



Casa abierta al tiempo

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa División de Ciencias  
Biológicas y de la Salud

**Efecto del ácido retinoico sobre la apoptosis, proliferación y migración  
de células de cáncer de pulmón, a través de las vías PI3K-Akt y MAPK**

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA

**Lic. en B. E. REYNA SARA QUINTERO BARCEINAS**

### DIRECTORA:

Dra. Claudia Haydée González de la Rosa  
Departamento de Ciencias Naturales  
Unidad Cuajimalpa, UAM

### ASESORES:

Dr. Alejandro García Regalado	Dr. Pablo G. Damián Matzumura
Departamento de Ciencias Naturales	Departamento Biol. De la Reproducción
Unidad Cuajimalpa, UAM	Unidad Iztapalapa, UAM

México D.F.

Diciembre 2013

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, forma parte del padrón de programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: 001481

El presente trabajo fue realizado gracias a la beca otorgada por el CONACYT con número de becario: 420046.

## MIEMBROS DEL JURADO

Los miembros del jurado fueron designados por la comisión de posgrado de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, los abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **Efecto del ácido retinoico sobre la apoptosis, proliferación y migración de células de cáncer de pulmón, a través de las vías PI3K-Akt y MAPK.** Con fecha 5 de Diciembre de 2013.



---

Dr. Pablo G. Damián Matzumura

**PRESIDENTE**



---

Dra. Elena Aréchaga Ocampo

**SECRETARIA**



---

Dr. Alejandro García Regalado

**VOCAL**



---

Dra. Mina Königsberg Fainstein

**VOCAL**

*A mi mamá, mi ejemplo de  
superación y esfuerzo.  
Gracias por hacer que todo  
sea posible.*

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización de este proyecto fue posible gracias al apoyo de la Dra. Claudia que me dio la oportunidad de colaborar con ella y confió en mí.

Al Dr. Alejandro por toda la paciencia que me tuvo en el laboratorio, por compartir sus conocimientos conmigo y por enseñarme a comprometerme con mi proyecto.

Al Dr. Pablo por dedicarle tiempo a la revisión de este proyecto.

Agradezco a mis hermanos Marcela y David su apoyo incondicional hacia mí, sus buenos deseos y sus palabras de aliento siempre me ayudan a seguir adelante. A mis sobrinas Montse y Caro que simplemente con una sonrisa suya hacen que todo sea más fácil. A mi abuelita, la persona más fuerte que conozco.

A mi Papá que me dio el ejemplo de seguir adelante en el camino de la investigación. A Padri que me enseñó a sonreír ante cualquier adversidad.

A mis amigas y amigos que han estado apoyándome en todo momento y que nunca me han dejado sola.

Por último y no menos importante, agradecer a la UAM el darme todas las herramientas necesarias para sacar adelante este proyecto.

## GLOSARIO

Akt	Cinasa de serina/treonina conocida también como proteína cinasa B (PKB)
AMPc	Adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico
ATRA	Ácido retinoico all-trans
Cinasa	Enzima que actúa transfiriendo un grupo fosfato desde una molécula de ATP a un aminoácido de otra proteína
CoA	Co-activadores
CoR	Co-represor
CPCNP	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
CRABP	Proteínas celulares de unión al ácido retinoico
CRBP	Proteínas celulares de unión a retinoides
CREB	Proteínas celulares de unión al elemento de respuesta a AMPc
DBD	Dominio de unión al DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
HDAC	Histonas desacetilasas
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trifosfato
JNK	Cinasa N-terminal de c-jun
LBD	Dominio de unión al ligando
Ligando	Sustancia específica que es capaz de unirse y formar complejos

termodinámicamente estables con otra biomolécula para llevar a cabo una respuesta biológica

MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MEK	Proteína cinasa de ERK
NCoR	Co-represor nuclear
PDK1	Proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos
PH	Dominio homólogo a pleckstrina
PI3K	Fosfatidilinositol 3- cinasa
PIP <sub>3</sub>	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
Raf	Proteína cinasa de serina/treoninaRaf
RAL	Retinaldehído
RAR	Receptores del ácido retinoico
RARE	Elementos de respuesta a ácido retinoico
Ras	Proteína G monomérica perteneciente a la familia de GTPasas
RNA	Ácido ribonucleico
RTK	Receptores con actividad de tirosina cinasa
RXR	Receptores X de retinoides
SMRT	Mediador del silenciamiento de ácido retinoico
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular

# ÍNDICE

Resumen.....	10
Abstract.....	11
I. Introducción.....	12
II. Antecedentes.....	31
III. Justificación.....	35
IV. Pregunta de Investigación.....	36
V. Hipótesis.....	36
VI. Objetivo General.....	36
VII. Objetivos Particulares.....	37
VIII. Material y Métodos.....	38
IX. Resultados.....	43
• ATRA promueve la activación de Akt y ERK1/2 en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar A549.....	43
• ATRA promueve la activación de Akt y ERK1/2 de forma independiente a sus efectos genómicos .....	46
• BMS493 bloquea la transcripción de los genes blanco de ATRA.....	50
• La vía PI3K-Akt está involucrada en la resistencia al tratamiento con ATRA en inhibir la proliferación .....	51
• La vía ERK está involucrada en la resistencia al tratamiento con ATRA en inhibir la proliferación .....	53



- ATRA promueve la fosforilación de ERK a través de MEK.....55
- Las vías PI3K y ERK están involucradas en la supervivencia celular mediada por ATRA ..... 56
- El tratamiento con ATRA promueve la migración celular en células A549..... 59

X. Discusión..... 64

XI. Conclusiones..... 75

XII. Perspectivas..... 76

XIII. Anexos..... 77

- Anexo A..... 77
- Anexo B..... 79
- Anexo C.....80

XIV. Bibliografía..... 81

## RESUMEN

El ATRA ha sido utilizado como agente anti-neoplásico por su capacidad de inducir diferenciación, principalmente en leucemias, mientras que en otros tipos de cáncer es capaz de promover la inhibición de la proliferación; sin embargo, en pacientes con cáncer de pulmón el efecto inhibitorio de proliferación no se puede apreciar en todos los casos y no se sabe a qué se debe esta resistencia al tratamiento con ATRA. Por otro lado, las vías de señalización PI3K-Akt y ERK se encuentran constitutivamente activas en células cancerosas promoviendo sobrevivencia, proliferación e invasión celular, sugiriendo su participación en la resistencia al tratamiento con ATRA en cáncer de pulmón. En este trabajo demostramos que el ATRA es capaz de activar a las vías de señalización PI3K-Akt y ERK por un mecanismo independiente de la transcripción y que, la activación de Akt y ERK está relacionada con el mecanismo de resistencia a ATRA, provocando efectos desfavorables, ya que promueve sobrevivencia y migración en células de cáncer de pulmón. La inhibición de estas vías de señalización restaura el efecto benéfico del ATRA, disminuyendo la proliferación, aumentando la apoptosis y evitando el proceso de migración celular. Por lo tanto, este trabajo propone el uso del ATRA en combinación con inhibidores de PI3K y ERK como posible tratamiento para ser evaluado en estudios clínicos para que, en un futuro, pueda ser usado como terapia en pacientes con cáncer de pulmón que son resistentes al tratamiento con ATRA.

## **ABSTRACT**

All-trans retinoic acid has been used as anti-neoplastic by their ability to induce differentiation mainly in leukemia, in others types of cancer has been able to promote proliferation inhibition, however in patients with lung cancer the inhibitory effect of proliferation is not seen in all of them and it is not know why is this resistance to ATRA. The signaling pathway PI3K-Akt and ERK are constitutively active in cancer cells promoting, survival, proliferation and cell invasion, suggesting their participation in the resistance to ATRA in lung cancer cells. In this study we demonstrate that the treatment with ATRA active the signaling pathway PI3K-Akt y ERK by a mechanism independent of transcription, and the activation of Akt and ERK is related to the mechanism of resistance to ATRA leading adverse effects to promote survival and migration in lung cancer cells. The inhibition of this signaling pathway restores the beneficial effect of ATRA reducing proliferation, increasing apoptosis avoiding the process of cell migration in lung cancer cells. Therefore this work proposes the use of ATRA in combination with PI3K and ERK inhibitors like a possible treatment to be evaluated in clinical trials so that, in the future it can be used as therapy for lung cancer patients who are resistant to treatment with ATRA.

## INTRODUCCIÓN

- **Estadísticas de cáncer en México**

El cáncer es la enfermedad que más muertes provoca en el mundo, cerca de 7.6 millones de casos al año. Los diferentes tipos de cáncer se localizan principalmente en órganos como pulmón, estómago, hígado, colon y mama (OMS, 2011).

Del total de defunciones registradas en México durante el 2011, el 12.9% fue debido a tumores y de éstos el 93.6% fueron tumores malignos (INEGI, 2012). Los tumores malignos que han reportado alta mortalidad en la población masculina mayor a 20 años son debidos a cáncer de próstata (16.9%), cáncer de bronquios y pulmón (12.8%) y por último cáncer de estómago (8.6%). La población femenina mayor a 20 años muere por cáncer de mama (13.8%), cáncer cervicouterino (10.4%) y cáncer de estómago (7%) (INEGI, 2012). Para el cáncer de bronquios y pulmón el grupo de edad con la tasa de mortalidad más alta se ubica tanto en hombres como en mujeres arriba de los 80 años (Tabla 1); la magnitud de las defunciones por tumores malignos entre la población mayor de 20 años de edad, es proporcional con la edad, ya que la tasa de mortalidad observada se incrementa de forma importante a partir de los 50 años y éstas son más altas para la población de 80 y más años.

En el año 2011, nueve de cada 100 mil adultos de 20 a 29 años fallecieron a consecuencia de algún tumor maligno y se incrementó hasta 878 de cada 100 mil adultos de 80 años y más (Tabla 1).

Por 100 mil habitantes de cada grupo de edad y sexo

Principales tumores malignos	Grupo de edad							
	20 a 29	30 a 39	40 a 49	50 a 59	60 a 64	65 a 74	75 a 79	80 y más
<b>Hombres</b>								
Bronquios y pulmón	0.35	0.80	2.98	11.98	30.18	67.18	115.27	131.00
Estómago	0.41	1.51	3.91	10.34	20.87	36.16	61.72	81.22
Hígado y de las vías biliares intrahepáticas	0.18	0.41	1.29	5.58	12.15	25.79	41.80	61.89
Colon	0.35	1.05	2.71	6.75	13.76	20.31	35.76	47.03
Mama	0.01	0.04	0.09	0.09	0.00	0.39	0.65	1.44
Próstata	0.02	0.06	0.55	5.69	22.36	68.75	180.09	361.69
<b>Mujeres</b>								
Bronquios y pulmón	0.10	0.67	2.07	7.98	14.32	28.30	47.14	62.28
Estómago	0.44	1.59	3.83	9.12	14.09	24.80	43.39	67.21
Hígado y de las vías biliares intrahepáticas	0.16	0.45	1.57	6.69	12.80	26.19	41.72	50.18
Colon	0.24	0.90	2.13	4.45	11.23	16.98	25.73	40.55
Mama	0.40	4.46	14.55	26.74	35.55	38.07	43.39	65.64
Cervicouterino	0.79	3.78	10.44	17.40	22.22	30.25	42.83	54.66

**Tabla 1.** Tasa de mortalidad por 100 mil habitantes en de la población de 20 años y más por principales tumores malignos según grupo de edad y sexo en la población mexicana. Fuente: INEGI (2012).

- **Cáncer de pulmón**

Existen 2 tipos de cáncer pulmonar, el más frecuente de ellos (>80% del total), es el de células no pequeñas (abreviado como CPCNP). Este tipo de cáncer se subclasifica en 3 diferentes histopatologías: carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes y adenocarcinoma, dependiendo del tipo y apariencia de las células que presentan (Brambilla *et al.*, 2001).

El principal factor de riesgo relacionado con el cáncer de pulmón es el tabaquismo, asociado en su mayoría a los hombres. Sin embargo, estos datos han variado con el paso del tiempo, mostrando un aumento del tabaquismo en las mujeres, pudiendo esperarse una mayor incidencia de cáncer de pulmón en ellas en los próximos años

(INEGI, 2012). Otros factores ambientales de riesgo importantes son la exposición al humo de tabaco, al humo de leña, al radón, entre muchos otros (Darby *et al.*, 2005).

- **Tratamientos**

La resección quirúrgica de un tumor primario sigue siendo la mejor posibilidad de curación para pacientes con CPCNP. Estadios tempranos I y II de pacientes con CPCNP son usualmente tratados con cirugía (o radiación si los pacientes no son candidatos a cirugía) con o sin quimioterapia adyuvante para estadios IB y II. Estadios avanzados IIIA y IIIB se tratan generalmente con una combinación de quimioterapia y radiación, si el paciente no es candidato a cirugía. Pacientes con metástasis (estadio IV) son tratados con quimioterapia para mejorar su calidad de vida, paliar sus síntomas y aumentar la sobrevida (Larsen *et al.*, 2011)

El beneficio clínico que ofrece el tratamiento con quimioterapia se restringe a pacientes que se presentan en buen estado general. Ante esto, la urgencia por encontrar nuevos agentes mejor tolerados y con mecanismos de acción diferentes, es un reto en la investigación científica que se necesita afrontar para mejorar la duración y la calidad de vida de esta gran población de pacientes (Hoang *et al.*, 2002).

Años de investigación dedicados al estudio del cáncer han generado conocimiento nuevo sobre la transducción de señales en la angiogénesis, la invasión, la apoptosis y el control del ciclo celular en la iniciación, propagación y sobrevivencia de las células de cáncer, lo que se ha traducido en el descubrimiento de nuevos blancos

terapéuticos, tales como vías de señalización desreguladas, la inhibición específica de estas vías resulta en una menor toxicidad (Burstein and Schwartz, 2008).

Múltiples vías de señalización activas de manera constitutiva en cáncer ya están siendo interrumpidas de manera específica en combinación con la quimioterapia para ofrecer mejores resultados. Algunos de los agentes dirigidos principalmente a las células neoplásicas ya son usados como tratamientos de primera línea, por ejemplo el bevacizumab, un anticuerpo monoclonal que inhibe al VEGFR, se añade en combinación con anti-neoplásicos como paclitaxel o carboplatino y llevan a una mejor respuesta, mejorando el tiempo de vida de los pacientes con CPCNP (Larsen *et al.*, 2011). Otro anticuerpo monoclonal que forma parte del tratamiento para pacientes con CPCNP es el cetuximab, que inhibe al EGFR y se puede aplicar en combinación con cisplatino y vinorelbine (Furrukh *et al.*, 2013).

El enfoque que se ha utilizado para la búsqueda de un tratamiento exitoso en el cáncer de pulmón, es la modulación de vías de señalización implicadas en la progresión del cáncer. Un agente antineoplásico que tiene la capacidad de modular vías de señalización involucradas en proliferación, diferenciación y sobrevivencia, es el ácido retinoico *all-trans* (ATRA), un retinoide derivado de la vitamina A que está siendo probado como terapia alternativa (Sanz and Lo-Coco, 2011).

- **Retinoides**

Los retinoides son compuestos químicos análogos de la vitamina A, obtenidos de la dieta, en particular de los huevos, leche, mantequilla, aceites de hígado de pescado, y de la provitamina  $\beta$ -caroteno de origen vegetal (Bushue and Wan, 2010). Se conocen cerca de 4,000 moléculas naturales y análogas derivadas de la vitamina A.

Una vez ingerida, la vitamina A, se absorbe en forma de retinol por las células de la mucosa intestinal y se transporta a través de la sangre en quilomicrones, que son lipoproteínas que recogen desde el intestino delgado los triglicéridos, los fosfolípidos, y el colesterol ingeridos en la dieta, llevándolos hacia el hígado, donde el retinol es absorbido y almacenado como ésteres de retinol en las células hepáticas. Posteriormente es oxidado de manera reversible por la enzima retinol deshidrogenasa, para producir su aldehído, el retinal. De la misma manera el retinal es oxidado de manera irreversible a ATRA (Bushue and Wan, 2010).

La estructura de los retinoides comprende tres unidades: una región hidrófoba, una unidad enlazadora y un extremo polar (Fig. 1) que es por lo general un ácido carboxílico; la modificación de cada unidad ha generado muchos compuestos análogos (Barnard *et al.*, 2009) (Bushue and Wan, 2010).





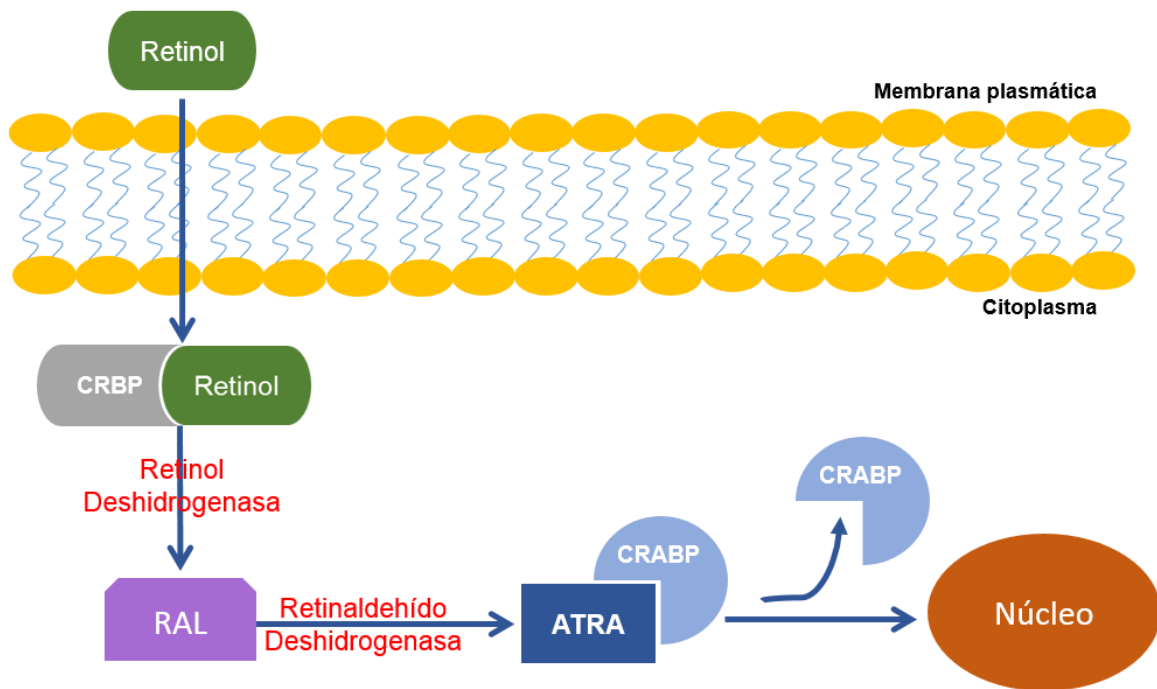
**Figura 1.** Estructura de los retinoides. (Barnard *et al.*, 2009)

Los retinoides endógenos con actividad biológica incluyen ATRA, ácido retinoico 9-cis, retinaldehído 11-cis, entre otros. Una característica que se debe tomar en cuenta del ATRA, es su capacidad de isomerizarse en condiciones experimentales y fisiológicas (Bushue and Wan, 2010).

- **Proteínas de unión a retinoides**

Para llevar a cabo su función biológica, los retinoides deben unirse a proteínas específicas de unión a retinoides (CRBP) que sirven para mediar su acción en los receptores nucleares. Estas proteínas se localizan en compartimentos extracelulares e intracelulares y están asociadas a las diferentes formas isoméricas de los retinoides, ayudando a solubilizar y estabilizar a los retinoides en espacios acuosos. Por ejemplo, el retinol circula en la sangre unido a la proteína de unión a retinoides

en el suero. Dentro de las células el retinol todo-trans y su producto de oxidación, el retinal todo-trans, están asociados a proteínas celulares de unión al retinol (CRBP). Mientras que el ATRA intracelular se une a las proteínas celulares de unión al ácido retinoico (CRABP) (Fig.2).



