticas que se han reportado en el cáncer (Torti, D.;Trusolino, L. 2011). Estas distintas alteraciones se han descrito que suceden en dos grupos de genes conocidos como proto-oncogenes y los genes supresores de tumor. Los proto-oncogenes codifican proteínas que participan en la proliferación e inhibición de la muerte celular (Croce, C. 2008). La acumulación de mutaciones en los proto-oncogenes, por ganancia de función, favorece su activación y por lo tanto la transformación de la célula. Las proteínas codificadas por los proto-oncogenes han sido clasificadas en: factores de transcripción, remodeladores de la cromatina, factores de crecimiento, proteínas transductoras de señales y reguladores de la apoptosis (Croce, C. 2008).

Por otro lado, los genes supresores de tumor actúan en distintos procesos al regular las vías que conllevan a la proliferación celular, a favorecer la reparación del daño en el DNA, al inhibir la migración de las células y a la activación de los programas de muerte celular en situaciones de daño irreversible (Macleod, K. 2000). Se ha estudiado que las mutaciones en los genes supresores de tumor conducen a la pérdida de función de los productos que codifican. De acuerdo a la hipótesis del “doble hit” propuesta por Alfred Knudson en 1971, la pérdida o mutación de ambas copias de genes supresores de tumores

en las células favorece el desarrollo del cáncer (Macleod, K. 2000). Estas mutaciones pueden estar presentes en un alelo en las células de línea germinal, lo cual predispone a desarrollar el cáncer en etapas más avanzadas cuando el otro alelo se altera por mutaciones somáticas. A este fenómeno se le conoce como pérdida de la heterocigocidad (Macleod, K. 2000).

Recientemente se ha propuesto que además de las mutaciones en proto-oncogenes y genes supresores de tumor, existen otro tipo de alteraciones heredables que llevan al desarrollo del cáncer. Tales alteraciones son las modificaciones epigenéticas en la célula (You, J.; Jones, P. 2012). Alteraciones en el patrón de metilación de promotores, modificaciones post-traduccionales de las histonas y sus variantes, alteración de los complejos remodeladores de la cromatina y variaciones en la expresión de RNA no codificantes se han asociado al cáncer (You, J.; Jones, P. 2012).

La transformación de una célula normal a una célula tumoral, debida a alteraciones en el material genético, se le conoce como carcinogénesis y es un proceso que se lleva a cabo en tres etapas que son la iniciación, la promoción y la progresión del tumor (Barrett, J. 1993). En la iniciación, la célula normal adquiere mutaciones, en proto-oncogenes y genes supresores de tumor, que favorecen su proliferación y sobrevivencia. Durante la etapa de promoción, las células transformadas se expanden clonalmente hasta formar una lesión benigna visible. Finalmente, en la progresión, las células tumorales continúan adquiriendo más mutaciones que las transforman a un fenotipo maligno (Barrett, J. 1993).

En el año 2000, Hanahan y Weinberg enumeraron las características fisiológicas que son propias de las células tumorales. A estas características les llamaron "Hallmarks of cancer" y son: la autosuficiencia en señales de proliferación, la insensibilidad a las señales antiproliferativas, la evasión de la muerte celular, la inmortalidad replicativa, la producción de nuevos vasos sanguíneos y la invasión a otros tejidos (Hanahan, D.; Weinberg, R. 2000). En una revisión actualizada de su trabajo, propusieron dos nuevas características más que son la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la respuesta inmune antitumoral (Hanahan, D.; Weinberg, R. 2011).

## **CÁNCER DE PULMÓN**

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial. En los próximos años se considera que el número de casos nuevos se incrementará debido al crecimiento y envejecimiento de la población a nivel mundial. Los factores de riesgo asociados al desarrollo de esta enfermedad son el hábito tabáquico, la alimentación desbalanceada y el estilo de vida sedentario.

A nivel mundial, el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en hombres y la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres. El mayor porcentaje de nuevos casos y la mortalidad se ha reportado en las regiones centrales y este de Europa así como en la región del este de Asia. Se ha asociado al hábito tabáquico, la contaminación del ambiente y el riesgo ocupacional como factores que incrementan el riesgo de desarrollar el cáncer pulmonar (Torre, L.; Siegel, R.; *et al.* 2016).

La mayoría de los casos de cáncer de pulmón se relacionan con el hábito tabáquico. Se estima que alrededor del 85 % al 90 % de los casos de cáncer de pulmón se deben al hábito tabáquico (Ettinger, D.; Akerley, W.; *et al.* 2012). En personas fumadoras el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón se encuentra incrementado entre 10 y 20 veces más comparado con no fumadores (Mollberg, N.; Surati, M.; *et al.* 2011). En fumadores el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón depende de factores como la edad, el número de cigarros consumidos al día, la duración del hábito y la edad de iniciación.

La contaminación del medio ambiente es otro factor de riesgo que se ha asociado al desarrollo del cáncer de pulmón. La presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos y de partículas menores a 10  $\mu\text{M}$  en el aire incrementan el riesgo de desarrollar la enfermedad (Molina, J.; Yang, P.; *et al.* 2008, Gridelli, C.; Rossi, A.; *et al.* 2015). En algunos países del continente Europeo se estima que alrededor del 11 % de los casos diagnosticados de cáncer de pulmón se encuentran asociados a la contaminación del medio ambiente (Molina, J.; Yang, P.; *et al.* 2008).

El riesgo de desarrollar cáncer de pulmón también se ha asociado con la exposición a minerales como los asbestos y a sustancias radiactivas como el radón. Estas dos sustancias cuando se inhalan son depositadas en los pulmones, causando daño al DNA (Mollberg, N.; Surati, M.; *et al.* 2011).

También la predisposición genética como mutaciones de línea germinal en el gen *TP53* se ha asociado con la aparición de la enfermedad en edades tempranas en sujetos no fumadores. Mutaciones en otros genes como *EGFR* y *HER2* han sido encontradas en casos de cáncer de pulmón hereditario (Molina, J.; Yang, P.; *et al.* 2008, Gridelli, C.; Rossi, A.; *et al.* 2015).

En México, el cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres y hombres, afectando a personas de la séptima década de vida (Ruiz-Godoy.; Rizo Rios.; *et al.* 2007). La incidencia es mayor en los hombres que en las mujeres. Al igual que en el resto del mundo, en México el tabaquismo se asocia con el riesgo de desarrollar la enfermedad. Además el riesgo ocupacional y la contaminación del medio ambiente juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer de pulmón en la población mexicana (Ruiz-Godoy.; Rizo Rios.; *et al.* 2007).

La sobrevida total del cáncer de pulmón se encuentra muy disminuida debido al diagnóstico tardío de la enfermedad y a la escasa accesibilidad a los tratamientos. En países desarrollados, la sobrevida a 5 años es del 17 – 18 %; mientras que en países menos desarrollados llega a ser del 7 % (Torre, L.; Siegel, R.; *et al.* 2016).

### **Clasificación histológica del cáncer pulmonar**

De acuerdo a sus características histopatológicas, el cáncer de pulmón se clasifica en dos grupos: el carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés) y el carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC por sus siglas en inglés) (Gridelli, C.; Rossi, A.; *et al.* 2015). El NSCLC representa el 85 % de los casos diagnosticados del cáncer de pulmón, mientras que el SCLC representa el 15 % restante. A su vez el NSCLC se divide en tres histotipos que son: el carcinoma de células escamosas o epidermoide, el

carcinoma de células grandes y el adenocarcinoma. El adenocarcinoma es el histotipo más frecuente con una incidencia del 90 % de los casos diagnosticados como células no escamosas (Gridelli, C.; Rossi, A.; *et al.* 2015). Los adenocarcinomas se desarrollan a partir de células progenitoras de los bronquiolos y de células progenitoras de alveolos (neumocitos tipo II) (Minna, J.; Roth, J.;*et al.* 2002). En los últimos 30 años, el adenocarcinoma se ha vuelto el histotipo más frecuente. Lo anterior se ha asociado al uso de filtros en los cigarrillos, los cuales favorecen una inhalación de sustancias y partículas de menor tamaño a las zonas más profundas del pulmón en donde se localizan los bronquios y los alveolos, sitio donde se desarrolla el adenocarcinoma (Gridelli, C.; Rossi, A.; *et al.* 2015).

Actualmente, la OMS ha propuesto una nueva clasificación de los adenocarcinomas pulmonares, basándose no sólo en las características histológicas. En esta nueva clasificación se propuso la creación de 5 sub-histotipos del adenocarcinoma pulmonar que son: el lepidico, el acinar, el papilar, el micropapilar y el sólido (Gridelli, C.; Rossi, A.; *et al.* 2015).

## **TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN**

El tratamiento para el cáncer de pulmón depende de tomar en cuenta parámetros como la condición clínica del paciente, el estadio de la enfermedad, el tipo histológico y el perfil molecular (Gridelli, C.; Rossi, A.; *et al.* 2015). Las principales terapias para el cáncer de pulmón son:

La cirugía del tumor constituye una de las estrategias más exitosas en pacientes diagnosticados en etapas tempranas del cáncer. Con el avance de las técnicas quirúrgicas, las resecciones del tumor se han convertido en menos invasivas, reduciendo el tiempo de hospitalización. La resección de los nódulos linfáticos mediastinales durante las lobectomías representa gran parte del éxito de la cirugía. Sin embargo, existen ciertas limitaciones de la resección quirúrgica del tumor como el estadio clínico del paciente (problemas cardiacos o pulmonares), la edad y el estadio del tumor (Gridelli, C.; Rossi, A.;

*et al.* 2015). Desafortunadamente los pacientes con cáncer de pulmón son diagnosticados en etapas muy avanzadas de la enfermedad, en donde el tumor ha hecho metástasis.

La radiación ionizante constituye una de las principales alternativas para tratar los tumores pulmonares. Generalmente se aplica a pacientes que se encuentran en etapa avanzada de la enfermedad. La radiación ionizante tiene como objetivo matar a las células tumorales o inhibir su proliferación, controlando su crecimiento.

Alrededor del 70 % de los pacientes con cáncer de pulmón son diagnosticados en etapas avanzadas de la enfermedad. En estos pacientes la quimioterapia se encuentra indicada como terapia paliativa. El tratamiento con agentes quimioterapéuticos depende del tipo histológico y del perfil de mutaciones en ciertos genes. La mayoría de los tratamientos quimioterapéuticos ejercen su efecto al inducir la muerte de las células tumorales. Sin embargo, existen agentes quimioterapéuticos que inhiben el crecimiento de las células o que inhiben el proceso de angiogénesis (Molina, J.; Yang, P.; *et al.* 2008).

Los agentes citotóxicos que se usan en el tratamiento del cáncer se clasifican en (Zitvogel, L.; Apetoh, L.; *et al.* 2008):

- **Antimetabolitos.** Son moléculas análogas a los ácidos nucleicos que inhiben la síntesis de DNA y de RNA. La gemcitabina, el 5-fluorouracilo y el metotrexato son fármacos que pertenecen a esta categoría.
- **Agentes alquilantes.** Estos fármacos ejercen su efecto al unirse de manera covalente al DNA, inhibiendo su síntesis y promoviendo la muerte de la célula. Dentro de esta categoría se encuentra la ciclofosfamida y el melfalano.
- **Antraciclinas.** Este tipo de compuestos ejercen su efecto mediante dos mecanismos. Las antraciclinas se intercalan entre los pares de bases del DNA inhibiendo la síntesis. Por otro lado, las antraciclinas reaccionan con el hierro intracelular generando especies reactivas de oxígeno que causan daño a moléculas intracelulares. Ejemplos de estos fármacos son la doxorubicina y la idarubicina.
- **Inhibidores de la polimerización de los microtúbulos.** Los fármacos que pertenecen a esta categoría inhiben la polimerización de los microtúbulos presente

en el huso mitótico lo que detiene el proceso de división celular. Dentro de este grupo de compuestos se encuentran los taxanos como el taxol, el paclitaxel y el docetaxel.

- **Compuestos platinados.** Esta clase de compuestos se unen de manera covalente al DNA, formando entrecruzamientos dentro de una cadena o entre ambas cadenas del DNA. De esta manera inhiben la replicación del DNA y favorecen el proceso de muerte celular. En esta categoría se encuentran el oxaliplatino y el cis-diaminodicloro platino (CDDP o cisplatino).

El CDDP fue sintetizado en el año 1965 e inicialmente fue utilizado como inhibidor del crecimiento de bacterias. Años después, se encontró que el CDDP también inhibía el crecimiento de células tumorales. Hasta la fecha, el CDDP se encuentra indicado como el tratamiento de elección del cáncer de pulmón. El mecanismo de acción de este compuesto es formar enlaces covalentes con las bases nitrogenadas del DNA. Específicamente, forma enlaces covalentes con el nitrógeno de la posición 7 de las bases adenina y guanina. La formación de estos enlaces covalentes intracatenarios e intercatenarios se conoce como aductos. Los aductos inducen la activación de vías de reparación del DNA como la vía de bases mal apareadas (MMR por sus siglas en inglés) la cual transmite señales a las vías de p53 y p73, culminando con la inducción de la muerte celular (Tanida, S.; Mizoshita, T.; *et al.* 2012).

Cuando se induce daño en el DNA por cisplatino, la activación transcripcional y post-traducciona l de p53 depende de la vía de la proteína mutada de la ataxia telangiectasia (ATM) y de la proteína relacionada a ATM-Rad53 (ATR). Por otro lado, la activación de p73 depende de la vía de MMR y de la proteína oncogénica c-Abl. Cuando p53 y p73 se acumulan en el núcleo de la célula, inducen la transcripción de proteínas pro-apoptóticas que desencadenan el proceso de muerte celular (Tanida, S.; Mizoshita, T.; *et al.* 2012). Además de inducir el proceso de muerte celular, el cisplatino arresta a las células en la fase de síntesis del ciclo celular, inhibiendo a las ciclinas A y B.

Aunque el tratamiento con CDDP incrementa la recuperación del paciente en etapas iniciales del tratamiento, eventualmente en el tumor se van seleccionando las clonas de

células resistentes. No obstante, se sabe que los tumores de algunos pacientes presentan resistencia inicial al tratamiento con CDDP. Hasta la fecha los principales mecanismos de resistencia al fármaco son (Tanida, S.; Mizoshita, T.; *et al.* 2012):

- Disminución de la acumulación intracelular del compuesto. Este mecanismo de resistencia se debe a la disminución en la expresión de los transportadores encargados de introducir el fármaco a la célula, como el transportador CTR1. Así como al incremento en la expresión de transportadores que aumentan el flujo de salida del fármaco, como las proteínas asociadas a la resistencia de fármacos (MRP).
- Incremento de las moléculas inactivadoras. El incremento de la concentración de antioxidantes endógenos como el glutatión inactivan al CDDP.
- Activación de las vías de reparación de daño a DNA. El incremento en la activación de la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER) disminuye el número de aductos que el CDDP forma con el DNA.
- Otros mecanismos de resistencia. El incremento en la señalización de la vía de HER2 inhibe la transmisión de señales pro-apoptóticas que se generan cuando el CDDP induce daño al DNA.

Estos mecanismos de resistencia al CDDP han obligado a la búsqueda y desarrollo de otros blancos moleculares y de fármacos para tratar el cáncer de pulmón.

### **RECEPTOR PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO**

En la actualidad, la clasificación molecular del cáncer de pulmón ha identificado un grupo de genes que se encuentran alterados en los tumores. Estos genes en su mayoría codifican para factores de transcripción, proteínas de citoplasma, complejos remodeladores de la cromatina y receptores de membrana (Cancer Genome Atlas Research Network. 2014). De este último grupo es frecuente encontrar mutaciones en genes codificantes para receptores con actividad de cinasa para residuos de tirosina (RTKs por sus siglas en inglés) y que participan en vías de señalización. Por ejemplo, el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR por sus siglas en inglés).

El gen del *EGFR* se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 7 (7p11.2). Codifica para un péptido de aproximadamente 170 kDa el cual se inserta en la membrana plasmática después de su biogénesis. El EGFR se encuentra expresado en células epiteliales, mesenquimales, en tejido cardíaco y en células neuronales (da Cunha Santos, G.; Shepherd, F.; *et al.* 2011, Roskoski, R. 2014). El EGFR pertenece a una familia de receptores que se encuentra conformada por cuatro miembros que son EGFR/HER1/ERBB1, HER2/ERBB2, HER3/ERBB3 y HER4/ERBB4.

Los ligandos encontrados y estudiados para estos receptores se dividen en cuatro familias. La primera de ellas interactúa con el EGFR y se conforma por el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  y la anfiregulina. En el segundo grupo se encuentran la betacelulina y la epiregulina, estos ligandos se unen a EGFR y a HER4. El tercer grupo consiste en la neuregulina 1 y la neuregulina 2 los cuales se unen a HER3 y HER4. Finalmente, el cuarto grupo de ligandos se encuentra conformado por neuregulina 3 y neuregulina 4 cuyo receptor es HER4 (Roskoski, R. 2014). Hasta el momento no se han identificado ligandos para el receptor HER2.

La familia de receptores de EGFR se encuentra estructurada por cinco regiones: en el extremo amino terminal está la región extracelular; una región transmembranal con una longitud de 19-25 residuos de aminoácidos; un segmento contiguo a la región transmembranal; un dominio intracelular con actividad de cinasa para residuos de tirosina y una cola en la región carboxilo terminal rica en residuos de tirosina (Roskoski, R. 2014).

En la región extracelular, conformada por cuatro dominios, los dominios 1 y 3 participan en la unión con el ligando, mientras los dominios 2 y 4 participan en la homo- o heterodimerización con miembros de la familia HER. La unión del ligando con el receptor induce cambios conformacionales en la región extracelular que exponen un segmento de residuos de aminoácidos del dominio 2, los cuales participan en la dimerización (Roskoski, R. 2014). Finalmente, la dimerización de los receptores induce la activación de la cinasa para residuos de tirosina.

El dominio de cinasa para residuos de tirosina, ubicado en la región intracelular, se

conforma de dos lóbulos: un lóbulo pequeño próximo a la región N-terminal y un lóbulo grande ubicado en la región C-terminal. Estos dos lóbulos forman un surco que funciona como sitio de unión para el ATP. Además, en el lóbulo pequeño se encuentra un residuo de lisina en la posición 645 el cuál interactúa, mediante fuerzas electroestáticas, con el residuo de glutamato en la posición 762. Esta interacción favorece la conformación activa de la cinasa (Roskoski, R. 2014).

La activación de la cinasa en los receptores de la familia HER difiere del resto de las cinasas de otras familias de receptores. La activación de la cinasa de otras familias de receptores procede con la fosforilación de uno o más residuos de aminoácidos ubicados en la región catalítica. Sin embargo, en la familia de receptores HER esta fosforilación no es necesaria (Roskoski, R. 2014). Zhang y colaboradores fueron los primeros en demostrar que la activación de la cinasa de los receptores HER es a través de un mecanismo de activación alostérico (Zhang, X.; Gureasko, W.; *et al.* 2006). En su modelo proponen que la activación procede con la formación de un dímero asimétrico entre los dominios de cinasas de los receptores activados por ligando. Este dímero asimétrico se asemeja estructuralmente al complejo que se forma entre las cinasas dependientes de ciclinas (CDK por sus siglas en inglés) y las ciclinas (Zhang, X.; Gureasko, W.; *et al.* 2006). En esta estructura asimétrica, uno de los dominios de cinasa se encarga de inducir cambios conformacionales que activan al otro dominio de cinasa. Estos cambios conformacionales inducen la apertura del sitio de la enzima al promover la formación del puente salino entre los residuos de lisina y glutamato. Cuando la cinasa de uno de los receptores se activa, cataliza la transferencia de un grupo fosforilo proveniente del trifosfato de adenosina (ATP) a residuos de tirosina ubicados en el extremo carboxilo terminal del otro receptor. Estos residuos de tirosina fosforilados actúan como sitios de unión para proteínas adaptadoras y enzimas que participan en cascadas de transducción de señales (Roskoski, R. 2014).

La activación de los receptores de la familia HER favorece la transducción de señales proliferativas y de supervivencia a través de distintas cascadas de señalización.

