

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON
OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO DIRIGIDOS A
EGFR Y CICLINA D1 EN MODELOS CELULARES DE
CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS**

DANIEL EDUARDO VERBEL VERGARA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de medicina, Instituto de Genética, Maestría en Genética Humana

Bogotá, Colombia

2017

EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO CON OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO DIRIGIDOS A EGFR Y CICLINA D1 EN MODELOS CELULARES DE CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS

Daniel Eduardo Verbel Vergara

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de: **Magister en Genética Humana**

Director:

Ph.D., Q. F. Dr. Fabio A. Aristizábal G.

Línea de Investigación:

Búsqueda y Caracterización de productos anticáncer

Identificación de marcadores moleculares asociados a la respuesta de tratamientos en

Cáncer

Grupo de Investigación:

Farmacogenética del Cáncer

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de medicina, Instituto de Genética, Maestría en Genética Humana

Bogotá, Colombia

2017

Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová tu Dios estará contigo en dondequiera que vayas

Josué 1:9 (RVR1960)

Agradecimientos

Este trabajo lo dedico a JESUS, mi DIOS, aquel que el transcurso de este hermoso posgrado me dejó atónito al conocer algunas cosas de la gran magnitud de su creación y quien en todo este tiempo me enseñó a nunca olvidarme que en su camino todas las cosas nos ayudan a bien.

A mi papá Carmelo y mi mamá Idalia, quienes me regalaron la formación que hoy tengo, y que aún en la distancia estuvieron a mi lado con sus oraciones.

A mi linda hermana Daniela, quien decidió compartir una parte de esta historia, reír y llorar conmigo.

A mi amada esposa Cesia, por ayudarme a cumplir esta meta, por amar lo que yo amo y por soñar con mis sueños.

A mi pastor y amigos de la Iglesia Pentecostal Unida quienes siempre oraron a DIOS, para que esta meta se hiciera realidad.

A los profesores Fabio Aristizábal, Clara Arteaga, Mauricio Rey, Eduar Bejarano y Luis Paternina, por la formación brindada y sus consejos.

A mis compañeras Andrea, Diana, Caro, Angelita y Jonny quienes fueron muy importantes para culminar esta etapa de mi vida.

A todo el grupo de Farmacogenética del Cáncer, por ayudarme en mi formación como profesional, y en forma muy especial a Michael, Eduardo, Ángela, Astrid, Vivi y Lala.

Resumen

El cáncer de pulmón de células no pequeñas es una de las patologías con mayor incidencia a nivel mundial. La mayoría de los tumores que se presentan en esta patología, están conformados por células que tienen características metabólicas y proliferativas que las hacen responsables del mantenimiento del tumor en los pacientes. Análisis de expresión génica diferencial entre tejidos normal y tumoral, han mostrado que algunas proteínas se encuentran sobreexpresadas en estos últimos, entre estas, la ciclina D1 y el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR). Actualmente, la terapia anticáncer está basada en la utilización de moléculas de acción blanco específico como son anticuerpos o pequeñas moléculas que bloqueen la función de estas proteínas, algunos de ellos llamados inhibidores de tirosinquinasa (TKIs), sin embargo, debido a la alta tasa de mutación que presentan las células tumorales estos tratamientos tienen un efecto parcial. Una alternativa al tratamiento con anticuerpos, son los oligonucleótidos antisentido (ASOs), los cuales son moléculas conformadas por ácidos nucleicos modificados que interactúan con los RNAs mensajeros y suelen disminuir la expresión de proteínas blanco.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la utilidad de ASOs dirigidos a EGFR y ciclina D1 en las líneas tumorales A549 y H292, y una línea no tumoral de fibroblastos de pulmón. Los resultados indican que los tratamientos con ASOs presentan actividad antitumoral específica y selectiva, pues disminuyen la proliferación celular y aumentan la apoptosis de las células tumorales, mientras que su actividad en células fibroblásticas es reducida.

Palabras clave: Cáncer, pulmón, Inhibidores Tirosina Quinasas, Oligonucleótidos antisentido, Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal, Ciclina D1.

Abstract

Non-small cell lung cancer is one of the most prevalent diseases worldwide. The majority of the tumors that present in this pathology are formed by cells whose have metabolic and proliferative characteristics that make them responsible for the maintenance of the tumor in the patients. Differential gene expression analysis between normal and tumor tissues has shown that some proteins are overexpressed in the latter, including cyclin D1 and epidermal growth factor receptor (EGFR). Currently, anticancer therapy is based on the use of antibodies or small molecules that block the function of these proteins, some of them called tyrosine kinases inhibitors (TKIs), however, due to the high mutation rate that these tumor cells present, treatments have a partial effect. An alternative to the treatment with TKIs are antisense oligonucleotides (ASOs), which are molecules made up of modified nucleic acids that interact with messenger RNAs and usually decrease protein expression.

The objective of this research was to evaluate the utility of ASOs targeting EGFR and cyclin D1 in combination therapy in tumor cell lines A549 and H292, and a non-tumor line of lung fibroblasts MRC-5. The results indicate that the treatments with ASOs present selective antitumor activity, as they decrease cell proliferation and increase the apoptosis of tumor cells, whereas their activity in fibroblastic cells is reduced.

Keywords: Cancer, lung, Tyrosine Kinase Inhibitors, Antisense Oligonucleotide, Epidermal Growth Factor Receptor, Cyclin D1

Contenido

	Pág.
1. Introducción	1
2. Objetivos	3
2.1 General	3
2.2 Específicos.....	3
3. Marco teórico	4
3.1 Cáncer de pulmón	4
3.2 Origen de NSCLC	4
3.3 Expresión génica diferencial en células madre de cáncer	6
3.4 Ciclina D1	6
3.5 Ciclina D1 y NSCLC	9
3.6 Receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR).....	10
3.7 EGFR y cáncer.....	11
3.8 Inhibidores tirosinquinasa	12
3.9 Oligonucleótidos antisentido.....	13
4. Metodología	15
4.1 Líneas celulares	15
4.2 Oligonucleótidos Antisentidos.....	15
4.3 Inserción de agentes terapéuticos	16
4.4 Ensayos de citotoxicidad	16
4.5 Ensayos de inmunofluorescencia	18
4.6 Ensayo de apoptosis	18
4.7 Extracción de RNA y Síntesis de cDNA.....	19
4.8 Ensayos de PCR en tiempo real.....	20
4.9 Análisis estadístico.....	21
5. Resultados y discusión	22
5.1 Expresión de ciclina D1 y EGFR en líneas celulares	22
5.2 Efectos citotóxicos de ASOs, Erlotinib y Arcyriaflavin A.....	27
5.3 Efectos citotóxicos del tratamiento combinado de ASOs e inhibidores de la actividad de EGFR y Ciclina D1	35
5.4 Evaluación de la expresión de EGFR y Ciclina D1 en células tratadas con ASOs	39
5.5 Apoptosis mediada por ASOs.....	44
6. Conclusiones y recomendaciones	47
6.1 Conclusiones.....	47

XII Evaluación del tratamiento de oligonucleótidos antisentido dirigidos a EGFR y/o
Ciclina D1 en modelos celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas

6.2 Recomendaciones 48

Lista de tablas

Tabla 1 Cebadores utilizados para evaluar la expresión relativa de los genes CCND1, EGFR y BCLXL. Los datos suministrados en la tabla corresponden a la secuencias nucleotídicas de cada pareja de cebadores y el tamaño de cada uno de los amplicones generados.	21
Tabla 2 Determinación de la CL-50 de ASOs en líneas celulares H292, A549 y MRC-5.	31
Tabla 3 Determinación de la CL-50 de ASOs, Erlotinib y Arcyriaflavin A en líneas celulares H292, A549 y MRC-5	34
Tabla 4 Determinación de la CL-50 de tratamientos combinados en líneas celulares H292, A549 y MRC-5	36

Lista de ilustraciones

	Pág.
Ilustración 1 Las terapias convencionales pueden reducir los tumores al matar principalmente células con alto potencial proliferativo. Tomado de (Reya, 2001).....	5
Ilustración 2 Regulación Ciclina-CDK del ciclo celular en mamíferos (Randy Suryadinata, 2010)	7
Ilustración 3 Activación oncogénica de la expresión de Ciclina D1. Tomado de (Elizabeth A. Musgrove, 2011)	8
Ilustración 4 Función de Ciclina D1 durante la progresión celular de células normales. Tomado de (Coller, 2007)	9
Ilustración 5 Activación y función de EGFR (Mukesh, 2006)	11
Ilustración 6 Mecanismo de acción de oligonucleótidos antisentido (Corey, 2007)	14
Ilustración 7. Tratamientos empleados en la investigación. Los tratamientos fueron evaluados en las líneas celulares tumorales y fibroblásticas para establecer las CL-50 y su actividad antitumoral <i>in vitro</i> . Las concentraciones evaluadas para cada tratamiento variaron entre 0,125 y 1 uM	17
Ilustración 8 Expresión de Ciclina D1 en líneas celulares tumorales y normales. Células fijadas en placas de 12 pozos fueron fijadas, permeabilizadas y tratadas con anticuerpo primario monoclonal anti-Ciclina D1 (Dilución 1/100; SC-20044; Santa Cruz, CA) y los anticuerpos secundarios policlonales IgG generados en cabra, anti-ratón, conjugado con CFL 488. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las células fueron observadas empleando el objetivo 40X.....	23
Ilustración 9 Expresión de EGFR en líneas celulares tumorales y normales. Células fijadas en sembradas en placas de 12 pozos fueron fijadas, permeabilizadas y tratadas con anticuerpo primario monoclonal anti-EGFR (Dilución 1/100; SC-367974; Santa Cruz, CA) y los anticuerpos secundarios policlonales IgG generados en cabra, anti-ratón, conjugado con CFL 596. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las células fueron observadas empleando el objetivo 40X.....	24
Ilustración 10 Ensayo de apoptosis en línea celular H292 tratadas con ASOs. Células fijadas en sembradas en placas de 12 pozos fueron fijadas, permeabilizadas y tratadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante del Kit comercial <i>n situ</i> BrdU-Red DNA Fragmentation (TUNEL) Assay Kit (Lifetechnologies®). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las células fueron observadas en empleando el objetivo 10x.....	46

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ASO	Oligonucleótido antisentido
ATP	Adenosintrifosfato
CAK	Quinasas activadoras de CDKs
CDK	Quinasa dependiente de Ciclina
<i>EGFR</i>	Receptor del factor de crecimiento epidermal
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
SCLC	Cáncer de pulmón de células pequeñas
SFB	Suero fetal bovino
STAT3	Activador de la transcripción 3
TA	Temperatura ambiente
TICs	Células iniciadoras de tumores
TKIs	Inhibidores Tirosina Quinasas

Lista de gráficas

Pág.

Gráfica 1 Expresión basal de genes EGFR y CCND1 en líneas celulares tumorales y fibroblásticas. Los valores C_T promedios obtenidos para los genes CCND1 y EGFR fueron utilizados para calcular los valores de expresión relativa de los mismos en cada una de las líneas celulares. GAPDH fue utilizado como gen normalizador en cada una de las líneas celulares. ** $P < 0.01$	25
Gráfica 2 Evaluación de tratamientos ASO-CICLINA y ASO-EGFR en líneas celulares tumorales. Células sembradas en placas de 96 pozos fueron transfectadas con los ASOs y sus respectivos controles (0,125, 0.25, 0.5 y 1 μ M). La viabilidad y proliferación de las células tratadas fueron evaluadas mediante el ensayo de Resazurina a las 72 horas postratamiento. Células no tratadas fueron utilizadas como control de crecimiento celular y células tratadas con lipofectamina fueron utilizadas para establecer la citotoxicidad del vehículo transfactor.....	30
Gráfica 3 Evaluación de tratamientos ASO-CICLINA y ASO-EGFR en línea celular MRC-5. Células sembradas en placas de 96 pozos fueron transfectadas con los ASOs y sus respectivos controles (0,125, 0.25, 0.5 y 1 μ M). La viabilidad y proliferación de las células tratadas fueron evaluadas mediante el ensayo de Resazurina a las 72 horas postratamiento. Células no tratadas fueron utilizadas como control de crecimiento celular y células tratadas con lipofectamina fueron utilizadas para establecer la citotoxicidad del vehículo transfactor.....	31
Gráfica 4 Evaluación de tratamientos Erlotinib y Arcyriaflavin A en líneas celulares H292, A549 y MRC-5. Células sembradas en placas de 96 pozos fueron tratadas con Erlotinib y Arcyriaflavin A (0,125, 0.25, 0.5 y 1 μ M). La viabilidad y proliferación de las células tratadas fueron evaluadas mediante el ensayo de Resazurina a las 72 horas postratamiento. Células no tratadas fueron utilizadas como control de crecimiento celular y células tratadas con DMSO fueron utilizadas para establecer la citotoxicidad del disolvente.....	33
Gráfica 5 Evaluación de tratamientos combinados en las líneas celulares H292, A549 y MRC-5. Células sembradas en placas de 96 pozos fueron tratadas con Erlotinib, ArcyriaflavinA o transfectadas con los ASOs, Los valores observados en las gráficas representan la concentración final del tratamiento combinado, cada uno de los agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento combinado aporta la mitad de la concentración final. La viabilidad y proliferación de las células tratadas fueron evaluadas mediante el ensayo de Resazurina a las 72 horas postratamiento. Células no tratadas fueron utilizadas como control de crecimiento celular y células tratadas con lipofectamina +	

DMSO fueron utilizadas para establecer la citotoxicidad del vehículo transfeccionador combinado con el disolvente orgánico36

Gráfica 6 Análisis comparativo de los índices de crecimiento obtenidos tras la evaluación de diferentes tratamientos. Los índices de crecimiento para cada tratamiento fueron calculados del cociente entre el porcentaje de supervivencia celular 72 horas postratamiento y el respectivo valor en el control de crecimiento (células sin tratamiento) que por defecto tiene un valor de 1. **A, B** y.....37

Gráfica 7 Curva estándar (eficiencia) de los genes CCND1, EGFR, BCLXL y de los genes normalizadores GAPDH y RPLPO. El valor de eficiencia para cada gen, indicado en la parte superior-derecha, se obtuvo a partir de la ecuación de la recta de la curva de valores C_T Vs. Concentración de DNA (curva dilución 1:10).....42

Gráfica 8 Expresión de los genes CCND1 y EGFR en línea celular fibroblástica (MRC-5) y línea celular tumoral (H292). ASO-CICLINA y ASO-EGFR fueron transfectados en forma independiente en cada una de las líneas celulares y cDNA fue sintetizado a partir de RNA aislado a las 48 horas postransfección. El Kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche®) fue utilizado para detectar cADN de CCND1, EGFR y genes de referencia. La expresión génica relativa se calculó a partir de valores de C_T obtenidos. **P<0.0143

1. Introducción

El cáncer de pulmón constituye una de las patologías que causa una significativa cantidad de muertes a nivel Mundial. Para el año 2011 se estimaron más de 1.5 millones de casos, de los cuales aproximadamente el 86% fallecieron a causa de complicaciones de esta patología. (Torre, 2012). Para este mismo año en Colombia se estimaron 1742 casos. Esta enfermedad constituye la primera y segunda más grande causa de mortalidad a nivel mundial entre los diferentes tipos de cáncer en hombres y mujeres, respectivamente (Torre, 2012). Los factores de riesgo asociados con esta enfermedad son el hábito de fumar, exposición a contaminantes ambientales como el asbesto, y arsénico, radón, e hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre otros (Torre, 2012).

El cáncer de pulmón se ha dividido histológicamente en dos tipos: cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). No obstante, este último presenta algunas subdivisiones en los que encontramos con mayor frecuencia, el adenocarcinoma y el cáncer de pulmón de células escamosas. NSCLC es el de mayor prevalencia representando cerca del 85% de todas las afecciones por cáncer de pulmón (Navada S, 2006; Sher T, 2008).

Diferentes investigaciones han evidenciado que las células cancerígenas presentes en esta patología muestran una gran variedad de características morfológicas y fisiológicas, además, poseen diferentes grados de diferenciación. Algunas de estas células han llamado el interés de los investigadores porque expresan marcadores de superficie que son hallados normalmente en las células madre embrionarias, y adicionalmente, se ha comprobado que estas tienen una mayor capacidad de proliferación que las demás (Reya, 2001; Rosen, J.M., and Jordan, C.T., 2009). Estas células llamadas CSC (de sus siglas en inglés Cancer Stem Cell) tienen características metabólicas y de proliferación que las hacen responsables del mantenimiento y progresión del tumor en los pacientes. Análisis de expresión génica diferencial entre tejidos normal y de NSCLC, han mostrado que algunas proteínas se encuentran sobreexpresadas en las CSCs, entre las que se

encuentran la ciclina D1 y el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) (Lapidot T, 1994; Zhang WC, 2012; Sutherland HJ, 1996). La ciclina D1, es la proteína encargada de activar el paso de fase G1 a la fase S durante el ciclo celular, la sobreexpresión de esta proteína se ha asociado con cambios fisiológicos a nivel celular, los cuales son consecuentes con la transformación a células tumorales (Kato ,. J., 1993; Kato ,. J., 1994). Por su parte EGFR es una proteína que tiene dominios tirosinquinasa, los cuales son activados tras la unión del factor de crecimiento epidermal (EGF) y promueven la proliferación celular por activar la expresión de genes corriente abajo (Hynes NE and Lane HA, 2005; Pao William and Chmielecki Juliann, 2010).

Actualmente, la terapia en NSCLC está basada precisamente en la utilización de anticuerpos o pequeñas moléculas que bloqueen la activación de los dominios tirosinquinasa, estos son llamados inhibidores de tirosinquinasa (TKIs) (Hartmann, 2009). Sin embargo, los pacientes tratados con TKIs presentan una recaída en promedio a los 12 meses, debido a la alta tasa de mutación que presentan las células tumorales. Como alternativa al tratamiento con anticuerpos, los oligonucleótidos antisentido (ASO) pueden ser diseñados para disminuir la expresión proteínas blanco, y constituir una potencial alternativa terapéutica para el tratamiento de NSCLC. La presente propuesta de investigación tiene como objetivo determinar la utilidad de ASOs dirigidos a EGFR y ciclina D1 en terapia combinada como una potencial alternativa para el tratamiento de NSCLC en modelos celulares.

A nivel mundial existen varios estudios que involucran la utilidad de oligonucleótidos antisentido como alternativa terapéutica, sin embargo, sólo pocos emplean a EGFR y ciclina D1 como blanco terapéutico. Este estudio aporta información sobre el potencial uso de estos oligonucleótidos en terapia antitumoral y sentará bases para determinar la realización de posteriores estudios a nivel clínico. El presente trabajo se desarrolló con el apoyo del Grupo de Investigación Farmacogenética del Cáncer de la Universidad Nacional de Colombia.

2. Objetivos

2.1 General

Determinar el efecto in vitro del tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos a EGFR y Ciclina D1 en modelos celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas

2.2 Específicos

- Determinar la viabilidad, proliferación celular y apoptosis en líneas celulares de NSCLC tratadas con oligonucleótidos antisentido dirigidos a EGFR y/o Ciclina D1.
- Evaluar el efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos a ciclina D1 y/o EGFR sobre la expresión de los respectivos genes en líneas celulares de NSCLC.
- Realizar comparaciones múltiples de los efectos de los diferentes tratamientos sobre las líneas celulares de NSCLC.

3. Marco teórico

3.1 Cáncer de pulmón

El cáncer pulmonar fue considerado hasta mediados del siglo XIX como una enfermedad poco frecuente, sin embargo, a partir de 1930 su frecuencia ha aumentado y en la actualidad es uno de los tumores malignos más frecuente en el mundo. Durante el último siglo se ha identificado que el cáncer de pulmón presenta varios subtipos histológicos y que los mismos tienen sensibilidad diferencial a agentes quimioterapéuticos (Hansen, 1976). La tendencia a la subdivisión de cáncer de pulmón en grupos cada vez más significativos clínicamente ha continuado, con el reconocimiento de que hay muchas diferencias histológicas entre los principales subtipos de cáncer de pulmón, incluyendo el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), que se compone de adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes. Hoy en día, la subcategorización es alimentada por la constatación de que los tumores pueden ser definidos por diversos criterios moleculares (Chmielecki, 2010).

3.2 Origen de NSCLC

Datos de leucemias, tumores de células germinales, y un gran número de tumores sólidos apoyan la noción de que los cánceres son mantenidos por una subpoblación de células iniciadoras de tumores (TICs) que se auto renuevan y evolucionan, éste es conocido popularmente como el modelo de las células madre del cáncer (CSC) (Reya, 2001; Rosen, J.M., and Jordan, C.T., 2009). Los estudios en NSCLC indican que en el origen de estos tumores están involucradas las células iniciadoras de tumores que a su vez son responsables del mantenimiento y progresión de los mismos. La teoría de las células madre del cáncer propone dos conceptos principales, el primero de ellos menciona que los cánceres surgen a partir de células madre que están presentes en los tejidos de los niños e individuos adultos maduros; y el segundo, que los tumores

cancerígenos se componen de los mismos tipos de células que los tejidos normales, es decir, células madre, células de tránsito, y células diferenciadas terminalmente. La hipótesis de que los tumores cancerígenos surgen debido al arresto de la maduración de las células madre se propuso en 1994 para todos los tejidos, basándose principalmente en observaciones del origen de teratocarcinomas y carcinomas hepatocelulares (Sell S, Pierce GB, 1994). Casi al mismo tiempo, los estudios de trasplante de tumores condujeron a un renovado interés en el concepto de que estos se mantienen por una pequeña fracción de las células del cáncer que tienen las propiedades de células madre (Lapidot T, 1994; Sutherland HJ, 1996; Bonnet D, Dick JE: II., 1997). Zhang y Colaboradores realizaron estudios en células obtenidas de 36 tumores humanos y dieron a conocer que solo una subpoblación de estas aporta a crecimiento del tumor. En este estudio sólo las células que expresaron el marcador CD166 (un marcador de células madre embrionarias) eran capaces de generar 78 veces más tumores, que las que no lo expresaban, adicionalmente, el volumen de los tumores generados por estas células era significativamente mayor, al de los generados por las demás (Zhang WC, 2012). Por otra parte, estas células demostraron tener gran capacidad invasiva, de generar metástasis y presentaban un metabolismo alterado (Zhang WC, 2012). Los resultados obtenidos indican que la orientación de las terapias hacia las TICs puede ser un enfoque prometedor para erradicar tumores de manera temprana **Ilustración 1**.

