

2008

“Receptor de ácido retinoico  $\alpha$  2 como marcador molecular de respuesta a cisplatino/paclitaxel y al *all-trans* ácido retinoico en pacientes con cáncer pulmonar avanzado”





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**INSTITUTO NACIONAL  
DE CANCEROLOGIA**

**“Receptor de ácido retinoico  $\alpha_2$  como marcador  
molecular de respuesta a cisplatino/paclitaxel y al  
*all-trans* ácido retinoico en pacientes con cáncer  
pulmonar avanzado”**

TESIS QUE PRESENTA:

**DR. MIGUEL ÁNGEL ÁLVAREZ AVITIA**

EN LA SUBESPECIALIDAD DE:

**ONCOLOGÍA MÉDICA**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. OSCAR GERARDO ARRIETA RODRÍGUEZ**

ASESORES DE TESIS

**DRA. CLAUDIA HAYDÉE GONZÁLEZ DE LA ROSA**

**DRA. ELENA ARECHAGA OCAMPO**

CD. DE MEXICO, DISTRITO FEDERAL

AGOSTO 2008

*Agradecer y mencionar nombres, es cometer imprudencias,  
y herir a los susceptibles,  
sin embargo, haré caso omiso de las recomendaciones,  
y me atreveré a unas cuantas imprudencias.  
Gracias a mis padres, Miguel y Minda, este es su sueño,  
a Claudia, sus desvelos, apoyo, amor y tenacidad se reflejan en lo que soy,  
y a mis maestros, profesores y amigos,  
Oscar, Manuel, Fernando, José Luis, Elena, Javier, Marce y otros muchos,  
aquellos que han dejado su influencia en mi proceder.  
...Leelo y Misha, por mantenerme cuerdo.*

**PROLOGO.**

*Estamos haciendo un libro,  
testimonio de lo que no decimos.  
Reunimos nuestro tiempo, nuestros dolores,  
nuestros ojos, las manos que tuvimos,  
los corazones que ensayamos;  
nos traemos al libro,  
y quedamos, no obstante,  
más grandes y más miserables que el libro.  
Lamento no es el dolor.  
El canto no es el pájaro.  
El libro no soy yo, ni es mi hijo,  
Ni es la sombra de mi hijo.  
El libro es solo el tiempo,  
un tiempo mío entre todos los tiempos,  
un grano de mazorca,  
un pedazo de hidra.*

**JAIME SABINES  
TARUMBA (1956)**

# TABLA DE CONTENIDOS

<b>Introducción.....</b>	<b>6</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>8</b>
<b>Planteamiento del problema.....</b>	<b>9</b>
<b>Antecedentes.....</b>	<b>10</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>18</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>20</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>21</b>
<b>Diseño metodológico .....</b>	<b>22</b>
<b>Métodos y técnicas.....</b>	<b>24</b>
<b>Infraestructura.....</b>	<b>28</b>
<b>Resultados y análisis .....</b>	<b>29</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>33</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>35</b>
<b>Anexos:</b>	
<b>Tablas.....</b>	<b>36</b>
<b>Imágenes.....</b>	<b>44</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>50</b>

## INTRODUCCIÓN

El Cáncer Pulmonar es, en la actualidad, una de las primeras causas de muerte por cáncer, ha sido un problema creciente y la tendencia es al aumento en la incidencia. Una relación causa efecto se ha logrado establecer de manera clara con el tabaquismo, lo que ha contribuido con el aumento del número de casos en las mujeres en los últimos 20 años, esperándose para el año 2020, solo en los Estados Unidos, 8.4 millones de muertes por año asociadas a tabaquismo. En México, al igual que en algunos países de Latinoamérica, el sub-registro ha jugado un papel importante en la desinformación y no ha permitido tener datos epidemiológicos exactos de este problema de salud, pero aun así, el cáncer pulmonar corresponde la décimo segunda causa de muerte. La determinación de los factores de riesgo y etiológicos han permitido develar de manera parcial los eventos relacionados a la carcinogénesis, aunque lamentablemente, no por completo,

Los retinoides, análogos estructurales y funcionales de la vitamina A, al parecer, juegan un papel importante, no solo en la diferenciación de los tejidos normales, sino en los eventos tempranos de daño mutagénico en las vías de señalización relacionadas con la falta de diferenciación y de apoptosis, así como de proliferación celular descontrolada.

Con estos antecedentes, y en la búsqueda de nuevos tratamientos, los retinoides se han explorado en el tratamiento de otras neoplasias. En modelos animales experimentales de tumores de cabeza y cuello de histopatología epidermoide han demostrado efectividad en la regresión de lesiones premalignas. En las leucemias promielocíticas agudas, el aumento en la actividad de los receptores de retinoides inducida por el *all-trans* ácido retinoico (ATRA por sus siglas en ingles) ha mostrado una gran efectividad como tratamiento. En las neoplasias o tumores sólidos el efecto terapéutico del ATRA aun es un punto álgido de investigación. No sólo se cree que puede potenciar el efecto citotóxico de algunos quimioterápicos, como el cisplatino, sino que también pueden lograr su efecto anti-tumoral a través de sus receptores nucleares.

Uno de los receptores de retinoides más estudiados es RAR  $\beta$ 2; los primeros indicios que llevaron a sospechar que RAR  $\beta$ 2 pudiera tener un papel en la oncogénesis, fue la observación de su pérdida de expresión en diferentes tejidos tumorales, tanto en modelos animales como en cánceres humanos, lo que ha motivado esta investigación.

## RESUMEN

El Cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) es la primera causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres a nivel mundial. En México, a pesar del sub-registro, es una de las primeras causas de muerte por cáncer, y al momento del diagnóstico, más del 90% de los pacientes se encuentran con etapas localmente avanzadas o metastásicas de la enfermedad. La quimioterapia (QT) y la radioterapia son el tratamiento estándar para estas etapas, con supervivencias de sólo 7-10 meses, motivo por el cual se están investigando nuevas estrategias de tratamiento para mejorar el pronóstico de estos pacientes. Los retinoides, análogos funcionales y estructurales de la vitamina A (como el *all-trans* ácido retinoico (ATRA), han mostrado un efecto antitumoral combinado con terapia citotóxica en otros tumores sólidos.

La meta del estudio es determinar la tasa de respuesta de los pacientes con CPCNP tratados con Cisplatino/Paclitaxel y ATRA vs. aquellos solo tratados con QT, así como establecer si el Receptor de Ácido Retinoico  $\beta$ 2 (RAR 2) puede ser un biomarcador (molecular o clínico) útil de respuesta a ATRA, lo que nos permitirá determinar qué pacientes pudiesen beneficiarse de dicho tratamiento. Por lo tanto el objetivo del trabajo fue conocer la frecuencia de expresión de RAR 2 en pacientes con CPCNP asociada con las características clínico patológicas de los tumores pulmonares y con las tasas de respuestas a QT, lo que permitirá definir a futuro nuevas líneas de tratamiento en pacientes con cáncer de pulmón con enfermedad avanzada o metastásica.

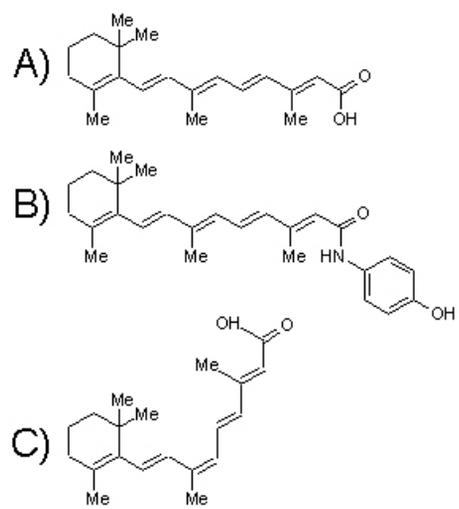
## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Si RAR  $\beta 2$  tiene un papel en la oncogénesis pulmonar, la expresión de este receptor podría ser utilizado como biomarcador molecular de respuesta al tratamiento con ATRA, entonces los pacientes con cáncer de pulmón avanzado que expresen RAR  $\beta 2$  pudieran beneficiarse al recibir tratamiento con QT de primera línea y ATRA de manera combinada debido al potencial efecto sinérgico con citotóxicos o al efecto antioncogénico del ATRA en el cáncer pulmonar.

## ANTECEDENTES

### Cáncer pulmonar

La carcinogénesis pulmonar es un proceso crónico que involucra múltiples alteraciones genéticas, celulares y tisulares, resultado del daño mutagénico a genes que regulan el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis, lo que finalmente lleva al desarrollo de cáncer invasivo y metastásico. Existen varios tipos de cáncer pulmonar, el más frecuente de ellos (>80% del total) se llama cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP)<sup>1</sup>. Esta neoplasia es la primera causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres a nivel mundial, y es también es una de las neoplasias malignas con mayor incidencia<sup>2</sup>. A pesar del sub-registro nacional, en México ocupa el lugar número 12 en frecuencia y al momento del diagnóstico, más del 90% de los pacientes en México y Latinoamérica se encuentran en etapas localmente avanzadas o con presencia de metástasis. La QT (QT), sola o en combinación con radioterapia, es el tratamiento estándar para el CPCNP en etapas avanzadas. Con tratamientos de primera línea que incluyen platino, como la combinación cisplatino/paclitaxel, la sobrevida media es de sólo 7-10 meses<sup>3-5</sup>. Los regímenes de docetaxel o pemetrexed son la actual segunda línea de QT estándar en CPCNP, con una tasa de respuesta de 6-9%<sup>6-8</sup>. Debido a este pobre pronóstico, hay gran interés en el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento para los pacientes. Los avances en el entendimiento de la biología del cáncer han llevado al descubrimiento de varios blancos moleculares potenciales, de manera tal que una de las nuevas estrategias es la combinación de QT estándar con otros fármacos, como los relacionados con la inducción de apoptosis, la diferenciación o el arresto del ciclo celular. La razón de esto último es basado en el concepto de que los principales mecanismos de oncogénesis son el daño en las vías de señalización relacionadas con proliferación y muerte celular. El mejor modelo de terapia de inducción de diferenciación, apoptosis o arresto celular, es el tratamiento con ácido retinoico *all-trans* (ATRA por sus siglas en inglés). A continuación se mencionarán algunos datos sobre el ATRA y su relación con el cáncer.



Existen algunos estudios clínicos fase II que aunque incluyen muy pocos pacientes, apoyan lo observado *ex vivo*: un estudio con 39 pacientes mostró que el pretratamiento con 20 mg/día de ácido retinoico 13-*cis* en pacientes con cáncer escamoso de cabeza y cuello avanzado es capaz de potenciar el efecto del cisplatino<sup>18</sup>. Otro estudio mostró que aunque el bexaroteno (retinoide sintético con selectividad por RXRs) tuvo eficacia limitada en 145 pacientes con cáncer de mama metastásico, produjo beneficio clínico en el 20% de las pacientes<sup>19</sup>. Hay sólo tres ensayos clínicos con pacientes con CPCNP avanzado reportados en la literatura, nuevamente realizados sobre grupos pequeños de pacientes. En ellos se combina la administración de uno o dos retinoides con los tratamientos actuales de primera línea. Los tres reportaron aumento en las tasas de respuesta a la QT y en sobrevida libre de enfermedad a un año: el primero incluyó 28 pacientes tratados con la combinación bexaroteno/cisplatino/vinorelbine<sup>20</sup>, el segundo incluyó 48 pacientes tratados con bexaroteno/carboplatino/gemcitabina<sup>21</sup> y en el tercero se utilizó la combinación bexaroteno/ATRA/cisplatino/docetaxel en 7 pacientes<sup>22</sup>. El aumento en la tasa de respuesta a un año en los 2 primeros estudios fue de 25% y el de sobrevida de 61 y 53%, respectivamente. El tercer estudio fue un reporte de casos, y se alcanzó una respuesta objetiva en 6 de 7 pacientes (85%), y en 3 pacientes (42%) alcanzaron una sobrevida media (SVM) mayor de 17 meses.