La vía de las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés)

es una de las rutas de crecimiento y proliferación que se encuentran reguladas por receptores de la familia HER. Cuando EGFR se fosforila, las proteínas adaptadoras Grb2 y Sos reclutan a Ras en su forma inactiva (Ras-GDP). Cambios conformacionales en Sos activan a Ras (Ras-GTP) el cual activa a Raf. Raf fosforila a miembros de la familia de MAPK como las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK 1 y 2). Estas cinasas se relocalizan al núcleo de la célula en donde activan factores de transcripción involucrados en la proliferación celular (Scaltriti, M.; Baselga, J. 2006).

Otra vía regulada por los miembros de la familia HER es la vía PI3K/Akt. La fosforilación de HER3 recluta a la cinasa para el fosfatidilinositol 3 (PI3K) que está conformada por dos subunidades: la subunidad regulatoria conocida como p85 y la subunidad catalítica o p110. La subunidad p85 es la encargada de unirse a los residuos de tirosina fosforilados en HER3. La subunidad p110 cataliza la fosforilación del fosfatidilinositol 4, 5-difosfato, generando el fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato molécula responsable de la activación de Akt la cual regula vías como la síntesis de proteínas, la apoptosis, el ciclo celular y la sobrevivencia (Scaltriti, M.; Baselga, J. 2006).

La vía de la fosfolipasa C $\gamma$  también se encuentra regulada por los receptores HER. La activación de la fosfolipasa C $\gamma$  incrementa los niveles intracelulares de ión calcio y regula la activación de la proteína cinasa C (PKC). Esta última activa a miembros de la vía de MAPK (Scaltriti, M.; Baselga, J. 2006).

### **Mutaciones en el gen de EGFR**

Las mutaciones se han encontrado frecuentemente en el adenocarcinoma pulmonar desarrollado en personas de origen asiático, no fumadores y del género femenino (Gower, A.; Wang, Y.; *et al.* 2014). Se ha reportado que las mutaciones en el gen de EGFR en tumores de pacientes con NSCLC se presentan en el 15 % de la población caucásica, en 33 % de la población latinoamericana y hasta el 60 % de la población asiática (Arrieta, O.; Cardona, A.; *et al.* 2011, Massarelli, E.; Johnson, F.; *et al.* 2013). De las mutaciones, las más comunes son las deleciones del exón 19 y las mutaciones puntuales en el exón 21. Ambas constituyen el 90 % de todas las mutaciones estudiadas en *EGFR* (Takeuchi, S.; Yano, S. 2014). Estas mutaciones se localizan en los exones que codifican para el dominio con

actividad de cinasa. En el exón 19, las mutaciones con mayor frecuencia son las deleciones de 3 a 8 residuos de aminoácidos, lo que genera un cambio de conformación en la hélice reguladora del sitio activo, la cual adopta una conformación activa que expone el sitio activo de la enzima (Massarelli, E.; Johnson, F.; *et al.* 2013). Por otra parte, las mutaciones del exón 21 inducen cambios del residuo de leucina por un residuo de arginina (L858R). Esta alteración en los residuos de aminoácidos afecta el equilibrio entre la forma activa y la forma inactiva de la cinasa, favoreciendo la forma activa (Massarelli, E.; Johnson, F.; *et al.* 2013).

Teniendo el conocimiento de que en el cáncer el EGFR se encuentra sobreexpresado, este receptor fue propuesto como un blanco terapéutico para tratar la enfermedad. Durante la década de los 90 se comenzó con el desarrollo de terapias a base de moléculas inhibitoras de la cinasa del receptor. Las moléculas derivadas de la 4 anilino-quinazolina, como el Erlotinib, demostraron ser potentes inhibidores reversibles de la cinasa del EGFR. Estos inhibidores compiten con el ATP por unirse al sitio activo de la enzima, de manera que bloquean la transducción de señales río abajo. Uno de los mecanismos de acción propuestos para el Erlotinib explica que al bloquear la transducción de señales se impide la activación de las vías de MAPK y PI3K/Akt, inhibiendo las señales que llevan a la proliferación y sobrevivencia celular. El Erlotinib al impedir la activación de Akt bloquea la fosforilación de proteínas que participan favoreciendo la apoptosis como BIM. Al no fosforilarse BIM, se imposibilita su degradación en el proteasoma y se activa la apoptosis (Gong, Y.; Somwar, R.; *et al.* 2007). Además de activar la apoptosis a través de esta vía, el Erlotinib causa un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la activación de la enzima NADPH oxidasa en la mitocondria. Lo anterior se debe a que el Erlotinib produce un incremento en la transcripción de la subunidad catalítica de la enzima, de manera que incrementa su actividad. La acumulación de estas ROS causa la activación de la cinasa JNK, la cual al ser translocada de citoplasma a mitocondria transducen señales que incrementan la permeabilidad de este organelo, causando la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Qian, X.; Li, J.; *et al.* 2009)

Después de ser aprobados los TKIs para su uso en el tratamiento del cáncer por la FDA, se

reportó que estos inhibidores tienen una mayor afinidad a la cinasa del receptor cuando están presentes las mutaciones de activación previamente descritas. Por lo tanto, los pacientes con cáncer y en particular cáncer pulmonar cuyos tumores cuenten con las mutaciones en *EGFR* son más sensibles al tratamiento con los TKIs (Massarelli, E.; Johnson, F.; *et al.* 2013). Se ha demostrado en estudios clínicos de fase III que los pacientes con adenocarcinoma pulmonar cuyos tumores presentan las mutaciones en *EGFR*, responden mejor al tratamiento con erlotinib o gefitinib en comparación al tratamiento a base de compuestos platinados. El tratamiento con los TKI incrementa la sobrevida libre de progresión en los pacientes, es decir durante el tiempo del tratamiento, la masa o el tamaño de los tumores se reduce o se mantiene constante. Los estudios clínicos de fase III IPASS y EURTAC concluyeron que como primera línea de tratamiento de los tumores pulmonares tipo adenocarcinoma, el gefitinib y el erlotinib incrementan la sobrevida libre de progresión y mejoran la calidad de vida de los pacientes (Pallis, A.; Syrigos, K. 2013).

A pesar de que el tratamiento con los TKI se asocia con una mejor sobrevida libre de progresión en pacientes con adenocarcinoma pulmonar y mutaciones en *EGFR*, se ha observado que los tumores se vuelven resistentes al tratamiento. Los principales mecanismos de resistencia a los TKI que se han estudiado son los siguientes:

- Mutaciones secundarias. La aparición de la mutación T790M en el gen *EGFR* incrementa la afinidad del ATP hasta 10 veces por el sitio activo de la cinasa, de manera que el ATP compite con los TKI.
- Amplificación de MET. La amplificación del gen que codifica para el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-MET) induce resistencia al tratamiento con TKI. La proteína MET activa la señalización de la vía PI3K/AKT sobrepasando la inhibición de EGFR y favoreciendo la transducción de señales de proliferación y sobrevida.
- Activación de otras vías de transducción de señales. La activación de las vías de MAPK y JAK/STAT se han descrito como mecanismos de resistencia a los TKI. La activación de estas vías se debe a mutaciones en los genes que codifican para

KRAS, BRAF o receptores como el receptor para factor de crecimiento relacionado a insulina (IGFR).

## **MUERTE CELULAR**

Dentro de las características que poseen las células tumorales descritas por Hanahan se encuentra la evasión de la muerte celular (Hanahan, D.; Weinberg, R. 2000). La muerte celular juega un papel importante en procesos como el desarrollo embrionario, el recambio celular de los tejidos, en la regulación de la respuesta inmune, entre otros. En ciertas patologías, la muerte celular puede encontrarse incrementada, lo cual lleva a un daño excesivo del tejido, o bien puede encontrarse disminuida como en el cáncer.

Durante el proceso de muerte celular las características morfológicas de las células permite clasificar a este proceso en tres tipos: Tipo I o apoptosis, tipo II o muerte celular autofágica y tipo III o necrosis (Sun, Y.; Peng, Z. 2009). Recientemente, se ha propuesto que para el estudio y la clasificación de la muerte celular se incluyan las características de eventos bioquímicos y moleculares que participan durante el proceso. A continuación, se describen las características morfológicas y moleculares de los tres tipos de muerte celular:

### **Apoptosis**

La apoptosis es el tipo de muerte celular que se activa por la falta de factores de crecimiento o de sobrevivencia así como por la presencia de estrés intracelular. La apoptosis fue descrita por primera vez a principio de la década de los años setenta por Kerr y colaboradores (Kerr. 1972). Ellos describieron las características morfológicas de las células apoptóticas observando condensación del citoplasma, de la cromatina y la formación de protuberancias de la membrana celular las cuales en etapas avanzadas del proceso dan origen a la formación de pequeños segmentos que mantienen la integridad de la membrana celular llamados cuerpos apoptóticos. Estos fragmentos son fagocitados por células vecinas o células fagocíticas profesionales (Sun, Y.; Peng, Z. 2009). En los años 90, Horvitz y colaboradores demostraron que la apoptosis se encuentra regulada a nivel

genético en células de *C. elegans* por un grupo de genes denominados *CED*. Años más tarde se encontraron los homólogos de los genes *CED* en humano y en ratón. Estos genes codifican un grupo de enzimas con actividad de proteasas encargadas de llevar a cabo la apoptosis. Estas enzimas conocidas como caspasas (Li, J.; Yuan, J. 2008) hidrolizan sustratos en residuos de aspartato. Las caspasas se clasifican en caspasas iniciadoras (caspasa 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 y 12) y en caspasas efectoras (caspasa 3, 6 y 7). Durante el desarrollo embrionario, la apoptosis contribuye a la formación de tejidos y órganos. En adultos participa en el mantenimiento de la homeostasis del organismo en los sistemas inmunológico, digestivo, endocrinológico y nervioso (Ashkenazi, A.; Salvesen, G. 2014). Existen diferentes tipos de estímulos que inducen la muerte por apoptosis en las células y dependiendo del estímulo se activan dos vías conocidas como vía extrínseca y vía intrínseca (Sun, Y.; Peng, Z. 2009).

La vía extrínseca de la apoptosis inicia por la interacción de señales extracelulares con receptores de membrana. Las señales extracelulares son ligandos de Fas (FasL o CD95), el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) y el ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL). Estos ligandos se unen al receptor para FasL, el receptor 1 para  $TNF\alpha$  (TNFR1) y el receptor para TRAIL (TRAILR), respectivamente. Estos receptores comparten en su región citoplásmica una porción de 80 residuos de aminoácidos conocida como dominio de muerte. Cuando los receptores interactúan con su ligando, se estabiliza la heterotrimerización de los mismos y se inducen cambios conformacionales que facilitan la unión de un complejo multiproteico conocido como el complejo de señalización inductor de muerte (DISC) en los dominios de muerte. Con respecto al receptor para FasL, el DISC está conformado por la proteína asociada a Fas con dominios de muerte (FADD), c-FLIP, la proteína cinasa-1 asociada a receptores (RIP1) y las pro-caspasas 8 y 10. Por otro lado, cuando los receptores TNFR1 y TRAIL se activan, requieren previo a la formación del DISC, la unión de una proteína adaptadora llamada dominio de muerte asociado a TNFR (TRADD) (Galluzzi, L.; Vitale, I.; *et al.* 2012).

Después de la formación del DISC, la pro-caspasa 8 se activa convirtiéndose en caspasa 8, la cual tiene la actividad de hidrolizar secuencialmente a un conjunto de pro-caspasas y

finalmente a la pro-caspasa 3 convirtiéndola en caspasa 3 activa. La caspasa 3 tiene distintos blancos moleculares como proteínas remodeladoras del citoesqueleto, proteínas asociadas a la envoltura nuclear, factores de transcripción y endonucleasas. El procesamiento de estos sustratos conduce a los cambios morfológicos de la apoptosis descritos por Kerr (Luthi, A.; Martin, S. 2007).

La vía intrínseca de la apoptosis se activa como resultado de estrés intracelular. Este estrés puede generarse por daño en el DNA, estrés oxidante, incremento en la concentración de calcio intracelular, acumulación de proteínas mal plegadas en retículo endoplásmico e inhibición de la producción de ATP (Galluzzi, L.; Vitale, I.; *et al.* 2012). La diversidad de señales de estrés que activan a la vía intrínseca convergen en la mitocondria. La formación de los poros en las membranas mitocondriales se regula por la expresión de moléculas pertenecientes a la familia de proteínas de linfoma de células B (Bcl-2). Las proteínas Bax y Bak se acumulan y oligomerizan en las membranas externa e interna de la mitocondria, formando poros e induciendo la alteración del potencial de membrana y la liberación de moléculas de la mitocondria al citosol. Estas moléculas son: el citocromo C, el factor inductor de apoptosis (AIF), la endonucleasa G, la proteína de unión directa a IAP con bajo punto isoeléctrico (DIABLO) y la proteína de requerimiento de alta temperatura (HTRA2) (Galluzzi, L.; Vitale, I.; *et al.* 2012). Cuando el citocromo C es liberado al citosol, se une al factor-1 de apoptosis activador de proteasa (Apaf-1) y al dATP para formar un complejo llamado apoptosoma. Este complejo activa a la pro-caspasa 9, la cual es la caspasa iniciadora de la vía intrínseca y activa a la pro-caspasa 3, ejecutándose así el proceso de apoptosis.

Las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis se relacionan a través de la proteína Bid. Como se mencionó previamente, en la vía extrínseca, la caspasa 8 hidroliza a la proteína Bid produciendo un fragmento conocido como Bid trunca (tBid). tBid al igual que Bax y Bak se inserta en la membrana externa e interna de la mitocondria induciendo la formación de poros, la liberación de las moléculas: citocromo C, AIF, endonucleasa G, DIABLO y HTRA2 activándose la vía intrínseca (Galluzzi, L.; Vitale, I.; *et al.* 2012).

Control de la apoptosis

La apoptosis es un proceso que se encuentra estrictamente regulado por distintos genes. En particular, la vía intrínseca se encuentra bajo el control de las proteínas pertenecientes a la familia de Bcl-2. Estas proteínas actúan como agonistas o antagonistas y de acuerdo a la cantidad de unas u otras la apoptosis se ve inhibida o favorecida. Las proteínas de la familia Bcl-2 se clasifican en proteínas antiapoptóticas (BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-W y A1) y proteínas proapoptóticas (Bax, Bad, Bim, Bid, Bok, Noxa y Puma) (Ashkenazi, A.; Salvesen, G. 2014). Estructuralmente, estas proteínas cuentan con secuencias conservadas conocidas dominios de homología de Bcl-2 (BH). Las proteínas antiapoptóticas secuestran a las proteínas proapoptóticas (Bax, Bad y Bok) a través de la interacción entre los dominios BH, antagonizando el efecto proapoptótico. Sin embargo, este antagonismo es superado por las proteínas proapoptóticas Bim, Noxa y Puma a través de dos mecanismos. En el primer mecanismo, las proteínas Bim, Noxa y Puma se unen a las proteínas antiapoptóticas a través de interacciones de los dominios BH, promoviendo la liberación de las proteínas Bax, Bak y Bad y la activación de la vía intrínseca. En el segundo mecanismo, Bim, Noxa y Puma interactúan con Bax y Bak induciéndoles cambios conformacionales que favorecen la oligomerización de estas últimas proteínas y la formación de poros en las membranas mitocondriales (Czabotar, P.; Lessene, G.; *et al.* 2014).

## Autofagia

La autofagia es un mecanismo de adaptación que se origina ante un estrés subletal como la falta de nutrientes o daño intracelular. El tratamiento con algunos agentes quimioterapéuticos induce muerte celular asociada a la autofagia. Morfológicamente se observa vacuolización masiva del citoplasma (Kroemer, G.; Marino, G.; *et al.* 2010, Galluzzi, L.; Vitale, I.; *et al.* 2012). Durante la autofagia los organelos, las proteínas y otros componentes celulares son secuestrados en vesículas formadas por dos membranas y que se denominan autofagosomas. Posteriormente, los autofagosomas se fusionan con lisosomas degradándose el contenido de los autofagolisosomas. Los metabolitos producidos son liberados al citosol para que sean utilizados en otras reacciones metabólicas (Jain, M.; Paczulla, A.; *et al.* 2013). La formación de los autofagosomas se lleva

a cabo en cuatro pasos que son la iniciación, la nucleación, la elongación y la terminación. La autofagia se regula por miembros de la familia de proteínas relacionadas a la autofagia (Atg) y por el complejo multiproteico el blanco mamífero de la rapamicina (mTOR). En condiciones normales de nutrientes, mTOR fosforila a las proteínas iniciadoras de la autofagia ULK1 y Atg13, inhibiendo la actividad catalítica de ULK. La falta de nutrientes inactiva a mTOR de manera que se disocia de ULK y Atg13. Estas proteínas al ser liberadas forman el complejo ULK/Atg13/FIP200 el cual fosforila a la proteína Ambra 1 y promueve la formación del complejo Beclina1/Vps34/Atg14 (Kroemer, G.; Marino, G.; *et al.* 2010). El complejo Beclina1/Vps34/Atg14 participa en la nucleación del autofagosoma debido a su actividad de cinasa de fosfatidil inositol difosfato, la cual produce fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) y el reclutamiento de otras proteínas.

Finalmente en la etapa de elongación y terminación, los sistemas de conjugación de proteínas Atg7/Atg10 y Atg7/Atg3 unen al complejo multiproteico Atg12-Atg5-LC3 II a la membrana del autofagosoma mediante la interacción con fosfatidiletanolamina (Kroemer, G.; Marino, G.; *et al.* 2010). En estas últimas etapas el autofagosoma se cierra y se une a través de proteínas de la familia SNARE a los lisosomas.

Algunos tratamientos farmacológicos en cultivos celulares inducen muerte celular asociada a la autofagia a través de la inhibición de mTOR (Huo, H.; Zhou, Z.; *et al.* 2014), en donde la represión/supresión genética o farmacológica de moléculas que participan en la autofagia confiere protección a las células. Sin embargo, se ha demostrado *in vitro* que la autofagia confiere resistencia a tratamientos y que la inhibición de la misma favorece la muerte celular (Li, Y.; Lam, S.; *et al.* 2013).

## Necrosis

La necrosis es un tipo de muerte celular causada por agentes físicos, químicos y biológicos que provocan daños irreversibles en la célula. Morfológicamente se asocia con incremento en el volumen de la célula, ruptura de la mitocondria, ruptura de la membrana celular y finalmente lisis celular. En este proceso se libera el contenido intracelular causando la activación de una respuesta inmune inflamatoria. A diferencia de la apoptosis, la necrosis fue considerada como un tipo de muerte celular no regulada y accidental. Sin embargo,

recientemente se descubrió que existe un tipo de necrosis que se encuentra regulada a nivel molecular y se le ha denominado necroptosis (Jain, M.; Paczulla, A.; *et al.* 2013). La necroptosis se activa cuando por daño alquilante al DNA, excitotoxinas o la unión de ligandos a receptores de muerte. Los receptores de muerte que se activan tras la unión de ligandos como TNF o TRAIL son los receptores RIP1 y RIP3. La activación de estos receptores favorece la formación de un complejo multiproteico que se ha denominado necrosoma, el cual se encuentra conformado por las enzimas RIPK1 y RIPK3 (Jain, M.; Paczulla, A.; *et al.* 2013). Estas enzimas activan a otras que incrementan el metabolismo de carbohidratos, de glutamina lo cual induce la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la muerte necrótica. Así mismo, el incremento en la cantidad de calcio intracelular provoca la necroptosis. La acumulación del calcio en el citosol induce la formación de poros en las membranas mitocondriales, provocando la ruptura de la mitocondria y la activación de un grupo de enzimas con actividad proteolítica llamadas calpaínas (Jain, M.; Paczulla, A.; *et al.* 2013). Las calpaínas degradan a las caspasas inactivándolas y a canales iónicos en la mitocondria favoreciendo la producción de ROS y la necrosis.