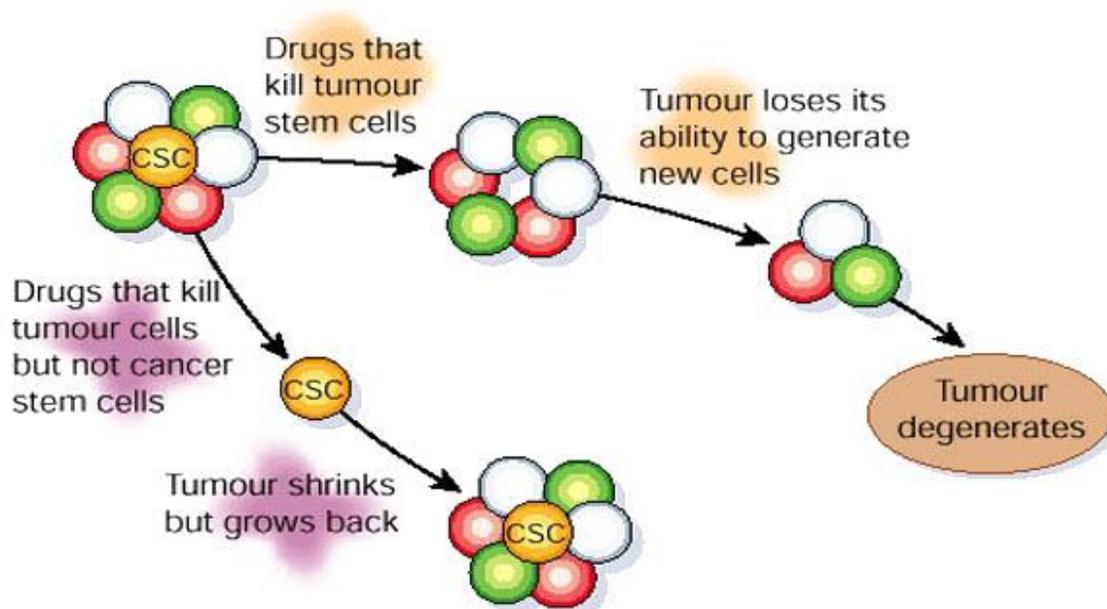


Ilustración 1 Las terapias convencionales pueden reducir los tumores al matar principalmente células con alto potencial proliferativo. Tomado de (Reya, 2001)

3.3 Expresión génica diferencial en células madre de cáncer

Las células tumorales poseen un patrón de expresión génica bastante alterado respecto a las células normales, son muchos los estudios dedicados a investigar que genes se encuentran expresados diferencialmente en las células tumorales y si se pueden utilizar como biomarcadores o potenciales blancos terapéuticos (Botling J, 2013; Chen R, 2014; W.-Y. Shi, 2014). Los genes cuya expresión se encuentra alterada codifican para proteínas y para miRNAs. Estos se hallan en diferentes vías, entre estas: Ciclo celular, replicación del DNA, metabolismo de aminoácidos, proteosoma, vía de señalización MAPK y p53. Sin embargo, muchos de estos genes confluyen en la regulación del ciclo celular (Zhang WC, 2012; W.-Y. Shi, 2014; Xue, 2014).

En cáncer de pulmón, análisis de los perfiles de expresión génica entre células normales y tumorales han identificado genes expresados diferencialmente (GED). Wang et al. identificó 17 GED en células tumorales (Wang, 2000), resultados comparables con los obtenidos por Kikuchi et al., quien Identificó 40 GED que podrían separar los casos con metástasis de los ganglios linfáticos de aquellos sin metástasis en NSCLC (Kikuchi, 2003).

Algunos de los GED que han sido utilizados como blancos terapéuticos son el receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFR) y Ciclina D1. Particularmente, EGFR es un blanco de muchas terapias que se encuentran en el mercado y ha aumentado la supervivencia de algunos pacientes (SM, 2006; Hirsch FR, 2003; Gautschi O, 2007)

3.4 Ciclina D1

Las ciclinas y sus socios catalíticos, las quinasas dependientes de ciclinas (CDK), fueron identificados por grupos liderados por Leland Hartwell, Paul Nurse y Timothy caza; descubrimientos que llevaron al Premio Nobel de Fisiología/ Medicina en 2001 (Culotti J, Hartwell LH., 1971; Nurse P, Bissett Y., 1981; Lee MG, Nurse P., 1987). Estos trabajos llevaron a la identificación de varias ciclinas humanas que llevan su nombre alfabéticamente y se dividen en cuatro grupos en función de su comportamiento en el

ciclo celular: Ciclinas de la fase G₁, Ciclinas de la fase G₁/S, Ciclinas de la fase S, y Ciclinas de la fase M. Esta clasificación es útil pero no universalmente aplicable, porque la misma Ciclina puede tener una función diferente o patrón de expresión en diferentes tipos de células, y puede contribuir para el control de más de una fase del ciclo celular. Las Ciclinas actúan junto con sus socios de CDK para impulsar células de una fase del ciclo celular a la siguiente (Sanchez I, 2005). El papel de la molécula de ciclina en este proceso es dirigir la actividad de las CDKs hacia proteínas diana apropiadas **Ilustración 2.**

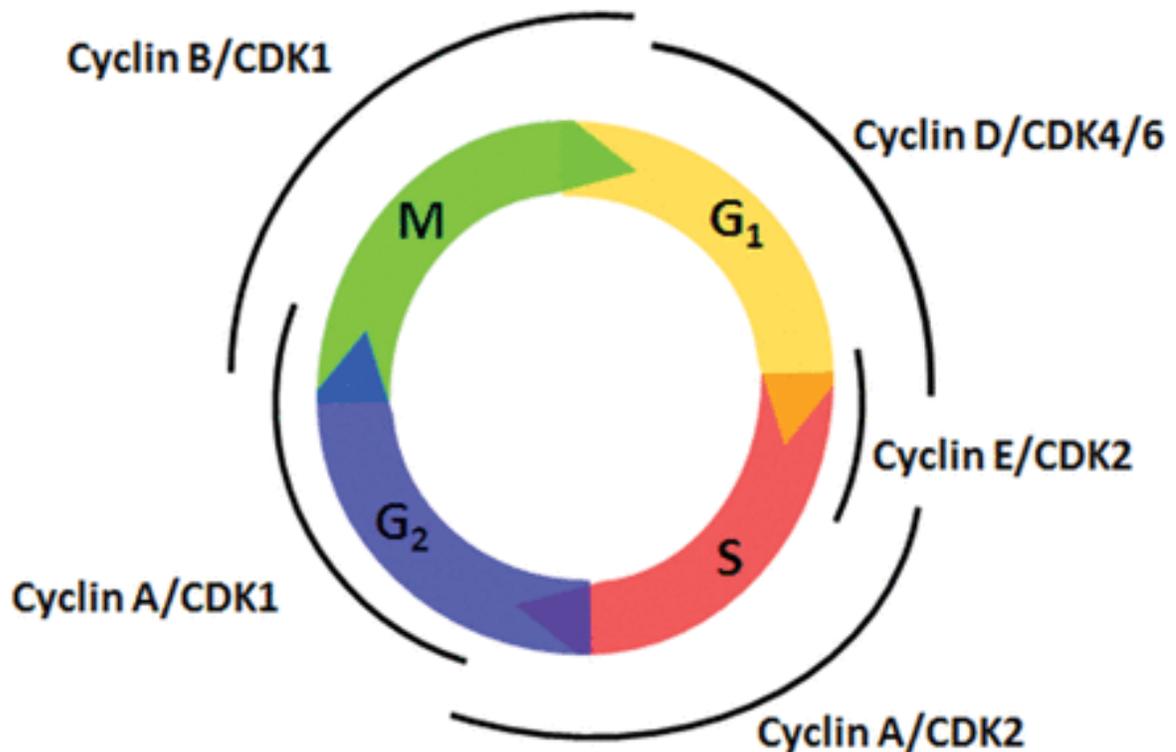


Ilustración 2 Regulación Ciclina-CDK del ciclo celular en mamíferos (Randy Suryadinata, 2010)

En la fase G₁, ciclinas de tipo D se unen casi exclusivamente a CDK2, CDK4 y CDK6, siendo el complejo ciclina D1 / CDK4 el que tiene la actividad de quinasa entre estos complejos. Tres ciclinas de tipo D se han descrito en mamíferos hasta el momento: la ciclina D1, D2 y D3. Un gran número de estudios posteriores han informado sobre las funciones fisiológicas de la ciclina D1 en células normales y han identificado que su expresión se induce por numerosos mitógenos que son detectadas por receptores de factores de crecimiento y por citosinas, lo que lleva a la activación de vías de señalización intracelular. Por ejemplo, la estimulación de la vía PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa) / Akt conduce a la activación de NF-κB (factor nuclear kappa Beta), un factor de

transcripción que induce la producción de la proteína ciclina D1 (Ewen, 2000; Hinz, 1999). Por el contrario, la expresión de ciclina D1 es reprimida por otros factores, como p53 **Ilustración 3** (Rocha, 2003). Como se mencionó anteriormente, la primera función identificada de la ciclina D1 está relacionada con el control de progresión de la fase G1-S. Durante G1, siguiendo una señal mitogénica, ciclina D1 forma complejos preferencialmente con CDK4. Las proteínas p21Cip1 y p27Kip1 actúan como factores de montaje de ciclina D1 y CDK4. El complejo de ciclina D1 / CDK4 es fosforilado por las quinasas activadoras de CDK (CAK), y CDK4 activado puede hiperfosforilar la proteína supresora de tumores retinoblastoma (Rb) (Kato, J., 1994). La fosforilación de Rb1 conduce a la disociación de E2F del complejo Rb1 / E2F (Kato, J., 1993). E2F disociado induce la transcripción de la ciclina E y otros genes que son necesarios para la entrada en la fase S **Ilustración 4**.

Ciclina D1 también puede actuar independientemente de la CDKs, como es demostrado por varios estudios. Ciclina D1 interactúa directamente varios receptores nucleares y factores de transcripción a los cuales reprime o induce, incluyendo el receptor de estrógenos (ER), receptor de andrógenos (AR), y la señal de receptor gamma activado y del activador de la transcripción 3 (STAT3) (Zwijsen RM, 1998; Knudsen, K., 1998; Knudsen, K., 1999; Bienvenu, 2001; Qin, 2003).

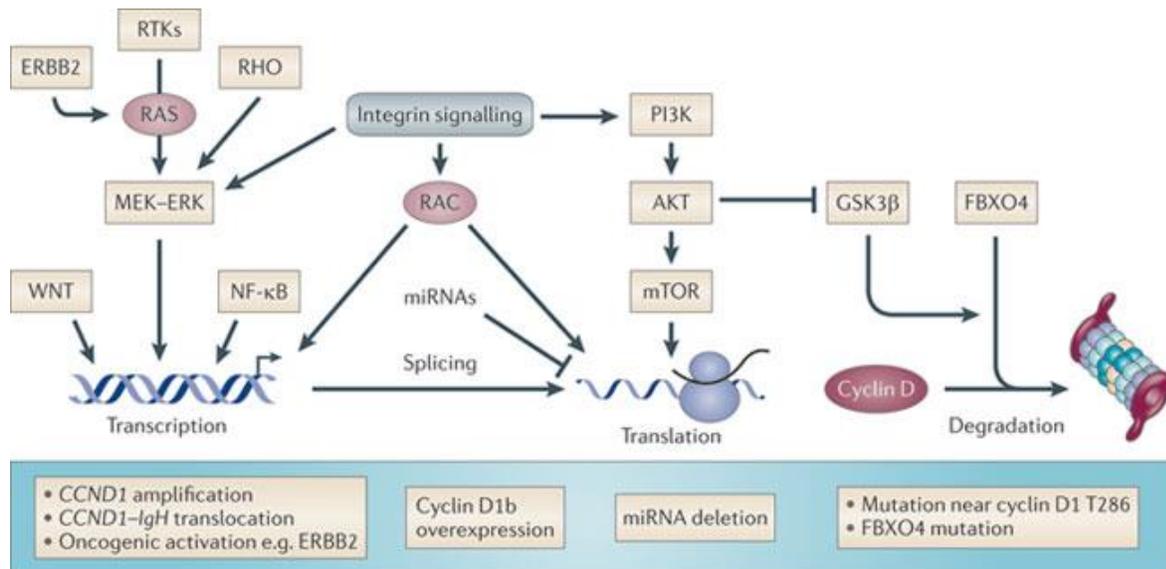
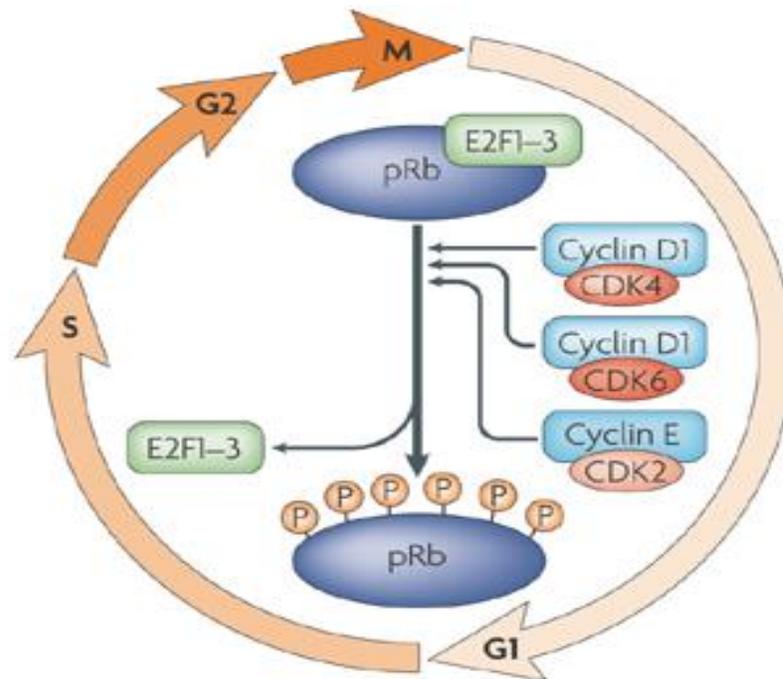


Ilustración 3 Activación oncogénica de la expresión de Ciclina D1. Tomado de (Elizabeth A. Musgrove, 2011)



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Ilustración 4 Función de Ciclina D1 durante la progresión celular de células normales. Tomado de (Coller, 2007)

3.5 Ciclina D1 y NSCLC

Estudios que implican la ciclina D1 en la patogénesis del cáncer de pulmón se dividen en dos grupos: en primer lugar, una serie de estudios en NSCLC han demostrado que el locus CCND1 en 11q13 se amplifica hasta en el 32% de los cánceres (Betticher DC, 1996; Marchetti, 1998; Reissmann, 1999) y en segundo lugar, análisis inmunohistoquímicos (IHC) han demostrado que la proteína ciclina D1 está presente en altos niveles en 12-76% de tumores de cáncer invasivo y en una fracción significativa de las lesiones no invasivas del epitelio bronquial de pacientes con cáncer de pulmón, sin aumentar su número de copias (Ikehara, 2003; Esposito, 2005; Dworakowska, 2005; Wang J, 2006).

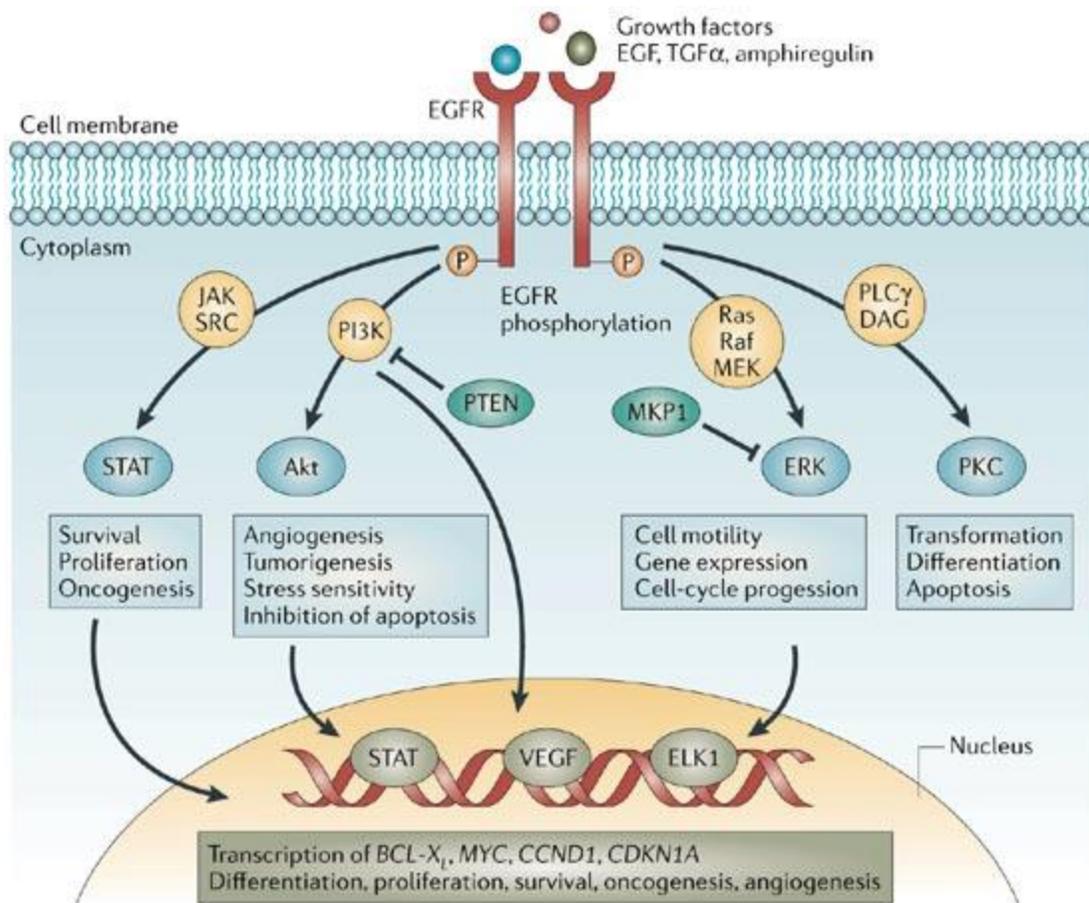
El hallazgo de CCND1 amplificado y sobreexpresado en una fracción de tumores y fuertemente expresado cuando se compara con tejido normal en una gran fracción de carcinomas que no han sufrido amplificación del gen, constituyen una fuerte evidencia de la implicación de la inapropiada expresión de ciclina D1 en la carcinogénesis de pulmón (Betticher DC, 1996; Marchetti, 1998; Reissmann, 1999).

La mayoría de los datos sobre amplificación del gen CCND1 y expresión en NSCLC invasivo, lesiones precursoras y epitelio bronquial normal de estudios de pacientes con cáncer de pulmón son consistentes con la hipótesis que la desregulación de CCND1 y su producto constituyen un importante mecanismo asociado con la carcinogénesis.

3.6 Receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR)

Receptor del factor de crecimiento epidermal pertenece a la familia de los receptores tirosinquinasa (TKs) que incluyen EGFR, ERBB2, ERBB3 y ERBB4 (estos últimos también conocidos como HER2, HER3 y HER4 respectivamente) (Schlessinger, 2002).

Estructuralmente, cada receptor está compuesto de un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio transmembranal y un dominio intracelular (Pao William and Chmielecki Juliann, 2010). Todos los miembros de esta familia tienen una actividad TK intrínseca, excepto ERBB3 (Cortés, 2010). Los receptores existen como monómeros inactivos, pero, después de su unión a ligandos, tales como factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento transformante alfa, los receptores adquieren cambios conformacionales que facilitan su homodimerización o heterodimerización, seguida por autofosforilación intermolecular de residuos de tirosina claves en la activación del bucle de los dominios TK catalíticos mediante la transferencia de fosfatos de una molécula de adenosin trifosfato (ATP). Subsecuentemente, adaptadores apropiados o moléculas de señalización con homología a SRC2 y proteínas con dominios de unión a tirosinas se unen a las fosfotirosinas del extremo carboxiterminal y reclutan proteínas involucradas en cascadas de señalización aguas abajo que controlan múltiples procesos celulares tales como supervivencia y proliferación celular **Ilustración 5** (Hynes NE and Lane HA, 2005; Pao William and Chmielecki Juliann, 2010).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

Ilustración 5 Activación y función de EGFR (Mukesh, 2006)

3.7 EGFR y cáncer

El factor de crecimiento epidermal (EGFR) es frecuentemente sobreexpresado en cáncer de pulmón de células no pequeñas (Hirsch FR, 2003). Este receptor juega un papel muy importante en la supervivencia de las células tumorales y en su forma activa causa la fosforilación de proteínas corriente abajo que causan proliferación celular, invasión, metástasis e inhibición de la apoptosis. Expresión de esta proteína parece ser dependiente de los subtipos histológicos, en carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma de células grades presenta una mayor expresión (Hirsch FR, 2003). Son muchos informes publicados que tratan de establecer una correlación entre la sobreexpresión de la proteína EGFR y la supervivencia. Sin embargo, los datos sobre el papel pronóstico de la expresión de EGFR son inconsistentes y confusos, con

algunos informes que indican que el EGFR se asocia a peor supervivencia mientras que ninguna asociación pronóstica se ha visto en otros estudios. En estudios realizados por Nakamura et al, para 2006, se llevó a cabo un meta-análisis de 18 estudios que incluyen cerca de 3000 pacientes, para revisar si la expresión de EGFR tenía impacto sobre la prolongación del tiempo de vida, la mayoría de estos estudios utilizaron la inmunohistoquímica para evaluar la expresión de la proteína. Los resultados indicaron que la sobreexpresión de EGFR fue observada en el 39% de adenocarcinomas, 58% de carcinoma de células escamosas y 38% de carcinoma de células grandes, concluyendo que la sobreexpresión de EGFR (usando IHC) no se asocia con peor pronóstico, sin embargo, investigadores de la universidad de Colorado mostraron que el número de copias de este gen cuantificada por FISH si se relaciona con mal pronóstico de la enfermedad (Nakamura, 2006). Estudios han reportado que además de la sobreexpresión de EGFR, mutaciones en este receptor también pueden influir sobre el desarrollo de las células tumorales (Allan R. Li, 2008 .). Actualmente, la terapia en cáncer de pulmón está dirigida a inhibir la activación de los dominios tirosinquinasa de EGFR mediante moléculas llamadas inhibidores de tirosinquinasa (TKIs), así como al bloqueo directo del factor mediante el uso de anticuerpos.

3.8 Inhibidores tirosinquinasa

Las proteínas con dominios tirosin-quinasa juegan un papel en los procesos normales de regulación celular. Sin embargo, la actividad de tirosin-quinasa aberrante puede conducir a la transformación celular y puede asociarse con el mantenimiento del tumor y la progresión. En los últimos años, el uso de la química combinatoria, computacional y medicinal ha conducido a la identificación de pequeñas moléculas que compiten con el sitio de unión del adenosintrifosfato (ATP) al dominio catalítico de varias proteínas tirosin-quinasa oncogénicas, estos son conocidos como Inhibidores tirosin-quinasa (TKIs). Algunos de estos compuestos son altamente específicos de una única tirosin-quinasa, mientras que otros pueden inhibir varias simultáneamente. A nivel práctico, la relativa promiscuidad de estos inhibidores frente a más de una tirosina quinasa oncogénica puede tener mérito clínico así como implicaciones para la toxicidad del tejido huésped (Busse, 2001).

Inhibidores de la tirosina quinasa (TKI) son eficaces en el tratamiento selectivo de diversos tumores malignos. Imatinib fue el primero en introducirse en oncología clínica, y fue seguido por fármacos como gefitinib, erlotinib, sorafenib, sunitinib, y dasatinib (Hartmann et al. 2009). Aunque comparten el mismo mecanismo de acción, a saber, la inhibición competitiva ATP en el sitio de unión catalítica de la tirosina quinasa, ellos difieren entre sí en el espectro de quinasas blanco, su farmacocinética, así como en los efectos adversos de cada uno. Con variaciones de fármaco a fármaco, inhibidores de tirosinquinasa causan toxicidad de la piel, incluyendo la foliculitis, en más de 50% de los pacientes (Hartmann, 2009). Entre los inhibidores tirosin-quinasa que están disponibles comercialmente por el momento, los agentes que se dirigen a EGFR, erlotinib y gefitinib, muestran el más amplio espectro de efectos adversos en la piel y el cabello, incluyendo la foliculitis, paroniquia, crecimiento del vello facial, eritema facial, y diversas formas de alopecia frontal. En contraste, la foliculitis no es común durante la administración de sorafenib y sunitinib, que se dirigen a VEGFR, PDGFR, FLT3, y otros, mientras que ambos agentes se han asociado con hemorragias en astilla subungueales (Hartmann, 2009). Además de los efectos secundarios hematológicos de la mayor parte de TKIs como la anemia, trombocitopenia y neutropenia, los efectos adversos extra hematológicos más comunes son edema, náuseas, hipotiroidismo, vómitos y diarrea. En cuanto a posibles efectos a largo plazo, la toxicidad genera insuficiencia cardiaca congestiva, lo cual es objeto de debate en pacientes que reciben terapia de imatinib y sunitinib; Sin embargo, esta observación se relaciona probablemente a la selección de pacientes, aunque, TKIs en general parece ser una clase de fármaco muy bien tolerado (Hartmann, 2009). Otra de las dificultades es que cerca del 60% de los pacientes tratados con estos medicamentos presentan recaída a los doce meses en promedio debido a mutaciones en sus sitios blancos, generados por la alta tasa de mutación que presentan las células tumorales. Por estas razones nuevas alternativas terapéuticas deben ser generadas. Algunas como la tecnología con oligonucleótidos antisentido, pueden disminuir la expresión de proteínas blanco mediante la interacción con el mRNA y no con su producto, dando un enfoque más seguro a la terapia.