El mecanismo de acción por el cual los retinoides logran efectos anti-oncogénicos aún es tema de investigación. Se cree que los mecanismos potenciales para el sinergismo entre citotóxicos y retinoides son multifactoriales. En líneas celulares de carcinoma de ovario, se encontró que la potenciación de la citotoxicidad del cisplatino por el ATRA no involucraba un incremento en la concentración celular del platino sino la inhibición de la enzima glutatión-S-transferasa y el aumento en la formación de aductos de ADN<sup>23</sup>. Sin embargo, conforme se avanza en la investigación del tema, ha surgido la hipótesis de que el efecto anti-oncogénico de los retinoides es mediado por sus múltiples receptores nucleares, ya que gracias a ellos los retinoides regulan la gran gama de procesos celulares mencionados previamente.

## Receptores de retinoides

Existen dos familias principales de receptores de retinoides, los RARs y los RXRs, miembros de la superfamilia de receptores nucleares<sup>24</sup>. Los RARs unen tanto ATRA como ácido retinoico 9-*cis*, los dos principales metabolitos naturales de la vitamina A, mientras que los RXRs son activados solamente por ácido retinoico 9-*cis*<sup>25</sup>. Cada una de estas familias consiste en tres isotipos ( , y ) codificados por genes diferentes; a su vez, cada isotipo tiene varias isoformas debido al uso de diferentes promotores en el mismo gen o bien, al procesamiento (*splicing*) alternativo del ARN mensajero (ARNm)<sup>26</sup>. Los receptores de retinoides actúan como factores de transcripción dependientes de ligando y requieren asociarse en dímeros constituidos por dos moléculas idénticas (homodimerización) o por dos diferentes isoformas (heterodimerización) antes de poder unirse a los elementos de respuesta a ácido retinoico (RARE por sus siglas en inglés) presentes en los promotores de sus genes blanco<sup>26</sup>. Esto significa que cuando un retinoide se une a su receptor dimérico, se promueve la transcripción de genes blanco, involucrados en el desarrollo, diferenciación celular, anti-proliferación y homeostasis. Debido a las múltiples isoformas, al menos 48 diferentes combinaciones de heterodímeros (RXR/RAR) son teóricamente posibles, pero debido a los patrones espacio-temporales específicos, un tipo celular puede tener sólo un determinado subgrupo de estas combinaciones. Por ejemplo, mientras que el ARNm de RAR $\alpha$  es expresado en la mayoría de los tejidos humanos, el de RAR $\beta$  sólo se expresa en piel y el de RAR $\gamma$  en tejido epitelial y neural. Tanto los RARs como los RXRs están constituidos por 450-500 aa y exhiben una estructura modular que incluye un dominio de unión al ADN (llamado DBD o región C) y un dominio de unión a ligando (llamado LBD o región E), formado por 10-12  $\alpha$ -hélices (Fig. 2 y 3)<sup>27</sup>.

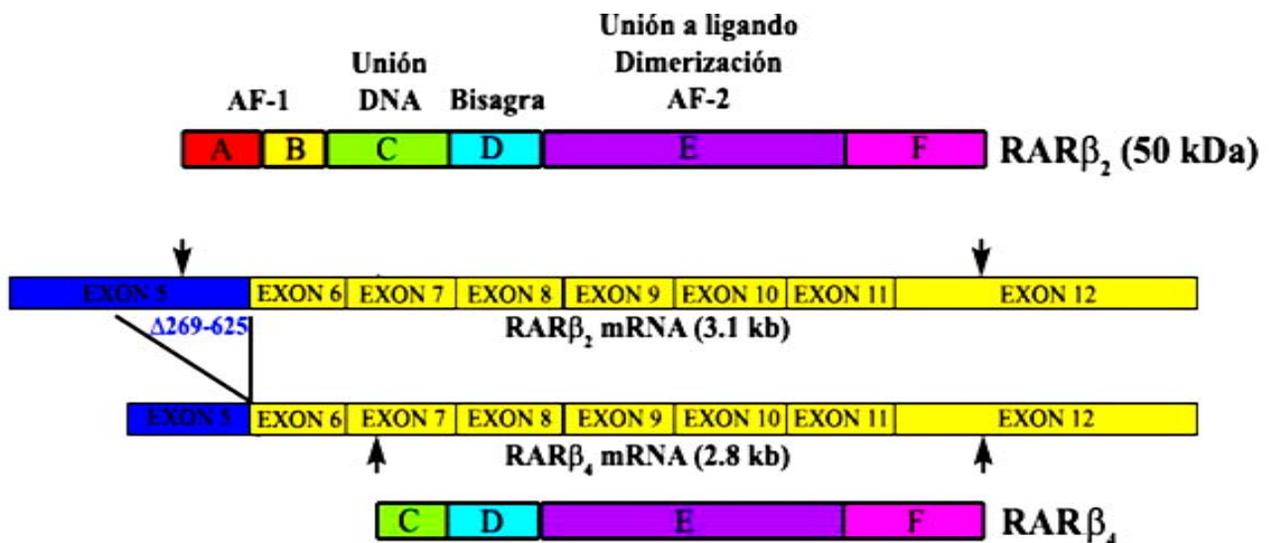
El nivel de complejidad en la señalización de los retinoides aumenta al considerar que las isoformas de cada subtipo de receptores pueden tener funciones diferentes e incluso antagónicas, por ejemplo, algunos estudios han encontrado que la isoforma RAR $\beta$  2 puede tener un efecto supresor de tumores al inhibir proliferación, mientras que a la isoforma RAR $\beta$  4 recientemente se le ha relacionado con promoción de la proliferación celular.



## Receptor RAR

En el humano, existen 3 principales isoformas de este receptor: 1, 2 y 4. La isoforma RAR 1 es transcrita a partir del promotor P1 del gen RAR , mientras que la isoforma RAR 2 es transcrita a partir del promotor P2; posteriormente a través de *splicing* alternativo, se obtiene la isoforma RAR 4 a partir del ARNm de RAR 2 (Fig. 3)<sup>33</sup>.

RAR 1 es una isoforma fetal y se sabe que tiene papeles muy importantes durante el desarrollo embrionario. RAR 2 es la isoforma más abundante y debido a que el promotor P2 del gen RAR contiene secuencias RARE, RAR 2 es también la isoforma cuya expresión es más inducida por retinoides. Como se aprecia en la figura 3, la traducción de RAR 4 inicia dentro de la región proteica C, donde reside el sitio de unión al ADN, por lo que se cree que puede actuar como dominante negativa de RAR 2 debido a que aún puede dimerizar y unir retinoides, pero es incapaz de iniciar la transcripción<sup>31</sup>. Sin embargo, se desconocen las señales celulares que llevan a la



expresión de esta isoforma.

**Figura 3.** Comparación de los ARNm y las estructuras proteicas de RAR 2 y RAR 4. Los dominios proteicos (A-F) de las isoformas se muestran en escala. La secuencia nucleotídica 269-625 de RAR 2 es eliminada en RAR 4. El sitio de inicio de traducción y el codón de paro de cada transcrito está indicado con flechas<sup>34</sup>.

Los primeros indicios que llevaron a sospechar que RAR  $\beta$  pudiera tener un papel en oncogénesis, fue la observación de su pérdida de expresión en diferentes tejidos tumorales, tanto en modelos animales como en cánceres humanos. Los mecanismos propuestos para explicar la pérdida de expresión de RAR  $\beta$  son<sup>35</sup>:

- a) Disminución de los niveles intracelulares de retinoides que ocasionaría la ausencia de activación transcripcional del gen. Esta disminución podría deberse a que las células transformadas tuvieran una reducida captación de vitamina A sérica, o bien, elevado catabolismo de retinoides.
- b) Pérdida de heterocigotidad del locus (LOH 3p). Sin embargo, esta hipótesis no ha podido ser comprobada pues tal mutación aún no se ha demostrado.
- c) Silenciamiento epigenético, por desacetilación de histonas o metilación de islas CpG de su promotor. La metilación del promotor de RAR  $\beta$  se ha comprobado en varias líneas celulares y tipos de cáncer de modelos animales, principalmente de mama y de pulmón. En ellos se ha observado que el ATRA es capaz de remodelar la cromatina silente de RAR  $\beta$ , regresando a su promotor a un estado transcripcionalmente activo.

Otros estudios que apoyan el papel prominente de RAR  $\beta$  en carcinogénesis son:

- 1) Las células de carcinoma de pulmón que sobreexpresan RAR  $\beta$  son menos tumorigénicas en ratones desnudos que las células que no lo sobreexpresan<sup>36</sup>.
- 2) La transfección con un vector de expresión de RAR  $\beta$  puede suprimir el crecimiento de varias líneas celulares de cáncer<sup>37</sup>.
- 3) RAR  $\beta$  puede suprimir metástasis de células de cáncer de mama en un modelo de xenoinjerto en ratón<sup>38</sup>, y
- 4) la pérdida de expresión de RAR  $\beta$  en pacientes con neuroblastoma correlacionó con un pronóstico pobre<sup>39</sup>.

Las vías de señalización que permiten la actividad antitumoral de RAR  $\alpha$  son prácticamente desconocidas, hasta el momento se sabe que disminuye la activación de las MAP cinasas y la actividad del factor de transcripción AP-1 y suprime la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico y de COX-2, proteínas a las que se les ha encontrado un papel relevante en la oncogénesis pulmonar<sup>40,41</sup>. Sin embargo, a pesar de todos estos antecedentes, aún no es clara la efectividad del ATRA para aumentar la supervivencia y la respuesta al tratamiento en pacientes con CPCNP y mucho menos si dicho efecto está relacionado con una mayor expresión intratumoral del receptor RAR  $\alpha$ .

## OBJETIVO GENERAL

- ✚ Determinar si la expresión de RAR 2 es un biomarcador molecular de respuesta al tratamiento combinado de ATRA y QT de primera línea (paclitaxel y cisplatino) que permita seleccionar a los pacientes que pudieran beneficiarse con este tratamiento combinado.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Comparar las tasas de respuestas entre los pacientes con CPCNP avanzado tratados con QT y ATRA vs. aquellos tratados sólo con QT
2. Comparar la sobrevida libre de enfermedad y la sobrevida global en pacientes con CPCNP avanzado tratados con QT y ATRA vs. aquellos tratados sólo con QT
3. Comparar las toxicidades presentadas en ambos grupos de pacientes.
4. Conocer la frecuencia de expresión intratumoral de RAR 2 en pacientes mexicanos con CPCNP.
5. Asociar los niveles de expresión intratumorales de RAR 2 con características clínicas y patológicas de pacientes con CPCNP.
6. Comparar las tasas de respuesta a cisplatino/paclitaxel entre 2 subgrupos de pacientes con CPCNP: aquéllos cuyos tumores pulmonares no tengan expresión de RAR 2 y aquéllos cuyos tumores pulmonares expresen RAR 2, para determinar el beneficio de la expresión de RAR 2 como biomarcador de respuesta a tratamiento.

# HIPOTESIS

## *HIPOTESIS*

Los pacientes con Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas avanzado (EC IIIB y IV) que expresan RAR 2 presentan una mejor respuesta al tratamiento con QT de primera línea y ATRA, lo que permitirá agrupar a pacientes que pudiesen beneficiarse de tratamiento combinado en primera línea.

## *HIPOTESIS NULA*

*No existe una correlación entre la expresión de RAR 2 y la respuesta al tratamiento con QT y ácido retinoico en los pacientes con Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas avanzado (EC IIIB y IV) en primera línea de tratamiento.*

## JUSTIFICACIÓN

La administración de ATRA junto a paclitaxel/cisplatino podría impactar significativamente en el mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes al aumentar la sobrevida libre de enfermedad. Por lo que la determinación de un marcador molecular de respuesta al tratamiento con ATRA como es la expresión de RAR 2 intratumoral puede mejorar la evaluación pronóstica del paciente con CPCNP, neoplasia que a pesar del intenso estudio al que ha sido sometida, continúa siendo una de las de peor pronóstico. Además, de manera indirecta y a largo plazo, el uso de un biomarcador para la selección de un grupo de pacientes que se beneficien de la administración de ATRA podría disminuir los costos de atención, ya que una estrategia que mejore la respuesta al tratamiento de QT de primera línea (que también es el más económico), representa la disminución en el requerimiento de terapias más costosas.