## ANTECEDENTES

### MUERTE CELULAR INMUNOGÉNICA

La muerte celular es un evento que puede o no inducir la activación de la respuesta inmune dependiendo de factores como el tipo de célula que muere, la manera en que ésta muere, las moléculas que libera o expone durante el evento de muerte y el tipo de células que captan dichas moléculas (Green, D.; Ferguson, T.; *et al.* 2009). Históricamente, la apoptosis se ha considerado como un tipo de muerte no inmunogénica debido a que no hay liberación de moléculas intracelulares durante el proceso apoptótico, sin inducir la activación de una respuesta inmunológica inflamatoria. Mientras tanto, la necrosis induce una respuesta inflamatoria debida a la liberación del contenido intracelular (Green, D.; Ferguson, T.; *et al.* 2009). En conclusión, para que la muerte celular active a la respuesta inmune es necesario que durante el proceso se liberen de moléculas intracelulares. A las moléculas liberadas se les conoce como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), estas moléculas no presentan actividad inmunológica dentro de la célula pero al ser liberadas o expuestas en la membrana se unen a receptores de reconocimiento de patrones (PRR) presentes en las células de la respuesta inmune causando su activación. Los DAMPS varían en su composición química ya que pueden ser proteínas, nucleótidos o ácidos nucleicos y de acuerdo a su localización se dividen en tres grupos (Garg, A.; Nowis, D.; *et al.* 2010): moléculas expuestas en la membrana plasmática como la carleticulina y las proteínas de choque térmico; moléculas liberadas en forma soluble al medio extracelular, por ejemplo el ácido úrico, algunas citocinas pro-inflamatorias y la proteína no histona de alta movilidad del grupo "box 1" (HMGB1) y moléculas que se producen como productos de degradación final, entre ellos se encuentran los ácidos nucleicos y el ATP. Estas moléculas actúan como señales que favorecen el reclutamiento de células de la respuesta inmune actuando como quimiocinas, la fagocitosis de las células muertas y la maduración y activación de células dendríticas (Garg, A.; Nowis, D.; *et al.* 2010).

En años recientes se ha estudiado, en células tumorales, que la inducción de la muerte celular apoptótica asociada a la activación de vías de señalización de daño que provocan la exposición y liberación de DAMPs durante el proceso de muerte, activa a la respuesta

inmune en contra de las células tumorales residuales (Garg, A.; Dudek-Peric.; *et al.* 2015). Este tipo de muerte celular se ha denominado como muerte celular inmunogénica (ICD). A diferencia de la muerte celular fisiológica por apoptosis que no está asociada a la liberación y exposición de DAMPS, la inducción de la ICD se ha demostrado en líneas celulares tumorales, tratadas con fármacos citotóxicos como el oxaliplatino, la doxorubicina, la mitoxantrona, la ciclofosfamida y el bortezomib. Estos compuestos, como parte de su mecanismo de acción principal, inducen estrés dentro de la célula lo cual conduce a la liberación de los DAMPS. Recientemente se ha demostrado que el CDDP o en combinación con piridoxina induce muerte inmunogénica en células de cáncer de pulmón de ratón (Aranda, F.; Bloy, N.; *et al.* 2015). Previamente se había considerado al CDDP como un mal inductor de ICD en otras líneas celulares. El primer trabajo que demostró la existencia de la ICD fue realizado por Casares y colaboradores. La inoculación en ratones inmunocompetentes de células de cáncer de colon murino tratadas con doxorubicina, protegía de la implantación posterior de las mismas células tumorales viables (Casares, N.; Pequignot, M.; *et al.* 2005). El efecto se pierde cuando se emplean ratones *nu/nu* inmunodeficientes, o con el bloqueo de células de la respuesta inmune como linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> o al eliminar por knock out a las moléculas liberadas durante la muerte inmunogénica (Obeid, M.; Tesniere, A.; *et al.* 2007, Tesniere, A.; Schlemmer, F.; *et al.* 2010). En estudios posteriores se demostró que los DAMPS liberados y expuestos por las células tumorales tratadas con los fármacos citotóxicos en la ICD eran los encargados de incrementar la inmunogenicidad de las células apoptóticas, ya que al reprimir la expresión de alguno de ellos se suprimía el efecto observado.

Con base en los estudios realizados por el grupo de Kroemer y otros grupos de trabajo, el Comité Internacional del Estudio de la Muerte Celular ha estipulado que la ICD requiere de la expresión espacio-temporal de al menos tres DAMPS conocidos como marcadores característicos de la ICD. Estos marcadores son la proteína calreticulina, el ATP y la proteína no histona de alta movilidad del grupo "box 1" (HMGB1) (Kepp, O.; Senovilla, L.; *et al.* 2014). En etapas iniciales del proceso de ICD, la calreticulina es relocalizada del retículo endoplásmico a la membrana celular, evento que precede a la exposición de la

fosfatidilserina en la parte externa de la membrana. Posteriormente, el ATP es secretado del citosol al espacio extracelular evento asociado con la formación de las protuberancias (blebbing) de la membrana. Finalmente, la HMGB1 es liberada del núcleo al espacio extracelular en una etapa conocida como necrosis secundaria (Garg, A.; Nowis, D.; *et al.* 2010). A continuación se describen las características de estos DAMP y el efecto que tienen sobre células de la respuesta inmune.

**Calreticulina.** Es una proteína soluble con una masa molecular de 46 kDa y ubicada principalmente en retículo endoplásmico. Esta proteína consiste de un dominio de lectina globular, un dominio rico en prolina y un dominio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ . Dentro del retículo endoplásmico, la calreticulina participa en la regulación de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , así como proteína chaperona en el plegamiento correcto de las moléculas de clase 1 del complejo mayor de histocompatibilidad y en la carga de péptidos en estas moléculas. En el núcleo, participa en el transporte de moléculas dentro y fuera del núcleo y en la transducción de señales (Garg, A.; Nowis, D.; *et al.* 2010).

Durante la inducción de la ICD, la calreticulina, en etapas tempranas, es relocalizada del retículo endoplásmico a la membrana celular. Esta relocalización requiere de la participación de tres módulos: módulo sensor de estrés en retículo endoplásmico, módulo apoptótico y módulo de translocación (Garg, A.; Nowis, D.; *et al.* 2010). El módulo sensor de estrés en retículo endoplásmico se activa en presencia de ROS en dicho organelo. La presencia de ROS activa a la proteína cinasa PERK que fosforila al factor de iniciación eucariótico de la traducción 2- $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) causando la transducción de señales que activan la vía de estrés de proteínas mal plegadas en retículo endoplásmico. La activación de la caspasa-8 se encuentra regulada por la activación de esta vía en retículo endoplásmico. La activación de la caspasa-8, que forma parte del módulo apoptótico, degrada proteínas dentro del retículo endoplásmico como a Bap31. La participación de Bap31 en la relocalización de la calreticulina durante la ICD se desconoce; sin embargo, el silenciamiento de esta proteína suprime la relocalización de la calreticulina en la membrana (Garg, A.; Nowis, D.; *et al.* 2010). Finalmente, la calreticulina es relocalizada de retículo endoplásmico a membrana mediante la activación del módulo de translocación.

Este proceso involucra el transporte anterógrado de calreticulina desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi y la fusión de vesículas conteniendo calreticulina a la membrana. La exposición de la calreticulina en la membrana favorece la fagocitosis de las células apoptóticas, estudios realizados han concluido que la calreticulina en membrana actúa como una señal de "cómeme". Cuando se expone en la membrana celular, la calreticulina se une a receptores expresados en células dendríticas como la proteína relacionada al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1 o CD91). La interacción entre la calreticulina y CD91 activa la vía de Rac-1 favoreciendo la fagocitosis de la célula apoptótica (Garg, A.; Nowis, D.; *et al.* 2010, Garg, A.; Dudek-Peric.; *et al.* 2015).

**ATP.** El ATP es un nucleótido que se produce durante la glucólisis, la oxidación fosforilativa y la oxidación de ácidos grasos. Tiene una masa molecular de 507 Da y estructuralmente se compone de un anillo heterocíclico de adenosina, una ribosa unida a la adenosina y tres grupos fosfato unidos al carbono 5' de la ribosa. Dentro de la célula participa en procesos bioenergéticos. En el medio extracelular, el ATP regula la sobrevivencia, la muerte, la proliferación, la diferenciación y la movilidad celular (Krysko, D.; Garg, A.; *et al.* 2012). El ATP es liberado al medio extracelular en células que se encuentran bajo una condición de estrés o en proceso de muerte. En líneas celulares de distintos tipos de tumores, se ha demostrado que el tratamiento con agentes quimioterapéuticos induce la liberación del ATP cuando las células están muriendo (Martins, I.; Tesniere, A.; *et al.* 2009). Durante la ICD, el ATP es liberado de la célula a través de diferentes mecanismos que dependen del proceso de apoptosis. En etapas previas a la externalización de la fosfatidilserina en la membrana, el ATP se libera mediante la activación de la enzima PERK y de la exocitosis dependiente de PI3K. Durante etapas tempranas de la apoptosis, el ATP se libera por un mecanismo que involucra la participación de las proteínas autofágicas ATG5, ATG7 y Beclina 1. Aunque no está claro el mecanismo por el cual estas proteínas favorecen la liberación de ATP, se ha demostrado que el silenciamiento de los genes que codifican dichas proteínas suprime la liberación del ATP. En etapas finales de la apoptosis, cuando la permeabilidad de la membrana celular está comprometida, el ATP es liberado de forma pasiva al medio extracelular (Krysko, D.; Garg, A.; *et al.* 2012). El ATP liberado durante la

ICD actúa como señal quimioatrayente y activadora de células dendríticas, dependiendo del tipo de receptores con los que interactúe. En células dendríticas, el ATP al interactuar con el receptor purinérgico P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> favorece la quimioatracción, mientras que la unión con el receptor P<sub>2</sub>X<sub>7</sub> induce la activación del inflamasoma. La activación de este complejo induce la secreción de IL-1β, la citocina esencial en la diferenciación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, con capacidad de secretar interferón gamma y de eliminar células tumorales (Krysko, D.; Garg, A.; *et al.* 2012).

**HMGB1.** La HMGB1 es una proteína no histona constituida por dos dominios homólogos de unión al DNA, conocidos como caja A y caja B, y una región carboxilo terminal abundante en residuos de aminoácidos cargados negativamente. En el núcleo, HMGB1 se une al DNA y a factores de transcripción de manera de participa en la replicación del DNA, el control de la transcripción, la recombinación genética y la reparación del DNA (Tang, D.; Kang, R.; *et al.* 2010). En el citoplasma, HMGB1 participa en el proceso de autofagia al interactuar con Beclina-1. Fuera de la célula actúa como un DAMP que induce una potente respuesta inflamatoria mediada por la producción de TNF-α, IL-1, IL-6 e IL-8 (Krysko, D.; Garg, A.; *et al.* 2012). Durante la ICD, la HMGB1 se libera en etapas avanzadas del proceso a través de dos mecanismos distintos. Previo a la alteración de la permeabilidad de la membrana, la HMGB1 es secretada mediante la activación de la autofagia. Por otra parte, en etapas avanzadas de la ICD, la HMGB1 es liberada de manera pasiva debido a la alteración de la permeabilidad de la membrana celular (Garg, A.; Nowis, D.; *et al.* 2010). La HMGB1 liberada se une a distintos receptores presentes en células de la respuesta inmune, entre ellos se encuentran los receptores TLR4, TLR2 y el receptor para productos de la glicosilación avanzada (RAGE) (Tang, D.; Kang, R.; *et al.* 2010). Estudios recientes han demostrado que los efectos inmunológicos inducidos por la HMGB1 dependen del estado redox de la proteína. Cuando se encuentra completamente reducida actúa como una molécula quimioatrayente; mientras que al encontrarse parcialmente reducida (en presencia de un puente disulfuro) ejerce una función pro-inflamatoria y en su forma completamente oxidada no presenta actividad alguna (Krysko, D.; Garg, A.; *et al.* 2012).

La participación de HMGB1 en el efecto antitumoral mediado por la ICD es trascendente, en estudios (*in vivo*) se ha demostrado que el silenciamiento de la expresión de esta proteína en las células tumorales favorece la implantación de los tumores en ratones inmunocompetentes.

Desde que fueron realizados los primeros trabajos relacionados con la ICD, han sido identificados una variedad de compuestos y tratamientos que la inducen en diversas líneas celulares. Entre ellos se encuentran agentes quimioterapéuticos como la ciclofosfamida, la mitoxantrona, el bortezomib, la doxorubicina y el oxaliplatino. Así mismo, tratamientos físicos como alta presión hidrostática, radiación UV y tratamiento fotodinámico a base de hipericina. En los tratamientos mencionados no se ha demostrado que exista una relación estructura función que ayude a predecir que otros tratamientos pudieran inducir la ICD. Sin embargo, ha sido propuesta una clasificación de los compuestos inductores de la ICD con base en su capacidad de inducir muerte celular asociada a estrés en retículo endoplásmico (Garg, A.; Dudek-Peric.; *et al.* 2015). De esta manera, los inductores de la ICD se clasifican en: inductores de tipo 1 e inductores de tipo 2. Los inductores de tipo 1 se caracterizan por no tener como blanco celular principal al retículo endoplásmico. Estos compuestos inducen estrés en retículo endoplásmico de manera colateral o secundaria. La mayoría de los compuestos inductores de la ICD pertenecen a esta categoría y entre ellos se encuentran compuestos cuyo blanco celular principal es el DNA, la maquinaria de reparación del DNA, algunas proteínas del citosol y de la membrana. Por mencionar algunos ejemplos, las antraciclinas, la ciclofosfamida, el bortezomib, el paclitaxel, algunos glicosidos y la shikonina. Por otra parte, los inductores de tipo 2 tienen como blanco celular principal el retículo endoplásmico. Entre ellos se encuentran la terapia fotodinámica a base de hipericina y algunos virus oncolíticos (Garg, S.; Dudek-Peric.; *et al.* 2015).

Como se ha mencionado previamente, con los avances en el estudio molecular del cáncer ha sido posible identificar a los genes que se encuentran alterados en el cáncer de pulmón. El gen que codifica para el receptor *EGFR* se ha identificado como uno de los frecuentemente mutados en los tumores tipo adenocarcinoma (Soria, J.; Mok, T.; *et al.*

2012). La proteína gana la función de señalar constitutivamente a través de vías que favorecen la proliferación y sobrevivencia. Por ello, se han desarrollado terapias a base de inhibidores de cinasas que van dirigidas en contra del receptor mutado. El Erlotinib es uno de los inhibidores que se han aprobado por la FDA para el tratamiento del NSCLC. Se sabe que este fármaco induce muerte por apoptosis y arresto celular en líneas celulares con mutaciones en *EGFR* (Huether, A.; Hopfner, M.; *et al.* 2005, Gong, Y.; Somwar, R.; *et al.* 2007). Sin embargo, se desconoce si el Erlotinib induce muerte por apoptosis asociada a la exposición/liberación de los marcadores de muerte inmunogénica.

Los reportes anteriores abren la posibilidad de estudiar si el cisplatino o el Erlotinib que inducen muerte por apoptosis está asociada con la liberación de los DAMPs de la muerte inmunogénica, en favor de la muerte inmunogénica y su potencial de activar la respuesta inmune antitumoral.

## JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial el cáncer pulmón es la principal causa de muerte por cáncer. En México, se encuentra dentro de los primeros lugares de incidencia y mortalidad en la población. Desafortunadamente, los pacientes con cáncer pulmonar son diagnosticados en etapas avanzadas de la enfermedad, imposibilitando la resección quirúrgica del tumor como alternativa terapéutica. En este caso, el tratamiento del cáncer de pulmón es a base de radioterapia y quimioterapia.

En años recientes se ha descrito que ciertos agentes quimioterapéuticos inducen un tipo de muerte celular que puede estimular a la respuesta inmune antitumoral sin la ayuda de adyuvantes. Se ha visto que este tipo de respuesta inmune elimina a las células tumorales residuales al tratamiento.

El cisplatino es el fármaco de elección que se administra a los pacientes con cáncer de pulmón tipo adenocarcinoma, el cuál es el histotipo más frecuente. Recientemente se ha sugerido que los tumores de pulmón, tipo adenocarcinoma, con mutaciones en *EGFR* sean tratados con inhibidores de cinasas para residuos de tirosina como el Erlotinib.

Estos dos fármacos, aunque difieren en su mecanismo de acción, inducen muerte celular por apoptosis. Por lo tanto, debido a su uso en la clínica es de vital importancia saber si estos fármacos inducen muerte inmunogénica en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar efecto que será evaluado a través de la detección de los marcadores establecidos y más estudiados que son: la calreticulina, el ATP y la proteína HMGB1.

## **HIPÓTESIS**

Si durante el proceso de muerte inducido por los compuestos citotóxicos, las líneas celulares de carcinoma de pulmón relocalizan CRT a la membrana celular y liberan ATP y HMGB1, entonces estos marcadores sugerirán que los compuestos inducen muerte inmunogénica.

## **OBJETIVOS**

### General

Estudiar si en las líneas celulares de cáncer de pulmón, el CDDP, el Erlotinib o su combinación inducen la expresión de marcadores asociados a la muerte inmunogénica.

### Particulares

- Estudiar si los tratamientos inducen en las líneas celulares la muerte por apoptosis.
- Cuantificar la producción basal de ATP por las líneas celulares y su alteración en presencia de los compuestos
- Conocer la distribución de la proteína HMGB1 en las líneas celulares no expuestas y expuestas a los compuestos.
- Cuantificar la liberación de HMGB1 en las líneas celulares a nivel basal y su alteración en presencia de los compuestos
- Detectar si los compuestos inducen la relocalización de calreticulina en la membrana de las células tumorales.

## METODOLOGÍA

### Líneas celulares

Las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar utilizadas fueron: la A549 (que lleva el alelo silvestre de *EGFR*), la HCC827 (con la delección E746-A750 en el exón 19 del *EGFR*) y la HCC4006 (con la delección L747-E749 en el exón 19 del *EGFR*). Estas dos últimas líneas celulares muestran sensibilidad al tratamiento con Erlotinib. Las líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas VA) y fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis MO) suplementadas con suero fetal bovino (SFB) (Hyclone, Issaquah WA) (10 % v/v) y antibióticos (medio completo). Los cultivos celulares fueron cultivados en un ambiente humidificado a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos a confluencia fueron tratados con una disolución de tripsina-verseno (InVitro, Ciudad de México, México) y tratamiento mecánico para facilitar su desprendimiento y mantener el cultivo celular.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 y 24 pozos así como en cajas de cultivo T25. Se determinó la cantidad de células necesarias para que al final del cultivo, el control conteniendo medio de cultivo, llegara a una confluencia cercana al 90%.

### Preparación de los compuestos

El Erlotinib HCl se obtuvo de Sequoin Research Products (UK) y se disolvió con dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, St. Louis MO) para tener un stock con concentración 7 mM. El CDDP se obtuvo de Sigma (St Louis, MO) y se disolvió con solución salina isotónica para tener un stock a concentración 2 mM.

### Obtención de curvas dosis respuesta y determinación de la CI<sub>50</sub> de Erlotinib y CDDP

Las células se cultivaron en placas de 96 pozos a una densidad de  $1.2 \times 10^4$  (A549) y  $2 \times 10^4$  (HCC827 y HCC4006) células por pozo durante 24 h para permitir su adhesión al plástico. El efecto del Erlotinib se evaluó en las líneas con mutaciones en *EGFR*. Para estudiar el efecto del Erlotinib, se retiró el sobrenadante de los cultivos y se adicionaron 200 µL de

diluciones seriadas desde 6.25 nM hasta 200 nM durante 24 y 48 h. Para estudiar el efecto del CDDP, se adicionaron 200  $\mu$ L de diluciones seriadas desde 5  $\mu$ M hasta 200  $\mu$ M por un periodo de 24 h. Como controles se emplearon células en presencia de medio de cultivo y con las concentraciones de DMSO correspondientes a las diluciones del Erlotinib. Al finalizar los tiempos de incubación se cuantificó la citotoxicidad inducida por el Erlotinib y el CDDP empleando el kit TACS MTT Cell proliferation assays (Trevigen, Gaithersburg MD). Se adicionaron 10  $\mu$ L del reactivo MTT a cada pozo y la placa se incubó por 4 h a 37°C y en la oscuridad. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se añadieron 150  $\mu$ L de DMSO a cada pozo; la placa se agitó durante 30 min a temperatura ambiente (T.A). Finalmente, la absorbancia del producto colorido fue medida a 560 nm de longitud de onda empleando el lector de placas Multiskan Ascent (Thermo, Waltman MA).