3.9 Oligonucleótidos antisentido

Los oligonucleótidos antisentido (ASO) son hebras de cadena sencilla sintéticamente preparados con secuencias de desoxiribonucleótidos, normalmente 18-21 nucleótidos de

longitud y complementarios a la secuencia de ARNm del gen diana. Como los ASO son capaces de unirse selectivamente a secuencias de ARNm afines por hibridación específica de secuencia, se obtiene como resultado la escisión o la inhabilitación del mRNA y, por tanto, inhibe la expresión del gen diana **Ilustración 6.**

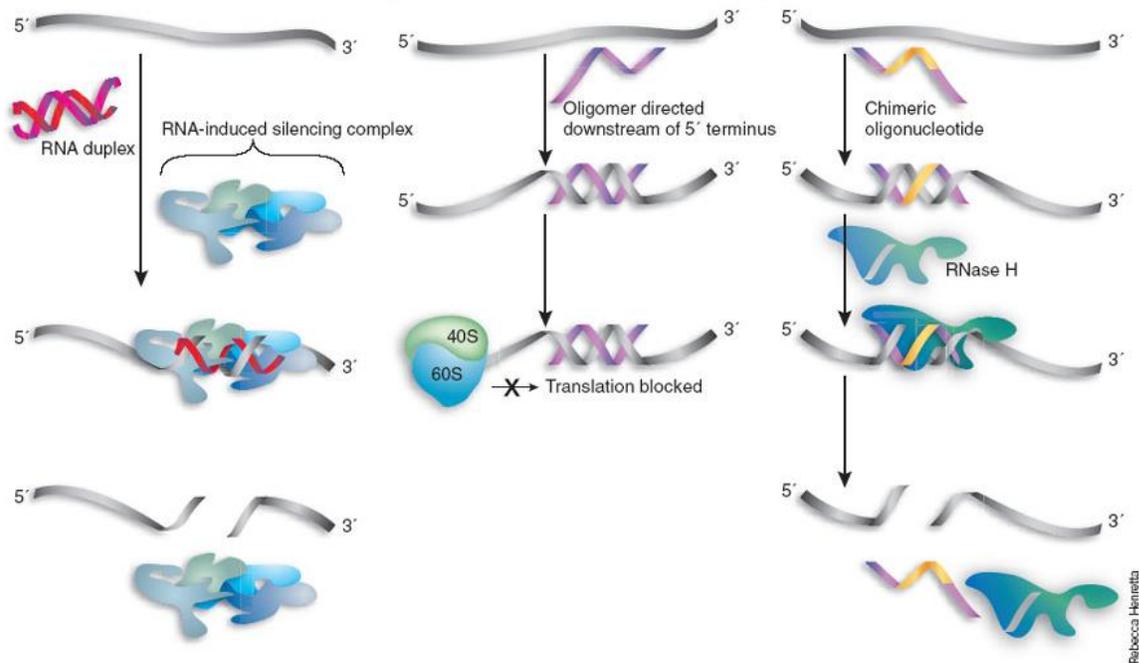


Ilustración 6 Mecanismo de acción de oligonucleótidos antisentido (Corey, 2007)

ASOs pueden ser utilizados como herramienta para disminuir la expresión de proteínas que se encuentran involucradas en la progresión tumoral como EGFR y ciclina D1. La disminución de la expresión de estas dos proteínas, tendría muchas ventajas, entre estas: I) inhibiría la progresión del ciclo celular II) evitaría la activación de los dominios tirosinquinasa de EGFR, debido a su baja expresión III) los oligonucleótidos pueden ser diseñados para actuar en regiones en las cuales se registra la menor tasa de mutación y así asegurar la disminución de la expresión de receptores mutados y no mutados y IV) dado el caso que otras vías de señalización estén siendo activadas por receptores diferentes a los TK, la inhibición de la expresión de ciclina D1 detendrá el ciclo celular en fase G1.

4. Metodología

4.1 Líneas celulares

Se emplearon líneas celulares adherentes derivadas de Carcinoma Mucoepidermoide Pulmonar H292 (ATCC® CRL-1848™), Carcinoma Pulmonar A549 (ATCC® CCL-185™) y Células fibroblásticas de Pulmón MRC-5 (ATCC® CCL-171™). Las líneas celulares fueron seleccionadas del banco de células del Grupo Farmacogenética del Cáncer, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia y presentan expresión constitutiva de EGFR y Ciclina D1.

Las líneas tumorales fueron cultivadas en medio RPMI 1460 (Sigma®) Suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Gibco®) al 10%, Bicarbonato de Sodio 1mM, HEPES 25 mM, y Gentamicina (100 µg/mL), en frascos de cultivo celular de 75 cm² (Corning). La línea fibroblástica fue cultivada en medio MEM (Gibco™) Suplementado con SFB (Gibco®) al 10%, Piruvato de Sodio 1mM y Gentamicina (100 µg/mL). Las condiciones de cultivo fueron 37°C con 5 % de CO₂ en aire y 100% de humedad relativa.

Para el mantenimiento de los cultivos se realizó un cambio de medio cada 72 horas. Una vez se obtenía una confluencia celular máxima de 80%, se retiró el medio y se realizaron lavados con solución de buffer de fosfatos (PBS) de 149.2 mM, pH:7.3, con el fin de retirar los restos de SFB, posteriormente se desprendieron células con ayuda de una solución de tripsina-EDTA 0.025%-0.03% respectivamente (v/v) durante 5 minutos en incubadora a 37°C. Con esta suspensión celular se evaluó la viabilidad celular mediante tinción con azul de tripan al 0.4%.

4.2 Oligonucleótidos Antisentidos

Los oligonucleótidos antisentido empleados en la investigación tuvieron un tamaño no superior a 20 nucleótidos, presentaban una complementariedad del 100% con su mRNA

blanco y reportaron actividad en la regulación de sus mRNAs blancos. Los oligonucleótidos controles correspondieron a secuencias del ADN no complementarias a los mRNAs blancos y que presentaran una complementariedad menor al 70 % con otros mRNA. Los oligonucleótidos fueron sintetizados con modificaciones fosforotioato en la estructura de azúcar-fosfatos de los cinco nucleótidos de los extremos 3' y 5' para aumentar su estabilidad.

4.3 Inserción de agentes terapéuticos

La inserción de los oligonucleótidos antisentidos en las células, se realizó empleando la técnica de lipofección empleando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen®) de acuerdo con las instrucciones dadas por el fabricante. Brevemente, 6500, 4500 y 7000 células de las líneas H292, A549 y MRC-5, respectivamente, se sembraron en placas de 96 pozos por 24 horas a fin de que se adhirieran a la placa y alcanzaran una confluencia del 80%. Después de un lavado con PBS, se transfectaron con un volumen de 100 μ l de solución Optimen-Lipofectamina (1/100) y una concentración en el orden de μ M de cada uno de los oligonucleótidos. A las 24 horas postransfección se realizó un cambio de medio por los medios sugeridos anteriormente suplementado con SBF 10%. Las células transfectadas fueron utilizados en posteriores ensayos.

Los agentes químicos Erlotinib y Arcyriaflavin A fueron resuspendidos en DMSO y posteriormente suministrados directamente en el medio Optimen (Gibco®). Cuando se aplicaron tratamientos con ASOs, Erlotinib y Arcyriaflavin A simultáneamente, se realizaron preparaciones independientes para cada uno de los agentes terapéuticos de manera antes mencionada, y posteriormente fueron mezcladas y suministradas a las células

4.4 Ensayos de citotoxicidad

Para valorar el efecto citotóxico de los diferentes tratamientos, células sembradas en placas de 96 pozos fueron tratadas con diferentes concentraciones finales de ASOs, sus respectivos controles, y demás agentes terapéuticos: 0.125, 0.25, 0.5, y 1 μ M. Cada pozo se trató con 100 μ L de cada una de las diluciones, dejando un grupo de pozos no tratados como control de crecimiento, un grupo de pozos sin células como blanco de

tratamiento y un grupo de pozos control de Lipofectamina sin tratamiento. Las células de cada uno de los tratamientos fueron analizadas inicialmente a las 24 horas pre-tratamiento (el cual representará el tiempo 0 horas) con el ensayo de Resazurina para determinar la población celular viable inicial. A su vez, se valoró la recuperación celular pos-tratamiento con el fin de determinar el efecto citotóxico de los tratamientos. Las células fueron incubadas con medio suplementado durante 24, 48 y 72 horas post-transfección, pasados estos tiempos las células fueron evaluadas con la prueba de Resazurina (4.4µM/pozo) y se realizaron las lecturas en el espectrofluorómetro TECAN GENios a una medida de fluorescencia de 535 nm - excitación - 595 nm - emisión, con el fin de determinar el efecto del compuesto a partir gráficas realizadas empleando los datos de concentración Vs. porcentaje de supervivencia celular. Después de calcular los porcentajes de supervivencia celular relativos a las células control (no tratadas), se construyeron curvas dosis-respuesta y se calcularon las concentraciones letales 50 (CL-50) de cada tratamiento, para cada línea celular, empleando una regresión no lineal en el programa estadístico GraphPad–Prism 6® (GraphPad Software, USA). Para cada tratamiento se realizaron al menos dos replicas independientes con resultados consistentes cada una de ellas por triplicado. Luego, con las concentraciones CL-50s obtenidas para los ASOs a las 72 horas pos-tratamiento, se analizaron las diferencias en las tasas de crecimiento celular utilizando el índice de crecimiento, denotado como el porcentaje de células viables.

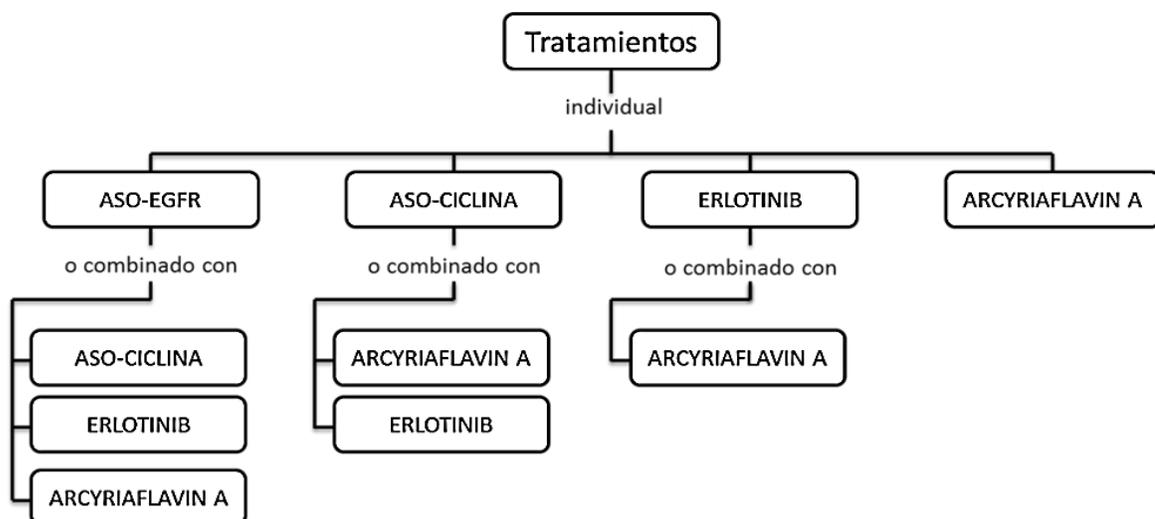


Ilustración 7. Tratamientos empleados en la investigación. Los tratamientos fueron evaluados en las líneas celulares tumorales y fibroblásticas para establecer las CL-50 y su actividad antitumoral *in vitro*. Las concentraciones evaluadas para cada tratamiento variaron entre 0,125 y 1 µM

4.5 Ensayos de inmunofluorescencia

Una alícuota de 65.000 células de cada una de las líneas celulares se sembraron en placas de 12 pozos, que contenían en su interior laminas cubreobjetos, previamente limpiadas con etanol y esterilizadas por calor. Pasadas 24 horas, ya adheridas las células a la lámina, se fijaron con Paraformaldehído al 4% (vol/vol) en PBS durante 10 minutos y se permeabilizaron con 0.5% de Triton X-100 (vol/vol) en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. Para mitigar la auto-fluorescencia presente en las células, fueron sometidas a una solución de Cloruro de Amonio (NH_4Cl_2) 50mM y 0.1M de Glicina en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron en PBS/Albumina 1% durante 30 minutos a 37°C, seguido de la exposición a anticuerpo primario monoclonal anti-Ciclina D1 (Dilución 1/100; SC-20044; Santa Cruz, CA) o anti-EGFR (Dilución 1/100; SC-367974; Santa Cruz, CA) a 4°C durante toda la noche. Consecutivamente, se adicionaron los siguientes anticuerpos secundarios policlonales IgG: 1) Anticuerpo generado en cabra, anti-ratón, conjugado con CFL 488 (Dilución 1/200; sc-362257; Santa Cruz, CA) y 2) Anticuerpo generado en burro anti-conejo, conjugado con CFL 594(Dilución 1/200; sc-362281; Santa Cruz, CA) . Finalmente, las células fueron tratadas con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.1µg/ml) durante 5 minutos en cámara húmeda a 37°C protegido de la luz. Posterior a cada paso, las células fueron sometidas a tres lavados con PBS por 5 minutos cada uno. Las láminas cubreobjetos fueron montadas en láminas portaobjetos, invirtiéndolas, adicionando Glicerol al 70% y sellando los bordes con resina; y visualizadas en un microscopio invertido de escaneo láser confocal Nikon C1, Software EZ-C1. Ver. 3.90. Las fotografías fueron tomadas usando los objetivos 10X y 40X, y el análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ 1.43 Java 1.6.0_20 de 64-bit. Como controles de la técnica se emplearon células fijadas, permeabilizadas en la lámina, e incubadas con DAPI y anticuerpo secundario solamente.

4.6 Ensayo de apoptosis

El ensayo de apoptosis se realizó empleando la técnica de TUNEL (TdT-mediated -dUtp Nick End Labeling) a través del equipo comercial in situ BrdU-Red DNA Fragmentation (TUNEL) Assay Kit (Lifetecnologies®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, las células fueron fijadas empleando formaldehído/PBS 4% e incubadas durante 15

minutos a TA. Posteriormente, las células fueron tratadas con solución de proteinasa K (20 µg/ml) durante 5 minutos a TA. A continuación se incubaron con solución de permeabilización (0,1% de Tritón X-100) durante 10 minutos a TA y se añadió la mezcla de reacción proporcionada por la casa comercial, seguidamente las células fueron incubadas durante 1 hora a 37 °C en oscuridad, y finalmente fueron visualizadas en un microscopio invertido de escaneo láser confocal Nikon C1, Software EZ-C1. Ver. 3.90. Las fotografías fueron tomadas usando el objetivo de 10X y el análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ 1.43 Java 1.6.0_20 de 64-bit. Como controles de la técnica se emplearon células fijadas, permeabilizadas en la lámina, e incubadas con DNAsa.

4.7 Extracción de RNA y Síntesis de cDNA

Una alícuota de 65.000 células de cada una de las líneas celulares se sembró en placas de 12 pozos y fueron tratadas ASO-EGR, ASO-CICLINA y sus respectivos controles como se indica en la sección 4.4, con modificaciones en los volúmenes de reactivos utilizados proporcional al tamaño de los pozos. La extracción de RNA total se llevó a cabo directamente de la placas de cultivo empleando el reactivo TRIzol(thermofisher ®) siguiendo las instrucciones de la casa fabricante. Para ello, a cada pozo de células tratadas se les retiró el medio de cultivo, se adicionó 500ul de TRIzol(thermofisher ®) y fueron incubadas durante 5 minutos a TA. Posteriormente los homogeneizados fueron trasladados a tubos nuevos de 1.5 ml, y mezclados con 100 ul de cloroformo e incubadas durante 3 minutos, al término de este tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g/min durante 15 minutos. La mezcla se separó en una fase inferior roja (fenol-cloroformo), una fase intermedia y una fase superior incolora, esta última fue transferida a tubos nuevos de 1.5 ml y mezclados con 250 ul de isopropanol e incubados a TA durante 10 minutos, seguidamente, las muestras fueron centrifugadas 12.000 g/min durante 10 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado con 500 ul de etanol al 70%. Por último, el RNA fue resuspendido en 50 ul de Agua Ultrapura libre de RNAsas en incubado a 60° C para mejorar la solubilidad del mismo. El RNA total obtenido de las muestras se cuantifico por Qubit® RNA Assay Kit (Q32852: Invitrogen®) Finalmente, los ácidos nucleicos fueron almacenados a 20°C y empleado en la retrotranscripción.

Para la síntesis de cDNA se utilizaron 450 ng de cada una de las muestras de RNAs y se realizó empleando el kit QuantiNova Reverse Transcription (205413; Qiagen) según indicaciones del fabricante, el volumen final de reacción fue de 20 μ l. La muestra de ARN se incubó en la mezcla de eliminación de gDNA QuantiNova a 45°C durante 2 minutos para reducir eficazmente el ADN genómico contaminante. Después de la eliminación del ADN genómico, la muestra de ARN fue retrotranscrita utilizando los reactivos dispuestos por el kit para este proceso e incubada 3 minutos a 25°C, 45°C durante 10 minutos y por último se inactiva la enzima a 85°C durante 1 minuto. Las reacciones fueron corridas en el termociclador My Cycler (Biorad®).

4.8 Ensayos de PCR en tiempo real

Los ensayos de cuantificación relativa de la expresión génica se realizaron empleando los cDNAs obtenidos a partir de muestras de células tratadas, con el kit para PCR en tiempo real LightCycler® 480 SYBR Green I Master (4707516001; Roche®). Para esto se utilizó un programa de amplificación de 40 ciclos, una fase de desnaturalización 95°C por 10 segundos, una fase de anillamiento de 58°C durante 15 segundos, y una fase de extensión a 72° durante 30 segundos, finalmente las muestras fueron sometidas a un análisis de curvas melting para descartar la presencia de amplicones inespecíficos. Cada reacción tuvo un volumen de 15 μ l, que incluyeron el cDNA, los iniciadores específicos **Tabla 1**, y la mezcla de reacción, las reacciones de amplificación fueron realizadas en el equipo Light Cycler 480 II (Roche®).

Previo a la realización de ensayos de cuantificación relativa de la expresión génica, cada uno de los pares de cebadores empleados durante los ensayos de amplificación fueron evaluados para establecer las eficiencias de amplificación. Para ello, cDNAs en diferentes diluciones fueron amplificados con cada par de cebadores. Los CT (*threshold cycle*) obtenidos fueron graficados (CT vs Dilución) y mediante el cálculo de una regresión lineal se obtuvo la eficiencia de amplificación.

Teniendo en cuenta que las cinéticas de amplificación que se determinaron no fueron similares, los valores CT (*threshold cycle*) obtenidos por triplicado, para cada tratamiento, fueron empleados para establecer los cambios en la expresión génica con el método de cuantificación relativa de doble delta de CT ($\Delta\Delta C_T$) modificado por Pfaff et al. usando

como genes de referencia RPLPO y GAPDH, los cuales presentan expresión constitutiva (Pfaffl, 2001). Como control negativo se utilizaron en lugar de cDNA, agua grado biología molecular.

4.9 Análisis estadístico

Las comparaciones entre tratamientos se realizaron a través de la prueba t- student con el software estadístico GraphPad Prism versión 6.00 (GraphPad Software®). Para establecer correlaciones se utilizó el índice de correlación de Spearman. Los valores estadísticamente significativos fueron aquellos con valor $p < 0.001$.

Tabla 1 Cebadores utilizados para evaluar la expresión relativa de los genes CCND1, EGFR y BCLXL. Los datos suministrados en la tabla corresponden a la secuencias nucleotídicas de cada pareja de cebadores y el tamaño de cada uno de los amplicones generados.

CEBADORES	SECUENCIA (5´ a 3´)	TAMAÑO DEL AMPLICÓN (pb)
CICLINA D1 FORWARD	CCGTCCATGCGGAAGATC	75
CICLINA D1 REVERSE	GAAGACCTCCTCCTCGCACT	
EGFR FORWARE	GGCAGGAGTCATGGGAGAA	153
EGFR REVERSE	GCGATGGACGGGATCTTAG	
BCL-XL FORWARE	TTAGGATAGACAGTAGCATGA	145
BCL-XL REVERSE	TTAGGATAGACAGTAGCATGA	
RPLPO FORWARE	TTAGGATAGACAGTAGCATGA	147
RPLPO REVERSE	TTAGGATAGACAGTAGCATGA	
GAPDH FORWARD	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	224
GAPDH REVERSE	GAAGATGGTGATGGGATTTTC	

5. Resultados y discusión

5.1 Expresión de ciclina D1 y EGFR en líneas celulares

Para verificar si las líneas celulares MRC-5, H292 y A549 expresaban Ciclina D1 y EGFR, se realizaron ensayos de expresión génica e inmunofluorescencia, cuyos resultados indicaron que todas las líneas celulares tenían transcripción activa de los genes de interés. Con el fin de establecer si había expresión de los genes en las líneas celulares empleadas, se evaluó inicialmente la expresión basal de los mRNAs codificantes para cada una de las proteínas por RT-PCR en tiempo real, normalizando los valores C_T obtenidos con los genes housekeeping GADPH y RPLPO.

Todas las líneas celulares expresaron el gen CCND1, una leve sobreexpresión fue observada en las líneas tumorales respecto a la línea fibroblástica **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, sin embargo, esta no fue significativa estadísticamente. Estos datos fueron confirmados a nivel proteico empleando la técnica de inmunofluorescencia indirecta, mediante la cual se observó la proteína codificada por el gen CCND1 en todas las líneas celulares, sin embargo, la localización celular de esta proteína fue variable entre las mismas. Los datos observacionales indican que para las líneas celulares A549 y H292, la proteína tiene una localización predominantemente citoplasmática, contrario a lo identificado en la línea celular MRC-5, en la cual presentó con una localización predominantemente nuclear **Ilustración 8**.

La expresión del gen EGFR fue evidente en todas las líneas celulares, no obstante, los niveles de expresión fueron significativamente más altos en las líneas tumorales que en la línea fibroblástica **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** A nivel proteico, todas las líneas celulares mostraron una expresión de EGFR a nivel de sus membranas **Ilustración 9**.