## DISEÑO METODOLOGICO

### *Diseño experimental.*

Estudio clínico controlado, prospectivo, aleatorizado y doble ciego.

### *Definición de la población de estudio.*

Las instituciones que reclutaron a los pacientes fueron el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) y el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), previa autorización de los comités científicos y de bioética de las respectivas instituciones, de acuerdo con los criterios de inclusión que a continuación se mencionan: mayores de 18 años de edad con capacidad de decisión propia, con estadio III o IV según TNM de cáncer pulmonar de células no pequeñas por diagnóstico histopatológico, que recibieran QT paliativa a base de paclitaxel  $175 \text{ mg/m}^2$  y cisplatino  $80 \text{ mg/m}^2$  cada 3 semanas durante 2 ciclos, estado general con un Karnofski igual o mayor de 70%, pruebas de función hepática y citometría hemática dentro de rangos normales y depuración de creatinina mayor de 75 ml por minuto, que aceptaron participar en el estudio y firmaron la carta de consentimiento informado. Los criterios de exclusión fueron: co-morbilidad con otro tipo de cáncer, o con enfermedades autoinmunes, que hubieran recibido tratamientos con QT adyuvante o neoadyuvante antes de la toma de biopsia, que requirieran reducción de la dosis de QT por alteraciones en sus exámenes de laboratorio; pacientes con mal estado general; ausencia de diagnóstico histológico. La atención inicial de los pacientes, así como los estudios de gabinete para establecer su estadio, se realizaron de la forma rutinaria, con historia clínica completa, perfil bioquímico, conteo sanguíneo diferencial, examen general de orina, electrocardiograma y tomografía computada de abdomen y tórax. Los pacientes continuaron con el seguimiento en la consulta externa de Oncología Médica, donde se realizaron exámenes clínicos y se evaluaron con exámenes de laboratorio cada mes durante los primeros 6 meses y cada 2 meses durante los siguientes 2 años. La tomografía de tórax se realizó cada 2 meses en los primeros 6 meses y cada 4 meses durante los siguientes 2 años, o antes en caso de existir indicación médica. Se consideró

progresión si durante el examen médico presentó nuevas lesiones. La respuesta al tratamiento fue evaluada de acuerdo a criterios RECIST y la sobrevida libre de progresión se midió desde el día de inicio de tratamiento. Se confirmó la presencia de metástasis a SNC mediante RM de cráneo en pacientes sintomáticos durante el seguimiento.

Procedimiento y diseño del estudio clínico: posterior a revisar criterios de inclusión y exclusión, así como firmar carta de consentimiento, se aleatorizó a los pacientes a recibir placebo o ácido retinoico all-trans. Un brazo recibió 1 tableta/día de placebo y el otro ATRA (20 mg/día, dosis utilizada previamente en estudios fase II en donde se combina con QT sin efectos tóxicos), iniciado un día previo al inicio de QT y durante todo el tratamiento. Antes de cada ciclo de QT, el paciente fue evaluado clínicamente y con exámenes de laboratorio rutinarios.

## *MÉTODOS Y TÉCNICAS*

### *Muestras tumorales*

Las muestras tumorales utilizadas corresponden a las biopsias realizadas a los pacientes reclutados en el estudio como parte de su protocolo de diagnóstico. Dichas biopsias fijadas con 4% de formalina y embebidos en parafina fueron evaluadas y caracterizadas por médicos onco-patólogos para su diagnóstico histopatológico. Posterior a dicho análisis, los bloques de tejido en parafina fueron proporcionados por los departamentos de Patología de los Institutos involucrados. Se hizo una evaluación visual de la cantidad de tejido disponible, privilegiándose la realización de los cortes para inmunohistoquímica. Sólo en aquellas muestras donde el tejido no estuviera agotado de forma evidente, se realizaron los cortes respectivos para obtener ARN total. Una muestra de pulmón sano, utilizada como control de la expresión basal de RAR 2, se obtuvo de una necropsia realizada en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

### *Amplificación del ARNm de RAR 2 por Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)*

Se obtuvo el ARN total de las muestras tumorales usando el kit Absolutely RNA<sup>®</sup> FFPE (Stratagene) y siguiendo el protocolo sugerido por el proveedor, obteniéndose 20 µl de ARN total a partir de 2 cortes de 10 µm de la biopsia en el bloque de parafina. Se tomaron 6 µl del ARN obtenido para hacer cada reacción de Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), utilizando el kit GeneAmp<sup>®</sup> (Applied Biosystem). Todas las reacciones se realizaron por triplicado para cada muestra de ARN. La mezcla para transcripción reversa en un volumen de 40 µl consta de 5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1mM de cada dNTP, 1 U/µl de Inhibidor de RNasa, 2.5 U/µl de Transcriptasa Reversa MuLV, 2.5 µM de Hexámeros Aleatorios como cebadores y < 1µg del ARN total, todo ello en buffer de reacción 1X. Las reacciones se incubaron 10 min a temperatura ambiente, 20 min a 42° C, 5 min a 99° C y 5 min a 5° C en un termociclador BioRad. Para amplificar por PCR un fragmento del RNA mensajero que codifica para RAR β2, se utilizaron oligonucleótidos específicos para RAR β2 (sentido 5'-ATGTTTGACTGTATGGATGTTC-3'; antisentido 5'-

ATTTGTCCTGGCAGACGAAGCA-3', amplicón de 256 pb). Como control de la calidad del ADN complementario obtenido, se amplificó simultáneamente en la misma reacción un fragmento del ARN mensajero de  $\beta$ -actina (sentido 5'-ATCGTGATGGACTCCGGTGA-3'; antisentido 5'-CCATCTCTTGCTCGAAGTCC-3', amplicón de 232 pb). El oligonucleótido sentido de RAR  $\beta$ 2 es complementario a una secuencia eliminada en el ARN mensajero de RAR  $\beta$ 4. La mezcla de PCR en un volumen de reacción de 100  $\mu$ l consta de 2 mM de  $MgCl_2$ , 1mM de cada dNTP, 2.5 U de AmpliTaq ADN polimerasa, 0.15  $\mu$ M de cada uno de los 4 oligonucleótidos específicos de RAR  $\beta$ 2 y  $\beta$ -actina y el ADN complementario obtenido en la reacción de Transcripción Reversa descrita previamente, todo ello en buffer de reacción 1X. Las temperaturas de alineamiento se calcularon de acuerdo a la fórmula  $[(A+T)(2)] + [(C+G)(4)] - 5$ . Posterior a la desnaturalización del ADN complementario molde, las muestras se incubaron por 45 ciclos de 95° C por 45 s, 55° C por 45 s y 72° C por 1 min. A continuación se incubaron una vez a 72° C por 7 min. La amplificación por PCR se realizó en un termociclador BioRad. La décima parte del volumen de reacción se utilizó para el análisis por electroforesis en un gel de agarosa al 2.5%. Luego de la digitalización de la imagen, se realizó densitometría tomando como referencia la intensidad de la banda amplificada de  $\beta$ -actina y se analizó con el programa SigmaPlot.

### *Inmunohistoquímica*

Para determinar la presencia de la proteína RAR  $\beta$ 2 en las biopsias de los pacientes, se hicieron cortes de 4  $\mu$ m de las muestras proporcionadas por los departamentos de Patología del INCan y el INER. Los cortes histológicos fueron adheridos a portaobjetos con poli-L-lisina. Las muestras fueron deparafinadas inicialmente con temperatura (65° C a baño maría en un baño de agua AquaaBath<sup>®</sup>) y después por inmersión en xileno (J.T. Baker<sup>®</sup>) durante 12 min. Posteriormente las muestras fueron hidratadas en una solución 1:1 de xileno-etanol por 2 min, seguida de etanol al 90%, 80% y 70% por 2 min en cada incubación, hasta llegar a agua bidestilada por 5 min. Las muestras se incubaron en citrato de sodio 10 mM pH 6.0 a 95°C durante 10 min y posteriormente en la misma solución a temperatura ambiente durante 20 min. En seguida, las muestras se lavaron 3 veces con agua destilada durante 10 min y se incubaron por 10 minutos con la solución de Bloqueo de Peroxidasa (kit EnVision+ System-HRP, DAKOCytomation<sup>®</sup>). Las muestras se lavaron 3 veces con PBS

( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, NaCl 137 mM, pH 7.5) y se incubaron toda la noche en una cámara húmeda a 4° C con una dilución 1:10 del anticuerpo policlonal de conejo anti-RAR (H-55, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) con BSA al 1% en PBS. Transcurrido ese tiempo, las muestras se lavaron en PBS-Tween-20 al 0.1% por 10 min y en PBS por 5 min. En seguida se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda con un Polímero marcado con peroxidasa y acoplado a anticuerpos anti-conejo (EnVision+ System-HRP, DAKOCytomation®). El complejo antígeno-anticuerpo se reveló con la solución de diaminobenzidina (EnVision+ System-HRP, DAKOCytomation®) hasta un máximo de 5 min o antes al observar señal al microscopio de luz. Las muestras se lavaron 10 min con agua bidestilada, los núcleos se contratiñeron con hematoxilina y se lavaron 10 min con PBS. Finalmente los tejidos se deshidrataron incubando por 2 min en soluciones con concentraciones crecientes de alcohol (del 70%, 80%, 90% y alcohol absoluto) por 2 min en cada baño, nuevamente, y finalmente en xileno, para cubrirlas con histomount (Zymed®) y cubreobjetos. Los resultados se analizaron en un microscopio de luz y se tomaron fotografías.

### *Análisis Estadístico*

Con propósitos descriptivos, las variables continuas fueron resumidas en medias aritméticas, medianas y desviaciones estándar (error) y las variables categóricas como proporciones con 95% de intervalo de confianza. Para la comparación inferencial se utilizó la prueba t de Student o la U de Mann-Whitney, de acuerdo a la distribución de los datos (normal y anormal), determinada por la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se usaron la Chi cuadrada o la prueba exacta de Fisher para calcular la significancia entre las variables categóricas. La significancia estadística y las variables significantes limítrofes ( $p < 0.1$ ) fueron incluidas en análisis de regresión logística multivariado. La supervivencia global fue medida desde el día del diagnóstico histológico hasta la fecha de muerte o su última visita, analizado con la técnica de Kaplan-Meier y comparando los subgrupos mediante la prueba log-rank. Para el análisis de la curva de supervivencia, todas las variables fueron dicotómicas. Se realizó ajuste para los confundidores probables mediante el análisis de regresión multivariado. La significancia estadística se determinó con  $p < 0.05$  con prueba de 2 colas. Se empleó la versión 16 del paquete SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, E.U.A.) para analizar los datos.

## ***INFRAESTRUCTURA***

Se tuvo acceso a equipo básico para biología molecular en el Laboratorio de Oncología Experimental en el Área de Investigación del INCan, a cargo del Dr. Oscar Gerardo Arrieta Rodríguez del Departamento de Oncología Médica, Subdirección de Medicina Interna y la Dra. Elena Aréchaga Ocampo, de la Subdirección de Investigación Básica del INCan, con la colaboración de la Dra. Claudia Haydée González de la Rosa, investigadora de la UAM Cuajimalpa, para el análisis estadístico de los expedientes médicos y la obtención de ácidos nucleicos a partir de las biopsias de cada paciente, así como para la realización de las inmunohistoquímicas.

## RESULTADOS Y ANÁLISIS

Se analizaron a 112 pacientes de manera prospectiva, entre Marzo del 2005 hasta Marzo del 2008, las características generales de la población estudiada se resumen en la Tabla 1. Se revisaron de manera individualizada las características de los hombres y mujeres, la población masculina representó el 54.46% (61 casos) del total, la edad media fue de  $59.41 \pm 1.12$ , la mayor parte de los tumores fue de histología Adenocarcinoma 68.8% (77 casos), seguido de los Epidermoides, 20.5% (23 casos). El antecedente de tabaquismo, un factor importante en la carcinogénesis de esta patología, fue más prevalente en el género masculino, 85.2%, comparado con solo 1/3 de la mujeres que fumaban; de manera global, el tabaquismo se encontraba como antecedente en 62.5% de todos los pacientes del estudio. El estado general al momento del diagnóstico y entrada al estudio era adecuado en la mayoría de los pacientes para considerar su tratamiento, los pacientes con K 70 era el 58.9% del total (66 casos). Las etapas clínicas consideradas eran la EC IIIB y IV de la AJCC, en el 77.7% (87 casos) de los pacientes se presentaron con enfermedad metastásica y el resto de los pacientes con etapa clínica IIIB (25 casos).