**Figura 2.** Participación de las proteínas de unión a retinoides. El retinol viaja por el torrente sanguíneo unido a proteínas celulares de unión a retinoides (CRBP) y difunde en la célula gracias a su naturaleza lipofílica. En el citoplasma vuelve a unirse con proteínas CRBP las cuales modulan la acumulación intracelular del retinol que, por medio de la enzima retinol deshidrogenasa se convierte en retinal (RAL), para posteriormente ser convertido a ATRA, por medio de la enzima retinaldehído deshidrogenasa. Una vez sintetizado el ATRA se une a proteínas celulares de unión a ácido retinoico (CRABP), las cuales lo transportarán al núcleo.

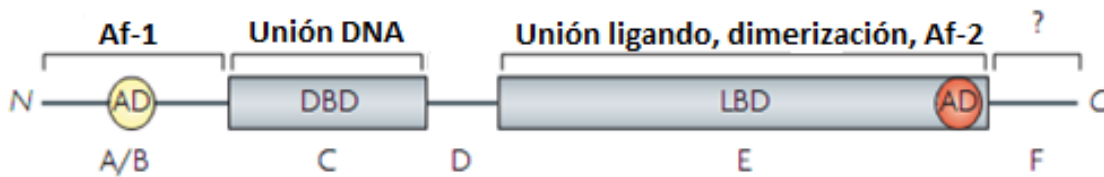
- **Receptores de ácido retinoico**

Los retinoides unidos a sus receptores nucleares regulan la expresión génica, activando de esta forma la transcripción de sus genes blanco (Bushue and Wan, 2010). Se han descrito dos clases de receptores de retinoides: los receptores de ácido retinoico (RAR) y los receptores X de retinoides (RXR); cada clase de receptor contiene tres subtipos:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Pero, únicamente los RAR pueden ser activados tanto por el ATRA como por el 9-cis, mientras que los RXR son exclusivamente activados por el ácido retinoico 9-cis (Bushue and Wan, 2010).

Los RXR pueden formar heterodímeros con diferentes tipos de receptores incluyendo los RAR, esta asociación es necesaria para poder unirse a los elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE) presentes en los promotores de sus genes blanco (Altucci and Gronemeyer, 2001).

Al igual que otros receptores nucleares, los RAR y RXR contienen 6 dominios estructurales y funcionales denominados de la A a la F (Fig. 3). Existen dos dominios conservados, el dominio de unión al ADN (DBD) y el dominio de unión a ligando (LBD). El dominio DBD está compuesto por dos dedos de zinc y media la unión al ADN. La regulación transcripcional es controlada principalmente por el dominio LBD que contiene una región de unión a ligando, una superficie de dimerización y una región de activación transcripcional que es dependiente del ligando denominada AF-2. El segmento A/B en el N-terminal tiene una región de activación que es independiente de ligando denominada AF-1. La región D corresponde a un enlazador

que permite la orientación adecuada de los dominios DBD y LBD; por último, la región F situada en el C-terminal está presente en los RAR, pero no en los RXR y cuya función es desconocida. La función de los dominios de activación (AD) es activar la transcripción, la cual a su vez es regulada por el dominio de unión al ADN (DBD) (Fig. 3) (de Lera *et al.*, 2007).

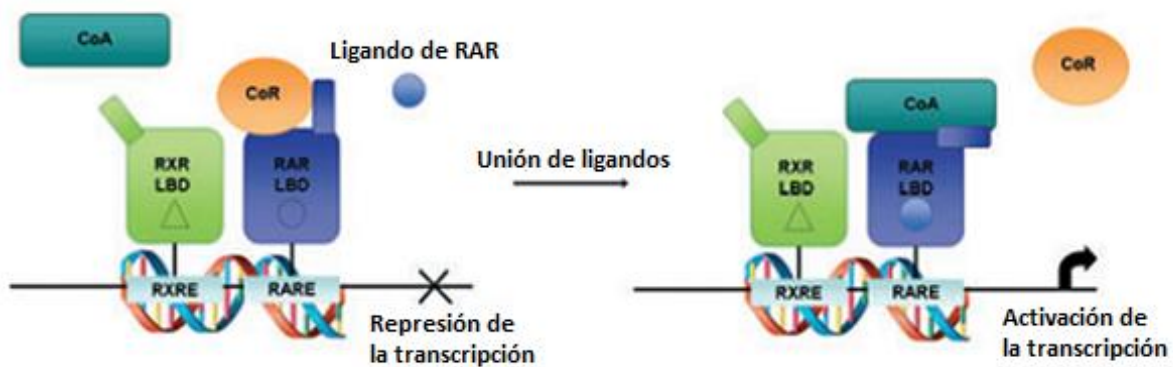


**Figura 3.** Organización estructural de los receptores de retinoides. Modificada (de Lera *et al.*, 2007).

- **Mecanismo genómico del ATRA**

El ATRA ha sido el más estudiado de los retinoides, debido a sus efectos de inhibición de la proliferación, promoción de apoptosis y diferenciación en leucemias (Altucci and Gronemeyer, 2001). El mecanismo molecular por el cual el ATRA promueve sus efectos biológicos es el siguiente: en ausencia del ligando, el heterodímero RAR/RXR se encuentra unido aun co-represor (CoR) que bloquea la transcripción (Fig.4). Este CoR se caracteriza por tener actividad de histona desacetilasa. El reclutamiento de histonas desacetilasas ocurre a través de dos proteínas intermediarias: un mediador del silenciamiento del ácido retinoico (SMRT) y un co-represor del receptor nuclear (NCoR), que forman parte de complejos con actividad desacetilasa, por lo que la cromatina alrededor es más compacta y está

silenciada mientras esté unido este co-represor. La unión del ligando induce modificaciones en la estructura de RAR, provocando un cambio conformacional que da lugar a la desestabilización del complejo co-represor, formando una nueva interfaz capaz de reclutar co-activadores (CoA) que permiten la entrada de la maquinaria de transcripción en los promotores de los genes blanco de ATRA, tales como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), p53, RAR $\beta$ , p38, entre muchos otros que tienen efecto contra el cáncer al inhibirla proliferación e inducir la apoptosis en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el de pulmón (Fig.4) (Altucci and Gronemeyer, 2001).



**Figura 4.** Mecanismo de acción del heterodímero RAR/RXR. En ausencia del ligando, el heterodímero RAR/RXR se encuentra unido a un CoR que bloquea la transcripción. La unión del ligando al dominio LBD del receptor RAR, promueve cambios conformacionales que desestabilizan la unión del CoR permitiendo la entrada de CoA, los cuales conducen a la activación de la transcripción (Hurst and Else, 2012).

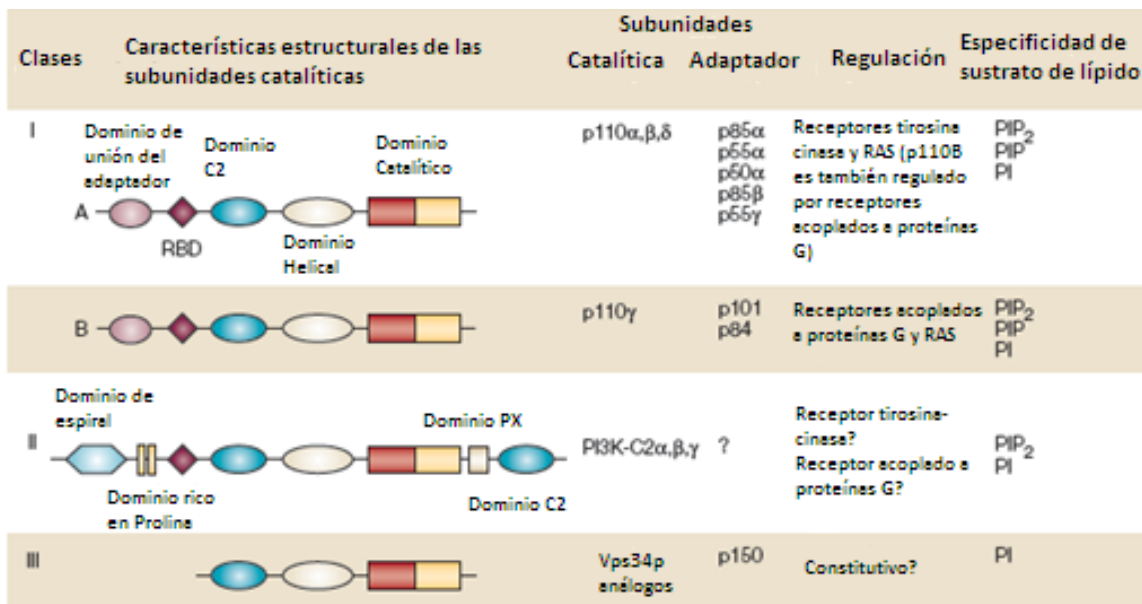
- **Mecanismo no genómico del ATRA**

En los últimos años se ha descrito que ATRA puede ejercer sus efectos a través de un mecanismo independiente de la transcripción (mecanismo no genómico) que, por lo general, se caracteriza por ejercer su acción de una manera más rápida (minutos) que las acciones genómicas clásicas antes descritas; esta acción no transcripcional, no depende de la síntesis de RNA ni de la síntesis de proteínas (Bushue and Wan, 2010). Este descubrimiento ha tomado fuerza debido a que se ha visto involucrada la participación de los receptores nucleares a través de la activación de proteínas cinasas a tiempos cortos, regulando vías de señalización como PI3K-Akt y ERK1/2, las cuales tienen que ver principalmente con supervivencia y proliferación celular. (Masia *et al.*, 2007; Piskunov and Rochette-Egly, 2011).

- **Vía de señalización PI3K-Akt**

Los ejemplos antes mencionados de las acciones no transcripcionales del ATRA tienen lugar gracias a la interacción con la ruta PI3K-Akt, la cual está asociada a procesos oncogénicos. PI3K pertenece a una familia conservada de cinasas de lípidos que contienen dominios catalíticos homólogos pero con elementos reguladores distintos. PI3K fosforila el grupo hidroxilo en la posición 3' del anillo de inositol del fosfatidilinositol (Bader *et al.*, 2005), promoviendo la generación de segundos mensajeros como el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) implicados en funciones celulares como proliferación, migración y supervivencia (Vanhaesebroeck *et al.*, 2001). La familia de las proteínas PI3K, se divide en tres clases de acuerdo a

sus diferencias estructurales, preferencia por su lípido sustrato, distribución en tejidos y mecanismos de activación (Fig.5)(Dbouk and Backer, 2010; Vanhaesebroeck *et al.*, 1999). La activación de PI3K lleva a la acumulación de PIP<sub>3</sub>, el cual proporciona un sitio de anclaje para proteínas que contienen dominios homólogos a pleckstrina (PH) tales como la cinasa Akt (Osaki *et al.*, 2004).



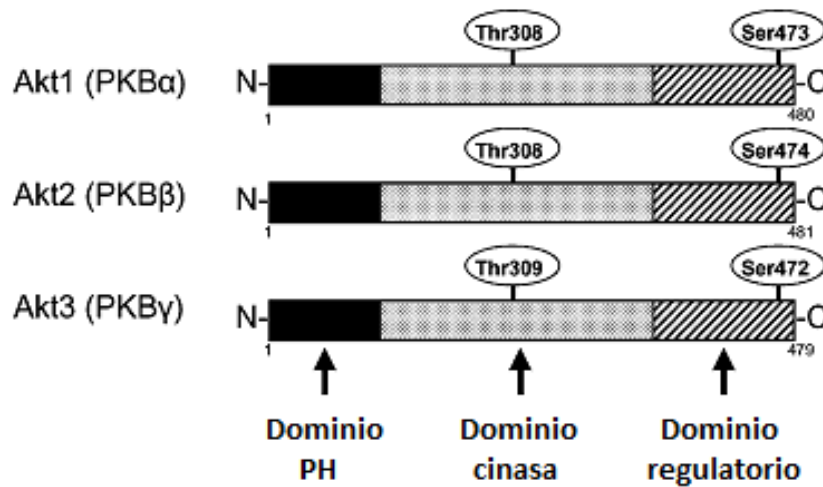
**Figura 5.** Familia de las PI3K. Las subunidades catalíticas de la clase I son p110 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , las cuales tienen un dominio de unión a proteínas reguladoras, un dominio de unión a Ras (RBD), un dominio homólogo a PKC2 (C2), un dominio helicoidal y un dominio catalítico. Las subunidades catalíticas de la clase IA, se asocian constitutivamente a una subunidad reguladora, de las cuales se conocen al menos cinco proteínas codificadas por tres distintos genes. Los miembros de la clase IB están conformados por la subunidad catalítica p110 $\gamma$ , la cual se asocia a la subunidad reguladora p101 ó a la proteína p84. La clase II comprende a PI3k-C2 $\alpha$ , PI3k-C2 $\beta$  y PI3k-C2 $\gamma$ , las cuales carecen de sitios de unión a subunidades regulatorias, pero contienen un dominio phox (PX) y un dominio C2 en su región C terminal que median la unión a fosfoinosítidos. La clase III comprende a Vps34p análogo de PI3K en levaduras la cual se une a la subunidad reguladora p150. Tomada y modificada de (Baderet *al.*, 2005)

- **Akt**

La proteína Akt es una cinasa de serina/treonina clave en la regulación de varios procesos celulares como apoptosis, angiogénesis y proliferación celular. La proteína Akt regula estos procesos celulares mediante la fosforilación de sus proteínas efectoras río abajo, como pueden ser oncoproteínas y supresores de tumores (Marsit *et al.*, 2005; Yoeli-Lerner and Toker, 2006). En mamíferos se han descrito tres isoformas de Akt denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  ó Akt 1, 2, y 3, las cuales presentan alto grado de homología difiriendo en sus sitios de fosforilación (Song *et al.*, 2005). Akt1 es la isoforma predominante en la mayoría de los tejidos, Akt2 se ha observado en tejidos que responden a insulina, mientras que Akt3 se encuentra sólo en células del sistema nervioso (Osaki *et al.*, 2004).

Cada isoforma de Akt está compuesta por 3 distintas regiones funcionales: un dominio (PH) en su región amino terminal, el cual se une a PIP<sub>3</sub>, producto de la activación de PI3K; un dominio catalítico con actividad de cinasa en su región central; y un motivo hidrofóbico en su región carboxilo terminal (Song *et al.*, 2005). La proteína Akt es activada por la fosforilación de 2 residuos regulatorios, un residuo de treonina (T308) en su dominio de cinasa y uno de serina (S473) en su motivo hidrofóbico (Fig.6) (Osaki *et al.*, 2004).



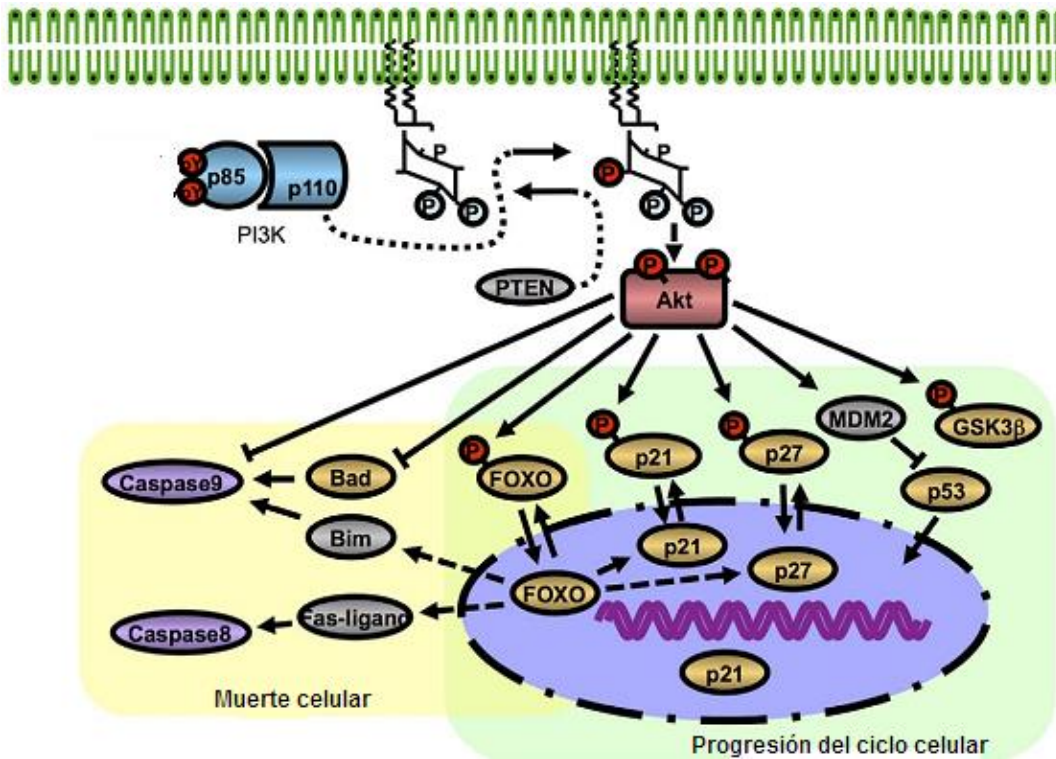


**Figura 6.** Estructura de las isoformas de Akt. Un dominio PH, un dominio central de cinasa que incluye a la T308 en Akt1 y Akt2, y en Akt3 incluye a la T309, y un dominio regulatorio C-terminal que incluye a la S473 en Akt1, a la S474 en Akt2 y a la S472 en Akt3. Cada isoforma es fosforilada en residuos de treonina y serina diferentes (Osaki *et al.*, 2004).

La actividad de Akt puede ser directamente regulada por el PIP<sub>3</sub>, reclutándola a la membrana plasmática y alterando su conformación, lo que permite una subsecuente fosforilación por PDK1, una cinasa de serina/treonina que contiene un dominio PH en su región carboxilo terminal que le permite unirse con alta afinidad al PIP<sub>3</sub> para poder activarse. De esta forma, la cinasa PDK1 en su estado activo, fosforila la treonina 308 en el dominio de cinasa de Akt, mientras que la fosforilación de la serina en el motivo hidrofóbico es atribuida a una hipotética PDK2 o a una autofosforilación de Akt (Fig.6) (Lindsley *et al.*, 2005).

Una de las principales funciones de la activación de la vía PI3K-Akt es promoverla sobrevivencia celular y bloquear mecanismos pro-apoptóticos, mediante la fosforilación de una gran variedad de sustratos de Akt, incluyendo proteínas pro-

apoptóticas Bad y caspasa 9. De la misma manera la activación de Akt promueve la proliferación celular por diferentes moléculas blanco como GSK3, p27 y FOXO (Fig. 7).

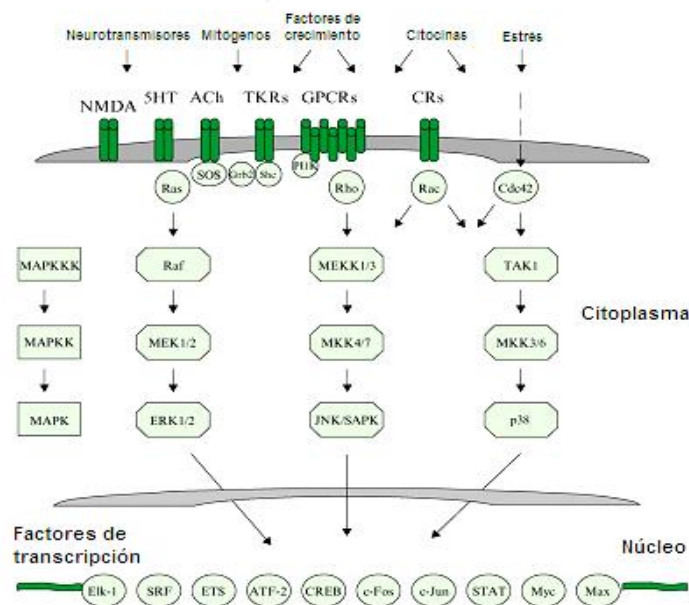


**Figura 7.** Papel de Akt en supervivencia celular y progresión del ciclo celular. La activación de PI3K promueve la formación de PIP<sub>3</sub> en membrana plasmática promoviendo el reclutamiento de Akt. Akt en su estado activo, activa o inhibe por fosforilación a sus proteínas blanco que se encuentran río abajo involucradas en supervivencia celular y proliferación. Modificada de (Shiozaki *et al.*, 2012).