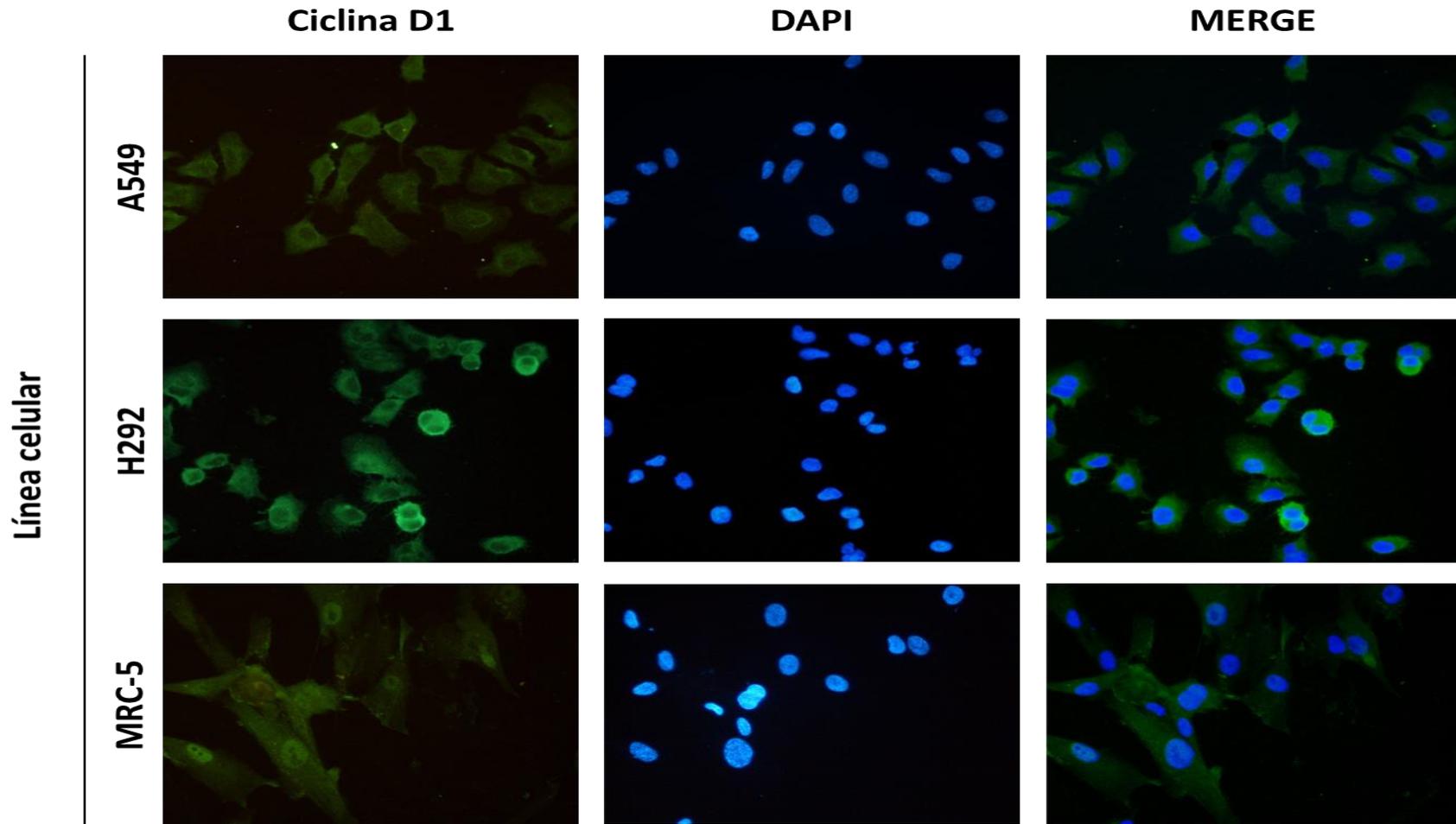


Ilustración 8 Expresión de Ciclina D1 en líneas celulares tumorales y normales. Células fijadas en placas de 12 pozos fueron fijadas, permeabilizadas y tratadas con anticuerpo primario monoclonal anti-Ciclina D1 (Dilución 1/100; SC-20044; Santa Cruz, CA) y los anticuerpos secundarios policlonales IgG generados en cabra, anti-ratón, conjugado con CFL 488. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las células fueron observadas empelando el objetivo 40X.

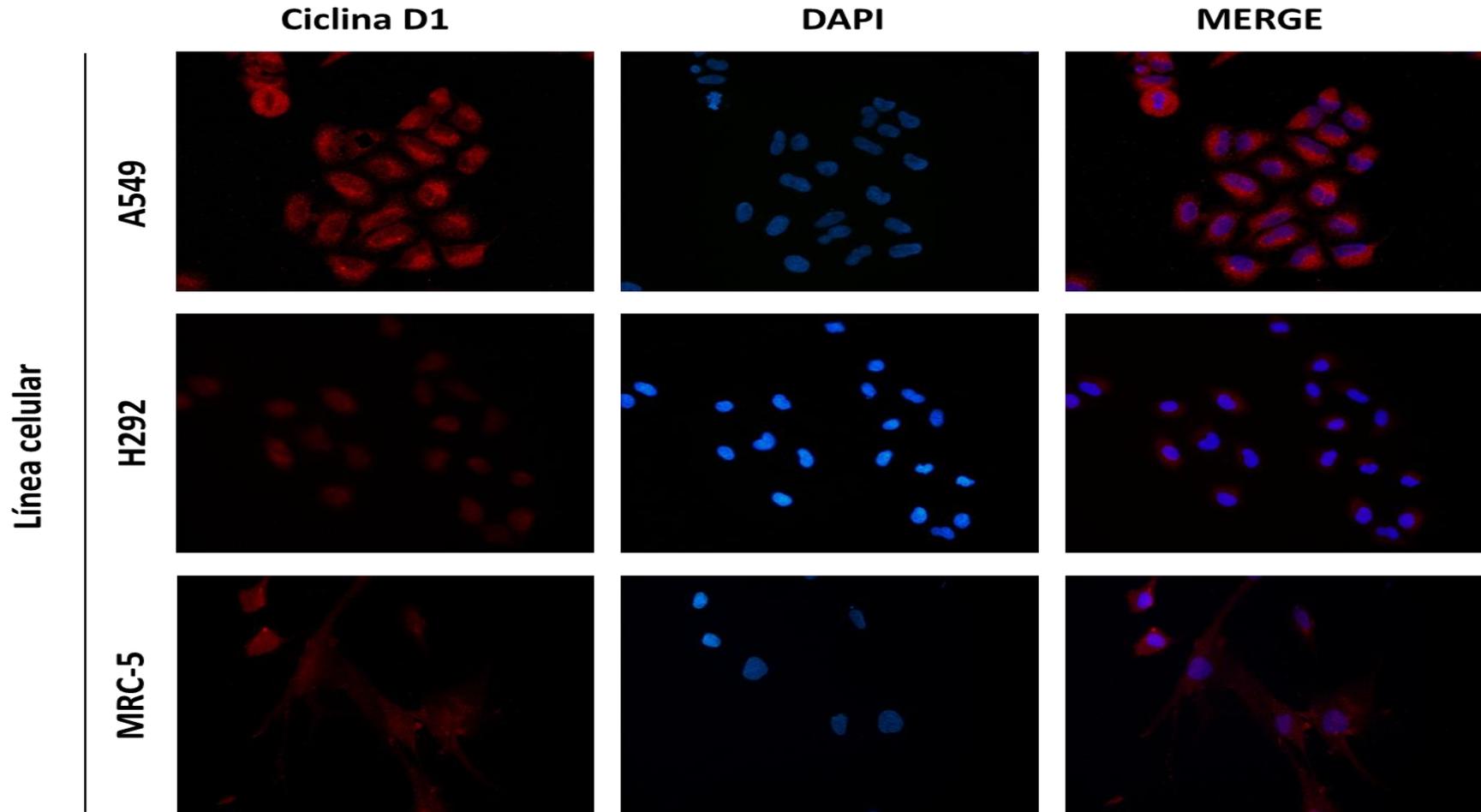
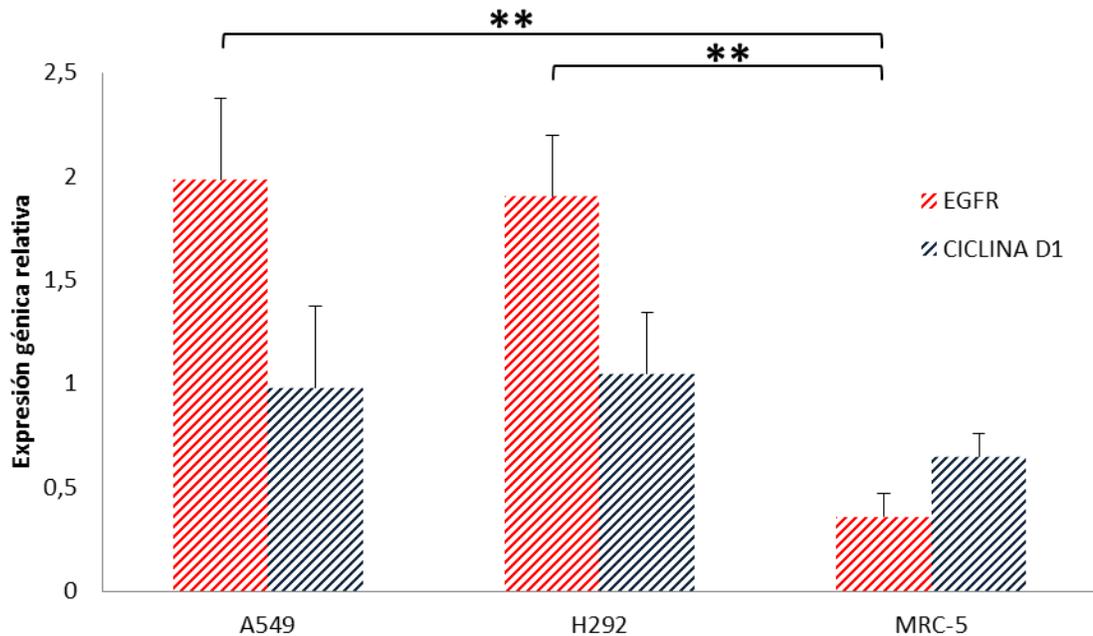


Ilustración 9 Expresión de EGFR en líneas celulares tumorales y normales. Células fijadas en sembradas en placas de 12 pozos fueron fijadas, permeabilizadas y tratadas con anticuerpo primario monoclonal anti-EGFR (Dilución 1/100; SC-367974; Santa Cruz, CA) y los anticuerpos secundarios policlonales IgG generados en cabra, anti-ratón, conjugado con CFL 596. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las células fueron observadas empelando el objetivo 40X.

Resultados y discusión



Gráfica 1 Expresión basal de genes EGFR y CCND1 en líneas celulares tumorales y fibroblásticas. Los valores C_T promedios obtenidos para los genes CCND1 y EGFR fueron utilizados para calcular los valores de expresión relativa de los mismos en cada una de las líneas celulares. GAPDH fue utilizado como gen normalizador en cada una de las líneas celulares. ** $P < 0.01$

La expresión a la alta de CCND1 en las líneas celulares tumorales respecto a la línea fibroblástica es coherente con los informes en pacientes con carcinomas de células escamosas laríngeas, neuroblastoma y cáncer del pulmón, en los cuales el gen se encuentra sobreexpresado, y además, es asociado con mal pronóstico de la enfermedad, incluso, estudios previos han demostrado que mutaciones, amplificaciones o sobreexpresión del gen CCND1 alteran la progresión del ciclo celular, y conducen a un aumento en la velocidad de crecimiento de las células que las poseen. Estas alteraciones han sido observadas en una variedad de aislados de tumores incluyendo cáncer epitelial de ovarios, cáncer colorectal, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer nasofaríngeo y cáncer de pulmón (Xia, 2015; Kim, 2015; Huang XH, 2014; Stahl P, 2015; Liu Z, 2014; Liao K, 2014). Estos resultados, constituyen una evidencia más del papel que juegan estos genes en el mantenimiento y patogénesis de esta enfermedad.

La principal función de la proteína Ciclina D1 es el control de progresión de la fase G1-S. Un aumento en la expresión de esta proteína se relaciona directamente con una mayor velocidad en la progresión de la fase G1-S, por ende, facilita indirectamente la mitosis de

las células. Las líneas celulares tumorales poseen un ciclo celular desregulado, el cual se caracteriza por la expresión de genes como el CCND1.

Por otro lado, la localización de ciclina D1 en células no tumorales es predominantemente nuclear, debido a que está involucrada en la activación transcripcional de genes para regular la progresión del ciclo celular (Sherr C. J. & Roberts J. M., 2004), no obstante, puede ser localizada a nivel citoplasmático en células altamente diferenciadas como la neuronas, donde su principal función es inhibir el proceso de apoptosis, o cuando va a ser degradada vía proteosoma. Algunas investigaciones han documentado que cuando ciclina D1 tiene una localización citoplasmática puede regular la metástasis e invasión celular de tejidos tumorales, lo cual, constituye una explicación a la localización de la proteína en las líneas celulares tumorales analizadas en el presente trabajo de investigación (Fusté, 2016). Estudios han identificado que Paxilina constituye un sustrato del complejo de Cdk4/ciclina D1. Paxilina es una proteína que liga los receptores de membrana implicados en conexiones celulares con el citoesqueleto, su ausencia promueve la pérdida de contacto entre el citoesqueleto y las integrinas implicadas en la unión de las células a sustratos extracelulares, incrementando la dinámica y la movilidad celular (Fusté, 2016). El complejo de Cdk4/ciclina D1 fosforila una fracción de paxilina específicamente asociada a la membrana celular, y promueve la activación de Rac1, desencadenando así una alteración de la membrana y la invasión celular tanto en los fibroblastos normales como en las células tumorales. La localización de ciclina D1 en el citoplasma no actúa simplemente para restringir la proliferación celular, sino que constituye un mecanismo funcionalmente relevante que opera en condiciones normales y patológicas para controlar la adhesión celular, la migración y la metástasis mediante la activación de un CCND1 Cdk4-paxillin -Rac1 (Fusté, 2016).

Las células fibroblásticas normales expresan EGFR en su membrana celular, pues la activación de dichos receptores está involucrado en el crecimiento y división celular, sin embargo, en células tumorales este se encuentra con una mayor expresión debido a la tasa de crecimiento que presentan las mismas y aneuploidías que aumentan el número de copias del gen que codifica para esta proteína (Lee, 2006). Adicionalmente, muchas de estas células poseen mutaciones en estos receptores que les proporcionan una ganancia de función y permiten la activación constitutiva de los mismos aún en ausencia de

factores de crecimiento, sin embargo, las líneas celulares empleadas en el presente estudio no han sido documentadas con mutaciones en este gen. Los resultados del presente estudio confirman que EGFR se sobreexpresa en células tumorales, lo que es un evento común una gran variedad de tumores humanos incluyendo cáncer de mama, gástrico, colorrectal, esofágico, próstata, renal, páncreas, y de ovario (Salomon, 1995). La activación de la vía de señalización del EGFR tiene muchos efectos incluyendo aumento de la proliferación y angiogénesis y disminución de la apoptosis. La alta expresión de EGFR se ha asociado con etapa avanzada del tumor, la resistencia a las terapias estándar (terapia hormonal, la quimioterapia, y la radiación) (Newby JC, 1997; Sartor, 2000) y, en algunos tumores, con mal pronóstico del paciente.

Teniendo en cuenta que las líneas celulares expresan los transcritos de Ciclina D1 y EGFR, se decidió evaluar el efecto de los oligonucleótidos antisentido sobre la proliferación y viabilidad de las líneas celulares tumorales y fibroblásticas.

5.2 Efectos citotóxicos de ASOs, Erlotinib y Arcyriaflavin

A

Para todas las líneas celulares los mayores efectos sobre la disminución de la proliferación celular fueron obtenidos empleando la máxima concentración evaluada (1 μ M) a las 72 horas postratamiento **Anexo 1-3**.

En las líneas celulares tumorales los oligonucleótidos antisentido disminuyeron la supervivencia celular a medida que aumentaba su concentración molar, sin embargo, el efecto fue más pronunciado en la línea celular A549. En las máximas concentraciones evaluadas los oligonucleótidos antisentidos generaron una mayor disminución de la supervivencia celular respecto a sus controles, tanto en la línea celular A549 como en H292, sin embargo, los valores de supervivencia celular generados por los controles fueron inferiores en ~10% a los obtenidos con el vehículo transvector, lo que nos indica que generan un efecto citotóxico mínimo **Gráfica 2**.

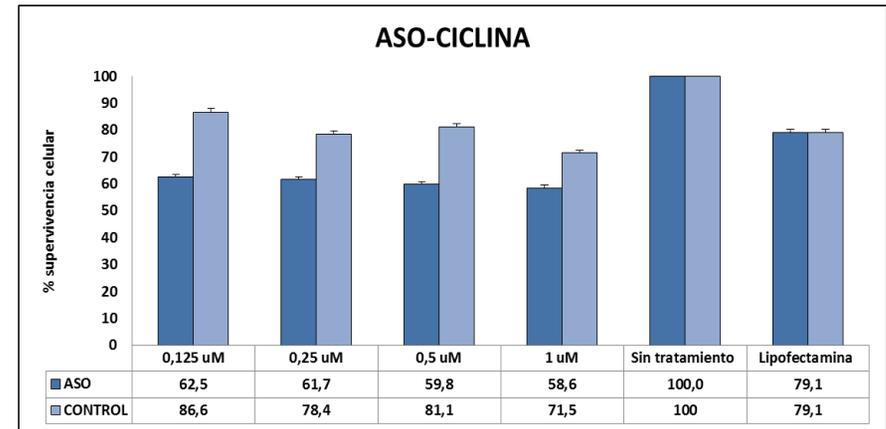
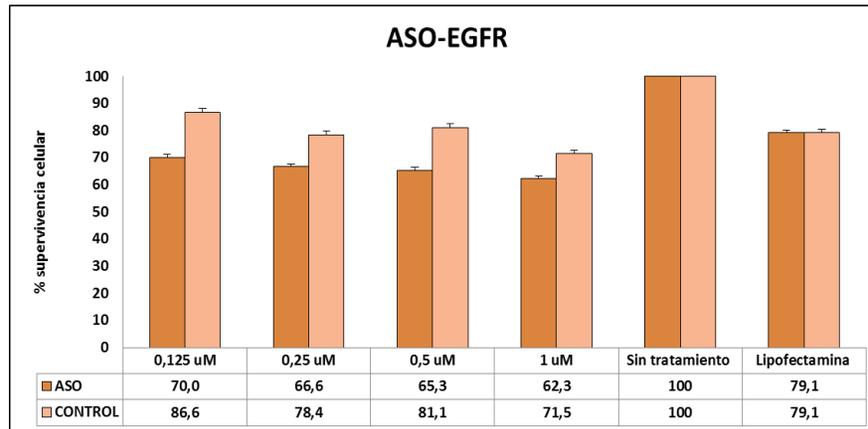
Los tratamientos con ASOs tuvieron un mismo comportamiento en la línea celular fibroblástica aunque los valores de supervivencia celular en la máxima concentración evaluada fueron superiores a los observados en las líneas tumorales, y los controles disminuyeron la proliferación celular, pero en una proporción similar a la del vehículo de transfección **Gráfica 3**.

Para calcular las concentraciones letales 50, se hicieron análisis de regresión lineal empleando los datos de supervivencia celular a las 72 horas postransfección para todas las concentraciones evaluadas, los valores fueron tenidos en cuenta solo cuando el coeficiente de correlación (r^2) fue mayor a 0,75 y sugería una buena estimación de los CL-50s **Anexo 4**. De esta manera, los valores CL-50 para los controles solo pudieron ser estimados en la línea celular A549 (CONTROL-CICLINA: 28,9 μ M; CONTROL-EGFR:3,33 μ M), y fueron siempre superiores a los estimados en los respectivos tratamientos (ASO-CICLINA:0,76 μ M ASO-EGFR: 0,89 μ M) **Tabla 2**.

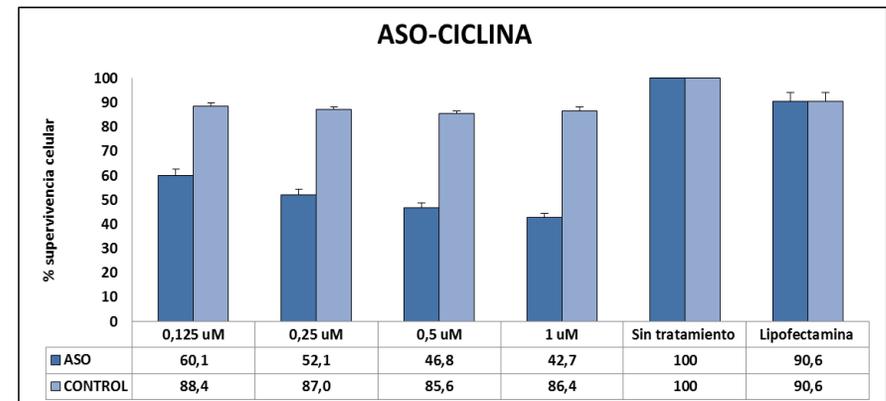
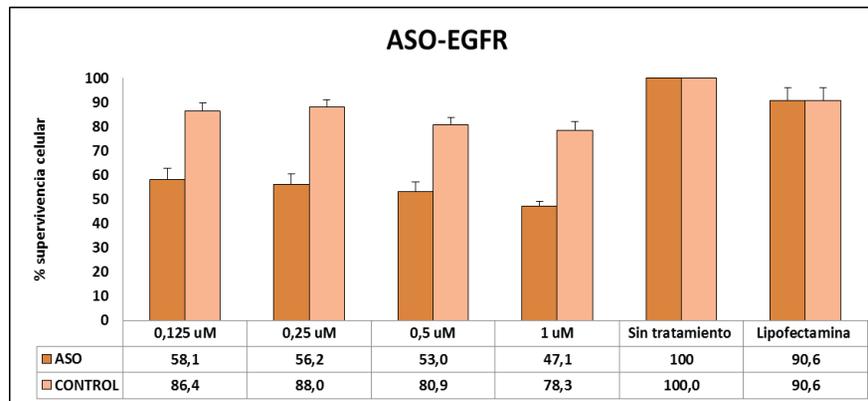
Los oligonucleótidos con modificaciones de tipo fosforotioato en su estructura azúcar-fosfato son fáciles de sintetizar y asumen patrones de unión al mRNA con puentes de hidrógeno como los reportados por Watson-Crick, por lo cual pueden activar la degradación mediada por ARNasa H del ARNm y son resistentes a las nucleasas. Los efectos de los antisentido con modificaciones fosforotioato pueden observarse durante más de 48 horas después de una sola aplicación a células, resultados que concuerdan con los obtenidos en nuestra investigación, donde la actividad de los oligonucleótidos fue observada hasta las 72 horas postratamiento (Bonham, 1995). A pesar que la estabilidad de los oligonucleótidos fosforotioatos puede variar con la secuencia y el metabolismo de la línea celular tratada (Crooke, 1995), estos han sido los más prometedores para usar en medicamentos de este tipo, de hecho, los oligonucleótidos antisentido fosforotioatos contra bcl-2, raf-1, o PKC- α , han sido empleados en estudios clínicos (Webb A, 1997; Stevenson JP, 1999; Nemunaitis J, 1992), no obstante, la presencia de átomos de azufre en estas moléculas puede causar un efecto citotóxico independiente del mecanismo antisentido, pues forman estructuras estables con proteínas mediante puentes disulfuro, y causan la muerte de las células tratadas. Los oligonucleótidos utilizados en este estudio, presentan modificaciones de esta clase en los primeros cinco nucleótidos de los extremos 3' y 5', lo cual hace posible que tengan una buena afinidad con sus mRNAs blancos, no obstante, aun cuando las modificaciones solo se encuentran en los extremos,

constituyen la explicación para la citotoxicidad causada por CONTROL-CICLINA y CONTROL-EGFR en las líneas celulares tratadas, donde se observaron tasas de letalidad cercanas al 30%. Curiosamente, la línea celular más afectada fue H292, en la cual, el mecanismo antisentido se ve opacado por la toxicidad de las modificaciones en los oligonucleótidos. Diferentes estudios han señalado que esta línea celular es más sensible a los efectos de los agentes tóxicos que la línea A549, por ejemplo, la investigación realizada por Yoo et al. identificó que la línea celular H292 es más sensible a los efectos causados por exposición a diferentes agentes citotóxicos que la línea A549 (Yoo, 2010; Brohl, 2010). Los resultados de las pruebas de citotoxicidad sugieren que las tasas de letalidad generados por los ASOs son debidas mayormente a un efecto dependiente de la secuencia de los oligonucleótidos y no a los agentes de transfección o modificaciones químicas de tipo fosforotioato en sus extremos.

