



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

---

---

**“Efecto de un análogo de talidomida sobre la vía de proteínas RhoA-ROCK, en células SiHa”**

Tesis que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD**

Presenta:

**BIOL. SILVIA YALID VARGAS ROLDÁN**

Director(a) de Tesis

**DR. T. EDUARDO FERNÁNDEZ MARTÍNEZ**

**Codirectora: Dra. Leticia Rocha Zavaleta**

San Agustín Tlaxiaca Hgo. Diciembre de 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
 Instituto de Ciencias de la Salud  
 School of Health Sciences  
 Área Académica de Medicina  
 Department of Medicine  
 Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

8/noviembre/2018

AAM/MCBS/083/2018

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

**Silvia Yalid Vargas Roldán**  
 Alumna de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Efecto de un análogo de talidomida sobre la vía de proteínas RhoA-ROCK en células SiHa" con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE DR. MARIO ISIDORO. ORTIZ RAMÍREZ

PRIMER VOCAL DR. TOMÁS EDUARDO FERNÁNDEZ MARTÍNEZ

SECRETARIO DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA

SUPLENTE DR. LUIS ENRIQUE SORIA JASSO

Luis Enrique Soria Jasso

SUPLENTE DRA. RAQUEL CARIÑO CORTÉS

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente  
 "AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

M.C. ESP. ADRIÁN MOYA ESCALERA  
 DIRECTOR



DRA. LYDIA LOPEZ PONTIGO  
 COORDINADORA DE POSGRADO ICESA

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ  
 COORDINADOR DEL PROGRAMA



Instituto de Ciencias de la Salud  
 Ex Hacienda la Concepción s/n Camino a Tilcuaulia,  
 San Agustín Tlaxiaca, Hgo. C.P. 42160  
 Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308  
 mtra\_bio\_sal@uaeh.edu.mx

[www.uaeh.edu.mx](http://www.uaeh.edu.mx)

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca **606814**.

Durante el periodo abril-mayo de 2018 se realizó una estancia nacional de investigación en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en la ciudad de México, México, apoyada por Beca Mixta del CONACyT.

Agradezco al Centro de Investigación de Biología de la Reproducción del Área Académica de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y al laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por todo el apoyo, recursos, e infraestructura proporcionados para la realización de esta tesis.

## **DEDICATORIA**

A mi familia:

Es curioso darnos cuenta de que a pesar de nuestros errores y aciertos, al final del día, siempre queda ese lugar al cual podemos regresar, en el que siempre estarán esperándonos con los brazos abiertos sin importar el tiempo, la distancia y los daños, aquél lugar al que podemos llamar con orgullo: HOGAR.

Hoy estoy aquí, expresando con gran alegría, que he llegado tan lejos gracias a ustedes; la vida me ha llevado en distintas ocasiones en dirección contraria a la suya y en ningún momento me he sentido sola, porque ustedes son eso a lo que llamo AMOR.

Gracias papás, Silvia Elena Roldán Arana y José Camilo Vargas Lira, porque sin su amor, confianza y entrega, no sería la persona que soy ahora, porque ambos me han enseñado que con esfuerzo, dedicación, constancia y sobre todo con corazón TODO es posible. Ojalá tenga la dicha de parecerme un poco a ustedes.

Gracias hermano, Alberto Isaac Vargas Roldán, por ser mi compañero de vida, por ser un ejemplo de lucha y perseverancia, estoy muy orgullosa del hombre que eres, porque gracias a ti sé lo que implica renacer de las cenizas y brillar todavía más que antes.

Gracias a mi sobrino, José Adrián Vargas Martínez, por enseñarme que las cosas sencillas son las más bellas, por ser mi refugio en los días tristes que poco a poco tiñes de color con tus sonrisas. Nada es como tú.

Gracias a Laura Berenice Olvera Rosales, mi hermana por elección, por ser mi mejor amiga y mi familia lejos de casa, por enseñarme a confiar en mí misma, por ser mi apoyo en los momentos difíciles y por ser mi canción favorita.

A mi lobito, porque llegaste en el momento en el que más te necesitaba, para enseñarme que el amor que viene en 4 patas y un aullido es tan bello que de igual manera, puede llenarme el corazón. Definitivamente has cambiado nuestras vidas.

Muchas gracias por todo el amor y el apoyo que me han dado hasta el día de hoy, los amo de una manera inigualable, son lo mejor que hay en mi vida. GRACIAS.

## **AGRADECIMIENTOS**

Dr. T. Eduardo Fernández Martínez, gracias por la confianza depositada en mí para la realización de este trabajo de investigación. Por todos los conocimientos transmitidos a lo largo de estos años de posgrado y sobre todo por ser un profesor ejemplar y del que más he aprendido a través de mi vida académica. Agradezco infinitamente todo el cariño y la amistad brindada en este tiempo, realmente ha sido maravilloso coincidir con usted, es una persona extraordinaria en todo sentido. Muchísimas gracias por compartir tanto conmigo.

Dra. Leticia Rocha Zavaleta, le agradezco de todo corazón por haberme abierto las puertas de su laboratorio, por depositar en mí su confianza, por brindarme todos los conocimientos y enseñanzas para poder culminar este proyecto. Las palabras no alcanzan para expresar mi total gratitud hacia usted y hacia todas las atenciones que tuvo conmigo. Sin duda alguna, haber trabajado con usted ha sido la mejor experiencia hasta ahora en mi camino profesional. Doy gracias a la vida por haberla puesto en mi camino.

Dr. Héctor Antonio Ponce Monter, ha sido todo un privilegio ser una de las últimas alumnas que tuvieron la dicha de tomar clases con usted y de haber recibido tantas enseñanzas de su parte. Mil gracias por su tiempo y paciencia para enseñarme todo el mecanismo de contracción del músculo liso uterino, realmente todos esos conocimientos, hoy en día, son la base para este proyecto. El mundo necesita más investigadores como usted.

Dra. Raquel Cariño Cortés, ¿qué sería de mí sin todos los ánimos que siempre me ha dado? Muchas gracias por ser parte de mi comité, leer y revisar mi tesis aportando siempre comentarios constructivos y de los cuales he podido aprender a sobremanera. Sobre todo, gracias por esa sonrisa que siempre está ante cualquier situación y por todos los buenos deseos y el apoyo en cada paso que he dado.

Dr. Mario I. Ortiz Ramírez y Dr. Luis Enrique Soria Jasso, les agradezco por todos los comentarios proporcionados para la realización de este trabajo, por tomarse el tiempo de leer y revisar mi trabajo de investigación y apoyarme como estudiante. Es un honor para mí tenerlos en mi jurado.

Dr. Víctor Manuel Muñoz Pérez, muchas gracias por enseñarme las bases del cultivo celular y de Western Blot, por el apoyo brindado a través de este tiempo, por la paciencia y los ánimos y, sobre todo por confiar en mí en la realización de esta tesis.

M. en C. Cecilia Zacarías Aguilar, muchas gracias por todo lo instruido en mi estancia académica, por instruirme en cultivo celular, por todos los consejos y los comentarios dados para poder mejorar como profesionista. Agradezco infinitamente todo el apoyo proporcionado desde el primer hasta el último día. Gracias de todo corazón, una vez más.

M. en C. Liliana Guadalupe Cortés Ballinas, gracias por guiarme e instruirme en la técnica de Western Blot, la parte más importante en la realización de este proyecto, agradezco cada minuto de tiempo designado a compartir los conocimientos necesarios para la realización del mismo, a aclarar cualquier duda y, sobre todo mi más entero agradecimiento por la paciencia para conmigo, gracias totales.

Lic. María Guadalupe Columba Navarrete Bernal, las palabras nunca serán suficientes para extender mi sentir, muchas gracias por ser esa luz en el camino, por siempre estar ahí cuando tuve alguna duda tanto en cultivo celular, citometría y Western Blot y apoyarme en la realización de los mismos. Más que nada, agradezco tu amistad y cariño, por tantos momentos compartidos y por enseñarme cosas que van más allá de lo académico, todo eso me ha llenado como persona y me ha enseñado que no importa el tiempo, la amistad va más allá de eso.

QFB Daniela Tenorio Hernández, muchas gracias por esclarecer todas mis dudas, por siempre explicarme de manera correcta y muy entendible cualquier tema del cual desconocía, por guiarme en la realización de algunos experimentos y por llenar de alegría mis días. Gracias por tu linda amistad y por todos esos momentos que se quedan guardados en el corazón.

M. en C. José Andrés López Mejía, muchas gracias por todo lo enseñado, por resolver mis dudas en Western Blot y cultivo celular, por las pláticas enriquecedoras y sobre todo por darme los ánimos necesarios en el momento adecuado.

En general agradezco a todos los miembros del laboratorio C212 del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la UNAM, por todo el apoyo brindado desde el comienzo de mi estancia académica hasta la culminación de la misma, esto no hubiera sido posible sin todos ustedes. Gracias de corazón por formar parte de mi vida académica.

Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez, gracias por ser un excelente ser humano, por siempre guiarme de manera adecuada en cada tema y cuestión relacionados a este posgrado.

Marcelo Santos Escamilla, gracias por todo lo que me has apoyado a lo largo de este camino, por siempre escuchar y alentarme, por estar junto a mí incluso cuando yo misma me dejo sola, en tus brazos siempre encuentro la fuerza necesaria para poder continuar, tanto que espero que nuestros pasos siempre vayan en la misma dirección. Gracias por cuidar de mí, no sabes lo mucho que significa para mí tenerte en mi vida.

Agradezco a todos mis compañeros de generación de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud, por tantos momentos compartidos, por ser esenciales en el desarrollo de la misma y por siempre ser un gran apoyo. En especial, quiero agradecer a Itziar, Pedro e Ivonne, por ser mis cómplices y el mejor regalo que la maestría pudo dejarme. Los quiero mucho.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	I
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	IV
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	V
<b>ABREVIATURAS</b> .....	VI
<b>RESUMEN</b> .....	X
<b>ABSTRACT</b> .....	XII
<b>1 MARCO TEÓRICO</b> .....	1
1.1 Útero.....	1
1.1.2 Anatomía general del cérvix .....	2
1.1.2.1. Exocérvix .....	2
1.1.2.2 Endocérvix .....	3
<i>1.1.2.3 Unión escamoso-cilíndrica (UEC)</i> .....	4
1.1.2.4 Ectropión/ectopia .....	5
1.1.2.5 Metaplasia escamosa y zona de transformación.....	5
<b>2 ANTECEDENTES</b> .....	7
2.1 Generalidades.....	7
2.1.1 Cáncer cervicouterino .....	7
2.1.2 Causas del cáncer cervicouterino .....	8
2.1.2.1 Infección por virus de papiloma humano .....	9
2.1.3 Diagnóstico .....	10
2.1.4 Tratamiento para el cáncer cervicouterino .....	10
2.1.4.1 Cirugía.....	11
2.1.4.2 Radioterapia .....	11
2.1.4.3 Quimioterapia.....	11
<b>2.2 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA</b> .....	13
2.2.1 Fosfodiesterasas .....	13
2.2.1.1 Inhibición de PDEs para el tratamiento del cáncer .....	13
2.2.1.2 Inhibidores de PDE-4 .....	15
2.2.1.3 Inhibición de PDE-4 como blanco terapéutico para el cáncer .....	17
2.2.2 Talidomida .....	18
2.2.2.1 Mecanismo de acción de la talidomida .....	19
2.2.2.2 Usos actuales de la talidomida en la clínica .....	21



2.2.3 Análogos de talidomida como inhibidores de PDE-4 .....	21
2.2.4 Mecanismo de contracción mediado por la vía de proteínas RhoA-ROCK.....	23
2.2.4.1 Vía RhoA-ROCK y su relación con el cáncer.....	26
2.2.4.1.1 Vía RhoA-ROCK en el cáncer cervicouterino.....	27
<b>3 HIPÓTESIS .....</b>	<b>30</b>
<b>4 JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>5 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>Objetivo general .....</b>	<b>31</b>
<b>Objetivos particulares.....</b>	<b>31</b>
<b>6 MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>6.1 Fármacos y Soluciones .....</b>	<b>32</b>
6.1.1 Anticuerpos.....	32
6.1.2 Línea celular .....	32
<b>6.2 Viabilidad celular .....</b>	<b>33</b>
6.2.1 Principio.....	33
6.2.2 Procedimiento .....	33
<b>6.3 Cuantificación del AMPc.....</b>	<b>34</b>
6.3.1 Principio.....	34
6.3.2 Procedimiento .....	34
<b>6.4 Expresión de p-MLCP y p-MLC por Western blot .....</b>	<b>35</b>
6.4.1 Principio.....	35
6.4.2 Procedimiento .....	35
6.4.2.1 Extracción de proteína.....	35
6.4.2.2 Cuantificación de proteína.....	36
6.4.2.3 Western blot .....	36
<b>6.5 Análisis estadístico.....</b>	<b>39</b>
<b>7 RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
<b>7.1 Efecto del 4AFDPMe sobre la viabilidad de células SiHa .....</b>	<b>40</b>
<b>7.2 El 4NO<sub>2</sub>FDPMe induce un aumento en el número de células viables en células SiHa....</b>	<b>42</b>
<b>7.3 El 4AFDPMe induce un incremento en los niveles intracelulares de AMPc en células SiHa .....</b>	<b>45</b>
<b>7.4 El 4AFDPMe promueve la activación temporal de p-MLC en células SiHa .....</b>	<b>47</b>
<b>7.5 El 4AFDPMe induce la inactivación transitoria de MLCP por medio de su fosforilación .....</b>	<b>48</b>

<b>8 DISCUSIÓN</b> .....	49
<b>9 PERSPECTIVAS</b> .....	58
<b>10 CONCLUSIONES</b> .....	59
<b>11 BIBLIOGRAFÍA</b> .....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** A) Esquema general del útero, en la que se muestran las partes que lo conforman. B) Partes de la capa interna (endometrio) del útero.
- Figura 2** Epitelio escamoso estratificado.
- Figura 3** Criptas del epitelio cilíndrico.
- Figura 4** Proporciones estimadas de mortalidad mundial por cáncer por sitios principales en mujeres, 2012.
- Figura 5** Curvas de mortalidad e incidencia de cáncer cervicouterino, de 2000 a 2010. Tasas estandarizadas por edad por 100,000 mujeres.
- Figura 6** Estructura química de la talidomida y de sus análogos 3-(4-nitroftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (4NO<sub>2</sub>FDPMe) y 3-(4-aminoftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (4AFDPMe).
- Figura 7** Estructura de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP).
- Figura 8** Regulación del mecanismo de contracción celular mediado por la vía RhoA-ROCK.
- Figura 9** Efecto del 4AFDPMe a concentraciones diversas sobre la viabilidad celular en células SiHa a 24 h de tratamiento.
- Figura 10** Efecto del 4AFDPMe a concentraciones diversas sobre la viabilidad celular en células SiHa a 48 h de tratamiento.
- Figura 11** Efecto del 4NO<sub>2</sub>FDPMe a concentraciones diversas sobre la viabilidad celular en células SiHa a 24 h de tratamiento.
- Figura 12** Efecto del 4NO<sub>2</sub>FDPMe a concentraciones diversas sobre la viabilidad celular en células SiHa a 48 h de tratamiento.
- Figura 13** Niveles intracelulares de AMPc en células SiHa estimuladas con 4AFDPMe (125 y 250 μM).
- Figura 14** Activación de pMLC (Thr18/Ser19) conforme al tiempo de exposición al 4AFDPMe 250 μM en células SiHa
- Figura 15** Activación de p-MLCP (Thr853) conforme al tiempo de exposición al 4AFDPMe 250 μM en células SiHa.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1** Composición de los geles de acrilamida al 8% y 15%.

**Tabla 2** Composición del gel estratificado (Stacking gel).

## ABREVIATURAS

<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentración de calcio intracelular de Ca <sup>2+</sup>
<b>4AFDPMe</b>	3-(4-aminofthalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo
<b>4NO<sub>2</sub>FDPMe</b>	3-(4-nitroftalimido)-3-(3,4dimetoxifenil)-propanoato de metilo
<b>AC</b>	Adenilato ciclase
<b>AMPc</b>	3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
<b>AP</b>	Persulfato de amonio
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>CaCu</b>	Cáncer cervicouterino
<b>CKI</b>	Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas
<b>CRBN</b>	Cereblon
<b>DMEM</b>	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's medium)
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ENL</b>	Eritema nodoso lepromatoso
<b>Epo</b>	Eritropoyetina
<b>ERKs</b>	Cinasas reguladas por señalización extracelular
<b>Faf8</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos 8
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Fármacos de E.U.A.)

<b>FDPMe</b>	3-ftalimido-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo
<b>FSK</b>	Forskolina
<b>GMPc</b>	Monofosfato cíclico de guanosina
<b>GPCR</b>	Receptores acoplados a proteínas G
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina
<b>HPDE-4</b>	Alta afinidad a PDE-4
<b>IBMX</b>	3-Isobutil-1-metilxantina
<b>IgM</b>	Inmunoglobulinas-M
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferón- $\gamma$
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-10</b>	Interleucina-10
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina-1 $\beta$
<b>IL-2</b>	Interleucina-2
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IL-8</b>	Interleucina-8
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>LPDE-4</b>	Baja afinidad a PDE-4
<b>MAK</b>	Cinasa activada por mitógeno
<b>MLC</b>	Cadena ligera de la miosina
<b>MLCK</b>	Cinasa de la cadena ligera de la miosina

<b>MLCP</b>	Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio
<b>MYPT1</b>	Subunidad reguladora de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear-κB
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PAP</b>	Papanicolaou
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>PDE</b>	Fosfodiesterasas
<b>PDE-4</b>	Fosfodiesterasa-4
<b>PDE-4B2</b>	Fosfodiesterasa-4B2
<b>PKA</b>	Cinasa de proteínas dependiente de AMPc
<b>PKC</b>	Cinasa de proteínas dependiente de Ca
<b>pMLC</b>	Cadena ligera de la miosina fosforilada
<b>QT</b>	Quimioterapia
<b>RhoGDI</b>	Disociación de nucleótidos Rho-guanina
<b>Rho-GEFs</b>	Factores de intercambio de nucleótidos de guanina
<b>ROCK</b>	Cinasa asociada a Rho
<b>RT</b>	Radioterapia
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SEM</b>	Error estándar de la media

<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
<b>UEC</b>	Unión escamoso-cilíndrica
<b>VPH</b>	Virus del papiloma humano
<b>ZT</b>	Zona de transformación
<b>ZTA</b>	Zona de transformación anormal o atípica



## RESUMEN

El cáncer cervicouterino es un problema de salud mundial, es la cuarta neoplasia femenina más frecuente en el mundo. Los tratamientos actuales son ineficientes, pues las células cancerígenas son capaces de desarrollar resistencia a éstos, los cuales también generan efectos adversos para el paciente. Una diana farmacológica es la inhibición de fosfodiesterasas-4 (PDE-4), éstas son enzimas que hidrolizan al AMPc, por lo que su inhibición eleva la concentración intracelular del AMPc que activa a las cinasas de proteínas dependientes de AMPc (PKA), mismas que fosforilan proteínas clave en la vía de contracción celular involucrada en los procesos de invasividad, motilidad, y migración celular en el cáncer. Una de esas proteínas es RhoA, una proteína-G pequeña que activa a la cinasa asociada a Rho (ROCK), esta cinasa fosforila e inhibe a la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP), a su vez, ésta desfosforila a la cadena ligera de la miosina (MLC) para inhibir el proceso de contracción celular; en suma, esta vía puede ser controlada por fosforilaciones con PKA. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos análogos de la talidomida, 3-(4-nitroftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (4NO<sub>2</sub>FDPMe) y 3-(4-aminoftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (4AFDPMc), como inhibidores de PDE-4, sobre la viabilidad de células cancerosas de cérvix SiHa; posteriormente, se eligió el que tuvo el mejor efecto y se continuó su estudio.

Mediante la prueba de MTT se demostró que la proliferación de células SiHa disminuye a 24 y 48 h de su tratamiento con concentraciones altas (250, 500, y 1000 µM) del 4AFDPMc; sin embargo, a concentraciones bajas (0.976-125 µM), ésta aumentó en 48 h de tratamiento, lo que sugiere que el efecto del 4AFDPMc sobre la viabilidad en células SiHa es dependiente de la concentración. Por el contrario, se encontró que concentraciones de 7.81 a 125 µM del 4NO<sub>2</sub>FDPMe indujeron un aumento significativo en el número de células, aunque a partir de la concentración de 250 µM el número de células viables empieza a decrecer; pero concentraciones altas del compuesto, 500 y 1000 µM, reducen en gran medida el número de células viables, por esa razón se decidió continuar los experimentos restantes únicamente con el 4AFDPMc.

La concentración de AMPc se cuantificó por medio de un kit de inmunoensayo por ELISA, donde se observó que el 4AFDPMc incrementó los niveles intracelulares de AMPc

estimulados con forskolina (FSK, activador directo de la adenilato ciclasa, AC) de manera equiefectiva a rolipram (inhibidor específico de PDE-4).

La expresión de ambas, la MLC fosforilada (p-MLC) en Thr-18 y Ser-19, y de la MLCP fosforilada (p-MLCP) en Thr-853 de su subunidad reguladora (MYPT1), se determinó mediante Western Blot; se encontró que existe un aumento en la expresión de la p-MLC y en la activación de la p-MLCP como respuesta al estímulo con el 4AFDPMe, las cuales han sido asociadas al proceso de contracción, invasión y migración celular; de hecho, se observó una relación en cuanto al curso temporal entre la expresión de ambas proteínas. Se detectó que la forma completamente activa de ambas proteínas tiene un máximo de 3 a 10 minutos posteriores al estímulo y ambas coinciden en un decremento en el minuto 15; sin embargo, en el minuto 30 después del estímulo, los niveles de ambas proteínas parecen incrementarse transitoriamente, pues para el minuto 60 hay una disminución casi total de éstas.

Los resultados observados demuestran que el 4AFDPMe reduce el número de células viables de la línea celular SiHa, además de que el efecto que éste tiene sobre la viabilidad celular es dependiente de la concentración. Además, este estudio corrobora que este compuesto tiene un efecto inhibitor de PDE-4 ya que elevan de manera significativa el AMPc celular; de igual manera, sugieren que este compuesto inmunomodulador, no teratogénico, antiinflamatorio y útero-relajante, tiene una actividad sobre la vía de proteínas RhoA-ROCK.

**Palabras clave:** *Fosfodiesterasas-4, inhibidores de fosfodiesterasas-4, AMPc, RhoA-ROCK, cáncer cervicouterino*

## ABSTRACT

Cervical cancer is a worldwide health problem, and this is the fourth most frequent neoplasia in women. Current treatments are inefficient because cancer cells develop resistance to them, as well as they cause adverse effects for patients. A pharmacological target is the inhibition of phosphodiesterase-4 (PDE-4), these are enzymes that hydrolyze cAMP, so their inhibition increases the intracellular cAMP that activates cAMP-dependent protein kinases (PKA), which phosphorylate key proteins in the cellular contraction pathway involved in the processes of invasiveness, motility and cell migration in cancer. One of these proteins is RhoA, a small G-protein that activates the Rho-associated kinase (ROCK), this kinase phosphorylates and inhibits the myosin light-chain phosphatase (MLCP), in turn, it dephosphorylates the myosin light chain (MLC) to inhibit the process of cellular contraction; to cause relaxation; in sum, this pathway can be controlled by phosphorylations with PKA. The aim of this work was to evaluate the effect of two thalidomide analogs, methyl 3-(4-nitrophthalimido)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propanoate (4NO<sub>2</sub>PDPM<sub>e</sub>) and methyl 3-(4-aminophthalimido)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propanoate (4APDPM<sub>e</sub>), as inhibitors of PDE-4, on the viability of cervical cancer cells SiHa; subsequently, the one that had the best effect was chosen, and its study continued.

