

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

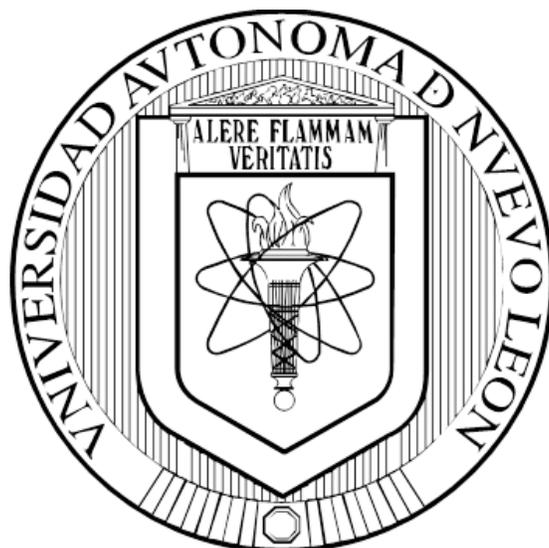
**EXPRESIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA 1 β Y SU EFECTO
SOBRE LA VIABILIDAD DE LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER
PULMONAR A549**

POR
JESÚS BALDOMERO VIZCARRA VALDÉS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

Agosto, 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



TESIS

**EXPRESIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA 1 β Y SU EFECTO
SOBRE LA VIABILIDAD DE LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER
PULMONAR A549**

POR
IBT. JESÚS BALDOMERO VIZCARRA VALDÉS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

Agosto, 2016

**“EXPRESIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA 1 β Y SU EFECTO SOBRE
LA VIABILIDAD DE LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER PULMONAR A549”**

Comité de Tesis

Dra. Ana Carolina Martínez Torres
Director de Tesis

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretaria

Dra. Diana Reséndez Pérez
Vocal 1

Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal 2

Dra. Laura Trejo Ávila
Vocal 3

**EXPRESIÓN DE ALCOHOL DESHIDROGENASA 1 β Y SU EFECTO SOBRE
LA VIABILIDAD DE LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER PULMONAR A549**

DIRECCIÓN DE TESIS

Dra. Ana Carolina Martínez Torres
Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Inmunología y Virología y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico e infraestructura brindados para la realización de esta tesis y para mi manutención.

Agradezco a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por abrirme las puertas y aceptarme en su equipo de trabajo, así como por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo de investigación.

A la Dra. Ana Carolina Martínez Torres por su apoyo incesable desde el comienzo hasta el final, por ser una parte fundamental en mi aprendizaje tanto académico como profesional y por depositar su confianza en mí. Je ne t'oublierai pas.

También agradezco a mi comité de tesis, al Dr. Pablo Zapata Benavides por su tiempo, amistad y disposición; a la Dra. Laura Trejo Ávila, por su atención y consejo y a la Dra. Diana Reséndez Pérez por su apoyo y acertadas observaciones.

Agradezco el apoyo de mis amigos y familia en la ciudad de Mazatlán, José Carlos, Damián, Roberto, Gilberto, Mario, Jonathan, Abuelos Tino y Meli, Chita y José, a mis Tíos Guillermo, Fidel & Lupita, Judith, Francisco, René, María Luz, Arnoldo y Óscar. A mis compañeros y amigos del Laboratorio 14, Luis Gómez, William, Martín, Milena, Myrna, Zugeysi, Carolina, Alan, Alejandra; del Laboratorio 5 y otros, David Corro, Daniela, Karina, Santiago, Felipe, Mariela, Zacarías, Ashanti, Edgar, Dr. Moisés, Erika, Carmen.

Gracias a mi compañera de vida Daniela Arriaga Hernández, por su grande amor y compañía en los momentos más difíciles. Vielen Dank für die besten Tage meines Lebens. Te amo.

DEDICATORIA

A mi madre, Concepción Valdés Lizárraga, por su grande amor y cariño.

A mi padre, Baldomero Vizcarra Valdés, por su sabio consejo y grande ejemplo.

A mi hermano, Javier Vizcarra Valdés, por su contagiosa alegría y fuerte espíritu.

Agradezco a Dios, por el asombroso regalo de la vida y la existencia.

ÍNDICE

1	ABSTRACT	1
2	INTRODUCCIÓN	3
3	ANTECEDENTES	4
3.1	Sellos Distintivos del Cáncer.....	4
3.2	Autosuficiencia de Señales de Crecimiento.....	6
3.3	Insensibilidad a Señales Anti-Crecimiento.....	10
3.4	Evasión de Apoptosis.....	12
3.5	Potencial de Replicación Ilimitada.....	13
3.6	Metabolismo Energético Alterado del Cáncer y Especies Reactivas de Oxígeno....	14
3.7	Alcohol Deshidrogenasa.....	18
3.8	Alcohol Deshidrogenasa en el Metabolismo de la Vitamina A.....	21
3.9	Cáncer Pulmonar.....	24
3.10	Alteraciones Moleculares del Cáncer Pulmonar.....	26
3.11	Alcohol Deshidrogenasa y su Relación con el Cáncer.....	28
3.12	Ácido Retinoico y su Relación con el Cáncer Pulmonar.....	31
4	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	39
5	JUSTIFICACIÓN	40
6	HIPÓTESIS	41
7	OBJETIVO	42
	Objetivos Específicos.....	42

8	MATERIALES Y MÉTODOS	43
8.1	Cultivo Celular.....	43
8.2	Expresión de la Proteína ADH1 β mediante Análisis de Western Blot.....	43
8.3	Transfección de la Línea Celular A549 con el Vector pCMV6-ADH1 β	44
8.4	Análisis de Viabilidad (MTT) de las Células A549 Transfectadas con pCMV6-ADH1 β	46
8.5	Análisis del Efecto sobre la Muerte Celular de las Células A549 Transfectadas con pCMV6-ADH1 β mediante el Ensayo de Annexina V.	47
8.6	Análisis del Efecto sobre la Producción de ROS de las Células A549 Transfectadas con pCMV6-ADH1 β mediante el Ensayo de DCFDA.	48
8.7	Análisis Estadístico.....	49
9	RESULTADOS	50
9.1	La Proteína ADH1 β está Sub Expresada en la Línea Celular A549.....	50
9.2	ADH1 β es Expresada en la Línea Celular A549 Transfectada con el Vector pCMV6-ADH1 β	51
9.3	La Expresión Exógena de ADH1 β Reduce la Capacidad Metabólica de la Línea Celular A549 Transfectada con pCMV6-ADH1 β	58
9.4	La Expresión Exógena de ADH1 β Aumenta la Producción de Especies Reactivas de Oxígeno de la Línea Celular A549 Transfectada con pCMV6-ADH1 β	59
9.5	La Expresión Exógena de ADH1 β Aumenta la Exposición de Fosfatidil Serina de la Línea Celular A549 Transfectada con pCMV6-ADH1 β	61
10	DISCUSIÓN	63
11	CONCLUSIONES	68
12	BIBLIOGRAFÍA	69

Índice de Abreviaturas

µg	Microgramos
µL	Microlitros
mM	Milimolar
ADH1 β	Alcohol deshidrogenasa 1 β
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CRABP	Proteína de unión a ácido retinoico celular
DMEM	Medio Esencial Mínimo Modificado por Dulbecco
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
DMSO	Dimetil Sulfóxido
NSCLC	Carcinoma pulmonar de células no pequeñas (Non Small Cell Lung Cancer)
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón de fosfatos salino
RA	Ácido Retinoico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
RARE	Elementos de Respuesta de Ácido Retinoico
RXR	Receptores X de Retinoides
RAR	Receptor de Ácido Retinoico
SFB	Suero fetal bovino
SCLC	Carcinoma Pulmonar de Células Pequeñas (Small Cell Lung Cancer)
SDS	Dodecilsulfato Sódico
TBS-T	Tampón de Tris salino y tween-20
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

Índice de Figuras

Figura 1. Sellos distintivos del Cáncer.....	5
Figura 2. Dos diferentes puntos de vista sobre la biología del cáncer.....	9
Figura 3. Relación entre los niveles de ROS y la consecuencia biológica que estos provocan a la célula de cáncer.....	17
Figura 4. Alcohol deshidrogenasa cataliza la oxidación reversible de etanol a acetaldehído.....	18
Figura 5. Posiciones relativas de los siete genes de alcohol deshidrogenasas humanas (ADH) en el brazo largo del cromosoma 4.....	19
Figura 6. Ruta Metabólica del Retinol.....	22
Figura 7. Metabolismo y señalización del ácido retinoico.....	24
Figura 8. Tipos de Cáncer Pulmonar.....	25
Figura 9. Alteraciones Moleculares más frecuentes observadas en NSCLC.....	27
Figura 10. Niveles de ácido retinoico en ratones wild type y ratones con genes knockout para Adh1, adh3, adh4.....	34
Figura 11. Análisis RT-PCR de la Expresión de RAR, RXR, TR (thyroid hormone receptor) y ADH3 en tejidos malignos con NSCLC y tejidos normales.....	37
Figura 12. Mapa del Vector pCMV6-ADH1 β	46
Figura 13. Subexpresión de la proteína ADH1B en las células A549.....	50
Figura 14. Análisis densitométrico de la expresión de la proteína ADH1 β en la línea celular A549 y MRC-5.....	51
Figura 15. Expresión de la proteína ADH1B en las células A549 transfectadas.....	52
Figura 16. Análisis densitométrico de la sobreexpresión de la proteína ADH1 β en las células A549 transfectadas.....	53
Figura 17. Morfología de células A549 transfectadas con pCVM6 y pCMV6-ADH1B a las 72 horas.....	54
Figura 18. Evaluación de la fluorescencia emitida por GFP en las células A549 transfectadas.....	55
Figura 19. Evaluación de la fluorescencia emitida por GFP en células A549 transfectadas.....	56

Figura 20. Expresión de las proteínas ADH1B, DDK, CYP2E1 en las células transfectadas.....	57
Figura 21. Evaluación de la viabilidad de las células A549 transfectadas mediante Ensayo de MTT.....	58
Figura 22. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células transfectadas.....	59
Figura 23. Porcentaje de especies Reactivas de oxígeno (ROS) en las células transfectadas.....	60
Figura 24. Determinación de Niveles de Anexina V en células A549 transfectadas. ...	61
Figura 25. Porcentaje de células A549 transfectadas positivas para Anexina V.....	62

Índice de Tablas

Tabla 1. Expresión de RNAm de RAR y RXR en epitelio bronquial normal y en NSCLC.....	36
---	----

1 ABSTRACT

Lung cancer is the type of cancer with the highest mortality rate on global scale and actual against this pathology are still suboptimal. Increasing the knowledge about the most significant molecular alterations that are found in this type of cancer has resulted in better therapies. The ADH1 β (alcohol dehydrogenase) gene has been identified as sub expressed at the RNA level in lung and other types of cancer, nevertheless this condition has not been confirmed at the protein level and the physiopathological role of the ADH1 β enzyme is not clear. In order to confirm its subexpression, the expression level of the protein ADH1 β was evaluated by Western blot on the A549 lung cancer cell line and on the MRC5 normal lung cell line and they were compared. Once the subexpression of ADH1 β at the protein level in A549 cells was confirmed, it was continued to assess whether increased expression of ADH1 β , due to the transfection with the expression vector pCMV6-ADH1 β , could have an impact on the metabolic capacity, reactive oxygen species production and the expression of phosphatidil serine. These parameters were evaluated by a MTT assay, the DCFDA assay and the Annexin V assay respectively on A549 cells that expressed ADH1 β exogenously by being transfected with the expression vector pCMV6-ADH1 β . The results obtained confirm that the A549 cell line has a sub expression of ADH1 β at the protein level when compared with the MRC5 expression of ADH1 β ; the transfected A549 cells that express ADH1 β exogenously show a lower metabolic capacity; a higher reactive oxygen species level and a higher exposition of phosphatidil serine. These results suggest that the exogenous expression of ADH1 β on the A549 cell line induces yet unknown cellular mechanisms that lead to a decrease in relative cell viability of the cells, and also they induce mechanisms of cell death by increasing the exposition of phosphatidil serine on cellular membrane and by increasing the level of reactive oxygen species. This study is the first to show the subexpression of ADH1 β in the A549 lung cancer cell line and to show that the increase in expression plays a role in the biology of lung cancer cells.

RESUMEN

El cáncer pulmonar es el tipo de cáncer con la más alta tasa de mortalidad a nivel mundial y los tratamientos actuales contra esta patología aún son subóptimos. Aumentar el conocimiento sobre las alteraciones moleculares más significativas que se encuentran en este tipo de cáncer ha generado mejores terapias. El gen ADH1 β (Alcohol deshidrogenasa 1 β) ha sido identificado como disminuido a nivel de RNAm en tejido de carcinoma pulmonar y otros tipos de cáncer, sin embargo no se ha confirmado esto a nivel proteína y el papel de la enzima ADH1 β en la fisiopatología del cáncer pulmonar se desconoce. Por lo que para confirmar su subexpresión se evaluó el nivel de expresión de la proteína ADH1 β mediante Western blot en la línea celular de carcinoma pulmonar A549 y se comparó con la expresión de ADH1 β de la línea celular normal pulmonar MRC5. Una vez que se confirmó la baja expresión a nivel proteína de ADH1 β en la línea celular A549, se prosiguió a evaluar si el aumento de su expresión podría impactar en el metabolismo, viabilidad, y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) de las células A549 con una mayor expresión de ADH1 β , debido a su transfección con el vector pCMV6-ADH1 β . Para ello se evaluó su capacidad metabólica utilizando un ensayo de MTT; posteriormente se evaluó la producción de ROS mediante el ensayo de DCFDA, y finalmente con el ensayo de Anexina V se evaluó la exposición de fosfatidil serina. Los resultados obtenidos indican que la línea A549 tiene una sub expresión a nivel proteína de la enzima ADH1 β en comparación a la línea MRC5; las células A549 transfectadas con el vector pCMV6-ADH1 β que expresan ADH1 β exógenamente exhiben una capacidad metabólica disminuida; un nivel aumentado de ROS y de células con exposición de fosfatidil serina. Estos resultados sugieren que la expresión exógena de ADH1 β en la línea celular A549 induce mecanismos celulares, aún desconocidos, que llevan a una disminución en la viabilidad relativa de las células y que además propician la exposición de la fosfatidil serina en la membrana externa de las células al mismo tiempo que inducen una mayor producción de ROS. Este estudio es el primero en demostrar la subexpresión de ADH1 β en la línea celular de cáncer pulmonar A549 y en demostrar que su aumento tiene un papel en la biología celular de cáncer pulmonar.

2 INTRODUCCIÓN

“Cáncer” es un término para un grupo de enfermedades en las que se presenta un crecimiento celular descontrolado con el potencial de invadir otros tejidos del cuerpo. (NCI, 2014). Dicha patología figura entre las causas líderes de muerte a nivel mundial con un número de 8.2 millones de muertes reportadas en 2012 (Globocan, 2012) y se estima que para el año 2030 aumentarán las muertes hasta alcanzar los 13.1 millones (OMS, 2014). En México, el cáncer es la tercera causa principal de muerte y se estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos (Secretaría de Salud, SPPS, 2013). Existen más de 100 diferentes tipos de cáncer; entre ellos, el cáncer pulmonar es uno de los más comunes en el mundo y presenta una alta tasa de mortalidad con 1.59 millones de muertes en 2012 a nivel mundial (OMS). El Cáncer de Pulmón de Células no pequeñas (NSCLC) es la forma más común de este tipo de cáncer, representando un 80% de los casos (ACS, 2001). Diversas alteraciones moleculares han sido reportadas en el cáncer pulmonar, tal como la sub expresión del RNAm de ADH1 β , el gen codificante para la enzima Alcohol Deshidrogenasa 1 β (Sarah *et al.*, 2012). El papel de esta enzima en el metabolismo de alcoholes como el etanol y el retinol ejerce efectos importantes sobre la homeostasis, diferenciación y proliferación celular; es así cómo una alteración en estos procesos podría contribuir a la transformación y/o proliferación de células tumorales. En esta tesis se realizó un análisis del nivel de expresión de ADH1 β en la línea celular de cáncer pulmonar A549 y, se evaluó el efecto que tiene la expresión exógena de ADH1 β en A549 transfectadas con el vector de expresión pCMV6-ADH1 β sobre la capacidad metabólica, los niveles de especies reactivas de oxígeno y la exposición de la fosfatidil serina. Los resultados obtenidos proporcionan una visión más amplia de la fisiopatología del Cáncer de pulmón y que contribuyan a determinar el papel de ADH1 β en la fisiopatología y carcinogénesis de esta enfermedad, más específicamente en la viabilidad de la línea celular de cáncer pulmonar A549.

3 ANTECEDENTES

3.1 Sellos Distintivos del Cáncer.

Desde los tiempos más antiguos, los médicos han tratado de descifrar las causas del cáncer. Los antiguos Egipcios culpaban del cáncer a los dioses. En 2012, La Agencia Internacional para Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud ha identificado más de 100 carcinógenos químicos, físicos y biológicos. Muchas de estas asociaciones fueron reconocidas antes de que se comprendiera como el cáncer se desarrolla.

El cáncer comienza cuando las células en alguna parte del cuerpo comienzan a crecer fuera de control. El crecimiento de una célula cancerosa es diferente del de una célula normal. En lugar de morir, las células cancerosas continúan creciendo formando nuevas células anormales y pueden invadir otros tejidos. Una célula se vuelve cancerosa debido a lesiones irreparables en el DNA las cuales persisten en la progenie de la célula dañada. Este daño acumulativo y su interacción con el ambiente celular propician la adopción por parte de la célula de características distintivas que culminan en la conversión en célula cancerosa (National Cancer Institute, 2012).

Ya que el cáncer tiene su origen en una célula normal que se transforma, crece, invade el tejido, y finalmente se esparce a través del cuerpo (Hanahan D. & Weinberg R.A., 2000), cada tipo de célula del organismo es capaz de producir un tipo de cáncer diferente, sin embargo, algunos tipos de cáncer se desarrollan de forma más común que otros, por ejemplo los cánceres de pulmón, mama, próstata, y cervicouterino son los tipos más comunes (WHO, 2001). Para que se desarrolle el cáncer deben de existir ciertas alteraciones celulares, entre las que se encuentra la habilidad de la célula cancerosa para evadir apoptosis como respuesta a alteraciones que bloquean las vías de muerte celular (Kaufman *et al.*, 2000). El cáncer se distingue por su invasividad y por su capacidad de generar metástasis, es decir cuando la masa de un tumor primario viaja a través del torrente sanguíneo y

coloniza otros órganos del cuerpo. Las metástasis son además la causa principal de muerte por cáncer en humanos (Hanahan D. & Weinberg R.A., 2000)

Según Hanahan y Weinberg (Hanahan D. & Weinberg R.A., 2000) el cáncer presenta seis capacidades biológicas de la fisiología celular que son adquiridas durante el desarrollo secuencial de los tumores humanos: autosuficiencia de factores de crecimiento, insensibilidad a señales anti crecimiento, evasión de la apoptosis, replicación ilimitada, angiogénesis sostenida, invasividad y metástasis. El progreso conceptual en la última década ha añadido cuatro distintivos emergentes a esta lista: Reprogramación del metabolismo energético, evasión de la destrucción inmune, inestabilidad genómica y la inflamación promotora de tumor (Figura 1).



Figura 1. Sellos Distintivos del Cáncer. Las diferentes capacidades biológicas de la fisiología celular que son adquiridas durante el desarrollo secuencial de los tumores humanos

Adaptado de The Hallmarks of Cancer, Hanahan & Weinberg, 2011.

Los factores de crecimiento son señales que promueven que la célula pueda crecer y dividirse. Su papel en el crecimiento fetal y la reparación de tejido

dañado fue reconocido por primera vez en 1960s (Levi-Montalcini *et al.*, 1960). Después se conoció que las formas anormales o niveles anormalmente altos de factores de crecimiento contribuyen al crecimiento y propagación de las células cancerosas. Las investigaciones se han centrado en comprender cómo las células reconocen y responden a estos factores, y cómo eso puede llevar a cambios en las rutas de señalización intracelulares que resultan en las características anormales observadas en las células cancerosas.

Después de un cuarto de siglo de rápidos avances, la investigación en cáncer ha generado una gran cantidad de conocimiento complejo que revela que el cáncer es una enfermedad multifactorial que involucra cambios dinámicos en el genoma con múltiples pasos y que estos pasos reflejan las alteraciones genéticas que impulsan la transformación progresiva de células normales humanas en derivados altamente malignos. Las observaciones de modelos de cánceres humanos y animales argumentan que el desarrollo tumoral procede de acuerdo a un modelo análogo a la evolución Darwiniana, en la que la sucesión de cambios genéticos, los cuales pueden conferir algún tipo de ventaja de crecimiento, lleva a la conversión progresiva de células humanas normales a células de cáncer.

Las células de cáncer poseen defectos en los circuitos regulatorios que gobiernan la proliferación celular normal y la homeostasis. Es posible obtener una comprensión más acertada de la biología del cáncer cuando se analizan las características más comunes e importantes que una célula de cáncer presenta.

3.2 Autosuficiencia de Señales de Crecimiento.

Las células normales requieren señales de crecimiento antes de que puedan pasar de un estado quiescente hacia un estado proliferativo activado. Estas señales son transmitidas hacia las células por medio de receptores trans membranales que se unen a distintas clases de moléculas de señalización: factores de crecimiento difusibles, componentes de la matriz extracelular, y moléculas de adhesión/interacción célula a célula. Muchos de los oncogenes actúan imitando la señalización normal de crecimiento.

Las células tumorales generan muchas de sus propias señales de crecimiento, reduciendo así su dependencia a la estimulación por parte microambiente tisular normal. La producción de PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas) y TGF α (factor de crecimiento tumoral α) producidas por glioblastomas y sarcomas, respectivamente, son dos ejemplos ilustrativos de este fenómeno (Fedi *et al.*, 1997). Esta liberación de la dependencia en señales exógenas altera un mecanismo homeostático muy importante que normalmente opera para asegurar un comportamiento apropiado de muchos tipos celulares en un tejido.