Dentro de los estudios iniciales, se determinó el ACE (Antígeno Carcinoembrionario), un marcador tumoral que se encuentra importantemente relacionado con el riesgo de metástasis a SNC, encontrándose elevado en la mayoría de los pacientes en los que se determinó con una media de  $80.40 \pm 2.74$  (con rangos de 0.4 a 2464 ng/ml), sin diferencias entre géneros, siendo su valor normal  $< 8$  ng/ml.

Con respecto al tratamiento, las características se describen en la Tabla 2. Los pacientes se encontraban aleatorizados a recibir quimioterapia  $\pm$  ácido retinoico, los pacientes que recibieron ácido retinoico fueron 54 casos (48.2%), la mayor parte de los paciente completó 5 a 6 ciclos de tratamiento (56.3%, 63 casos) y solo una quinta parte de los pacientes recibió entre uno y dos ciclos de tratamiento. Dentro del brazo de tratamiento con ATRA no hubo diferencias entre géneros (42.6% vs. 57.4%,  $p = 0.546$ ).

La edad en ambos grupos, al igual que el estado general, tabaquismo se encontraba sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). En cuanto a la histología, los Adenocarcinomas fueron los más comunes en ambos brazos, 68.4% en brazo de placebo y 70.4% en ATRA ( $p = 0.813$ ). En cuanto a la expresión de RAR 2 detectada por RT-PCR, no se encontró diferencias entre ambos grupos ( $p = 0.490$ ). Es importante destacar que a pesar de la progresión, las condiciones de los pacientes permitieron que se recibiera una segunda línea de tratamiento en el 42% de los casos.

En total, se evaluó la presencia de RAR 2 en las biopsias de 68 pacientes mediante Inmunohistoquímica o RT-PCR o ambas, en 44 pacientes se logró la extracción de ARNm y se les realizó RT-PCR y en 75 laminillas de 60 pacientes se les realizó la técnica de IHQ además de 1 control. De estos pacientes a 46 se les realizó ambas técnicas para evaluar la expresión de RAR 2.

Posterior a la estandarización de la técnica de la Inmunohistoquímica se realizó la tinción de 75 laminillas de pacientes en los cuales se pudieron realizar los cortes, ya que hay que aclarar que muchos de los pacientes llegan al INCan con diagnóstico y solo se contaba con laminillas en el Departamento de Patología, tomándose como positivo aquellas que tuvieran ++ de positividad en la tinción para RAR 2. Se analizaron 48 muestras de Adenocarcinoma (64% de las muestras), 19 casos de Carcinoma Epidermoide (25.3%), 8 casos de Carcinomas no diferenciados (10%) y se consiguió a través del Departamento de Patología del INER una muestra de tejido pulmonar de una necropsia, sin diagnóstico oncológico, que fue el control de las tinciones, se tiñeron 10 laminillas de la muestra control. Los resultados de las tinciones se describen en la Tabla 3. Los Adenocarcinomas mostraron positividad (++ y +++) en el 21% de los casos (11 laminillas); en los de histología epidermoide sólo una cuarta parte mostró positividad (5 casos), al igual los no diferenciados (2 casos). Destacando que 3/4 partes de las laminillas se consideraron negativas, sin diferencia entre las histologías.

Los resultados de la RT-PCR se encuentran en la Tabla 4. Se procesaron 48 muestras, correspondientes a 44 pacientes, para la obtención del ARN total, sin embargo

en 3 de ellas no se pudo obtener por lo escaso de la muestra (indicadas como no valorables, 6.2% de las muestras y 6.8% de los pacientes), sólo una muestra fue negativa (2.08% de las muestras y 2.2% de los pacientes), en el resto de las muestras (44) se pudo detectar el ARNm de RAR  $\alpha$  2 (91.6% de las muestras y 90.9% de los pacientes). Cuatro pacientes tenían muestra de ARNm y cDNA duplicado, por lo que se realizaron 2 RT-PCR para control mismo del estudio. Uno de estos pacientes, con las muestras 25 y 49, tenía biopsia de la lesión pulmonar primaria que reportó Adenocarcinoma y se obtuvo tejido de metástasis de SNC con mismo reporte de patología, que también fue positiva la expresión de RAR  $\alpha$  2 por RT-PCR.

En la Tabla 4 se muestran los resultados globales de las RT-PCR, las que se encontraban positivas en la mayoría de los casos, solo tres casos no fueron evaluables, destacando que no fue posible la extracción de una cantidad suficiente de ARNm de los bloques de parafina, y una sola muestra mostró negatividad de RAR  $\alpha$  2, con adecuada expresión del control de  $\beta$ -actina.

Se trató de hacer una correlación entre la positividad por IHQ y RT-PCR, mostrada en la Tabla 5, sin embargo, no existe una correlación ya que la RT-PCR fue positiva independiente de la positividad o negatividad de la inmunohistoquímica y del tipo histológico.

En la Tabla 6 se describen los resultados del tratamiento. La respuesta global fue significativamente mejor en los pacientes del grupo de ATRA, 53.7% vs. 16.1% en placebo ( $p < 0.0001$ ), con mejor respuesta global después de 2 ciclos de tratamiento ( $p < 0.0001$ ), no hubo diferencias en el retraso de tratamiento en ninguno de los dos grupos ( $p = 0.632$ ), así como tampoco en la reducción de dosis ( $p = 0.886$ ). Se mantuvo una intensidad de  $96.21 \pm 12.30 \text{ mg/m}^2$  en el grupo de ATRA y de  $85.35 \text{ mg/m}^2$  en placebo, sin diferencias estadísticas, al igual que la intensidad de paclitaxel en que tampoco hubo diferencias.

La tolerancia al tratamiento fue adecuada en ambos grupos, la toxicidad hematológica grado 3-4 no mostró diferencias ( $p = 0.98$ ) en ningún grupo; de manera similar se comportó la toxicidad gastrointestinal. Si se presentó menor neurotoxicidad grado 3 en el grupo de ATRA vs. placebo (3.8% vs. 12.7%,  $p = 0.029$ ).

Un punto destacado de mencionar es que los pacientes en el grupo de ATRA tuvieron una segunda línea de tratamiento con mayor frecuencia que los de grupo placebo, 54.7% vs. 31% ( $p = 0.029$ ), sin diferencias entre los grupos en cuanto a una tercera línea de tratamiento ( $p = 0.165$ ).

En el análisis univariado (Tabla 7) se encontró que los factores asociados a respuesta global fueron la etapa clínica, con respuestas en EC IIIB de 56% vs. 28.2% en EC IV ( $p = 0.011$ ) y el tratamiento con ATRA con respuestas de 53.7% vs. 16.1% en grupo de placebo ( $p < 0.0001$ ), sin encontrarse diferencias con respecto a género, edad, antecedente de tabaquismo, histología y expresión de RAR 2 determinada por RT-PCR. Evidenciándose que el factor de más peso para la respuesta es el tratamiento en un análisis multivariado, como se muestra en la Tabla 8.

## DISCUSIÓN

En este estudio pionero se documenta la relación entre la respuesta al tratamiento con quimioterapia en los pacientes con Cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado (etapas clínicas IIIB y IV) y la administración de ATRA. Además, se intentó relacionar esta respuesta a la expresión del RAR  $\alpha$ , como un efector directo del ATRA, con los antecedentes de que se había asociado un incremento de la respuesta a la quimioterapia cuando se adicionaban retinoides; sin embargo, no se había intentado realizar la correlación con los niveles de expresión RAR  $\alpha$ .

Se encontró una fuerte asociación con significancia estadística en cuanto a la respuesta y el tratamiento con ATRA ( $p < 0.0001$ ), sin que esto se viese influenciado por otros factores como el género, edad, histología o tabaquismo. Sin embargo, su asociación con la expresión con RAR  $\alpha$  no fue clara por IHQ y/o RT-PCR ( $p > 0.05$ ), ya que la mayor parte de las IHQ fueron negativas (3/4 partes de las muestras), contrario a las RT-PCR, donde la inmensa mayoría fue positiva (>90%) sin ninguna correlación entre los resultados de las pruebas.

La positividad de las RT-PCR es un marcado factor de confusión, ya que no estamos observando la verdadera relación entre la expresión de RAR  $\alpha$  tumoral y respuesta al tratamiento, porque dicha expresión debería de estar acorde con la expresión determinada mediante la IHQ, que en otros estudios se ha hecho mediante hibridización *in situ*, con positividad del 26%<sup>44</sup>, lo que concuerda con lo que se obtuvo con la IHQ, ya que esta expresión teóricamente se debe de encontrar perdida o disminuida, comparada con los tejidos no tumorales, por los efectos relacionados directamente a la carcinogénesis, como son la pérdida de expresión, pérdida genética y/o cambios epigenéticos como la hipermetilación del promotor de RAR  $\alpha$  y/o desacetilación de histonas<sup>45</sup>, incluso se ha encontrado mutación hasta del 100% de los CPCNP, con delección 3q<sup>46</sup>. Hay que tomar en cuenta los factores que pudiesen haber influido en los resultados de la RT-PCR, principalmente la alta positividad que tienen otros tejidos no neoplásicos en las muestras analizadas y de las que se obtuvo el ARNm y cDNA, y esta determinación se ha logrado determinar gracias a la validación externa de las laminillas a las que se les realizó la IHQ, por la Dra. María Eugenia Vázquez Manríquez del Departamento de Patología del INER, que a la fecha de hoy, en las laminillas analizadas y validadas, ha determinado una alta positividad del tejido estromal, macrófagos alveolares, eritrocitos y otras estructuras peritumorales, y que la positividad en los tumores es realmente baja, por lo que se debería de valorar a futuro la realización de microdissección en las muestras tumorales a analizar, y después de ésta, realmente se valoraría la verdadera positividad del RAR  $\alpha$  evitando analizar tejido naturalmente positivo. Aún están pendientes los resultados finales de esta validación, por lo que se debe de tomar con reserva estos datos preliminares.

Es importante destacar las respuestas obtenidas en el grupo de ATRA, lo que permitió impactar en la SVLP y SVG. Por otro lado, en el grupo de tratamiento con ATRA, se mantuvo la intensidad de dosis del Cisplatino y del Paclitaxel sin incrementar esto la toxicidad, ya que no hubo diferencias en la toxicidad hematológica ( $p = 0.95$ ) y gastrointestinal ( $p = 0.0810$ ), lo que sí tuvo un peso estadístico fue la diferencia en neuropatía grado 3, con disminución marcada en el grupo de ATRA 3.8% vs. 12.7% ( $p = 0.029$ ). Las segundas líneas de tratamiento en cáncer pulmonar suelen estar destinadas a pacientes con buen estado general después de la progresión de la enfermedad, esto en alusión a que los pacientes con tratamiento con ATRA recibieron una segunda línea de tratamiento en 54.7% vs. 31% ( $p = 0.029$ ) en el grupo placebo, indicando de manera directa que el tratamiento con ATRA incrementa el beneficio clínico del tratamiento en estos pacientes, manteniéndolos en mejor estado general, aunque ya no hubo diferencias en los pacientes cuando recibieron una tercera línea de tratamiento ( $p = 0.165$ ).

Una de las interrogantes que deja este análisis es la pregunta inicial, es decir, ¿realmente se relaciona la expresión de RAR 2 con la respuesta al tratamiento con quimioterapia y retinoides? O si este efecto, demostrado en la supervivencia esta mediado por otros mecanismos.

