



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

All-trans ácido retinoico en procesos de inhibición de proliferación celular, inducción de apoptosis y expresión de los receptores RAR y RXR, en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas tratadas con quimioterapia.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

NORMA YANET HERNÁNDEZ PEDRO

DIRECTOR DE TESIS

DR. OSCAR GERARDO ARRIETA RODRÍGUEZ

FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DRA. ELIZABETH LANGLEY MCCARRON

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE DEL 2019



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.

All-trans ácido retinoico en procesos de inhibición de proliferación celular, inducción de apoptosis y expresión de los receptores RAR y RXR, en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas tratadas con quimioterapia.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Sera y Carlos que siempre me han apoyado.

A Minibits, Gabo y Vale por apoyarme y guiarme en el camino económico

A Mily, por ser una gran niña y quien cambió mi vida.

A Eunice, por enseñarme a disfrutar las cosas que me da la vida.

A laboratorio de Neuroinmunología, Benjamín, Alelí, Lupita, Chelita, Paty, Dr Sotelo, Ale y Esperanza por su apoyo incondicional y por ser parte importante de mi formación académica.

A todos mis compañeros del posgrado, en especial a Khalil, Rolando, Rubí, Elisa y los demás especiales. Gracias por ser un escape para toda la presión que implica hacer un doctorado.

A mis compañeras y grandes amigas del basquetbol, Jamie, Chul, Carmen, Diana, Juana, Lore, Jess, que siempre han estado en las buenas, en las malas y en las fiestas.

A mis compañeros del INCan, Pedro, Mario, Diana, Lulú, Ale, Graciela, por ayudarme a consolidar mi carrera como investigadora.

A Gigio, Paty, Juanis, Javi, Elias, Regi y Emilio por ser una extensión de mi familia.

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la UNAM por el apoyo incondicional recibido durante el Doctorado.

Apoyos recibidos:

El presente trabajo de tesis fue apoyado por:

El consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca No. 389552

ÍNDICE GENERAL	Páginas
GLOSARIO	6-7
RESUMEN	8-9
ABSTRACT	10-11
INTRODUCCIÓN	
Cáncer de pulmón	12
<i>Esquemas de tratamiento en Cáncer de pulmón</i>	13
<i>Mecanismo de acción de la primera línea de tratamientos</i>	14
<i>Cisplatino</i>	14
<i>Paclitaxel</i>	15-16
<i>Efecto del tratamiento cisplatino-paclitaxel</i>	17
<i>Ácido retinoico</i>	17-19
<i>Receptores de ácido retinoico y cáncer</i>	21-22
<i>Tratamiento con ATRA</i>	22-24
<i>Combinación de quimioterapia con ATRA</i>	24-25
JUSTIFICACIÓN	25
HIPOTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS PARTICULARES.	27
MATERIAL Y METODOS	28-33
RESULTADOS	34-50
DISCUSIÓN	51-55
CONCLUSIÓN	56

PERSPECTIVAS	57
BIBLIOGRAFIA	58-70
ANEXOS	71-82

GLOSARIO

CPCNP: Cáncer de pulmón de células no pequeñas

RA: Ácido retinoico

ATRA: All-trans ácido retinoico

CIS: Cisplatino

PACLI: Paclitaxel

RAR: Receptor de ácido retinoico

RXR: Receptor X de ácido retinoico

RAR α : Receptor alpha de ácido retinoico

RAR β : Receptor beta de ácido retinoico

RAR γ : Receptor gamma de ácido retinoico

RXR α : Receptor X alpha de ácido retinoico

RXR β : Receptor X beta de ácido retinoico

RXR γ : Receptor X gamma de ácido retinoico

CP: Cáncer de pulmón

CPCP: Cáncer de pulmón de células pequeñas

CDDP: Cis-diaminodicloroplatino (II)

ADNg: Ácido desoxirribonucleico genómico

RE: Retículo endoplásmico

holo-RBP: Proteína plasmática de unión al retinol

TTR: Transtirretina

ILBP: Unión a lípidos intracelulares

CRABP1: Proteína de unión al ácido retinoico celular 1

CRABP2: Proteína de unión al ácido retinoico celular 2

N-CoR: Correpresor 1 de receptor nuclear

SMRT: Mediador silenciador para los receptores de ácido retinoico

RARE: Elementos de respuesta a ácido retinoico

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

CBP/p300cAMP: Elementos de respuesta de unión a proteínas

COX 2: Cyclooxygenase-2

PPAR γ : Peroxisoma Activados los Receptores

AP-1: Proteína de activación 1

Cdk2: Quinasa dependiente de ciclina 2

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado con el Factor de Necrosis Tumoral

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

RESUMEN:

El cáncer de pulmón es uno de los más comunes en el mundo, ocupando el primer lugar de incidencia y mortalidad a nivel global. El 80% de los casos se diagnostica en etapas avanzadas por lo que la tasa de supervivencia es del 4% a un año y 15% a 5 años. El tratamiento estándar para el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) en etapas avanzadas es la quimioterapia basada en platinos (cisplatino + paclitaxel, cisplatino + pemetrexed) solo o en combinación con radioterapia, sin embargo, los beneficios clínicos con estos agentes muestran bajas tasas de respuesta a un año. Por lo que es evidente que se requiere de una mayor investigación para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento.

Los avances en el entendimiento de la biología del cáncer han llevado al descubrimiento de muchos blancos moleculares potenciales como los relacionados con la inducción de la apoptosis, la diferenciación o el arresto del ciclo celular. Una de las nuevas estrategias de tratamiento, incluyen agentes como el ácido retinoico (RA). Los retinoides son derivados de la vitamina A y han sido utilizados en el tratamiento de diversos cánceres; farmacológicamente, los retinoides son importantes moduladores del crecimiento celular, proliferación, procesos angiogénicos, regulación de la expresión génica, diferenciación, apoptosis y supresión de la carcinogénesis.

Métodos: Se utilizó la línea celular del cáncer de pulmón H1666, la cual fue tratada con all-trans ácido retinoico (1 μM), cisplatino (CIS, 35 μM) y paclitaxel (PACLI, 0.008 μM) en diferentes combinaciones. Se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo MTT, mientras que el ciclo celular y la apoptosis se determinaron mediante citometría de flujo. Se determinó la expresión de los receptores de ácido retinoico (RAR) y los receptores X de ácido retinoico (RXR) mediante RT-qPCR.

Resultados: El grupo de ATRA y sus combinaciones ATRA-CIS, ATRA-PACLI, CIS-PACLI y ATRA-CIS-PACLI mostraron la mayor inhibición de la viabilidad a las 72

horas. A las 24 horas los grupos PACLI, ATRA-PACLI, CIS-PACLI y ATRA-CIS-PACLI incrementaron la fase S y G2-M. Este efecto se mantuvo a las 48 horas, además se incrementó la fase sub-G0 en los grupos ATRA, CIS y ATRA-CIS. A las 72 horas se incrementó la fase sub-G0 en los grupos ATRA, CIS, ATRA-CIS y ATRA-PACLI. ATRA-CIS-PACLI mantuvieron un incremento en la fase G0-G1 y la fase S.

Se encontró un incremento en la apoptosis a las 24 horas en las combinaciones ATRA-CIS, ATRA-PACLI y CIS-PACLI. A las 48 horas todos los grupos incrementaron la inducción de apoptosis, además, el grupo PACLI incrementó los niveles de células necróticas. A las 72 horas todos los grupos incrementaron la cantidad de células necróticas.

La cuantificación de receptores mostró una regulación de los receptores RAR α , β y γ en los grupos que recibieron ATRA, ATRA-CIS y ATRA-PACLI. Este efecto se mantuvo hasta las 72 horas. Los receptores RXR α , β y γ mostraron un incremento en su expresión en todos los grupos a las 24, 48 y 72 horas.

Conclusión:

Se encontró un efecto sinérgico en la adición de ATRA a CIS o PACLI en líneas celulares. ATRA es capaz de regular la expresión de receptores RAR y RXR.

ABSTRACT

Lung cancer is the leading cause of cancer-related mortality worldwide, with almost 1.4 million deaths per year. Lung cancer is diagnosed at an advanced stage in most of cases, due to it is associated with high mortality rate. Early detection remains an elusive goal, therefore, the survival rate to 5 years remain very low. The standard treatment for non-small cell lung cancer in the advanced stages is chemotherapy alone or in combination with radiotherapy, however, the clinical benefits with this treatment are very poor. For this reason, new strategies of treatment are been development.

Advances in the understanding of cancer biology have led to the discovery of several molecular targets such as those related to the induction of apoptosis, differentiation or the arrest of the cell cycle. One of the new treatment strategies includes agents such as retinoic acid (RA). The products derived from vitamin A and have been used in the treatment of various cancers; pharmacologically, retinoids are important modulators of cell growth, proliferation, angiogenic processes, regulation of gene expression, differentiation, apoptosis and suppression of carcinogenesis.

Methods:

We used lung cancer cell line H1666, which was treated with all-trans retinoic acid (1 μM), cisplatin (CIS 35 μM) and paclitaxel (PACLI 0.008 μM) in their different combinations. The cell viability was analyzed by the MTT assay, while the cell cycle and apoptosis were determined by flow cytometry. The expression of the retinoic acid receptors (RAR) and the retinoic acid X receptors (RXR) was determined by RT-qPCR.

Results:

The ATRA group and its combinations ATRA-CIS, ATRA-PACLI, CIS-PACLI and ATRA-CIS-PACLI showed the highest inhibition of viability at 72 hours. At 24 hours the group groups PACLI, ATRA-PACLI, CIS-PACLI and ATRA-CIS-PACLI increased the phase S and G2-M. This effect was maintained at 48 hours, and the sub-G0 phase was increased in the ATRA, CIS and ATRA-CIS groups. After 72 hours, the sub-G0 phase was increased in the ATRA, CIS, ATRA-CIS and ATRA-PACLI groups. ATRA-CIS-PACLI maintained an increase in phase G0-G1 and phase S.

An increase in apoptosis was found at 24 hours in the combinations ATRA-CIS, ATRA-PACLI and CIS-PACLI. At 48 hours all the groups increased the induction of apoptosis. In addition, the PACLI group increased levels of necrotic cells. At 72 hours all groups increase the number of necrotic cells.

The quantification of receptors showed a regulation of the RAR α , β and γ receptors in the groups that received ATRA, ATRA-CIS and ATRA-PACLI. This effect was maintained until 72 hours. The RXR α , β and γ receptors showed an increase in their expression in all groups at 24, 48 and 72 hours.

Conclusion:

A synergistic effect was found in the addition of ATRA to CIS or PACLI in cell lines. ATRA is able to regulate the expression of RAR and RAR receptors.

INTRODUCCIÓN:

En Norteamérica, el cáncer de pulmón (CP) es el segundo cáncer más frecuente diagnosticado en hombres y mujeres, con más de 1,8 millones de casos estimados por año (Ferlay et al. 2018). En México, en 2015 se estimó que 1.69 millones de personas fallecieron a causa de CP (INEGI 2018) diagnosticándose aproximadamente 8 mil 600 nuevos casos de CP por año (Arrieta et al. 2013).

El CP generalmente es diagnosticado en fase avanzada, lo que conlleva a una tasa de mortalidad elevada. A nivel mundial, el CP es la primera causa de muerte con más del 27% de todas las muertes por cáncer (Siegel, Miller, and Jemal 2017). En México, el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas en 2008 reportó 6,697 muertes por esta neoplasia siendo la primera causa de muerte por cáncer en hombres y la segunda en mujeres (Jimenez-Pérez, Granados-García, and Green-Schnneweiss 2000)(Arrieta et al. 2013). La detección temprana sigue siendo un objetivo difícil de alcanzar, por lo que las tasas de supervivencia a 5 años siguen siendo muy bajas (15%) (Jemal et al. 2011).

Según la clasificación de la OMS de 2004, el CP agrupa a todos los tumores epiteliales malignos de pulmón excluyendo tumores pleomórficos, sarcomatoides, carcinoides y los derivados de la glándula salivar (Travis et al. 2015). Clínicamente el CP se divide en dos grandes categorías histológicas: cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), siendo diferentes en cuanto a la patogénesis, diferenciación, biología y tratamiento. El CPCP representa aproximadamente el 20% de los cánceres pulmonares, es de comportamiento muy agresivo y el 98% de los pacientes que lo presentan cuentan con historia de tabaquismo (Sher, Dy, and Adjei 2008). El CPCNP supone el 80-85% de los CP e incluye fundamentalmente a los siguientes tipos histológicos: epidermoide, adenocarcinoma y de células grandes (Landis et al. 1999). El tabaquismo es el factor etiológico más común, asociado a esta neoplasia, sin embargo, el número de casos de CPCNP diagnosticado en los no fumadores se ha incrementado en los últimos años (Wakelee et al. 2007).

Esquemas de tratamiento en Cáncer de pulmón

El esquema de tratamiento para el CP está asociado con el estadio de la enfermedad. Los estadios IA, IB, IIA y IIB son susceptibles de tratamiento quirúrgico. Mientras que los estadios IIIA (N2T3), IIIB y IV no son quirúrgicos. El estadio IIIA (excepto N2T3) puede ser tratado quirúrgicamente en algunos casos tras quimioterapia neoadyuvante (Ettinger et al. 2010). El proyecto de estadificación de la asociación internacional para el estudio del cáncer de pulmón (IASLC por sus siglas en inglés) ha mostrado estadísticas superiores en la supervivencia de los pacientes en la etapa temprana, con una mediana de supervivencia global de 95 meses para estadio IA, 75 meses para etapa IB, 44 meses para IIA, 29 meses para IIB y 19 meses para IIIA (Chansky et al. 2009).

Pacientes en estadios IA y IB son considerados a tratamiento quirúrgico, la lobectomía o resección mayor es recomendable en lugar de resecciones sublobulares. El uso preoperatorio o post operatorio de quimioterapia o radiación en estadio I no es recomendable (Zarogoulidis et al. 2013). Pacientes con estadio II son considerados para estrategias multidisciplinarias de tratamiento, la administración de radiación post operatoria no es recomendada en pacientes sometidos a una resección radical del tumor en estadio II con ganglios linfáticos N1 metastásico (estadio II, N1). En pacientes con resección radical en estadio II y se encuentran en buenas condiciones físicas, se puede ofrecer quimioterapia adyuvante basado en platino entre la 4ta y 8va semana posterior a la toracotomía. Pacientes en estadio II, no considerados a tratamiento quirúrgico debido a las comorbilidades, deben ser considerados para tratamiento bajo quimioterapia y radioterapia (Zarogoulidis et al. 2013)(Robinson et al. 2007). Pacientes en estadio IIIA1-III A2 usualmente son operados por linfadenectomía mediastinal seguido de quimioterapia adyuvante basada en platinos (Robinson et al. 2007). Estadio IIB es considerado para tratamiento concurrente con quimioterapia y radioterapia. En casos seleccionados se podría implementar el uso de cirugía (Zarogoulidis et al.

2013)(Robinson et al. 2007). Los pacientes en estadio IIIB y IV reciben agentes citotóxicos análogos basados en platinos (cisplatino-carboplatino), ifosfamida, mitomicina C, etoposido, gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, vinorelbine, y pemetrexed (Le Chevalier et al. 2001)(Kelly et al. 2001)(Schiller et al. 2002).

El tratamiento estándar para el CPCNP en etapas avanzadas IV, es la quimioterapia combinada y/o en combinación con radioterapia, sin embargo, los beneficios clínicos con estos agentes muestran tasas de respuesta muy pobre. Por ejemplo; en los tratamientos de primera línea que utilizan la combinación de cisplatino o carboplatino/ paclitaxel, la supervivencia media es de sólo 7-10 meses, con tasas de respuesta del 20 al 30%, y los utilizados como segunda línea de quimioterapia como; docetaxel o pemetrexed muestran una tasa de respuesta de 6-9% en CPCNP (Molina et al. 2008)(Cullen et al. 1999).

Mecanismo de acción de Cisplatino y Paclitaxel

Cisplatino

El Cisplatino, también conocido como cis-diaminodicloroplatino (II) (CDDP) es un complejo neutro de metal con configuración *cis* (Dasari and Tchounwou 2014).

Figura 1. El cisplatino ha mostrado actividad anticancerígena en una variedad de tumores sólidos incluyendo CPCNP (Dasari and Tchounwou 2014).

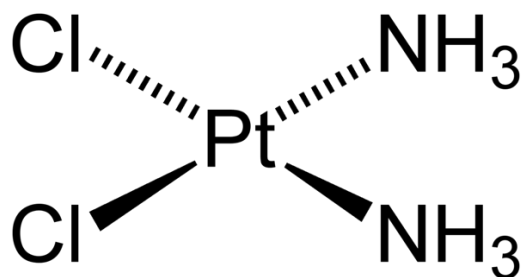


Figura 1: Estructura química de Cisplatino. Es un compuesto de coordinación de platino, concretamente el cis-diaminodicloroplatino (II). Su fórmula es $[PtCl_2(NH_3)_2]$. Después de someterse a la hidrólisis, reacciona con el ADN para producir enlaces cruzados inter e

intracadenas. Estos enlaces cruzados dan como resultado la apoptosis y la inhibición del crecimiento celular. La citotoxicidad del cisplatino se correlaciona con la detención celular en la fase G2 del ciclo celular.

El cisplatino ejerce su efecto citotóxico al unirse al ADN genómico (ADNg). Como resultado, los procesos de replicación y transcripción no se llevan a cabo, lo que conlleva a la muerte celular (Gonzalez et al. 2001). El cisplatino ingresa a las células a través de canales transmembranales, disminuyendo la concentración intracelular de cloro por debajo de 20 mM, el fármaco se hidrata formando especies reactivas con carga positiva las cuales interaccionan con nucleófilos celulares (Andrews and Howell 1990). Los agentes de platino pueden formar cuatro tipos de enlaces en el ADN, los mono-aductos (que típicamente se convierten en enlaces cruzados intracatenarios), enlaces cruzados entre cadenas, enlaces cruzados intra cadenas y enlaces cruzados ADN-proteína (Rose, Kostyanovskaya, and Huang 2014). El aducto más común es un enlace cruzado intracadena entre guaninas adyacentes (Perez 1998). Sin embargo, el cisplatino también puede unirse al DNA mitocondrial, interactuando con fosfolípidos y fosfatidilserina de la membrana, desorganizando el citoesqueleto y afectando la polimerización de la actina (Jamieson and Lippard 1999). Además, puede formar aductos al reaccionar con compuestos que contienen grupos tiol tal como el glutatión. Una vez formados los aductos con el ADN, las moléculas de cisplatino activan la vía de estrés del retículo endoplasmático (RE) (también conocida como respuesta de proteína desplegada), activando la vía de las caspasas induciendo como consecuencia la apoptosis celular (Rose et al. 2014).

Paclitaxel

El paclitaxel es un compuesto vegetal obtenido a través del extracto de la corteza de *Taxus brevifolia*.

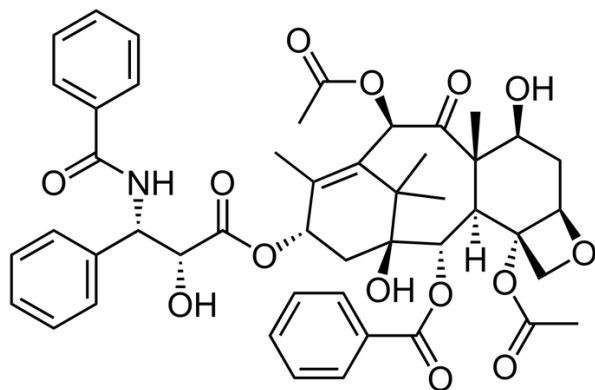


Figura 2. Estructura del paclitaxel. El paclitaxel tiene un esqueleto hidrocarbonado formado por tres ciclos de 6, 8 y 6 carbonos polisustituido con cuatro metilos y ocho funciones oxigenadas (entre ellas, una de *b*-fenilisoserina que esterifica la posición C-13). La molécula posee un total de once estereocentros.

Paclitaxel promueve el ensamblaje de polímeros de microtúbulos compuestos por subunidades repetitivas de heterodímeros de tubulina α y β . El paclitaxel reduce la concentración crítica de subunidades de tubulina purificadas necesarias para la polimerización en microtúbulos y aumenta el porcentaje de subunidades de tubulina que se ensamblan intracelularmente (Schiff, Fant, and Horwitz 1979). Paclitaxel induce arresto mitótico *in vitro* e *in vivo*, mediante la activación del punto de control mitótico (también conocido como el punto de control del conjunto de huso mitótico), principal mecanismo de control del ciclo celular que actúa durante la mitosis para evitar la mala segregación cromosómica. El punto de control mitótico retrasa la separación de los cromosomas que entran en la mitosis como pares replicados de cromátidas hermanas, hasta que cada pareja ha hecho uniones estables a ambos polos del huso mitótico (Kops, Weaver, and Cleveland 2005). Esta disposición garantiza que cada célula hija recibirá una copia de cada cromátida. Las cromátidas se conectan a los microtúbulos del huso a través de sus cinetocoros (complejos proteicos que se ensamblan en las regiones centroméricas del ADN) (Lara-Gonzalez, Westhorpe, and Taylor 2012). Los cinetocoros no unidos, que no tienen uniones estables a los microtúbulos, activan una cascada de transducción de señales que retrasa la progresión mitótica al inhibir el ciclosoma-complejo promotor

de la anafase (Foley and Kapoor 2013). El tratamiento con paclitaxel arresta a células en mitosis debido a la inducción de cinetocoros no unidos (Waters et al. 1998).

Paclitaxel induce muerte celular en la interfase, incluso sin haber sido afectada por una mitosis previa, ya que puede interferir con la señalización celular, el tráfico y el transporte mediado por microtúbulos (Herbst and Khuri 2003)(Komlodi-Pasztor et al. 2011). Experimentos *in vitro* han mostrado que paclitaxel induce la muerte en células interfásicas que no han experimentado previamente mitosis (Janssen et al. 2013)(Zasadil et al. 2014). En modelos animales, el índice mitótico indicativo de arresto celular después del tratamiento con dosis de paclitaxel es bastante bajo, lo que sugiere que el microambiente permite que paclitaxel muestre efectos de interfase no observados en cultivo (Janssen et al. 2013)(Orth et al. 2011).

Efecto del tratamiento cisplatino-paclitaxel

Los primeros estudios en células de cáncer de pulmón mostraron el efecto citotóxico de paclitaxel en un rango de 3 a 50nM y cisplatino en rangos de (150-500 μ M) (Soriano et al. 1999). Estudios subsecuentes mostraron un efecto aditivo cuando el cisplatino y el paclitaxel se daban de forma simultánea (Kano et al. 1996).

En los años 90's los componentes de platino fueron combinados con agentes quimioterapéuticos de tercera generación como vinorelbine y gemcitabina, y los taxanos como docetaxel y paclitaxel. Estas combinaciones mostraron altas tasas de respuestas y prolongaron la supervivencia libre de progresión y llegó a ser el tratamiento estándar para pacientes con cáncer de pulmón con buen estado funcional (Cheong et al. 2005).

Varios estudios han demostrado que la combinación de cisplatino y taxanos (paclitaxel o docetaxel) en comparación con vinorelbine o pemetrexed extendió la media de supervivencia de 8-11 meses y las tasas de supervivencia a un año de

38%, además fue mejor tolerado disminuyendo la toxicidad y mejorando la calidad de vida (Fossella et al. 2003)(Kelly et al. 2001)(Schiller et al. 2002).

Ácido retinoico

Los retinoides son análogos estructurales y funcionales de la vitamina A. Debido a que los organismos no pueden sintetizar la vitamina A, esta es obtenida mediante la ingesta de alimentos en forma de retinol, ésteres de retinol o β -caroteno. La vitamina A es almacenada como ésteres de retinol en las células estelares hepáticas. Posteriormente, el retinol es oxidado por la enzima retinol deshidrogenasa para formar retinal, subsecuentemente, el retinal es oxidado de manera irreversible para formar all-trans ácido retinoico (ATRA) por la enzima retinal deshidrogenasa y posteriormente oxidado por la enzima del citocromo P450 en el tejido hepático (Blaner et al. n.d.)(Chelstowska et al. 2016). El retinol tiene seis isoformas biológicas activas que incluyen al all-trans, 11-cis, 13-cis, 9,13-di-cis, 9-cis and 11,13-di-cis, siendo el ATRA la forma fisiológica predominante. Otros retinoides endógenos con actividad biológica incluyen a 9-cis AR, 11-cis retinaldehído, 3,4-didehidro ácido retinoico (AR) y quizá 14-hidroxi-4, 14-retro retinol, 4-oxo AR, y 4-oxo retinol (Chambon 1996)(Kedishvili 2013). Algunos retinoides no son funcionales, sino moléculas de almacenamiento inactivas, precursores metabólicos o derivados de las formas activas. **Figura 3.**

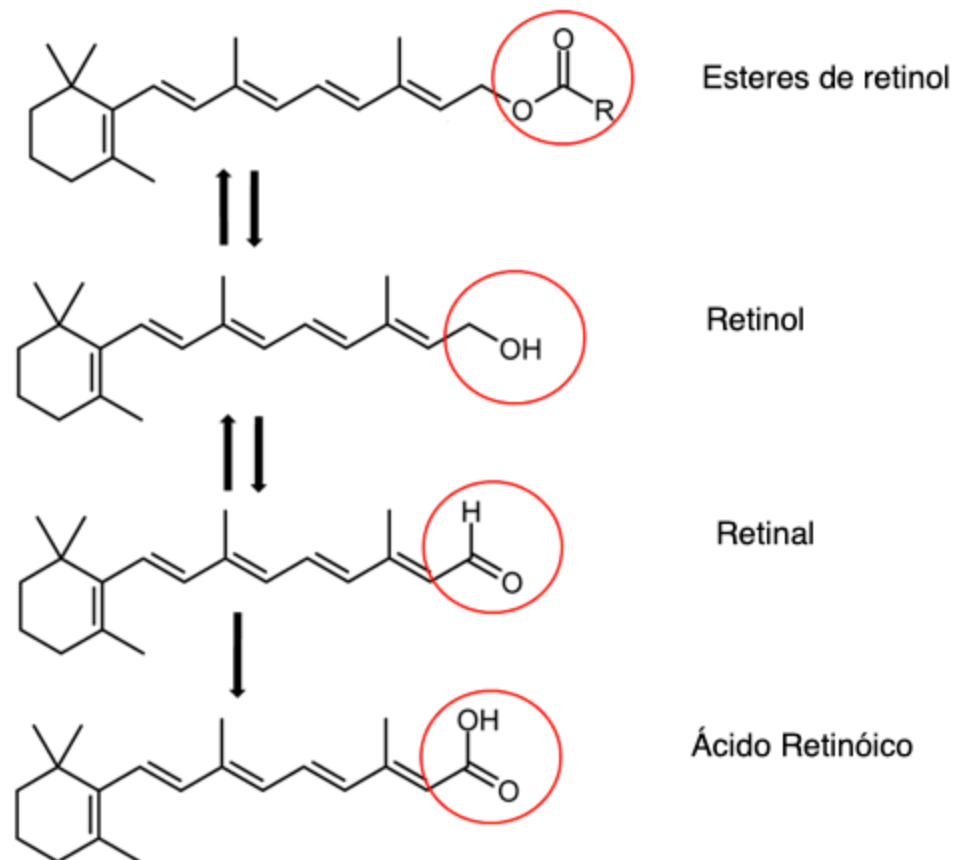


Figura 3. Síntesis de la vitamina A. El retinol y los retinil ésteres son frecuentemente referidos como vitamina A preformada. El retinol puede ser convertido por el cuerpo a retinal, que puede a su vez ser oxidado a ácido retinoico, la forma de la vitamina A conocida por afectar la transcripción de genes. El retinol, retinal, ácido retinoico, y compuestos relacionados son conocidos como retinoides.

Una vez sintetizado el ácido retinoico, puede viajar por la sangre unido a través de la proteína plasmática de unión al retinol (holo-RBP) asociada con otra proteína llamada transtirretina (TTR) hasta las células blanco (Kawaguchi et al. 2007). El retinol deja el complejo holo-RBP-TTR y difunde rápidamente a través de las membranas (van Bennekum AM et al. 2001). En algunos tejidos, el complejo retinol-RBP-TTR es reconocido por el receptor de membrana, denominado STRA6, que media la captación de retinol en las células (Noy 2016)(Chen et al. 2016). Se ha

descrito que STRA6 media el flujo de retinol desde las células y de ese modo actúan como un transportador bidireccional, con una concentración de retinol específica, determinando la polaridad del transporte (Chen et al. 2016)(Bushue and Wan 2010).

Las concentraciones intracelulares de varios retinoides son controladas, además de las proteínas de unión, por la actividad de varias enzimas metabólicas. Su tráfico celular es facilitado por la vinculación a miembros de la proteína de unión a lípidos intracelulares (ILBP), conocida como proteína de unión al ácido retinoico celular 1 (CRABP1) y 2 (CRABP2); y la proteína de unión a ácidos grasos 5 (FABP5) (Donovan et al. 1995)(Tan et al. 2002). Una vez unido a estas proteínas, AR es transportado a diferentes partes de la célula, para realizar sus efectos biológicos o ser metabolizado (Budhu and Noy 2002)(Chambon 1996)(Dong et al. 1999)(Fiorella and Napoli 1994)(Napoli 1996). Alternativamente, AR puede ser secuestrado en el citoplasma cuando se une a sus proteínas de unión, modulando así la biodisponibilidad y la toxicidad del AR (Fiorella and Napoli 1994)(Napoli 1996). Un componente clave de la acción de la AR es su movilización hacia el núcleo donde actúa como un activador de receptores nucleares que a su vez regulan la transcripción de genes.

La función intracelular de los retinoides es regulada a través de la activación de dos clases de receptores nucleares RARs y retinoides (RXR) (Gronemeyer, Gustafsson, and Laudet 2004). Los receptores RAR y RXR están incluidos dentro de la superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción activados por ligandos y que incluyen receptores de esteroide, vitamina D y hormona tiroideas (Balmer and Blomhoff 2002). Cada receptor tiene tres isoformas (α , β y γ) que codifican para los diferentes genes (RAR α , RAR β , RAR γ y RXR α , RXR β , RXR γ), los cuales regulan la expresión de genes y otros procesos como el crecimiento celular, diferenciación, supervivencia y muerte (Altucci et al. 2007).

Los heterodímeros RXR/RAR son las unidades funcionales que traducen las señales de los retinoides, modulando positiva o negativamente la expresión de genes específicos. Los RARs interactúan con diferentes proteínas coactivadoras y correpresoras para regular la transcripción. El complejo formado por los heterodímeros RAR/RXR actúa como represor transcripcional en ausencia de ligando. Bajo estas condiciones los heterodímeros RAR/RXR se unen a complejos correpresores que contienen N-CoR o SMRT (N-CoR-2) más proteínas adicionales (Perissi et al. 2010). Por otro lado, cuando los heterodímeros se unen a los elementos de respuesta a ácido retinoico (RARE) que se encuentran en la región promotora de los genes del ácido retinoico, activan la transcripción (Soprano, Qin, and Soprano 2004)(Lotan and Clifford 1991). **Figura 4**

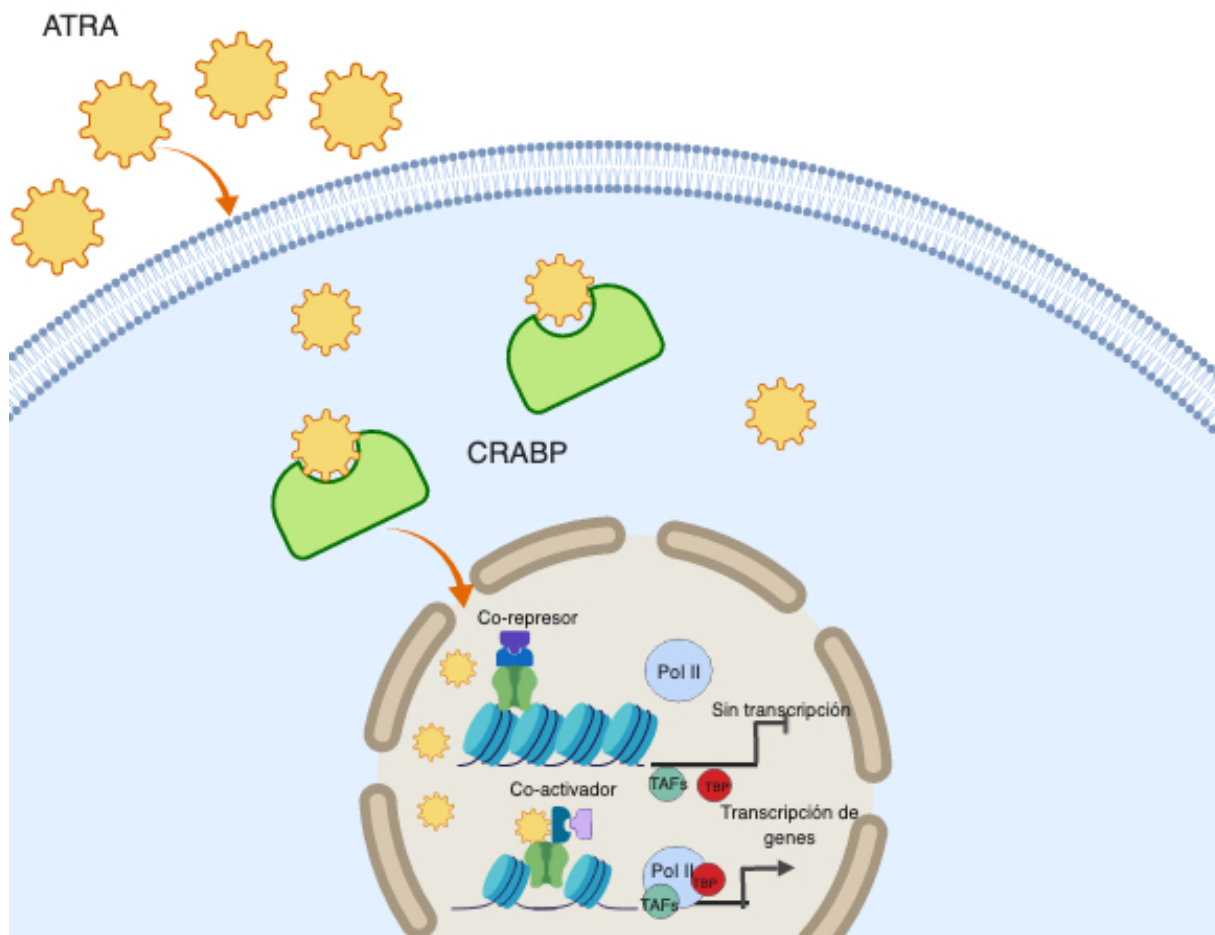


Figura 4. Esquema de la vía de señalización de ATRA. Una vez que el ATRA es sintetizado es liberado al torrente sanguíneo donde viaja hasta su blanco. El ATRA difunde a través de la membrana y se acumula en el citoplasma, donde se une a las proteínas de unión al ácido retinoico celular (CRABPs) las cuales la translocan al núcleo. Una vez en el núcleo se une a los dímeros de los receptores de RA (RAR) y los receptores de retinoides X (RXR), denominados RAR / RXR, los cuales se unen a los elementos de respuesta de RA (RARE) en sus genes diana en ausencia de ligando, interactuando con complejos de proteínas (co-represores) que estabilizan la estructura nucleosomal de la cromatina y evitan el acceso al promotor. Tras la unión de RA, un cambio conformacional en la estructura helicoidal del dominio de unión a ligando RAR cambia sus propiedades de interacción proteína-proteína, liberando a los co-represores y reclutando complejos co-activadores que desestabilizan los nucleosomas y / o facilitan el ensamblaje de la transcripción pre complejo de iniciación, que contiene ARN polimerasa II (Pol II), proteína de unión a TATA (TBP) y factores asociados a TBP (TAF).

Receptores de ácido retinoico y cáncer

Los RAR y RXR regulan la expresión de subconjuntos de genes diana implicados en la diferenciación celular, la proliferación y la apoptosis. Cambios en la expresión, pérdida en la expresión de RAR, mutaciones o modificaciones postraduccionales han sido considerados como la causa de transformaciones malignas y correlacionan con crecimiento tumoral (Duong and Rochette-Egly 2011).

El receptor RAR α está asociado con diferenciación de células epiteliales e impulsa los cambios estructurales durante la transición de la etapa glandular a la canalicular en el pulmón (Lohnes et al. 1995). El RAR α pertenece a la superfamilia de los receptores de hormonas y actúa como un factor de transcripción regulado por el ácido retinoico. En adultos, el RAR α se encuentra altamente regulado en piel (Watson et al. 2004). El papel oncogénico de RAR α se ha descrito en leucemia promielocítica aguda, en donde sufre un reordenamiento cromosómico con el gen

PLM, donde se sintetizan las proteínas híbridas PML-RAR α y su recíproca RAR α -PML. Estas proteínas híbridas tienen una función importante en la patogénesis de la leucemia aguda promielocítica, debido a que provocan la disrupción de los cuerpos nucleares que interfieren con el proceso normal de apoptosis (Grimwade 1999).

Por otro lado, el receptor más estudiado en cuanto a su posible papel en oncogénesis pulmonar es RAR β (Renaud et al. 1995). Específicamente el RNA mensajero (mRNA) de RAR β se encuentra frecuentemente disminuido o silenciado en tumores sólidos, incluyendo cáncer de pulmón, carcinoma de células escamosas de cabeza-cuello, y en líneas celulares de cáncer de mama, lo cual ha llevado a la hipótesis de que RAR β actúa como un supresor tumoral (Widschwendter et al. 2000).