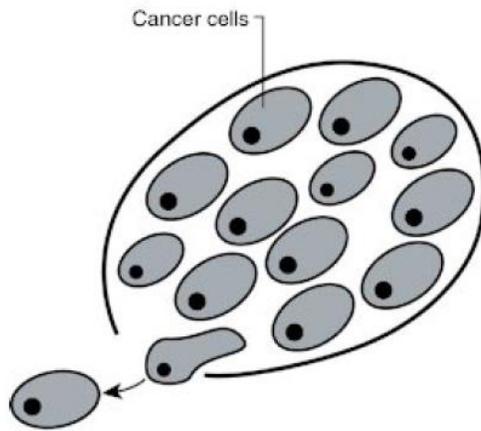
Los receptores celulares que transducen las señales de crecimiento hacia el interior de las células son blancos de desregulación durante la patogénesis tumoral. Usualmente llevan actividad de tirosin cinasa en sus dominios citoplasmáticos, y se encuentran sobre-expresadas en muchos tipos de cáncer. Esta sobre-expresión puede permitir que las células se vuelvan hipersensibles a niveles basales de factor de crecimiento que normalmente no activaría la proliferación. (Fedi *et al.*, 1997). Por ejemplo, EGFR está regulado positivamente en tumores de estómago, cerebro y de mama, mientras que Her2/neu está sobre-expresado en carcinomas mamarios y de estómago. (Slamon 1987; Yarden & Ullrich, 1988). Adicionalmente, la sobre-expresión de receptores de factores de crecimiento puede licitar señalización que es independiente de ligandos. Esto puede ser logrado mediante alteraciones estructurales de los receptores, por ejemplo, versiones truncadas de EGFR que carecen de su dominio citoplasmático se activan constitutivamente. (DiFiore *et al.*, 1987). Las células de cáncer también pueden cambiar los tipos de integrinas que expresan, favoreciendo a los que transmiten señales pro-crecimiento. (Lukashev & Werb, 1998; Giancotti & Ruoslahti, 1999). Estos receptores de superficie que son bifuncionales y heterodiméricos unen físicamente las células a superestructuras extracelulares conocidas como la matriz extracelular. La unión exitosa a fracciones específicas de la matriz extracelular permite que los receptores de integrina transduzcan señales hacia el citoplasma las cuales influyen el comportamiento celular, desde la quiescencia a la motilidad, resistencia a apoptosis, y la entrada en el ciclo celular activo. Por otra parte, la incapacidad de las integrinas de formar

estos enlaces puede deshabilitar la movilidad celular, inducir apoptosis o causar un arresto en el ciclo celular. (Giancotti & Ruoslahti, 1999).

Los mecanismos más complejos de la autosuficiencia de señales de crecimiento se derivan de alteraciones en los componentes del circuito citoplasmático río abajo que recibe y procesa las señales emitidas por receptores de factores de crecimiento e integrinas. La cascada SOS-Ras-Raf-MAPK juega un papel en alrededor del 25% de los tumores humanos, las proteínas Ras están presentes en formas estructuralmente alteradas que permiten que liberen un flujo de señales mitogénicas hacia las células sin la necesidad de estimulación de sus reguladores río arriba. (Medema & Bos, 1993). Por ejemplo, en uno de los tumores mejor estudiados, carcinoma de colon humano, alrededor de la mitad llevan mutaciones en oncogenes Ras. (Kinzler & Vogelstein, 1996).

Esta cascada también está ligada con otras rutas por medio de conexiones cruzadas permiten que las señales extracelulares liciten múltiples efectos biológicos. Por ejemplo, la interacción directa de la proteína Ras con la quinasa PI3 permite señales de crecimiento que evocan señales de sobrevivencia dentro de la célula (Downward *et al.*, 1998). Dentro del tejido normal, las células están grandemente instruidas para crecer por sus vecinos (señales parácrinas) o por señales sistémicas (endócrina). El campo de la investigación en cáncer ha sido principalmente guiado por un enfoque reduccionista en las células de cáncer y en los genes dentro de ellas. Este enfoque ha producido un cuerpo de conocimiento extraordinario. Sin embargo, nuevos enfoques consideran a los tumores como tejidos complejos en los que las células de cáncer han subvertido a células normales para servir como colaboradores activos en su programa neoplásico. Las interacciones entre las células malignas y el microambiente tumoral son críticas para entender la patogénesis del cáncer y para desarrollar terapias nuevas y efectivas. (Figura 2).

The Reductionist View



A Heterotypic Cell Biology

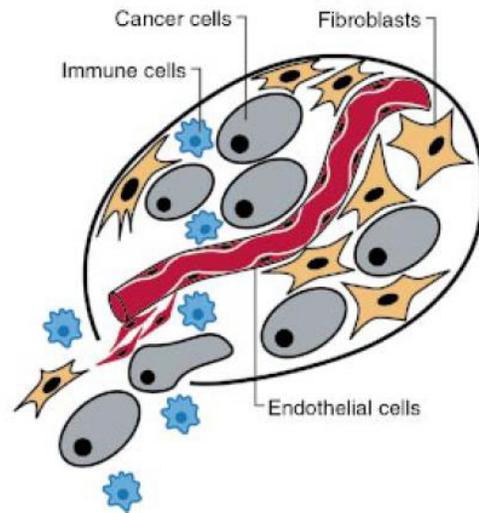


Figura 2. Dos diferentes puntos de vista sobre la biología del cáncer. La perspectiva reductiva postula que las células de cáncer se encuentran solas y la heterotípica postula los tumores como tejidos complejos rodeados de otras células especializadas.

Adaptado de Hallmarks of Cancer, Hanahan & Weinberg, 2000.

La señalización heterotípica entre diversos tipos celulares dentro de un tumor puede ser muy importante en explicar la proliferación de células tumorales así como los mecanismos autónomos que fueron antes mencionados. Por ejemplo, se propone que muchas de las señales de crecimiento que impulsan la proliferación de células de carcinoma se originan de componentes de células estromales de la masa tumoral. Así pues, las células tumorales exitosas son aquellas que han adquirido la habilidad de convencer a sus vecinos normales e inducirlos a liberar un flujo abundante de señales estimuladoras para el crecimiento. (Skobe & Fusenig, 1998). Además, las células inflamatorias que son atraídas a sitios de neoplasia pueden promover (en vez de eliminar) la supervivencia de las células de cáncer (Cordon-Cardo & Prives, 1999; Coussens *et al.*, 1999; Hudson *et al.*, 1999).

La autosuficiencia de señales de crecimiento es una característica imprescindible para una célula cancerosa, sin embargo, existen otras características que contribuyen al cáncer.

3.3 Insensibilidad a Señales Anti-Crecimiento.

Dentro de un tejido normal, operan múltiples señales anti proliferativas que mantienen la quiescencia celular y la homeostasis del tejido; estas señales incluyen inhibidores de crecimientos solubles e inmovilizados, los cuales están incrustados en la matriz extracelular y en la superficie de células cercanas. Las señales anti proliferativas puede bloquear el crecimiento a través de dos distintos mecanismos. Las células pueden ser forzadas fuera del ciclo activo de proliferación hacia un estado quiescente (G0) desde el cual pueden reemerger cuando las señales extracelulares así lo permitan. Alternativamente, las células pueden ser inducidas a renunciar permanentemente a su potencial proliferativo al entrar a un estado post-mitótico.

Las células de cáncer deben evadir estas señales anti proliferativas si quieren prosperar. Muchos de los circuitos que permiten a las células normales responder a señales de anti proliferación están asociados al reloj del ciclo celular, específicamente a los componentes que gobiernan el tránsito de una célula a través de la fase G1 de su ciclo celular.

Al nivel molecular, muchas de las señales anti proliferativas son canalizadas a través de la proteína retinoblastoma (pRb) y sus dos relativos, p107 y p130. Cuando pRb se encuentra en un estado hipofosforilado, esta bloquea la proliferación al secuestrar y alterar la función de factores de transcripción E2F que controlan la expresión de bancos de genes que son esenciales para la progresión de la fase G1 hacia la fase S. (Weinberg *et al.*, 1995). La alteración de la ruta de pRb libera múltiples E2F y entonces permite la proliferación celular, dejando las células insensibles a factores anti proliferativos que normalmente operarían junto con esta ruta para bloquear el avance a través de la fase G1 del ciclo celular. TGF β previene la fosforilación que inactiva pRb, es decir, bloquea el avance a través de G1. Más directamente, TGF β causa la síntesis de las proteínas p15INK4B y p21, las cuales bloquean los complejos ciclina:CDK responsables de la fosforilación de pRb (Hannon & Beach, 1994; Datto *et al.*, 1997).

El circuito de señalización pRb puede ser alterado en una variedad de maneras en diferentes tipos de tumores humanos (Fyran & Reiss, 1993). Algunos pierden la capacidad de respuesta a TGF β al regular negativamente los receptores de TGF β , mientras otros muestran receptores mutantes y disfuncionales. (Fyran & Reiss, 1993; Markowitz *et al.*, 1995). La proteína citoplasmática Smad4, la cual transduce las señales del receptor TGF β hacia blanco río abajo, puede ser eliminada a través de una mutación en su gen codificante. (Schutte *et al.*, 1996). El locus que codifica p15INK4B puede ser eliminado (Chin *et al.*, 1998). CDK4, puede volverse insensible a las acciones inhibitorias de p15INK4B debido a mutaciones que crean sustituciones aminoacídicas en sus dominios de interacción con p15INK4B; el complejo ciclina:CDK resultante está libre para inactivar pRb al hiperfosforilarlo (Zuo *et al.*, 1996). Finalmente, pRb funcional puede ser perdido a través de una mutación en su gen. La conclusión es que el circuito anti proliferativo que converge en Rb y en el ciclo celular, está de alguna manera u otra alterado en la mayoría de los cánceres humanos. La proliferación celular depende de más factores que sólo la evasión de señales anti proliferativas. Nuestro tejido también retiene la multiplicación celular al instruir a las células a entrar irreversiblemente a estados diferenciados y post-mitóticos; es aparente que las células tumorales usan varias estrategias para evadir esta diferenciación terminal.

Una estrategia para evadir esta diferenciación involucra directamente el oncogén c-myc, el cual codifica un factor de transcripción. Durante el desarrollo normal, Myc posee una acción estimulante del crecimiento cuando se encuentra en asociación con el factor Max, sin embargo puede ser suplantado por el factor Mad; los complejos Mad-Max licitan señales de inducción de diferenciación. La sobre expresión de la oncoproteína c-Myc, como se es vista en varios tumores, puede revertir este proceso, cambiando el balance en favor a la formación de complejos Myc-Max, y así inhabilitando la diferenciación y promoviendo el crecimiento.

Además de los cambios en los procesos relacionados a la proliferación, también existen cambios en las señales que controlan la muerte celular regulada.

3.4 Evasión de Apoptosis.

La habilidad de las poblaciones celulares tumorales de expandirse en número no sólo está determinada por la tasa de proliferación sino también por la tasa de erosión celular. La muerte celular programada-apoptosis-representa una fuente principal de esta erosión. Existe mucha evidencia principalmente de estudios en modelos murinos y células en cultivo, así como de análisis a biopsias de carcinoma, de que la resistencia a la apoptosis es un sello distintivo de muchos y quizá todos los tipos de cáncer.

El programa apoptótico está presente de forma latente en todos los tipos de células del cuerpo. Una vez activada por varias señales fisiológicas, las membranas celulares son afectadas, los esqueletos citoplasmáticos y citosólicos son desintegrados, los cromosomas son degradados y el núcleo es fragmentado. Todo esto en un tiempo de 30 a 120 minutos. Al final, los restos celulares son fagocitados por células cercanas en el tejido y desaparecen dentro de 24 horas. (Wyllie *et al.*, 1980).

Existen receptores de superficie celular que se unen a factores de sobrevivencia o de muerte. Ejemplo de esto son las señales de muerte canalizadas por el ligando y el receptor FAS. Los sensores intracelulares monitorean y activan la ruta de muerte en respuesta a anomalías detectadas, tales como el daño al DNA, desbalance en señalización provocado por acción de un oncogén, insuficiencia de factores de crecimiento, o hipoxia. (Evan & Littlewood, 1998)

Muchas de las señales que licitan la apoptosis convergen en la mitocondria, la cual responde a señales pro apoptóticas liberando citocromo C, un potente catalizador de la apoptosis (Green & Reed, 1998). Miembros de la familia de proteínas Bcl-2, que incluyen moléculas pro apoptóticas (Bax, Bak, Bid, Bim) o anti apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W) actúan al gobernar la señalización mitocondrial de muerte por medio de la liberación de citocromo C.

La proteína supresora de tumor p53 puede licitar apoptosis al regular positivamente la expresión de Bax pro apoptótica en respuesta al haber detectado

daño en el DNA; Bax entonces procede a estimular a la mitocondria para la liberación de citocromo C.

Los efectores finales de la apoptosis incluyen un arreglo de proteasas intracelulares llamadas caspasas (Thornberry & Lazebnik, 1998). Las caspasas 8 y 9 son activadas por receptores de muerte tales como FAS o por el citocromo C liberado de la mitocondria, respectivamente. Estas caspasas disparan la activación de más caspasas efectoras que ejecutan el programa de muerte.

El descubrimiento del oncogén bcl-2 en linfoma y su reconocimiento como factor anti apoptotico abrió la investigación de que la apoptosis es una barrera que el cáncer debe superar. Cuando bcl-2 se coexpresa con el oncogén myc en ratones transgénicos fue capaz de promover la formación de linfomas de células B al potenciar la sobrevivencia de linfocitos. (Strasser *et al.*, 1990)

La resistencia a la apoptosis puede ser adquirida por la célula de cáncer por medio de varias estrategias. La más común es la pérdida de algún regulador pro apoptótico mediante una mutación que involucre al gen supresor de tumor p53. Adicionalmente, la ruta PI3K-AKT, la cual transmite señales anti apoptóticas y de supervivencia, están involucradas en mitigar la apoptosis de muchos tumores humanos. Se espera que virtualmente todas las células de cáncer posean alteraciones que les permiten evadir la apoptosis.

3.5 Potencial de Replicación Ilimitada.

Muchos y quizá todos los tipos de células de mamíferos poseen un programa celular autónomo intrínseco que limita su multiplicación. Este debe ser alterado para que una clona de células se expanda hasta constituir un tumor macroscópico. Hayflick demostró que las células en cultivo tienen un potencial replicativo finito (Hayflick, 1997). Una vez que las poblaciones celulares se han multiplicado un cierto número de veces, estas detienen su crecimiento en un proceso llamado senescencia. La senescencia de fibroblastos humanos en cultivo puede ser eludida al deshabilitar las proteínas supresoras de tumor pRb y p53, permitiendo que se continúen multiplicando hasta que entren en un segundo estado llamado Crisis. El

estado de crisis está caracterizado por muerte celular masiva, desarreglos cariotípicos y la emergencia de una variante celular que ha adquirido la habilidad de multiplicarse sin límite, una característica llamada inmortalización. (Wright *et al.*, 1989).

La mayoría de las células tumorales que son propagadas en cultivo parecen ser inmortalizadas, sugiriendo que el potencial de replicarse ilimitadamente es un fenotipo que fue adquirido *in vivo* durante la progresión tumoral.

La porción final de los cromosomas, los telómeros, que están compuestos de miles de repeticiones de una secuencia corta de 6 pares de bases, permiten calcular las generaciones celulares. En cada ciclo celular se pierde de 50 a 100 pares de bases de DNA telomérico del final de cada cromosoma. Este acortamiento progresivo se debe a la inhabilidad de las polimerasas de DNA para replicar completamente el extremo 3' del DNA cromosomal durante cada fase S. Las porciones finales de los cromosomas que quedan desprotegidas son las que participan en fusiones cromosomales que resultan en la muerte de la célula afectada (Counter *et al.*, 1992).

El mantenimiento de los telómeros es evidente en todos los tipos de células malignas; 85% de ellas lo logran regulando positivamente la expresión de la enzima telomerasa, la cual añade repeticiones de hexanucleótidos en la porción final del DNA telomérico (Bryan & Cech, 1999), el 15% restante mantienen sus telómeros mediante recombinación de intercambio intercromosomal. (Bryan *et al.*, 1995). Ambos mecanismos parecen estar fuertemente suprimidos en células humanas normales con el objeto de negar el potencial replicativo ilimitado.

3.6 Metabolismo Energético Alterado del Cáncer y Especies Reactivas de Oxígeno.

El metabolismo celular de las células de cáncer es una característica clave que es alterada en comparación con células normales. En 1924, Otto Warburg propuso que la mayoría de las células de cáncer usan preferencialmente la glicólisis para generar ATP en lugar de usar la fosforilación oxidativa, independientemente de la

disponibilidad de oxígeno. Se ha encontrado que genes involucrados en la glicólisis están sobre expresados en 24 diferentes tipos de cáncer representando más del 70% de los casos de cáncer humanos (Altenberg *et al.*, 2004). En la presencia de oxígeno, los tejidos normales producen su energía metabolizando glucosa en piruvato vía glucólisis seguido de una fosforilación oxidativa. Bajo condiciones anaerobias, se produce lactato derivado del piruvato. Warburg observó que los tumores proliferantes producían lactato a partir de glucosa a pesar de estar bien oxigenados, esto ahora se conoce como el “efecto warburg”. Debido a que la producción de ATP a través de la glicólisis aeróbica es menos efectiva que a través de la fosforilación oxidativa, las células de cáncer mantienen una tasa alta de glicólisis para generar suficientes ATPs para proliferación celular rápida (Yeung *et al.*, 2008). Esta alteración metabólica de las células de cáncer incrementa su biosíntesis de macromoléculas y les permite mantener un ambiente permisivo y así lidiar con la producción incrementada de especies reactivas de oxígeno. Los motores detrás de esta condición, incluyen la expresión de genes y actividad alterada de enzimas metabólicas. Estas alteraciones involucran rutas metabólicas que normalmente no ocurrirían dentro de células normales. El microambiente hipóxico en el cual las células de cáncer habitan puede constituir una presión de selección que acepta las clonas de células tumorales con un alto metabolismo glicolítico de manera que evolucionan a través del proceso carcinogénico. (Semenza *et al.*, 2000).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son una familia de moléculas que son continuamente generadas, transformadas y consumidas en todos los organismos vivos como consecuencia de la vida aerobia (Stadtman *et al.*, 1992). Evidencia sugiere que las células transformadas usan señales ROS para impulsar la proliferación u otros eventos requeridos para la progresión tumoral. ROS y el estrés oxidativo que este genera puede inducir cáncer, las células transformadas parecen generar más ROS que las células normales, el sistema antioxidante está paradójicamente amplificado en células malignas, la estimulación por factores de crecimiento de la progresión del ciclo celular, o mutaciones que activan la ruta de

señalización del receptor tirosin kinasa, involucran un incremento en la señalización ROS y diferentes agentes quimioterapéuticos del cáncer pueden ser selectivamente tóxicos a células tumorales debido a que aumentan el estrés oxidativo y empujan a las células estresadas más allá de sus límites. Mucha evidencia apoya la idea de que el incremento crónico de ROS puede disparar la transformación y contribuir a la progresión del cáncer al amplificar la inestabilidad genómica. Líneas celulares transformadas exhibieron niveles más altos de stress oxidativo intracelular. Las células de cáncer normalmente producen más ROS que las células normales. La transformación neoplásica está asociada a un incremento en los niveles basales de estrés oxidativo. En células normales, la proliferación que resulta de la estimulación con factores de crecimiento requiere señalización por ROS. Esto es consistente con la idea de que la activación constitutiva de esta ruta en las células de cáncer está asociada a un incremento basal en la señalización oxidante. Varios carcinógenos también pueden ejercer sus efectos al generar ROS durante su metabolismo.

Los ROS son una espada de doble filo (Figura 5). Por una parte, a bajos niveles, ROS facilita la supervivencia de las células de cáncer debido a que la progresión del ciclo celular estimulada por los factores de crecimiento y receptores de tirosin kinasas requieren ROS para su activación (Carney *et al.*, 1991), además, la inflamación crónica, un principal mediador del cáncer se encuentra regulada por ROS. Por otra parte, niveles altos de ROS pueden suprimir el crecimiento tumoral a través de la activación sostenida de inhibidores del ciclo celular (Van Raamsdonk *et al.*, 2009) y la inducción de la muerte celular, así como la senescencia al dañar macromoléculas (Müller *et al.*, 2007). De hecho, la mayoría de los agentes quimioterapéuticos y radioterapéuticos matan las células de cáncer al potenciar el estrés por ROS (Dickinson *et al.*, 2011).

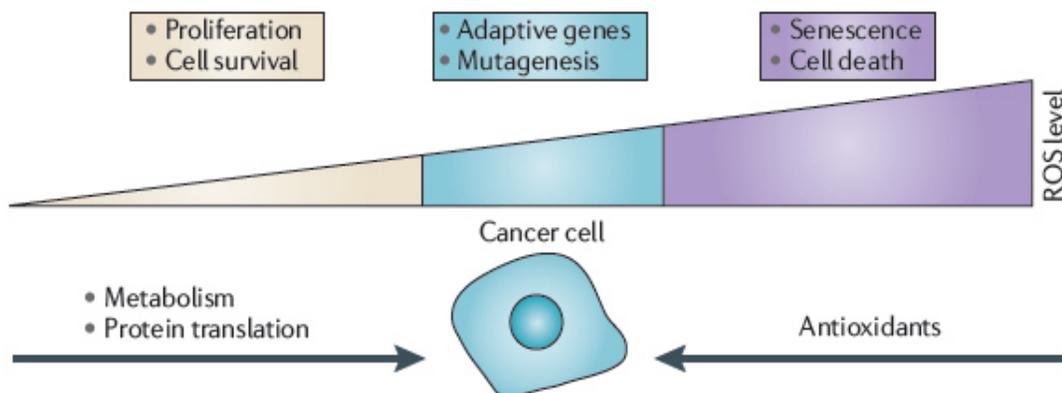


Figura 3. Relación entre los niveles de ROS y la consecuencia biológica que estos provocan a la célula de cáncer. El efecto de ROS en la célula depende del nivel en el que estos se encuentren presentes. Niveles bajos de ROS (izquierda) proveen un efecto benéfico, apoyando la proliferación celular y las rutas de supervivencia. Sin embargo, cuando los niveles se vuelven excesivamente altos (derecha), causan estrés oxidativo detrimental que puede llevar a la muerte celular.

Adaptado de Nature Reviews Cancer 11, 85-95, 2011.

