



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

**ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DEPENDIENTES
DE LA VARIACION EN EL NÚMERO DE COPIAS O METILACIÓN
EN GENES RESIDENTES DE LA REGIÓN 7p21.1,
EN CÁNCER PULMONAR.**

Tesis para obtener el título de:

B I Ó L O G O

P r e s e n t a:

RAFAEL SERRANO RAMÍREZ

Tutor: Dr. Federico Ávila Moreno.
Asesor Interno: Dra. Ma. de Lourdes Mora García.

UNAM, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Unidad de Biomedicina,(UBIMED),
Laboratorio 12.

México, D.F. 15 de Noviembre del 2011.



Tesis Realizada con el Financiamiento de los Proyectos B17-07 y B09-08 (INER); Proyecto CONACYT-Ciencia Básica 53643; Proyecto UNAM, PAPIIT-IACOD: IA201611.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

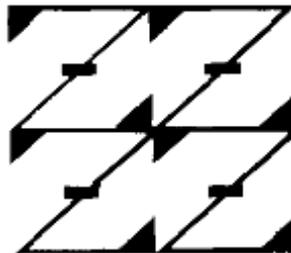
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



SINODALES

- PRESIDENTE:** DR. BENNY WEISS STEIDER.
- VOCAL:** DR. FEDERICO ÁVILA MORENO.
- SECRETARIO:** DRA. MARIA DE LOURDES MORA GARCIA.
- SUPLENTE:** DRA. LUCILA ALVAREZ BARRERA.
- SUPLENTE:** DR. JUAN JOSE RODRIGEZ MERCADO.







El trabajo de investigación de esta tesis se realizó en el Laboratorio del Departamento de Investigación en Bioquímica de la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y UNAM, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Unidad de Biomedicina (UBIMED), Laboratorio 12.

Mis Estudios para la Realización de Tesis fue Posible Gracias al Apoyo Otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) A Través del Registro como Becario (#13198) del Proyecto de Ciencia Básica 53643. Así Como el Financiamiento Otorgado por Proyecto UNAM, PAPIIT-IACOD: IA201611.





Agradecimientos

Al que permitió que existiera todo lo que hoy tenemos vida, amor, esperanza, honestidad, familia y sobre todo salud.

Tu eres mi fortaleza en ti está la alegría y el valor, dame la sensibilidad de ganarme la vida con mi esfuerzo y dedicación.

Gracias

“mi única alegría reside en ti señor”

Salomón.



Agradecimientos

A mis padres: María Elena Carmen y Rafael para los que solo tengo amor, agradecimiento, admiración y respeto; por todas y cada una de sus palabras de aliento, por su confianza, su esfuerzo durante todos estos años y dedicación para conmigo, siempre procurando lo mejor para mí ¡! LOS QUIERO MUCHO ¡!.

Gracias

**... tú me conoces mucho más de lo que yo me conozco
¡! Gracias por quererme como soy y por aceptarme con limitaciones ¡!**



Agradecimientos

A toda mi familia por permitirme entender y comprender lo afortunado que soy.

En especial:

*A mamá **Toñita** y papá **Rafa** que son pilar fundamental y parte importante en mi desarrollo, por enseñarme a valorar la vida con optimismo. **Gracias abuelitos!!!***

*A la Familia; **Ramírez Montiel** que son parte importante en mi vida, por la confianza para con migo; Padrino, Madrina, Izrra, Poncho, Lupita, Maybe gracias por todo...*

Gracias

“Es más fácil encontrar con quien compartir las penas que las alegrías”

El talmud.



Agradecimientos

A mis amigos de siempre:

Abigail por ese humor y desapego a la vida es más sencilla y hermosa.

Areli por esa sencillez que siempre me brindaste tú y tu familia.

Claudia por tu paciencia, comprensión y por la amistad que me has brindado, para siempre.

Eduardo por esa sencillez, humildad para apreciar el conocimiento nuevo y por el vigor para enfrentar a la vida.

Elia y Alex (chocorroles) se han convertido parte esencial en este ambiente, por su confianza, complicidad y recibir su apoyo e inigualable comprensión en momentos difíciles.

Erick, por tu sinceridad, confianza, y aprender que nunca es tarde para retomar lo nunca olvidado.

Karla y Lulu parte esencial de un círculo de amistad y confianza.

Mariela por esa chispa, sencillez y tenacidad gracias en momentos de difíciles decisiones para conmigo.

Miriam y Edgar por ese crecimiento de amistad sincera y seguimos haciéndolo- es para toda la vida y apoyarme en momentos de mucha alegría tkm “” Raquelito “”.

Pilar y Sergio por su constancia -apoyo en momentos de mucha lucha y enseñarme la fuerza y valor de la vida

Sharim y Rosario por esa sinceridad incondicional por la afinidad y compañerismo.

Y a todos aquellos que han sido parte importante en mi vida y estuvieron a mi lado.

Gracias

“tú eres mi amigo, haz que no conozca la calumnia y que hoy trabaje con honradez.”



Agradecimientos

Todo mi reconocimiento y agradecimiento al Dr. Federico Ávila Moreno quien ha permitido formar parte de su grupo de trabajo y me ha otorgado, adicionalmente el enorme privilegio de crecer académica y profesionalmente.

Gracias por todo

A mis compañeros de laboratorio

Rosario, Karina, Lulú, Leonel, Diego, Cesar, Carlos.

Mi más sincero agradecimiento por su enseñanza y aprender más del significado amistad, quien con su enorme empeño y trabajo enriqueció substancialmente este trabajo.

Gracias

***“Si he conseguido ver más lejos, es porque me he
aupado en hombros de gigantes”***

Issac Newton.



Agradecimientos

A cada uno de los Sinodales del examen profesional, quienes enriquecieron esta tesis con sus comentarios, consejos y observaciones.

PRESIDENTE: DR. BENNY WEISS STEIDER.

VOCAL: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO.

SECRETARIO: DRA. MARIA DE LOURDES MORA GARCIA.

SUPLENTE: DRA. LUCILA ALVAREZ BARRERA.

SUPLENTE: DR. JUAN JOSE RODRIGEZ MERCADO.

Gracias

“No existen suficientes experimentos que puedan demostrar que tengo razón, pero basta uno sólo para demostrar que estoy equivocado”

Albert Einstein.



Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México

*Por darnos la posibilidad de crecer y desarrollarnos profesional-
académicamente, en un ámbito personal y social.*

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

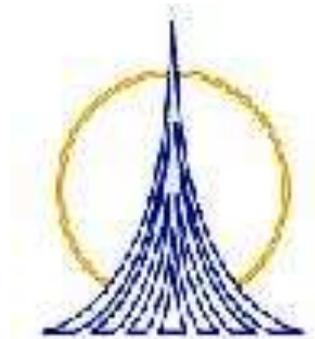
*Por ser mi segunda casa y darme las bases esenciales para llegar a ser un
gran Biólogo.*

*A los Formadores, Maestros, y Amigos: Dra. Ma. de Lourdes Mora, Dr.
Gerardo Cruz, Q.F.B. Guadalupe Basilio, Biol. Maricela Arteaga, Biol.
Ma. de los Ángeles Galván, Biol. Manuel Rico, Dr. Jorge Flavio, Biol.
Leticia López, Quim. Miky Otanny Kimura.*

Al personal de la Biblioteca, parte esencial en nuestra formación.



Gracias



“La ignorancia afirma o niega rotundamente; la Ciencia duda”

Francois Marie Arouet Voltaire.



En memoria de:

*A ti angelito lleno de luz que siempre velas y cuidas por nuestros
padres*

María Elena Rodríguez J.

Socorro López I.

Alfonso Ramírez E.

Guadalupe Ramírez Z.

José Luis Serrano L.

A ti mi chiquitín.



ÍNDICE

1 Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. Cáncer.....	3
2.2 Cáncer pulmonar.....	3
2.3 Clasificación histológica del cáncer pulmonar.....	6
2.3.1 <i>Carcinomas pulmonares de células no-pequeñas (NSCLC)</i>	6
2.3.2 <i>Carcinomas de células escamosas o epidermoides (SCC)</i>	6
2.3.3 <i>Carcinomas tipo adenocarcinoma (AD)</i>	7
2.3.4 <i>Carcinomas de células grandes (LCC)</i>	7
2.3.5 <i>Carcinomas pulmonares de células pequeñas (SCLC)</i>	7
2.4 Estadificación clínica del cáncer pulmonar.....	8
2.4.1 <i>Tumor primario, región y nódulo / linfoide</i>	9
2.4.2 <i>Metástasis</i>	10
2.5 Factores de riesgo en cáncer pulmonar.....	12
2.5.1 <i>Ambientales</i>	12
2.5.2 <i>Hormonales</i>	12
2.5.3 <i>Virales</i>	13
2.5.4 <i>Genéticos</i>	14
2.6 Alteraciones epigenéticas (Metilación del DNA) en cáncer pulmonar.....	15
2.7 Alteraciones en la regulación de la expresión génica en cáncer.....	18
2.8 Alteraciones en los perfiles de expresión del RNAm en cáncer pulmonar.....	19
3. Antecedentes directos	21
3.1 Aberraciones cromosómicas y variación en el número de copias (CNV) en cáncer pulmonar.....	21
3.2 CNV de alta frecuencia en el cromosoma 7, en cáncer pulmonar.....	23
3.3 Aberraciones epigenéticas en el cromosoma 7, en cáncer pulmonar.....	26



4 Planteamiento del problema	30
5. Justificación	31
6 Hipótesis	31
7 Objetivo general	32
8. Objetivos particulares	32
9. Extrategia experimental	33
10. Materiales y métodos	34
10.1 Medio de cultivo RPMI 1640	34
10.2 Medio de congelación	34
10.3 Preparación de PBS 10X	34
10.4 Obtención y preparación del tejido pulmonar	34
10.5 Procesamiento de tejido pulmonar	35
10.6 Cultivo celular	35
10.7 Viabilidad celular	35
10.8 Extracción de DNA, RNA y Proteína	36
10.8.1 <i>Extracción a partir de tejido fresco en congelación</i>	36
10.8.2 <i>Extracción de RNAm</i>	37
10.8.3 <i>Extracción de DNA</i>	38
10.8.4 <i>Extracción de Proteína</i>	38
10.9 Cuantificación e Integridad del DNA y RNA	39
10.10 Diseño de oligonucleótidos (<i>primers</i>)	39
10.10.1 <i>Diseño de primers</i>	39
10.10.2 <i>Condiciones de amplificación por PCR en tiempo final y PCR en tiempo real</i>	42
11. Desarrollo de curvas de dilución estándar y validación de productos específicos mediante curvas de disociación, por PCR en tiempo real	45