- **Vía de señalización MAPK**

La proliferación celular no es únicamente promovida por Akt, este proceso es ampliamente regulado por una gran variedad de vías de señalización que involucran una serie de eventos de transducción de señales a través de la membrana

plasmática, el citoplasma y el núcleo. Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) son importantes mediadores de esta señal de transducción, que además de regular la proliferación celular, también participan regulando procesos como la diferenciación y la apoptosis (Kyosseva, 2004). Esta ruta de señalización se ha reportado activa en más del 50% de leucemias y otros tipos de cáncer, como cáncer de mama y de próstata. Se han identificado tres grupos principales de MAP cinasas: la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), la cinasa N-terminal de c-jun (JNK) y la cinasap38. Por un lado, ERK es estimulada por señales de crecimiento, mientras que JNK y p38 son activadas por estímulos de estrés. Una característica común de los tres grupos de MAP cinasas es que están organizadas en 3 módulos de activación, una MAP cinasa (MAPK), una MAP cinasa activadora también llamada MAP cinasa-cinasao MAPKK y una MAP cinasa-cinasa-cinasa (MAPKKK) (Fig. 8) (Kyosseva, 2004).



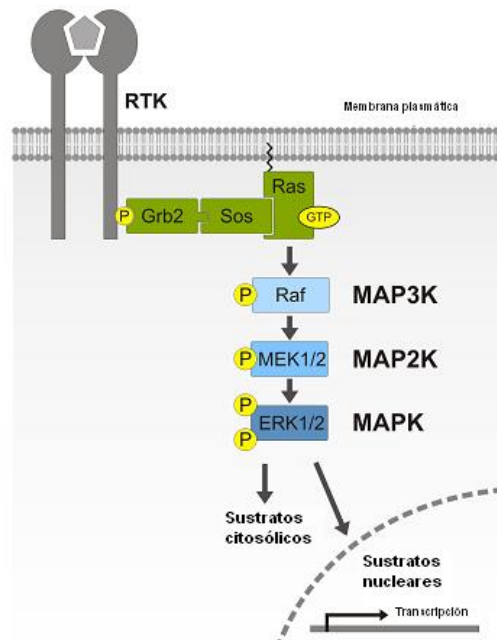
**Figura 8.** Cascada de señalización de MAP cinasas. En células de mamíferos los tres grupos de MAP cinasas, ERK, JNK y p38 son activadas por diversos estímulos extracelulares, provocando la fosforilación de factores de transcripción específicos.

- **ERK**

La MAP cinasa ERK tiene 8 isoformas, ERK1-8, sin embargo las cinasas ERK1 y ERK2 han sido las más caracterizadas y estudiadas. ERK1/2 son cinasas de serina-treonina que presentan 83% de identidad entre ellas, se expresan en todos los tejidos, pero se encuentran altos niveles en el cerebro, músculo esquelético, timo y corazón (Cargnello and Roux, 2011).

La cinasa ERK (p44ERK1/p42ERK2) se estimula en células de mamíferos vía receptores con actividad de tirosina cinasa (RTKs) y por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) de una manera dependiente o independiente de Ras (Kyosseva, 2004). Después de la unión de factores de crecimiento o mitógenos a sus respectivos receptores, ocurre la activación del complejo Shc/Grb2/SOS formado por proteínas adaptadoras (Shc y Grb2). Tras la estimulación del complejo, la proteína Ras intercambia GDP por GTP presentando un cambio conformacional que la vuelve activa, esto debido a su interacción con la proteína SOS (factor intercambiador de nucleótidos de guaninas). De esta forma, Ras recluta a Raf a la membrana celular. El gen Raf codifica 3 isoformas de cinasas: A-Raf, B-Raf y Raf-1 (C-Raf), y son normalmente activadas por una serie de eventos tales como: reclutamiento a la membrana plasmática mediante la interacción con Ras, dimerización de proteínas Raf, fosforilación/desfosforilación en diferentes dominios o

por asociación con complejos de andamiaje. Recientemente se descubrió que B-Raf es el activador más potente de MEK comparado con Raf-1 y A-Raf. La actividad de las proteínas cinasas activadas por mitógenos MEK y ERK se regula positivamente por la fosforilación de Raf en residuos de serina en el dominio catalítico. Todas las Raf son capaces de fosforilar y activar a MEK. La activación de la cinasa ERK 1/2 se regula positivamente por fosforilación de MEK1 y MEK2 (Fig. 9). ERK puede fosforilar directamente diversos factores de transcripción incluyendo ets-1, c-Jun y c-Myc. Sin embargo, a través de un mecanismo indirecto, ERK puede llevar a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, fosforilando y activando al inhibidor IKK (McCubrey *et al.*, 2006). ERK tiene cerca de 160 blancos, puede entrar al núcleo y fosforilar una gran variedad de factores de transcripción. También regula la actividad de muchas proteínas involucradas en apoptosis por ejemplo Bcl-2, Bax, Bad, caspasa 9 entre muchas otras (Chappell *et al.*, 2011). Además de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular. ERK2 ha sido asociada con proliferación mientras que ERK1 puede inhibir los efectos de ERK2 en ciertas células (Fig. 9).



**Figura 9.** Representación de la cascada de señalización de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK). La activación por los receptores con actividad de tirosina cinasa (RTK) resulta en el reclutamiento de una proteína adaptadora (Grb2), que se une a la tirosina fosforilada del RTK y a su vez el factor intercambiador de nucleótidos de guaninas (GEF) interactúa con Ras para activarla. Esto resulta en la activación de C-Raf y la iniciación de la cascada de fosforilación de MAP cinasa. Una vez activa ERK puede fosforilar a sus sustratos que se encuentran en el citoplasma y en el núcleo. Modificada de (Meister *et al.*, 2013).

Por todas estas razones, las vías de señalización PI3K-Akt y Raf/MEK/ERK son un blanco terapéutico importante. Algunos inhibidores de Ras, Raf y MEK, así como de PI3K y Akt actualmente están siendo estudiados y muchos otros están siendo utilizados en ensayos clínicos (Chappell *et al.*, 2011).

## ANTECEDENTES

Los efectos benéficos del ATRA que se han obtenido a lo largo de estos años en algunos casos han mejorado la calidad de vida de una población de pacientes que padecen cáncer de pulmón. El tratamiento con ATRA, en combinación con otros agentes citotóxicos, ha aumentado la sobrevida de manera significativa comparado con pacientes que no reciben ATRA (Arrieta *et al.*, 2010). Sin embargo, este efecto no siempre es el mismo en todos los pacientes, la efectividad con la que responden a un tratamiento con ATRA se ha visto limitada en diferentes tipos de cáncer, entre estos cáncer de pulmón y hasta la fecha poco se sabe acerca de este mecanismo.

Estudios con líneas celulares de cáncer pulmonar han demostrado que la administración de 1  $\mu$ M de ATRA en la línea celular H1944 de adenocarcinoma pulmonar provoca inhibición en la proliferación y apoptosis (Choi *et al.*, 2007), mientras que la administración de 1  $\mu$ M de ATRA no ejerce ningún efecto inhibitorio de proliferación ni apoptosis en las líneas A549 y H1703, también de adenocarcinoma pulmonar (Choi *et al.*, 2007).

Los primeros estudios acerca de esta resistencia al ATRA, reportan que la mayoría de las líneas celulares de cáncer pulmonar no muestra incremento en la expresión de RAR $\beta$  después de la administración de 1  $\mu$ M de ATRA (efecto esperado debido a la presencia de RARE en el promotor de este gen), quizás debido a alteraciones en el gen RAR $\beta$  (Geradts *et al.*, 1993). Petty, en el 2005, indicó que esta resistencia a la inhibición de la proliferación por el tratamiento con ATRA es debida a la pérdida de

expresión de RAR $\beta$  durante la carcinogénesis pulmonar, causada por silenciamiento epigenético debido a metilación o desacetilación de histonas. Lo anterior indica que la restauración de la expresión de RAR $\beta$ 1 puede servir de base como estrategia en el tratamiento del cáncer, con fármacos combinados con retinoides que restauren la expresión de RAR $\beta$ , que funcionen como terapia para el cáncer de pulmón (Petty *et al.*, 2005).

Otros estudios demuestran que la activación de la vía PI3K-Akt disminuye los niveles del ARNm de RAR $\beta$ 2 (supresor de tumores) por un mecanismo que involucra a la cinasa Akt fosforilando a una proteína intermediaria (SMRT), que participa en el reclutamiento de histonas desacetilasas (HDAC) que forman parte del complejo co-represor (CoR), el cual, al estar fosforilado, se mantiene unido al heterodímero RAR/RXR y reprime la transcripción de RAR $\beta$ 2, uno de los genes que se transcribe de manera inmediata después del tratamiento con ATRA. La fosforilación de una proteína del complejo CoR (SMRT) había sido descrita que es debido a la cinasa MEK1 (Lefebvre *et al.*, 2006), pero no se sabía que era un blanco de Akt y que su fosforilación podría estar relacionada con la resistencia a ATRA.

Hasta el momento no es clara la participación de la vía ERK1/2 en mecanismos de resistencia al tratamiento con ATRA, sin embargo ya se ha descrito que en células leucémicas resistentes al tratamiento con ATRA (HL-60R) hay una activación sostenida de la cascada de señalización de MAPK (Jensen *et al.*, 2013).



Por otro lado, en el 2002 se reportó que el tratamiento de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y con ATRA (1  $\mu$ M) desencadenaba la activación de la ruta de señalización de PI3K y que esta activación es requerida para la diferenciación celular (Lopez-Carballo *et al.*, 2002). Años más tarde en el 2007, se demostró que el mecanismo por el cual se activaba esta vía de señalización en las células SH-SY5Y era mediante la fosforilación de la cinasa Akt mediada por el tratamiento con ATRA, donde dicha fosforilación de la cinasa Akt es independiente de los mecanismos transcripcionales inducidos por el ATRA (Masia *et al.*, 2007).

Además de la activación de la vía de señalización PI3K-Akt también se reportó una activación rápida de la vía de señalización ERK1/2 en células de neuroblastoma tratadas con ATRA (1  $\mu$ M) durante 5 min. En el 2008 el mecanismo de acción no genómico por el cual se activaba la vía ERK1/2 fue estudiado en células de Sertoli que fueron tratadas con ATRA (1  $\mu$ M) detectando fosforilación de la cinasa ERK1/2 a los 15 min después de la adición del ATRA (Zanotto-Filho *et al.*, 2008).

Lo anterior sugiere que el ATRA favorece procesos celulares involucrados en sobrevivencia y proliferación en diferentes líneas celulares. Los efectos del ATRA en migración e invasión han sido poco estudiados y el mecanismo por el cual ocurren sigue siendo desconocido ya que solo se ha visto en algunos tipos de cáncer. En el 2004 en células de cáncer de páncreas humano (Capan-1) se estudió el efecto del ATRA en invasión y dispersión celular; estos resultados indicaron que el tratamiento con ATRA (5  $\mu$ M) durante 48h producía un efecto inhibitorio de proliferación, sin embargo promovía invasión y dispersión celular (Leelawat *et al.*, 2005).

En el 2005 se reportó que el ATRA lleva a la activación de las vías PI3K-Akt y ERK1/2 y esto conduce a la activación de Rac1 involucrada en el re-arreglo del citoesqueleto en células de neuroblastoma (Pan *et al.*, 2005). Estos antecedentes sugieren que la activación de las vías PI3K-Akt y ERK1/2 podría estar involucrada en la resistencia al tratamiento con retinoides, además de promover migración celular por activación de Rac1.

Estos resultados sugieren la participación del ATRA en la regulación de procesos de migración celular por activación de las vías PI3K-Akt y ERK1/2 en algunos tipos de cáncer, pero hasta el momento no se sabe nada acerca de este mecanismo en cáncer de pulmón.

Por lo tanto, la inhibición de estas vías de señalización podría restaurar el efecto de sensibilidad a ATRA brindando un mejor resultado inhibiendo proliferación, promoviendo apoptosis y evitando que se lleve a cabo el proceso de migración celular.

## **JUSTIFICACIÓN:**

Se sabe que el ATRA puede modular diversas vías de señalización involucradas en cáncer, lo que puede explicar los efectos de sensibilidad o resistencia a los efectos de inhibición de la proliferación y apoptosis por el tratamiento con ATRA que se pueden observar en algunos pacientes con cáncer pulmonar. La caracterización del ATRA como modulador de las vías de señalización PI3K-Akt y ERK 1/2 ayudaría a comprender la resistencia a los efectos del ATRA sobre la proliferación y apoptosis, así como su participación en procesos de migración celular. Esta contribución brindaría un mejor entendimiento de los efectos de ATRA en vías de señalización desreguladas en cáncer, además podría proponer un posible tratamiento que pueda ser usado en pacientes con cáncer pulmonar para restaurar los efectos inhibitorios de proliferación y apoptosis en pacientes que no muestran sensibilidad al tratamiento con retinoides.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:**

¿Qué efecto tiene el bloquear las vías de señalización PI3K-Akt y ERK1/2, en combinación con el tratamiento con ATRA, sobre la resistencia a la inhibición de la proliferación, la apoptosis y la migración de células de cáncer pulmonar?

## **HIPÓTESIS:**

La inhibición de las vías de señalización PI3K-Akt y ERK1/2 restaura el efecto anti-proliferativo y apoptótico del ATRA en células de adenocarcinoma pulmonar resistentes a inhibición de la proliferación y apoptosis.

## **OBJETIVO GENERAL:**

- Determinar el papel de ATRA en la activación de las vías PI3K-Akt y ERK1/2 y su relación con la resistencia a inhibición de la proliferación y apoptosis, así como en la migración en la línea celular de cáncer pulmonar A549.

## **OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Determinar el efecto de ATRA en la activación de las vías PI3K-Akt y ERK1/2 en la línea celular de cáncer pulmonar A549.
2. Comprobar que la activación de las vías PI3K-Akt y ERK1/2 se debe a un efecto no genómico.
3. Determinar el efecto de ATRA, solo o en combinación, con los inhibidores de PI3K-Akt y ERK1/2, sobre la proliferación en la línea celular de cáncer pulmonar A549.
4. Determinar el efecto de ATRA, solo o en combinación, con los inhibidores de PI3K-Akt y ERK1/2, sobre la apoptosis en la línea celular de cáncer pulmonar A549.
5. Determinar el efecto de ATRA, solo o en combinación con los inhibidores de PI3K-Akt y ERK1/2, sobre la migración celular en la línea celular de cáncer pulmonar A549.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Cultivos celulares**

**A549:** Línea celular de adenocarcinoma de pulmón, resistente a los efectos anti-proliferativos del ácido retinoico (Choi *et al.*, 2007). Se utilizó medio DMEM-F12 suplementado con 10% de suero de bovino fetal (SFB), 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina a 37° C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Tratamientos**

Se prepararon stocks de ATRA (Sigma-Aldrich) en DMSO a una concentración de 10 mM y se almacenaron en nitrógeno líquido y en oscuridad. La concentración de DMSO no excede de 0.1%. Inmediatamente antes de cada experimento, las soluciones de trabajo (5 µM) se prepararon diluyendo en medio de cultivo. Los periodos de tratamiento con ATRA variaron entre 5, 15, 30 y 60 min, en oscuridad para evitar la isomerización del ATRA. Para determinar el efecto no genómico en la activación de las vías PI3k-Akt y ERK1/2, las células fueron pre-incubadas durante 1 hora con un inhibidor antagonista de los receptores de tipo RAR, el BMS493 (TocrisBioscience) a una concentración de 10 µM. Para el ensayo de proliferación se utilizó un inhibidor de PI3K, el 15e a una concentración de 10 µM (TocrisBioscience) y un inhibidor de MAPK, el PD98059 a una concentración de 25 µM (Enzo LifeScience). Tanto el 15e, el PD98059 como el BMS493 fueron disueltos en DMSO y agregados al medio de cultivo.

## **Análisis de proteínas mediante *Western Blot***

Para determinar el efecto de ATRA en la activación de la vía PI3k-Akt, se detectó la forma fosforilada de Akt1 y Akt total por medio de *western blot*, utilizando anticuerpos comerciales específicos anti-pAkt sc-7985; Santa Cruz, dilución 1:1000), anti-Akt (P2482; Sigma, dilución 1:5000), y anti-actina (sc-1616; Santa Cruz, dilución 1:10000). Para determinar el efecto de ATRA en la activación de la vía ERK, se determinó la forma fosforilada y total de ERK1/2 por medio de *western blot*, utilizando anticuerpos comerciales específicos anti-pERK1/2 [pTpY185/187], (Invitrogen 44-680G, dilución 1:5000), anti-ERK1/2 (sc-135900; Santa Cruz, dilución 1:5000) y anti-actina. Para comprobar la expresión de un gen blanco del ATRA se utilizó el anticuerpo específico para p53 (sc-125; Santa Cruz, dilución 1:5000). Para obtener proteínas totales, células confluentes (100%) en cajas Petri P60 fueron puestas en ayuno de SFB durante 18 h, terminado el ayuno se dieron los estímulos con ATRA o con los inhibidores (dependiendo el experimento) y posteriormente fueron lavadas con PBS 1X y lisadas en 300  $\mu$ L de buffer de lisis con ayuda de un gendarme, cada muestra se incubó a 4° C por 10 min. En seguida se centrifugó a 10,000 x g por 10 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante, la concentración de proteína se cuantificó por el método de ácido bicinonínico con el kit comercial *BCA ProteinAssay* (Prod. # 23227; ThermoScientific). Posteriormente 25  $\mu$ g de proteína total fue separada por su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida a una concentración del 10%, en condiciones desnaturizantes, posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una cámara

húmeda durante 2 h a 0.4A, utilizando buffer de transferencia 1X pH 8.3. La membrana fue bloqueada por 1 h a temperatura ambiente con TBS-T al 5% de leche. Transcurrido ese tiempo, se agregó cada uno de los anticuerpos primarios antes mencionados y se dejó incubando toda una noche a 4 °C en agitación constante. La membrana se lavó con TBS-T, posteriormente la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante, transcurrido el tiempo de incubación la membrana fue lavada con TBS-T. Finalmente el ensayo se reveló con un kit comercial de quimioluminiscencia (Cat. # WBKLS0500; Millipore) llamado "*ChemiluminescentHRPSubstrate*". El análisis densitométrico se hizo utilizando el programa ImageJ, las formas fosforiladas se normalizaron con respecto al control (células no tratadas) y se graficó el promedio y el Error Estándar de la Media (SEM).

### **Ensayo de proliferación celular**

Para determinar el efecto de ATRA en procesos de proliferación celular, se utilizó 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) del fabricante Roche (Lot. 11639000). Las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 10 000 células por pozo en 200  $\mu$ l, cuando alcanzaron el 100% de confluencia las células se ayunaron de SFB durante 18 h, dependiendo el experimento las células se pre-incubaron en presencia o ausencia de los inhibidores, 15e (10 $\mu$ M) y PD98059 (25 $\mu$ M) durante 90 min, posteriormente se estimularon con ATRA (5 $\mu$ M) durante 48 h con ATRA en medio sin SFB, 2 h antes de que se cumplieran las 48 h de estímulo con ATRA, las células se incubaron con BrdU, (10  $\mu$ M) terminado el tiempo de estímulo se retiró el medio de



cultivo y se lavaron las células con PBS. Las células se fijaron y se incubaron con el anticuerpo anti-BrdU(dilución: 1:100) durante 90 min a temperatura ambiente, pasado el tiempo las células se lavaron con PBS y se adicionó la solución sustrato, seguido de 30 min de incubación, por último se determinó la absorbancia a 370nmutilizando el aparato *TecanInfinite M100 platereader*.