La habilidad de las células de cáncer para distinguir entre ROS como señal de sobrevivencia o de apoptosis está controlada por la dosis, duración, tipo y sitio de la producción de ROS. Niveles modestos de ROS se requieren para que las células de cáncer sobrevivan, mientras que niveles excesivos las matan (Irani *et al.*, 1997). La mayoría de los factores de riesgo asociados a cáncer interactúan con las células a través la generación de ROS. Los ROS activan varios factores de transcripción tales como NF- κ B, activador protein-1 (AP-1), hypoxia-inducible factor-1 α y signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), resultando en la expresión de proteínas que controlan la inflamación; transformación celular; supervivencia de células tumorales; proliferación de células tumorales; e invasión, angiogénesis así como metástasis. ROS también controla la expresión de varios genes supresores de tumor tales como p53, gen de retinoblastoma (Rb), y el homólogo de tensina y fosfatasa (PTEN).

En resumen, el efecto de ROS sobre la vida o la muerte de la célula dependen del nivel de ROS presente. Niveles bajos de ROS proveen un efecto benéfico,

apoyando las rutas de proliferación y supervivencia. Sin embargo, una vez que los niveles de ROS se vuelven excesivamente altos, causan estrés oxidativo detrimental que lleva a la muerte celular. Para contrarrestar tal nivel de estrés oxidativo, las células usan antioxidantes que previenen que ROS se acumule a niveles muy altos. En una célula de cáncer, el metabolismo aberrante y la traducción de proteína generan niveles anormalmente altos de ROS. A través de mutaciones adicionales y adaptaciones, una célula de cáncer ejerce una fuerte regulación sobre ROS y antioxidantes de tal modo que la célula sobreviva y que los niveles de ROS sean reducidos a niveles moderados. Este extraordinario control de ROS y de los mecanismos designados para contrarrestarlo permite a la célula evadir los efectos detrimentales de los niveles altos de ROS, pero también incrementan la probabilidad de que la célula experimente eventos mutagénicos adicionales mediados por ROS y las respuestas a estrés que promueven la tumorigénesis. El potencial de ROS de promover la angiogénesis y metástasis de células tumorales ha sido demostrado en modelos animales de cáncer de mama, de próstata, pulmonar entre otros (Ishikawa *et al.*, 2008).

3.7 Alcohol Deshidrogenasa.

Alcohol deshidrogenasa (ADH) es una metaloenzima dimérica que contiene zinc y que es dependiente de NAD. Posee una masa molecular por subunidad de 40kDa, la cual cataliza la interconversión de una amplia variedad de alcoholes endógenos y xenobióticos primarios y secundarios, así como sus aldehídos y cetonas correspondientes (Figura 6) (Edenberg & Bosron, 1997).

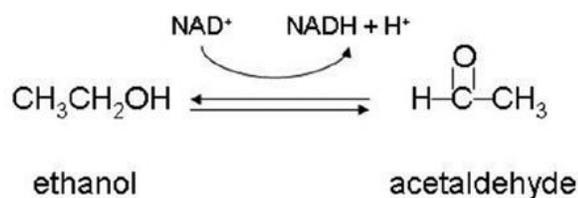


Figura 4. Alcohol deshidrogenasa cataliza la oxidación reversible de etanol a acetaldehído. Primero ocurre la unión de la coenzima NAD⁺ y la unión del sustrato de alcohol en coordinación por el zinc, luego ocurren una serie de desprotonaciones hasta la liberación del producto de aldehído.

El gen codificante para la enzima ADH1 β está localizado en el cromosoma 4q22, y el gen ADH1 β (que codifica para la subunidad β) es el locus responsable por la mayoría de la actividad de ADH sobre el etanol en el hígado. En humanos, ADH existe en múltiples formas como dímero y es codificado por al menos siete genes diferentes. Existen 5 clases (I-V) de alcohol deshidrogenasa, pero la forma hepática que es usada principalmente en humanos es la clase 1. Esta clase consiste de las subunidades α , β , y γ que son codificadas por los genes ADH1A, ADH1B, y ADH1C respectivamente (Sultatos *et al.*, 2004). Las enzimas dentro de una clase forman homodímeros y heterodímeros unas con otras (Edenberg *et al.*, 2000). Los humanos tienen siete ADHs con las que pueden llevar a cabo el primer paso en el metabolismo del alcohol. Los genes que codifican estas enzimas están localizados todos en el cromosoma 4 en un arreglo head-to-tail de aproximadamente 370 kb de largo. (Figura 7).

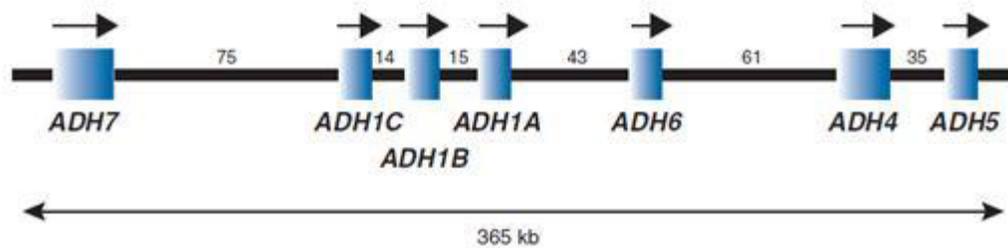


Figura 5. Posiciones relativas de los siete genes de alcohol deshidrogenasas humanas (ADH) en el brazo largo del cromosoma 4.

Adaptado de The genetics of alcohol metabolism, Howard Edenberg.

Todas las enzimas producidas a partir de estos genes difieren ligeramente en sus actividades. Los genes ADH1A, ADH1B y ADH1C producen proteínas con mucha similitud que funcionan como homo- y hetero-dímeros (Hurley *et al.*, 2002); Sus propiedades cinéticas, localización de tejido, y expresión durante el desarrollo todas apoyan a roles principales en el metabolismo oxidativo del etanol en el hígado. Las tres enzimas ADH1 humanas son altamente expresadas en el hígado adulto y menor nivel en una variedad de tejido extra hepático.

El gen ADH4 se expresa casi exclusivamente en el hígado (Hurley *et al.*, 2002), donde contribuye significativamente a la oxidación de etanol durante el consumo de altos niveles. El producto del gen ADH5 expresado es la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión. Los substratos fisiológicos de ADH5 son compuestos formados durante la reacción entre glutatión y formaldehído y entre glutatión y óxido nítrico (Que *et al.*, 2005; Sanghani *et al.*, 2000). Las principales funciones de esta enzima son oxidar el formaldehído en ácido fórmico y finalizar la señalización de óxido nítrico. La enzima ADH5 humana es no saturable con etanol como substrato, a no ser que ácidos grasos de media cadena se encuentren presentes en el ensayo (Engeland *et al.*, 1993). Y se pensaba originalmente que contribuía muy poco en la oxidación del etanol. Sin embargo, algunos investigadores sugieren que juega un rol significativo en el metabolismo first-pass (Lee *et al.*, 2003). Aunque el gen ADH6 ha sido identificado, no existen datos fisiológicos en las funciones de la enzima ADH6. El gen ADH7 tiene un patrón limitado de expresión y principalmente se encuentra en células endoteliales, tales como las de la pared del esófago y tejido estomacal, así como durante el desarrollo embrionario donde puede contribuir al metabolismo del retinol, una forma de vitamina A (Hurley *et al.*, 2002). En adultos, ADh7 ha sido implicada en el metabolismo first-pass del etanol que toma lugar en los tejidos gastroesofágicos, antes de que el etanol sea enviado al hígado vía la vena portal. (Hurley *et al.*, 2002).

La acción de esta enzima permite el consumo de bebidas alcohólicas, pero su propósito evolutivo es probablemente la degradación de alcoholes naturalmente contenidos en comida o producidos por bacterias en el tracto digestivo (Kovacs *et al.*, 2011). El etanol es una molécula de alcohol de dos carbonos que puede ser oxidada en acetaldehído y posteriormente oxidada en ácido acético por acción de la enzima acetaldehído deshidrogenasa (ALDH). En humanos, la ruta principal del metabolismo del etanol involucra la oxidación a acetaldehído por la enzima ADH. El acetaldehído es oxidado por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) en acetato, el cual es excretado en la orina. El producto de la oxidación del etanol, el ácido acético, es un nutriente para los humanos al ser un precursor

del acetil-coA, molécula que puede usarse para la producción de energía y biosíntesis. Otro propósito evolutivo de ADH1 puede ser el metabolismo del alcohol endógeno vitamina A (retinol), el cual genera la hormona ácido retinoico. Aunque su función en esto es principalmente la eliminación de niveles tóxicos de retinol (Duester *et al.*, 2007). Se ha reportado que la biosíntesis del ácido retinoico se ve interrumpida por el etanol debido a una competencia por el sitio catalítico de ADH, lo cual puede contribuir al desarrollo de ciertos tipos de cáncer.

3.8 Alcohol Deshidrogenasa en el Metabolismo de la Vitamina A.

Algunos miembros de la familia alcohol deshidrogenasa poseen actividad de retinol deshidrogenasa y pueden funcionar en la producción de ácido retinoico activo. Se demostró que el sitio activo de ADH1 β puede acomodar all-trans-retinol, 4-oxo-retinol y 4-hidroxi-retinol (Mario *et al.*, 1999). La Vitamina A se refiere a un grupo de compuestos orgánicos insaturados nutricionales, que incluyen al retinol, retinal, ácido retinoico, y varias provitaminas A como lo son los carotenoides siendo el beta-caroteno el más importante; es obtenida a partir de la dieta en la forma de ésteres de retinil presentes en la carne animal o beta caroteno presente en plantas. Es un químico multifuncional esencial para la vida humana, además de su función como sensor de luz en la visión, la vitamina A juega roles críticos en casi todos los órganos humanos y regula el crecimiento y diferenciación celular desde la embriogénesis a la adultez. (Mark et al 2006); también actúa en el cuerpo como un antioxidante, un químico protector que puede reducir el riesgo de ciertos cánceres; afecta la producción de la hormona del crecimiento humana (Raifen *et al.*, 1996) y es esencial para mantener el tejido epitelial intacto como una barrera física contra la infección; también está involucrada en mantener un número de tipos celulares inmunes tanto del sistema inmune innato como del adquirido. Estos incluyen los linfocitos (B, T y NK), así como muchos mielocitos (neutrófilos, macrófagos y células dendríticas mieloides) (Fennema *et al.*, 2008).

Las moléculas que participan en el desarrollo pulmonar y la homeostasis son los retinoides. Las formas más comunes de vitamina A preformadas en la dieta humana son ésteres de retinol y retinil. El retinol tiene 20 carbonos, y el grupo funcional está localizado en el carbono 15. El ácido retinoico (RA) es un derivado metabólico de la vitamina A (retinol) que regula rutas del desarrollo en animales cordados (Clagett *et al.*, 2002). Las enzimas metabólicas de retinoides se aseguran que suficiente all-trans RA sea producido a partir de retinol para controlar la señalización de RA en tejidos específicos (Duester *et al.*, 2000). Las células del embrión o adultos que requieren RA la obtienen a partir de la sangre donde circula en forma de retinol unido a la proteína de unión a retinol. En el citoplasma de la células, el retinol se une a la proteína citoplasmática CRBP, la cual facilita su conversión enzimática a RA. (Napoli *et al.*, 1999). El retinol secuestrado es primeramente convertido en retinal por la retinol o alcohol deshidrogenasas y entonces en RA por la retinal deshidrogenasa (Duester *et al.*, 2000). RA se une en el citoplasma a CRABP, la cual puede asistir en el funcionamiento de RA en el núcleo (Figura 8) (Delva *et al.*, 1999).

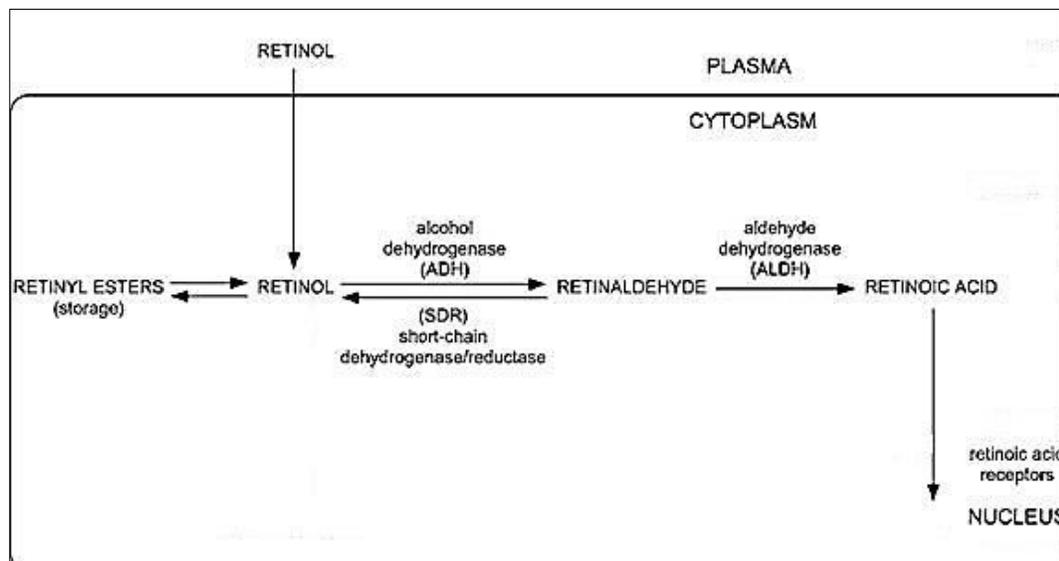


Figura 6. Ruta Metabólica del Retinol. El retinol intracelular se puede unir a CRBP. Diversas formas de ADH catalizan la oxidación del retinol en retinaldehído, y varias formas de aldehído deshidrogenasa catalizan la oxidación del retinaldehído en ácido retinoico.

Adaptado de Biochemical Journal, 383, pag 295-302; 2004.

En plasma humano, el retinol se une a una proteína específica de transporte, la proteína de unión a retinol. En el citoplasma, el retinol se une a proteínas celulares de unión a retinol (CRBP) (Catherino *et al.*, 2007). Los Retinoides se muestran prometedores como agentes terapéuticos y quimiopreventivos, presuntamente por que modulan el crecimiento, diferenciación y apoptosis de células normales, pre malignas y malignas. Sus efectos regulatorios en la expresión genética están mediados por RAR y RXR, los cuales son miembros de la súper familia de genes de receptores esteroidales y hormonales, ligando dependientes y que se unen a DNA, y funcionan como factores potenciadores de la transcripción.

La vitamina A tiene un rol muy diferente al ácido retinoico (una forma oxidada irreversible del retinol), el cual es un factor de crecimiento de tipo hormonal muy importante para las células epiteliales y otras células (Tanumihardjo *et al.*, 2011). El ácido retinoico, una molécula lipofílica que es un metabolito de la Vitamina A (all-trans-Retinol), afecta la transcripción genética y modula una amplia variedad de procesos biológicos como la proliferación celular, diferenciación e incluyendo apoptosis. Los blancos del ácido retinoico-all-trans y RARs incluyen una multitud de genes estructurales, oncogenes, factores de transcripción y citosinas. (Lee *et al.*, 2004). La actividad biológica del ácido retinoico es mediada a través de receptores específicos de ácido retinoico (RAR) y receptores retinoides-X (RXR). Los elementos de respuesta de RA (RARE) encontrados en los promotores de muchos genes, comúnmente consisten en *variable direct repeats* de la secuencia *PuGGTCA* espaciada por cinco nucleótidos (Chambon *et al.*, 1993). El heterodímero RAR/RXR media los efectos de RA. En la ausencia de ligando (RA), el heterodímero RAR/RXR se une a DNA y a co-represores. Este complejo induce la represión transcripcional a través de la desacetilación de histonas. La unión del ligando (RA) induce cambios conformacionales y la unión de co-activadores llevando a la acetilación de histonas y a la activación de la transcripción (Figura 9).

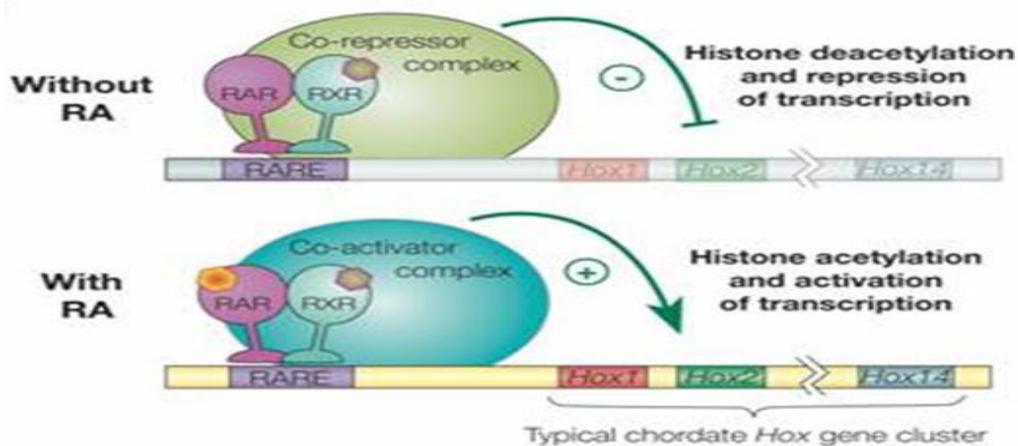


Figura 7. Metabolismo y señalización del ácido retinoico. En la ausencia de ligando, el heterodímero RAR/RXR se encuentra constitutivamente unido a DNA en RAREs y está asociado con complejos co-represores que inducen el silenciamiento transcripcional al desacetilar histonas asociadas con las secuencias diana incrementando así la condensación de la cromatina.

Adaptado de International Journal of Biological Sciences 2006

Solamente unos pocos blancos directos de la señalización de RA han sido descritos. Estos incluyen los RAR mismos, genes Hox, y algunos otros factores de transcripción tales como HNF-3 α y Cdx1, y además genes involucrados en el metabolismo del ácido retinoico (CRABP1 y 2). El dominio de unión a DNA contiene dos *motifs* de dedos de zinc que interactúan con el surco mayor del DNA (Marlétaz *et al.*, 2006). Entre los blancos conocidos del heterodímero RAR/RXR están los genes Hox. Los genes Hox codifican factores de transcripción que contienen dominios de unión a DNA altamente conservados de 60 amino ácidos. (Garcia-Fernandez *et al.*, 2005) Se ha observado que la expresión de genes de la familia Hox está regulada positivamente en la mayoría de los tipos de tumores sólidos, incluyendo cáncer de colon, pulmón y próstata.

3.9 Cáncer Pulmonar.

El cáncer pulmonar puede ser descrito como una enfermedad multifactorial, impulsada por la acumulación de alteraciones tanto de factores genéticos y epigenéticos, como de ambientales, la cual es originada en el epitelio pulmonar. Cambios epigenéticos como alteraciones en la metilación del DNA, modificación

de histonas, o regulación por microRNAs pueden llevar a la inactivación de genes supresores de tumor (Jakopovic *et al.*, 2013). El cáncer pulmonar es resultado de múltiples cambios en el genoma de células pulmonares susceptibles y es causado por la exposición a carcinógenos encontrados en el humo de tabaco, el ambiente y lugares de trabajo, etc. La Organización Mundial de la Salud divide el cáncer de pulmón en dos grandes clases basadas en su biología, terapia y pronóstico: Carcinoma Pulmonar de Células No Pequeñas (NSCLC) y Carcinoma Pulmonar de Células Pequeñas (SCLC). El NSCLC representa más del 85% de todos los casos de cáncer y tiene diferentes subtipos (Figura 3).

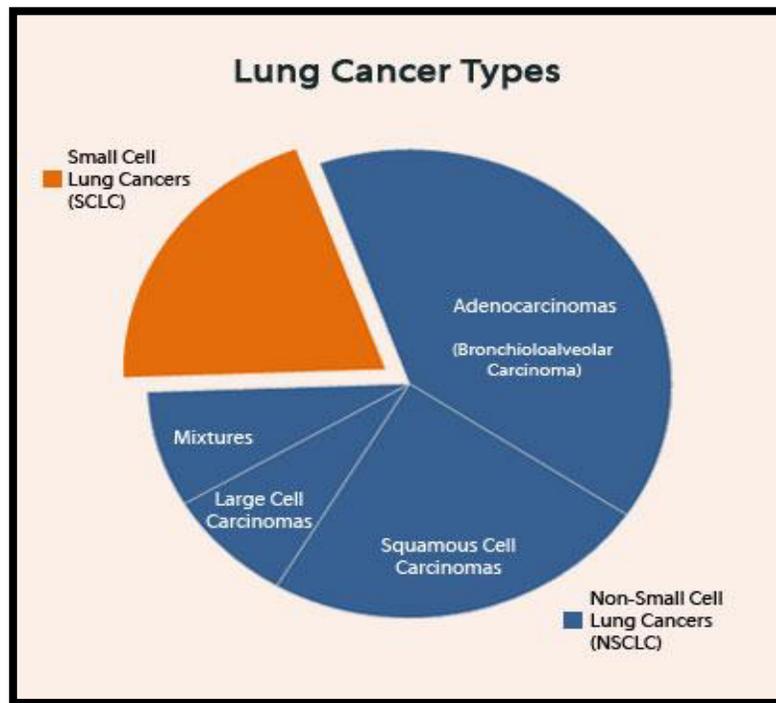


Figura 8. Tipos de Cáncer Pulmonar. La gran parte de los cánceres pulmonares pertenecen a la categoría de NSCLC (azul) y solo de un 10 a 15% pertenecen a SCLC.

Adaptado de Organización Mundial de la Salud, 2000

Adenocarcinoma es el tipo más común de cáncer de pulmón observado en los Estados Unidos y es también el tipo celular predominante en no fumadores. Su localización es generalmente en las vías aéreas pequeñas; los carcinomas de células escamosas se encuentran comúnmente en el centro del pulmón, junto al bronquio mientras que los carcinomas de células grandes pueden ocurrir en

cualquier parte del pulmón, estos tienden a crecer y expandirse más rápido que los otros dos tipos.

La mayoría de los casos de cáncer pulmonar pertenecen a la clasificación de Carcinoma pulmonar de células no pequeñas (por sus siglas en inglés Non Small Cell Lung Cancer); estos están caracterizados por presentar tasas bajas de respuesta a tratamiento y una prognosis pobre con un 15% de sobrevivencia a los 5 años y muy poca sobrevivencia al año.

