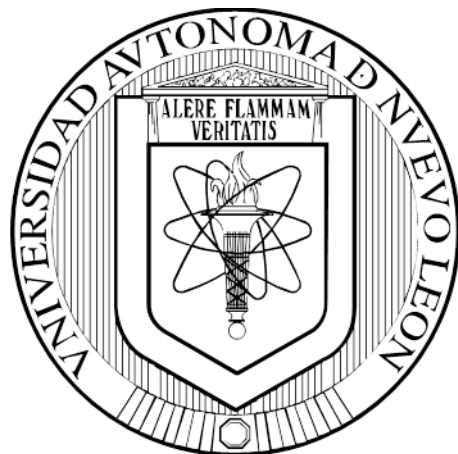


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PAR-4 EN PACIENTES CON CÁNCER  
PULMONAR Y SU ASOCIACIÓN CON EL PRONÓSTICO DE LA  
ENFERMEDAD**

**POR**

**MCP JORGE EMMANUEL CARRIZALES LUNA**

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

**JUNIO, 2018**

**EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PAR -4 EN PACIENTES CON CÁNCER  
PULMONAR Y SU ASOCIACIÓN CON EL PRONÓSTICO DE LA  
ENFERMEDAD**

Comité de tesis

---

Dr. Pablo Zapata Benavides  
Director de tesis

---

Dr. Moisés Armides Franco Molina  
Secretario

---

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores  
Vocal 1

---

Dra. Diana Reséndez Pérez  
Vocal 2

---

Dra. Laura María Trejo Ávila  
Vocal 3

**EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PAR-4 EN PACIENTES CON CÁNCER  
PULMONAR Y SU ASOCIACIÓN CON EL PRONÓSTICO DE LA  
ENFERMEDAD**

Dirección de tesis

---

Dr. Pablo Zapata Benavides  
Director de tesis

---

Dr. José Isafas Badillo Almaraz  
Director externo

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al laboratorio de inmunología y virología de la FCB/UANL por proveer el apoyo financiero y la infraestructura requerida para la realización de este trabajo.

Al Dr. Pablo Zapata Benavides por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo.

Al Dr. José Isaías Badillo Almaraz por el apoyo con las muestras de tejido pulmonar, interpretación de las mismas y su hospitalidad en la ciudad de Zacatecas.

Al Dr. Moisés Franco Molina por su ayuda en la consecución de las líneas celulares utilizadas en el presente trabajo.

A mis amigos del L5, Santiago Saavedra, Felipe Torres y Karina Chávez, precisamente por su amistad, dentro y fuera del laboratorio.

Al Dr. Santiago Saavedra Alonso, por su ayuda en la metodología y redacción del presente trabajo.

Al MC Felipe Torres del Muro por su ayuda en las técnicas de inmunohistoquímica y demás métodos de laboratorio.

A la Dra. Karina Chávez Escamilla por su ayuda en la realización del Western blot.

A mis compañeros del L6, Yarellis, Silvia y Erika, así como mis compañeros del L7, Mario y Karen, por el apoyo sincero que me brindaron durante mi estancia en el LIV.

A mis compañeros Gustavo y Cesilia, con quienes tuve el gusto de compartir estos de años de maestría, por su apoyo en las actividades académicas.

## **DEDICATORIA**

*A Gloria María de Jesús Romero Beltrán,  
por su amistad y compañía.*

## ÍNDICE

Sección	Página
LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
NOMENCLATURA	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	2
3. HIPÓTESIS	3
4. OBJETIVOS	4
4.1 Objetivo general	
4.2 Objetivos particulares	
5. ANTECEDENTES	5
5.1 Generalidades de Cáncer	
5.2 Cáncer de pulmón: Etiología, subtipos histológicos, involucro de Par-4	
5.3 Prostate apoptosis response-4 (Par-4)	
6. MATERIAL Y MÉTODOS	16
6.1 Obtención y procesado de biopsias de carcinoma pulmonar y muestras control	
6.2 Inmunohistoquímica en tejido de biopsia pulmonar	
6.3 Cultivo celular	
6.4 Extracción de proteínas y Western Blot	
6.5 Cuantificación de proteínas	
6.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS e Inmunodetección	
6.7 Ensayo de viabilidad con MTT	
6.8 Inmunohistoquímicas de líneas celulares	
6.9 Cuantificación de la expresión de Par-4 en inmunohistoquímica de tejido pulmonar	
6.10 Análisis estadístico	
7. RESULTADOS	21
7.1 Análisis de la expresión basal de la proteína Par-4 en líneas celulares de cáncer de pulmón humanas	

7.2	Análisis de la localización celular de Par-4 en líneas celulares de cáncer de pulmón humanas	
7.3	Análisis de la expresión/localización de Par-4 en líneas celulares de cáncer de pulmón humanas y su asociación con la respuesta a cisplatino	
7.4	Análisis de la expresión de Par-4 en muestras de tejido pulmonar	
7.5	Análisis de la expresión de Par-4 en tumores de pulmón	
8.	DISCUSIÓN	30
9.	CONCLUSIONES	34
10.	PERSPECTIVAS	35
	LITERATURA CITADA	36
	RESUMEN BIOGRÁFICO	41

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Asociación de la expresión basal y localización celular de Par-4 con la sensibilidad a cisplatino.....	24
2. Datos clínicos e histopatológicos y estatus de Par-4 en pacientes con cáncer primario de pulmón.....	26



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Estructura de la proteína Par-4	11
2. Mecanismos de acción y puntos de control de Par-4 (prostate apoptosis response-4)	14
3. Expresión basal de Par-4 en líneas celulares humanas de cáncer de pulmón.	21
4. Normalización de Western Blot para la expresión basal de Par-4 en líneas celulares humanas de cáncer de pulmón	22
5. Análisis de la localización celular de Par-4 en líneas celulares de cáncer de pulmón humanas	23
6. Expresión de Par-4 en biopsias de tejido pulmonar	28
7. Análisis y cuantificación de la expresión de Par-4 en biopsias de pulmón	29

## NOMENCLATURA

$\mu$ l	Microlitro
A427	Línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano
ANOVA	Análisis de Varianza
Calu-1	Línea celular de carcinoma pulmonar escamoso humano
Col.	Colaboradores
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
HCC827	Línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano
NSCLC	Carcinoma de células no pequeñas de pulmón
PAWR	Gen Pro-apoptótico Regulador de WT1
Ras	Proteína Ras
Rb	Retinoblastoma
SCLC	Carcinoma de células pequeñas de pulmón
SKMES-1	Línea celular de carcinoma humano de células escamosas de pulmón
SKLU-1	Línea celular de adenocarcinoma humano de pulmón
TP53	Gen que codifica p53

## RESUMEN

Cáncer de pulmón representa una neoplasia cuyo pronóstico ha permanecido inalterado en las últimas décadas, ya que menos de 15% de los pacientes diagnosticados logra sobrevivir más de 5 años. La biología molecular de esta neoplasia muestra una clara resistencia a la apoptosis ya que existe una pérdida del gen TP53 en más del 50% de los pacientes afectados así como una sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas. Por lo anterior es importante profundizar el conocimiento molecular de esta neoplasia. Par-4 (prostate apoptosis response-4, por sus siglas en inglés) se trata de una proteína inicialmente descrita en cáncer de próstata pero que se ha visto implicada en muchas neoplasias, sobre todo siendo inactivada mediante diversos mecanismos. En este proyecto planteamos el potencial pronóstico (medido como sobrevida global del paciente y respuesta a tratamiento) de Par-4 en base a la expresión basal de esta proteína y su localización celular. Se utilizó un panel de líneas celulares humanas de cáncer de pulmón encontrando una expresión basal diferente entre las mismas. Las líneas con mayor expresión basal de Par-4, contrario a lo esperado, precisaron una mayor cantidad de cisplatino para impedir su proliferación. La localización celular de Par -4 en las líneas celulares estudiadas fue exclusivamente citoplasmática. En las biopsias pulmonares estudiadas se encontró una mayor expresión de Par-4 en pacientes con carcinomas primarios de pulmón comparados con aquellos con metástasis a este órgano. La localización celular de esta proteína en dichas biopsias fue exclusivamente citoplasmática. Sin embargo, la muestra estudiada resultó escasa por lo que es necesario aumentar la cantidad de pacientes en futuros proyectos. En conjunto, los resultados obtenidos indican que Par -4 se encuentra en las neoplasias primarias de pulmón y en las metástasis a este órgano por lo que su implicación y aplicación pronóstica -terapéutica debe profundizarse teniendo en cuenta las interacciones celulares de dicha proteína.

## ABSTRACT

Lung cancer represents a malignant neoplasm whose prognosis has remained unaltered in the last decades, with less than 15% of patients diagnosed with the disease surviving more than 5 years. The molecular biology of this neoplasm shows resistance to apoptosis as a result of loss of the *TP53* gene in more than 50% of patients and an overexpression of antiapoptotic proteins. Therefore, is important to improve our molecular knowledge of this malignancy. Par-4 (prostate apoptosis response-4) it's a protein that was first described in prostate cancer but has, since then, been implicated in a wide variety of neoplasms, most of the times being inactivated by different mechanisms. In the present study we hypothesized a prognostic role (measured as overall survival and response to treatment) of the basal levels and cellular localization of Par-4. We found defend basal levels of this protein in a set of human lung cancer cell lines screened. The cell lines with the highest expression of Par-4, as opposed to expect required a higher dose of cisplatin to inhibit their proliferation. The cellular localization of the protein was cytoplasmic in all cell lines screened. In lung cancer biopsies we found a higher expression of Par-4 in patients with primary lung cancer compared with that suffering metastasis disease to the lung. Cellular localization was also cytoplasmic in lung biopsies positive to Par-4. However, the number of biopsies included was poor, making mandatory further studies with a larger cohort of patients. Overall, our results shows that Par-4 is present in primary lung cancer and metastasis disease to this organ, indicating the importance of continue our research in the prognostic/therapeutic implications and applications of this protein and its cellular interactions.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón representa la neoplasia más agresiva a nivel mundial ya que menos del 15% de los pacientes afectados con esta enfermedad sobrevive más de 5 años. Al momento del diagnóstico suele encontrarse en estadios tardíos, con metástasis múltiple, por lo que las opciones terapéuticas suelen ser pocas. El tipo histológico más frecuente, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, representa aproximadamente 80% de las neoplasias primarias de pulmón y suele presentar mutaciones en *TP53* en ~65% de los casos, además de una sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas y pro-supervivencia. Por su parte, la proteína Par-4 (*prostate apoptosis response-4*, por sus siglas en inglés), fue descrita inicialmente en células de cáncer de próstata andrógeno dependientes, en los que produjo una muerte celular programada; sin embargo, su presencia de manera ubicua en el organismo, su relativa conservación aminoacídica entre especies, así como su selectividad para inducir apoptosis en células neoplásicas sin afectar células normales la convirtieron en objeto de estudio, encontrándose su implicación en distintas malignidades. Su estudio se ha concentrado en su potencial terapéutico, soslayando un probable papel pronóstico, ya que la inducción de apoptosis se debe a su translocación desde el citoplasma hacia el núcleo. En el presente estudio se evaluó la expresión basal de Par-4 en líneas celulares humanas de cáncer de pulmón y en biopsias de pacientes con esta afección en distintos estadios con el objeto de determinar su relación con la respuesta a tratamiento quimioterapéutico y el pronóstico de la enfermedad.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón es una neoplasia agresiva que suele encontrarse en estadios avanzados al momento del diagnóstico, por lo que se precisa una estrategia agresiva para su tratamiento. Gran proporción de pacientes alberga factores considerados de pronóstico adverso como la resistencia a fármacos antineoplásicos de primera línea, sólo el 30% responden a la quimioterapia; de ser así, el tratamiento resulta inefectivo. En consecuencia de lo anterior, es importante profundizar en el conocimiento a nivel molecular para observar si existe una asociación entre la expresión basal y/o localización de Par-4 con la sensibilidad a drogas y pronóstico del paciente.