By using the MTT test it was shown that the proliferation of SiHa cells is decreased at 24 and 48 hours after their treatment with high concentrations (250, 500, and 1000 μM) of 4APDPM<sub>e</sub>; however, the proliferation was increased at 48 h after their treatment with low concentrations (0.976-125 μM), what suggests that the 4APDPM<sub>e</sub> has a concentration-dependent effect on the viability of SiHa cells. On the contrary, it was found that concentrations of 7.81 to 125 μM of 4NO<sub>2</sub>PDPM<sub>e</sub> induced a significant increase in the number of cells, while from the concentration of 250 μM the number of viable cells begins to decrease; however, high concentrations of the compound, 500 and 1000 μM, significantly reduce the number of viable cells. For that reason, it was decided to continue the remaining experiments only with the 4APDPM<sub>e</sub>.

The concentration of cAMP was quantified by an ELISA immunoassay kit, where it was observed that 4APDPM<sub>e</sub> increased the intracellular levels of cAMP-stimulated with

forskolin (direct activator of adenylate cyclase) in an equieffective manner to rolipram (specific PDE-4 inhibitor).

The expression of both, the phosphorylated MLC (p-MLC) in Thr-18 and Ser-19, and the phosphorylated MLCP (p-MLCP) in Thr-853 on its regulatory subunit (MYPT1) was determined by Western Blot. It was found that there is an increase in the expression of p-MLC and in the activation of p-MLCP in response to the stimulation with 4APDPMe, which have been associated with the process of contraction, invasion, and cell migration; in fact, a relationship was observed regarding the time course between the expression of both proteins. It was detected that the completely active form of both proteins has a maximum from 3 to 10 minutes after the stimulus and both coincide in a decrease at the 15th minute; however, at the 30th minute after the stimulus, the levels of both proteins seem to increase transiently, because by the 60th minute there is an almost total decrease of them.

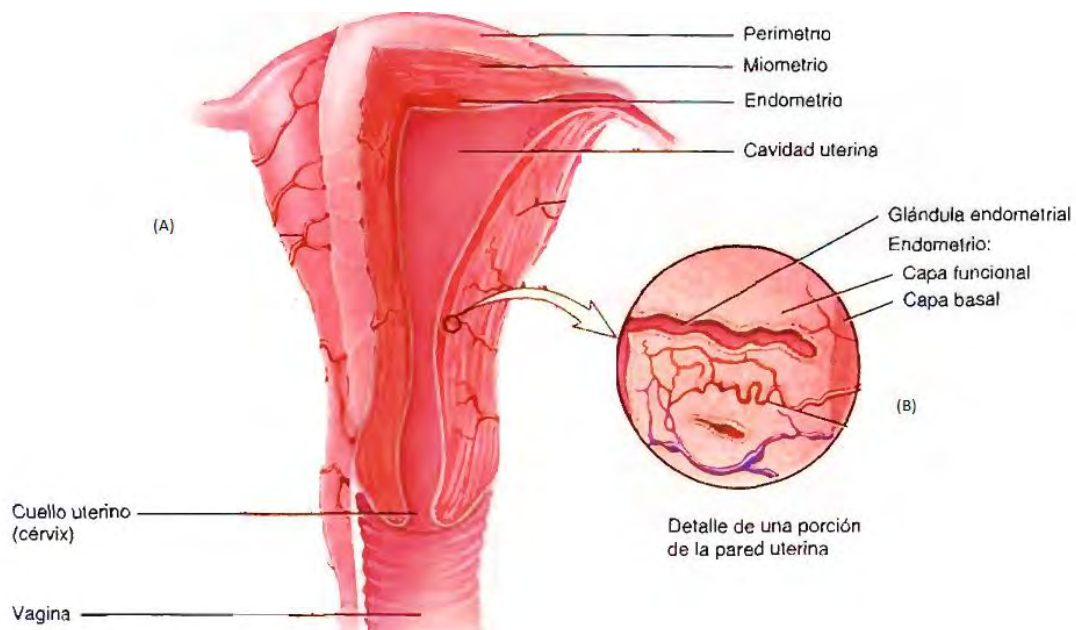
The observed results show that 4APDPMe reduces the number of viable cells of the SiHa cell line, in addition to the fact that its effect on cell viability is concentration-dependent. Furthermore, this study corroborates that this compound has a PDE-4 inhibitory effect since it significantly elevates cellular cAMP; similarly, they suggest that this immunomodulatory, non-teratogenic, anti-inflammatory and uterus-relaxing compound, has an activity on the RhoA-ROCK protein pathway.

**Keywords:** *Phosphodiesterase-4, PDE-4 inhibitors cAMP, RhoA-ROCK, cervical cancer*

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 Útero

El útero es un órgano que tiene el tamaño y la forma de una pera invertida, éste cuenta con tres subdivisiones anatómicas, las cuales son: 1) una porción con forma de cúpula encima de las trompas uterinas llamada fondo uterino; 2) una porción central llamada cuerpo uterino, y 3) una porción inferior angosta llamada cuello uterino o cérvix. El útero presenta tres tipos histológicos de tejido: perimetrio, miometrio y endometrio (Figura 1A). La capa externa (el perimetrio) es parte del peritoneo visceral. La capa media del útero, el miometrio, está formada por tres capas de fibras musculares lisas, más gruesas en el fondo y más delgadas en el cuello. La capa interna (endometrio) se divide en dos capas, la capa funcional que reviste la cavidad uterina y la capa más profunda llamada capa basal, de igual manera contiene unas glándulas llamadas glándulas endometriales (Figura 1B) (1).



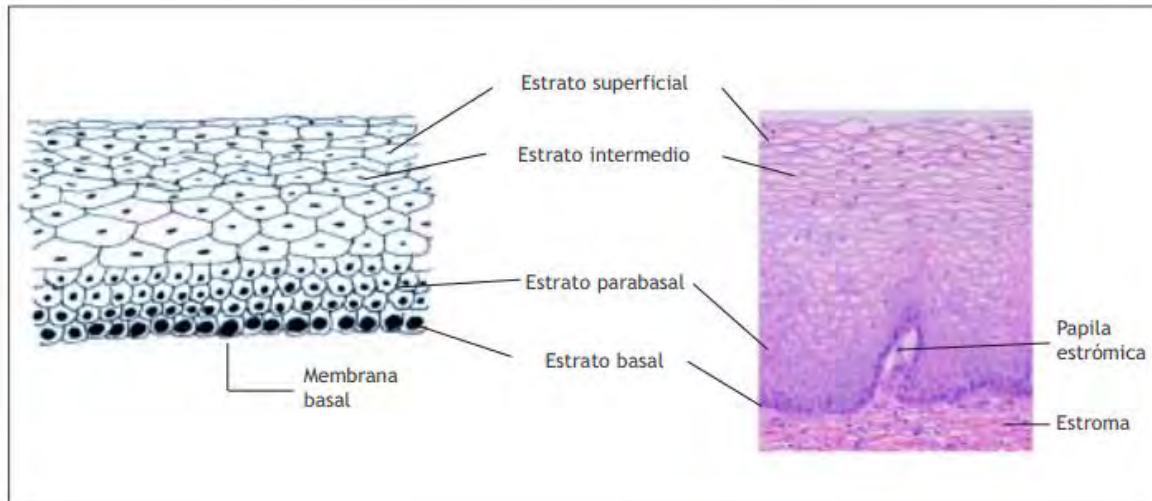
**Figura 1.** A) Esquema general de útero, en la que se muestran las partes que lo conforman. B) Partes de la capa interna (Endometrio) del útero. Tomada de: (1).

### 1.1.2 Anatomía general del cérvix

El cuello uterino o cérvix es la porción inferior del útero, delimitado en la parte de arriba por el istmo y protruye en la vagina. Está compuesto por tejido fibromuscular y mide entre 3 y 4 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro, se ubica hacia atrás en forma oblicua. Se divide en la porción vaginal o exocérvix y el canal o endocérvix (2).

#### 1.1.2.1. Exocérvix

El exocérvix está tapizado por un epitelio escamoso no queratinizado similar al epitelio vaginal, que contiene glucógeno, el cual está dividido en 4 estratos (Figura 2): El primero es llamado estrato basal y, está constituido por una hilera de células basales, dispuestas perpendicularmente a la membrana basal, las cuales presentan núcleos grandes, estas células se dividen y maduran para formar las siguientes capas celulares, que reciben el nombre de células parabasales que conforman el segundo estrato llamado: estrato parabasal, estas células parabasales presentan mayor cantidad de citoplasma y son de tamaño mayor que las células basales, son las encargadas del crecimiento y regeneración epitelial; de la misma manera, las células parabasales se siguen diferenciando y madurando y así dan lugar a las células intermedias que conforman el tercer estrato que es llamado estrato medio o estrato espinoso, está compuesto por células intermedias que se encuentran en proceso de maduración, se caracterizan por el aumento del tamaño del citoplasma, los núcleos de estas células son redondos con cromatina finamente granular. Finalmente, el último estrato es llamado estrato superficial y, es el compartimento más diferenciado del epitelio. Las células de este último estrato son planas y grandes, presentan un citoplasma abundante y un núcleo picnótico característico, la principal función de estas células es la protección y la prevención de infecciones, debajo del epitelio escamoso se encuentra tejido conectivo con una fina vascularización que nutre al epitelio suprayacente y se pueden encontrar algunas terminaciones nerviosas (3,4).

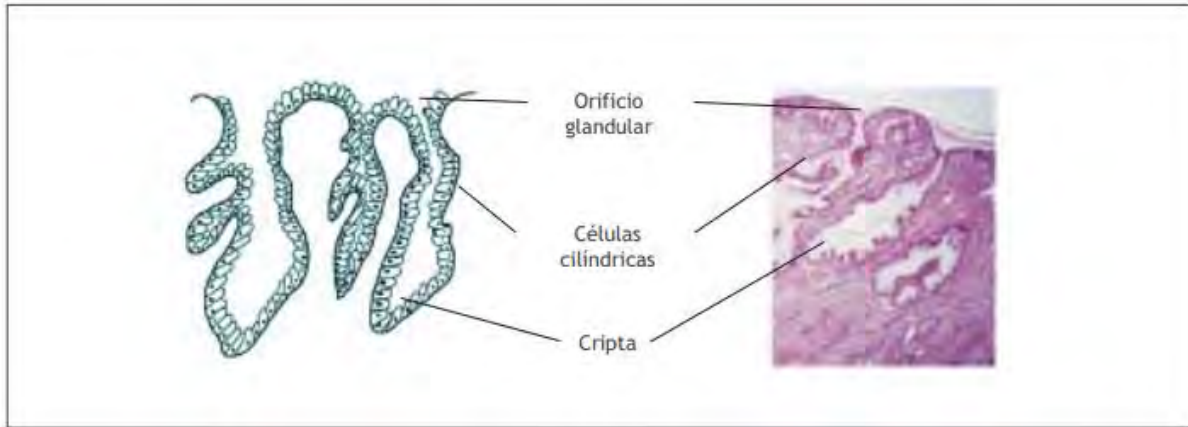


**Figura 2.** Epitelio escamoso estratificado, Tomada de: (4).

### 1.1.2.2 Endocérnix

Por otro lado, el canal endocervical o endocérnix está formado por una hilera de células cilíndricas mucíparas que revisten la superficie y las estructuras glandulares, este epitelio cilíndrico forma múltiples pliegues longitudinales que sobresalen en la luz del canal, lo que resulta en proyecciones papilares y, además, forma invaginaciones en el estroma cervical con una profundidad de 5 a 8 mm, lo que origina la formación de criptas llamadas glándulas endocervicales (Figura 3), gracias a toda la arquitectura que presenta, el epitelio cilíndrico tiene una apariencia granular (2–5).

Las células del epitelio cilíndrico secretan moco, el cual sirve como lubricante del cérnix y de la vagina. Este moco está compuesto por agua, mucina, electrolitos, azúcares, proteínas solubles, lípidos e inmunoglobulinas, por lo que es considerado como un hidrogel. Las propiedades del moco secretado por las células cilíndricas y la cantidad de éste, varía dependiendo de las fases del ciclo menstrual, pues responde a estímulos hormonales. Actualmente, 2 tipos de moco cervical han sido identificados, el tipo E (estrogénico) y el tipo G (gestativo). Los estrógenos producen estimulación de las células que dan como resultado un moco abundante, alcalino y acuoso que facilita la penetración y migración espermática. Por otro lado, la progesterona se encarga de la disminución del moco, que es ácido y grueso con numerosos leucocitos que no dejan penetrar a los espermatozoides (3,4).



**Figura 3.** Criptas del epitelio cilíndrico. Tomada de: (4).

### 1.1.2.3 Unión escamoso-cilíndrica (UEC)

La unión escamosa-cilíndrica original (la que se observa en la niñez, perimenarquia, pospubertad y primeros tiempos del período reproductivo), se observa como una línea delimitada por un escalón producido por el distinto grosor de los epitelios cilíndrico y escamoso, su localización varía según la edad de la mujer, su estado hormonal, antecedentes del parto, embarazo y uso de anticonceptivos orales (4,6).

Durante la niñez y la perimenarquia, la UEC original se encuentra en el orificio cervical externo, o muy cerca de él. Después de la pubertad y durante el período reproductivo, el cuello uterino se hincha y agranda y el conducto cervical se alarga, lo cual genera la eversión del epitelio cilíndrico de la parte inferior del conducto cervical hacia el exocérnix, esto es lo que se llama ectropión o ectopia. El ectropión se hace mucho más pronunciado durante el embarazo. La acción del tampón del moco que cubre las células cilíndricas se perturba cuando el epitelio cilíndrico del ectropión se ve expuesto al entorno vaginal ácido. Esto conduce a la destrucción y, en último término, al reemplazo del epitelio cilíndrico por epitelio escamoso metaplásico neoformado. Una metaplasia es el cambio o reemplazo de un tipo de epitelio por otro. El proceso metaplásico suele comenzar en la UEC original y desplazarse hacia el orificio externo durante el período reproductivo hasta la perimenopausia. De este modo se forma una nueva UEC entre el epitelio escamoso metaplásico neoformado y el epitelio cilíndrico persistente en el exocérnix. Conforme la mujer se acerca a la menopausia, la nueva UEC va avanzando en el exocérnix hacia el orificio externo y se va posicionando a



distancias variables del mismo, como resultado de la formación progresiva del nuevo epitelio escamoso metaplásico en las zonas expuestas del epitelio cilíndrico en el exocérnix. A partir del período perimenopáusic, el cuello uterino va reduciéndose por la falta de estrógeno, con lo cual se acelera el desplazamiento de la nueva UEC por el conducto cervical hacia el orificio externo (4,6).

#### 1.1.2.4 Ectropión/ectopia

El ectropión o ectopia es definido como la eversión del epitelio cilíndrico endocervical hacia el exocérnix. Es considerado un proceso normal, fisiológico, en el desarrollo y vida de una mujer. En el ectropión se desplaza toda la mucosa, con inclusión de las criptas y el estroma subyacente. En esta zona se produce la transformación fisiológica a metaplasia escamosa, así como la transformación anormal en el cáncer cervicouterino (4).

#### 1.1.2.5 Metaplasia escamosa y zona de transformación

La metaplasia escamosa se define como el proceso mediante el cual las áreas del epitelio cilíndrico se reemplazan por un epitelio escamoso. La eversión resulta en la exposición del epitelio columnar del canal endocervical normalmente alcalino a la acidez de la vagina. Cuando la acidez vaginal destruye reiteradamente las células del epitelio cilíndrico en una zona del ectropión, con el tiempo las células son reemplazadas por un epitelio metaplásico neoformado. La irritación, por el medio vaginal ácido, del epitelio cilíndrico expuesto produce la aparición de las células de reserva subyacentes (primer signo de la metaplasia escamosa), que proliferan y diferencian, formando un epitelio delgado, multicelular, de células escamosas inmaduras sin estratificación, llamado epitelio metaplásico escamoso inmaduro. A medida que continúa el proceso, las células escamosas metaplásicas inmaduras evolucionan a epitelio metaplásico estratificado maduro, éste se asemeja al epitelio escamoso estratificado original (4,6,7).

La metaplasia escamosa es un proceso irreversible, pues el epitelio transformado (pavimentoso) no puede volver a convertirse en cilíndrico. La metaplasia escamosa puede avanzar en grados diversos en distintas zonas del cuello uterino, el epitelio metaplásico adyacente a la UEC nueva es inmaduro, mientras que el epitelio metaplásico maduro se encuentra cerca de la UEC original. El epitelio metaplásico incipiente puede evolucionar de dos modos: en su mayoría se convierte en epitelio metaplásico escamoso maduro, similar, al

epitelio escamoso original normal que contiene glucógeno y, en minoría puede evolucionar a epitelio atípico displásico (4,6,7).

La zona de transformación (ZT) es la región que se encuentra situada entre la UEC original y la UEC nueva, donde el epitelio cilíndrico se está sustituyendo o ha sido sustituido por el epitelio escamoso. La zona de transformación puede considerarse normal cuando presenta metaplasia escamosa, incipiente o evolucionada, junto con zonas o islotes de epitelio cilíndrico, sin signos de carcinogénesis cervical. Se denomina zona de transformación anormal o atípica (ZTA) cuando en ella se observan signos de carcinogénesis cervical, como cambios displásicos. La mayoría de las manifestaciones de carcinogénesis cervical ocurren en esta zona (6).

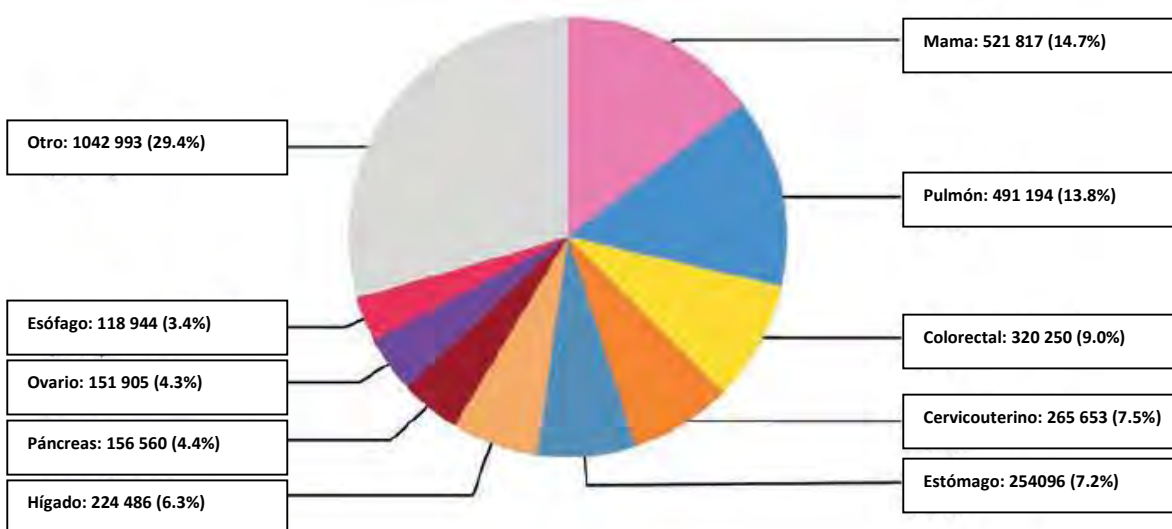
Algunos tipos de virus de papiloma humano (VPH) oncogénicos pueden infectar las células metaplásicas escamosas basales inmaduras y transformarlas en células atípicas con anomalías tanto nucleares como citoplasmáticas. La proliferación y expansión no controladas de estas células atípicas en su gran mayoría, conducen a la formación de un epitelio displásico anormal que puede volver a su estado normal, persistir como displasia o evolucionar a cáncer invasor al cabo de varios años (4,6).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades

#### 2.1.1 Cáncer cervicouterino

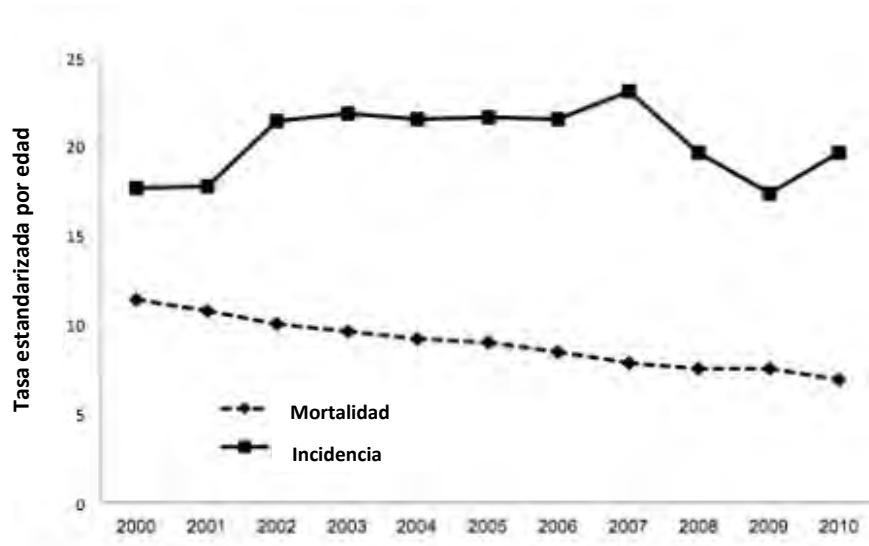
El cáncer cervicouterino (CaCu) es una neoplasia de células del epitelio escamoso o del epitelio cilíndrico en el cuello (cérvix) del útero. Es considerada la cuarta neoplasia maligna femenina más frecuente en el mundo. En 2012, este padecimiento causó 266,000 muertes a nivel mundial (Figura 4). Es el tipo de cáncer más común entre las mujeres en 39 de los 184 países del mundo, y es la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres en 45 países. Estos países se encuentran principalmente en África subsahariana, partes de Asia y algunos países de América Central y del Sur (5).



**Figura 4.** Proporciones estimadas de mortalidad mundial por cáncer por sitios principales en mujeres, 2012. Tomado y modificado de: (5).

En México, de acuerdo al registro histopatológico de neoplasias, el CaCu corresponde al 15.5% de neoplasias y ocupa el segundo lugar en la población femenina de acuerdo a su frecuencia, por lo tanto, es un gran problema de salud pública (8). La incidencia y mortalidad absoluta del cáncer de cuello uterino, registrada entre 2000 y 2010, muestra que hubo 82,090 nuevos casos y 46,173 muertes, respectivamente. El número de casos nuevos se ha mantenido constante, con un ligero pico en 2007 (Figura 5), pero con una disminución a partir de ese

año. Mientras tanto, el número de muertes por cáncer de cuello uterino ha disminuido sustancialmente. Esta disminución en las tasas de incidencia y mortalidad se debe quizás al desarrollo e implementación de políticas y programas contra este padecimiento en el país (9).



**Figura 5.** Curvas de mortalidad e incidencia de cáncer cervicouterino, de 2000 a 2010. Tasas estandarizadas por edad por 100,000 mujeres. Tomado y modificado de: (9).

En el año 2014, se registraron 3,063 casos nuevos de tumores malignos de cuello uterino con una tasa de incidencia de 6.08 por 100,000 habitantes mayores de 10 años. En mujeres de 25 años y más, se registraron 4,056 defunciones con una tasa cruda de 11.9 defunciones por 100,000 mujeres y un promedio de edad a la defunción de 59.15 años (10).