La mayoría de los pacientes con NSCLC son diagnosticados en una etapa avanzada e incurable, con metástasis local o distante (IARC, 2014). La metástasis del cáncer pulmonar requiere una transición del tipo celular epitelial a mesenquimal. Esto puede ocurrir a través de la activación de rutas de señalización como Akt/GSK3Beta, MEK-ERK, Fas, y Par6. Los cánceres pulmonares primarios comúnmente realizan metástasis hacia el cerebro, huesos, hígado y a las glándulas suprarrenales. La inmunotinción de una biopsia es utilizada para determinar la fuente original.

3.10 Alteraciones Moleculares del Cáncer Pulmonar.

En los años recientes ha habido un incremento en el esfuerzo para comprender la base molecular del NSCLC (Nguyen *et al.*, 2006). La inactivación transcripcional de genes supresores de tumores, de reparación de DNA y de inhibidores de la metástasis, entre otros, ha sido reportada (Herbst *et al.*, 2008). Diversas alteraciones moleculares han sido reportadas en el cáncer pulmonar, tal como la sub expresión del RNAm de ADH1B, el gen codificante para la enzima Alcohol Deshidrogenasa 1 β (Sarah *et al.*, 2012).

Como la complejidad y naturaleza única de los cánceres humanos individuales se vuelve más aparente, el análisis genético de pacientes individuales se ha vuelto importante en guiar el desarrollo de tratamientos novedosos. Un número de genes incluyendo p53, RRM1 y ERCC1 han sido identificados como influyentes en el desarrollo y progresión de este tipo de Cáncer Pulmonar (Sun, 2006; Zheng *et al.*, 2007). Las mutaciones y amplificaciones del Receptor de factor de crecimiento

epitelial (EGFR) son comunes en NSCLC y son el blanco de varios tratamientos inhibidores. EGFR regula la proliferación celular, apoptosis, angiogénesis, y la invasión tumoral. (Shepherd *et al.*, 2005; Tsao *et al.*, 2005; Blackhall *et al.*, 2006). Las mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumor causan alteraciones a múltiples rutas de señalización intracelulares que afectan el metabolismo de la célula tumoral y lo modifican para incrementar la supervivencia y crecimiento.

Por otra parte, mutaciones en el proto oncogen K-ras son responsables del 10-30% de los adenocarcinomas pulmonares (Avel *et al.*, 2006). Alrededor del 4% de los Carcinomas pulmonares de Células No pequeñas involucran una fusión de los genes EML4-ALK tirosin cinasa (Kumar *et al.*, 2013). Her2/neu aunque es afectado, ocurre menos frecuentemente; otros genes comúnmente alterados son c-MET, NKX2-1, LKB1, PIK3CA, and BRAF (Figura 4) (Herbst *et al.*, 2008).

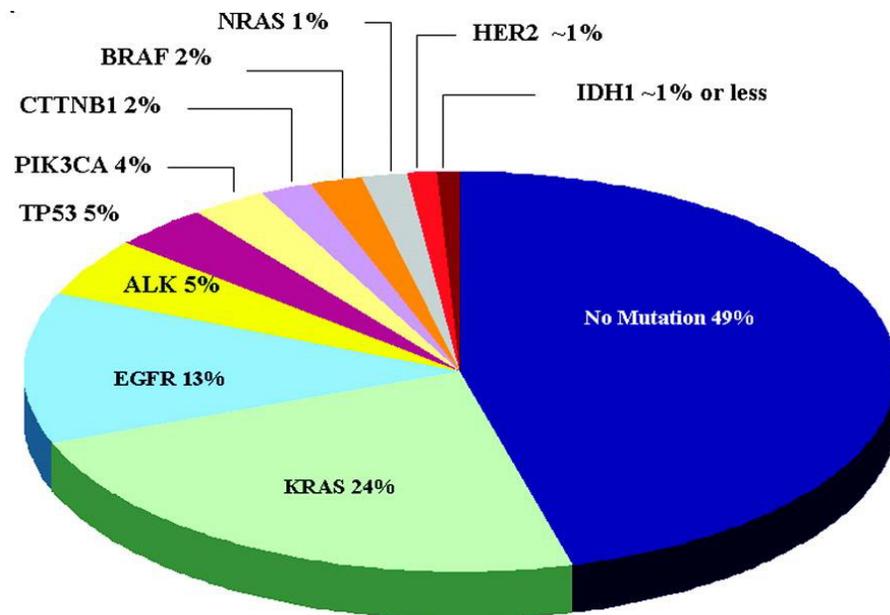


Figura 9. Alteraciones Moleculares más frecuentes observadas en NSCLC. Las mutaciones más frecuentes son en los genes KRAS (24%), EGFR (13%) y ALK (5%).

Adaptado de Lung Cancer, New England Journal of Medicine, 2008

Interesantemente, algunas aberraciones genéticas pueden ser generalmente asociadas con subtipos o perfiles clínicos de NSCLC (Sequist *et al.*, 2011).

El adenocarcinoma es el subtipo histológico predominantemente asociado con ambas alteraciones como mutación en el gen EGFR y reordenamiento de ALK. (Aisner *et al.*, 2013). Adicionalmente a los genes ALK y EGFR, otros blancos potenciales han sido descubiertos en NSCLC, incluyendo KRAS, HER2, ROS1, BRAF, PIK3CA, c-MET, MAP2K1, FGFR, DDR2, PTEN, AKT, RET, NRAS. (Sequist *et al.*, 2011).

Desde un punto de vista práctico, las muestras que contienen adenocarcinoma de forma pura o mezclada deberían someterse a chequeo de estos biomarcadores (Bishop *et al.*, 2012). Un panel experto en patología y oncología, formado por el Colegio de Patólogos Americanos (College of American Pathologists) recomiendan investigaciones de anormalidades involucrando solamente dos genes: El receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) y la kinasa anaplásica de linfoma (ALK) (Lindeman *et al.*, 2013).

El descubrimiento del papel de estas moléculas en cáncer pulmonar ha permitido también el desarrollo de terapias dirigidas contra éstos y sus vías de señalización. Por lo tanto, la detección de genes alterados relacionados a cáncer pulmonar puede resultar esencial para la diagnosis, prognosis y/o detección de tumores potencialmente metastásicos.

3.11 Alcohol Deshidrogenasa y su Relación con el Cáncer.

ADH1 β se ha asociado a varios tipos de cáncer, sin embargo, su rol es aún desconocido. Se han detectado polimorfismos de este gen que se asocian con un mayor riesgo de desarrollar cáncer esofágico. Otras anormalidades en el funcionamiento de esta enzima han sido asociadas con el desarrollo de cáncer hepático, pancreático, oral, cerebral entre otros. Por lo que se ha sugerido que la sub expresión de ADH1 β está relacionada a esta patología (Sarah *et al.*, 2012; Kryptova *et al.*, 2014; McCarty *et al.*, 2012); sin embargo, el análisis de la expresión a nivel de proteína de ADH1B no se ha reportado y se desconoce el papel fisiopatológico que posee en el cáncer pulmonar.

Kroptova y colaboradores demuestran que existe una expresión disminuida de los niveles de RNAm de ADH1B y ADH1C en carcinoma colorectal (Kroptova *et al.*, 2014), además de que en cáncer gástrico se observaron disminuidos significativamente los niveles de RNAm de los genes ADH4, ADH1B (Kroptova *et al.*, 2013), lo cual también fue reportado en cáncer pulmonar por Sarah y colaboradores (Sarah *et al.*, 2012), ; aún más, se ha realizado una asociación estadísticamente significativa entre la ingesta de alcohol, diferentes genotipos del gen ADH1B y el riesgo de presentar cáncer de mama (McCarty *et al.*, 2012). Resultados similares se han reportado para cáncer hepático, pancreático, oral, cerebral y otros (Wojciech *et al.*, 2011). Además, se ha asumido que la transformación celular tumoral puede involucrar cambios estructurales en los receptores RAR o RXR (Chang *et al.*, 2004) y/o en las enzimas que convierten el retinol a ácido retinoico (ADH1, ALDH1). Se ha reportado que la señalización de retinoides puede participar en el mecanismo de desarrollo tumoral fibroso (Zaitseva *et al.*, 2007). Por otro lado, la reducción en la actividad de ADH1 resulta en un decremento en el ácido retinoico biológicamente activo en el citoplasma llevando a una transformación estructural de la matriz extracelular (Molotkov *et al.*, 2002).

Con respecto a la prevención y terapia del tumor, los substratos de ADH1 como los retinoides han sido utilizados y han mostrado tener efectos supresores de tumor, especialmente en casos de malignidades de la cavidad oral, mama y hematopoyéticas (Dragnev *et al.*, 2003). La suplementación dietética de β -caroteno, el cual es una de las principales fuentes naturales de retinoides, fue asociada con un incremento en el cáncer pulmonar cuando fue estudiada en una prueba de prevención de cáncer pulmonar en hombres fumadores, en no-fumadores se observó el efecto opuesto (Fennema *et al.*, 2008).

La Asociación Internacional de Investigación en Cáncer enlista al etanol en las bebidas alcohólicas como un Carcinógeno del grupo 1. Aunque el mecanismo por el cual el alcohol puede causar cáncer permanece oscuro, muchos estudios epidemiológicos identifican el consumo crónico de alcohol como un factor de

riesgo significativo para cánceres de la cavidad oral, faringe, laringe y esófago en humanos. No se ha demostrado el rol carcinogénico que posee el etanol en el tejido pulmonar, sin embargo, un panel de expertos del World Cancer Research Fund y el American Institute for Cancer Research, han concluido que la ingesta de alcohol posiblemente puede incrementar el riesgo de cáncer pulmonar. Reportes recientes implican al acetaldehído, el primer metabolito oxidativo del etanol, como responsable en el riesgo de desarrollar cáncer relacionado al consumo de etanol. Se ha reportado que el acetaldehído causa mutaciones al formar DNA *adducts* (unión covalente de un carcinógeno con el DNA) e inhibir la reparación del DNA. Beber o inhalar acetaldehído tiene efectos mutagénicos y carcinogénicos en animales experimentales, e induce carcinomas nasales y de la laringe, además de que impacta fuertemente el cáncer de tracto aerodigestivo superior, sugiriendo que también puede jugar un rol en la carcinogénesis en el pulmón. (Baan *et al.*, 2007). Aunque el mecanismo por el cual el alcohol puede causar cáncer permanece oscuro, muchos estudios epidemiológicos han identificado el consumo crónico de alcohol como un factor significativo de riesgo de cáncer de la cavidad oral, faringe, laringe, y esófago en humanos. (Bagnardi *et al.*, 2001). El etanol es metabolizado en acetaldehído y radicales libres, los cuales incrementan las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), resultando en daño oxidativo a proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, y además inducen cambios de señalización. Sin embargo, el mecanismo detallado de la carcinogénesis inducida por etanol todavía no es claro. Es ampliamente pronosticado que el etanol acelera la invasión tumoral al estimular la expresión de VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular) que puede inducir angiogénesis de tumor.

Se ha descrito que el etanol induce hipoxia y eleva factor inducible de Hipoxia-1 α (HIF-1 α) en el hígado. Hipoxia o tensión de bajo oxígeno es una característica del microambiente tumoral. Las células malignas son forzadas a adaptarse a la tensión de bajo oxígeno mientras crecen cada vez más lejos del suministro de sangre. La hipoxia de tejido es una característica fundamental de tumores sólidos y promueve procesos biológicos involucrados en la progresión tumoral (Harris *et al.*, 2002). HIF-1 α es activado por hipoxia y es un regulador maestro de la homeostásis del

oxígeno, ya que regula la expresión de muchos genes involucrados en la glicolisis, transporte de glucosa, síntesis de óxido nítrico y de citosinas tales como TNF α ; presión sanguínea, inflamación y muerte celular (Chan *et al.*, 2007). La falta de oxígeno apaga la respiración oxidativa mitocondrial, las células de cáncer deben cambiar entonces al metabolismo glicolítico para obtener bioenergía. Las especies reactivas de oxígeno han sido implicadas en disminuir la hidroxilación de HIF-1 α a través de hidroxilasas de prolina al oxidar el hierro ferroso necesario para la actividad catalítica de estas enzimas. La hipoxia potencia los niveles de HIF-1 α al inhibir la hidroxilación de la prolina y por lo tanto la degradación de HIF-1 α (Majmudar *et al.*, 2010). El consumo crónico de etanol por ratas mostro causar hipoxia debido al consumo incrementado de oxígeno, esto refleja el requerimiento de oxígeno para re oxidar equivalentes reductores, NADH, producidos por la oxidación de etanol por la alcohol deshidrogenasa y la oxidación del acetaldehído por la aldehído deshidrogenasa (Sato *et al.*, 1983). También se ha demostrado que el RNAm y la proteína de HIF-1 α se encontraban elevadas después de una administración intragástrica de etanol a ratas por 24 semanas (Li *et al.*, 2006.). En resumen, la inducción de HIF-1 α puede funcionar como una adaptación metabólica a la hipoxia, ya que regula positivamente muchos genes que pueden servir para proteger contra ésta. Una condición hipóxica, a través de los mecanismos inducidos por HIF-1 α , es capaz de desencadenar la producción de especies reactivas de oxígeno y pueden inducir el stress oxidativo implicado en el desarrollo del cáncer (Acker *et al.*, 2002).

3.12 Ácido Retinoico y su Relación con el Cáncer Pulmonar.

Los retinoides, análogos de la vitamina A, son requeridos para el crecimiento normal y diferenciación del epitelio bronquial humano. Una de las funciones fisiológicas de los retinoides es prevenir la carcinogénesis al regular la diferenciación de tejidos epiteliales. Esta contención es específicamente relevante para el epitelio de vías respiratorias debido a que la deficiencia de vitamina A resulta en un reemplazo del epitelio mucociliar con epitelio escamoso keratinizante (metaplasia escamosa) y está asociado con un incremento en la

incidencia de cáncer pulmonar. Ellos también son capaces de revertir lesiones pre malignas y prevenir segundos tumores primarios en algunos pacientes con NSCLC. Estos efectos se piensa que resultan de la modulación del crecimiento celular, diferenciación y apoptosis. En el adulto, el ácido retinoico controla la diferenciación de células epiteliales durante el proceso normal de reemplazo celular al momento de morir, por ende, el ácido retinoico posee la habilidad de prevenir la carcinogénesis. (De Luca *et al.*, 1997). El ácido retinoico y sus derivados tienen efectos profundos en la diferenciación y proliferación de células epiteliales. (Chambon *et al.*, 1996). Deficiencias en estos compuestos causan hiperplasia y metaplasia escamosa del epitelio respiratorio (Harris *et al.*, 1972).

Así como el etanol, el retinol es un alcohol que puede ser convertido a su aldehído correspondiente en reacciones catalizadas por varias isoenzimas de la alcohol deshidrogena citosólicas. Por lo tanto no sorprende, que *in vitro*, y posiblemente *in vivo*, estos dos alcoholes pueden interactuar significativamente al competir una con la otra por la misma ruta enzimática y al interferir con sus respectivas reacciones. Debido a estas características bioquímicas y celulares solapadas, no es sorprendente que cuando el etanol es consumido, afecte a las funciones fisiológicas y patológicas de la vitamina A. Análisis epidemiológicos también revelaron una correlación entre una baja ingesta de vitamina A y el riesgo de cáncer de pulmón, cérvix, cuello y cabeza. (Hong *et al.*, 1994) Tanto *in vitro* como *in vivo*, RA ha mostrado la capacidad de suprimir el desarrollo de metaplasia escamosa, displasia y transformación maligna del epitelio respiratorio (Saffiotti *et al.*, 1967). Interacciones adversas ocurren cuando la vitamina A y el etanol son administrados simultáneamente. Esto es particularmente evidente en alcohólicos los cuales fueron administrados con suplementos de retinol para contrarrestar la deficiencia de vitamina A donde se encontró que la interacción retinol/etanol que ocurría incrementó la hepatotoxicidad y carcinogenicidad. El mecanismo de tales interacciones no está bien comprendido pero puede relacionarse al hecho de que las ADHs pueden utilizar tanto retinol como etanol como substratos. ADH1 juega un rol central en la interacción retinol/etanol, sugiriendo así que el defecto principal que lleva a las interacciones adversas puede ser la habilidad disminuida

de convertir retinol en RA a través de la ruta metabólica de ADH. El metabolismo de retinol de ADH evidentemente produce menos toxicidad que el metabolismo por otras rutas. La deficiencia de vitamina A ha sido asociada con un incremento de la incidencia de cáncer pulmonar (Hong *et al.*, 1994).

El ácido retinoico all-trans (ATRA) es un retinoide y un agente prometedor en el tratamiento de cáncer debido a su habilidad para inhibir proliferación e inducir apoptosis en muchos ensayos *in vivo* e *in vitro* en células tumorales. ATRA es frecuentemente usada como un inductor de diferenciación tanto en leucemia como en tumores sólidos como neuroblastoma. ATRA promueve la supervivencia celular y migración a través de la activación de la ruta ERK en células de adenocarcinoma pulmonar; en contraste, la inhibición de la ruta ERK en combinación con ATRA disminuyó la proliferación pulmonar. Se propuso que la activación de la ruta de supervivencia en respuesta a tratamiento por retinoides puede ser un mecanismo de resistencia de las células de cáncer pulmonar. Se demostró que ATRA activa la señalización por ERK en la línea celular A549 por un mecanismo independiente de la transcripción génica. La activación de ERK promueve la supervivencia y migración, bloqueando el efecto anti cáncer de ATRA. Tal activación resulta en el desarrollo de resistencia a retinoides en las células de cáncer pulmonar. Retinol causa un incremento en la producción de ROS en células A549, el cual lleva a una activación de NF- κ B y una disminución en la expresión de RAGE. La expresión de RAGE ha sido recientemente considerada un evento clave en el desarrollo y progresión del cáncer pulmonar y; por otra parte el retinol era considerado previamente como un antioxidante, agente anti cáncer, pero se ha observado que induce efectos negativos y pre-neoplásicos.

Cuando la oxidación de retinol en RA es deshabilitada como lo es en ratones ADH1 deficientes (ADH1^{-/-}), los niveles de ácido retinoico disminuyen considerablemente (Figura 10).

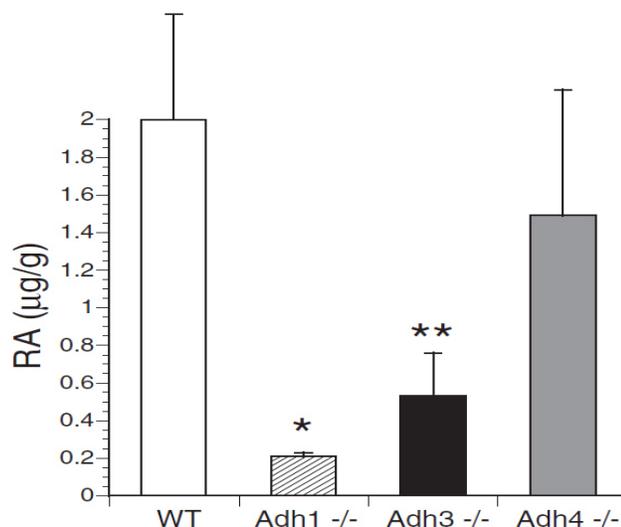


Figura 10. Niveles de ácido retinoico en ratones wild type y ratones con genes knockout para Adh1, adh3, adh4. ADH1 es responsable de la mayoría de la oxidación *in vivo* de retinol a ácido retinoico.

Adaptado de Molotkov et al. European Journal of Biochemistry, 2002.

El retinol se puede volver un sustrato para P450 que se sabe que metabolizan retinol a 4-hidroretinol. Esto puede llevar a una toxicidad mediada por P450 que requiere oxígeno molecular y produce radicales libres de oxígeno. La asociación entre deficiencia de vitamina A y la incidencia de cáncer sugiere que los retinoides son supresores fisiológicos de la carcinogénesis. El desarrollo del cáncer puede entonces requerir que las células iniciadas y pre malignas escapen al control de los retinoides naturales. Una manera por la cual esto puede ser logrado es la expresión aberrante de uno o más receptores de retinoides, lo cual resultaría en una señalización por retinoides interrumpida. De hecho, varios estudios han demostrado que la expresión de RAR β es suprimida en líneas de cáncer pulmonar cultivadas y han sugerido que la expresión de este receptor está asociada con la supresión del cáncer. Evidencia reciente implica a RAR β específicamente en la supresión de tumor *in vivo*; una transfección con un vector de expresión de RAR β de una línea de cáncer pulmonar humano epidermoide *in vitro* resulta en una tumorigenicidad disminuida en ratones desnudos (Houle *et al.*, 1993).

Los heterodímeros RXR-RAR se unen específicamente a secuencias de DNA—Elementos de Respuesta De Ácido Retinóico (RAREs) que usualmente están localizados en los 58 genes en las regiones *upstream* de los genes regulados por Retinoides. Cada tipo de receptor incluye tres subtipos designados α , β y γ , los cuales exhiben patrones de expresión temporales y espaciales específicos durante el desarrollo embrionario y a través de una diferente distribución en tejidos adultos. La ruta de señalización RA-RAR es importante para el crecimiento y diferenciación epitelial y estudios recientes han sugerido que RAR, especialmente RAR β está relacionado a carcinogénesis (Houle *et al.*, 1993). Los retinoides y RAR β pueden jugar un rol crítico en la ruta de señalización que dispara la diferenciación y la limitante de la división celular en tejido pulmonar normal. El hecho de que la expresión del RNAm de RAR β sea disminuida o suprimida en un número de tumores, incluyendo carcinomas pulmonares, carcinomas escamosos de la cabeza y cuello, y carcinoma mamario, sugiere que puede estar involucrado en el desarrollo de cáncer.

Cuando ciertos receptores retinoides en el núcleo (RARs) y receptores retinoides X son suprimidos, la actividad anormal puede resultar en el potenciamiento del desarrollo de cáncer (Xu *et al.*, 2009). Reportes recientes han demostrado que la metilación aberrante en el promotor de RAR β puede jugar un rol en la inactivación del gen (Zochbauer *et al.*, 2001). Se ha reportado que la expresión de RAR β , y posiblemente también RAR γ y RXR β está suprimida en un gran porcentaje de pacientes con cáncer pulmonar. Berard *et al.*, generaron ratones transgénicos que expresan un fragmento anti sentido específico contra RAR β 2 y demostraron así, que la inactivación parcial de RAR β 2 daba lugar al desarrollo de cáncer pulmonar. Se ha demostrado que la expresión del receptor RAR β está disminuida en NSCLC (Tabla 1) (Xu *et al.*, 1997).