### **3. HIPÓTESIS**

La expresión basal y localización celular de Par-4 pronostican la respuesta a fármacos y la sobrevida global en cáncer de pulmón.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Determinar la asociación entre la expresión basal de Par-4, así como la localización celular, con la respuesta a fármacos en líneas celulares humanas de cáncer de pulmón y en la sobrevida global del paciente con cáncer pulmonar.

### 4.2 Objetivos particulares

#### *In vitro*

1. Evaluar la expresión basal de Par-4 en líneas celulares de cáncer pulmonar.
2. Identificar la localización de la expresión de Par-4 en líneas celulares de cáncer pulmonar.
3. Determinar si existe asociación entre la expresión basal y/o localización con la sensibilidad a drogas.

#### *Ex vivo*

1. Determinar la expresión basal de Par-4 en biopsia de pulmón de pacientes con cáncer pulmonar.
2. Identificar la localización de la proteína Par-4 en biopsia de pulmón de pacientes con cáncer.
3. Relacionar si existe asociación de la expresión de Par-4 con el pronóstico del paciente.



## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 Generalidades sobre el cáncer.

El cáncer es un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracteriza por una proliferación descontrolada de células, las cuales han adquirido ventajas respecto a sus contrapartes normales. Estas ventajas fueron descritas por Hanahan y Weinberg y consisten en lo siguiente: señalización proliferativa sostenida, evasión de los supresores de tumores, activación de invasión y metástasis, inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis y resistencia a la apoptosis (Hanahan y Weinberg, 2000). De manera posterior, una actualización por los mismos autores añadió nuevas características (Hanahan y Weinberg, 2011). Cada una de estas ventajas puede estar presente en diferentes momentos durante la evolución de la neoplasia, lo que le permite resistir a la terapia. Aunque se ha mejorado el pronóstico de muchas neoplasias, la mortalidad relacionada con esta enfermedad sigue siendo muy alta (Torre *et al.*, 2015).

La etiología del cáncer varía dependiendo del tejido afectado, sin embargo los distintos tipos de cáncer tienen en común una desregulación entre la proliferación y la muerte celular. La ganancia de funciones o pérdida de la regulación (en forma de mutaciones, rearrreglos, fusiones, amplificaciones, etcétera) en los genes que controlan estas dos acciones da lugar a una transformación; de no poder eliminarse el error, su perpetuación conduce al inicio de una neoplasia. Los genes que regulan el crecimiento celular se dividen de manera general en proto-oncogenes y genes supresores de tumores. La introducción de una mutación en la primera categoría da como resultado un oncogén, cuyo producto suele ser suficiente para producir una proliferación celular excesiva. Los genes supresores de tumores por su parte, al sufrir una mutación, son incapaces de reprimir la proliferación celular, lo cual de igual manera resulta en cáncer. Sin embargo, suele requerirse mutaciones en ambos alelos en este tipo de genes; la aparición de una neoplasia en caso de una mutación en un solo alelo se denomina haploinsuficiencia, ya que el producto restante del gen no mutado es incapaz de detener el crecimiento celular. Una mutación somática sumada a una mutación germinal se denomina pérdida de la heterocigosidad (Sánchez, 2013). Otras mutaciones importantes se producen en genes

que controlan el paso entre las distintas fases del ciclo celular (Otto y Sicinski., 2017), genes que regulan telomerasa (Akincilar, Unal, y Tergaonkar., 2016), genes que promueven vascularización y diseminación de tumores (Bottos y Bardelli., 2013), entre otros. Sin embargo, no todas las mutaciones conducen a iniciación o progresión del cáncer. Se les conoce como mutaciones conductoras a aquellas que proveen de una ventaja selectiva de crecimiento, mientras que aquellas que no lo hacen son denominadas pasajeras. Los genes que se han descrito como conductores en al menos un tipo de neoplasia son conocidos como genes de cáncer (Pon y Marra., 2015). Pueden coexistir mutaciones en células germinales y somáticas, sin embargo hasta en 80% de las neoplasias se presentan sólo mutaciones en células somáticas, lo que resalta el papel del estilo de vida y el ambiente como determinantes de la carcinogénesis (Futreal *et al.*, 2004).

Las mutaciones somáticas son inherentes e inevitables dado el carácter propenso a error de la replicación de ADN; no obstante, no suelen presentarse en células madre o de hacerlo suelen ser neutrales en lo que respecta a la oncogénesis. La acumulación de las mismas, sin embargo, en un período de tiempo determinado y en un microambiente apropiado promueve la aparición de una clona neoplásica. El número de mutaciones requeridas para iniciar este proceso varía pero suele ser bajo, de 5 a 7 mutaciones en neoplasias sólidas (Stratton, Campbell y Futreal., 2009). Luzatto y Pandolfi analizan en un artículo reciente la probabilidad de acumulación de mutaciones somáticas y su traducción en cáncer. Estos autores refieren que dicha probabilidad es dependiente de la tasa basal de mutación y la división celulares. En lo que respecta a la primera, la tasa de mutación, parece ser determinada genéticamente ya que se ve incrementada en aquellas personas con defectos en los mecanismos de reparación de ADN (Anemia de Fanconi, Ataxia-Telangiectasia, Xeroderma Pigmentoso, etc.), y puede verse afectada por exposición a mutágenos. Por su parte, la tasa de división celular varía de tejido a tejido, lo que explica en parte por qué algunas neoplasias son más comunes que otras. Esta tasa es afectada por factores inflamatorios, los cuales promueven la proliferación celular (Luzatto y Pandolfi, 2015). De lo anterior se concluye que tanto el ambiente como, aunque en menor parte, la herencia determinan en última instancia la aparición de cáncer, sin dejar de lado factores aleatorios.

## 5.2 Cáncer de pulmón: Etiología, subtipos histológicos, involucro de Par-4

Cáncer de pulmón constituye la neoplasia de mayor mortalidad a nivel mundial; tan sólo en 2012 se registraron 1, 590, 000 fallecimientos por esta patología (Islami *et al.*, 2015). En su etiología se encuentra implicado el tabaquismo, siendo las nitrosaminas (NNK) las principales sustancias carcinogénicas identificadas (Akopyan., 2006). Los metabolitos de las nitrosaminas se unen fácilmente al ADN, formando aductos que se traducen en mutaciones. Todos los subtipos de cáncer de pulmón han sido asociados al tabaquismo, sin embargo el carcinoma de células escamosas y el carcinoma de células pequeñas son característicos de fumadores con alto consumo tabáquico. Otros factores relacionados son: exposición a radón, riesgos industriales como exposición a asbesto, berilio, arsénico y sus derivados, cadmio, silica, cloruro de vinilo, compuestos de níquel, compuestos de cromo, carbón, gas mostaza, clorometil-ésteres, gases de diesel; la polución ambiental ha sido igualmente implicada (Zappa y Mousa, 2016).

La histología continúa siendo importante para la clasificación de esta neoplasia. Los dos grupos en que se divide para su estudio son carcinoma de células pequeñas (SCLC por sus siglas en inglés) y carcinoma de células no pequeñas (NSCLC). El primero constituye un tumor de comportamiento sumamente agresivo, por lo general se genera en la vías aéreas proximales, al diagnóstico se encuentra gran involucro de vasos linfáticos y metástasis en sitios distantes. El carcinoma de células no pequeñas cuenta con dos subtipos predominantes: el adenocarcinoma y el carcinoma de células escamosas, ambos constituyen más del 80% de NSCLC. El cáncer de células escamosas suele presentarse en vías aéreas proximales e involucra de manera temprana ganglios linfáticos, además de que suele presentar cavitación por lo que es fácil sospecharlo en la radiografía de tórax, sobre todo ante el antecedente de tabaquismo. El adenocarcinoma, además de fumadores, puede presentarse en personas sin antecedentes de tabaquismo, por lo que otros factores ambientales deben ser descartados; por lo general inicia en vías aéreas distales aunque puede tener inicio en mutaciones de glándulas mucinosas proximales del pulmón. Otros tumores primarios menos comunes del pulmón son el carcinoma de células grandes, el carcinoma pleomórfico, tumores carcinoides y, una variante de SCLC, el carcinoma neuroendocrino de células grandes (Chen *et al.*, 2014).

La amplia disponibilidad de estudios moleculares ha mejorado la comprensión de la biología tumoral así como abierto la posibilidad de nuevos tratamientos. Como ocurre en otras neoplasias, las mutaciones y los rearrreglos estructurales en genes cuyos productos promueven la proliferación celular así como la inactivación de genes supresores tumorales se encuentran involucrados en la carcinogénesis de pulmón. *TP53* es el principal gen afectado en esta neoplasia (~80% en cáncer de células escamosas, ~50% en adenocarcinoma) (Kim., 2015). El tipo de mutación más frecuente es una mutación puntual en el dominio de unión al ADN. Aún en el caso de encontrarse proteína p53 silvestre (wild type), la proteína mutante suele impedir la función normal de las restantes. La pérdida de la actividad de p53 suele traducirse en una incapacidad de las células para llevar a cabo la apoptosis (Sabapthy y Lane, 2017).

Las familia de proteínas RAS (*KRAS*, *NRAS* y *HRAS*) son un tipo de proteínas G asociadas a membrana las cuales encuentran implicadas en la traducción de señales desde el exterior, en forma de ligandos, hacia el interior de la célula en la cual activan vías de señalización (Zhang y Cheong, 2016). En su estado basal, las proteínas de esta familia unen GDP, sin embargo al activarse receptores celulares (como EGFR) unen GTP e inician eventos que involucran las vías de MAPK y PIK3CA, favoreciendo la transcripción de genes involucrados en la supervivencia. La mutación activadora de *KRAS* es la mutación oncogénica más frecuente en carcinoma de pulmón, aproximadamente 15-20% de los pacientes con NSCLC y 25-40% en lo que respecta a la variedad de adenocarcinoma exclusivamente.