Es por esta razón que el CaCu, es considerado como una enfermedad grave a nivel mundial, que requiere de una amplia investigación y entendimiento oportuno para así poder crear estrategias para su prevención, pronta detección y posible erradicación.

### 2.1.2 Causas del cáncer cervicouterino

En años recientes, se ha evidenciado que la incidencia de CaCu aumenta gradualmente con la tendencia de los pacientes a ser jóvenes. Sin embargo, existen otros factores que pueden desencadenar este tipo de enfermedad, como lo son el consumo de tabaco, la susceptibilidad

genética, sexualidad prematura, consumo de anticonceptivos orales, la paridad y, en mayor parte por infecciones asociadas al VPH (5,11,13–15).

#### 2.1.2.1 Infección por virus de papiloma humano

Es bien sabido que el agente etiológico responsable del 99.7% de los casos de este padecimiento es el VPH, por lo que es considerado como un requisito previo para el CaCu (5,14). Los VPHs son agentes de transmisión sexual y hoy en día, han sido identificados de 225 tipos de VPH (15), de los cuales sólo el VPH-18 y el VPH-16 representan el 70% de los casos de cáncer de cervicouterino, siendo el VPH-16 el tipo que contribuye con el 50% de los casos (14,16,17).

Para que ocurra la infección por VPH, éste invade a las células de las capas basales del epitelio ya que tienen mayor capacidad mitótica, donde inicia la transcripción de sus genes. El virus se une a su célula blanco a través de un receptor de membrana, la  $\alpha$ -6-integrina. Cuando la infección se produce pueden ocurrir dos sucesos, el primero es que el virus permanezca sin replicarse en las células, permitiendo una infección latente que no produce cambios en la morfología de éstas; el segundo, es que el virus se establezca dentro del núcleo de forma episómica, donde replica su genoma, dando lugar a la expresión de genes con síntesis de proteínas estructurales y ensamblaje de partículas virales en las células superficiales y más maduras del epitelio escamoso. Las oncoproteínas E5, E6 y E7 del VPH son los principales factores víricos responsables del desarrollo y crecimiento del cáncer, principalmente a través de la alteración de la regulación del crecimiento por las proteínas del huésped y la inducción de la inestabilidad genómica. Dichas partículas virales producen un efecto citopático en las células escamosas, lo que genera cambios morfológicos que consisten en la alteración de la queratinización, vacuolización y degeneración nuclear (18–22).

La infección crónica por VPH puede conducir finalmente al desarrollo del cáncer. La proteína viral E2 proapoptótica reprime la transcripción de genes virales tempranos como los oncogenes E6 y E7. La integración del DNA viral interrumpe la expresión de E2 y aumenta la capacidad proliferativa, un paso crucial en la progresión hacia el cáncer. Las oncoproteínas E6 y E7 actúan sinérgicamente y son fundamentales para el desarrollo de cánceres inducidos por el VPH. La combinación de E6 y E7, puede inmortalizar la mayoría de los tipos de células primarias. Las proteínas E6 y E7 son necesarias, pero no suficientes, para la progresión

maligna; para que esto suceda, la acumulación de daño en el DNA, la replicación incontrolada de éste y las mutaciones de la proliferación mediada por E6 y E7 de las células suprabasales, aunadas a la inhibición de la apoptosis, son importantes. Esto es consistente con el largo período de latencia entre la infección inicial por VPH y el desarrollo de cáncer (21,23–26).

### 2.1.3 Diagnóstico

El cáncer de cuello uterino puede ser diagnosticado mediante citología e histopatología, aplicados a métodos clínicos como la prueba de Papanicolaou (PAP) o por la visualización de una lesión en el cuello uterino mediante colposcopia y biopsias. Se debe tomar una muestra de biopsia de cualquier lesión sospechosa, ya que muchas pruebas de Papanicolaou no son diagnósticas o son falsamente negativas en presencia de cáncer invasivo. Si una muestra de biopsia muestra células que sugieren microinvasión, y si el paciente no tiene un cáncer invasivo manifiestamente evidente, se debe realizar una biopsia de cono. Para tener evidencia precisa de las lesiones clínicamente ocultas, se debe obtener suficiente estroma subyacente para permitir una evaluación adecuada de la profundidad y el ancho de la invasión debajo de la membrana basal (27).

La base de la colposcopia es visualizar bajo ampliación la zona de transformación y su reacción al ácido acético al 3-5% o al yodo de Lugol. Así, con este procedimiento se examina el conducto vaginal y el cuello del útero (cérvix) utilizando un colposcopio. El diagnóstico es confirmado con una biopsia, ésta se realiza en cualquier área sospechosa y se examina para detectar la presencia de células cancerígenas. Después de tener el diagnóstico correcto se da inicio al tratamiento correspondiente (28).

### 2.1.4 Tratamiento para el cáncer cervicouterino

El tipo de tratamiento que se le indica a una paciente depende directamente del diagnóstico o estadio clínico de la enfermedad; sin embargo, también depende de otros factores, tales como la edad del paciente, tratamientos previos, citologías, historial reproductivo, cirugías previas, entre otros. El tratamiento estándar incluye cirugía, quimioterapia (QT) y radioterapia (RT), los cuales pueden ser aplicados de manera junta o separada, dependiendo del diagnóstico (29).

#### 2.1.4.1 Cirugía

La cirugía ha mostrado ser una técnica exitosa en casos de tumores benignos y bien localizados, sin embargo, se ha demostrado que ésta pierde su eficacia en pacientes ya diagnosticados con metástasis (30).

#### 2.1.4.2 Radioterapia

La radioterapia utiliza rayos ionizantes de alta energía, lo cual provoca cambios profundos en el núcleo de la célula, principalmente al ADN de éstas; por lo tanto, resultan alteraciones que pueden inducir a la muerte celular o a que no exista proliferación alguna (31). Las radioterapias pueden ser intracavitarias, localizadas o generales y esto depende del avance de la enfermedad. De igual manera, ha sido reportado que después de una cirugía una paciente puede ser tratada con radioterapia y esto tiene una mejora satisfactoria sobre el control local de la enfermedad (32). La capacidad de la radioterapia para curar el CaCu localmente avanzado está limitada por el tamaño del tumor, porque las dosis requeridas para tratar tumores grandes superan el límite de toxicidad en el tejido normal. Los esfuerzos para superar este problema han incluido el uso de radioterapia de partículas grandes, el uso de diferentes esquemas de fraccionamiento de radiación y el uso concurrente de hipertermia o quimioterapia (33). Además, este tratamiento suele ser demasiado agresivo ya que ataca tanto células normales como a células cancerígenas (31). En los últimos años, la combinación de quimioterapia y radiación (quimioradioterapia) del CaCu local avanzado ha mejorado drásticamente el control local y la supervivencia general en comparación con la terapia tradicional con radiación (31).

#### 2.1.4.3 Quimioterapia

Las quimioterapias se basan en la utilización de fármacos para reducir el volumen del tumor y evitar que éste se expanda por otras partes del organismo, para así evitar una metástasis; por otro lado, reduce el riesgo de que el cáncer vuelva a desarrollarse. Se ha observado que diversos tipos de células al ser expuestos a una diversa cantidad de quimiofármacos detienen su proliferación y finalmente mueren (34).

Hoy en día, el cisplatino, es el quimiofármaco más eficiente en el tratamiento del CaCu, sin embargo, se ha demostrado que las células cancerígenas son capaces de desarrollar

resistencia inherente o adquirida a éste cuando es administrado por periodos prolongados, por lo que la eficacia de éste es limitada (35,36).

Actualmente, se ha evidenciado que tratar el cáncer con un solo agente terapéutico no da resultados completamente efectivos, sin embargo, la quimioterapia combinada para el tratamiento del cáncer proporciona soluciones positivas. Las combinaciones de fármacos tradicionales para el tratamiento del cáncer incluyen combinaciones basadas en metotrexato, antraciclinas y paclitaxel, entre otros. Es por esto que la quimioterapia proporciona un tratamiento auxiliar esencial, no obstante, este tipo de tratamiento no resulta ser tan eficaz, principalmente debido a los problemas de administración de medicamentos, incluidos varios tipos de barreras fisiológicas, así como la resistencia a éstos. Además, los medicamentos quimioterapéuticos tradicionales a menudo dañan las células sanas y causan toxicidad para la paciente (34).

Por esta razón, existe la necesidad de desarrollar compuestos que sean efectivos y eficaces para tratar el CaCu y que ayuden a disminuir la incidencia de éste, así como sus índices de mortalidad y morbilidad, ya que los compuestos existentes hoy en día, a pesar de mostrar efectos positivos para combatir este padecimiento, presentan características específicas que limitan su efectividad y producen efectos adversos cruciales para el tratamiento de esta enfermedad.



## 2.2. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

### 2.2.1 Fosfodiesterasas

Las fosfodiesterasas (PDEs) son las enzimas que catalizan la hidrólisis e inactivación de segundos mensajeros, como el 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) y el 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). La súper familia de PDEs comprende 11 familias (PDE-1 a PDE-11) descritas hasta la fecha (37). Las 11 familias de PDEs se han clasificado con base en las secuencias de aminoácidos, la sensibilidad a reguladores endógenos y compuestos farmacológicos, y de acuerdo a su especificidad a sustratos que éstas presentan (38). Estas enzimas se expresan diferencialmente en los tejidos humanos y tienen como finalidad ubicaciones específicas dentro de órganos y células. Desde un punto de vista farmacológico, esta complejidad implica que las PDE son blancos potenciales para la intervención terapéutica en las enfermedades causadas o reguladas por el mecanismo de transducción de nucleótidos cíclicos (39).

PDE-4 es la isoforma predominante de PDE conocida hasta la fecha, esta familia comprende un grupo de enzimas amplio que se encuentran codificadas por cuatro genes distintos que se encuentran relacionados entre sí, PDE4A-D, y éstas generan más de 20 isoformas diferentes en mamíferos (39). Las PDE-4 hidrolizan selectivamente al AMPc y se dividen en dos clases principales, las formas largas y las formas cortas que difieren en la presencia o ausencia de los dominios reguladores en su extremo amino (38,40). PDE-4A y PDE-4C son las formas largas y cuentan con un sitio de fosforilación para que la PKA active estas isoformas en un bucle de realimentación a corto plazo. PDE-4B y PDE-4D son las formas cortas y de manera inversa a lo que ocurre con las formas largas, estas isoformas controlan su transcripción mediante el AMPc (por concentración) y promotores hormonales, puesto que éstas conducen a una disminución en los niveles de AMPc después de una elevación sostenida del contenido de nucleótidos cíclicos (39).

#### 2.2.1.1 Inhibición de PDEs para el tratamiento del cáncer

Se ha demostrado que la estimulación de la ruta de señalización de AMPc inhibe la migración y la motilidad de varios tipos de células incluyendo fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, células de melanoma, células de cáncer de colon, células de cáncer de páncreas, células de cáncer de vejiga y células de cáncer de cuello uterino (41–49); sin embargo,

también se ha observado previamente que los fármacos que modulan la señalización intracelular de AMPc tienen un efecto antiproliferativo, por lo tanto, pueden ser buenos candidatos para el desarrollo de medicamentos contra el cáncer. Actualmente, se sabe que la expresión del AMPc en las células está regulada por las PDEs, esto permite que las isoformas de PDEs controlen funciones celulares específicas; por ello, una forma muy efectiva de estimular selectivamente la señalización de AMPc es a través de la inhibición de las PDEs (50).

Dong et al. (50) demostraron que la inhibición selectiva de PDE-3, PDE-4, PDE-7, o PDE-8 inhibe la migración de células de cáncer de mama. De igual manera, realizaron un análisis detallado de la expresión de PDE en células y tejidos de cáncer de mama, tanto a nivel de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) como de proteína, y hallaron gran cantidad de PDE expresadas en éste, tales como 1A, 1C, 2A, 3B, 4A, 4B, 4C, 4D, 5A, 6B, 6C, 7A, 7B, 8A, 8B, 9A, 10A y 11A, de las cuales, la isoforma PDE-8A se expresó de forma prominente a nivel de ARNm en todas las líneas celulares de cáncer de mama de su estudio. De igual forma, demostraron que la migración de las células de cáncer de mama es inhibida significativamente por la activación de la señalización de AMPc mediante el tratamiento con inhibidores de PDE. El uso de inhibidores de PDE no selectivos, tales como dipiridamol o IBMX, así como inhibidores selectivos para PDE-3, PDE-4, PDE-7 y PDE-8 inhibió la migración de células de cáncer de mama, y esta inhibición se potenció por estimulación directa AC, enzima que sintetiza AMPc, con FSK.

En un estudio realizado por Mahdian et al. (51) se evaluó el efecto en el arresto del crecimiento celular, provocado por inhibidores selectivos y no selectivos de PDE-3 que conducen mayoritariamente a un aumento de los niveles de AMPc, en células de cáncer de cuello uterino (HeLa) y cáncer de mama (MCF-7), lo que confirmó que aminonina y cilostamida, inhibidores selectivos de PDE-3, e IBMX, un inhibidor de PDEs no selectivo, tienen actividad inhibidora del crecimiento en líneas celulares HeLa y MCF7 de una manera dependiente de la concentración y del tiempo; por otro lado, confirmaron que los inhibidores selectivos de PDE-3 indujeron la muerte celular por inducción de apoptosis.

El aumento de los niveles de AMPc se ha asociado con el arresto en la fase del ciclo celular G1. Este es un resultado directo de la inducción de CKI (inhibidores de las cinasas

dependientes de ciclinas, p21 y p27. Además, el tratamiento de algunas células tumorales usando moduladores de AMPc dio como resultado el aumento de los niveles de p21 y p27 y la inducción de CKI a través de un mecanismo independiente de PKA (15).

Dado su gran actividad terapéutica sobre diferentes tipos de cáncer, los inhibidores de PDE específicos y no específicos, son actualmente un blanco terapéutico que vale la pena estudiar ampliamente, para así poder considerar nuevas alternativas a los tratamientos convencionales contra este padecimiento.

#### 2.2.1.2 Inhibidores de PDE-4

En los últimos años, las compañías farmacéuticas han sintetizado y desarrollado con cierto éxito un gran número de inhibidores selectivos de PDE (52). Recientemente, los inhibidores de PDE-4 han recibido mucha atención debido a sus propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias, y miorelajantes; de igual manera, se ha probado que los inhibidores de PDE-4 proveen un gran potencial terapéutico a través de la elevación selectiva de AMPc, ya que este segundo mensajero juega un papel importante en funciones biológicas diversas, como prevenir la inducción y el mantenimiento de la contracción a través de la estimulación de la PKA, así como la regulación negativa de la mayoría de las citocinas proinflamatorias y células inmunitarias, ejerciendo una diversa actividad inmunomoduladora y, por ende, antiinflamatoria (37,39,53,54).

Las isoformas de PDE-4 se encuentran presentes en la mayoría de las células proinflamatorias y están implicadas en enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias; por lo tanto, inhibidores selectivos de PDE4 se han convertido en un blanco terapéutico de estudio para la prevención del parto prematuro y para el tratamiento de enfermedades relacionadas con desórdenes autoinmunes e inflamatorios (37,39,55).

La primera generación de inhibidores selectivos de PDE-4, tales como rolipram y ro-201724, se ha utilizado durante muchos años como herramienta para investigar el papel de PDE-4. El rolipram, inhibidor específico de PDE-4, ha mostrado ser eficaz en la inhibición de una amplia gama de células inflamatorias *in vitro* (52); además, este fármaco ha sido efectivo como un relajante muy potente en tiras de miometrio humano embarazado *in vitro* (53). También, ha mostrado tener la capacidad para inducir la relajación bronquial, dando así la posibilidad de que algunos inhibidores de PDE-4 posean tanto la actividad antiinflamatoria

y broncodilatadora (52). Por otro lado, se ha evidenciado que este inhibidor de PDE-4 tiene efectos analgésicos en el dolor de cáncer de hueso y que estos están mediados principalmente a través de la inhibición de la activación 'neurona-astrocítica', que se produce mediante la supresión de la señalización mediada por las proteínas cinasa del N-terminal c-jun (JNK) / proteína-1 quimioatrayente de monocitos MCP-1 o CCL2 espinal, vía crítica para el dolor neuropático (35).

A pesar de que este fármaco resulta ser efectivo como inhibidor de PDE-4, también se le ha relacionado con un gran número de efectos secundarios (náuseas, emesis y secreción de ácido gástrico), por lo que su uso se ha limitado como prototipo para la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos que puedan ser empleados en la clínica. El rolipram ha resultado ser un instrumento efectivo que ha permitido observar los estados conformacionales de las formas cortas y de las formas largas de PDE-4, los cuales han mostrado diferencias en la afinidad de cada una de sus isoformas, las que muestran una afinidad alta en el rango de concentración nanomolar (HPDE-4) y las de afinidad menor en el rango micromolar (LPDE-4) (53).

Existen inhibidores selectivos de PDE-4 de segunda generación, como piclamilast, un fármaco nuevo que permite la identificación de algunos efectos secundarios relacionados con la inhibición de HPDE-4, así como efectos terapéuticos relacionados con la interacción de LPDE-4 en procesos inflamatorios al término del embarazo (53). De manera similar, otros inhibidores de PDE-4 fueron diseñados, tales como el cilomilast y rufloamilast, los cuales originalmente se administraban para el tratamiento de trastornos respiratorios como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, pero estos dos compuestos mostraron tener efectos adversos reducidos en comparación con el rolipram, aunque de manera similar a este último, se ha evidenciado la inhibición de las contracciones espontáneas miométriales a término. Por estos compuestos, se ha planteado la alternativa de que los efectos secundarios de inhibidores de PDE-4 puedan separarse de los beneficios terapéuticos, mediante el desarrollo de compuestos que actúen de manera más específica sobre las isoformas de PDE-4 (54,56).

Recientemente, se ha probado por la agencia norteamericana de fármacos y alimentos, la "Food and Drug Administration" (FDA), un inhibidor de PDE-4 para el tratamiento de la artritis psoriásica activa, este compuesto se conoce como apremilast y originalmente fue diseñado para el tratamiento de enfermedades crónicas en la piel y en articulaciones. Esta

molécula es el resultado de la síntesis y estudio de un grupo de compuestos análogos de la talidomida (57,58).

### 2.2.1.3 Inhibición de PDE-4 como blanco terapéutico para el cáncer

A pesar de su papel destacado en las enfermedades inflamatorias, se ha evidenciado que las PDE-4 juegan un papel importante en diferentes tipos de cáncer. Tsonuda et al (59) identificaron que la PDE-4, específicamente la isoforma PDE-4B, presenta mayores niveles de expresión en muestras de tumores de cáncer colorrectal y que rolipram revierte la desorganización de células de cáncer colorrectal HCT116 en el estado fisiológico normal de la polaridad de las células epiteliales al inducir el ensamblaje apical del marcador de unión estrecha ZO-1 y del marcador de unión adherente E-cadherina, así como aumentar la actividad de caspasa-3 (un marcador de apoptosis) en las cavidades luminales. Cabe destacar que el rolipram redujo la fosforilación de la cinasa-1 de serina/treonina AKT, que se sabe que está asociada con la alteración de la formación de la cavidad luminal y el desarrollo de cáncer colorrectal.

Recientemente, se ha sugerido que la sobreexpresión de las enzimas PDE-4 es crítica para la activación de cinasa de proteínas activada por mitógeno (MAPK) por Ras oncogénica (proteína de la familia de GTPasas pequeñas) en células de melanoma (59). En 2012, Sengupta y colaboradores (60) identificaron que la regulación anormal de la vía del AMPc tiene una gran relevancia en la formación de tumores cerebrales y sugirieron que la causa principal de esta regulación está ligada con la expresión alterada de las PDE-4.

En un estudio sobre la actividad de PDE en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, mostró que la isoforma PDE-4 es predominante en ésta; de forma similar, se observó que bajo ciertas condiciones, el tratamiento de células MCF-7 con inhibidores selectivos de PDE-4, DC-TA-46 y rolipram, inhiben su crecimiento (61) y, en un estudio realizado por O'Connor et al (62), observaron que el inhibidor de PDEs no selectivo 3-isobutilmetilxantina (IBMX) y rolipram inhiben la migración quimiotáctica inducida por el ácido lisofosfatídico de células de carcinoma mamario MDA-MB-435. Además, Clarysse et al. (63), comprobaron que al combinar FSK y el inhibidor de PDE-4, CI-1044, se reduce la entrada de  $Ca^{2+}$  dependiente del canal 3 de potasio activado por calcio de conductancia pequeña (SK3) e inhibe la migración de las células MDA-MB-435.

Pullamsetti et al. (64) han demostrado que los inhibidores de PDE-4 reducen la proliferación de células tumorales de pulmón humano. En otro estudio realizado por Goldhoff et al. (61), se halló que DC-TA-46, un inhibidor de PDE-4, inhibe el crecimiento de células de melanoma B16, así como el de células de cáncer de mama MCF-7 de manera dependiente de la concentración.

De esta manera, por el conjunto de propiedades que presentan los compuestos inhibidores de PDE-4 y al ser esta la isoforma predominante en diversos tipos de cáncer surge la necesidad de estudiar más a fondo el papel que éstas juegan en el CaCu, con la finalidad desarrollar compuestos que sean específicos, eficaces y, sobre todo, que puedan ser propuestos como un enfoque prometedor para la terapia de CaCu.

### 2.2.2 Talidomida

La talidomida ( $\alpha$ -N-ftalimidoglutarimida), es una sustancia química derivada del ácido glutámico, conformado por un anillo glutarimida y un anillo ftalimido (2-(2,6-dioxido -3-piperidil)-H1-isondolina-1,3 (H2)-diona o N-ftalimido-glutarimida (Figura 6) (65–67). Este fármaco es un polvo blanco cristalino insípido con una masa molecular de 258.2 g/mol y con un punto de fusión de 269-271°C; además, es poco soluble en agua pero puede disolverse fácilmente en dimetilsulfóxido (DMSO) (68).

La talidomida es una molécula poco estable, pues a un pH fisiológico origina su hidrólisis espontánea producida en ambos anillos, por lo que se ha postulado que la talidomida puede actuar como un profármaco para sus productos de hidrólisis o metabolitos que son activos biológicamente (67). Esta molécula posee un centro quiral en el anillo glutarimida, el cual permite que se originen dos tipos de enantiómeros, el “R” y el “S”; de igual manera, un cambio en el pH puede alterar la orientación del hidrógeno y producir un cambio estereoquímico (100% “R” y 100% “S”) o se puede producir una mezcla racémica (50% “R” y 50% “S”), en la cual, el isómero “S” se ha relacionado con la actividad teratogénica dependiente de la dosis, así como la capacidad antiinflamatoria, y el isómero “R” se ha relacionado con los efectos sedantes, así como con los antieméticos (67,69).

La talidomida fue sintetizada por primera vez en Alemania en el año de 1954, originalmente se desarrolló como un agente hipnótico-sedante parecido a los barbitúricos, pero sin la presencia de efectos adictivos y tóxicos, de esta manera fue aceptada y comercializada en

varios países excepto en Estados Unidos debido a la FDA, ya que requería de más información acerca de los reportes de neuropatía periférica. En poco tiempo, este fármaco se convirtió en un agente común inductor de sueño con propiedades antieméticas positivas, por lo cual fue recomendado a mujeres embarazadas en el primer trimestre de embarazo para controlar las náuseas y vómito matutinos (65,66,68–70).

