

Caracterización del perfil quimiosensibilidad y del estado de ampliación génica de un panel de líneas celulares de origen tumoral pulmonar

Characterization of chemosensitivity profile gene amplification status of a panel of lung cancer cell lines

Sandra Johanna Morantes*, Sandra Perdomo**, Edward Fabián Carrillo***, Fabio Aristizábal****

Resumen

En este trabajo se presentan los resultados de un análisis de ampliación génica y de sensibilidad a fármacos antineoplásicos, realizado para un panel de líneas celulares de origen tumoral pulmonar. Para los ensayos de quimiosensibilidad las células fueron tratadas durante 48 h con concentraciones variables de taxol, cisplatino, doxorubicina y 5-fluoracilo. La citotoxicidad de los fármacos se cuantificó usando el ensayo de reducción de resazurina y se reportó en valores de concentración inhibitoria 50 (CI₅₀). Para los análisis de ampliación génica se emplearon sondas TaqMan® dirigidas contra los genes *AKT2*, *PIK3CA*, *ERBB2*, *EGFR*, *c-REL* y genes de la familia *MYC*. El número de copias para cada gen fue calculado usando el método de doble delta Ct, empleando *ACTB* como gen de referencia y la línea MRC-5 como muestra control. Los resultados mostraron que la viabilidad de todas las líneas celulares se afectó por el tratamiento con taxol, cisplatino y doxorubicina, pero no con el tratamiento con 5-fluoracilo. Las CI₅₀ calculadas se ubicaron entre $0,38 \pm 0,03 \mu\text{M}$ y $111,3 \pm 3,58 \mu\text{M}$, siendo el taxol y la doxorubicina los fármacos más potentes. Del panel evaluado las células NCI-H292 resultaron ser las más sensibles y las células LSPG8G las más resistentes a los fármacos. Interesantemente en las células NCI-H292 ningún gen se encontró amplificado; por el contrario en las células LSPG8G los genes *cMYC*, *MYCN*, *MYCL* y *AKT2* mostraron un aumento en el número de copias con respecto al de las células control. Estos resultados sugieren que eventos de ampliación génica podrían contribuir con el fenómeno de quimioresistencia en líneas celulares de cáncer de pulmón, sin embargo otros estudios deben realizarse para confirmar esta hipótesis.

Palabras clave: cáncer de pulmón, citotoxicidad *in vitro*, dosis génica, NCI-H292, LSPG8G.

Abstract

In this paper, we show results of anticancer drug sensitivity assays and studies of gene amplification performed for a panel of lung cancer cell lines. For the chemosensitivity assays the cells were treated for 48 h with different concentrations of taxol, cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil. The cytotoxic effect of each drug was determined using the resazurin reduction assay and reported in terms of inhibitory concentration 50 (IC₅₀). For the analysis of gene amplification we used TaqMan® probes designed against *AKT2*, *PIK3CA*, *ERBB2*, *EGFR*, *REL* and *MYC* family members. Copy number for each gene was calculated using the delta-delta-CT method, employing *ACTB* as reference gene and MRC-5 cell line as control sample. In the chemosensitivity assays, we observed a clear decrease in cell viability in the cells treated with taxol, cisplatin and doxorubicin but not in the cells treated with 5-fluorouracil. IC₅₀ values ranging between $0,38 \pm 0,03 \mu\text{M}$ and $111,3 \pm 3,58 \mu\text{M}$,

* PhD Ciencias Farmacéuticas, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. sjmorantesm@unal.edu.co

** PhD Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Javeriana, Unidad de Investigación Básica Oral, Universidad El Bosque. sperdomo@javeriana.edu.co

*** PhD Ciencias Farmacéuticas, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Libre-Cali. efcarrillo@unal.edu.co

**** PhD en Ciencias Biológicas, Profesor Titular, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. faaristizabal@unal.edu.co

being the taxol and doxorubicin the most potent drugs. NCI-H292 cell line was the most sensitivity and LSPG8G cell line was the most resistant. Interestingly, NCI-H292 cells did not show increase in the copy numbers for the gene evaluated, in contrast, we observed changes in the gene dosage for *cMYC*, *MYCN*, *MYCL* and *AKT2* in LSPG8G cells. These results suggest that gene amplification could contribute to drug resistance in lung cancer cell lines; however, more studies are needed to confirm this hypothesis.

Key words: lung cancer, *in vitro* cytotoxicity, gene dosage, NCI-H292, LSPG8G.

Recibido: noviembre 28 de 2012 **Aprobado:** junio 15 de 2013

Introducción

Las líneas celulares derivadas desde tumores humanos han constituido uno de los modelos preclínicos más empleados para estudiar las bases genéticas y moleculares del cáncer de pulmón. Antes de su establecimiento, la mayoría de las investigaciones alrededor de esta enfermedad progresaban lentamente, sin embargo con su desarrollo, hoy ya se conocen diferentes cambios a nivel molecular relacionados con la transformación tumoral, el desarrollo de metástasis y la aparición de quimioresistencia (Miller, 2005).

La quimioresistencia es uno de los principales obstáculos para el tratamiento del cáncer de pulmón (ŠKarda *et al.*, 2008) y puede presentarse en respuesta al tratamiento (resistencia adquirida) o al momento del diagnóstico (resistencia intrínseca). La selección de clones quimioresistentes a partir de líneas celulares expuestas a concentraciones crecientes de fármacos antitumorales, es una de las aproximaciones más empleadas para estudiar la resistencia adquirida. En estos ensayos un criterio que define las diferencias entre la sensibilidad de la línea parental (no tratada) y la línea resistente (tratada), es el valor de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀). Sin embargo, para realizar estas comparaciones hay ciertos aspectos que deben considerarse, pues se ha demostrado que este valor, puede cambiar dependiendo de los tiempos de duplicación de la línea celular empleada, los tiempos de exposición al fármaco, el número de células tratadas y el método usado para cuantificar la viabilidad celular (Sumantran, 2011; Ari *et al.*, 2010; Zumpe *et al.*, 2010; Ulukaya *et al.*, 2008).

La amplificación génica es uno de los mecanismos más frecuentes de activación de oncogenes en los tumores sólidos (Starczynowski *et al.*, 2011). Es un evento a nivel celular que se caracteriza por un incremento en el número de copias de un gen o región cromosómica y se asocia comúnmente con sobreexpresión de los genes implicados (Albertson, 2006).