Dentro de los nuevos objetivos de terapia se encuentra el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR, por sus siglas en inglés). Este receptor pertenece a la familia de receptores de tirosin-cinasa. La unión de su ligando con el receptor provoca autofosforilación y activación de cascadas intracelulares de señalización. Mutaciones en este receptor se encuentran en aproximadamente 10% de los pacientes occidentales y hasta 35% de los pacientes del este de Asia. Se cuenta con medicamentos que bloquean la señalización de este receptor o la señalización río abajo del mismo, lo que ha dado respuestas superiores cuando se usa en conjunto con fármacos antineoplásicos en comparación con la quimioterapia sola (Liu *et al.*, 2017); sin embargo, la resistencia

adquirida es un problema importante (Hirsch *et al.*, 2017). Otro miembro de la familia de tirosin cinasas, subfamilia del receptor de insulina, es la proteína ALK, con rearrreglos en <5% de los pacientes con adenocarcinoma, que en forma análoga a las mutaciones del EGFR brinda una señalización sostenida y cuenta con fármacos que bloquean la misma (Crizotinib); también como el caso de EGFR, el bloqueo terapéutico crea resistencia al activarse vías diferentes de señalización o alteraciones adicionales (Dorward *et al.*, 2017).

Otras mutaciones ya caracterizadas como conductoras son: *ROSI* (receptor de tirosin cinasa) alterado en 1-2% de NSCLC, *BRAF* (cinasa implicada en la vía de MAP cinasas) con mutaciones en 1-4% de adenocarcinomas, *FGFR1* (receptor del factor de crecimiento de fibroblastos) mutado en 15-20% de carcinomas escamosos, y *MET* (receptor de tirosin cinasa implicado en la transición epitelio mesénquima) amplificado en 2-4% de NSCLC (Black y Khurshid, 2015). La vía PIK3CA, aunque no es reconocida como una mutación conductora, se encuentra mutada en 5% de los adenocarcinomas y 15% de los carcinomas epidermoides (Chen *et al.*, 2014). Finalmente, el aumento de la actividad de la telomerasa se encuentra en 57% de los carcinomas de células no pequeñas, lo que contribuye a la inmortalidad celular (Lemjabbar-Alaoui *et al.*, 2015).

Los tumores neuroendocrinos de pulmón presentan algunas diferencias en la biología tumoral respecto a las mutaciones señaladas en los párrafos precedentes. Los tumores carcionoides suelen presentar variantes, más no mutantes, en *TP53*, sobreexpresión de ALK, y una activación de la vía mTOR; los tumores de células pequeñas suelen presentar pérdidas o ganancias cromosomales, mutaciones hasta en 90% de los casos de *TP53*, inactivación de *RBI* en 80-100% de los pacientes, mutaciones en *PTEN* en 15-20%, y un ratio Bax/Bcl2 alterado (Rossi *et al.*, 2018).

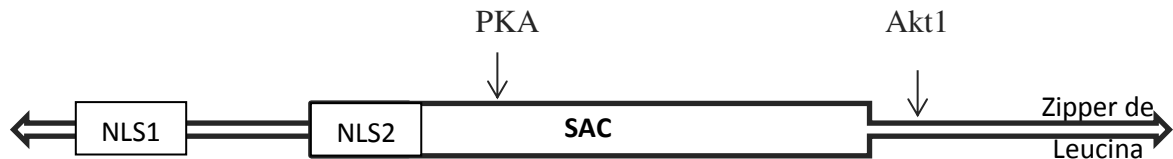
En lo que se refiere al involucro, en malignidades de pulmón, de la proteína Par-4, agente supresor de tumores cuya función se analiza en detalle en la siguiente sección, Joshi y colaboradores, mediante inmunohistoquímica en microarreglos de tejido, analizaron 133 muestras de NSCLC, 47% de las cuales fueron negativas para Par-4. Al analizar los tipos histológicos encontraron que el subtipo adenocarcinoma fue negativo para esta proteína en 41% de los tejidos analizados, mientras que el subtipo escamoso lo

fue en 6% de las muestras analizadas. La clasificación TNM también tuvo relación con la presencia de Par-4, ya que en estadios tempranos 41% de las inmunohistoquímicas de tejidos fueron positivas mientras que sólo 16% de los estadios III y IV tenían presencia de la proteína (Joshi *et al.*, 2008). Lo anterior va en concordancia con la evolución clonal del cáncer ya que se favorece la selección de clonas resistentes con cada replicación celular. Otro estudio en el mismo orden de ideas es el de Hebbar y colaboradores, quienes exploraron mediante minería de datos la relación entre la expresión de Par-4 (mRNA) y la sobrevida en pacientes con cáncer de pulmón. En el subtipo escamoso encontraron que una mayor expresión de Par-4-mRNA se relacionó con una disminución de la sobrevida global, hallazgo que no se presentó en el caso del subtipo adenocarcinoma (Hebbar, Wang y Rangnekar, 2012). Los autores no se extienden en la discusión de estos resultados, señalando únicamente que las diferencias en los resultados podrían ser sólo pertinentes a tipos específicos de cáncer y reflejar los mecanismos de resistencia a apoptosis río abajo de Par-4. Una desventaja de esta aproximación, al evaluar los transcritos del gen PAWR, es que no se evalúan las interacciones celulares de la proteína.

### **5.3 Prostate apoptosis response-4 (Par-4)**

Sells y colaboradores describieron una proteína que desde entonces ha recibido gran atención por su potencial como herramienta efectora de apoptosis. Esta proteína, denominada Par-4 (prostate apoptosis response-4), se describió de manera inicial en células de próstata de ratones dependientes de andrógenos. En este modelo la deprivación hormonal, por medio de castración, condujo a la entrada masiva de calcio con la consecuente muerte celular. Las células no andrógeno-dependientes fallan en producir muerte celular, sin embargo la utilización del fármaco Ionomicina reactiva la muerte celular programada al reinstaurar el flujo de calcio. En dicho trabajo, Par-4 se expresó durante la apoptosis pero no durante la inducción experimental de necrosis ni el arresto celular (Sells *et al.* 1994).

Posteriormente Johnstone y colaboradores identificaron el gen codificante de esta proteína y, mediante hibridación *in situ* con inmunofluorescencia, encontraron su localización en el brazo largo del cromosoma 12 (Johnstone *et al.*, 1998).



**Figura 1.** Estructura de la proteína Par-4.

De los 342 aminoácidos que integran a Par-4 en humanos, 59 están contenidos dentro de una región conocida como SAC, por sus siglas en inglés, selectivo para la apoptosis en cáncer, ya que esta región se identificó, mediante análisis delecional, como la secuencia aminoacídica mínima necesaria para sensibilizar o iniciar apoptosis en células neoplásicas (El-Guendy *et al.*, 2003). La secuencia de localización nuclear 2 (NLS-2), la cual forma parte del SAC, confiere a Par-4 la capacidad de moverse desde el citoplasma hacia el núcleo, donde efectuará las funciones pro-apoptóticas descritas más adelante. También dentro de esta secuencia de aminoácidos destaca uno en especial, la treonina 155, blanco de fosforilación por la proteína kinasa A, evento que permite la activación y capacidad de translocación (Gurumurthy *et al.*, 2005). Se ha postulado que esta fosforilación es responsable de la selectividad de inducción apoptótica de Par-4 en células neoplásicas, dado que las células normales presentan esta cinasa en menor cantidad. La serina 249 de Par-4 es el blanco de fosforilación de Akt1; esta es una fosforilación que inactiva a la proteína al favorecer el secuestro citoplasmático de la misma por las chaperonas 14-3-3, impidiendo su acción (Goswami *et al.*, 2005 y 2006). El extremo carboxilo de esta proteína está constituido por un zipper de leucina, cuya función se describe más adelante.

Par-4 es capaz de funcionar tanto como sensibilizador como inductor de apoptosis. Consistente con estos papeles, se ha reconocido su papel como gen supresor de tumores. Cada una de estas funciones se detallan a continuación y se resumen en la Figura 2.

Par-4 es capaz de iniciar apoptosis tanto por vía extrínseca como por vía intrínseca. Por vía extrínseca, es capaz de interactuar con Fas así como de promover la movilización de su ligando, FasL, hacia la membrana (Chakraborty, 2001) y de la interacción de TRAIL con el ligando DR5 (Lee, 2010). Una vía reciente fue descrita por Burikhanov y colaboradores quienes caracterizaron la secreción de Par-4 por parte de células normales tras la inducción con agentes promotores de stress en retículo endoplásmico. La interacción de Par-4 con GRP78 (principal chaperona implicada en dicho stress) en la membrana celular es capaz de activar la apoptosis por vía extrínseca (Burikhanov *et al.*, 2009). Subsecuentes investigaciones ahondaron en esta nueva vía: la secreción de Par-4 requiere una activación de p53, la principal vía de secreción es a través de la vía clásica, bloqueada por Brefeldin A, sin embargo también ocurre a través de la vía no convencional por vesículas activadas por Rab8b, e importantemente se identificaron secretagogos como los antipalúdicos cloroquina e hidroxicloroquina, además de derivados de compuestos naturales como la arelquin-1 (Burikhanov *et al.*, 2017). En esta misma publicación se utilizó suero de pacientes con carcinoma de células renales, antes y después de recibir la administración de antipalúdicos, y al incubarlas con líneas celulares neoplásicas diversas se encontró una menor proliferación de las mismas respecto al control. La administración de anticuerpo que bloquea las proteínas GRP78 y/o Par-4 anula este efecto, por lo que se concluye que es precisamente esta interacción la responsable del efecto antitumoral observado.

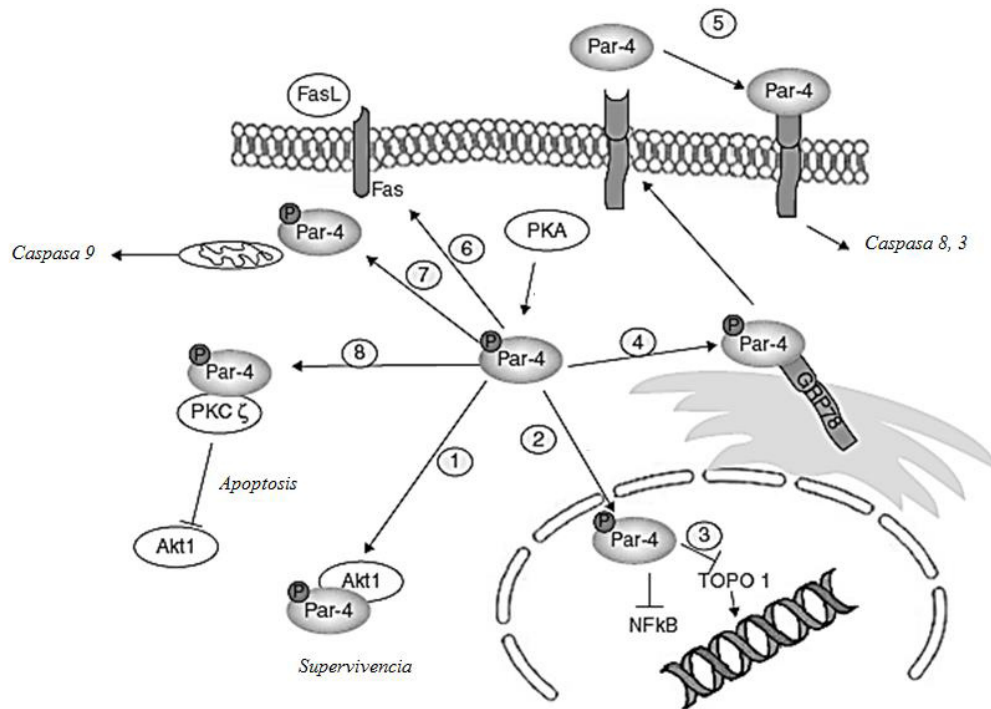
Por vía intrínseca, Par-4 requiere la translocación del citoplasma hacia el núcleo en donde inhibe el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), disminuyendo la expresión de proteínas pro-supervivencia y anti-apoptóticas (Camandola y Mattson, 2000). En esta vía juega un papel muy importante el zipper de leucina de Par-4 que interactúa con factores de transcripción como WT1 (Wilms Tumor protein 1), proteína conocida por su participación en el desarrollo embrionario del sistema urogenital, en la etiopatogenia del