11.1 Ensayos <i>in vitro</i> de inhibición de la metilación del DNA y remodelación de la cromatina	46
12. Análisis estadístico	48
13. Resultados	50
13.1 Identificación de CNV de alta frecuencia en el cromosoma 7	50
13.2 Ensayos de validación de CNV en la región citogenética 7p21.1 mediante PCR en tiempo real.	51
13.3 Análisis de Expresión del RNAm de genes localizados en la región 7p21.1.....	62
13.4 Ensayos <i>in vitro</i> de inhibición de la metilación de secuencias promotoras y desacetilasas de histonas sobre líneas celulares de cáncer pulmonar	69
14. Discusión	75
15. Conclusiones	81
16. Perspectivas	83
17. Referencia bibliográfica	84
18. Anexos	92
18.1 Publicación científica derivada del trabajo de tesis	100



ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Metilación del DNA y el silenciador visto en la embriogénesis.....	17
FIGURA 2. Condiciones de amplificación de ciclaje para el análisis cuantitativo de PCR en tiempo real	52
FIGURA 3. Condiciones de amplificación de ciclaje para el análisis cuantitativo de PCR en tiempo real en muestras de progresión neoplásica.....	52
FIGURA 4. Construcción de curva estándar y curva de disociación en la disolución de DNA.....	53
FIGURA 5. Análisis cuantitativo en PCR en tiempo real de CNV para el gen MEOX2.....	55
FIGURA 6. Análisis cuantitativo en PCR en tiempo real de CNV para el gen HDAC	56
FIGURA 7. Análisis cuantitativo en PCR en tiempo real de CNV para el gen AHR.....	57
FIGURA 8. Análisis cuantitativo en PCR en tiempo real de CNV para el gen TWIST1	58
FIGURA 9. Análisis cuantitativo en PCR en tiempo real de CNV para el gen EVX1	59
FIGURA 10. Análisis cuantitativo en PCR en tiempo real de CNV para el gen EVX2	60
FIGURA 11. Amplificación de progresión neoplásica para el análisis de Expresión en genes analizados.....	62
FIGURA 12. Análisis de nivel de expresión en PCR en tiempo real para el gen MEOX2.....	63
FIGURA 13. Análisis de nivel de expresión en PCR en tiempo real para el gen HDAC9.....	64



FIGURA 14. Análisis de nivel de expresión en PCR en tiempo real para el gen AHR.....	65
FIGURA 15. Análisis de nivel de expresión en PCR en tiempo real para el gen TWIST1	66
FIGURA 16. Análisis de nivel de expresión en PCR en tiempo real para el gen EVX1	67
FIGURA 17. Análisis de nivel de metilación en líneas celulares (INER-37 e INER-51) en PCR en tiempo real para el gen MEOX2.....	69
FIGURA 18. Análisis de nivel de metilación en líneas celulares (INER-37 e INER-51) en PCR en tiempo real para el gen HDAC	70
FIGURA 19. Análisis de nivel de metilación en líneas celulares (INER-37 e INER-51) en PCR en tiempo real para el gen AHR.....	71
FIGURA 20. Análisis de nivel de metilación en líneas celulares (INER-37 e INER-51) en PCR en tiempo real para el gen TWIST	72
FIGURA 21. Análisis de nivel de metilación en líneas celulares (INER-37 e INER-51) en PCR en tiempo real para el gen EVX1	73

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Grupo de genes analizados para CNV en PCR tiempo real	41
TABLA 2. Grupo de genes analizados para expresión en PCR tiempo real	41
TABLA 3. Condiciones utilizadas para el flouorforo Syber Green de marca Fermentas para el análisis de PCR tiempo real.	43
TABLA 4. Condiciones utilizadas para el floroforo Syber green de marca Applied Biosystems para el análisis de PCR tiempo real.	43



TABLA 5. Condiciones de ciclaje en PCR en tiempo real para el análisis de CNV y Metilación.....	44
TABLA 6, Condiciones de ciclaje en PCR en tiempo real para el análisis de Expresión	44
TABLA 7. Grupo de genes localizados en la región de alta frecuencia 7p21.1, estudiada en el análisis de PCR en tiempo real, para muestras de progresión neoplásica.	50

ANEXOS

TABLA A . Clasificación TNM para neoplasia pulmonares; comparación entre la sexta y séptima edición	92
TABLA B . Lista de oligonucleótidos diseñados para el análisis progresión neoplásica ubicados en el cromosoma numero 7	94
FIGURA C, D . Análisis de nivel de metilación en líneas celulares (INER-37 e INER-51) en PCR en tiempo real para el gen MEOX2	95
FIGURA E, F . Análisis de nivel de metilación en líneas celulares (INER-37 e INER-51) en PCR en tiempo real para el gen HDAC	96
FIGURA G, H . Análisis de nivel de metilación en líneas celulares (INER-37 e INER-51) en PCR en tiempo real para el gen AHR	97
FIGURA I, J . Análisis de nivel de metilación en líneas celulares (INER-37 e INER-51) en PCR en tiempo real para el gen TWIST	98
FIGURA K, L . Análisis de nivel de metilación en líneas celulares (INER-37 e INER-51) en PCR en tiempo real para el gen EVX1	99



Abreviaturas.

- **AD:** Adenocarcionomas.
- **DNA:** Ácido desoxirribonucleico.
- **AV :** Ácido Valproico
- **CaCu:** Cáncer Cervicouterino.
- **CGH:** Hibridación Genómica Comparativa.
- **CH₃:** Grupo metilo.
- **CNV :** Variación del Número de Copias
- **DNMT:** Metil Transferasa.
- **ER α,β :** Estrógenos α,β .
- **GSTMI:** Glutación S-Transferasa.
- **HIDR:** Hidralazina.
- **HPV:** Virus del Papiloma Humano.
- **JSRV:** retrovirus de oveja.
- **LCC:** Carcinomas de células grandes.
- **NSCLC:** Carcinomas pulmonares de células no-pequeñas
- **PBS:** Tampón Fosfato Salino.
- **RNA_m:** Ácido ribonucleico mensajero.
- **SCC:** Carcinomas epidermoides.
- **SCLC:** Carcinomas pulmonares de células pequeñas
- **SNPs:** Polimorfismo genético de una sola base.
- **TNM:** Sistema de estadificación en tumores.
- **PCR-RT:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.



1. Resumen

El cuerpo humano está compuesto de muchos tipos de células, normalmente, las células se dividen y mueren para dar mantenimiento y homeostasis a los tejidos. Dicho proceso bajo ciertas condiciones de exposición ambiental o transformación neoplásica se descontrola causando división celular en límites anormales, invasión de tejido circundante y muy frecuentemente metástasis. Bajo este contexto nuevas células continúan en expansión clonal cuando el cuerpo no las necesita, y las células maduras no mueren cuando su ciclo de vida debería terminar, es bajo tal crecimiento excesivo como se transforma en una masa de tejido que constituye al tumor.

Los carcinomas pulmonares se dividen en 2 grupos: Carcinomas pulmonares de células pequeñas y carcinomas pulmonares de células no-pequeñas, siendo este último el más frecuente con 80% de los casos. En cuyo caso los pacientes deben ser estadificados conforme a la clasificación TNM, donde se distinguen 2 grupos, aquellos beneficiados por cirugía y aquellos pacientes con tumores considerados irreseccables.

Adicional a ello, distintos factores de riesgo se encuentran asociados al desarrollo de cáncer pulmonar entre ellos: el consumo de tabaco, exposición a asbesto, radiación, hidrocarburos poli-cíclicos, PM2.5, PM10, etc. Los cuales probablemente afectan mecanismos de regulación genética y epigenética. Con relación al inicio del tratamiento químico y/o radioterapéutico,

A la fecha resultados recientes de investigación básica y clínica, mediante el uso de herramientas de análisis masivo del genoma, han sugerido la identificación de probables marcadores genéticos y epigenéticos asociados con su capacidad de respuesta al tratamiento terapéutico, sobre-vida, recaídas, etcétera. Los cuales permanecen en espera de ser validados y aceptados como normadores de tratamiento en carcinoma broncogénico.



A la fecha no existen estudios que describan en su conjunto las alteraciones principales de regulación estructural del DNA y epigenética en el brazo corto del cromosoma 7. Para ello, a partir del análisis masivo del genoma en muestras de pacientes con lesiones precursoras y neoplásicas pulmonares se determinaron alteraciones en la expresión génica dependientes de la CNV o epigenética en genes residentes de la región 7p21.1 en muestras de pacientes que representan la progresión neoplásica pulmonar mediante PCR en tiempo real. Así mismo, mediante ensayos de cultivo *in vitro* se realizaron ensayos para demostrar si dichas alteraciones epigenéticas son reversibles a través del uso de inhibidores de metilación del DNA y/o inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACs), como aquellas principales enzimas capaces de remodelar la estructura de la cromatina, a través del estudio de líneas celulares de cáncer pulmonar establecidas a partir de pacientes con diagnóstico del tipo histológico AD, bajo atención médica en el INER.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que mediante el estudio de análisis masivo del genoma tanto en lesiones precursoras como en neoplasias pulmonares, que existe aumento en la CNV, para los genes MEOX2, HDAC9, AHR, TWIST1, así como EVX1, lo cual correlaciona con aumento en la expresión principalmente en muestras de lesiones precursoras para dichos genes tales como MEOX2, HDAC9, AHR, TWIST1 y EVX1. Adicionalmente mediante el uso de líneas celulares *in Vitro* bajo esquemas de tratamiento con inhibidores de metilación del DNA e inhibidores de desacetilasas de histonas, se pudo concluir que existe aumento en la expresión del RNAm conforme aumenta la concentración de ambos fármacos (Ácido Valproico e Hidralazina), lo cual sugiere que su promotor se encuentra hipermetilado así mismo existe inhibición de la cromatina mediante la actividad de desacetilasas de histonas sobre las líneas celulares de pacientes mexicanos sobre los genes analizados y propuestos para este trabajo como MEOX2, HDAC9, AHR, TWIST1, y EVX1 .



2. Introducción

2.1 Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades en las cuales el organismo produce exceso de células malignas, conocidas como cancerígenas o cancerosas, con crecimiento y división más allá de los límites normales, invasión del tejido circundante, a veces, metástasis.