### **Ensayo de migración o cierre de “herida”**

Las células se sembraron a confluencia en cajas P60 con DMEM-F12 más SFB al 10%,las células confluentes fueron puestas en ayuno de SFB durante 18 h, terminado el ayuno se realizó una “herida” con una punta de pipeta estéril que dividía la caja en dos partes, una vez realizada la herida se lavaron con PBS 1X para eliminar todas las células no adheridas o muertas,dependiendo el experimento las células se pre-incubaron en presencia o ausencia de los inhibidores, 15e (10 $\mu$ M) y PD98059 (25 $\mu$ M) durante 90 min, posteriormente se estimularon con ATRA (5 $\mu$ M) durante 48 hen medio sin SFB. Las células control (no tratadas) sufrieron el mismo proceso pero se incubaron sin ATRA, sin inhibidores y en ayuno de SFB. La migración de las células a través de la herida se visualizó con un microscopio de epifluorescenciaAxiovert 40 CFL (Carl Zeiss) acoplado a una cámara digital, se tomaron fotografías con un objetivo 5X al tiempo 0 (momento en el que se realizó la herida) y tras 48 h de incubación. Para calcular la eficiencia del cierre de la herida en las distintas condiciones de cultivo se midió el área de la herida a tiempo final (48h), utilizando el programa ImageJ. Los resultados se expresan como porcentaje de cierre (área de la herida) a las 48h respecto a las células control.

## **Ensayo de TUNEL**

Se detectaron células apoptóticas usando el kit “*DeadEndcolorimetric TUNEL assay*” del fabricante Promega (Cat # G7132). Las células A549 se crecieron en cajas P35 con cubreobjetos que fueron previamente esterilizados con alcohol al 70% durante 30 min, se pre-trataron en presencia o ausencia de los inhibidores 15e (10 $\mu$ M) y PD98059 (25 $\mu$ M) durante 90 min y posteriormente se estimularon por 48 h con ATRA (5 $\mu$ M). Después del tratamiento las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2% en PBS. Las células se incubaron con la enzima desoxi-nucleotidil-transferasa terminal (TdT) y los nucleótidos biotinilados. Después se incubaron con estreptavidina, que se va a unir a los nucleótidos biotinilados incorporados en los 3'-OH del DNA fragmentado presente en las células apoptóticas. Posteriormente las células se lavaron y se detectó la estreptavidinacondiaminobencidina (DAB). La cuantificación de células apoptóticas se hizo escogiendo 5 campos diferentes y contando 50 células en cada campo, se normalizo con las células no tratadas y se graficó el promedio y el Error Estándar de la Media (SEM).

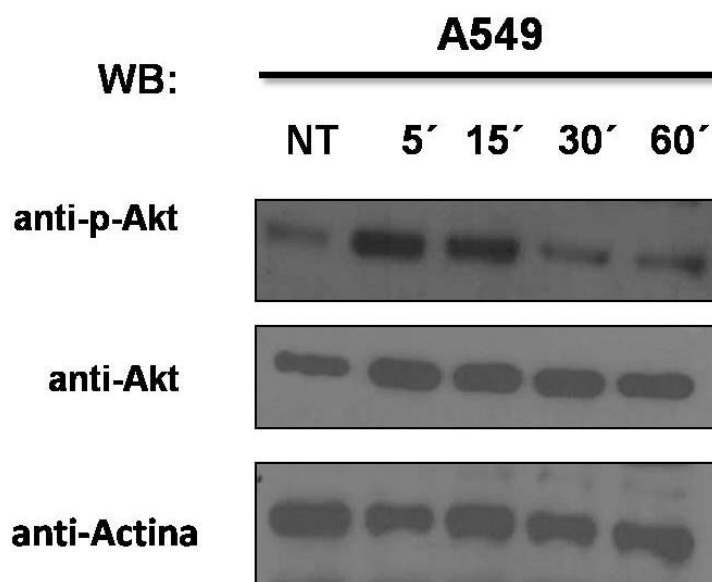
## **Análisis estadístico**

El significado estadístico de las diferencias entre los datos fue determinado por análisis de varianza (n=3) y una prueba de *Newman-Keuls*, usando el software *GraphPadPrism5.0*.  $p < 0.05$  fue considerada como estadísticamente significativa. Los valores se presentan como promedio  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

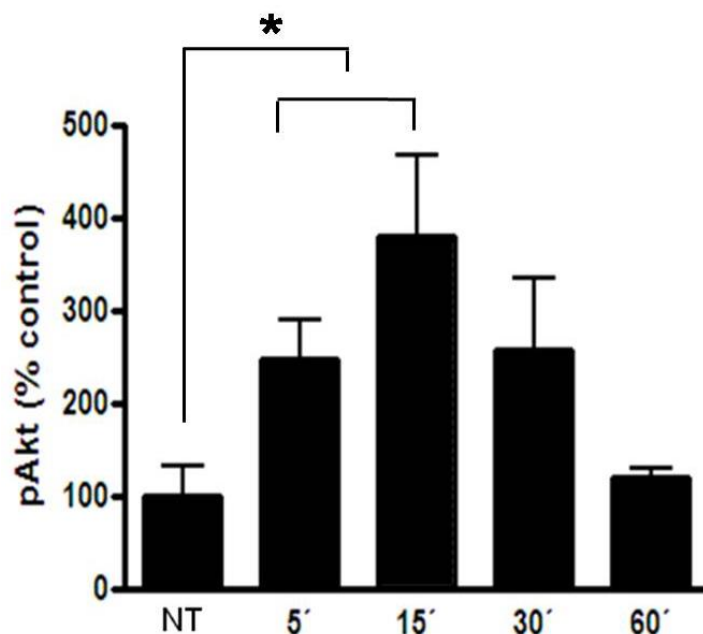
## RESULTADOS

### ***ATRA promueve la activación de Akt y ERK1/2 en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar A549***

Para determinar el efecto de ATRA en la vía de señalización PI3K-Akt, las células A549, reportadas como resistentes al efecto anti-proliferativo de ATRA, se trataron con ATRA a diferentes tiempos. Nuestros resultados sugieren que ATRA promueve la activación de Akt (Fig.10), esto evaluado por la detección de la fosforilación de la Ser473 mediante ensayos de *western blot*. La máxima concentración de fosforilación de Akt se observó a los 5 y 15 min de tratamiento, retornando a la concentración basal a los 60 min (Fig. 11).



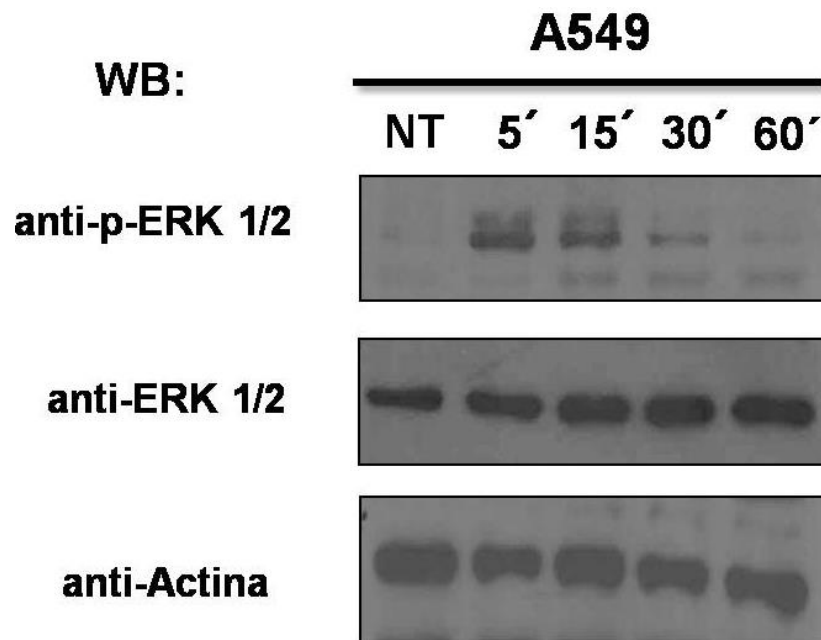
**Figura 10.** ATRA activa a la cinasa Akt. Células A549 fueron puestas en ayuno, seguido del tratamiento con 5  $\mu$ M de ATRA a diferentes tiempos, posteriormente se analizaron por *Western blot* utilizando anticuerpos específicos, como control se utilizaron células no tratadas (NT).



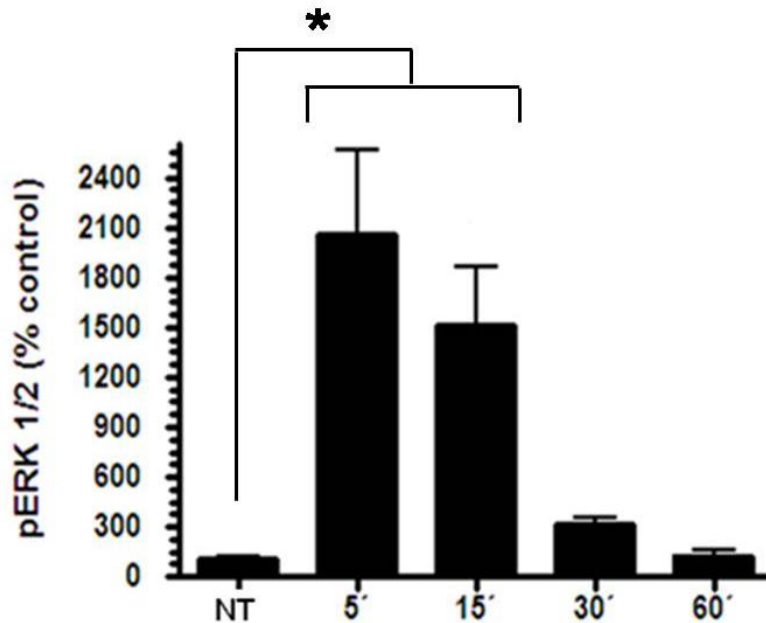
**Figura 11.** La gráfica representa el porcentaje obtenido de la normalización de pAkt utilizando como control a las células no tratadas (NT= 100%)de tres experimentos independientes, promedio  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$ , comparado con células no tratadas (NT) (ANOVA, *Newman-Keuls test*).

En la figura 11 se muestran los valores densitométricos de 3 experimentos independientes en la activación de Akt debido al tratamiento con ATRA. Nuestros resultados muestran diferencias estadísticamente significativas de la activación de la cinasa Akta los 15 min de tratamiento con ATRA. Estos resultados sugieren la activación de la vía PI3K puede ser a través de un efecto no genómico debido a los tiempos cortos de fosforilación de Akt.

Por otro lado se evaluó el papel de ATRA en la activación de ERK1/2, los resultados muestran que el tratamiento con ATRA promueve la fosforilación de ERK 1/2 con un efecto máximo de fosforilación entre los 5 y 15 min de tratamiento, retornando a niveles basales a los 30 min (Fig. 12). Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con ATRA promueve la activación de ERK 1/2.



**Figura 12.** ATRA activa a la cinasa ERK1/2. Células A549 fueron puestas en ayuno, seguido del tratamiento con 5  $\mu$ M de ATRA a diferentes tiempos, posteriormente se analizaron por *Western blot* utilizando anticuerpos específicos, como control se utilizaron células no tratadas (NT).

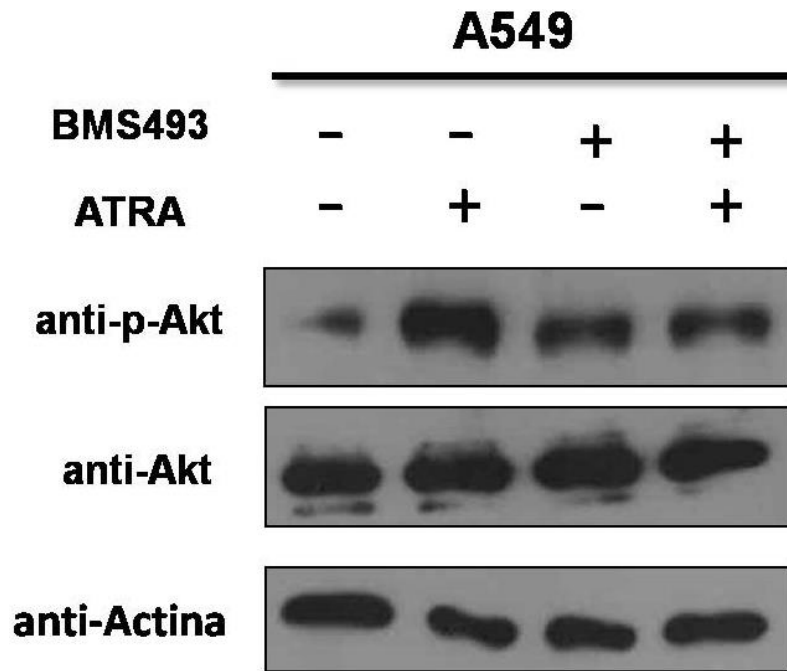


**Figura 13.** La gráfica representa el porcentaje obtenido de la normalización de pERK1/2 utilizando como control a las células no tratadas (NT= 100%) de tres experimentos independientes, promedio  $\pm$  SEM, \* $p < 0.001$ , comparado con células no tratadas (NT) (ANOVA, *Newman-Keuls test*).

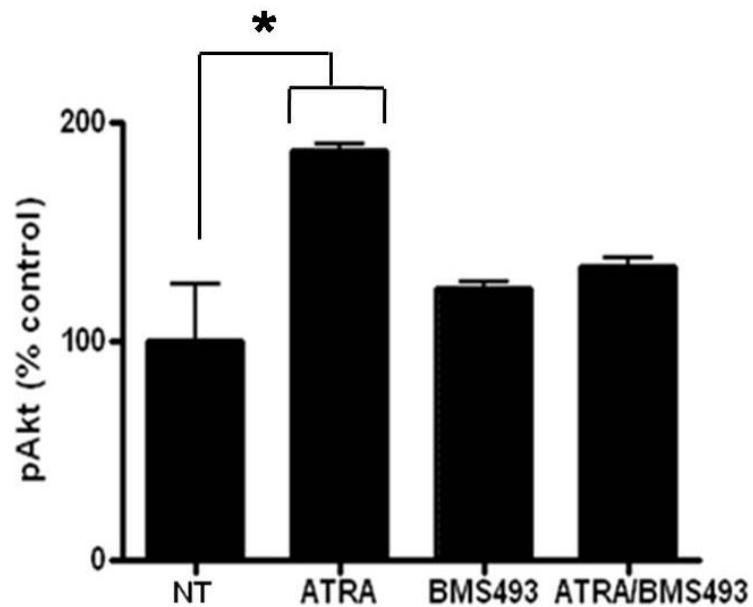
En la figura 13 se muestran graficados los valores densitométricos de 3 experimentos independientes en la activación de ERK1/2 debido al tratamiento con ATRA. Nuestros resultados muestran diferencias significativas en la activación de ERK1/2 a los 5 y 15 min de tratamiento con ATRA.

***El ATRA promueve la activación de Akt y ERK1/2 de forma independiente de sus efectos genómicos***

Para comprobar si la activación de la vía PI3K-Akt era debida a un efecto no genómico promovido por ATRA, las células A549 se pre-incubaron durante 1 h con un antagonista de los receptores RAR (BMS493), posteriormente las células se estimularon con ATRA durante 15 min, ya que nuestros resultados demuestran que a ese tiempo es posible observar el máximo de fosforilación de la cinasa Akt y de la cinasa ERK1/2, la inhibición de los receptores de ácido retinoico con BMS493 no bloquean la fosforilación de la cinasa Akt inducida por ATRA porque la fosforilación de Akt se aprecia inclusive después del pre-tratamiento con BMS493 (Fig. 14), comprobando que la fosforilación de Akt por el ATRA es debida a un efecto no genómico. En contraste, el tratamiento con BMS493 si previene la fosforilación de la cinasa ERK 1/2 (Fig.16).



**Figura 14.** BMS493 no previene la fosforilación de Akt. Células A549 fueron pre-tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de BMS493 y posteriormente estimuladas con 5  $\mu\text{M}$  de ATRA durante 15 min. Los niveles de fosforilación y de proteína total fueron evaluados por *western blot* utilizando anticuerpos específicos.

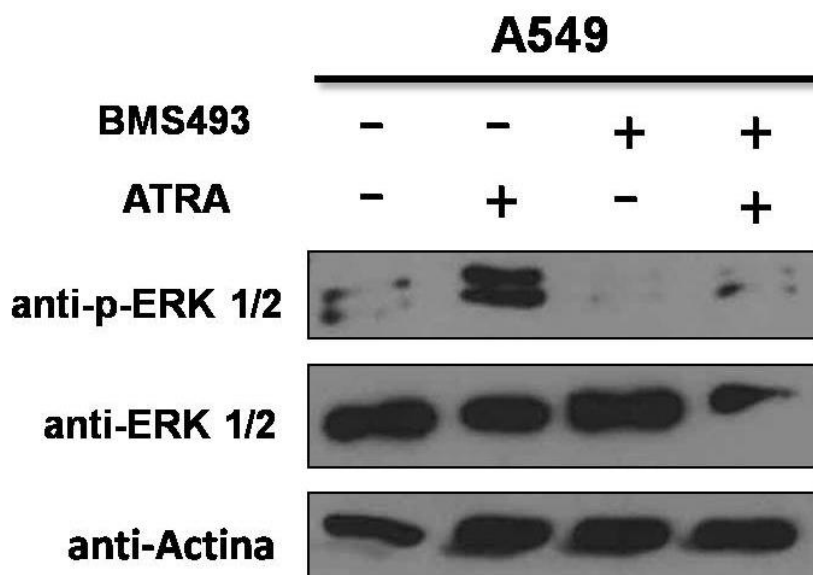


**Figura 15.** La gráfica representa el porcentaje obtenido de la normalización de pAkt utilizando como control a las células no tratadas (NT=100%) de tres experimentos independientes, promedio  $\pm$  SEM, \* $p < 0.01$  comparada con células no tratadas (NT) (ANOVA, *Newman-Keuls test*).

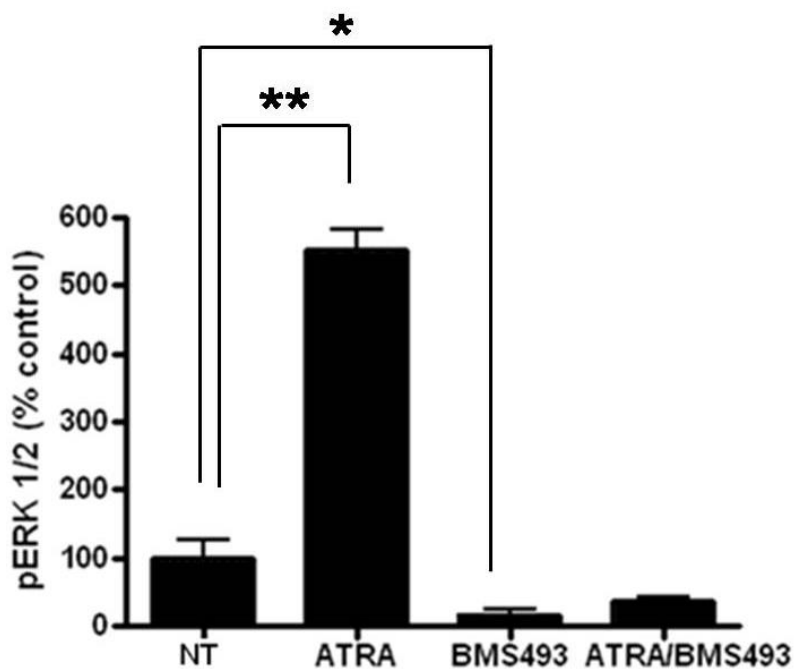
En la figura 15 se muestran los valores densitométricos de 3 experimentos independientes del efecto del inhibidor de los receptores de ácido retinoico (BMS493) en la fosforilación de Akt. Nuestros resultados muestran diferencia significativa en la activación de la cinasa Akt a los 15 min del tratamiento con ATRA (87% mayor respecto al control), mientras que, el tratamiento con el inhibidor no muestra diferencia significativa en la fosforilación de Akt comparado con las células no tratadas debido a que el error estándar de la media (SEM) fue muy alto, sin embargo la tendencia al tratamiento con el BMS493 no muestra reducción de la fosforilación de Akt comparado con el control, si hubo un aumento del 34% en la fosforilación de Akt aunque no fue significativo (Anexo A), consistente con lo anterior se reporta que la inhibición de los receptores RAR utilizando antagonistas específicos, que no bloquean la fosforilación de Akt en células de neuroblastoma tratadas con ATRA, e inclusive el tratamiento solo con el antagonista de RAR promueve la fosforilación de Akt (Masia *et al.*, 2007).