En cáncer de pulmón y otros tumores sólidos se ha reportado que los oncogenes *MYC*, *MYCN*, *MYCL*, *EGFR*, *AKT-2*, *ERBB2*, *PIK3CA* y *REL* pueden estar amplificados (Santarius *et al.*, 2010; Alvarez *et al.*, 2012). Por otro lado, la relación de dosis génica y respuesta a fármacos se ha establecido en algunos trabajos, aunque la mayoría se enfocan en genes que codifican para dianas terapéuticas (Cappuzzo *et al.*, 2005) y/o proteínas transportadoras (Yasui *et al.*, 2004).

En este trabajo se establecieron las condiciones para realizar pruebas de quimiosensibilidad a 48 h de exposición, usando líneas celulares de cáncer de pulmón con diferentes tiempos de duplicación y empleando el ensayo de reducción de resazurina como método indirecto para evaluar viabilidad celular. Se compara el perfil de sensibilidad frente a fármacos antineoplásicos con diferentes mecanismos de acción y se caracteriza el estado de amplificación génica (número de copias promedio por genoma) para el grupo de oncogenes atrás descritos. Al final se identifican líneas celulares sensibles y resistentes a quimioterapéuticos y se presentan resultados que pueden servir de soporte para comenzar estudios de amplificación génica en modelos *in vitro* de resistencia adquirida.

Materiales y métodos

Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se emplearon las líneas celulares LSPG8G (aislada en el laboratorio a partir de un carcinoma anaplásico de célula grande) A549 (adenocarcinoma), NCI-H520 (carcinoma escamocelular), NCI-H727 (carcinoma), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide), NCI-H460 (carcinoma anaplásico de célula grande) y MRC-5 (fibroblastos normales de pulmón). Todas las células fueron propagadas en frascos de cultivo celular de 75 cm², a 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂ y medio RPMI-1640, suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino, penicilina 100 U/ml y estreptomycin a 100 mg/ml.

Fármacos

Se emplearon las formas comerciales de los fármacos: paclitaxel, cisplatino, doxorubicina HCl y 5-fluorouracilo. Se evaluaron cinco diluciones seriadas en diferentes rangos de concentración y cada dilución se evaluó por triplicado. La concentración de partida se modificó dependiendo del fármaco, para el taxol la concentración inicial fue de 100 μM , para cisplatino, doxorubicina y 5-fluorouracilo fue de 300 μM .

Selección de densidades de trabajo para los ensayos de quimiosensibilidad

Para garantizar un crecimiento exponencial de las células durante el tiempo de exposición a los fármacos, se calculó la densidad celular óptima de trabajo. Para calcularla, se tuvo en cuenta el tiempo de duplicación poblacional de las células, el porcentaje de confluencia en las placas de 96 pozos después de 48 h y 72 h de cultivo y los resultados de linealidad obtenidos a partir del ensayo de reducción de resazurina. La densidad se seleccionó a partir de un grupo de 6 densidades (5×10^3 , $7,5 \times 10^3$, $12,5 \times 10^3$, $1,5 \times 10^4$ y 2×10^4 células por pozo). Cada densidad celular fue sembrada en triplicado usando 100 μl de medio de cultivo, e incubadas bajo las mismas condiciones en las que se realizan los ensayos de quimiosensibilidad (descritos adelante). Luego se realizó el ensayo de reducción de resazurina y se verificó si se mantenía una relación lineal entre la fluorescencia emitida por las células que metabolizaron la resazurina y las densidades sembradas en los pozos.

Ensayos de Quimiosensibilidad

Las células en fase de crecimiento exponencial, fueron tripsinizadas, contadas en cámara de Neubauer y sembradas en las densidades celulares seleccionadas. Las placas se incubaron por 24 h a 37°C para permitir la adhesión al soporte. Transcurrido este tiempo la monocapa celular fue expuesta durante 48 h a 100 μL de las diluciones de cada fármaco. Luego se cuantificó el efecto citotóxico mediante el ensayo de reducción de resazurina. Cada ensayo de quimiosensibilidad se realizó por triplicado, en semanas diferentes.

Ensayo de reducción de resazurina

Para realizar este ensayo el medio con los tratamientos se reemplazó por 100 ml de medio con resazurina a una concentración final de 44 μM . Las placas se incubaron por 4 horas y la fluorescencia emitida por las células viables y/o metabólicamente activas se cuantificó usando un espectrofluorómetro

a una longitud de onda de excitación de 535 y una de emisión de 595 (O'Brien *et al.*, 2000). Las unidades de fluorescencia emitidas por las células tratadas se transformaron a porcentajes de supervivencia normalizando con las unidades de fluorescencia emitidas por las células control (células sin tratamiento). En todos los casos se asumió un 100% de supervivencia en las células sin tratamiento, al final la respuesta celular se graficó en función del logaritmo de la concentración y a partir de la curva dosis-respuesta se calcularon los valores de CI_{50} , usando el programa estadístico GraphPad Prism® versión 5 (GraphPad Software Inc).

Extracción de ADN genómico para análisis moleculares

Las células en un 80% de confluencia fueron lavadas con PBS y tratadas con una solución de tripsina (0,025%) - EDTA (0,03%) durante 5 minutos. La suspensión obtenida se centrifugó a 1200 rpm x 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El botón celular obtenido se resuspendió en 200 μl de una solución de Tris-HCl 50mM pH 8,0, acetato de calcio 2 mM con 200 μg de proteinasa K. La mezcla se incubó a 55°C por una hora y luego a 95°C por 5 minutos para inactivar la enzima. Inmediatamente después el ADN se recuperó por extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitación con etanol. Su cuantificación se realizó por métodos espectrofotométricos.