El receptor de ácido retinoico X gamma (RXR γ) está estrechamente relacionado con los receptores de la hormona tiroidea. Existen dos isoformas principales de RAR gamma: RAR gamma 1 se encuentra predominantemente expresado en piel, mientras que RAR gamma 2 ha sido encontrado en la embriogénesis temprana y en células de carcinoma embrionario (Lehmann, Zhang, and Pfahl 1992). RAR gamma está involucrado de forma redundante en vertebrados en el control pleiotrópico de patrones embrionarios y organogénesis, proliferación celular, diferenciación y apoptosis, así como control homeostático (Lehmann et al. 1992).

En cáncer de pulmón los receptores que muestran modificaciones en su expresión son RAR α , RAR γ , RXR α y RXR β , sugiriendo que las alteraciones en la expresión de estos receptores podrían jugar un papel importante en la carcinogénesis (Picard et al. 1999)(Martinet et al. 2000)(Chen, Goyette, and Lohnes 2004). La hipermetilación del gen RXR se ha observado en 31.7 % de pacientes con CPCNP. La metilación de RXR γ tiene diferentes efectos en la supervivencia de acuerdo a la condición de fumador de los pacientes, metilación RXR γ se ha asociado a una peor supervivencia en pacientes no fumadores, pero con una tendencia hacia una mejor supervivencia en pacientes fumadores (Lee et al. 2010). Sin embargo, la supresión

de mRNA de todos los RXR en tumores resecaados de cáncer de pulmón está asociada con una peor supervivencia global.

Tratamiento con ATRA

En la última década los retinoides se han propuesto como agentes quimioterapéuticos o quimiopreventivos debido a que regulan una gran cantidad de procesos biológicos (Dragnev, Rigas, and Dmitrovsky 2000). Muchas evidencias experimentales apoyan el conocimiento de que los RA pueden interferir, en varios niveles, con los eventos multifactoriales que intervienen en la oncogénesis de tumores sólidos, evitando la progresión de lesiones pre-malignas a malignas o bien, una vez establecido el tumor, pueden impedir o demorar su crecimiento.

All-trans ácido retinoico (ATRA) y sus análogos han mostrado actividades clínicas importantes en la prevención y terapias del cáncer (Ki Hong et al. 1995)(Lotan 1996). Uno de los mayores efectos biológicos del ATRA es la regulación de la diferenciación, inhibición de la proliferación y apoptosis en neoplasias hematopoyéticas y neoplasias solidas como cáncer de mama y pulmón. Estas funciones se atribuyen a la relación entre los receptores de los retinoides y otras vías de diferenciación durante la carcinogénesis. De acuerdo con esto, sustancias específicas de unión a RXR inhiben AP-1 (proteína de activación 1), disminuyendo la proliferación en epitelio respiratorio normal, por otro lado, RAR β y RXR α dependiente de AP-1 interactúan con otros receptores nucleares, como PPAR γ , con cofactores CBP/p300cAMP (elementos de respuesta de unión a proteínas) asegurando la inhibición del ciclo celular mediada por AP-1, y por lo tanto favoreciendo la apoptosis o diferenciación. Mecanismos de regulación a la baja de RAR β combinados con un incremento de CBP y AP-1 desencadenan progresión tumoral y proliferación(Karamouzis, Konstantinopoulos, and Papavassiliou 2007)(Karamouzis and Papavassiliou 2005). Concurrentemente la incapacidad de

RXR α para formar heterodímeros con PPAR γ permite una regulación al alza de COX 2 dependiente de AP1/CBP, resultando en la inhibición de la apoptosis. Además, la actividad transcripcional mediada por AP-1 regula otras vías como la formación de complejos Jun/Fos que regula genes implicados en el ciclo celular, funciones de supervivencia y promotores tumorales (Brabender et al. 2002).

Adicionalmente, los retinoides juegan un papel central en la producción de tumores del estroma y por lo tanto en el control de la progresión e invasión del tumor a través de su habilidad de regular la expresión de metaloproteinasas de la matriz extracelular, del factor transformante β y proteínas reguladoras del ciclo celular, como ciclinas dependientes de cinasas I, p16 y p21 (Wang et al. 1999). Los retinoides activan la transcripción del ciclo celular inhibiendo p21, a través de la interacción directa con el promotor de RAR-RXR (Liu, Iavarone, and Freedman 1996).

Por otro lado, hay numerosos estudios que muestran que el AR es capaz de inducir muerte celular programada como agente único o en combinación con otros agentes citotóxicos, en diferentes líneas celulares (Grunt ThW et al. 1998)(Wang et al. 2000)(Vivat-Hannah et al. 2001). ATRA incrementa los receptores de TNF en la superficie celular de varias líneas celulares, principalmente en cáncer de mama y pulmón. En líneas celulares de cáncer de mama ATRA y 9-cis AR produce reducciones en la ciclina D1 y expresión Cdk2; sugiriendo que la activación de la RAR α es importante para la inhibición de Bcl-2, survivina, ciclina D1, y Cdk2. El ligando RAR β tiene el efecto más consistente en la expresión de Bcl-2 y al mismo tiempo, también regula a la baja los niveles de la proteína ciclina D1, la cual tiene poco efecto en survivina o Cdk2 (Pratt, Niu, and White 2003). El tratamiento con ATRA en células de carcinoma de ovario permite el arresto del ciclo celular en G1/G0 lo que genera un aumento de los niveles de Rb2/p130, PP2a y p27 (Vuocolo et al. 2003). En células epiteliales y bronquiales tratadas con retinoides también ha sido vinculado al arresto del ciclo celular en la fase G1, suprimiendo el crecimiento y disminuyendo de la expresión de ciclinas (Nabeyrat et al. 2000).

La habilidad de ATRA para inducir apoptosis es variable y depende altamente del tipo celular. Los retinoides causan apoptosis en células de cáncer de páncreas, melanoma, carcinomas cervicales y pulmón entre otros. ATRA induce apoptosis post-maduración a través de la inducción de ligandos de muerte y caspasa 8, que median la acción de TRAIL a través de los receptores de DR5 (Altucci et al. 2001).

Combinación de quimioterapia con ATRA

El efecto sinérgico de la combinación de agentes citotóxicos como el platino o paclitaxel con retinoides ha sido demostrado en algunas líneas celulares de cáncer, por ejemplo, la combinación de paclitaxel o cisplatino con ácido retinoico 13-cis tiene un potente efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento de diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón (Soriano et al. 1999). El pretratamiento de células de adenocarcinoma pancreático con all-trans ácido retinoico o ácido retinoico 9-cis incrementa los efectos citotóxicos del cisplatino (Pettersson, Colston, and Dalglish 2001), este efecto también se reportó para la combinación de all-trans-ácido retinoico y cisplatino en células de adenocarcinoma de ovario, para all-trans ácido retinoico y paclitaxel en líneas celulares de cáncer prostático y de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Budman, Calabro, and Kreis 2002)(Satake et al. 2003). Considerando estos antecedentes, nosotros proponemos que la combinación de ATRA con quimioterapéuticos de primera línea de tratamiento actuará de manera sinérgica en la inducción de apoptosis y arresto del ciclo celular en líneas de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Justificación

El ATRA ha mostrado beneficios en la respuesta a tratamiento, incrementando la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón con alta expresión del receptor de ácido retinoico beta. Por lo que este trabajo evalúo el efecto de la combinación

de ATRA más quimioterapia citotóxica basada en cisplatino y paclitaxel sobre líneas celulares de cáncer de pulmón.

HIPÓTESIS

La combinación de ATRA con cisplatino y paclitaxel tendrá un efecto sinérgico, potenciará la apoptosis y modificará la expresión de receptores RAR y RXR en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial efecto sinérgico del ATRA y quimioterapia sobre la apoptosis y proliferación celular, además de evaluar la expresión de los receptores del ácido retinoico (RAR y RXR) en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la activación de apoptosis en respuesta al tratamiento con ATRA solo o combinado con paclitaxel o cisplatino.

Evaluar el efecto del tratamiento con ATRA solo o combinado con paclitaxel/cisplatino, sobre la proliferación de células de CPCNP.

Evaluar el efecto del tratamiento con ATRA solo o combinado con paclitaxel/cisplatino sobre la expresión los receptores RAR α , RAR β y RAR γ en células de CPCNP

Evaluar el efecto del tratamiento con ATRA solo o combinado con paclitaxel/cisplatino sobre la expresión los receptores RXR α , RXR β y RXR γ en células de CPCNP

MATERIAL Y MÉTODOS

Línea celular

La línea celular H-1666 de cáncer de pulmón de células no pequeñas fue obtenida de la ATCC (CRL-5885). La cual fue cultivada en medio DMEM-F12 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de la solución de 10,000 U/ml de penicilina/10,000 µg/ml de estreptomycin (Gibco). Las condiciones de cultivo fueron a 37°C en atmosfera húmeda y 5% de CO₂.

Tratamiento de la línea celular

Se realizó la determinación de la concentración inhibitoria 50% (IC50) de ATRA, cisplatino y paclitaxel. Posteriormente, se realizaron las combinaciones con y sin ATRA en presencia o ausencia de paclitaxel o cisplatino a las 24 horas. Una vez establecidas las dosis, las combinaciones quedaron de la siguiente manera: ácido retinoico all-trans (ATRA) 1 µM (Sigma Aldrich, México), 35 µM cisplatino (CIS) (PISA Pharmaceuticals), 0.008 µM paclitaxel (PACLI) (Dabur Pharmaceuticals Ltd) y las combinaciones ATRA-CIS, ATRA-PACLI, ATRA-CIS-PACLI y CIS-PACLI

Ensayos de proliferación

La proliferación celular se determinó mediante el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el cual es captado por las células y reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazán. Posteriormente el formazán debe ser solubilizado con isopropanol ácido, la coloración formada será directamente proporcional a la actividad enzimática. Para este ensayo se utilizaron cajas de 96 pozos a una concentración de 50,000 células por pozo las cuales se dejaron en incubación a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 12 horas para permitir su adherencia. Posteriormente, se adicionó el tratamiento quimioterapéutico en presencia o ausencia de ATRA. Una vez tratadas, se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ por 24 horas, se descartó el sobrenadante y se añadieron 50 µL de MTT (mg/ml) en solución amortiguadora libre de calcio y magnesio. Se incubaron por 4 horas más a 37 °C para permitir la formación de cristales de formazán, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 µL de

isopropanol ácido. Se dejaron los cultivos a temperatura ambiente hasta que los cristales de formazán fuesen disueltos. Al concluir el tiempo de incubación se realizaron las lecturas de densidad óptica (DO) utilizando un filtro de 620 nm como referencia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm (Wickramasinghe 1996).

El porcentaje de Viabilidad se obtuvo de la siguiente forma:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{DO células tratadas} \times 100}{\text{DO células control}}$$

Cada ensayo se realizó por triplicado, con controles negativos (solvente) y células no tratadas.

Evaluación del índice de combinación (IC): método de isobol

Chou y Talalay introdujeron un término científico "Índice de combinación" (IC) que se utiliza para determinar efectos sinérgicos o antagónicos (Chou and Talalay 1984)(Chou 2010). El índice de combinación por el método (CI)-isobol proporciona una evaluación cuantitativa del efecto sinérgico entre drogas. Se calcula un IC a partir de los datos dosis-efecto de tratamientos farmacológicos únicos y combinados. Un valor de IC menos que 1 indica sinergia; CI = 1 indica aditivo efecto; y IC > 1 indica antagonismo. La interacción de drogas (sinergismo o antagonismo) es más pronunciado más allá de un valor de CI de 1. De acuerdo con el rango de CI, el sinergismo podría definirse como leve (IC: 0,85-0,90), moderado (0,7-0,85), sinergismo (IC: 0,3-0,7), fuerte (IC: 0,1-0,3), y muy fuerte (IC <0,1)(Chou 2006)(Chou 2010).

Formalmente, el índice de combinación (IC) de un tratamiento farmacológico conjunto se define como $CI = D1 / Dx1 + D2 / Dx2$. Aquí D1 y D2 son las dosis de droga 1 y droga 2, respectivamente, en la combinación; Dx1 y Dx2 cada uno es la dosis de un tratamiento con solo el medicamento 1 y el medicamento 2 que daría el mismo efecto que el de la combinación, respectivamente. Las dosis Dx1 y Dx2

deben ser estimado a partir de los datos dosis-efecto de un solo fármaco. En nuestro estudio, la relación dosis-efecto de los tratamientos individuales y combinados se midieron como porcentaje de inhibición del crecimiento celular para obtener el índice de combinación (IC) para los múltiples fármacos probados, es decir ATRA, CIS y PACLI.

Análisis del ciclo celular

La distribución de la etapa del ciclo celular en las células fue determinada por citometría de flujo usando ioduro de propidio (IP). El IP es un fluoróforo con capacidad de intercalarse en el ARN y ADN, de manera que la intensidad de fluorescencia de las células permeabilizadas previamente y teñidas con IP será directamente proporcional a la cantidad de ácidos nucleicos contenidos en ella; si adicionalmente, se degrada el ARN mediante una RNAsa, la intensidad de fluorescencia detectada en el citómetro de flujo será directamente proporcional al contenido de ADN de esta célula y por ende se puede inferir en que estadio del ciclo celular se encuentra.

Después del tratamiento experimental, 1×10^6 de células fueron lavadas con PBS, centrifugadas a 300 x g por 5 minutos y decantadas, para posteriormente ser fijadas con etanol frío al 70%. Luego, las células se lavaron con PBS, se centrifugaron y se resuspendieron en regulador de permeabilización (0,2 M de Na_2HPO_4 , 0,1 M de ácido acético ácido) y se incubaron 30 min a temperatura ambiente. Luego, las muestras se centrifugaron y se resuspendieron en una solución de RNAsa A (100 μg / ml) y IP (25 μg / ml). Las células se incubaron en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. Se adquirieron 10,000 eventos por cada una de las muestras en el citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, EE. UU.). El ciclo celular fue determinado en la región FL-2A discriminando posibles formaciones de dobletes mediante el análisis de región en FL2A versus FL2W. Los datos fueron analizados mediante el programa Cell Quest Pro y Flow Jo ver. 7.6.1

Evaluación de apoptosis

Se obtuvieron $2-4 \times 10^6$ células de cada uno de los grupos. Posterior a la recolección de células, se centrifugaron a $300 \times g$ por 5 min, se decantó el sobrenadante y realizó un lavado con 2ml de regulador salino de fosfatos (PBS). Se resuspendieron las células en 5ul de anexina V FITC y 5 ul de yoduro de propidio en 100 ul de regulador de unión. Se agitaron y se dejaron en oscuridad por 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS y se decantó el sobrenadante. Se adicionaron 400ul más de regulador de unión (0.1 M Hepes/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl_2) a cada tubo. Se adquirieron 10,000 eventos totales por citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences) y se analizaron los resultados utilizando el programa Cell QuestPro y Flow Jo v7.6.1.

Determinación de los receptores RAR y RXR mediante rt-PCR

Los niveles de RNAm de los receptores de ácido retinoico fueron evaluados por RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar el ADN copia (cDNA) proveniente de los RNAm. El RNA se extrajo por el método del trizol. Brevemente, los cultivos celulares se lavaron 2 veces con PBS, se adicionaron 3 ml de tripsina (Gibco) para despegar la monocapa de células, la suspensión se colectó y se agregó 1ml de trizol. Posteriormente, se agregaron 200 μl de cloroformo, la mezcla se agitó y se incubó 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C y la fase acuosa se transfirió a un tubo de 1.5 ml. El RNA se precipitó con un volumen igual (v/v) de isopropanol y se centrifugó durante 20 min a 4°C . Se eliminó el isopropanol y el botón se lavó con 800 μl de etanol al 75% por agitación en vórtex. El botón se centrifugó a 7,500 rpm durante 5 min a 4°C , se eliminó el etanol y el botón de RNA se resuspendió en 50 μl de agua con dietilpirocarbonato (DEPC). La calidad del RNA se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Para la síntesis del cDNA a partir del RNA total se realizó una reacción de transcripción reversa (RT) en una mezcla de 4 μl de oligo dT 10 μM y 6 μg del RNA, a 70°C durante 10 min. Después se adicionó una mezcla de 8 μl del amortiguador 5X, 4 μl de dithiothreitol 0.1 M, 4 μl de desoxi-

ribonucleótidos (dNTP's) 200 μ M, 2 μ l de transcriptasa reversa (200U/ μ l) (SuperScript II, Invitrogen) y agua libre de nucleasas para llevar a un volumen de 40 μ l. La mezcla se incubó a 22°C durante 10 min y posteriormente se incubó a 42°C durante 2 h para llevar a cabo la reacción de RT y a 70°C durante 15 min para detener la reacción. El cDNA se utilizó como molde para la amplificación de los RNAm por PCR, para esto se utilizó 1 μ l del cDNA obtenido por RT de las líneas celulares y una mezcla de los siguientes reactivos: 5 μ l del amortiguador 10X (Tris-HCl 200 mM, pH 8.4, KCl 500 mM), 2 μ l MgCl₂ 50 mM, 1 U de Taq DNA polimerasa, (Gibco), 4 μ l dNTPs 200 μ M, 2 μ l del oligo 5' 10 μ M, 2 μ l del oligo 3' 10 μ M y se llevó a un volumen final de 50 μ l con agua libre de nucleasas. Las condiciones generales de amplificación fueron de: 1 ciclo de 94°C por 5 min, 40 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 45 s y 74°C por 30 s a 2 min y una extensión final de 1 ciclo a 72°C por 7 min. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Gene Amp PCR system 2400 (Perkin-Elmer). Los productos de PCR se detectaron mediante electroforesis en geles al 2% de agarosa en TBE.

La PCR cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR) se realizó utilizando la mezcla de reactivos (Applied Biosystems® México), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron Sondas TaqMan® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE. UU.) acopladas al fluoróforo VIC (verde) o FAM (azul). Se utilizaron las siguientes sondas: RAR α (Hs00940446_m1), RAR β (Hs00977140_m1), RAR γ (Hs01559231_gH), RXR α (Hs01067640_m1), RXR β (Hs00232774_m1) y RXR γ (Hs02519543_s1). Se utilizó RNAsa P como control endógeno. El análisis fue realizado según las instrucciones del fabricante usando el equipo ABI PRISM 7500. Se analizó por cuantificación relativa, los datos obtenidos de la Real-time RT-PCR se normalizaron con respecto a un gen de referencia, RNAsa P. Para calcular la expresión relativa a un gen de referencia se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ donde la herramienta CT utiliza una fórmula matemática derivada del método de Pfaffl para el cálculo de la expresión relativa.

Análisis Estadístico

Para fines descriptivos, las variables continuas se resumieron como medias aritméticas, medianas y desviaciones estándar (SD). La distribución de datos (paramétrica y no paramétrica) se determinó por la prueba Kolmogorov-Smirnov. Las comparaciones inferenciales entre los grupos se analizaron mediante varianza de una vía (ANOVA) y la prueba post-hoc (Tukey) o Kruskal-Wallis. Se consideró estadísticamente significativa si el valor de $p \leq 0.05$ en una de las pruebas usadas. Se utilizó el software SPSS (IBM SPSS, Inc., Chicago, IL, EE. UU. Versión 20) para el análisis de datos.

RESULTADOS

Citotoxicidad in vitro

Viabilidad celular evaluada por MTT a las 24, 48 y 72 horas (**Figura 1**). Los datos representan el porcentaje \pm DES ES de tres experimentos independientes por triplicado. La gráfica muestra, una disminución significativa de la viabilidad celular a las 24 horas en los grupos ATRA-PACLI ($66.6 \pm 2.6\%$ $p=0.005$) y CIS-PACLI ($64.6 \pm 1.5\%$ $p=0.005$) y ATRA-CIS-PACLI ($71.1 \pm 1.0\%$ $p=0.003$) con respecto al grupo control ($100 \pm 0\%$). A las 48 horas se observó una disminución en el grupo CIS ($86.4 \pm 10.3\%$). Sin embargo, los grupos que alcanzaron una diferencia significativa fueron: ATRA ($58.0 \pm 1.8\%$), PACLI ($67.4 \pm 0.5\%$), ATRA-CIS ($62.1 \pm 2.7\%$), CIS-PACLI ($62.5 \pm 2.5\%$), ($p<0.005$, para cada comparación), presentando la disminución más significativa los grupos ATRA-PACLI ($42.3 \pm 4.9\%$) y ATRA-CIS-PACLI ($42.3 \pm 3.0\%$) con respecto al grupo control ($95.5 \pm 6.0\%$) ($p<0.001$). A las 72 horas la viabilidad celular disminuyó en los grupos PACLI ($56.3 \pm 5.0\%$, $p=0.005$), encontrándose el mayor efecto en los grupos ATRA ($41.5 \pm 5.7\%$), CIS-PACLI ($41.1 \pm 9.6\%$) ATRA-CIS-PACLI ($38.2 \pm 3.6\%$), ATRA-CIS ($37.44 \pm 3.0\%$) y ATRA-PACLI ($36.6 \pm 1.6\%$) con respecto al grupo control ($90.41 \pm 1.7\%$) ($p<0.001$).

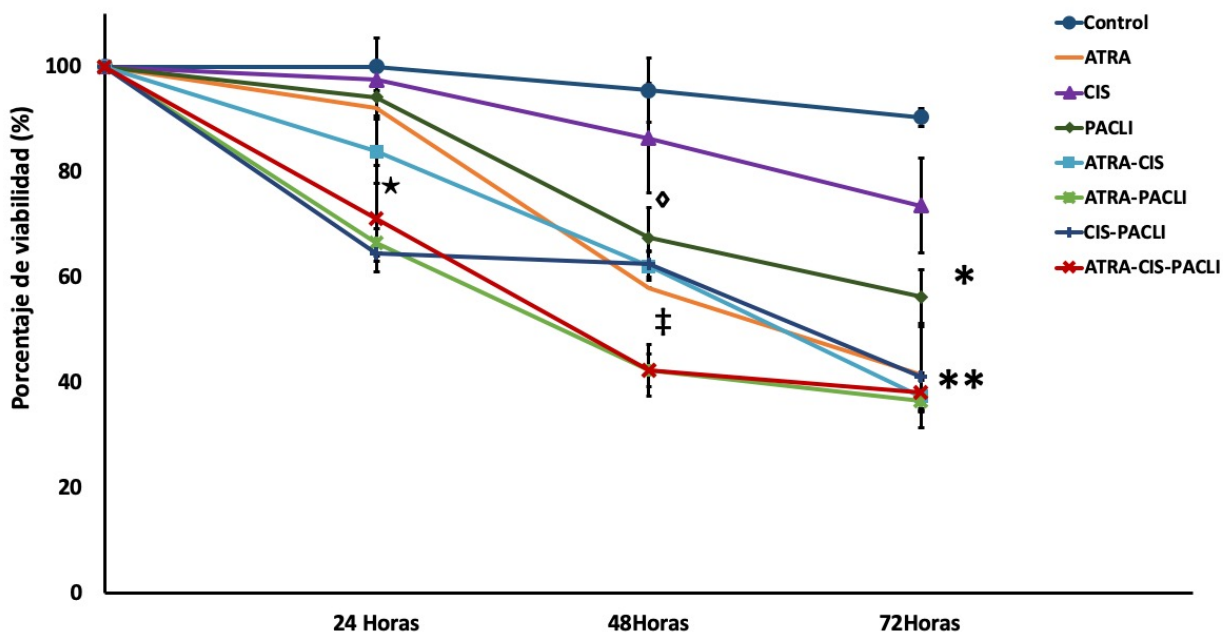


Figura 1. Viabilidad celular. Cada valor representa la media, desviación estándar de tres experimentos independientes. Se muestran las diferencias de los grupos a las 24 horas $*p=0.005$ y $*p=0.003$. A las 48 horas se encontraron diferencias estadísticas de $^{\circ}p=0.005$, $^{\dagger}p=0.001$. A las 72 horas se muestran las diferencias de: $*p=0.005$, $**p=0.001$.

Evaluación de índice de combinación

El índice de combinación evaluado por Chou y Talalay mostró un efecto sinérgico a las 24 horas en las siguientes combinaciones ATRA-CIS (0.61 ± 0.06), ATRA-PACLI (0.40 ± 0.02), y ATRA-CISPACLI (0.56 ± 0.10) y un efecto sinérgico muy fuerte en la combinación CIS-PACLI (0.023 ± 0.01). A las 48 horas se encontró un efecto antagónico en todas las combinaciones ATRA-CIS (1.47 ± 0.03), ATRA-PACLI (1.28 ± 0.04), CIS-PACLI (1.23 ± 0.09) y ATRA-CIS-PACLI (1.53 ± 0.03). A las 72 horas se mantuvo el efecto antagónico en los grupos ATRA-CIS (1.34 ± 0.27), ATRA-PACLI (1.59 ± 0.16), CIS-PACLI (1.19 ± 0.02) y ATRA-CIS-PACLI (2.14 ± 0.03).

Tiempo (Horas)	A	C	A+C	Efecto	A	P	A+P	Efecto	C	P	C+P	Efecto	A	C	P	A+C+P	Efecto
24	0.46 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.61 ± 0.06	Sin	0.23 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.40 ± 0.02	Sin	0.07 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.23 ± 0.01	Sin fuerte	0.27 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.56 ± 0.10	Sin
48	1.11 ± 0.05	0.36 ± 0.09	1.47 ± 0.03	Ant	0.72 ± 0.05	0.56 ± 0.05	1.28 ± 0.04	Ant	0.36 ± 0.09	0.87 ± 0.05	1.23 ± 0.09	Ant	0.73 ± 0.05	0.24 ± 0.09	0.56 ± 0.5	1.53 ± 0.03	Ant
72	0.92 ± 0.18	0.42 ± 0.10	1.34 ± 0.27	Ant	0.91 ± 0.18	0.68 ± 0.05	1.59 ± 0.16	Ant	0.45 ± 0.10	0.74 ± 0.05	1.19 ± 0.02	Ant	0.97 ± 0.18	0.44 ± 0.10	0.73 ± 0.05	2.14 ± 0.03	Ant

A: ATRA; C: CIS; P: PACLI; Sin: Sinergismo; Ant: Antagonismo.

Tabla 1. Índice de combinación (IC) los diferentes tratamientos en la línea H1666. Los valores del IC se muestran en medias ± desviación estándar (DS) para cada una de las siguientes combinaciones: ATRA-CIS (A+C), ATRA-PACLI (A+P), CIS-PACLI (C+P), ATRA-CIS-PACLI (A+C+P).

Ciclo celular

Se evaluó ciclo celular a diferentes tiempos, a las 24 horas se encontró una disminución de la fase G₀-G₁ en los grupos PACLI (16.43 ± 1.5%, p<0.001), ATRA-PACLI (18.8 ± 0.36%, p<0.001), CIS-PACLI (23.6 ± 1.49%, p<0.001) y ATRA-CIS-PACLI (23.6 ± 8.0%, p<0.001) en comparación con los grupos control (68.5 ± 6.3%), ATRA (59.1 ± 5.9%), CIS (52.3 ± 12.2%) y ATRA-CIS (62.4 ± 4.2%) (**Figura 2A**). La fase G₂-M mostró un incremento en el grupo PACLI (39.4 ± 4.5%) en comparación con Control (1.8 ± 1.7%, p<0.001), ATRA (8.8 ± 2.9 %, p<0.001), CIS (8.44 ± 3.0 %, p<0.001), ATRA-CIS (5.0 ± 2.8 %, p<0.001), CIS-PACLI (23.4 ± 2.2%, p=0.020) y ATRA-CIS-PACLI (13.8 ± 4.0%, p<0.001). Aunque hubo una disminución en el grupo ATRA-PACLI (23.9 ± 10.9%, p=0.10) no alcanzó a ser significativo. El porcentaje de viabilidad fue mayor en los grupos PACLI (p<0.001), ATRA-PACLI (p=0.005) y CIS-PACLI (p=0.006) con respecto a ATRA, CIS (5.0 ± 2.8%) y ATRA-CIS (**Figura 2B**). La fase S mostró un incremento en el grupo ATRA-CIS-PACLI (54.2 ± 6.0%) en comparación con el grupo control (22.0 ± 8.0%, p=0.002), ATRA

($27.9 \pm 2.4\%$, $p=0.001$), CIS ($29.0 \pm 11.1\%$, $p=0.012$), PACLI ($36.2 \pm 1.5\%$, $p=0.018$), ATRA-CIS ($23.9 \pm 5.2\%$, $p<0.001$) (**Figura 2C**). No se encontraron diferencias en sub G0, control ($9.1 \pm 1.6\%$), ATRA ($4.0 \pm 3.2\%$), CIS ($10.1 \pm 4.4\%$), PACLI ($7.8 \pm 1.8\%$), ATRA-CIS ($8.5 \pm 4.0\%$), ATRA-PACLI ($14.6 \pm 9.2\%$) y CIS-PACLI ($9.3 \pm 0.7\%$) (**Figura 2D**).

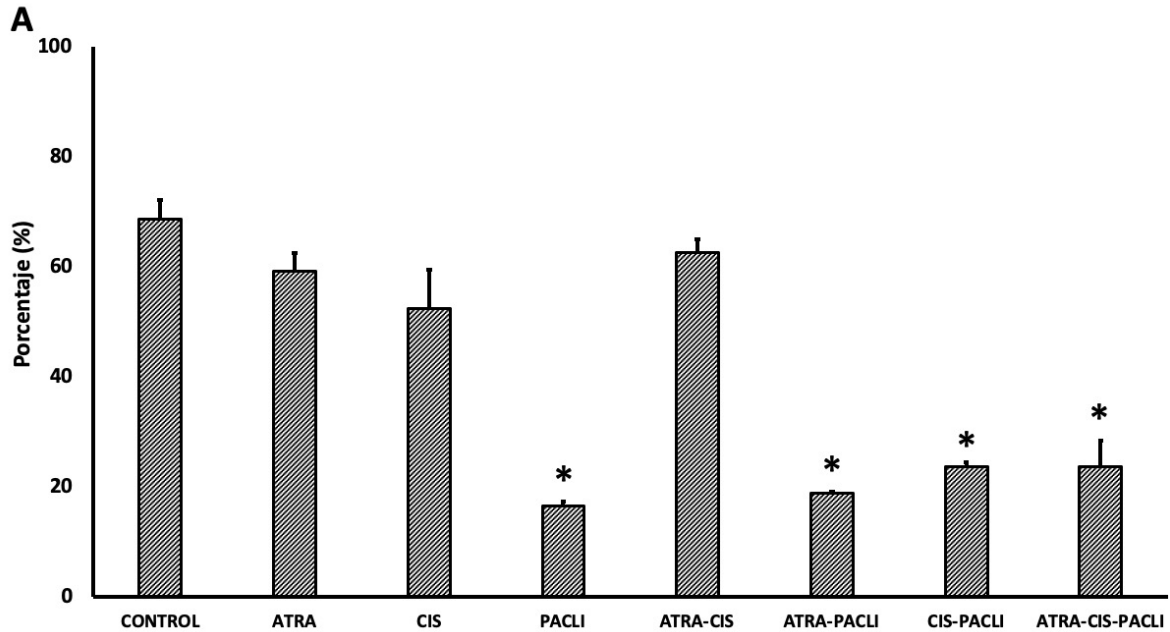
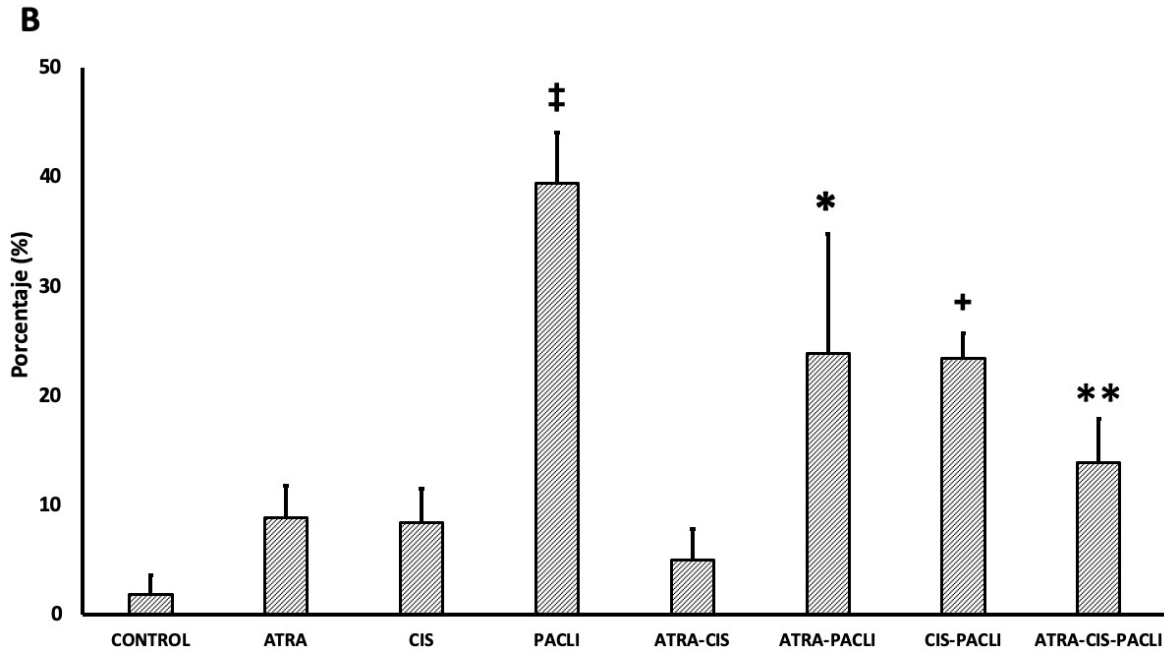
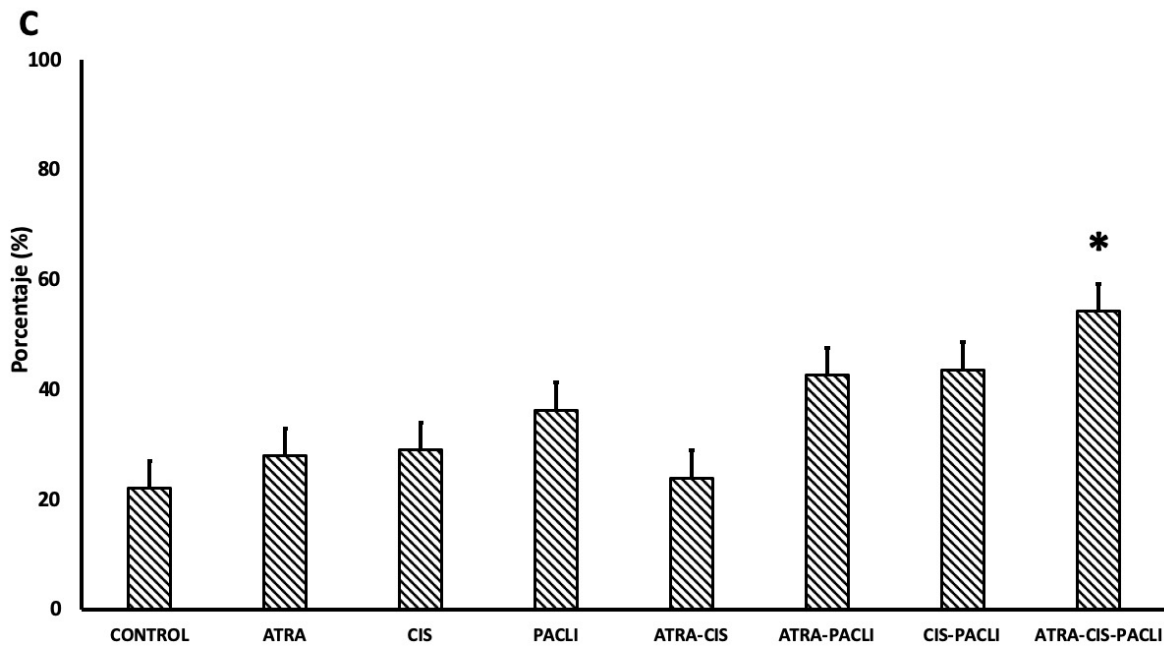


Figura 2A. Distribución del ciclo celular por citometría de flujo a las 24 horas. * $p<0.001$ muestra las diferencias significativas en la fase G_0-G_1 comparadas contra el Control



*Figura 2B. Fase G₂-M del ciclo celular. Se observan diferencias significativas de: * $p < 0.001$, ** $p = 0.020$, ‡ $p < 0.001$ y + $p < 0.001$, comparadas contra el grupo control.*



*Figura 2C. Fase S a 24 horas. * $p = 0.002$ comparado con el grupo control.*

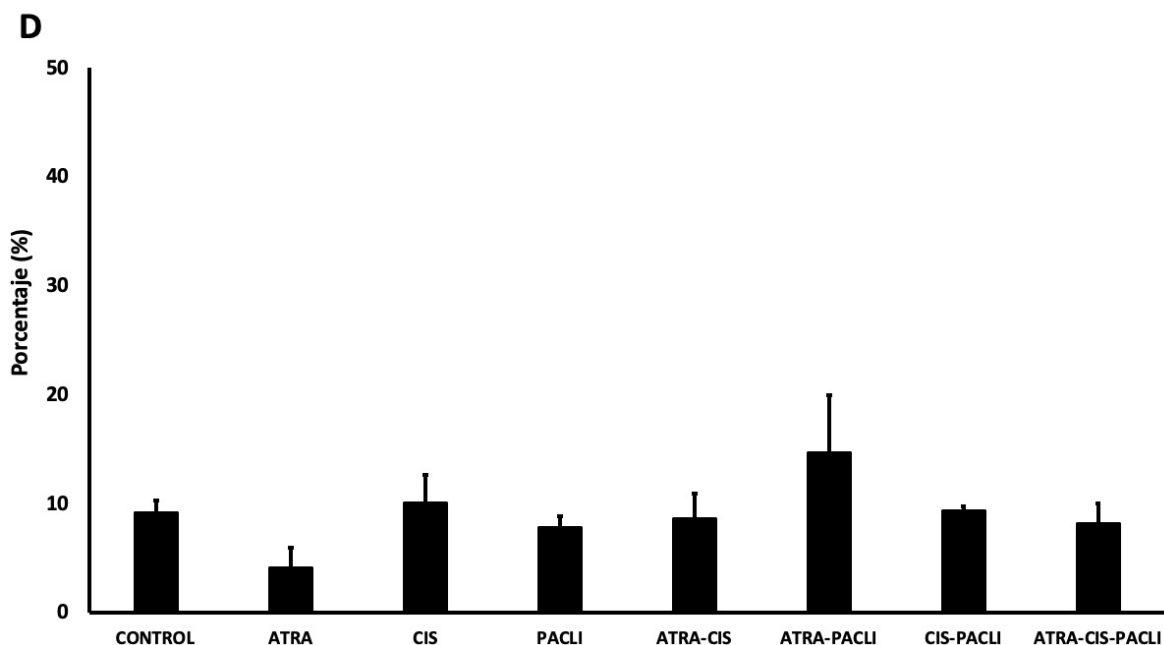


Figura 2D. Fase sub G0. No se muestra diferencias entre grupos.