¿Cuáles son los otros mecanismos o cuáles las hipótesis alternativas que se deberán de explorar para poder determinar el efector de la respuesta?, un punto importante es indagar el papel que tiene el RAR 2 como “switch” en el encendido de otras vías a través de moléculas como AP-1 (Activator Protein-1) y PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- ) que permiten a través de la regulación y unión con otras moléculas como Cox2 la inhibición de la apoptosis; hay reportes en la literatura en donde se ha logrado correlacionar la expresión de RAR 2 y Cox2, lo que evidencia un curso más agresivo de la enfermedad <sup>44,47</sup>. Además, los retinoides juegan un papel importante en la dinámica del estroma, se ha demostrado que tiene la capacidad de regular proteínas como las metaloproteinasas de matriz, TGF- y proteínas del ciclo células como las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclina 1, como p21 o p16 <sup>48</sup>.

Otros investigadores han logrado demostrar que el tratamiento con ácido retinoico a nivel de cultivos celulares de cáncer de mama incrementa la expresión de proteínas como CTAG1 y CTAG2, moduladoras de la respuesta inmune innata contra los tumores, y suprime algunas proteínas tumorales <sup>49</sup>.

## CONCLUSIONES

En conclusión, logramos demostrar el efecto benéfico de la combinación ATRA-quimioterapia de primera línea en pacientes con cáncer pulmonar avanzado, pero la otra parte de la pregunta de investigación, la que corresponde a la relación entre la expresión de RAR 2 y las respuestas tan importantes obtenidas con ATRA, no nos fue posible responder. Sin embargo, la evidencia de su beneficio clínico abre una puerta importante en la investigación, lo que permitiría a futuro determinar que pacientes se benefician de un tratamiento más selectivo y con mayor beneficio en primera línea de tratamiento, sin que esto incremente la toxicidad, además permitiendo que más pacientes mantengan su status funcional óptimo, lo que permitiría en caso de progresión tener mayor probabilidad de recibir una segunda línea, que en la actualidad su uso queda aún limitado por el costo, por lo que se plantea la posibilidad de realización de microdissección en muestras tumorales para determinar la expresión de RAR 2, además establecer la expresión en nuestra población en tejidos sanos, haciendo determinaciones en fumadores y no fumadores, ya que al parecer la nicotina es un importante regulador negativo de la expresión de los receptores de retinoides en general y tratar de investigar el papel que tienen otros reguladores negativos en la respuesta al tratamiento como la isoforma de RAR 4, proteínas de la familia de apoptosis como BCL2 y BAX.

## TABLAS

<b>TABLA 1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN</b>							
		<b>MUJERES</b>		<b>HOMBRES</b>		<b>TOTAL</b>	
<b>N</b>		51		61		112	
<b>EDAD MEDIA</b>		57.31±1.20		61.18 ±1.02		59.41 ± 1.12	
<b>ACE BASAL</b>		80.66 ± 2.12		80.20 ± 3.21		80.40 ± 2.74	
<b>ÍNDICE TABÁQUICO</b>		4.81 ± 11.37		21.58 ± 21.8		13.97 ± 19.62	
		n	%	n	%	n	%
<b>TABAQUISMO</b>	SI	18	35.3%	52	85.2	70	62.5%
	NO	33	64.7	9	14.8	42	37.5%
<b>KARNOSFKY</b>	70	32	62.7	34	55.7	66	58.9
	>70	19	37.3	27	44.3	46	41.1
<b>HISTOLOGIA</b>	ADENOCARCINOMA	40	78.4	37	60.7	77	68.8
	EPIDERMOIDE	10	19.6	13	21.3	23	20.5
	INDIFERENCIADIO	1	2.0	10	16.4	11	9.8
	NO DETERMINADO	0	0	1	1.6	1	0.9
<b>ESTADIO CLINICO</b>	IIIB	13	25.5	12	19.7	25	22.3
	IV	38	74.5	49	80.3	87	77.7
<b>TRATAMIENTO</b>	ACIDO RETINOICO	23	45.1	31	50.8	54	48.2
	PLACEBO	30	49.2	28	54.9	58	51.8
<b>TRATAMIENTO DE SEGUNDA LINEA</b>		21	41.2	26	42.6	47	42
<b>EXPRESION DE RAR 2</b>	RT-PCR	20	90.47	20	86.9	40	90.9
	IHQ	8	13.3	5	8.33	13	21.6

**TABLA 2**  
**CARACTERISTICAS DE LA POBLACION EN LOS BRAZOS DE TRATAMIENTO**

VARIABLE	GRUPO	PLACEBO	ACIDO RETINOICO	P
		%	%	
<b>GENERO</b>	MUJERES	48.3	42.6	0.546
	HOMBRES	51.7	57.4	
<b>EDAD</b>	60 AÑOS	48.3	55.6	0.441
	>60 AÑOS	51.7	44.4	
<b>KARNOFSKY</b>	70	65.5	51.9	0.142
	>70	35.5	48.1	
<b>TABAQUISMO</b>	SI	37	63	0.922
	NO	37.9	62.1	
<b>HISTOLOGIA</b>	ADENOCARCINOMA	68.4	70.4	0.813
	OTROS	31.6	29.6	
<b>ESTADIO CLINICO</b>	IIIB	15.5	29.0	0.632
	IV	84.5	70.4	
<b>EXPRESIÓN DE RAR- 2</b>	RT-PCR	85.7	88.9	0.490

**TABLA 3  
DETERMINACION DE LA EXPRESION DE RAR 2 POR  
INMUNOHISTOQUÍMICA**

<b>EXPRESIÓN DE RAR<math>\beta</math>2</b>	<b>IHC</b>
<b>GRADO DE POSITIVIDAD</b>	<b>n (%)</b>
<b>TEJIDO PULMONAR NORMAL (control)</b>	
<b>Positivo(++)</b>	1 (10 repeticiones)
<b>ADENOCARCINOMAS (n = 48)</b>	
<b>Negativo (-)</b>	<b>29 (60.4%)</b>
<b>Positivo (+)</b>	<b>8 (16.6%)</b>
<b>Positivo (++)</b>	<b>4 (8.3%)</b>
<b>Positivo (+++)</b>	<b>7 (14.5%)</b>
<b>Positivos (++ y +++)</b>	<b>11 (21.8%)</b>
<b>EPIDERMOIDES (n = 19)</b>	
<b>Negativo (-)</b>	<b>14 (73.6%)</b>
<b>Positivo (+)</b>	<b>0 (0)</b>
<b>Positivo (++)</b>	<b>0 (0)</b>
<b>Positivo (+++)</b>	<b>5 (26.3%)</b>
<b>Positivos (++ y +++)</b>	<b>5 (26.3%)</b>
<b>OTROS (carcinomas no diferenciados) (n = 8)</b>	
<b>Negativo (-)</b>	<b>5 (62.5%)</b>
<b>Positivo (+)</b>	<b>1 (12.5%)</b>
<b>Positivo (++)</b>	<b>0 (0)</b>
<b>Positivo (+++)</b>	<b>2 (25%)</b>
<b>Positivos (++ y +++)</b>	<b>2 (25%)</b>

**TABLA 4.  
RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN DE RAR 2 POR RT-PCR**

<b>NÚMERO</b>	<b>NUMERO DE PROTOCOLO</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>HISTOLOGIA</b>
1	1	Positivo	Adenocarcinoma
2	2	Positivo	Epidermoide
3	3	Negativo	Adenocarcinoma
4	4	Positivo	Adenocarcinoma
5	5	No valorable	Adenocarcinoma
6	6	Positivo	Adenocarcinoma
7	7	Positivo	Epidermoide
8	9	Positivo	Adenocarcinoma
9	10	Positivo	Adenocarcinoma
10	12	Positivo	Epidermoide
11	13	No valorable	No diferenciado
12	14	No valorable	Epidermoide
13	16	Positivo	Epidermoide
14	17	Positivo	Adenocarcinoma
15	19	Positivo	Adenocarcinoma
16	21	Positivo	Adenocarcinoma
17	22	Positivo	Adenocarcinoma
18	23	Positivo	Adenocarcinoma
19	27	Positivo	No diferenciado
20	28	Positivo	Adenocarcinoma
21	29	Positivo	Adenocarcinoma
22	30	Positivo	Epidermoide
23	31	Positivo	Adenocarcinoma
24	32	Positivo	No diferenciado
25	33	Positivo	Epidermoide
26	34	Positivo	Adenocarcinoma
27	38	Positivo	Adenocarcinoma
28	39	Positivo	Adenocarcinoma
29	40	Positivo	Adenocarcinoma
30	41	Positivo	Adenocarcinoma
31	42	Positivo	No diferenciado
32	43	Positivo	Adenocarcinoma
33	44	Positivo	Adenocarcinoma
34	45	Positivo	Epidermoide
35	46	Positivo	No diferenciado
36	47	Positivo	Adenocarcinoma
37	49	Positivo	Adenocarcinoma
38	50	Positivo	Adenocarcinoma
39	51	Positivo	No diferenciado
40	52	Positivo	Epidermoide
41	11 y 20	Positivo	Adenocarcinoma
42	15 y 18	Positivo	Adenocarcinoma
43	25 /49	Positivo	Adenocarcinoma
44	35 y 36	Positivo	No diferenciado

**TABLA 5.  
CORRELACION ENTRE INMUNOHISTOQUIMICA Y RT-PCR DE  
PACIENTES ANALIZADOS**

<b>NUMERO DE PACIENTE</b>	<b>NUMERO SECUENCIAL DE PROTOCOLO</b>	<b>IHQ (0,+ , ++,+++, NV)</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>HISTOLOGIA</b>
1	1	Positivo	+++	Adenocarcinoma
2	2	Positivo	+++	Epidermoide
3	3	Negativo	NV	Adenocarcinoma
4	4	Positivo	0	Adenocarcinoma
5	5	No valorable	+++	Adenocarcinoma
6	6	Positivo	+++	Adenocarcinoma
7	7	Positivo	0	Epidermoide
8	9	Positivo	0/0	No diferenciado
9	10	Positivo	0	Adenocarcinoma
10	12	Positivo	0	Adenocarcinoma
11	13	Positivas	0	Adenocarcinoma
12	14	Positivo	++	Epidermoide
13	16	No valorable	0	No diferenciado
14	17	No valorable	0	Epidermoide
15	19	Positivo	+	Adenocarcinoma
16	21	positivo	+	Epidermoide
17	22	Positivo	Sin muestra	Adenocarcinoma
18	23	Positivo	0	Adenocarcinoma
19	27	Positivo	+	Adenocarcinoma
20	28	Positivo	0	Adenocarcinoma
21	29	Positivo	Sin muestra	Adenocarcinoma
22	30	Positivo	0	Adenocarcinoma
23	31	Positivo	+++	No diferenciado
24	32	Positivo	+++	Adenocarcinoma
25	33	Positivo	+	Adenocarcinoma
26	34	Positivo	0/+++	Epidermoide
27	38	Positivo	0	Adenocarcinoma
28	39	Positivo	0	Adenocarcinoma
29	40	Positivo	0	No diferenciado
30	41	Positivo	+++	Epidermoide
31	42	Positivo	0	Adenocarcinoma
32	43	positivo	0	Adenocarcinoma
33	44	Positivo	+ /+++	No diferenciado
34	45	Positivo	0	Adenocarcinoma
35	46	Positivo	Sin muestra	Adenocarcinoma
36	47	Positivo	0	Adenocarcinoma
37	49	Positivo	0	Adenocarcinoma
38	50	Positivo	Sin muestra	Adenocarcinoma
39	51	Positivo	0	No diferenciado
40	52	Positivo	Sin Muestra	Adenocarcinoma
41	54	Positivo	+	Epidermoide
42	55	Positivo	0	Adenocarcinoma
43	56	Positivo		Adenocarcinoma