Después de la administración de este fármaco para tratar náuseas en mujeres embarazadas, surgieron reportes sobre defectos de nacimiento y deformidades en los miembros de los recién nacidos. Finalmente, Lenz en 1961 publicó el primer artículo sugiriendo que la talidomida era la responsable de los efectos teratogénicos que surgieron en los años de 1956 y 1961 en los recién nacidos, y pronto resultó evidente esta relación, por tal razón fue prohibida su venta en 1961 y durante 1962 (65,67,69,71).

Después de que este fármaco fue retirado del mercado, en 1965 Sheskin, mostró evidencias de que este agente tiene propiedades antiinflamatorias, puesto que administró talidomida como sedante en pacientes que sufrían eritema nodoso lepromatoso (ENL), encontrando así efectos sorprendentes, pues fue efectiva en la cura de lesiones por esta enfermedad en las primeras 48 horas. Este descubrimiento estableció las bases para el incremento del interés en el uso de la talidomida y su mecanismo de acción, así como de la síntesis de compuestos nuevos, análogos de la talidomida que fueran más estables y efectivos pero libres de efectos teratogénicos, así como en su aplicación para el tratamiento para enfermedades inflamatorias crónicas y degenerativas (69).

#### 2.2.2.1 Mecanismo de acción de la talidomida

En estudios realizados, para conocer el mecanismo de acción de la talidomida, por medio de técnicas de purificación por afinidad se ha demostrado que este compuesto es capaz de inhibir a una proteína llamada cereblon (CRBN) ya que éste es el blanco directo de talidomida (72,73). CRBN es una proteína que forma un complejo de ubiquitina ligasa E3 con una proteína 1 de unión al ADN dañado (DDB1) y Cul4A, importantes para el crecimiento de las extremidades y la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos 8 (Faf8), lo cual ha sido demostrado en peces cebra y pollos (72,74). Hoy en día, se sabe que la talidomida inicia sus efectos teratogénicos al unirse a CRBN por medio de una interacción del anillo glutarimida del fármaco y esta proteína, y en consecuencia se inhibe su función de ligasa ubiquitina E3 y

la subsecuente acumulación de los sustratos, lo que resulta en los defectos de desarrollo como las deformidades de orejas y extremidades, a través de la regulación a la baja de *Fgf8* y *Fgf10* (72,74,75). Otros reportes de algunos análogos de talidomida como pomalidomida y lenalidomida, que son estructuralmente similares a esta, también han mostrado unirse a CRBN e inhiben su autoubiquitinación mediante la interacción del anillo glutarimida; sin embargo, de igual manera se determinó si el anillo ftalimido era otro blanco de CRBN y se corroboró que esta proteína no se une a esta región del anillo ftalimido; aunado a esto, se ha evidenciado que la inhibición de CRBN por parte de talidomida, pomalidomida y lenalidomida es esencial para los efectos anticancerígenos que estos compuestos presentan, principalmente en el mieloma múltiple (76). Hoy en día, se sabe que lenalidomida y pomalidomida, están involucrados en la regulación positiva de p21 y la inactivación del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (77).

De igual manera, se ha evidenciado que la talidomida presenta principalmente propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias, debido a su gran rango para inhibir y estimular efectos en el sistema inmunitario, cuyo mecanismo de acción más plausible es la inhibición de la producción de la citocina proinflamatoria, pronecrótica y pleiotrópica TNF- $\alpha$ , a través del incremento en la velocidad de degradación de su RNAm, aunque también se le ha relacionado con neurotoxicidad, teratogénesis, angiogénesis y neovascularización (67,69).

Otros de los mecanismos que se han propuesto mediante los cuales la talidomida puede regular su actividad inmunomoduladora, es a través de la reducción del número de células formadoras de inmunoglobulinas-M (IgM), a su vez se encarga de mejorar la secreción de una citocina antiinflamatoria en células mononucleares de la sangre periférica, que es la interleucina-2 (IL-2). De igual manera, se ha observado la participación de la talidomida en un factor de transcripción nuclear el cual mediante su activación juega diversos papeles en el mantenimiento de la homeostasis, en el control de desarrollo de la enfermedad, en la regulación de la supervivencia celular y en la activación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, por ejemplo, su activación provoca la producción de citocinas proinflamatorias incluyendo la más potente, TNF- $\alpha$ , el cual es el factor nuclear- $\kappa$ B (69).



#### 2.2.2.2 Usos actuales de la talidomida en la clínica

Hoy en día, el uso de este fármaco ha sido aprobado para el tratamiento de varias enfermedades crónico degenerativas, inflamatorias y autoinmunes, en las que se han reportado resultados positivos y satisfactorios, tal es el ejemplo de: shock séptico, la enfermedad de Crohn, eritema nodoso leproso, artritis reumatoide, caquexia y aftas asociadas al SIDA, enfermedad de Behçet, y la reacción injerto contra huésped (67,69,70); sin embargo, el uso de la talidomida actual en la clínica no se limita únicamente a este tipo de enfermedades, puesto que presenta propiedades diversas que hacen de este fármaco un blanco interesante de estudio, por ejemplo: su actividad antiangiogénica sirve en el tratamiento de condiciones oncológicas, cuyos resultados han sido observados en su eficacia en ensayos humanos para mieloma múltiple, linfoma de células manto, glioma, melanoma metastásico y el cáncer de páncreas (65).

#### 2.2.3 Análogos de talidomida como inhibidores de PDE-4

Diversos grupos de investigadores farmacológicos, clínicos y químicos se han encargado de diseñar y sintetizar una gran variedad de análogos de talidomida debido a las importantes propiedades terapéuticas que presenta la talidomida y a su papel en la respuesta inmunitaria sobre la inhibición en la producción de TNF- $\alpha$  y la cascada proinflamatoria, esto a su vez con el fin de aumentar su potencia como inhibidores, su eficacia inmunomoduladora y su estabilidad química. Sin embargo, de igual manera se han encargado de disminuir en estos análogos los efectos secundarios y la disminución o eliminación de los efectos teratogénicos tales que la talidomida presenta (67,69,70).

Varias familias de análogos nuevos de talidomida han sido sintetizadas, sin embargo, existen dos familias principales que han mostrado ser inhibidores potentes de TNF- $\alpha$ :

a) La primera familia está compuesta por moléculas que son muy similares a la talidomida en su función y estructura química, los cuales se conocen como inmunomoduladores puesto que presentan propiedades coestimuladoras de células T, éstas se encargan de la secreción de IL-2 e interferón- $\gamma$  (IFN)- $\gamma$ , aumentan la producción de IL-10 citocina antiinflamatoria de tipo Th2 (humoral) en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) estimuladas e inhiben la producción de IL-1 $\beta$  e IL-6; los miembros más importantes de esta familia son dos, pomalidomida y lenalidomida (69).

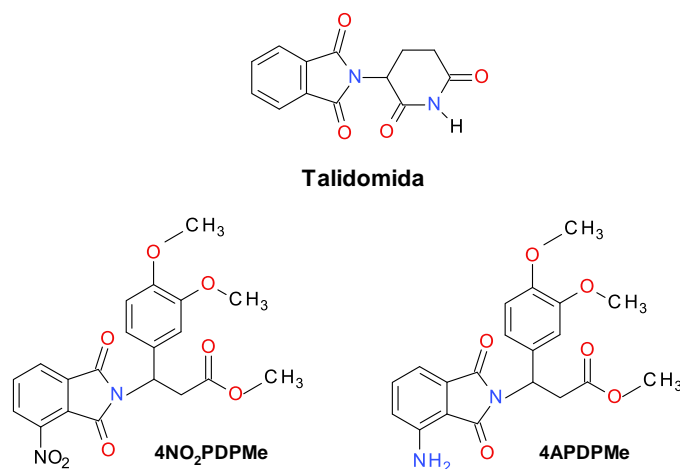
b) La segunda familia de análogos de talidomida inhibidores de TNF- $\alpha$ , ha sido sintetizada con base al parecido de los productos de hidrólisis espontánea por pH de la talidomida. Estos análogos han mostrado una propiedad ausente en la talidomida, pues son inhibidores potentes y específicos de PDE-4 que, como se ha mencionado, es la enzima principal que cataliza la hidrólisis del AMPc y está ampliamente distribuida en monocitos y macrófagos, células que son productoras principales del TNF- $\alpha$  (69,70). Un buen ejemplo de estos análogos es el apremilast; Nishi y colaboradores (78) determinaron los efectos de este compuesto en cáncer colorrectal estudiando el gen KRAS y PDE-4B2 expresados de manera normal y mutados en células HKe3 y en condiciones *in vivo*; sus resultados demuestran que este compuesto, de aprobación reciente por la FDA, promovió significativamente la apoptosis de células HKe3-mtKRAS y HKe3-wt a través de una ruta de señalización que incluye PDE-4B2 y caspasa-1, la cual es catalogada como un regulador de las respuestas celulares al estrés a través de la regulación de las respuestas citoprotectoras, la reparación del tejido y la muerte celular (79).

Otros de los compuestos que pertenecen a este grupo de inhibidores específicos de PDE-4 son: 3-ftalimido-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (FDPM<sub>e</sub>), 3-(4-aminoftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (4AFDPM<sub>e</sub>); 3-(4-nitroftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (4-NO<sub>2</sub>FDPM<sub>e</sub>) y 3-tetrafluoroftalimido-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (TFFDPM<sub>e</sub>) (69,80).

Fernández-Martínez et al. (81) observaron que 4AFDPM<sub>e</sub> y 4NO<sub>2</sub>FDPM<sub>e</sub> redujeron el flujo de calcio intracelular debido a que la respuesta contráctil de los tejidos disminuyó en presencia de éstos, lo cual indica que este es un mecanismo de acción para inducir la relajación del tejido miométrial; a su vez, observaron que estos análogos incrementaron de manera significativa los niveles de AMPc en células HeLa dependiendo de la concentración de éstos, lo que confirma su actividad como inhibidores de PDE-4 y sugiere que este es uno de los mecanismos de acción plausibles como agentes útero-relajantes.

De igual manera, Muñoz-Pérez et al. (82) determinaron que los niveles de AMPc en útero embarazado incrementan en presencia de ambos compuestos; así mismo, comprobaron que ambos análogos mostraron efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios al inhibir TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y estimular IL-10 en el tejido.

Ambos análogos, el 4NO<sub>2</sub>FDPMe y el 4AFDPMe, resultaron atractivos para continuar su estudio, debido a las propiedades que presentan por ser inhibidores de la enzima PDE-4 y porque, como se ha explicado, la proliferación en diversas células tumorales es reducida debido al el incremento de AMPc intracelular, además de que varios compuestos que actúan elevando el AMPc inhiben el crecimiento tumoral *in vitro*, así como participan en la motilidad y migración celular. Asimismo, estudios indican que el AMPc activa a la PKA y ésta fosforila proteínas diversas que median el proceso de relajación-contracción; así entonces, esa característica sugirió que estos fármacos pudieran actuar sobre la vía de proteínas RhoA-ROCK y regular los procesos de motilidad, invasión y migración celular, los cuales son clave en el proceso del cáncer (81,83).



**Figura 6.** Estructura química de la talidomida y de sus análogos 3-(4-nitroftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (4NO<sub>2</sub>FDPMe) y 3-(4-aminoftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (4AFDPMe).

#### 2.2.4 Mecanismo de contracción mediado por la vía de proteínas RhoA-ROCK

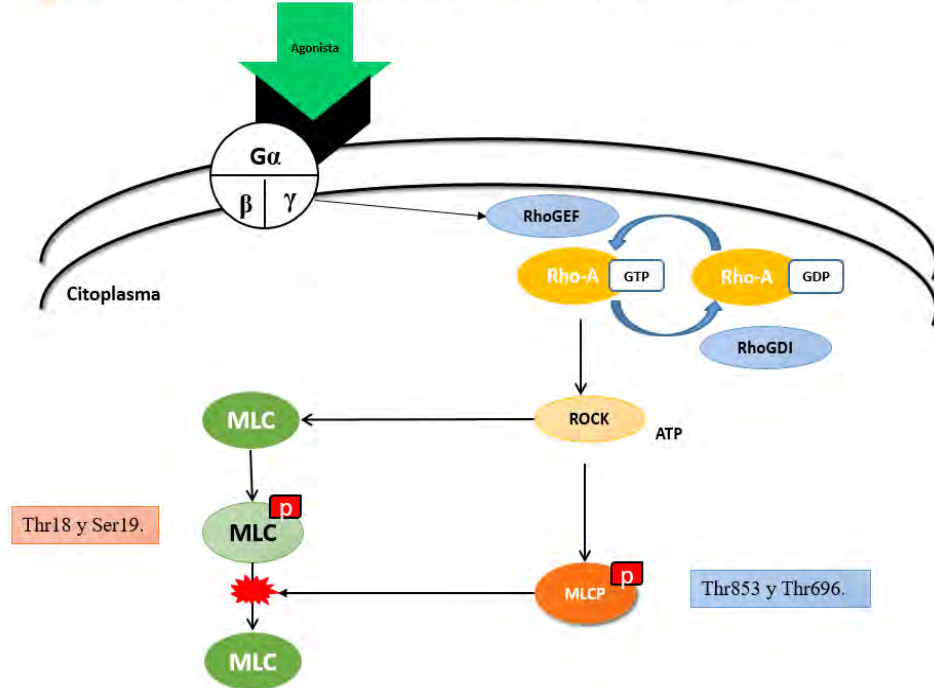
Es bien sabido que en las células llevan a cabo el proceso de contracción para producir motilidad, es necesaria la actividad de la vía de proteínas RhoA-ROCK, ya que esta vía regula fuertemente la contracción. Este proceso de contracción, puede seguir dos rutas distintas: la primera es mediante un mecanismo que bloquea la actividad de la MCLP, la cual es una holoenzima compuesta por tres subunidades: PP1c que tiene actividad catalítica, MYPT1 (por sus siglas en inglés) que es una subunidad de unión a la miosina y una pequeña subunidad M20 (figura 7), dicho mecanismo se da mediante un proceso de autoinhibición a

través de la fosforilación de simultánea o independiente de dos sitios diferentes de la subunidad MYPT1 en los residuos Thr853 y Thr696, que bloquea la actividad de la MLCP, pues es su zona reguladora, y la segunda es mediante una fosforilación directa del residuo Thr18 y Ser19 de la MLC, ya que esta última no sólo es fosforilada y activada por la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) para inducir la contracción (84–88). Los agonistas que se unen a receptores acoplados a proteínas Gq y G<sub>12/13</sub> son capaces de activar la vía de señalización para estimular a las proteínas de la familia Rho a través de los factores de intercambio del nucleótido de guanina-Rho (Rho-GEFs) o indirectamente a través de la cinasa de proteínas dependiente de Ca<sup>++</sup> (PKC); así, cuando el GTP se une a RhoA, éste es capaz de activar moléculas efectoras como ROCK, ésta al fosforilar e inhibir a la MLCP incrementa la contracción, por lo que la inhibición de RhoA puede incrementar la actividad de la MLCP y así inducir la relajación (84,87). Una alternativa de inhibición de la vía RhoA es por la fosforilación del residuo Ser-188 de RhoA producida por la PKA que se activa al incrementar los niveles de AMPc para inducir la relajación (83) (Figura 8).



**Figura 7.** Estructura de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP). Se pueden observar sus tres subunidades. PP1cδ, MYPT1 y M20. Tomado y modificado de: (89).

### Mecanismo de contracción mediado por la vía de proteínas RhoA-ROCK



**Figura 8.** Regulación del mecanismo de contracción celular mediado por la vía RhoA-ROCK. RhoGEF: factores de intercambio de nucleótidos de guanina Rho; RhoGDI: inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina Rho; RhoA: proteína G pequeña, unida a trifosfato de adenosina (ATP) o a difosfato de adenosina (ADP); ROCK: cinasa asociada a Rho; ADP: difosfato de adenosina; ATP: trifosfato de adenosina; MLC: cadena ligera de la miosina; p-MLC: cadena ligera de la miosina fosforilada; MLCP: fosfatasa de la cadena ligera de la miosina; p-MLCP: fosfatasa de la cadena ligera de la miosina. (Imagen propia).

RhoA puede ser inhibida por el AMPc que induce su fosforilación en Ser188 vía PKA, principalmente mediante su captación por el inhibidor de la disociación de Rho-GDP (RhoGDI) (86). RhoA está implicada como mediadora en el proceso de sensibilización del calcio; sin embargo, existe evidencia experimental que demuestra que este fenómeno se reduce usando un inhibidor específico para RhoA y que el mecanismo molecular de RhoA está involucrado en la inhibición de la MLCP (90–92). ROCK, es una cinasa serina/treonina, y es uno de los efectores de transducción de señales principales de RhoA. Existen dos isoformas que surgen de genes separados (ROCK-1 y ROCK-2) (93–96). ROCK puede inactivar a MLCP por la fosforilación de su sitio MYPT1 en Thr853 (92,97), lo cual está regulado positivamente por RhoGEFs pero regulada negativamente por RhoGDIs (98,99).

De igual manera, ha sido evidenciado que ROCK puede fosforilar directamente MLC en Ser19 y Thr18 bajo condiciones *in vitro*, lo que conduce a la mejora en la actividad de la ATPasa de la miosina (96,100). Además, varias proteínas reguladoras esenciales que participan en la contracción son susceptibles a la fosforilación por PKAs activadas por niveles elevados de AMPc; por ejemplo, ROCK-1 y ROCK-2 poseen 45 y 43 sitios, respectivamente, que pueden ser fosforilados, algunos de los cuales podrían inhibir su actividad. Además, la inhibición de RhoA mediada por PKA a través de la fosforilación de Ser-188, se ha informado que promueve su asociación con RhoGDIs (83,98,101).

#### 2.2.4.1 Vía RhoA-ROCK y su relación con el cáncer

La migración celular es crítica para la invasión y metástasis de células cancerosas. El primer paso está representado por la remodelación dinámica del citoesqueleto de actina filamentosa, que permite la formación de protuberancias que se adhieren a la matriz extracelular y generan fuerzas intracelulares para el movimiento celular. De hecho, la remodelación de la actina está involucrada en la transformación del cáncer y la metástasis (102–104).

RhoA es un punto de control fundamental por el cual las células detectan alteraciones en la matriz extracelular y se encuentra asociada con la organización del citoesqueleto. Cuando RhoA está activa y se encuentra unida a GTP provoca la formación de fibras de estrés mediante la activación de cinasas río abajo asociadas a Rho, las cuales potencian la formación de microfilamentos de actina/miosina para facilitar la motilidad y migración celular (105). La familia ROCK, que consta de ROCK-1 y ROCK-2, desempeña un papel central en la organización del citoesqueleto de actina y participa en la contracción, la adhesión, la migración, la proliferación y la apoptosis celular. ROCK desempeña un papel importante en el desarrollo y progresión de tumores a través de la regulación de muchas funciones celulares clave asociadas con malignidad, incluyendo: tumorigénesis, crecimiento tumoral, metástasis, angiogénesis, apoptosis, supervivencia de células tumorales y quimiorresistencia. Aunque la activación de ROCK generalmente se considera oncogénica, algunos estudios muestran que ROCK funciona como un regulador negativo en la progresión del cáncer. Como resultado, el papel preciso de ROCK en la afectación de diferentes tipos de procesos de cáncer se define en el contexto, específicamente dependiendo del tipo de célula y el microambiente que rodea un tumor (106). La regulación de la actividad de ROCK se ve

alterada en muchos tipos de cáncer mediante la modulación de los procesos de activación de estas proteínas, la localización subcelular y las interacciones alteradas con moléculas reguladoras. Dado su papel central en la regulación de los principales procesos oncogénicos, la inhibición de la actividad de ROCK ha demostrado eficacia contra los tumores en una gran cantidad de estudios preclínicos (107).

ROCK afecta el crecimiento, la formación, migración, invasión y metástasis de las células tumorales al modular la tensión celular y la formación de conexión intercelular y las vías de señalización mediadas por RhoA; particularmente, la vía RhoA/ROCK/MLC está involucrada en la regulación de la motilidad celular (108). Una de las principales funciones de Rho es promover la formación de fibras de estrés en la célula. La formación de fibras de estrés está regulada por el estado de fosforilación de la MLC. La fosforilación de MLC permite a la miosina interactuar con la actina para producir contractilidad (109). La migración celular es un componente clave del proceso metastásico tumoral; por ende, cuando RhoA se encuentra regulada positivamente se asocia con la progresión tumoral en diferentes tipos de cáncer (110,111) y se ha demostrado que su activación promueve la migración en células de CaCu (103).

#### *2.2.4.1.1 Vía RhoA-ROCK en el cáncer cervicouterino*

Varios estudios han demostrado que la familia de proteínas Rho juega un papel importante en la invasión del CaCu (115). Se ha evidenciado que los miembros de la familia  $G_{12}$  de proteínas G heterotriméricas ( $G\alpha_{12}$  y  $G\alpha_{13}$ ) tienen un papel importante en la oncogénesis y en el crecimiento de células tumorales, demostrando que la expresión de las proteínas  $G_{12}$  está regulada positivamente en células de CaCu (115). Asimismo, Yuan et al. (115) encontraron que la vía RhoA/ROCK-JNK es necesaria para la invasión de células de CaCu en las líneas celulares Caski y HeLa, inducida por la activación de  $G\alpha_{12/13}$ , ya que observaron que  $G_{12}$  estimula a RhoA. Trabajos previos confirman que Rho puede activar a JNK a través de ROCK (116,117). Los estudios realizados por Yuan et al. (115), muestran que al inhibir a ROCK disminuyen significativamente los niveles de JNK, así como la fosforilación de la proteína c-Jun (que en combinación con la proteína c-Fos, conforma al factor de transcripción de respuesta temprana AP-1) en células HeLa, y que esto reduce notablemente la invasión celular inducida por  $G_{12}$ . Es por esta razón, que sugieren que el JNK se activa río abajo de la

ruta Rho-ROCK en la vía de señalización activada por G<sub>12</sub>, lo que promueve la invasión de celular en CaCu.

Pruebas recientes, han revelado que RhoA puede estar asociada con metástasis en CaCu (118,119), lo que implica que la participación de alteraciones en la activación de RhoA, puede tener un papel en la carcinogénesis del cáncer cervicouterino.

He y colaboradores (118), estudiaron los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular C (VEGF-C) en la remodelación del citoesqueleto de actina y en la migración de células de cáncer de cuello uterino (SiHa) e identificaron el papel de la moesina (proteína de punta de extensión organizadora de membrana) y la cascada de señalización RhoA/ROCK-2 que se encuentra implicada en estas acciones. Tales resultados mostraron que el VEGF-C aceleró la metástasis del cáncer de cuello uterino al impulsar directamente la migración y la invasión de células cancerosas y que estos procesos están estrechamente relacionados con los efectos de VEGF-C sobre la expresión de la moesina y la activación a través de la vía de señalización RhoA/ROCK-2, puesto que ésta fue capaz de activar a la moesina y finalmente condujo a la motilidad celular. Además, señalan que la migración e invasión de células SiHa por VEGF-C se inhiben por siRNAs específicos de moesina o ROCK-2, sugiriendo que la cascada RhoA/ROCK-2/moesina juega un papel importante en estos procesos.

En 2016, Zou et al. (119) investigaron el papel de la proteína interactiva de la etapa temprana de cáncer de mama-1 (BRIP1) en células HeLa; sus investigaciones muestran que la expresión ectópica de BRIP1 inhibe marcadamente las propiedades tumorigénicas en esta línea celular, esto sustentado por la disminución del crecimiento, adhesión e invasión celular, así como por el aumento de la apoptosis. Conjuntamente, identificaron que la sobreexpresión de BRIP1 suprime la actividad RhoA en estas células, y que las propiedades antitumorales obtenidas por la sobreexpresión de BRIP1 se ven inhibidas por la activación de RhoA.