A las 48 horas se encontró una disminución del incremento en la fase G0-G1 en los grupos tratados con PACLI (37.3 ± 5.3), ATRA-PACLI (39.5 ± 5.1), CIS-PACLI (36.4 ± 4.8) en comparación con el grupo control (57.5 ± 6.2 , $p=0.010$, 0.036 y 0.006), ATRA (59.7 ± 2.8 , $p<0.001$, <0.001 y <0.001), CIS (59.9 ± 2.7 $p<0.001$, <0.001 y <0.001) y ATRA-CIS (57.6 ± 0.66 , $p<0.001$, 0.001 y <0.001) (**Figura 3A**). En la fase G2-M se encontró una disminución en todos los grupos respecto al control. Los grupos que mostraron una mayor disminución fueron ATRA (0.3 ± 0.1 , $p=0.049$), CIS (0.3 ± 0.1 , $p=0.031$) y ATRA-CIS (0.15 ± 0.01 $p=0.010$) respecto al grupo control. Mientras que PACLI (3.9 ± 1.6 , $p=0.005$), ATRA-PACLI (3.22 ± 2.88 , $p=0.002$) CIS-PACLI (4.8 ± 1.2 , $p=0.048$) y ATRA-CIS-PACLI (3.7 ± 1.6 , $p=0.05$). El grupo CIS-PACLI (4.8 ± 1.2) mostró un incremento en esta fase en comparación con ATRA ($p=0.019$), CIS ($p=0.012$), y ATRA-CIS ($p=0.004$) (**Figura 3B**). Por otro lado, la fase S mostró un incremento en los grupos que recibieron paclitaxel. El grupo que mostró el mayor incremento fue PACLI (49.0 ± 12.3), seguido de CIS-PACLI (47.9 ± 5.6) y ATRA-PACLI (45.0 ± 4.8) en comparación con los grupos ATRA

(11.6 ± 4.0 , $p < 0.001$ en todas las comparaciones), CIS (9.6 ± 2.8 , $p < 0.001$ en todas las comparaciones) y ATRA-CIS (6.8 ± 1.0 , $p < 0.001$ respectivamente). El grupo ATRA-CIS-PACLI (36.3 ± 3.5) mostró diferencias con respecto a los grupos ATRA ($p = 0.002$), CIS ($p = 0.001$) y ATRA-CIS ($p < 0.001$) (**Figura 3C**) La fase Sub G0 incrementó en los grupos ATRA (27.7 ± 5.6 , $p = 0.002$), CIS (29.7 ± 0.7 , $p = 0.001$) y ATRA-CIS (35.3 ± 1.3 , $p < 0.001$) comparado con los grupos control (3 ± 1.9). Los grupos ATRA, CIS, y ATRA-CIS mostraron un incremento respecto a los grupos PACLI (9.9 ± 8.5 , $p = 0.05$, $p = 0.04$, $p = 0.05$), ATRA-PACLI (12.4 ± 0.26 , $p = 0.015$, $p = 0.010$, $p = 0.002$), CIS-PACLI (11.5 ± 1.5 , $p = 0.010$, $p = 0.010$, $p = 0.012$, $p = 0.004$) y ATRA-CIS-PACLI (19.1 ± 2.1 , $p = 0.05$, $p = 0.048$, $p = 0.05$) (**Figura 3D**).

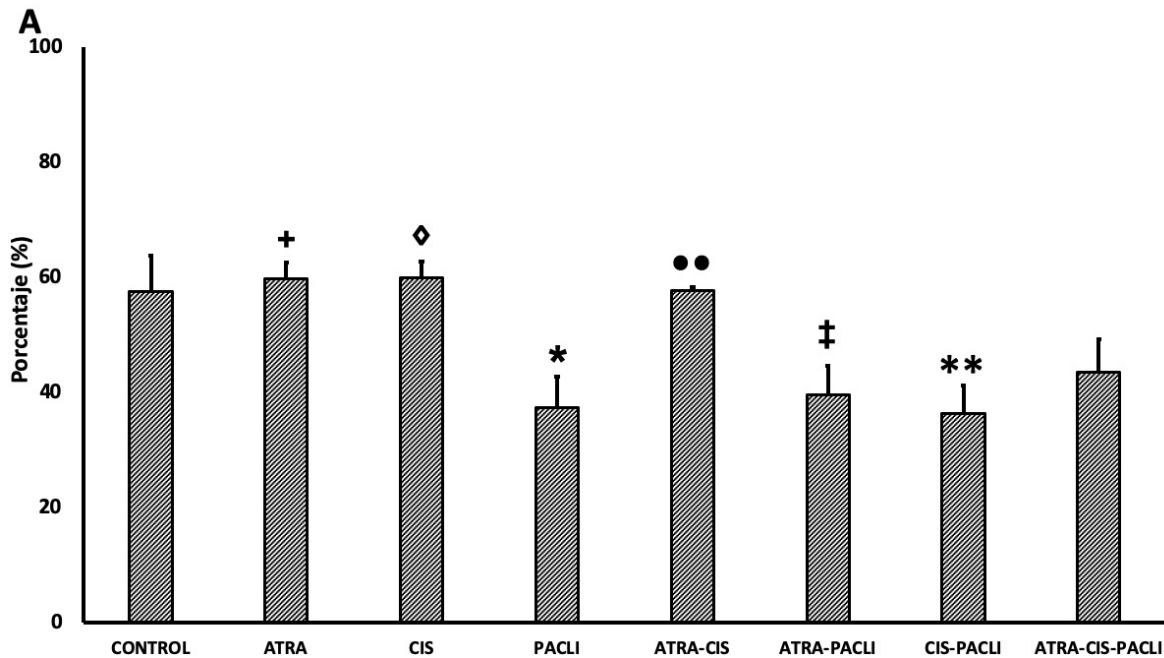


Figura 3A. Distribución del ciclo celular por citometría de flujo a las 48 horas. La fase G₀-G₁ fue significativo * $p = 0.010$, ‡ $p = 0.036$, ** $p = 0.006$ comparado con el grupo control y † $p < 0.001$ comparado con el grupo ATRA, ◊ $p < 0.001$ CIS y •• $p < 0.001$ ATRA-CIS.

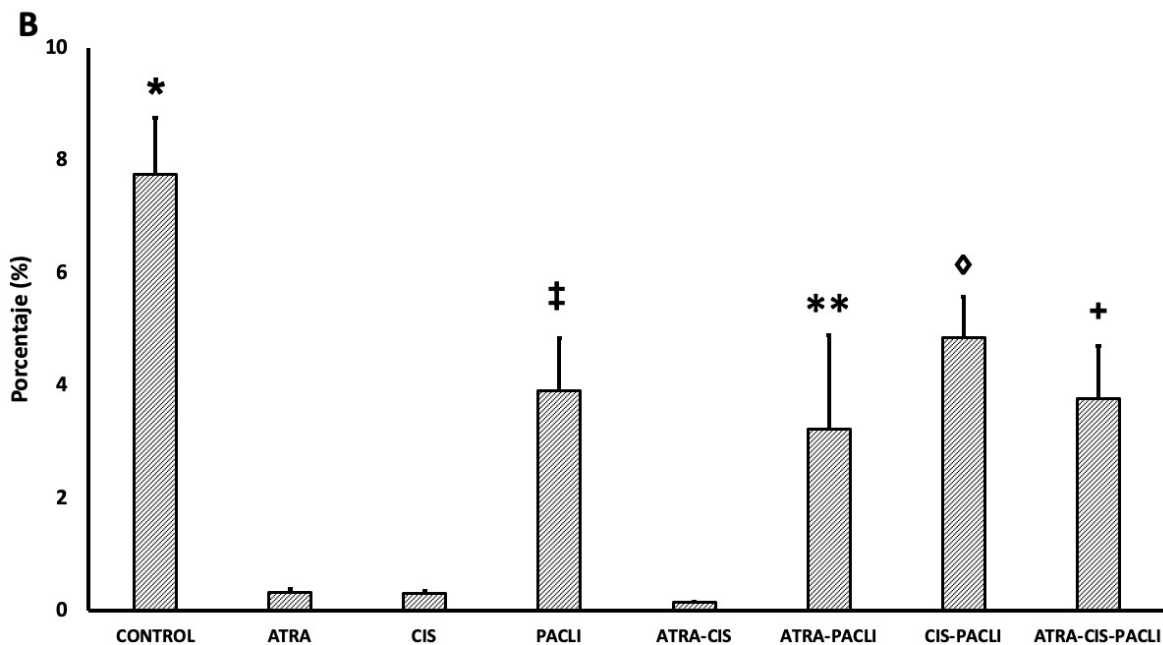


Figura 3B. Fase G₂-M a las 48 horas. Se muestran diferencias significativas cuando se comparó * $p < 0.001$ en ATRA, CIS y ATRA-CIS comparados con el control. También se encontraron diferencias entre ‡ $p = 0.049$ ATRA, ** $p = 0.010$ ATRA-PACLI y + p CIS-PACLI comparados con el control.

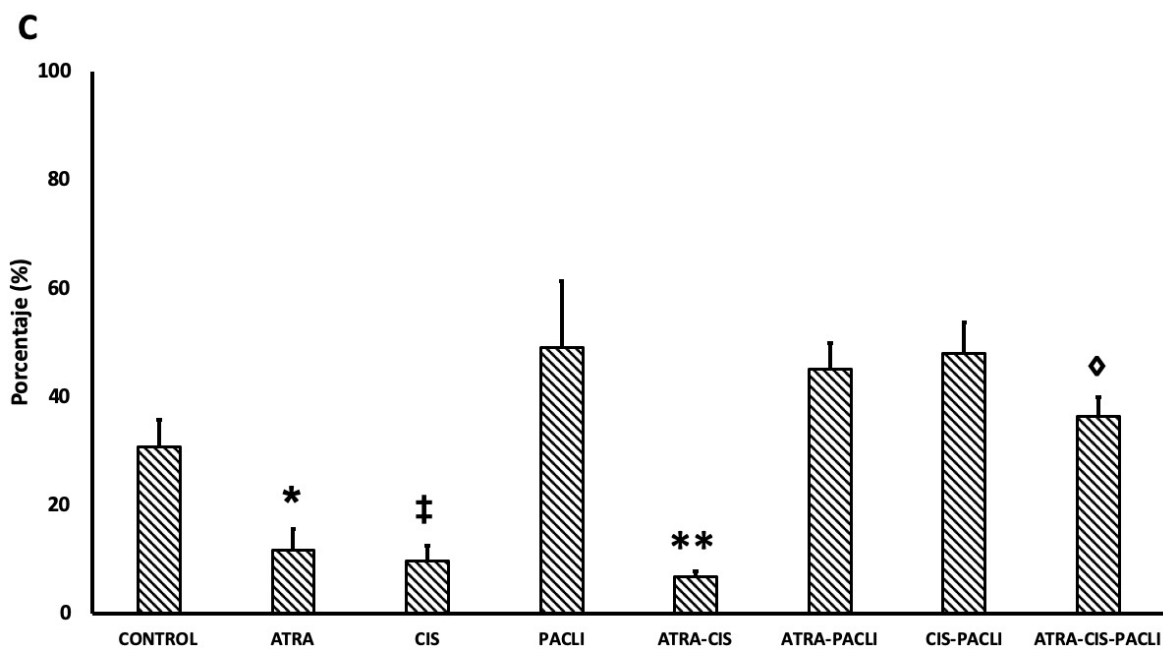


Figura 3C Fase S a las 48 horas. Se encontraron diferencias entre $*p=0.001$ ATRA, CIS † $p<0.001$, ATRA-CIS $**p<0.001$ comparado con PACLI. Se encontraron diferencias entre $^{\circ}p<0.001$ ATRA comparado con ATRA, CIS y ATRA-CIS.

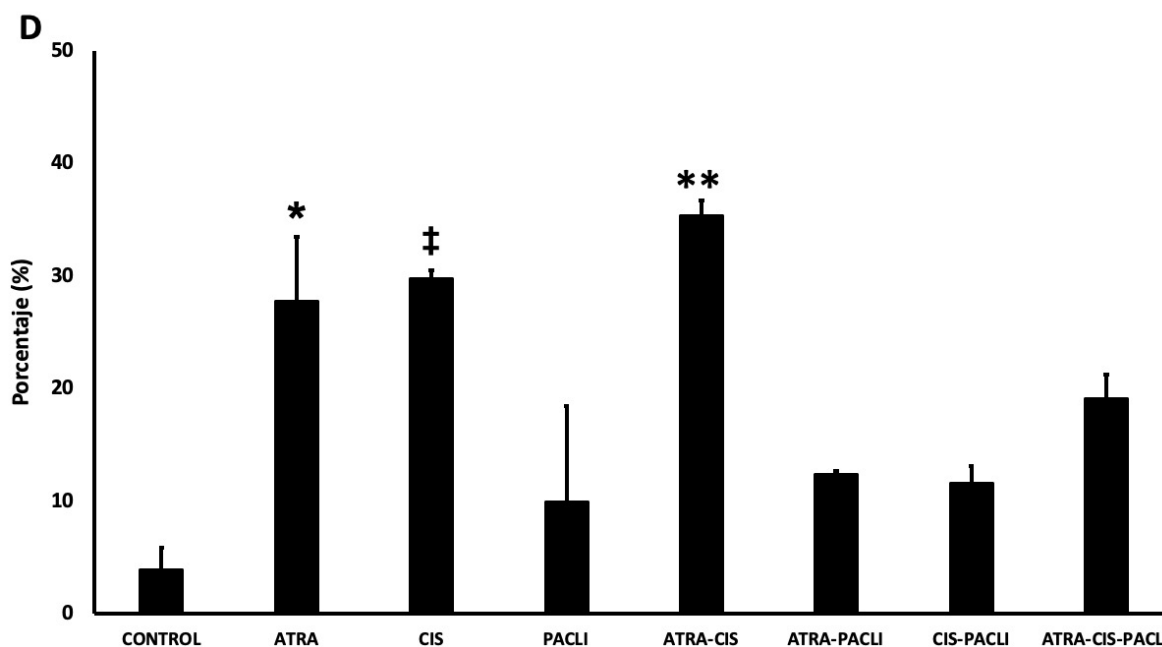


Figura 3D Fase Sub G0 a las 48 horas. Se muestran diferencias entre $*p=0.002$ ATRA, $*p=0.001$ CIS, $*p<0.001$ vs control. Se muestran diferencias entre ATRA comparado con PACLI $*p=0.05$, ATRA-PACLI $*p=0.015$, CIS-PACLI $*p=0.010$, y ATRA-CIS-PACLI $p=0.05$. Se muestran diferencias entre CIS comparado con PACLI † $p=0.04$, ATRA-PACLI † $p=0.010$, CIS-PACLI † $p=0.010$, y ATRA-CIS-PACLI † $p=0.048$. Se muestran diferencias entre ATRA-CIS comparado con PACLI $**p=0.05$, ATRA-PACLI $**p=0.002$, CIS-PACLI $**p=0.012$, y ATRA-CIS-PACLI $**p=0.05$.

A las 72 horas se encontraron diferencias en la fase G0-G1 en el grupo ATRA-CIS-PACLI (30.3 ± 4.9) con respecto al grupo control (51.8 ± 2.8 $p=0.001$). Los demás grupos no mostraron cambios ATRA (56.7 ± 1.9), CIS (54 ± 3.4), PACLI (40.5 ± 5.1), ATRA-CIS (55.1 ± 5.3), ATRA-PACLI (38.3 ± 5.3), CIS-PACLI (37.3 ± 1.0) (**Figura 4A**). La fase G2-M mostró cambios significativos entre ATRA (0.85 ± 0.2), CIS (0.65 ± 0.41) y ATRA-CIS (0.15 ± 0.01) cuando se comparó con el grupo control (3.2 ± 0.1 , $p<0.001$). PACLI (3.7 ± 1.7), ATRA-PACLI (3.0 ± 0.08), CIS-PACLI (4.1 ± 0.68)

y ATRA-CIS-PACLI (1.0 ± 1.0) no mostraron diferencias significativas (**Figura 4B**). Se encontró un incremento en la fase S principalmente en el grupo ATRA-CIS-PACLI (51.7 ± 3.7) y CIS-PACLI (44.1 ± 3.65) en comparación con los grupos ATRA (6.5 ± 0.9 , $p=0.021$), CIS (5.5 ± 1.0 , $p=0.018$) y ATRA-CIS (5.29 ± 1.7 , $p=0.017$). Se encontró una disminución en los grupos ATRA (6.5 ± 0.9), CIS (5.5 ± 1.0) y ATRA-CIS (5.29 ± 1.7) comparado con el grupo control (30 ± 5.9 , $p<0.001$ para todas las comparaciones). No se encontraron diferencias en otros grupos (**Figura 4C**). En la fase Sub G0 se encontró un incremento en el grupo de CIS (40.1 ± 4.5) comparado con CIS-PACLI (13.7 ± 3.9 , $p=0.032$) y ATRA-CIS-PACLI (14.1 ± 3.0 , $p=0.035$). No se encontraron diferencias en otros grupos (**Figura 4D**).

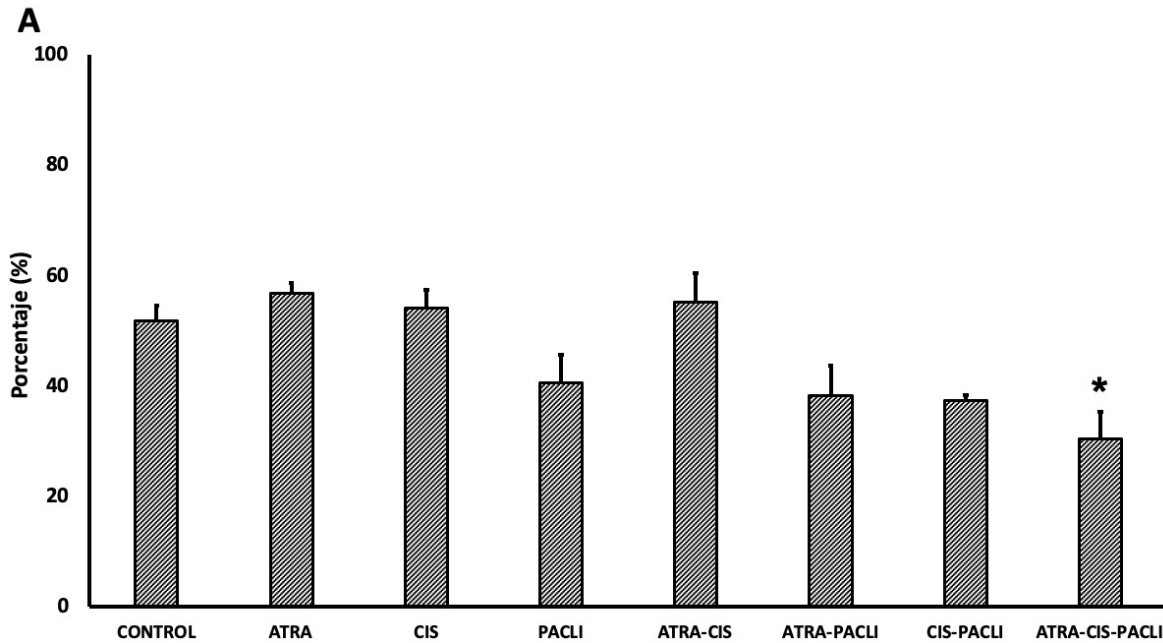


Figura 4A Distribución del ciclo celular por citometría de flujo a las 72 horas. La fase G_0-G_1 fue significativo, $*p=0.001$, cuando se comparó con el control.

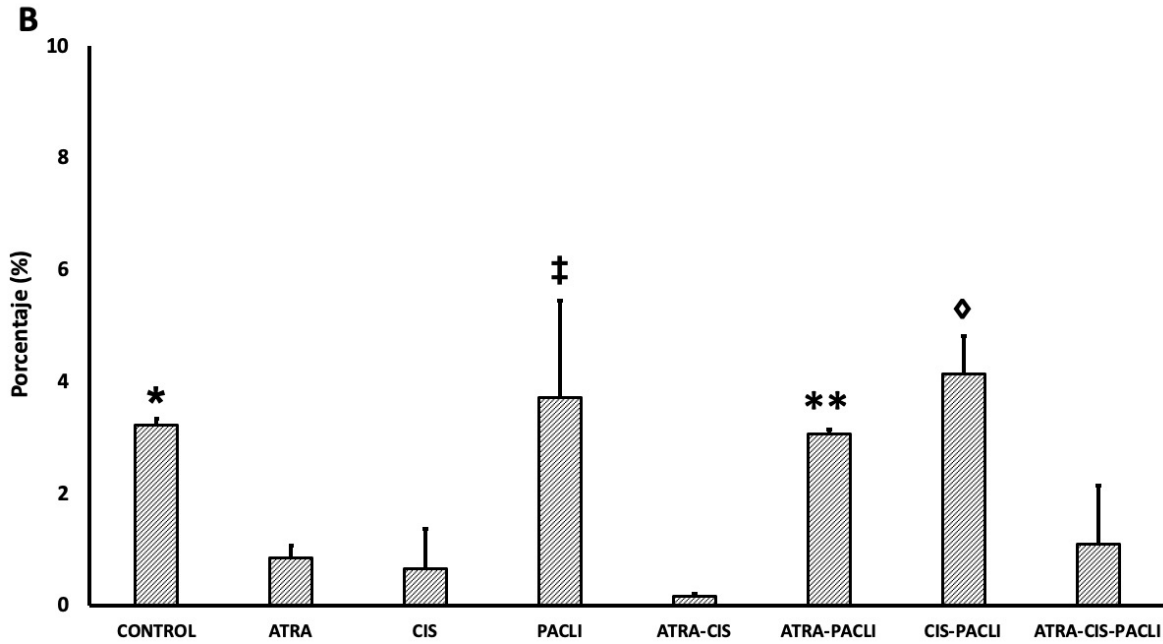
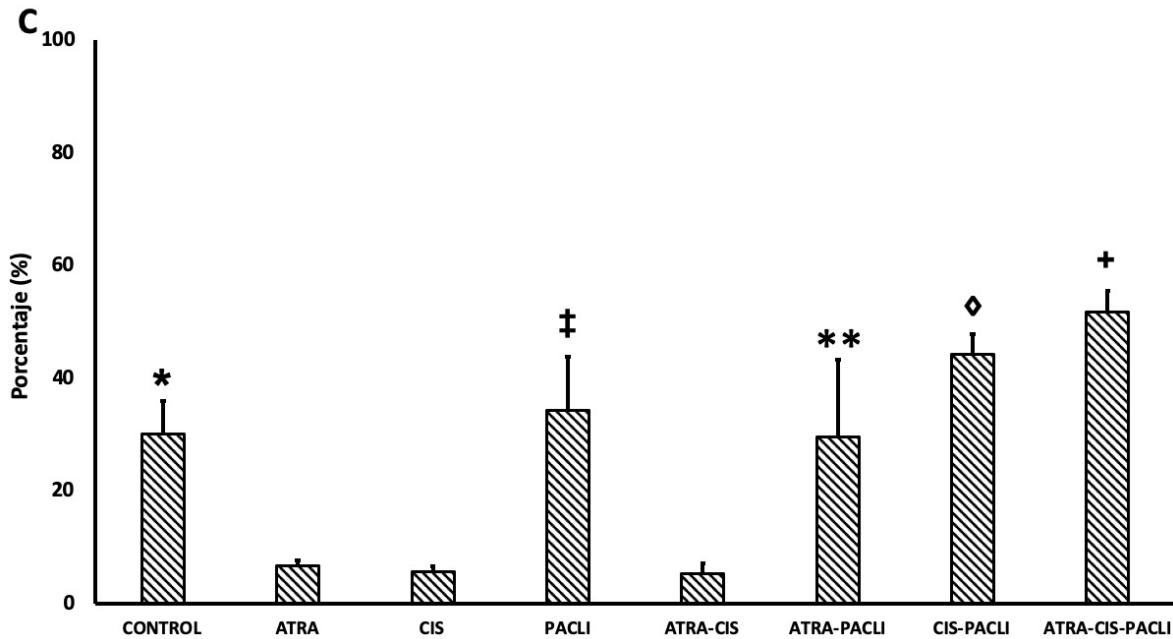
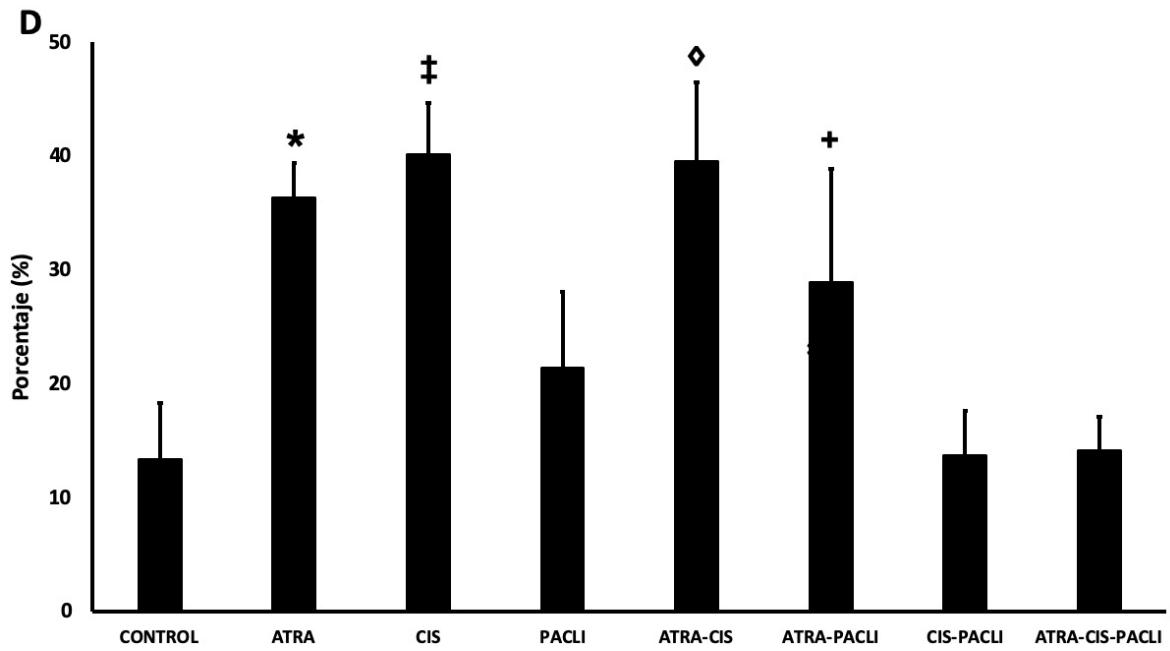


Figura 4B Fase G₂-M a las 72 horas. Se encontraron diferencias entre ATRA, CIS ATRA-CIS y ATRA-CIS-PACLI cuando se comparó con el control ($p < 0.001$).*



*Figura 4C Fase S a las 72 horas. Se muestran las diferencias * $p < 0.001$, entre el grupo ATRA-CIS-PACLI vs ATRA, CIS y ATRA-CIS.*



*Figura 4D Fase Sub G0 a las 72 horas. Se muestran las diferencias entre los grupos * $p=0.032$ CIS-PACLI y ** $p=0.035$ ATRA-CIS-PACLI vs CIS.*

Apoptosis

Se evaluó apoptosis a las 24, 48 y 72 horas mediante citometría de flujo (Figura 5, 6 y 7, respectivamente). A las 24 horas se encontró disminución en la viabilidad celular de los grupos ATRA-PACLI (57.5 ± 6.5 , $p=0.005$) y CIS-PACLI (47.8 ± 8.3 , $p=0.001$) comparado con los grupos control (77 ± 9.8). No se encontraron cambios en los grupos ATRA (75.3 ± 10.4), CIS (74.6 ± 13.4), PACLI (82 ± 2.6) y ATRA-CIS (60.3 ± 11.0) (**Figura 5A**). Se encontró un incremento en la apoptosis en el grupo CIS-PACLI (44.8 ± 1.13), ATRA-PACLI (38.4 ± 6.7) y ATRA-CIS (36.0 ± 1.1) comparado el grupo PACLI (11.4 ± 1.9 , $p=0.003$, $p=0.001$ y $p<0.001$). Los grupos control (16 ± 9.5), ATRA (18.7 ± 8.2), CIS (19.4 ± 13.8) y ATRA-CIS-PACLI (19.4 ± 7.4) no mostraron diferencias (**Figura 5B**). La evaluación de necrosis mostró una disminución en los grupos ATRA-CIS (3.5 ± 1.9) y ATRA-PACLI (4.0 ± 0.4) sin llegar a ser estadísticamente significativo. Por otro lado, se encontró un incremento en el grupo de ATRA-CIS-PACLI (9.0 ± 4.8) control (6.8 ± 1.3), ATRA (5.9 ± 2.0), CIS (5.9 ± 2.1), PACLI (6.3 ± 0.7) y CIS-PACLI ($7.4 \pm .65$) sin llegar a ser estadísticamente significativo (**Figura 5C**).

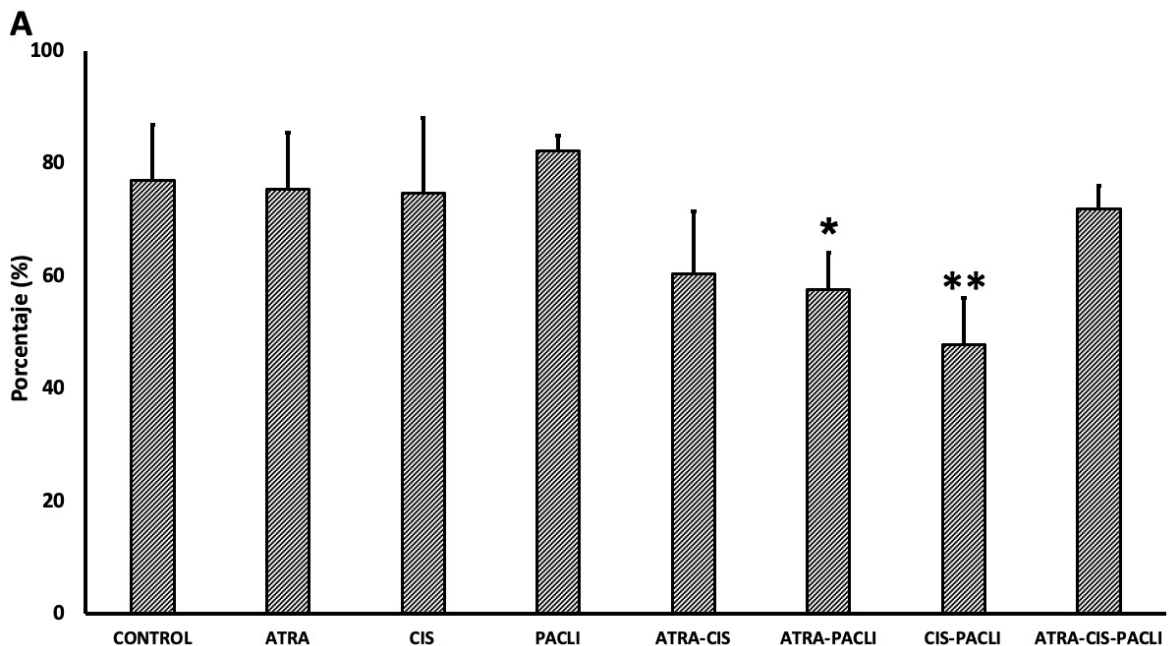


Figura 5A. Evaluación de apoptosis a las 24 horas. Diferencia en la viabilidad entre los grupos * $p=0.005$ ATRA-PACLI y ** $p=0.001$ CIS-PACLI vs control.

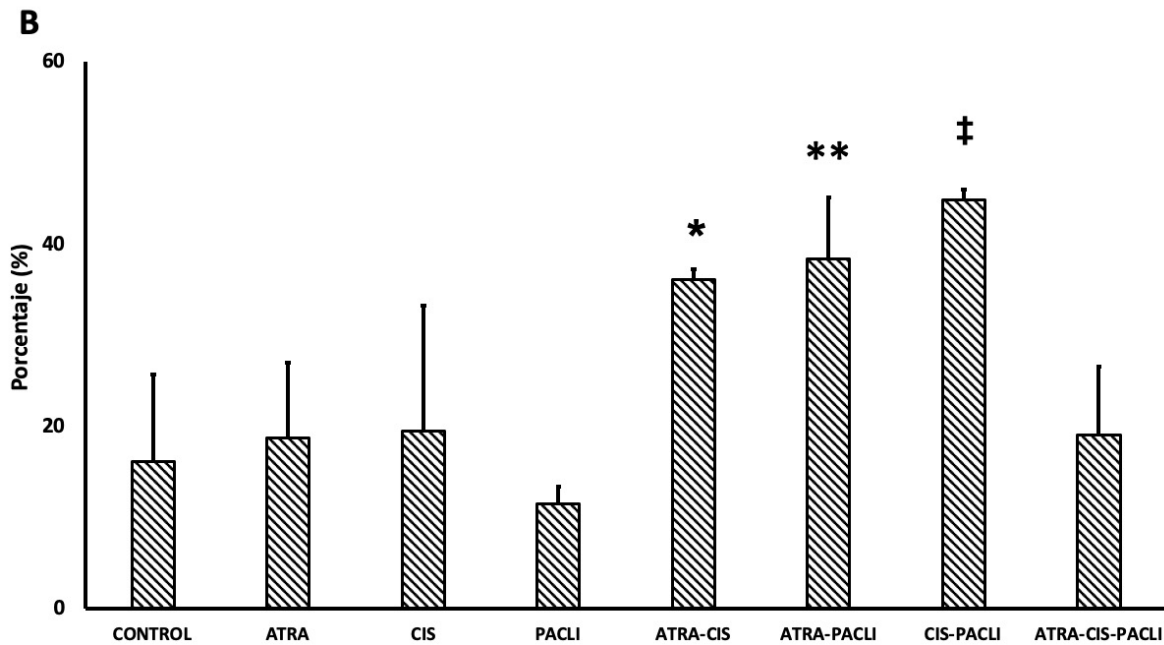


Figura 5B. Evaluación de células en apoptosis. La apoptosis mostró diferencias entre los grupos * $p=0.003$ ATRA-CIS, ** $p=0.001$ ATRA-PACLI y ‡ $p<0.001$ CIS PACLI comparado con el control.

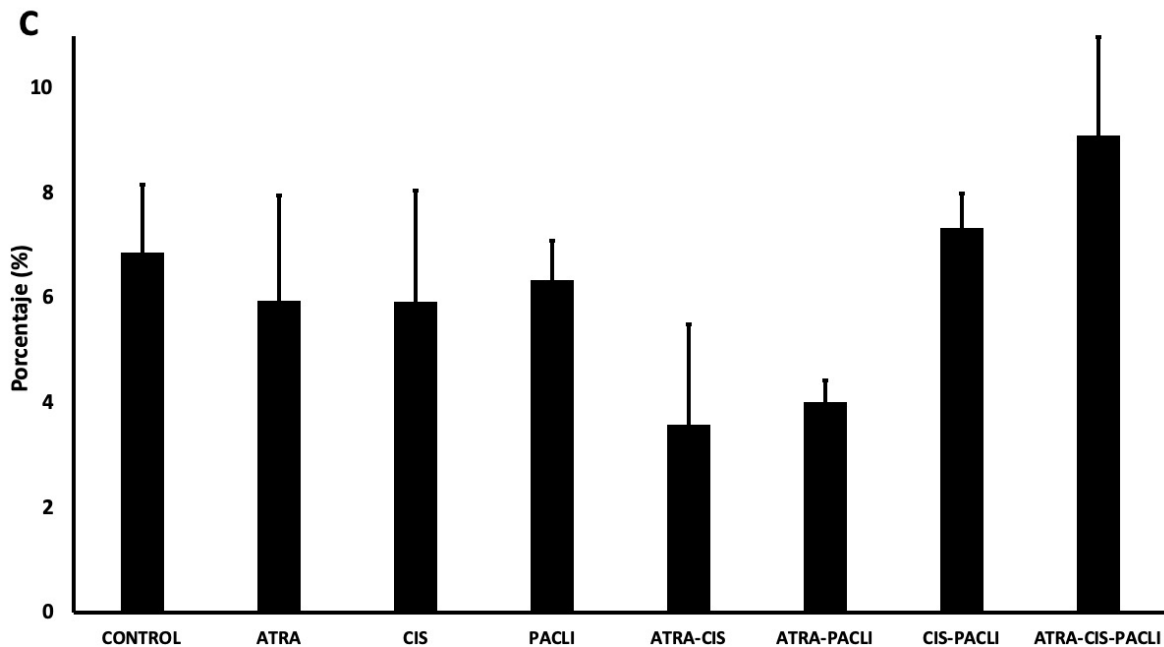


Figura 5C. Evaluación células necróticas a las 24 horas. No se encontraron diferencias en las células necróticas.