<b>44</b>	<b>57</b>	Positivo	Sin Muestra	No diferenciado
<b>45</b>	<b>58</b>	Positivo	+	Epidermoide
<b>46</b>	<b>59</b>	Sin ARNm	0	Epidermoide
<b>47</b>	<b>60</b>	Sin ARNm	0	Adenocarcinoma
<b>48</b>	<b>61</b>	Sin ARNm	0	No diferenciado
<b>49</b>	<b>62</b>	Sin ARNm	0	Epidermoide
<b>59</b>	<b>63</b>	Sin ARNm	0	Adenocarcinoma
<b>51</b>	<b>64</b>	Sin ARNm	+	Adenocarcinoma
<b>52</b>	<b>65</b>	Sin ARNm	++	Adenocarcinoma
<b>53</b>	<b>66</b>	Sin ARNm	0	Epidermoide
<b>54</b>	<b>67</b>	Sin ARNm	0	Epidermoide
<b>55</b>	<b>68</b>	Sin ARNm	0	Adenocarcinoma
<b>56</b>	<b>69</b>	Sin ARNm	0	Adenocarcinoma
<b>57</b>	<b>70</b>	Sin ARNm	+++	Epidermoide
<b>58</b>	<b>71</b>	Sin ARNm	0	Adenocarcinoma
<b>59</b>	<b>72</b>	Sin ARNm	+	Adenocarcinoma
<b>60</b>	<b>73</b>	Sin ARNm	+++	Adenocarcinoma
<b>61</b>	<b>75</b>	Sin ARNm	0	Adenocarcinoma
<b>62</b>	<b>76</b>	Sin ARNm	0/+++	Adenocarcinoma
<b>63</b>	<b>77</b>	Sin ARNm	0	Adenocarcinoma
<b>64</b>	<b>11 y 20</b>	Positivo	0	No diferenciado
<b>65</b>	<b>15 y 18</b>	Positivo	0	Adenocarcinoma
<b>66</b>	<b>25 /49</b>	Positivo	0	Adenocarcinoma
<b>67</b>	<b>35 y 36</b>	Positivo	+++	No diferenciado
<b>68</b>	<b>8 y 37</b>	Positivo	++	Adenocarcinoma

NV: No Valorable

**TABLA 6.  
RESULTADOS DE TRATAMIENTO EN LOS BRAZOS DE TRATAMIENTO Y TOXICIDAD**

	PLACEBO	ACIDO RETINOICO	P	
	%	%		
<b>RESPUESTA GLOBAL</b>	16.1	53.7	<i>&lt;0.0001</i>	
<b>RESPUESTA DESPUES DE 2 CICLOS DE QT</b>	16.1	57.4	<i>&lt;0.0001</i>	
<b>RETRASO DE TRATAMIENTO</b>	24.1	20.4	<i>0.632</i>	
<b>REDUCCIÓN DE DOSIS</b>	12.1	13.0	<i>0.886</i>	
<b>INTENSIDAD DE CISPLATINO</b>	85.35±22.71	96.21±12.30		
<b>INTENSIDAD DE PACLITAXEL</b>	142.8±4.18	145.05±5.79		
<b>LEUCOPENIA</b>	<b>GRADOS 1-2</b>	42.1	33.4	<i>0.95</i>
	<b>GRADOS 3-4</b>	5.3	1.9	
<b>NEUTROPENIA</b>	<b>GRADOS 1-2</b>	10.5	11.2	<i>0.98</i>
	<b>GRADOS 3-4</b>	12.3	11.2	
<b>NÁUSEA/VÓMITO</b>	<b>GRADOS 1-2</b>	38.6	25.2	<i>0.837</i>
	<b>GRADOS 3-4</b>	12.3	13	
<b>DIARREA</b>	<b>GRADOS 1-2</b>	12.3	16.2	<i>0.810</i>
	<b>GRADOS 3-4</b>	3.8	1.9	
<b>NEUROPATÍA</b>	<b>GRADOS 1-2</b>	34.5	54.8	<i>0.029</i>
	<b>GRADOS 3-4</b>	12.7	3.8	
<b>SEGUNDA LÍNEA DE TRATAMIENTO</b>		31.0	54.7	<i>0.029</i>
<b>TERCERA LINEA DE TRATAMIENTO</b>		6.9	15.1	<i>0.165</i>

<b>TABLA 7.</b>			
<b>FACTORES ASOCIADOS A RESPUESTA (ANÁLISIS UNIVARIADO)</b>			
<b>FACTOR</b>	<b>GRUPO</b>	<b>AU IC 95%</b>	<b>P</b>
<b>GÉNERO</b>	MUJERES	35%	0.913
	HOMBRES	34%	
<b>EDAD</b>	60 AÑOS		
	>60 AÑOS		
<b>TABAQUISMO</b>	SI	34.8	0.946
	NO	34.1	
<b>HISTOLOGÍA</b>	ADENOCARCINO MA	31.6	0.309
	EPIDERMOIDE	47.8	
	OTROS	27.3	
<b>ESTADIO CLÍNICO</b>	IIIB	56.0	0.011
	IV	28.2	
<b>TRATAMIENTO</b>	ACIDO RETINOICO	53.7	<0.0001
	PLACEBO	16.1	
<b>RETRASO DE QT</b>	SI	32.0	0.761
	NO	35.3	
<b>REDUCCIÓN DE QT</b>	SI	50.0	0.193
	NO	32.3	
<b>EXPRESION DE RAR 2</b>	IHQ POSITIVA	54.54	0.163
	NEGATIVA	44.4	
	RT-PCR	89.9	0.799

<b>TABLA 8.</b>			
<b>FACTORES ASOCIADOS A RESPUESTA (ANÁLISIS MULTIVARIADO)</b>			
	<b>HR</b>	<b>IC</b>	<b>P</b>
<b>KARNOFSKY 70</b>	0.71	0.296-1.704	0.444
<b>EDAD 60 AÑOS</b>	1.94	0.808-4.695	0.138
<b>TRATAMIENTO</b>	5.84	2.36-14.46	< 0.0001

# IMÁGENES

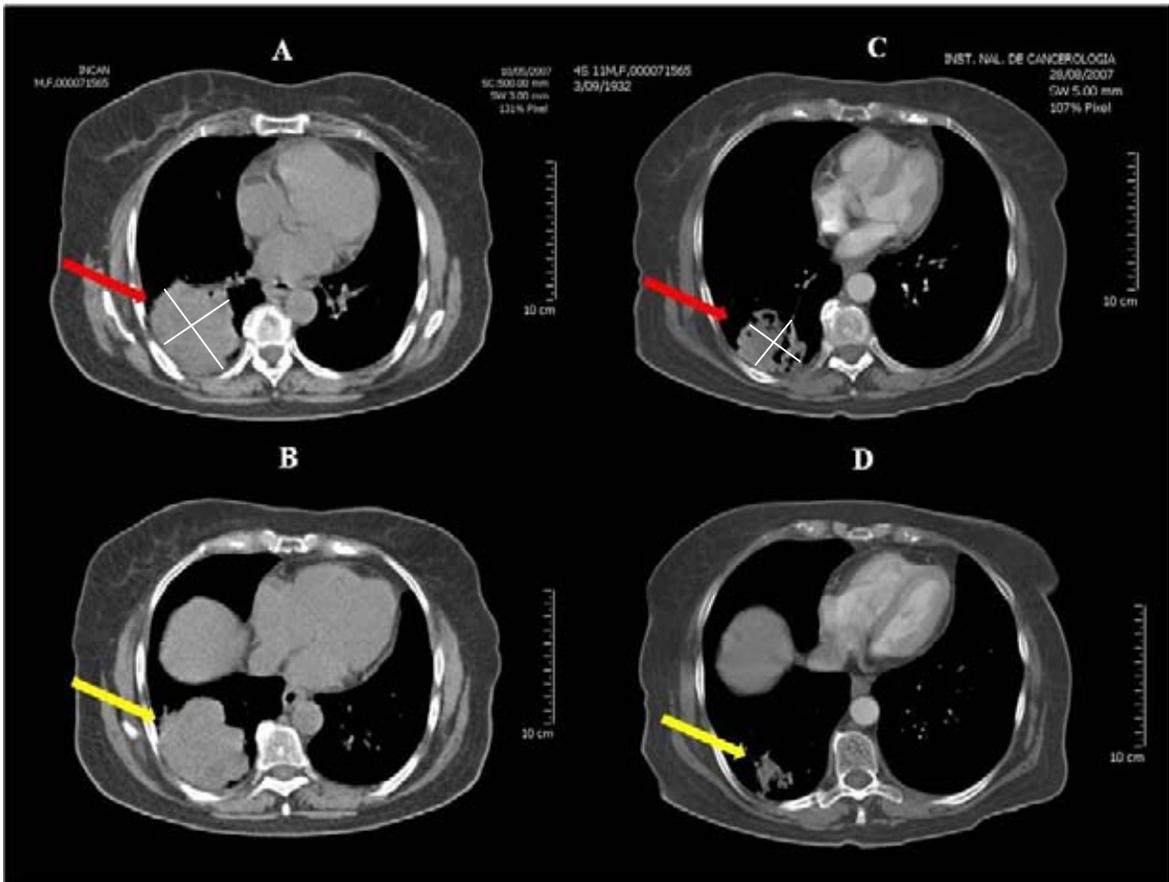


Imagen 1.