El porcentaje de viabilidad en cada pozo se calculó, considerando como la máxima proliferación celular los pozos que contenían medio de cultivo. Con los datos obtenidos de viabilidad se calculó el porcentaje de citotoxicidad causada por los fármacos citotóxicos. Con base a las curvas obtenidas, se obtuvo la  $CI_{50}$  del Erlotinib y del CDDP empleando el método de Linweaver-Burke.

### **Tratamiento de las líneas celulares con Erlotinib y CDDP**

Las líneas celulares HCC827 y HCC4006 fueron tratadas empleando distintas condiciones experimentales: i) Células tratadas con CDDP por 24 h, ii) Células tratadas con Erlotinib por 48 h, iii) Células tratadas con Erlotinib a la  $CI_{50}$  por 48 h, cambiando el compuesto cada 24 h, iiiii) Células tratadas con Erlotinib por 24 h y con CDDP las 24 h restantes. La concentración de CDDP empleada fue 60  $\mu$ M para la línea HCC827 y 70  $\mu$ M para la línea HCC4006. La línea celular A549 fue tratada con CDDP por 24 h a la  $CI_{50}$ .

### **Cambios morfológicos en las líneas celulares asociados a la apoptosis inducidos por Erlotinib y CDDP**

Con el fin de detectar si los tratamientos inducen cambios morfológicos asociados a la apoptosis y el tiempo en el cual se presentan estos cambios, las líneas celulares se

cultivaron en placas de 96 pozos o en chamber slides de 8 pozos. Las células se trataron con los compuestos como se mencionó previamente. Los cultivos en placas de 96 pozos se observaron a lo largo del tratamiento para detectar cambios morfológicos los cuales se documentaron empleando un microscopio de campo claro (Thermo Fisher, Waltham MA). La fragmentación de la cromatina en células en apoptosis y en cuerpos apoptóticos fue detectada en los cultivos provenientes de los chamber slide. Para lo cual, se retiró el medio de cultivo lentamente, se lavó con PBS, las células se fijaron con etanol absoluto y tiñeron con 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Tras una incubación de 15 min, se lavó con PBS, las laminillas se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame CA) y las células fueron observadas en el microscopio de epifluorescencia Leica DMLB 1005 (Leica, Wetzlar) para adquirir micrografías.

#### **Análisis del ciclo celular y pico SubGo en la línea HCC827**

La línea HCC827 se incubó en botellas T25 a una densidad de  $8 \times 10^5$  células. Después de que los cultivos celulares fueron tratados como se mencionó anteriormente, las células presentes en el sobrenadante (muertas y apoptóticas) fueron colectadas en un tubo de 15 mL. Las células adheridas fueron tratadas con la disolución de tripsina-verseno para facilitar su desprendimiento. Ambas fracciones fueron colectadas en el tubo, el cual fue centrifugado a 1600 rpm, por 10 min a T.A. El botón celular se lavó y resuspendió en PBS, la suspensión celular se ajustó a  $1 \times 10^6$  cel/mL. Las células se fijaron en 10 veces el volumen de etanol a  $-20^\circ\text{C}$  (70 % v/v), se lavaron y permeabilizaron con una disolución de PBS conteniendo Tritón X-100 (0.1 %), 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (0.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y RNAasa A (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Tras incubar durante 30 min a T.A. y obscuridad se adquirieron, al menos 20,000 eventos, empleando el citómetro de flujo FACSCANTO II (BD, Franklin Lakes NJ). Los porcentajes de las células en las distintas fases del ciclo celular y pico SubGo se cuantificaron empleando el programa FlowJo V 10.

#### **Cuantificación de células en apoptosis y necrosis mediante la tinción con Anexina V/Yoduro de propidio**

A partir de cultivos por duplicado en botellas T25 tratados en las condiciones experimentales antes mencionadas, se cuantificó el porcentaje de células en apoptosis y necrosis empleando el ensayo de FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, Franklin Lakes NJ). Este ensayo se realizó en la línea celular HCC827 expuesta a los tratamientos indicados durante 36, 40 y 48 h, así como en la línea A549 expuesta a CDDP por 10 h (control positivo de células en apoptosis). En estos periodos de tiempo, se observó un mayor número de células en apoptosis. En breve, las células fueron recuperadas como se mencionó anteriormente. La suspensión de células obtenidas se dividió en dos fracciones. Una de las fracciones se empleó para cuantificar la actividad de la caspasa 3 (mencionado posteriormente) y la otra para el estudio de la células en apoptosis. Para este último caso, las células se lavaron con PBS libre de  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$  y el botón de células ( $2 - 3 \times 10^5$  cel) se resuspendió en Binding Buffer. Las células se tiñeron con 1  $\mu\text{L}$  de FITC Anexina V y 5  $\mu\text{L}$  de yoduro de propidio (PI), se incubaron a T.A. en oscuridad y por 15 min siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalizado el tiempo de incubación, se adquirieron por lo menos 15,000 eventos empleando el citómetro de flujo FACSCANTO II (BD, Franklin Lakes NJ). Los porcentajes de las células en apoptosis y necrosis se analizaron en el programa FlowJo V10.

### **Cuantificación de la actividad de la caspasa 3**

Con el objetivo de estudiar si la apoptosis detectada es mediada por la activación de la caspasa 3, se cuantificó la actividad de la enzima en la fracción de células obtenidas del ensayo anterior. Las células, a una densidad de  $8 \times 10^5$ , se lavaron con solución salina isotónica, el botón se resuspendió en 80  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lisis y se incubó durante 10 min en hielo. Posteriormente, el homogenado se centrifugó a 10,000 xg durante un min y del sobrenadante se transfirieron 50  $\mu\text{L}$  a una placa oscura de 96 pozos, el resto fue almacenado a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  para cuantificar proteínas. A cada pozo de la placa oscura se adicionó 50  $\mu\text{L}$  de 2X Reaction Buffer y 5  $\mu\text{L}$  de sustrato DEVD-AFC. La placa, incluyendo los controles del ensayo especificados en el kit Caspase-3 Fluorometric Assay (R&D Systems, Minneapolis MN), se incubó durante 2 h en la oscuridad a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Como control de células en apoptosis, se tomaron los sobrenadantes de los cultivos que contienen

preferentemente células apoptóticas. Finalmente, la placa se leyó en el lector de placas Fluoroskan Ascent (Thermo, Waltman MA) empleando los filtros de excitación y emisión 390 nm y 485 nm, respectivamente.

### **Cuantificación de proteínas**

De los extractos celulares obtenidos se cuantificaron las proteínas utilizando el ensayo Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL). Los extractos celulares provenientes del ensayo de caspasa 3 se diluyeron 1:40 con agua desionizada. Se adicionaron 150 µL de las diluciones de los extractos celulares en una placa de 96 pozos y se adicionaron 150 µL de la solución de BCA. Se realizó la curva estándar de calibración empleando diluciones del estándar de albúmina. La placa se incubó durante 2 h a 37 °C y las lecturas de la absorbancia de cada pozo se obtuvieron en el lector de placas Multiskan Ascent (Thermo, Waltman MA) a 562 nm de longitud de onda. Los valores de la absorbancia de las muestras problema se interpolaron en la curva de calibración y el valor de la concentración obtenida se multiplicó por el factor de dilución.

### **Cuantificación del ATP, ADP intracelular y determinación de la relación ADP/ATP**

A partir de los cultivos realizados en placas de 96 pozos en las condiciones y tiempos señalados, se retiraron cuidadosamente tres cuartas partes del sobrenadante de los pozos y se almacenó a -80°C para posteriormente cuantificar HMGB1. En las células se cuantificó el ATP y ADP intracelular empleando el ensayo ApoSENSOR ADP/ATP Ratio Assay Kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale NY). A las células se añadió 60 µL de Nucleotide Releasing Buffer y la placa se incubó con agitación constante a T.A. por 5 min.

En una placa de 96 pozos con paredes opacas se añadieron 100 µL de ATP Monitoring Enzyme a cada pozo y se transfirieron 50 µL de los extractos celulares. La mezcla se incubó por 1 min e inmediatamente se realizó la lectura de la luz emitida por la reacción entre el ATP y la enzima, empleando el luminómetro Fluoroskan Ascent (Thermo, Waltman MA). Se dejó transcurrir 10 min antes de adicionar 10 µL de la ADP converting enzyme. La placa se incubó por 2 min y la cantidad de luz emitida fue registrada inmediatamente. El ensayo

se efectuó en las líneas celulares HCC827 y HCC4006 tratadas con los compuestos durante 36, 40 y 48 h, así como en la línea A549 tratada con CDDP por 10 h.

El valor de la relación ADP/ATP se obtuvo dividiendo el valor obtenido de la segunda lectura entre el valor de la primera lectura.

### **Cuantificación de HMGB1 en los sobrenadantes**

La cuantificación de HMGB1 extracelular se realizó empleando el kit HMGB1 ELISA (IBL International GMHB, Hamburgo, Alemania). Para este ensayo se utilizaron los sobrenadantes de los cultivos celulares provenientes del ensayo para determinar el ATP y ADP intracelular. Después de descongelar las muestras, se diluyeron 1:10 en Diluent Buffer. Posteriormente, a cada pozo se adicionó 50  $\mu$ L de Diluent Buffer y 50  $\mu$ L de las diluciones de los sobrenadantes de los cultivos. Se realizó la curva estándar de calibración empleando diluciones del estándar de HMGB1. Los pozos se cubrieron con papel adhesivo e incubaron a 37 ° C en ambiente húmedo por 22 h. Finalizado el tiempo de incubación, se descartó el líquido de los pozos, se realizaron lavados con Wash Buffer y se adicionaron 100  $\mu$ L de Enzyme Conjugate. Después de incubar las tiras a T.A. por 2 h se realizaron lavados con Wash Buffer y se adicionaron 100  $\mu$ L de Color Solution a cada pozo. Tras incubar a T.A. 30 min, el desarrollo del color se detuvo empleando 100  $\mu$ L de Stop Solution. En el ensayo se incluyó un control positivo al cual se adicionó una dilución de HMGB1 recombinante y un control al cual se añadió medio cultivo para cuantificar la cantidad de HMGB1 presente. Finalmente, se obtuvieron las lecturas de absorbancia empleando el lector de placas Multiskan Ascent (Thermo, Waltman MA) a 450 nm. Los valores de absorbancia de las muestras problema se interpolaron en la curva de calibración. El valor de la concentración obtenida se multiplicó por el factor de dilución y se le restó el valor de la concentración de HMGB1 presente en el medio de cultivo.

primario.

### **Determinación de la expresión de *HMGB1* por RT-qPCR**

A partir de los cultivos tratados con los compuestos, se recuperaron las células adherentes residuales al tratamiento. A partir de estas células se extrajo el RNA total empleando el PureLink RNA Mini Kit (Ambion, Austin TX) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se sintetizó el cDNA empleando el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Ambion, Austin TX). La reacción de RT-qPCR se realizó en el 7500 Real Time PCR System (Applied BioSystems, Foster City, CA) empleando sondas TaqMan y Fam como fluorocromo.

### **Distribución celular de *HMGB1* por inmunofluorescencia**

Las células tratadas y no tratadas con los compuestos se lavaron con PBS estéril y se fijaron con etanol (EtOH) absoluto. Las células se rehidrataron y se permeabilizaron con una disolución de SDS al 1 % en PBS por 5 min. Después de lavar, las células se incubaron en disolución bloqueadora (suero de cerdo al 2 % en PBS) por 30 min y a continuación se incubaron con el anticuerpo primario anti-*HMGB1* humano hecho en conejo (Abcam Massachusetts, US) (dilución 1:50) toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Al día siguiente, las células se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa Fluor 488 (dilución 1:200) (Thermo Scientific, Waltham, MA USA) por 1 h a T.A. Posteriormente, las células se lavaron con disolución de PBS y se incubaron con DAPI durante 15 min a T.A. Finalmente, las laminillas se montaron con Vectashield y fueron observadas en el microscopio Leica DMLB 1005 (Leica, Wetzlar) para adquirir las imágenes. En el ensayo se empleó un control donde se omitió la adición de anticuerpo

### **Detección de calreticulina membranal en líneas tratadas empleando citometría de flujo**

A partir de los cultivos por duplicado en botellas T25 y en tiempos de tratamiento previos a la observación de células en apoptosis se analizó la presencia de calreticulina en la membrana mediante citometría de flujo. El ensayo se realizó en la línea HCC827 expuesta a los tratamientos indicados durante 3 h, 6 h, 12 h y 24 h, así como en la línea A549 tratada con CDDP por 30 min, 3 h y 6h. Se descartó el sobrenadante de los cultivos, se

recuperaron las células adherentes y posteriormente se centrifugaron a 1800 rpm por 12 min. El sobrenadante se retiró y se realizó un lavado empleando la solución de PBS con ázida de sodio 0.1% y albúmina al 1% (PBS/NaN<sub>3</sub>/BSA). El sobrenadante se resuspendió en 200 µL PBS y se adicionó 1 µL del anticuerpo anti-calreticulina humana acoplado a ficoeritrina (Clona FMC 75, Abcam Cambridge, MA). Las células se incubaron durante 30 min a 4 °C, se realizó un lavado con PBS/NaN<sub>3</sub>/BSA y el botón de células se resuspendió en una solución de PBS y 7-AAD. Las células se incubaron por 10 min. Finalizada la incubación se adquirieron al menos 15000 eventos en el citómetro de flujo FACSCANTO II (BD, Franklin Lakes NJ).

### **Determinación de calreticulina en la membrana celular empleando microscopia confocal**

Con base a los resultados obtenidos para determinar la exposición de la calreticulina por citometría de flujo, las células fueron cultivadas en las mismas condiciones y tratamientos en cubreobjetos (MatTek Corporation, Ashland MA). Al finalizar el tratamiento, el medio de cultivo se retiró y se realizaron dos lavados con PBS/NaN<sub>3</sub>/BSA. Las células fueron fijadas empleando paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 min. Después de dos lavados y una incubación con PBS/NaN<sub>3</sub>/BSA durante 30 min, las células se incubaron con el anticuerpo anti-calreticulina humana marcado con Alexa fluor 488 (Bioss, Woburn MA) a T.A. en la oscuridad durante 1 h. Después, las células fueron lavadas con PBS/NaN<sub>3</sub>/BSA y se añadió la aglutinina de soya acoplada a Alexa fluor 633 (Invitrogen, Carlsbad CA) para teñir membrana e incubando a T.A. en la oscuridad por 10 min. Finalmente, las células fueron teñidas con DAPI por a T.A. 15 min y visualizadas en el microscopio confocal Olympus FV1000 (Olympus Life Science, Center Valley PA). Las micrografías se adquirieron usando el objetivo de 60X.

### **Análisis estadístico**

Los resultados, obtenidos de experimentos realizados por triplicado, se muestran como la media ± SEM. Se empleó la prueba de t de student para comparar la diferencia entre dos grupos, utilizando el software Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Valores de p<0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

### Curvas dosis respuesta y determinación de la $CL_{50}$ de los compuestos

En la línea celular HCC827, concentraciones de Erlotinib en el rango de 6.25 a 25 nM causaron un efecto citostático. Concentraciones en el rango de 50 a 200 nM indujeron inhibición de la proliferación y en un bajo porcentaje se presentó efecto citotóxico (aproximadamente 30 %). A pesar de que no se alcanzó la  $CL_{50}$ , se decidió emplear la concentración de 80 nM (figura 1A) en los experimentos posteriores. En esta línea, concentraciones de CDDP de 50 a 160  $\mu$ M causaron bajos porcentajes de citotoxicidad sin alcanzar la  $CL_{50}$  (figura 1B). En experimentos posteriores se empleó la concentración de 50  $\mu$ M.

Como se observa en la figura 1A, en la línea celular HCC4006 concentraciones de Erlotinib menores a 50 nM no afectaron la proliferación celular a las 48 h de cultivo. Concentraciones de 200 nM ( $CL_{50}$ ) o mayores indujeron citostasis y una baja proporción de células muertas. La concentración de Erlotinib empleada en los experimentos posteriores fue de 200 nM. En esta línea, el CDDP a concentraciones de 40 y 80  $\mu$ M indujeron 35-40 % de células muertas. La concentración de CDDP 150  $\mu$ M causó un efecto citotóxico cercano al 60 %, por lo que la  $CL_{50}$  fue de 120  $\mu$ M (figura 1B), concentración empleada en los siguientes experimentos.

En la línea celular A549, el CDDP indujo efecto citotóxico a las concentraciones evaluadas a las 24 h de tratamiento. La  $CL_{50}$  calculada fue de 15  $\mu$ M y como se muestra en la figura 1B, concentraciones en el rango de 25 a 160  $\mu$ M mantuvieron el efecto citotóxico entre 70 y 80 %, citotoxicidad máxima alcanzada. En experimentos posteriores se empleó 25  $\mu$ M.

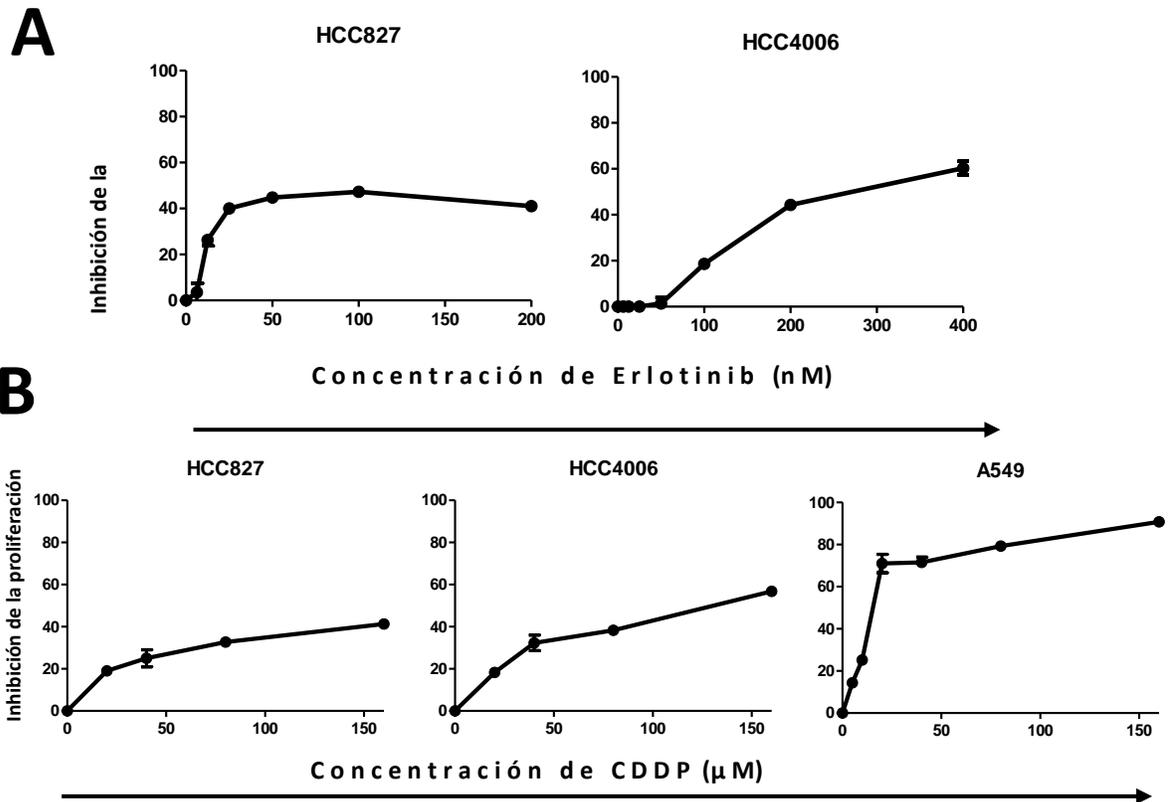


Figura 1. Curvas dosis-respuesta del Erlotinib (A) y del CDDP (B) en las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar. Se muestra el porcentaje de inhibición de la proliferación respecto al control (células sin tratamiento). Datos obtenidos de tres experimentos. Cada experimento realizado por triplicado. Se indica la media  $\pm$  SEM.