A las 48 horas se encontró una disminución en las células vivas en los grupo ATRA (12.7 ± 6.9 , $p=0.015$), CIS (12.0 ± 0.5 , $p=0.004$), PACLI (14.8 ± 1.7 , $p=0.006$), ATRA-CIS (5.12 ± 1.8 $p=0.007$), ATRA-PACLI (2.7 ± 1.6 , $p=0.005$), CIS-PACLI (13.9 ± 2.4 , $p= 0.004$) y ATRA-CIS-PACLI (12.9 ± 1.8 , $p= 0.005$) con respecto al grupo control (66.5 ± 8.1) (**Figura 6A**). Se encontró un incremento en la apoptosis en los grupos ATRA (65.9 ± 12.0), CIS (77.6 ± 1.8), ATRA-CIS (90.4 ± 1.99), ATRA-PACLI (92.6 ± 3.11), CIS-PACLI (68.5 ± 5.3) y ATRA-CIS-PACLI (67.5 ± 5.8) comparados con el grupo control (20.8 ± 3.3 , $p<0.001$ para todos las comparaciones). Se mostró un incremento del grupo PACLI (55.7 ± 9.1) sin llegar a ser significativo (**Figura 6 B**). La necrosis se vio incrementada en el grupo PACLI (29.4 ± 7.4) comparado con CIS (10.30 ± 1.21 , $p<0.001$), ATRA-CIS (4.5 ± 1.6 , $p<0.001$) y ATRA-PACLI (4.7 ± 3.2 $p<0.001$). No se encontraron diferencias en los demás grupos control (12.6 ± 3.92), ATRA (21.3 ± 8.5), CIS (10.3 ± 1.2 . $p=0.1$), CIS-PACLI (17.5 ± 3.0 $p=0.10$), ATRA-PACLI (4.72 ± 2.5 , $p=0.21$) y ATRA-CIS-PACLI (19.5 ± 4.1) (**Figura 6C**).

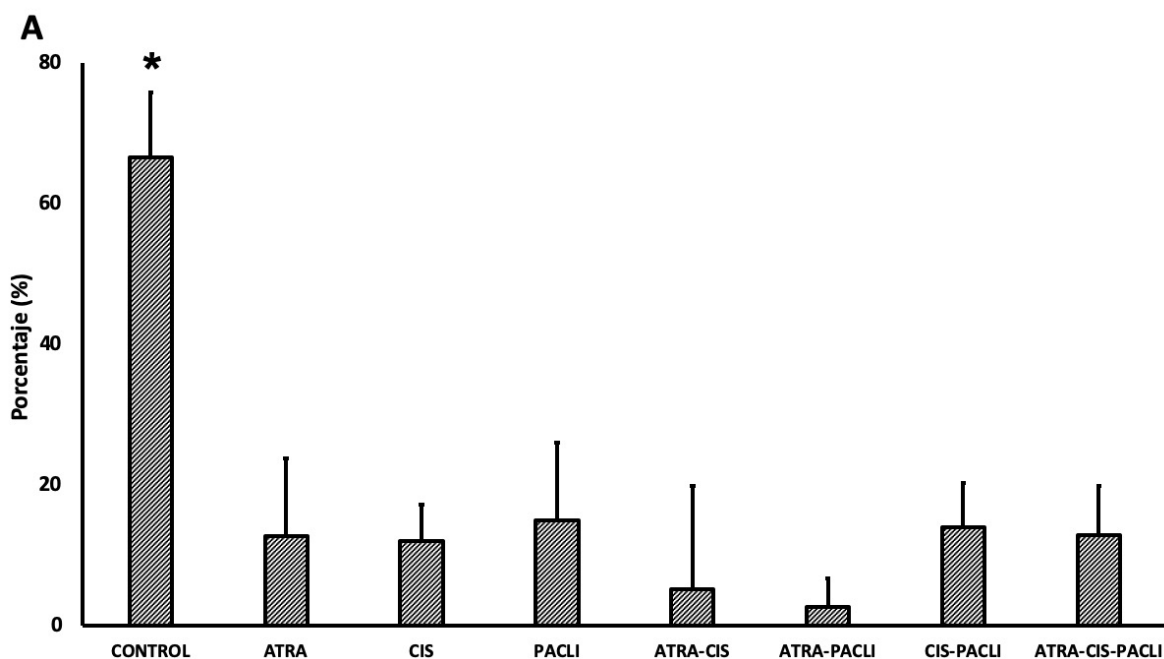
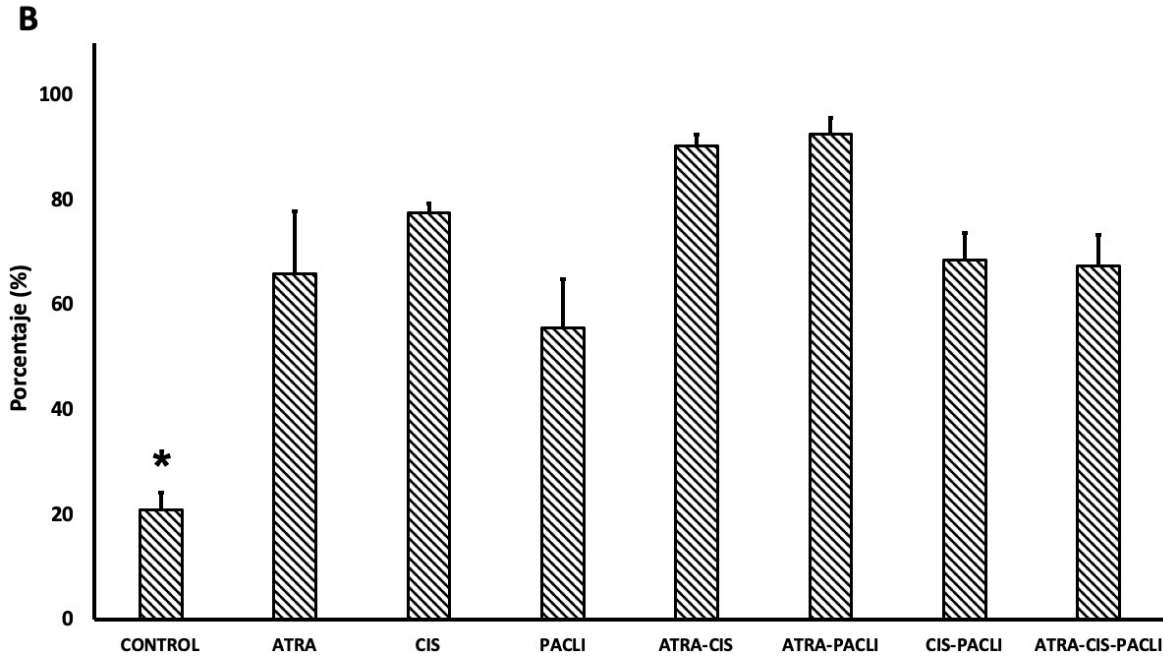


Figura 6A. Evaluación de apoptosis a las 48 horas. Diferencia en la viabilidad en todos los grupos con respecto al grupo control * $p<0.001$.



*Figura 6B. Evaluación de apoptosis a las 48 horas. Se muestra las diferencias en viabilidad respecto al grupo control * $p < 0.001$.*

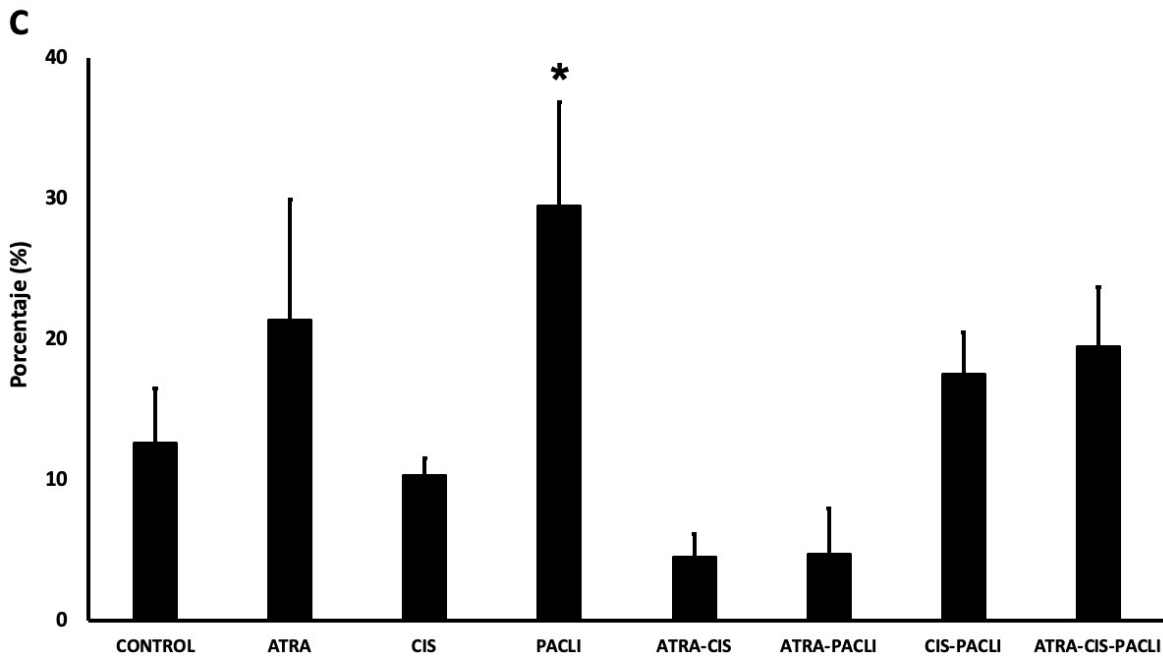


Figura 6C. Evaluación de apoptosis a las 48 horas. Se muestra las diferencias en necrosis del grupo PACLI respecto a CIS, ATRA-CIS y ATRA-PACLI ($p < 0.001$ para todas las comparaciones).*

A las 72 horas se encontró una disminución en las células vivas en todos los grupos ATRA (26.2 ± 10.9), CIS (19.9 ± 5.1), PACLI (21.6 ± 11.1), ATRA-CIS (25.7 ± 14.6), ATRA-PACLI (22.7 ± 3.9), CIS-PACLI (19.1 ± 6.2) y ATRA-CIS-PACLI (21.0 ± 6.9), comparados contra el grupo control (66.3 ± 9.3 $p < 0.001$ para todas las comparaciones) (**Figura 7A**). La apoptosis mostró un incremento en los grupos ATRA (47.4 ± 4.0), CIS (48.5 ± 1.3), ATRA-CIS (52.5 ± 8.4), ATRA-PACLI (41.2 ± 4.7), CIS-PACLI (46.8 ± 7.0) y ATRA-CIS-PACLI (49.0 ± 12.3), comparado con el grupo control (21.9 ± 5.6 , $p < 0.001$ para todos los grupos). El grupo de PACLI (34.6 ± 8.6 , $p = 0.78$), mostró un incremento sin llegar a ser significativo (**Figura 7B**). La necrosis mostró un incremento en los grupos PACLI (43.7 ± 7.8 , $p < 0.001$), ATRA-PACLI (36 ± 3.2 , $p = 0.001$) y CIS-PACLI (33.9 ± 1.1 , $p = 0.001$) comparado con el grupo control (11.7 ± 3.9). Los grupos ATRA (26.3 ± 9.1), CIS (31.5 ± 5.5) y ATRA-CIS-PACLI (29.6 ± 5.6) mostraron un incremento, sin llegar a ser estadísticamente significativo (**Figura 7C**).

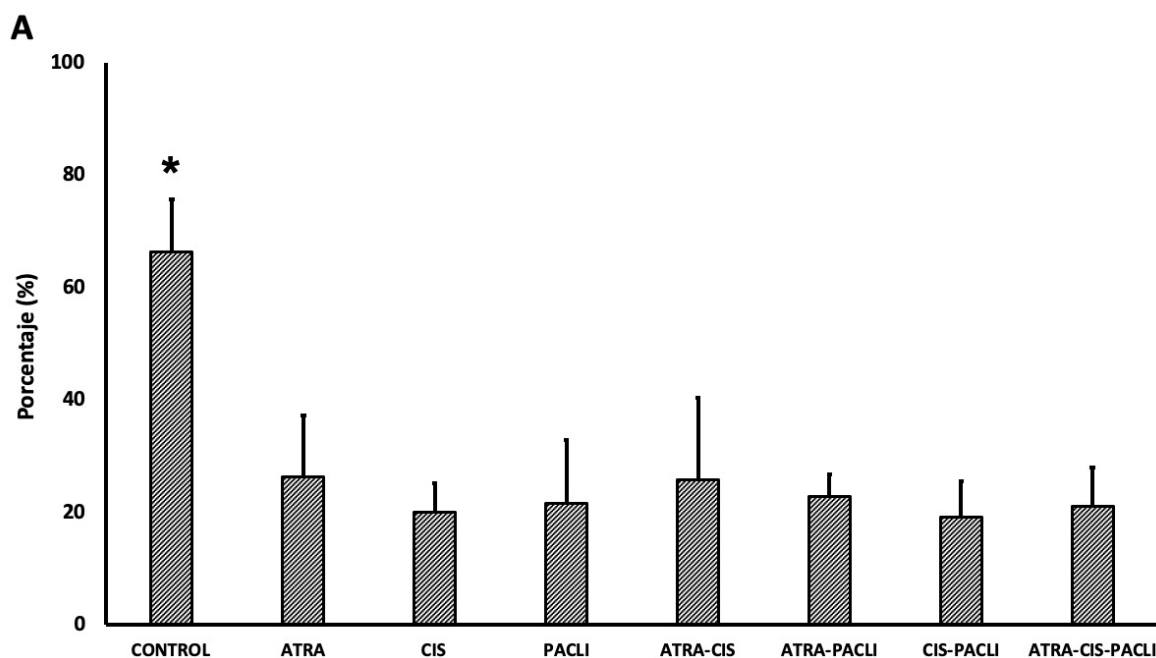


Figura 7A. Evaluación de apoptosis a las 72 horas. Diferencia en la viabilidad entre los grupos ATRA, CIS, PACLI, ATRA-CIS, ATRA-PACLI, CIS-PACLI y ATRA-CIS-PACLI con respecto al grupo control (* $p < 0.001$ para todos los grupos).

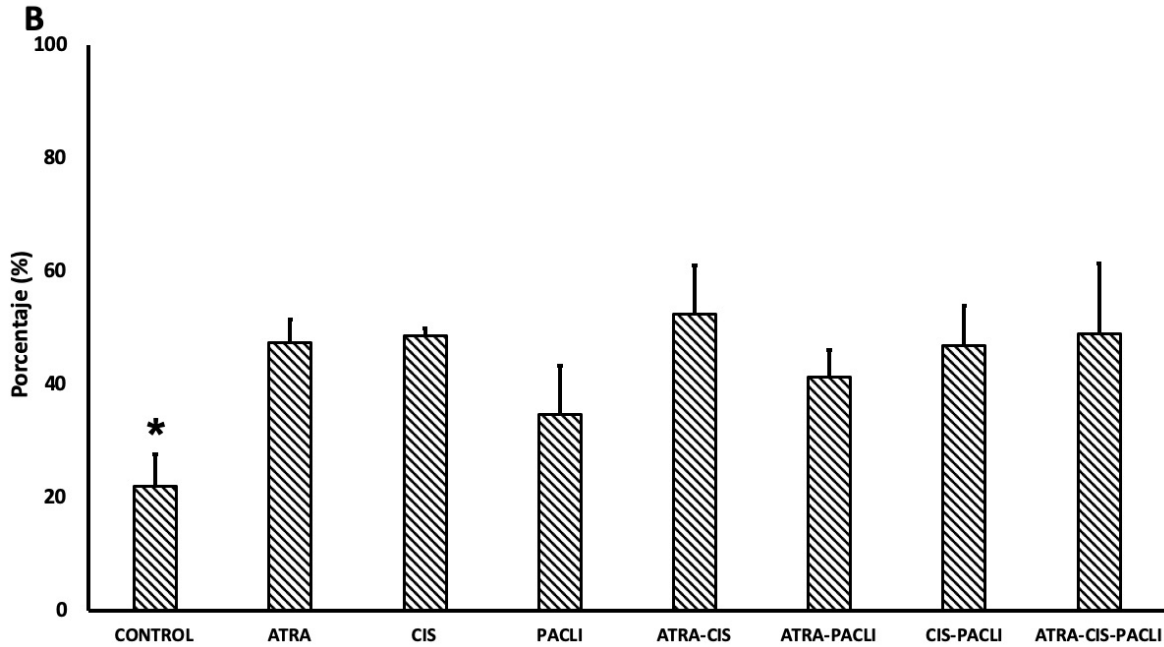


Figura 7B. Evaluación de apoptosis a las 72horas. Diferencias de apoptosis entre ATRA, CIS, PACLI, ATRA-CIS, ATRA-PACLI, CIS-PACLI y ATRA-CIS-PACLI vs control (* $p < 0.001$ para todos los grupos).

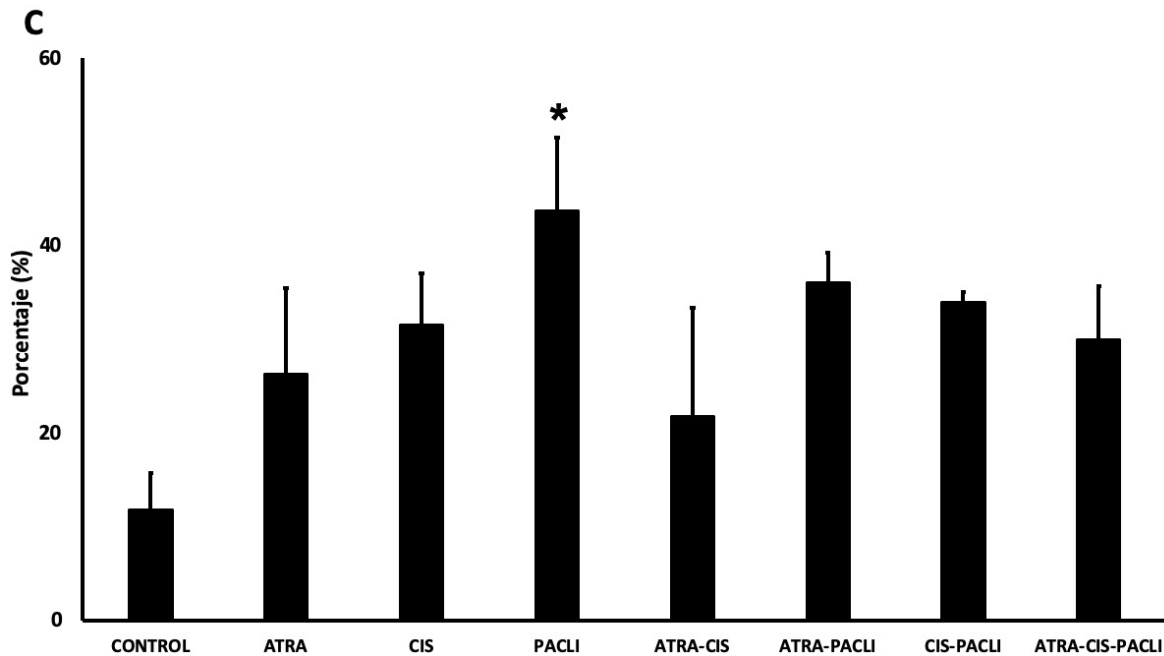


Figura 7C. Evaluación de apoptosis a las 72horas. Se encontró incremento en la necrosis de los grupos PACLI * $p = 0.001$, ATRA-PACLI ** $p < 0.001$ y CIS-PACLI ‡ $p = 0.011$ vs control.

Expresión de mRNA para los receptores de ácido retinoico

Se analizó la expresión de los receptores RAR α , β y γ y RXR α , β y γ a diferentes tiempos. Se encontró un incremento en la expresión del mRNA a las 24 horas del receptor RAR α de los grupos ATRA-CIS (1.99 ± 0.31), ATRA-PACLI (1.99 ± 0.25) y ATRA-CIS-PACLI (1.99 ± 0.41) comparados con el control (1.00, $p < 0.001$) (**Figura 8A**). A las 48 horas se incrementó la expresión del mRNA de este receptor en los grupos ATRA (1.99 ± 0.41), ATRA-CIS (1.99 ± 0.27), ATRA-PACLI (1.52 ± 0.21) y ATRA-CIS-PACLI (1.89 ± 0.27) con respecto al grupo control (1.00, $p = 0.001$) (**Figura 8 B**). A las 72 horas se mantuvo el incremento en la expresión del mRNA del receptor RAR α en los grupos ATRA (2 ± 0.19), ATRA-CIS (1.99 ± 0.19), ATRA-PACLI (1.99 ± 0.05) y ATRA-CIS-PACLI (1.99 ± 0.47) ($p < 0.001$ para todas las combinaciones) (**Figura 8 C**).

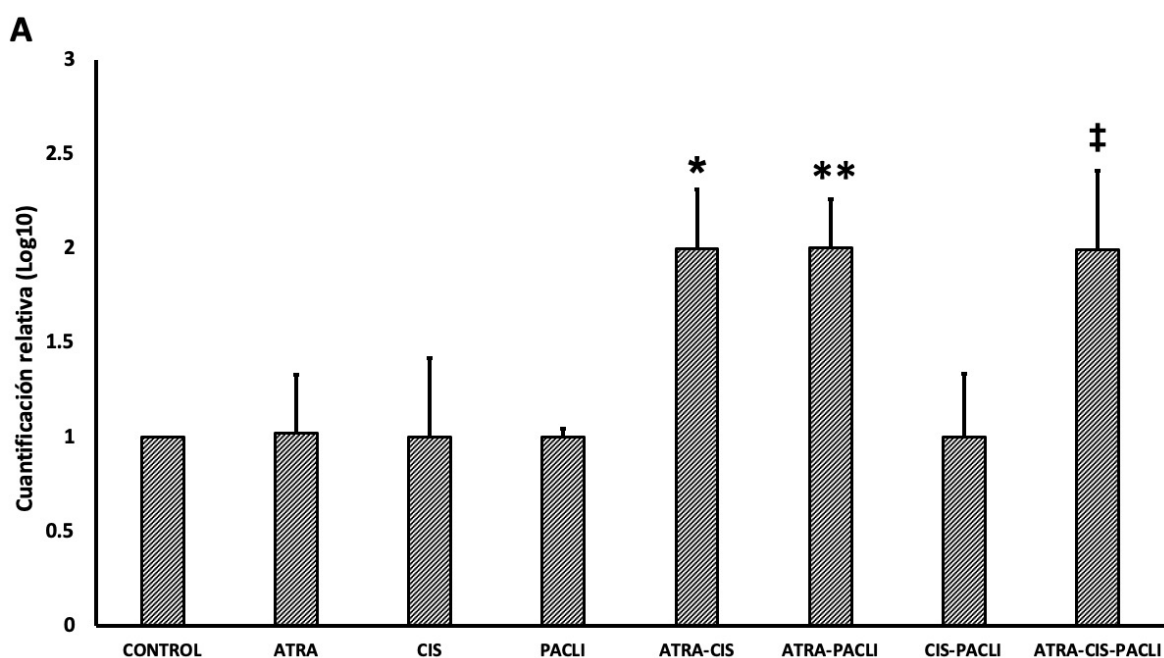


Figura 8A. Cuantificación de RAR α a las 24 horas. Diferencias en expresión de los receptores en ATRA-CIS * $p < 0.001$, ATRA-PACLI ** $p < 0.001$ y ATRA-CIS-PACLI ‡ $p < 0.001$ respecto al grupo control

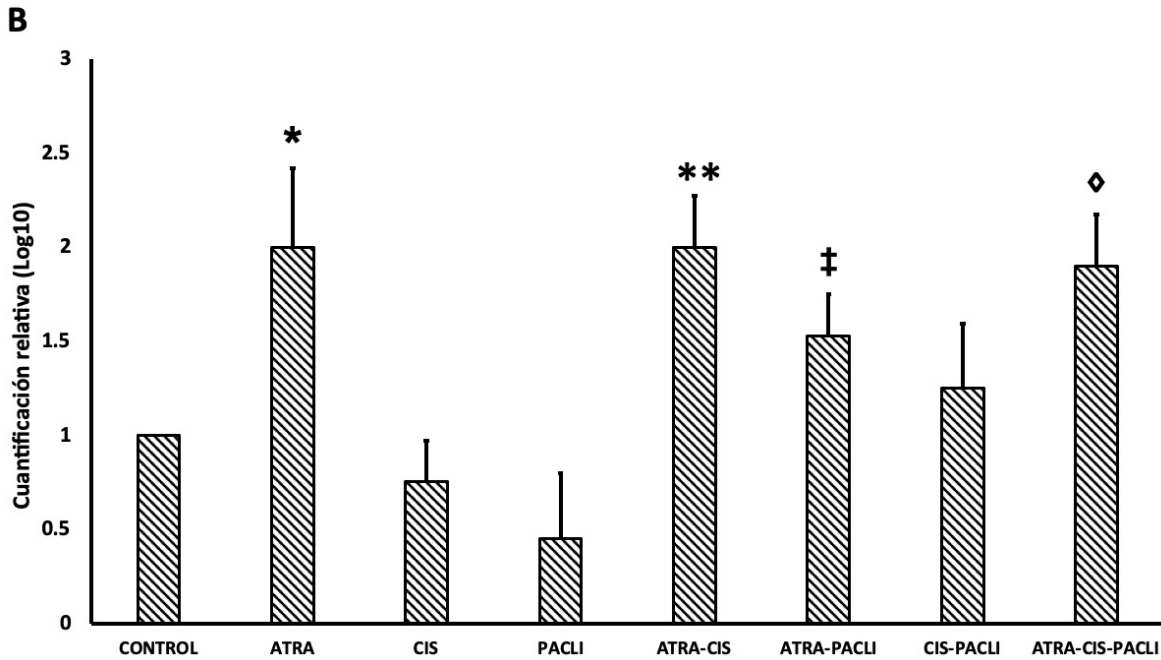


Figura 8B. Cuantificación de *RARα* a las 48 horas. Diferencias en la expresión de *RAR α* en ATRA * $p < 0.001$, ATRA-CIS ** $p < 0.001$, ATRA-PACLI ‡ $p < 0.001$ y ATRA-CIS-PACLI ◊ $p < 0.001$ cuando se comparó con el grupo control.

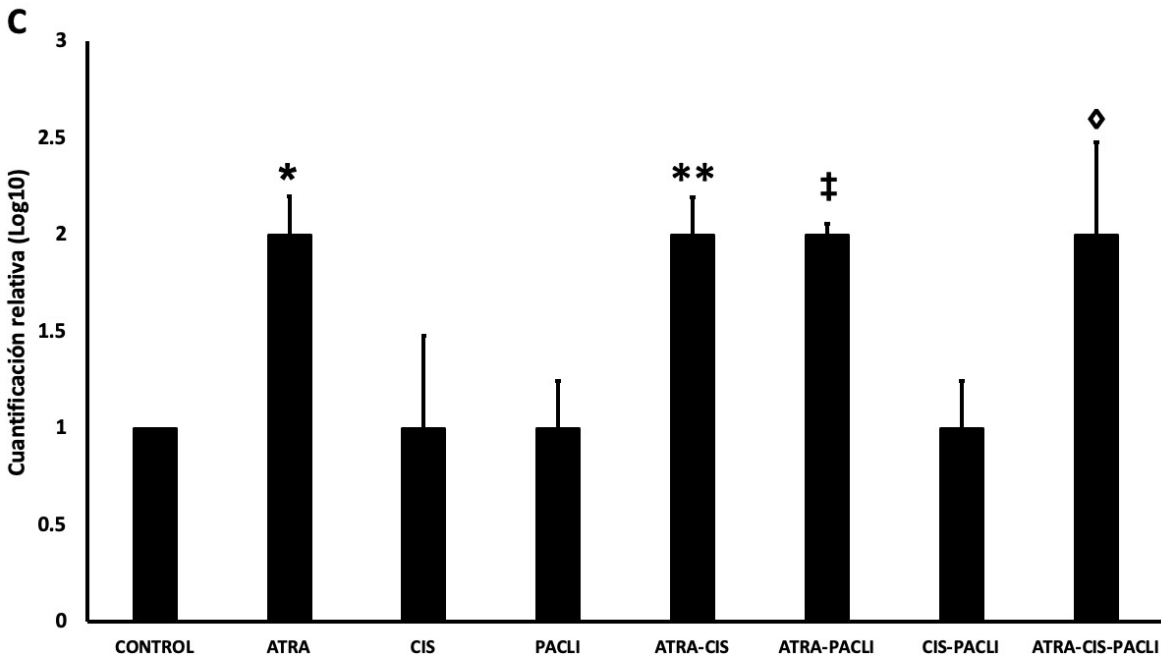


Figura 8C. Cuantificación de *RARα* a las 72 horas. Diferencias en la expresión de *RARα* en ATRA * $p < 0.001$, ATRA-CIS ** $p < 0.001$, ATRA-PACLI ‡ $p < 0.001$ y ATRA-CIS-PACLI ◊ $p < 0.001$, cuando se comparó con el grupo control.

Respecto al mRNA del receptor RAR β , este incrementó su expresión en los grupos ATRA-CIS (1.73 ± 0.13), cuando se comparó con el grupo control (1.00, $p=0.012$) a las 24 horas (**Figura 9 A**). A las 48 horas se incrementó la expresión en el grupo de ATRA (1.75 ± 0.23), ATRA-CIS (1.99 ± 0.08), CIS-PACLI (1.99 ± 0.26) y ATRA-CIS-PACLI (1.99 ± 0.05) con respecto al grupo control (1.00, $p=0.026$ con el grupo de ATRA-PACLI y $p=0.001$ para los demás grupos) (**Figura 9B**). A las 72 horas se mantuvo el incremento del receptor RAR β en los grupos ATRA (1.65 ± 0.09), ATRA-CIS (1.99 ± 0.09), ATRA-PACLI (1.99 ± 0.09) y ATRA-CIS-PACLI (1.99 ± 0.04) con respecto al grupo control (1.0, $p=0.024$ para ATRA y $p=0.001$ para las demás comparaciones), los grupos CIS (0.80 ± 0.06), PACLI (1.0 ± 0.08) y ATRA-PACLI (0.80 ± 0.09) no mostraron cambios (**Figura 9C**).

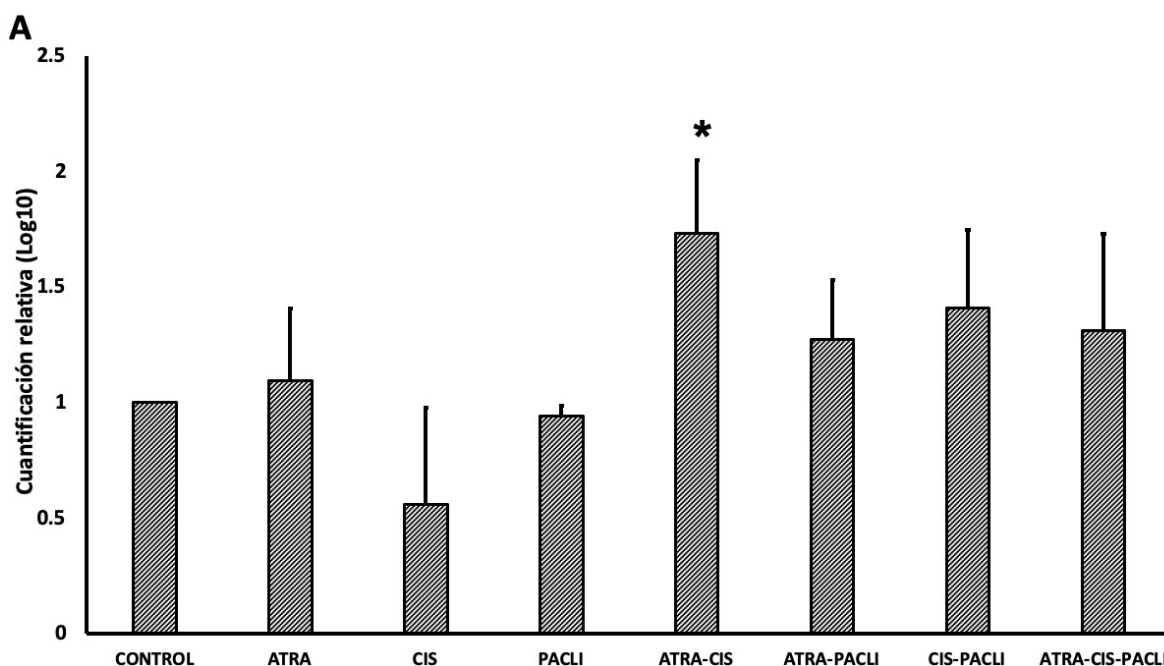


Figura 9A. *Cuantificación de RAR β a las 24 horas. La expresión de los receptores incrementó principalmente en los grupos tratados con ATRA.*

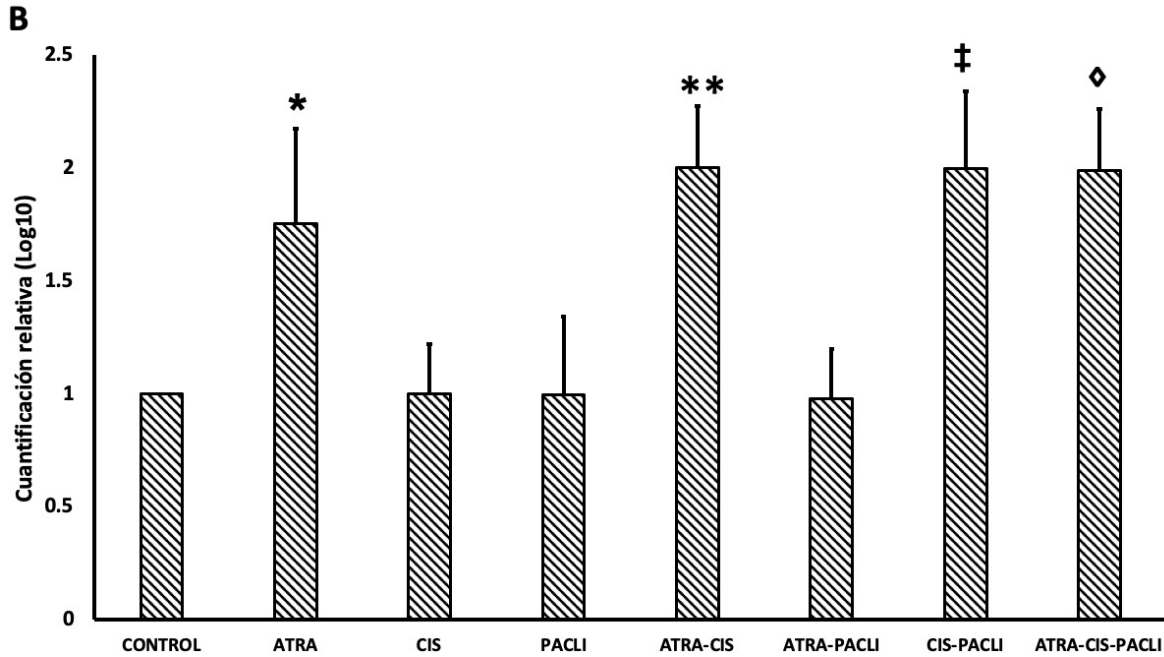


Figura 9B. Cuantificación de $RAR\alpha$ a las 48 horas. Diferencias en la expresión de $RAR\alpha$ en ATRA * $p < 0.001$, ATRA-CIS ** $p < 0.001$, ATRA-PACLI ‡ $p < 0.001$ y ATRA-CIS-PACLI ◊ $p < 0.001$, cuando se comparó con el grupo control.