Por otro lado, en un estudio sobre la estimulación de la migración celular en células HeLa por la eritropoyetina (Epo) (120), se evidenció que el efecto de Epo depende de la actividad de dos vías de señalización: la ruta de MAPK y la vía de RhoA. Así, revelan que Epo activa ambas vías de una manera dependiente de la cinasa Janus (JAK) y que esta activación es necesaria para los efectos de Epo en la migración celular. Se sabe, como se señaló previamente, que la ROCK al inactivar la MLCP complementa la función de MLCK en la



promoción de la fosforilación de la cadena ligera reguladora de la miosina y la contractilidad de la actomiosina (100); así pues, Hamadmad et al. (120) sugieren que la activación de RhoA depende de la activación de la ruta de las cinasas reguladas por señalización extracelular (ERKs) y esto demuestra cómo el proceso de fosforilación de la MLC se lleva a cabo para generar el movimiento coordinado de la célula durante el proceso de migración.

En los últimos años, Liu y colaboradores (121) determinaron el papel que juega RhoA y sus efectores río abajo (ROCK-1 y ROCK-2) en la proliferación y migración en células HeLa. Además, indican que existe una gran correlación entre RhoA y del sistema de estadificación FIGO (“International Federation of Gynecology and Obstetrics”) del CaCu, la invasión vascular y la metástasis linfática de CaCu, lo que refleja su función promotora en la invasión y metástasis del cáncer. En cuanto al papel que juega en la proliferación y migración, se observó que RhoA promueve ambas, en esta línea celular. Proponiendo que, a una expresión alta, RhoA puede promover un potencial metastásico alto. Por lo cual, se plantea que RhoA podría ser un biomarcador excelente en el pronóstico de metástasis de CaCu.

Estos hallazgos señalan a la vía de proteínas RhoA-ROCK como reguladores importantes de la invasión del cáncer de cuello uterino, lo que puede conducir a la identificación de marcadores de diagnósticos nuevos, así como de dianas terapéuticas, para ayudar a comprender mejor los mecanismos responsables de la invasividad de esta enfermedad.

### **3. HIPÓTESIS**

El 4AFDPMe y el 4NO<sub>2</sub>FDPME inhibirán a la PDE-4 en células Siha, y el mejor candidato modificará la vía de señalización RhoA-ROCK.

### **4. JUSTIFICACIÓN**

El CaCu es considerado la cuarta neoplasia maligna femenina más frecuente en el mundo. Actualmente, el tratamiento para este padecimiento es ineficiente ya que las células tumorales presentan resistencia a los quimiofármacos existentes. Por lo tanto, existe la necesidad de obtener moléculas nuevas con uso potencial para tratar este padecimiento. Los análogos de talidomida 4NO<sub>2</sub>FDPME y 4AFDPMe pueden elevar el AMPc intracelular que está implicado en procesos diversos en el cáncer, por medio de la inhibición de la PDE-4. Además, se sabe que este segundo mensajero puede regular la vía de proteínas RhoA-ROCK implicada en la contracción celular, por la activación de las PKAs, cuyo mecanismo aún es desconocido para ambos compuestos. Es necesario realizar estudios enfocados a esta vía de proteínas, para conocer de forma precisa la manera en que estos compuestos actúan en las células de CaCu. De esta manera, se tendrá un conocimiento mecanístico sobre la acción que este fármaco tiene en el proceso de invasión celular en este tipo de cáncer. Estos análogos de talidomida e inhibidores de PDE-4 representan una alternativa viable para contrarrestar la invasividad celular, cuya evaluación contribuirá al avance en el diseño de compuestos más estables, efectivos y seguros para tratar el CaCu.

## **5. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Estudiar el mecanismo de acción del análogo de talidomida 4AFDPMe, en células de cáncer cervical (SiHa), como inhibidor de la fosfodiesterasa-4, para verificar su efecto en la vía RhoA/ROCK.

### **Objetivos particulares**

1. Determinar el efecto de dos análogos de talidomida, 4NO<sub>2</sub>FDPMe y 4AFDPMe, sobre la viabilidad de células SiHa por MTT, y seleccionar al que posea el mejor efecto inhibidor para continuar su estudio.
2. Cuantificar los niveles de AMPc en células SiHa mediante ELISA, en presencia y ausencia del 4APDPMe, para verificar su actividad inhibidora sobre la PDE-4.
3. Determinar la expresión de la MLCP fosforilada en Thr853 (p-MLCP) en células SiHa usando Western Blot, en presencia y ausencia del 4AFDPMe, con el objetivo de evidenciar su efecto sobre la fosforilación de esta proteína.
4. Establecer la expresión de la MLC fosforilada en Thr18 y Ser19 (p-MLC) en células SiHa mediante Western Blot, con y sin 4AFDPMe, para determinar su efecto sobre la activación de esa proteína.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Fármacos y Soluciones

Todos los reactantes usados para las determinaciones fueron adquiridos de la mejor calidad disponible en el mercado. Los análogos de la talidomida: 3-(4-aminoftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (4AFDPMe) y 3-(4-nitroftalimido)-3-(3,4-dimetoxifenil)-propanoato de metilo (4NO<sub>2</sub>FDPMe) fueron sintetizados anteriormente siguiendo la ruta sintética descrita por Muller y colaboradores (67,70). Las condiciones de reacción fueron modificadas y desarrolladas anteriormente en el laboratorio donde se ha desarrollado el trabajo experimental (66,80). Rolipram, inhibidor específico de PDE-4, y FSK fueron comprados a Sigma-Aldrich, México. Los compuestos fueron disueltos en DMSO marca J.T. Baker, México.

#### 6.1.1 Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este proyecto fueron: “Phospho-myosin light chain 2 (Thr18/Ser19)”, y “Phospho-MYPT1 (Thr853)”, que fueron comprados a Cell Signaling Technology®.

#### 6.1.2 Línea celular

Se utilizó la línea celular SiHa derivada de CaCu (122), la cual se mantuvo en incubadora a 37° C, con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (“Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) con suplementos, 10% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO) inactivado (incubación por 30 minutos a 57° C) y con 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina.

Cuando las células fueron replicadas se realizaron 3 lavados con PBS estéril (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM, pH = 7.4) y fueron incubadas con verseno estéril (EDTA 1 mM, NaCl 0.17 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM pH = 7.7) para poder desprenderlas. Una vez desprendidas, se recolectó la suspensión de células y se centrifugó a 4,000 rpm por 5 minutos para obtener una pastilla que se sembró en condiciones diversas conforme al experimento a realizar.

## **6.2 Viabilidad celular**

Para verificar las concentraciones óptimas del 4AFDPMe se realizaron pruebas de viabilidad por MTT.

### *6.2.1 Principio*

Este método se basa en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), que es un colorante amarillo pálido, soluble en agua, es reducido tempranamente en células viables, por componentes de la cadena respiratoria, a formazán (cristales azul violeta, insoluble en agua), fundamentalmente por la respiración (deshidrogenasas mitocondriales) y su flujo de electrones, lo cual es intrínsecamente tóxico para las células (123,124). Dicho método fue desarrollado por Mosmann, 1983 (125) como un método colorimétrico cuantitativo de microtitulación para la determinación de la supervivencia y capacidad de proliferación de células mamíferas, y es preciso y rápido (126).

### *6.2.2 Procedimiento*

Se sembraron 10,000 células por pozo en placas de 96 pozos con medio DMEM al 10% SFB. Se incubaron por dos horas a 37°C, una vez adheridas, se probaron concentraciones del 4NO<sub>2</sub>FDPME y del 4AFDPMe en un intervalo de 0-1000 μM y se completó un volumen final de 200 μL, se incubó la placa con el fármaco durante 24 y 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se retiró el medio con el tratamiento y se agregaron 100 μL de MTT (0.05 mg/mL PBS), se incubaron durante 2 horas; posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 100 μL de isopropanol para solubilizar el formazán y se realizó una lectura de absorbancia del compuesto a 570 nm en el equipo BioTek® ELx800 con espectrofotometría para obtener el número de células vivas en función de la absorbancia, interpolado en una curva patrón realizada previamente. Se tomó un control de células sin tratamiento y un control con el vehículo de los compuestos DMSO (10 μL).

### 6.3 Cuantificación del AMPc

Para la determinación de la concentración intracelular de AMPc en células SiHa y para confirmar que el 4AFDPMe actúa mediante la inhibición de PDE-4, se utilizó el Kit de inmunoensayo competitivo colorimétrico “Direct cAMP ELISA Assay kit” (Enzo Life Sciences, Inc., Exeter, UK).

#### 6.3.1 Principio

Es un kit de inmunoensayo competitivo colorimétrico para la determinación cuantitativa de AMPc intracelular en células o tejidos, que son lisados en HCl 0.1 M para detener la actividad de fosfodiesterasa endógena y estabilizar el AMPc liberado. Las muestras tratadas con HCl 0.1 M se analizan directamente en una placa de microtitulación sin extracción, secado y reconstitución. La sensibilidad se incrementa 10 veces por acetilación. La absorbancia se lee a 405 nm. Este kit permite evaluar fácilmente la activación de AC mediante receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).

#### 6.3.2 Procedimiento

Para la cuantificación de AMPc intracelular, se establecieron 3 controles: control de controles (nivel basal) sin tratamiento, DMSO el disolvente de los compuestos y FSK. Se sembraron 25,000 células por pozo en placas de 96 pozos con medio DMEM al 10% SFB. Se incubaron por dos horas a 37 °C, una vez adheridas, las células fueron incubadas con el 4AFDPMe y rolipram (inhibidor específico de PDE-4 para comparación) a dos concentraciones diferentes, 125 y 250 µM, durante 45 minutos y después fueron estimuladas con FSK 1 µM por 15 minutos, completando 1 hora de incubación. De igual manera, para conocer el efecto *per se* de los fármacos se incubó un pozo con la concentración mayor del 4AFDPMe y rolipram (250 µM), sin estimulación con FSK. Se tomaron como controles a un pozo sin tratamiento (basal), DMSO 10 µL y FSK 1 µM (incubación por 15 min). La medición de los niveles de AMPc en células SiHa se realizó siguiendo las instrucciones del cAMP Elisa Kit de la marca Enzo life Sciences® ADI-900-066. La concentración intracelular de AMPc se determinó a 405 nm utilizando el equipo BioTek® ELx800.

## **6.4 Expresión de p-MLCP y p-MLC por Western blot**

Para la determinación de las proteínas p-MLCP (Thr 583) y p-MLC en los residuos Thr-18 y Ser19, se realizaron Western blots.

### *6.4.1 Principio*

El Western Blot (WB), es también conocido como tinción de proteínas o “protein blotting” o “immunoblotting”, ésta es una técnica que fue introducida en el año de 1979 por Towbin et al. (127), sirve para la inmunodetección y cuantificación de proteínas específicas en homogenados celulares o tisulares. Esta técnica permite transferir las proteínas de un gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS) a una membrana absorbente, siendo las proteínas transferidas a la membrana una copia exacta del gel donde han sido separadas por electroforesis. Esta transferencia de gel a membrana supone una gran herramienta para la detección y caracterización de proteínas, especialmente las que están en bajas abundancias (128). Esta membrana es incubada con dos anticuerpos; el anticuerpo primario se une a las proteínas de la membrana, mientras que el anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario. Una vez terminado el tiempo de incubación, se añade un fluoróforo (peroxidasa de rábano), el cual emitirá una luz que se observa en forma de bandas (las cuales corresponden a las proteínas) (129).

### *6.4.2 Procedimiento*

#### *6.4.2.1 Extracción de proteína*

Se sembraron células en placas de 100 mm y cuando alcanzaron una confluencia del 80% con 10 mL de DMEM 10% SFB, se llevó a cabo la estimulación de éstas con la dosis determinada del 4AFDPM (250  $\mu$ M) a diferentes tiempos (1, 3, 5, 10, 30 y 60 minutos), todo esto a temperatura ambiente.

Después de cumplir con las condiciones necesarias para cada tratamiento, se realizaron los pasos siguientes a 4 °C. Se retiró el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados con PBS frío. Se adicionó 1 mL de PBS para raspar las células de la caja y recuperar dicho raspado en tubos Eppendorf de 1.5 mL, éstos se centrifugaron 20 minutos a 13,400 rpm y se retiró el sobrenadante y se agregaron 100  $\mu$ L de buffer de lisis RIPA (Tris 50mM pH= 8, NaCl 150 mM, 1.0% Tritón X-100, 0.5% Deoxicolato de sodio, 0.1% SDS), que incluía un inhibidor de proteasas (“Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets”, Roche, Francia) y un

inhibidor de fosfatasa (“Phosphatase Inhibitor Cocktail”, Thermo Scientific, EUA) y se dejó en agitación constante por 20 minutos. El lisado que se obtuvo fue centrifugado por 3 minutos a 13,400 rpm, transcurrido el tiempo de centrifugación se recolectó el sobrenadante para su cuantificación siguiente.

#### 6.4.2.2 *Cuantificación de proteína*

La cuantificación de la proteína se realizó por medio del “Kit DC Protein Assay” (BIO-RAD, EUA), de acuerdo a las indicaciones del protocolo se realizó una curva patrón con albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich, EUA) en un rango de concentraciones de 0.2-1.5 mg/mL con 5 diluciones como mínimo.

Después de tener listas las diluciones para la curva patrón, se colocaron 5  $\mu$ L de cada una y 5  $\mu$ L de cada muestra a cuantificar en una placa de 96 pozos. Se añadió el volumen de cada reactivo de acuerdo a lo indicado en el protocolo y se dejó incubar la placa por 15 minutos. Después del tiempo de incubación, la absorbancia se midió a 750 nm y por medio de la curva patrón determinamos la cantidad de proteína correspondiente por cada una de las muestras.

#### 6.4.2.3 *Western blot*

De acuerdo a la diferencia en el tamaño de las proteínas a analizar, se utilizaron dos condiciones diferentes. Para determinar la expresión de la p-MLCP (Thr853) se elaboró un gel de acrilamida al 8% y para la expresión de la p-MLC (Thr18 y Ser19) se realizó un gel al 15% (Tabla 1). Las proteínas fueron cargadas en el gel estratificado (“stacking gel”) (Tabla 2) y, se corrió por 1.5 h a 150 V y la transferencia a la membrana de nitrocelulosa (0.2  $\mu$ m Bio-Rad) a 270 mA por 1.5 h. Después de llevada a cabo la transferencia, se evaluó con rojo de Ponceau la presencia de los carriles en la membrana y la cantidad relativa de proteína entre éstos.



**Tabla 1.** Composición de los geles de acrilamida al 8% y 15%.

<b>Gel de resolución (“Resolving gel”)</b>		
	<b>8%</b>	<b>15%</b>
<b>H<sub>2</sub>O MilliQ</b>	4.6 mL	2.3 mL
<b>Acrilamida</b>	2.7 mL	5.0 mL
<b>Amortiguador de resolución (“Resolving buffer”)</b>	2.5 mL	2.5 mL
<b>Persulfato de amonio (AP) (10%)</b>	100 µL	100 µL
<b>SDS (10%)</b>	100 µL	100 µL
<b>Tetrametiletilendiamina (TEMED)</b>	10 µL	10 µL

**Tabla 2.** Composición del gel estratificado (Stacking gel).

<b>“Stacking gel”</b>	
<b>H<sub>2</sub>O MilliQ</b>	2.9 mL
<b>Acrilamida</b>	0.5 mL
<b>Amortiguador de estratificado (“Stacking buffer”)</b>	0.5 mL
<b>AP (10%)</b>	40 µL
<b>SDS (10%)</b>	50 µL
<b>TEMED</b>	4 µL

Después de desteñir las membranas, éstas se bloquearon por 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de TBS-Tween (2.4 g Trizma HCl, 8.0 g NaCl, 1 ml Tween 20/ 1 L, pH= 7.6) que contenía leche al 5%. Una vez bloqueadas las membranas, se dejaron incubando toda la noche a 4° C en agitación constante con los anticuerpos correspondientes en las siguientes diluciones:

Anticuerpo “phospho-MYPT1 Thr853” 4563, 1:250; anticuerpo “phospho-MLC-2 Thr18/Ser19 3674, 1:250; y anticuerpo GAPDH GTX-100118, 1:30,000.

Después de 3 lavados con TBS-Tween durante 10 minutos, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario “anti-Rabbit IgG-HRP” (sc-2004, 1:5,000) por 1 hora a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados más y se revelaron las membranas utilizando los reactivos quimio-luminiscentes “Clarity™ Western ECL Substrate” (BIO-RAD, EUA) con diferentes tiempos de exposición.

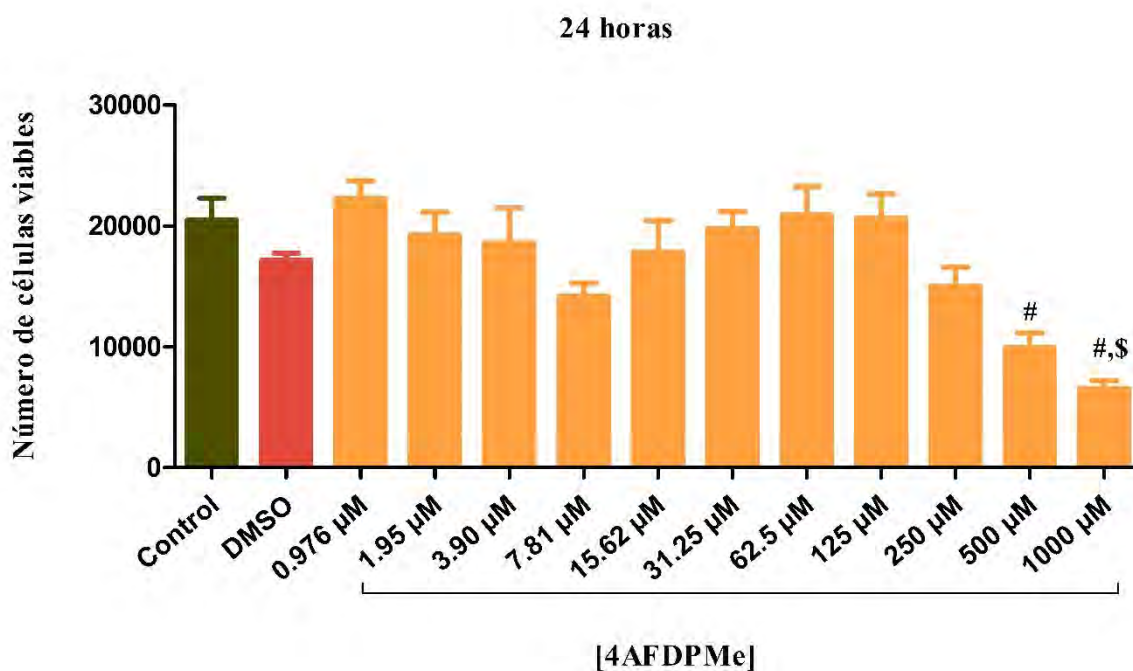
## **6.5 Análisis estadístico**

La prueba estadística para determinar las diferencias entre los compuestos se realizó mediante un análisis estadístico de varianza ANOVA de una vía para la comparación múltiple pareada total seguido de una prueba post, utilizando una versión de software GraphPad Prism versión

## 7. RESULTADOS

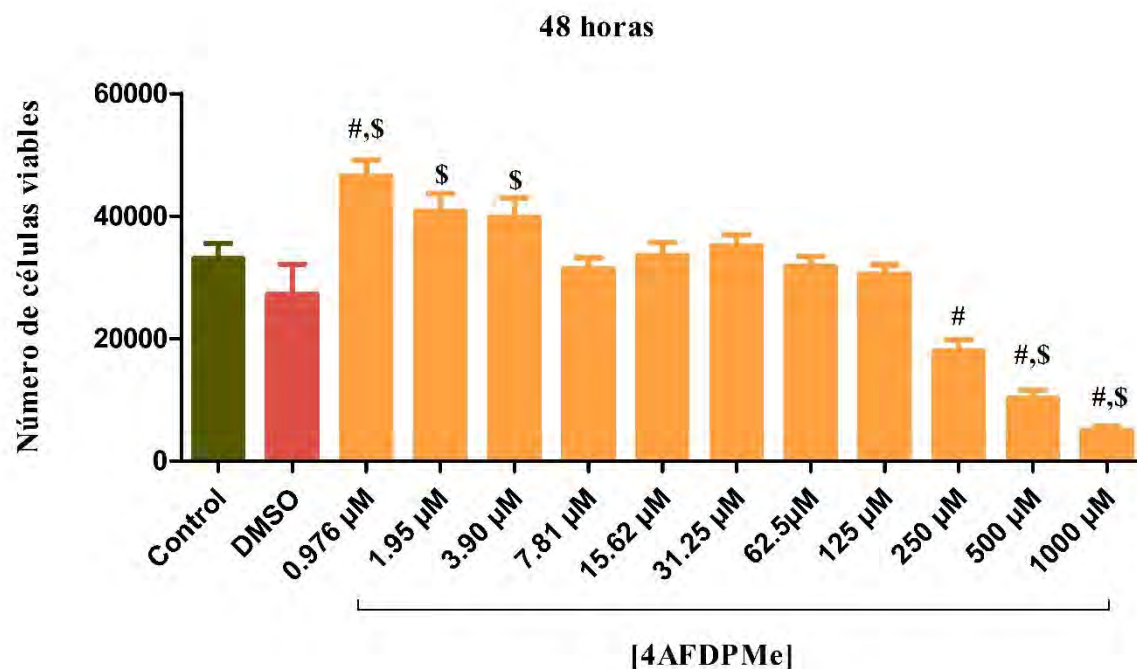
### 7.1 Efecto del 4AFDPMe sobre la viabilidad de células SiHa

Al evaluar el efecto que tiene el 4AFDPMe sobre la viabilidad celular en células SiHa, se observó que a 24 horas las concentraciones de 0.976  $\mu\text{M}$  a 250  $\mu\text{M}$  no muestran una disminución en la viabilidad celular y no presentan una diferencia significativa con respecto al control sin tratamiento y al vehículo DMSO, exceptuando la concentración de 7.81  $\mu\text{M}$  que induce una disminución pequeña sobre la proliferación celular. En cambio, las concentraciones más altas de 500 y 1000  $\mu\text{M}$ , provocan una reducción considerable del número de células, siendo éstas estadísticamente significativas con respecto al control sin tratamiento. Por otro lado, la concentración de 1000  $\mu\text{M}$  muestra una diferencia marcada ( $p < 0.05$ ) con respecto al DMSO (Figura 9).



**Figura 9.** Efecto del 4AFDPMe a concentraciones diversas sobre la viabilidad celular en células SiHa a 24 h de tratamiento. Cada columna representa la media de seis experimentos ( $n=6$ ) y las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$  SEM). # = Diferente significativamente vs. control sin tratamiento, \$ = Diferente significativamente vs. DMSO ( $p < 0.05$ ), ANOVA, Bonferroni.