Receptor	% positive cases (No. positive/total)			
	Normal	NSCLC	SCC†	ADC†
RAR α	100 (17/17)	94.7 (72/76)	94.4 (34/36)	95.0 (38/40)
RAR β	88.9 (15/17)	41.8 (33/79)‡	47.4 (18/38)§	36.6 (15/41)
RAR γ	94.1 (16/17)	72.4 (55/76)	74.3 (26/35)	70.7 (29/41)
RXR α	100 (17/17)	100 (63/63)	100 (30/30)	100 (33/33)
RXR β	94.1 (16/17)	76.1 (51/67)	73.3 (22/30)	78.4 (29/37)
RXR γ	88.9 (15/17)	95.2 (40/42)	100 (18/18)	91.7 (22/24)

Tabla 1. Expresión de RNAm de RAR y RXR en epitelio bronquial normal y en NSCLC. La diferencia entre la expresión de RAR β de tejido normal y de NSCLC fue estadísticamente significativa.

Adaptado de Journal of National Cancer Institute 1997;89:624-9

La reducción de la expresión de RAR β en células del epitelio bronquial que es causada por fumar cigarrillo puede estar relacionada a la carcinogénesis del pulmón (Berard *et al.*, 1993). Ha sido reportado que el gen ADH3 está regulado por retinoides a través de un RARE canónico. Debido a que ADH3 cataliza la oxidación del retinol en retinaldehído, el evento de razón limitante en la síntesis de RA, la disminución de ADH3 puede causar una reducción de la concentración local de RA en tejidos malignos, llevando a una expresión interrumpida de RAR β (Duester *et al.*, 1991). La comparación de los niveles de RNAm de ADH3 entre tejidos de pulmones normales y malignos reveló que la expresión de ADH3 fue reducida en tejidos malignos (Figura 11).

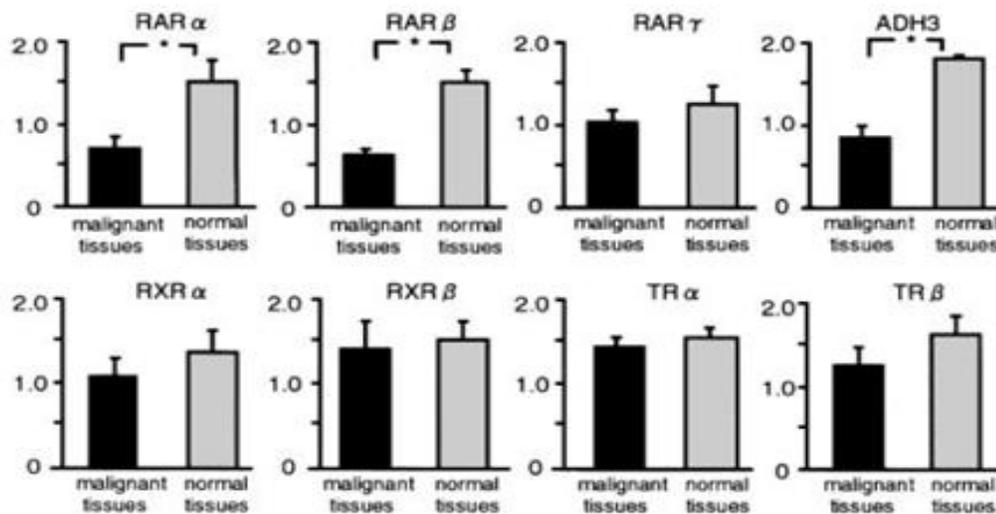


Figura 11. Análisis RT-PCR de la Expresión de RAR, RXR, TR (tyroid hormone receptor) y ADH3 en tejidos malignos con NSCLC y tejidos normales. Se utilizó RT-PCR (Reacción en cadena de polimerasa transcriptasa reversa semicuantitativa, PCR cuantitativa en tiempo real para evaluar la expresión de RAR α , β y γ RXR α y β en tejidos malignos y no malignos obtenidos de pacientes con NSCLC. Comparado con tejidos no malignos, los tejidos malignos tuvieron un 45% de reducción en la expresión de RAR α y β .

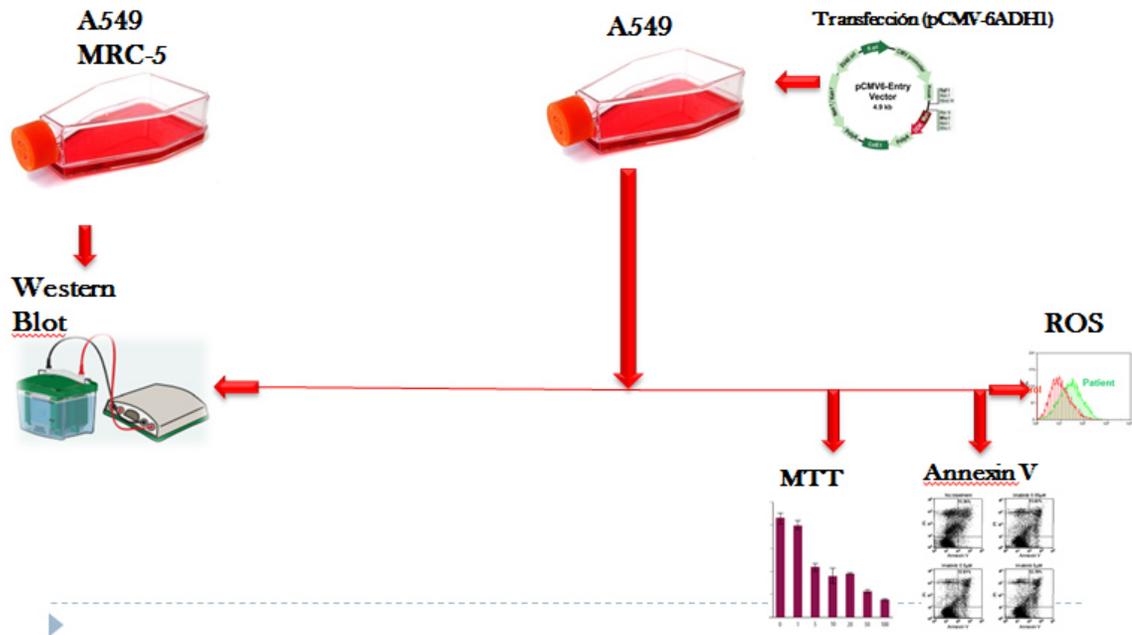
Adaptado de *Respirology* (2003) 8, 302–309

Los resultados reportados sugieren una posible asociación de la pérdida de la expresión del receptor de ácido retinoico α y β y ADH3 con la carcinogénesis del pulmón (Inui *et al.*, 2003). Los resultados sugieren que la regulación de la transcripción RA-dependiente mediada por RAR α y ADH3 puede ser fundamental para la carcinogénesis del pulmón. Se requiere investigación que aclare cómo las señales mediadas por RAR están involucradas en la carcinogénesis. El gen RAR β , el cual puede funcionar como gen supresor de tumor, ha sido reportado que es silenciado por la metilación en cáncer de colon y mama (Cote *et al.*, 1998). La expresión proteica y de RNAm de RAR β ha sido perdida en algunos pulmones de fumadores (Xu *et al.*, 1997).

Debido a que los receptores nucleares de retinoides median la mayoría de los efectos de los retinoides en la expresión genética, la expresión reducida de uno o más de estos receptores puede potenciar el desarrollo de cáncer. Aunque la expresión disminuida de RAR β aparenta ser un evento común en la carcinogénesis pulmonar, el mecanismo molecular subsecuente no está claro. Sin embargo, muchas líneas celulares de cáncer pulmonar exhiben defectos en la transcripción de RAR β -RARE, posiblemente debido a la inactivación o ausencia de co-factores que son requeridos para la transcripción (Zhang *et al.*, 1994).

Debido a que RAR β tiene una afinidad diez veces más alta por RA comparado a RAR α , RAR β es más importante para la auto regulación de la propia síntesis de RA. Sin embargo, es concebible que la reducción en la expresión de RAR α en NSCLC lleva a defectos en la transcripción de RAR β y en la interrupción de la ruta de señalización RA (Qiu *et al.*, 2000).

4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



5 JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón es un problema de salud pública a nivel mundial cuya tasa de prevalencia y muerte están incrementando. En México, como país en vías de desarrollo, los recursos para tratamientos oncológicos son limitados, por lo que existe un menor porcentaje de supervivencia, y un mayor sufrimiento de los pacientes en comparación con los países desarrollados. Los últimos avances desarrollados en el área de la biología molecular y terapia génica se han encaminado a la búsqueda de nuevos blancos moleculares contra el cáncer, que estén involucrados con la proliferación celular y metástasis, con el objeto de silenciar su expresión y frenar la progresión de la enfermedad. Se requiere una mejor comprensión de los mecanismos moleculares y procesos celulares subyacentes de la iniciación del cáncer, especialmente enfocándose en cómo los pequeños cambios en solo algunos de los genes regulatorios o proteínas puede alterar una variedad de funciones celulares. Es ahora reconocido que los estudios proteómicos son fundamentales para obtener un reconocimiento preciso de la fisiología celular para finalmente clarificar la patogénesis de diversos tipos de neoplasias malignas.

El gen ADH1 β que codifica para la enzima Alcohol Deshidrogenasa 1 β , muestra una sub expresión a nivel RNAm en tejidos de pacientes con cáncer pulmonar con respecto a tejido no canceroso. Sin embargo, su expresión a nivel proteína y el papel en la fisiopatología del cáncer pulmonar no ha sido descrita y se desconoce el efecto que ejerce la sub expresión de ADH1 β en el cáncer pulmonar. ADH1 β es un buen blanco de estudio debido a que tiene un papel importante en el metabolismo y proliferación celular, esto mediado por la señalización por ácido retinoico. Esto sugiere la necesidad de conducir investigación más profunda sobre los mecanismos moleculares que llevan a la disminución de ADH1 β en el cáncer pulmonar. Se espera que los resultados de este estudio aumenten el conocimiento sobre el papel biológico de ADH1 β en cáncer pulmonar y que den pauta al potencial desarrollo de procedimientos de diagnóstico y terapia de esta enfermedad.

6 HIPÓTESIS

La enzima ADH1 β es sub expresada en la línea celular A549, y su expresión exógena en A549 reduce su capacidad metabólica, aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno e induce la exposición de fosfatidil serina.

7 OBJETIVO

Evaluar la expresión de la proteína ADH1 β en la línea celular A549 y determinar el efecto de su expresión exógena sobre la capacidad metabólica, producción de especies reactivas de oxígeno y la exposición de fosfatidil serina.

Objetivos Específicos

1. Evaluar la expresión de la proteína ADH1 β en líneas celulares A549 y MRC-5.
2. Determinar el efecto sobre la capacidad metabólica de las células A549 que expresan ADH1 β exógenamente.
3. Determinar el efecto sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en las células A549 que expresan ADH1 β exógenamente.
4. Determinar los niveles de exposición de fosfatidil serina en las células A549 que expresan ADH1 β exógenamente.

8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Cultivo Celular.

La línea celular A549, una línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano con propiedades alveolares de tipo-II, tiene su origen en un carcinoma alveolar (Lieber *et al.*, 1976). A549 presenta una morfología epitelial, son adherentes, y es una buena línea para ensayos de transfección. La población se dobla en número a las 22 horas. Por otra parte, la línea celular MRC5 corresponde a tejido normal pulmonar y es un tipo celular adherente con características fibroblásticas.

Los cultivos celulares son realizados siguiendo los protocolos estándar sugeridos por el American Type Culture Collection (ATCC, 2014). Las células son mantenidas con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/mezcla nutricional) (CORNING), adicionado con Suero Fetal Bovino al 10% y antibiótico al 1% (Penicilina, Estreptomicina y Neomicina) (GIBCO). Las células se incubaron a 37°C con una atmósfera controlada de 5% de CO₂ (Incubadora THERMO SCIENTIFIC). La tripsina utilizada para despegar las células de la placa se encuentra al 1% diluida con buffer de fosfatos salinos 1X (PBS1X) que tiene un pH de 7.2 (GIBCO). El conteo celular se realizó usando azul tripán (solución de 0.4% de SIGMA-ALDRICH, Inc.), una cámara Neubauer, y un microscopio óptico, siguiendo el protocolo establecido por la ATCC.

Estas células se encuentran disponibles en el banco de líneas celulares del Laboratorio de Inmunología y Virología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

8.2 Expresión de la Proteína ADH1β mediante Análisis de Western Blot.

Para realizar la lisis celular se obtiene la patilla celular de al menos 1×10^6 células. Posteriormente se añadió el buffer de lisis (Triton 1%, 1mM EDTA, 150 mM NaCl, 50mM tris PH6.8) con inhibidor de proteasas (SIGMA-ALDRICH) a un volumen 5-10 veces mayor al tamaño de la patilla celular y se sonicaron durante 15-30 segundos. Se dejó reposar la solución por 30 minutos. Esto fue seguido por

la centrifugación de las muestras a 3000G por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. El buffer de Laemmli es especialmente formulado para preparar proteína y usarlo en el sistema SDS-PAGE. Una muestra de proteína es mezclada con 2X del buffer (1:1) y calentada en agua hirviendo de 2 a 5 min. El 2-mercaptoetanol reduce los puentes disulfuro intra e intermoleculares. El detergente SDS desnatura las proteínas y subunidades y les confiere una carga negativa para que puedan separarse en base a su peso. El azul de bromofenol sirve como un colorante de frente de corrida que va delante de las proteínas y permite observar la muestra en el momento de cargar. El glicerol incrementa la densidad de la muestra para que se deposite con facilidad en el pozo. Para ambos casos se determinó la cantidad de proteína usando el método de Lowry. Posteriormente 10-40 μg de lisado fueron corridos en un gel de poliacrilamida al 5-10% y después fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon en leche descremada al 5% durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se usaron anticuerpos primarios anti-ADH1 β (abcam), y anti-beta-actina como control. La unión específica del anticuerpo fue detectada utilizando un anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo unido a HRP para ser detectado por quimioluminiscencia. Finalmente se colocó la solución de quimioluminiscencia y se expuso a un film por 10 minutos. La densidad de las bandas en la membrana se determinó utilizando el software Image-J.

8.3 Transfección de la Línea Celular A549 con el Vector pCMV6-ADH1 β .

Se siguió el protocolo de transfección sugerido por el fabricante de Lipofectamina 2000 (Life Technologies). Se sembraron 250 000 Células A549 viables en cajas de 6 pocillos y se permitieron adherirse a la placa hasta alcanzar una confluencia del 80% a 90%. Posteriormente se administraron 2.5 μg de pCMV6-ADH1 β y del vector vacío pCMV6. Se colectaron las células en tubos eppendorf y se procedió a realizar extracción de proteína y posteriormente. Un día previo a la transfección se plaquearon 250 000 células en 100 ml de medio DMEM en placas para cultivo celular de 6 pozos (CORNING) para que las células estén a un 70-80% de confluencia al tiempo de la transfección, esto es para obtener altos

niveles de expresión y para minimizar la citotoxicidad. Posteriormente, la transfección se llevó a cabo en medio libre de suero Opti-MEM para mayor compatibilidad con Lipofectamina 2000 debido a que algunos medios pueden inhibir la transfección lipídica catiónica; y sin añadir antibióticos al medio durante la transfección debido a que esto causa muerte celular. Para cada pocillo a transfectar, se diluyó 2.5 µg del vector pCMV6-ADH1β de ORIGENE (Figura 14) en 25 µl de Opti-MEM sin suero y se mezclarán delicadamente. Por otro lado se diluyó 7.5 µl lipofectamina en 25 µl de Opti-MEM. Después se combinó el DNA diluido con la Lipofectamina diluida, se mezclará gentilmente para ser incubada de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se removió el medio de crecimiento de las células y se reemplaza con 100 µl de medio Opti-MEM. Se añadieron 25 µl de los complejos diluidos a cada pocillo y se mezclaron gentilmente moviendo la placa. Se incubaron las células a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5% por 2 horas y posteriormente se retiró el medio y fue reemplazado por medio DMEM al 10%. Finalmente, se probó la efectividad de la transfección evaluando la expresión de ADH1β por Western Blot a las 24-72 horas post-transfección. Se confirmó la transfección evaluando la expresión de la proteína FLAG Myc-DDK, la cual es una proteína de fusión expresada en conjunto con ADH1β, así como una evaluación de la fluorescencia emitida por la proteína verde fluorescente GFP la cual es adicionada a 1/3 de la cantidad total del plásmido pCMV6-ADH1β (Figura 12).

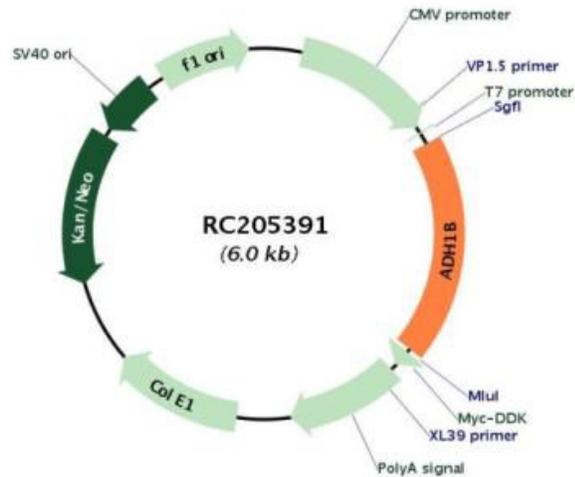


Figura 12. Mapa del Vector pCMV6-ADH1 β . El promotor de CMV (citomegalovirus), el cual puede ser usado para expresar cDNA clonado y está seguido por una señal PolyA hGH (Hormona de crecimiento humano) localizada río abajo del inserto. El ColE1 ori es el origen de la replicación bacteriana, el ori SV40 permitala replicación en célula de mamíferos y el f1 ori es el origen de replicación de fagos filamentosos, el cual permita la recuperación de plásmidos de una sola cadena. El gen resistente a ampicilina confiere la selección del plásmido en *E. coli*.

8.4 Análisis de Viabilidad (MTT) de las Células A549 Transfectadas con pCMV6-ADH1 β .

Las células A549 transfectadas con pCMV6-ADH1 β fueron sembradas en placas de 96 pocillos y se incubaron por 24, 48 y 72 horas a 37°C con atmósfera controlada de 5% de CO₂ para permitir que las células se adhieran a la placa. Posteriormente, para determinar la actividad metabólica de las células A549 transfectadas con pCMV6-ADH1 β se agregó el reactivo de MTT (5mg/mL), por pozo, dejándolo actuar por 2 horas a 37°C para permitir la formación de cristales de formazán, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 μ L de Dimetil sulfóxido (DMSO) (SIGMA-ALDRICH), por pozo, por último, se realizó la lectura de densidad óptica (DO) en un lector de placas ELISA (BioTek) a una longitud de onda de 570nm. Las células A549 transfectadas con pCMV6-ADH1 β fueron sembradas en placas de 96 pocillos y se incubaron por 24, 48 y 72 horas a 37°C con atmósfera controlada de 5% de CO₂ para permitir que las células se adhieran a la placa. El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-

difeniltetrazólico), es captado por las células y reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazán cuando éstas presentan un metabolismo mitocondrial normal (Twentyman & Luscombe, 1987), el resultado de esta reacción puede ser cuantificado por espectrofotometría. Posteriormente, para determinar la actividad metabólica de las células A549 transfectadas con pCMV6-ADH1 β se agregó el reactivo de MTT (5mg/mL), por pozo, dejándolo actuar por 2 horas a 37°C para permitir la formación de cristales de formazán, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 μ L de Dimetil sulfóxido (DMSO) (SIGMA-ALDRICH), por pozo, por último, se realizó la lectura de densidad óptica (DO) en un lector de placas ELISA (BioTek) a una longitud de onda de 570nm.

8.5 Análisis del Efecto sobre la Muerte Celular de las Células A549 Transfectadas con pCMV6-ADH1 β mediante el Ensayo de Annexina V.

El principio de este tipo de análisis citométrico se basa en que dos características bioquímicas de las células en proceso de muerte: 1) la exposición de la fosfatidilserina (PS) en la membrana plasmática en etapas tempranas de muerte celular apoptótica (Martin *et al.*, 1995) y 2) la pérdida de la integridad de la membrana plasmática en etapas tardías. La anexina V (ANN) es una proteína de unión a fosfolípidos, Ca²⁺ dependiente, con gran afinidad por la PS; unida a un fluorocromo como la aloficianina (APC), puede utilizarse para la detección de PS por medio de FACS (Fluorescent-activated cell sorting).

Se realizó la transfección de las líneas A549 como se detalló anteriormente. Concluido esto, el sobrenadante (que contiene células desheridas muertas o no viables y fracciones celulares) se recolectó en tubos eppendorf de 1.5 mL y las células que continúan adheridas serán despegadas con Trypsin-EDTA (GIBCO). La solución con células y fracciones celulares se recolectará en los mismos tubos eppendorf y centrifugada a 1600 rpm (0.2 rcf) por 10 minutos a temperatura ambiente (Centrifuge 5415D eppendorf, Hamburg). Las células asentadas (pellet) serán marcadas aplicando 100 μ L de una solución de Annexin V Binding Buffer (ABB) (10mM HEPES, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl₂, pH 7.4), ANN-APC (2.5

$\mu\text{L/mL}$ de ABB) (Molecular probes by life technologies). Los tubos serán incubados a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos y posteriormente las muestras serán leídas por FACS (BD Accuri TM C6 Flow cytometer). El fluorocromo presente en las células marcadas es activado por la incidencia de un haz de luz, proveniente del citómetro y cuantificados por un programa computacional (BD AccuriTM C6 Software).

8.6 Análisis del Efecto sobre la Producción de ROS de las Células A549 Transfectadas con pCMV6-ADH1 β mediante el Ensayo de DCFDA.