tumor de Wilms (nefroblastoma), e importantemente en la modulación de proteínas pro-supervivencia como Bcl-2 (Huff., 2011; Johnstone *et al.*, 1996). También se han descrito sus interacciones con proteína cinasa A (PKA), Akt1 y proteínas cinasas atípicas (PKC y PKC  $\zeta$ ) (Moscat, Díaz Meco y Wooten, 2009). Cisplatino, una de las principales herramientas terapéuticas para el tratamiento de cáncer pulmonar, juega un papel de retroalimentación positiva con caspasa 3 y Par-4, escindiendo a esta última proteína en el aminoácido 131 permitiendo su translocación hacia el núcleo donde puede inhibir genes pro-supervivencia de NF- $\kappa$ B; a su vez Par-4 causa activación de caspasa 3 (Chaudry *et al.*, 2011). Los autores hipotetizan que podrían perderse dominios de represión en el N-terminal y potenciar la interacción de Par-4 con otros factores de transcripción.

Además de su papel como inductor de muerte celular programada, se conoce la capacidad de Par-4 de actuar como agente sensibilizador para un posterior estímulo apoptótico, como podría ser quimioterapia (Boehrer *et al.*, 2002), radiación UV (Díaz Meco *et al.*, 1999), radiación ionizante (Chendil *et al.*, 2002), entre otros. Esto se produce a través de la regulación a la baja de Bcl-2, proteína implicada en la supervivencia celular al impedir la permeabilización de la membrana mitocondrial (Cheema *et al.*, 2003). De igual manera, la inhibición de NF- $\kappa$ B por Par-4 potencia la apoptosis inducida por agentes quimioterapéuticos como la camptotecina (Barradas *et al.*, 1999).

García-Cao y colaboradores describieron el papel como gen supresor de tumores de Par-4 utilizando ratones nulos para esta proteína. En comparación con aquellos ratones con la forma silvestre de la proteína, los ratones nulos presentaron mayor cantidad de tumores espontáneos, dos o más al momento del sacrificio, siendo carcinomas la principal malignidad. La susceptibilidad a la acción de carcinógenos se evidenció de igual forma con la utilización de nitrosaminas y andrógenos ya que los ratones nulos (Par-4<sup>-/-</sup>) desarrollaron cáncer vesical y prostático, respectivamente (García-Cao *et al.*, 2005).



**Figura 2. Mecanismos de acción y puntos de control de Par-4 (prostate apoptosis response-4).** La cinasa Akt, controlada por la fosfatasa PTEN, puede provocar la fosforilación y posterior secuestro citoplasmático de Par-4, impidiendo su translocación al núcleo (1). La proteína cinasa A fosforila a Par-4 en el aminoácido treonina 155, activándolo y permitiendo su translocación al núcleo y posterior regulación a la baja de NF-κB (2). Par-4 puede inactivar directamente la actividad de topoisomerasa 1, enzima implicada en el desenrollamiento de ADN, actividad muy importante en células de alta capacidad replicativa como las células tumorales (3). Par-4 interactúa directamente con GRP78, chaperona del retículo endoplásmico implicada en la respuesta de proteínas no plegadas, facilitando su translocación a la membrana celular (4). La secreción paracrina de Par-4 por células no transformadas activa este receptor desencadenando apoptosis vía extrínseca (5). Por medio de la interacción de Fas y su ligando (FasL) (6), Par-4 puede desencadenar apoptosis por vía extrínseca. La disminución de proteínas bcl2 en la mitocondria, producto de la regulación a la baja del gen *BCL2*, es el resultado de la inhibición de NF-κB, lo que desencadena la apoptosis por vía intrínseca (7). El zipper de leucina de Par-4 es capaz de unirse a proteínas cinasas atípicas e inactivar Akt, impidiendo la actividad pro-supervivencia de esta última. (Figura modificada de Irby y Kline, 2013)

Se han descrito diversos mecanismos por los cuales se lleva a cabo una inactivación de Par-4. La hipermetilación del promotor de esta proteína en cáncer de endometrio (Moreno-Bueno *et al.*, 2007) y el secuestro citoplasmático son los principales mecanismos (Goswami *et al.*, 2005). También se ha documentado la pérdida o regulación a la baja de Par-4 hasta en 70% de las neoplasias renales (Cook, 1999); observaciones similares se han hecho en cáncer de mama (Zapata-Benavides, 2009)

(Alvarez, 2013), neuroblastoma (Kogel, 2001), y cáncer de colón (Wang, 2010). Además, en cáncer de páncreas se ha encontrado una delección en 12q21, lugar donde se localiza el gen que codifica a Par-4, por lo que podría estar relacionado con la agresividad de esta malignidad (Ahmed, 2008).

Dos grupos de trabajo de manera independiente investigaron un posible papel pronóstico de Par-4 en pacientes con cáncer de mama (Nagai *et al.*, 2010, Shaterley *et al.*, 2016). Shaterley y colaboradores analizaron prospectivamente 127 muestras de pacientes con diferentes estadios de cáncer de mama. Los pacientes con bajos niveles del transcrito de Par-4 tuvieron una menor supervivencia global comparados con aquellos que presentaron altos niveles del mismo, siendo esto significativo desde el punto de vista estadístico ( $p=0.0082$ ). La supervivencia libre de enfermedad también fue mayor en este último grupo, con una media de 133 meses contra una media de 118 meses en el grupo de bajos niveles de transcrito, aunque esto no alcanzó una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0597$ ). Nagai y colaboradores, por su parte, utilizando microarreglos de tejidos analizaron 995 muestras de neoplasias primarias de mama mediante inmunohistoquímica. El 57% de las muestras fueron negativas para Par-4. Las muestras positivas fueron clasificadas adicionalmente como nuclear o citoplasmática para generar curvas de Kaplan Meier. Los pacientes con expresión nuclear de Par-4 tuvieron una mayor supervivencia global comparados con aquellos cuya expresión fue predominantemente citoplasmática. Tanto Shaterley como Nagai remarcan la asociación de la pérdida de Par-4 con la progresión de la enfermedad, evento que podría resultar en nuevas aproximaciones terapéuticas avocadas a restaurar la expresión de esta proteína.

En el presente trabajo nos enfocamos en el papel pronóstico de Par-4 en cáncer de pulmón, cuya biología tumoral no se ha dilucidado por completo, lo que se refleja en la agresividad y pobre supervivencia de esta enfermedad.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Obtención de muestras de carcinoma pulmonar y muestras control**

Se obtuvieron 26 muestras de biopsias pulmonares del Hospital General de Zacatecas. Las muestras fueron recolectadas mediante broncoscopías en pacientes con sospecha de carcinoma pulmonar, y fueron conservadas en bloques de parafina hasta su análisis. El diagnóstico final se realizó por parte del Departamento de Anatomía Patológica de dicho hospital. Se clasificaron las muestras de la siguiente manera: 8 muestras correspondieron a carcinomas primarios de pulmón, 5 a metástasis pulmonares de carcinomas diversos, y 11 a patologías inflamatorias de origen infeccioso, principalmente neumonía. Este último grupo fue analizado a manera de grupo control. Se obtuvieron datos clínicos de los pacientes bajo aprobación del comité de ética del mencionado Hospital por mediación del Dr. José Isaías Badillo Almaraz.

### **6.2 Inmunohistoquímica en tejido de biopsia pulmonar**

Se procesaron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de tejido pulmonar, los cuales fueron proporcionados por el director externo de este proyecto, Dr. José Isaías Badillo Almaraz. Se procedió a desparafinar en plancha a 65°C por espacio de 20 min., tras lo cual las laminillas fueron sumergidas en xilol durante 10 min. La hidratación se llevó a cabo con una serie decreciente de alcohol (Absoluto-90%-80%-70%-60%-50%) con 5 min. de incubación en cada concentración. La permeabilización se llevó a cabo en una solución con tritón X100 al 1% y citrato de sodio, con cuatro minutos de incubación para cada tejido. Se procedió a inactivar peroxidasa endógena mediante una solución con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% durante 8 min. La recuperación antigénica se efectuó mediante buffer citrato con pH 6, con las laminillas sumergidas y expuestas a microondas hasta el punto de ebullición, tras lo cual se mantuvieron en dicho buffer durante 20 min. adicionales. Posterior a esto se realizó un bloqueo de sitios inespecíficos con leche descremada al 2.5%, durante una hora. El anticuerpo primario (anti-Par-4, Santa Cruz

Biotechnology ([A-10] sc-1666) fue utilizado en una dilución 1:100 en buffer TBS, con una incubación de toda la noche a 4°C. Se efectuaron tres lavados con PBS para retirar el exceso de anticuerpo y se incubó con el anticuerpo secundario incluido en el kit R.T.U. Vecastain (Vector Laboratories, PK-7800), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El revelado fue realizado mediante diaminobenzidina (ImmPACT DAB, Vector Laboratories, SK-41005) preparada de acuerdo a las instrucciones del fabricante y expuesta al tejido durante 8 min. Se utilizó hematoxilina a manera de contraste durante 3 min. Para efectuar un aclaramiento, las laminillas fueron sometidas a una serie creciente de alcoholes (50-60-70-80-90%-absoluto), durante 5 min. en cada grado de alcohol, y finalmente a xilol durante 10 min.