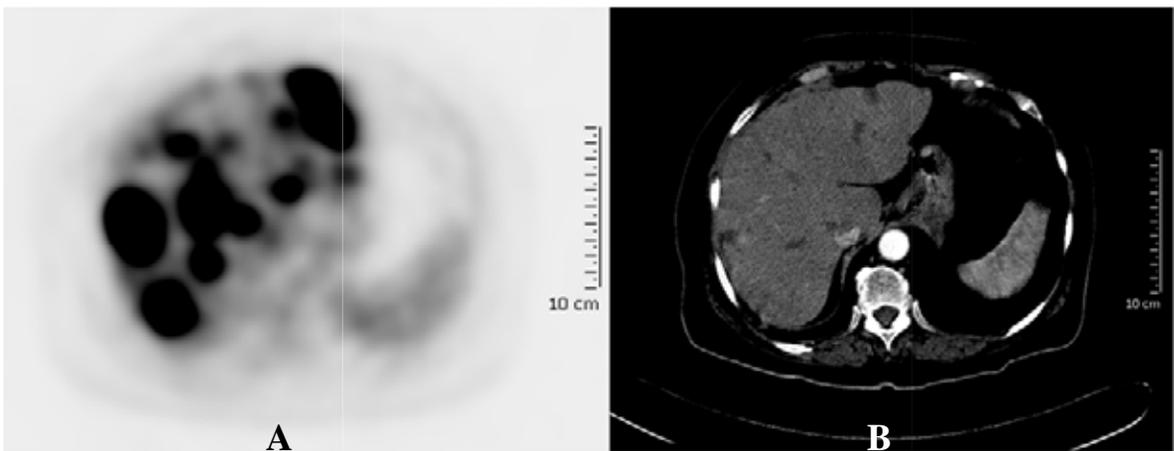
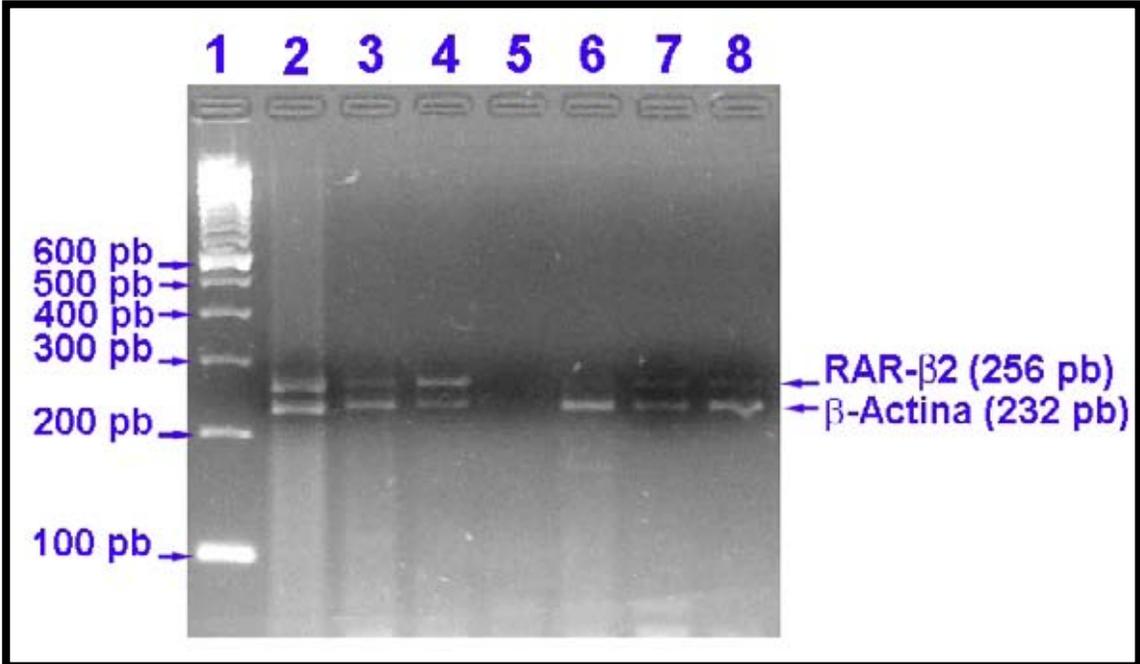
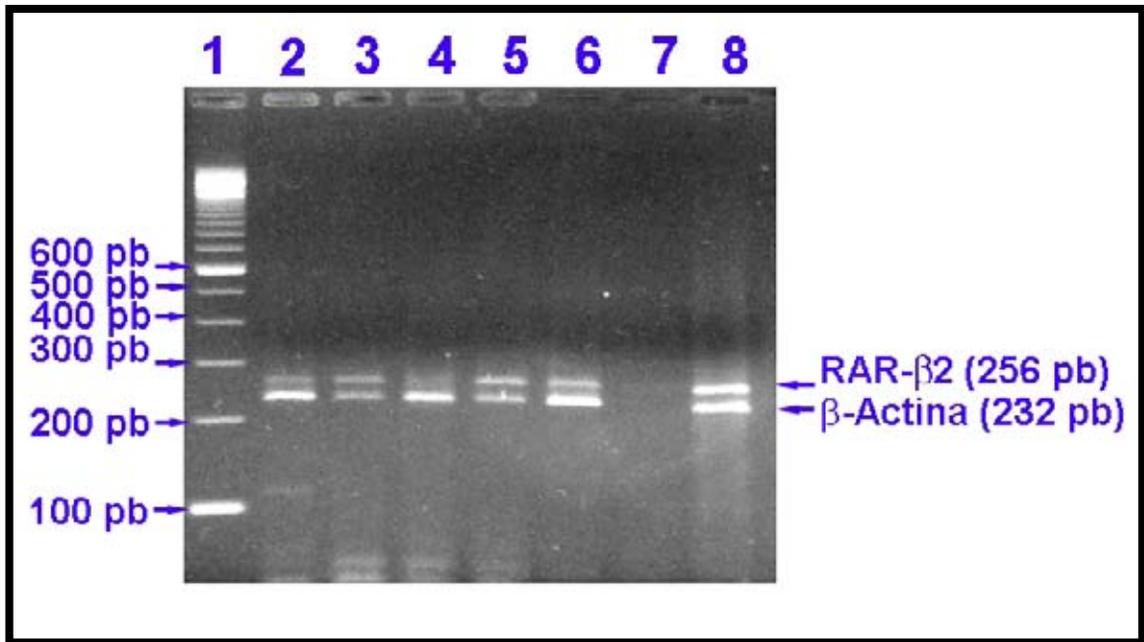
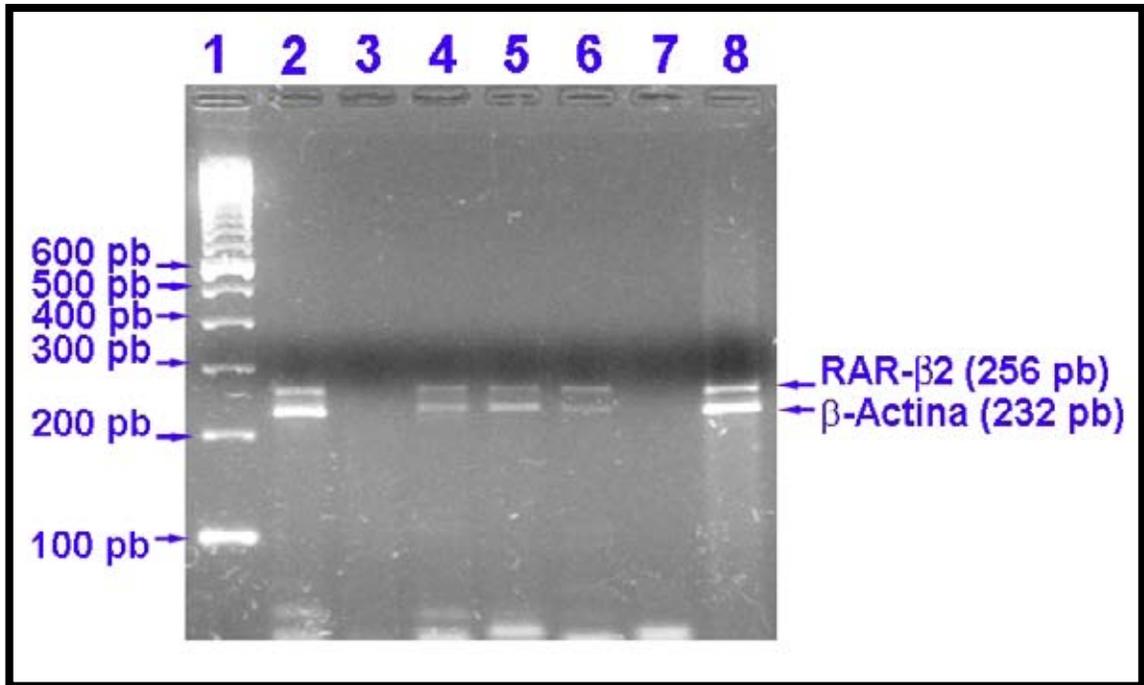
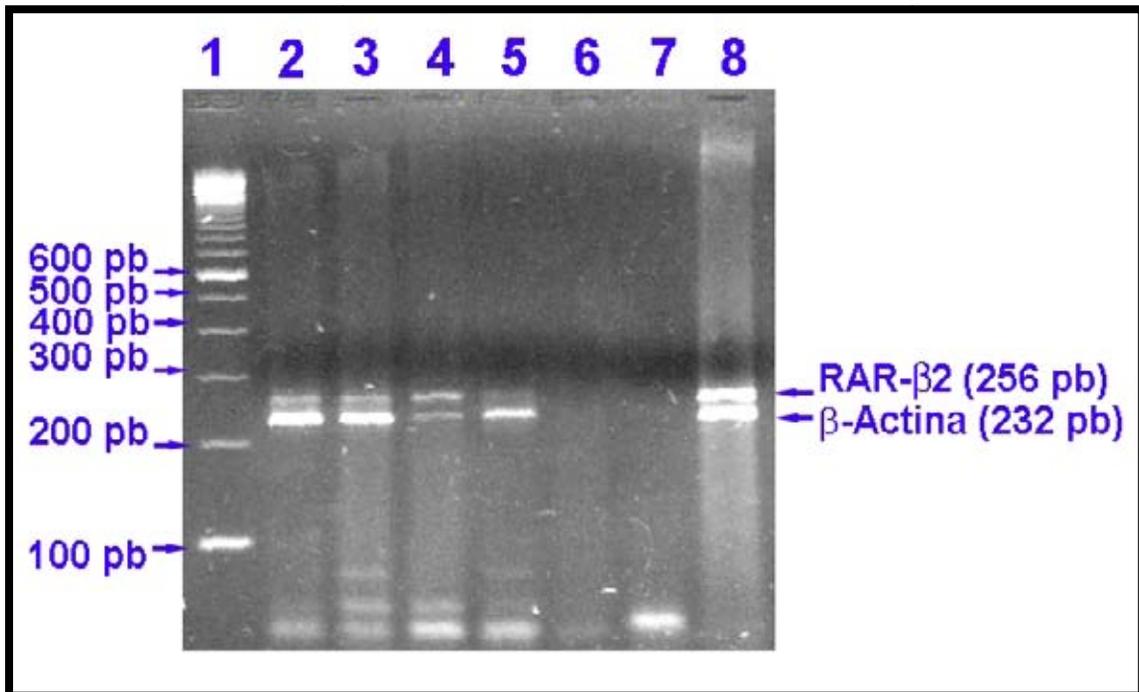


Imagen 2.

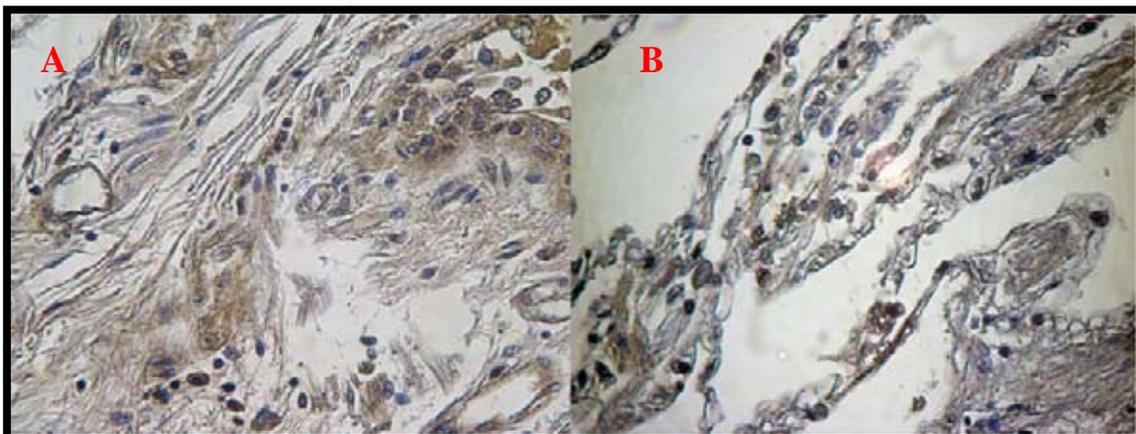




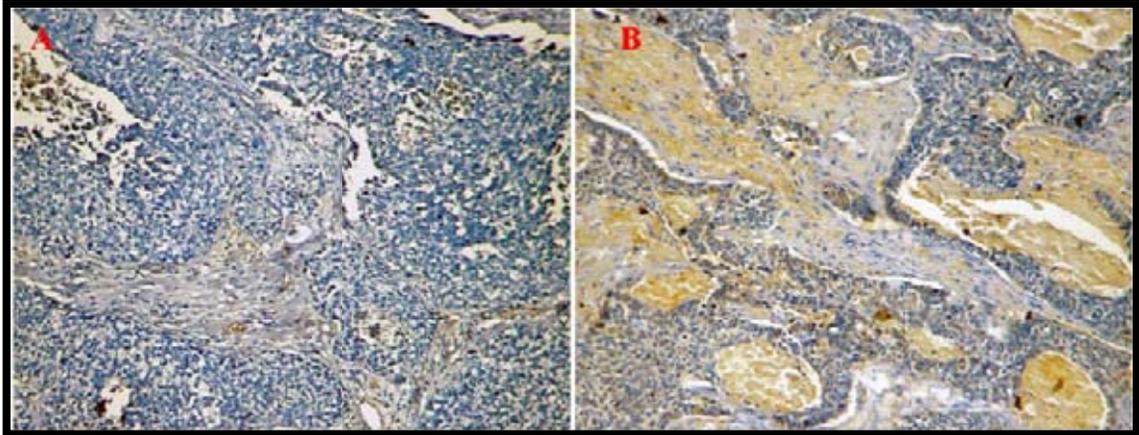


**Imagen 6**

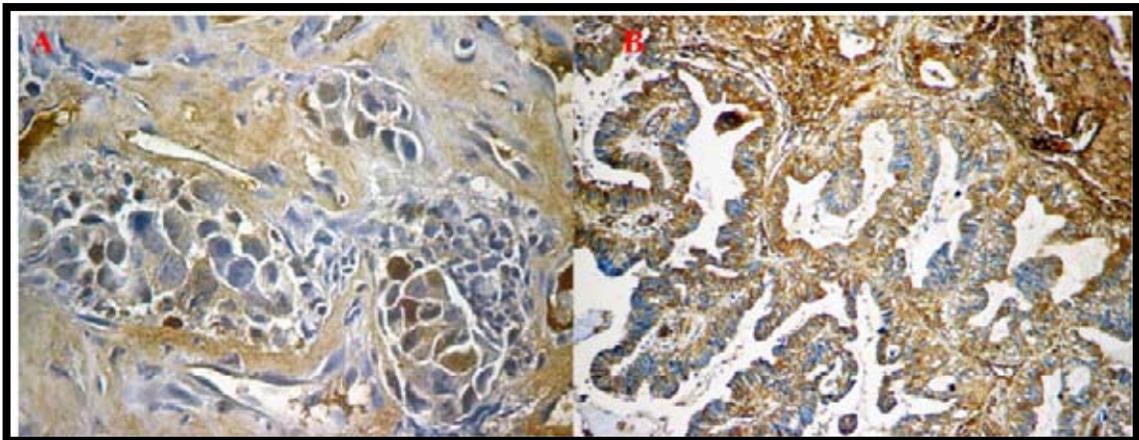
**Imágenes 3-6.** Geles de agarosa al 2.5%, teñidos con Bromuro de Etidio, representativos de las PCR de RAR  $\beta$ 2 realizadas con los cDNA obtenidos de las muestras tumorales de los pacientes. En todas las imágenes, el carril 1 corresponde al marcador de pares de bases (100 bp DNA ladder, Invitrogen) y el carril 8 al control positivo realizado en cDNA de línea celular de adenocarcinoma pulmonar que expresa abundantemente el RNAm de RAR  $\beta$ 2 (A549). Los carriles del 2 al 7 son muestras experimentales de diferentes pacientes. En todos los carriles se cargaron 10  $\mu$ l de la reacción de PCR. Con flechas se indica la posición de los amplicones esperados en cada reacción.