La palabra cáncer deriva del latín *cancrī*, y se deriva del griego *karkinos*, significa “cangrejo” (carcinoma), se dice que las formas corrientes de cáncer avanzado adopta una forma abigarrada, con ramificaciones, que se adhiere a todo lo que agarra, con la obstinación y de forma similar a la de un cangrejo marino, del cual se deriva su nombre. Se considera a veces sinónimo de los términos “neoplasia” y “tumor”, sin embargo, el cáncer siempre es una neoplasia o tumor maligno (Ruiz A. y Col 2004). La palabra cáncer sinónimo de carcinoma, se aplica a los neoplasias malignas que se originan en estirpes celulares de origen epitelial o glandular y no a las que son generadas por células de estirpe mesenquimal (sarcomas).

2.2 Cáncer pulmonar

En el cuerpo humano normalmente las células crecen, se dividen y mueren en aras del mantenimiento de la homeostasis celular y tisular (Bosetti C. y Col 2005). Dichos procesos bajo circunstancias fisiológicas trastornadas, se descontrolan dando origen a la formación de una masa de tejido tumoral que constituye una neoplasia maligna o cáncer.

El cáncer es un grupo de enfermedades que manifiestan como característica principal un crecimiento y proliferación celular descontrolada, lo cual ocurre a través de un proceso de transformación neoplásico hacia el establecimiento de un tumor maligno (Ruiz A. y Col 2004). Dichas propiedades de división celular descontrolada, así como la metástasis, permiten diferenciar



a tumores malignos (carcinomas) de los tumores benignos simplemente llamados tumores, los cuales no invaden o producen metástasis (Ruiz A. y Col 2004).

Las células tumorales comienzan a crecer hasta formar una lesión *in situ*, pueden pasar varios años hasta romper con los límites de la membrana basal, desarrollando un carcinoma infiltrante, así como invadir las estructuras vecinas entre otros tejidos del sistema circulatorio como aorta, corazón, tejido linfático, en el caso del tórax esófago, pleura, pared torácica, diafragma y mediastino.

Respecto de tumores generados en tórax y específicamente en pulmón, cuando el tumor progresa e invade la corriente linfática de forma inicial es posible la afectación de la primera estación ganglionar situada en los bronquios segmentarios y lobares, para posteriormente progresar hacia los ganglios mediastínicos y supraclaviculares. Adicionalmente, la metástasis de neoplásicas pulmonares por diseminación vía hematógena se produce desde estadios muy tempranos, por lo que, al momento del diagnóstico pueden estar ya localizados fuera del pulmón (Parkin D. y Col 2005).

A pesar de los avances en el estudio de la oncología pulmonar, el cáncer pulmonar en ambos géneros en su conjunto permanece como la primera causa de muerte por neoplasias malignas a nivel mundial, incluyendo México. Dichas neoplásicas han mostrado mayor frecuencia en el varón y está aumentado proporcionalmente en la mujer debido al aumento de mujeres fumadoras, con mayor incidencia de la quinta a la séptima década de vida (Parkin D. y Col 2005).

Diversos cambios genéticos han sido asociados al desarrollo del cáncer pulmonar como resultado de la exposición a distintos factores de riesgo ambientales como el consumo del tabaco. Evidentemente, el mayor logro conseguido hasta el momento ha sido confirmar que el consumo del tabaco constituye el principal factor responsable de la aparición del cáncer broncogénico. De hecho, más del 90% de los tumores pulmonares son



asociados al tabaquismo, representando el cáncer pulmonar aprox. 31% del total de casos por neoplasias malignas, mientras que le siguen 15% de los casos de cáncer de próstata en países en vías de desarrollo. No obstante el más frecuente en el género femenino lo representan el cáncer cérvico-uterino y cáncer de mama; mientras que en menor incidencia el cáncer de estómago, esófago, faringe, hepático, cutáneo o el de páncreas en ambos géneros (Sun J. y Col 2007).

El cáncer pulmonar, se ha incrementado en países en vías de desarrollo de un 31% a 50% en los últimos 20 años, tanto en personas fumadoras y no-fumadoras. Nuevos estudios indican que su aparición es independiente del tiempo transcurrido de un individuo fumador a otro que nunca ha fumado (Parkin D. y col 2005). No obstante la proporción de personas no-fumadoras con neoplasias pulmonares en un estudio al sur de Asia de las cuales 15% son del género femenino y el resto del género masculino (Sun J. y Col 2007).

No obstante lo anterior, individuos ex-fumadores, muestran un riesgo muy alto a desarrollar cáncer de pulmón (Rodenhiser D. y Col 2006). Todo ello, implica que un gran porcentaje de la población en riesgo desarrollará muy probablemente este tipo de neoplasia durante los próximos años, por lo tanto, ha sido necesario aumentar los esfuerzos para comprender los mecanismos biológicos que contribuyen a su aparición, progresión y persistencia en el paciente.



2.3 Clasificación histológica del cáncer pulmonar.

2.3.1 Carcinomas pulmonares de células no-pequeñas

El tratamiento de los tumores pulmonares varía de forma sustancial de acuerdo con la histología neoplásica.

Los tumores pulmonares se dividen en carcinomas microcíticos y carcinomas no-microcíticos. El término carcinoma no microcíticos o también conocidas como carcinomas pulmonares de células no-pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés) tiene un origen neuroendocrino (Ruiz A. y Col 2004) se refiere a un conjunto de tipos histopatológicos principales tales como; Carcinomas epidermoides o de células escamosas, Adenocarcinomas y Carcinomas de células grandes que en su conjunto muestran una incidencia de 85-90% de los casos clínicamente diagnosticados (Bosetti C. y Col 2005).

En términos generales todos los NSCLC poseen pobre índice de sobre vida a 5 años en promedio menor al 14%, el cual contrasta con neoplasias no-pulmonares como carcinomas de colón, recto, mama, renal, próstata, piel, entre otros; cuyo índice de sobre vida es en promedio superior al 60% (Bosetti C. y Col 2005).

2.3.2 Carcinomas de células escamosas o epidermoides

Los carcinomas de células escamosas (SCC), se derivan del epitelio bronquial o bronquios proximales, por tanto son de localización central. Al crecer puede obstruir el bronquio, produciendo áreas de neumonitis obstructiva, es fácil de diagnosticar por citologías de esputo y lavados bronquio-alveolares debido a su localización, es el tipo histológico más relacionado con el hábito tabáquico (Jemal A. y Col 2002).



2.3.3 Carcinomas tipo adenocarcinomas

Es el tipo histológico más frecuente, se deriva del epitelio que integra a los alveolos y glándulas mucosas bronquiales, es de localización periférica, afectando incluso a la pleura o pared torácica, predomina en mujeres y en pacientes frecuentemente no-fumadores, aunque también se relaciona con el consumo de tabaco. Este tipo de tumores adenocarcinomas (AD), se observan cuando existen cicatrices o patologías benignas pulmonares previas. Una variedad del adenocarcinoma es el carcinoma bronquiolo-alveolar, que supone 10-25% de los casos del tipo AD, se presenta sobre todo como una lesión solitaria, pudiendo en otras ocasiones afectar de forma difusa y bilateral, siendo entonces de muy mal pronóstico (Jemal A. y Col 2002).

2.3.4 Carcinomas de células grandes

Este tipo de carcinomas de células grandes (LCC), es la variedad menos frecuente y de pobre pronóstico, se presenta habitualmente como una masa de tejido de localización periférica, con afectación del hilio pulmonar con áreas asociadas de neumonitis. Tiene dos variedades: el carcinoma de células claras y el carcinoma de células gigantes (Jemal A. y Col 2002).

2.3.5 Carcinomas pulmonares de células pequeñas

Es un tumor muy agresivo, de origen neuroendocrino el cual tiende a diseminarse con facilidad. Existen varios subtipos: carcinoma de células pequeñas (SCLC), carcinoma mixto de células pequeñas y grandes en presencia de componentes escamosos, glandulares o ambos, los tumores típicos están diferenciados por presentar mitosis muy escasas o ausentes, y sus células presentan poco o ningún pleomorfismo, por consecuencia los tumores atípicos están diferenciados por presentar aumento de mitosis, un considerable aumento en el pleomorfismo a nivel celular, necrosis e irregularidad nuclear con algunos nucléolos prominentes (Fuentes V. y Col



2000). Se caracteriza por presentar marcadores de diferenciación neuroendocrina, con mayor frecuencia que los carcinomas no-microcíticos, lo que es útil para diferenciarlos, es difícil realizar un diagnóstico diferencial con los carcinomas neuroendocrinos, que tienen mejor pronóstico y pueden ser resecados si se diagnostican en estadios tempranos (Niklinski J. y Col 2001).

2.4 Estadificación clínica del cáncer pulmonar

Con baja frecuencia se detecta como un carcinoma localizado en pulmón, sin embargo de alta frecuencia de estadios avanzados el cual compromete afectación ganglionar del mediastino, por lo que la diseminación vía hematogena al momento del diagnóstico en la gran mayoría de los casos muestran procesos de metástasis, con mayor agresividad en el caso del carcinoma de células pequeñas, aunque no exclusivo de este grupo neoplásico.

Los sitios anatómicos de mayor de diseminación metastásica son el hígado, el hueso, las glándulas suprarrenales y cerebro (Baumgarther F. y Col 2003).

Los tumores del grupo SCLC se consideran como una enfermedad sistémica al momento de su manifestación sintomática. Cerca de dos tercios presentan compromiso fuera del tórax e involucran al menos un órgano. Debido a la dificultad por identificar micrometástasis en cáncer pulmonar, la quimioterapia es considerada la primera línea de tratamiento. Por ello, la clasificación TNM no es usada para el grupo SCLC (Baumgarther F. y Col 2003).

Dentro del sistema TNM para cáncer pulmonar, T indica el tamaño y lugar de asentamiento del tumor primario, N se refiere a la afectación ganglionar de acuerdo con su localización y M indica la presencia o ausencia de metástasis a distancia (Goldstraw P. y Col 2007). De acuerdo con la



clasificación TNM de la sexta edición, se pueden reconocer 4 etapas o estadios clínicos:

- Estadio 1: El tumor tiene un tamaño menor a 3 cm y no presenta invasión a ganglios linfáticos, y se ubica en el árbol bronquial principalmente.
- Estadio 2: Los tumores tienen uno o más de 3 cm de tamaño e invaden a la pleura inicial en su periferia.
- Estadio 3: El tumor es mayor a 5 cm e invade directamente cualquiera de las siguientes regiones: pared torácica, diafragma y pleura mediastinica.
- Estadio 4: El tumor desarrolla metástasis hacia otro órgano.