### **6.3 Cultivo celular**

Las líneas celulares A427, Calu-1, SK-MES-1, HCC827 y SK-LU-1, fueron donadas por el dr. Heriberto Prado García, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Las células fueron mantenidas en medio mínimo de Dulbecco's modificado de Eagle (DMEMF-12; Life Technologies, Invitro gen, Burlington, Ontario, Canada) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco, Grand Island, NY), y 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL estreptomina, en cajas de cultivo a 37°C en una atmósfera húmeda y con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **6.4 Extracción de proteínas y Western blot**

Se obtuvieron paquetes celulares de cada línea humana de cáncer de pulmón, se lavaron con PBS y se resuspendieron las células en 100 µL de buffer de lisis (Tritón 1%, NaCl 150 mM, Tris 25mM, pH 7.6) y se incubaron en hielo por 30 min. Posteriormente se centrifugaron a 7,500 rpm por 5 min. y el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

## **6.5 Cuantificación de proteínas**

La concentración de proteínas se determinó usando el Kit Bio-Rad DC Protein Assay siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la cuantificación de los extractos proteínicos se prepararon diluciones de 1:5 utilizando como diluyente el buffer de lisis; después se prepararon las diluciones 1:20 con los reactivos S y A; posteriormente se agregaron 177  $\mu\text{L}$  de reactivo B y se procedió a incubar por 10 min. a temperatura ambiente. Como referencia se incluyeron estándares proporcionados por el fabricante; tras la incubación se cuantificó la concentración de proteínas en placa con el lector (Multiskan FC, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 570 nm. Las concentraciones se obtuvieron en base a una curva de concentración con estándares de 0.25-1.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

## **6.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS e inmunodetección**

Se tomaron 50  $\mu\text{g}$  de proteína total y se desnaturalizaron en buffer de carga (SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol), se colocaron a 95°C por 5 min. y después se cargaron en geles de acrilamida-SDS PAGE al 12%. Dicho gel se corrió a 40 volts por 20 min., posteriormente se incrementó el voltaje a 100 volts por 90 min. adicionales. La transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa se llevó a cabo usando un casete de transferencia en condiciones de 25 volts por 2.5 h. Al término de la transferencia se procedió con el bloqueo de la membrana por medio de una solución de TBS con leche al 5% y Tween al 5 % por una hora. El anticuerpo primario anti-Par-4 (sc-1666) se utilizó en una dilución 1:1000, dejando una incubación de toda la noche. Tras lo anterior, se realizaron tres lavados con buffer TBS de 10 min. cada uno. El anticuerpo secundario anti-ratón (Santa Cruz Biotechnology, sc-2005) se diluyó 1:1000 y se incubó con la membrana durante dos horas, al final de lo cual se realizaron tres lavados para retirar el exceso de anticuerpo no unido. La solución quimioluminiscente del kit ImmunoCruz (Santa Cruz Biotechnology) se agregó a la membrana de acuerdo a las instrucciones del fabricante, procediéndose al revelado. El anticuerpo anti-beta-actina (Santa Cruz Biotechnology) se diluyó 1:5000 y se incubó con la membrana durante toda la noche. De igual forma se lavó con solución TBS tres veces por 10 min. cada lavado, para después incubar con anticuerpo secundario anti-ratón en dilución 1:1000 por dos

horas, con tres lavados subsecuentes, incubación con solución quimioluminiscente y revelado.

### **6.7 Ensayo de viabilidad celular con MTT**

Se realizó el ensayo de proliferación celular con MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol) en las líneas celulares mencionadas. En caja de 96 pozos se efectuó el plaqueo con 5000 células por pozo en 200  $\mu$ L, permitiéndose la adhesión de dichas células (24 h.), tras lo cual se efectuó la adición de cisplatino en diferentes concentraciones (De 1.5 a 30  $\mu$ M). Las células fueron incubadas con dicho tratamiento durante diferentes tiempos (24 h., 48 h. y 72 h.). Subsecuentemente se retiró el medio con tratamiento y se agregó a cada pozo 20  $\mu$ L de una mezcla de MTT (5 mg del mismo por mL de PBS), con una incubación de 1-4 h, dependiendo de la línea celular. Tras lo anterior se retiró el medio, se agregó 150  $\mu$ L de DMSO, y se midió en lector de placas (Multiskan FC, Thermo Scientific) con absorbancia a 570 nm. Los datos fueron analizados en Excell.

### **6.8 Inmunohistoquímica de líneas celulares**

Las líneas celulares de cáncer de pulmón humano fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia adecuada (80-90%), tras lo cual se procedió a retirar el medio de cultivo y agregar tripsina para el desprendimiento de la capa celular. Las células fueron resuspendidas en medio DMEM F12 con SFB al 10% y transferidas a una placa de 6, conteniendo cada uno de los pocillos un cubreobjetos. Tras la adhesión de las células al cubreobjetos, y una vez alcanzada una confluencia adecuada, se procedió a retirar el medio de cultivo y agregar metanol frío para la fijación, durante 10 min. Hasta su utilización, cada placa fue almacenada a -20°C. Las células fueron hidratadas con PBS durante 10 minutos de manera inicial. Subsecuentemente se retiró el PBS y se agregó solución permeabilizante durante cuatro minutos. Tras la permeabilización se procedió a inactivar la peroxidasa endógena con una solución de metanol/peróxido de hidrógeno al 3%, esto durante 10 min. Tras este paso se procedió a bloqueo de sitios inespecíficos con

leche descremada al 2.5% durante media hora. Al retirar el bloqueo, se colocó el anticuerpo primario (anti-Par-4, sc-1666, Santa Cruz Biotechnology) en proporción 1:100, con una incubación de toda la noche a 4°C. Para contar con un control de la técnica, uno de los 6 pocillos se dejó con PBS, esto es, sin anticuerpo primario. Al término de la incubación, se retiró el exceso de anticuerpo con PBS y se agregó el anticuerpo secundario incluido en el kit R.T.U. Vecastain (Vector Laboratories, PK-7800), el cual fue utilizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El revelado se llevó a cabo con diaminobenzidina (ImmPACT DAB, Vector Laboratories, SK-41005), con diez minutos de incubación. Finalmente se procedió al contraste utilizando hematoxilina, con una incubación de cuatro minutos y su montaje en portaobjetos para su examinación al microscopio.

### **6.9 Cuantificación de la expresión de Par-4 en inmunohistoquímica de tejido pulmonar**

Se capturaron imágenes de los tejidos procesados mediante microscopio Zeiss PrimoStar (Zeiss, Alemania) equipado con AxioCam ERc 5s y el software AxioVision Rel 4.8, esto con los objetivos 40x y 100x. Mediante el programa Fiji (ImageJ) se realizó deconvolución de colores y se procedió a cuantificación de tres áreas distintas de tinciones color café, correspondientes la reacción antígeno-anticuerpo revelada por la diaminobenzidina, y se realizó un promedio con los tres valores obtenidos, por laminilla.

### **6.10 Análisis estadísticos**

Utilizando el software IBM SPSS Statics 20 (SPSS Inc., Chicago, IL), se realizó ANOVA de una vía para el análisis de la expresión de Par-4 entre tres grupos, así como prueba de Tukey para obtener la diferencia entre los mismos.

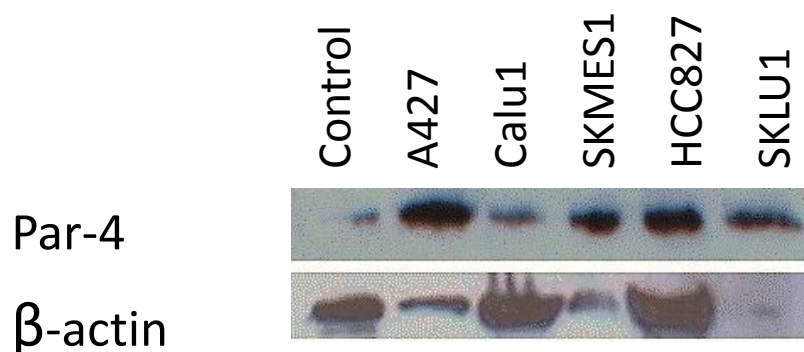


## 7. RESULTADOS

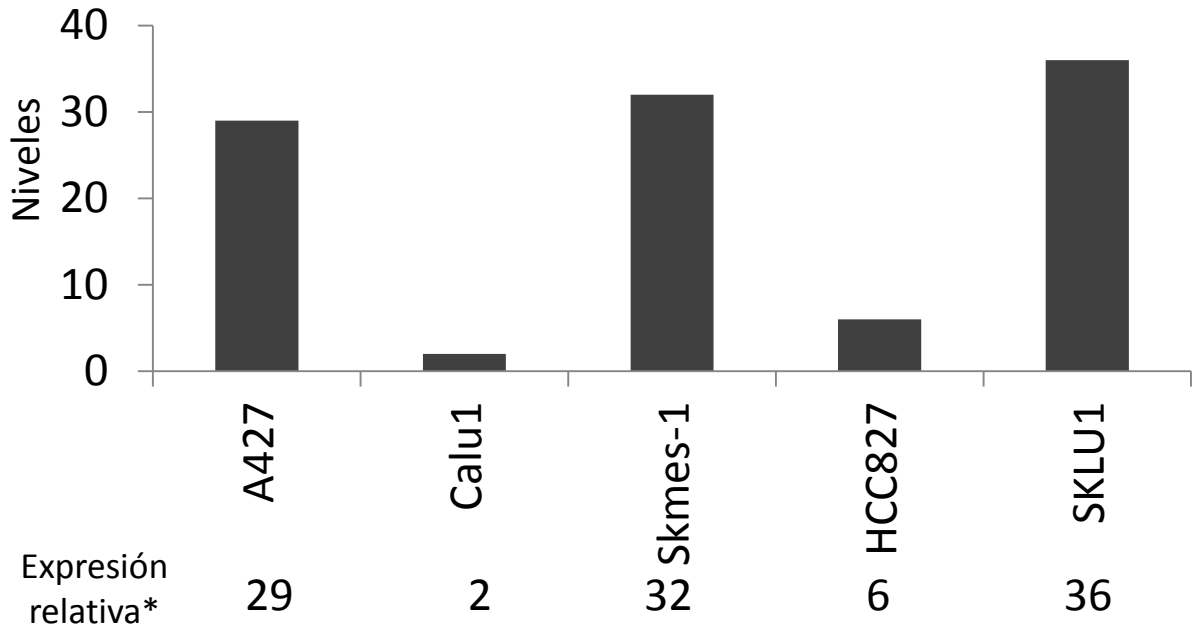
### 7.1 Análisis de la expresión de Par-4 en líneas celulares de cáncer de pulmón humanas

Las líneas celulares humanas de cáncer de pulmón A427, Calu-1, SKMES-1, HCC827 y SKLU1 fueron analizadas mediante Western Blot para determinar la expresión basal de Par-4. Se utilizó como control la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7, la cual ha sido reportada en la literatura como positiva para Par-4 (Shaterley et al., 2016). Beta actina se utilizó como control endógeno. La normalización se realizó mediante el software ImageJ. La mayor expresión de Par-4 se encontró en las líneas A427, SKMES-1 y SKLU1, con elevaciones 29, 32 y 36 veces sobre el control. Por su parte, HCC827 y Calu1 presentaron una expresión 6 y 2 veces mayor que la línea MCF-7.

Los resultados se muestran en la Figura 3 y en la Gráfica 1.