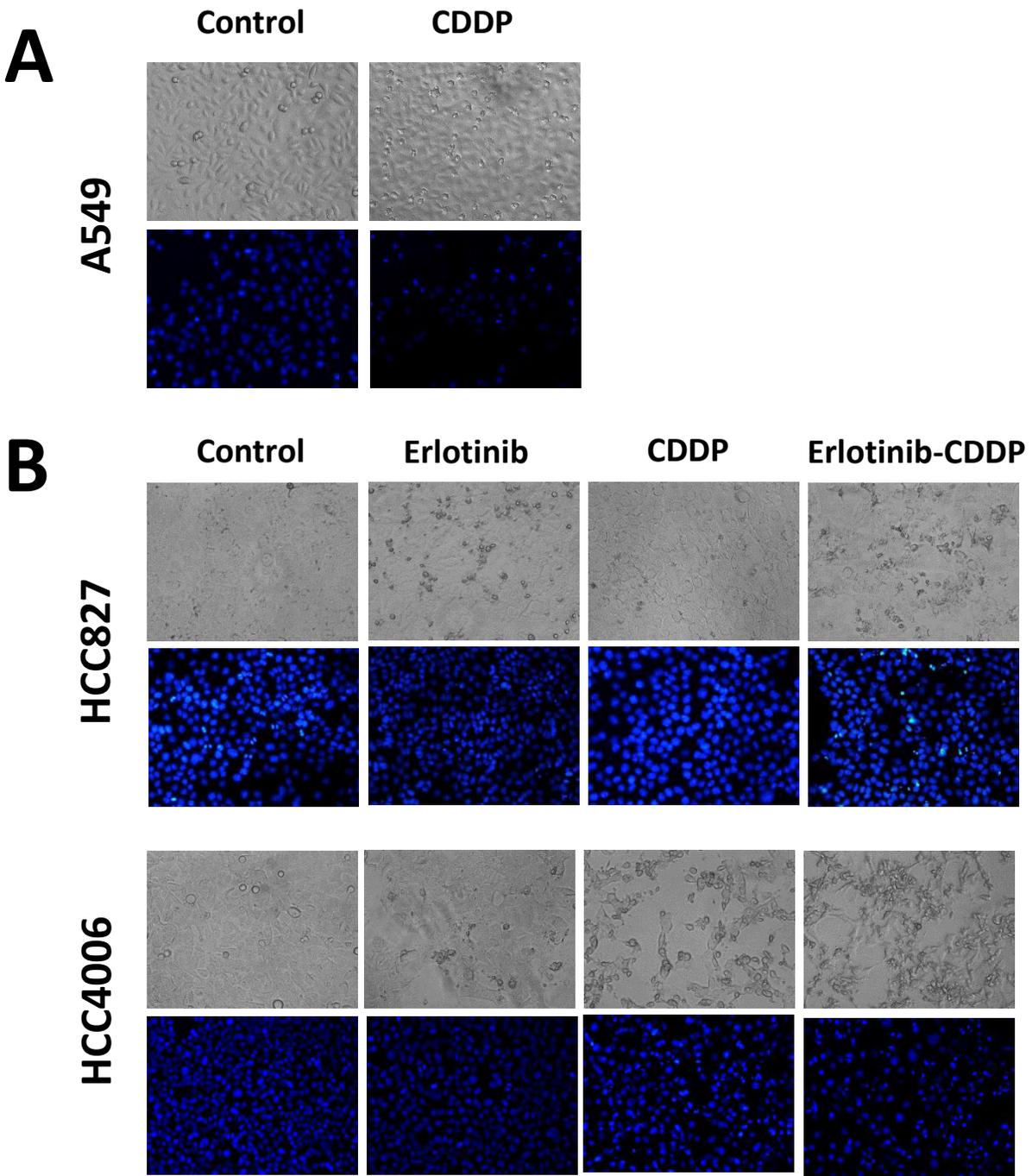
### Cambios morfológicos en las líneas celulares asociados a la apoptosis inducidos por Erlotinib y CDDP

Una vez establecidas las concentraciones de los compuestos a probar, las líneas celulares fueron expuestas a dichas concentraciones para observar si se inducían cambios morfológicos asociados a daño celular, así como el tiempo en el cual se presentan. Ya que el objetivo del trabajo fue estudiar si los compuestos en estudio inducen muerte celular inmunogénica, esta característica fue inicialmente detectada mediante observación microscópica de algunos parámetros morfológicos asociados con la apoptosis como son: disminución del tamaño celular, blebbing y formación de cuerpos apoptóticos conteniendo material nuclear.

La línea celular A549 a las 9-12 h de exposición a CDDP presentó blebbing de la membrana entre el 30 a 40 % de las células (figura 2A). A las 24 h de tratamiento, se observó un incremento en las células muertas y gran cantidad de cuerpos apoptóticos.

Cuando las células HCC827 y HCC4006 fueron tratadas con la concentración correspondiente de Erlotinib, los cambios morfológicos se presentaron alrededor de las 36 h de tratamiento. En los cultivos se observaron principalmente células sin alteraciones morfológicas; mientras que la proporción de células afectadas varió en número de células en apoptosis, cuerpos apoptóticos y células muertas (figura 2B). En la línea celular HCC827, el CDDP a la concentración de 50  $\mu\text{M}$  no indujo cambios en la morfología celular que pudieran ser distinguidos con el microscopio. Concentraciones mayores de CDDP indujeron cambios morfológicos que se observaron en muy pocas células. Con relación a la línea celular HCC4006, en la figura 2 B se muestra que 80  $\mu\text{M}$  de CDDP generó una mayor proporción de células dañadas, comparado con la línea HCC827; las células dañadas presentaron diferentes etapas del proceso apoptótico.

Como se indicó anteriormente, otra condición experimental empleada fue la adición inicial de Erlotinib con la subsecuente exposición a CDDP. Esta condición fue estudiada sólo en las líneas con mutaciones en *EGFR*. En la línea HCC827 se presentó un ligero incremento de células dañadas lo cual fue corroborado con la tinción con DAPI. En cambio, en la línea HCC4006, la combinación de tratamiento indujo células dañadas en muy alta proporción (figura 2B).



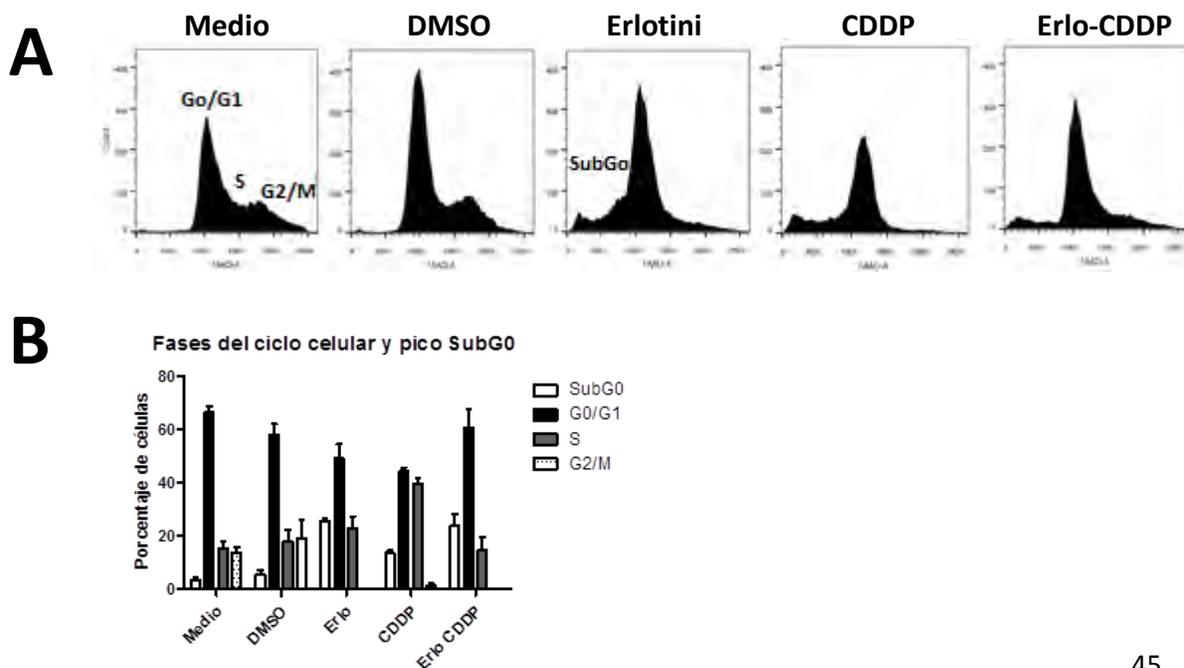
**Figura 2.** Cambios morfológicos asociados con el tratamiento en las líneas de cáncer de pulmón A549 (A), HCC827 y HCC4006 (B). Se muestran imágenes representativas de los cultivos observados en el microscopio a campo claro. En la parte inferior se muestran imágenes de los cultivos teñidos con DAPI y observados en el microscopio de epifluorescencia. Como control se emplearon células sin tratamiento. Microfotografías a aumento de 20X.

## Análisis del ciclo celular y pico SubGo en la línea HCC827

Se analizó el ciclo celular y el pico SubGo empleando citometría de flujo en la línea HCC827. El tratamiento con Erlotinib o con CDDP disminuyó el porcentaje de células en la fase Go/G1 en aproximadamente 15%. El Erlotinib incrementó ligeramente el porcentaje de células en fase S, mientras que el CDDP incrementó al doble las células en fase S. Con ambos tratamientos no se detectaron células en las fases G2/M. En la figura 3B se muestra que el Erlotinib incrementó 5 veces la población de células en el pico SubGo, mientras que el CDDP causó un incremento de 2.5 veces esta población.

Cuando se adicionaron ambos tratamientos y se compararon con respecto a las células en medio de cultivo se obtuvo que disminuyó ligeramente el porcentaje de células en la fase Go/G1; las células en fase S no se modificaron y se incrementó el porcentaje de células en pico SubGo en aproximadamente 5 veces más. Cuando el efecto de la adición de ambos tratamientos se comparó con respecto al efecto del Erlotinib, las células en fase Go/G1 incrementaron, en fase S disminuyeron y el porcentaje de células en el pico SubGo fue similar (figura 3B).

En resumen, estos cambios indican que el Erlotinib induce la muerte en células derivadas de la fase Go/G1 y en cambio el CDDP arresta a las células en la fase S del ciclo celular.



**Figura 3.** Porcentaje de células HCC827 en las fases del ciclo celular y pico SubGo. Histogramas indicando las fases del ciclo celular, pico SubGo (A). En la gráfica se indica el porcentaje de células en las fases del ciclo celular y pico SubGo (B). Se muestra la media  $\pm$  SEM.

### **Cuantificación de células en apoptosis y necrosis mediante la tinción con Anexina V/Yoduro de propidio**

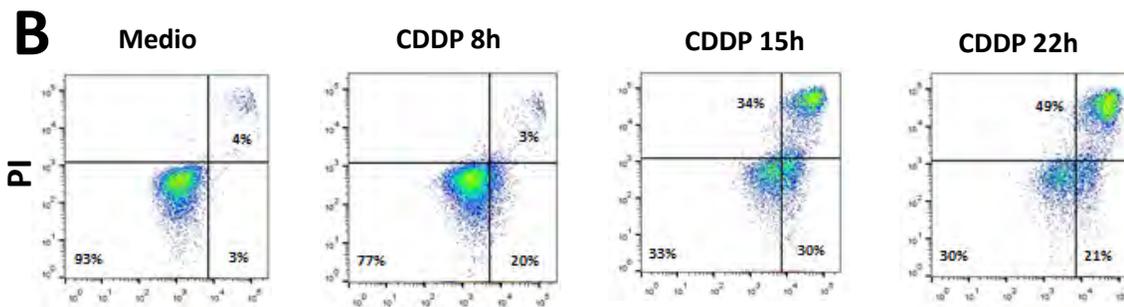
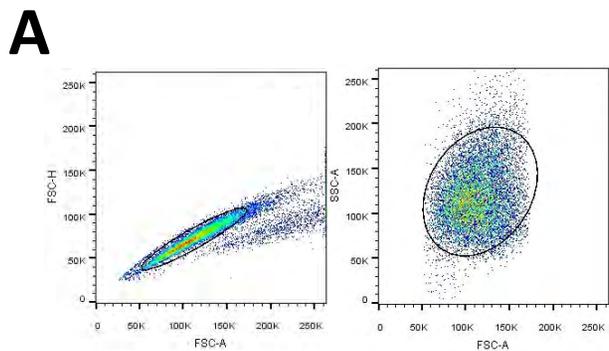
Ya que los compuestos indujeron muerte de las células tumorales y las observaciones microscópicas iniciales sugerían mayor número de células en apoptosis, se procedió a analizar la proporción de células viables, apoptóticas y necróticas. En la línea A549, la proporción de células en medio de cultivo fue de 93% viables, 3% apoptóticas y 4% necróticas. En las figuras 4B y 4D se muestra que la exposición a CDDP por 8h disminuyó el porcentaje de células viables, incrementó 7 veces la proporción de células apoptóticas y el porcentaje de células necróticas se mantuvo similar al detectado en medio de cultivo. A las 15 h de tratamiento con CDDP la proporción de células viables disminuyó a 33%, las células apoptóticas incrementaron 10 veces respecto a las detectadas en medio de cultivo y un porcentaje similar fueron necróticas. A las 20 h de tratamiento con CDDP el porcentaje de células viables se mantuvo similar al detectado en la condición anterior, la proporción células apoptóticas disminuyó a 21% y las células necróticas incrementaron a 49% (figura 4B y 4D).

En la línea HCC827 las determinaciones se realizaron a tiempos entre 36-40 h, y se compararon con el tiempo final de cultivo (48 h). La proporción de células en medio de cultivo y del DMSO fue de 80% viables, 4% células apoptóticas y 16% células en necrosis. En la figura 4C y 4D se muestra que el Erlotinib disminuyó la proporción de células viables a 40%, una proporción similar fueron apoptóticas y las restantes se detectaron como células en necrosis. El CDDP disminuyó las células viables a 70%, incrementó a 20% las células apoptóticas y mantuvo a las células necróticas en porcentajes similares a los detectados en medio de cultivo. En la adición secuencial de Erlotinib y CDDP, 35% de las células se detectaron viables, porcentaje similar al inducido por Erlotinib. Incrementó 4 veces el porcentaje de células apoptóticas con respecto al medio, pero con respecto al

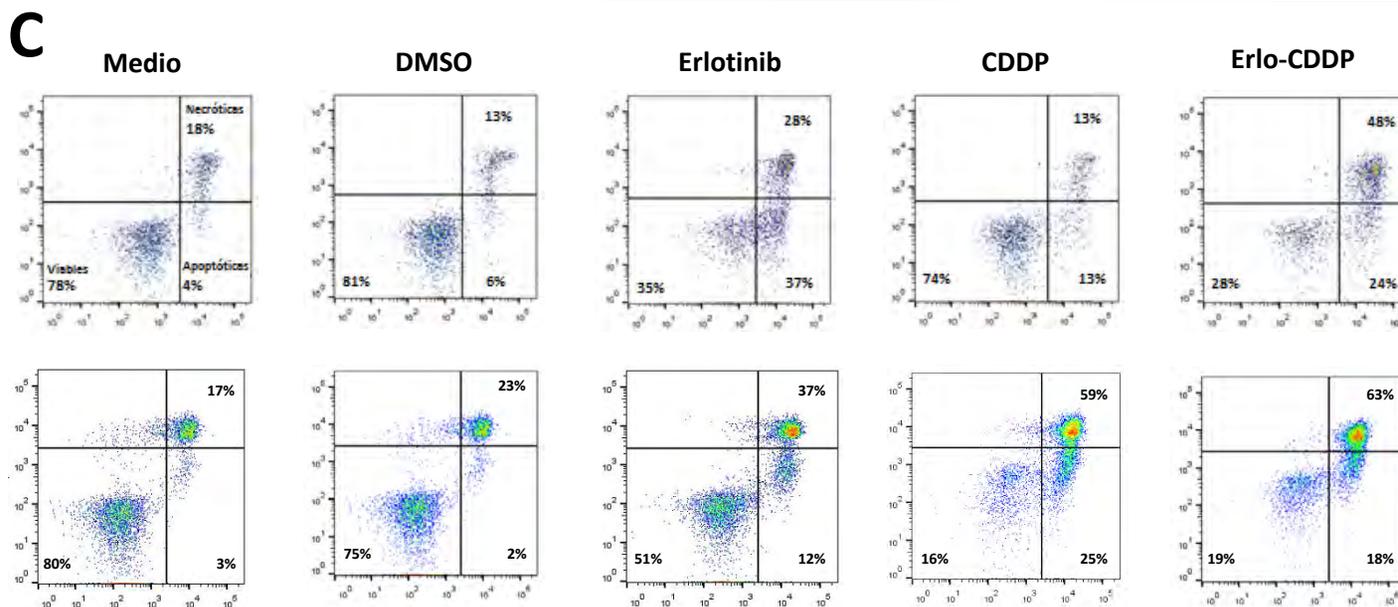
Erlotinib esta proporción disminuyó a la mitad. La combinación de fármacos incrementó el porcentaje de células necróticas aproximadamente al triple respecto al control y al doble respecto al Erlotinib (figura 4C).

En la línea HCC4006, la adición de DMSO no modificó la proporción de células viables, apoptóticas y necróticas con respecto a las células sin tratamiento (figuras 4C y 4D). La adición de Erlotinib, disminuyó el porcentaje de células viables a 51 % incrementó 5 veces las células apoptóticas y 35 % de las células se detectaron como necróticas. En cambio, la adición de CDDP disminuyó a 16% la proporción de células viables, incrementó 13 veces las células apoptóticas y el doble se detectaron como necróticas respecto a las células sin tratamiento. Resultados similares se obtuvieron al tratar las células con la adición secuencial de Erlotinib y CDDP (figuras 4C y 4D).

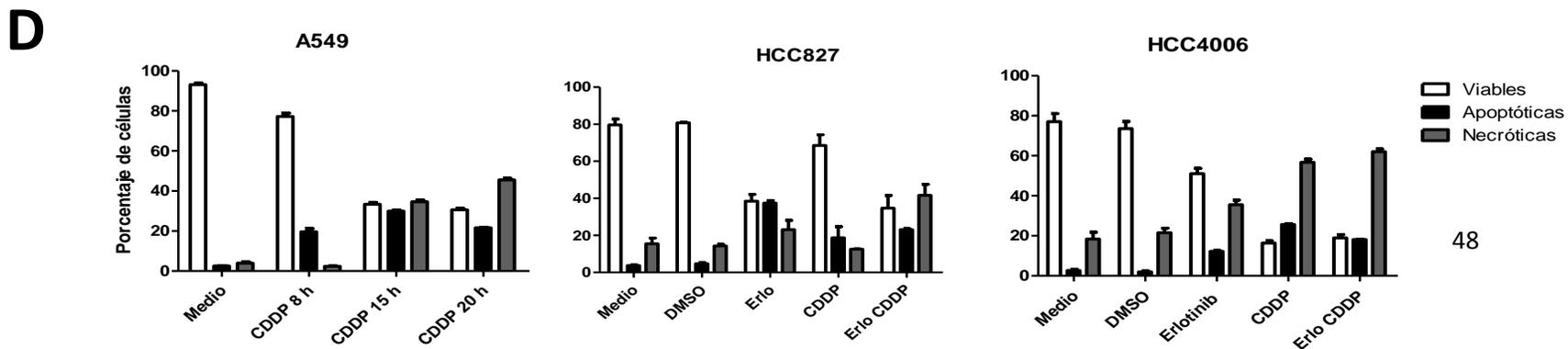
Datos similares fueron obtenidos de los cultivos a las 36 h y 48 h.