Para el ensayo se cultivarán 250 000 células en placas de 6 pocillos (CORNING), posteriormente fueron transfectadas con el vector pCMV6-ADH1 β . Después de 72 horas se procedió a colectar las células adheridas con tripsina y posteriormente fueron marcadas con $20\text{ }\mu\text{M}$ de DCFDA y fueron incubadas por 30 minutos a 37°C . Finalmente, se homogenizaron las células y se analizaron 10 000 células en el citómetro de flujo en el canal FL-1. La producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) se analizó utilizando el compuesto DCFDA (Abcam) que utiliza el agente celular permeante 2',7' -diclorofluorescina diacetato (DCFDA), un tinte fluorogénico que mide la actividad de hidroxilo, peroxilo y otras especies reactivas de oxígeno dentro de una célula. Después de difundirse en la célula, el DCFDA es deacetilado por estereasas celulares a un compuesto no fluorescente, el cual es oxidado por ROS en 2', 7' -dichlorofluoresceina (DCF). DCF es un compuesto altamente fluorescente que puede ser detectado en el citómetro de flujo con una excitación máxima y espectro de emisión de 495 nm y 529 nm respectivamente. Para el ensayo se cultivaron las células a una concentración de al menos 1.5×10^4 . Se procedió a colectar las células adheridas con tripsina y posteriormente fueron marcadas con $20\text{ }\mu\text{M}$ de DCFDA y fueron incubadas por 30 minutos a 37°C . Finalmente, se homogenizaron las células y se analizaron 10 000 células en el citómetro de flujo en el canal FL-1.

8.7 Análisis Estadístico.

Los datos resultantes fueron sometidos a un tratamiento estadístico utilizando el programa IBM SPSS Statistics 20. En los casos donde existen solamente dos grupos a comparar, se realiza una prueba t para determinar el grado de significancia. Para la comparación entre más de dos grupos experimentales se utilizó una prueba ANOVA. Los datos son presentados como la media \pm D.E de los resultados. $P < 0.05$ se considera significativo.

9 RESULTADOS

9.1 La Proteína ADH1 β está Sub Expresada en la Línea Celular A549.

Se procedió a evaluar la expresión de la proteína ADH1 β en las líneas celulares A549 (carcinoma pulmonar) y MRC-5 (normal transformada). La línea celular MRC-5 ya ha sido utilizada como control (célula normal) en investigaciones de cáncer pulmonar (Mulhivill *et al.*, 2012). El objetivo de este experimento fue evaluar y comparar la expresión de la proteína ADH1 β en las líneas celulares A549 y MRC-5. La expresión fue evaluada mediante el método de western blot utilizando B-actina como control de carga (Figura 13).

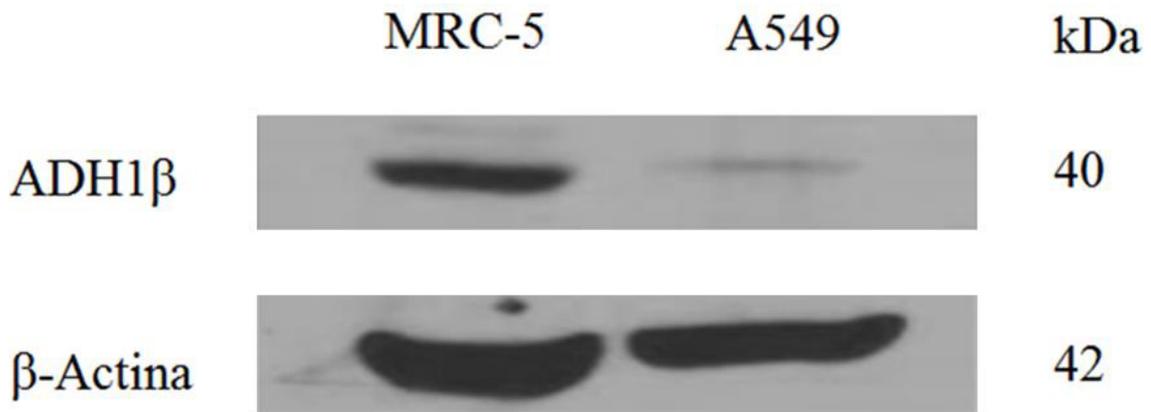


Figura 13. Subexpresión de la proteína ADH1B en las células A549. La expresión de la proteína ADH1B (40kDa) fue analizada mediante Western Blot de las líneas celulares A549 y MRC-5. Se utilizó β -Actina (42 kDa) como control de carga.

Se puede observar la diferencia en la intensidad de la banda correspondiente a la proteína ADH1 β (40 kDa) en donde MRC-5 (izquierda) posee una cantidad mayor de ADH1 β en comparación con A549 (derecha). Consiguientemente, se realizó un análisis densitométrico de las bandas de western blot correspondientes a la proteína ADH1 β en las células A549 y MRC-5. Para este análisis se utilizó el software Image-J. Las mediciones de las bandas de expresión de cada proteína se normalizaron con el control de carga β -Actina y estos resultados semi cuantitativos se muestran comparados en la figura 14.

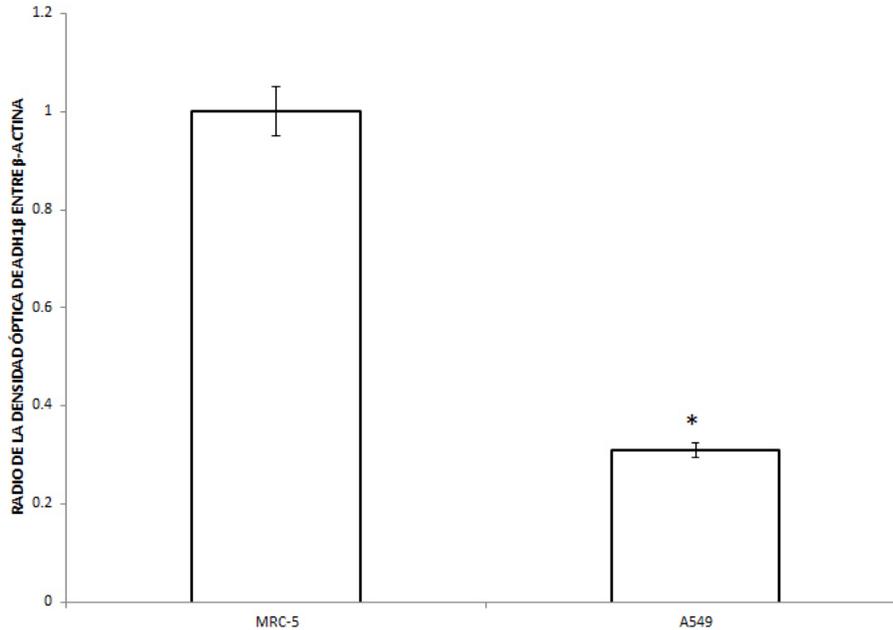


Figura 14. Análisis densitométrico de la expresión de la proteína ADH1β en la línea celular A549 y MRC-5. Se observa que la densidad óptica que corresponde a la expresión de la proteína ADH1B es menor en la línea celular A549 en comparación a la línea celular MRC-5. Las diferencias estadísticas con respecto al control son representadas como * $P=0.008$.

El análisis densitométrico de las bandas corrobora la noción de que existe una mayor expresión de la proteína ADH1β en las células MRC-5 que en las células A549. Tras confirmar la sub expresión de ADH1β en la línea celular A549 se procedió a transfectar A549 con el vector pCMV6-ADH1β con el fin de elevar su expresión y observar los efectos que una mayor expresión de ADH1β tiene sobre la viabilidad celular la línea de cáncer pulmonar A549.

9.2 ADH1β es Expresada en la Línea Celular A549 Transfectada con el Vector pCMV6-ADH1β.

La transfección de la línea celular A549 con un agente lipocatiónico es un modelo de transfección que ya ha sido estudiado por diferentes autores (Gao *et al.*, 1991). Con el objetivo de expresar de forma exógena la enzima ADH1β en la línea celular A549 se transfectaron las células con el vector pCMV6-ADH1β y se realizó un Western Blot contra la enzima ADH1β para evaluar su expresión durante los periodos de 24, 48 y 72 horas post-transfección a dos diferentes

concentraciones de Lipofectamina 2000 y así poder determinar la mejor condición de transfección (Figura 15).

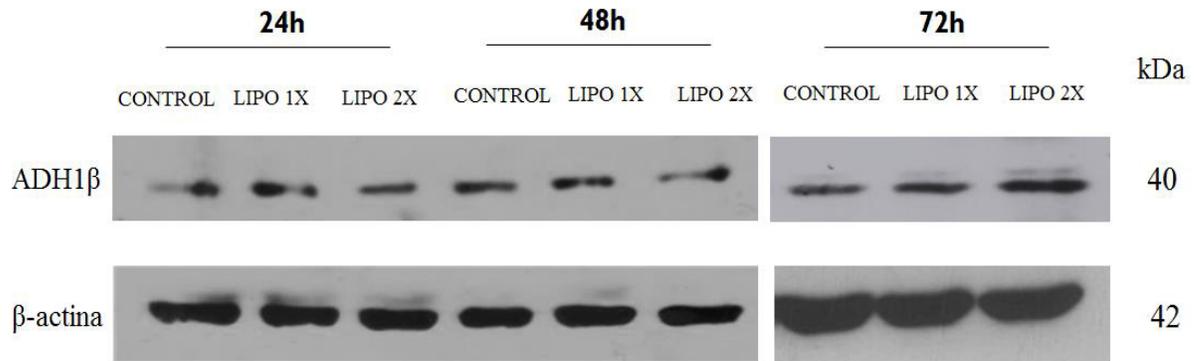


Figura 15. Expresión de la proteína ADH1B en las células A549 transfectadas. La expresión de la proteína ADH1B fue analizada mediante Western Blot en las células A549 transfectadas con pCMV6-ADH1β. La proteína β-actina fue usada como control de carga a las 24, 48 y 72 horas con dos diferentes concentraciones de Lipofectamina 2000.

La expresión de la enzima ADH1β fue evaluada en células A549 transfectadas a diferentes tiempos después de la transfección (24, 48 y 72 horas), así como a dos diferentes concentraciones de Lipofectamina 2000 (1X, 2X). En la figura 16 se puede observar que existe una mayor intensidad de la banda correspondiente a la enzima ADH1β 72 horas Lipofectamina 2X (extremo derecho) en comparación al resto de los tiempos. Para corroborar esto, se analizó y se comparó la densidad óptica de las bandas obtenidas en el western blot de ADH1β utilizando el software Image-J (Figura 16).

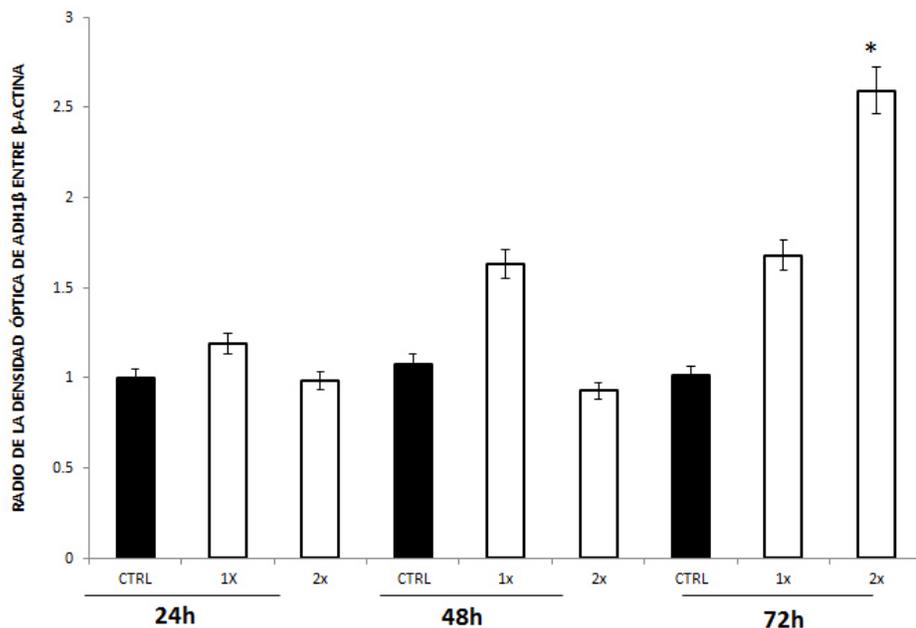


Figura 16. Análisis densitométrico de la sobreexpresión de la proteína ADH1 β en las células A549 transfectadas. Las células fueron transfectadas con pCMV6-ADH1 β en periodos de 24, 48 y 72 horas a dos diferentes concentraciones de Lipofectamina 2000. Las células utilizadas como control están representadas en negro. Las diferencias estadísticas con respecto al control son representadas como * $P=0.004$

Se determinó que la condición de 72 horas con Lipofectamina al 2x (7.5 μ l) fue la que mostró una mayor expresión de ADH1 β y se seleccionó como la mejor condición para los ensayos consiguientes. Los cultivos se mantuvieron bajo las condiciones previamente descritas durante 72 horas.

Se procedió a observar las células A549 bajo el microscopio invertido con el objetivo de determinar si había cambios en la apariencia de la población celular (Figura 17).

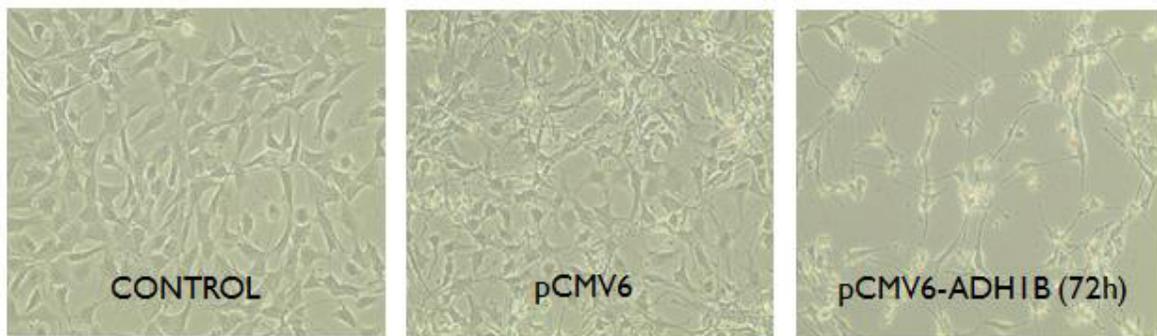


Figura 17. Morfología de las células A549 transfectadas con pCVM6 y pCMV6-ADH1B a las 72 horas. Las células A549 fueron transfectadas con pCMV6 y PCMV6-ADH1B a las 72 horas. Fotografías en campo claro (10X) (microscopio Nikon T5100).

El efecto más notable de la expresión exógena de ADH1 β de las células transfectadas con pCMV6-ADH1 β a las 72 horas fue una reducción en la población celular así como un cambio en la apariencia de las células (derecha) cuando son comparadas con el control (izquierda) o con las mismas condiciones de transfección pero en el vector vacío pCMV6 (centro).

Con el objetivo de determinar si el vector pCMV6-ADH1 β había sido introducido exitosamente en las células A549, se midió la fluorescencia emitida por la proteína verde fluorescente (GFP) en un ensayo de gen reportero (Zhang *et al.*, 1996) que fue administrado en conjunto con el vector pCMV6-ADH1 β a una concentración de 1/3 la concentración del vector pCMV6-ADH1 β . La fluorescencia se midió en el citómetro de flujo en el canal FL-1 (Figura 18).

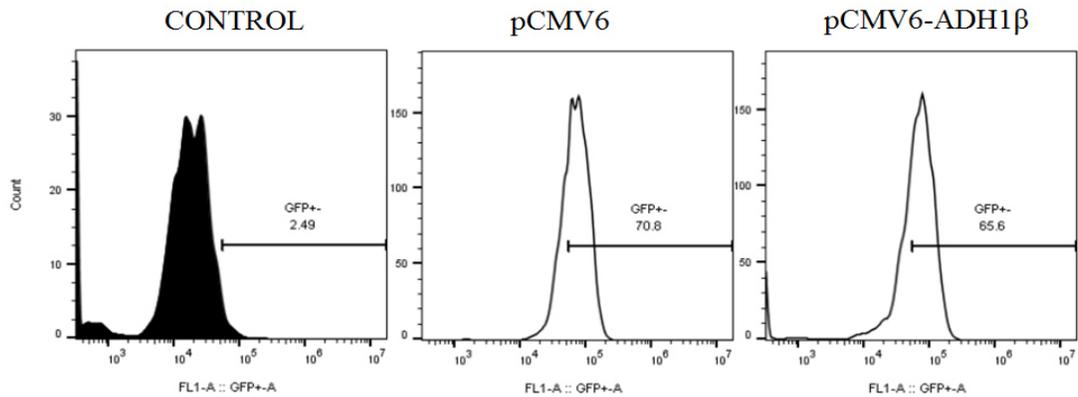


Figura 18. Evaluación de la fluorescencia emitida por GFP en las células A549 transfectadas. Se analizó la fluorescencia en el canal FL-1 de las células A549 dejadas como control (representadas en negro), células A549 transfectadas con el vector vacío pCMV6 y las células A549 transfectadas con pCMV6-ADH1 β .

El porcentaje de células A549 transfectadas con pCMV6-ADH1 β que fueron marcadas positivamente con GFP fue de aproximadamente 70% para pCMV6-ADH1 β y en cuanto el vector vacío pCMV6 fue de 65% en comparación con las células control que no fueron transfectadas.

A continuación se muestra de manera gráfica los resultados de citometría para el ensayo de GFP (Figura 19).

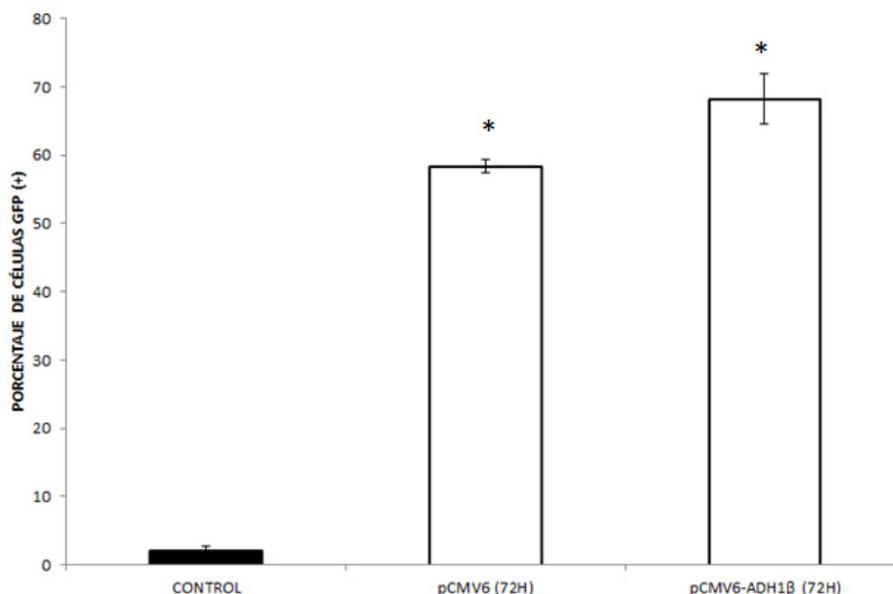


Figura 19. Evaluación de la fluorescencia emitida por GFP en células A549 transfectadas. La fluorescencia fue determinada en las células A549 transfectadas con el vector vacío pCMV6 y células A549 transfectadas con pCMV6-ADH1β. Las diferencias estadísticas con respecto al control son representadas como * $P=0.004$ y $P=0.005$.

El porcentaje de células marcadas como GFP positivas fue del 70% para las células A549 transfectadas con pCMV6-ADH1β, de 60% para las células A549 transfectadas con el vector vacío pCMV6 y finalmente de 10% para las células A549 dejadas como control. Mediante este ensayo nos aseguramos que tanto como el vector pCMV6-ADH1β como GFP fueron introducidos a las células exitosamente.

No obstante, se realizó otro ensayo para determinar si el vector pCMV6-ADH1β había sido introducido exitosamente en las células A549 donde se procedió a evaluar la expresión de la proteína DDK-FLAG, el cual es un fragmento de la proteína Myc que está fusionada con ADH1β en el mapa del vector (Véase figura 13). Además se evaluó la expresión del citocromo CYP2E1, ya que se quería determinar su expresión en relación con la proteína ADH1β debido a que se cree que variaciones en genes metabólicos como CYP2E1 modifican los procesos metabólicos de algunos carcinógenos y se sugiere que están relacionados al riesgo de cáncer (Wang *et al.*, 2010). (Figura 20).

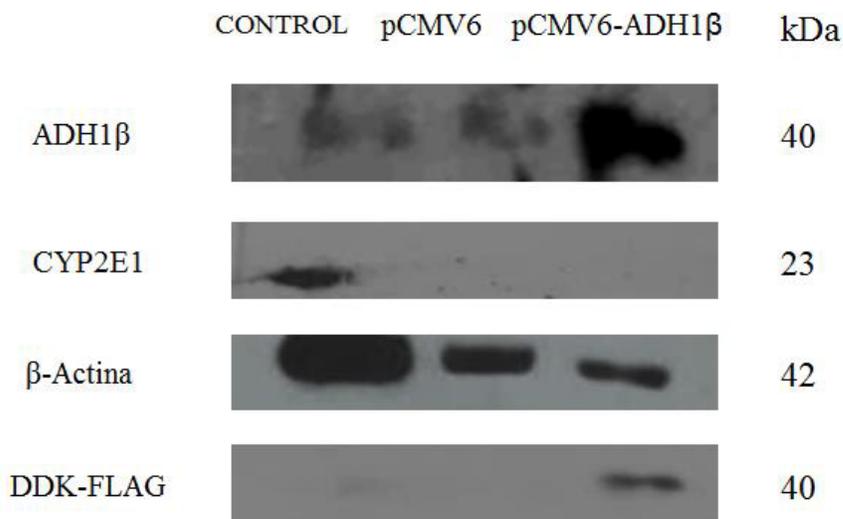


Figura 20. Expresión de las proteínas ADH1B, DDK, CYP2E1 en las células transfectadas. Las células A549 transfectadas con el vector pCMV6-ADH1B fueron analizadas mediante western Blot para determinar la expresión de la proteína ADH1B, DDK, CYP2E1 y β -actina se utilizó como control de carga.