Análisis de número de copias o dosis génica

Los análisis se realizaron por PCR en tiempo real empleando el sistema ABI® 7500 Prism (Applied Biosystems), en un volumen final de 25 μl y en mezclas de reacción multiplex preparadas con 0,04 μM de cebadores, 0,375 μM de sondas, 1x de Master Mix y 20ng de ADN. El programa de PCR utilizado para la detección de los fragmentos incluyó un ciclo de 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos 15 s a 95°C y 1 min a 61°C. La dosis génica fue determinada empleando el método comparativo de doble delta Ct ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$). En todos los ensayos se usó el gen *ACTB* como gen referencia y ADN de las células MRC-5 (fibroblastos normales de pulmón) como muestra control. Un valor de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ mayor a 2 se consideró como amplificación génica (Huang *et al.*, 2007). La secuencia de las sondas TaqMan® y los cebadores usados en este ensayo se reportan en estudios previos (Perdomo *et al.*, 2012; Alvarez *et al.*, 2012) y se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de cebadores y sondas Taqman empleadas para la cuantificación de dosis génica por PCR multiplex.

GEN	SONDA (5'- 3')	CEBADOR DERECHO(5'- 3')	CEBADOR IZQUIERDO (5'- 3')
ERBB2	(Tamra) ATCCGTCCGCCTCAGCCTCCAAA (Hex)	GTCTTGAACCTCCACCTCAG	ACAGACGGTACACACTTTAAAGG
EGFR	(Fam) AACTAACCGCCGCCAGCACCACC (Tamra)	GACCTGGGAGCTGGGAGAAC	ACCTGCCTTTTGCCAACGAG
AKT2	(Tamra) ACCACGAGCCACGGAAGCCAGTCA (Rox)	AGACCTGGGCTGGTGTGTG	CAGACTGTGGGACCTTCTCTC
MYC	(Tamra) ACCAGCAGCAGCAGCAGAGCGA (Rox)	TCTACTGCGACGAGGAGGAG	GCAGCAGCTCGAATTCTTCC
MYCN	(Tamra) CGCCGCTTCCACAGTGACCACG (Hex)	AGGAAGATGAAGAGGAAGAAATCG	TGACAGCCTTGGTGTGGAG
MYCL1	(Tamra) ACCTGGAGACACCTGGACACGCC (Tamra)	CCTAAGAGACCTCAAGCCAGTG	CCAGATATGGGGCTCATAACACC
REL	(Tamra)TCCTGCCTTTGCTCAGCTGCTT (Rox)	GGATTTGGCAAGGTGAGTGG	ACAGCATTTAACATGCATTAGCC
PI3KCA	(Tamra)AGTGCCGCTGCTGCTCCGACAAC (Joe)	AGCAGACCCAGTACCTGTCC	AGGGTTGGTCTTCTATGAGAATC
ACTB	(Tamra) TTGCCTCCCGCCCGTCCCG (Fam)	CCGCTTCCCCTCCATCGTG	GGCTCCTGTGCAGAGAAAGC

Resultados

Selección de densidades de trabajo para ensayos quimiosensibilidad

Al graficar las unidades relativas de fluorescencia (URF) en función de las densidades celulares se determinó que las líneas LSPG8G, NCI-H292, NCI-H520 y NCI-H727 después de 72 h de crecimiento continuo, muestran una respuesta lineal frente a la reducción de resazurina cuando se siembran entre 5000 y 20000 células por pozo (figura 1). Para la línea A549 se mantiene la tendencia lineal solo entre 5000 y 12500 células por pozo. En densidades mayores se pierde esta tendencia y a las 48 h se observa un 100% de confluencia, un nivel que no garantiza el crecimiento exponencial de las células durante el tiempo de tratamiento y por tanto la confiabilidad de los resultados de

los ensayos de citotoxicidad. Para el resto de las líneas, en densidades menores a 15000 células por pozo, se observaron niveles de confluencia entre un 50 - 70% a las 48 h y entre el 70 y 95% a las 72 h de cultivo; la mayor confluencia a las 72 h se observa para las células con mayor tamaño (LSPG8G) y con tiempos de duplicación cortos (A549). La menor confluencia se observó para la línea NCI-H520, una línea con un tiempo de duplicación de 61 h y en general más pequeña que el resto de células del panel. En el tabla 2 se resumen los resultados del análisis de linealidad, se muestran los valores R^2 y los porcentajes de confluencia observados a las 72 h de cultivo para las densidades de trabajo seleccionadas. Una densidad de trabajo de 15000 células por pozo se recomendó para las células NCI-H460 en un estudio previo (Prieto & Aristizábal, 2009).

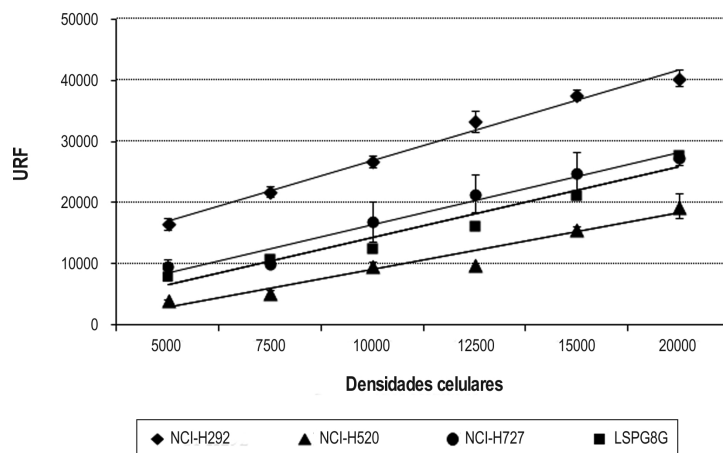


Figura 1. Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) en función del número de células por pozo. Fluorescencia (tex 535 nm y tem 595 nm) para las líneas LSPG8G (■), NCI-H520 (▲), NCI-H727 (●) y NCI-H292 (◆), después de 72 h de cultivo continuo. Cada punto en la grafica representa el promedio de tres repeticiones \pm el error estándar de la media.

Tabla 2. Relación de densidades celulares recomendadas para realizar ensayos de quimiosensibilidad en líneas celulares de cáncer de pulmón

Línea Celular	Tipo Histológico	R ² ¹	TDP ²	Densidad ³	Confluencia (%) ⁴
LSPG8G	Indiferenciado de Célula grande	0,95	48 h	10000	80-95%
NCI-H520	Escamocelular	0,95	61 h	15000	70-80%
NCI-H727	Carcinoide	0,97	48 h	10000	80-90%
NCI-H292	Mucoepidermoide	0,99	48 h	10000	80-90%
A549	Adenocarcinoma	0,97	22 h	5000	80-95%

1. Coeficientes de determinación que relacionan unidades relativas de fluorescencia en función de la densidad celular.
2. TDP. Tiempo de duplicación poblacional reportado por la ATCC. El TDP para LSPG8G fue calculado a partir de una curva crecimiento realizada durante 7 días.
3. Densidad sugerida para realizar ensayos de citotoxicidad en placas de 96 pozos y 48 h de exposición al xenobiótico.
4. Porcentajes de confluencia observados en los pozos después de 72 h de cultivo continuo.