Estos resultados demuestran que la activación de la vía PI3K es a través de un efecto no genómico con la posible participación de los RAR en la activación de PI3K-Akt.





**Figura 16.** BMS493 previene la fosforilación de ERK1/2. Células A549 fueron pre-tratadas con 10  $\mu$ M de BMS493 y posteriormente estimuladas con 5  $\mu$ M de ATRA durante 15 min. Los niveles de fosforilación y de proteína total fueron evaluados por *western blot* utilizando anticuerpos específicos.

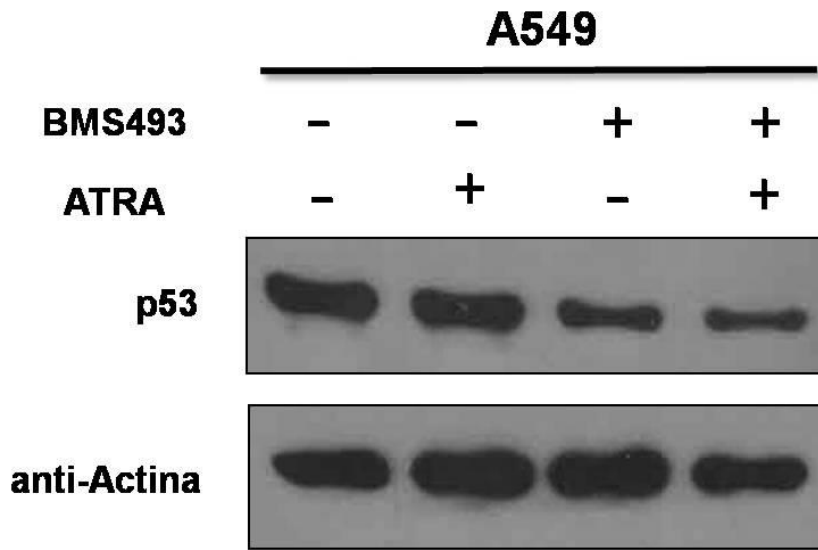


**Figura 17.** La gráfica representa el porcentaje obtenido de la normalización de pERK1/2 utilizando como control a las células no tratadas (NT=100%) de tres experimentos independientes, promedio  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , comparada con células no tratadas (NT) (ANOVA, *Newman-Keuls test*).

En la figura 17 se muestran graficados los valores densitométricos de 3 experimentos independientes con el inhibidor de los receptores de ácido retinoico (BMS493) en la fosforilación de ERK1/2, se observa que el pre-tratamiento con BMS493 previene la fosforilación de ERK1/2 inducida por ATRA a los 15 min comparado con células no tratadas (disminuye un 83%) (Anexo A). Sin embargo a pesar de observar que el BMS493 evita la fosforilación de ERK1/2, estos resultados nos sugieren que la activación de la vía ERK1/2 es a través de un efecto no genómico porque es posible observar fosforilación de ERK1/2 a los 15 min de tratamiento con ATRA (aumenta 4 veces más la fosforilación respecto al control).

### ***BMS493 bloquea la expresión de los genes blanco de ATRA***

Para comprobar los resultados anteriores se evaluó la eficacia del inhibidor de RAR (BMS493). Las células A549 se pre-incubaron 1 h con el BMS493, posterior a esa incubación se estimuló con ATRA durante 48 h, debido a que se sabe que a ese tiempo el ATRA ejerce sus efectos genómicos promoviendo la transcripción de sus genes blanco (Curtin *et al.*, 2001); nuestros resultados demuestran que el BMS493 inhibe la expresión de p53 (Fig. 18), un gen blanco del ATRA, comprobando que el tratamiento con BMS493 bloquea la función de los RAR como factores de transcripción. Estos resultados sugieren que la inhibición de los RAR con BMS493 funciona bloqueando la transcripción de los genes blanco del ATRA y que la fosforilación de Akt y ERK1/2 que observamos a los 15 min del estímulo con ATRA es debida a un efecto no genómico que no involucra transcripción de genes.



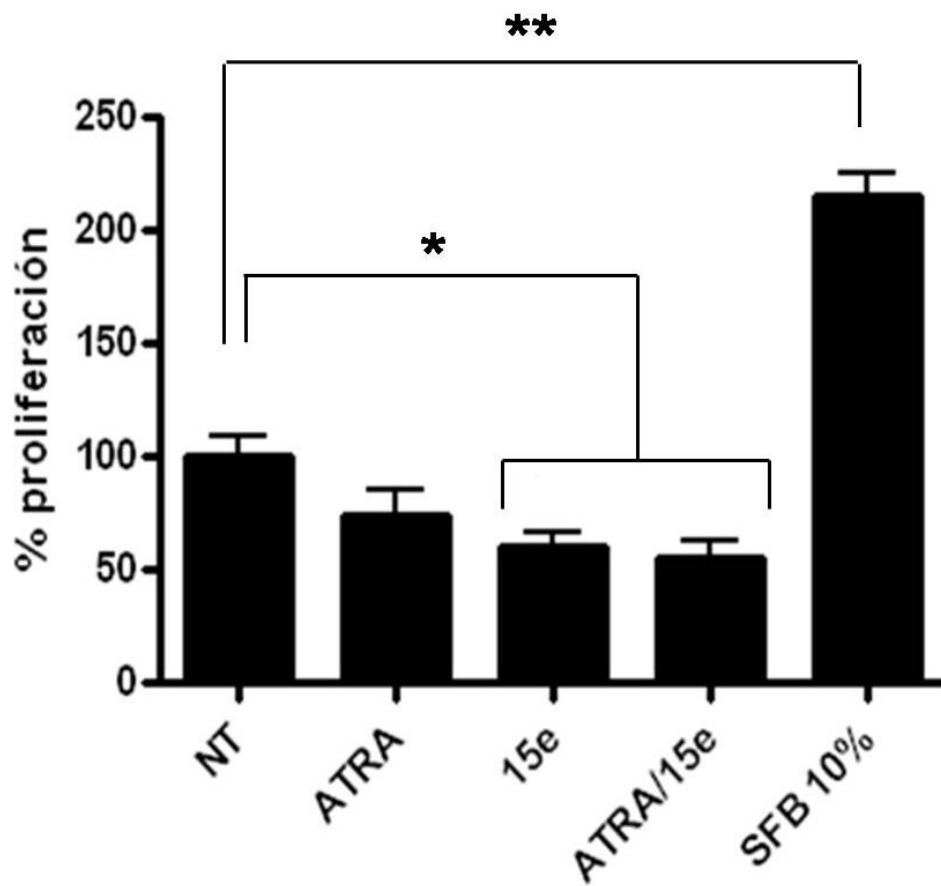
**Figura 18.** El BMS493 bloquea la transcripción de los genes blanco de ATRA. Células A549 fueron puestas en ayuno, seguido del pre-tratamiento con 10 $\mu$ M de BMS493, posteriormente se estimularon con ATRA por 48h; la expresión de p53 fue analizada por *western blot* (imagen representativa de 3 experimentos independientes).

Nuestros resultados demuestran que ATRA activa las vías de señalización PI3K-Akt y ERK1/2, las cuales han sido relacionadas con sobrevivencia y proliferación. Además, que la activación de Akt y ERK1/2 es mediante mecanismos independientes de la transcripción.

***La vía PI3K-Akt está involucrada en la resistencia al tratamiento con ATRA en inhibir la proliferación***

Para comprobar el efecto funcional al inhibir esta vía de señalización en el proceso de proliferación celular, se utilizó un inhibidor específico de PI3K (15e). Las células A549 fueron pre-incubadas durante 90 min con el inhibidor de PI3K a una

concentración de 10 $\mu$ M, posterior a esa incubación se estimuló con ATRA durante 48 h. Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con ATRA no ejerce efecto inhibitorio de proliferación significativo, comparado con células no tratadas, estos resultados son consistentes con lo ya reportado para esta línea celular que es resistente al ATRA(Choi *et al.*, 2007)(Fig. 19). Por otro lado, la combinación del inhibidor de PI3K (15e) con ATRA disminuye de manera significativa la proliferación celular (disminuye un 45% respecto al control), no hubo cambio significativo disminuyendo la proliferación con el 15e comparado con ATRA/15e (Anexo A). Estos resultados nos indican que la vía PI3K-Akt media la resistencia al tratamiento con ATRA en inhibir la proliferación.

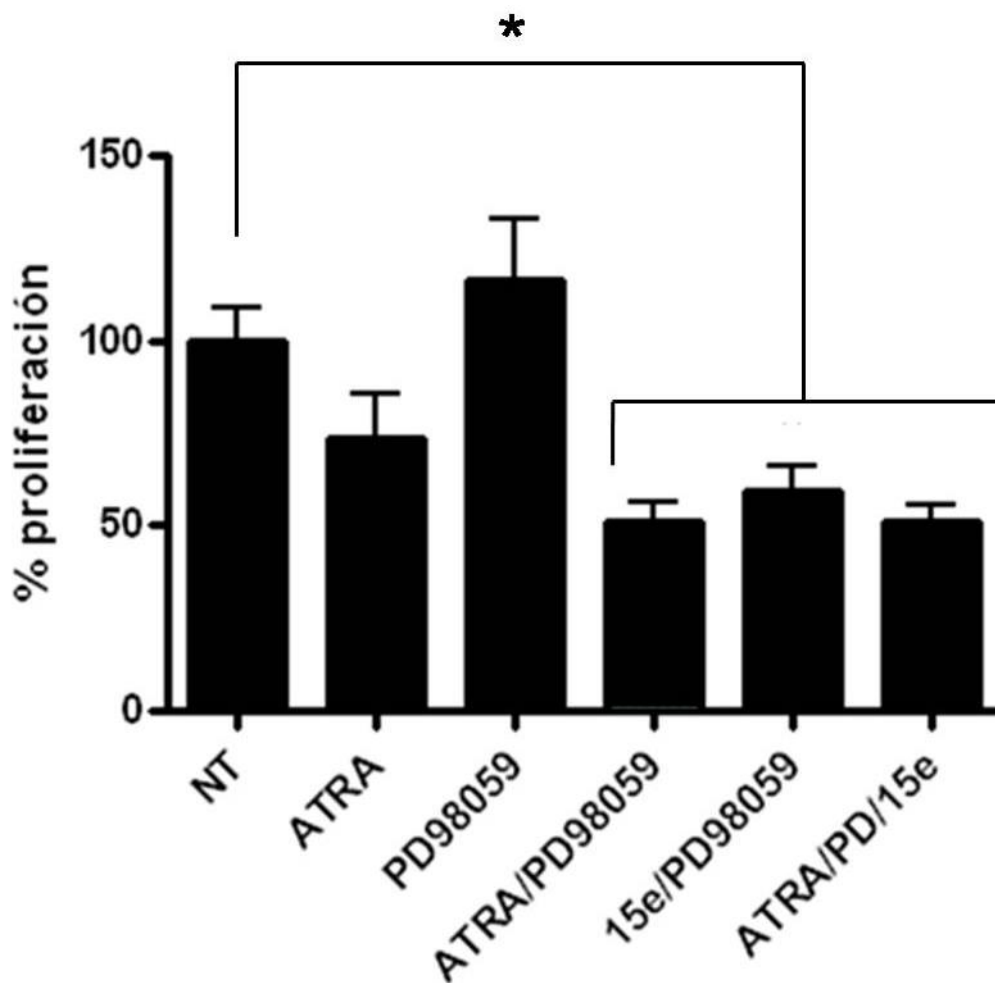


**Figura 19.** El inhibidor de PI3K en combinación con el ATRA disminuye la proliferación celular (45%) en la línea celular A549. La gráfica representa el promedio de los valores de absorbancia tomados a 370nm, normalizados con células no tratadas (NT), en la proliferación de tres experimentos independientes, promedio  $\pm$  SEM,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.001$ , comparada con células no tratadas (NT) (ANOVA, *Newman-Keuls test*).

Estos resultados indican que el uso de inhibidores de PI3K podrían restaurar los efectos genómicos del ATRA disminuyendo proliferación.

### ***La vía ERK está involucrada en la resistencia al tratamiento con ATRA en inhibir la proliferación***

El efecto funcional de inhibir una vía de señalización relacionada directamente con proliferación celular (MAPK) se comprobó utilizando un inhibidor específico de la cinasa MEK (PD98059). Las células A549 fueron pre-incubadas durante 90 min con el PD98059 a una concentración de 25 $\mu$ M, posterior a esa incubación se estimuló con ATRA durante 48 h. Los resultados demuestran que el tratamiento con ATRA no provoca cambios significativos en la proliferación comparado con células no tratadas (Fig. 20), pero si disminuye la proliferación en un 50% cuando se incubaron con ATRA en combinación con el PD98059, comparado con células no tratadas (Anexo A), mientras que, el tratamiento con el PD98059 no ejerce efecto inhibitorio significativo. Se observa la misma tendencia de disminuir la proliferación usando otras combinaciones de inhibidores (15e y PD98059).

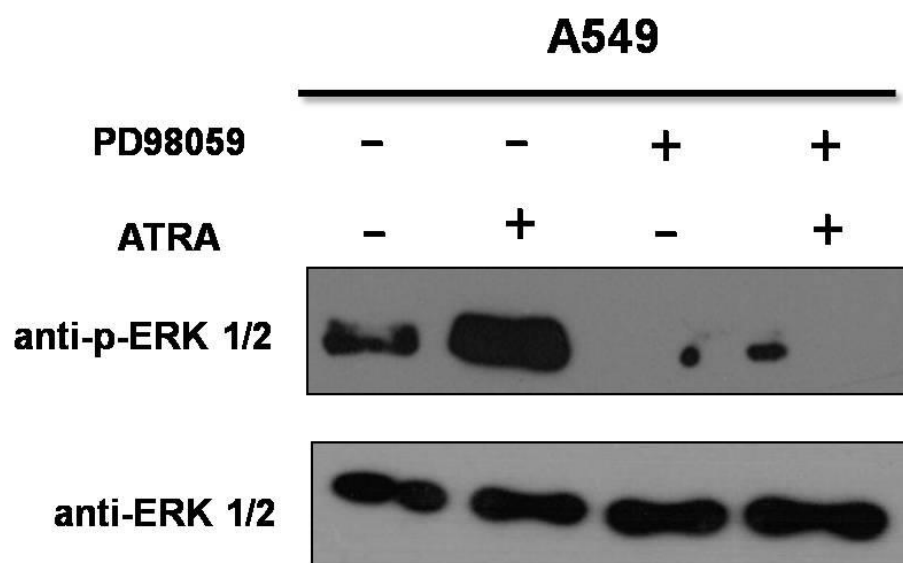


**Figura 20.** El inhibidor de MAPK en combinación con el ATRA disminuye la proliferación (50%) en la línea celular A549. La gráfica representa el promedio de los valores de absorbancia tomados a 370nm, normalizados con células no tratadas (NT), en la proliferación de tres experimentos independientes, promedio  $\pm$  SEM,  $*p < 0.05$ , comparada con células no tratadas (NT) (ANOVA, *Newman-Keuls test*).

Si hay diferencia significativa entre los inhibidores 15e y PD98059, sin embargo no hay diferencia significativa cuando son combinados con ATRA, los dos disminuyen la proliferación en un 50% (Anexo A).

### ***ATRA promueve la fosforilación de ERK a través de MEK***

Para evaluar la eficacia del inhibidor de MEK (PD98059) las células A549 se pre-incubaron durante 90 min con 25 $\mu$ M del PD98059, posteriormente se estimuló con ATRA durante 15 min, conociendo que a ese tiempo el ATRA provoca la fosforilación de ERK1/2, provocando la activación de esa vía (Fig. 21).



**Figura 21.** El PD98059 previene la fosforilación de la cinasa ERK1/2. Células A549 fueron puestas en ayuno, seguido del pre-tratamiento con 25 $\mu$ M de PD98059 durante 90 min, posteriormente se estimularon con ATRA por 15 min. La fosforilación de ERK1/2 fue analizada por *western blot* (Imagen representativa de 3 experimentos independientes).

El PD98059 evita la fosforilación de ERK1/2 (Fig. 21), comprobando que, ATRA promueve fosforilación de ERK1/2 a través de MEK y que, el pre-tratamiento de 90 min con PD98059 es suficiente para bloquear la función de MEK para evitar la activación de la vía.