Anexina - V



Anexina - V



48

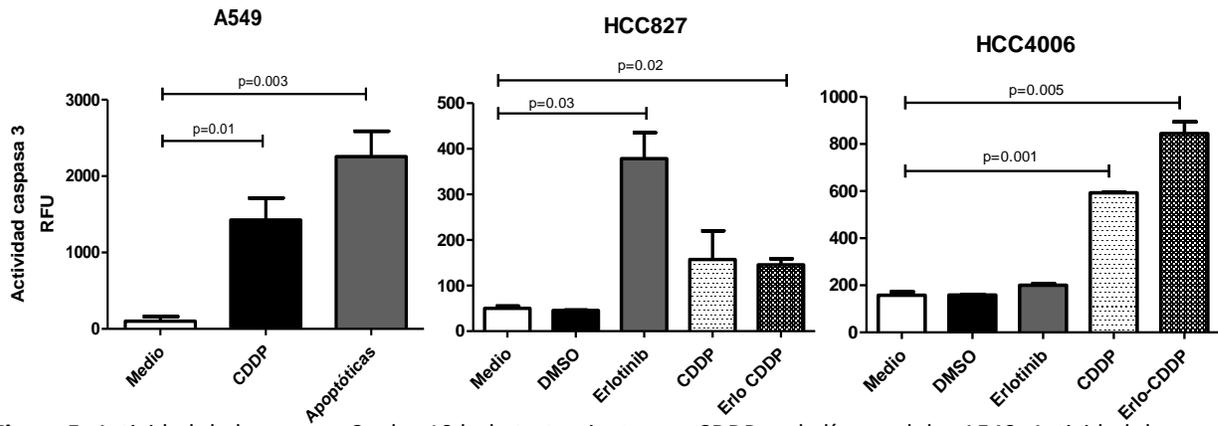
**Figura 4.** Estrategia de análisis para determinar el porcentaje de células apoptóticas. Se eliminaron agregados celulares a partir de la gráfica de puntos de tamaño área vs tamaño altura, región seleccionada. A partir de las células individuales (tamaño vs complejidad), se obtuvieron las gráficas de puntos para cuantificar porcentajes de células viables, apoptóticas y necróticas (A). Se muestra en gráficas de puntos el porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas de la línea celular A549 tratada con CDDP a distintos tiempos (B). Se muestran gráficas de puntos de las líneas celulares HCC827 y HCC4006 tratadas con Erlotinib, CDDP y la adición secuencial de los compuestos a las 40 h de tratamiento (C). Gráficas de barras mostrando los porcentajes de las poblaciones celulares en cada línea (D). Se muestran resultados de tres experimentos y se indica la media  $\pm$  SEM.

### **Actividad de la caspasa 3**

Ya que los compuestos terapéuticos indujeron apoptosis, se determinó si este fenómeno es mediado por la activación de la caspasa 3. A partir de lisados celulares provenientes de cultivos de la línea A549 a las 15 h y de la línea HCC827 a las 36, 40 y 48 h, se midió la actividad de caspasa 3. Adicionalmente, de los cultivos se colectó la fracción enriquecida de células en apoptosis como control de que esta es ejecutada por caspasa 3. En la línea A549, el CDDP incrementó aproximadamente 20 veces la actividad de la caspasa 3 respecto al control ( $p=0.01$ ) y 40 veces más en la fracción enriquecida de células apoptóticas ( $p=0.003$ ) (figura 5).

En la línea HCC827, la actividad de la caspasa 3 fue similar en las células con medio de cultivo y con DMSO. El Erlotinib incrementó 8 veces más la actividad de la enzima respecto a los controles ( $p=0.03$ ) y 40 veces más en la fracción enriquecida de células apoptóticas. El CDDP incrementó al triple la actividad de la caspasa 3, aunque este incremento no es significativo. La combinación de los tratamientos mostró un comportamiento similar al CDDP (figura 5).

En la línea HCC4006, la adición de DMSO a los cultivos no modificó la actividad de la caspasa 3 con respecto a las células sin tratamiento. El Erlotinib no alteró la actividad de la enzima. En cambio, la adición de CDDP incrementó 3 veces la actividad de la enzima respecto a los controles ( $p=0.001$ ). La adición secuencial de los tratamientos incrementó 4 veces la actividad de la caspasa 3 respecto a las células sin tratamiento ( $p=0.005$ ).



**Figura 5.** Actividad de la caspasa 3 a las 10 h de tratamiento con CDDP en la línea celular A549. Actividad de la caspasa 3 a las 40 h de tratamiento en las líneas celulares HCC827 y HCC4006. Los valores se expresan como unidades relativas de fluorescencia (RFU). Se muestran resultados de tres experimentos y se indica la media  $\pm$  SEM.

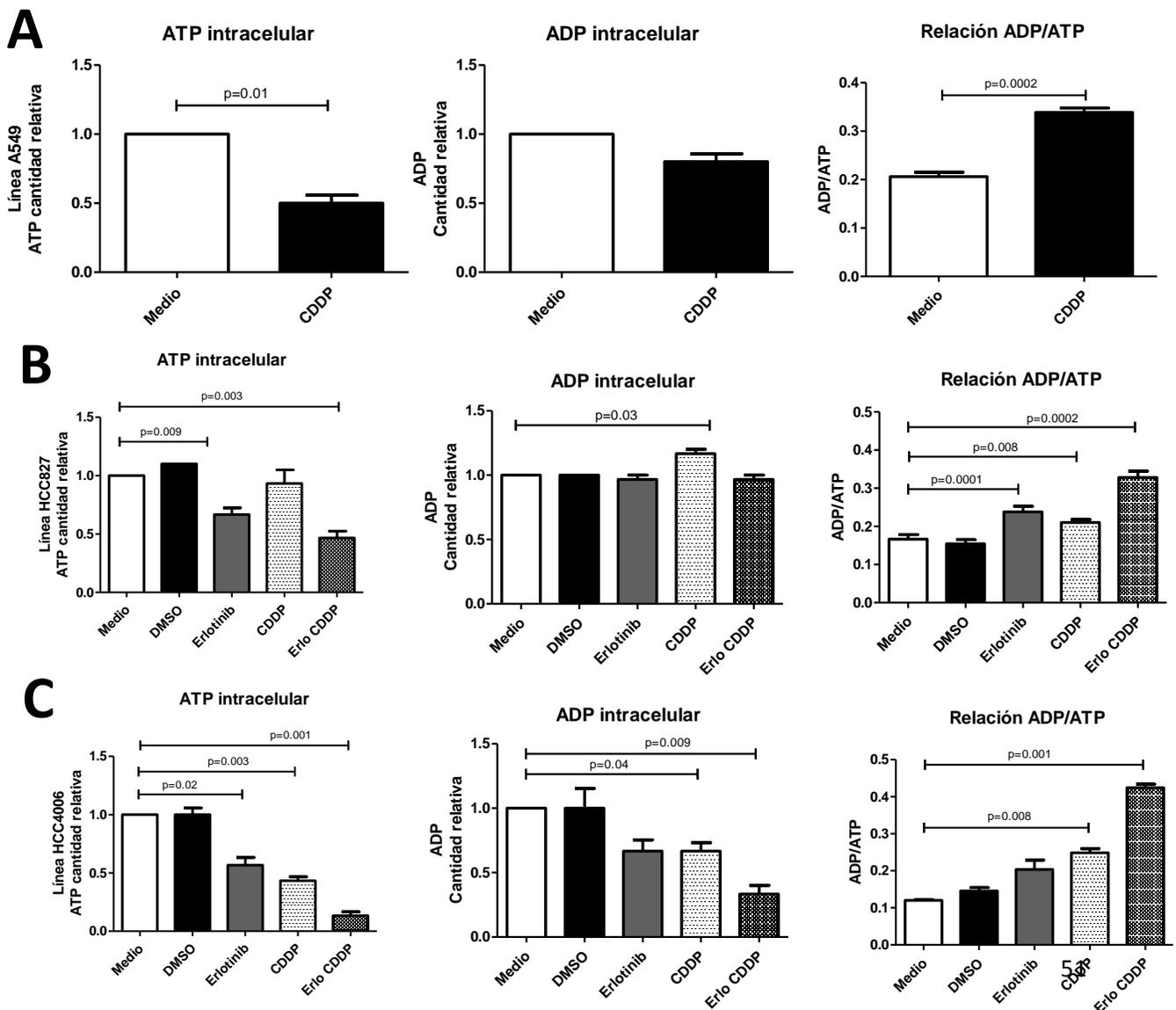
### Cuantificación intracelular del ATP y ADP y relación ADP/ATP

Se ha reportado que durante la ICD inducida por algunos compuestos citotóxicos, el ATP intracelular es liberado en etapas intermedias y tardías donde se detectan cambios morfológicos y bioquímicos asociados a la apoptosis (Martins, Tesniere et al. 2009), causando incremento en la relación ADP/ATP (Bradbury, Simmons et al. 2000). Con el fin de estudiar si el CDDP y el Erlotinib causan disminución en el ATP intracelular bajo las condiciones experimentales evaluadas, se cuantificó la cantidad de ATP, ADP intracelulares y la relación ADP/ATP. En la línea A549 el tratamiento con CDDP durante 15 h disminuyó la cantidad de ATP a la mitad con respecto a las células sin tratamiento ( $p=0.01$ ). El ADP intracelular disminuyó 20% (no significativamente) y el tratamiento incrementó la relación ADP/ATP ( $p=0.0002$ ) (figura 6A).

En la línea HCC827, el medio de cultivo y DMSO mostraron resultados similares de la cantidad de ATP, ADP y la relación de estos. La exposición a Erlotinib por 40 h disminuyó el ATP ( $p=0.009$ ), no modificó el ADP intracelular e incrementó la relación ADP/ATP ( $p=0.0001$ ), eventos comparados con relación a las células sin tratamiento (figura 6B). En cambio, el tratamiento con CDDP no alteró la cantidad de ATP intracelular, incrementó el ADP ( $p=0.03$ ) así como la relación ADP/ATP ( $p=0.008$ ). La adición secuencial de los compuestos disminuyó al ATP intracelular ( $p=0.003$ ), no modificó la cantidad de ADP e

incrementó la relación ADP/ATP ( $p=0.0002$ ), comportamiento similar al causado por Erlotinib (figura 6B).

En la línea HCC4006, el DMSO no modificó los valores de ATP, ADP y la relación ADP/ATP ya que fueron similares a los obtenidos con el medio de cultivo. El Erlotinib tras 40 h de tratamiento disminuyó el ATP ( $p=0.02$ ), el ADP disminuyó (no significativamente) e incrementó ligeramente la relación ADP/ATP. Un comportamiento similar pero significativo fue observado al exponer las células a CDDP. La adición secuencial de Erlotinib y CDDP redujo aún más la cantidad de ATP y ADP que los compuestos estudiados e incrementó casi al doble la relación ADP/ATP (figura 6C).



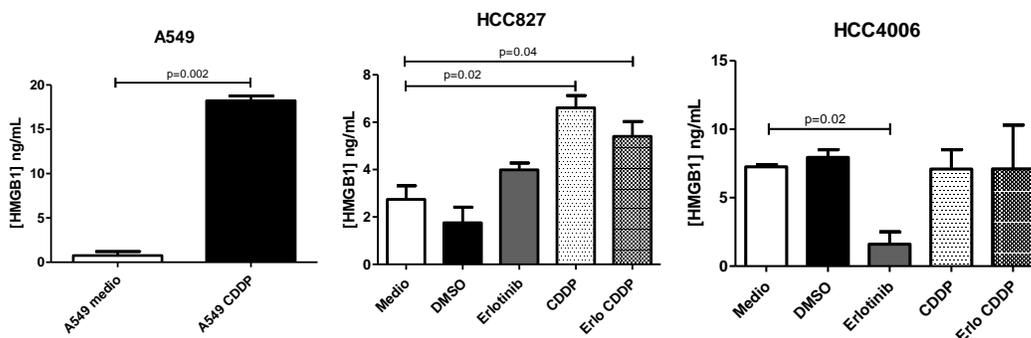
**Figura 6.** Cantidad relativa de ATP, ADP y relación ADP/ATP en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar. Resultados obtenidos de 3 experimentos. Cada experimento realizado por triplicado. Se indica la media  $\pm$  SEM.

### Cuantificación de HMGB1 en sobrenadantes de cultivos celulares

Como segundo marcador asociado a la ICD, se cuantificó la HMGB1 en los sobrenadantes provenientes de los cultivos para la determinación de la relación ADP/ATP. Los resultados, mostrados en la figura 7, indican que en la línea celular A549 el tratamiento con CDDP incrementó la cantidad de HMGB1 presente en el sobrenadante ( $p=0.002$ ).

En la línea celular HCC827, la cantidad de HMGB1 en los sobrenadantes provenientes de las células en medio cultivo o DMSO fue similar. La exposición a Erlotinib incrementó no significativamente la HMGB1 en el sobrenadante. En cambio, el tratamiento con CDDP o la adición secuencial de los compuestos incrementaron significativamente la cantidad de HMGB1 en los sobrenadantes (figura 7).

La línea HCC4006 libera, de manera basal, aproximadamente el doble de HMGB1 comparado con la línea HCC827. El DMSO no alteró la cantidad de HMGB1 liberada por estas células. El Erlotinib redujo en 70 % la liberación de HMGB1 ( $p=0.02$ ); mientras que, el CDDP o la adición secuencial de los compuestos no modificaron la concentración de HMGB1 en el sobrenadante (figura 7).



**Figura 7.** Cuantificación de HMGB1 en los sobrenadantes de los cultivos de células tumorales. Se muestran resultados de dos experimentos. Cada experimento realizado por duplicado. Se indica la media  $\pm$  SEM.

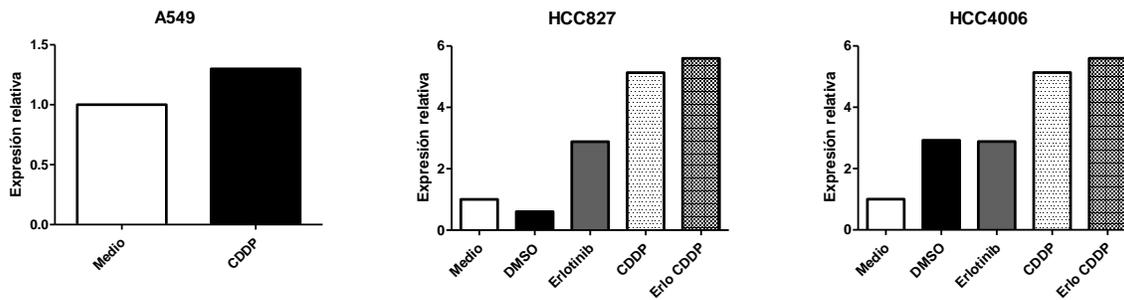
### **Expresión de *HMGB1* por RT-qPCR en células residuales a los tratamientos**

Se ha reportado que la línea celular A549 resistente al CDDP incrementa la expresión del mensajero de *HMGB1* (Zhang, R.; Li, Y.; *et al.* 2015). A pesar de que en nuestras condiciones experimentales las células residuales provienen de la exposición al CDDP por 24 h y no se establecieron como resistentes, se decidió estudiar la expresión relativa del transcrito de *HMGB1* en estas células. Lo anterior permitirá determinar si el incremento de *HMGB1* detectado en los sobrenadantes de los cultivos proviene de células apoptóticas/necróticas o bien de las células residuales al tratamiento.

Los resultados, que se muestran en la figura 8, indican que las células A549 residuales no sobreexpresaron el mensajero de *HMGB1*, por lo que el incremento de *HMGB1* detectado en el sobrenadante proviene de las células apoptóticas/necróticas.

En la línea celular HCC827, el Erlotinib incrementó tres veces la expresión de *HMGB1* mientras que el CDDP y la adición secuencial de los tratamientos incrementaron aproximadamente 5 veces la expresión del mensajero. Las células residuales de los tratamientos antes indicados incrementaron la expresión del transcrito de *HMGB1*, por lo que el incremento en el sobrenadante de *HMGB1* pudiera provenir de estas células.

En contraste, las células residuales de la línea celular HCC4006 incrementaron la expresión del mensajero de *HMGB1* tanto con el DMSO como con los tratamientos. Sin embargo, el aumento en la expresión del transcrito no se reflejó directamente en incrementos de la proteína en los sobrenadantes de los cultivos. Donde, como se indicó anteriormente, el Erlotinib redujo la *HMGB1* liberada, mientras que el CDDP y la adición secuencial de los compuestos no incrementaron la concentración de *HMGB1* comparado con el medio de cultivo. El estudio de la distribución de *HMGB1* en las células residuales es necesario para comprender esta discrepancia. En la figura 8 se muestran los resultados.



**Figura 8.** Expresión relativa del transcrito de *HMGB1* en células residuales posteriores al tratamiento.

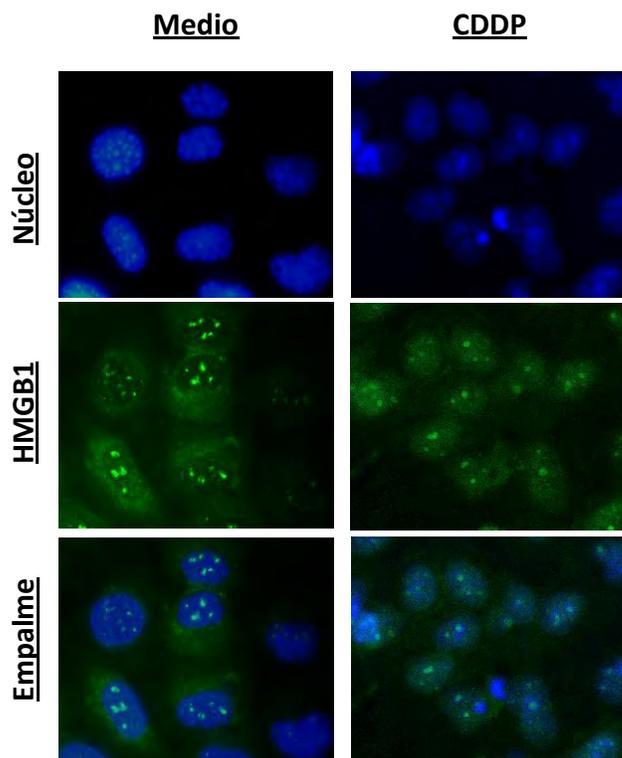
### Distribución celular de HMGB1 en células residuales a los tratamientos

Con el fin de observar la localización celular de la proteína HMGB1 en las células residuales a los tratamientos, se realizó una tinción por inmunofluorescencia. En la línea celular A549 en medio de cultivo, la HMGB1 se localiza en el citoplasma y núcleo de las células. En núcleo fue observada con un aspecto granular grueso. Tras el tratamiento con CDDP por 15 h, la HMGB1 se distribuyó en el núcleo de las células residuales (Figura 9). Por lo que consideramos que el incremento de HMGB1 detectada en los sobrenadantes de los cultivos proviene principalmente de las células en apoptosis. Se ha reportado que la HMGB1 puede translocarse del citoplasma al núcleo para reparar las lesiones causadas por el CDDP, fenómeno que mantiene la viabilidad de las células y participa en la resistencia al tratamiento (Zheng, H.; Chen, J.; *et al.* 2016).