Ensayos de quimiosensibilidad

Los resultados de tres experimentos independientes muestran que bajo nuestras condiciones de ensayo, los fármacos cisplatino, taxol y doxorubicina HCl, afectan la actividad metabólica de todas las líneas en rangos de concentración del orden μM . Al probar rangos del orden nanomolar, las células conservan la capacidad de metabolizar la resazurina y los valores de fluorescencia emitidos por las células tratadas son comparables a los valores observados en las células sin tratamiento. Cuando las células fueron tratadas con 5-fluoracilo, la reducción de la capacidad metabólica y/o viabilidad celular solo fue evidente en concentraciones mayores a 1mM.

En general la actividad citotóxica de los fármacos fue dependiente de la concentración, aunque no en todos los casos se observó una respuesta lineal. En la figura 2 se observa la tendencia de las curvas dosis-respuesta obtenidas para las células LSPG8G tratadas con taxol, cisplatino y doxorubicina. Una tendencia que fue similar en la mayoría de las líneas. En la figura 3 se grafica el comportamiento bifásico observado en las células A549 tratadas por 48 h con doxorubicina, una tendencia que fue reproducible sólo en esta línea. En cuanto a la sensibilidad frente a los fármacos se pudo ver que la línea NCI-H292 es una de las más sensibles, especialmente a taxol y doxorubicina y las células LSPG8G y NCI-H460 tienden a ser las más resistentes, especialmente a doxo-

rubicina. Los valores de las CI_{50} calculados para todas las líneas se muestran en la figura 4.

Análisis de amplificación génica (dosis génica)

Empleando el método de doble delta Ct, se calculó la dosis génica para *c-MYC*, *MYCN*, *MYCL*, *EGFR*, *AKT-2*, *ERBB2*, *PIK3CA* y *c-REL* para un panel de líneas celulares de origen tumoral pulmonar. Para validar el uso de este método previamente se verificó que la eficiencia de amplificación de los genes problema fuera comparable a la eficiencia del gen control (*ACTB*) (Perdomo *et al.*, 2012).

Los resultados mostraron que ningún gen se encuentra amplificado en las células A549 y NCI-H292, por el contrario un claro aumento en el número de copias fue observado para las líneas LSPG8G, NCI-H460, NCI-H520, NCI-H727, siendo común la amplificación de *MYCN* y *MYCL* en estas líneas. El mayor cambio en la dosis génica se registró para el gen *cMYC* en las células LSPG8G y para el gen *PIK3CA* en las células NCI-H460. Coincidentalmente en estas dos últimas líneas se observó el mayor número de genes amplificados y mostraron ser de las más resistentes del panel. En la tabla 3 se muestra la dosis génica calculada para todas las líneas celulares.

Discusión

Los análisis de quimiosensibilidad muestran que las líneas celulares responden diferente frente a los fár-