En cambio, al analizar la viabilidad celular del 4AFDPMe a 48 horas, se observó de manera similar que las concentraciones desde 15.62  $\mu\text{M}$  a 125  $\mu\text{M}$  no modifican el número de células y que éste es muy parecido al control sin tratamiento; sin embargo, a concentraciones bajas, a partir de 0.976  $\mu\text{M}$  hasta 3.90  $\mu\text{M}$ , se induce un incremento en el número de células, siendo la concentración de 0.976  $\mu\text{M}$  marcadamente diferente ( $p < 0.05$ ) respecto al control sin tratamiento y al DMSO, y las concentraciones de 1.95 y 3.90  $\mu\text{M}$  diferentes contra este último. En cuanto a las concentraciones más altas, de 250, 500, y 1000  $\mu\text{M}$ , éstas disminuyen significativamente el número de células viables en comparación al control sin tratamiento, siendo también la concentración más alta 1000  $\mu\text{M}$  significativamente diferente al DMSO (Figura 10).

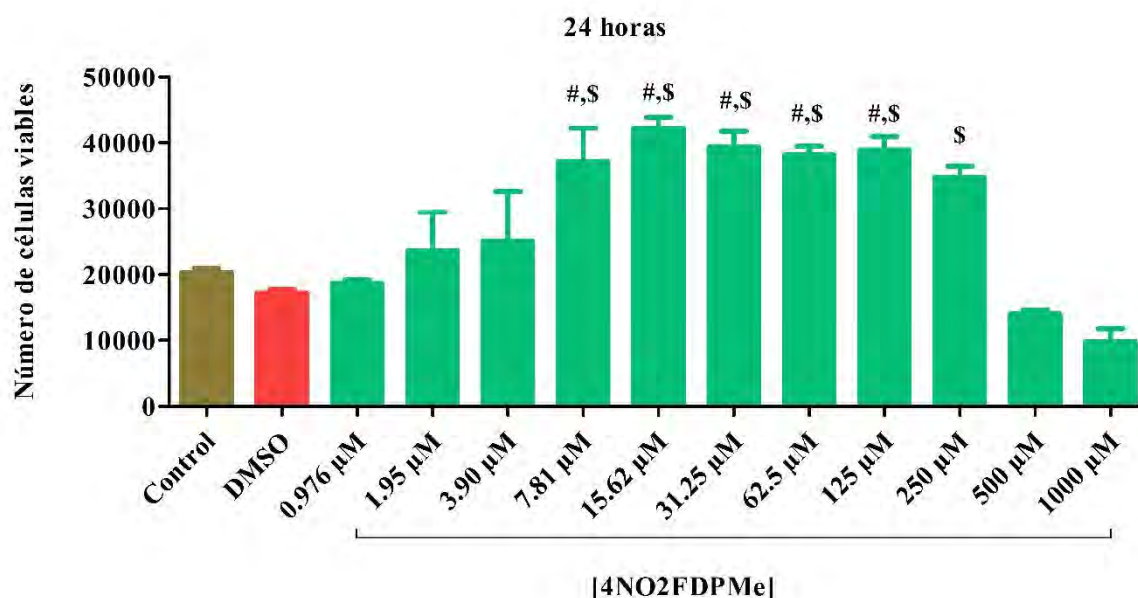


**Figura 10.** Efecto del 4AFDPMe a concentraciones diversas sobre la viabilidad celular en células SiHa a 48 h de tratamiento. Cada columna representa la media de seis experimentos ( $n=6$ ) y las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$  SEM). # = Diferente significativamente vs. control sin tratamiento, \$ = Diferente significativamente vs. DMSO ( $p < 0.05$ ), ANOVA, Bonferroni.

## 7.2 El 4NO<sub>2</sub>FDPMe induce un aumento en el número de células viables en células

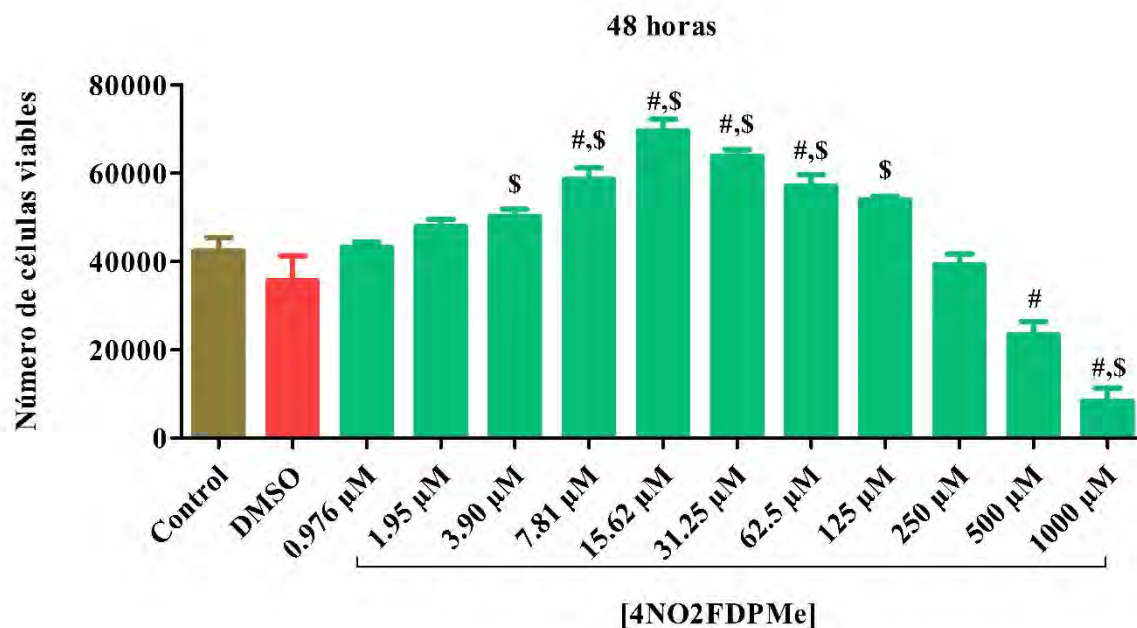
### SiHa

Al evaluar el efecto del 4NO<sub>2</sub>FDPMe sobre la viabilidad de células SiHa se observó que, a 24 horas de tratamiento, las concentraciones que van de 0.976  $\mu$ M a 3.90  $\mu$ M no modifican la viabilidad celular comparativamente al control sin tratamiento, ni al DMSO. Por otro lado, las concentraciones que van de 7.81 a 125  $\mu$ M indujeron un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) en el número de células viables en comparación al control sin tratamiento y al DMSO. Por el contrario, a partir de la concentración de 250  $\mu$ M se observa que empieza a haber un decremento en el número de células viables; aunque, esa concentración muestra ser sólo estadísticamente diferente con respecto al DMSO. Sin embargo, las concentraciones más altas del compuesto, 500  $\mu$ M y 1000  $\mu$ M, reducen en gran medida el número de células viables, no obstante, no muestran diferencia estadística con respecto al control sin tratamiento ni al DMSO (Figura 11).



**Figura 11.** Efecto del 4NO<sub>2</sub>FDPMe a concentraciones diversas sobre la viabilidad celular en células SiHa a 24 h de tratamiento. Cada columna representa la media de seis experimentos (n= 6) y las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$  SEM). # = Diferente significativamente vs. control sin tratamiento, \$ = Diferente significativamente vs. DMSO ( $p < 0.05$ ), ANOVA, Bonferroni.

Por otro lado, cuando se evaluó el efecto del 4NO<sub>2</sub>FDPMe sobre la viabilidad de las células SiHa a 48 horas, se encontró que las concentraciones de 0.976 a 3.90 μM no promovieron cambio alguno sobre el número de células viables al ser comparadas con el grupo control de controles ni al DMSO, únicamente, la concentración de 3.90 μM provocó un aumento ligero, pero significativo, en comparación al DMSO. Las concentraciones de 7.81 μM a 125 μM, generaron un aumento estadísticamente significativo en el número de células viables con respecto al control sin tratamiento y al DMSO, siendo la concentración de 15.62 μM aquella que presenta un mayor número de células viables. No obstante, se observó que la concentración de 125 μM muestra una diferencia estadística en cuanto al mayor número de células viables con respecto al DMSO, y que la concentración de 250 μM mantiene el mismo nivel de células viables comparado al control sin tratamiento y, por lo tanto, no es diferente a éste ni al DMSO. Sin embargo, las concentraciones más altas, 500 y 1000 μM, sí promueven una reducción considerable del número de células viables, bajando el número en un 50 y 75%, respectivamente ( $p < 0.05$ ), en contraste al control sin tratamiento; incluso, la concentración de 1000 μM alcanza a ser diferente estadísticamente con respecto al DMSO (Figura 12).



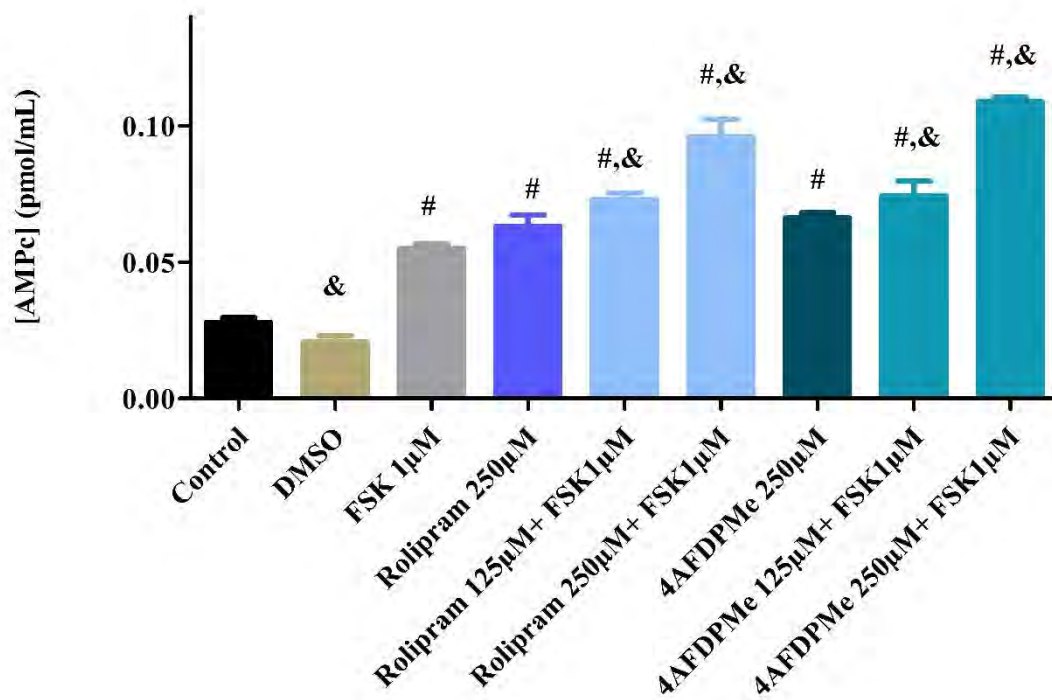
**Figura 12.** Efecto del 4NO<sub>2</sub>FDPMc a concentraciones diversas sobre la viabilidad celular en células SiHa a 48 h de tratamiento. Cada columna representa la media de seis experimentos (n= 6) y las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$  SEM). # = Diferente significativamente vs. control sin tratamiento, \$ = Diferente significativamente vs. DMSO ( $p < 0.05$ ), ANOVA, Bonferroni.

Tomando en cuenta que los resultados sobre el efecto del 4NO<sub>2</sub>FDPMc en la viabilidad celular de células SiHa sugieren fuertemente que este compuesto estimula la viabilidad celular y, por ende, la proliferación en esta línea celular, se decidió descartarlo de los experimentos restantes y estudiar únicamente al compuesto 4AFDPMc en este proyecto.



### **7.3 El 4AFDPMé induce un incremento en los niveles intracelulares de AMPc en células SiHa**

En la actualidad, se sabe que el AMPc es un segundo mensajero que juega un papel importante en procesos diversos relacionados al cáncer por medio de la inhibición de PDE-4 o de alguna otra manera de elevarlo intracelularmente, ya sea por la activación directa de la AC. De esta manera, para corroborar el efecto del 4AFDPMé como inhibidor de PDE-4 en células SiHa, se llevó a cabo la cuantificación de AMPc intracelular en esta línea celular. Se observó que el DMSO no modificó los niveles basales de AMPc; sin embargo, FSK a 1  $\mu\text{M}$  indujo un aumento considerable (al doble) de la concentración intracelular de AMPc en comparación al control sin tratamiento (basal). Además, las células estimuladas con 250  $\mu\text{M}$  de rolipram y del 4AFDPMé muestran niveles similares de AMPc a los observados con la estimulación con FSK 1  $\mu\text{M}$ ; inclusive, los compuestos incrementaron los niveles de este segundo mensajero en contraste marcado con el nivel basal ( $p < 0.0001$ ). Más aún, al comparar los niveles de AMPc inducidos por 125 y 250  $\mu\text{M}$  de rolipram y de 4AFDPMé en las células estimuladas con FSK 1  $\mu\text{M}$ , estos fueron mayores a los generados solo con FSK y al nivel basal, alcanzando significancia estadística (Fig. 13). Prácticamente, el 4AFDPMé a 250  $\mu\text{M}$  con estímulo de FSK 1  $\mu\text{M}$  duplica los niveles de AMPc causados solo por FSK; por lo tanto, se sugiere que el 4AFDPMé tiene un efecto inhibitorio sobre PDE-4, ya que el incremento de AMPc intracelular inducido con FSK, que estimula directamente a AC, es a su vez aumentado por la acumulación de este segundo mensajero al no ser hidrolizado en una forma dependiente de la concentración del análogo.

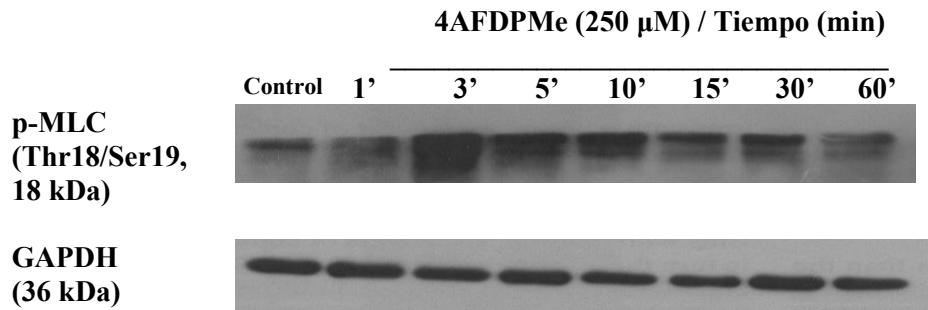


**Figura 13.** Niveles intracelulares de AMPc en células SiHa estimuladas con 4AFDPMe (125 y 250  $\mu$ M). Se tomaron como controles: Control sin tratamiento, DMSO, forskolina (FSK, 1  $\mu$ M) y rolipram (125 y 250  $\mu$ M). Cada columna representa una n=6 y las barras verticales representan el error estándar de la media ( $\pm$  SEM). Se muestran las diferencias: # = diferente significativamente vs. Control sin tratamiento, & = diferente significativamente vs. FSK. ANOVA, Bonferroni ( $p < 0.0001$ ).

#### 7.4 El 4AFDPMMe promueve la activación temporal de p-MLC en células SiHa

La MLC fosforilada es una molécula fundamental para el mecanismo de contracción celular que está implicado en los fenómenos de motilidad, invasión y migración celular (97). Por esta razón, era importante evaluar si la presencia del análogo de talidomida e inhibidor de PDE-4 inducía la activación de esta proteína.

Se constató que existe una cantidad basal de MLC fosforilada en los residuos Thr18/Ser19 (p-MLC) que aumenta paulatinamente a partir del primer minuto de estimulación con el 4AFDPMMe a 250  $\mu$ M (concentración seleccionada ya que fue la mejor para aumentar la concentración intracelular de AMPc y con la que ya hay una reducción significativa de la viabilidad de SiHa). De manera similar, se observó que los puntos de máxima estimulación con el compuesto ocurren a los 3, 5, y 10 minutos, siendo mayor en el minuto 3. A partir del minuto 15, existe un decremento de ésta, sin embargo, en el minuto 30 vuelve a existir una elevación, que casi desaparece en el minuto 60, donde el nivel de p-MLC es similar al nivel basal que presenta el carril control sin estimulación con el compuesto (Figura 14).



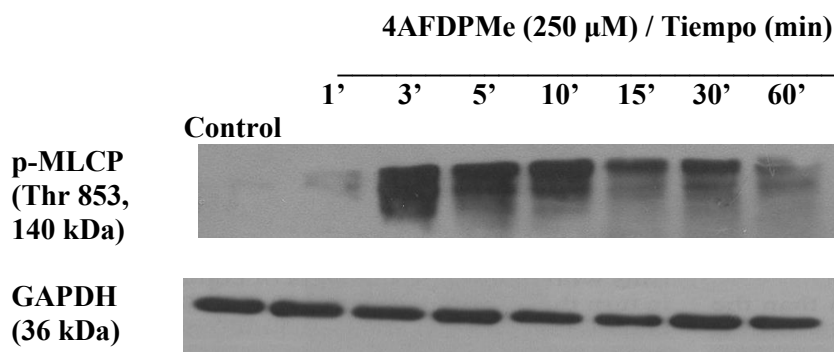
**Figura 14.** Activación de p-MLC (Thr18/Ser19) conforme al tiempo de exposición al 4AFDPMMe 250  $\mu$ M en células SiHa. Se muestra una fotografía representativa de los experimentos realizados al menos por triplicado, donde se utilizó extracto total de proteína para analizar la presencia de p-MLC y GAPDH constitutiva como control por Western Blot. Los carriles incluyen un control sin tratamiento, y la estimulación con el análogo a diferentes tiempos (1 a 60 min).

La p-MLC puede ser desfosforilada por la MLCP, que también es una enzima implicada en el proceso de contracción y motilidad celular, ya que induce la relajación celular impidiendo el movimiento y, por ende, la migración celular, por lo que se decidió analizar el efecto del 4AFDPMMe sobre la expresión de ésta.

## 7.5 El 4AFDPMe induce la inactivación transitoria de MLCP por medio de su fosforilación

La MLCP puede ser fosforilada e inactivada por ROCK en dos sitios específicos (Thr 696 y Thr 853) de la subunidad MYPT-1 (p-MLCP), reforzando de esta manera la contracción, motilidad y migración celular (100).

En la figura 14 se observó que la exposición de las células SiHa al 4AFDPMe a 250  $\mu$ M provocó variaciones sobre la expresión de p-MLCP respecto al tiempo. Cuando no hay presencia del compuesto casi no existe una cantidad basal de la proteína fosforilada en este residuo. Sin embargo, se puede apreciar que ésta va aumentando a partir del primer minuto con la estimulación, siendo mayor en el minuto 3 y manteniéndose hasta el minuto 10. Por otro lado, se puede ver que en el minuto 15 existe un decremento en la cantidad de tal proteína, no obstante, en el minuto 30 se elevan nuevamente los niveles de esta proteína y, por lo contrario, éstos son casi imperceptibles en el minuto 60 de exposición con el compuesto (Figura 15).



**Figura 15.** Activación de p-MLCP (Thr853) conforme al tiempo de exposición al 4AFDPMe 250  $\mu$ M en células SiHa. Se muestra una fotografía representativa de los experimentos realizados al menos por triplicado, donde se utilizó extracto total de proteína para analizar la presencia de p-MLCP y GAPDH constitutiva como control por Western Blot. Los carriles incluyen un control sin tratamiento y la estimulación con el análogo a diferentes tiempos (1 a 60 min).

## 8. DISCUSIÓN

Hoy en día los tratamientos utilizados para tratar el cáncer no han resultado ser completamente efectivos, principalmente por el desarrollo de resistencia a los fármacos existentes y por los efectos adversos diversos que éstos generan, sin controlar eficientemente el desarrollo de la enfermedad, su propagación a otras partes del cuerpo y, finalmente, a la muerte. Por lo tanto, surge la necesidad de crear moléculas y/o compuestos novedosos con dianas específicas que actúen limitando el progreso y la invasión de esta enfermedad.

Actualmente, las investigaciones se han enfocado a entender de manera precisa el desarrollo y progreso del cáncer. Así mismo, en los últimos años se ha evidenciado que el AMPc es una molécula que puede actuar en diversos procesos biológicos, incluidos secreción, contracción muscular, aprendizaje, conductancia de canales iónicos, producción y acción de citocinas proinflamatorias, entre otros (130). Por otro lado, estos estudios han demostrado que este segundo mensajero es un blanco clave en el estudio del cáncer, ya que se ha observado que las variantes diferentes en los niveles intracelulares de AMPc están relacionadas con la proliferación, diferenciación, contracción, muerte celular, y tumorigénesis de tipos diversos de cáncer, entre ellos el cáncer cervicouterino (130,131). Los niveles intracelulares de AMPc pueden regularse a través de PDE, ya que estas enzimas catalizan la hidrólisis de este segundo mensajero (39,53).

En la actualidad los inhibidores de PDE-4 han sido catalogados como fármacos promisorios para tratar enfermedades diversas, ya que se sabe que actúan elevando los niveles intracelulares de este segundo mensajero y este, como ya se ha mencionado, cumple funciones importantes en el organismo; por ejemplo, se ha demostrado que estos inhibidores de PDE-4, son miorrelajantes, actúan en la inmunomodulación de mediadores proinflamatorios con un papel destacado en enfermedades inflamatorias. Por esta razón, los inhibidores de PDE-4 surgen como compuestos atractivos por su participación en procesos antiproliferativos, antimetastásicos, y antitumorales, sobre líneas celulares de cáncer diversas, que son característicos y asociados con este padecimiento. Entre los inhibidores de PDE-4 se han encontrado un grupo de compuestos sintetizados con base en los productos de hidrólisis espontánea de la talidomida, que no tienen los efectos adversos y teratogénicos que ésta presenta, aunque estos análogos de talidomida conservan sus propiedades

inmunomoduladoras y antiinflamatorias; sin embargo, poseen un mecanismo de acción diferente a la talidomida, ya que elevan los niveles intracelulares de AMPc por medio de la inhibición específica de PDE-4 (67,70,81). Por ello, en este estudio se eligieron dos análogos de talidomida del grupo de inhibidores específicos de PDE-4, el 4NO<sub>2</sub>FDPMe y el 4AFDPMe, de los que se evaluó su efecto sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer cervicouterino (SiHa), se seleccionó el mejor y, posteriormente, del mismo se determinó su capacidad para inducir un aumento en la concentración de AMPc intracelular como inhibidor de PDE-4 para, finalmente, verificar su efecto sobre la vía de proteínas RhoA-ROCK, puesto que la elevación de este segundo mensajero activa a la PKA y ésta fosforila proteínas diversas implicadas en el mecanismo de contracción celular, tales como RhoA-ROCK, que a su vez están involucradas en los procesos de migración, invasión y metástasis en el cáncer cervicouterino (120,121).