H292

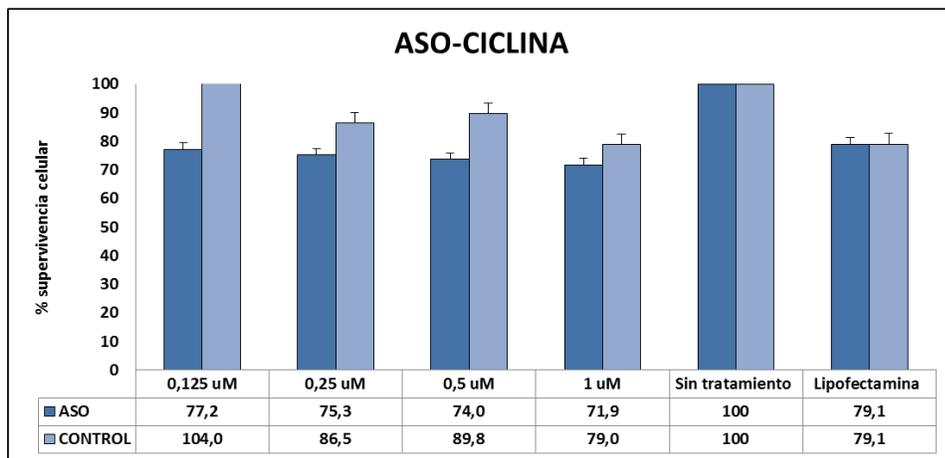
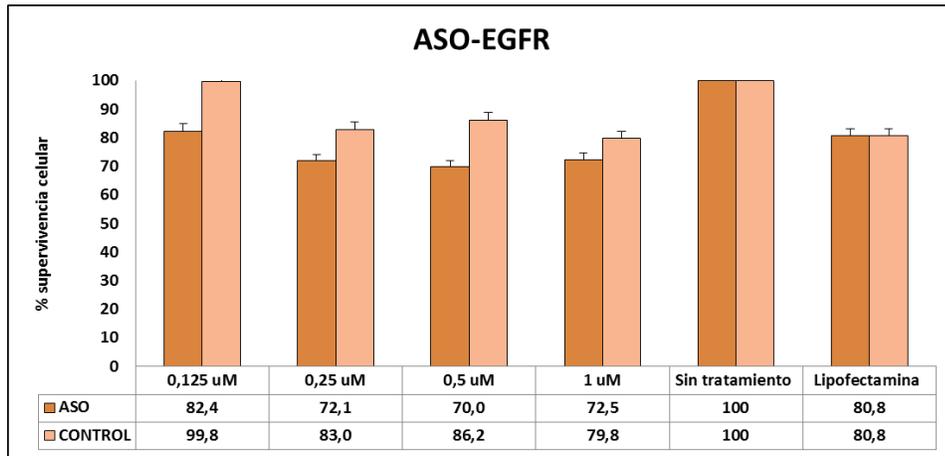


A549



Gráfica 2 Evaluación de tratamientos ASO-CICLINA y ASO-EGFR en líneas celulares tumorales. Células sembradas en placas de 96 pozos fueron transfectadas con los ASOs y sus respectivos controles (0,125, 0.25, 0.5 y 1uM). La viabilidad y proliferación de las células tratadas fueron evaluadas mediante el ensayo de Resazurina a las 72 horas postratamiento. Células no tratadas fueron utilizadas como control de crecimiento celular y células tratadas con lipofectamina fueron utilizadas para establecer la citotoxicidad del vehículo transvector.

MRC-5



Gráfica 3 Evaluación de tratamientos ASO-CICLINA y ASO-EGFR en línea celular MRC-5. Células sembradas en placas de 96 pozos fueron transfectadas con los ASOs y sus respectivos controles (0,125, 0.25, 0.5 y 1uM). La viabilidad y proliferación de las células tratadas fueron evaluadas mediante el ensayo de Resazurina a las 72 horas postratamiento. Células no tratadas fueron utilizadas como control de crecimiento celular y células tratadas con lipofectamina fueron utilizadas para establecer la citotoxicidad del vehículo transvector.

Tabla 2 Determinación de la CL-50 de ASOs en líneas celulares H292, A549 y MRC-5.

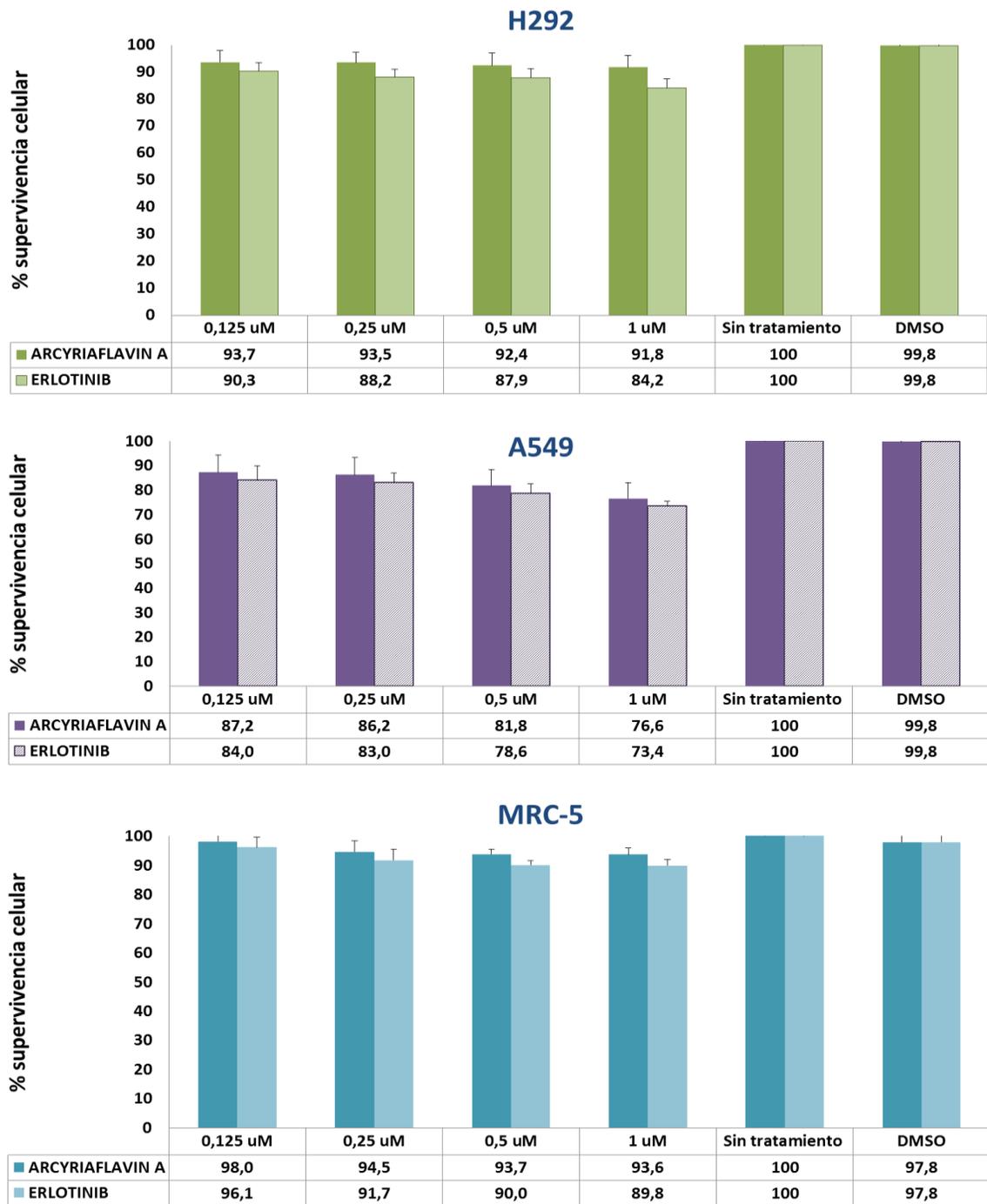
	CONTROL-CICLINA	ASO-CICLINA	CONTROL-EGFR	ASO-EGFR
A549	28,9	0,76	3,33	0,89
H292	ND	2,8	ND	3,1
MRC-5	ND	5,79	ND	ND

Teniendo en cuenta los ASOs generaban una citotoxicidad asociada a su secuencia, se realizaron ensayos para determinar si los efectos citotóxicos de los mismos eran comparables con los de agentes terapéuticos que inhiben el mismo blanco molecular pero a nivel proteico, es decir, erlotinib y Arcyriaflavin A.

Los tratamientos con erlotinib y Arcyriaflavin A en las líneas tumorales disminuyeron la supervivencia celular a medida que aumentaba la concentración molar, sin embargo, en la máxima concentración evaluada de cada tratamiento los valores de supervivencia celular son muy superiores a los obtenidos por los tratamientos con ASOs, tanto para la línea H292 como para A549, es decir, a la misma concentración el tratamiento con oligonucleótidos antisentidos genera una mayor mortalidad que Erlontib y Arcyriaflavin A **Gráfica 4 Anexo 5.**

En la línea celular fibroblastica, los valores supervivencia celular siempre estuvieron por encima del 90 %, aún en la máxima concentración evaluada de los tratamientos con Erlotinib y Arcyriaflavin A. En esta línea celular al igual que en las líneas tumorales, los valores de supervivencia celular generados por el tratamiento con ASOs fueron inferiores a los generados por el tratamiento con Erlontib y Arcyriaflavin A **Gráfica 4 Anexo 5.**

Al comparar las concentraciones letales 50 para cada uno de los tratamientos en todas las líneas celulares, se evidencia que los tratamientos con Erlotinib y Arcyriaflavin tienen valores superiores a los estimados para ASO-CICLINA y ASO-EGFR, respectivamente **Anexo 6**, es decir, a una menor concentración los ASOs podrían generar el mismo efecto que Erlotinib y Arciryafavin A **Tabla 3.**



Gráfica 4 Evaluación de tratamientos Erlotinib y Arcyriaflavin A en líneas celulares H292, A549 y MRC-5. Células sembradas en placas de 96 pozos fueron tratadas con Erlotinib y Arcyriaflavin A (0,125, 0.25, 0.5 y 1uM). La viabilidad y proliferación de las células tratadas fueron evaluadas mediante el ensayo de Resazurina a las 72 horas postratamiento. Células no tratadas fueron utilizadas como control de crecimiento celular y células tratadas con DMSO fueron utilizadas para establecer la citotoxicidad del disolvente.

El tratamiento con ASOs tuvo un mayor efecto sobre la disminución de la proliferación celular respecto a los demás tratamientos individuales. Estos datos son explicados por el tipo de blanco molecular al cual está dirigido cada una de las terapias. El tratamiento con oligonucleótidos antisentido está dirigido a disminuir la expresión de mRNAs, cada mRNA puede producir más de una unidad de la misma proteína, pues, durante el proceso de traducción alrededor de cada mRNA se forman estructuras denominadas poliribosomas y cada uno de esos ribosomas produce al menos una unidad funcional de la proteína, cuando se promueve la degradación o bloqueo de los mRNAs se está afectando la producción de gran cantidad de proteínas funcionales. Por el contrario, los agentes Erlotinib y Arcyriaflavin A están dirigidos a bloquear las proteínas productos del proceso de traducción de muchos RNAs, a pesar que, esta terapia puede alcanzar tasas de muerte iguales o superiores a las obtenidas con ASOs, la cantidad de sustancia requerida será mucho mayor. Por esta razón, los valores CL-50 son mucho más altos para Erlotinib y Arcyriaflavin A en comparación con ASO-CICLINA y ASO-EGFR.

Tabla 3 Determinación de la CL-50 de ASOs, Erlotinib y Arcyriaflavin A en líneas celulares H292, A549 y MRC-5

	Arcyriaflavin A	ASO-CICLINA	Erlotinib	ASO-EGFR
A549	2,53	0,76	3,33	0,89
H292	8,47	2,8	3,89	3,1
MRC-5	9,7	5,79	6,63	ND

5.3 Efectos citotóxicos del tratamiento combinado de ASOs e inhibidores de la actividad de EGFR y Ciclina D1

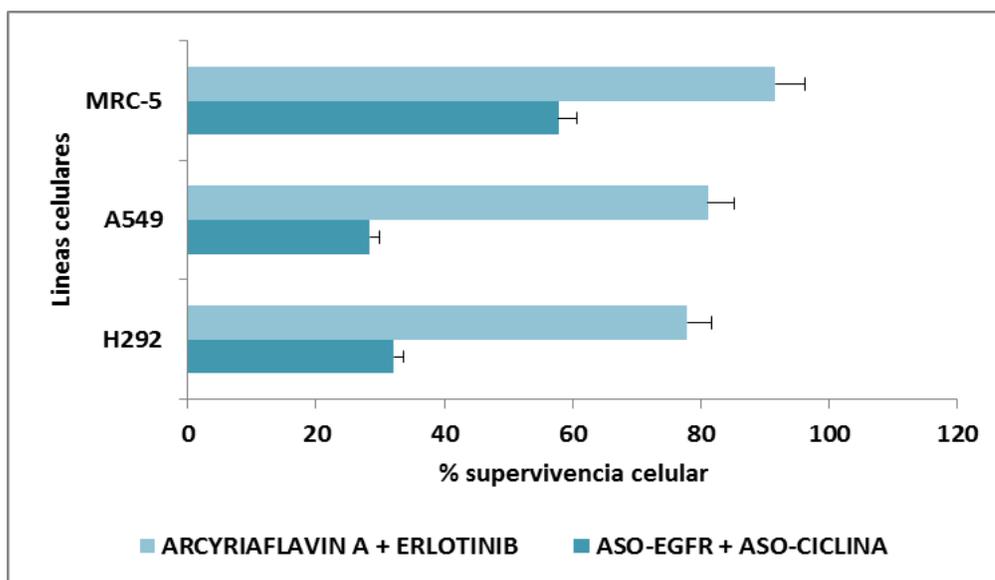
Habiendo determinado que los tratamientos individuales con ASOs, Erlotinib y Arcyriaflavin A tenían un efecto citotóxico, se procedió a establecer si los tratamientos combinados de ASOs, Erlotinib y Arcyriaflavin A potencializaban la disminución de la viabilidad y proliferación celular de las líneas tratadas respecto a los tratamientos individuales.

Los resultados mostrados a continuación corresponden a los porcentajes de supervivencia celular a las 72 horas postratamiento y 1 μ M, pues a este tiempo y concentración se generaron las mayores efectividades de los tratamientos. El tratamiento combinado de Erlotinib y Arcyriaflavin A afectó mínimamente la supervivencia de las células tratadas, pues en el caso más notable, la supervivencia celular alcanzó el 77,9% en la línea celular H292, mientras, el tratamiento combinado con ASOs fue el que mayor disminución de la proliferación celular causó en todas las líneas celulares, en las líneas celulares A549 y H292 las tasas de proliferación celular fueron del 28,4 y 32,1 %, respectivamente; En la línea celular fibroblástica este tratamiento tuvo un comportamiento similar, no obstante, no fue tan pronunciado como en las líneas celulares tumorales **Gráfica 5**.

Los valores CL-50 estimados para el tratamiento combinado Erlotinib + Arcyriaflavin A fueron superiores a los demás tratamientos combinados, en todas las líneas celulares, indicando que se necesita una mayor cantidad de moléculas para inhibir la acción de sus blancos proteicos, respecto a los demás tratamientos, mientras, los valores CL-50s estimados para el tratamiento combinado de ASOs fueron los más bajos en todas las líneas celulares, cabe resaltar que entre estos el mayor valor fue registrado para la línea celular fibroblástica **Tabla 4**.

El potencial efecto antitumoral, fue comprobado al observar los índices de crecimiento generados al exponer todas las líneas celulares a concentraciones de 1 μ M de todos los tratamientos. Los resultados indican que en las líneas celulares tumorales, el tratamiento ASO-EGFR + ASO-CICLINA disminuye el crecimiento celular de manera significativa respecto a todos los demás tratamientos empleados ($P < 0.01$) **Gráfica 6 A-B**. Este

comportamiento fue distinto en la línea fibroblástica, pues, a pesar de provocar un detrimento leve del crecimiento de células tratadas, la disminución no fue significativa respecto a los resultados obtenidos con los tratamientos individuales de ASO-EGFR y ASO-CICLINA ($P=0.03212$) **Gráfica 6 C**. No obstante, las tasas de mortalidad generadas por este tratamiento fueron significativamente disminuidas respecto a los tratamientos de los tratamientos individuales y combinados de Erlotinib y Arcyriaflavin A. Al comparar los índice de crecimiento en las tres líneas celulares después de ser expuestas al tratamiento combinado con ASOs, observamos que este afecta en mayor dimensión a las líneas celulares tumorales, es decir, que presenta cierto grado de selectividad por las mismas **Gráfica 6 D**.

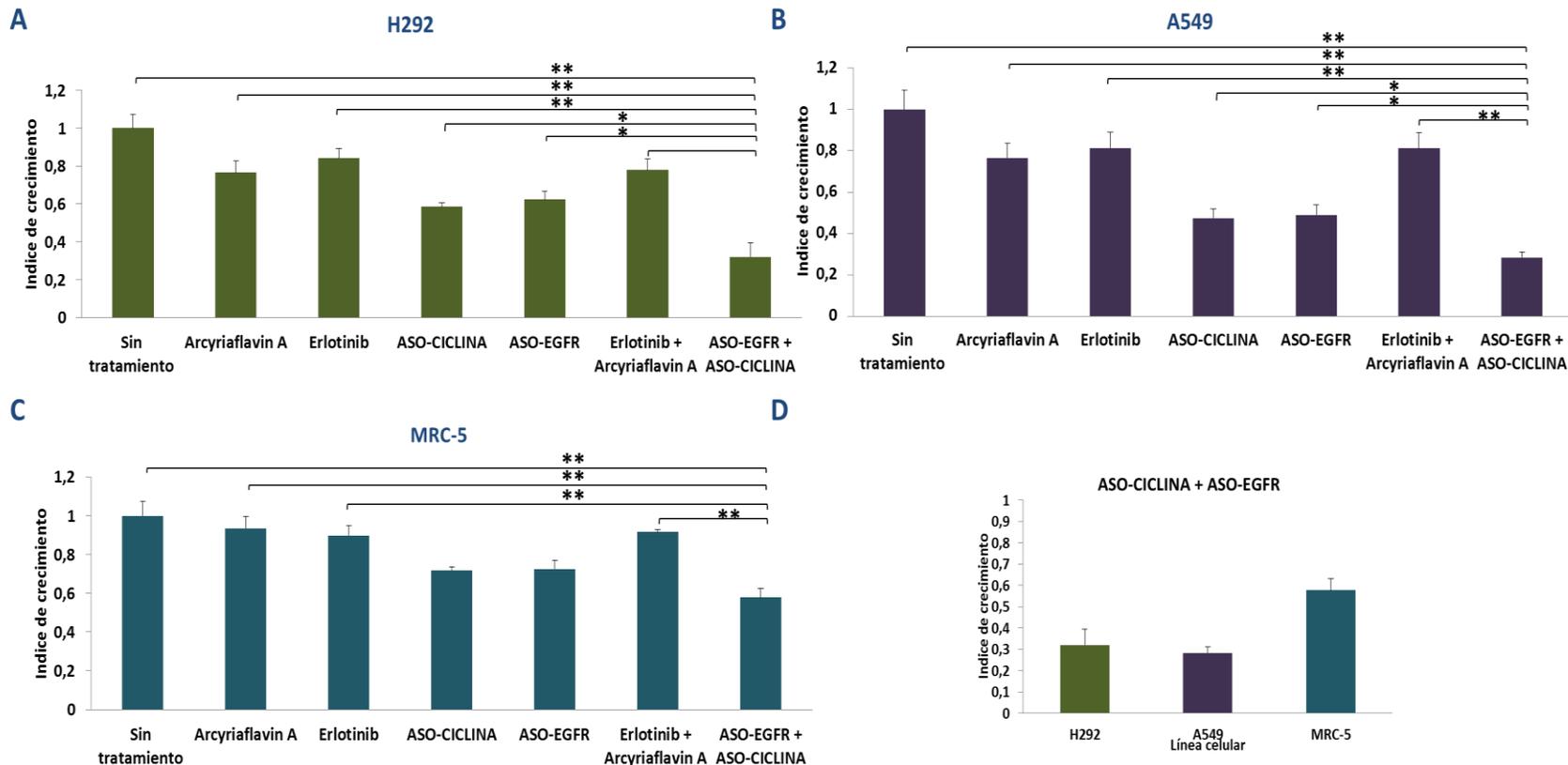


Gráfica 5 Evaluación de tratamientos combinados en las líneas celulares H292, A549 y MRC-5. Células sembradas en placas de 96 pozos fueron tratadas con Erlotinib, ArcyriaflavinA o transfectadas con los ASOs. La viabilidad y proliferación de las células tratadas fueron evaluadas mediante el ensayo de Resazurina a las 72 horas postratamiento. Células no tratadas fueron utilizadas como control de crecimiento celular y células tratadas con lipofectamina + DMSO fueron utilizadas para establecer la citotoxicidad del vehículo transcriptor combinado con el disolvente orgánico

Tabla 4 Determinación de la CL-50 de tratamientos combinados en líneas celulares H292, A549 y MRC-5

Tratamientos	H292	A549	MRC-5
Erlotinib + Arcyriaflavin A	5,52	13,7	13,66
ASO-EGFR + ASO-CICLINA	0,027	0,018	3,06

Resultados y discusión



Gráfica 6 Análisis comparativo de los índices de crecimiento obtenidos tras la evaluación diferentes tratamientos.. Los índices de crecimiento para cada tratamiento fueron calculados del cociente entre el porcentaje de supervivencia celular 72 horas postratamiento y el respectivo valor en el control de crecimiento (células sin tratamiento) que por defecto tiene un valor de 1. **A, B y C** representan los índices de crecimiento celular tras la evaluación de los diferentes tratamientos en las líneas celulares H292, A549 y MRC-5, respectivamente. **D** Comparación de los índices de crecimiento en las diferentes líneas celulares tratadas con ASO-CICLINA + ASO-EGFR. *P<0.05 **P<0.01

Resultados y discusión

Teniendo en cuenta que una de los objetivos del estudio era evaluar el potencial efecto de la combinación los distintos tratamientos, se tomaron las mismas concentraciones de ASOs y sus análogos funcionales a nivel proteico, pues de esta manera podríamos conocer la efectividad de la combinación de diferentes terapias actuando sobre los mismos blancos moleculares.

El tratamiento ASO-EGFR + ASO-CICLINA causó tasas de muerte celular muy superiores a las causadas por los demás tratamientos, aún en la línea celular fibroblástica. La terapia combinada con estos dos antisentidos causa una mayor muerte celular debido a que pueden estar regulando negativamente la expresión de dos genes indispensables para el mantenimiento y proliferación celular. Al regular negativamente la expresión de EGFR, la cantidad de receptores que están presentes en la célula debería disminuir significativamente, lo cual, podría regular negativamente las vías de transducción activadas por el mismo, que tienen como fin último activar la proliferación celular. Ahora bien, la activación de EGFR regula la expresión de CCND1, y ciclina D1 regulará positivamente el paso de la fase G1 a S, sin embargo, la expresión de esta proteína también ha debido ser regulada negativamente por ASO-CICLINA. Con este tratamiento se han intervenido dos blancos terapéuticos en una misma vía de transducción, por esta razón, tiene una alta efectividad.

El tratamiento combinado con oligonucleótidos antisentido tiene una alta efectividad, pues, afecta el índice de crecimiento celular en todas las líneas celulares, sin embargo, su potencial como futuro fármaco radica en que el efecto que causa sobre las líneas celulares tumorales es mucho mayor al causado sobre la línea celular fibroblástica. Todas la terapias antitumorales utilizadas actualmente, afectan la viabilidad y proliferación de las tumorales y normales, debido a que los procesos que se intervienen están activos en ambos tipos de células, esto nos indica que los nuevos fármacos deben tener una alta selectividad por las células tumorales, lo cual caracteriza a los oligonucleótidos antisentido, pues en menores concentraciones a sus análogos Erlotinib y Arcyriaflavin A causan una mayor letalidad en la líneas celulares tumorales. En este sentido, es necesario aclarar que la línea MRC-5 es una línea que previamente sufrió un proceso de inmortalización celular y no es la más indicada para realizar estos estudios, sin embargo, a este nivel brinda mucha información útil para futuros estudios *in vivo*.