A continuación se muestra la clasificación TNM para las neoplasias pulmonares (Goldstraw P. y Col 2007) basado en la sexta edición del TNM; así mismo, se indica la comparación entre la sexta y séptima edición del TNM como fue publicado por Cerecedo Z. y Col (2009), Ver anexo tabla **A**.

2.4.1 Tumor primario, region y nodule linfoide

➤ **Tumor primario**

T0: no evidencia de tumor primario

Tis: carcinoma *in situ*.

T1: **etapa 1**: el tumor es menor o igual a 3 cm de dimensión y está localizado en la pleura visceral del pulmón.

T1a: el tumor es menor o igual a 2 cm, es de dimensión grande.

T1b: el tumor es mayor a 2 cm pero no mayor a 3 cm, es de dimensión grande.



T2: **etapa 2:** el tumor es mayor a 3 cm pero menor o igual a 7 cm e invaden a la pleura inicial en su periferia del pulmón.

T2a: el tumor es mayor a 3 cm pero no menor o igual a 5 cm, es de dimensión grande.

T2b: el tumor es mayor a 5 cm pero no menor o igual a 7 cm, es de dimensión grande.

T3: **etapa 3:** el tumor es mayor a 7 cm invadiendo el surco superior tumoral, diafragma, pleura mediástinica, pericardio parietal.

T4: **etapa 4:** el tumor ha invadido por completo la pleura mediastinica, la carina, los grandes vasos, el corazón principalmente.

➔ **Región y nódulo linfoide**

NX: región del nódulo linfoide el cual no es evaluado.

N0: en nódulos linfoides no existe metástasis.

N1: existe metástasis en nodulos peribronquiales y nódulos intrapulmonares con extensión envolvente directa.

N2: existe metástasis en nodulos linfáticos ipsilateral mediastinico.

N3: existe metástasis en nodos linfáticos contralaterales del mediastino.

2.4.2 Metástasis

MX: metástasis a distancia no evaluada.

M0: no hay metástasis a distancia.

M1: existe metástasis a corta distancia.



M1a: existe separación del tumor en los nodos linfático del lóbulo contralateral, invadiendo pleura del pericardio.

M1b: existe metástasis a gran distancia.

Adicional a lo anterior, los avances en el estudio de las alteraciones genéticas y moleculares en el cáncer pulmonar está permitiendo definir patrones moleculares asociados con la población de alto riesgo a desarrollar esta enfermedad, así como la capacidad de detectar pacientes de alto riesgo a desarrollar recidiva tumoral, además de permitir el diseño de terapias específicas basados en los hallazgos clínicos demostrados (Goldstraw P. y Col 2007).

Diversos reportes basados en la estadificación TNM señalan al diagnóstico en estadios tempranos con mayor margen probabilidad de resección quirúrgica curativa, al mostrar índice de sobrevida a cinco años superiores al 40%, lo cual contrasta con pacientes con estadificación avanzada o tardía con tumores quirúrgicamente no-resecables y sobrevida en promedio menor a 1 año (Barch P. y Col 1999).

El cáncer de pulmón aparece como consecuencia de acumulación secuencial de cambios múltiples en el genotipo y fenotipo de las células expuestas a cancerígenos como el humo del tabaco, entre otros factores de riesgo.

Adicionalmente otras alteraciones genéticas, involucradas en la inhibición de la apoptosis, promoción de la angiogénesis y alta capacidad de invasión y metástasis, así como la inactivación epigenética de algunos de estos incluyendo genes supresores de tumor a través del mecanismo de metilación del DNA genómico representan vías de escape a los mecanismos de control del ciclo celular.



2.5 Factores de riesgo en cáncer pulmonar

2.5.1 Ambientales

El proceso de carcinogénesis se basa en la acumulación de alteraciones en genes esenciales para el control del crecimiento y la división celular. En individuos expuestos al humo del tabaco, las células del epitelio bronquial se encuentran bajo constante agresión física y química por la acción de los compuestos carcinógenos derivados de la combustión del tabaco (tales como benzopireno, nitrosaminas, entre otras) las cuales producen diversas alteraciones genéticas reflejados en cambios o alteraciones en los niveles de expresión de ciertos RNA mensajeros (RNAm) y proteínas, diferenciándose las células histológicamente normales hacia células tumorales (Mollerup S. y Col 2002).

Adicionalmente, se considera la exposición a diversos agentes químicos como el arsénico, el asbesto, el cadmio, sílice, níquel, cromo; entre otros, contaminantes ambientales en suspensión, como el humo de leña, así como factores de dieta (Stabile L. y Col 2002).

2.5.2 Hormonales

En personas no fumadoras el viable papel de las hormonas son dependientes del género para su posible desarrollo del cáncer pulmonar, el papel biológico del estrógeno en la carcinogénesis pulmonar es promotor de la proliferación celular (Fasco M. y Col 2002).

Mientras que ambos receptores de estrógenos $ER\alpha$ y $ER\beta$ se expresan en ambos géneros en tejido pulmonar; se ha detectado que la expresión de $ER\beta$ es mayor en personas no-fumadoras en contraste de aquellos pacientes en condición fumadora (Fasco M. y Col 2002).

Estudios epidemiológicos proponen que tales estrógenos tanto exógenos y endógenos, pueden asociarse con el desarrollo de cáncer pulmonar.



Sin embargo, las alteraciones moleculares en tumores de distinto origen son diversas generadas en vías bioquímicas muy concretas, tales como la división celular, muerte celular programada (apoptosis), detección y reparación del daño al DNA, vías transductores de señales y moléculas de adhesión celular, entre otras. Dentro de cada vía bioquímica existen numerosas proteínas con diferentes grados de importancia biológica para el desarrollo del tumor.

En los últimos años se ha trabajado especialmente en la identificación de aquellas moléculas que se encuentran alteradas en los tumores pulmonares, aunque hasta el momento se conocen tan sólo unas pocas con alta especificidad pulmonar (Fasco M. y Col 2002).

2.5.3 Virales

Se ha calculado que entre el 15-25% de los tumores malignos en humano están vinculados hacia una etiología viral, uno de ellos es el virus de papiloma humano (HPV) involucrado en la patogénesis del cáncer de pulmón (Zur H. y Col 1999).

Por otro lado la frecuencia de HPV, cómo elemento de detección temprana asociada al cáncer pulmonar muestra alta variación dependiente de la zona geografía de la población, con diversas variantes de HPV16 y HPV18, se han propuesto su participación en el desarrollo de cáncer de pulmón en personas mayores frecuentemente no-fumadoras, restringido en áreas geográficas definidas por su alta frecuencia e incidencia en diversas poblaciones (Zur H. y Col 1999).

Por otro lado, se ha descrito la infección por β -retrovirus (JSRV), asociada principalmente en las ovejas, es capaz de inducir la proliferación del árbol respiratorio distal, causando frecuentemente edema pulmonar o el fallecimiento (Zur H. y Col 1999). Adicionalmente, la capacidad secundaria de JSRV, por causar cáncer de pulmón en ovejas, ocurre de forma similar en



frecuencia a la encontrada, en cáncer pulmonar en humano para pacientes no-fumadores (Zur H. y Col 1999).

2.5.4 Genéticos

En cáncer pulmonar en general han sido asociadas diferentes alteraciones genéticas, entre otras, mutaciones, polimorfismos genéticos de una sola base (SNPs, por sus siglas en inglés), pérdida de heterocigosidad, aberraciones cromosómicas ganancias, amplificaciones, pérdidas y deleciones así como la variación en el número de copias (CNV) y/o cambios epigenéticos (metilación del DNA y/o acetilación-metilación de histonas), afectando la remodelación de la cromatina, probablemente en contribución de la transformación neoplásica (Rodenhiser D. y Col 2006). Ello, principalmente en genes que potencian el establecimiento o desarrollo de la neoplasia llamados oncogenes (Matakidou A. y Col 2005).

Al respecto, si bien el cáncer pulmonar es considerado como una enfermedad causada por la exposición ambiental, los factores genéticos e incluso aquellos de tipo heredo-familiar, muestran su efecto reflejado en la susceptibilidad al cáncer pulmonar, como ha sido descrito para el locus citogenética 6q23-25 en cáncer broncogénico (Matakidou A. y Col 2005).

En relación a trabajos de casos y controles en pacientes no-fumadores, para el estudio de enzimas de fase 1 y fase 2 de detoxificación a xenobióticos, ha permitido identificar la presencia de polimorfismos para el citocromo P450 1:1 (CYP1A1) tales como (1462V), el cual es homocigoto para casos de pacientes con supresión de la Glutathion S-Transferasa (GSTMI) debido al genotipo GSTM-I NULO, donde aumenta el riesgo de 2-4 veces al desarrollo de cáncer pulmonar (Hung R. y Col 2003).

Otros genes importantes estudiados en cáncer pulmonar son: XRCCI, XRCC3 ERCCZ, ERCCI, ERCC2, OGGI y XPA involucrados en la reparación



de daño al DNA, los cuales han sido señalados con fuerte asociación al desarrollo del cáncer broncogénico (Znou W. y Col 2003).

No obstante lo anterior, el factor más significativo es la exposición a factores de riesgo externos, como el consumo de tabaco. Al respecto de acuerdo con reportes previos cerca del 80% de los casos de NSCLC se asocian al tabaquismo (Rodenhiser D. y Col 2006).

Sin embargo a la fecha continúan en aumento los casos de cáncer pulmonar no asociados al tabaquismo (Sun S. y Col 2007), en cuyo caso probablemente intervienen otros factores de riesgo, predisposición genética y/o reprogramación epigenética.

2.6 Alteraciones epigenéticas (Metilación del DNA) en cáncer pulmonar

En particular la metilación consiste en la transferencia de un grupo metilo (CH₃), en la posición 5 del carbono de la base nitrogenada pirimidina llamada citosina del DNA, mayoritariamente situadas previa y contiguamente a la base purina conocida como guanina (Steven A. y Col 2004).

Puesto que la metilación es fundamental como un mecanismo de regulación y silenciamiento de la expresión génica, es capaz de provocar alteraciones en el proceso de la transcripción genética, en ausencia de alteraciones en la secuencia primaria del DNA, siendo uno de los mecanismos responsables de la plasticidad fenotípica (Steven A. y Col 2004).