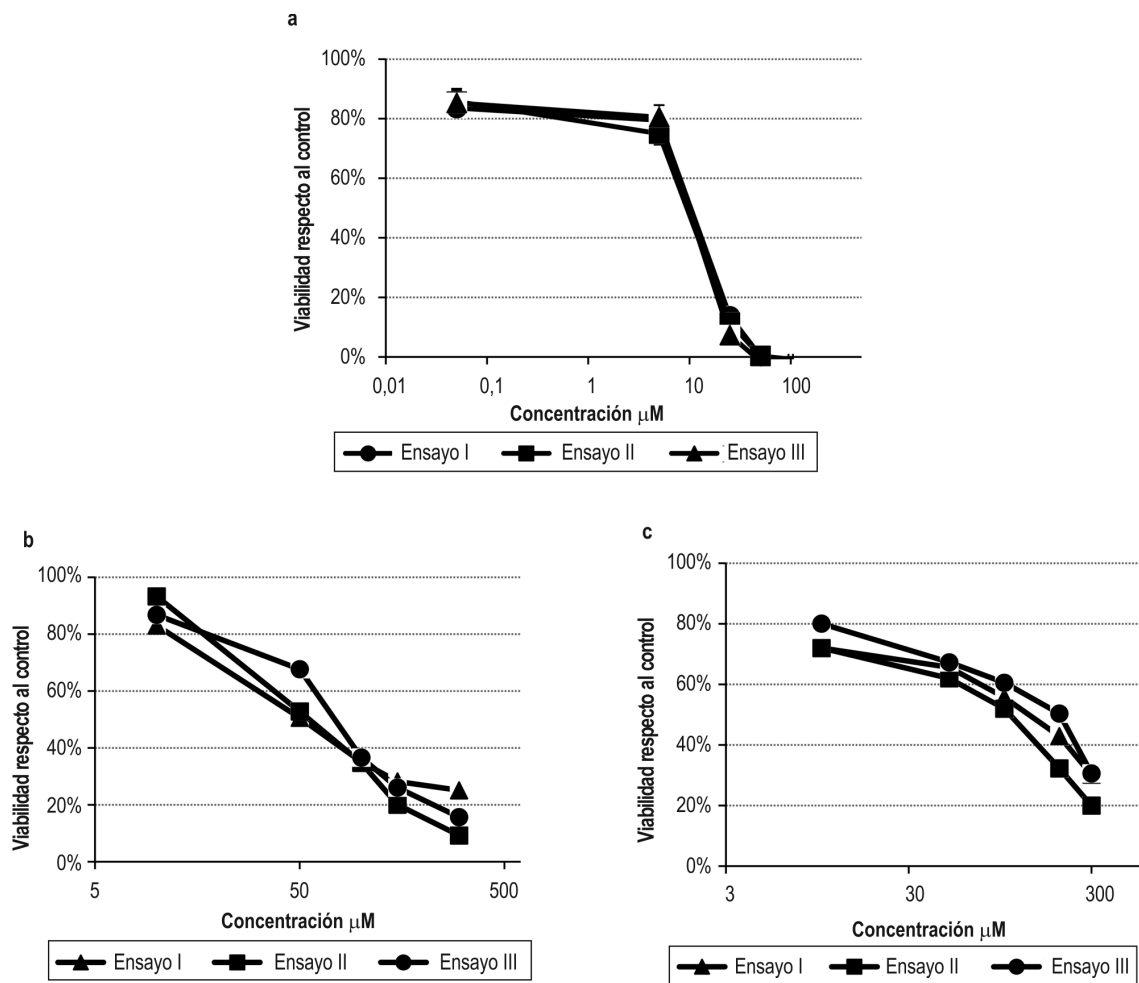


Figura 2. Porcentajes de Viabilidad en función del logaritmo de la concentración calculados para células LSPG8G después de 48 h de exposición a taxol, cisplatino y doxorubicina. a. Taxol. b. Cisplatino y c. Doxorubicina. Las curvas dosis - respuesta de los ensayos I, II y III representan experimentos realizados en semanas independientes y cada punto de la curva muestra el promedio de tres valores de supervivencia obtenidos para las diferentes concentraciones evaluadas. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.

macos. Bajo nuestras condiciones de ensayo, algunas líneas fueron muy sensibles a doxorubicina ($CI_{50} < 1 \mu M$), otras mostraron una sensibilidad intermedia frente taxol (CI_{50} entre 1 y 10 μM) y la mayoría fueron resistentes a 5-fluoracilo y cisplatino ($CI_{50} > 10 \mu M$) (Noro *et al.*, 2006; Søndergaard *et al.*, 2010).

Estas diferencias de sensibilidad y en general la respuesta *in vitro* frente a un fármaco o un xenobiótico, puede ser el resultado de una interacción entre diferentes variables, entre estas; las características de la línea, el mecanismo de acción del fármaco y las condiciones de ensayo. Dentro de las características de la línea vale la pena resaltar la influencia que pueden tener las alteraciones genéticas o epigenéticas que presentan las células, su origen tumoral primario, tipo histológico, los tiempos de duplicación poblacional y

hasta el número de pases en el que se encuentre la línea al momento del análisis.

Al comparar los valores de CI_{50} calculados en este trabajo con los publicados en la literatura, se observa que estos valores son más altos para algunas células. También fue evidente que las CI_{50} difieren entre estudios, aunque se utilice la misma línea y el mismo fármaco. Al parecer la densidad celular, el tiempo de exposición, el vehículo en el que se disuelve el compuesto y el ensayo que se use para cuantificar el efecto citotóxico (XTT, MTT, Resazurina, [3H] timidina, ensayo luminiscencia de ATP) también pueden influir sobre la determinación de los valores de CI_{50} (Zumpe *et al.*, 2010; Ulukaya *et al.*, 2008). Para el paclitaxel por ejemplo, algunas investigaciones muestran que este fármaco ejerce su actividad citotóxica sobre las células A549 en

Tabla 3. Dosis génica relativa al control MRC-5 para líneas celulares de cáncer de pulmón.

Líneas Genes	LSPG8G	A549	NCI-H292	NCI-H460	NCI-H520	NCI-H727
PIK3CA	0,40	0,26	0,41	40,08	1,32	1,65
REL	1,59	0,32	0,07	5,82	0,19	0,25
cMYC	146,56	0,59	0,12	1,36	0,14	0,84
MYCN	7,13	0,96	1,28	7,01	3,03	3,68
MYCL	5,52	1,38	1,50	3,11	8,91	3,34
AKT	2,88	0,84	0,07	0,43	0,23	0,24
EGFR	2,09	1,79	0,99	1,26	2,62	2,27
ERBB2	0,83	0,81	0,40	1,02	0,98	1,51

Valores con $2^{-\Delta\Delta Ct}$ mayor a 2 se consideró como amplificación génica.

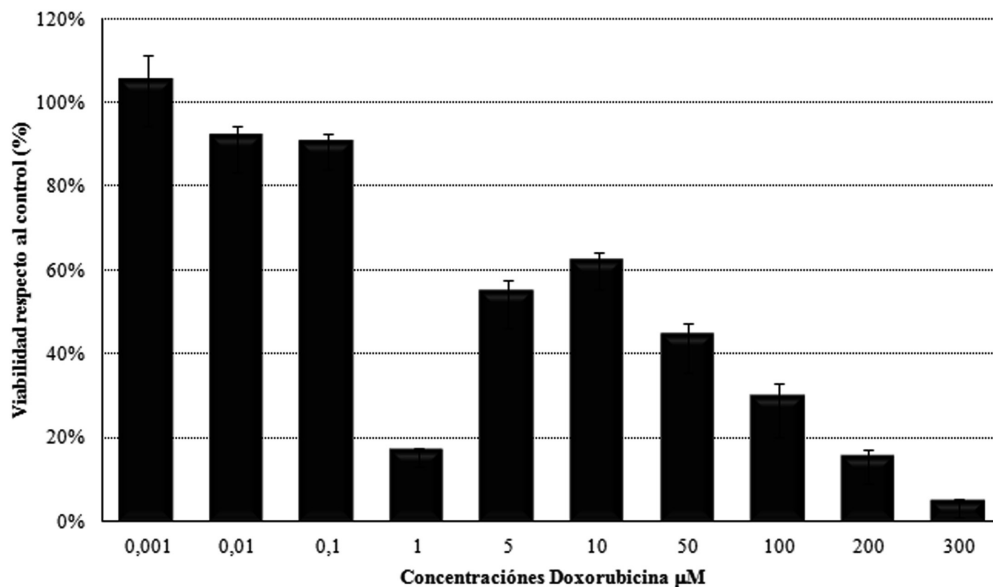


Figura 3. Respuesta bifásica de A549 frente a Doxorubicina. Viabilidad celular evaluada por el ensayo de reducción de resazurina, 48 h después de la exposición a 10 concentraciones diferentes de doxorubicina. Los resultados son presentados como la media de tres experimentos realizados en semanas diferentes \pm el error estándar de la media.

rangos del orden de nanomolar (Buey *et al.*, 2005; Breen *et al.*, 2008), otros trabajos reportan CI_{50} del orden micromolar (Ulukaya *et al.*, 2008). Por otro lado, Liebmann *et al.*, (1993) demuestran que la actividad citotóxica del paclitaxel es menor sobre A549 cuando las células son tratadas con el compuesto disuelto en Cremophor EL® (diluyente empleado en la formulación clínica) y mayor cuando está disuelto en DMSO; en contraste, Georgiadis

et al., (1997) demuestran que el vehículo no influye sobre la actividad citotóxica del paclitaxel. En nuestro estudio se empleó la formulación clínica de paclitaxel (disuelto Cremophor EL) y se obtuvieron valores de CI_{50} del orden (μM) para todas las líneas celulares.