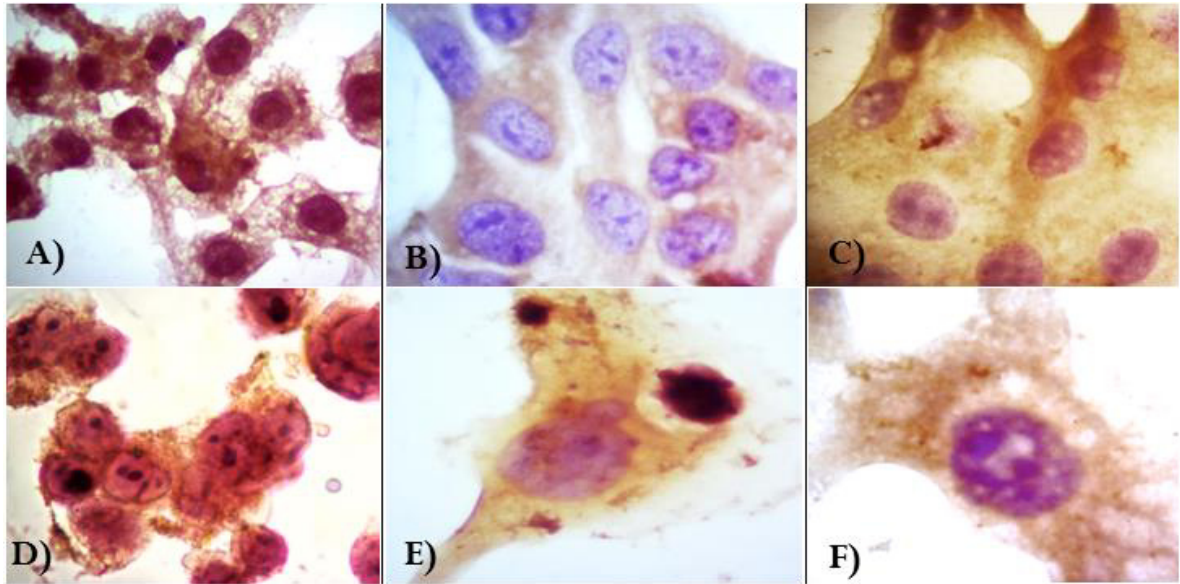
**Figura 3. Expresión basal de Par-4 en líneas celulares humanas de cáncer de pulmón.** Western blot, a partir de 50 µg de proteínas totales. Beta actina fue empleado como control endógeno.



**Figura 4. Normalización de Western blot para la expresión basal de Par-4 en líneas celulares humanas de cáncer de pulmón.** La gráfica representa la expresión basal de Par-4 en las líneas celulares de cáncer de pulmón mencionadas. La expresión relativa (\*) es referida respecto a la línea celular de cáncer de mama MCF-7, a la cual se le asignó un valor de 1.

## 7.2 Análisis de la localización celular de Par-4 en líneas celulares de cáncer de pulmón humanas

Se realizaron tinciones inmunohistoquímicas en las líneas celulares humanas de cáncer de pulmón A427, Calu-1, SKMES-1, HCC827 y SKLU1 para observar la localización celular de Par-4. En todas las líneas celulares analizadas la presencia de Par-4 se encontró de manera exclusiva en citoplasma. En la figura 5 se muestran imágenes representativas de dichas inmunohistoquímicas.



**Figura 5. Análisis de la localización celular de Par-4 en líneas celulares de cáncer de pulmón humanas.** A) Inmunohistoquímica para control del anticuerpo utilizando anti-Par-4 en la línea celular PC3 (cáncer de próstata humano). Se aprecia localización tanto citoplasmática como nuclear de Par-4. B) Inmunohistoquímica de la línea celular HCC827 (adenocarcinoma humano de pulmón). C) Inmunohistoquímica de la línea celular SKLU-1 (adenocarcinoma humano de pulmón). D) Inmunohistoquímica de la línea celular A427 (adenocarcinoma humano de pulmón). E) Inmunohistoquímica de la línea Calu-1 (Carcinoma escamoso humano de pulmón). F) Inmunohistoquímica de la línea celular SKMES-1 (Carcinoma escamoso humano de pulmón). En todas las líneas celulares de pulmón estudiadas se aprecia una localización endógena de Par-4 en citoplasma. Imágenes en objetivo 100x.

### 7.3 Análisis de la expresión/localización de Par-4 en líneas celulares de cáncer de pulmón humanas y su asociación con la respuesta a cisplatino

Las líneas celulares humanas de cáncer de pulmón Calu-1 y HCC827, con baja expresión de Par-4, así como las líneas SKMES-1 y SKLU1, con alta expresión esta proteína, fueron plaqueadas en cajas de 96 pocillos e incubadas por 24 horas antes de ser expuestas a concentraciones crecientes de cisplatino durante 48 horas. Contrario a lo esperado, se observó una IC<sub>50</sub> menor en las líneas celulares con menor expresión basal (Calu-1 y SKMES-1) respecto a las líneas con mayor expresión basal de Par-4 (SKLU-1 y SKMES-1). Los resultados se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Asociación de la expresión basal y localización celular de Par-4 con la sensibilidad a cisplatino.**

	LÍNEA CELULAR	EXPRESIÓN BASAL DE PAR-4*	IC50	LOCALIZACIÓN CELULAR DE PAR-4
Baja expresión basal de Par-4	Calu1	2	4.30µM	Citoplasma
	HCC827	6	14.4 µM	Citoplasma
Alta expresión basal de Par-4	SKMES-1	32	20.80 µM	Citoplasma
	SKLU-1	36	>20 µM	Citoplasma

Tabla1. Las líneas celulares estudiadas se dividieron en dos grupos, con baja y alta expresión de Par-4, y se comparó la respuesta a tratamiento (sensibilidad a la exposición a cisplatino durante 48 h). \*Niveles de expresión respecto a la línea celular control MCF7.

#### **7.4 Análisis de la expresión de Par-4 en muestras de tejido pulmonar**

En el presente trabajo se recibieron 26 muestras de pacientes con sospecha de carcinoma pulmonar. Nueve carcinomas primarios de pulmón fueron analizados en conjunto con 4 metástasis pulmonares y 1 mesotelioma, que corresponde a una neoplasia pleural primaria. La edad promedio al diagnóstico fue de 69 años en el grupo de pacientes con carcinoma primario de pulmón y de 42 años en el caso de metástasis pulmonar. Los datos demográficos se resumen en la tabla 2.

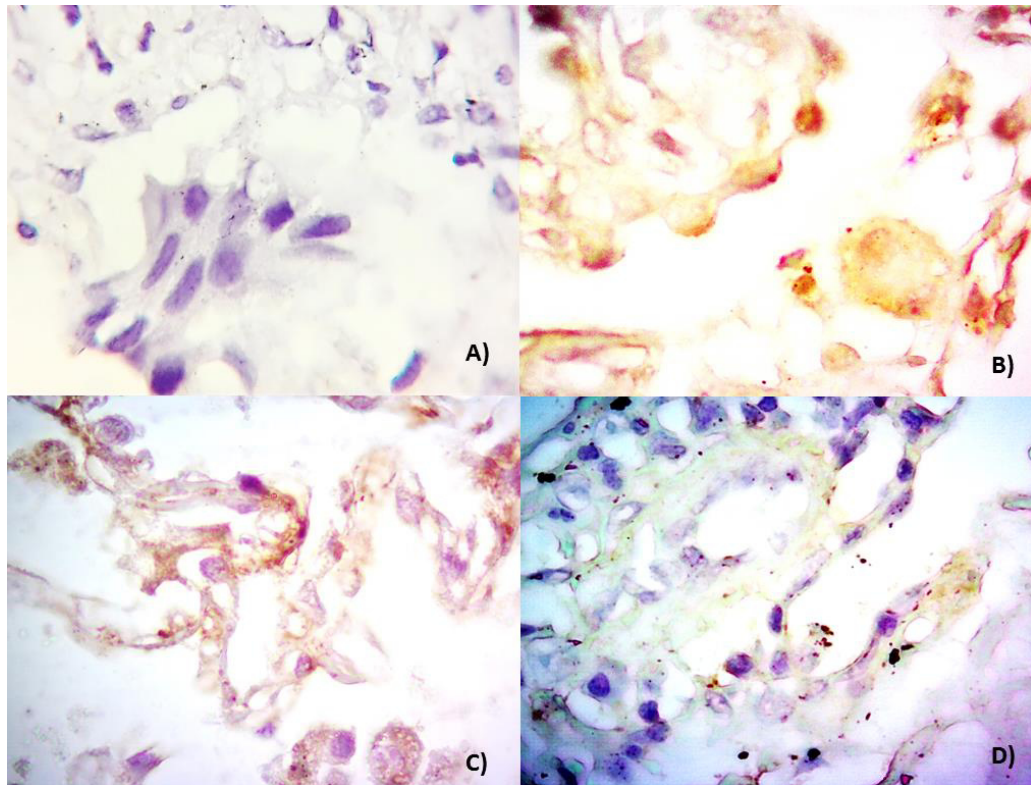
**Tabla 2. Datos clínicos e histopatológicos y estatus de Par-4 en pacientes con cáncer primario de pulmón**

Paciente	Genero	Edad	Histología	TNM	Sobrevida	Par-4
2	F	60	Carcinoide	*	*	Negativo
3	M	75	Células grandes	IV	1 mes	Negativo
4	F	90	Cel. pequeñas	III	Vive	Citoplasmático
8	M	73	Adenocarcinoma	IV	1 mes	Negativo
12	F	58	Carcinoide	IV	Vive	Citoplasmático
14	M	74	Escamoso	IV	1 día	Negativo
19	F	81	Escamoso	III		Citoplasmático
25	F	45	Escamoso	IV	2 meses	Negativo
26	M	29	Metástasis de Sarcoma de Ewing	IV	3 días	Negativo
6	F	60	Metástasis de Condrosarcoma	IV	Vive	Citoplasmático
7	F	47	Metástasis de Ca de Mama	IV	Vive	Negativo
9	M	35	Metástasis de Ca Renal	IV	1 mes	Citoplasmático
15	M	76	Mesotelioma	IV	Vive	Negativo
1	M	46	Neumonía	NA	Vive	
5	F	78	Proceso inespecífico agudo	NA	Vive	Citoplasmático
10	M	36	Neumonía	NA	Vive	Negativo
11	M	54	Neumonía	NA	Vive	Citoplasmático
16	F	15	Neumonía	NA	Vive	Negativo
17	M	51	Absceso	NA	Vive	Negativo
20	M	59	Antracosis	NA	Vive	Negativo
21	M	83	Neumonía +Antracosis	NA	Vive	Negativo
22	M	72	Neumonía	NA	Vive	Negativo
23	M	29	Neumonía	NA	Vive	Citoplasmático
24	M	14	Neumonía	NA	Vive	Negativo

\*Datos no proporcionados; NA: No aplica

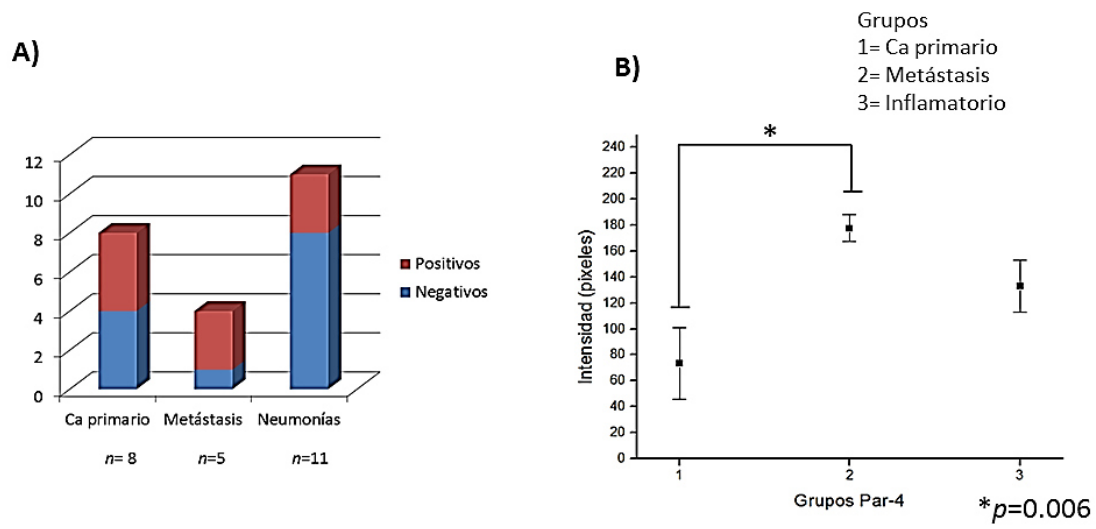
## **7.5 Análisis de la expresión de Par-4 en tumores de pulmón**

La determinación de Par-4 mediante inmunohistoquímica se llevó a cabo de manera cuantitativa a través del software ImageJ. En la figura 5 se presentan imágenes representativas de inmunohistoquímica para tinción de Par-4 de acuerdo a las categorías asignadas. En la figura 6 se muestra el análisis estadístico entre los grupos (carcinoma primario de pulmón, metástasis a pulmón y patologías inflamatorias) de acuerdo al promedio de intensidad en píxeles por grupo. Dado que la cuantificación de la reacción en nuestro caso corresponde a la reacción antígeno-anticuerpo revelada a través de la diaminobencidina, el valor obtenido es inversamente proporcional a la intensidad de reacción.