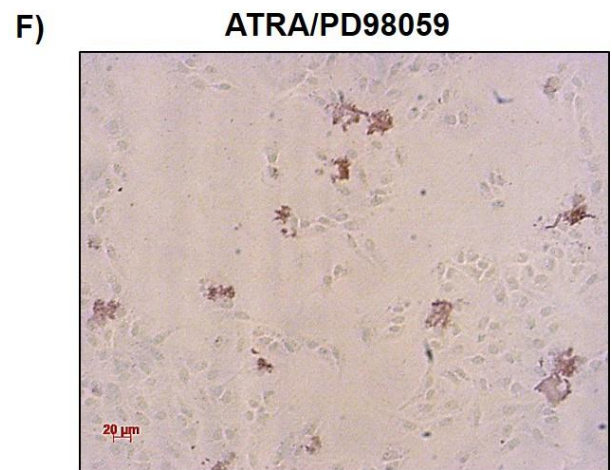
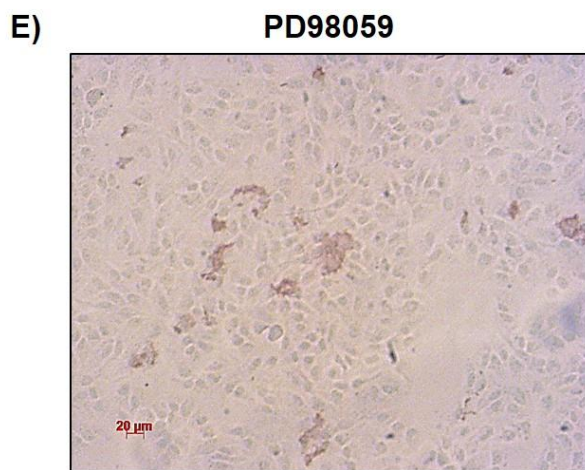
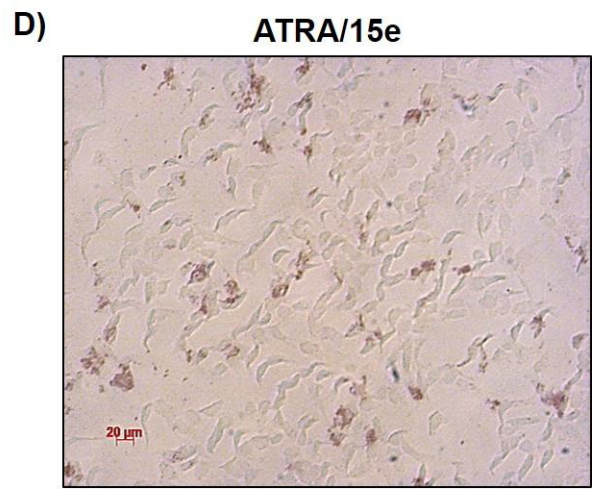
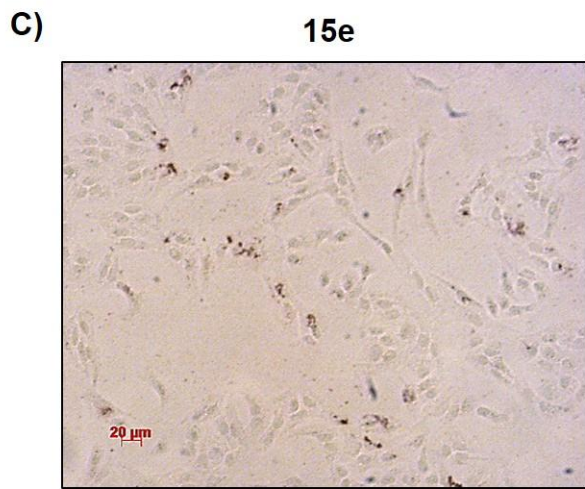
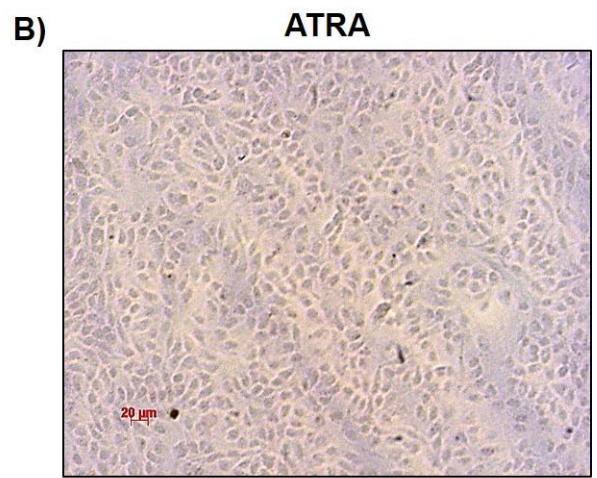
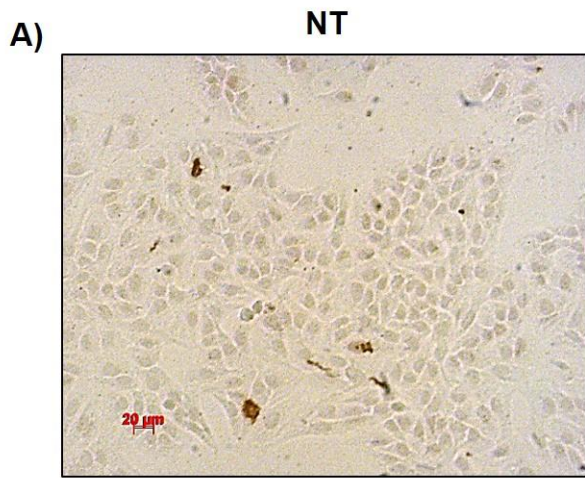
### ***Las vías PI3K y ERK están involucradas en la supervivencia celular mediada por ATRA***

Con base en los resultados anteriores, se realizó un experimento para evaluar apoptosis por el método de TUNEL, para ver la capacidad de las células de inducir la apoptosis cuando son pre-tratadas con los inhibidores de las vías PI3K-Akt y ERK1/2.

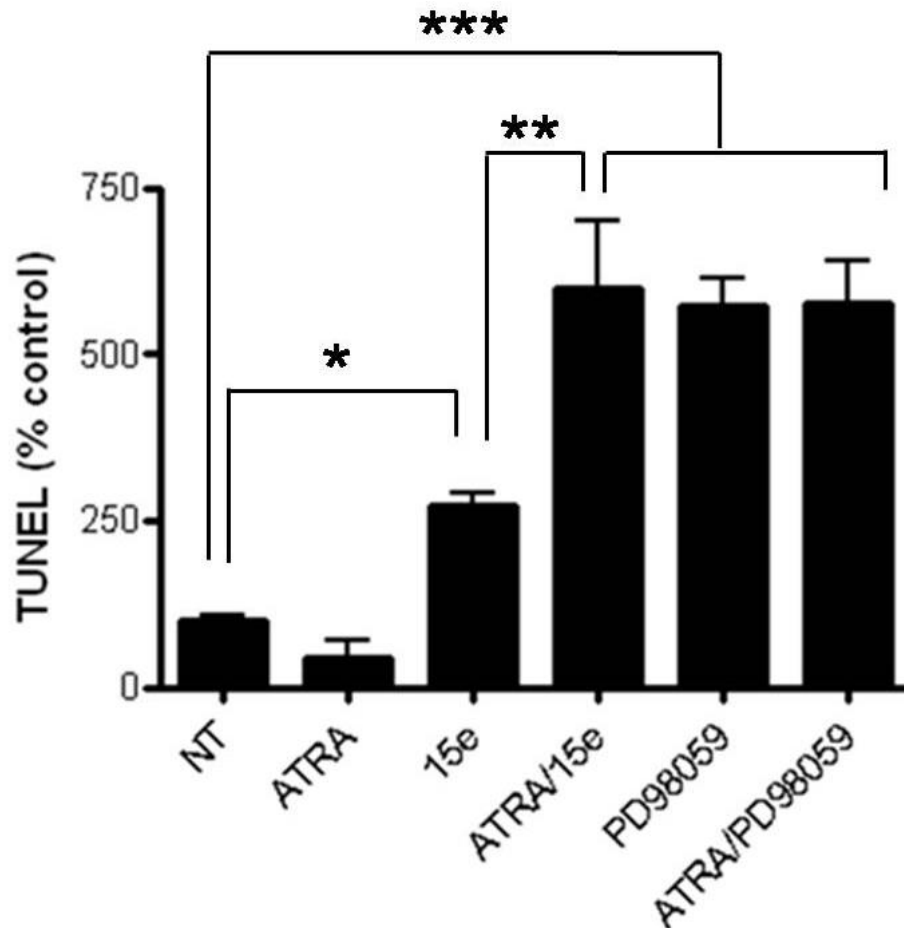
En la figura 22 se puede observar el efecto anti-apoptótico de ATRA a las 48 h, que se logra revertir cuando las células son pre-tratadas con el inhibidor 15e en combinación con el ATRA, observando aumento de células apoptóticas (células con núcleos teñidos de color café) debido a la fragmentación del DNA. Estos resultados nos indican que la activación de la vía PI3K-Akt mediada por el tratamiento con ATRA está involucrada en mecanismos de resistencia a la apoptosis, promoviendo supervivencia celular.

Para determinar si la activación de la vía ERK1/2 mediada por el ATRA está involucrada en supervivencia. Células A549 fueron pre-tratadas con el inhibidor de MEK y posteriormente con ATRA por 48 h. En la figura 22 se observan las imágenes del ensayo de TUNEL, en donde se muestra que la combinación del inhibidor de MEK y ATRA incrementa el número de células apoptóticas (células con los núcleos teñidos de color café).





**Figura 22.** El tratamiento con ATRA promueve sobrevivencia en células A549. Se pre-trataron células con los inhibidores 15eó PD98059, posteriormente se trataron con ATRA por 48 h. Se detectaron las células apoptóticas teñidas de color café, se observaron 5 campos de cada tratamiento, la figura muestra las imágenes representativas.



**Figura 23.** Porcentaje de células apoptóticas. Se contaron 50 células de 5 campos diferentes. Promedio  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , comparada con células no tratadas (NT) (ANOVA, Newman-Keuls test).

Se cuantificó el número de células apoptóticas de 5 campos diferentes de cada condición, contando 50 células aleatoriamente por campo, posteriormente se

normalizó el número de células apoptóticas con células no tratadas. El análisis estadístico muestra que el ATRA no promueve apoptosis, al contrario la tendencia del tratamiento con ATRA es promover supervivencia (Fig. 23). El pre-tratamiento con el inhibidor 15e en combinación con el ATRA durante 48 h ejercen un efecto significativo promoviendo apoptosis en células A549 (aumentando 6 veces más el número de células apoptóticas respecto al control) (Anexo A), además se observa diferencia significativa entre ATRA/15e comparado con el 15e solo (Fig. 23). Mientras que, el pre-tratamiento con el inhibidor PD98059 solo o en combinación con el ATRA tienen el mismo efecto promoviendo apoptosis (Fig. 23).

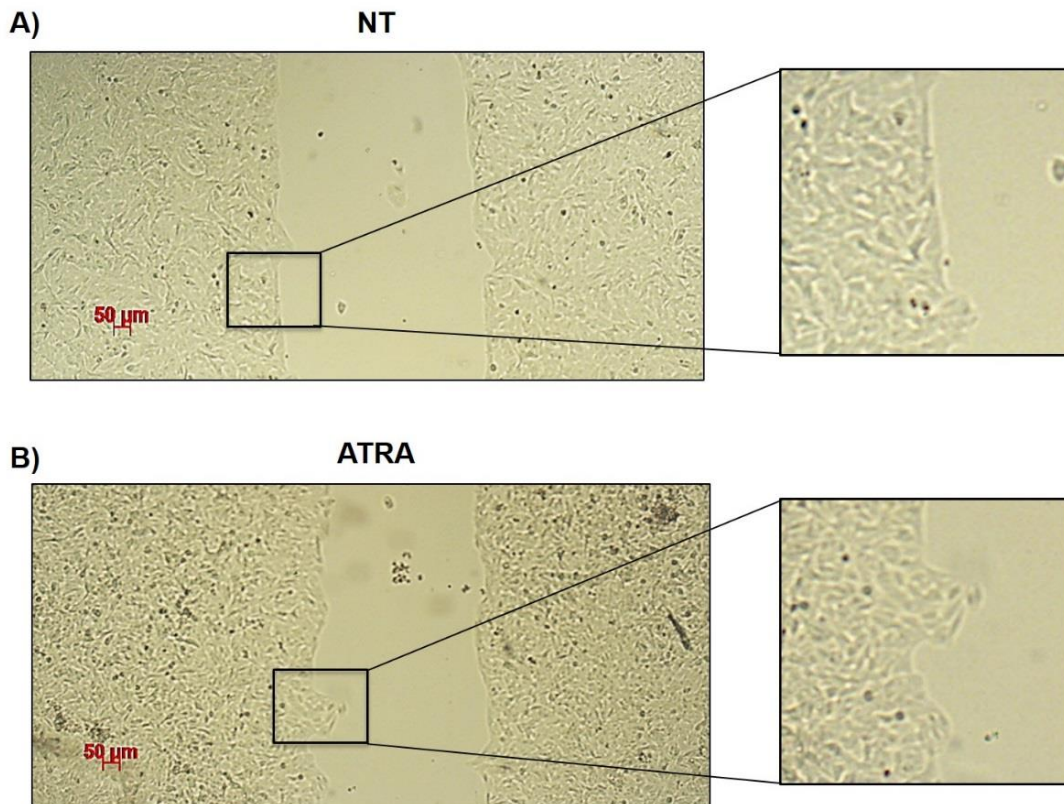
Estos resultados nos demuestran la participación de las vías PI3K-Akt y ERK1/2 en la supervivencia celular mediada por ATRA. Además proponen el uso combinado de ATRA con inhibidores de PI3K y MAPK para potenciar el efecto de la apoptosis, lo que se traduce en un posible blanco terapéutico para ser usado en células de cáncer de pulmón.

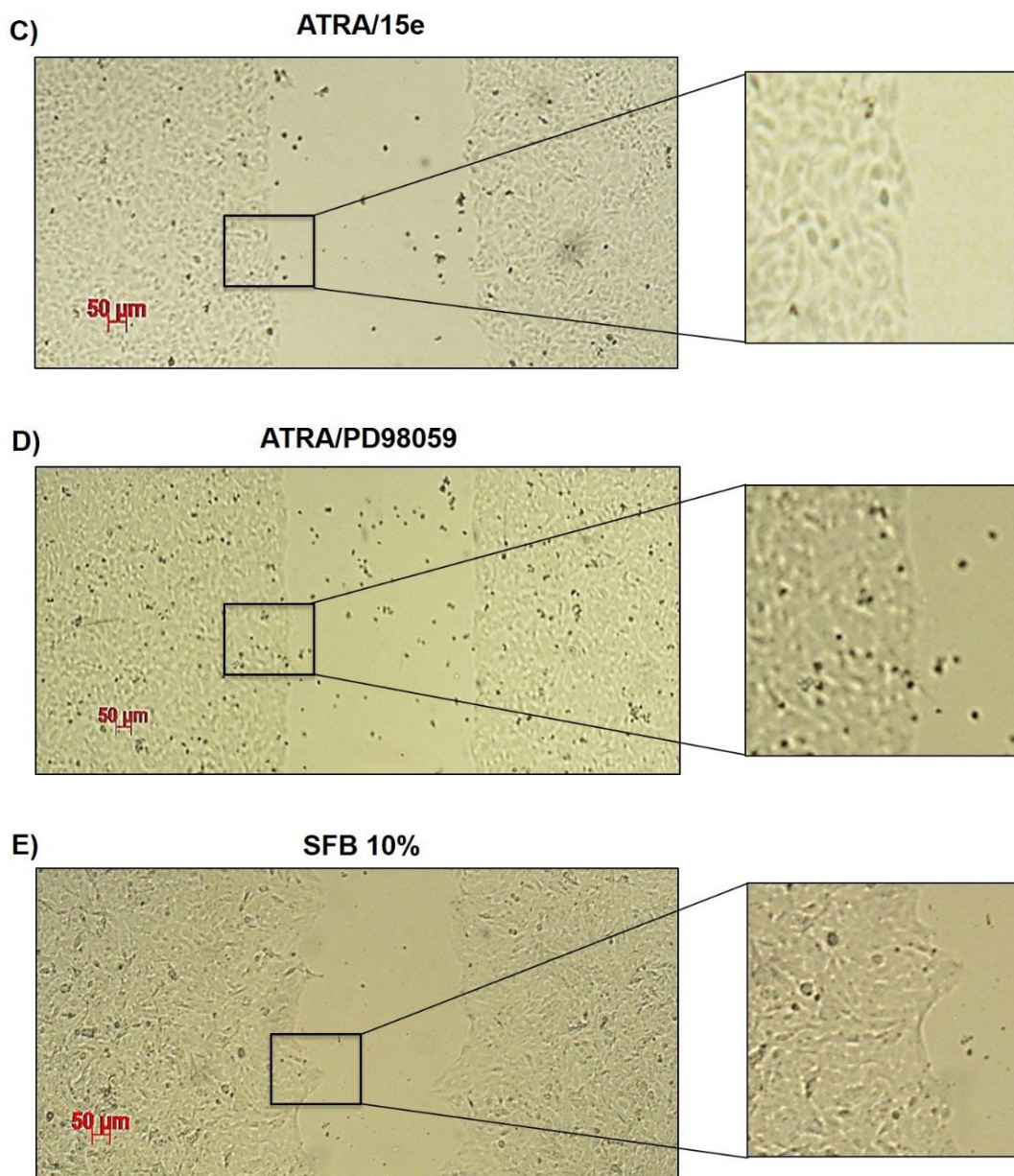
### ***El tratamiento con ATRA promueve migración celular a través de las vías de señalización PI3K-Akt y ERK en células A549***

Nuestros resultados muestran que ATRA induce la activación de las vías de señalización PI3K-Akt y ERK1/2. Para analizar el efecto de la activación de estas vías en procesos de migración celular se realizaron ensayos de cierre de "herida" en presencia de los inhibidores 15e y PD98059. Como se muestra en la figura 24, en las

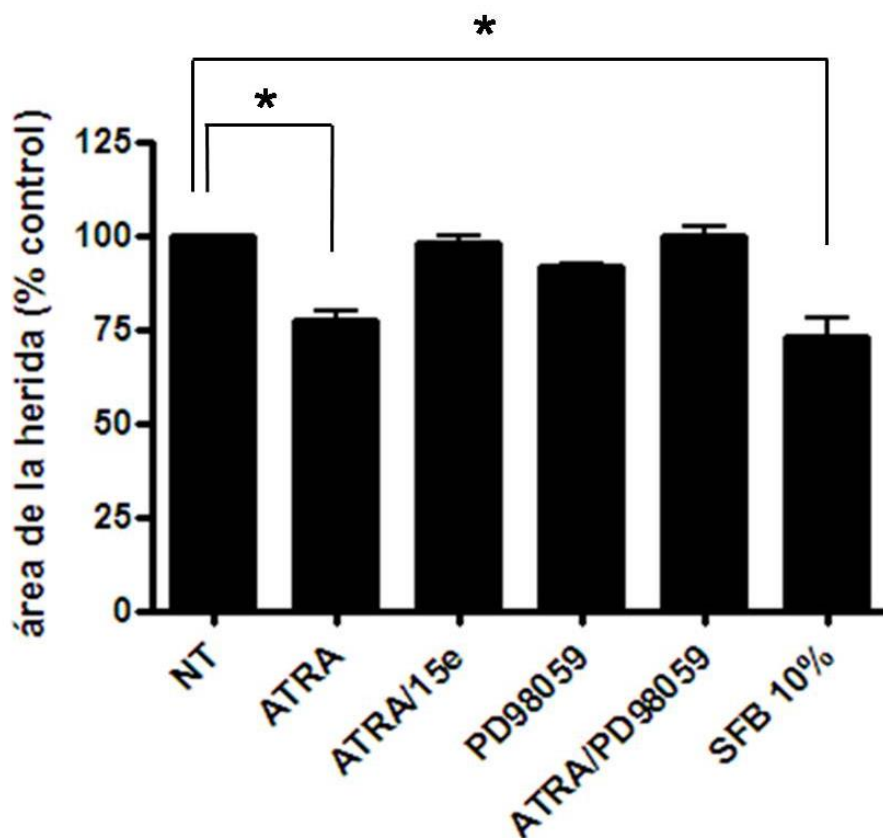
células tratadas con ATRA durante 48 h, se observa reducción significativa de la “herida” en un 22% comparada células no tratadas; estos resultados demuestran que el tratamiento con ATRA promueve migración en células A549; cuando las células fueron pre-tratadas con el inhibidor de PI3K (15e) durante 90 min, se observa que no hay reducción del área de la “herida”, es decir se bloquea el efecto del ATRA en promover migración, datos estadísticamente significativos ( $p < 0.001$ ) (Fig. 24).

Un efecto similar se observa cuando las células son pre-tratadas con el inhibidor de MAPK (PD98059) y posteriormente tratadas con ATRA durante 48 h, el PD98059 bloquea el cierre de la “herida” inducido por el ATRA (Fig. 24).





**Figura 24.** Ensayo de migración celular por cierre de herida en monocapas a confluencia. Imágenes tomadas con microscopio deepifluorescenciacorrespondiente a células cultivadas durante 48h con ATRA, en ausencia o presencia de los inhibidores 15eó PD98059. Se muestran imágenes tomadas con un objetivo 5X. Como control positivo de migración se usó suero fetal bovino al 10% y como control negativo células no tratadas (NT). Los recuadros de la derecha representan la magnificación de la “herida” de cada tratamiento.



**Figura 25.** Análisis del efecto del 15e y el PD98059 en el proceso de migración celular. Células A549 fueron sembradas en cajas P60, cuando alcanzaron el 100% de confluencia se ayunaron, se realizó una “herida” con la punta de una pipeta pasteur estéril, posteriormente se incubaron durante 48 h con ATRA en presencia o ausencia de los inhibidores, 15e (10  $\mu$ M) y PD98059 (25  $\mu$ M). Se muestra una gráfica que representa el área de la “herida” tomando como control las células no tratadas, entre menor sea el área de la “herida”, mayor el porcentaje de células que migraron. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  SEM,  $*p < 0.001$ , comparado con células no tratadas (NT) (ANOVA, *Newman-Keuls test*).