5.4 Evaluación de la expresión de EGFR y Ciclina D1 en células tratadas con ASOs

Previo al análisis de expresión diferencial, fue necesario establecer las eficiencias de amplificación para cada uno de los pares de cebadores empleados en el estudio **Tabla 1**. Los valores de eficiencia para los genes RPLPO, CCND1 y BCLXL fueron muy semejantes, sin embargo, difieren de los valores obtenidos para los genes GADPH y EGFR **Gráfica 7**. Para realizar los análisis de cuantificación relativa se empleó una modificación del método $\Delta\Delta C_T$, en el cual las eficiencias no fueron asumidas como semejantes y para cada uno de los genes fue evaluado con su respectiva eficiencia (Pfaffl, 2001).

Para establecer la especificidad de los tratamientos con ASOs, se evaluó la expresión de los genes CCND1 y EGFR. Para ello, cultivos celulares de las líneas H292 y MRC-5 fueron transfectadas con ASO-EGFR, ASO-CICLINA, y sus respectivos controles. Pasadas 72 horas postratamiento, se lisaron las células, se realizó extracción de RNA, retro-transcripción y con los cDNAs obtenidos se comparó el cambio de expresión génica dada por los dos tratamientos mediante RT-PCR en tiempo real. Los C_{Ts} obtenidos fueron utilizados para calcular los valores de expresión relativa teniendo como genes de referencia, RPLPO y GADPH.

Como mencionamos previamente, la expresión de los genes blanco fue variable en cada una de las líneas celulares. Por su parte, el tratamiento con ASO-EGFR produjo una disminución significativa de la expresión de gen blanco en las líneas celulares evaluadas. En las líneas celulares tumorales y fibroblástica, el efecto del tratamiento ASO-EGFR disminuyó la expresión del gen blanco en un 70,3 y 66,6 %, respectivamente. El tratamiento con ASO-CICLINA no produjo una disminución evidente de la expresión del gen CCND1 en ninguna de las líneas celulares evaluadas.

Adicionalmente, para determinar si los tratamientos causaron una disminución en la expresión de las proteínas codificadas por los mRNAs blanco, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia dirigidos a las proteínas de interés en células previamente tratadas con ASO-EGFR y ASO-CICLINA, posteriormente, las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ 1.43 Java 1.6.0_20 de 64-bit, sin embargo, los análisis realizados no fueron concluyentes debido a la variabilidad en la morfología de las células y la

imposibilidad de tomar datos objetivos de emisión de fluorescencia de cada una de las mismas **Anexos 7-8**.

En el presente estudio, logramos comprobar que la actividad biológica inhibida por ASO-EGFR era producto de la interacción de este con el mRNA codificante para la EGFR, pues, tanto en la línea celular tumoral como en la fibroblástica los niveles de expresión del gen disminuyeron significativamente cuando fueron expuestas a dicho tratamiento. Sin embargo, ASO-EGFR fue capaz de inhibir en mayor grado la proliferación celular de las líneas que tenían mayor grado de expresión de EGFR en comparación con las que presentaban menores niveles de expresión. Estudios previos han demostrado que la regulación a la baja de la expresión de EGFR en células tumorales utilizando vectores de expresión que contienen fragmentos de mRNA de EGFR de longitud completa y orientación antisentido, pueden determinar la inhibición del crecimiento (Moroni MC, 1992; Rajagopal S, 1995; He Y, 1998; Fang K, 1999), resultados similares se han obtenido con oligonucleótidos antisentidos y RNAi (Wang S, 1995; Rubin Grandis J, 1997; Witters L, 1999). Las líneas celulares tumorales empleadas en este estudio han sido caracterizadas por presentar una alta expresión de EGFR, cuya activación inadecuada y sobreexpresión resulta en un aumento de la proliferación celular, supervivencia, invasión y metástasis (Antonicelli, 2013). La inhibición de EGFR conduce a una regulación positiva de las moléculas pro-apoptóticas y finalmente resulta en la muerte celular a través de la activación de la vía apoptótica mitocondrial intrínseca. La función de EGFR puede ser suplida por otros miembros de la familia de los HER a la cual pertenece, sin embargo, la activación de vía apoptótica mitocondrial intrínseca por EGFR, no podrá ser revertida por la actividad de ningún otro receptor (Antonicelli, 2013). Lo anteriormente expuesto constituye una de las principales razones, por la cuales, la disminución de la expresión de EGFR causa una alta tasa de muerte celular.

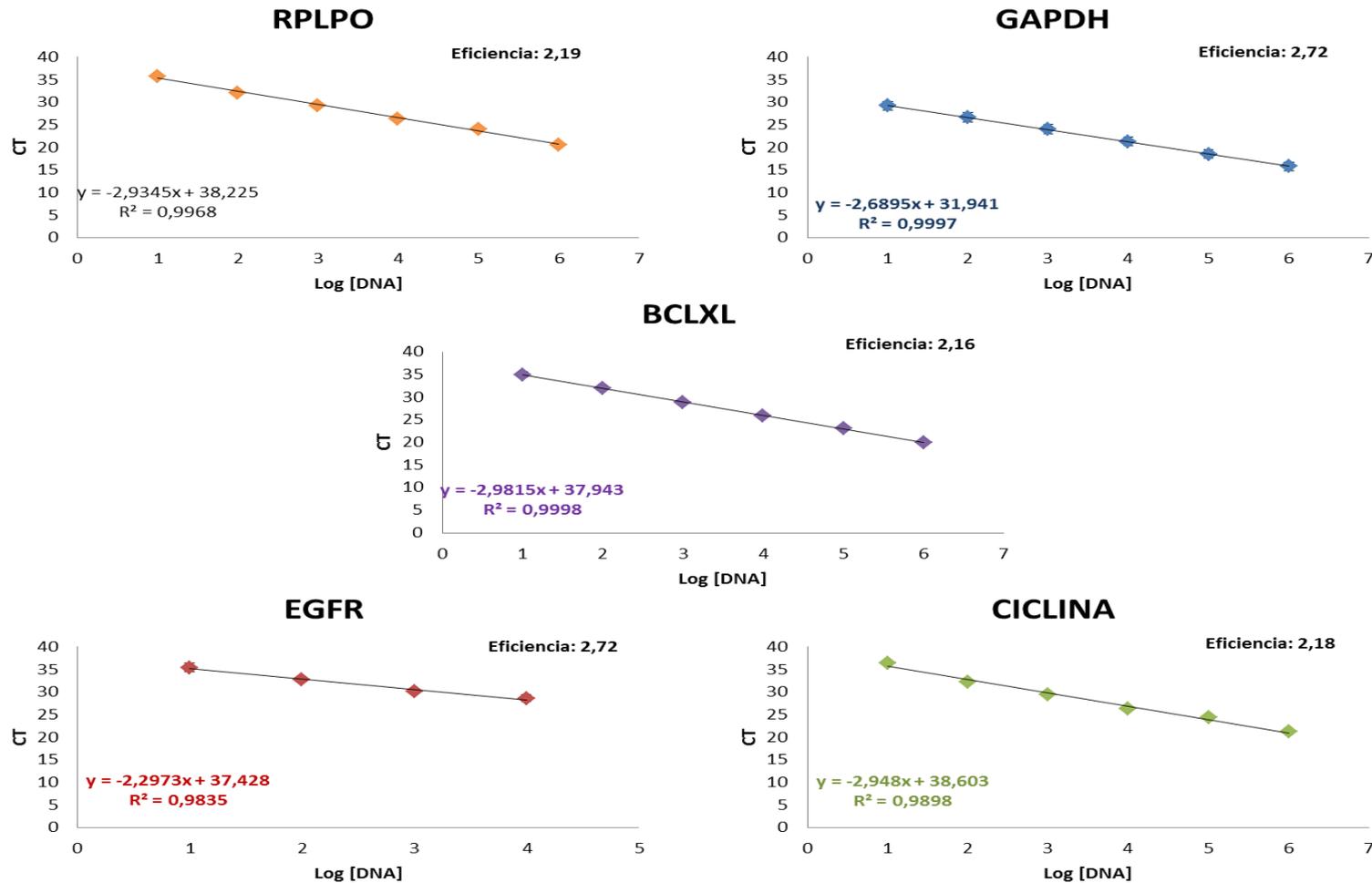
La expresión del gen CCND1 no fue afectada por el tratamiento con ASO-CICLINA a las 48 h postratamiento en ninguna de las líneas celulares evaluadas, nuestros resultados coinciden con los reportados por Cagnoli et al. quienes evaluaron este mismo antisentido en líneas celulares de cáncer de ovario y no evidenciaron una disminución del transcrito de ciclina D1 a las 48 horas postratamiento, pero si en los niveles de la proteína (Monica Cagnoli, 1998). Estos datos son explicados por diseño del oligonucleótido anisentido,

pues la secuencia del mismo es complementaria al sitio de inicio de la traducción del mRNA codificante para Ciclina D1, por lo tanto, la terapia puede estar mediando el bloqueo de la síntesis de proteína sin intervenir con la cantidad del transcrito que está siendo expresada.

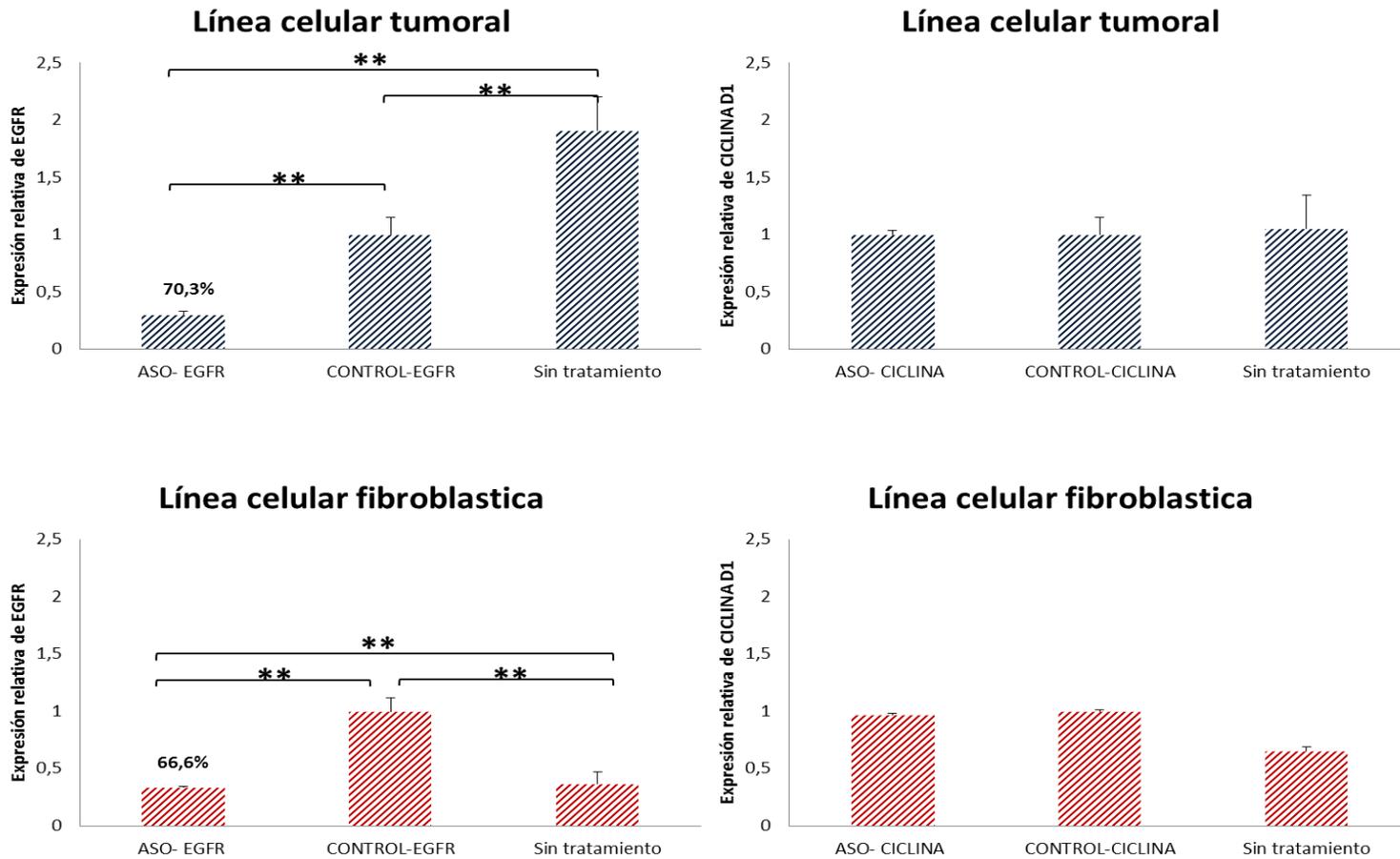
La disminución de la expresión de Ciclina D1 en las líneas celulares debería estar asociada con una detención del ciclo celular y posterior senescencia de las células, por lo tanto, no habría muerte celular, sin embargo, algunas investigaciones han documentado que esta proteína cuando se encuentra a nivel citoplasmático puede cumplir una función antiapoptótica (Liu,, DX and Greene,, LA, 2001). En neuronas postmitóticas y cardiomiocitos, ciclina D1 se encuentra localizada principalmente a nivel citoplasmático (al igual que las líneas celulares tumorales empleadas en esta investigación), lo que ha sido indicado como una señal de finalización de la diferenciación celular y un rol antiapoptótico (Tamaru, 1994; Ferguson, 2000), esto podría explicar el hecho que las líneas celulares tumorales sometidas al tratamiento con ASO-CICLINA D1 presentan una alta tasa de muerte y no una senescencia celular. Sin embargo, la línea celular MRC-5 presenta una baja tasa de muerte celular al ser sometida a este tratamiento, lo cual, es explicado por la predominante localización nuclear de la Ciclina D1, pues, al inhibir la síntesis de esta proteína se causa la detención del ciclo celular más que la muerte de las mismas.

Las letalidad celular causada por ASOs empleados en esta investigación, está asociada a la tasa de proliferación celular de cada una de las líneas estudiadas, pues su objetivo es inhibir este proceso. A mayor tasa de proliferación celular, más rápido se observará el efecto de los ASOs sobre la mortalidad de las mismas. Las líneas celulares tumorales poseen una tasa de proliferación celular superior a la de líneas celulares fibroblásticas, por tal razón, el efecto sobre estas será más rápido. En la línea celular fibroblástica, indistintamente de la concentración molar de los tratamientos, las células se mantuvieron vivas. Ahora bien, mientras más tiempo tarden los oligonucleótidos al interior de la células mayor será su metabolismo, lo cual deberá aminorar el efecto esperado.

Resultados y discusión



Gráfica 7 Curva estándar (eficiencia) de los genes CCND1, EGFR, BCLXL y de los genes normalizadores GAPDH y RPLPO. El valor de eficiencia para cada gen, indicado en la parte superior-derecha, se obtuvo a partir de la ecuación de la recta de la curva de: valores C_T Vs. Concentración de DNA (curva dilución 1:10)



Gráfica 8 Expresión de los genes CCND1 y EGFR en línea celular fibroblástica (MRC-5) y línea celular tumoral (H292). ASO-CICLINA y ASO-EGFR fueron transfectados en forma independiente en cada una de las líneas celulares y cDNA fue sintetizado a partir de RNA aislado a las 48 horas postransfección. El Kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche®) fue utilizado para detectar cADN de CCND1, EGFR y genes de referencia. La expresión génica relativa se calculó a partir de valores de C_T obtenidos. ** $P < 0.01$

5.5 Apoptosis mediada por ASOs

Para determinar si el efecto citotóxico observado en las células tratadas con los ASOs generaba un proceso de apoptosis en las mismas, se realizaron ensayos de apoptosis empleando técnica de TUNEL (TdT-mediated -dUtp Nick End Labeling) a través del equipo comercial in situ BrdU-Red DNA Fragmentation (TUNEL) Assay Kit (Lifetechnologies®) en células previamente tratadas con las concentraciones CL-50 de los ASOs.

El proceso de apoptosis se evidenció en pocas células indistintamente del tratamiento al que fueron sometidas. En todas las células analizadas se observó un patrón de fluorescencia en el citoplasma, independientemente de que las células presentaran un proceso apoptótico o no. La marcación fluorescente se presentó como pequeños puntos esparcidos en todo el citoplasma, en ocasiones focalizados alrededor de la membrana celular. Este patrón de fluorescencia sólo fue observado en células tratadas con ASO-EGFR y ASO-CICLINA, en las células no tratadas la fluorescencia no fue evidente. Esta marcación corresponde a los oligonucleótidos antisentidos y controles que por naturaleza química (ácidos nucleicos) pueden constituirse en sustratos de la enzima Terminal deoxinucleotidil transferasa y emitir fluorescencia luego de ser tratados. De esta manera, se pudo comprobar que el método de transfección con lipofectamina fue eficiente para incorporar los ASOs al interior de las células.

Para establecer, si el mecanismo de apoptosis estaba relacionado con la activación de la expresión de proteínas pro-apoptóticas como BCLXL, se realizaron análisis de expresión relativa de este gen en células previamente tratadas con ASO-EGFR y ASO-CICLINA. Los resultados indican que en ninguna de las líneas celulares analizadas hubo una variación significativa de la expresión del gen.

Por lo general, las células positivas para el ensayo túnel se encontraban en una fase temprana del proceso apoptótico, pues muy pocas mostraron los cuerpos apoptóticos, una evidencia indiscutible del proceso, la mayoría presentaba una degradación del material genético, lo cual se observaba por la emisión de fluorescencia en los núcleos celulares. Las células que se encontraban en la fase terminal de la apoptosis no pudieron ser detectadas en su totalidad posiblemente debido a que muchas de ellas se desprenden de la placa y son desechadas durante los distintos procedimientos que se

emplean durante el montaje del ensayo Tunel. En la presente investigación, las células tratadas con ASO-EGFR ó ASO-CICLINA no experimentaron un cambio en la expresión de BCLXL, cabe resaltar que todas las células tratadas con ASO-EGFR o ASO-CICLINA no entran en un proceso apoptótico, sólo aquellas cuya expresión relativa de los genes haya sido disminuida a un nivel en el cual no puedan suplir sus funciones, por esta razón, no todas las células en las que haya una disminución de la expresión de CCND1 o EGFR activarán la expresión de BCLXL u otros genes pro-apoptóticos.

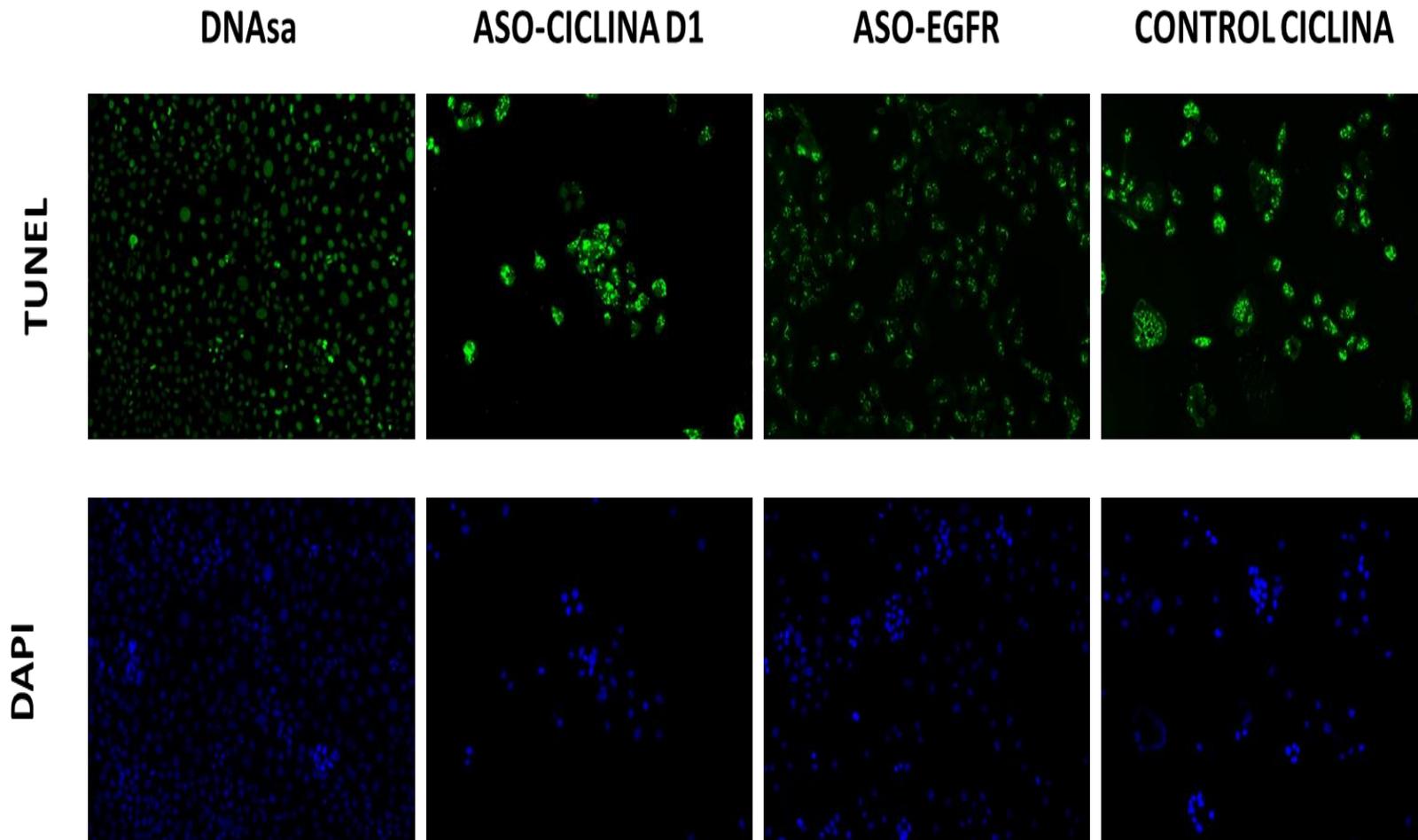


Ilustración 10 Ensayo de apoptosis en línea celular H292 tratadas con ASOs. Células fijadas en sembradas en placas de 12 pozos fueron fijadas, permeabilizadas y tratadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante del Kit comercial *in situ* BrdU-Red DNA Fragmentation (TUNEL) Assay Kit (Lifetechnologies®). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las células fueron observadas en empleando el objetivo 10x

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

En las células tumorales Ciclina D1 presenta una localización predominantemente Citoplasmática, la cual es asociada con su función en procesos de migración celular, mientras, en las células fibroblásticas presenta una localización predominantemente nuclear, cuya función es controlar del ciclo celular

Las monoterapias con ASO-EGFR y ASO-CICLINA presentan una mayor efectividad para inhibir la proliferación celular respecto a los agentes Erlotinib y Arcyriaflavin A, respectivamente.

El tratamiento con oligonucleótidos dirigidos a EGFR y Ciclina D1 en forma combinada disminuye de proliferación celular significativamente respecto a todos los demás tratamientos en las líneas celulares evaluadas y este efecto predominante en líneas celulares tumorales.

El tratamiento con oligonucleótidos antisentido posee una mayor efectividad porque puede inhibir la actividad de sus blancos terapéuticos empleando menores concentraciones a las empleadas por los agentes Erlotinib y Arcyriaflavin A

La monoterapia con ASO-EGFR en líneas celulares fibroblásticas y tumorales es consecuente con la disminución de los transcritos de EGFR y activa el proceso de apoptosis en las células tratadas.

6.2 Recomendaciones

Los ASOs dirigidos a Ciclina D1 y EGFR presentan actividad antitumoral selectiva, sin embargo, debe comprobarse la disminución de las proteínas EGFR y Ciclina D1 mediante técnicas como citometría de flujo o Western Blot

Los ASOs dirigidos a Ciclina D1 y EGFR presentan actividad antitumoral selectiva, sin embargo, las modificaciones fosforotioato causan una alta citotoxicidad independiente del mecanismo antisentido, por lo cual, es necesario evaluar ASOs con la misma secuencia nucleotídica pero con otras modificaciones que puedan disminuir la citotoxicidad no relacionada con el efecto antisentido de los mismos.