**Figura 6. Expresión de Par-4 en biopsias de tejido pulmonar.** Inmunohistoquímicas representativas de tejido pulmonar. A) Adenocarcinoma de pulmón, tinción negativa para Par-4. B) Tejido pulmonar en paciente con neumonía adquirida en la comunidad. Se aprecia una fuerte expresión de Par-4. C) Muestra de carcinoma escamoso de pulmón, se aprecia una moderada expresión de Par-4. D) Tejido correspondiente a paciente con metástasis pulmonar (origen primario de carcinoma renal). Se aprecia una tinción débil de Par-4. Todas las imágenes corresponden a objetivo 100x.





**Figura 7. Análisis y cuantificación de la expresión de Par-4 en biopsias de pulmón.** A) Representación gráfica del número de biopsias analizadas de acuerdo a los grupos de estudio, B) Análisis estadístico de las biopsias positivas para Par-4 de acuerdo a la intensidad en píxeles. Se realizó ANOVA de una vía y prueba de Tukey con el software SPSS versión 20. \* $p>0.006$

## 8. DISCUSIÓN

El cáncer de pulmón tiene una biología molecular compleja. Tanto en carcinomas de células pequeñas y no pequeñas existen mutaciones en p53, por lo general en el dominio de unión a ADN, impidiéndole efectuar sus acciones. De igual forma se han reportado sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas en ambos tipos histológicos. Cisplatino, droga de elección en el tratamiento del cáncer de pulmón, ejerce su función mediante la formación de enlaces intra e intercatenarios en el ADN, lo que frecuentemente culmina en muerte celular programada de no ser posible la reparación del daño. Sin embargo, existe una elevada tasa de resistencia, tanto intrínseca como adquirida, a este antineoplásico. Lo anterior remarca la necesidad de ahondar en el conocimiento a nivel molecular de este grupo de carcinomas, enfocado sobre todo a la resistencia a la apoptosis.

En el presente estudio se analizó la posibilidad de utilizar Par-4 (*prostate apoptosis response-4*), conocido supresor de tumores, como un marcador pronóstico. Trabajos previos, como el de El-Guendy y colaboradores, habían señalado la relación entre la localización celular de esta proteína con la respuesta a tratamiento. En dicho trabajo, los investigadores administraron un vector adenoviral conteniendo la región central de Par-4, conocida como SAC (selectiva para apoptosis en cáncer, por sus siglas en inglés), a un panel diverso de líneas celulares. Aquellas líneas con una localización endógena de Par-4 en el núcleo fueron sensibles a apoptosis por el vector, no sucediendo así con las líneas cuya proteína Par-4 era puramente citoplasmática. Lo anterior pone de manifiesto la importancia de las interacciones nucleares de este factor de transcripción.

En base a esto, la hipótesis del presente trabajo se encontraba encaminada a asociar la expresión basal y la localización de Par-4 con la respuesta a tratamiento y pronóstico en cáncer pulmonar. Durante el desarrollo del trabajo experimental encontramos obstáculos en la consecución de datos clínicos de los pacientes así como el número de muestras. Los pocos pacientes que logramos captar presentaron neoplasias primarias de pulmón poco frecuentes, como tumores carcinoides y carcinoma de células pequeñas, además de encontrarse en estadios avanzados de la enfermedad, por lo cual no

podimos separar grupos de baja y alta carga tumoral de manera en que nos fuera posible relacionar una diferencia en la expresión basal de Par-4 con los grados de la clasificación TNM. A un mismo tiempo, más pacientes del género femenino (cinco) fueron captadas que pacientes del género masculino (tres). En la región estudiada, Zacatecas, sigue siendo frecuente la exposición a biomasa, que podría en parte explicar esta diferencia en la epidemiología. A excepción de una paciente con carcinoma de células pequeñas que recibió tratamiento y continúa con vida, el resto de la población estudiada no fue candidata a quimioterapia o cirugía dado lo avanzado de la enfermedad, por lo que la respuesta a tratamiento tampoco pudo estudiarse en este trabajo. En proyectos futuros deberá de considerarse una aportación multicéntrica de muestras o que las mismas provengan de centros de concentración en los que las patologías malignas de pulmón sean representativas de la prevalencia en el país, de manera tal que sea posible tanto una mayor separación de estadios tumorales como un estudio de la diversidad molecular de esta enfermedad.

Las biopsias positivas para la tinción inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-Par-4, tanto en neoplasias primarias como metástasis a pulmón, fueron de localización citoplasmática. La cuantificación de la reacción, medida por la intensidad en píxeles del revelado con diaminobenzidina, se llevó a cabo con el software ImageJ, mediante deconvolución de color. Dicha cuantificación arrojó una mayor expresión de Par-4 en las muestras positivas en carcinomas primarios a comparación de las muestras de metástasis pulmonares, esto de manera estadísticamente significativa. Esto va de acuerdo a la evolución clonal del cáncer ya que la implantación y crecimiento tumoral en sitios distintos al de la malignidad de origen precisa la adquisición de un fenotipo agresivo, en el cual la resistencia a la apoptosis sin duda juega un papel muy importante. La combinación de estos resultados nos lleva a plantear una nueva hipótesis y perspectiva, tomando en cuenta la actividad pro-supervivencia de Akt. Una fosforilación en la serina 249 por Akt ha sido descrita como mecanismo de represión, el cual impide la translocación nuclear al permitir el secuestro por las chaperonas 14-3-3 en el citoplasma. Esto representa un experimento que podría realizarse por inmunohistoquímica, con un anticuerpo contra pAkt o Par-4 fosforilado en esta serina. Se han descrito mutaciones en el gen *PTEN*, la fosfatasa involucrada con la

desfosforilación y consecuente inactivación en Akt, en 2 y 8% de las adenocarcinomas y carcinomas escamosos de pulmón, respectivamente, lo que podría impactar de manera directa en la inactivación de Par-4 y el pronóstico del paciente. Otros mecanismos de inactivación podrían involucrar mecanismos epigenéticos y deleciones del brazo largo del cromosoma 12, sitio en que se encuentra el gen *PAWR*, que da origen a Par-4.

En lo que se refiere a la parte *in vitro* de este proyecto, encontramos una expresión basal de nuestra proteína en el panel de líneas celulares de carcinoma pulmonar estudiadas. En la normalización del Western Blot, la expresión de Par-4 fue mayor que la del control utilizado. Sin embargo, contrario a la hipótesis planteada, la mayor cantidad de este supresor de tumores no tuvo relación con la sensibilidad a drogas, sino justamente lo opuesto ya que en las líneas celulares SKLU-1 y SKMES-1, con expresión basal alta de la proteína, la concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) a 48 con cisplatino fue más alta que en aquellas con baja expresión de la misma (líneas HCC827 y Calu1). No obstante, en los estudios de inmunohistoquímica, la localización celular endógena fue citoplasmática, lo que de igual forma que los resultados *ex vivo* resalta la necesidad de efectuar una medición de la actividad de Akt, ya que podría tratarse de una represión de Par-4 a este nivel.

Un aspecto a considerar es la resistencia a cisplatino que presentaron las líneas celulares utilizadas, SKMES-1 y SKLU-1. Nuestra  $IC_{50}$ , en el primer caso, concuerda con lo reportado por Ceppi y colaboradores (Ceppi *et al.*, 2009). En el caso de SKLU-1, existen reportes que van de 3.4  $\mu$ M (Estrada-Montaña *et al.*, 2017) hasta 13.3  $\mu$ M (Camacho *et al.*, 2013) concentración de cisplatino expuesta durante 48 horas en esta línea celular necesaria para alcanzar la  $IC_{50}$ . Esto puede deberse a que ambos grupos cultivaron sus células en medio RMPI, que inicialmente fue el medio en que recibimos nuestras líneas, sin embargo fueron adaptadas para su crecimiento en DMEM F12. De igual forma, al tratarse de líneas celulares donadas, nos fue imposible conocer el número de pase proporcionado. Cabe señalar que SKLU-1 presenta una mutación con ganancia de función en el oncogen *KRAS* (G12D). Pruitt y colabores (Pruitt *et al.*, 2005) publicaron una serie de experimentos en las cuales destaca la transfección de líneas celulares inmortalizadas y neoplásicas mediante un retrovirus conteniendo las

mutaciones H-Ras (12V) y K-Ras (12V) lo que se tradujo en una regulación a la baja de Par-4. No obstante, en este mismo trabajo, Par-4 administrado de manera ectópica a través de un vector viral disminuyó la expresión y actividad transformante de Ras. Lo anterior apunta a una actividad inhibitoria recíproca, y el caso de la línea SKLU-1, al contener altos niveles de Par-4, nos lleva a generar nuevas hipótesis que podrían considerarse en trabajos futuros.

En base a lo expuesto en esta sección consideramos que debe continuarse el estudio de esta proteína como factor pronóstico en una muestra más amplia. Par-4 ha sido considerada una potencial herramienta terapéutica pero su papel pronóstico debe continuarse explorando tanto en tumores primarios como en metástasis a este órgano. Utilizar biopsias implica obtener una muestra representativa del tumor y permite estudiar dos o más secciones de tejidos en los cuales incluir el uso de distintos anticuerpos. Las diversas interacciones señaladas son asequibles de investigar a través de tinciones inmunohistoquímicas por lo que los resultados presentados en este trabajo dan pie a seguir utilizando esta aproximación en futuros proyectos.