La adición del grupo metilo al DNA, en la citosina, ocurre a través de la acción de las enzimas DNA Metil-Transferasas (DNMT). Donde aproximadamente 70% del contenido de las secuencias di-nucleótido CpG están presentes en el genoma de mamíferos (Clare S. y Col 2004).

A este respecto el proceso que dispara el aumento en los niveles de metilación de secuencias CpG asociado a células cancerosas tiene su explicación debido a procesos de metilación temprana debido a sobre-



activación de las DNMTs asociadas, así como, a desbalances en los mecanismos de acetilación y/o metilación de histonas, como mecanismos iniciales encargados de la remodelación de la cromatina, reflejados en modificaciones en los perfiles de expresión genética.

Las alteraciones genéticas y epigenéticas son frecuentes en cáncer, entre ellas ha destacado la hipermetilación de genes supresores de tumor, genes que codifican proteínas que intervienen en la reparación de daño al DNA y genes involucrados en promover la metástasis (Keith D. y Col 2005).

Otro ejemplo es la hipermetilación del gen p16 como evento frecuente del cáncer en humanos. Mientras que, el nivel de metilación es menor para el gen p15 ubicado en la región adyacente al gen p16, ubicados en la región 9p21. En este sentido la hipermetilación del gen p15, se ha observado más bien asociada entre otras, con el desarrollo de neoplasias malignas de origen hematopoyético, plasmocitomas y linfoma cerebral (Keith D. y Col 2005).

Distintas evidencias señalan alteraciones en los mecanismos que regulan la interacción entre el DNA metilado con los procesos de remodelación de la cromatina, entre ellos destacando la modificación química de histonas (figura 1, tomada y adapta de Jean P. y Col 2004).

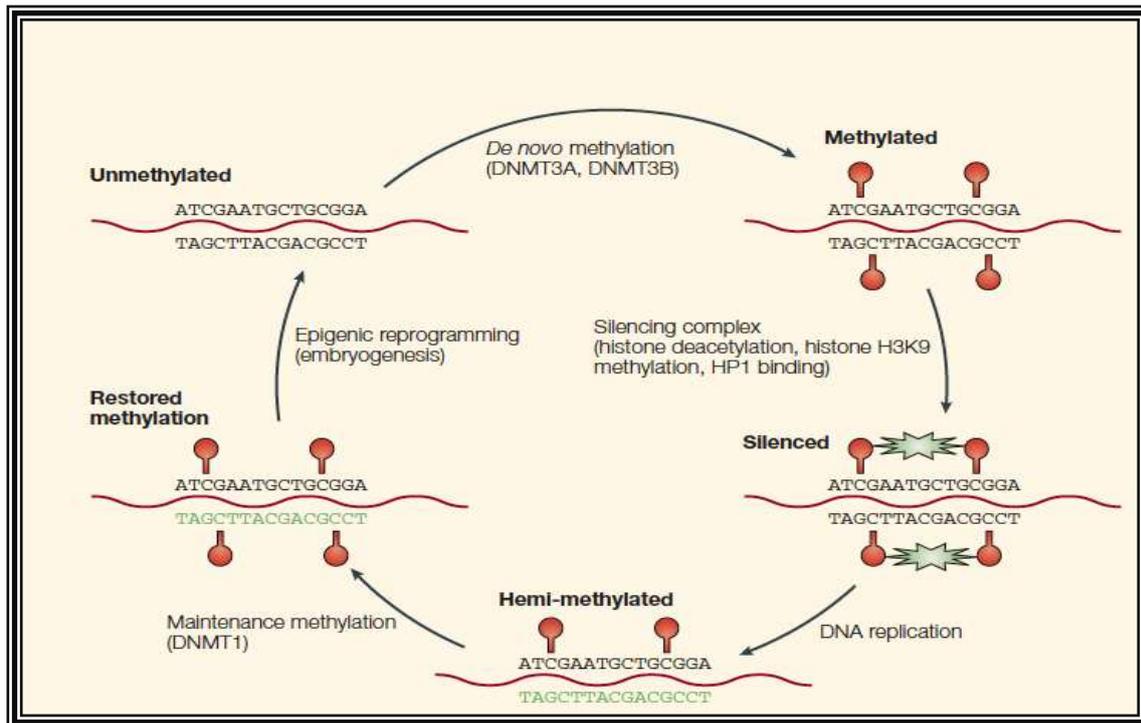


Figura 1. Metilación del DNA observado en la embriogénesis, la metilación del DNA (5-Metil-Citosina), mediante DNA-metil-transferasa-3a (DNMT3A) y la DNMT3B, que afecta la metilación *De Novo* en islas CpG, activa una cascada de procesos como la replicación del DNA, sintetiza nuevamente DNA (color verde), el resultado es la replicación de la metilación y el silenciamiento se mantiene durante la embriogénesis temprana. (Tomado de Jean P. y col 2004).

A este respecto el DNA está empaquetado y enrollado en las histonas conformando la heterocromatina, mientras que su modificación química la transforma en eucromatina, lo cual se consideran actualmente como los principales mecanismos de regulación de la expresión genética (Dustin E. y Col 2008).

- Modificación de las histonas como acetilación, metilación, fosforilación y sumoylación son capaces de afectar tanto la estructura global de la cromatina como la activación o represión genética.
- Metilación del DNA genómico en los segmentos de regulación transcripcional como las secuencias promotoras las cuales contienen dinucleótidos CpGs (islas CpGs) como mecanismo silenciador de la transcripción. La pérdida del imprinting de metilación del DNA genómico (hipometilación), como probable evento inicial del cáncer, también se ha



asociado frecuentemente con el avance neoplásico en proporción con la severidad de la enfermedad (Robertson K. y Col 2005).

De acuerdo a ello, las alteraciones en los mecanismos de regulación epigenética dan lugar a alteraciones en los perfiles de expresión, que contribuyen al desarrollo del cáncer. Las células cancerosas en términos generales muestran hipometilación global del DNA genómico. Sin embargo hipometilación de islas CpGs de secuencias promotoras o incluso segmentos llamados bahías CpGs cercanas al promotor, así como alteraciones en los patrones de modificación química de las histonas (Dustin E. y Col 2008).

El conocimiento de la expresión génica en los carcinomas pulmonares, permite establecer no solo el conocimiento de las vías de señalización en este tipo de neoplasia, sino establecer normas de definición en términos de su pronóstico y perfil genético, como posibles elementos de detección temprana de este tipo de tumores. Adicionalmente, estudios de orden genético-epigenético han permitido el avance en el estudio de la eficacia de nuevos fármacos frente al cáncer pulmonar (Felsenfeid G. y Col 2003).

2.7 Alteraciones en la regulación de la expresión génica en cáncer

Los cambios en la expresión génica son el resultado de los patrones de la expresión de sus genes. Un gen que codifica para un RNA mensajero está constituido por un segmento determinado de la cadena del DNA, principalmente en las regiones promotoras del gen y las interacciones de estos factores con sus secuencias reguladoras, desencadenan eventos que tendrán como resultado la activación o la represión en la expresión de un gen o un grupo de genes (Felsenfeid G. y Col 2003).

En un proceso de regulación epigenética es posible identificar 2 procesos generales: la metilación del DNA directamente impide la unión de factores de transcripción e indirectamente proporcionando la estructura “cerrada” de la cromatina (Salozhin S. y Col 2005). En cáncer la



hipermetilación de secuencias CpGs se ha involucrado con el silenciamiento de genes supresores de tumor y la hipometilación con la sobre-expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la invasión y metástasis (Shhulz W. y Col 2005).

En la regulación de la expresión genética influye un gran número de procesos celulares, tanto normales como anormales, a lo largo de la vida de una célula, en sus inicios el estudio de la expresión génica parecía considerar únicamente la necesidad de atraer a las RNA polimerasas a regiones cercanas al sitio de inicio de transcripción y llevar a cabo la expresión de un gen (Shulz W. y Col 2005).

La participación de la dinámica nuclear en la regulación de la expresión génica, son los procesos de re-localización y asociación entre regiones de la cromatina con factores reguladores de la transcripción en forma dinámica a las zonas de la heterocromatina o eucromatina, ocasionando la represión o activación de la expresión génica (O'Brien y Col 2009), lo cual se encuentra en continuo proceso de alteración en cáncer pulmonar.

2.8 Alteraciones en los perfiles de expresión del RNAm en cáncer pulmonar

Entre las distintas alteraciones moleculares estudiadas en neoplasias pulmonares, destacan la intención de establecer vías de señalización que alteran los patrones de expresión transcripcional involucradas en la carcinogénesis pulmonar. Entre ellas, cabe destacar la presencia de alteraciones genéticas como secuencias microsatélites, metilación aberrante del DNA, alteraciones en la expresión del RNAm, así como otras alteraciones en genes relacionados con receptores a factores de crecimiento, receptores autócrinos, y el sobre-expresión de ribonucleoproteínas (hnRNPs), entre otras (Toledo G. y Col 2000).



Algunos tumores pulmonares presentan aberraciones cromosómicas entre ellas, deleciones de la región cromosómica 9p21, afectando uno o más genes supresores de tumor como el gen p16 (INK4A), el cual actúa sobre el control del ciclo celular en la transición de fase G1 a fase S. Al respecto, mientras que en SCLCs se han descrito tales alteraciones de p16, en cambio estas alteraciones son más frecuentes en NSCLCs deleciones o mutaciones puntuales, presentes en un 10% al 40% de los casos (Toledo G. y Col 2000).

Se ha sugerido que las mutaciones en p16 pueden asociarse a la progresión tumoral, mediante ensayos de metastasis *in vitro* sobre tumores primarios, adicionalmente la detección inmunohistoquímica de la proteína P16 en tumores primarios NSCLCs, muestra que el porcentaje de negatividad aumenta en relación con el avance del estadio clínico. Esta tendencia a perder la expresión de la proteína no se confirma en otros estudios pero todos coinciden en que hasta un 30% o 40% de NSCLCs en estadios tempranos presentan ausencia de expresión de p16, por lo que se concluye que la ausencia de la expresión del RNA de P16 constituye un factor predictor de pobre sobrevida en pacientes con NSCLCs (Toledo G. y Col 2000).