La respuesta bifásica frente a un fármaco ha sido discutida previamente para varias líneas celulares (Yeung *et*

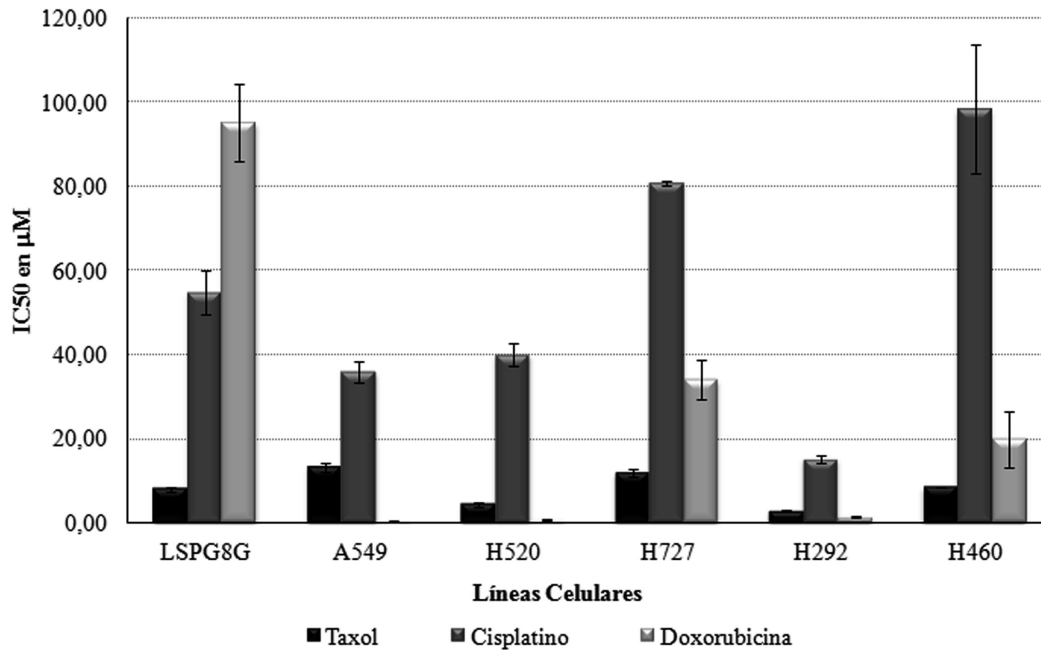


Figura 4. Perfil de sensibilidad de las células LSPG8G, A549, NCI-H520, NCI-H727, NCI-H292 y NCI-H460 tratadas durante 48 h con taxol, cisplatino y doxorubicina. Los resultados son presentados como la media de tres experimentos realizados en semanas diferentes \pm el error estándar de la media.

al., 1999), sin embargo la tendencia de la curva dosis respuesta observada para células A549 tratadas con doxorubicina no se encontró reportada previamente. Para el taxol se ha descrito que este comportamiento bifásico es un indicativo de que el fármaco puede estar ejerciendo su actividad citotóxica por dos mecanismos diferentes; apoptosis a bajas concentraciones y necrosis a altas concentraciones (Yeung *et al.*, 1999).

La amplificación génica es uno de los cambios genéticos más comunes que ocurre en las neoplasias humanas. En tumores y en líneas celulares se ha detectado con frecuencia un aumento en la dosis génica de genes que codifican para proteínas que participan en la inhibición de la apoptosis, favorecen la proliferación y/o estimulan el crecimiento celular. También se ha descrito que la magnitud del aumento en el número de copias puede depender del origen primario (colon, seno, pulmón, estómago, etc), del tipo histológico y que puede estar correlacionada con la agresividad de tumor (Knuutila *et al.*, 1998).

En este estudio las líneas celulares LSPG8G y NCI-H460, exhibieron el mayor número de genes amplificados e interesantes cambios en el número de copias para los genes *cMYC* y *PIK3CA*. Coincidentalmente las dos líneas fueron derivadas del mismo tipo histológico y mostraron los rangos más altos de quimioresistencia, especialmente a doxorubicina.

El oncogen *c-MYC* es un miembro de la familia *MYC*, relacionado funcionalmente con la síntesis de ADN (Mørkve *et al.*, 1992) y la regulación de la expresión de genes involucrados en crecimiento celular (Mitani *et al.*, 2001). Se ha visto amplificado en leucemias y linfomas (Mørkve *et al.*, 1992), en cáncer de pulmón de célula pequeña y carcinoma escamocelular, entre otros tumores (Mitani *et al.*, 2001; Carrillo *et al.*, 2009; Alvarez *et al.*, 2012). En nuestro estudio este gen se vio claramente amplificado en las células LSPG8G, una línea derivada desde un tumor anaplásico de célula grande, un tipo histológico, altamente indiferenciado y extremadamente agresivo (Pardo *et al.*, 2009) Los otros dos miembros de la familia *MYC*, los genes *MYCL* y *MYCN* mostraron un modesto cambio en el número de copias en cuatro de las seis líneas evaluadas. Estos genes se ha visto amplificados en neuroblastoma, retinoblastoma y también en muestras de cáncer de pulmón (Lu *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2012).

El gen *PIK3CA* codifica para una de las subunidades de la proteína PI3K y se ha reportado amplificado en tumores del tracto urinario, cáncer de ovario, cérvix y cabeza y cuello (Frendi *et al.*, 2009). La ganancia en el número de copias para este gen, se ha correlacionado con aumentos en la expresión de PI3K y respuesta a fármacos (Heinonen *et al.*, 2008).