## 9. CONCLUSIONES

1. Se encontró una expresión de la proteína Par-4 en las líneas celulares de cáncer de pulmón humanas A427, Calu1, HCC827, SKMES-1 y SKLU1.
2. La localización celular endógena de la proteína Par-4 en las líneas celulares de pulmón estudiadas fue exclusivamente citoplasmática.
3. Las líneas celulares de cáncer de pulmón con mayor expresión basal de Par-4 presentaron una  $IC_{50}$  mayor que aquellas líneas con una baja expresión de esta proteína.
4. La expresión basal de la proteína Par-4 en biopsias de pacientes con cáncer de pulmón fue mayor que en las biopsias de pacientes con metástasis a este órgano.
5. La localización celular de Par-4 en pacientes con cáncer de pulmón y en pacientes con metástasis a este órgano fue exclusivamente citoplasmática.

## 10. PERSPECTIVAS

1. Continuar y ampliar el presente trabajo con un número de muestra más amplio y una población heterogénea, en un estudio multicéntrico o un centro de referencia nacional.
2. Investigar la fosforilación de Akt, cinasa prosupervivencia, en la proteína Par-4. Esto en biopsias de pacientes así como *in vitro* (líneas celulares) por medio de anticuerpos dirigidos contra ambas proteínas mediante inmunohistoquímica.
3. Determinar la presencia/ausencia de Par-4 secretado en suero de pacientes afectados por neoplasias y su relación con el pronóstico de la enfermedad.
4. Ahondar en el papel que juegan los fármacos antineoplásicos y la activación de Par-4 en líneas celulares de cáncer de pulmón humano.

## REFERENCIAS

1. Hanahan D y Weinberg RA, 2000. The hallmarks of cancer. *Cell journal* 100(1):57-70
2. Hanahan D y Weinberg RA, 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646-74.
3. Torre LA et al., 2015. Global cancer statics, 2012. *CA Cancer Clin J* 65(2):87-108
4. Sánchez NC., 2013. Knowing and understanding the cancer cell: Physiopathology of cancer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24 (4), 553-562
5. Otto T y Sicinski O., 2017. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 17(2):93-115
6. Akincilar SC, Unal B, y Tergaonkar V., 2016. Reactivation of telomerase in cancer. *Cell Mol Life Sci* 73(8):1659-70
7. Bottos A y Bardelli A, 2013. Oncogenes and angiogenesis: a way to personalize anti-angiogenic therapy?. *Cell Mol Life Sci*.70(21):4131-40
8. Pon JR y Marra MA., 2015. Driver and passenger mutations in cancer. *Annu Rev Pathol*. 10:25-50
9. Futreal PA et al., 2004. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer*. 2004 Mar;4(3):177-83
10. Stratton MR, Campbell PJ y Futreal PA., 2009. The cancer genome. *Nature* 458(7239):719-24
11. Luzzatto L y Pandolfi PP, 2015. Causality and Chance in the development of cancer. *N Engl J Med*. 2015 Oct 15;373(16):1579
12. Islami F et al., 2015. Global trends of lung cancer mortality and smoking prevalence. *Translational lung cancer research* 4(4):327-38
13. Akopyan., 2006. Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis. *Int J Oncol*. 29(4):745-52
14. Zappa C y Mousa SA, 2016. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res* 5(3):288-300
15. Chen Z et al., 2014. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer* 14(8):535-46



16. Kim S., 2015. New and emerging factors in tumorigenesis: an overview. *Cancer Manag Res.* 7:225-39
17. Sabapathy K y Lane DP, 2017. Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others. *Nat Rev Clin Oncol.* 15(1):13-30
18. Zhang F y Cheong JT., 2016. The renewed battle against RAS mutant cancers. *Cell. Mol. Life Sci.* 73(9):1845-58
19. Liu TC et al., 2017. Role of epidermal growth factor receptor in lung cancer and targeted therapies. *Am J Cancer Res.* 2017 Feb 1;7(2):187-202
20. Hirsch FR et al., 2017. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet* 389; 299-311
21. Dorward DA et al., 2017. Molecular pathology of non-small cell lung cancer. *Diagnostic histopathology* 23(10) 450-457
22. Black RC y Khurshid H., 2015. NSCLC: An Update of Driver Mutations, Their Role in Pathogenesis and Clinical Significance. *R I Med J* (2013). 2015 Oct 1;98(10):25-8
23. Lemjabbar-Alaoui H et al., 2015. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochimica et biophysica acta* 1856(2):189-210
24. Rossi G et al., 2018. Molecular alterations of neuroendocrine tumours of the lung. *Histopathology.* 72(1):142-152
25. Joshi et al., 2008. Par-4 inhibits Akt and suppresses Ras-induced lung tumorigenesis. *The EMBO Journal* (2008) 27, 2181–2193
26. Sells et al. 1994. Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells. *Journal of Cell Growth and Differentiation* 5(4):457-66
27. Johnstone et al., 1998. Mapping of the human pawr (PAR4) gene to chromosome 12q21. *Genomics* 53:241
28. El-Guendy et al., 2003. Identification pf a unique core domain of PAR4 sufficient for selective apoptosis in cancer cells. *Molecular and celular Biology* 23:5516-25

29. Gurumurthy et al., 2005. Phosphorylation of Par-4 by protein kinase A is critical for apoptosis. *Journal of molecular and cellular biology* 25(3):1146-61
30. Goswami A et al., 2005. Binding and phosphorylation of par-4 by akt is essential for cancer cell survival. *Mol Cell*. 20(1):33-44
31. Goswami A et al. 2006. The Phosphoinositide 3-Kinase/Akt1/Par-4 Axis: A Cancer-Selective Therapeutic Target. *Cancer research* 66(6):2889-92
32. Chakraborty M et al., 2001. Par-4 drives trafficking and activation of Fas and FasL to induce cancer cell apoptosis and tumor regression. *Cancer Res* 61(19):7255-63
33. Lee TJ et al. 2010. Overexpression of Par-4 sensitizes TRAIL-Induced apoptosis via inactivation of NF- $\kappa$ B and Akt signaling pathways in renal cancer cells. *J Cell Biochem*.109(5):885-95
34. Burikhanov et al., 2009. The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis. *Cell journal* 138(2):377-88
35. Burikhanov et al., 2017. Chloroquine-Inducible Par-4 secretion is essential for tumor cell apoptosis and inhibition of metastasis. *Cell rep* 18(2): 508–519.
36. Camandola S y Mattson MP., 2000. Pro-apoptotic action of PAR-4 involves inhibition of NF- $\kappa$ B activity and suppression of BCL-2 expression. *J Neurosci Res*.61(2):134-9.
37. Huff V., 2011. Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene. *Nat Rev Cancer* 11(2):111-21
38. Johnstone RW et al., 1996. A novel repressor, par-4, modulates transcription and growth suppressor functions of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Mol Cell Biol*.16(12):6945-56
39. Moscat J, Díaz Meco MT y Wooten MW., 2009. Of the atypical PKCs, Par-4 and p62: recent understandings of the biology and pathology of a PB1-dominated complex. *Cell Death Differ*. 16(11):1426-37
40. Chaudry P et al., 2011. Prostate apoptosis response-4 (Par-4), a novel substrate of caspase-3 during apoptosis activation. *Mol Cell Biol*. 32(4):826-39

41. Boehrer et al., 2002. In lymphatic cells par-4 sensitizes to apoptosis by down-regulating bcl-2 and promoting disruption of mitochondrial membrane potential and caspase activation. *Cancer Res.* 62(6):1768-75
42. Chendil D et al., 2002. Par-4, a pro-apoptotic gene, inhibits radiation-induced NF kappa B activity and Bcl-2 expression leading to induction of radiosensitivity in human prostate cancer cells PC-3. *Cancer Biol Ther.* 1(2):152-60
43. Cheema SK et al., 2003. Par-4 transcriptionally regulates Bcl-2 through a WT1-binding site on the bcl-2 promoter. *J Biol Chem* 278(22):19995-20005
44. Barradas M et al., 1999.
45. García-Cao, et al., 2005. Genetic inactivation of Par4 results in hyperactivation of NF-kappaB and impairment of JNK and p38. *EMBO Reports* 4(3):307-12
46. Moreno-Bueno G et al., 2007. Inactivation of the candidate tumor suppressor Par-4 in endometrial cancer. *Cancer Res* 67(5):1927-34.
47. Cook J et al, 1999. Decreased expression of the pro-apoptotic protein Par-4 in renal cell carcinoma. *Oncogene.* 18(5):1205-8.
48. Zapata-Benavides, 2009. Expression of prostate apoptosis response (Par-4) is associated with progesterone receptor in breast cancer. *Archives of medical research* 40(7):595-9
49. Alvarez JV et al, 2013. Par-4 Downregulation Promotes Breast Cancer Recurrence by Preventing Multinucleation following Targeted Therapy. *Cancer Cell* 24(1):30-44
50. Kogel D, 2001. Dlk/ZIP kinase-induced apoptosis in human medulloblastoma cells: requirement of the mitochondrial apoptosis pathway. *Br J Cancer.* 2001 Nov 30;85(11):1801-8
51. Wang BD, 2010. Prostate apoptosis response protein 4 sensitizes human colon cancer cells to chemotherapeutic 5-FU through mediation of an NF kappaB and microRNA network. *Mol Cancer.* 9:98
52. Ahmed MM, 2008. Downregulation of Par-4, a pro-apoptotic gene, in pancreatic tumors harboring K-ras mutation. *Int J Cancer.* 2008 Jan 1;122(1):63-70.

53. Nagai et al., 2010. Down-regulation of the candidate tumor suppressor gene PAR-4 is associated with poor prognosis in breast cancer. *International Journal of Oncology*. 37(1):41-9
54. Shaterley et al., 2016. Prostate Apoptosis Response-4 (PAR4) Suppresses Growth and Invasion of Breast Cancer Cells and Is Positively Associated with Patient Survival. *Journal of anticancer research* 36(3):1227-35
55. Hebbar N, Wang C y Rangnekar VM., 2012. Mechanisms of apoptosis by the tumor suppressor Par-4. *J Cell Physiol*. 2012 Dec;227(12):3715-21
56. Ceppi et al., 2009. Effects of Src kinase inhibition induced by dasatinib in non-small cell lung cancer cell lines treated with cisplatin. *Mol Cancer Ther*. 8(11):3066-74
57. Estrada-Montaña et al. 2017. Iron(III) Pincer Complexes as a Strategy for Anticancer Studies. *Eur. J. Inorg. Chem*. 1673-1678.
58. Camacho CC et al., 2013. Synthesis, structural characterization and in vitro cytotoxic activity of novel polymeric triorganotin(IV) complexes of urocanic acid. *Appl. Organometal. Chem*. 27, 45-51

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Jorge Emmanuel Carrizales Luna

Candidato para el grado de la  
Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunología

Tesis: EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PAR-4 EN PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR Y SU ASOCIACIÓN CON EL PRONÓSTICO

Campo de estudio: Epidemiología molecular del cáncer

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, México, el 28 de julio de 1985, hijo de María del Carmen Luna Martínez y Jorge Carrizales Martínez.

Educación: Médico cirujano y partero (UANL, 2002-2009), Especialidad en Patología Clínica (UANL, 2013-2016).

Experiencia profesional: Médico residente HGZ No.1, Zacatecas, Zacatecas (2010-2011), Médico residente Hospital de Especialidad Siglo XXI (2011-2012), Médico residente Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González (2013-2016).