Se determinó el efecto de los análogos de talidomida e inhibidores de PDE-4, el 4NO<sub>2</sub>FDPMe y el 4AFDPMe, sobre la viabilidad celular en células SiHa. El 4NO<sub>2</sub>FDPMe, en un intervalo de concentraciones que van de 0.976 µM a 125 µM, elevó la viabilidad celular en este tipo de células, pero las concentraciones de 500 y 1000 µM la redujeron. Por el contrario, el análogo 4AFDPMe tuvo un efecto bifásico, pero mayoritariamente inhibió la viabilidad de las células SiHa en una forma dependiente de la concentración. Esto puede atribuirse a su capacidad de inhibir a la PDE-4 y aumentar los niveles intracelulares de AMPc, ya que estudios diversos han reportado que el aumento de este segundo mensajero está implicado en la inhibición de la proliferación y viabilidad celular (50). Los efectos opuestos que ejercen ambos análogos sobre la viabilidad celular podrían atribuirse a las diferencias estructurales existentes entre ambos; anteriormente, se ha informado que la talidomida y sus análogos exhiben diferencias en la efectividad que presentan en varias funciones biológicas y que estas diferencias pueden deberse a las variaciones en las vidas medias en el plasma humano a 37 °C, la estabilidad y la solubilidad, por ejemplo, el análogo FDP ha mostrado tener una vida media de aproximadamente 8 h, mientras que la del FDPMe ha sido de aproximadamente 3 h y un análogo que se asemeja al 4AFDPMe tiene una vida media de casi 4 h, estas diferencias pueden estar originadas en la solubilidad y estabilidad de cada compuesto en el organismo, así como su biodisponibilidad. Aunque este estudio se realizó *in vitro*, se considera que tales factores sean de suma importancia, ya que ciertos análogos

podrían ser metabolizados o eliminados de las células, el tejido, o del organismo a distintas velocidades sin llegar a presentar un efecto significativo; de hecho, modificaciones pequeñas en las moléculas, como los grupos funcionales e incluso el tipo de enantiómero usado (R o S) pueden conferirle características específicas a cada compuesto, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (66,80). Tomando en cuenta que el número de células cancerosas viables aumenta con el estímulo del 4NO<sub>2</sub>FDPMe, a pesar de que también es un inhibidor de PDE-4 y que se comporta farmacológicamente como el 4AFDPMe en varios estudios (81,82) se decidió descartarlo de los experimentos siguientes.

La inhibición del 4AFDPMe sobre la viabilidad celular de SiHa, fue similar a la reportada en el trabajo realizado por Mahdian et al. (51), en el cual demuestran que amrinona y cilostamida, inhibidores selectivos de PDE-3, disminuyen significativamente la viabilidad de las líneas celulares HeLa y MCF-7 de una manera dependiente del tiempo; sin embargo, señalan que IBMX, un inhibidor de PDE no selectivo, disminuye la viabilidad de estas líneas celulares de una manera dependiente de la concentración y del tiempo. De igual manera, Shafer et al. (132) demostraron que el tratamiento con diferentes inhibidores inespecíficos de PDE, como cafeína, teofilina, e IBMX, reduce rápida y marcadamente la viabilidad celular de las líneas celulares NCI-H345, NCI-H128, y SCC-9 de cáncer de pulmón. Por otro lado, Schmidt et al. (133) señalan que rolipram reduce significativamente la viabilidad celular en tres líneas celulares de meduloblastoma de manera dependiente de la concentración. Todos estos hallazgos sugieren que la elevación de AMPc por medio de la inhibición de PDE-4 induce un decremento en la viabilidad celular.

Por otro lado, se observó un efecto bifásico ya que a medida que disminuye la concentración del 4AFDPMe aumenta la viabilidad celular, y existe un mayor número de células con respecto al control a las 48 horas de tratamiento, específicamente en la concentración menor (0.97 μM), lo que sugiere que el mecanismo de este compuesto sobre la viabilidad celular es dependiente de la concentración. La inducción de la viabilidad y proliferación celular en esta línea celular ocasionada por el compuesto puede deberse a que a concentraciones bajas del 4AFDPMe existe una elevación de AMPc baja y que esa concentración regule diferencialmente la fisiología normal de las células SiHa, lo cual puede estimular la progresión del ciclo celular sin dañar a las células y su proliferación celular; ya que, en años

recientes, se sabe que algunos tipos de células necesitan mantener bajos los niveles del AMPc en los compartimentos en que se encuentra regulado por las PDE-4, lo cual podría inducir el incremento de la proliferación celular (134,135). Además, se ha señalado que el incremento en los niveles intracelulares de AMPc tiene papeles bidireccionales, es decir, puede actuar aumentando o disminuyendo la viabilidad y proliferación celular, dependiendo del tipo celular y de las condiciones de éste y del modelo experimental en la investigación (60,61,63). Estos efectos contradictorios del AMPc sobre la proliferación y viabilidad celular claramente pueden deberse a que las células de los mamíferos tienen formas múltiples de AC y, de igual manera, existen isoformas diversas de PDE y no todas pueden estar implicadas en el proceso de inhibición de estos procesos asociados al cáncer. Además, la diversidad de las proteínas que gobiernan los niveles de AMPc en la célula puede contribuir a las grandes variaciones en la respuesta a la activación de las vías de señalización de este segundo mensajero (130,132). Más aún, se ha establecido que hay isoformas de la PDE-4 que pueden adoptar dos conformeros activos sensibles al rolipram, un estado conformacional de alta afinidad que responde al rango de concentración nanomolar (HAPDE-4) y un estado conformacional de baja afinidad que se activa en el rango micromolar (LAPDE-4); de hecho, los efectos adversos del rolipram correlacionan con el estadio de HAPDE-4, mientras que los efectos terapéuticos se correlacionan con el estadio de LAPDE-4, que es el conformero hallado en útero cerca del término del embarazo para promover la contracción en el parto, lo que sugiere que los estadios se modifican dependiendo del tejido y ambiente endócrino, inmunitario, o de enervación nerviosa (81). Así entonces, los efectos bidireccionales de los análogos a concentraciones diversas podrían ser explicados por la inhibición diferencial de estos conformeros de PDE-4 y los niveles de AMPc generados en los compartimentos celulares diversos.

Dado que el AMPc está implicado en el proceso de viabilidad celular y al encontrar que en esta línea celular concentraciones altas del 4AFDPMc (250-1000  $\mu$ M) reducen de manera significativa este proceso, se comprobó entonces si una concentración alta del compuesto (250  $\mu$ M), actuaría elevando los niveles intracelulares de este segundo mensajero y si éste aumentaba de una manera dependiente de la concentración en este tipo de células. Los resultados aquí obtenidos fueron similares a los hallados recientemente por Fernández-Martínez et al. (81), que evidenciaron que el 4AFDPMc elevó los niveles de AMPc en células



HeLa de manera dependiente de la concentración por medio de la inhibición de PDE-4; también, se asemejaron a los resultados obtenidos por Muñoz-Pérez (82) que determinó que este compuesto incrementó la concentración de AMPc intracelular en útero de rata gestante de manera dependiente de la concentración. Estos hallazgos comprobaron que este compuesto 4AFDPMe, aumenta los niveles intracelulares de AMPc incluso más que el activador directo de AC, FSK 1 $\mu$ M, y que rolipram, inhibidor selectivo de PDE4 a 250  $\mu$ M.

La diferencia en la capacidad elevadora de AMPc entre el 4AFDPMe y el rolipram puede deberse a la especificidad de los compuestos hacia las distintas isoformas de PDE-4. Algunos inhibidores de PDE-4 tienen una afinidad diferente por la inhibición sobre distintas isoformas de PDE-4; incluso, las PDE son capaces de anclarse a complejos de señalización ubicadas de manera específica intracelular y específicamente con el objetivo de la degradación concreta de AMPc, lo cual permite que las diversas isoformas de PDE controlen funciones celulares específicas. Debido a esto, las alteraciones en la expresión de las isoformas de PDE otorgan cambios funcionales particulares y pueden contribuir a las patologías moleculares de las respuestas celulares para proteger contra los aportes perjudiciales (50). De esta manera, dicha selectividad es consistente con el hecho ya establecido de que la señalización del AMPc está compartimentada en las células con actividad de PDE4 que contribuyen con acciones diversas en distintos compartimentos (136). En tipos de cáncer diversos se ha identificado que rolipram presenta más afinidad hacia las isoformas de PDE-4A (61). Actualmente, rolipram es el fármaco prototipo de primera elección para la creación de nuevos compuestos que actúen elevando los niveles de AMPc por medio de la inhibición de PDE-4 (53). Méhats y colaboradores (53), han demostrado que rolipram permite una acumulación de este segundo mensajero de una manera dependiente del tiempo al ser combinado con FSK; así como lo observamos en este estudio, al combinar rolipram y/o el 4AFDPMe con FSK. Además, apremilast, un análogo de talidomida e inhibidor selectivo de PDE-4 tiene una afinidad similar para todas las isoformas de PDE-4 (137), no obstante, se ha determinado que en algunos tipos de cáncer, como el cáncer colorrectal, este compuesto actúa por medio de la inhibición de la isoforma PDE-4B2 (78). Con respecto al tiempo de actividad del análogo, en estudios funcionales sobre la relajación del músculo liso uterino se ha demostrado que en un periodo de 30 minutos se presenta una relajación mayor del tejido en presencia del 4AFDPMe; además, se ha demostrado que en células HeLa, el periodo de incubación óptimo

para llegar a la concentración más alta del AMPc inducida por el 4AFDPMe fue de 30 minutos (81).

Por todo ello, la inhibición de las PDE-4 se ha considerado un blanco importante, ya que al incrementar los niveles intracelulares de AMPc este actúa a través de mecanismos intracelulares diversos, fundamentalmente por medio de la activación de la PKA y su papel en el proceso de contracción celular al fosforilar proteínas diana como la proteína monomérica RhoA que juega un papel importante en la migración e invasión celular que puede derivar en metástasis (48,138). Actualmente, se ha considerado que la invasión celular y la metástasis son una característica primordial del cáncer y se ha planteado que la metástasis induce la mayor parte de morbilidad y mortalidad en esta enfermedad (139,140). Por esta razón y por la falta de fármacos antimetastásicos, se ha determinado que la investigación migrastática debe enfocarse en los mecanismos que regulan la migración celular, tales como la polimerización de la actina y la contracción celular. La polimerización de la actina y la contractilidad cumplen con los objetivos ideales de la eficacia migrastática, ya que estos procesos son requeridos por los mecanismos de invasión y migración celular (138). De manera general, una célula cancerosa que lleva a cabo el proceso de migración presenta tres características importantes: la creación de protuberancias de actina, adherencias a superficies nuevas, y la contracción celular requerida para la retracción y translocación del cuerpo celular; además, en cooperación con los motores de miosina, la actina es el recurso clave para la contracción celular (141,142).

Como ya se mencionó anteriormente, el proceso principal que regula la contracción celular es la participación de la vía de proteínas RhoA-ROCK. Una vez que ROCK es activada, por medio de la unión de GTP a RhoA, fosforila directamente a la MLC en Thr18 y Ser19 generando así el proceso de contracción celular (100). Asimismo, ROCK fosforila a la MLCP en los residuos Thr853 y 696 de la subunidad MYPT-1, lo que induce su inactivación, impidiendo que lleve a cabo el papel de desfosforilar a la p-MLC (97). Así, la fosforilación de ambas (MLC y MLCP) incrementa los niveles de la p-MLC, lo cual estimula su actividad ATPasa, dando como resultado la contractilidad de la actomiosina (138).

Estudios diversos han demostrado que la PKA puede inducir la inactivación de RhoA, señalando que el mecanismo por el cual puede ser inactivada es que cuando RhoA se

encuentra unida a GTP (RhoA-GTP) es fosforilada por PKA y se extrae de la membrana en su forma unida a GTP por RhoGDI $\alpha$ , terminando así la señalización de RhoA-GTP prematuramente (109). Varios estudios han caracterizado que la PKA actúa inhibiendo la señalización de RhoA fosforilándola en Ser-188, esto al aumentar los niveles de AMPc intracelulares (143). De esta forma, mediante la inactivación de RhoA, es fácil deducir que no se lleva a cabo la activación de su efector río abajo (ROCK), por lo que la MLC y la MLCP no son fosforiladas por esta proteína, así la MLCP permanece activa.

Contradictoriamente, Takeda y colaboradores (144), demostraron por vez primera que el ácido cannabidiólico (CBDA) inhibe la migración de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 altamente invasivas, por medio de un mecanismo que implica la inhibición de PKA, y mediante la activación de RhoA, con lo que establecieron que la activación de la vía de señalización RhoA conduce a la inhibición de la movilidad de diversas células cancerosas, incluidas las células MDA-MB-231. Por lo contrario, Zajchowski y colaboradores (145), señalan que la activación de RhoA inhibe la invasión y migración de una línea celular de cáncer de mama MCF-7, además señalan que la RhoA se expresa en todas las líneas celulares de carcinoma mamario, sin embargo, ninguno de su patrones de expresión se correlaciona con el potencial invasivo.

Los resultados obtenidos en este estudio sobre los niveles de la MLC fosforilada en Thr18 y Ser-19 muestran que, a pesar de existir niveles basales de esta proteína fosforilada, el estímulo con el 4AFDPMe origina cambios transitorios sobre sus niveles, incrementándolos en tiempos menores a 15 minutos y, de la misma forma, a los 30 minutos, posteriormente hay una recuperación en los niveles de esta proteína fosforilada, lo que sugiere que este compuesto genera cambios en la línea celular de cáncer cervicouterino SiHa a través de la fosforilación de la MLC en Thr18 y Ser-19 por medio de la vía de proteínas RhoA-ROCK. De igual manera, se encontró que el 4AFDPMe induce a la inactivación transitoria de la MLCP fosforilándola en Thr853; además, la activación de la MLC fosforilada en Thr18 y Ser19 coincidió con la fosforilación de la MLCP en Thr853 en los mismos intervalos de tiempo, por lo cual se consideró que la señalización de RhoA-ROCK/MLC/MLCP es activada por este compuesto. Sin embargo, dichos resultados pueden estar regulados en gran parte a que la actividad PKA en la célula está compartimentada; por lo tanto, se necesita

información sobre patrones espaciotemporales de la actividad de PKA para comprender el papel de ésta en elementos específicos de migración celular e identificar más sustratos posibles que resulten ser relevantes (146). Ya que como se mencionó, los niveles máximos de expresión de estas proteínas son entre los 3-10 minutos, existiendo un declive en el minuto 15, son embargo en el minuto 30 hay una recuperación en los niveles de ambas proteínas y esto es contundente con lo ya discutido anteriormente, porque a los 30 minutos existe una mayor acumulación de AMPc (81). Asimismo, se sabe que diversas proteínas implicadas en el proceso de contracción son susceptibles de ser fosforiladas por PKA; por ejemplo, ROCK1 y ROCK2 poseen 45 y 43 sitios, respectivamente, que pueden fosforilarse, algunos de los cuales pueden cambiar su actividad, inhibirla o aumentarla (98). De esta manera, recientemente se ha informado que ROCK1 y ROCK2 tienen diferencias funcionales en la regulación de la adhesión, la migración, la proliferación y la expresión génica, pero los mecanismos subyacentes no se comprenden completamente (147). Además, se han identificado objetivos múltiples para las proteínas Rho, lamentablemente no está claro si las isoformas actúan selectivamente a través de blancos río abajo distintos o similares para mediar respuestas específicas (148); por lo tanto, se sugiere realizar más estudios sobre la función de las isoformas de ROCK en el cáncer, con el fin de dilucidar los mecanismos subyacentes de sus diferencias funcionales y determinar la isoforma funcional predominante involucrada en la contracción, migración, e invasión celular en este padecimiento.

Un estudio reciente, demuestra que honokiol, un compuesto derivado de la magnolia, inhibe la migración de células 786-0 de carcinoma celular renal altamente metastásico mediante la activación de la vía RhoA/ROCK/MLC, aquí, Cheng y colaboradores (149) también demostraron que la fosforilación de la MLC en Thr18 y Ser-19 coincide con la activación de RhoA y que existe una formación de fibras de estrés de actina en esta línea celular al ser tratadas con honokiol, estos resultados fueron corroborados al utilizar Y-27632 un inhibidor de ROCK, ya que este inhibidor mejora la migración celular en células de carcinoma celular renal, por lo que concluyen que la inhibición de la vía de señalización RhoA/ROCK/MLC regula positivamente la migración de las células 786-0. Sus resultados también demuestran que el tiempo en el cual se obtuvo mayor cantidad de estas proteínas fue de 30 minutos, lo cual coincide temporalmente con nuestros resultados. De manera similar, Chen y colaboradores (150), señalaron que el supresor tumoral TMEFF2 inhibe la migración celular

y que este efecto está medido en gran parte por la acción que ejerce sobre la activación de RhoA en células de cáncer de próstata.

En la actualidad, se ha demostrado que la regulación positiva de RhoA y, por consiguiente, de su efector río abajo, ROCK, está asociada con la progresión tumoral en diversos tipos de cáncer y que la activación de esta proteína, de igual manera, promueve la migración celular en gran cantidad de células cancerígenas, entre ellas destacan células de carcinoma cervical (HeLa), colon, y hepatocelular (113,121,151). Estos resultados contradictorios reflejan que la regulación tanto positiva como negativa de RhoA tiene efectos altamente específicos de cada línea celular, aunado a esto y debido a los resultados encontrados en este estudio, se establece que la regulación de la activación RhoA y los mecanismos mediante los cuales las GTPasas influyen de manera diferente en las funciones celulares son dos cuestiones clave que deben abordarse (145).

## **9. PERSPECTIVAS**

- A) Evaluar el proceso de migración de la línea celular SiHa en presencia y ausencia del 4AFDPMe.
- B) Comprobar la fosforilación de RhoA en el residuo Ser-188 en presencia y ausencia del 4AFDPMe
- C) Determinar la expresión de la vía de señalización RhoA-ROCK/MLC/MLCP en presencia de un inhibidor de ROCK selectivo, como Fasudil o Y-27632 y el 4AFDPMe.

## 10. CONCLUSIONES

A) El 4AFDPMMe a concentraciones altas (250, 500, 1000  $\mu$ M) reduce el número de células viables de la línea celular SiHa a 24 y 48 horas. Sin embargo, a 48 horas de tratamiento, a medida que disminuye la concentración de este compuesto, existe una mayor viabilidad celular, lo que sugiere que el efecto del 4AFDPMMe es dependiente de la concentración.

B) El 4AFDPMMe aumenta las concentraciones intracelulares de AMPc en células SiHa de una manera dependiente de la concentración. Lo que corrobora su mecanismo de acción como inhibidor de PDE-4.

C) El 4AFDPMMe aumenta los niveles intracelulares de AMPc en células SiHa más que el inhibidor selectivo de PDE-4 rolipram y el activador directo de AC FSK.

D) La estimulación con 4AFDPMMe en células SiHa aumenta la cantidad de MLC fosforilada en Thr18 y Ser19.

E) Los niveles de MLCP fosforilada en Thr853 en células SiHa aumentan como respuesta al estímulo con el 4AFDPM.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Tortora, Gerard y Derrickson B. Los aparatos reproductores. In: Anatomía y fisiología humana. 11ª Ed. Editorial Médica Panamericana; 2006. p. 1064–111.
2. Sternberg SS. Histology for pathologists. 2nd ed., Lippincott-Raven; 1997. 1200 p.
3. Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM. Blaustein's pathology of the female genital tract. 6th Ed. Springer; 2011. 1246 p.
4. Sellors EJ, Sankaranarayanan R. La colposcopia y el tratamiento de la neoplasia intraepitelial cervical: Manual para principiantes. Lyon, Francia: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2003. 134 p.
5. Organization. WH. World Cancer Report 2014. Steward BW, Wild CP, editors. World Cancer Report 2014. France: International Agency For Research on Cancer; 2014. 630 p.
6. World Health Organization. Control integral del cáncer cervicouterino: guía de prácticas esenciales. World Health Organization., editor. Suiza: Organización Mundial de la Salud; 2007. 279 p.
7. Lawrence WD, Shingleton HM. Early physiologic squamous metaplasia of the cervix: Light and electron microscopic observations. *Am J Obstet Gynecol.* 1980;137(6):661–71.
8. Alonso-de Ruiz P, Lazcano-Ponce E, Hernández-Ávila M. Cáncer cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control. Editorial Panamericana, editor. Vol. 42, Salud Pública de México. Instituto Nacional de Salud Pública; 2000. 254 p.
9. Anaya-Ruiz M, Vincent AK, Perez-Santos M. Cervical Cancer Trends in Mexico: Incidence, Mortality and Research Output. *Asian Pacific J Cancer Prev.* Asian Pacific Organization for Cancer Prevetion; 2014 Nov 6;15(20).
10. Secretaría de salud. El cáncer de cuello uterino. Más cerca de lo que parece. Semana de sensibilización en cáncer de cuello uterino del 22 al 28 de agosto. 2016.
11. Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection:



- biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer*. 2005 Sep;15(5):727–46.
12. Castellsagué X, Muñoz N. Cofactors in Human Papillomavirus Carcinogenesis: Role of Parity, Oral Contraceptives, and Tobacco Smoking. In: *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003. p. 20–8.
  13. Magnusson PKE, Lichtenstein P, Gyllensten UB. Heritability of cervical tumours. *Int J Cancer*. Wiley-Blackwell; 2000;88(5):698–701.
  14. Walboomers JMM, Jacobs M V., Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah K V., et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999 Sep;189(1):12–9.
  15. Rao S, Gray-Bablin J, Herliczek TW, Keyomarsi K. The Biphasic Induction of p21 and p27 in Breast Cancer Cells by Modulators of cAMP Is Posttranscriptionally Regulated and Independent of the PKA Pathway. *Exp Cell Res*. 1999 Oct 10;252(1):211–23.
  16. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007 Aug 1;121(3):621–32.
  17. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006 Aug 31;24:S1–10.
  18. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*. 2015;25:2–23.
  19. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*. American Society for Microbiology (ASM); 1997 Mar;71(3):2449–56.
  20. Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 1999 Feb

26;274(9):5810–22.

21. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002 May 1;2(5).
22. Yap T, Watkin N, Minhas S. Infections of the Genital Tract: Human Papillomavirus–Related Infections. *Eur Urol Suppl*. 2017 Apr 1;16(4):149–62.
23. Blachon S, Demeret C. The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are pro-apoptotic. *Biochimie*. 2003 Aug 1;85(8).
24. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res*. 2009 Aug 1;143(2).
25. Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. 1989;63(10):4417–21.
26. Arbeit JM, Howley PM, Hanahan D. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 2;93(7):2930–5.
27. Gurumurthy M, Peevor R, Fiander A. Human papillomavirus update (including vaccination). *Obstet Gynaecol Reprod Med*. 2013 Aug;23(8):231–7.
28. Shiraz A, Majmudar T. Colposcopy and cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynaecol Reprod Med*. 2017 Jun;27(6):177–83.
29. Wright TC, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D, et al. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. *Am J Obstet Gynecol*. 2007 Oct;197(4):340–5.
30. Grigsby PW, Herzog TJ. Current Management of Patients With Invasive Cervical Carcinoma. *Clin Obs Gynecol*. 2001;44(3):531–7.
31. Koivusalo R, Krausz E, Ruotsalainen P, Helenius H, Hietanen S. Chemoradiation of Cervical Cancer Cells: Targeting Human Papillomavirus E6 and p53 Leads to Either Augmented or Attenuated Apoptosis Depending on the Platinum Carrier Ligand.

CANCER Res. 2002;62:7364–71.

