

Estudio de marcadores de muerte inmunogénica en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar tratadas con agentes terapéuticos.

Chávez-Domínguez R, Aguilar-Cázares D, Prado-García H, Islas-Vázquez L, López-González J. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Departamento de Enfermedades Crónico-Degenerativas, Laboratorio de Cáncer Pulmonar. Calzada de Tlalpan N° 4502, Col. Sección XVI, Delegación Tlalpan, Ciudad de México, C.P 14080. 54871703. rodolfo_chvz@outlook.com

Introducción. El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial. El adenocarcinoma es el histotipo más frecuente, siendo la quimioterapia a base de compuestos platinados el tratamiento estándar. Diferentes estudios reportan que los pacientes cuyos tumores presentan mutaciones en *EGFR*, tienen mejor respuesta al tratamiento con inhibidores de tirosina cinasas (TKI's) que a la quimioterapia convencional. El Erlotinib, un TKI reversible, en líneas celulares sensibles induce arresto en el ciclo celular y apoptosis. Estos eventos biológicos también son inducidos por el Cisplatino (CDDP). Estudios previos reportan que algunos fármacos citotóxicos inducen una modalidad de muerte celular llamada muerte celular inmunogénica (ICD), la cual activa a la respuesta inmune antitumoral. La ICD requiere de la expresión espacio-temporal de tres marcadores moleculares, conocidos como los marcadores de la ICD. En tiempos iniciales, la calreticulina es expuesta en la membrana. Posteriormente, el ATP citosólico y la proteína nuclear HMGB1 son liberados. Hasta la fecha, no existen reportes que indiquen si el Erlotinib o el CDDP en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar con mutaciones en *EGFR* o con el gen silvestre, respectivamente, inducen ICD.

Materiales y métodos. Las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar HCC827, HCC4006 (deleción en exón 19 de *EGFR*) y A549 (gen silvestre del *EGFR*) se obtuvieron de la ATCC. El Erlotinib se obtuvo de Sequoin Research Products y el CDDP se obtuvo de Sigma. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos y se trataron con diluciones seriadas de los compuestos. El efecto citotóxico fue evaluado empleando el ensayo del MTT. Las líneas celulares HCC827 y HCC4006 fueron tratadas por 48 h con Erlotinib, la línea celular A549 fue tratada con CDDP por 24 h y la CL_{50} fue calculada. Para cumplir el objetivo de estudiar si estos compuestos citotóxicos inducen la ICD, se adicionó una concentración de fármacos citotóxicos que indujera el 80 % de inhibición. Las células apoptóticas y necróticas se cuantificaron empleando el ensayo de Anexina V-yoduro de propidio y la actividad de la caspasa-3 se detectó por fluorometría. Como marcadores de la ICD, se estudiaron la relación ADP/ATP (luminometría), la HMGB1 (cuantificada por ELISA) y la exposición de calreticulina en membrana (citometría de flujo y microscopía confocal).

Resultados. En las líneas celulares HCC827 y HCC4006, el Erlotinib a bajas concentraciones indujo arresto en las fases del ciclo celular G_0/G_1 . Sin embargo, a altas concentraciones, el Erlotinib indujo muerte por apoptosis mediada por la activación de la caspasa-3, incremento en el valor de la relación ADP/ATP y liberación de la HMGB1 (línea HCC827). En tiempos previos al evento de muerte, no se detectó la exposición de calreticulina en la membrana. En la línea celular A549, el CDDP indujo muerte celular por apoptosis mediada por la activación de la caspasa-3, incremento en el valor de la relación ADP/ATP y liberación de HMGB1. La calreticulina en membrana se detectó expuesta en membrana como pequeños puntos.

Conclusiones. En líneas celulares con mutaciones en *EGFR*, el erlotinib indujo muerte celular no inmunogénica. En líneas celulares con el gen silvestre para *EGFR*, el CDDP indujo muerte celular inmunogénica.