Por otro lado, se ha descrito aumento en la expresión de la telomerasa en lesiones pre-invasoras (pre-malignos) en carcinomas de pulmón con bajo grado de actividad en lesiones como hiperplasia, displasia y carcinoma *in situ* en comparación con el carcinoma invasor de pulmón, mientras que en células de la capa basal del epitelio bronquial normal e hiperplásico adyacente a zonas tumorales, se observa débil expresión de RNA telomerasa. Esta expresión aumenta con relación a la progresión tumoral de moderada a fuerte, a través de las distintas capas del epitelio en metaplasias y displasias, observándose también un aumento en el carcinoma *in situ* en contraste del tejido adyacente al tumor invasor. Estos hallazgos han sugerido que la telomerasa podría servir como marcador potencial en la detección temprana del cáncer pulmonar, sin embargo la expresión del RNAm de la telomerasa no ha sido detectada en algunas muestras estudiadas de hiperplasia adenomatosa atípica (HAA), estos hallazgos indican dos posibilidades: *i*) que las lesiones de HAA no son lesiones



precursoras de lesiones pre-neoplásicas de Adenocarcinoma, o *ii*) que la activación de la telomerasa sea un suceso tardío en la patogénesis de los carcinomas periféricos tipo AD (Toledo G. y Col 2000).

3. Antecedentes directos

3.1 Aberraciones cromosómicas y Variación en el Número de Copias en cáncer pulmonar.

Los análisis alelo-típicos en tumores y derivados de líneas celulares se han orientado principalmente sobre el estudio de las aberraciones estructurales del DNA presentes en etapas avanzadas o tardías de las neoplasias pulmonares.

A este respecto, se han realizado estudios mediante el uso de hibridación genómica comparativa (CGH), sobre metafases de cromosomas (Luk C y Cols 2001) y micro-arreglos de DNA genómico de baja resolución (aprox. 50-100 mega bases), destacando la pérdida/delección de las regiones completas 3p21, 8p22, 9p21-22, 13q22, 17p12-13, así como, la ganancia/amplificación de las regiones 1q31, 3q25-27, 5p13-14, 8q23-24 (Petersen H. y Col 1997).

Cabe mencionar que este tipo de estudios han mostrado limitaciones en cuanto a la posibilidad de identificar regiones discretas que señalen genes o marcadores genéticos asociados a los diferentes estadios clínicos de los pacientes con carcinomas pulmonares.

En este sentido los estudios basados en las alteraciones a nivel genético y, expresión génica en tumores de pulmón o modelos celulares, son necesarios para dar una profunda comprensión de la biología del cáncer pulmonar.

A este respecto han destacado la integración de consorcios para el estudio del cáncer pulmonar, entre ellos uno conformado por Institutos y



Universidades de 4 países quienes basado en el uso de plataformas de análisis masivo del genoma en micro-arreglos de DNA, ha permitido el estudio de secuencias polimórficas del DNA genómico (Plataforma Affymetrix SNP250k).

Este consorcio logro identificar con alta precisión micro-deleciones, micro-amplificaciones, así como la variación del número de copias (CNV) de regiones citogenéticas sobre aproximadamente 250 muestras de tumores pulmonares tipo Adenocarcinoma en estadios clínicamente avanzados. Destacando CNV de mayor frecuencia en las regiones 14q13.3, 5p15.33, 7p11.2, y 17q12; además de micro-deleciones presentes en las regiones 5q11.2, 7q11.22 y 9p23 (Weir B. y Col 2007).

Aunque algunas de estas alteraciones no están precisamente asociadas al tabaquismo principal factor de riesgo del cáncer pulmonar- a este respecto se han realizado diferentes estudios donde se han confirmado alteraciones de alta prevalencia de orden genético en cáncer pulmonar, entre ellas destacando en el gen EGFR, las cuales consisten en micro-deleciones, inserciones o mutaciones puntuales que han sido relacionadas con el desarrollo del cáncer pulmonar (Sonobe M. y Col 2005).

Sin embargo, son muy pocos los estudios orientados al estudio del cáncer pulmonar no asociado al tabaquismo, cuyo padecimiento se plantea como otro tipo de enfermedad pulmonar no-exposicional, cuyo lugar ocupa ya la séptima causa de muerte por tumores malignos, señalando el posible aumento en la incidencia neoplásico pulmonar maligno libre de factores de riesgo en los próximos años a nivel mundial (Sun S. y Col 2007).

La importancia de estudiar CNV en cáncer pulmonar radica en la posibilidad de encontrar una correlación entre CNV con alteraciones en los niveles o perfiles de expresión genética, es decir, a mayor aumento de CNV para un conjunto de genes mayor sobreexpresión del RNAm, o bien alteraciones en los mecanismos epigenéticos de control (metilación del DNA vs acetilación de histonas), capaces de afectar funciones celulares en el desarrollo y establecimiento del cáncer y/o evolución clínica de los pacientes con cáncer



pulmonar (Aitman B. y Col 2007). A este respecto, no obstante se han descrito CNV en distintos locus citogenéticos, relativamente reciente han destacado CNV en el cromosoma 7, cuyos análisis lo posicionan como posible nuevo indicador de progresión y pronóstico en cáncer pulmonar.

3.2 CNV de alta frecuencia en el cromosoma 7, en cáncer pulmonar.

Estudios previos sobre cáncer pulmonar han descrito micro-aberraciones cromosómicas de alta frecuencia, mediante el análisis masivo del genoma a través de hibridación génomica comparativa (CGH), logrando evidenciar aberraciones genéticas tales como deleciones de alta penetración y frecuencia en la población de pacientes con carcinomas pulmonares del grupo NSCLC. A este respecto, cabe mencionar que estudios previos han demostrado aberraciones frecuentes en el cromosoma 7 asociados con el grupo histopatológico NSCLC (Pei J. y Col 2001).

Por lo anterior, las alteraciones del cromosoma 7 se cree generalmente surgen a través de procesos de selección que conllevan a la activación del oncogén EGFR en la región del brazo corto del cromosoma 7 (7p12). Mientras que otros autores han demostrado que la amplificación de la región del brazo largo 7q31, también puede ocurrir de manera frecuente (Engelman A. y Col 2007).

Un estudio previo, demostró también que varias regiones citogenéticas recurrentemente alteradas del cromosoma 7, son contiguas a la región donde residen los genes EGFR y MET frecuentemente alterados y de interés terapéutico en pacientes con cáncer pulmonar (Garnis C. y Col 2006).

Adicional con la anterior, un estudio relativamente reciente mediante análisis por CGH y su análisis de expresión *in silico* demostró un alto grado de correlación indicando que a mayor CNV del gen, mayor aumento en la expresión del RNAm en micro-aberraciones frecuentes del brazo corto de Chr:



7, entre ellas destaca en particular la región 7p15.3-7p11.2 (Stephen L. y Col 2008).

Dicho estudio incluyó el análisis de 30 líneas celulares del grupo NCLSC, lo cual permitió establecer la posible correlación entre el aumento de CNV con aumento en la expresión del RNAm entre otros de los genes FIGNL1, EGFR, LANCL2, ECOP, FKBP9 y MRPS17 (Stephen L. y Col 2008).

Dicho análisis identificó nuevos candidatos a oncogenes en cáncer de pulmón, entre ellos destacan: FTS12, NUDT1, TAF6, POLR2J, así mismo permitió confirmar genes previamente conocidos de importancia clínica, tales como: EGFR y MET. Adicional a ello, 17 de 30 líneas celulares incluidas al estudio mostraron amplificación de la región 7p15.3-p11.2 la cual contiene 28 genes, de los cuales 8 mostraron aumento de CNV con aumento significativo en la expresión del RNAm, entre ellos destacan los genes: MCM7, NUDT1, CCT64, GNB2, esta correlación, se observa también para el gen EGFR, la cual correlaciona con gran variedad de tipos histológicos de cáncer pulmonar incluyendo al grupo NSCLC (Stephen L. y Col 2008). Recientemente, nuestro grupo de investigación mediante el uso de herramientas de análisis masivo (Affymetrix, SNP500K) ha identificado y propuesto el aumento de CNV posiblemente surgidas en etapas tempranas del cáncer pulmonar, ubicados en la región subtelomérica 7p21.1, a través del análisis de muestras de pacientes que representan la progresión histopatológica del cáncer pulmonar es decir a partir del estudio de lesiones pulmonares tanto precursoras, como tejido neoplásico pulmonar premaligno *in situ*, así como *maligno/invasor* en contraste con su contraparte de tejido pulmonar normal adyacente (Ávila Moreno F. y Col 2011).

Dado que a la fecha se desconoce con certeza cuales pudieran constituir las alteraciones citogenéticas y epigenéticas tempranas a lo largo de la progresión neoplásica de pacientes con carcinomas pulmonares, el presente estudio pretende describir y proponer aquellas alteraciones en la expresión del RNAm dependientes o independientes del aumento de CNV o dependientes de su regulación epigenética por metilación de secuencias promotoras o



remodelación de la cromatina de aquellos genes localizados en la región 7p21.1, como región candidata a presentar CNV alta frecuencia en tumores sólidos de pacientes con cáncer pulmonar primario, cuyos genes pudieran constituir posibles marcadores tempranos o blancos de relevancia funcional en la progresión neoplásica pulmonar.

A este respecto estudios recientes han demostrado la presencia de alteraciones tanto estructurales como posiblemente epigenéticas para el gen STX1A ubicado en el brazo largo del cromosoma 7, en la región citogenética 7q11.23. Así como, del gen HIF1A en la región 14q23.2, ambas regiones descritas como regiones de alta frecuencia en pacientes con cáncer pulmonar (Lau K. y Col 2007), ello mediante el uso de plataformas de análisis para el estudio de secuencias polimórficas (SNPs) (SNP-array "Affymetrix 250K o 500K"), algunas de ellas, posiblemente tempranas o específicas de estadios tardíos del DNA genómico de alta frecuencia y prevalencia ubicadas en la región 7p22, 7p21 y 7p15 (Ávila M. y Col 2011), además del cromosoma 14 en la región 14q23.2 en pacientes con cáncer pulmonar (Lau K. y Col 2007).