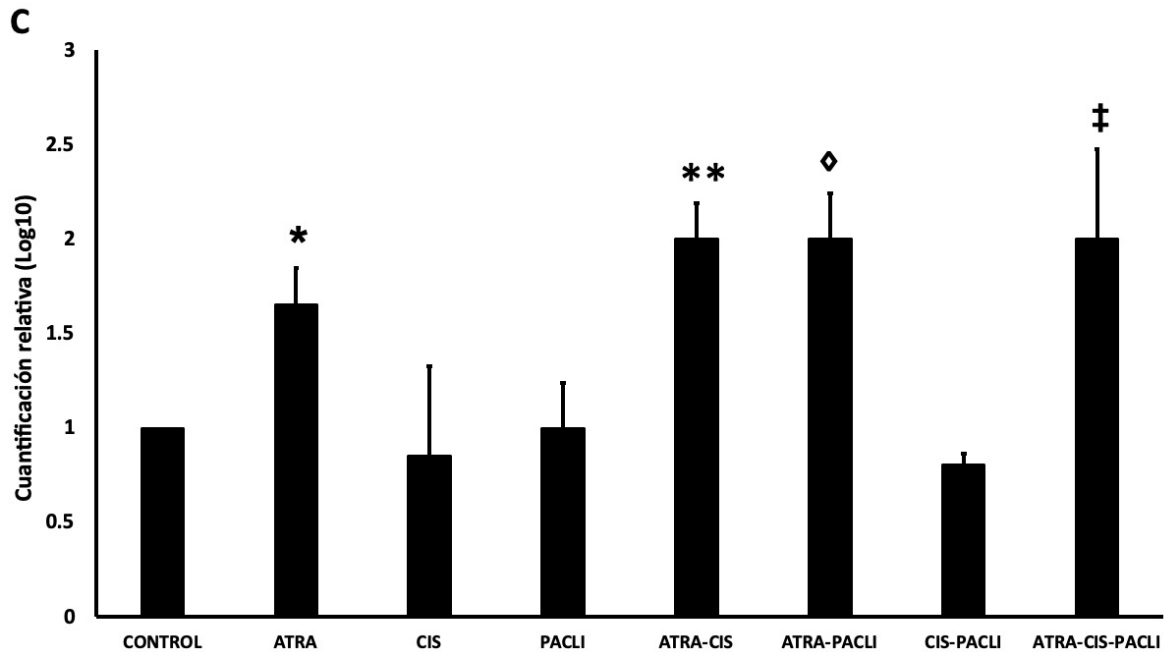


Figura 9C. Cuantificación de $RAR\beta$ a las 72 horas. Diferencias en la expresión de $RAR\alpha$ en ATRA * $p < 0.001$, ATRA-CIS ** $p < 0.001$, ATRA-PACLI ‡ $p < 0.001$ y ATRA-CIS-PACLI ◊ $p < 0.001$, cuando se comparó con el grupo control.

Con respecto a la expresión del receptor RAR γ se encontró un incremento a las 24 horas en todos los grupos ATRA-CIS (2 ± 0.37) y ATRA-CIS-PACLI (2 ± 0.24) con respecto al grupo control (1.0, $p < 0.001$). Se encontró una disminución en la expresión de los grupos ATRA (0.58 ± 0.05), CIS (0.69 ± 0.07), PACLI (0.63 ± 0.1) sin llegar a ser significativo. (**Figura 10A**). La evaluación a las 48 horas mostró un incremento en los grupos ATRA (1.99 ± 0.11), CIS (1.99 ± 0.12), PACLI (1.99 ± 0.4), ATRA-CIS (1.99 ± 0.05), ATRA-PACLI (1.99 ± 0.23), CIS-PACLI (1.99 ± 0.05) y ATRA-CIS-PACLI (1.99 ± 0.4) con respecto al grupo control (1.0, $p < 0.001$) (**Figura 10B**). A las 72 horas se mantuvo el incremento en todos los grupos que recibieron tratamiento ATRA (1.99 ± 0.04), CIS (2 ± 0.07), PACLI (1.97 ± 0.11), ATRA-CIS (1.99 ± 0.21), ATRA-PACLI (1.99 ± 0.38), CIS-PACLI (1.99 ± 0.06) y ATRA-CIS-PACLI (1.99 ± 0.45) con respecto al grupo control (1.0, $p < 0.001$) (**Figura 10C**).

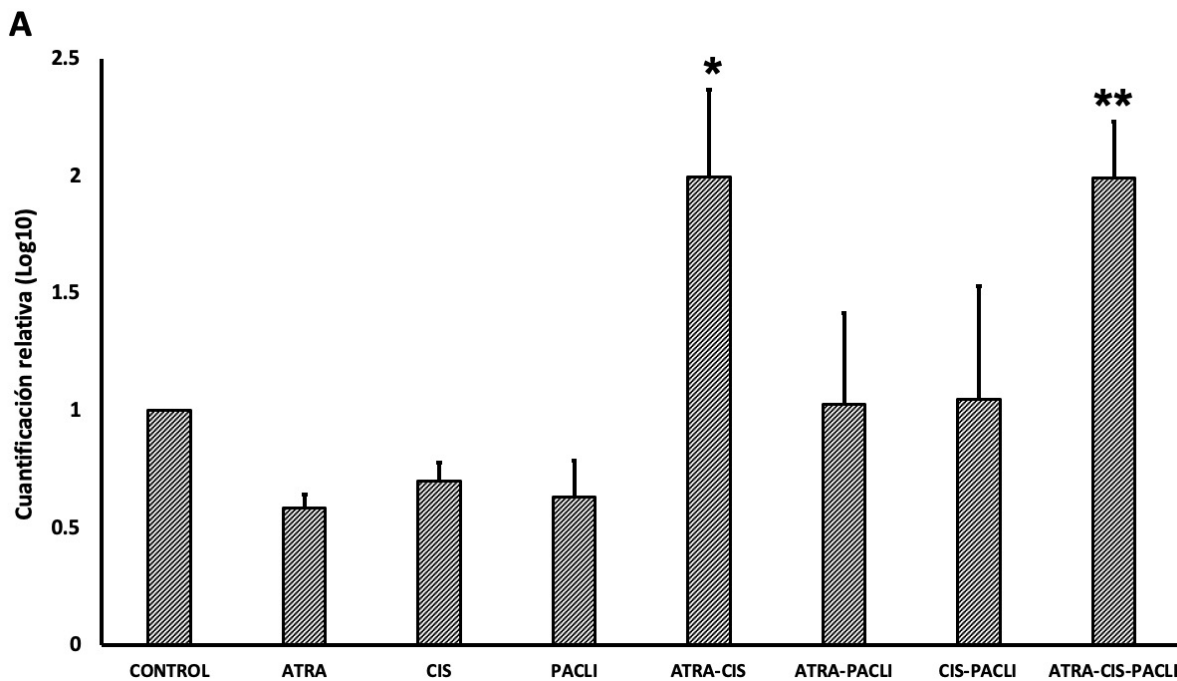


Figura 10A. Cuantificación de RAR γ a las 24 horas. La expresión del receptor incrementó en los grupos ATRA-CIS $*p < 0.001$ y ATRA-CIS-PACLI $**p < 0.001$ respecto al grupo control.

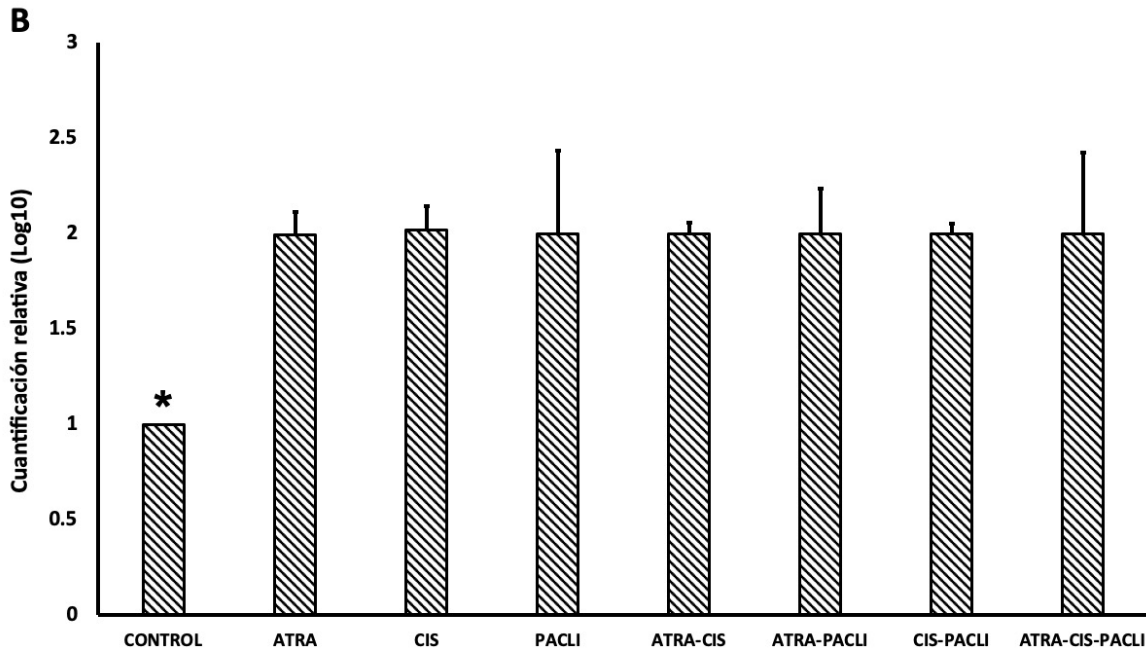


Figura 10B. Cuantificación de RAR γ a las 48 horas La expresión del receptor se incrementó en todos los grupos respecto al grupo control $p < 0.001$.*

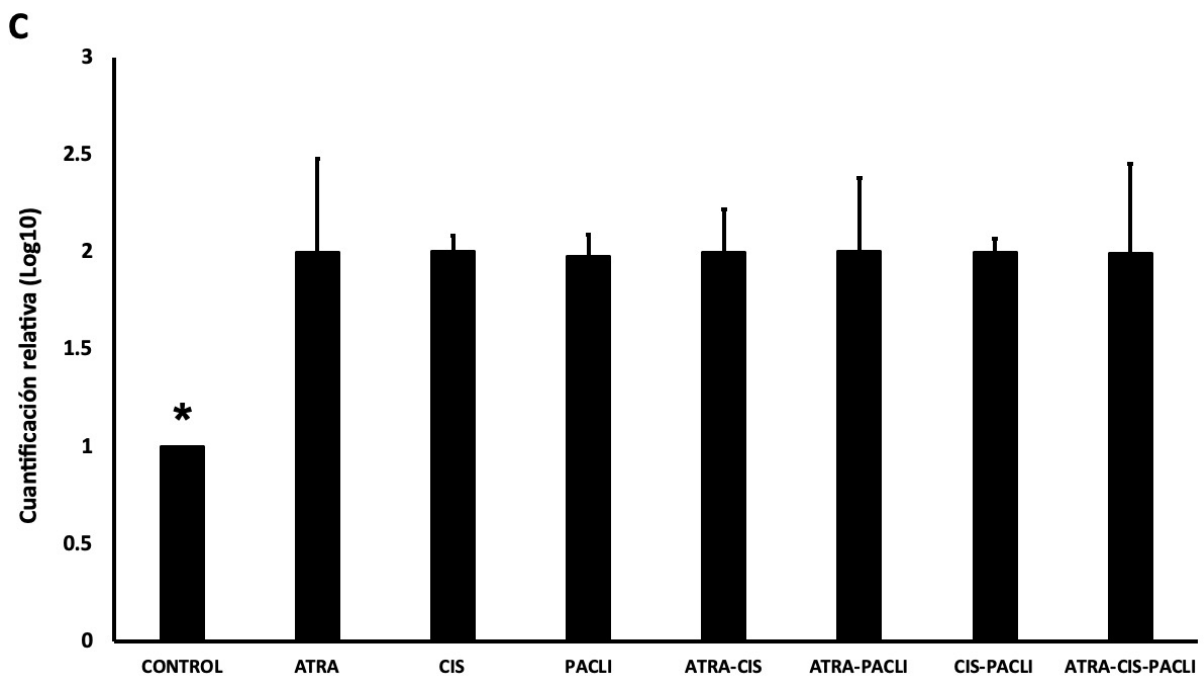


Figura 10C. Cuantificación de RAR γ a las 72 horas La expresión del receptor se incrementó en todos los grupos respecto al grupo control $p < 0.001$.*

La evaluación del mRNA de RXR α a las 24 horas mostró un incremento en los grupos ATRA (1.88 ± 0.09 , $p=0.001$), CIS (2.0 ± 0.07 , $p<0.001$), PACLI (1.70 ± 0.18 , $p=0.003$), ATRA-CIS (1.69 ± 0.17 , $p=0.018$), ATRA-PACLI (1.69 ± 0.14 , $p=0.018$), CIS-PACLI (1.81 ± 0.17 , $p=0.001$) y ATRA-CIS-PACLI (1.89 ± 0.23 , $p=0.001$) con respecto al grupo control (1.0) (**Figura 11A**). A las 48 horas se mantuvo el incremento de la expresión en los grupos ATRA (1.91 ± 0.11 , $p=0.001$), CIS (2.0 ± 0.10 , $p<0.001$), PACLI (1.70 ± 0.05 , $p=0.008$), ATRA-CIS (1.65 ± 0.1 , $p=0.012$), ATRA-PACLI (1.69 ± 0.18 , $p=0.019$), CIS-PACLI (1.47 ± 0.30 , $p=0.021$) y ATRA-CIS-PACLI (1.89 ± 0.33 , $p=0.001$) con respecto al control (1.0) (**Figura 11B**). El análisis a las 72 horas mantuvo el incremento en la expresión del receptor en los grupos ATRA (1.74 ± 0.10), CIS (1.99 ± 0.2), PACLI (1.99 ± 0.09), ATRA-CIS (1.99 ± 0.06), ATRA-PACLI (1.99 ± 0.09), CIS-PACLI (1.99 ± 0.13) y ATRA-CIS-PACLI (1.99 ± 0.10) con respecto al grupo control (1.0, $p=0.008$ cuando se comparó con ATRA y $p<0.001$ con respecto a los demás grupos) (**Figura 11C**).

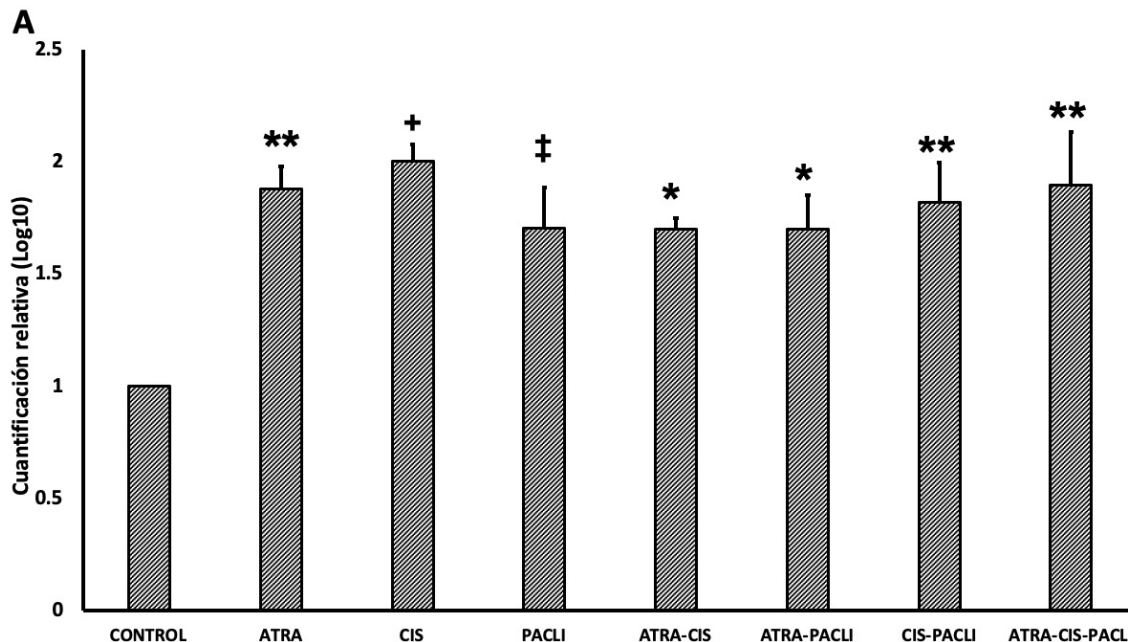


Figura 11A. Cuantificación de RXR α a las 24 horas. La expresión de los receptores incrementó en los grupos ATRA, CIS-PACLI, y ATRA-CIS-PACLI ****** $p=0.001$; CIS **+** $p<0.001$; PACLI **‡** $p=0.003$; ATRA-CIS y ATRA-PACLI ***** $p=0.008$ comparado contra el control.

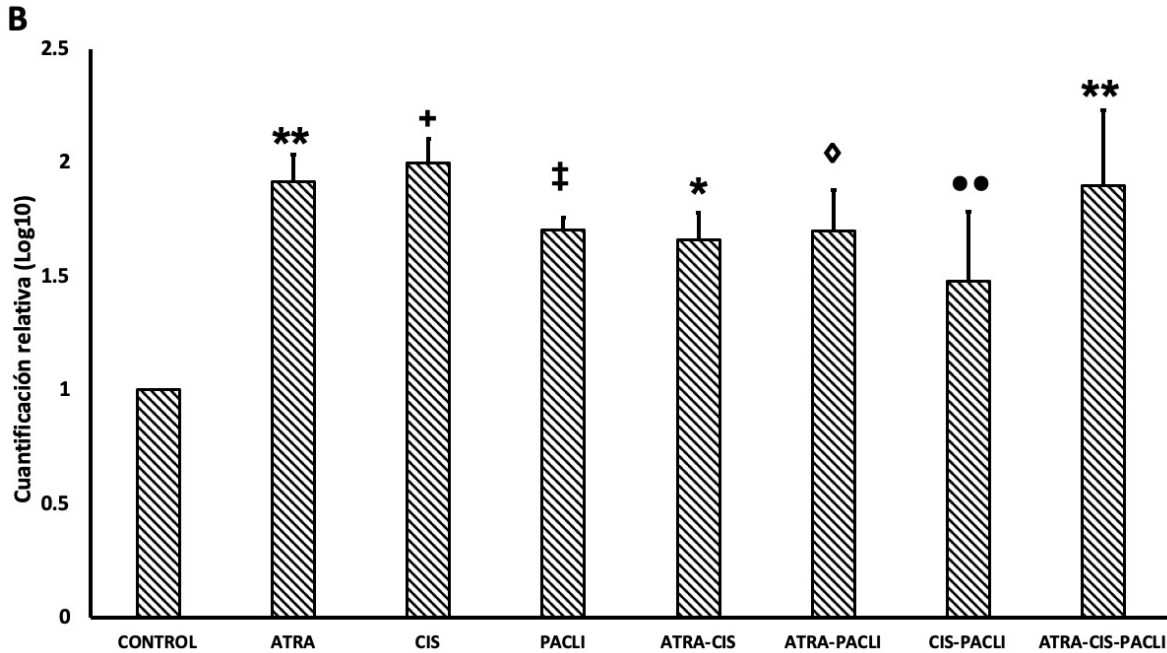


Figura 11B. Cuantificación de RXR γ a las 48 horas. La expresión de los receptores incrementó en los grupos ATRA y ATRA-CIS-PACLI $**p=0.001$; CIS $+p<0.001$; PACLI $‡p=0.008$; ATRA-CIS $*p=0.008$; CIS-PACLI $**p=0.021$ y ATRA-PACLI $\diamond p=0.019$ comparado contra el grupo control.

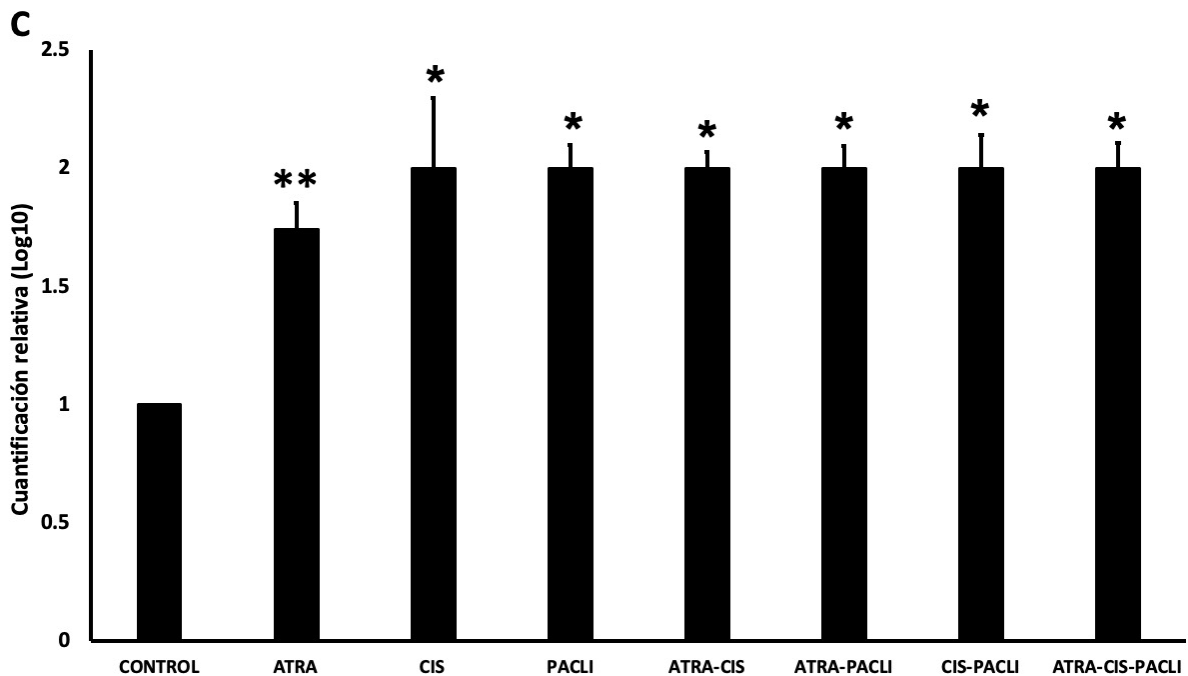


Figura 11C. Cuantificación de RXR γ a las 48 horas. La expresión de los receptores incrementó en los grupos ATRA $**p=0.008$, CIS; PACLI; ATRA-CIS; CIS-PACLI; ATRA-PACLI y ATRA-CIS-PACLI; $*p<0.001$ comparado contra el grupo control.

A las 24 horas, el mRNA del receptor RXR β mostró cambios en la expresión de los grupos PACLI (1.99 ± 0.06 , $p=0.001$), ATRA-PACLI (1.99 ± 0.22 , $p=0.008$), CIS-PACLI (1.99 ± 0.36 , $p=0.019$) y ATRA-CIS-PACLI (1.99 ± 0.40 , $p=0.019$) con respecto al grupo control (1.0) (**Figura 12A**). A las 48 horas se encontró un incremento de ATRA (1.73 ± 0.05 , $p=0.012$), CIS (1.99 ± 0.31 , $p<0.001$), ATRA-CIS (1.89 ± 0.08 , $p=0.006$), ATRA-PACLI (1.60 ± 0.27 , $p=0.027$) y ATRA-CIS-PACLI (1.99 ± 0.07 , $p<0.001$) respecto al grupo control (1.0) (**Figura 12B**). A las 72 horas todos los grupos mostraron un incremento, ATRA (1.99 ± 0.23), CIS (1.99 ± 0.07), PACLI (1.99 ± 0.45), ATRA-CIS (1.99 ± 0.06), ATRA-PACLI (1.69 ± 0.18), CIS-PACLI (1.99 ± 0.06) y ATRA-CIS-PACLI (2.0 ± 0.32) con respecto al grupo control (1.0, $p=0.005$ cuando se comparó con ATRA-PACLI y $p<0.001$ cuando se comparó con los demás grupos) (**Figura 12C**).

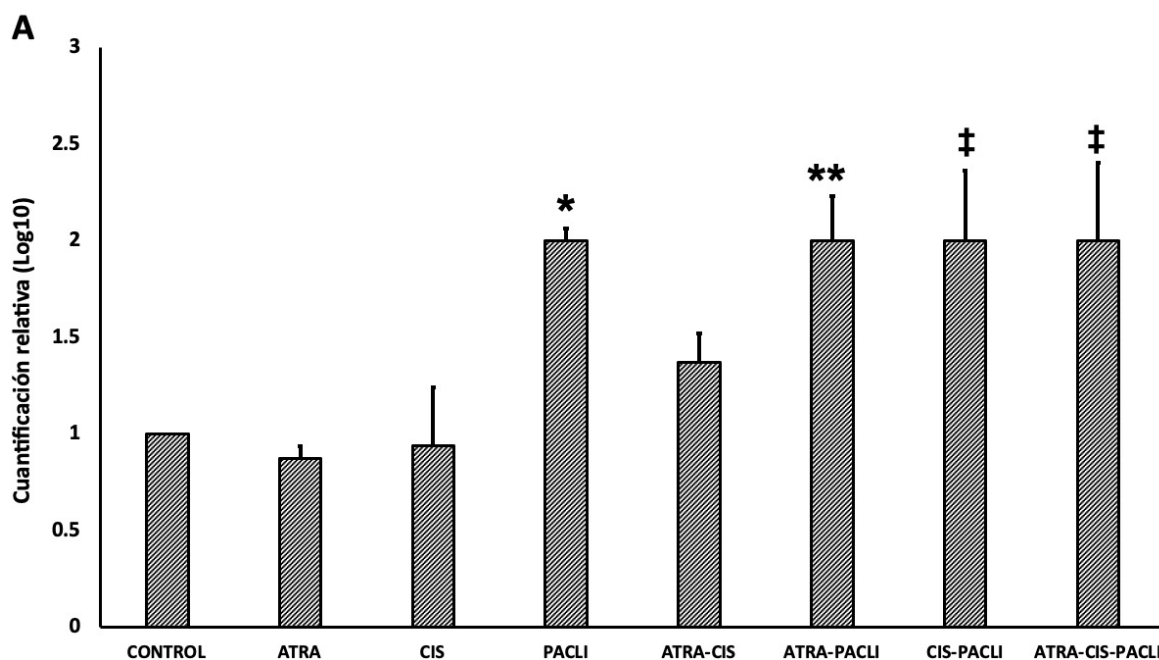


Figura 12A. Cuantificación de RXR β a las 24 horas. La expresión de los receptores incrementó en los grupos PACLI $*p=0.001$; ATRA-PACLI $**p=0.008$ CIS-PACLI Y ATRA-CIS-PACLI $†p=0.019$ comparado contra el grupo control.

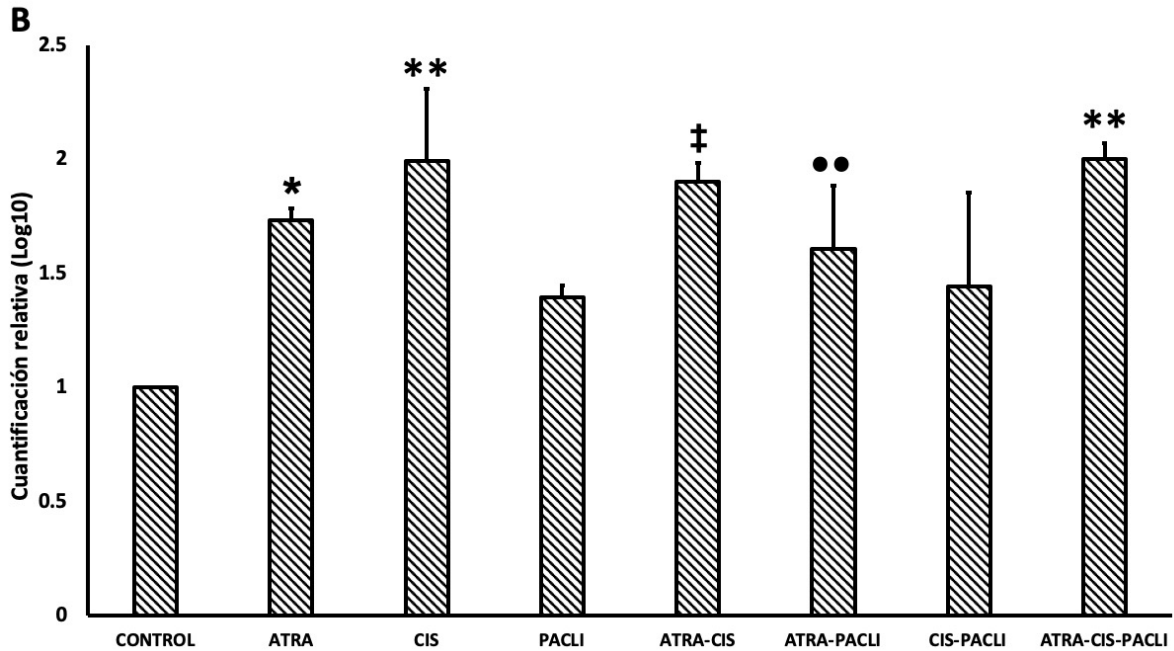


Figura 12B. Cuantificación de RXR β a las 48 horas. La expresión de los receptores incrementó en los grupos ATRA * $p=0.0012$; CIS y ATRA-CIS-PACLI ** $p<0.001$; ATRA-CIS ‡ $p=0.006$; y ATRA-PACLI •• $p=0.021$ comparado contra el grupo control.

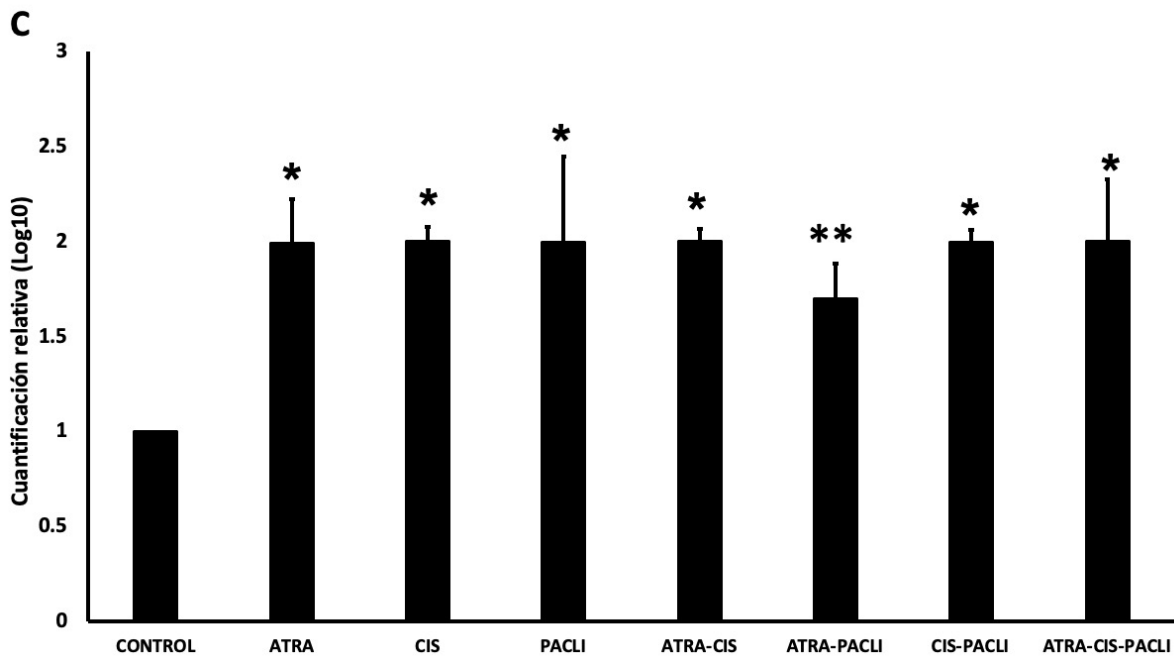


Figura 12C. Cuantificación de RXR β a las 72 horas La expresión de los receptores incrementó en los grupos ATRA, CIS, PACLI, ATRA-CIS, CIS-PACLI y ATRA-CIS-PACLI * $p<0.001$ y ATRA-PACLI ** $p=0.005$ comparados contra el grupo control.

El mRNA del receptor RXR y incrementó su expresión desde las 24 horas en los grupos ATRA (2.0 ± 0.12 , $p < 0.001$), CIS (2.0 ± 0.05 , $p < 0.001$), $p < 0.001$, PACLI (2.0 ± 0.15 , $p < 0.001$), ATRA-CIS (1.73 ± 0.13 , $p = 0.004$), ATRA-PACLI (2.0 ± 0.09 , $p < 0.001$), CIS-PACLI (2.0 ± 0.09 , $p < 0.001$) y ATRA-CIS-PACLI (1.75 ± 0.32 , $p = 0.004$) con respecto al grupo control (1.0) (**Figura 13A**). A las 48 horas se mantuvo alta la expresión del receptor en los grupos ATRA (1.80 ± 0.12 , $p = 0.008$), CIS (1.74 ± 0.13 , $p = 0.012$), PACLI (2 ± 0.20 , $p < 0.001$), ATRA-CIS (1.90 ± 0.06 , $p = 0.001$) CIS-PACLI (1.80 ± 0.26 , $p = 0.027$) y ATRA-CIS-PACLI (1.66 ± 0.54 , $p = 0.044$) (**Figura 13B**). A las 72 horas se mantuvo el incremento en la expresión de los grupos ATRA (1.99 ± 0.09 , $p < 0.001$), CIS (1.78 ± 0.06 , $p = 0.026$), PACLI (1.68 ± 0.20 , $p = 0.021$), ATRA-CIS (1.90 ± 0.06 , $p = 0.001$) y ATRA-PACLI (1.78 ± 0.09 , $p = 0.029$) con respecto al grupo control (**Figura 13C**).

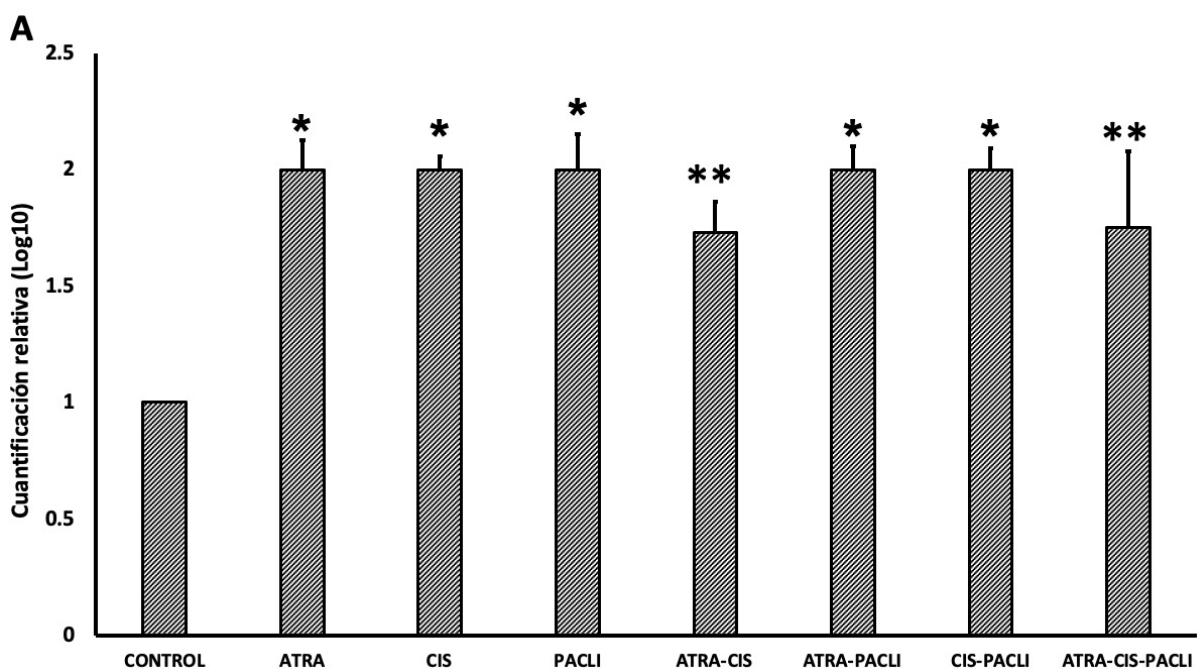


Figura 13A. Cuantificación de RXR y a las 24 horas. La expresión de los receptores incrementó en los grupos ATRA, CIS, PACLI, ATRA-PACLI, CIS-PACLI * $p < 0.001$; ATRA-CIS y ATRA-CIS-PACLI ** $p = 0.004$ comparado contra el grupo control.