**Imagen 7.** En esta imagen se muestra una microscopía de luz de 2 laminillas diferentes del paciente control, con tinción de ++ para la IHQ y contratinción de los núcleos con hematoxilina, ambas (panel A y B) se observan a 40x.



**Imagen 8.** En el panel A se encuentra una tinción de IHQ sin positividad, las zonas de infiltración tumoral solo tiñeron los vasos, a 20x. En panel B se encuentra laminilla de paciente con positividad de + para IHQ a 20 x, las zonas de mayor tinción son aéreas de necrosis y estroma, las células tumorales solo tiñeron levemente.



**Imagen 9.** En ambos paneles se muestran imágenes de laminillas de pacientes, en panel A se marca positividad de ++ y en panel B se encuentra positividad de +++ para la IHQ contra RAR 2

## BIBLIOGRAFÍA

1. Choy H, Pass HI, Rosell R, et al: Lung Cancer, in Chang AE, Ganz PA, F. HD, et al (eds): *Oncology. An Evidence-Based Approach*. New York, Springer Science & Business Media, Inc., 2006, pp 545-621
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al: Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58;71-96.
3. Kelly K, Crowley J, Bunn PA, Jr., et al: Randomized Phase III Trial of Paclitaxel Plus Carboplatin Versus Vinorelbine Plus Cisplatin in the Treatment of Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Southwest Oncology Group Trial. *J Clin Oncol* 19:3210-3218, 2001
4. Scagliotti GV, De Marinis F, Rinaldi M, et al: Phase III Randomized Trial Comparing Three Platinum-Based Doublets in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 20:4285-4291, 2002
5. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, et al: Comparison of Four Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 346:92-98, 2002
6. Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV, et al: Randomized Phase III Trial of Pemetrexed Versus Docetaxel in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Previously Treated With Chemotherapy. *J Clin Oncol* 22:1589-1597, 2004

7. Shepherd FA, Dancey J, Ramlau R, et al: Prospective Randomized Trial of Docetaxel Versus Best Supportive Care in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Previously Treated With Platinum-Based Chemotherapy. *J Clin Oncol* **18:2095-2103, 2000**
8. Fossella FV, DeVore R, Kerr RN, et al: Randomized Phase III Trial of Docetaxel Versus Vinorelbine or Ifosfamide in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Previously Treated With Platinum-Containing Chemotherapy Regimens. *J Clin Oncol* **18:2354-2362, 2000**
9. Dragnev KH, Rigas JR, Dmitrovsky E: The Retinoids and Cancer Prevention Mechanisms. *Oncologist* **5:361-368, 2000**
10. Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P: Function of retinoid nuclear receptors: Lessons from Genetic and Pharmacological Dissections of the Retinoic Acid Signaling Pathway During Mouse Embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46:451-480, 2006**
11. Soriano AF, Helfrich B, Chan DC, et al: Synergistic Effects of New Chemopreventive Agents and Conventional Cytotoxic Agents against Human Lung Cancer Cell Lines. *Cancer Res* **59:6178-6184, 1999**
12. Pettersson F, Colston KW, Dalglish AG: Retinoic acid enhances the cytotoxic effects of gemcitabine and cisplatin in pancreatic adenocarcinoma cells. *Pancreas* **23:273-279, 2001**
13. Aebi S, Kroning R, Cenni B, et al: all-trans retinoic acid enhances cisplatin-induced apoptosis in human ovarian adenocarcinoma and in squamous head and neck cancer cells. *Clin Cancer Res* **3:2033-2038, 1997**

- 14.** Budman DR, Calabro A, W. K: Synergistic and antagonistic combinations of drugs in human prostate cancer cell lines in vitro. *Anticancer Drugs* **13:1011-1016, 2002**
- 15.** Satake K, Takagi E, Ishii A, et al: Anti-tumor effect of vitamin A and D on head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx* **30:403-412, 2003**
- 16.** Lovat PE, Oliverio S, Corazzari M, et al: Induction of GADD153 and Bak: novel molecular targets of fenretinide-induced apoptosis of neuroblastoma. *Cancer Lett* **197:157-163, 2003**
- 17.** de Cupis A, Semino C, Pirani P, et al: Enhanced effectiveness of last generation antiproliferative compounds vs. cisplatin on malignant pleural mesothelioma cell lines. *Eur J Pharmacol* **473:83-95, 2003**
- 18.** Shin DM, Glisson BS, Khuri FR, et al: Phase II and Biologic Study of Interferon Alfa, Retinoic Acid, and Cisplatin in Advanced Squamous Skin Cancer. *J Clin Oncol* **20:364-370, 2002**
- 19.** Esteva FJ, Glaspy J, Baidas S, et al: Multicenter Phase II Study of Oral Bexarotene for Patients With Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol* **21:999-1006, 2003**
- 20.** Khuri FR, Rigas JR, Figlin RA, et al: Multi-Institutional Phase I/II Trial of Oral Bexarotene in Combination With Cisplatin and Vinorelbine in Previously Untreated Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* **19:2626-2637, 2001**
- 21.** Edelman MJ, Smith R, Hausner P, et al: Phase II Trial of the Novel Retinoid, Bexarotene, and Gemcitabine Plus Carboplatin in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* **23:5774-5778, 2005**

- 22.** Nandan R: Promising results achieved with a combination of chemotherapy and two retinoids in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* **51:387-388, 2006**
- 23.** Caliaro MJ, Vitaux P, Lafon C, et al: Multifactorial mechanism for the potentiation of cisplatin (CDDP) cytotoxicity by all-trans retinoic acid (ATRA) in human ovarian carcinoma cell lines. *Br J Cancer* **75:333-340, 1997**
- 24.** Gronemeyer H, Gustafsson J-A, Laudet V: Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* **3:950-964, 2004**
- 25.** Allenby G, Bocquel MT, Saunders M, et al: Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90:30-34, 1993**
- 26.** Chambon P: A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J*. **10:940-954, 1996**
- 27.** Renaud JP, Rochel N, Ruff M, et al: Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* **378:681-9, 1995**
- 28.** Klaholz BP, Mitschler A, Moras D: Structural Basis for Isotype Selectivity of the Human Retinoic Acid Nuclear Receptor. *J Mol Biol* **302:155-170, 2000**
- 29.** Wang Z-Y, Chen Z: Differentiation and apoptosis induction therapy in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet Oncol* **1:101-106, 2000**
- 30.** Chen CF, Goyette P, Lohnes D: RAR g acts as a tumor suppressor in mouse keratinocytes. *Oncogene* **23:5350-5359, 2004**

- 31.** Xu X-C: Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor- $\beta$  in cancer. *Cancer Lett* 253:14-24, 2007
- 32.** Sun SY, Lotan R: Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol* 41:41-55, 2002
- 33.** Chen LI, Sommer KM, Swisshelm K: Downstream Codons in the Retinoic Acid Receptor  $\beta$ -2 and  $\beta$ -4 mRNAs Initiate Translation of a Protein Isoform That Disrupts Retinoid-activated Transcription. *J. Biol. Chem.* 277:35411-35421, 2002
- 34.** Sommer KM, Chen LI, Treuting PM, et al: Elevated retinoic acid receptor  $\beta$  4 protein in human breast tumor cells with nuclear and cytoplasmic localization. *PNAS* 96:8651-8656, 1999
- 35.** Ren M, Pozzi S, Bistulfi G, et al: Impaired Retinoic Acid (RA) Signal Leads to RAR $\beta$ 2 Epigenetic Silencing and RA Resistance. *Mol. Cell. Biol.* 25:10591-10603, 2005
- 36.** Houle B, Rochette-Egly C, Bradley WE: Tumor-Suppressive Effect of the Retinoic Acid Receptor  $\beta$  in Human Epidermoid Lung Cancer Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:985-989, 1993
- 37.** Soprano DR, Qin P, Soprano KJ: Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr* 24:201-221, 2004
- 38.** Wallden B, Emond M, Swift ME, et al: Antimetastatic gene expression profiles mediated by retinoic acid receptor  $\beta$  2 in MDA-MB-435 breast cancer cells. *BMC Cancer* 5:140-53, 2005

- 39.** Cheung B, Hocker JE, Smith SA, et al: Favorable prognostic significance of high-level retinoic acid receptor beta expression in neuroblastoma mediated by effects on cell cycle regulation. *Oncogene 17:751-759, 1998*
- 40.** Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al: Clinical and Biological Features Associated With Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations in Lung Cancers. *J Natl Cancer Inst 97:339-346, 2005*
- 41.** Song S, Lippman SM, Zou Y, et al: Induction of cyclooxygenase-2 by benzo[a]pyrene diol epoxide through inhibition of retinoic acid receptor-b2 expression. *Oncogene 24:8268-8276, 2005*
- 42.** Petty WJ, Dragnev KH, Memoli VA, et al: Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibition Represses Cyclin D1 in Aerodigestive Tract Cancers. *Clin Cancer Res 10:7547-7554, 2004*
- 43.** Kagechika H: Novel synthetic retinoids and separation of the pleiotropic retinoidal activities. *Current Medicinal Chemistry 9:591-608, 2002.*
- 44.** Khuri RF, Lotan R, Kemp BL, Lippman SM, Wu H, Feng L, et al. Retinoic Acid Receptor-Beta as a Prognostic Indicator in Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol 2000; 18: 2798-2804*
- 45.** Petty WJ, Li N, Biddle A, Bounds R, Nitkin C, Ma Y, Dragnev KH, et al. A Novel Retinoic Acid Receptor Isoform and Retinoid Resistance in Lung Carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst 2005; 97: 1645 – 51.*
- 46.** Whang-Peng J, Bunn PA Jr, Kao-Shan C, Lee C, Carney DN, Gazdar A, Minna JD: A nonrandom chromosomal abnormality, del 3p(14-23), in human small cell lung cancer (SCLC). *Cancer Genet Cytogenet 1982, 2:119-134.*

- 47.** Keshamouni VG, Han SW, Roman J. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Lung Cancer. *PPAR Research* 2007; doi:10.1155/2007/90289
- 48.** Krisztina Bogos K, Renyi-Vamos F, Kovacs G, Tovar J, Dome B. Role of retinoic receptors in lung carcinogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2008, 27:18
- 49.** Wallden B, Emond M, Swift ME, Disis ML and Swisshelm K. Antimetastatic gene expression profiles mediated by retinoic acid receptor beta 2 in MDA-MB-435 breast cancer cells. *BMC Cancer* 2005, 5:140