Se observa que la banda correspondiente a la proteína ADH1 β de las células A549 transfectadas que expresan ADH1 β exógenamente tiene una mayor intensidad en comparación con el control o el vector vacío pCMV6. El péptido DDK-FLAG muestra señal únicamente en las células que fueron transfectadas con el vector pCMV6-ADH1 β , confirmando así que el plásmido fue introducido y expresado exitosamente en las células A549 transfectadas con el vector pCMV6-ADH1 β . La expresión del citocromo CYP2E1 solo se mostró en las células que no fueron transfectadas (control).

Posteriormente, se realizaron diferentes ensayos para determinar la capacidad metabólica, la producción de especies reactivas de oxígeno y la exposición de fosfatidil serina de las células A549 que expresan exógenamente ADH1 β .

9.3 La Expresión Exógena de ADH1 β Reduce la Capacidad Metabólica de la Línea Celular A549 Transfectada con pCMV6-ADH1 β .

Para determinar si la expresión exógena de ADH1 β en las células transfectadas con pCMV6-ADH1 β tiene efecto sobre la viabilidad y la capacidad metabólica de las células A549 se analizó la capacidad de metabolizar MTT después de la transfección con el ensayo de MTT. Para este experimento las células fueron transfectadas con pCMV6-ADH1 β a diferentes tiempos comenzando con 24 horas, 48 horas y finalmente 72 horas (Figura 21).

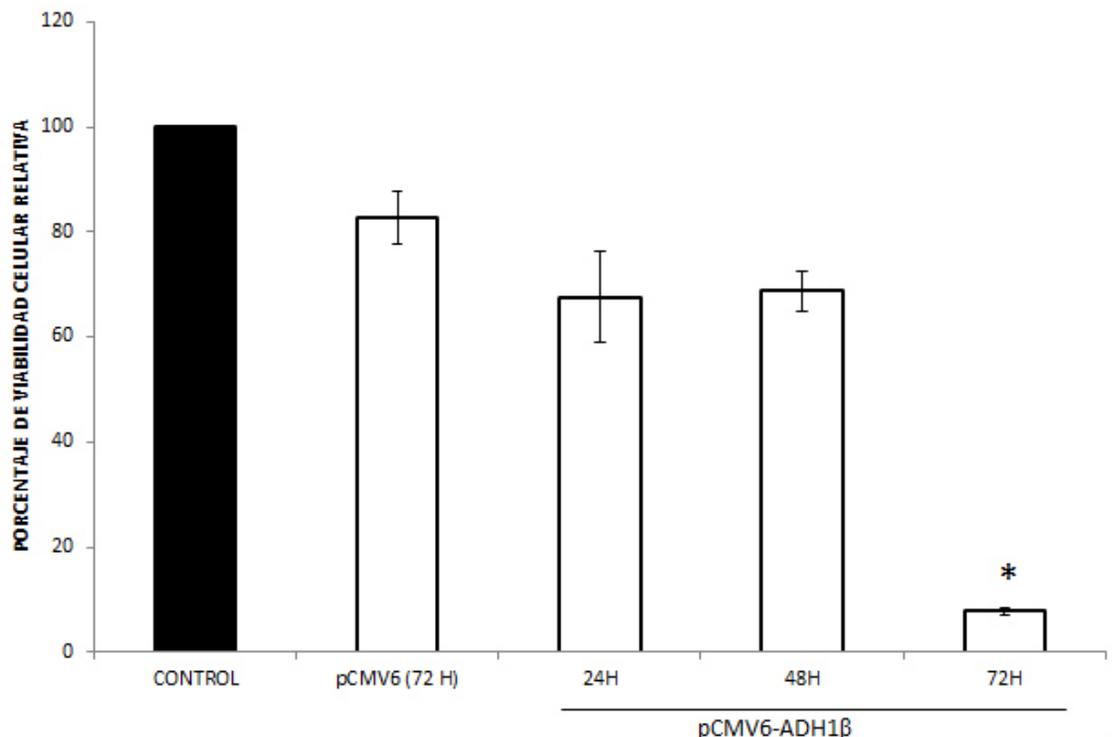


Figura 21. Evaluación de la viabilidad de las células A549 transfectadas mediante Ensayo de MTT. Las células A549 transfectadas con el vector pCMV6 a las 72 horas y las células A549 transfectadas con pCMV6-ADH1 β a las 24, 48 y 72 horas. Las diferencias estadísticas con respecto al control son representadas como * $P=0.001$.

Como se muestra en la Figura 21, el porcentaje de viabilidad celular disminuye ligeramente hasta el 80% de viabilidad celular relativa para las células A549 transfectadas con el vector vacío pCMV6, mientras que la viabilidad relativa de las células que expresan ADH1 β exógenamente disminuye a 65% a las 24 y 48 horas y hasta en un 10% en la condición de 72 horas en comparación a las células A549

dejadas como control (negro), esto con un nivel de significancia de $P=0.001$. Estos resultados concuerdan con los ensayos previos donde se determinó que la condición de 72 horas exhibe una mayor expresión de la enzima ADH1 β .

Debido a esta disminución en la capacidad metabólica de las células A549 que expresan exógenamente ADH1 β se procedió a evaluar si existía un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno que estuviera contribuyendo a este fenómeno.

9.4 La Expresión Exógena de ADH1 β Aumenta la Producción de Especies Reactivas de Oxígeno de la Línea Celular A549 Transfectada con pCMV6-ADH1 β .

Ya que el estado de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) afecta de manera importante la viabilidad celular (Ishikawa *et al.*, 2008), se procedió a evaluar este parámetro utilizando el compuesto DCFDA en un ensayo de citometría de flujo de las células A549 transfectadas con el vector pCMV6-ADH1 β que expresan ADH1 β de manera exógena. (Figura 22).

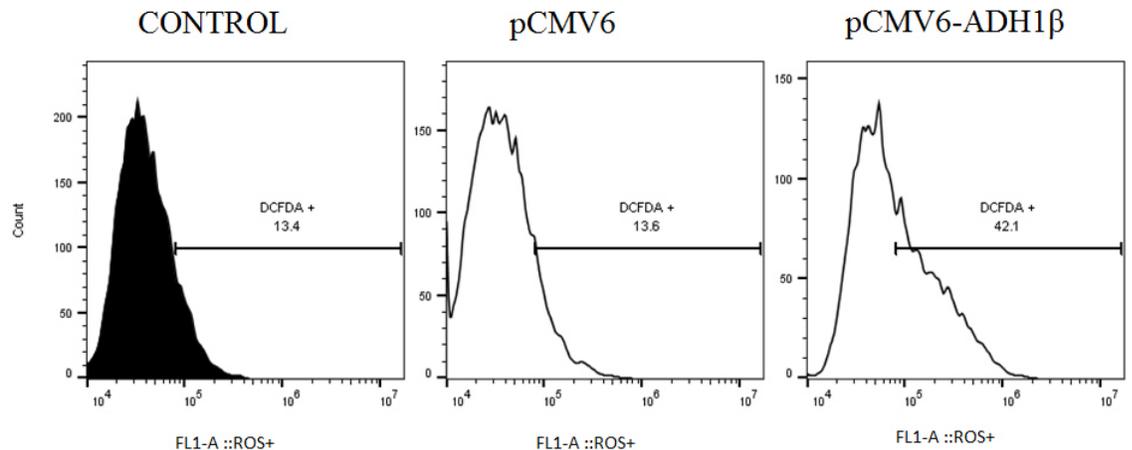


Figura 22. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células transfectadas. Las células A549 transfectadas con el vector pCMV6-ADH1B que expresan ADH1B de manera exógena fueron analizadas mediante el ensayo de DCFDA al tiempo de 72 horas.

Los resultados del ensayo con DCFDA mostraron un mayor porcentaje de células marcadas positivamente en la población correspondiente a las células A549 que expresan ADH1 β exógenamente (derecha) en comparación a la población

transfectada con el vector vacío pCMV6 (centro), que exhibió un porcentaje ligeramente mayor al de las células A549 dejadas como control (izquierda) pero significativamente menor al de las células A549 que expresan ADH1 β de manera exógena. A continuación se muestra de manera gráfica los resultados de citometría para el ensayo de DCFDA (Figura 23).

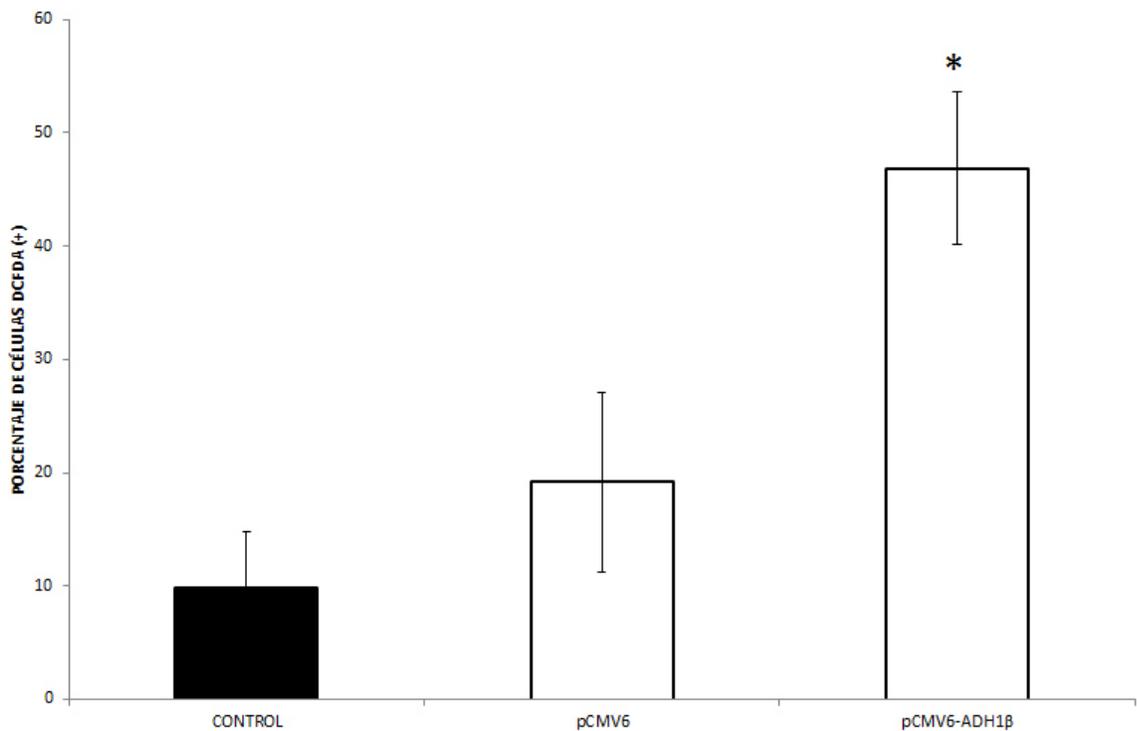


Figura 23. Porcentaje de especies Reactivas de oxígeno (ROS) en las células transfectadas. Las células transfectadas que expresan ADH1B exógenamente fueron analizadas mediante el ensayo de DCFDA. Las diferencias estadísticas con respecto al control son representadas como * $P=0.001$.

Los resultados de este ensayo sugieren que las células A549 que expresan ADH1 β exógenamente experimentan un incremento del 50% estadísticamente significativo en la producción de especies reactivas de oxígeno a las 72 horas, no así para las células que son transfectadas con el vector vacío pCMV6 en donde no existen cambios estadísticamente significativos con respecto al control. Estos resultados concuerdan con el ensayo de MTT donde la capacidad metabólica de las células que expresan ADH1 β exógenamente se ve reducida a las 72 horas.

Con el objeto de evaluar si este fenómeno traía consecuencias que llevaran a la muerte de las células A549 que expresan ADH1 β exógenamente se procedió a

evaluar la exposición de la molécula fosfatidil serina de las células A549 que expresan ADH1 β exógenamente mediante el marcaje con Anexina V.

9.5 La Expresión Exógena de ADH1 β Aumenta la Exposición de Fosfatidil Serina de la Línea Celular A549 Transfectada con pCMV6-ADH1 β .

Primero se procedió a evaluar los niveles de Anexina V en las células A549 transfectadas con el vector pCMV6-ADH1 β (Figura 24).

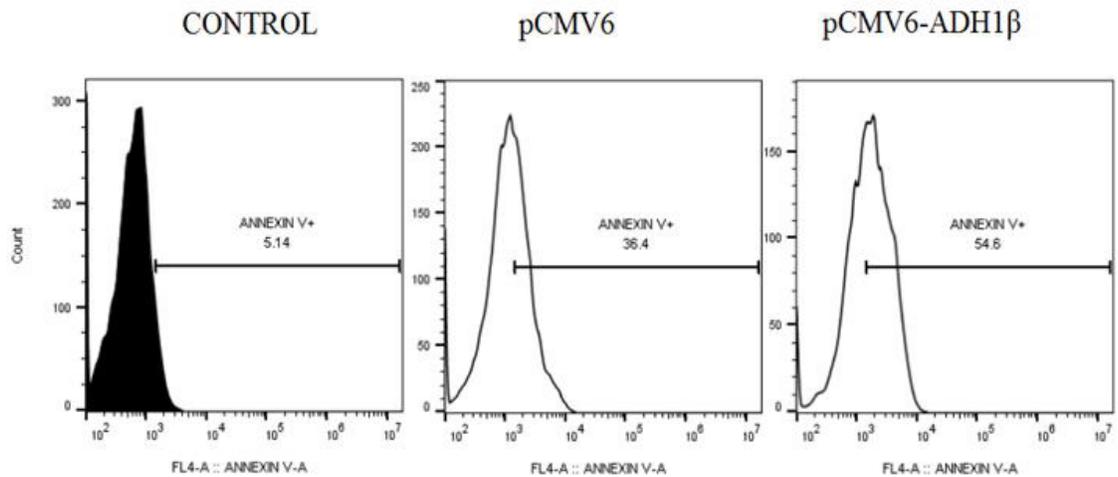


Figura 24. Determinación de Niveles de Anexina V en células A549 transfectadas.

Las células A549 transfectadas con el vector pCMV6-ADH1 β que expresan ADH1 β de manera exógena fueron analizadas mediante el ensayo de DCFDA al tiempo de 72 horas.

De manera similar a los resultados previos, las células transfectadas con pCMV6-ADH1 β (derecha) exhibieron un porcentaje de marcaje con Anexina V mayor al de las células transfectadas con el vector vacío pCMV6 (centro) y a las células control (izquierda).

A continuación se muestran en gráfica de barras los niveles de Anexina V en células A549 transfectadas con pCMV6-ADH1 β (Figura 25).

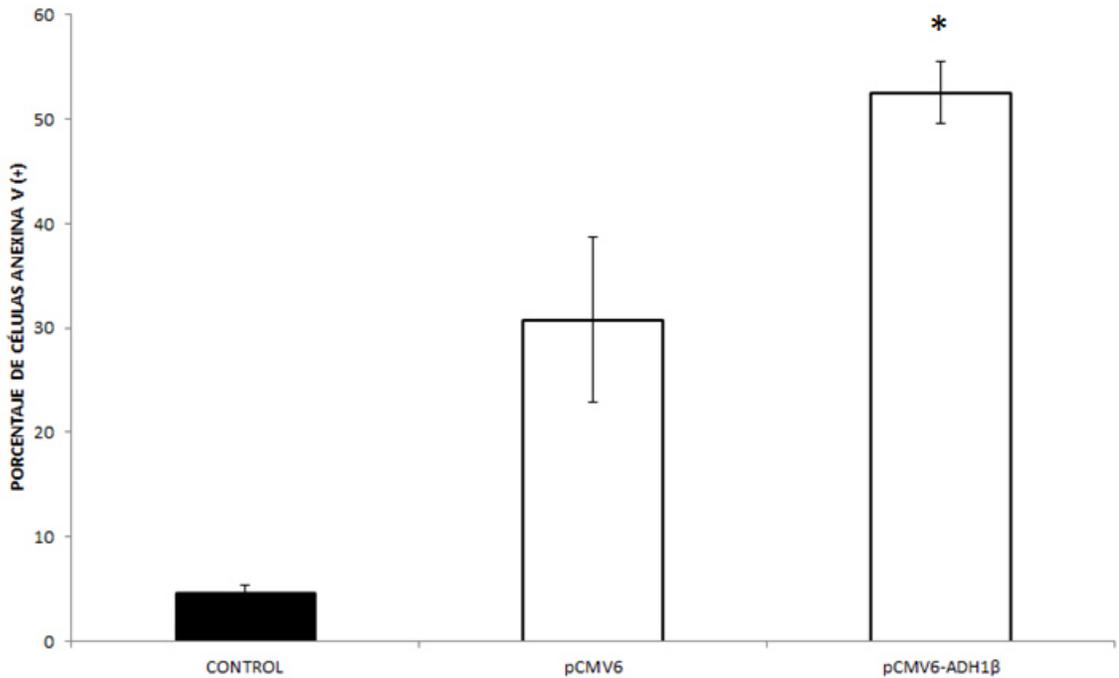


Figura 25. Porcentaje de células A549 transfectadas positivas para Annexina V. El ensayo se realizó en células A549 transfectadas con pCMV6-ADH1β a 72 horas. Diferencias estadísticas respecto al control, * $P=0.003$.

Se encontró diferencia significativa con respecto al control en cuanto al porcentaje de células A549 transfectadas con el vector pCMV6-ADH1β que fueron marcadas positivamente con Annexina V. Estos resultados sugieren que la transfección con el vector pCMV6-ADH1β induce un aumento en la exposición de la Fosfatidil Serina de las células A549.

10 DISCUSIÓN

El Cáncer pulmonar es la segundo tipo más común de cáncer y es la principal causa de mortalidad de cáncer tanto para hombres como mujeres (Siegel *et al.*, 2012). Se estima que existen 1.6 millones de casos nuevos y 1.37 millones de muertes debido a el cáncer pulmonar cada año (Furrukh *et al.*, 2013). En años recientes, se han explorado nuevos tratamientos con mecanismos de acción novedosos, y se ha promovido el aumento en el conocimiento sobre los procesos biológicos y fisiopatológicos clave del cáncer pulmonar.

El gen ADH1 β ha sido reportado como sub expresado a nivel de RNAm en cáncer pulmonar (Sarah *et al.*, 2012). El papel de esta enzima en la carcinogénesis y la progresión del cáncer pulmonar no han sido bien esclarecidos; aunque se conoce su fundamental importancia para los procesos que regulan la homeostasis de las rutas metabólicas del etanol y el ácido retinoico. Diversos estudios reportan que alteraciones en estas rutas podrían representar puntos clave en la carcinogénesis y progresión pulmonar. En general, un desbalance en la homeostasis de los retinoides se ha asociado con una variedad de enfermedades humanas incluyendo cáncer (Love *et al.*, 1994). Se espera que los resultados de este proyecto de tesis aumenten la comprensión de los procesos celulares que ADH1 β regula o sobre los cuales tiene un impacto en la línea celular de cáncer pulmonar A549. La ruta metabólica que la enzima ADH1 β regula es la del etanol, compuesto que ha sido clasificado como carcinógeno del grupo 1, sin embargo, la enzima ADH1 β posee la capacidad de metabolizar retinol, un paso necesario para la producción de ácido retinoico biológicamente activo, el cual interactúa con los receptores nucleares de ácido retinoico RAR-RXR, activando así la transcripción de una variedad de genes involucrados en el desarrollo temprano del tejido pulmonar en un proceso llamado señalización ácido retinoica.

El primer experimento que se presenta en esta tesis, es la comparación entre la expresión de la enzima ADH1 β de las dos líneas celulares A549 y MRC5. En estudios anteriores se había reportado la sub expresión de ADH1 β en cáncer pulmonar a nivel de RNAm (Sarah *et al.*, 2012), se esperaba que a nivel de proteína

y en una línea celular de cáncer pulmonar se observara el mismo fenómeno. Con el propósito de verificar la sub expresión de ADH1 β en la línea celular A549 se comparó la expresión de ésta con la línea celular pulmonar normal utilizada como control MRC5 (Mulhivill *et al.*, 2012) (Figura 13). Al compararla con la línea control MRC5 se observa la sub expresión de ADH1 β en A549 (Figura 14). Sarah *et al.*, 2012 y Kropitova *et al.*, 2014 han sugerido que la sub expresión de ADH1 β está relacionada al cáncer pulmonar. Aunque la relación entre el RNAm y la proteína de ADH1 β no fue evaluada en este proyecto de tesis, es probable que al existir menos RNAm, la cantidad de proteína activa también disminuirá. Una sub expresión de la enzima ADH1 β , debería tener un efecto importante en el metabolismo del ácido retinoico y el etanol; ocasionando un desbalance en la homeostasis de los retinoides. Al haber una sub expresión de la enzima ADH1 β se espera que su actividad en los procesos celulares también se vea disminuida. Molotkov *et al* demuestran que la reducción en la actividad de ADH1 β resulta en un decremento en el ácido retinoico biológicamente activo en el citoplasma, llevando a una transformación estructural de la matriz extracelular y a ciertas anomalías que han sido asociadas con el desarrollo de cáncer.

Posteriormente, las células A549 fueron transfectadas con el vector de expresión pCMV6-ADH1 β con ayuda del agente lipocatiónico Lipofectamina 2000. La transfección de la línea celular A549 con un agente lipocatiónico es un modelo de transfección que ya ha sido estudiado por diferentes autores (Gao *et al.*, 1991). El objetivo de esta transfección era elevar los niveles celulares de la enzima ADH1 β y así restablecer la funcionalidad de los procesos que ADH1 β regula. En primer lugar se realizaron ensayos para determinar las mejores condiciones de transfección tanto como para tiempo de transfección y concentración de agente lipocatiónico, donde se determinó que a las 72 horas con una concentración de Lipofectamina de 2X se obtenían mejores resultados (Figura 15/16). Se estudió la morfología que adquieren las células al ser transfectadas con el vector pCMV6-ADH1 β a las 72 horas (Figura 17) y se realizaron ensayos para confirmar que el vector había sido introducido y que la enzima ADH1 β había aumentado sus niveles. Se verificó la introducción del vector pCMV6-ADH1 β con un ensayo de gen reportero utilizando la proteína verde

fluorescente GFP (Figura 18/19). De manera similar, se verificó la expresión de la enzima ADH1 β proveniente del vector pCMV6-ADH1B evaluando la expresión del fragmento de la proteína DDK-Flag (Myc) mediante western blot (Figura 20). De esta manera se confirmó la transfección de las células A549 con el vector pCMV6-ADH1 β .