En la figura 25 se puede ver graficado el porcentaje del área de la “herida” de cada condición, cuando las células fueron pre-tratadas con los inhibidores 15e o PD98059 en presencia del ATRA. En la figura se observa que no hay cambio significativo en el

área de la “herida” comparada con células no tratadas. En contraste el tratamiento únicamente con ATRA reduce significativamente el área de la “herida” ( $p < 0.001$ ).

Con estos resultados se propone que las combinaciones ATRA/15e y ATRA/PD98059 pueden ser usadas como tratamientos para evitar la migración celular promovida por ATRA en células de cáncer de pulmón.

## DISCUSIÓN

Con este trabajo se demostró que el efecto de resistencia a inhibición de la proliferación y apoptosis que presenta la línea celular A549 de adenocarcinoma pulmonar por el tratamiento con ATRA es debido a la activación de las vías de señalización PI3K-Akt y ERK1/2. Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con ATRA provoca fosforilación de las cinasas Akt y ERK1/2 a los 5 minutos de tratamiento en estas células, sugiriendo que esta activación es debida a un mecanismo no genómico del ATRA. Para comprobar el efecto no genómico del ATRA en la activación de Akt se utilizó el BMS493, un antagonista de los RAR que previene la expresión de los genes blanco de los retinoides; nuestros resultados demuestran que el BMS493 no previene la activación de Akt por lo tanto confirman que la activación de la vía PI3K-Akt es debida a un efecto no genómico. El BMS493 causó fosforilación de Akt, probablemente debido a que está reportado que el BMS493 tiene un efecto dual de antagonista/agonista (Alvarez *et al.*, 2009), este mismo efecto utilizando otro pan-RAR antagonista (AGN 193109) ya había sido reportado en células de neuroblastoma, combinado con el ATRA no se bloquea la activación de Akt, pero cuando se administra solo, actúa como agonista provocando fosforilación de Akt, mostrando un perfil de antagonista bloqueando la actividad transcripcional de los RAR pero por otro lado actuando como agonista con respecto a la activación de PI3K (Masia *et al.*, 2007).



La activación de ERK1/2 a los 5 min después del estímulo con ATRA ya nos habla de un efecto no genómico, pero para corroborarlo se utilizó el BMS493, y, encontramos que la fosforilación de ERK1/2 si es prevenida por el tratamiento con el antagonista de los RAR (Fig. 17). Este resultado contrasta con lo reportado por Aggarwal y colaboradores, que usando otro antagonista de RAR (Ro 61-8431) en células traqueo-bronquiales no vieron afectada la fosforilación de ERK1/2 después del tratamiento con ATRA (Aggarwal *et al.*, 2006). El mecanismo de acción de ambos antagonistas es diferente, el Ro 61-8431 es un análogo del ácido retinoico y un antagonista específico de los RAR (Yoshimura *et al.*, 1995), mientras que el BMS493 entra en una subclase de antagonista que se conoce como agonista inverso debido a que tiene el potencial de promover la interacción con los co-represores de los RAR, disminuyendo de este modo su actividad transcripcional. Se ha reportado que la unión del BMS493 a los RAR provoca que cambie su conformación evitando el posicionamiento de la hélice H12 a una orientación activa que evita la unión de los co-activadores (le Maire *et al.*, 2010), lo anterior sugiere que el cambio conformacional inducido por el BMS493 no afecta la activación de la vía PI3K-Akt pero si la de la vía ERK, esta es una posible explicación de porque el BMS493 repercute en la activación/inhibición de estas cinasas a tiempos tan cortos como son 5 minutos.

Los resultados nos confirman que la activación de las vías PI3K-Akt y ERK1/2 por ATRA es debido a un efecto no genómico que involucra a los RAR, sin embargo

hace falta esclarecer más la participación de los RAR en la activación de estas vías de señalización.

En este trabajo se comprobó la efectividad del BMS493 para inhibir la expresión de genes blanco del ATRA como es p53 un gen supresor de tumores que se activa bajo condiciones de estrés (Curtin *et al.*, 2001); donde el tratamiento con BMS493 disminuye la expresión de p53, sin embargo no fue posible apreciar una mayor expresión de p53 después del tratamiento con ATRA comparado con las células no tratadas (Fig. 18), estos resultados sugieren que la activación de PI3K-Akt por ATRA regulan negativamente la expresión de p53 promoviendo mecanismos de sobrevivencia. Consistente con lo anterior se reporta que la expresión de p53 es regulado negativamente por Akt a través de la oncoproteína Mdm2 un blanco río abajo de Akt. La proteína Mdm2 es una ubiquitina-ligasa que es activada por Akt. Mdm2 regula los niveles de p53 por diferentes mecanismos, puede actuar como una ubiquitina-ligasa marcando a p53 para ser degradado vía proteosoma, además Mdm2 se une al dominio de activación transcripcional de p53, bloqueando el reclutamiento de los factores necesarios para la inducción de la expresión de sus genes blanco (Mayo and Donner, 2001). En células MCF-7 la activación de Akt promueve la fosforilación de Mdm2 en su serina 166 y 186 obligando su entrada al núcleo, donde ubiquitina a p53 para su degradación vía proteosoma, inhibiendo de esta manera la transcripción de los genes blanco de p53, como p21 (Mayo and Donner, 2001), lo anterior nos da una explicación de por qué el tratamiento con ATRA no incrementa la expresión de p53 de manera significativa.

Para determinar si el efecto de ATRA en la resistencia a inhibición de la proliferación en esta línea celular se debe a la activación de las vías PI3K-Akt y ERK1/2, se llevó a cabo un ensayo de proliferación celular en células tratadas con ATRA durante 48h pre-tratadas con los inhibidores de PI3K y MAPK (15e y PD98059 respectivamente). Nuestros resultados indican que el tratamiento con ATRA no ejerce efecto inhibitorio de proliferación comparado con las células no tratadas (Fig. 19 y 20), consistente con lo ya reportado para esta línea celular en la resistencia a la inhibición de la proliferación por ATRA (Geradts *et al.*, 1993; Petty *et al.*, 2005); el tratamiento con el inhibidor de PI3K disminuye la proliferación celular de manera significativa comparada con células no tratadas (Fig. 19), la combinación ATRA/15e también es efectiva disminuyendo significativamente la proliferación celular en un 50%. Aunque no hubo cambio significativo comparado con el 15e, la tendencia es a potenciar el efecto inhibitorio de proliferación, tales resultados demuestran que la vía PI3K-Akt media la resistencia al tratamiento con ATRA en inhibir proliferación.

Por el contrario, los efectos del inhibidor de MAPK en la proliferación celular (Fig. 20) fueron diferentes a los obtenidos con 15e, el PD98059 no ejerció ningún efecto inhibitorio de proliferación, pero la combinación ATRA/PD98059 demostró una reducción significativa de la proliferación (50%) comparada con las células no tratadas, lo que indica que la inhibición de la vía MAPK es un punto clave para que el ATRA pueda llevar a cabo su efecto inhibitorio de proliferación.

Dado que las vías de señalización PI3K-Akt y ERK1/2 son de las más importantes en regular sobrevivencia y proliferación, respectivamente, y es común

encontrarlas activas de manera constitutiva en cáncer (Haagensen *et al.*, 2012), se demostró la inhibición simultánea de estas vías de señalización. Nuestros resultados muestran que la combinación de inhibidores (15e y PD98059) disminuyen la proliferación comparado con células no tratadas, sin embargo no se presenta efecto aditivo en el tratamiento del ATRA combinado con los dos inhibidores.

La cascada de señalización PI3K-Akt es una importante vía involucrada en sobrevivencia, que también puede regular procesos de diferenciación en distintos tipos de células (Manning and Cantley, 2007). La vía de señalización ERK1/2 es otra importante cascada que puede ser activada por mitógenos y citocinas para estimular la proliferación celular, ERK1/2 ha sido asociado a sobrevivencia celular y proliferación principalmente, sin embargo dependiendo el tipo de células, estímulo y la duración de la activación puede producir otras respuestas biológicas como migración, diferenciación y apoptosis (Kyosseva, 2004). Dado que el proceso de proliferación celular no es el único en que se ven involucradas estas vías de señalización, la administración de ATRA en combinación con los inhibidores de ambas vías puede provocar que se promueva otro proceso celular como el de diferenciación y que esta sea la causa de que en nuestros resultados no observemos un efecto inhibitorio de proliferación mayor del 50% al inhibir ambas vías en células de cáncer de pulmón.

Sin embargo, nuestros resultados demuestran que el tratamiento con ATRA, en combinación con los inhibidores de PI3K o MAPK, pueden disminuir la proliferación en un 50%. La utilización de estos inhibidores en combinación con ATRA en ensayos

de proliferación celular no había sido reportada para células de cáncer de pulmón, por lo tanto este trabajo propone que la inhibición de la vía PI3K o MAPK en combinación con el ATRA puede ser usado como posible tratamiento para disminuir la proliferación en un 50% en células de cáncer de pulmón.

Para determinar el efecto del ATRA, solo o en combinación con los inhibidores de PI3K y MAPK sobre la regulación de la apoptosis se trataron las células durante 48h con estos compuestos. Nuestros resultados indican que el tratamiento con ATRA exhibe una tendencia a promover sobrevivencia en células A549, debido al poco número de células apoptóticas que se detectaron a las 48h, datos que no fueron significativos comparados con células no tratadas, sin embargo al mismo tiempo estos resultados nos sugieren un fenómeno de resistencia a apoptosis por el tratamiento con ATRA. En consistencia con lo anterior se reporta que ATRA promueve sobrevivencia en células de cáncer de pulmón (Garcia-Regalado *et al.*, 2013). Por otra parte, la adición de los inhibidores (15e y PD98059) contrarresta el mecanismo de sobrevivencia provocado por el ATRA, aumentando el número de células apoptóticas, la combinación de ATRA/15e ejerce un efecto aditivo significativo induciendo apoptosis, aumentando 2.5 veces más el número de células apoptóticas comparado con el tratamiento solo con el inhibidor de PI3K, demostrando que el ATRA es efectivo para promover apoptosis siempre que se encuentren inhibidas las vías PI3K y MAPK en células de cáncer de pulmón. Lo que observamos en nuestros resultados es que el tratamiento con el PD98059 incrementa 2 veces más el número de células apoptóticas comparado con el 15e, lo que nos sugiere que es más efectivo

induciendo apoptosis, quizás debido a que el arresto del ciclo celular promovido por el tratamiento con el PD98059 durante 48h es un mecanismo muy fuerte de muerte celular, consistente con estos resultados se ha reportado en otros estudios que el PD98059 no afecta la primera mitosis después de que las células estuvieron expuestas al fármaco, pero que la mayoría de las células (el 90%) permanecen detenidas en la interfase sin entrar a una segunda mitosis en un lapso mayor a 48h y que esto provoca que una gran proporción de las células muera en la interfase después de haber salido de la primera mitosis o incluso sin haber entrado a la primera mitosis(Kawabata *et al.*, 2012). El mecanismo de acción de los inhibidores de la vía MAPK es provocar arresto del ciclo celular, incrementando el porcentaje de células en la fase G1, un indicativo de apoptosis, provocando también la disminución de la expresión de ciclina E, ciclina D1 y pro-caspasa 3 (Kawabata *et al.*, 2012; Miyoshi *et al.*, 2012).En otros estudios se ha propuesto que la incubación de las células APL con los inhibidores de PI3K conducen a una pérdida del potencial de membrana mitocondrial, una reducción en los niveles de pro-caspasa 9 y la aparición de la caspasa 9, esto indica que los efectos de los inhibidores de PI3K es promover apoptosis mediante la ruta mitocondrial de muerte celular(Billottet *et al.*, 2009). El tratamiento con ATRA después de haber inhibido la vía PI3K o MAPK nos da un efecto potenciador de la apoptosis, lo que resulta en una posible combinación terapéutica efectiva para promover apoptosis en células de cáncer de pulmón.

Hasta la fecha poco se sabe acerca del efecto funcional de ATRA en migración y dado que las vías de señalización que se están estudiando podrían también participar

en este evento. Se determinó el efecto del ATRA y de las vías PI3K-Akt y ERK en procesos de migración celular mediante ensayos de cierre de herida. Nuestros resultados muestran que en células A549 tratadas con ATRA durante 48 h se promueve migración celular ya que se reduce el diámetro de la herida en un 22% comparado con las células no tratadas, lo que significa que el ATRA indujo la reorganización del citoesqueleto de las células para poder migrar, este comportamiento no había sido demostrado en células de cáncer de pulmón tratadas con ATRA. Sin embargo, hay reportes que indican que los retinoides están involucrados en la expresión de metaloproteasas (Zaragoza *et al.*, 2007) lo que ayudaría a degradar la matriz extracelular para que las células migren e invadan otros tejidos. Los resultados que obtuvimos con los pre-tratamientos demuestran que el inhibidor de PI3K o MAPK seguido del tratamiento con ATRA previenen el proceso de migración provocado por el ATRA ya que no se observa disminución significativa en el área de la herida comparado con células no tratadas, por lo tanto sugieren que las vías de señalización PI3K y MAPK están involucradas en procesos de migración celular regulados por el ATRA en células de cáncer de pulmón, la inhibición de estas vías de señalización ayuda a revertir este efecto. Consistente con estos resultados ya se había reportado que el ATRA puede inhibir el proceso de proliferación celular pero potenciar el proceso de invasión celular en células pancreáticas (Leelawat *et al.*, 2005). En el 2005 se demostró que el ácido retinoico activa a PI3K y que esto provoca la activación de Rac1, sugiriendo que la activación de PI3K y Rac1 regulan también la activación de la vía MAPK (Pan *et al.*, 2005), recientemente se comprobó la participación de la vía PI3K-Akt regulando la activación de Rac para promover

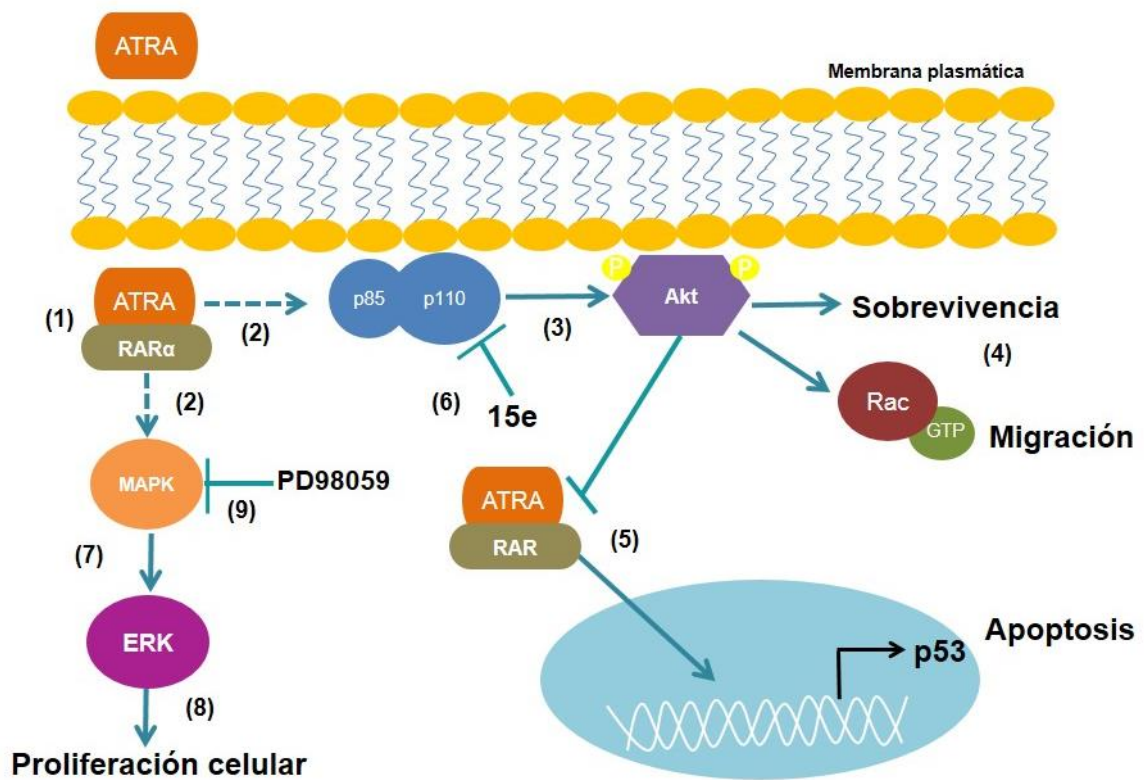
invasión en células de cáncer de pulmón (Garcia-Regalado *et al.*, 2013). Rac es una GTPasade la familia Rho que controla una gran variedad de funciones celulares como las adhesiones célula-célula, adhesiones célula-matriz, migración celular, progresión del ciclo celular y transformación celular, influenciando de esta manera varios aspectos relacionados con la tumorigénesis. Rac ha sido implicada en la regulación del proceso de migración celular induciendo la reorganización del citoesqueleto de actina para la formación de *ruffles* de membrana en fibroblastos, así como regulando la expresión de varias metaloproteasas de matriz (MMP)(Mack *et al.*, 2011). Estudios recientes en células de cáncer de próstata demuestran que la activación de la vía de señalización PI3K-Akt puede inducir invasión celular mediante la regulación de metaloproteasas, demostrando que la vía PI3K-Akt puede contribuir a incrementar la invasividad de las células y facilitar la progresión del cáncer (Shukla *et al.*, 2007). La utilización de inhibidores de PI3K, Akt o MMP suprimen las propiedades invasivas de estas células (Jung *et al.*, 2013), aunque se ha visto que PI3K es fundamental para la invasión de células de cáncer de próstata, existen otras vías de señalización que están involucradas en la invasión de tumores como la vía ERK1/2 cuya activación es suficiente para desencadenar un comportamiento invasivo (Shukla *et al.*, 2007).

Nuestros resultados sugieren que el tratamiento con ATRA promueve migración en células de cáncer de pulmón mediada por la activación de las vías de señalización PI3K y MAPK. Estos resultados respaldan las propuestas previas de la utilización de inhibidores de las vías PI3K o MAPK en combinación con el ATRA, que podrían ser



usados para obtener un mejor resultado en pacientes con cáncer de pulmón que no respondieron inicialmente a una terapia con retinoides.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo de maestría y en los antecedentes, proponemos un modelo que describe el mecanismo de acción de ATRA en células de cáncer de pulmón resistentes a su efecto anti-proliferativo (Fig. 26). En este modelo ATRA atraviesa la membrana plasmática y se une a RAR $\alpha$  para formar un complejo de señalización (paso 1), este complejo es capaz de activar las vías de señalización PI3K-Akt y ERK1/2 desde la membrana plasmática (paso 2), hasta el momento se desconoce si la interacción es directa o indirecta a través de otras proteínas intermedias. La activación de Akt (paso 3) promueve sobrevivencia y migración a través de Rac (paso 4). Akt en su forma activa induce la degradación de p53 mediante la ligasa de ubiquitina mdm2, además reprime la expresión transcripcional de genes blanco de ATRA como p53. La inhibición de PI3K por el 15e (paso 6) bloquea los procesos de sobrevivencia y migración, además de permitir la expresión de p53 mediada por ATRA. La activación de MAPK (paso 7) nos lleva a proliferación celular (paso 8). La inhibición de MAPK por el PD98059 lo evita (paso 9).



**Figura 26.** Modelo del mecanismo de acción de ATRA en células de cáncer de pulmón resistentes a su acción anti-proliferativa.

## CONCLUSIONES

- ATRA activa a las vías PI3K-Akt y ERK1/2 por un mecanismo independiente de la transcripción.
- La activación de PI3K-Akt y ERK1/2 nos lleva a procesos de supervivencia y migración celular, así mismo, evita el efecto inhibitorio de proliferación celular del ATRA.
- El tratamiento con los inhibidores de PI3K y MAPK evitan el proceso de migración celular y supervivencia provocado por el tratamiento con ATRA.
- La activación de PI3K-Akt y de ERK1/2 está relacionada con la resistencia a inhibición de la proliferación y apoptosis en células de cáncer de pulmón.