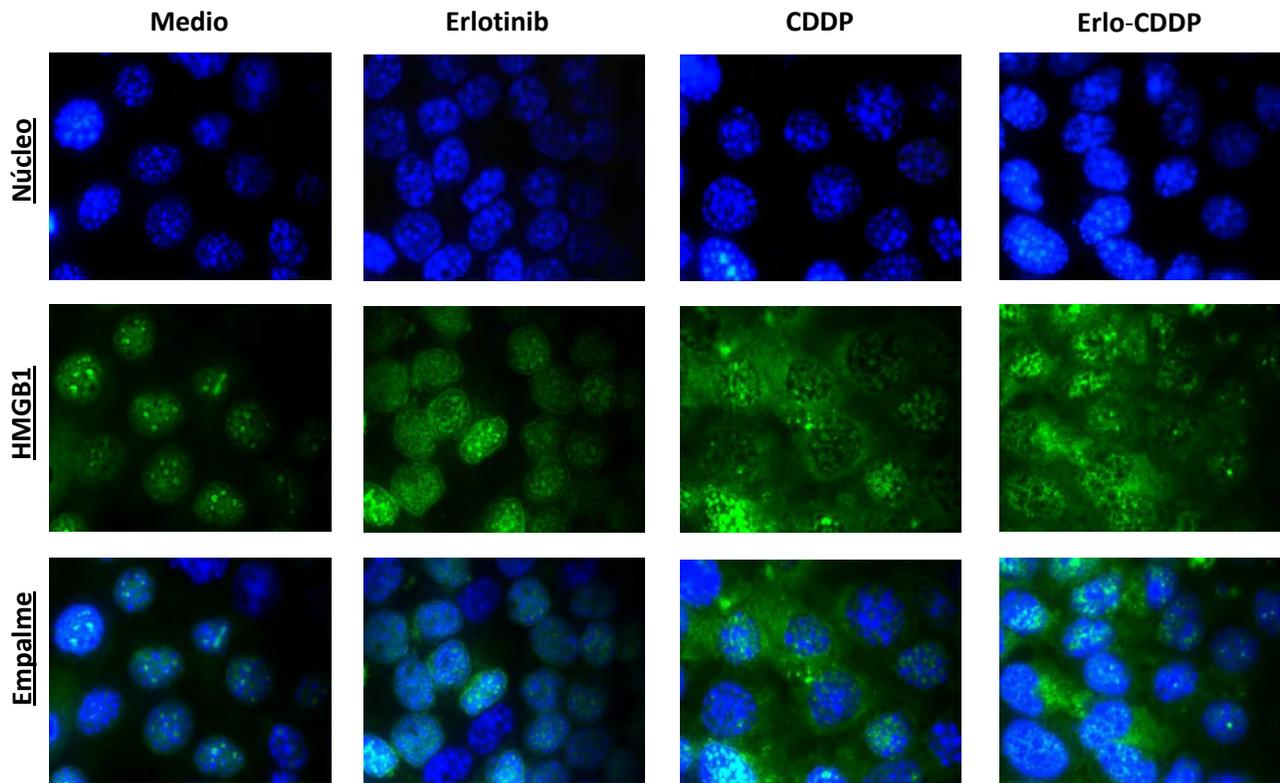
En la línea celular HCC827 sin tratamiento, la HMGB1 se localiza de manera granular gruesa en el núcleo. Tras el tratamiento con Erlotinib, la HMGB1 se observó nuclear formando gránulos más pequeños. En algunas células se observó de manera perinuclear y en citoplasma. El tratamiento con CDDP o la adición secuencial de los compuestos distribuyeron la HMGB1 en núcleo y citoplasma, ver figura 10.

En la línea HCC4006, la HMGB1 se observó en el núcleo de las células en medio de cultivo. El tratamiento con Erlotinib incrementó la cantidad de gránulos en el núcleo. La exposición a CDDP no modificó la distribución de HMGB1, observándose una distribución similar a la mostrada por las células en medio de cultivo. La adición secuencial de Erlotinib y CDDP incrementó el número de células muertas y de restos celulares, en los cuales se

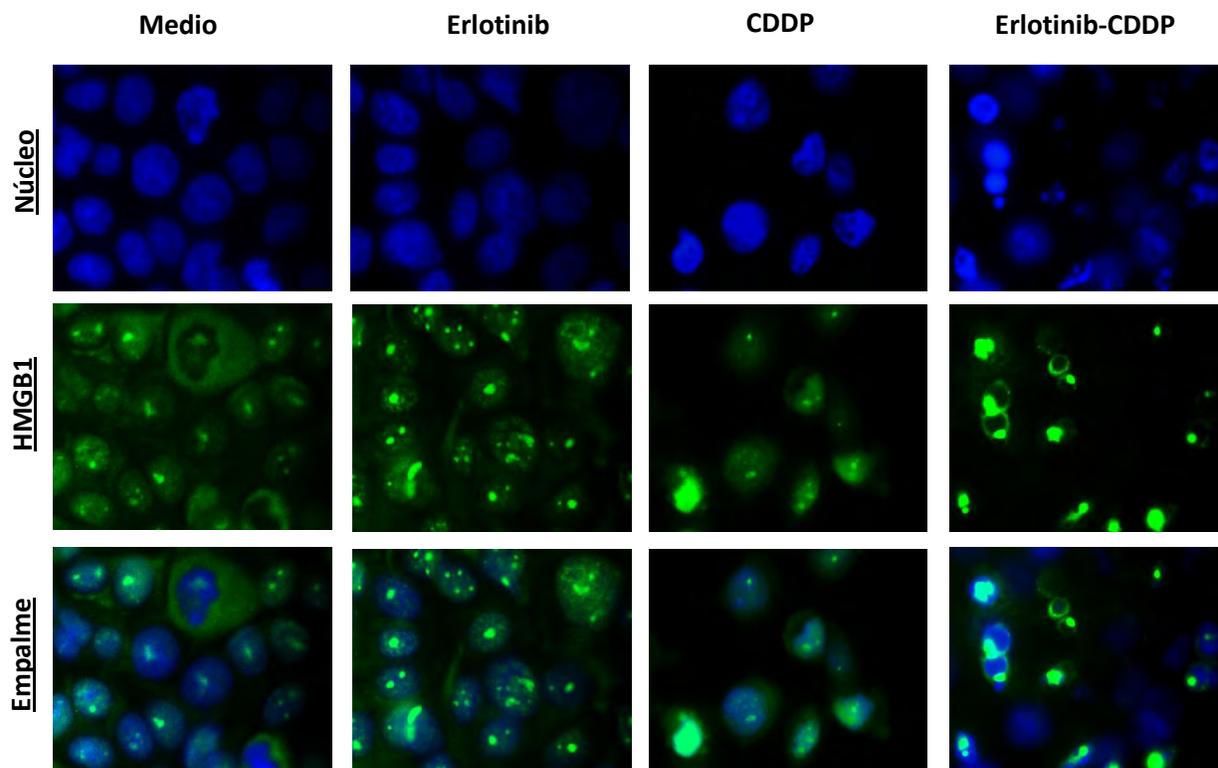
observó la HMGB1 formando anillos en cuerpos apoptóticos que parecen mantener la integridad de la membrana (figura 11).



**Figura 9.** Distribución de la proteína HMGB1 en la línea celular A549 sin tratamiento y tratada con CDDP durante 15 h. Se muestran imágenes representativas de los cultivos celulares con un aumento de 100 X. Tinción en azul DAPI, tinción en verde HMGB1.



**Figura 10.** Distribución de la proteína HMGB1 en la línea celular HCC827 sin tratamiento, tratada con Erlotinib, CDDP y la combinación de ambos compuestos. Se muestran imágenes representativas de los cultivos celulares con un aumento de 100 X. Tinción en azul DAPI, tinción en verde HMGB1.



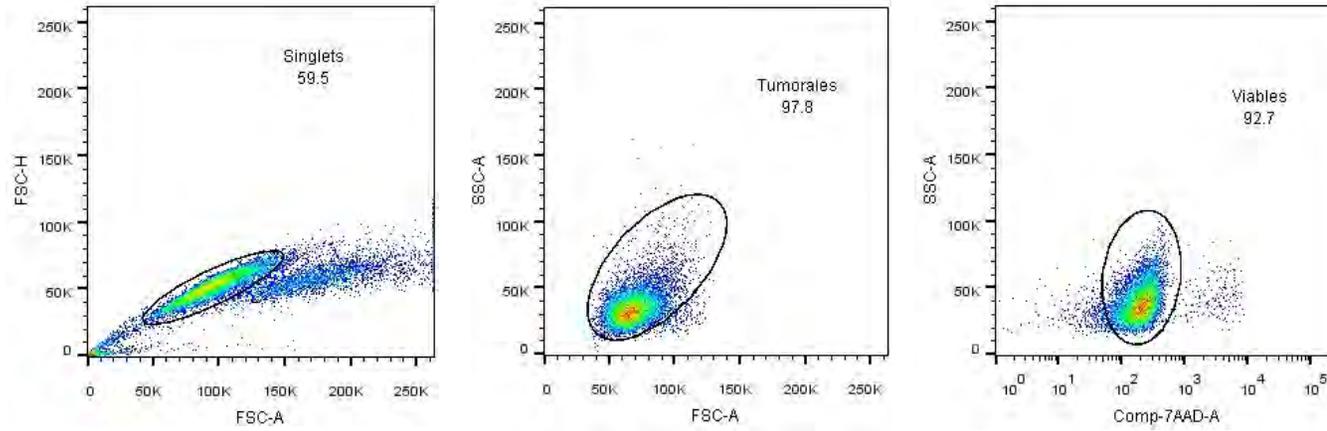
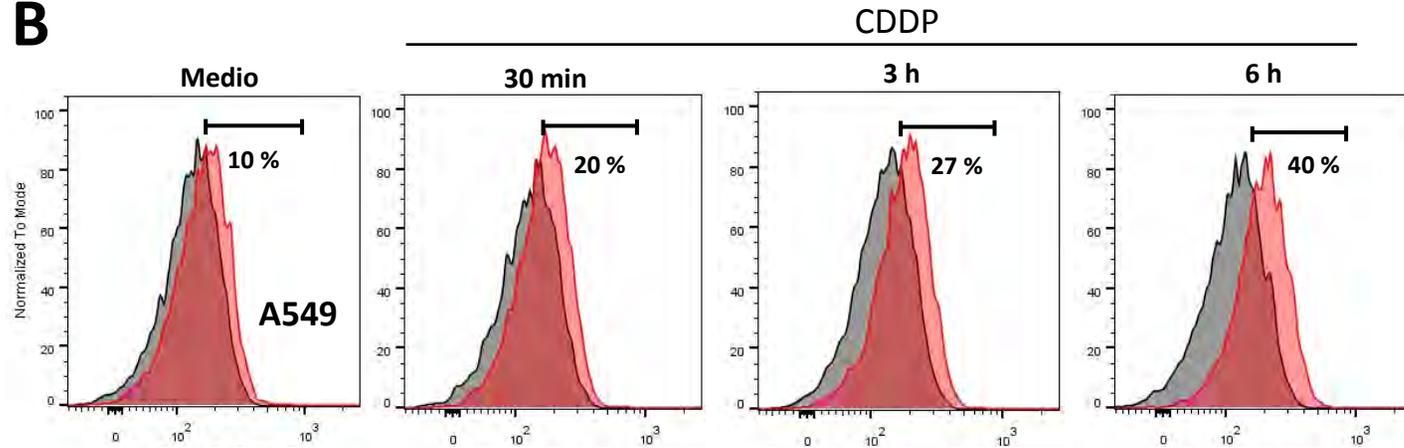
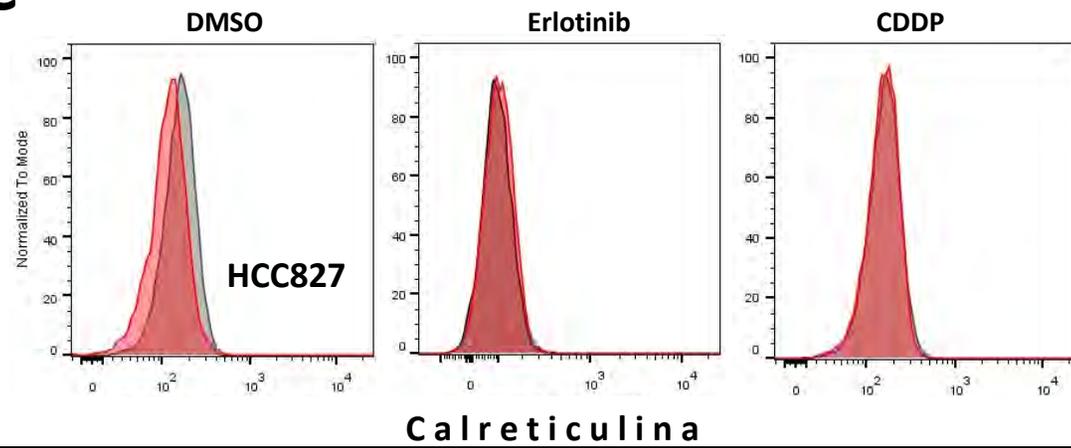
**Figura 11.** Distribución de la proteína HMGB1 en la línea celular HCC4006 sin tratamiento, tratada con Erlotinib, CDDP y la combinación de ambos compuestos. Se muestran imágenes representativas de los cultivos celulares con un aumento de 100 X. Tinción en azul DAPI, tinción en verde HMGB1.

### **Detección de calreticulina membranal en líneas tratadas empleando citometría de flujo**

Para demostrar que los compuestos estudiados inducen ICD, se requiere del estudio de la exposición de la calreticulina en membrana en etapas tempranas de la apoptosis; es decir, previo a la observación de cambios morfológicos y bioquímicos asociados a la apoptosis.

La expresión de calreticulina en membrana se estudió inicialmente por citometría de flujo y en células adherentes. Ya que la relocalización de calreticulina en membrana es un proceso tiempo dependiente, las determinaciones se realizaron en tiempos previos a la aparición de cambios morfológicos en las células tratadas. En el análisis se excluyó a la población de células muertas detectada con 7-AAD (figura 12A). En la línea A549, la determinación se realizó a los 30 min, 3 h y 6 h de tratamiento. Como se muestra en la figura 12 B, a los 30 min se obtuvo 20 %, a las 3 h 27 % y a las 6 h 40 % de células positivas para la calreticulina.

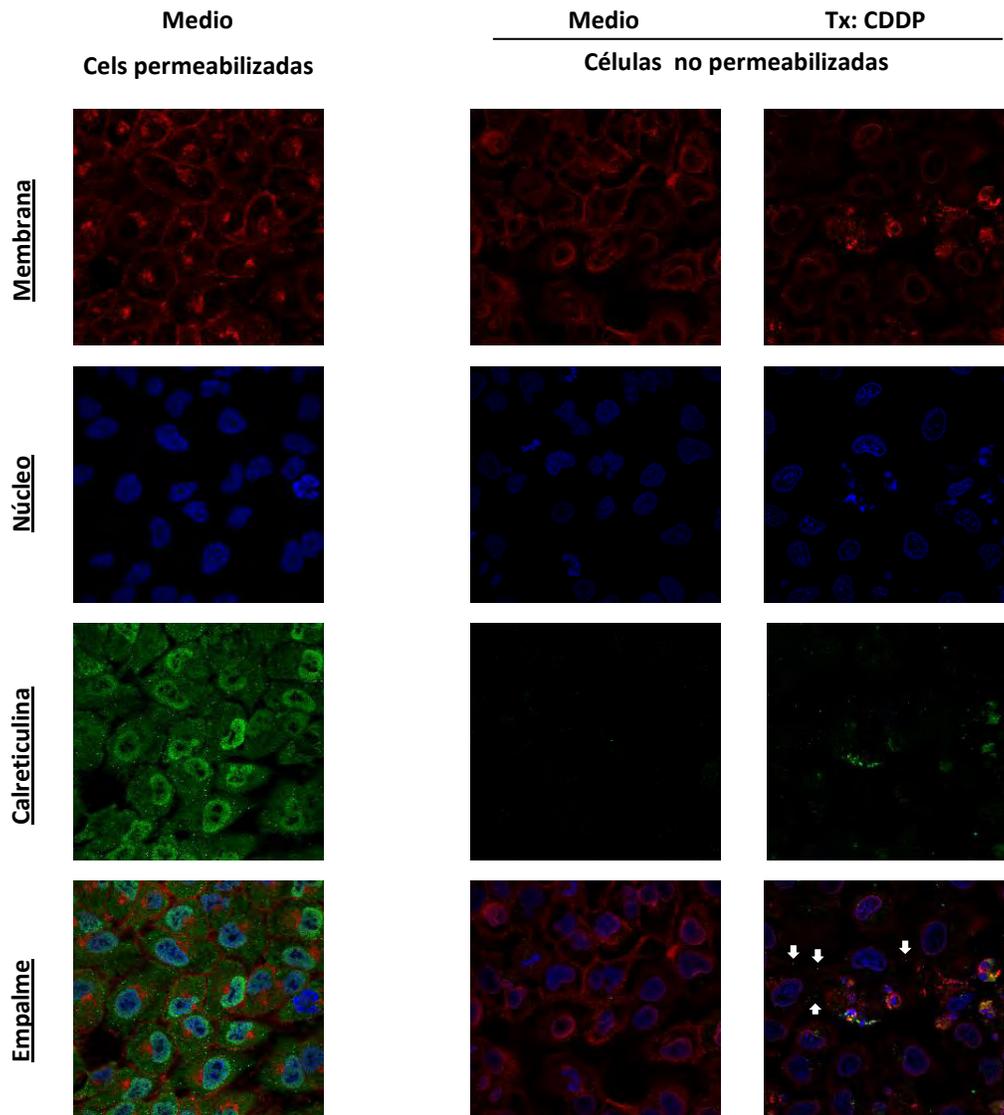
En la línea HCC827 el Erlotinib y el CDDP no incrementaron el porcentaje de células que expresan calreticulina en membrana (figura 12 C).

**A****B****C**

**Figura 12.** Estrategia de análisis para determinar el porcentaje de células calreticulina-positivas. Se eliminaron agregados celulares a partir de la gráfica de puntos de tamaño área vs tamaño altura, región seleccionada. De las células individuales (tamaño vs complejidad), se seleccionaron las células viables (7-AAD negativas) (A). Se muestran en histogramas la proporción de células calreticulina-positiva de la línea celular A549 tratada con CDDP a distintos tiempos (B). Se muestran histogramas de la línea HCC827 con Erlotinib y CDDP a las 24 h de tratamiento (C).

### **Exposición de calreticulina en la membrana celular empleando microscopia confocal**

Para corroborar la exposición de la calreticulina en la membrana plasmática en la línea A549 tratada con CDDP por citometría de flujo, se empleó microscopía confocal. Las células A549 fueron permeabilizadas y tratadas con el anticuerpo anti-calreticulina para conocer la distribución intracelular. La calreticulina se observó localizada en el citoplasma y en el núcleo de las células (figura 13). Como control de la expresión de calreticulina en la membrana de las células se determinó esta molécula en células no permeabilizadas, no observando tinción de calreticulina. Con base en los resultados obtenidos por citometría de flujo, se determinó la exposición de calreticulina en células no permeabilizadas y tratadas con CDDP durante 6 h, detectando a la calreticulina en forma de puntos distribuidos en la membrana celular y en distintos planos de la imagen (células señaladas). Los resultados se muestran en la figura 13.



**Figura 13.** Exposición de la calreticulina en la línea celular A549. Para conocer la distribución intracelular de la calreticulina se emplearon células no expuestas a CDDP y permeabilizadas. Con el objetivo de conocer la expresión basal en membrana de calreticulina en las células A549, se emplearon células sin tratamiento y no permeabilizadas. El tratamiento con CDDP indujo la exposición de calreticulina en membrana a las 6 h. Se muestran imágenes correspondientes a la membrana celular teñida con WGA (rojo), el núcleo con DAPI (azul) y la calreticulina se identificó con el anticuerpo anti-calreticulina acoplado a Alexa 488 (verde). Medio=Medio de cultivo, Tx=Tratamiento. Imágenes con amplificación total de 60 X.

Los resultados obtenidos de esta investigación sugieren que el CDDP induce muerte celular inmunogénica en la línea celular A549. En cambio, el Erlotinib principalmente actúa bloqueando la proliferación de las células y solo en altas concentraciones se observó efecto citotóxico que no es mediado por el conjunto de marcadores que caracterizan a la ICD.