32. Tsai C-S, Lai C-H, Wang C-C, Chang JT, Chang T-C, Tseng C-J, et al. The Prognostic Factors for Patients with Early Cervical Cancer Treated by Radical Hysterectomy and Postoperative Radiotherapy. *Gynecol Oncol.* 1999 Dec;75(3):328–33.
33. Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, Thigpen JT, Deppe G, Maiman MA, et al. Concurrent Cisplatin-Based Radiotherapy and Chemotherapy for Locally Advanced Cervical Cancer. *N Engl J Med.* 1999 Apr 15;340(15):1144–53.
34. Hu Q, Sun W, Wang C, Gu Z. Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;98:19–34.
35. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2007 Aug 12;7(8):573–84.
36. Dempke W, Voigt W, Grothey A, Hill BT, Schmoll HJ. Cisplatin resistance and oncogenes a review. *Anticancer Drugs.* 2000 Apr;11(4):225–36.
37. Méhats C, Schmitz T, Oger S, Hervé R, Cabrol D, Leroy M-J. PDE4 as a target in preterm labour. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2007;7 Suppl 1:S12.
38. Conti M, Jin SL. The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1999;63:1–38.
39. Méhats C, Oger S, Leroy M-J. Cyclic nucleotide phosphodiesterase-4 inhibitors: a promising therapeutic approach to premature birth? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;S15-7.
40. Houslay MD. PDE4 cAMP-specific phosphodiesterases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001;69:249–315.
41. Fleming YM, Frame MC, Houslay MD. PDE4-regulated cAMP degradation controls the assembly of integrin-dependent actin adhesion structures and REF52 cell migration. *J Cell Sci. The Company of Biologists Ltd;* 2004 May 1;117(Pt 11):2377–88.
42. Lyle KS, Raaijmakers JH, Bruinsma W, Bos JL, de Rooij J. cAMP-induced Epac-Rap

activation inhibits epithelial cell migration by modulating focal adhesion and leading edge dynamics. *Cell Signal*. 2008 Jun;20(6):1104–16.

43. Netherton SJ, Maurice DH. Vascular Endothelial Cell Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases and Regulated Cell Migration: Implications in Angiogenesis. *Mol Pharmacol*. 2005 Jan 1;67(1):263–72.
44. Dua P, Gude RP. Pentoxifylline impedes migration in B16F10 melanoma by modulating Rho GTPase activity and actin organisation. *Eur J Cancer*. 2008 Jul;44(11):1587–95.
45. Murata K, Sudo T, Kameyama M, Fukuoka H, Muka M, Doki Y, et al. Cyclic AMP specific phosphodiesterase activity and colon cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis*. 2000;18(7):599–604.
46. Burdyga A, Conant A, Haynes L, Zhang J, Jalink K, Sutton R, et al. cAMP inhibits migration, ruffling and paxillin accumulation in focal adhesions of pancreatic ductal adenocarcinoma cells: Effects of PKA and EPAC. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2013 Dec;1833(12):2664–72.
47. Zimmerman NP, Roy I, Hauser AD, Wilson JM, Williams CL, Dwinell MB. Cyclic AMP regulates the migration and invasion potential of human pancreatic cancer cells. *Mol Carcinog*. 2015 Mar;54(3):203–15.
48. Ou Y, Zheng X, Gao Y, Shu M, Leng T, Li Y, et al. Activation of cyclic AMP/PKA pathway inhibits bladder cancer cell invasion by targeting MAP4-dependent microtubule dynamics. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2014 Jan;32(1):47.e21-28.
49. Lee J-W, Lee J, Moon E-Y. HeLa human cervical cancer cell migration is inhibited by treatment with dibutyryl-cAMP. *Anticancer Res*. 2014 Jul;34(7):3447–55.
50. Dong H, Claffey KP, Brocke S, Epstein PM. Inhibition of breast cancer cell migration by activation of cAMP signaling. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Jul 29;152(1):17–28.
51. Mahdian D, Shafiee-Nick R, Mousavi SH. Different effects of adenylyl cyclase activators and phosphodiesterases inhibitors on cervical cancer (HeLa) and breast cancer (MCF-7) cells proliferation. *Toxicol Mech Methods*. 2014 May 19;24(4):307–

- 14.
52. Eskandari N, Mirmosayyeb O, Bordbari G, Bastan R, Yousefi Z, Andalib A. A short review on structure and role of cyclic-3',5'-adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase 4 as a treatment tool. *J Res Pharm Pract.* 2015;4(4):175–81.
53. Méhats C, Tanguy G, Paris B, Robert B, Pernin N, Ferré F, et al. Pregnancy induces a modulation of the cAMP phosphodiesterase 4-conformers ratio in human myometrium: consequences for the utero-relaxant effect of PDE4-selective inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;292(2):817–23.
54. Oger S, Méhats C, Barnette MS, Ferré F, Cabrol D, Leroy M-J. Anti-Inflammatory and Utero-Relaxant Effects in Human Myometrium of New Generation Phosphodiesterase 4 Inhibitors. *Biol Reprod.* 2004;70(2):458–64.
55. De Savi C, Cox RJ, Warner DJ, Cook AR, Dickinson MR, McDonough A, et al. Efficacious inhaled PDE4 inhibitors with low emetic potential and long duration of action for the treatment of COPD. *J Med Chem.* 2014;57(11):4661–76.
56. Yuan W, López Bernal A. Cyclic AMP signalling pathways in the regulation of uterine relaxation. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2007;7(1):10.
57. Schafer PH, Parton A, Capone L, Cedzik D, Brady H, Evans JF, et al. Apremilast is a selective PDE4 inhibitor with regulatory effects on innate immunity. *Cell Signal.* 2014;26(9):2016–29.
58. Schett G, Sloan VS, Stevens RM, Schafer P. Apremilast: a novel PDE4 inhibitor in the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* SAGE Publications; 2010;2(5):271–8.
59. Tsunoda T, Ota T, Fujimoto T, Doi K, Tanaka Y, Yoshida Y, et al. Inhibition of Phosphodiesterase-4 (PDE4) activity triggers luminal apoptosis and AKT dephosphorylation in a 3-D colonic-crypt model. *Mol Cancer.* 2012;11(1):46.
60. Sengupta R, Sun T, Warrington NM, Rubin JB. Treating brain tumors with PDE4 inhibitors. *Trends Pharmacol Sci.* 2011 Jun;32(6):337–44.

61. Goldhoff P, Warrington NM, Limbrick DD, Hope A, Woerner BM, Jackson E, et al. Targeted Inhibition of Cyclic AMP Phosphodiesterase-4 Promotes Brain Tumor Regression. *Clin Cancer Res.* 2008 Dec 1;14(23):7717–25.
62. O'Connor KL, Shaw LM, Mercurio AM. Release of cAMP gating by the alpha6beta4 integrin stimulates lamellae formation and the chemotactic migration of invasive carcinoma cells. *J Cell Biol.* 1998 Dec 14;143(6):1749–60.
63. Clarysse L, Guéguinou M, Potier-Cartereau M, Vandecasteele G, Bougnoux P, Chevalier S, et al. cAMP–PKA inhibition of SK3 channel reduced both Ca<sup>2+</sup> entry and cancer cell migration by regulation of SK3–Orai1 complex. *Pflügers Arch - Eur J Physiol.* 2014 Oct 24;466(10):1921–32.
64. Pullamsetti SS, Banat GA, Schmall A, Szibor M, Pomagruk D, Hänze J, et al. Phosphodiesterase-4 promotes proliferation and angiogenesis of lung cancer by crosstalk with HIF. *Oncogene.* 2013 Feb 28;32(9):1121–34.
65. Teo SK. Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy. *AAPS J. Springer;* 2005;7(1):E14-9.
66. Fernández-Martínez E, Morales-Ríos MS, Pérez-Álvarez V, Muriel P. Effects of thalidomide and 3-phthalimido-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propanamide on bile duct obstruction-induced cirrhosis in the rat. *Drug Dev Res.* 2001;54(4):209–18.
67. Muller GW, Corral LG, Shire MG, Wang H, Moreira A, Kaplan G, et al. Structural modifications of thalidomide produce analogs with enhanced tumor necrosis factor inhibitory activity. *J Med Chem.* 1996;39(17):3238–40.
68. Somers GF. Pharmacological properties of thalidomide (alpha-phthalimido glutarimide), a new sedative hypnotic drug. *Br J Pharmacol Chemother.* 1960;15(1):111–6.
69. Fernández-Martínez E. Thalidomide and its Analogs: A Potential Immunomodulatory Alternative for Treating Liver Diseases and Cirrhosis. In: Michelli ML, editor. *Nova Science Publishers.* New York: Nova Science Publishers; 2011. p. 1–30.
70. Muller GW, Shire MG, Wong LM, Corral LG, Patterson RT, Chen Y, et al.

- Thalidomide analogs and PDE4 inhibition. *Bioorg Med Chem Lett*. 1998;8(19):2669–74.
71. Lenz W. A personal perspective on the thalidomide tragedy. *Teratology*. 1992;46(5):417–8.
  72. Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, et al. Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity. *Science* (80- ). 2010 Mar 12;327(5971):1345–50.
  73. Ito T, Handa H. Cereblon and its downstream substrates as molecular targets of immunomodulatory drugs. *Int J Hematol*. 2016 Sep 26;104(3):293–9.
  74. Ito T, Ando H, Handa H. Teratogenic effects of thalidomide: molecular mechanisms. *Cell Mol Life Sci*. 2011 May 5;68(9):1569–79.
  75. Chang X-B, Stewart AK. What is the functional role of the thalidomide binding protein cereblon? *Int J Biochem Mol Biol*. 2011;2(3):287–94.
  76. Lopez-Girona A, Mendy D, Ito T, Miller K, Gandhi AK, Kang J, et al. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. *Leukemia*. 2012 Nov 3;26(11):2326–35.
  77. Zhu YX, Kortuem KM, Stewart AK. Molecular mechanism of action of immunomodulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2013 Apr;54(4):683–7.
  78. Nishi K, Luo H, Ishikura S, Doi K, Iwaihara Y, Wills L, et al. Apremilast Induces Apoptosis of Human Colorectal Cancer Cells with Mutant KRAS. *Anticancer Res*. 2017;37(7):3833–9.
  79. Sun Q, Scott MJ. Caspase-1 as a multifunctional inflammatory mediator: noncytokine maturation roles. *J Leukoc Biol*. Wiley-Blackwell; 2016 Nov 1;100(5):961–7.
  80. Fernández-Martínez E, Morales-Ríos MS, Pérez-Álvarez V, Muriel P. Immunomodulatory effects of thalidomide analogs on LPS-induced plasma and hepatic cytokines in the rat. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(7):1321–9.

81. Fernández-Martínez E, Ponce-Monter H, Soria-Jasso L, Ortiz M, Arias-Montaña J-A, Barragán-Ramírez G, et al. Inhibition of Uterine Contractility by Thalidomide Analogs via Phosphodiesterase-4 Inhibition and Calcium Entry Blockade. *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2016;21(10):1–18.
82. Muñoz-Pérez VM, Fernández-Martínez E, Ponce-Monter H, Ortiz MI. Relaxant and anti-inflammatory effect of two thalidomide analogs as PDE-4 inhibitors in pregnant rat uterus. *Korean J Physiol Pharmacol*. Korean Physiological Society and Korean Society of Pharmacology; 2017 Jul;21(4):429–37.
83. Jones SE, Palmer TM. Protein kinase A-mediated phosphorylation of RhoA on serine 188 triggers the rapid induction of a neuroendocrine-like phenotype in prostate cancer epithelial cells. *Cell Signal*. Elsevier; 2012;24(8):1504–14.
84. Lartey J, López Bernal A. RHO protein regulation of contraction in the human uterus. *Reproduction*. 2009;138(3):407–24.
85. Aguilar HN, Tracey CN, Zielnik B, Mitchell BF. Rho-kinase mediates diphosphorylation of myosin regulatory light chain in cultured uterine, but not vascular smooth muscle cells. *J Cell Mol Med*. 2012;16(12):2978–89.
86. Aguilar HN, Mitchell BF. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Hum Reprod Update*. 2010;16(6):725–44.
87. Hudson CA, Heesom KJ, Lopez Bernal A. Phasic contractions of isolated human myometrium are associated with Rho-kinase (ROCK)-dependent phosphorylation of myosin phosphatase-targeting subunit (MYPT1). *Mol Hum Reprod*. 2012;18(5):265–79.
88. Somlyo AP, Somlyo A V. Ca<sup>2+</sup> Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. *Physiol Rev*. 2003;83(4):1325–58.
89. Ito M, Nakano T, Erdodi F, Hartshorne DJ. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem*. 2004 Apr;259(1–2):197–209.
90. Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T, Kuroda S, Kaibuchi K, Matsuura Y, et al. Involvement



of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem.* 1992;267(13):8719–22.

91. Kitazawa T, Kobayashi S, Horiuti K, Somlyo A V, Somlyo AP. Receptor-coupled, permeabilized smooth muscle. Role of the phosphatidylinositol cascade, G-proteins, and modulation of the contractile response to Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem.* 1989;264(10):5339–42.
92. Noda M, Yasuda-Fukazawa C, Moriishi K, Kato T, Okuda T, Kurokawa K, et al. Involvement of rho in GTP gamma S-induced enhancement of phosphorylation of 20 kDa myosin light chain in vascular smooth muscle cells: inhibition of phosphatase activity. *FEBS Lett.* 1995;367(3):246–50.
93. Moore F, Da Silva C, Wilde JI, Smarason A, Watson SP, López Bernal A. Up-regulation of p21- and RhoA-activated protein kinases in human pregnant myometrium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;269(2):322–6.
94. Moran CJ, Friel AM, Smith TJ, Cairns M, Morrison JJ. Expression and modulation of Rho kinase in human pregnant myometrium. *Mol Hum Reprod.* 2002;8(2):196–200.
95. Niuro N, Nishimura J, Sakihara C, Nakano H, Kanaide H. Up-regulation of rho A and rho-kinase mRNAs in the rat myometrium during pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;230(2):356–9.
96. Somlyo AP, Somlyo A V. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 2003;83(4):1325–58.
97. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science.* 1996;273(5272):245–8.
98. Julian L, Olson MF. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK). *Small GTPases.* 2014;5(2):e29846 1-12.
99. Patel M, Karginov A V. Phosphorylation-mediated regulation of GEFs for RhoA. *Cell Adh Migr.* 2014;8(1):11–8.

100. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem.* 1996;271(34):20246–9.
101. Patel M, Karginov A V. Phosphorylation-mediated regulation of GEFs for RhoA. *Cell Adh Migr.* 2014;8(1):11–8.
102. Pawlak G, Helfman DM. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11(1):41–7.
103. Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17(5):559–64.
104. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 2003;112(4):453–65.
105. Cheng H-L, Su S-J, Huang L-W, Hsieh B-S, Hu Y-C, Hung T-C, et al. Arecoline induces HA22T/VGH hepatoma cells to undergo anoikis - involvement of STAT3 and RhoA activation. *Mol Cancer. BioMed Central*; 2010 May 28;9:126.
106. Wei L, Surma M, Shi S, Lambert-Cheatham N, Shi J. Novel Insights into the Roles of Rho Kinase in Cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2016 Aug 2;64(4):259–78.
107. Amaya CN, Mitchell DC, Bryan BA. Rho kinase proteins display aberrant upregulation in vascular tumors and contribute to vascular tumor growth. *BMC Cancer. BioMed Central*; 2017 Jul 14;17(1):485.
108. Miyazaki J, Ito K, Fujita T, Matsuzaki Y, Asano T, Hayakawa M, et al. Progression of Human Renal Cell Carcinoma via Inhibition of RhoA-ROCK Axis by PARG1. *Transl Oncol. Neoplasia Press*; 2017 Apr;10(2):142–52.
109. Lang P, Gesbert F, Delespine-Carmagnat M, Stancou R, Pouchelet M, Bertoglio J. Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J.* 1996 Feb 1;15(3):510–9.
110. Horiuchi A, Imai T, Wang C, Ohira S, Feng Y, Nikaido T, et al. Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma.

- Lab Invest. 2003 Jun;83(6):861–70.
111. Chen S, Wang J, Gou W-F, Xiu Y-L, Zheng H-C, Zong Z-H, et al. The involvement of RhoA and Wnt-5a in the tumorigenesis and progression of ovarian epithelial carcinoma. *Int J Mol Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*; 2013 Dec 12;14(12):24187–99.
  112. Liu X, Chen D, Liu G. Overexpression of RhoA promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014 Nov 2;78(11):1895–901.
  113. Patel M, Kawano T, Suzuki N, Hamakubo T, Karginov A V., Kozasa T. G 13/PDZ-RhoGEF/RhoA Signaling Is Essential for Gastrin-Releasing Peptide Receptor-Mediated Colon Cancer Cell Migration. *Mol Pharmacol.* 2014 Jul 24;86(3):252–62.
  114. Microfilament regulatory protein MENA increases activity of RhoA and promotes metastasis of hepatocellular carcinoma. *Exp Cell Res. Academic Press*; 2014 Sep 10;327(1):113–22.
  115. Yuan B, Cui J, Wang W, Deng K. G $\alpha$ 12/13 signaling promotes cervical cancer invasion through the RhoA/ROCK-JNK signaling axis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;473(4):1240–6.
  116. Marinissen MJ, Chiariello M, Tanos T, Bernard O, Narumiya S, Gutkind JS. The small GTP-binding protein RhoA regulates c-jun by a ROCK-JNK signaling axis. *Mol Cell.* 2004;14(1):29–41.
  117. Arai K, Maruyama Y, Nishida M, Tanabe S, Takagahara S, Kozasa T, et al. Differential requirement of G  $\alpha$ 12, G  $\alpha$ 13, G  $\alpha$ q, and G  $\beta$   $\gamma$  for endothelin-1-induced c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase activation. *Mol Pharmacol.* 2003;63(3):478–88.
  118. He M, Cheng Y, Li W, Liu Q, Liu J, Huang J, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes cervical cancer metastasis via up-regulation and activation of RhoA/ROCK-2/moesin cascade. *BMC Cancer.* 2010;10(1):170.
  119. Zou W, Ma X, Hua W, Chen B, Huang Y, Wang D, et al. BRIP1 inhibits the

- tumorigenic properties of cervical cancer by regulating RhoA GTPase activity. *Oncol Lett.* 2016;11(1):551–8.
120. Hamadmad SN, Hohl RJ. Erythropoietin Stimulates Cancer Cell Migration and Activates RhoA Protein through a Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase-Dependent Mechanism. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;324(3):1227–33.
  121. Liu X, Chen D, Liu G. Overexpression of RhoA promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014;78(11):1895–901.
  122. Friedl F, Kimura I, Osato T, Ito Y. Studies on a new human cell line (SiHa) derived from carcinoma of uterus. I. Its establishment and morphology. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1970 Nov;135(2):543–5.
  123. Putnam KP, Bombick DW, Doolittle DJ. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol In Vitro.* 2002 Oct;16(5):599–607.
  124. Bernas T, Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry.* 2002 Apr 1;47(4):236–42.
  125. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1–2):55–63.
  126. Bellamy WT. Prediction of response to drug therapy of cancer. A review of in vitro assays. *Drugs.* 1992 Nov;44(5):690–708.
  127. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences;* 1979 Sep;76(9):4350–4.
  128. Kurien B, Scofield R. Western blotting. *Methods.* 2006 Apr;38(4):283–93.

129. Jensen EC. The Basics of Western Blotting. *Anat Rec Adv Integr Anat Evol Biol*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2012 Mar 1;295(3):369–71.
130. Houslay MD, Milligan G. Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci*. 1997 Jun;22(6):217–24.
131. Della Fazia MA, Servillo G, Sassone-Corsi P. Cyclic AMP signalling and cellular proliferation: regulation of CREB and CREM. *FEBS Lett*. 1997 Jun 23;410(1):22–4.
132. Shafer SH, Phelps SH, Williams CL. Reduced DNA synthesis and cell viability in small cell lung carcinoma by treatment with cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors. *Biochem Pharmacol*. 1998 Nov;56(9):1229–36.
133. Schmidt AL, de Farias CB, Abujamra AL, Kapczynski F, Schwartsmann G, Brunetto AL, et al. BDNF and PDE4, but not the GRPR, Regulate Viability of Human Medulloblastoma Cells. *J Mol Neurosci*. 2010 Mar 30;40(3):303–10.
134. Conti M, Richter W, Mehats C, Livera G, Park J-Y, Jin C. Cyclic AMP-specific PDE4 Phosphodiesterases as Critical Components of Cyclic AMP Signaling. *J Biol Chem*. 2003 Feb 21;278(8):5493–6.
135. McEwan DG, Brunton VG, Baillie GS, Leslie NR, Houslay MD, Frame MC. Chemoresistant KM12C Colon Cancer Cells Are Addicted to Low Cyclic AMP Levels in a Phosphodiesterase 4-Regulated Compartment via Effects on Phosphoinositide 3-Kinase. *Cancer Res*. 2007 Jun 1;67(11):5248–57.
136. McEwan DG, Brunton VG, Baillie GS, Leslie NR, Houslay MD, Frame MC. Chemoresistant KM12C colon cancer cells are addicted to low cyclic AMP levels in a phosphodiesterase 4-regulated compartment via effects on phosphoinositide 3-kinase. *Cancer Res*. 2007 Jun 1;67(11):5248–57.
137. Schafer PH, Parton A, Capone L, Cedzik D, Brady H, Evans JF, et al. Apremilast is a selective PDE4 inhibitor with regulatory effects on innate immunity. *Cell Signal*. 2014 Sep;26(9):2016–29.
138. Gandalovičová A, Rosel D, Fernandes M, Veselý P, Heneberg P, Čermák V, et al. Migrastatics—Anti-metastatic and Anti-invasion Drugs: Promises and Challenges.

- Trends in Cancer. Elsevier; 2017;3(6):391.
139. Lazebnik Y. What are the hallmarks of cancer? *Nat Rev Cancer*. 2010;10(4):232–3.
  140. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
  141. Fife CM, McCarroll JA, Kavallaris M. Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. *Br J Pharmacol*. 2014 Dec;171(24):5507–23.
  142. Mitchison TJ, Cramer LP. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*. 1996 Feb 9;84(3):371–9.
  143. Oishi A, Makita N, Sato J, Iiri T. Regulation of RhoA signaling by the cAMP-dependent phosphorylation of RhoGDI $\alpha$ . *J Biol Chem*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2012 Nov 9;287(46):38705–15.
  144. Takeda S, Okajima S, Miyoshi H, Yoshida K, Okamoto Y, Okada T, et al. Cannabidiolic acid, a major cannabinoid in fiber-type cannabis, is an inhibitor of MDA-MB-231 breast cancer cell migration. *Toxicol Lett*. 2012 Nov 15;214(3):314–9.
  145. Zajchowski DA, Bartholdi MF, Gong Y, Webster L, Liu HL, Munishkin A, et al. Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. *Cancer Res*. 2001 Jul 1;61(13):5168–78.
  146. Tkachenko E, Sabouri-Ghomi M, Pertz O, Kim C, Gutierrez E, Machacek M, et al. Protein kinase A governs a RhoA–RhoGDI protrusion–retraction pacemaker in migrating cells. *Nat Cell Biol*. 2011 Jun 15;13(6):660–7.
  147. Wei L, Surma M, Shi S, Lambert-Cheatham N, Shi J. Novel Insights into the Roles of Rho Kinase in Cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016 Aug;64(4):259–78.
  148. Vega FM, Fruhwirth G, Ng T, Ridley AJ. RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets. *J Cell Biol*. The Rockefeller University Press; 2011 May 16;193(4):655–65.
  149. Cheng S, Castillo V, Welty M, Eliaz I, Sliva D. Honokiol inhibits migration of renal

cell carcinoma through activation of RhoA/ROCK/MLC signaling pathway. *Int J Oncol.* 2016 Oct 1;49(4):1525–30.

150. Chen X, Corbin JM, Tipton GJ, Yang L V., Asch AS, Ruiz-Echevarría MJ. The TMEFF2 tumor suppressor modulates integrin expression, RhoA activation and migration of prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2014 Jun;1843(6):1216–24.
151. Pu Y-S, Wang C-W, Liu G-Y, Kuo Y-Z, Huang C-Y, Kang W-Y, et al. Down-regulated expression of RhoA in human conventional renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2008;28(4B):2039–43.