## PERSPECTIVAS

- La activación de las vías PI3K-Akt y ERK1/2 por el ATRA debe continuar investigándose para esclarecer más el mecanismo de activación que ejerce el ATRA en esta vía de señalización.
- La participación de los receptores nucleares en la activación de las vías de señalización PI3K-Akt y ERK1/2 podría ser mejor estudiada empleando técnicas como la inmunoprecipitación, “*pulldown*” o el ensayo de doble híbrido con levadura, que nos permitan encontrar una relación de los receptores nucleares interactuando con alguna de estas cinasas.
- La utilización de inhibidores de PI3K y MAPK en combinación con el ATRA, debe continuar investigándose, realizando estudios *in vivo*, para que se genere un esquema de aplicación de ATRA discriminando entre pacientes que responden o no a una terapia inicial de retinoides.

## ANEXO A

### Figura 15

*Newman-Keuls Multiple Comparison Test*

NT vs ATRA

NT vs ATRA/BMS493

NT vs BMS493

BMS493 vs ATRA

BMS493 vs ATRA/BMS493

ATRA/BMS493 vs ATRA

Valor de P	% obtenidos de la normalización con células no tratadas
P < 0.01	NT= 100%
P > 0.05	ATRA= 186.7%
P > 0.05	BMS493= 124.5%
P < 0.05	ATRA/BMS493= 134%
P > 0.05	
P < 0.05	

### Figura 17

*Newman-Keuls Multiple Comparison Test*

BMS493 vs ATRA

BMS493 vs NT

BMS493 vs ATRA/BMS493

ATRA/BMS493 vs ATRA

ATRA/BMS493 vs NT

NT vs ATRA

Valor de P	% obtenidos de la normalización con células no tratadas
P < 0.001	NT= 100%
P < 0.05	ATRA= 553.07%
P > 0.05	BMS493= 16.75%
P < 0.001	ATRA/BMS493= 35.17%
P > 0.05	
P < 0.001	

### Figura 19 y 20

*Newman-Keuls Multiple Comparison Test*

ATRA/PD/15e vs SFB 10%

ATRA/PD/15e vs PD98059

ATRA/PD/15e vs NT

ATRA/PD/15e vs ATRA

ATRA/PD/15e vs 15e

ATRA/PD/15e vs 15e/PD98059

ATRA/PD/15e vs ATRA/15e

ATRA/PD/15e vs ATRA/PD98059

ATRA/PD98059 vs SFB 10%

ATRA/PD98059 vs PD98059

ATRA/PD98059 vs NT

ATRA/PD98059 vs ATRA

ATRA/PD98059 vs 15e

ATRA/PD98059 vs 15e/PD98059

ATRA/PD98059 vs ATRA/15e

ATRA/15e vs SFB 10%

ATRA/15e vs PD98059

ATRA/15e vs NT

ATRA/15e vs ATRA

ATRA/15e vs 15e

ATRA/15e vs 15e/PD98059

15e/PD98059 vs SFB 10%

15e/PD98059 vs PD98059

15e/PD98059 vs NT

15e/PD98059 vs ATRA

15e/PD98059 vs 15e

Valor de P	% obtenidos de la normalización con células no tratadas
P < 0.001	NT= 100%
P < 0.01	ATRA= 73.8%
P < 0.05	15e= 59.6 %
P > 0.05	ATRA/15e= 55.7%
P > 0.05	PD98059= 116.6%
P > 0.05	ATRA/PD98059= 51.3%
P > 0.05	15e/PD98059= 59.3%
P > 0.05	ATRA/PD98059/15e= 51.1%
P < 0.001	SFB= 214.8%
P < 0.01	
P < 0.05	
P > 0.05	
P > 0.05	
P > 0.05	
P > 0.05	
P > 0.05	
P < 0.001	
P < 0.01	
P < 0.05	
P > 0.05	
P > 0.05	
P > 0.05	
P > 0.05	
P < 0.001	
P < 0.01	
P < 0.05	
P > 0.05	
P > 0.05	

15e vs SFB 10%	P < 0.001
15e vs PD98059	P < 0.01
15e vs NT	P < 0.05
15e vs ATRA	P > 0.05
ATRA vs SFB 10%	P < 0.001
ATRA vs PD98059	P < 0.05
ATRA vs NT	P > 0.05
NT vs SFB 10%	P < 0.001
NT vs PD98059	P > 0.05
PD98059 vs SFB 10%	P < 0.001

**Figura 23**

Newman-Keuls Multiple Comparison Test	Valor de P	% obtenidos de la normalización con células no tratadas
ATRA vs ATRA/15e	P < 0.001	NT= 100%
ATRA vs ATRA/PD98059	P < 0.001	ATRA= 44.4%
ATRA vs PD98059	P < 0.001	15e= 272.2%
ATRA vs 15e	P < 0.05	ATRA/15e= 600%
ATRA vs NT	P > 0.05	PD98059= 572.2%
NT vs ATRA/15e	P < 0.001	ATRA/PD98059= 577.7%
NT vs ATRA/PD98059	P < 0.001	
NT vs PD98059	P < 0.001	
NT vs 15e	P < 0.05	
15e vs ATRA/15e	P < 0.01	
15e vs ATRA/PD98059	P < 0.01	
15e vs PD98059	P < 0.001	
PD98059 vs ATRA/15e	P > 0.05	
PD98059 vs ATRA/PD98059	P > 0.05	
ATRA/PD98059 vs ATRA/15e	P > 0.05	

**Figura 25**

Newman-Keuls Multiple Comparison Test	Valor de P	% obtenidos de la normalización con células no tratadas
SFB 10% vs ATRA/PD98059	P < 0.001	NT= 100%
SFB 10% vs ATRA/15e	P < 0.001	ATRA= 77.5%
SFB 10% vs PD98059	P < 0.01	ATRA/15e= 98.1%
SFB 10% vs ATRA	P > 0.05	PD98059= 91.6%
ATRA vs ATRA/PD98059	P < 0.001	ATRA/PD98059= 100%
ATRA vs NT	P < 0.001	SFB= 72.6%
ATRA vs PD98059	P < 0.01	
PD98059 vs ATRA/PD98059	P > 0.05	
PD98059 vs NT	P > 0.05	
NT vs ATRA/PD98059	P > 0.05	
ATRA vs ATRA/15e	P < 0.001	
ATRA/15e vs NT	P > 0.05	

## ANEXO B

### Buffer de lisis:

- 50 mM \_\_\_\_\_ Tris pH 7.5
- 0.15 M \_\_\_\_\_ NaCl
- 1 % \_\_\_\_\_ Tritón X-100
- Adicionar inhibidores de proteasas antes de ser usado \*

### Para preparar 500 mL utilizar:

25 mL de Tris-HCl 1M, pH 7.5

15 mL de NaCl 5M

5 mL de Tritón X-100

455 mL de agua destilada

Mezclar con un agitador magnético.

**\*Justo antes de ser utilizado adicionar inhibidores de proteasas.**

Para preparar 10 mL:

Agregar 10  $\mu$ L de EDTA (1mM), 10  $\mu$ L de Ortovanadato de Sodio (1mM), 10  $\mu$ L de NaF (1mM), 100  $\mu$ L de PMSF (1mM), 100  $\mu$ L de  $\beta$ -glicerolfosfato (10mM) y 1 mL del Complete<sup>®</sup>.

## **ANEXO C**

### **Buffer de transferencia 10 X pH 8.3**

Tris                      0.25 M

Glicina                  1.92 M

Aforar a 1 L de agua MilliQ™ (No ajustar el pH).

### **Buffer de transferencia 1X pH 8.3 (No ajustar el pH)**

Buffer de transferencia 10X              100 mL

Metanol                                      200 mL

Agua    700 mL

### **TBS – Tween 20**

Para preparar 2 L de TBS-Tween utilizar:

200 mL de TBS 10X

1800 mL de H<sub>2</sub>O

1 mL de Tween 20

Mezclar con un agitador magnético.

### **TBS 10X**

Para preparar 1L de TBS 10X en H<sub>2</sub>O utilizar:

Trizma Base 100mM

NaCl 1.5M

Mezclar con un agitador magnético y ajustar el pH a 7.5 con HCl.



## BIBLIOGRAFÍA

Aggarwal, S., Kim, S.W., Cheon, K., Tabassam, F.H., Yoon, J.H., and Koo, J.S. (2006). Nonclassical action of retinoic acid on the activation of the cAMP response element-binding protein in normal human bronchial epithelial cells. *Mol Biol Cell* 17, 566-575.

Altucci, L., and Gronemeyer, H. (2001). The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 181-193.

Alvarez, S., Khanwalkar, H., Alvarez, R., Erb, C., Martinez, C., Rodriguez-Barrios, F., Germain, P., Gronemeyer, H., and de Lera, A.R. (2009). C3 halogen and c8" substituents on stilbene arotinoids modulate retinoic Acid receptor subtype function. *ChemMedChem* 4, 1630-1640.

Arrieta, O., Gonzalez-De la Rosa, C.H., Arechaga-Ocampo, E., Villanueva-Rodriguez, G., Ceron-Lizarraga, T.L., Martinez-Barrera, L., Vazquez-Manriquez, M.E., Rios-Trejo, M.A., Alvarez-Avitia, M.A., Hernandez-Pedro, N., *et al.* (2010). Randomized phase II trial of All-trans-retinoic acid with chemotherapy based on paclitaxel and cisplatin as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 28, 3463-3471.

Bader, A.G., Kang, S., Zhao, L., and Vogt, P.K. (2005). Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 5, 921-929.

Barnard, J.H., Collings, J.C., Whiting, A., Przyborski, S.A., and Marder, T.B. (2009). Synthetic retinoids: structure-activity relationships. *Chemistry* 15, 11430-11442.

Billottet, C., Banerjee, L., Vanhaesebroeck, B., and Khwaja, A. (2009). Inhibition of class I phosphoinositide 3-kinase activity impairs proliferation and triggers apoptosis in acute promyelocytic leukemia without affecting atra-induced differentiation. *Cancer Res* 69, 1027-1036.

Brambilla, E., Travis, W.D., Colby, T.V., Corrin, B., and Shimosato, Y. (2001). The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 18, 1059-1068.

Burstein, H.J., and Schwartz, R.S. (2008). Molecular origins of cancer. *N Engl J Med* 358, 527.

Bushue, N., and Wan, Y.J. (2010). Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 62, 1285-1298.

Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 50-83.

Curtin, J.C., Dragnev, K.H., Sekula, D., Christie, A.J., Dmitrovsky, E., and Spinella, M.J. (2001). Retinoic acid activates p53 in human embryonal carcinoma through retinoid receptor-dependent stimulation of p53 transactivation function. *Oncogene* 20, 2559-2569.

Chappell, W.H., Steelman, L.S., Long, J.M., Kempf, R.C., Abrams, S.L., Franklin, R.A., Basecke, J., Stivala, F., Donia, M., Fagone, P., *et al.* (2011). Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* 2, 135-164.

Choi, E.J., Whang, Y.M., Kim, S.J., Kim, H.J., and Kim, Y.H. (2007). Combinational treatment with retinoic acid derivatives in non-small cell lung carcinoma in vitro. *J Korean Med Sci 22 Suppl*, S52-60.

Dbouk, H.A., and Backer, J.M. (2010). A beta version of life: p110beta takes center stage. *Oncotarget 1*, 729-733.

de Lera, A.R., Bourguet, W., Altucci, L., and Gronemeyer, H. (2007). Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. *Nat Rev Drug Discov 6*, 811-820.

Furrukh, M., Burney, I.A., Kumar, S., Zahid, K.F., and Al-Moundhri, M. (2013). Improving Outcomes in Advanced Lung Cancer: Maintenance therapy in non-small-cell lung carcinoma. *Sultan Qaboos Univ Med J 13*, 3-18.

Garcia-Regalado, A., Vargas, M., Garcia-Carranca, A., Arechaga-Ocampo, E., and Gonzalez-De la Rosa, C.H. (2013). Activation of Akt pathway by transcription-independent mechanisms of retinoic acid promotes survival and invasion in lung cancer cells. *Mol Cancer 12*, 44.

Geradts, J., Chen, J.Y., Russell, E.K., Yankaskas, J.R., Nieves, L., and Minna, J.D. (1993). Human lung cancer cell lines exhibit resistance to retinoic acid treatment. *Cell Growth Differ 4*, 799-809.

Haagensen, E.J., Kyle, S., Beale, G.S., Maxwell, R.J., and Newell, D.R. (2012). The synergistic interaction of MEK and PI3K inhibitors is modulated by mTOR inhibition. *Br J Cancer 106*, 1386-1394.

Hoang, T., Traynor, A.M., and Schiller, J.H. (2002). Novel therapies for lung cancer. *Surg Oncol 11*, 229-241.

Hurst, R.J., and Else, K.J. (2012). Retinoic acid signalling in gastrointestinal parasite infections: lessons from mouse models. *Parasite Immunol* 34, 351-359.

Jensen, H.A., Styskal, L.E., Tasseff, R., Bunaciu, R.P., Congleton, J., Varner, J.D., and Yen, A. (2013). The Src-family kinase inhibitor PP2 rescues inducible differentiation events in emergent retinoic acid-resistant myeloblastic leukemia cells. *PLoS One* 8, e58621.

Jung, C.H., Kim, E.M., Park, J.K., Hwang, S.G., Moon, S.K., Kim, W.J., and Um, H.D. (2013). Bmal1 suppresses cancer cell invasion by blocking the phosphoinositide 3-kinase-Akt-MMP-2 signaling pathway. *Oncology reports* 29, 2109-2113.

Kawabata, T., Tanimura, S., Asai, K., Kawasaki, R., Matsumaru, Y., and Kohno, M. (2012). Up-regulation of pro-apoptotic protein Bim and down-regulation of anti-apoptotic protein Mcl-1 cooperatively mediate enhanced tumor cell death induced by the combination of ERK kinase (MEK) inhibitor and microtubule inhibitor. *J Biol Chem* 287, 10289-10300.

Kyosseva, S.V. (2004). Mitogen-activated protein kinase signaling. *Int Rev Neurobiol* 59, 201-220.

Larsen, J.E., Cascone, T., Gerber, D.E., Heymach, J.V., and Minna, J.D. (2011). Targeted therapies for lung cancer: clinical experience and novel agents. *Cancer J* 17, 512-527.

le Maire, A., Teyssier, C., Erb, C., Grimaldi, M., Alvarez, S., de Lera, A.R., Balaguer, P., Gronemeyer, H., Royer, C.A., Germain, P., *et al.* (2010). A unique secondary-structure switch controls constitutive gene repression by retinoic acid receptor. *Nat Struct Mol Biol* 17, 801-807.

Leelawat, K., Ohuchida, K., Mizumoto, K., Mahidol, C., and Tanaka, M. (2005). All-trans retinoic acid inhibits the cell proliferation but enhances the cell invasion through up-regulation of c-met in pancreatic cancer cells. *Cancer Lett* 224, 303-310.

Lefebvre, B., Brand, C., Flajollet, S., and Lefebvre, P. (2006). Down-regulation of the tumor suppressor gene retinoic acid receptor beta2 through the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Mol Endocrinol* 20, 2109-2121.

Lindsley, C.W., Zhao, Z., Leister, W.H., Robinson, R.G., Barnett, S.F., Defeo-Jones, D., Jones, R.E., Hartman, G.D., Huff, J.R., Huber, H.E., *et al.* (2005). Allosteric Akt (PKB) inhibitors: discovery and SAR of isozyme selective inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 15, 761-764.

Lopez-Carballo, G., Moreno, L., Masia, S., Perez, P., and Baretino, D. (2002). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 277, 25297-25304.

Mack, N.A., Whalley, H.J., Castillo-Lluva, S., and Malliri, A. (2011). The diverse roles of Rac signaling in tumorigenesis. *Cell cycle* 10, 1571-1581.

Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.

Marsit, C.J., Zheng, S., Aldape, K., Hinds, P.W., Nelson, H.H., Wiencke, J.K., and Kelsey, K.T. (2005). PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration. *Hum Pathol* 36, 768-776.

Masia, S., Alvarez, S., de Lera, A.R., and Baretino, D. (2007). Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol Endocrinol* 21, 2391-2402.

Mayo, L.D., and Donner, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11598-11603.

Meister, M., Tomasovic, A., Banning, A., and Tikkanen, R. (2013). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Scaffolding Proteins: A Recount. *Int J Mol Sci* 14, 4854-4884.

Miyoshi, S., Hamada, H., Hamaguchi, N., Kato, A., Katayama, H., Irifune, K., Ito, R., Miyazaki, T., Okura, T., and Higaki, J. (2012). Antitumor activity of MEK and PI3K inhibitors against malignant pleural mesothelioma cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 41, 449-456.

Osaki, M., Oshimura, M., and Ito, H. (2004). PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9, 667-676.

Pan, J., Kao, Y.L., Joshi, S., Jeetendran, S., Dipette, D., and Singh, U.S. (2005). Activation of Rac1 by phosphatidylinositol 3-kinase in vivo: role in activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 93, 571-583.

Petty, W.J., Li, N., Biddle, A., Bounds, R., Nitkin, C., Ma, Y., Dragnev, K.H., Freemantle, S.J., and Dmitrovsky, E. (2005). A novel retinoic acid receptor beta isoform and retinoid resistance in lung carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 97, 1645-1651.

Piskunov, A., and Rochette-Egly, C. (2011). A retinoic acid receptor RARalpha pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein alphaQ to activate p38MAPK. *Oncogene*.

Shiozaki, A., Shen-Tu, G., Bai, X., Iitaka, D., De Falco, V., Santoro, M., Keshavjee, S., and Liu, M. (2012). XB130 mediates cancer cell proliferation and survival through multiple signaling events downstream of Akt. *PLoS One* 7, e43646.

Shukla, S., MacLennan, G.T., Hartman, D.J., Fu, P., Resnick, M.I., and Gupta, S. (2007). Activation of PI3K-Akt signaling pathway promotes prostate cancer cell invasion. *International journal of cancer Journal international du cancer* 121, 1424-1432.

Song, G., Ouyang, G., and Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of cellular and molecular medicine* 9, 59-71.

Vanhaesebroeck, B., Higashi, K., Raven, C., Welham, M., Anderson, S., Brennan, P., Ward, S.G., and Waterfield, M.D. (1999). Autophosphorylation of p110delta phosphoinositide 3-kinase: a new paradigm for the regulation of lipid kinases in vitro and in vivo. *EMBO J* 18, 1292-1302.

Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P.C., Woscholski, R., Parker, P.J., and Waterfield, M.D. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70, 535-602.

Yoeli-Lerner, M., and Toker, A. (2006). Akt/PKB signaling in cancer: a function in cell motility and invasion. *Cell cycle* 5, 603-605.

Yoshimura, H., Nagai, M., Hibi, S., Kikuchi, K., Abe, S., Hida, T., Higashi, S., Hishinuma, I., and Yamanaka, T. (1995). A novel type of retinoic acid receptor

antagonist: synthesis and structure-activity relationships of heterocyclic ring-containing benzoic acid derivatives. *J Med Chem* 38, 3163-3173.

Zanotto-Filho, A., Cammarota, M., Gelain, D.P., Oliveira, R.B., Delgado-Canedo, A., Dalmolin, R.J., Pasquali, M.A., and Moreira, J.C. (2008). Retinoic acid induces apoptosis by a non-classical mechanism of ERK1/2 activation. *Toxicol In Vitro* 22, 1205-1212.

Zaragoza, R., Gimeno, A., Miralles, V.J., Garcia-Trevijano, E.R., Carmena, R., Garcia, C., Mata, M., Puertes, I.R., Torres, L., and Vina, J.R. (2007). Retinoids induce MMP-9 expression through RARalpha during mammary gland remodeling. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 292, E1140-1148.