## DISCUSIÓN

En el tratamiento del cáncer se emplean diversos agentes citostáticos/citotóxicos para inhibir la proliferación celular o inducir la muerte de las células tumorales, respectivamente. Para el caso del NSCLC, el tratamiento convencional consiste en la combinación de compuestos platinados (CDDP y carboplatino) con taxanos. Sin embargo, en pacientes cuyos tumores presentan mutaciones de sensibilidad en *EGFR*, el tratamiento de elección es a base de TKI. Se ha reportado que el tratamiento convencional como los TKI inducen muerte celular mediada por apoptosis (Gong, Y.; Somwar, R.; *et al.* 2007, Matsumoto, M.; Nakajima, W.; *et al.* 2016). Hasta hace algún tiempo, la apoptosis era considerada como un tipo de muerte silenciosa, es decir, no activaba la respuesta inmune. Kroemer y colaboradores reportaron una variante de la apoptosis que estimula a la respuesta inmune (Casares, N.; Pequignot, M.; *et al.* 2005); esta apoptosis se denominó muerte inmunogénica ya que distintos componentes intracelulares al re-localizarse en la membrana o liberarse de las células muertas adquieren el potencial de actuar como adyuvantes endógenos. Estos adyuvantes en presencia de los antígenos tumorales causan activación de la respuesta inmune antitumoral (Garg, A.; Dudek-Peric.; *et al.* 2015). La muerte inmunogénica se ha estudiado principalmente en líneas celulares de cáncer de colon empleando oxaliplatino (Tesniere, A.; Schlemmer, F.; *et al.* 2010). Recientemente en un modelo murino se reportó que el CDDP o su combinación con piridoxina inducen la muerte inmunogénica de la línea celular LLC (Aranda, F.; Bloy, N.; *et al.* 2015). A pesar de que el CDDP y los TKI inducen la muerte por apoptosis en líneas celulares de distintos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de pulmón, no se ha determinado si en los carcinomas pulmonares la muerte inducida es o no inmunogénica. El objetivo de este estudio es conocer si los compuestos quimioterapéuticos antes indicados inducen muerte inmunogénica, evaluada mediante la emisión espacio-temporal de los tres marcadores distintivos que son: expresión de calreticulina en la membrana previo a los cambios morfológicos asociados a apoptosis, liberación de ATP y HMGB1 en etapas avanzadas de la apoptosis.

En la línea celular A549, estudios previos reportan que el CDDP en el rango de 20 a 100  $\mu\text{M}$  induce muerte por apoptosis a través de la vía intrínseca, llevando a la activación de la caspasa 3 (Liang, C.; Liu, L.; *et al.* 2004, Matsumoto, M.; Nakajima, W.; *et al.* 2016). En nuestro estudio, empleando 25  $\mu\text{M}$ , encontramos resultados similares a los reportados, lo que confirma que el CDDP induce la apoptosis en esta línea celular en aproximadamente 40% de las células. Se ha reportado en líneas tumorales murinas y humanas, de origen distinto al carcinoma pulmonar, que algunos agentes quimioterapéuticos inducen incremento de la relación ADP/ATP, el cual se ha considerado que puede deberse a la liberación del ATP intracelular (Bradbury, D.; Simmons, T.; *et al.* 2000, Martins, I.; Tesniere, A.; *et al.* 2009). Así mismo, se ha analizado en el sobrenadante de los cultivos el incremento en la concentración de HMGB1. Estos marcadores, que se ha demostrado funcionan como señales quimioatrayentes e inducen la maduración de las células dendríticas, son esenciales en la muerte inmunogénica. En nuestro estudio, el CDDP indujo en la línea celular A549 la expresión de ambos marcadores en el intervalo de 15 a 24 h de tratamiento, periodo en el que se observaron y detectaron células en apoptosis, así como cuerpos apoptóticos.

El proceso de muerte inmunogénica requiere que en etapas tempranas se lleve a cabo la exposición de calreticulina en la membrana. La localización membranal de esta molécula favorece la fagocitosis de estas células por las células dendríticas para que, posterior al procesamiento de los antígenos tumorales, se lleve a cabo la presentación cruzada para que linfocitos T citotóxicos adquieran la capacidad de eliminar a las células tumorales residuales (Garg, A.; Dudek-Peric.; *et al.* 2015, Di Blasio, S.; Wortel, I.; *et al.* 2016). La importancia primordial de esta molécula se ha estudiado principalmente en líneas de cáncer de colón silenciando su expresión o evitando, mediante anticuerpos bloqueadores, su interacción con el receptor CD91 presente en las células dendríticas lo que conlleva a evitar la inducción de una eficiente respuesta antitumoral (Gardai, S.; McPhillips, K.; *et al.* 2005, Obeid, M.; Tesniere, A.; *et al.* 2007). En las condiciones experimentales empleadas para nuestro estudio y en el intervalo de 30 min a 6 h de tratamiento detectamos incremento en la proporción de células que expresaron calreticulina en membrana.

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que el CDDP induce en la línea celular A549 la expresión espacio-temporal de los marcadores de la muerte inmunogénica, establecidos por el Comité Internacional del Estudio de la Muerte Celular. A partir de este conocimiento, sería primordial realizar estudios que permitan analizar si este fenómeno es inducido en otras líneas celulares que presenten el gen silvestre de *EGFR*. Así mismo, sería importante evaluar la capacidad antitumoral de la respuesta inmune a través de ensayos funcionales, empleando los modelos validados (Kepp, O.; Senovilla, L.; *et al.* 2014). Sin embargo, este tipo de ensayos presentarán algunas dificultades ya que requieren el empleo de ratones inmunocompetentes, en los cuales se ha evaluado la respuesta inmune antitumoral utilizando líneas celulares murinas. Hasta la fecha no ha sido posible implantar en ratones inmunocompetentes células provenientes de tumores humanos y el empleo de ratones inmunodeficientes no permitirá evaluar la participación de la respuesta inmune.

Respecto al Erlotinib, se ha estudiado que este compuesto actúa bloqueando el sitio activo de la cinasa para residuos de tirosina presente en el dominio intracelular del *EGFR*, de manera que impide la activación de las vías de señalización reguladas por este receptor (Roskoski, R. 2014). Se ha reportado que este compuesto, en el rango de 0.1 a 50  $\mu\text{M}$ , induce citostasis en líneas celulares de cáncer de mama y de cáncer de hígado tras 24 h de tratamiento (Huether, A.; Hopfner, M.; *et al.* 2005, Yamasaki, F.; Zhang, D.; *et al.* 2007). Este efecto citostático se debe al arresto de las células en las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular el cual es mediado por la expresión p27, molécula inhibidora de la cinasa dependiente de ciclina 2. No obstante, se ha reportado que, en líneas de cáncer de pulmón sensibles al tratamiento y en líneas de cáncer de mama, el Erlotinib induce muerte por apoptosis en el intervalo de 48 a 72 h de tratamiento (Gong, Y.; Somwar, R.; *et al.* 2007, Yamasaki, F.; Zhang, D.; *et al.* 2007). Esta apoptosis es mediada por la vía intrínseca, llevando a la activación de la caspasa 3 (Shan, F.; Shao, Z.; *et al.* 2016). En nuestro trabajo, en las líneas celulares de cáncer de pulmón con mutaciones en *EGFR*, encontramos resultados similares a los reportados confirmando que, a las 24 h de tratamiento en el rango de concentraciones de 5 a 400 nM, se induce un efecto citostático. Mayor tiempo de

exposición causa apoptosis en aproximadamente 20% de las células.

A pesar del bajo porcentaje inducido de células en apoptosis tras el tratamiento con Erlotinib, decidimos estudiar si en estas células se presentan los marcadores de muerte inmunogénica previamente indicados. Sin embargo, en las líneas celulares HCC827 y HCC4006 no detectamos la exposición de calreticulina en membrana y la liberación de HMGB1, respectivamente. Con base en los resultados obtenidos, se puede concluir que el Erlotinib no induce muerte asociada a marcadores de muerte inmunogénica en líneas celulares con mutaciones en *EGFR*, ya que la ausencia de alguno o más marcadores es suficiente para no inducir la respuesta inmune antitumoral. Con esta información, es necesario estudiar si los otros compuestos de la familia de los TKI empleados en el tratamiento del NSCLC inducen muerte asociada a marcadores de muerte inmunogénica.

Por otro lado, se ha reportado que en pacientes con NSCLC, el tratamiento intercalado entre TKI y quimioterapia a base de compuestos platinados favorece la sobrevida total y la sobrevida libre de progresión (La Salvia, A.; Rossi, A.; *et al.* 2017). A pesar de ello, no existen estudios que reporten este fenómeno *in vitro*. En nuestro estudio reportamos por primera vez el efecto que tiene la adición secuencial de estos compuestos en las líneas celulares con mutaciones en *EGFR*, el cual está asociado a la inducción de muerte necrótica sin la expresión de algunos marcadores de muerte inmunogénica. Sin embargo, encontramos resultados distintos en las líneas celulares sensibles a los TKI, ya que en la línea celular HCC4006 obtuvimos un mayor efecto con respecto a la línea celular HCC827. La baja expresión del miRNA-451 se asocia con resistencia al CDDP (Bian, H.; Pan, X.; *et al.* 2011), lo cual podría estar explicando el distinto efecto del CDDP en las líneas celulares HCC827 y HCC4006. Sin embargo, es necesario estudiar en estas líneas celulares otros mecanismos de resistencia al CDDP tales como la expresión de los receptores MDR o de los mecanismos que inactivan al CDDP en la célula. Así mismo, sería importante estudiar las diferencias moleculares y genéticas en ambas líneas celulares. De esta manera se podría predecir, con base en las posibles alteraciones, si existe o no mayor efecto del tratamiento secuencial y poder trasladar este conocimiento a pruebas pre-clínicas y de ser exitosas podría llevarse a estudios clínicos.

## CONCLUSIONES

- En la línea celular A549, el CDDP indujo muerte por apoptosis asociada a la expresión de marcadores de muerte inmunogénica. Se requieren de estudios funcionales que permitan evaluar la activación de la respuesta inmune antitumoral.
- En las líneas celulares HCC827 y HCC4006, el Erlotinib indujo muerte por apoptosis no asociada a la expresión de marcadores de muerte inmunogénica. Se requiere investigar si otros compuestos TKI inducen muerte inmunogénica.
- En las líneas celulares sensibles a los TKI, la adición secuencial de Erlotinib-CDDP indujo muerte necrótica no asociada a la expresión de marcadores de muerte inmunogénica. Estudios adicionales que profundicen en las diferencias genéticas y moleculares que permitirán predecir el efecto del esquema secuencial.

## LITERATURA CITADA

1. Collisson, E., Campbell, J., Brooks, A., et al. (2014). "Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma." *Nature* **511**: 543-550.
2. Aranda, F., Bloy, N., Pesquet, J., et al. (2015). "Immune-dependent antineoplastic effects of cisplatin plus pyridoxine in non-small-cell lung cancer." *Oncogene* **34**: 3053-3062.
3. Arrieta, O., Cardona, A., Bramuglia, G., et al. (2011). "Genotyping non-small cell lung cancer (NSCLC) in Latin America." *J Thorac Oncol* **6**: 1955-1959.
4. Ashkenazi, A., Salvesen, G (2014). "Regulated cell death: signaling and mechanisms." *Annu Rev Cell Dev Biol* **30**: 337-356.
5. Barrett, J. (1993). "Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment." *Environ Health Perspect* **100**: 9-20.
6. Bian, H., Pan, X., Yang, J., et al. (2011). "Upregulation of microRNA-451 increases cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cell line (A549)." *J Exp Clin Cancer Res* **30**: 20-20.
7. Bradbury, A., Simmons, T., Slater, K., et al. (2000). "Measurement of the ADP:ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis." *J Immunol Methods* **240**: 79-92.
8. Casares, N., Pequignot, M., Tesniere, A., et al. (2005). "Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death." *J Exp Med* **202**: 1691-1701.
9. Croce, C. (2008). "Oncogenes and Cancer." *N Engl J Med* **358**: 502-511.
10. Czabotar, P., Lessene, G., Strasser, A., et al. (2014). "Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 49-63.
11. da Cunha Santos, G., Shepherd, F., Tsao, M. (2011). "EGFR mutations and lung cancer." *Annu Rev Pathol* **6**: 49-69.
12. Di Blasio, S., Wortel, I., Bladel, D., et al. (2016). "Human CD1c(+) DCs are critical cellular mediators of immune responses induced by immunogenic cell death." *Oncoimmunology* **5**: e1192739.
13. Ettinger, D., Akerley, W., Borghaei, H., et al. (2012). "Non-small cell lung cancer." *J Natl Compr Canc Netw* **10**: 1236-1271.
14. Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J., et al. (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." *Cell Death Differ* **19**: 107-120.

15. Gardai, S., McPhillips, K., Frasch, S., et al. (2005). "Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte." *Cell* **123**: 321-334.
16. Garg, A., Dudek-Peric, A., Romano, E., Agostinis, P. (2015). "Immunogenic cell death." *Int J Dev Biol* **59**: 131-140.
17. Garg, A., Nowis, D., Golab, J., et al. (2010). "Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation." *Biochim Biophys Acta* **1805**: 53-71.
18. Gong, Y., Somwar, R., Politi, K., et al. (2007). "Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas." *PLoS Med* **4**: e294.
19. Gower, A., Wang, Y., Giaccone, G. (2014). "Oncogenic drivers, targeted therapies, and acquired resistance in non-small-cell lung cancer." *J Mol Med (Berl)* **92**: 697-707.
20. Green, D., Ferguson, T., Zitvogel, L., Kroemer G. (2009). "Immunogenic and tolerogenic cell death." *Nat Rev Immunol* **9**: 353-363.
21. Gridelli, C., Rossi, A., Carbone, P., et al. (2015). "Non-small-cell lung cancer." *Nat Rev Dis Primers* **1**: 15009.
22. Hanahan, D., Weinberg R. (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**: 57-70.
23. Hanahan, D., Weinberg R. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**: 646-674.
24. Huether, A., Hopfner, M., Sutter, A., et al. (2005). "Erlotinib induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular cancer cells and enhances chemosensitivity towards cytostatics." *J Hepatol* **43**: 661-669.
25. Huo, H., Zhou, Z., Wang, B., et al. (2014). "Dramatic suppression of colorectal cancer cell growth by the dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD-2014." *Biochem Biophys Res Commun* **443**: 406-412.
26. Jain, M., Paczulla, A., Klönisch, T., et al. (2013). "Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development." *J Cell Mol Med* **17**: 12-29.
27. Kepp, O., Senovilla, L., Vitale, I., et al. (2014). "Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death." *Oncoimmunology* **3**: e955691.
28. Kroemer, G., Marino, G., Levine, B. (2010). "Autophagy and the integrated stress response." *Mol Cell* **40**: 280-293.
29. Krysko, D., Garg, A., Kaczmarek, A., et al. (2012). "Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **12**: 860-875.

30. La Salvia, A., Rossi, A., Galetta, D., et al. (2017). "Intercalated Chemotherapy and Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors for Patients With Advanced Non-Small-cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis." *Clin Lung Cancer* **18**: 23-33.
31. Li, J., Yuan J. (2008). "Caspases in apoptosis and beyond." *Oncogene* **27**: 6194-6206.
32. Li, Y., Lam, S., Mak, J. et al. (2013). "Erlotinib-induced autophagy in epidermal growth factor receptor mutated non-small cell lung cancer." *Lung Cancer* **81**: 354-361.
33. Liang, C., Liu, L., Shiu, L., et al. (2004). "Action of solamargine on TNFs and cisplatin-resistant human lung cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* **322**: 751-758.
34. Luthi, A., Martin S. (2007). "The CASBAH: a searchable database of caspase substrates." *Cell Death Differ* **14**: 641-650.
35. Macleod, K. (2000). "Tumor suppressor genes." *Curr Opin in Genet Dev* **10**: 81-93.
36. Martins, I., Tesniere, A., Kepp, O., et al. (2009). "Chemotherapy induces ATP release from tumor cells." *Cell Cycle* **8**: 3723-3728.
37. Massarelli, E., Johnson, F., Erickson, H., et al. (2013). "Uncommon epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer and their mechanisms of EGFR tyrosine kinase inhibitors sensitivity and resistance." *Lung Cancer* **80**: 235-241.
38. Matsumoto, M., Nakajima, W., Seike, M., et al. (2016). "Cisplatin-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer cells is dependent on Bax- and Bak-induction pathway and synergistically activated by BH3-mimetic ABT-263 in p53 wild-type and mutant cells." *Biochem Biophys Res Commun* **473**: 490-496.
39. Minna, J., Roth, J., Gazdar, A. (2002). "Focus on lung cancer." *Cancer Cell* **1**: 49-52.
40. Molina, J., Yang, P., Cassivi, S., et al. (2008). "Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship." *Mayo Clin Proc* **83**: 584-594.
41. Mollberg, N., Surati, M., Demchuk, C., et al. (2011). "Mind-mapping for lung cancer: towards a personalized therapeutics approach." *Adv Ther* **28**: 173-194.
42. Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., et al. (2007). "Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death." *Nat Med* **13**: 54-61.
43. Pallis, A., Syrigos, K. (2013). "Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in the treatment of NSCLC." *Lung Cancer* **80**: 120-130.
44. Qian, X., Li, J., Ding, J., et al. (2009). "Erlotinib activates mitochondrial death pathways related to the production of reactive oxygen species in the human non-small cell lung cancer cell line A549." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**: 487-494.

45. Roskoski, R. (2014). "ErbB/HER protein-tyrosine kinases: Structures and small molecule inhibitors." *Pharmacol Res* **87**: 42-59.
46. Ruiz-Godoy, L., Rizo Rios, P., Sanchez Cervantes, F., et al. (2007). "Mortality due to lung cancer in Mexico." *Lung Cancer* **58**: 184-190.
47. Scaltriti, M., Baselga, J. (2006). "The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy." *Clin Cancer Res* **12**: 5268-5272.
48. Shan, F., Shao, Z., Jiang, S., Cheng, Z. (2016). "Erlotinib induces the human non-small-cell lung cancer cells apoptosis via activating ROS-dependent JNK pathways." *Cancer Med* **5**: 3166-3175.
49. Soria, J., Mok, T., Cappuzzo, F. Janne, P. (2012). "EGFR-mutated oncogene-addicted non-small cell lung cancer: current trends and future prospects." *Cancer Treat Rev* **38**: 416-430.
50. Sun, Y., Peng, Z. (2009). "Programmed cell death and cancer." *Postgrad Med J* **85**: 134-140.
51. Takeuchi, S., Yano, S. (2014). "Clinical significance of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: sensitivity and resistance." *Respir Investig* **52**: 348-356.
52. Tang, D., Kang, R., Zeh, H., Lotze, M. (2010). "High-mobility group box 1 and cancer." *Biochim Biophys Acta* **1799**: 131-140.
53. Tanida, S., Mizoshita, T., Ozeki, K., et al. (2012). "Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment." *Int J Surg Oncol* **2012**: 862879.
54. Tesniere, A., Schlemmer, F., Boige, V., et al. (2010). "Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin." *Oncogene* **29**: 482-491.
55. Torre, L., Siegel, R., Jemal, A. (2016). "Lung Cancer Statistics." *Adv Exp Med Biol* **893**: 1-19.
56. Torti, D., Trusolino, L. (2011). "Oncogene addiction as a foundational rationale for targeted anti-cancer therapy: promises and perils." *EMBO Mol Med* **3**: 623-636.
57. Yamasaki, F., Zhang, D., Bartholomeusz, C., et al. (2007). "Sensitivity of breast cancer cells to erlotinib depends on cyclin-dependent kinase 2 activity." *Mol Cancer Ther* **6**: 2168-2177.
58. You, J., Jones, P. (2012). "Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?" *Cancer Cell* **22**: 9-20.
59. Zhang, R., Li, Y., Wang, Z., et al. (2015). "Interference with HMGB1 increases the sensitivity to chemotherapy drugs by inhibiting HMGB1-mediated cell autophagy and inducing cell apoptosis." *Tumour Biol* **36**: 8585-8592.

60. Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., et al. (2006). "An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor." *Cell* **125**: 1137-1149.
61. Zheng, H., Chen, J., Yu, X., et al. (2016). "HMGB1 Enhances Drug Resistance and Promotes In Vivo Tumor Growth of Lung Cancer Cells." *DNA Cell Biol* **35**: 622-627.
62. Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Kroemer, G. (2008). "Immunological aspects of cancer chemotherapy." *Nat Rev Immunol* **8**: 59-73.