Las líneas celulares empleadas sólo representan un pequeño grupo de la gran cantidad disponible en el mercado, por lo tanto, se recomienda aplicar estos mismos tratamientos en otras líneas celulares tumorales de NSCLC y otros tipos de cáncer.

El presente estudio evaluó la actividad antitumoral de ASOs dirigidos a Ciclina D1 y EGFR *in vitro*, sin embargo, estos resultados obtenidos deben ser comprobados en modelos *in vivo* murinos para tener una aproximación más equiparable a su actividad en seres humanos.

Bibliografía

- Liu,, DX and Greene,, LA. (2001). Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. *Cell Tissue Res*, 305, 217–228.
- Allan R. Li, D. C. (2008 .). EGFR Mutations in Lung Adenocarcinomas. *J Mol Diagn*, 10, 242–248.
- Antonicelli, ,. A. (2013). EGFR-Targeted Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer: Focus on EGFR Oncogenic Mutation. *Int J Med Sci*, 10, 320-330.
- Betticher DC, H. J. (1996). Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer. *J Cancer*, 73, 294—300.
- Bienvenu, ,. F. (2001). Cyclin D1 represses STAT3 activation through a Cdk4-independent mechanism. *J Biol Chem*, 276, 16840—7.
- Bonham, ,. M. (1995). An assessment of the antisense properties of RNase H-competent and steric-blocking oligomers. *Nucleic Acids Res*, 23, 1197–1203.
- Bonnet D, Dick JE: II. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic ce. *Nat Med*, 3, 730–737.
- Botling J, E. K. (2013). Biomarker discovery in non-small cell lung cancerin non-small cell lung cancer: integrating gene expression profiling, meta-analysis, and tissue microarray validation. *Clin Cancer Res*, 19, 194-204.
- Brohl, K. S. (2010). Efficacy of combining targeted therapies cetuximab and dasatinib for resistant salivary gland carcinomas in vitro. *J Clin Oncol* 28:15s,, 28, 5557.
- Busse, D. Y. (2001). Tyrosine kinase inhibitors: rationale, mechanisms of action, and implications for drug resistance. *Semin Oncol.*, 5, 47-55.
- Cagnoli, M. B. (1998). Control of Cyclin D1 Expression by Antisense Oligonucleotides in Three Ovarian Cancer Cell Lines. *Gynecol Oncol*, 3, 372-7.
- Chen R, K. P.-C. (2014). A meta-analysis of lung cancer gene expression identifies PTK7 as a survival gene in lung adenocarcinom. *Cancer Res*, 74-84.

- Chmielecki, W. P. (2010). Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Cancer*, 10, 760–774.
- Coller, H. A. (2007). What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 667-670.
- Corey, D. (2007). RNA learns from antisense. *Nature Chemical Biology*, 3, 8-11.
- Cortés, M. A. (2010). *Regulación del receptor ErbB2 y su relación con la diferenciación neuroendocrina en el cáncer de próstata*. Madrid.
- Crooke, , S. (1995). Kinetic characteristics of Escherichia coli RNase H1: cleavage of various antisense oligonucleotide-RNA duplexes. *Biochem J*, 312, 599–608.
- Culotti J, Hartwell LH. (1971). Genetic control of the cell division cycle in yeast. Seven genes controlling nuclear division. *Exp Cell Res*, 67, 389—401.
- Dworakowska, , D. (2005). Prognostic value of cyclin D1 overexpression in correlation with pRb and p53 status in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Cancer Res Clin Oncol*, 131, 479—85.
- Elizabeth A. Musgrove, C. E. (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11, 558-572.
- Esposito, , V. (2005). Cell cycle related proteins as prognostic parameters in radically resected non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*, 58, 734—9.
- Ewen, , M. (2000). Relationship between Ras pathways and cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res*, 4, 1—17.
- Fang K, C. M.-H. (1999). Transfection of anti-sense complementary DNA of human epidermal-growth factor receptor attenuates the proliferation of human non-small-cell-lung-cancer cells. *Int J Cancer*, 81, 471–8.
- Ferguson, , K. (2000). The Rb-CDK4/6 Signaling Pathway Is Critical in Neural Precursor Cell Cycle Regulation. *J. Biol. Chem*, 275, 33593–33600.
- Fortunato Ciardiello, R. C. (2001). Antisense oligonucleotides targeting the epidermal growth factor receptor inhibit proliferation, induce apoptosis, and cooperate with cytotoxic drugs in human cancer cell lines. *International Journal of Cancer*, 93, 172–178.
- Fortunato, , C. (2001). Antisense oligonucleotides targeting the epidermal growth factor receptor inhibit proliferation, induce apoptosis, and cooperate with cytotoxic drugs in human cancer cell lines. *Int.J.Cancer*, 93, 172–178.

- Fusté, , N.-H.-R. (2016). Cytoplasmic cyclin D1 regulates cell invasion and metastasis through the phosphorylation of paxillin. *Nat Commun*, 16-17.
- Gautschi O, R. D. (2007). Cyclin D1 in nonsmall cell lung cancer: A key driver of malignant transformation. *Lung Cancer*, 55, 1–14.
- Hansen, H. H. (1976). Combination chemotherapy of advanced lung cancer: a randomized trial. *Cancer*, 38, 2201–2207.
- Hartmann, J. H. (2009). Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Curr Drug Metab*, 10, 470-81.
- He Y, Z. Q. (1998). Inhibition of human squamous cell carcinoma growth in vivo by epidermal growth factor receptor antisense RNA transcribed from the U6 promoter. *J Natl Cancer Inst*, 90, 1080–7.
- Hinz, , M. (1999). NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1- to-S-phase transition. *Mol Cell Biol*, 19, 2690—8.
- Hirsch FR, V.-G. M. (2003). Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol*, 3798-807.
- Huang XH, J. W. (2014). Small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of macrophage migration inhibitory factor (MIF) suppressed cyclin D1 expression and hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Oncotarget*, 5, 55.
- Hynes NE and Lane HA. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 5, 580.
- Ikehara, , M. (2003). Expression of cyclin D1 but not of cyclin E is an indicator of poor prognosis in small adenocarcinomas of the lung. *Oncol Rep*, 10, 137—9.
- Kato, , J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev*, 7, 331—42.
- Kato, , J. (1994). Regulation of cyclin D dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase. *Mol Cell Biol*, 14, 2713—21.
- Kikuchi, T. D. (2003). Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: identification of genes for prediction of lymph-node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs. *Oncogene*, 10, 2192-205.
- Kim, M. P. (2015). Tanshinone I induces cyclin D1 proteasomal degradation in an ERK1/2 dependent way in human colorectal cancer cells. *Fitoterapia*, 101, 162–168.

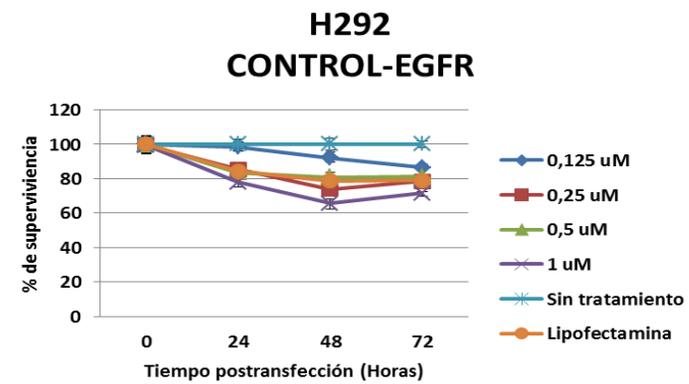
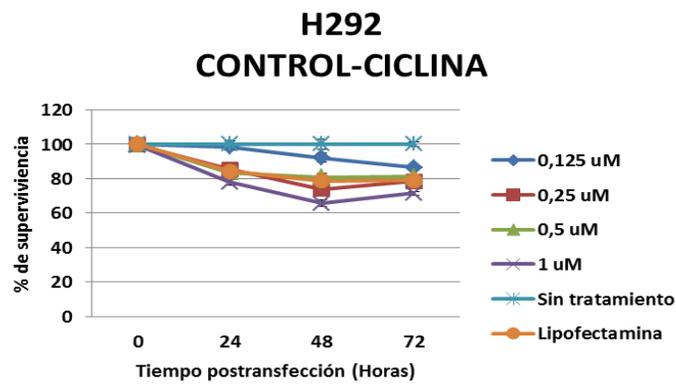
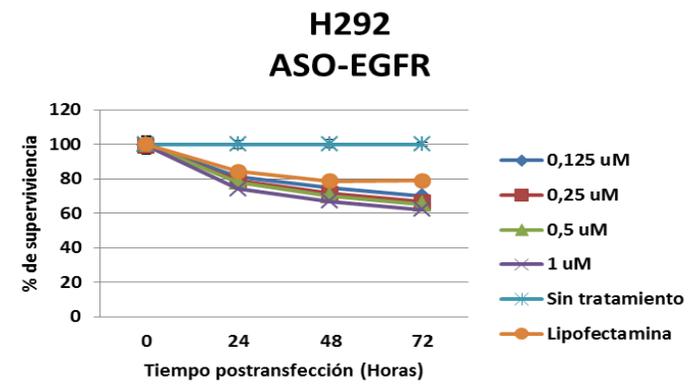
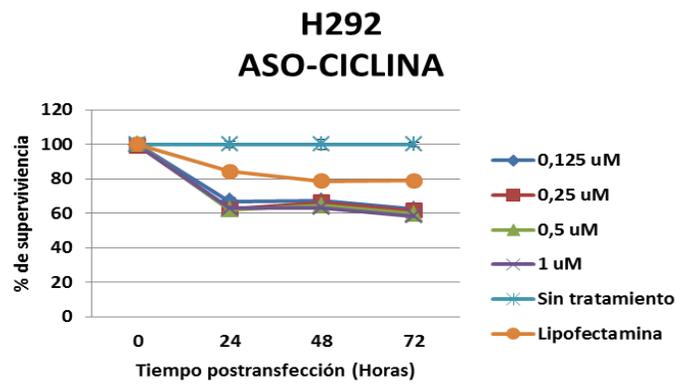
- Knudsen, ., K. (1998). Multiple G1 regulatory elements control the androgen-dependent proliferation of prostatic carcinoma cells. *J Biol Chem*, 273, 20213—22.
- Knudsen, ., K. (1999). D-type cyclins complex with the androgen receptor and inhibit its transcriptional transactivation ability. *Cancer Res*, 59, 2297—301.
- Lapidot T, S. C.-C. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367, 645—648.
- Lee MG, Nurse P. (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*, 327, 31—5.
- Lee, ., S. (2006). Is EGFR expression important in non-small cell lung cancer? *Thorax*, 61, 98—99.
- Liao K, L. J. (2014). Dihydroartemisinin inhibits cell proliferation via AKT/GSK3 β /cyclinD1 pathway and induces apoptosis in A549 lung cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol*, 7, 8684—8691.
- Liu Z, L. X. (2014). Knocking down CDK4 mediates the elevation of let-7c suppressing cell growth in nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer*, 14, 274.
- Marchetti, ., A. (1998). Cyclin D1 and retinoblastoma susceptibility gene alterations in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*, 75, 187—92.
- Monica Cagnoli, F. B. (1998). Control of Cyclin D1 Expression by Antisense Oligonucleotides in Three Ovarian Cancer Cell Lines. *GYNECOLOGIC ONCOLOGY*, 70, 372—377.
- Moroni MC, W. M. (1992). EGF-R antisense RNA blocks expression of the epidermal growth factor receptor and suppresses the transforming phenotype of a human carcinoma cell line. *J Biol Chem*, 5, 2714—22.
- Mukesh, K. N. (2006). Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 6, 876-885.
- Nakamura, ., H. (2006). Survival impact of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with non small cell lung cancer: a meta-analysis. *Thorax*, 61, 140—5.
- Navada S, L. P. (2006). Temporal trends in small cell lung cancer: analysis of the national Surveillance Epidemiology and End-Results (SEER) database. *J Clin Oncol*, 24, 384.

- Nemunaitis J, H. J. (1992). Phase I evaluation of ISIS 3521, an antisense oligodeoxynucleotide to protein kinase C-alpha, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol*, 17, 3586–95.
- Newby JC, J. S. (1997). Expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 during the development of tamoxifen resistance in human breast cancer. *Clin Cancer Res*, 3, 1643–1651.
- Nurse P, Bissett Y. (1981). Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature*, 292, 558–60.
- Oncol, S. C. (2000). Biological modifiers as potential radiosensitizers: targeting the epidermal growth factor receptor family. *Semin Oncol*, 27, 15–20.
- Pao William and Chmielecki Juliann. (2010). Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nature Rev. Cancer*, 10, 760-774.
- Pfaffl, M. W. (2001). Relative quantification. En *Real-time PCR* (págs. 63-82). Dorak.
- Qin, . C. (2003). Peroxisome proliferator activated receptor gamma agonists induce proteasome dependent degradation of cyclin D1 and estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res*, 63, 958—64.
- Rajagopal S, H. S.-N.-N. (1995). Epidermal growth factor expression in human colon and colon carcinomas: anti-sense epidermal growth factor receptor RNA down-regulates the proliferation of human colon cancer cells. *Int J Cancer*, 62, 661–7.
- Randy Suryadinata, M. S. (2010). Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Bioscience Reports*, 4.
- Reissmann, . P. (1999). Lung Cancer Study Group. Amplification and overexpression of the cyclin D1 and epidermal growth factor receptor genes in non-small-cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* , 125, 61—70.
- Reya, T. M. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414, 105–111.
- Rocha, . S. (2003). p53 represses cyclin D1 transcription through downregulation of Bcl-3 and inducing increased association of the p52 NF-B subunit with histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol*, 23, 4713—27.
- Rosen, J.M., and Jordan, C.T. (2009). The increasing complexity of the cáncer stem cell paradigm. *Science*, 324, 670–1673.
- Rosen, J.M., and Jordan, C.T. (2009). The increasing complexity of the cáncer stem cell paradigm. *Science*, 324, 1670–1673.

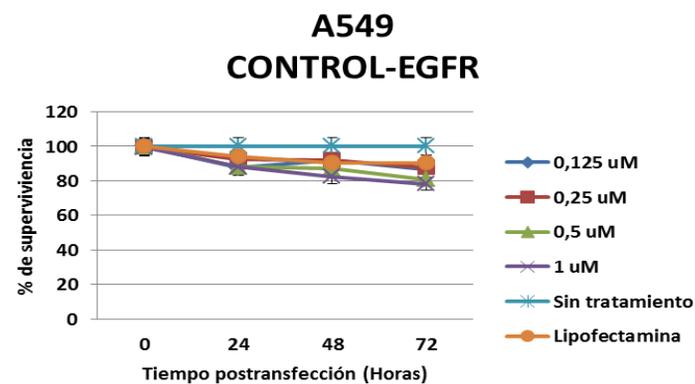
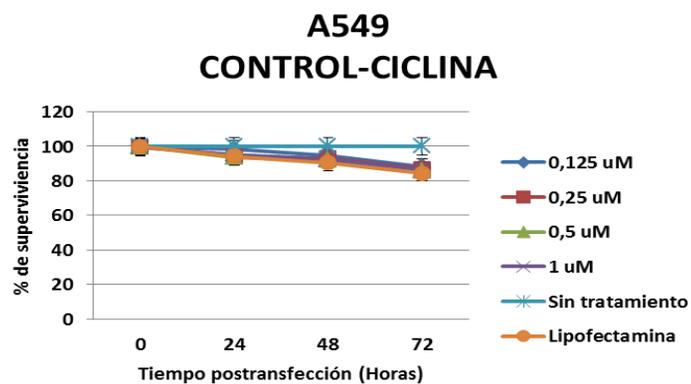
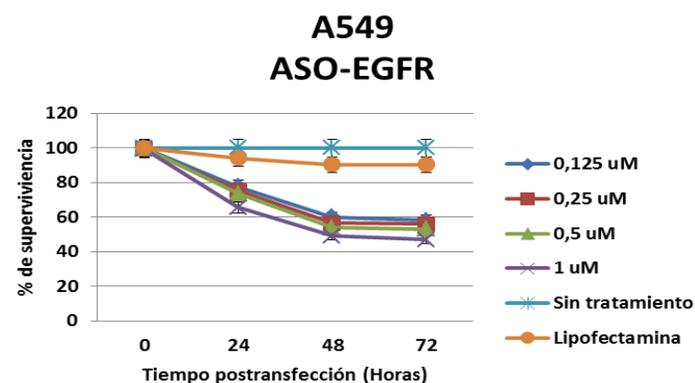
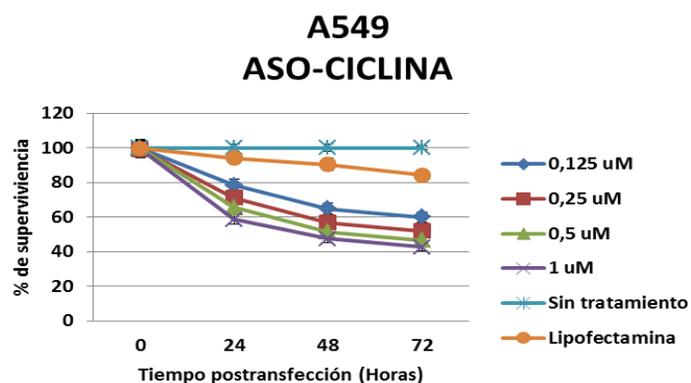
- Rubin Grandis J, C. A. (1997). Inhibition of epidermal growth factor receptor gene expression and function decreases proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells. *Oncogene*, 15, 409–6.
- Salomon, D. B. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, 19, 183–232.
- Sanchez I, D. B. (2005). New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. . *Semin Cell Dev Biol*, 16:311—21.
- Sartor, C. (2000). Biological modifiers as potential radiosensitizers: targeting the epidermal growth factor receptor. *Semin Oncol*, 27, 15–20.
- Schlessinger, J. (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor 110(6):. *Cell*, 10, 669-72.
- Sell S, Pierce GB. (1994). Biology of disease: maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest*, 70:6–21.
- Sher T, D. G. (2008). Small cell lung cancer. *Clin Proc*, 83, 355–367.
- Sherr C. J. & Roberts J. M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, 18, 2699–2711.
- SM, L. (2006). Is EGFR expression important in non small cell lung cancer? *Thorax*, 61, 98–99.
- Stahl P, S. C. (2015). Heterogeneity of amplification of HER2, EGFR, CCND1 and MYC in gastric cancer. *BMC Gastroenterol*, 15, 7.
- Stevenson JP, Y. K.-S. (1999). Phase I clinical/pharmacokinetic pharmacodynamic trial of the c-raf-1 antisense oligonucleotide ISIS 5132 (CGP 69846A). *J Clin Oncol*, 17, 2227–36.
- Sutherland HJ, B. A. (1996). Characterization of a hierarchy in human acute myeloid leukemia progenitor cells. *Blood*, 4754–4761.
- Tamaru, . T. (1994). Differential expression of D type cyclins during neuronal maturation. *Neurosci. Lett*, 168, 229–232.
- Torre, L. A.-T. (2012). Global cancer statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*, 65, 1542-4863.
- W.-Y. Shi, K.-D. L.-G.-T.-L.-Q.-F. (2014). Gene expression analysis of lung cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 18, 217-228.

- Wang J, M. L. (2006). Expression of AKT2, cyclin D1, and MMP-9 and their correlations to clinicopathologic features of non-small cell lung cancer. *Ai Zheng* , 69—72.
- Wang S, L. R. (1995). Delivery of antisense oligodeoxyribonucleotides against the human epidermal growth factor receptor into cultured KB cells with liposomes conjugated to folate via polyethylene glycol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 3318–22.
- Wang, T. H. (2000). Identification of genes differentially over-expressed in lung squamous cell carcinoma using combination of cDNA subtraction and microarray analysis. *Oncogene*, 19, 1519–1528.
- Webb A, C. D. (1997). BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*, 349, 1137–41.
- Witters L, K. R. (1999). Antisense oligonucleotides to the epidermal growth factor receptor. *Breast Cancer Res Treat* , 53, 41–50.
- Xia, B. Y. (2015). miR-211 suppresses epithelial ovarian cancer proliferation and cell-cycle progression by targeting Cyclin D1 and CDK6. *Mol Cancer*, 14, 57.
- Xue, Z. W. (2014). A microRNA gene signature for identification of lung cancer. *Surgical Oncology*, 23, 126–131.
- Yoo, J. H. (2010). Comparison of the Sensitivity of Human Bronchial Epithelial Cells to Cigarette Smoke-induced Inflammatory Responses. *Journal of The Korean Society of Tobacco Science* .
- Zhang WC, S.-C. N. (2012). Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell*, 148259–72.
- Zhang, Y. T. (2005). Antisense Inhibition. *2nd ed. Antisense Therapeutic. Antisense Therapeutics*, ed. M.I.Phillips., New Jersey: Humana Press.
- Zwijsen RM, B. R. (1998). Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1. *Genes Dev*, 3488-98.