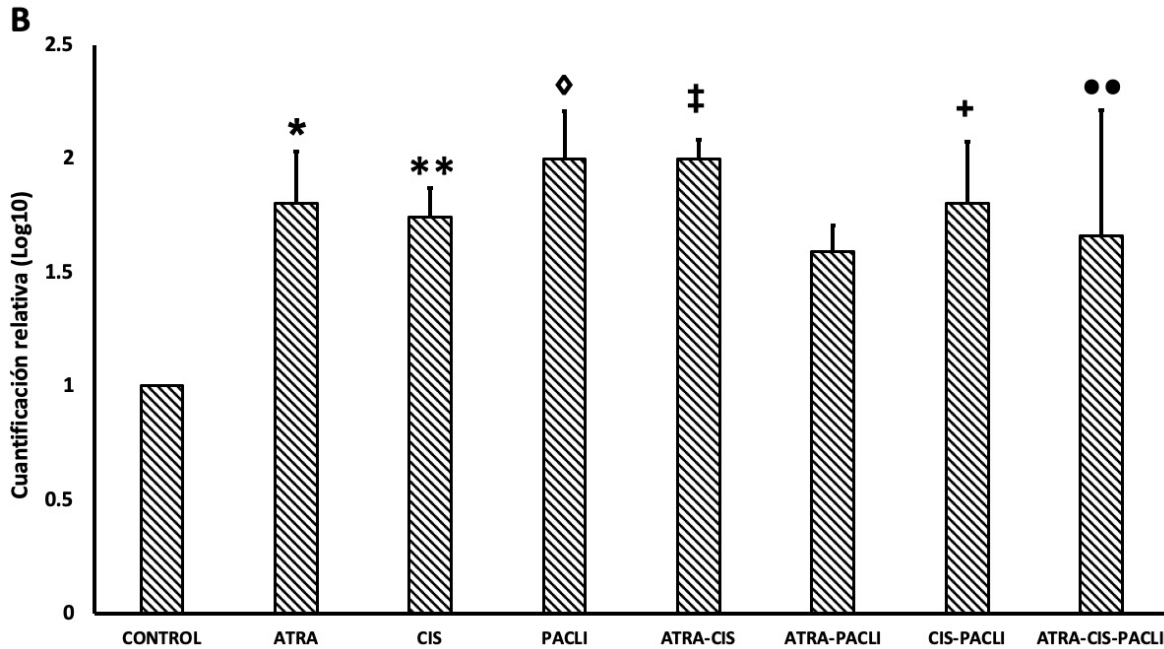


Figura 13B. Cuantificación de RXR γ a las 48 horas. La expresión de los receptores incrementó en los grupos ATRA * $p=0.008$, CIS ** $p=0.012$, PACLI ◇ $p<0.001$, ATRA-CIS ‡ $p=0.001$ CIS-PACLI + $p<0.001$ y ATRA-CIS-PCLI •• $p=0.044$ comparado contra el grupo control.

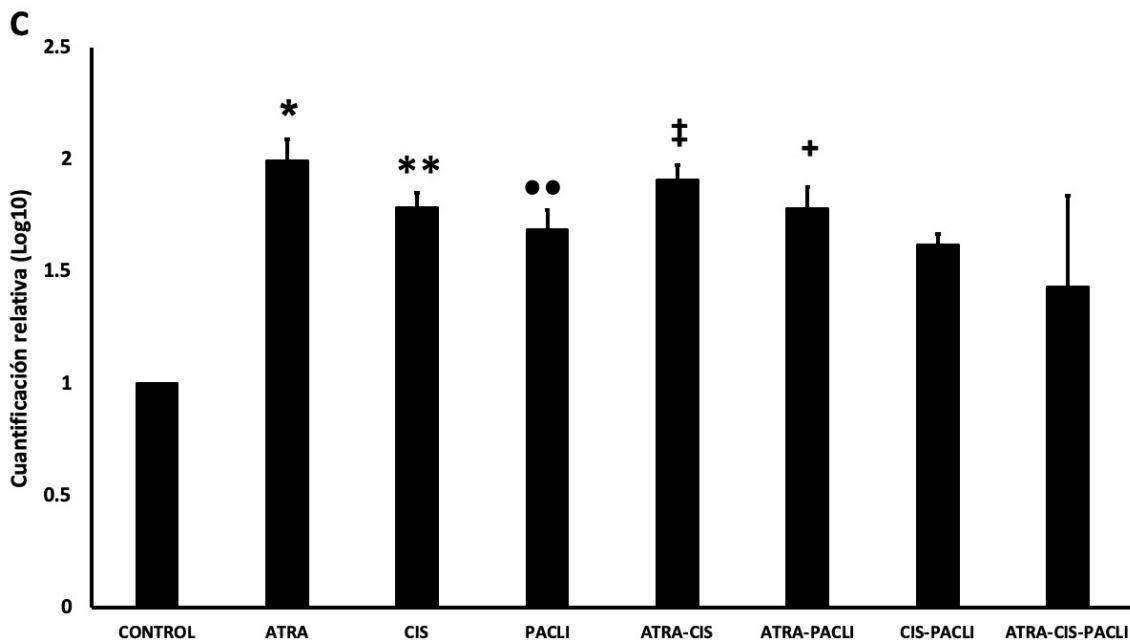


Figura 13C Cuantificación de RXR γ a las 72 horas. La expresión de los receptores incrementó en los grupos ATRA * $p=0.008$, CIS ** $p=0.026$, PACLI •• $p=0.021$, ATRA-CIS ‡ $p=0.001$ CIS-PACLI + $p=0.029$ comparado contra el grupo control.

DISCUSIÓN

Los retinoides y sus análogos naturales o sintéticos juegan un papel importante en el mantenimiento de los tejidos epiteliales como la piel, las membranas mucosas y el tejido pulmonar (Chambon 1996). Son prometedores agentes antineoplásicos con efectos terapéuticos y quimiopreventivos como la regulación del crecimiento celular, la diferenciación y la inducción de apoptosis (Bushue and Wan 2010). En este estudio encontramos que la combinación de ATRA con PACLI y CIS inhiben el crecimiento celular en las células H1666, mostrando una mejor actividad antitumoral en comparación con el tratamiento de quimioterapia (QT). Las combinaciones ATRA-CIS, ATRA-PACLI, CIS-PACLI y ATRA-CIS-PACLI también exhibieron efectos sinérgicos a las 24 horas. Múltiples estudios han demostrado efectos sinérgicos y anti proliferativos de la combinación ATRA-PACLI en diferentes tipos de cáncer, tales como gliomas, cáncer de pulmón, mama y células de carcinoma de colon, así como en xeno-injertos de glioma en ratones (Karmakar et al. 2007)(Karmakar, Banik, and Ray 2008)(Applegate and Lane 2015). La combinación ATRA-CIS ha mostrado efectos aditivos en ensayos experimentales incluidos cáncer de ovario, cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas, cervical y humano y carcinoma de células escamosas (Aebi et al. 1997)(Masuda et al. 2002). Estos efectos pueden derivarse del mecanismo de acción de cada compuesto. ATRA se une a los RAR y modula la transcripción de genes diana a través de elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE) (So and Crowe 2000). CIS induce apoptosis por disminución de Bcl-2 y el incremento de BAX. ATRA es capaz de reducir las relaciones Bcl-2/BAX después de una exposición prolongada (Aebi et al. 1997). De la misma manera, paclitaxel en combinación con los retinoides revela sinergia en parte debido a la fosforilación de Bcl-2 inducida por paclitaxel (Vivat-Hannah et al. 2001). En líneas celulares de glioma U787MG el tratamiento combinado de ATRA más paclitaxel es capaz de regular a la baja la molécula de señalización de supervivencia MEK-2, mientras que regula a la alta moléculas de señalización como p-ERK, p-JNK, y p-p38 MAPK; y también es capaz de inhibir la vía de supervivencia AKT (Karmakar et al. 2008).

En cuanto al ciclo celular, encontramos los mayores efectos después del tratamiento con PACLI y sus combinaciones. Los tratamientos PACLI, ATRA-PACLI, CIS-PACLI y ATRA-CIS-PACLI causaron arresto en el ciclo celular en la fase G2/M y S. Diversos estudios previos han demostrado que la apoptosis inducida por paclitaxel induce arresto del ciclo celular en las células de cáncer de pulmón en G2/M (Jordan et al. 1993)(Noh, Kim, and Kim 2014). Otros estudios han demostrado que PACLI ejerce un efecto sinérgico con ATRA a través del arresto mitótico de células cancerígenas en la fase G2-M (Vivat-Hannah et al. 2001). Además, los grupos celulares tratados con ATRA, CIS y ATRA-CIS mostraron un aumento en la población sub-G0/G1. Se ha demostrado que ATRA es capaz de reducir la viabilidad celular e incrementar la apoptosis en líneas tumorales de mama, pulmón e hígado (Güzey et al. 1998)(Mangiarotti et al. 1998). En líneas celulares de MCF-7 de cáncer de mama, ATRA es capaz de incrementar la acumulación de la fase G0/G1 induciendo apoptosis (Mangiarotti et al. 1998). Estos resultados confirman los hallazgos hechos por estudios previos que muestran que las células tratadas con CIS acoplado a un polímero biodegradable son arrestadas en las fases G0/G1 y G2/M, acompañado de un Sub- pico en G0/G1 (Moreno et al. 2008). CIS se considera un inhibidor inespecífico del ciclo celular, por lo que, las células en fase S son más sensibles a este fármaco (Moreno et al. 2008). CIS induce un daño irreversible en la célula durante la fase G2 que conduce a la apoptosis (Evans, Tilby, and Dive 1994)(Wagner and Karnitz 2009). Por otra parte, ATRA induce un aumento en la muerte celular (observado como un aumento en Sub-G0) lo que conlleva a una disminución de la proliferación celular (observado como un menor % de células en fase S). El tratamiento con ATRA en concentraciones de 40 nM a 1 μ M causa arresto del ciclo celular en G0 / G1 a través de la inhibición de la expresión ERK1, también disminuye la fosforilación de Rb, y aumenta la asociación de Rb/E2F-1 en células troncales carcinogénicas del cáncer gastrointestinal (Crowe, Kim, and Chandraratna 2003). En carcinoma pancreático, ATRA indujo arresto del ciclo celular en la fase G1 o G2, reduciendo la población en fase S tras 24 horas de

tratamiento, seguido de apoptosis con aumento en el porcentaje de células en sub-G0/G1 para una total inhibición de la proliferación (el-Metwally et al. 2005).

Estudios previos han indicado que ATRA bloquea el crecimiento celular a través del arresto de las células en la fase pre-S, lo que ocasiona que las células salgan de la fase G0 para terminar en muerte celular por apoptosis (Mangiarotti et al. 1998). Con respecto a la inducción de apoptosis, la combinación de ATRA con CIS o PACLI indujo la muerte celular de manera más eficiente que cualquiera de los dos tratamientos solos. La combinación con ATRA incrementa la citotoxicidad de CIS en carcinoma de ovario y células escamosas de cáncer de cabeza y cuello (Aebi et al. 1997)(Jozan et al. 2002). La inducción de la apoptosis se ha relacionado con la expresión de RAR en células de cáncer de mama humano (Liu et al. 1996). La combinación de ATRA-PACLI es capaz de regular a la baja hTERT e inactivar Bcl-2, promoviendo apoptosis en células de glioma U87MG (Karmakar et al. 2008). Además, los retinoides selectivos α/β en combinación con Taxol mostraron un efecto sinérgico a través de la inducción de apoptosis en MCF7 (Vivat-Hannah et al. 2001). El efecto citotóxico de ATRA sobre el crecimiento celular y la inducción de la apoptosis implica unión específica y activación del receptor de ácido retinoico como RAR α , β , γ (De Luca 1991).

En el cáncer de pulmón, los patrones de expresión de RAR y RXR juegan un papel importante en el pronóstico, la progresión, la supervivencia y falta de respuesta al tratamiento (Xu et al. 1997). Nuestro estudio muestra que el tratamiento con ATRA participa en la inducción de RAR. La expresión de RAR α aumenta a las 24 horas en todos los grupos que recibieron tratamiento con ATRA. La desregulación RAR α participa en el desarrollo de leucemia promielocítica (Pandolfi 2001) y cáncer de mama (Farias et al. 2002). Se ha sugerido que ATRA media esta actividad antitumoral a través de la activación del gen que codifica para RAR α (Simeone and Tari 2004). Del mismo modo, RAR α regula al alta los niveles de RAR β a través de la unión a RAREs en RAR β (Khuri et al. 2000). Nosotros encontramos incremento en los niveles de RAR β en células tratadas con ATRA. RAR β es el gen supresor

tumoral más estudiado cuya pérdida de expresión y metilación está asociada con la patogénesis del cáncer de pulmón (Brabender et al. 2002)(Virmani et al. 2000). En tumores de pulmón, mama y próstata, RAR β se pierde o se regula a la baja a través de la hipermetilación del promotor inconstante, sin delección o mutación del gen (Hayashi et al. 2001)(Martinet et al. 2000)(Wakelee et al. 2007). Otros estudios han demostrado que la regulación positiva de RAR β por ATRA se correlaciona con la inhibición del crecimiento en cáncer de mama y cáncer de pulmón (Peng et al. 2011). Además, en líneas celulares de cáncer de pulmón y mama sensibles a ATRA, la inducción de RAR β es estimulada por el tratamiento con ATRA (Liu et al. 1996)(Zhang, Liu, and Lee 1996). En cáncer de pulmón, la hipermetilación de RAR β se asocia con recurrencia, en etapas avanzadas de CPCNP (Kim et al. 2005)(Tomizawa et al. 2004). Previamente, demostramos que la adición de ATRA a CT aumenta sobrevida libre de progresión (SLP) y tasas de respuesta (RR) en cáncer de pulmón, y este efecto se relacionó con los niveles de RAR β (Arrieta et al. 2010). De manera similar, encontramos que RAR γ aumentó con el tratamiento ATRA y este se mantuvo a las 72 horas. RAR γ juega un papel en la diferenciación, proliferación celular y apoptosis en muchos tipos de células y microambientes celulares, también manteniendo un equilibrio entre la auto-renovación de células madre hematopoyéticas y diferenciación (Kumar et al. 2004)(Yan et al. 2010).

La expresión de RAR γ se pierde en el cáncer de piel y en algunas lesiones premalignas (Finzi et al. 1992). Recientemente, se ha observado que altos niveles de RAR γ se han asociado con la oncogénesis en el carcinoma hepatocelular (Yan et al. 2010). La expresión de RAR γ también se asocia con una alta citotoxicidad e inhibición del crecimiento de células de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello tratadas con ATRA (Klaassen et al. 2001).

Aunque los resultados *in vitro* con retinoides y CT son promisorios, en pacientes aún no se ha mostrado un beneficio claro. Estudios utilizando una dosis diaria de bexarotene 400 mg/m², un tipo de retinoide natural que actúa únicamente activando los receptores nucleares de tipo RXR, en combinación con dos regímenes de

quimioterapia cisplatino/vinorelbine y carboplatino/paclitaxel no han demostrado algún beneficio en el aumento de la sobrevida global ni en la sobrevida libre de progresión en pacientes con CPCNP en estadios avanzados excepto en aquellos pacientes que presentaron hipertrigliceridemia grado 3 y 4 (Janssen et al. 2013)(Blumenschein et al. 2008). En un estudio fase II donde se incluyeron 107 pacientes con CPCNP en estadios avanzados, se logró una tasa de respuesta de 55.8% (CI 95%, 46.6% - 64.9%) en el grupo que recibió all-trans ácido retinoico en comparación con 25.4% (CI 95%, 21.3% - 29.5%, $p=0.001$) comparado con el grupo que recibió placebo. Así mismo se obtuvo una mediana de sobrevida libre de progresión de 8.9 meses vs 6.0 meses ($p=0.008$) para all-trans ácido retinoico y placebo, respectivamente y logrando también una mejora en la sobrevida global en los pacientes con ácido all-trans retinoico de 23.5 ± 5.8 meses; 95% CI, 11.9 ± 35 comparado contra el grupo placebo el cual obtuvo una mediana de sobrevida global de 9.6 ± 0.9 meses; 95% CI, 7.7 ± 11.4) ($p = 0.004$) (Arrieta et al. 2010).

CONCLUSIÓN

En cáncer de pulmón se ha reportado que el tratamiento con ATRA puede mejorar la respuesta a tratamiento en pacientes tratados con cisplatino y paclitaxel. Sin embargo, no se habían descrito las posibles vías por la que el ATRA induce este efecto. Aquí reportamos que la adición de ATRA a la quimioterapia, CIS o PACLI, muestra un efecto sinérgico e incrementa el efecto anti proliferativo y anti apoptótico en células de cáncer de pulmón.

En cáncer de pulmón se ha reportado una pérdida en la expresión de sus receptores, principalmente $RAR\beta$, asociados a un crecimiento celular descontrolado. En muestras de tumores de cáncer pulmonar, la pérdida en la expresión se ha asociado a un peor pronóstico. El tratamiento con ATRA incrementó la expresión de RAR en líneas celulares, sin modificar la expresión de los receptores RXRs. La combinación de ATRA con cisplatino o paclitaxel, muestra un efecto sinérgico sobre la inducción de apoptosis e incrementa la expresión de los receptores de RAR en la línea celular H-1666 de cáncer de pulmón.

PERSPECTIVAS

El ácido retinoico ha mostrado un efecto protector en el nervio periférico disminuyendo los efectos de la quimioterapia citotóxica. Además, ha mostrado que incrementa la respuesta a quimioterapia en pacientes con cáncer de pulmón avanzado. Actualmente estamos evaluando el efecto de la combinación de ATRA e inhibidores de tirosina-cinasa en líneas celulares de cáncer de pulmón. De acuerdo a nuestros resultados lo que esperamos es incrementar el efecto citotóxico de la combinación, mediante el arresto del ciclo celular, incremento de la apoptosis y evitar que las células hagan resistencia con los inhibidores de tirosina-cinasa.

Referencias

- Aebi, S., R. Kröning, B. Cenni, A. Sharma, D. Fink, G. Los, R. Weisman, S. B. Howell, and R. D. Christen. 1997. "All-Trans Retinoic Acid Enhances Cisplatin-Induced Apoptosis in Human Ovarian Adenocarcinoma and in Squamous Head and Neck Cancer Cells." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 3(11):2033–38.
- Altucci, L., A. Rossin, W. Raffelsberger, A. Reitmair, C. Chomienne, and H. Gronemeyer. 2001. "Retinoic Acid-Induced Apoptosis in Leukemia Cells Is Mediated by Paracrine Action of Tumor-Selective Death Ligand TRAIL." *Nature Medicine* 7(6):680–86.
- Altucci, Lucia, Mark D. Leibowitz, Kathleen M. Ogilvie, Angel R. de Lera, and Hinrich Gronemeyer. 2007. "RAR and RXR Modulation in Cancer and Metabolic Disease." *Nature Reviews. Drug Discovery* 6(10):793–810.
- Andrews, P. A. and S. B. Howell. 1990. "Cellular Pharmacology of Cisplatin: Perspectives on Mechanisms of Acquired Resistance." *Cancer Cells (Cold Spring Harbor, N.Y. : 1989)* 2(2):35–43.
- Applegate, Catherine C. and Michelle A. Lane. 2015. "Role of Retinoids in the Prevention and Treatment of Colorectal Cancer." *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 7(10):184–203.
- Arrieta, Oscar, Claudia H. González-De la Rosa, Elena Aréchaga-Ocampo, Geraldine Villanueva-Rodríguez, Tania L. Cerón-Lizárraga, Luis Martínez-Barrera, María E. Vázquez-Manríquez, Miguel Angel Ríos-Trejo, Miguel A. Alvarez-Avitia, Norma Hernández-Pedro, Carlos Rojas-Marín, and Jaime De la Garza. 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." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28(21):3463–71.
- Arrieta, Oscar, Enrique Guzmán-de Alba, Luis Felipe Alba-López, Alicia Acosta-Espinoza, Jorge Alatorre-Alexander, José Francisco Alexander-Meza, Silvia Rosa Allende-Pérez, Salvador Alvarado-Aguilar, Margarita E. Araujo-

Navarrete, Luis Marcelo Argote-Greene, Cinthia Alejandra Aquino-Mendoza, Alma Magdalena Astorga-Ramos, Horacio Austudillo-de la Vega, Alejandro Avilés-Salas, Luis Javier Barajas-Figueroa, Nimbe Barroso-Quiroga, Mónica Blake-Cerda, Paula Anel Cabrera-Galeana, Germán Calderillo-Ruíz, Alma Delia Campos-Parra, Ana María Cano-Valdez, Daniel Capdeville-García, Graciano Castillo-Ortega, Catalina Casillas-Suárez, Patricia Castillo-González, José Francisco Corona-Cruz, María Elma Correa-Acevedo, Séfora Sonciry Cortez-Ramírez, Jhony Alberto de la Cruz-Vargas, Jaime G. de la Garza-Salazar, María Dolores de la Mata-Moya, María Eugenia Domínguez-Flores, Hugo Ricardo Domínguez-Malagón, Luis Manuel Domínguez-Parra, Alfredo Domínguez-Peregrina, Jaime Durán-Alcocer, María Isabel Enríquez-Aceves, Abelardo Elizondo-Ríos, Moisés Dante Escobedo-Sánchez, Pablo Espinosa-Mireles de Villafranca, Alberto Flores-Cantisani, Juan Pablo Flores-Gutiérrez, Francisco Franco-Marina, Edwin Efraín Franco-González, Ramón Antonio Franco-Topete, Homero Fuentes-de la Peña, Susana Galicia-Amor, Dolores Gallardo-Rincón, Armando Gamboa-Domínguez, Jorge García-Andreu, Claudia María García-Cuéllar, María Cecilia García-Sancho-Figueroa, Rogelio García-Torrentera, Raquel Gerson-Cwilich, Arturo Gómez-González, León Green-Schneeweiss, María del Rocío Guillén-Núñez, Hilda Gutiérrez-Velázquez, Carlos Ibarra-Pérez, Edgardo Jiménez-Fuentes, Paula Juárez-Sánchez, Alejandro Juárez-Ramiro, Javier Kelly-García, Roberto Kuri-Exsome, Jesús Miguel Lázaro-León, Eucario León-Rodríguez, Sara Llanos-Osuna, Sara Llanos-Osuna, Ulises Loyola-García, José Sullivan López-González, Francisco Javier López y de Antuñano, Marco Antonio Loustaunau-Andrade, Eleazar Omar Macedo-Pérez, Limberth Machado-Villarroel, Manuel Magallanes-Maciel, Luis Martínez-Barrera, Jorge Martínez-Cedillo, Gloria Martínez-Martínez, Alfredo Medina-Esparza, Abelardo Meneses-García, Alejandro Mohar-Betancourt, Jaime Morales Blanhir, José Morales-Gómez, Daniel Motola-Kuba, Marcela Patricia Nájera-Cruz, Carolina del Carmen Núñez-Valencia, María Angélica Ocampo-Ocampo, María Dolores Ochoa-Vázquez, Carlos A. Olivares-Torres, Andrés Palomar-Lever, Mario Patiño-

Zarco, Rogelio Pérez-Padilla, Yolanda Rocío Peña-Alonso, Alfredo Rafael Pérez-Romo, Mario Aquilino Pérez, Paulo Martín Pinaya-Ruíz, María Adela Pointevin-Chacón, Juan José Poot-Braga, Rodolfo Posadas-Valay, Marcelino Ramirez-Márquez, Ivonne Reyes-Martínez, Julio Robledo-Pascual, Jerónimo Rodríguez-Cid, Carlos Enrique Rojas-Marín, Elizabeth Romero-Bielma, Jaime Ernesto Rubio-Gutiérrez, Julia Angelina Sáenz-Frías, Miguel Angel Salazar-Lezama, Karla Sánchez-Lara, Raúl Sansores Martínez, Patricio Santillán-Doherty, Juan Alejandro-Silva, José Luis Téllez-Becerra, Vinicio Toledo-Buenrostro, Luis Torre-Bouscoulet, Laura Torecillas-Torres, Marineé Torres, Víctor Tovar-Guzmán, Jenny Georgina Turcott-Chaparro, Jesús Javier Vázquez-Cortés, María Eugenia Vázquez-Manríquez, Natalia Vilches-Cisneros, José Felipe Villegas-Elizondo, Mauro M. Zamboni, Jesús Zamora-Moreno, and Juan W. Zinser-Sierra. 2013. “[National Consensus of Diagnosis and Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer].” *Revista de Investigacion Clinica; Organo Del Hospital de Enfermedades de La Nutricion* 65 Suppl 1:S5-84.

Balmer, James E. and Rune Blomhoff. 2002. “Gene Expression Regulation by Retinoic Acid.” *Journal of Lipid Research* 43(11):1773–1808.

van Bennekum AM, S. Wei, M. V Gamble, S. Vogel, R. Piantedosi, M. Gottesman, V. Episkopou, and W. S. Blaner. 2001. “Biochemical Basis for Depressed Serum Retinol Levels in Transthyretin-Deficient Mice.” *The Journal of Biological Chemistry* 276(2):1107–13.

Blaner, William S., Yang Li, Pierre-Jacques Brun, Jason J. Yuen, Seung-Ah Lee, and Robin D. Clugston. n.d. “Vitamin A Absorption, Storage and Mobilization.” *Sub-Cellular Biochemistry* 81:95–125.

Blumenschein, George R., Fadlo R. Khuri, Joachim von Pawel, Ulrich Gatzemeier, Wilson H. Miller, Robert M. Jotte, Jacques Le Treut, Show-Li Sun, Jinkun K. Zhang, Zofia E. Dziwanowska, and Andres Negro-Vilar. 2008. “Phase III Trial Comparing Carboplatin, Paclitaxel, and Bexarotene with Carboplatin and Paclitaxel in Chemotherapy-Naive Patients with Advanced or Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: SPIRIT II.” *Journal of Clinical Oncology: Official*

- Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26(11):1879–85.
- Brabender, Jan, Kathleen D. Danenberg, Ralf Metzger, Paul M. Schneider, Reginald V Lord, Susan Groshen, Denice D. Tsao-Wei, JiMin Park, Dennis Salonga, Arnulf H. Hölscher, and Peter V Danenberg. 2002. "The Role of Retinoid X Receptor Messenger RNA Expression in Curatively Resected Non-Small Cell Lung Cancer." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 8(2):438–43.
- Budhu, Anuradha S. and Noa Noy. 2002. "Direct Channeling of Retinoic Acid between Cellular Retinoic Acid-Binding Protein II and Retinoic Acid Receptor Sensitizes Mammary Carcinoma Cells to Retinoic Acid-Induced Growth Arrest." *Molecular and Cellular Biology* 22(8):2632–41.
- Budman, Daniel R., Anthony Calabro, and Willi Kreis. 2002. "Synergistic and Antagonistic Combinations of Drugs in Human Prostate Cancer Cell Lines in Vitro." *Anti-Cancer Drugs* 13(10):1011–16.
- Bushue, Nathan and Yu-Jui Yvonne Wan. 2010. "Retinoid Pathway and Cancer Therapeutics." *Advanced Drug Delivery Reviews* 62(13):1285–98.
- Chambon, P. 1996. "A Decade of Molecular Biology of Retinoic Acid Receptors." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10(9):940–54.
- Chansky, Kari, Jean-Paul Sculier, John J. Crowley, Dori Giroux, Jan Van Meerbeeck, Peter Goldstraw, and International Staging Committee and Participating Institutions. 2009. "The International Association for the Study of Lung Cancer Staging Project: Prognostic Factors and Pathologic TNM Stage in Surgically Managed Non-Small Cell Lung Cancer." *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 4(7):792–801.
- Chelstowska, Sylwia, Made Airanthi K. Widjaja-Adhi, Josie A. Silvaroli, and Marcin Golczak. 2016. "Molecular Basis for Vitamin A Uptake and Storage in Vertebrates." *Nutrients* 8(11).
- Chen, Chang Feng, Philippe Goyette, and David Lohnes. 2004. "RARgamma Acts as a Tumor Suppressor in Mouse Keratinocytes." *Oncogene* 23(31):5350–59.

- Chen, Yunting, Oliver B. Clarke, Jonathan Kim, Sean Stowe, Youn-Kyung Kim, Zahra Assur, Michael Cavalier, Raquel Godoy-Ruiz, Desiree C. von Alpen, Chiara Manzini, William S. Blaner, Joachim Frank, Loredana Quadro, David J. Weber, Lawrence Shapiro, Wayne A. Hendrickson, and Filippo Mancina. 2016. "Structure of the STRA6 Receptor for Retinol Uptake." *Science (New York, N.Y.)* 353(6302).
- Cheong, Kerry, James Spicer, Simon Chowdhury, and Peter Harper. 2005. "Combination Therapy versus Single Agent Chemotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer." *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 6(10):1693–1700.
- Le Chevalier, T., D. Brisgand, J. C. Soria, J. Y. Douillard, J. L. Pujol, P. Ruffie, V. Aberola, and S. Cigolari. 2001. "Long Term Analysis of Survival in the European Randomized Trial Comparing Vinorelbine/Cisplatin to Vindesine/Cisplatin and Vinorelbine Alone in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer." *The Oncologist* 6 Suppl 1:8–11.
- Chou, T. C. and P. Talalay. 1984. "Quantitative Analysis of Dose-Effect Relationships: The Combined Effects of Multiple Drugs or Enzyme Inhibitors." *Advances in Enzyme Regulation* 22:27–55.
- Chou, Ting-Chao. 2006. "Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies." *Pharmacological Reviews* 58(3):621–81.
- Chou, Ting-Chao. 2010. "Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method." *Cancer Research* 70(2):440–46.
- Crowe, David L., Randie Kim, and Roshantha A. S. Chandraratna. 2003. "Retinoic Acid Differentially Regulates Cancer Cell Proliferation via Dose-Dependent Modulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway." *Molecular Cancer Research : MCR* 1(7):532–40.
- Cullen, M. H., L. J. Billingham, C. M. Woodroffe, A. D. Chetiyawardana, N. H. Gower, R. Joshi, D. R. Ferry, R. M. Rudd, S. G. Spiro, J. E. Cook, C. Trask, E. Bessell, C. K. Connolly, J. Tobias, and R. L. Souhami. 1999. "Mitomycin, Ifosfamide, and Cisplatin in Unresectable Non-Small-Cell Lung Cancer: Effects

- on Survival and Quality of Life.” *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 17(10):3188–94.
- Dasari, Shaloam and Paul Bernard Tchounwou. 2014. “Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action.” *European Journal of Pharmacology* 740:364–78.
- Dong, D., S. E. Ruuska, D. J. Levinthal, and N. Noy. 1999. “Distinct Roles for Cellular Retinoic Acid-Binding Proteins I and II in Regulating Signaling by Retinoic Acid.” *The Journal of Biological Chemistry* 274(34):23695–98.
- Donovan, M., B. Olofsson, A. L. Gustafson, L. Dencker, and U. Eriksson. 1995. “The Cellular Retinoic Acid Binding Proteins.” *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 53(1–6):459–65.
- Dragnev, K. H., J. R. Rigas, and E. Dmitrovsky. 2000. “The Retinoids and Cancer Prevention Mechanisms.” *The Oncologist* 5(5):361–68.
- Duong, Vanessa and Cécile Rochette-Egly. 2011. “The Molecular Physiology of Nuclear Retinoic Acid Receptors. From Health to Disease.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1812(8):1023–31.
- el-Metwally, Tarek H., Mahmoud R. Hussein, Parviz M. Pour, Charles A. Kuszynski, and Thomas E. Adrian. 2005. “Natural Retinoids Inhibit Proliferation and Induce Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells Previously Reported to Be Retinoid Resistant.” *Cancer Biology & Therapy* 4(4):474–83.
- Ettinger, David S., Wallace Akerley, Gerold Bepler, Matthew G. Blum, Andrew Chang, Richard T. Cheney, Lucian R. Chirieac, Thomas A. D’Amico, Todd L. Demmy, Apar Kishor P. Ganti, Ramaswamy Govindan, Frederic W. Grannis, Thierry Jahan, Mohammad Jahanzeb, David H. Johnson, Anne Kessinger, Ritsuko Komaki, Feng-Ming Kong, Mark G. Kris, Lee M. Krug, Quynh-Thu Le, Inga T. Lennes, Renato Martins, Janis O’Malley, Raymond U. Osarogiagbon, Gregory A. Otterson, Jyoti D. Patel, Katherine M. Pisters, Karen Reckamp, Gregory J. Riely, Eric Rohren, George R. Simon, Scott J. Swanson, Douglas E. Wood, Stephen C. Yang, and NCCN Non-Small Cell Lung Cancer Panel Members. 2010. “Non-Small Cell Lung Cancer.” *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* 8(7):740–801.

- Evans, D. L., M. Tilby, and C. Dive. 1994. "Differential Sensitivity to the Induction of Apoptosis by Cisplatin in Proliferating and Quiescent Immature Rat Thymocytes Is Independent of the Levels of Drug Accumulation and DNA Adduct Formation." *Cancer Research* 54(6):1596–1603.
- Farias, Eduardo F., Alice Arapshian, Ira J. Bleiweiss, Samuel Waxman, Arthur Zelent, and Rafael Mira-Y-Lopez. 2002. "Retinoic Acid Receptor Alpha2 Is a Growth Suppressor Epigenetically Silenced in MCF-7 Human Breast Cancer Cells." *Cell Growth & Differentiation : The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 13(8):335–41.
- Ferlay, J., M. Colombet, I. Soerjomataram, C. Mathers, D. M. Parkin, M. Piñeros, A. Znaor, and F. Bray. 2018. "Estimating the Global Cancer Incidence and Mortality in 2018: GLOBOCAN Sources and Methods." *International Journal of Cancer*.
- Finzi, E., M. J. Blake, P. Celano, J. Skouge, and R. Diwan. 1992. "Cellular Localization of Retinoic Acid Receptor-Gamma Expression in Normal and Neoplastic Skin." *The American Journal of Pathology* 140(6):1463–71.
- Fiorella, P. D. and J. L. Napoli. 1994. "Microsomal Retinoic Acid Metabolism. Effects of Cellular Retinoic Acid-Binding Protein (Type I) and C18-Hydroxylation as an Initial Step." *The Journal of Biological Chemistry* 269(14):10538–44.
- Foley, Emily A. and Tarun M. Kapoor. 2013. "Microtubule Attachment and Spindle Assembly Checkpoint Signalling at the Kinetochores." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14(1):25–37.
- Fossella, Frank, Jose R. Pereira, Joachim von Pawel, Anna Pluzanska, Vera Gorbounova, Eckhard Kaukel, Karin V Mattson, Rodryg Ramlau, Aleksandra Szczesna, Panagiotis Fidias, Michael Millward, and Chandra P. Belani. 2003. "Randomized, Multinational, Phase III Study of Docetaxel plus Platinum Combinations versus Vinorelbine plus Cisplatin for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: The TAX 326 Study Group." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 21(16):3016–24.
- Gonzalez, V. M., M. A. Fuertes, C. Alonso, and J. M. Perez. 2001. "Is Cisplatin-

- Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis?" *Molecular Pharmacology* 59(4):657–63.
- Grimwade, D. 1999. "The Pathogenesis of Acute Promyelocytic Leukaemia: Evaluation of the Role of Molecular Diagnosis and Monitoring in the Management of the Disease." *British Journal of Haematology* 106(3):591–613.
- Gronemeyer, Hinrich, Jan-Ake Gustafsson, and Vincent Laudet. 2004. "Principles for Modulation of the Nuclear Receptor Superfamily." *Nature Reviews. Drug Discovery* 3(11):950–64.
- Grunt ThW, E. Dittrich, M. Offterdinger, S. M. Schneider, Ch Dittrich, and H. Huber. 1998. "Effects of Retinoic Acid and Fenretinide on the C-ErbB-2 Expression, Growth and Cisplatin Sensitivity of Breast Cancer Cells." *British Journal of Cancer* 78(1):79–87.
- Güzey, M., E. Demirpençe, W. Criss, and H. F. DeLuca. 1998. "Effects of Retinoic Acid (All-Trans and 9-Cis) on Tumor Progression in Small-Cell Lung Carcinoma." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 242(2):369–75.
- Hayashi, K., H. Yokozaki, S. Goodison, N. Oue, T. Suzuki, R. Lotan, W. Yasui, and E. Tahara. 2001. "Inactivation of Retinoic Acid Receptor Beta by Promoter CpG Hypermethylation in Gastric Cancer." *Differentiation; Research in Biological Diversity* 68(1):13–21.
- Herbst, Roy S. and Fadlo R. Khuri. 2003. "Mode of Action of Docetaxel - a Basis for Combination with Novel Anticancer Agents." *Cancer Treatment Reviews* 29(5):407–15.
- Jamieson, E. R. and S. J. Lippard. 1999. "Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts." *Chemical Reviews* 99(9):2467–98.
- Janssen, Aniek, Evelyne Beerling, René Medema, and Jacco van Rheenen. 2013. "Intravital FRET Imaging of Tumor Cell Viability and Mitosis during Chemotherapy." *PloS One* 8(5):e64029.
- Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman. 2011. "Global Cancer Statistics: 2011." *CA Cancer J Clin.*
- Jimenez-Pérez, RF, M. Granados-García, and L. Green-Schnneweiss. 2000.

Manual de Oncología. Procedimientos Médico-Quirúrgicos. Mexico city: McGrawHill Interamericana.

Jordan, M. A., R. J. Toso, D. Thrower, and L. Wilson. 1993. "Mechanism of Mitotic Block and Inhibition of Cell Proliferation by Taxol at Low Concentrations." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(20):9552–56.

Jozan, Suzanne, Sebastien Paute, Monique Courtade-Saïdi, Severine Julié, Simone Vidal, Roland Bugat, and Annie Valette. 2002. "All Trans Retinoic Acid Enhances CDDP-Induced Apoptosis: Modulation of the CDDP Effect on Cell Cycle Progression." *International Journal of Oncology* 20(6):1289–95.

Kano, Y., M. Akutsu, S. Tsunoda, K. Suzuki, and Y. Yazawa. 1996. "In Vitro Schedule-Dependent Interaction between Paclitaxel and Cisplatin in Human Carcinoma Cell Lines." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 37(6):525–30.

Karamouzis, Michalis V, Panagiotis A. Konstantinopoulos, and Athanasios G. Papavassiliou. 2007. "Roles of CREB-Binding Protein (CBP)/P300 in Respiratory Epithelium Tumorigenesis." *Cell Research* 17(4):324–32.

Karamouzis, Michalis V and Athanasios G. Papavassiliou. 2005. "Retinoid Receptor Cross-Talk in Respiratory Epithelium Cancer Chemoprevention." *Trends in Molecular Medicine* 11(1):10–16.