Escasos estudios al respecto pero realizados sobre muestras de cáncer de vejiga han demostrado importantes hallazgos para el estudio de su regulación genético-epigenética de un locus citogenético dependiente de aumento de CNV e independiente de metilación del promotor, no obstante dependiente de mecanismos de remodelación de la cromatina mediante modificación química covalente -acetilación- de histonas. Dichos estudios han descrito alteraciones para el cromosoma 7, 8 y 10. Observando alteraciones en los perfiles de expresión en las regiones 7p21.3 (7-1), 8p12 (8-1) y 10q26.3 (10-4) asociados al aumento de CNV, dicho análisis realizado en 57 muestras de pacientes, permitió analizar hasta 8,555 genes, de los cuales se pudo concluir que la expresión de los genes EIF3S9 (7p21.3), ASH2L (8p12) y SHOC2 (10q26.3) son dependientes del aumento de CNV; sin embargo otros genes entre ellos vecinos como PLCD1 y DLEC1 (3p22.3) ubicados en el cromosoma número 3, son dependientes de mecanismos de remodelación de la cromatina, mientras que parcialmente dependientes de metilación del DNA,



esto pese a mostrar aumento de CNV (Stransky N. y Col 2006). No obstante dichos antecedentes, en el caso de cáncer pulmonar se desconoce si la regulación de la expresión genética de genes localizados en la región 7p21.1, son dependientes o independientes de CNV, así como dependientes de su regulación epigenética como mecanismo asociado con malignidad o progresión del cáncer pulmonar; adicionalmente su posible asociación con la exposición a factores de riesgo ambientales.

3.3 Alteraciones epigenéticas en el cromosoma 7, en cáncer pulmonar.

Estudios relativamente recientes sobre líneas celulares de cáncer pulmonar tipo AD (A-549 derivada del ATCC) han indicado hipermetilación global del genoma; así mismo se ha determinado alto nivel de metilación en el cluster de los genes HOMEBOX-A (HOXA) relacionados con el desarrollo embrionario y localizados en el brazo corto del cromosoma 7 (7p15.3). Lo anterior, evidenciado mediante análisis epigenómico basado en el estudio de metilación del DNA de alrededor de 39 islas CpG, mediante el uso de ensayos de recuperación de islas CpG metiladas (MIRA, por sus siglas en inglés de Methylated CpG Island Recovery Assay). Cabe mencionar que la región estudiada posee un tamaño de 155Kb (cluster HOXA). Adicionalmente, dicho estudio determino el perfil de metilación de los 4 clusters de genes Hox ubicados en los cromosomas 2, 7, 12, y 17. Para el caso del cluster HOXA en la región 7p15.3 dicha metilación provoca directamente el silenciamiento en la expresión de los genes HOXA lo cual posiblemente contribuya a la progresión neoplásica pulmonar, esto para el caso de ambos clusters tanto HOXA como HOXD (Rauch T. y Col 2007).

Pese a lo anterior, escasa información al respecto no permite conocer el comportamiento de su regulación genético-epigenética del cromosoma 7 en cáncer de pulmón, en particular de la región Chr:7p21.3-p21.1, la de mayor frecuencia de acuerdo con datos obtenidos en pacientes mestizos mexicanos, como se indica en el presente trabajo.



Por otro lado, algunos estudios pareados en tumores pulmonares y su contraparte de tejido pulmonar histológicamente normal adyacente, así como líneas celulares del cáncer pulmonar, han demostrado que el aumento en el nivel de expresión del gen TSLC1 (11q23.2) está asociado con hipometilación del promotor. Lo anterior, ha sido descrito mediante PCR cuantitativo por tiempo real y secuenciación combinada con transformación química de citosinas por bisulfito de sodio. Evidenciando que la pérdida de metilación en la región promotora del gen TSLC1 en muestras de tejido normal pulmonar, mientras que hipermetilación en líneas celulares de cáncer pulmonar tipo AD así como en algunas líneas celulares de cáncer pulmonar tipo AD (A-549) y tipo SCC (Calu-3 y NCI-H446). Por lo que, el silenciamiento del gen TSLC1 en cáncer de pulmonar, ocurre debido a hipermetilación de su región promotora (Ming S. y Col 2010).

Un estudio reciente, en el cual se analizó la amplificación de los factores de transcripción TFDP1 y CTNND1 en cáncer pulmonar, se confirmó la presencia de amplificación del DNA en 2 segmentos genéticos ubicados en la región cromosómica 11q12 y 13q34 con una frecuencia de 3% en los casos de tumor. Al respecto, cabe mencionar que ambos genes codifican para 2 oncogenes, como fuertes candidatos de inmunosupresión frente a tumores pulmonares. No obstante, a pesar de la baja frecuencia de amplificación para este gen, se ha concluido que su alta expresión en cáncer pulmonar del grupo NSCLCs responde a modificaciones epigenéticas causadas por el funcionamiento de la proteína E2F asociada al factor transcripcional TFDP1 como candidato a oncogén en cáncer pulmonar, lo cual permitió la identificación de 2 nuevas regiones cromosómicas 11q12 y 13q34, y la región cromosómica 13q34 es un fuerte candidato a oncogen NSCLCs (Castillo S. y Col 2010).

Adicional a lo anterior, la regulación epigenética por metilación de islas CpGs de secuencias promotoras es importante para el estudio de la tumorigenesis ,basado en ello, se ha demostrado la capacidad de control epigenético empleando el modelo de línea celular H460 y H1299 (NSCLCs), a



través del cual el análisis por micro-arreglos, reveló diferencias en 1,091 genes los cuales presentan metilación con una significancia estadística $p \leq 0.5$ incluyendo genes involucrados en la adhesión y comunicación celular, regulación transcripcional y traducción de señales, de los cuales 747 genes presentan hipermetilación principalmente en la línea celular H1299 mediante el análisis de PCR en Tiempo Real, en contraste el promotor en 344 genes están hipometilados en la línea celular H460, esta gran diferencia en ambas líneas celulares es de trascendencia para el estudio de la regulación epigenética en células del cáncer pulmonar (Kim E. y Col 2010).

Adicionalmente trabajos recientes han demostrado que el uso de 3-metil-colantreno y di-ethyl-nitrosamina, son capaces de inducir lesiones precancerosas y lesiones neoplásicas pulmonares en rata, probablemente semejantes de aquellas presentes en humano. A partir de estos modelos ha sido posible plantear el estudio secuencial de cambios dinámicos en los perfiles de metilación de secuencias promotoras en diversos genes entre ellos, aquellos que participan en el control del ciclo celular durante la carcinogénesis pulmonar. Dicho análisis demostró aumento en el porcentaje de metilación para el promotor del gen CDKN1B (p27), así como CDKN1C (p57), el cual aumenta de 11% en lesiones precursoras (metaplasias escamosas), 18.9% en displasias, 26.7% en carcinoma *in situ* hasta alcanzar un nivel de 36% en tumores invasores. Lo cual correlacionó con disminución en la expresión de la proteína tanto p27 como p57, lo cual fue revertido después del tratamiento con inhibidores de metilación del DNA aprobados por la FDA en U.S.A., como la 5-aza-2-deoxicitidina (Lui W. y Col 2010).

Un estudio reciente, identificó posibles marcadores asociados con la predicción benéfica pacientes del grupo NSCLCs, para ello se utilizó un total de 264 pacientes adultos en fase clínica II, IIb/IV con un historial de régimen de una o más sesiones de quimioterapia, así también bajo el tratamiento con el medicamento *erlotinib* (150 mg/día), se utilizaron muestras de biopsias de tumores primarios un total de 102 para un análisis masivo de genes mediante microarreglos (Affymetrix GeneChip), estos análisis revelaron tres genes



ubicados en el cromosoma 7 EGFR (7p11.2), PSPH (7p12), RAPGEF5 (7p15.3), con sobre expresión representando una estimación de 63% de sobre expresión de estas muestras con respecto al gen RAPGEF5 el cual muestra expresión nula con una estimación de 0.89% de los casos o muestras analizadas, llegando a la conclusión que para el uso de terapia con *erlotinib* como alternativa quimioterapéutica en pacientes puede contrarrestar la proliferación avanzada de NSCLCs, debido a los altos niveles de expresión del gen EGFR, ubicado en el cromosoma 7 (Tan E. y Col 2010), en cuyos pacientes dicha sobre-expresión puede estar bajo el control tanto genético como epigenético, no obstante se desconoce.

Por otro lado mediante el estudio, de análisis de hibridación de fluorescencia in situ (FISH), en muestras de pacientes con cáncer pulmonar en rango de edad 45 a 82 años, en tumores primarios (n=38) de los cuales 29 presentan metástasis, y 19 en combinación con metaplasia avanzada, siendo 50% del tipo AD, 20% SCC, y el resto carcinomas de células grandes. Se realizó un análisis masivo por el método FISH para detectar el gen EGFR localizado en la región 7p11.2, observando como positivo en 65% de los tumores primarios de los cuales en 7 casos fueron positivos por FISH y en 20 muestras presentaron ser negativos y correspondieron a procesos metastásicos, lo cual correlaciona con ausencia de mutación para el EGFR, con lo cual se concluye que la expresión de EGFR en la región 7p11.2 ocurre a debido a cambios tanto genéticos como epigenéticos durante la progresión en metástasis de NSCLCs (Lorenzo M. y Col 2010).

No obstante los antecedentes mencionados acerca del comportamiento genético-epigenético del cáncer pulmonar, actualmente son escasos los estudios que describan en su conjunto alteraciones de alta frecuencia de orden genético-epigenético del cromosoma 7 en cáncer pulmonar que permitan describir nuevos posibles marcadores de aparición temprana o exclusivos de estadios clínicos, así como histopatológicos o pronóstico en pacientes con cáncer pulmonar para una mayor comprensión de esta patología en nuestra población.



4. Planteamiento del problema

A nivel de la secuencia lineal del DNA genómico ocurren mecanismos de regulación tanto genéticos como epigenéticos capaces de influir en la regulación transcripcional de ciertos genes. Siendo de este modo posible identificar eventos en cascada que preceden a la transcripción en cáncer. Así mismo, la modulación de la estructura de la cromatina ha mostrado un papel crítico en la regulación epigenética. De este modo el silenciamiento epigenético de genes supresores de tumor, genes de reparación de daño al DNA, genes inductores de apoptosis, entre otros, son capaces de contribuir en gran parte al comportamiento biológico del tumor y muy probablemente en la evolución clínica del paciente con cáncer pulmonar. Sin embargo, a la fecha no existen estudios que describan en su conjunto alteraciones en los mecanismos de control estructural del DNA, entre ellos CNV, Metilación del DNA y/o remodelación de la cromatina, ello en las distintas fases de la progresión histopatológica pulmonar (lesiones pulmonares precursoras, pre-malignas y malignas/invasoras). Para ello, a partir del análisis masivo del genoma en muestras de pacientes con lesiones precursoras y neoplásicas pulmonares se llevaron a cabo ensayos de análisis genómico de CNV, análisis de metilación de secuencias promotoras y expresión del RNAm mediante PCR en tiempo real. Así mismo, mediante ensayos de cultivo *in vitro* se realizaron ensayos para demostrar si dichas alteraciones genéticas-epigenéticas son reversibles a través del uso de inhibidores de metilación del DNA y/o inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACs), como aquellas enzimas capaces de remodelar la cromatina, a través del estudio de líneas celulares establecidas a partir de pacientes con diagnóstico de cáncer pulmonar tipo AD, bajo atención médica en el INER.