Se observó un aumento en la expresión de ADH1 β en las células A549 transfectadas con pCMV6-ADH1 β en comparación con las células control (Figura 20). Además se evaluó la expresión de la proteína CYP2E1, sin embargo esta solo fue observada en las células control y no en las células transfectadas (Figura 20). En ausencia de ADH1, los niveles de CYP2E1 son elevados por el etanol y durante su reacción catalítica con el oxígeno molecular especies reactivas de oxígeno como el superóxido y peróxido de hidrógeno son producidas (Gonzalez *et al.*, 2005). CYP2E1 parece jugar un rol importante en los mecanismos por los cuales el etanol genera stress oxidativo y es hepatotóxico (Jimenez-Lopez *et al.*, 2001). Esto es importante ya que además de producir acetaldehído con potencial carcinogénico, el metabolismo por CYP2E1 resulta en una liberación significativa de radicales libres los cuales incrementan las especies reactivas de oxígeno (ROS) y como consecuencia esto puede causar daño a proteínas, ácidos nucleicos e inducir cambios de señalización. Estos son procesos que inhiben al glutatión reducido (GSH) y otros sistemas de defensa contra el stress oxidativo.

Tomando en cuenta los parámetros anteriormente discutidos, se buscó determinar si el cambio en la expresión de la enzima ADH1 β repercute de manera importante sobre la viabilidad de las células de cáncer pulmonar A549. Se analizó si la expresión de la enzima ADH1 β genera alteraciones en la actividad metabólica de la célula al evaluar las células A549 transfectadas con el vector pCMV6-ADH1 β en un ensayo de MTT. Las células A549 transfectadas con el vector pCMV6-ADH1 β sufren un deterioro en la capacidad de metabolizar el MTT, siendo este significativo al tiempo de 72 horas (Figura 21). Estos resultados nos permiten inferir que la condición original de Subexpresión de la enzima ADH1 β es importante para mantener la viabilidad de las células de cáncer pulmonar A549, ya que al elevar la

expresión de esta enzima de manera exógena se observa un detrimento en la capacidad metabólica de las células. El mecanismo por el cual este fenómeno es llevado a cabo no es claro pero podría estar relacionado a las rutas metabólicas que ADH1 β regula y al estado de las especies reactivas de oxígeno que son afectados por la expresión de ADH1 β .

Debido a que bajo condiciones de stress oxidativo las especies reactivas de oxígeno pueden llevar a lesiones moleculares fatales que contribuyen a la carcinogénesis (Ishikawa *et al.*, 2008), se determinó analizar el estado de las especies reactivas de oxígeno de las células A549 transfectadas con el vector pCMV6-ADH1 β utilizando el ensayo de DCFDA evaluando su intensidad de fluorescencia en el citómetro de flujo. Los resultados muestran que existe un incremento significativo en los niveles de especies reactivas de oxígeno de la línea células A549 transfectada con pCMV6-ADH1 β en contraste a las células control o a las que fueron transfectadas con el vector pCMV6 (Figura 22/23). Estos datos representan un hallazgo importante ya que se ha demostrado que el ROS intracelular es considerado un indicador de un metabolismo celular maligno o alterado y además puede activar la ruta de señalización PI3k/Akt la cual es un importante mediador del desarrollo tumoral (Zhang *et al.*, & Okoh *et al.*, 2013).

Se buscó ratificar que ADH1 β es importante para la proliferación de la línea celular de cáncer pulmonar al evaluar la exposición de la molécula fosfatidil serina utilizando el ensayo de Anexina V. En los resultados se observa un incremento en el porcentaje de células marcadas positivas para la Anexina V tanto en el grupo de células A549 transfectadas con pCMV6, aunque este no es significativo, como en el grupo de células A549 transfectadas con pCMV6-ADH1 β siendo este significativo estadísticamente (Figura 24/25). Estos resultados sugieren que las células A549 transfectadas con pCMV6-ADH1 β experimentan un tipo de muerte con características más cercanas a la apoptosis.

En Resumen, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la línea A549 tiene una sub expresión a nivel proteína de la enzima ADH1 β en comparación a la línea MRC5, una línea celular pulmonar normal (Figura 14); las células A549

transfectadas con el vector pCMV6-ADH1 β exhiben una viabilidad relativa disminuida (Figura 21); un nivel aumentado de Especies Reactivas de Oxígeno (Figura 22) y un nivel aumentado de la exposición de la fosfatidil serina (Figura 24/25).

Este proyecto de tesis se hizo con el fin de demostrar la importancia de la enzima ADH1 β y cómo un cambio en la expresión de esta puede impactar la viabilidad y proliferación de la línea celular de cáncer pulmonar A549. Se espera que los resultados de esta investigación expandan los conocimientos actuales sobre la biología y fisiopatología del cáncer pulmonar y que acerquen los esfuerzos científicos a un mejor entendimiento de esta enfermedad.

11 CONCLUSIONES

Estos resultados sugieren que la expresión exógena de ADH1 β en la línea celular A549 induce mecanismos relacionados con una disminución en la viabilidad relativa de las células y que además propician la exposición de la fosfatidil serina en la membrana de las células al mismo tiempo que inducen una mayor producción de especies reactivas de oxígeno. Una Enzima, y en particular ADH1, participa en el metabolismo celular de manera importante. Una alteración en el metabolismo del etanol y vitamina A causada por una anomalía en los niveles de ADH1 puede activar mecanismos de transformación maligna mediados por ROS, señalización alterada de ácido retinoico. El aumento en el conocimiento sobre la fisiopatología, carcinogénesis, y progresión tumoral del cáncer pulmonar es importante para lograr obtener una visión más amplia y acertada de los procesos tumorales. De esta manera, el aumento en el conocimiento de los procesos moleculares puede llevar al desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico y pronóstico que sean no invasivas y costo-efectivas, sensibles y con un buen índice de predictibilidad; además, propicia el descubrimiento de posibles blancos terapéuticos que disminuyan la progresión tumoral o en el mejor de los casos, erradiquen el cáncer y prevengan una regresión.

- La línea celular de cáncer pulmonar A549 posee una sub expresión a nivel proteína de la enzima ADH1 β en comparación a la línea MRC5.
- Las células A549 transfectadas con el vector pCMV6-ADH1 β exhiben una viabilidad disminuida.
- Las células A549 transfectadas con el vector pCMV6-ADH1 β exhiben un nivel aumentado de Especies Reactivas de Oxígeno.
- Las células A549 transfectadas con el vector pCMV6-ADH1 β exhiben un nivel aumentado en la exposición de la fosfatidil serina.

12 BIBLIOGRAFÍA

- American Cancer Society (2001). Cancer Facts and Figures.
- Acker T. and Plate K. H. (2002). A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology. *J. Mol. Med.* 80, 562–575.
- Altenberg B. and Greulich K. O. (2004). Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* 84, 1014–1020.
- Aviel-Ronen S, Blackhall FH, Shepherd FA, Tsao MS. (2006). K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. *Clinical Lung Cancer. Cancer Information Group.* 8 (1): 30–38.
- Baan, R. et al. (2007) Carcinogenicity of alcoholic beverages. *Lancet Oncol.*, 8, 292–293.
- Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. (2001). A metaanalysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer.*; 85:1700–1705.
- Berard J, Laboune F, Mukuna M, Masse S, Kothary R, Bradley WE. (1997). Lung tumors in mice expressing an antisense RAR β 2 transgene. *Biochem.* 8 426, 437.
- Cancer staging (2013). National Cancer Institute.
- Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Landum RW, Cheng MS, Wu JF, Floyd RA (1991). Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 88 (9): PMC 51506. PMID 1673789.
- Catherino W, Malik M. (2007). Uterine leiomyomas express a molecular pattern that lowers retinoic acid exposure. *Fertil Steril*, 87, pp. 1388–1398.
- Chambon P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB. J.* 1996; 10: 940–54.2.
- Chan, DA, Giaccia AJ. (2007). Hypoxia, gene expression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 26:333–339.

- Chang YS, Chung JH, Shin DH. (2004). Retinoic acid receptor-beta expression in stage I non-small cell lung cancer and adjacent normal appearing bronchial epithelium *Yonsei Med J*, 45, pp. 435–442.
- Clagett-Dame, M., and DeLuca, H. F. (2002). *Annu. Rev. Nutr.* **22**, 347–381.
- Defining Cancer (2014). National Cancer Institute.
- Dickinson BC, Chang CJ (2011). Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses". *Nature Chemical Biology* 7 (8): 504–11. doi:10.1038/nchembio.607.
- Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg (2000). The Hallmarks of Cancer Review *Cell*, Vol. 100, 57–70.
- Dragnev KH, Petty WJ, Dmitrovsky E. (2003). Retinoid targets in cancer therapy and chemoprevention *Cancer Biol Ther*, pp. S150–S156.
- Duester G, Shean ML, McBride MS, Stewart MJ. (1991). Retinoic acid response element in the human alcohol dehydrogenase gene ADH3: implications for regulation of retinoic acid synthesis. *Mol. Cell. Biol.*; 11: 1638–46.
- Duester G. (2008). Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 134(6): 921–31.
- Duester, G. (2000) Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* 267, 4315–4324.
- Edenberg HJ. (2000). Regulation of mammalian alcohol dehydrogenase genes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.*64:295–341.
- Fennema O. (2008). *Fennema's Food Chemistry*. CRC Press Taylor & Francis. pp. 454–455.
- Ferdinand Marlétaz, Linda Z. Holland, Vincent Laudet, Michael Schubert (2006). Review Retinoic acid signaling and the evolution of chordates. *Int J Biol Sci*; 2(2):38-47. doi:10.7150/ijbs.2.38.
- Gao, P. et al. (2007). HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo. *Cancer Cell* 12, 230–238.
- Globocan (2012). International Agency for Research on Cancer.
- Gonzalez FJ. (2005). Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat. Res.* 569:101–110.

- Guohong Zhang , Vanessa Gurtu, Steven R. Kain (1996). An Enhanced Green Fluorescent Protein Allows Sensitive Detection of Gene Transfer in Mammalian Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 227, Issue 3, 23 October, Pages 707-711.
- Harris AL. (2002). Hypoxia: a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*; 2:38 – 47.
- Harris CC, Sporn MB, Kaufman DG, Smith JM, Jackson FE, Saffiotti U. (1972) Histogenesis of squamous metaplasia in the hamster tracheal epithelium caused by vitamin A deficiency or benzo(a)pyrene-Ferric oxide. *J. Natl Cancer Inst.*; 48: 743–61.
- Hellgren M, Strömberg P, Gallego O, Martras S, Farrés J, Persson B, Parés X, Höög JO. (2007). Alcohol dehydrogenase 2 is a major hepatic enzyme for human retinol metabolism. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 64 (4): 498–505.
- Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. (2008). Lung Cancer. *J Med N Engl*, 359(13):1367-80.
- Hero, A. O., and G. Fleury. (2004). Pareto-optimal methods for gene ranking. *J. VLSI Signal Process. Syst.* 38:259–275.
- Hesson LB, Cooper WN, Latif F. (2007). Evaluation of the 3p21.3 tumour-suppressor gene cluster. *Oncogene* in press., May 28.
- History of Cancer (2012). American Cancer Society.
- Hong WK, Itri LM. (1994). Retinoids and human cancer. New York: Raven Press.; 597-658.
- Hong WK, Itri LM. (1994). Retinoids and human cancer. *The Retinoids. Biology, Chemistry, and Medicine*, 2nd edn. Raven Press, New York.; 597–630.
- Hough S, Avioli LV, Muir H. (1988). Effects of hypervitaminosis A on the bone and mineral metabolism of the rat. *Endocrinology* 122 (6): 2933–9.
- Houle B, Rochette-Egly C, Bradley WE. (1993). Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor b in human epidermoid lung cancer cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1993; 90: 985–9.

- Inui N, Sasaki S, Suda T, Chida K, Nakamura H, (2003) The loss of retinoic acid receptor α , β and alcohol dehydrogenase3 expression in nonsmall cell lung cancer. *Respirology*: 8 302-209.
- Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ (1997). Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 275 (5306): 1649–52. doi:10.1126/science.275.5306.1649. PMID 9054359.
- Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, and Hayashi J. (2008). ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* 320: 661–664, 156, 162).
- Jimenez-Lopez JM, Cederbaum AI. (2001). CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity: role in ethanol-induced liver injury. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 1:671–685.
- Kameyama K, Huang CL, Liu D, Okamoto T, Hayashi E, Yamamoto Y, Yokomise H. (2002). Problems related to TNM staging: patients with stage III non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 124(3):503-10.
- Kato S, Mano H, Kumazawa T, Yoshizawa Y, Kojima R, Masushige S. (1992). Effect of retinoid status on α , β and γ retinoic acid receptor mRNA levels in various rat tissues. *Biochem. J.*; 286: 755–60.
- Kawashima, Y et al. (2014). Efficient extraction of proteins from formalin-fixed paraffin-embedded tissues requires higher concentration of tris (hydroxymethyl) aminomethane. *Clinical Proteomics*, 11(1), p.4.
- Koop DR. (1992). Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P4502E1. *FASEB J.* 6:724–730.
- Kovacs B, Stöppler MC. (2011). Alcohol and Nutrition. *MedicineNet, Inc.* Retrieved 2011-06-07.
- L.M. De Luca, K. Kosa, F. Andreola, (1997). The role of vitamin A in differentiation and skin carcinogenesis, *J. Nutr.*
- Lee GS, Kochhar DM, Collins MD. (2004). Retinoid-induced limb malformations. *Curr. Pharm. Des.*; 10(22):2657-99.

- Li L, Chen SH, Zhang Y, Yu CH, Li SD, Li YM. (2006). Is the hypoxia-inducible factor 1 alpha mRNA expression activated by ethanol-induced injury, the mechanism underlying alcoholic liver disease?. *Hepatobiliary Pancreatic Dis. Int.* 5:560–563.
- Love JM, Gudas LJ (1994). Vitamin A, differentiation and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 6: 825–831.
- M. Furrakh, I. A. Burney, S. Kumar, K. F. Zahid, and M. Al-Moundhri, (2013). Improving outcomes in advanced lung cancer: maintenance therapy in non-small-cell lung carcinoma,” *Sultan Qaboos University Medical Journal*, vol. 13, no. 1, pp. 3–18.
- M. Pasinetti. (2005). From proteomics to biomarker discovery in Alzheimer’s disease. *Brain Res. Rev.* 48:360–369.
- Mader, S., Leroy, P., Chen, J. Y., and Chambon, P. (1993). Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. *J. Biol. Chem.* 268, 591–600.
- Majmudar AJ, Wong WJ, Simon MC. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxia stress. *Mol. Cell* 40:294–309.
- Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. (1994). The retinoid receptors. *The Retinoids. Biology, Chemistry, and Medicine*, 2nd edn. Raven Press, New York,; 319–47.
- Mark M, Ghyselink NB, Chambon P. (2006). Function of retinoid nuclearreceptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 451–480.
- McKim SE, Uesugi T, Raleigh JA, McClain CJ, Arteel GE. (2003). Chronic intragastric alcohol exposure causes hypoxia and oxidative stress in the rat pancreas. *Arch. Biochem. Biophys.* 417:34–43.
- Molotkov L, Foglio MH, Cuenca AE, Duester G. (2002). Distinct retinoid metabolic functions for alcohol dehydrogenase genes *Adh1* and *Adh4* in protection against vitamin A toxicity or deficiency revealed in double null mutant mice. *J Biol Chem*, 277, pp. 13804–13811.

- Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology & Medicine* 43 (4): 477–503.
- Mulvihill, Michael S., Yong-Won Kwon, Sharon Lee, Li Tai Fang, Helen Choi, Roshni Ray, Hio Chung Kang, Jian-Hua Mao, David Jablons, and Il-Jin Kim. (2012). Gremlin Is Overexpressed in Lung Adenocarcinoma and Increases Cell Growth and Proliferation in Normal Lung Cells. *PLoS ONE*. Public Library of Science,
- Mutka SC. et al. (2012). ADH IB Expression, but Not ADH III, Is Decreased in Human Lung Cancer. *PLoS ONE: Natl Acad Sci U S A* 1993;90:985-9.
- Nguyen DM, Schrupp DS. (2006). Lung cancer staging in the genomics era. *Thorac Surg Clin*.
- Oh JJ, Razfar A, Delgado I, Reed RA, Malkina A, Boctor B, Slamon DJ. (2006). 3p21.3 tumor suppressor gene H37/Luca15/RBM5 inhibits growth of human lung cancer cells through cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer Res*.
- Okoh VO, Felty Q, Parkash J, Poppiti R, Roy D. (2013). Reactive oxygen species via redox signaling to PI3K/AKT pathway contribute to the malignant growth of 4-hydroxy estradiol-transformed mammary epithelial cells. *PLoS One*. ;8(2):e54206.
- Parlesak A, Billinger MH, Bode C, Bode JC. (2002). Gastric alcohol dehydrogenase activity in man: influence of gender, age, alcohol consumption and smoking in a caucasian population. *Alcohol and Alcoholism*. Oxford, Oxfordshire 37 (4): 388–93.
- Qiu H, Lotan R, Lippman SM, Xu XC. (2000). Lack of correlation between expression of retinoic acid receptor-beta and loss of heterozygosity on chromosome band 3p24 in esophageal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*; 28: 196–202.
- R. Siegel, D. Naishadham, and A. Jemal, (2012). *Cancer statistics, CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 62, no. 1, pp. 10–29, 2012.
- Raifen, R, Altman Y, Zadi Z. (1996). Vitamin a levels and growth hormone axis. *Hormone research* 46(6): 279–281.

- Reporte Mundial sobre Cáncer (2014), Organización Mundial de la Salud.
- Rita Levi-Montalcini, Pietro U. Angeletti. (1968). Nerve Growth Factor. *Physiological Reviews* Vol. 48, No. 8.
- Rosell R, Felip E, Garcia-Campelo R, Balaña C. (2004). The biology of nonsmall- cell lung cancer: identifying new targets for rational therapy. *Lung Cancer*, 46(2):135-48.
- Saffiotti U, Montesano R, Sellakumar AR, Borg SA. (1967). Experimental cancer of the lung. Inhibition by vitamin A of the induction of tracheobronchial squamous metaplasia and squamous cell tumors. *Cancer*; 20: 857–64.
- Sato N, Kanada T, Kawario S, Hayash N. (1983). Effect of acute and chronic ethanol consumption on hepatic oxygen tension in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18:443–447.
- Secretaría de Salud (2013). Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud.
- Semenza G. L. (2000). Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit. Rev. Biochem.Mol. Biol.*35, 71–103.
- Semenza GL, Wang GL. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; 12:5447–54.
- Stadtman ER (1992). "Protein oxidation and aging". *Science* 257 (5074): 1220–4.
- Sultatos LG, Pastino GM, Rosenfeld CA, Flynn EJ. (2004). Incorporation of the genetic control of alcohol dehydrogenase into a physiologically based pharmacokinetic model for ethanol in humans. *Toxicological Sciences: an Official Journal of the Society of Toxicology* 78 (1): 20–31.
- Sun Y. (2006). p53 and its downstream proteins as molecular targets of cancer. *Mol Carcinog.*
- Tanumihardjo SA. (2011). Vitamin A: biomarkers of nutrition for development. *The American Journal of Clinical Nutrition* 94 (2): 658S–665S.
- The Biomarkers Consortium. (2010). Foundation for the National Institutes of Health.

- U.S Preventive Services Task Force. (2013)
- Uramoto H, Mitsudomi T. (2007). Which biomarker predicts benefit from EGFR-TKI treatment for patients with lung cancer?. *Br J Cancer*, 96(6):857-63.
- Van Raamsdonk JM, Hekimi S (2009). Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics* 5 (2): e1000361.
- Vaughn, A. E. & Deshmukh, M. (2008). Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nature Cell Biol.* 10, 1477–1483.
- Wang Y, Yang H, Li L, Wang H, Zhang C, Yin G, Zhu B. (2010). Association between CYP2E1 genetic polymorphisms and lung cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. Mar;46(4):758-64.
- Wheaton W, Chandel NS. (2011). Hypoxia regulates cellular metabolism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300:C385–393.
- Xiang Gao, Leaf Huang. (1991). A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Volume 179, Issue 1, 30 August, Pages 280-285
- Xiao-Chun Xu, Gabriella Sozzi, Jin S. Lee, J. Jack Lee, Ugo Pastorino, Silvana Pilotti, Jonathan M. Kurie, Waun K. Hong, Reuben Lotan (2009). Suppression of Retinoic Acid Receptor b in Non-Small-Cell Lung Cancer In Vivo: Implications for Lung Cancer Development 54:5663-9.
- Xiaodong Wang, Defeng Wu, Cederbaum I. (2013). Cytochrome P450 2E1 potentiates ethanol induction of hypoxia and HIF-1 α in vivo. *Free Radic Biol Med.* 63:175-86.
- Xu XC, Sozzi G, Lee JS et al. (1997). Suppression of retinoic acid receptor b in non-small-cell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development. *J. Natl Cancer Inst.*; 89: 624–9.
- Xu, X. C., Sozzi, G., Lee, J. S., Lee, J. J., Pastorino, U., Pilotti, S., Kurie, J. M., Hong, W. K., and Lotan, R. (1997). Suppression of retinoic acid receptor b in non-small-cell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development. *J. Natl. Cancer Inst.*, 89: 624–629.

- Yeung SJ, Pan J, Lee MH. (2008). Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:3981–99.
- Zaitseva M, Vollenhoven BJ. (2007). Retinoic acid pathway genes show significantly altered expression in uterine fibroids when compared with normal myometrium. *Mol Hum Reprod*, 13, pp. 577–585.
- Zhang Y1, Yang JH. (2013). Activation of the PI3K/Akt pathway by oxidative stress mediates high glucose-induced increase of adipogenic differentiation in primary rat osteoblasts.” *J Cell Biochem*. Nov;114 (11):2595-602.
- Zheng Z, Chen T, Li X, Haura E, Sharma A, Bepler G. (2007). DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *New England Journal of Medicine*.
- Zochbauer-Muller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. (2001). Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res.*; 61: 249–55.