Karmakar, Surajit, Naren L. Banik, Sunil J. Patel, and Swapan K. Ray. 2007. "Combination of All-Trans Retinoic Acid and Taxol Regressed Glioblastoma T98G Xenografts in Nude Mice." *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 12(11):2077–87.

Karmakar, Surajit, Naren L. Banik, and Swapan K. Ray. 2008. "Combination of All-Trans Retinoic Acid and Paclitaxel-Induced Differentiation and Apoptosis in Human Glioblastoma U87MG Xenografts in Nude Mice." *Cancer* 112(3):596–607.

Kawaguchi, Riki, Jiamei Yu, Jane Honda, Jane Hu, Julian Whitelegge, Peipei Ping, Patrick Wiita, Dean Bok, and Hui Sun. 2007. "A Membrane Receptor for Retinol Binding Protein Mediates Cellular Uptake of Vitamin A." *Science (New*

- York, N. Y.) 315(5813):820–25.
- Kedishvili, Natalia Y. 2013. “Enzymology of Retinoic Acid Biosynthesis and Degradation.” *Journal of Lipid Research* 54(7):1744–60.
- Kelly, K., J. Crowley, P. A. Bunn, C. A. Presant, P. K. Grevstad, C. M. Moinpour, S. D. Ramsey, A. J. Wozniak, G. R. Weiss, D. F. Moore, V. K. Israel, R. B. Livingston, and D. R. Gandara. 2001. “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.” *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 19(13):3210–18.
- Khuri, F. R., R. Lotan, B. L. Kemp, S. M. Lippman, H. Wu, L. Feng, J. J. Lee, C. S. Cooksley, B. Parr, E. Chang, G. L. Walsh, J. S. Lee, W. K. Hong, and X. C. Xu. 2000. “Retinoic Acid Receptor-Beta as a Prognostic Indicator in Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer.” *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 18(15):2798–2804.
- Ki Hong, W., S. M. Lippman, W. N. Hittelman, and R. Lotan. 1995. “Retinoid Chemoprevention of Aerodigestive Cancer: From Basic Research to the Clinic.” *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 1(7):677–86.
- Kim, Young Tae, Seung Hee Lee, Sook Whan Sung, and Joo Hyun Kim. 2005. “Can Aberrant Promoter Hypermethylation of CpG Islands Predict the Clinical Outcome of Non-Small Cell Lung Cancer after Curative Resection?” *The Annals of Thoracic Surgery* 79(4):1180–88; discussion 1180-8.
- Klaassen, I., R. H. Brakenhoff, S. J. Smeets, G. B. Snow, and B. J. Braakhuis. 2001. “Expression of Retinoic Acid Receptor Gamma Correlates with Retinoic Acid Sensitivity and Metabolism in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines.” *International Journal of Cancer* 92(5):661–65.
- Komlodi-Pasztor, Edina, Dan Sackett, Julia Wilkerson, and Tito Fojo. 2011. “Mitosis Is Not a Key Target of Microtubule Agents in Patient Tumors.” *Nature Reviews. Clinical Oncology* 8(4):244–50.
- Kops, Geert J. P. L., Beth A. A. Weaver, and Don W. Cleveland. 2005. “On the

- Road to Cancer: Aneuploidy and the Mitotic Checkpoint." *Nature Reviews. Cancer* 5(10):773–85.
- Kumar, Anupam, Jatinder Kaur, Tushar Kant Chattopadhyay, Meera Mathur, and Ranju Ralhan. 2004. "Differential Expression of Retinoic Acid Receptors in Normal and Malignant Esophageal Tissues." *Journal of Experimental Therapeutics & Oncology* 4(1):1–8.
- Landis, S. H., T. Murray, S. Bolden, and P. A. Wingo. 1999. "Cancer Statistics, 1999." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*.
- Lara-Gonzalez, Pablo, Frederick G. Westhorpe, and Stephen S. Taylor. 2012. "The Spindle Assembly Checkpoint." *Current Biology : CB* 22(22):R966-80.
- Lee, Su Man, Ji Yun Lee, Jin Eun Choi, Shin Yup Lee, Jae Yong Park, and Dong Sun Kim. 2010. "Epigenetic Inactivation of Retinoid X Receptor Genes in Non-Small Cell Lung Cancer and the Relationship with Clinicopathologic Features." *Cancer Genetics and Cytogenetics* 197(1):39–45.
- Lehmann, J. M., X. K. Zhang, and M. Pfahl. 1992. "RAR Gamma 2 Expression Is Regulated through a Retinoic Acid Response Element Embedded in Sp1 Sites." *Molecular and Cellular Biology* 12(7):2976–85.
- Liu, M., A. Iavarone, and L. P. Freedman. 1996. "Transcriptional Activation of the Human P21(WAF1/CIP1) Gene by Retinoic Acid Receptor. Correlation with Retinoid Induction of U937 Cell Differentiation." *The Journal of Biological Chemistry* 271(49):31723–28.
- Lohnes, D., M. Mark, C. Mendelsohn, P. Dollé, D. Decimo, M. LeMeur, A. Dierich, P. Gorry, and P. Chambon. 1995. "Developmental Roles of the Retinoic Acid Receptors." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 53(1–6):475–86.
- Lotan, R. 1996. "Retinoids in Cancer Chemoprevention." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10(9):1031–39.
- Lotan, R. and J. L. Clifford. 1991. "Nuclear Receptors for Retinoids: Mediators of Retinoid Effects on Normal and Malignant Cells." *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 45(4–5):145–56.

- De Luca, L. M. 1991. "Retinoids and Their Receptors in Differentiation, Embryogenesis, and Neoplasia." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5(14):2924–33.
- Mangiarotti, R., M. Danova, R. Alberici, and C. Pellicciari. 1998. "All-Trans Retinoic Acid (ATRA)-Induced Apoptosis Is Preceded by G1 Arrest in Human MCF-7 Breast Cancer Cells." *British Journal of Cancer* 77(2):186–91.
- Martinet, N., F. Alla, G. Farré, T. Labib, H. Drouot, R. Vidili, E. Picard, M. P. Gaube, D. Le Faou, J. Siat, J. Borelly, P. Vermylen, T. Bazarbachi, J. M. Vignaud, and Y. Martinet. 2000. "Retinoic Acid Receptor and Retinoid X Receptor Alterations in Lung Cancer Precursor Lesions." *Cancer Research* 60(11):2869–75.
- Masuda, Muneyuki, Satoshi Toh, Koji Koike, Yuichiro Kuratomi, Masumi Suzui, Atsuko Deguchi, Sohtaro Komiyama, and I. Bernard Weinstein. 2002. "The Roles of JNK1 and Stat3 in the Response of Head and Neck Cancer Cell Lines to Combined Treatment with All-Trans-Retinoic Acid and 5-Fluorouracil." *Japanese Journal of Cancer Research : Gann* 93(3):329–39.
- Molina, Julian R., Ping Yang, Stephen D. Cassivi, Steven E. Schild, and Alex A. Adjei. 2008. "Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship." *Mayo Clinic Proceedings* 83(5):584–94.
- Moreno, Daniel, Conchita Tros de Ilarduya, Eva Bandrés, María Buñuales, María Azcona, Jesús García-Foncillas, and María J. Garrido. 2008. "Characterization of Cisplatin Cytotoxicity Delivered from PLGA-Systems." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 68(3):503–12.
- Nabeyrat, E., S. Corroyer, R. Epaud, V. Besnard, V. Cazals, and A. Clement. 2000. "Retinoic Acid-Induced Proliferation of Lung Alveolar Epithelial Cells Is Linked to P21(CIP1) Downregulation." *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 278(1):L42-50.
- Napoli, J. L. 1996. "Biochemical Pathways of Retinoid Transport, Metabolism, and Signal Transduction." *Clinical Immunology and Immunopathology* 80(3 Pt 2):S52-62.

- Noh, Hee-Jung, Kyeong-Ah Kim, and Keun-Cheol Kim. 2014. "P53 Down-Regulates SETDB1 Gene Expression during Paclitaxel Induced-Cell Death." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446(1):43–48.
- Noy, Noa. 2016. "Vitamin A Transport and Cell Signaling by the Retinol-Binding Protein Receptor STRA6." *Sub-Cellular Biochemistry* 81:77–93.
- Orth, James D., Rainer H. Kohler, Floris Fojier, Peter K. Sorger, Ralph Weissleder, and Timothy J. Mitchison. 2011. "Analysis of Mitosis and Antimitotic Drug Responses in Tumors by in Vivo Microscopy and Single-Cell Pharmacodynamics." *Cancer Research* 71(13):4608–16.
- Pandolfi, P. P. 2001. "Oncogenes and Tumor Suppressors in the Molecular Pathogenesis of Acute Promyelocytic Leukemia." *Human Molecular Genetics* 10(7):769–75.
- Peng, Xinjian, Albert Green, Anne Shilkaitis, Yonghua Zhu, Laura Bratescu, and Konstantin Christov. 2011. "Early in Vitro Passages of Breast Cancer Cells Are Differentially Susceptible to Retinoids and Differentially Express RAR β Isoforms." *International Journal of Oncology* 39(3):577–83.
- Perez, R. P. 1998. "Cellular and Molecular Determinants of Cisplatin Resistance." *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 34(10):1535–42.
- Perissi, Valentina, Kristen Jepsen, Christopher K. Glass, and Michael G. Rosenfeld. 2010. "Deconstructing Repression: Evolving Models of Co-Repressor Action." *Nature Reviews. Genetics* 11(2):109–23.
- Pettersson, F., K. W. Colston, and A. G. Dalglish. 2001. "Retinoic Acid Enhances the Cytotoxic Effects of Gemcitabine and Cisplatin in Pancreatic Adenocarcinoma Cells." *Pancreas* 23(3):273–79.
- Picard, E., C. Seguin, N. Monhoven, C. Rochette-Egly, J. Siat, J. Borrelly, Y. Martinet, N. Martinet, and J. M. Vignaud. 1999. "Expression of Retinoid Receptor Genes and Proteins in Non-Small-Cell Lung Cancer." *Journal of the National Cancer Institute* 91(12):1059–66.
- Pratt, M. A. Christine, Minying Niu, and Dawn White. 2003. "Differential Regulation of Protein Expression, Growth and Apoptosis by Natural and Synthetic Retinoids." *Journal of Cellular Biochemistry* 90(4):692–708.

- Renaud, J. P., N. Rochel, M. Ruff, V. Vivat, P. Chambon, H. Gronemeyer, and D. Moras. 1995. "Crystal Structure of the RAR-Gamma Ligand-Binding Domain Bound to All-Trans Retinoic Acid." *Nature* 378(6558):681–89.
- Robinson, Lary A., John C. Ruckdeschel, Henry Wagner, Craig W. Stevens, and American College of Chest Physicians. 2007. "Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer-Stage IIIA: ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition)." *Chest* 132(3 Suppl):243S-265S.
- Rose, Maimon C., Elina Kostyanovskaya, and R. Stephanie Huang. 2014. "Pharmacogenomics of Cisplatin Sensitivity in Non-Small Cell Lung Cancer." *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 12(5):198–209.
- Satake, Kenichi, Emi Takagi, Akiko Ishii, Yasumasa Kato, Yukari Imagawa, Yuu Kimura, and Mamoru Tsukuda. 2003. "Anti-Tumor Effect of Vitamin A and D on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma." *Auris, Nasus, Larynx* 30(4):403–12.
- Schiff, P. B., J. Fant, and S. B. Horwitz. 1979. "Promotion of Microtubule Assembly in Vitro by Taxol." *Nature* 277(5698):665–67.
- Schiller, Joan H., David Harrington, Chandra P. Belani, Corey Langer, Alan Sandler, James Krook, Junming Zhu, David H. Johnson, and Eastern Cooperative Oncology Group. 2002. "Comparison of Four Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer." *The New England Journal of Medicine* 346(2):92–98.
- Sher, Taimur, Grace K. Dy, and Alex A. Adjei. 2008. "Small Cell Lung Cancer." *Mayo Clinic Proceedings* 83(3):355–67.
- Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, and Ahmedin Jemal. 2017. "Cancer Statistics, 2017." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*.
- Simeone, A. M. and A. M. Tari. 2004. "How Retinoids Regulate Breast Cancer Cell Proliferation and Apoptosis." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 61(12):1475–84.
- So, E. N. and D. L. Crowe. 2000. "Characterization of a Retinoic Acid Responsive Element in the Human Ets-1 Promoter." *IUBMB Life* 50(6):365–70.
- Soprano, Dianne Robert, Pu Qin, and Kenneth J. Soprano. 2004. "Retinoic Acid

- Receptors and Cancers.” *Annual Review of Nutrition* 24:201–21.
- Soriano, A. F., B. Helfrich, D. C. Chan, L. E. Heasley, P. A. Bunn, and T. C. Chou. 1999. “Synergistic Effects of New Chemopreventive Agents and Conventional Cytotoxic Agents against Human Lung Cancer Cell Lines.” *Cancer Research* 59(24):6178–84.
- Tan, Nguan-Soon, Natacha S. Shaw, Nicolas Vinckenbosch, Peng Liu, Rubina Yasmin, Béatrice Desvergne, Walter Wahli, and Noa Noy. 2002. “Selective Cooperation between Fatty Acid Binding Proteins and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Regulating Transcription.” *Molecular and Cellular Biology* 22(14):5114–27.
- Tomizawa, Yoshio, Hironobu Iijima, Taisuke Nomoto, Yasuki Iwasaki, Yoshimi Otani, Satoshi Tsuchiya, Ryusei Saito, Kunio Dobashi, Takashi Nakajima, and Masatomo Mori. 2004. “Clinicopathological Significance of Aberrant Methylation of RARbeta2 at 3p24, RASSF1A at 3p21.3, and FHIT at 3p14.2 in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer.” *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 46(3):305–12.
- Travis, William D., Elisabeth Brambilla, Andrew G. Nicholson, Yasushi Yatabe, John H. M. Austin, Mary Beth Beasley, Lucian R. Chirieac, Sanja Dacic, Edwina Duhig, Douglas B. Flieder, Kim Geisinger, Fred R. Hirsch, Yuichi Ishikawa, Keith M. Kerr, Masayuki Noguchi, Giuseppe Pelosi, Charles A. Powell, Ming Sound Tsao, and Ignacio Wistuba. 2015. “The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification.” *Journal of Thoracic Oncology*.
- Virmani, A. K., A. Rathi, S. Zöchbauer-Müller, N. Sacchi, Y. Fukuyama, D. Bryant, A. Maitra, S. Heda, K. M. Fong, F. Thunnissen, J. D. Minna, and A. F. Gazdar. 2000. “Promoter Methylation and Silencing of the Retinoic Acid Receptor-Beta Gene in Lung Carcinomas.” *Journal of the National Cancer Institute* 92(16):1303–7.
- Vivat-Hannah, V., D. You, C. Rizzo, J. P. Daris, P. Lapointe, F. C. Zusi, A. Marinier, M. V Lorenzi, and M. M. Gottardis. 2001. “Synergistic Cytotoxicity

- Exhibited by Combination Treatment of Selective Retinoid Ligands with Taxol (Paclitaxel)." *Cancer Research* 61(24):8703–11.
- Vuocolo, Scott, Enkhtsetseg Purev, Dongmei Zhang, Jiri Bartek, Klaus Hansen, Dianne Robert Soprano, and Kenneth J. Soprano. 2003. "Protein Phosphatase 2A Associates with Rb2/P130 and Mediates Retinoic Acid-Induced Growth Suppression of Ovarian Carcinoma Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 278(43):41881–89.
- Wagner, Jill M. and Larry M. Karnitz. 2009. "Cisplatin-Induced DNA Damage Activates Replication Checkpoint Signaling Components That Differentially Affect Tumor Cell Survival." *Molecular Pharmacology* 76(1):208–14.
- Wakelee, Heather A., Ellen T. Chang, Scarlett L. Gomez, Theresa H. Keegan, Diane Feskanich, Christina A. Clarke, Lars Holmberg, Lee C. Yong, Laurence N. Kolonel, Michael K. Gould, and Dee W. West. 2007. "Lung Cancer Incidence in Never Smokers." *Journal of Clinical Oncology*.
- Wang, Q., W. Yang, M. S. Uytingco, S. Christakos, and R. Wieder. 2000. "1,25-Dihydroxyvitamin D3 and All-Trans-Retinoic Acid Sensitize Breast Cancer Cells to Chemotherapy-Induced Cell Death." *Cancer Research* 60(7):2040–48.
- Wang, X. D., C. Liu, R. T. Bronson, D. E. Smith, N. I. Krinsky, and M. Russell. 1999. "Retinoid Signaling and Activator Protein-1 Expression in Ferrets given Beta-Carotene Supplements and Exposed to Tobacco Smoke." *Journal of the National Cancer Institute* 91(1):60–66.
- Waters, J. C., R. H. Chen, A. W. Murray, and E. D. Salmon. 1998. "Localization of Mad2 to Kinetochores Depends on Microtubule Attachment, Not Tension." *The Journal of Cell Biology* 141(5):1181–91.
- Watson, Rachel E. B., J. Arjuna Ratnayaka, Rebecca C. C. Brooke, Sharon Yee-Sit-Yu, Philippe Ancian, and Christopher E. M. Griffiths. 2004. "Retinoic Acid Receptor Alpha Expression and Cutaneous Ageing." *Mechanisms of Ageing and Development* 125(7):465–73.
- Wickramasinghe, S. N. 1996. "Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique, 3rd Edn. R. Ian Freshney, Wiley-Liss, Inc: New York. Xxiv + 486 Pages (1994)." *Cell Biochemistry and Function* 14(1):75–76.

- Widschwendter, M., J. Berger, M. Hermann, H. M. Müller, A. Amberger, M. Zeschnigk, A. Widschwendter, B. Abendstein, A. G. Zeimet, G. Daxenbichler, and C. Marth. 2000. "Methylation and Silencing of the Retinoic Acid Receptor-Beta2 Gene in Breast Cancer." *Journal of the National Cancer Institute* 92(10):826–32.
- Xu, X. C., G. Sozzi, J. S. Lee, J. J. Lee, U. Pastorino, S. Pilotti, J. M. Kurie, W. K. Hong, and R. Lotan. 1997. "Suppression of Retinoic Acid Receptor Beta in Non-Small-Cell Lung Cancer in Vivo: Implications for Lung Cancer Development." *Journal of the National Cancer Institute* 89(9):624–29.
- Yan, Ting-Dong, Hua Wu, Hai-Ping Zhang, Na Lu, Ping Ye, Feng-Hai Yu, Hu Zhou, Wen-Gang Li, Xihua Cao, Ya-Yu Lin, Jia-You He, Wei-Wei Gao, Yi Zhao, Lei Xie, Jie-Bo Chen, Xiao-Kun Zhang, and Jin-Zhang Zeng. 2010. "Oncogenic Potential of Retinoic Acid Receptor-Gamma in Hepatocellular Carcinoma." *Cancer Research* 70(6):2285–95.
- Zarogoulidis, Konstantinos, Paul Zarogoulidis, Kaid Darwiche, Efimia Boutsikou, Nikolaos Machairiotis, Kosmas Tsakiridis, Nikolaos Katsikogiannis, Ioanna Kougioumtzi, Ilias Karapantzos, Haidong Huang, and Dionysios Spyrtos. 2013. "Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)." *Journal of Thoracic Disease* 5 Suppl 4:S389-96.
- Zasadil, Lauren M., Kristen A. Andersen, Dabin Yeum, Gabrielle B. Rocque, Lee G. Wilke, Amye J. Tevaarwerk, Ronald T. Raines, Mark E. Burkard, and Beth A. Weaver. 2014. "Cytotoxicity of Paclitaxel in Breast Cancer Is Due to Chromosome Missegregation on Multipolar Spindles." *Science Translational Medicine* 6(229):229ra43.
- Zhang, X. K., Y. Liu, and M. O. Lee. 1996. "Retinoid Receptors in Human Lung Cancer and Breast Cancer." *Mutation Research* 350(1):267–77.

Full Length Research Paper

All-trans retinoic acid in combination with cisplatin and paclitaxel enhances apoptosis and up-regulates retinoic acid receptors in lung adenocarcinoma cells

Norma Hernández-Pedro^{1,2}, Benjamin Pineda², Elizabeth Langley³, Marcela Lizano⁴, Aleli Salazar-Ramiro², Roxana Magaña-Maldonado², Julio Sotelo² and Oscar Arrieta^{1,5,6}

¹Experimental Oncology Unit, Department of Basic Research, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico.

²Neuroimmunology Unit, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Mexico City, Mexico.

³Hormone Regulated Cancer Lab, Department of Basic Research, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico.

⁴Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología-Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México City.

⁵Department of Medical Oncology, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico.

⁶Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

*Corresponding author email: ogar@unam.mx

Acceptance 14 November 2016

ABSTRACT

Purpose: Loss of expression of retinoic acid receptors (RAR) results in lack of response to treatment and cancer progression. All-trans retinoic acid (ATRA) is a potential chemotherapeutic and chemopreventive agent with differentiation-inducing, anti-proliferative and pro-apoptotic effects that up-regulates retinoic acid receptors. The aim of this study was to assess a possible synergistic combination of ATRA with chemotherapy in terms of pro-apoptotic and anti-proliferative effects as well as on RAR expression in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods:** The human lung cancer cell line H1666, was treated with ATRA, cisplatin (CIS) and paclitaxel (PACLI) at different combinations. We analyzed cell viability by the MTT assay while cell cycle and apoptosis were determined by flow cytometry. RAR and RXR expression was determined by RT-qPCR. **Results:** ATRA combined with CIS or PACLI inhibited cell growth showing a synergistic effect at 24 hours. All Paclitaxel combined treatments arrested cells in the G2-M phase whereas ATRA-CIS increased the sub G0 population. Furthermore, ATRA alone enhanced apoptosis, and this effect was greater when combining ATRA-CISPACLI. Additionally, ATRA in all combinations promoted up-regulation of RAR α , β and γ . **Conclusion:** The addition of ATRA to CIS or PACLI enhanced their antitumor effect in lung cancer cells. This effect was more evident with the ATRA-PACLI combination.

Keywords: Non-small cell lung cancer, All-trans Retinoic Acid, Cisplatin, Paclitaxel, Retinoic Acid Receptors, Apoptosis, Cell Cycle.

INTRODUCTION

ABBREVIATIONS

NSCLC: Non-Small Cell Lung Cancer. ATRA: All-Trans Retinoic Acid. CT: Chemotherapy, PACLI: Paclitaxel, CIS: Cisplatin, RAR: Retinoic acid Receptors, RXR: Retinoic X Receptor.

Lung cancer is the leading cause of cancer deaths worldwide. The non-small-cell lung cancer subtype (NSCLC) accounts for more than 80% of the cases (Jemal et al., 2010). In Mexico, NSCLC is the first cause of death from cancer, with over 6,697 deaths per year (Arrieta et al., 2013), and a 5-year survival rate of only about 16% (Groome et al., 2007). Chemotherapy (CT) for advanced NSCLC has limited efficacy, with 20%-35% of global response and 35% of one-year survival rate (Scagliotti et al., 2002). A study comparing third-generation CT regimes, showed no differences in survival rate at one and two years, thus, cisplatin and paclitaxel remain the standard treatment for NSCLC (Schiller et al., 2002).

Carcinogenesis of the respiratory epithelium is a multifactorial process including inherited and acquired genetic changes, chromosomal rearrangements and epigenetic factors (Karamouzis and Papavassiliou, 2005). Retinoids are required for normal epithelial cell growth and regulation; however, their deficiency contributes to signaling dysfunction and has been associated with bronchial metaplasia and increased risk for lung cancer development (Bogos et al., 2008). Alteration or loss of expression of retinoic acid receptors (RAR), either RAR α , β or γ , are found in premalignant and malignant tissues, a feature that is associated with malignant transformation of human cells (Xu et al., 1994; Xu et al., 1997).

All-trans retinoic acid (ATRA) is an active metabolite that regulates the expression of target genes through binding and activation of RAR receptors, inhibition of proliferation, and differentiation of cell cultures (Liu et al., 1996). ATRA induces RAR β expression in peripheral nerves, inducing regeneration (Zhelyaznik and Mey, 2006), and in breast cancer cells ATRA also up-regulates this receptor causing growth inhibition (Liu et al., 1996).

Retinoids have been used as potential chemotherapeutic adjuvants since they promote differentiation and because of their anti-proliferative, proapoptotic, and anti-oxidant effects (Altucci et al., 2001). In premalignant lesions, retinoids inhibit the development of second primary cancers in patients with upper aerodigestive tract and lung cancers (Hong et al., 1990; Hansen et al., 2000). However, large randomized trials using retinoids for prevention of tobacco-related cancer, showed a higher incidence of lung cancer among smoking participants who received retinoids (Pastorino, 1997; Khuri and Lotan, 2004). We demonstrated previously that adding ATRA to chemotherapy increases

the response rate (RR) and progression free survival (PFS) in patients with advanced NSCLC (Arrieta et al., 2011). Additionally, preclinical data and phase II clinical trials have suggested that platinum-based chemotherapy plus bexarotene improves overall survival (OS), but a subsequent phase III clinical trial showed benefits only for OS in patients with increased triglycerides (Tyagi, 2005; Edelman et al., 2005). Based on these facts, the use of retinoids in clinical trials remains controversial.

This study aimed at describing the effects of ATRA in combination with Paclitaxel (PACLI) and Cisplatin (CIS), on proliferation, apoptosis, and the expression of retinoic acid receptors in lung cancer cells.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture

The NSCLC cell line H1666 (Adenocarcinoma line), was obtained from the ATCC (American Tissue Culture Collection, Rockville, MD, USA). Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO BRL), 4 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. Cells were grown and maintained under sterile conditions at 37°C in a humid environment with 5% CO₂. The assays were carried out in triplicate.

Cellular growth rates were determined using an MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. Cells were grown in 96-well plates in 10% FBS-containing DMEM medium at a density of 1×10^4 cells/well. After 24 hr, cells were treated with 1 μ M retinoic acid (ATRA) (Sigma Aldrich, Mexico), 35 μ M Cisplatin (CIS) (PISA Pharmaceuticals), 0.008 μ M Paclitaxel (PACLI) (Dabur Pharmaceuticals Ltd) or combinations thereof at the same concentrations. After 24, 48h or 72h, 10 μ l of the MTT labeling reagent (Roche Applied Science, Mexico) were added, and plates were incubated at 37°C for 4 hr. Afterwards, 100 μ l of solubilization solution (Roche applied, Mexico) was added and plates were incubated overnight. Cell viability was measured at 570 nm using a microplate reader (BioRad, Hercules, CA, U.S.A.).

Combination index (CI)-isobol method

Chou and Talalay introduced a scientific term "combination index" (CI) which is used to determine synergistic or antagonistic effects (Chou and Talalay, 1984; Chou, 2010). The combination index (CI)-isobol method provides a quantitative assessment of synergism between drugs. A CI is estimated from dose-effect data of

single and combined drug treatments. A value of CI less than 1 indicates synergism; CI = 1 indicates additive effect; and CI > 1 indicates antagonism. Drug interaction (synergism or antagonism) is more pronounced the farther a CI value is from 1. According to the CI range, the synergism could be defined as slight (CI: 0,85-0,90), moderate (0,7-0,85), synergism (CI: 0,3-0,7), strong (CI: 0,1-0,3), and very strong (CI<0,1) (Chou, 2010; Chou, 2006).

Formally, the combination index (CI) of a combined drug treatment is defined as $CI = D1/Dx1 + D2/Dx2$. Here D1 and D2 are the doses of drug 1 and drug 2, respectively, in the combination; Dx1 and Dx2 each is the dose of a treatment with only drug 1 and drug 2 that would give the same effect as that of the combination, respectively. The doses Dx1 and Dx2 need to be estimated from the dose-effect data of single drug treatments. In our study, the dose-effect relationship of individual and combined treatments was measured as the percentage cell growth inhibition to obtain the combination index (CI) for the multiple drugs tested i.e. ATRA, CIS and PACLI.

In vitro assays

To determine the cytotoxic effects of ATRA combined with CT (CIS and/or PACLI), cells were grown in 24-well plates in 10% FBS-containing DMEM medium at a density of 3×10^5 cells/well. After 24 hours, cells were treated with ATRA, CIS and PACLI alone or in different combinations for 24, 48 and 72 hours. The combinations used were Control (no treatment), ATRA, CIS, PACLI, ATRA-CIS, ATRA-PACLI, CIS-PACLI and ATRA-CIS-PACLI. After treatment, cells were incubated with trypsin and collected to determine RAR expression, cell cycle stage and induction of apoptosis.

Cell cycle analysis

The distribution of the cell cycle stage in cells was determined by flow cytometry using propidium iodide (PI) staining. After experimental treatment, 1×10^6 cells were rinsed with PBS, collected and fixed in cold 70% ethanol. The samples were stored at -20°C until analyzed. Then, cells were washed with PBS, centrifuged, resuspended in permeabilization buffer (0.2 M Na_2HPO_4 , 0.1 M acetic acid) and incubated for 30 min at 37°C . Afterwards, cells were centrifuged and resuspended in RNase (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and PI (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cells were incubated in the dark for 30 min at room temperature. Data were collected in the FACSCalibur Flow cytometer (Becton Dickinson, USA) and 10,000 events were evaluated. The cell cycle was determined on an FL-4 region. Measurements were obtained at 488 nm gating out, doublets and clumps for each sample were discarded. Cell QuestPro and Flow Jo

ver. 7.6.1 software were used for data analysis.

Detection of apoptosis by annexin V-7AAD

The Annexin V assay is based on the observation that phosphatidylserine (PS), a phospholipid normally confined in the inner plasma membrane, translocates to the cell surface during apoptosis. After pharmacological treatments, cells were rinsed with PBS, resuspended in 1ml filtered PBS, and adjusted to a concentration of 1×10^6 cells/ml. Cell suspensions were incubated with 200 μl of annexin V-binding buffer (0.1 HEPES (pH 7.4), 1.4 M NaCl and 25 mM CaCl solution) containing Annexin VFITC (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen) and 7 AAD. After gently vortexing, cells were incubated for 15 min at room temperature in the dark. Data were collected for 10,000 events by flow cytometry (FACSCalibur instrument, BD Biosciences) and analyzed using Cell QuestPro and Flow Jo ver. 7.6.1 software.

The dot-plot of the four quadrants in the figures was used to distinguish the viable (Annexin V-7AAD-), apoptotic (Annexin V+/7AAD+), and necrotic (Annexin V-7AAD+) cells (Pietra et al., 2001).

Gene expression analysis by real-time PCR

RNA extraction was performed using TRIzol[®] RNA Isolation Reagent (Gibco, Life Technologies Corporation), according to manufacturer's instructions. Briefly, 500 μl of TRIzol[®] reagent were added to cells and the mix was kept at -70°C until used. Cells were then thawed at room temperature and 200 μl of chloroform were added, samples were kept on ice for 3 min on a plate shaker. At the end of the incubation period the tubes were centrifuged at 14,000 rpm for 5 minutes, the aqueous phase was then removed and RNA was precipitated with an equal volume (v/v) of isopropyl-alcohol (Merck Darnstad Germany), tubes were centrifuged, the supernatant was discarded, and the pellet was washed with 800 μl of 75% ethanol. The mixture was centrifuged at 7500 rpm for 5 min at 4°C , the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 50 μl DEPC water.

Reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) was performed using master mix reagents (Applied Biosystems[®] Mexico), following manufacturer's instructions. TaqMan[®] Probes (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), were coupled with Standard Dye Sets, VIC (Green) or FAM (Blue), to detect the relative expression of RAR α (Hs00940446_m1), RAR β (Hs00977140_m1), RAR γ (Hs01559231_gH), RXR α (Hs01067640_m1), RXR β (Hs00232774_m1) and RXR γ (Hs02519543_s1). Mean threshold values for target genes were normalized for the endogenous control

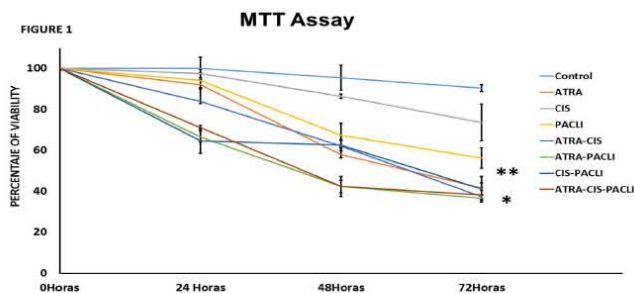


Figure 1. MTT Viability Assay The effect of ATRA, PACLI and CIS on H1666 cancer cell viability was determined using the MTT assay. Values are shown as percentage of viability relative to untreated cells. Data represent the means of three independent experiments. *p<0.005 comparing PACLI vs. Control, **p< 0.001 comparing ATRA, CIS, ATRA-CIS, ATRA-PACLI, CIS-PACLI and ATRA-CIS-PACLI vs. control at 72 hours.

Table 1. Combination index of treatments in the H1666 cell line. The CI values are shown as means ± standard deviation (SD) for each combination: ATRA-CIS (A+C), ATRA-PACLI (A+P), CIS-PACLI (C+P), ATRA-CIS-PACLI (A+C+P).

Time (Hours)	A	C	A+C	Effect	A	P	A+P	Effect	C	P	C+P	Effect	A	C	P	A+C+P	Effect
24	0.46	0.15	0.61	Syn	0.23	0.17	0.40	Syn	0.07	0.16	0.23	Strong Syn	0.27	0.09	0.20	0.56	Syn
	±	±	±		±	±	±		±	±	±		±	±	±	±	
	0.02	0.02	0.06		0.02	0.03	0.02		0.02	0.03	0.01		0.02	0.02	0.03	0.10	
48	1.11	0.36	1.47	Ant	0.72	0.56	1.28	Ant	0.36	0.87	1.23	Ant	0.73	0.24	0.56	1.53	Ant
	±	±	±		±	±	±		±	±	±		±	±	±	±	
	0.05	0.09	0.03		0.05	0.05	0.04		0.09	0.05	0.09		0.05	0.09	0.5	0.03	
72	0.92	0.42	1.34	Ant	0.91	0.68	1.59	Ant	0.45	0.74	1.19	Ant	0.97	0.44	0.73	2.14	Ant
	±	±	±		±	±	±		±	±	±		±	±	±	±	
	0.18	0.10	0.27		0.18	0.05	0.16		0.10	0.05	0.02		0.18	0.10	0.05	0.03	

control RNase P. The analysis was performed PRISM 7500.

Statistical analysis

For descriptive purposes, continuous variables

were summarized as arithmetic means, medians, and standard deviations (SD). According to data distribution (normal and non-normal) determined

Published by Basic Research Journal of Medicine and Clinical Science

by the Kolmogorov-Smirnov test, inferential comparisons among groups were conducted with One-way analysis of variance (ANOVA according to manufacturer's instructions using ABI) and post-hoc (Tukey) test or with Kruskal-Wallis test. Statistical significance was determined with $p \leq 0.05$ in a two-sided test. SPSS software package (IBM SPSS, Inc., Chicago, IL, USA version 20) was used for data analysis.

RESULTS

In Vitro cytotoxicity

Cell viability was evaluated by the MTT assay in H1666 cells treated with ATRA, CIS, PACLI and their combinations. Cell growth was evaluated at 24, 48 and 72 hours after exposure to each drug. ATRA alone reduced cell viability up to 42% and 58% at 48 hours and 72 hours ($p=0.005$ and $p=0.001$, respectively). ATRA-CIS diminished cell viability at 24, 48 and 72 h (17%, 38%, 63%; $p=0.05$, $p=0.001$, $p=0.001$, respectively), better than CIS alone, showing a synergistic effect. ATRA-PACLI also showed a progressive decrease in cell viability at 24, 48 and 72 h (34%, 58%, 64%; $p=0.001$, respectively) better than PACLI alone. No statistically significant differences were found between ATRA-PACLI vs. ATRACIS-PACLI ($p=0.834$) (Figure 1).

Combination index

CIS-PACLI displayed a strong synergism at 24 hours measured by the Combination Index (CI) (0.23 ± 0.01). We also found synergistic effects at 24h in ATRA-CIS (0.61 ± 0.06), ATRA-PACLI (0.40 ± 0.02); and ATRA-CISPACLI (0.56 ± 0.10). Conversely, at 48 and 72 hours we found antagonistic effects in all combinations (Table 1).

Cell cycle

As shown in Figure 2 (A, B and C) each of the three drugs used produced different effects on the cell cycle. ATRA increased the sub-G0 population at 48 and 72 hours. ATRA-CIS behaved like ATRA at all times. ATRAPACLI arrested cells in S-phase, with increased G2/M arrest at 24 hours. At 48 hours all cells were arrested in S-phase, while at 72 hours sub-G0 cell population increased. ATRA-CIS-PACLI arrested cells in S-phase at 24 and 72 hours, in contrast, at 48 and 72 hours increased the sub-G0 population.

Apoptosis

After 24 hours of treatment, we did not find differences in apoptosis between CONTROL, ATRA, CIS and PACLI treatments. However, at this time ATRA-CIS, ATRAPACLI and CIS-PACLI showed almost a two-fold increase in apoptosis ($p=0.033$; $p=0.015$, $p=0.023$). At 48 hours there a two to four-fold increase in apoptosis in almost all groups ($p<0.05$). However, the PACLI treatment showed an increase in both apoptosis and cell necrosis. At 72 hours, the death process by apoptosis continued, however, we also found an increase in necrosis in all groups as compared with controls ($p<0.05$) (Figure 3A, B and C).