Los genes EGFR y ERBB2 son dos miembros de la familia ERBB, que funcionan como receptores transmembrana y que junto con sus ligandos participan activamente en la estimulación del crecimiento y proliferación celular (Herbst *et al.*, 2008). El aumento en el número de copias para EGFR ha sido reportado para gliomas, cáncer de seno y de vejiga, también hay algunos reportes para cáncer de pulmón de célula pequeña (Knuutila *et al.*, 1998). La amplificación de EGFR ha sido relacionada con la respuesta a erlotinib y gefitinib, debido a que son fármacos que se asocian al dominio intracelular de este receptor (Pao *et al.*, 2004). En nuestro trabajo este gen se encontró amplificado en las células NCI-H520, una línea celular derivada de un carcinoma escamocelular. Para ERBB2 se ha descrito que se encuentra amplificado en cáncer de seno, ovario, estómago y colon (Knuutila *et al.*, 1998), en nuestro estudio este gen no se vio amplificado.

AKT es un gen serina/treonina que funciona como efector de la ruta de señalización activada por PIK-3CA, regula procesos celulares que controlan tamaño, crecimiento y proliferación celular y se ha encontrado amplificado en cáncer de seno y ovario (Cheng *et al.*, 1992; Bellacosa *et al.*, 1995). En cuanto a su relación con la sensibilidad a fármacos, se ha reportado que líneas celulares de pulmón, ovario y gliomas resistentes a cisplatino, activan constitutivamente el gen AKT y sugieren que esta activación puede ser un posible mecanismo de resistencia a cisplatino (Huang & Hung, 2009). En nuestros resultados las células en general muestran ser resistentes a cisplatino, sin embargo solo la línea LSPG8G muestra un ligero aumento en la dosis génica.

c-Rel es un importante factor de transcripción de la familia cRel/NF- κ B, participa activamente en la expresión de genes involucrados en el desarrollo, proliferación y supervivencia de células linfoides (Houldsworth *et al.*, 1996). El aumento en su dosis génica se ha asociado con el desarrollo de linfomas (Gilmore *et al.*, 2004) y algunos tumores sólidos (Romieu-Mourez *et al.*, 2003). En este trabajo se registró un aumento en el número de copias relativas de este gen para la línea NCI-H460, sin embargo no se encontraron otros reportes que soporten este resultado.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la línea NCI-H292 es una de las más sensibles a taxol, cisplatino y doxorubicina y la líneas LSPG8G y NCI-H460 son de las más resistentes, especialmente a doxorubicina. Los análisis moleculares sugieren que la amplificación génica puede ser una alteración frecuente en células resistentes, sin embargo otros análisis deben realizarse para probar esta hipótesis.

Referencias bibliográficas

- Ari, F., Ikitimur, E., Ulukayama, E. 2010. The ATP Assay, but not the MTT assay, Detects Further Cytotoxicity of the Combination of Anthracycline-based Therapy with Histone Deacetylase Inhibitor (Valproic Acid) in Breast Cancer Cells. *Turkish Journal of Biochemistry*. 35 (4): 293–299.
- Albertson, D. 2006. Gene Amplification in Cancer. *Trends in Genetics*. 22 (8): 447–455.
- Álvarez, A., Perdomo, S., Palacios, D., Cariillo, E., Garcia, L., Camacho, F., Ojeda, P., Aristizabal F. 2012. Detection of Gene Dosage in Circulating Free Plasma DNA as Biomarker for Lung Cancer. *Journal of Cancer Therapy*. 3: 343–351.
- Bellacosa, A., De Feo, D., Godwin, A. K., Bell, D. W., Cheng, J. Q., Altomare, D. A., *et al.* 1995. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *International Journal of Cancer*. 64: 280-285.
- Breen, L., Murphy, L., Keenan, J., Clynes, M. 2008. Development of Taxane Resistance in a Panel of Human Lung Cancer Cell Lines. *Toxicology in Vitro*. 22:1234–1241.
- Buey, R., Barasoain, I., Jackson, E., Meyer, A., Giannakakou, P., Paterson, I., Mooberry, S., Andreu, J., Díaz J. 2005. Microtubule Interactions with Chemically Diverse Stabilizing Agents: Thermodynamics of Binding to the Paclitaxel Site Predicts Cytotoxicity. *Chemistry & Biology*. 12: 1269–1279.
- Cappuzzo, F., Varella-Garcia, M., Shigematsu, H., Domenichini, I., Bartolini, S., Ceresoli, G.L. Rossi, E., *et al.* 2005. Increased HER2 Gene Copy Number Is Associated with Response to Gefitinib Therapy in Epidermal Growth Factor Receptor-positive Non-small-cell Lung Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology*. 23 (22): 5007–5018.
- Carrillo, E., Arias, Y., Perdomo, S., Aristizabal, F., Ojeda, P., Palacios, D.M. 2009. Oncogene Amplification as Tumor Marker in a Group of Colombian Lung Cancer Patients. *Colombia Medica*. 40: 148–157.
- Cheng, J., Godwin, A., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T., Hamilton, T., Tschlis P, Testa J. 1992. AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89: 9267–9271.
- Frendi A., Khabir A., Mnejja W., Al E. 2009. PIK3CA amplification is predictive of poor prognosis in Tunisian patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Science*. 100: 2034–2039.
- Georgiadis, S., Gazdar, F., Russell, K., Johnso, E. 1997. Paclitaxel Cytotoxicity Against Human Lung Cancer Cell Lines Increases with Prolonged Exposure Durations. *Clinical Cancer Research*. 3: 449–454.
- Gilmore, T., Kalaitzidis, D., Liang, M., Starczynowski, D. 2004. The c-Rel Transcription Factor and B-cell Proliferation: a Deal with the Devil. *Oncogene*. 23 (13) : 2275–86.
- Heinonen, H., Nieminen, A., Saarela, M., Kallioniemi, A., Klefström, J., Hautaniemi, S., Monni, O. 2008. Deciphering Downstream