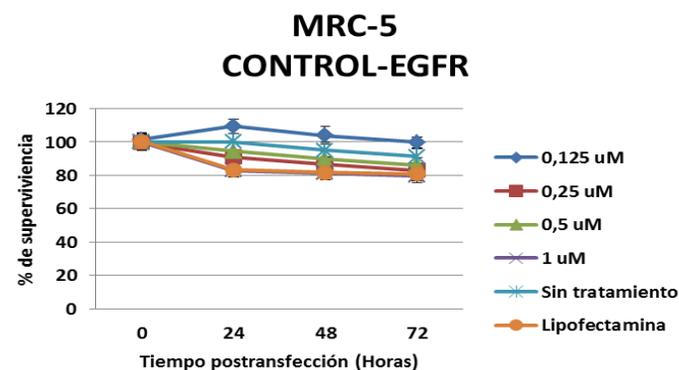
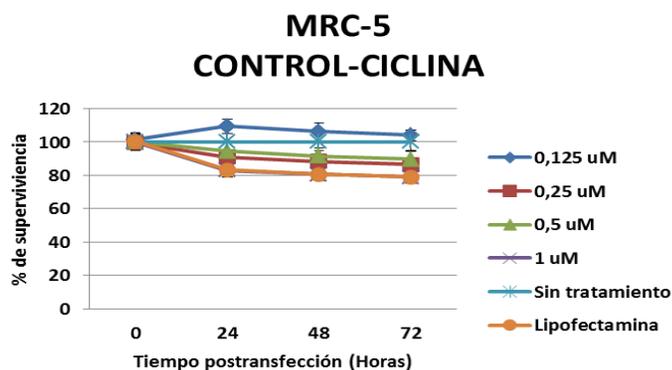
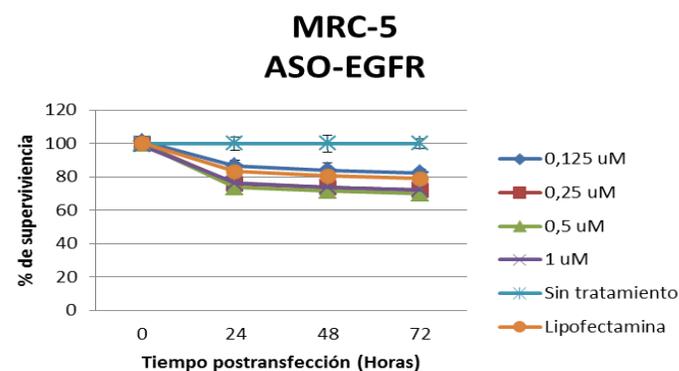
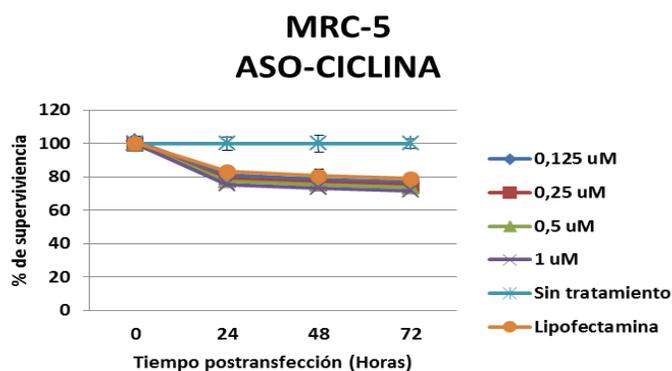
ANEXOS



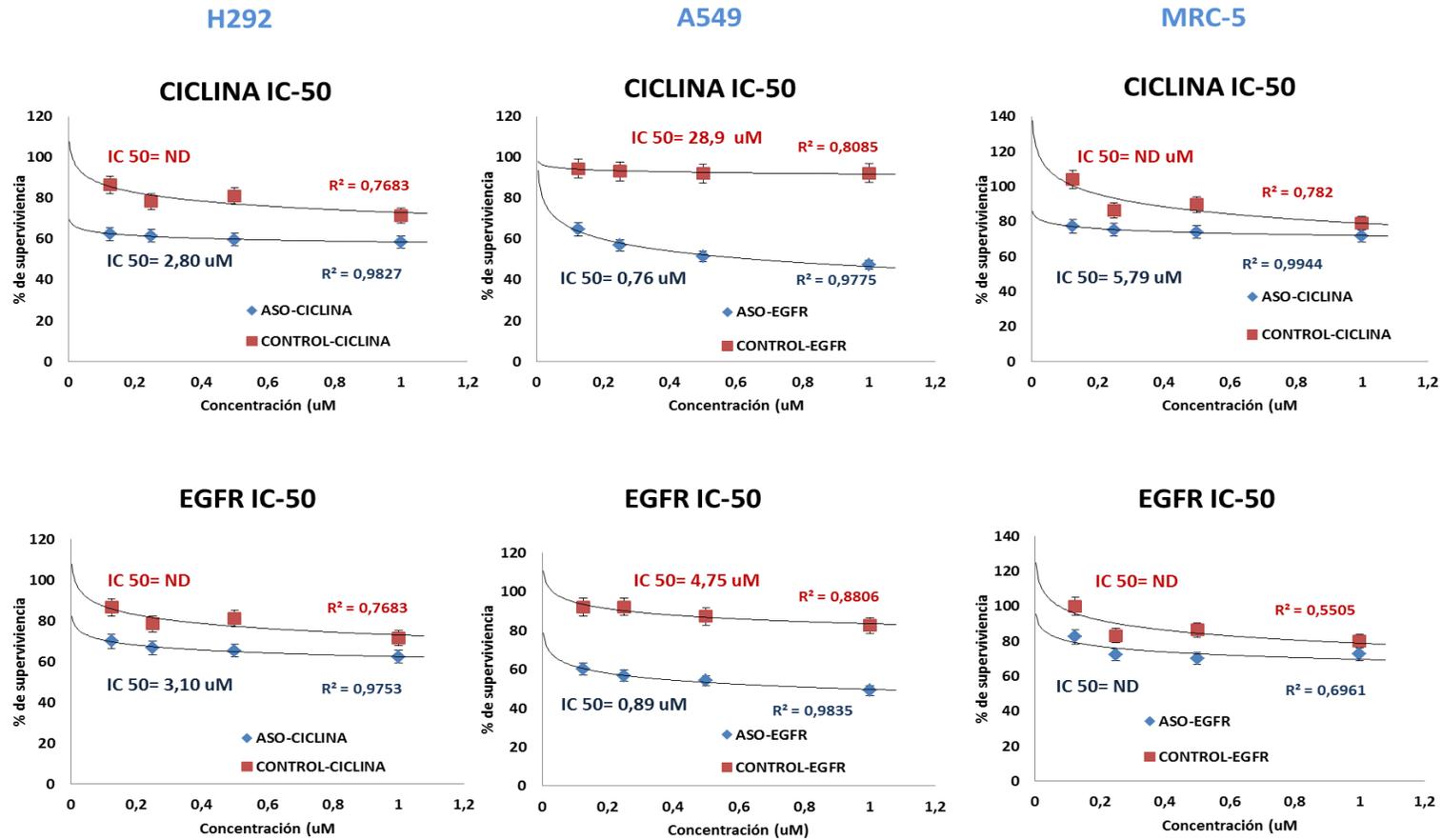
Anexo 1 Evaluación de tratamientos ASO-CICLINA y ASO-EGFR en línea celular H292. Células sembradas en placas de 96 pozos fueron transfectadas con los ASOs y sus respectivos controles (0,125, 0.25, 0.5 y 1uM). La viabilidad y proliferación de las células tratadas fueron evaluadas mediante el ensayo de Resazurina a las 24, 48 y 72 horas postratamiento. Células no tratadas fueron utilizadas como control de crecimiento celular y células tratadas con lipofectamina fueron utilizadas para establecer la citotoxicidad del vehículo transvector.



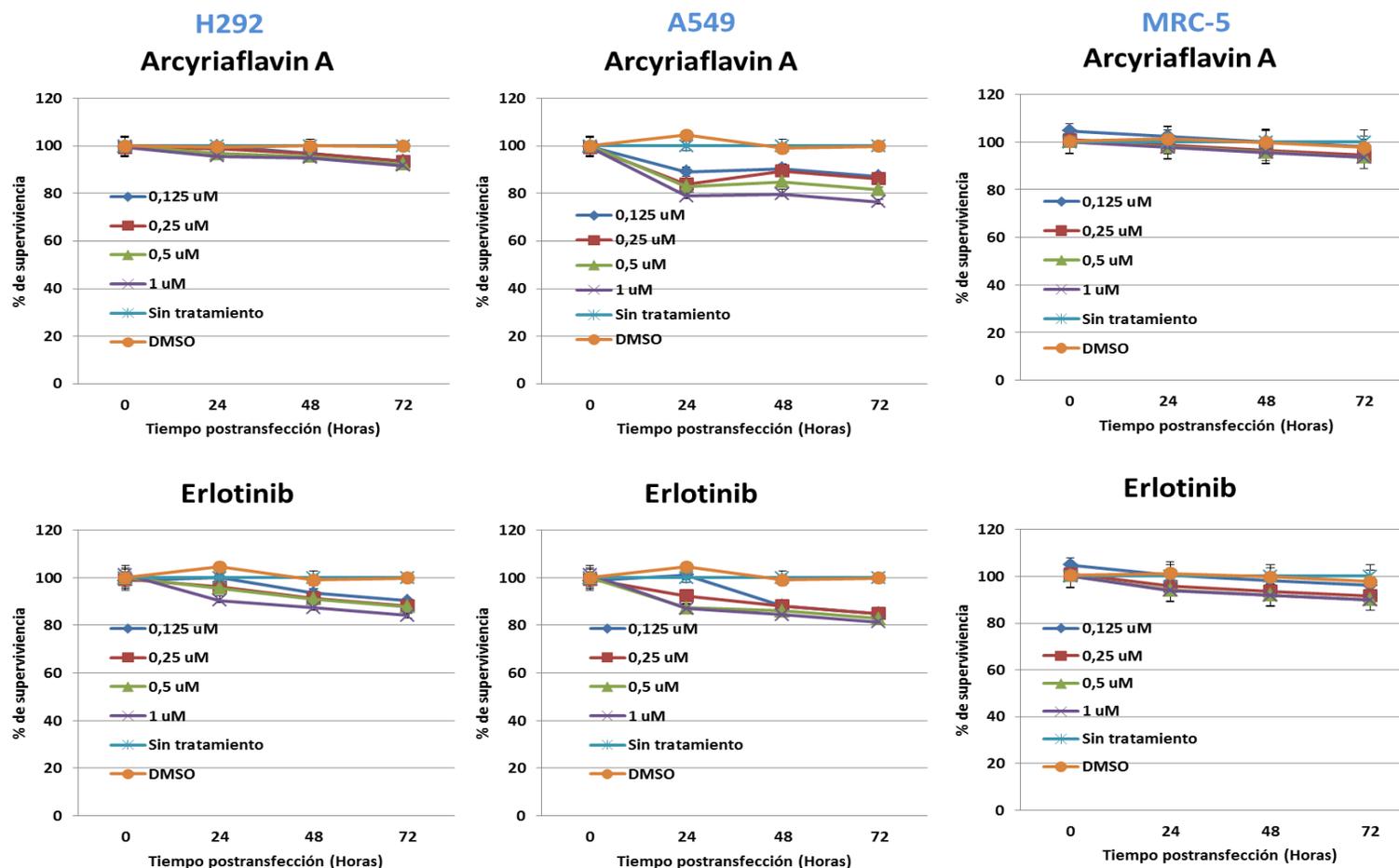
Anexo 2 Evaluación de tratamientos ASO-CICLINA y ASO-EGFR en línea celular A549. Células sembradas en placas de 96 pozos fueron transfectadas con los ASOs y sus respectivos controles (0,125, 0.25, 0.5 y 1uM). La viabilidad y proliferación de las células tratadas fueron evaluadas mediante el ensayo de Resazurina a las 24, 48 y 72 horas postratamiento. Células no tratadas fueron utilizadas como control de crecimiento celular y células tratadas con lipofectamina fueron utilizadas para establecer la citotoxicidad del vehículo transfección.



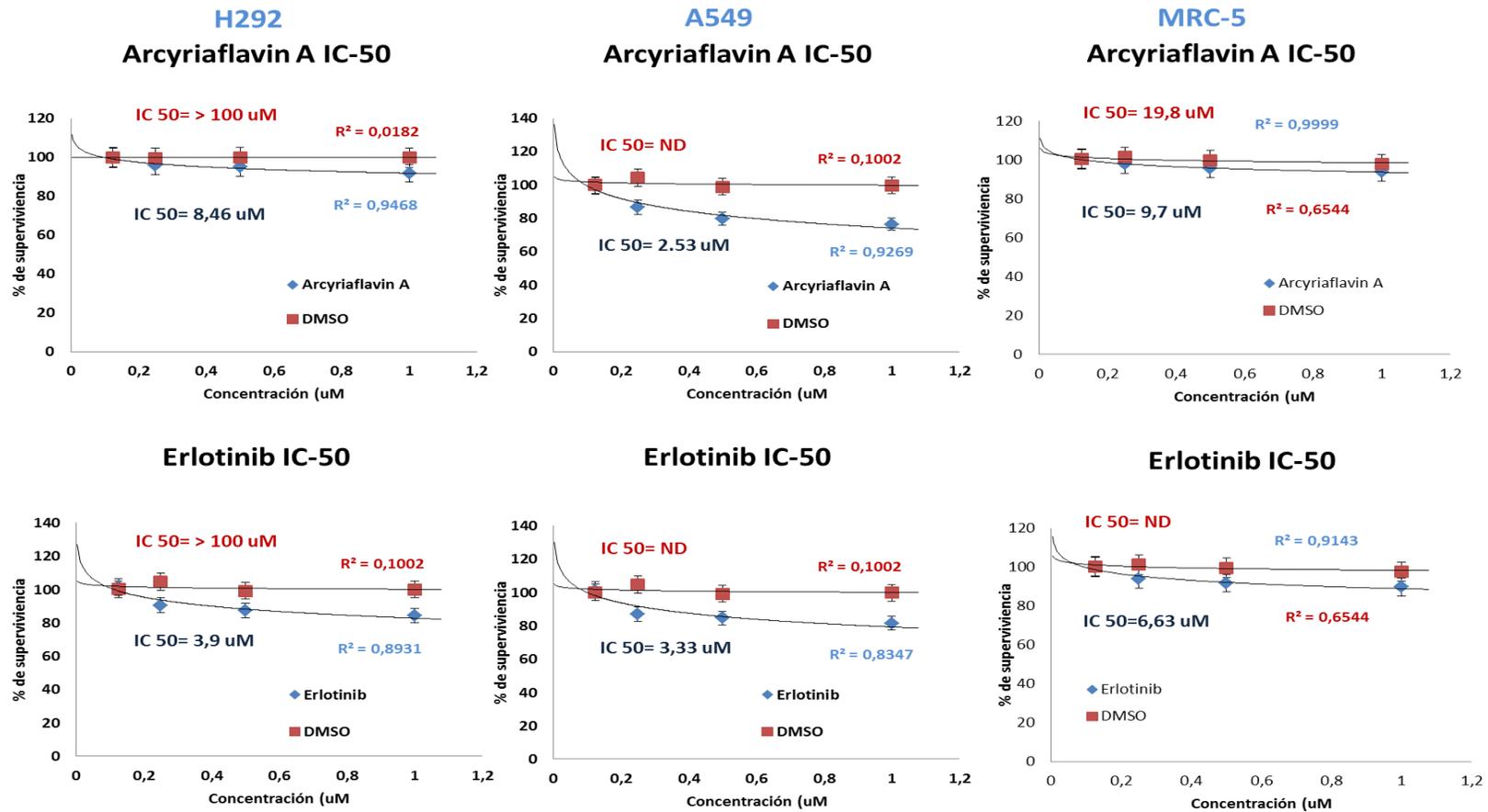
Anexo 3 Evaluación de tratamientos ASO-CICLINA y ASO-EGFR en línea celular MRC-5. Células sembradas en placas de 96 pozos fueron transfectadas con los ASOs y sus respectivos controles (0,125, 0.25, 0.5 y 1uM). La viabilidad y proliferación de las células tratadas fueron evaluadas mediante el ensayo de Resazurina a las 24, 48 y 72 horas postratamiento. Células no tratadas fueron utilizadas como control de crecimiento celular y células tratadas con lipofectamina fueron utilizadas para establecer la citotoxicidad del vehículo transvector.



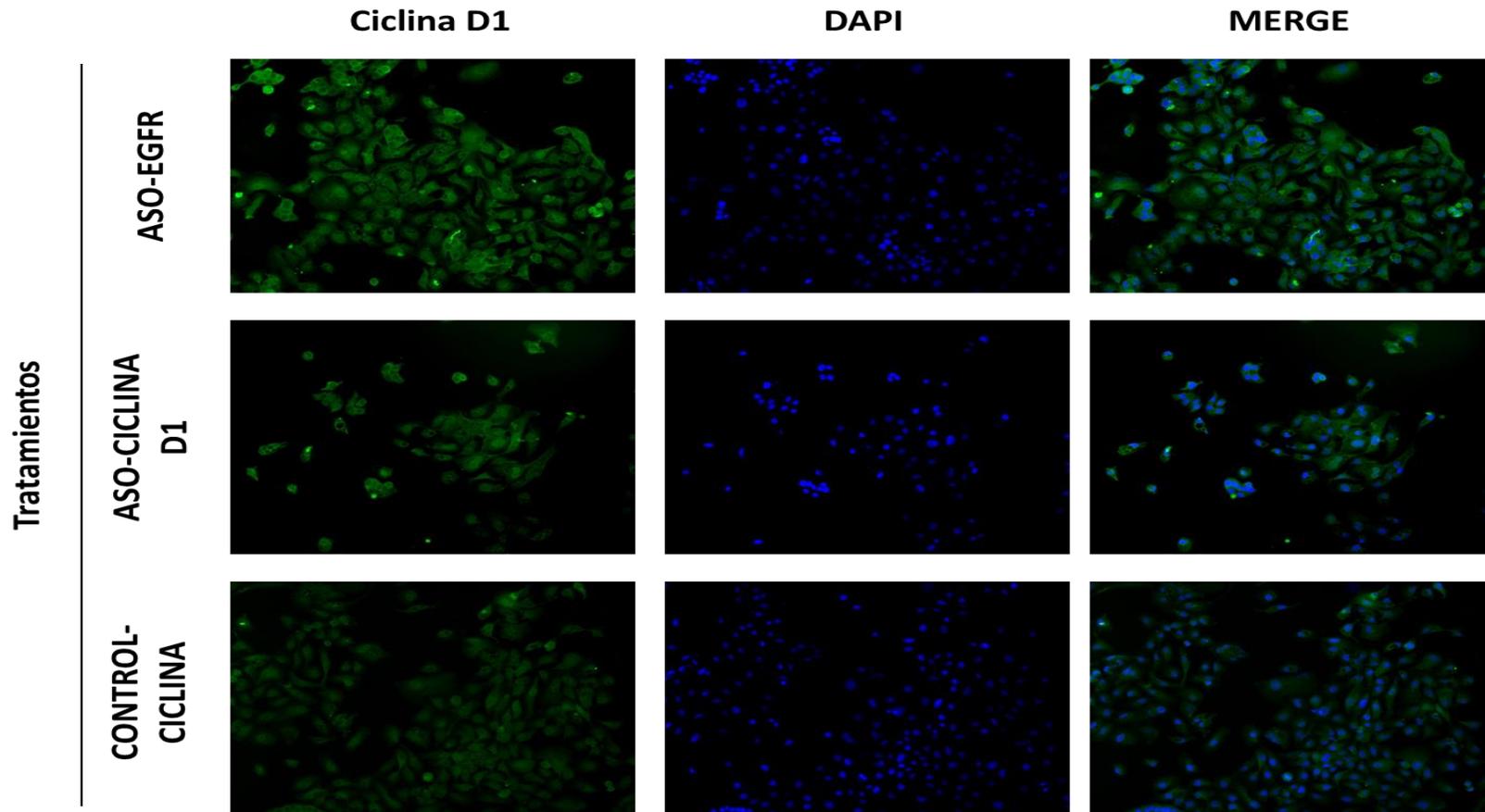
Anexo 4 Determinación de la CL-50 de ASOs en líneas celulares H292, A549 y MRC-5. Células sembradas en placas de 96 pozos fueron transfectadas con los ASOs y sus respectivos controles (0,125, 0,25, 0,5 y 1uM). La viabilidad y proliferación de las células tratadas fueron evaluadas mediante el ensayo de Resazurina a las 72 horas postratamiento. Los datos obtenidos fueron utilizados para realizar una regresión lineal y estimar los valores CL-50.



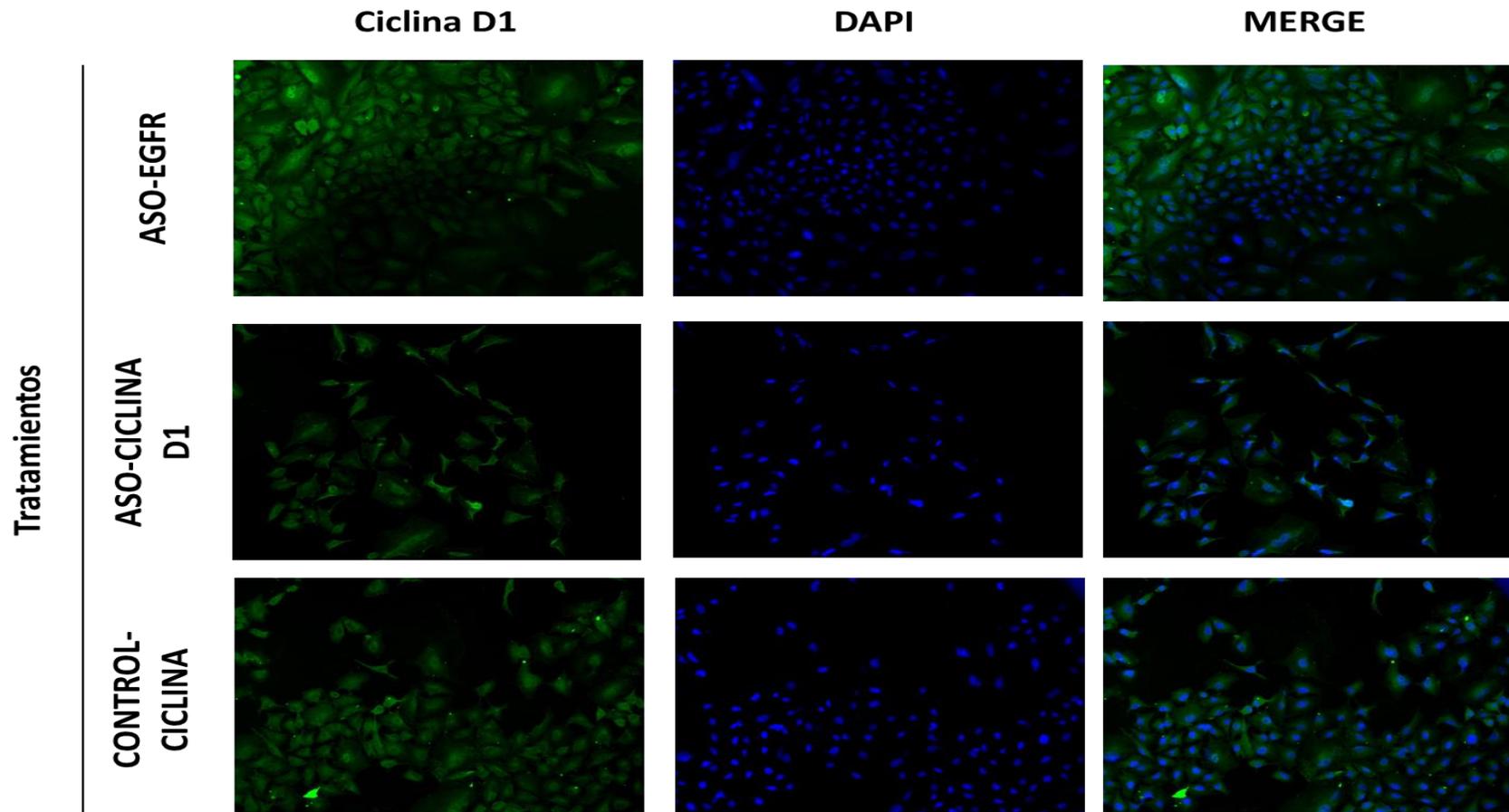
Anexo 5 Evaluación de tratamientos Erlotinib y Arcyriaflavin A en líneas celulares H292, A549 y MRC-5. Células sembradas en placas de 96 pozos fueron tratadas con Erlotinib y Arcyriaflavin A (0,125, 0,25, 0,5 y 1 uM). La viabilidad y proliferación de las células tratadas fueron evaluadas mediante el ensayo de Resazurina a las 24, 48 y 72 horas postratamiento. Células no tratadas fueron utilizadas como control de crecimiento celular y células tratadas con DMSO fueron utilizadas para establecer la citotoxicidad del disolvente.



Anexo 6 Determinación de la CL-50 de Erlotinib y Arcyriaflavin A en las líneas celulares H292, A549 y MRC-5. Células sembradas en placas de 96 pozos fueron tratadas con Erlotinib, Arcyriaflavin A y sus respectivos controles (0,125, 0,25, 0,5 y 1uM).. La concentración final del tratamiento fue 1uM, es decir, 0,5 uM de cada agente terapéutico. La viabilidad y proliferación de las células tratadas fueron evaluadas mediante el ensayo de Resazurina a las 72 horas postratamiento. Los datos obtenidos fueron utilizados para realizar una regresión lineal y estimar los valores CL-50



ANEXO 7 Expresión de CICLINA D1 en la línea celular H292 tratadas con ASO-EGFR y ASO-CICLINA D1. Células fijadas en sembradas en placas de 12 pozos fueron transfectadas con CL de ASO-CICLINA, Pasadas 72 horas postransfección fueron fijadas, permeabilizadas y tratadas con el anticuerpo primario monoclonal anti-Ciclina D1 (Dilución 1/100; SC-20044; Santa Cruz, CA) y los anticuerpos secundarios policlonales IgG generados en cabra, anti-ratón, conjugado con CFL 488. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las células fueron observadas en aumentos de 100x



ANEXO 8 Expresión de CICLINA D1 en la línea celular A549 tratadas con ASO-EGFR y ASO-CICLINA D1. Células fijadas en sembradas en placas de 12 pozos fueron transfectadas con CL de ASO-CICLINA, Pasadas 72 horas postransfección fueron fijadas, permeabilizadas y tratadas con el anticuerpo primario monoclonal anti-Ciclina D1 (Dilución 1/100; SC-20044; Santa Cruz, CA) y los anticuerpos secundarios policlonales IgG generados en cabra, anti-ratón, conjugado con CFL 488. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las células fueron observadas en aumentos de 100x