RAR and RXR expression after Chemotherapy plus ATRA treatment

RAR and RXR expression were measured by RT-qPCR in NSCLC cells under treatment with CT-ATRA (Figure 4 A, B and C). RAR α expression increased around 2-fold by ATRA alone after 48 and 72 hours while the combinations up-regulated RAR α since 24 hours. RAR β increased expression after 24 hours only in the ATRACIS group and after 48 and 72 hours in ATRA, CISPACLI and ATRA-CIS-PACLI. Overall, treatments containing ATRA up-regulated RAR β except for ATRAPACLI that had no effect on expression. RAR γ levels increased at 24 hours for ATRA-CIS and ATRA-CISPACLI. After 48 hours, all treatments induced a 2-fold increase in RAR γ levels, and this effect was maintained until the end of treatment. Consistently, the ATRA-CIS combination upregulated all three RAR receptors at all times, showing a better induction of these receptors over other treatments. No significant modifications were observed in RXR α , β and γ mRNA levels.

DISCUSSION

Retinoids and their natural or synthetic analogues are closely related to vitamin A, and play major roles in cell growth regulation. They are promising anti-neoplastic agents with therapeutic and chemopreventive effects as they regulate cell growth, differentiation and apoptosis. Retinoids suppress carcinogenesis in a variety of cell types (Clarke et al., 2004; Kim and Kim, 2011), also showing chemopreventive effects in clinical trials of breast cancer, renal cell carcinoma, oral premalignant lesions, bronchial epithelium of chronic smokers, skin premalignant lesions, and cervical cancer (Hansen et al., 2000; Fields et al., 2007).

In this study, we found that combining ATRA with

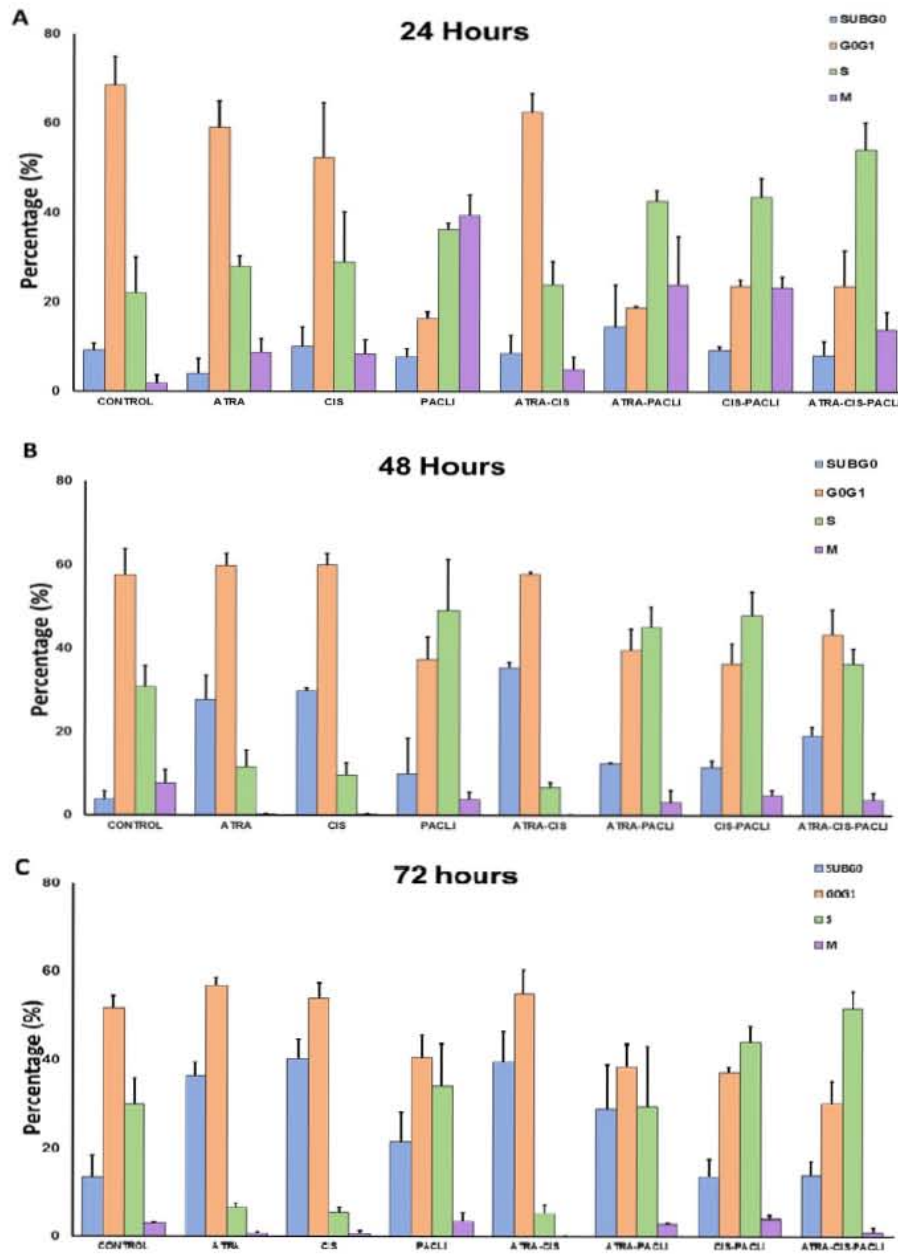


Figure 2. A, B and C Flow cytometry analysis of cell cycle distribution in H1666 cells. Cells were treated with either ATRA, CIS, PACLI or their combinations for 24, 48 and 72 h. At the specified time, they were harvested and stained with PI and analyzed by flow cytometry. Percentages of cells in the G1, S and G2/M phases of cell cycle are indicated.

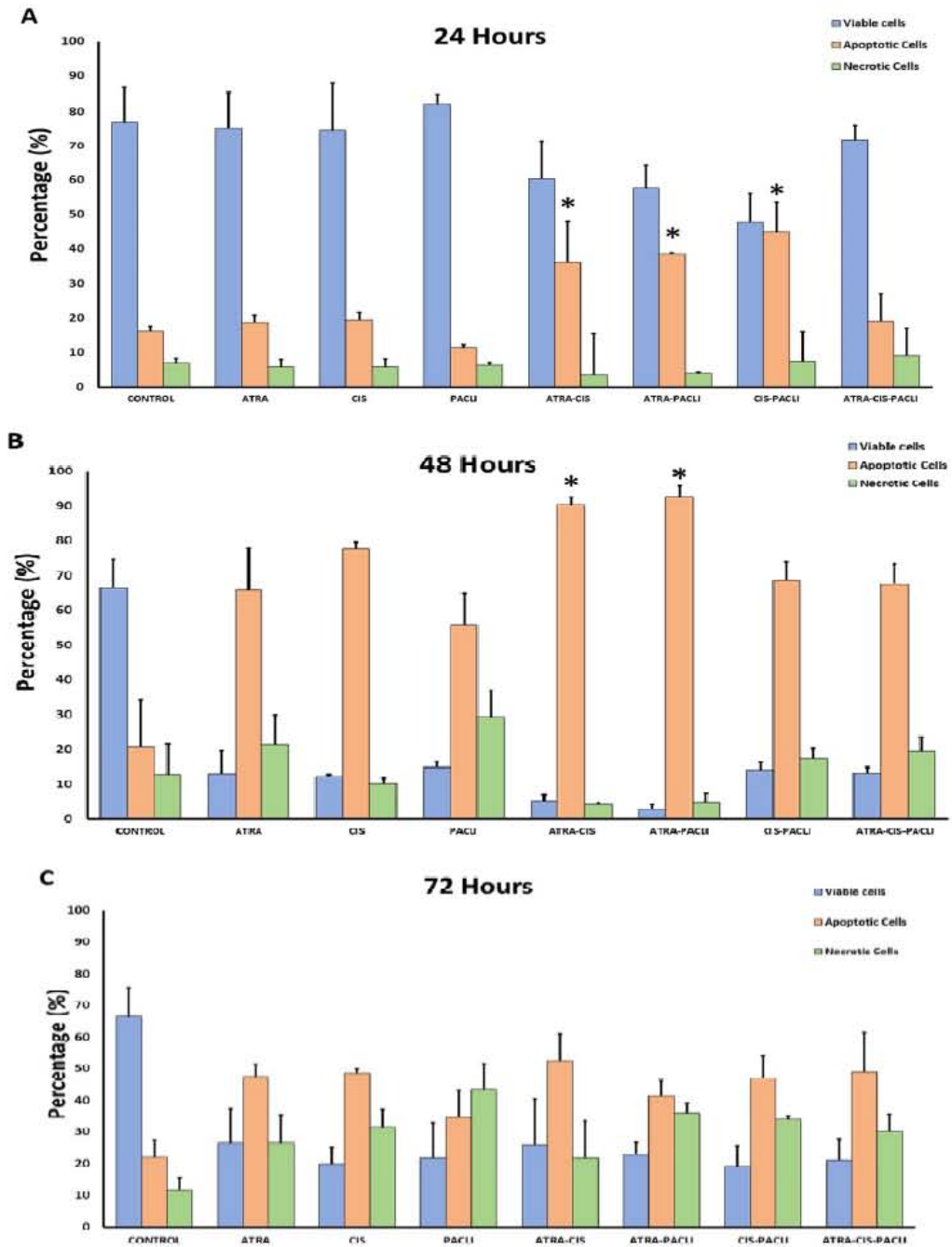


Figure 3. A, B and C Induction of Apoptosis. Apoptosis analysis using Annexin-V-PE/7-AAD double staining. Bar graphs show the percentage of dead, living, and apoptotic cells according to treatment. * $p=0.033$; $p=0.015$ and $p=0.023$ comparing ATRA-CIS, ATRA-PACLI and CIS-PACLI vs. control.

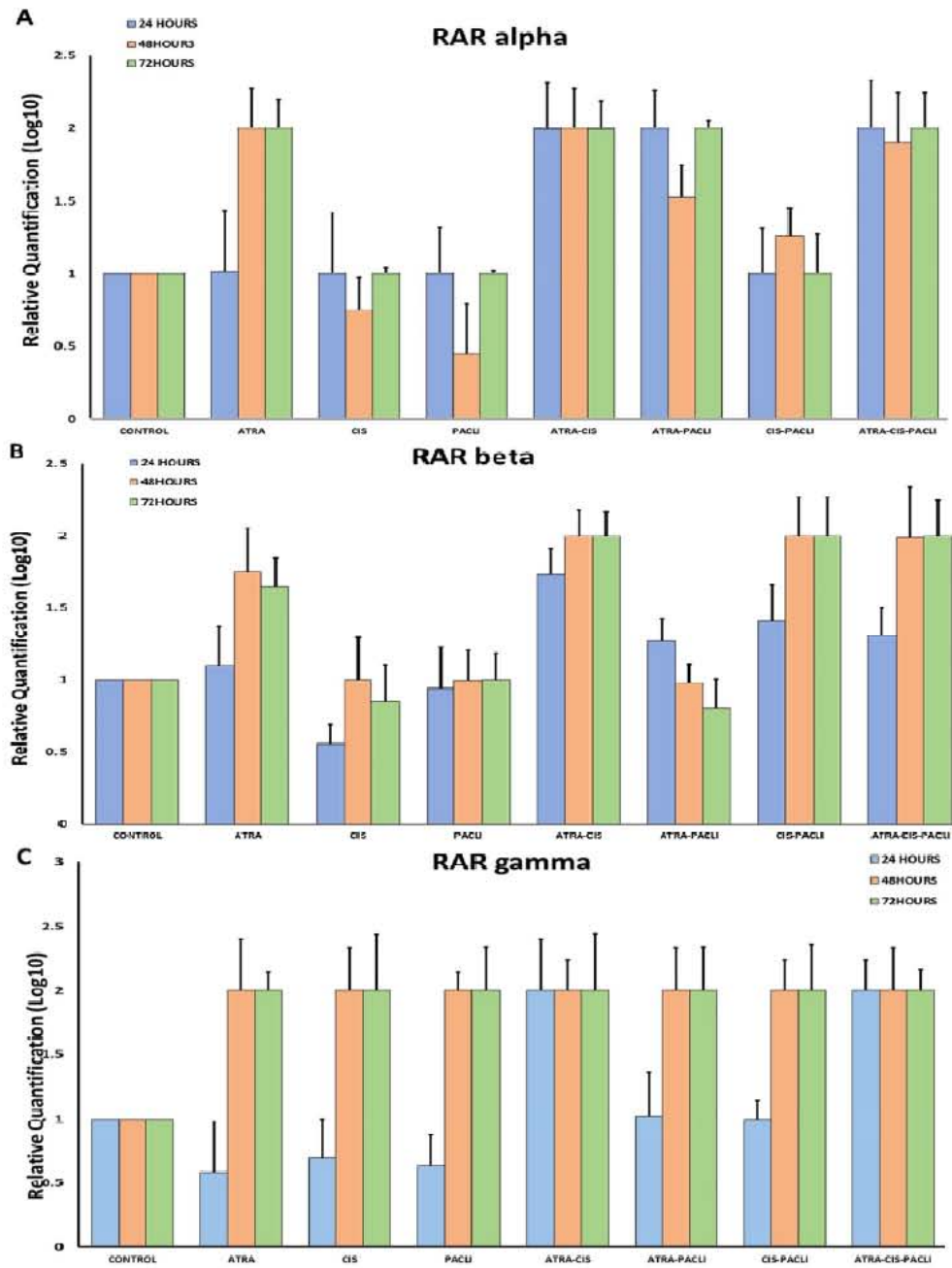


Figure 4. A, B and C Expression of RAR α , β and γ by Real Time PCR. Quantification of RAR- α , β and γ in the H1666 cell line as expressed in logarithm base 10 compared to the expression of RARs in controls. The expression of the receptors was significantly increased in all ATRA-treated groups.

PACLI and CIS inhibited cell growth in the H1666 cell and enhanced antitumor activity when compared to single drug therapy. Also, the combinations ATRA-CIS, ATRAPACLI, CIS-PACLI and ATRA-CIS-PACLI exhibited synergistic effects at 24 hours. Multiple studies have shown synergistic, antiproliferative effects of the ATRAPACLI combination in glioma, lung cancer, breast and colon carcinoma cells, as well as in glioma xenografts in mice (Karmakar et al., 2007; Karmakar et al., 2008; Hong et al., 2011). Besides, ATRA-CIS exerted additive effects in many experimental settings, including ovarian, head and neck, squamous cell carcinoma, cervical and human skin squamous cell carcinoma (Aebi et al., 1997; Masuda et al., 2002).

These observations may be derived from the mechanism of action of each compound. ATRA binds to RARs and modulate transcription of target genes through retinoic acid response elements (RAREs). CIS induces apoptosis by downregulation of Bcl-2 and upregulation of BAX. ATRA alone reduced Bcl-2/BAX ratios after prolonged exposure (Aebi et al., 1997). In the same manner, PACLI and retinoid signaling revealed that synergy is related in part due to phosphorylation of Bcl-2 induced by Paclitaxel (Vivat-Hannah et al., 2001).

Concerning cell cycle, we found the major effects after treatment with PACLI and its combinations. PACLI, ATRA-PACLI, CIS-PACLI and ATRA-CIS-PACLI treatments caused arrest at both, the G2/M-phase and the S-phase. Previous studies have shown that paclitaxel-induced apoptosis blocks lung cancer cells in the G2/M phase (Jordan et al., 1993; Haldar et al., 1997; Noh et al., 2014; Singh and Dash, 2009). Previous studies have shown that PACLI exerts a synergistic effect with ATRA by mitotic arrest of cancer cells in the G2-M phase (Vivat-Hannah et al., 2001).

Additionally, the cell groups treated with ATRA, CIS and ATRA-CIS showed an increase in the sub-G0/G1 population. This is supported by previous studies showing that cells treated with CIS are arrested in the G0/G1 and G2/M phases, accompanied by a Sub-G0/G1 peak (Moreno et al., 2008). CIS is considered a nonspecific cell cycle inhibitor, however, cells in S phase are more sensitive to this drug. CIS induces irreversible cell damage during G2 phase leading to apoptosis (Evans et al., 1994; Gonzalez et al., 2001; Wagner and Karnitz, 2009).

In addition, ATRA arrest in the sub-G0 and decrease phase S in cell cycle. ATRA treatment from 40 nM to 1 μ M causes G0/G1 cell cycle arrest through inhibit ERK1 expression, also decrease Rb phosphorylation, and increase Rb/E2F-1 association in gastrointestinal cancer stem cells (Crowe et al., 2003). In pancreatic carcinoma ATRA alone arrested cells in the G1 or G2 phase reducing the population at S-phase after 24 hours followed by apoptosis in sub-G0/G1 cells for a full inhibition of proliferation (el-Metwally et al., 2005). Previous reports have indicated that ATRA blocks cell

growth, arresting cells in the pre-S phase; making cells exit the cell cycle either into a G0 quiescent state or to cell death via apoptosis (Mangiarotti et al., 1998).

Concerning apoptosis, the combination of ATRA plus CIS or PACLI induced cell death more efficiently than either drug alone. The combination with ATRA enhances the cytotoxicity of CIS in ovarian carcinoma and in squamous head and neck cancer cells (Aebi et al., 1997; Jozan et al., 2002). Induction of apoptosis has been related to the expression of RARs in human breast cancer cells (Liu et al., 1996). The combination of ATRA-PACLI is able to down-regulate hTERT and inactivate Bcl-2, promoting apoptosis in U87MG glioma cells (Karmakar et al., 2008). Also, selective retinoid α/β in combination with Taxol shown a synergistic effect through apoptosis induction in MCF7 (Vivat-Hannah et al., 2001). The cytotoxic effect of ATRA on cell growth and induction of apoptosis involves specific binding and activation of retinoic acid receptor such as RAR α , β , γ (De Luca, 1991).

In lung cancer the expression patterns of RAR and RXR play an important role in prognosis, progression, survival, and lack of response to therapy (Xu et al., 1997). Our study shows that ATRA treatment participates in the induction of RARs. RAR α increases at 24 hours in all groups that received ATRA treatment. RAR α deregulation participates in the development of acute promyelocytic leukemia (Pandolfi, 2001) and human breast carcinoma (Farias et al., 2002). It has been suggested that ATRA mediates this antitumor activity through activation of RAR α , encoded by the RAR α gene (Simeone and Tari, 2004). Likewise, RAR α up-regulates RAR β levels through binding to RAREs on the RAR β promoter (Khuri et al., 2000; Leroy et al., 1991).

We found increased RAR β levels in cells treated with ATRA. RAR β is the most studied tumor suppressor gene whose loss of expression and methylation is associated with the pathogenesis of lung cancer (Brabender et al., 2005; Virmani et al., 2000). In lung, breast and prostate tumors, RAR β is lost or down-regulated through inconstant promoter hyper-methylation, without gene deletion or mutation (Hayashi et al., 2001; Martinet et al., 2000; Wakelee et al., 2007). Other studies have shown that up-regulation of RAR β by ATRA correlates with growth inhibition in human breast cancer and lung cancer cells (Peng et al., 2011). Furthermore, in ATRA-sensitive lung and breast cancer cell lines RAR β is induced by ATRA (Liu et al., 1996; Zhang et al., 1996). In lung cancer, hyper-methylation of RAR β is associated with recurrence, in advanced stages of NSCLC (Kim et al., 2005; Tomizawa et al., 2004). Previously, we showed that the addition of ATRA to CT increases PFS and RR in lung cancer, and this effect was related to RAR β levels (Arrieta et al., 2011).

In a similar manner, we found that RAR γ increased under ATRA treatment, and this effect was maintained up to 72 hours. RAR γ plays a role in differentiation,

proliferation and apoptosis in many different cell types and cell microenvironments, also maintaining a balance Published by Basic Research Journal of Medicine and Clinical Science between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation (Kumar et al., 2004; Yan et al., 2010). RAR γ expression is lost in skin cancer and in some premalignant lesions (Finzi et al., 1992). Recently, high levels of RAR γ have been associated with oncogenesis in hepatocellular carcinoma (Yan et al., 2010). High RAR γ expression is also associated with high cytotoxicity and growth inhibition of head and neck squamous cell carcinoma cells treated with ATRA (Klaassen et al., 2001).

CONCLUSION

The combination of ATRA with CIS or PACLI enhances the antiproliferative and antiapoptotic effect in lung cancer cells and induces the expression of RARs but not RXRs. Synergistic effects are more evident when using a combining ATRA with CIS or PACLI.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of Norma Hernández-Pedro of Programa de Doctorado en Ciencias Biomedicas de la Facultad de Medicina at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), with a doctoral fellowship provided by CONACyT-México (grant no. 389552).

REFERENCES

- Aebi S, Kroning R, Cenni B, Sharma A, Fink D, Los G, Weisman R, Howell SB, Christen RD (1997). all-trans retinoic acid enhances cisplatin-induced apoptosis in human ovarian adenocarcinoma and in squamous head and neck cancer cells, *Clinical cancer research: an official Journal of the American Association for Cancer Research*, 3 2033-2038.
- Altucci L, Rossin A, Raffelsberger W, Reitmair A, Chomienne C, Gronemeyer H (2001). Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL, *Nature medicine*, 7 680-686.
- Arrieta O, Guzman-de Alba E, Alba-Lopez LF, Acosta-Espinoza A, Alatorre-Alexander J, Alexander-Meza JF, Allende-Perez SR, Alvarado-Aguilar S, Araujo-Navarrete ME, Argote-Greene LM, Aquino-Mendoza CA, Astorga-Ramos AM, Austudillo-de la Vega H, Aviles-Salas A, Barajas-Figueroa LJ, Barroso-Quiroga N, Blake-Cerda M, Cabrera-Galeana PA, Calderillo-Ruiz G, Campos-Parra AD, Cano-Valdez AM, Capdeville-Garcia D, Castillo-Ortega G, Casillas-Suarez C, Castillo-Gonzalez P, Corona-Cruz JF, Correa-Acevedo ME, Cortez-Ramirez SS, de la Cruz-Vargas JA, de la Garza-Salazar JG, de la Mata-Moya MD, Dominguez-Flores ME, Dominguez-Malagon HR, Dominguez-Parra LM, Dominguez-Peregrina A, Duran-Alcocer J, Enriquez-Aceves MI, Elizondo-Rios A, Escobedo-Sanchez MD, de Villafranca PE, Flores-Cantisani A, Flores-Gutierrez JP, Franco-Marina F, Franco-Gonzalez EE, Franco-Topete RA, Fuentes-de la Pena H, Galicia-Amor S, Gallardo-Rincon D, Gamboa-Dominguez A, Garcia-Andreu J, Garcia-Cuellar CM, Garcia-Sancho-Figueroa MC, Garcia-Torrentera R, Gerson-Cwilich R, Gomez-Gonzalez A, Green-Schneeweiss L, Guillen-Nunez MdelR, Gutierrez-Velazquez H, Ibarra-Perez C, Jimenez-Fuentes E, Juarez-Sanchez P, Juarez-Ramiro A, Kelly-Garcia J, Kuri-Exsome R, Lazaro-Leon JM, Leon-Rodriguez E, Llanos-Osuna S, Llanos-Osuna S, Loyola-Garcia U, Lopez-Gonzalez JS, Lopez y de Antunano FJ, Loustaunau-Andrade MA, Macedo-Perez EO, Machado-Villarreal L, Magallanes-Maciell M, Martinez-Barrera L, Martinez-Cedillo J, Martinez-Martinez G, Medina-Esparza A, Meneses-Garcia A, Mohar-Betancourt A, Morales Blanhir J, Morales-Gomez J, Motola-Kuba D, Najera-Cruz MP, Nunez-Valencia Cdel C, Ocampo-Ocampo MA, Ochoa-Vazquez MD, Olivares-Torres CA, Palomar-Lever A, Patino-Zarco M, Perez-Padilla R, Pena-Alonso YR, Perez-Romo AR, Aquilino Perez M, Pinaya-Ruiz PM, Pointevin-Chacon MA, Poot-Braga JJ, Posadas-Valay R, Ramirez-Marquez M, Reyes-Martinez I, Robledo-Pascual J, Rodriguez-Cid J, Rojas-Marin CE, Romero-Bielma E, Rubio-Gutierrez JE, Saenz-Frias JA, Salazar-Lezama MA, Sanchez-Lara K, Sansores MR, Santillan-Doherty P, Alejandro-Silva J, Tellez-Becerra JL, Toledo-Buenrostro V, Torre-Bouscoulet L, Torrecillas-Torres L, Torres M, Tovar-Guzman V, Turcott-Chaparro JG, Vazquez-Cortes JJ, Vazquez-Manriquez ME, Vilches-Cisneros N, Villegas-Elizondo JF, Zamboni MM, Zamora-Moreno J, Zinser-Sierra JW (2013) [National consensus of diagnosis and treatment of non-small cell lung cancer], *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*, 65 Suppl 1 5-84.
- Arrieta O, Hernandez-Pedro N, Fernandez-Gonzalez-Aragon MC, Saavedra-Perez D, Campos-Parra AD, Rios-Trejo MA, Ceron-Lizarraga T, Martinez-Barrera L, Pineda B, Ordóñez G, Ortiz-Plata A, Granados-Soto V, Sotelo J (2011). Retinoic acid reduces chemotherapy-induced neuropathy in an animal model and patients with lung cancer, *Neurology*, 77 987-995.
- Bogos K, Renyi-Vamos F, Kovacs G, Tovari J, Dome B (2008). Role of retinoic receptors in lung carcinogenesis, *J. Exp. Clin. Cancer. Res.* 27 Pp18.
- Brabender J, Metzger R, Salonga D, Danenberg KD, Danenberg PV, Holscher AH, Schneider PM (2005). Comprehensive expression analysis of retinoic acid receptors and retinoid X receptors in nonsmall cell lung cancer: implications for tumor development and prognosis, *Carcinogenesis*, 26 525-530.
- Chou TC (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies, *Pharmacol Rev*, 58 621-681.
- Chou TC (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method, *Cancer Res*, 70 440-446.
- Chou TC, Talalay P (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors, *Advances in enzyme regulation*, 22 27-55.
- Clarke N, Germain P, Altucci L, Gronemeyer H (2004). Retinoids: potential in cancer prevention and therapy, *Expert reviews in molecular medicine*, 6 1-23.
- Crowe DL, Kim R, Chandraratna RA (2003). Retinoic acid differentially regulates cancer cell proliferation via dose-dependent modulation of the mitogen-activated protein kinase pathway, *Molecular cancer research: MCR*, 1 532-540.
- De Luca LM (1991). Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia, *FASEB J*, 5 2924-2933.
- Edelman MJ, Smith R, Hausner P, Doyle LA, Kalra K, Kendall J, Bedor M, Bisaccia S (2005). 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.
- el-Metwally TH, Hussein MR, Pour PM, Kuszynski CA, Adrian TE (2005). Natural retinoids inhibit proliferation and induce apoptosis in pancreatic cancer cells previously reported to be retinoid resistant, *Cancer biology and therapy*, 4 474-483.
- Evans DL, Tilby M, Dive C (1994). Differential sensitivity to the induction of apoptosis by cisplatin in proliferating and quiescent immature rat thymocytes is independent of the levels of drug accumulation and DNA adduct formation, *Cancer Res*, 54 1596-1603.
- Farias EF, Arapshian A, Bleiweiss IJ, Waxman S, Zelent A, Mira YLR (2002). Retinoic acid receptor alpha2 is a growth suppressor epigenetically silenced in MCF-7 human breast cancer cells, *Cell*

- Growth Differ, 13 335-341.
- Fields AL, Soprano DR, Soprano KJ (2007). Retinoids in biological control and cancer, *J. Cellular Biochem.* 102 886-898.
- Finzi E, Blake MJ, Celano P, Skouge J, Diwan R (1992). Cellular localization of retinoic acid receptor-gamma expression in normal and neoplastic skin, *The Ame. J. Pathol.* 140 1463-1471.
- Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM (2001). Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis?, *Molecular pharmacology*, 59 657-663.
- Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, Kennedy C, Krasnik M, Sobin LH, Goldstraw P (2007). The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours, *J Thorac Oncol*, 2 694-705.
- Haldar S, Basu A, Croce CM (1997). Bcl2 is the guardian of microtubule integrity, *Cancer Res*, 57 229-233.
- Hansen LA, Sigman CC, Andreola F, Ross SA, Kelloff GJ, De Luca LM (2000). Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy, *Carcinogenesis*, 21 1271-1279.
- Hayashi K, Yokozaki H, Goodison S, Oue N, Suzuki T, Lotan R, Yasui W, Tahara E (2001). Inactivation of retinoic acid receptor beta by promoter CpG hypermethylation in gastric cancer, *Differentiation*, 68 13-21.
- Hong GY, Jeong YI, Lee SJ, Lee E, Oh JS, Lee HC (2011). Combination of paclitaxel- and retinoic acid-incorporated nanoparticles for the treatment of CT-26 colon carcinoma, *Archives of pharmacol research*, 34 407-417.
- Hong WK, Lippman SM, Itri LM, Karp DD, Lee JS, Byers RM, Schantz SP, Kramer AM, Lotan R, Peters LJ (1990). Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck, *N Engl. J. Med.* 323 795-801.
- Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM (2010). Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19 1893-1907.
- Jordan MA, Toso RJ, Thrower D, Wilson L (1993). Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 9552-9556.
- Jozan S, Paute S, Courtade-Saidi M, Julie S, Vidal S, Bugat R, Valette A (2002). All trans retinoic acid enhances CDDP-induced apoptosis: modulation of the CDDP effect on cell cycle progression, *Intern. J. Oncol.* 20 1289-1295.
- Karamouzis MV, Papavassiliou AG (2005). Retinoid receptor cross-talk in respiratory epithelium cancer chemoprevention, *Trends in molecular medicine*, 11 10-16.
- Karmakar S, Banik NL, Patel SJ, Ray SK (2007). Combination of alltrans retinoic acid and taxol regressed glioblastoma T98G xenografts in nude mice, *Apoptosis*, 12 2077-2087.
- Karmakar S, Banik NL, Ray SK (2008). Combination of all-trans retinoic acid and paclitaxel-induced differentiation and apoptosis in human glioblastoma U87MG xenografts in nude mice, *Cancer*, 112 596-607.
- Khuri FR, Lotan R (2004). Retinoids in lung cancer: friend, foe, or fellow traveler?, *J. Clin. Oncol.* 22 3435-3437.
- Khuri FR, Lotan R, Kemp BL, Lippman SM, Wu H, Feng L, Lee JJ, Cooksley CS, Parr B, Chang E, Walsh GL, Lee JS, Hong WK, Xu XC (2000). Retinoic acid receptor-beta as a prognostic indicator in stage I non-small-cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.* 18 2798-2804.
- Kim J, Kim Y (2011). Animal models in carotenoids research and lung cancer prevention, *Transl Oncol*, 4 271-281.
- Kim YT, Lee SH, Sung SW, Kim JH (2005). Can aberrant promoter hypermethylation of CpG islands predict the clinical outcome of nonsmall cell lung cancer after curative resection?, *The Annals of thoracic surgery*, 79 1180-1188; discussion 1180-1188.
- Klaassen I, Brakenhoff RH, Smeets SJ, Snow GB, Braakhuis BJ (2001). Expression of retinoic acid receptor gamma correlates with retinoic acid sensitivity and metabolism in head and neck squamous cell carcinoma cell lines, *Int. J. Cancer*, 92 661-665.
- Kumar A, Kaur J, Chattopadhyay TK, Mathur M, Ralhan R (2004). Differential expression of retinoic acid receptors in normal and malignant esophageal tissues, *Journal of experimental therapeutics and oncology*, 4 1-8.
- Leroy P, Krust A, Zelent A, Mendelsohn C, Garnier JM, Kastner P, Dierich A, Chambon P (1991). Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor alpha are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid, *The EMBO journal*, 10 59-69.
- Liu Y, Lee MO, Wang HG, Li Y, Hashimoto Y, Klaus M, Reed JC, Zhang X (1996). Retinoic acid receptor beta mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells, *Mol Cell Biol*, 16 1138-1149.
- Mangiarotti R, Danova M, Alberici R, Pellicciari C (1998). All-trans retinoic acid (ATRA)-induced apoptosis is preceded by G1 arrest in human MCF-7 breast cancer cells, *Bri. J. Cancer*, 77 186-191.
- Martinet N, Alla F, Farre G, Labib T, Drouot H, Vidili R, Picard E, Gaube MP, Le Faou D, Siat J, Borely J, Vermeylen P, Bazarbachi T, Vignaud JM, Martinet Y (2000). Retinoic acid receptor and retinoid X receptor alterations in lung cancer precursor lesions, *Cancer Res*, 60 2869-2875.
- Masuda M, Toh S, Koike K, Kuratomi Y, Suzui M, Deguchi A, Komiya S, Weinstein IB (2002). The roles of JNK1 and Stat3 in the response of head and neck cancer cell lines to combined treatment with all-trans-retinoic acid and 5-fluorouracil, *Japanese J. Canc. Res. Gann*, 93 329-339.
- Moreno D, de Iarduya CT, Bandres E, Bunuales M, Azcona M, Garcia-Foncillas J, Garrido MJ (2008). Characterization of cisplatin cytotoxicity delivered from PLGA-systems, *Europ. J. Pharm. Biopharm. official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 68 503-512.
- Noh HJ, Kim KA, Kim KC (2014). p53 down-regulates SETDB1 gene expression during paclitaxel induced-cell death, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446 43-48.
- Pandolfi PP (2001). Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia, *Hum Mol Genet*, 10 769-775.
- Pastorino U (1997). beta-Carotene and the risk of lung cancer, *J Natl Cancer Inst*, 89 456-457; author reply 457-458.
- Peng X, Green A, Shilkaitis A, Zhu Y, Bratescu L, Christov K (2011). Early in vitro passages of breast cancer cells are differentially susceptible to retinoids and differentially express RARbeta isoforms, *Intern. J. Oncol.* 39 577-583.
- Pietra G, Mortarini R, Parmiani G, Anichini A (2001). Phases of apoptosis of melanoma cells, but not of normal melanocytes, differently affect maturation of myeloid dendritic cells, *Cancer Res*, 61 8218-8226.
- Scagliotti GV, De Marinis F, Rinaldi M, Crino L, Gridelli C, Ricci S, Matano E, Boni C, Marangolo M, Failla G, Altavilla G, Adamo V, Ceribelli A, Clerici M, Di Costanzo F, Frontini L, Tonato M (2002). Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.* 20 4285-4291.
- Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, Zhu J, Johnson DH (2002). Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer, *N Engl. J. Med.* 346 92-98.
- Simeone AM, Tari AM (2004). How retinoids regulate breast cancer cell proliferation and apoptosis, *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 61 1475-1484.
- Singh S, Dash AK (2009). Paclitaxel in cancer treatment: perspectives and prospects of its delivery challenges, *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 26 333-372.
- Tomizawa Y, Iijima H, Nomoto T, Iwasaki Y, Otani Y, Tsuchiya S, Saito R, Dobashi K, Nakajima T, Mori M (2004). Clinicopathological significance of aberrant methylation of RARbeta2 at 3p24, RASSF1A at 3p21.3, and FHIT at 3p14.2 in patients with non-small cell lung cancer, *Lung Cancer*, 46 305-312.
- Tyagi P (2005). Bexarotene in combination with chemotherapy fails to prolong survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer: results from the SPIRIT I and II trials, *Clin Lung Cancer*, 7 17-19.
- Virmani AK, Rathi A, Zochbauer-Muller S, Sacchi N, Fukuyama Y, Bryant D, Maitra A, Heda S, Fong KM, Thunnissen F, Minna JD, Gazdar AF (2000). Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas, *J Natl Cancer Inst*, 92 1303-1307.
- Vivat-Hannah V, You D, Rizzo C, Daris JP, Lapointe P, Zusi FC, Marinier A, Lorenzi MV, Gottardis MM (2001). Synergistic cytotoxicity exhibited by combination treatment of selective retinoid ligands with taxol (Paclitaxel), *Cancer Res*, 61 8703-8711.

- Wagner JM, Karnitz LM (2009). Cisplatin-induced DNA damage activates replication checkpoint signaling components that differentially affect tumor cell survival, *Molecular pharmacology*, 76 208-214.
- Wakelee HA, Chang ET, Gomez SL, Keegan TH, Feskanich D, Clarke CA, Holmberg L, Yong LC, Kolonel LN, Gould MK, West DW (2007). Lung cancer incidence in never smokers, *J. Clin. Oncol.* 25 472-478.
- Xu XC, Ro JY, Lee JS, Shin DM, Hong WK, Lotan R (1994). Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal, premalignant, and malignant head and neck tissues, *Cancer Res*, 54 3580-3587.
- Xu XC, Sozzi G, Lee JS, Lee JJ, Pastorino U, Pilotti S, Kurie JM, Hong WK, Lotan R (1997). Suppression of retinoic acid receptor beta in non-small-cell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development, *J. Natl. Cancer Inst.* 89 624-629.
- Yan TD, Wu H, Zhang HP, Lu N, Ye P, Yu FH, Zhou H, Li WG, Cao X, Lin YY, He JY, Gao WW, Zhao Y, Xie L, Chen JB, Zhang XK, Zeng JZ (2010). Oncogenic potential of retinoic acid receptor-gamma in hepatocellular carcinoma, *Cancer Res*, 70 2285-2295.
- Zhang XK, Liu Y, Lee MO (1996). Retinoid receptors in human lung cancer and breast cancer, *Mutation research*, 350 267-277.
- Zhelyaznik N, Mey J (2006). Regulation of retinoic acid receptors alpha, beta and retinoid X receptor alpha after sciatic nerve injury, *Neuroscience*, 141 1761-1774.