- Gene Targets of PI3K/mTOR/p70S6K Pathway in Breast Cancer. *BMC Genomics*. 9 : 348.
- Herbst, R., Heymach, J., Lippman, S. 2008. Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 359 (13): 1367–80.
- Houldsworth, J., Mathew, S., Rao, P., Dyomina, K., Louie, D., Parsa, N., Offit, K., Chaganti, R. 1996. REL Proto-oncogene Is Frequently Amplified in Extranodal Diffuse Large Cell Lymphoma. *Blood*. 87 (1) : 25–29.
- Huang, C., Yang L., Li, Z., Yang, J., Zhao J, Dehui X et al. 2007. Detection of CCND1 Amplification Using Laser Capture Microdissection Coupled with Real-time Polymerase Chain Reaction in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Genetics Cytogenetics*. 175(1):19-25.
- Huang, W., Hung M. 2009. Induction of Akt Activity by Chemotherapy Confers Acquired Resistance. *Journal of the Formosan Medical Association*. 108 (3): 180–194.
- Knuutila, S., Bjorkqvist, A., Autio, K., Tarkkanen, M., Wolf, M., Monni, O, et al. 1998. DNA Copy Number Amplifications in Human Neoplasms. *American Journal of Pathology*. 152 (5): 1107-1123.
- Liebmann, J., Cook, J., Lipschultz, C., Teague, D., Fisher, J., Mitchell, J. 1993. Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumour cell lines. *British Journal of Cancer*. 68(6):1104-1109.
- Lu, X., Pearson, A., Lunec, J. 2003. The MYCN Oncoprotein as a Drug Development Target. *Cancer Letters*. 197 : 125–130.
- Miller, Y. 2005. Pathogenesis of Lung Cancer: 100 Year Report. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 33 (3): 216–23.
- Mitani, S., Kamata, H., Fujiwara, M., Aoki, N., Tango, T., Fukuchi, K., Oka, T. 2001. Analysis of c-MYC DNA Amplification in Non-small Cell Lung Carcinoma in Comparison with Small Cell Lung Carcinoma Using Polymerase Chain Reaction. *Clinical and Experimental Medicine*. 2: 105–111.
- Mørkve, O., Halvorsen, O., Stangeland, L., Gulsvik, A., Lærum, O. 1992. Quantitation of Biological Tumor Markers (p53, C-myc, Ki-67 and DNA Ploidy) by Multiparameter Flow Cytometry in Non-small-cell Lung Cancer. *International Journal of Cancer*. 52 (6): 851–855.
- Noro, R., Gemma, A., Kosaihiira, S., Kokubo, Y., Chen, M., Seike, M., Kataoka, K., et al. 2006. Sensitive Lung Cancer Cell Lines Show Phosphorylation of Akt Without Ligand Stimulation. *BMC Cancer*. 6 (6): 277.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*. 267 (17) : 5421–5426.
- Pao, W., Miller, V., Zakowski, M., Doherty, J., Politi, K., Sarkaria, I., Singh, B. et al. 2004. EGF Receptor Gene Mutations Are Common in Lung Cancers from 'Never Smokers' and Are Associated with Sensitivity of Tumors to Gefitinib and Erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101 (36): 13306–13311.
- Pardo, J., Martinez-Peñuela, A., Sola, J., Panizo, A., Gúrpide, A., Martinez-Peñuela, J., Lozano, M. 2009. Large Cell Carcinoma of the Lung: An Endangered Species? *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 17 (5): 383–392.
- Perdomo, S., Morantes, J., Aristizábal, F. 2012. Development and Validation of a TaqMan PCR Assay for the Gene Dosage Quantification in Cancer. *Revista Colombiana De Ciencias Químico Farmacéuticas*. 42: xx–xx. En prensa.
- Prieto, S., Aristizábal, F. 2009. Perfil De Sensibilidad De HEpG2 Como Modelo Para Evaluación De Actividad Citotóxica de Xenobióticos Bioactivados via CYP450." *Vitae*. 16 (2): 219–227.
- Romieu-Mourez, R., Kim, D., Shin, S., Demicco, E., Landesman-Bolag, E., Seldin, D., Cardiff, R., Sonenshein, G. 2003. Mouse Mammary Tumor Virus C-rel Transgenic Mice Develop Mammary Tumors. *Molecular And Cellular Biology*. 23 (16): 5738–5754.
- Santarius, T., Shipley, J., Brewer, D., Stratton, M., Cooper, C. 2010. A Census of Amplified and Overexpressed Human Cancer Genes. *Nature Reviews Cancer*. 10: 59–64.
- Škarda, J., Hajdúch, M., Vítězslav K., 2008. "Drug Resistance in Lung Cancer." *Cancer Therapy*. 6: 377–388.
- Starczynowski, D., Lockwood, W., Deléhouzée, S., Chari, R., Wegrzyn, J., Fuller, M., Tsao M. et al. 2011. TRAF6 Is an Amplified Oncogene Bridging the RAS and NF-κB Pathways in Human Lung Cancer. *The Journal of Clinical Investigation*. 121 (10): 4095–4105.
- Sumantran, V. 2011. Cellular Chemosensitivity Assays: An Overview. En: *Cancer Cell Culture Methods in Molecular Biology*. Portsmouth UK, Humana Press. p. 437.
- Søndergaard, J., Nazarian, R., Wang, Q., Guo, D., Hsueh, T., Mok, S., Sazegar, H., et al. 2010. Differential Sensitivity of Melanoma Cell Lines with BRAFV600E Mutation to the Specific Raf Inhibitor PLX4032. *Journal of Translational Medicine*. 8: 39.
- Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Oral, A., Demirci, M. 2008. The MTT Assay Yields a Relatively Lower Result of Growth Inhibition Than the ATP Assay Depending on the Chemotherapeutic Drugs Tested. *Toxicology in Vitro*. 22 (1): 232–239.
- Yasui, K., Mihara, S., Zhao, C., Okamoto, H., Saito-Ohara, F., Tomida, A., Funato, T., Yokomizo, A., Naito, S., Imoto, I., Tsuruo, T., Inazawa, J. 2004. Alteration in Copy Numbers of Genes as a Mechanism for Acquired Drug Resistance Drug Resistance. *Cancer Research*. 64: 1403–1410.
- Yeung, T., Germond, C., Chen, X., Wang, Z. 1999. The Mode of Action of Taxol: Apoptosis at Low Concentration and Necrosis at High Concentration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 263 (2): 398–404.
- Zumpe, C., Bachmann, C., Metzger, A., Wiedemann, N. 2010. Comparison of Potency Assays Using Different Read-out Systems and Their Suitability for Quality Control. *Journal of Immunological Methods*. 360 (1-2) : 129–140.