5. Justificación

Ante la problemática actual relacionada con la incidencia y altos índices de mortalidad en cáncer de pulmón, recientemente se han diseñado estudios enfocados en la búsqueda de posibles marcadores genéticos que puedan servir como métodos de diagnóstico temprano; sin embargo, tales estudios sólo han reflejado las alteraciones cromosómicas y genéticas presentes en etapas avanzadas del cáncer pulmonar, por lo que, no ha sido posible sugerir con cierto grado de certeza, posibles marcadores de aparición temprana que permitan proponer un diagnóstico temprano e incluso que por su función estos marcadores permitieran diseñar estrategias terapéuticas en contra del cáncer pulmonar. Debido a lo anterior, el presente trabajo de investigación básica está enfocado al análisis de posibles alteraciones de CNV en correlación con su nivel de metilación de secuencias promotoras de genes residentes de la región citogenética 7p21.1, la cual señalamos de alta frecuencia en pacientes con cáncer pulmonar bajo atención médica en los institutos nacionales de salud entre ellos el INER. Lo anterior, nos permitirá proponer y analizar alteraciones en la expresión génica a lo largo de la progresión neoplásica pulmonar a partir de etapas tempranas de lesiones neoplásicas pulmonares, así como su dependencia de posibles mecanismos de regulación epigenética, permitiendo a mediano plazo la identificación de nuevos blancos de diagnóstico y/o tratamiento oportuno o pronóstico de los pacientes con cáncer pulmonar en México.

6. Hipótesis

La descripción de alteraciones en la expresión génica dependientes de la variación del número de copias o metilación de secuencias promotoras en genes residentes de la región 7p21.1, durante la progresión histopatológica del cáncer pulmonar, permitirá proponer o establecer nuevos probables marcadores localizados en el brazo corto del cromosoma 7, asociados al diagnóstico temprano en la patogenia del cáncer pulmonar.



7. Objetivo general

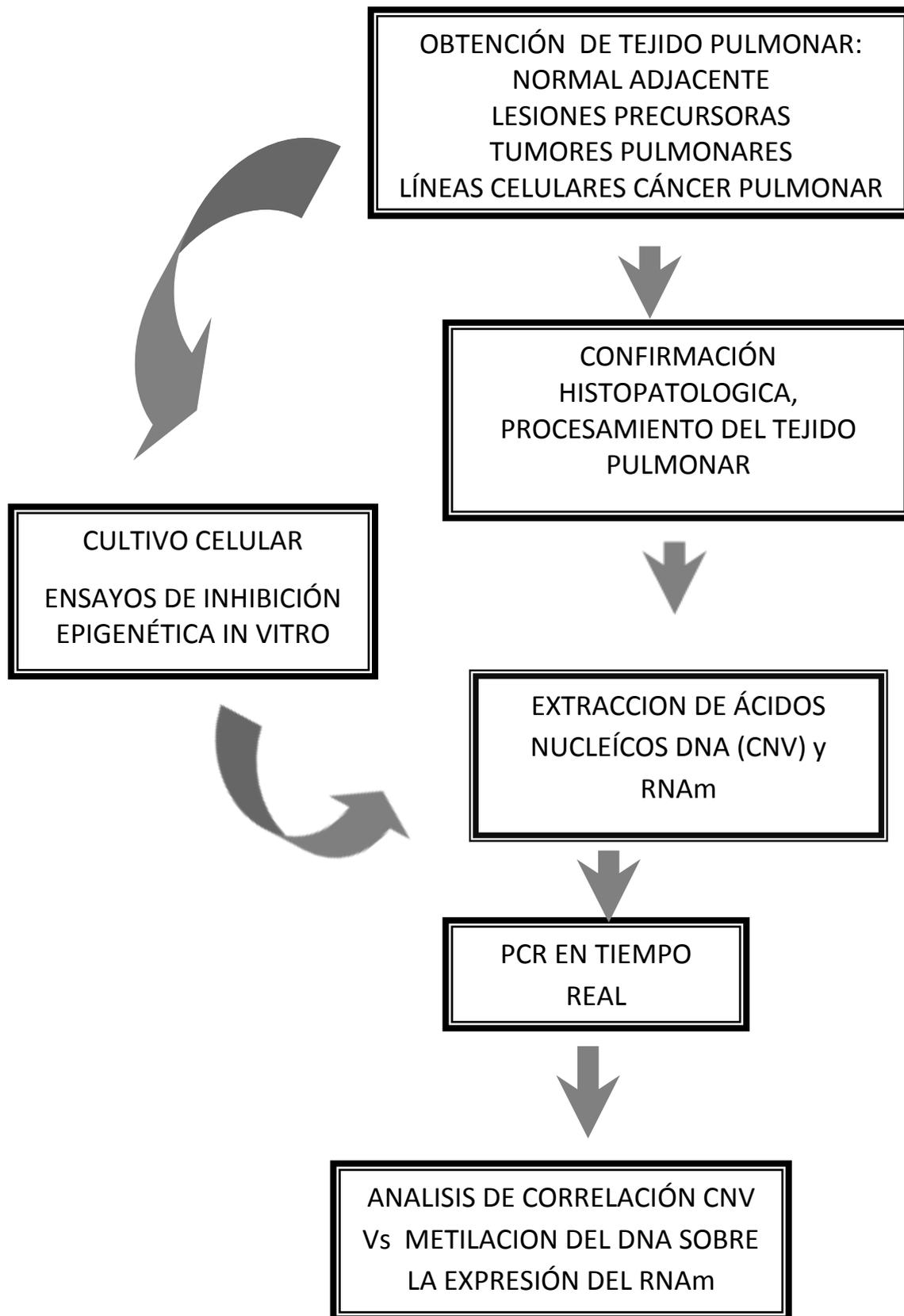
- Determinar alteraciones en la expresión génica dependientes de la variación en el número de copias o metilación en genes residentes de la región 7p21.1 en carcinomas pulmonares.

8. Objetivos particulares.

- Analizar el aumento en la variación del número de copias (CNV) de genes residentes de la región citogenética 7p21.1 en lesiones precursoras y carcinomas pulmonares, a través de ensayos de validación por PCR cuantitativo en tiempo real.
- Analizar los niveles de expresión de los genes con aumento de CNV, tanto en lesiones precursoras como carcinomas pulmonares derivados de pacientes.
- Correlacionar CNV y cambios en la expresión del RNAm mediante PCR en tiempo real en lesiones precursoras, carcinomas pulmonares y línea celular de cáncer pulmonar.
- Determinar la presencia o falta de correlación entre el nivel de expresión del RNAm dependiente de regulación epigenética o CNV mediante ensayos de inhibición de metilación del DNA o inhibidores de remodelación de la cromatina en muestras de pacientes con cáncer pulmonar.



9. Estrategia experimental





10. Materiales y métodos

10.1 Medio de cultivo RPMI-1640

Se empleó medio de cultivo RPMI-1640, suplementado entre otros, con 10%, de Suero Fetal Bovino, L-Glutamina al 1%, Gentamicina al 0.1, Hepes Buffer (1M) 0.5%, Piruvato de Sodio al 1%.

10.2 Medio de congelación

Se empleó Suero Fetal Bovino al 89%, DMSO al 11.0%

10.3 Preparación de PBS 10X

Se empleó NaCl: 80gr, KCL: 2gr, Na₂HPO₄: 14.4gr, KH₂PO₄: 2.4gr. y se lleva a un litro de solución ajustando el pH a 7.4. El buffer PBS fue empleado debido a su capacidad en mantener una constante de pH incluyendo su osmolaridad y la concentración de iones de la solución por lo general coinciden con los del cuerpo humano conociéndose como una solución isotónica.

10.4 Obtención y procesamiento de tejido pulmonar

Las muestras de tejido pulmonar se obtuvieron a través de la unidad de urgencias e investigación de enfermedades respiratorias, Departamento de cirugía y Departamento de patología. Todo ello bajo los criterios y normas actualmente probadas por el comité de bioética de Instituto y normas vigentes del sector salud.

Las muestras en fresco fueron colocadas y transportadas en frascos estériles con 15 ml de medio RPMI para su uso posterior.



10.5 Procesamiento de tejido pulmonar

Se realizó una selección de lesiones respectivas de tejido pulmonar, el cual fue procesado y almacenado el tejido fresco en triviales de capacidad de 2ml, así como tejido fijado en formaldehído al 10% y procesados en parafina, mediante el análisis histopatológico y confirmación de diagnóstico respectivo con ayuda de un patólogo.

10.6 Cultivos celulares

Fueron estandarizadas las condiciones de cultivo in Vitro para líneas celulares derivadas de carcinomas pulmonares de células no-pequeñas, entre otras: INER 37e INER 51 ambas establecidas a partir de pacientes mexicanos con derrame pleural con diagnóstico de cáncer pulmonar tipo AD (Ponce L. y col 2005), así como la línea A-427 de origen caucásico (obtenida del ATCC).

Bajo condiciones de humedad relativa al 5%, CO₂ 5%, y temperatura de 37°C, realizando recambios de cultivo cada 48hrs, empleando tripsina al 1%, para despegar la mayor cantidad de células adheridas a la pared de la caja de cultivo, y con ello se obtuvo la mayor población celular y cierta población celular se guardó como stock en medio de congelación, en nitrógeno líquido para su almacenamiento.

10.7 Viabilidad celular

Fue evaluada la proporción de células viables, sobre cada cultivo de líneas celulares y posibles cultivos primarios, mediante el uso de cámara de Neubauer, empleando el colorante vital azul de tripano 0.1%.



10.8 Extracción de DNA, RNA y proteína

Existen diversos métodos de purificación de ácidos nucleicos, estos varían según se desee aislar DNA o RNA, así como del grado de pureza requerido.

Esta purificación de ácidos nucleicos se realizó primero un aislamiento rápido por lisis celular, después una vez teniendo las células lisadas se procede a la separación electroforética en gel de agarosa y se pueden ver claramente dichos ácidos nucleicos.

Es importante señalar que no siempre es necesario efectuar el procedimiento de extracción de los ácidos nucleicos para la realización de la PCR.

Se utilizó para esta extracción el Kit; All Prep™ DNA / RNA / Protein Kit de QIAGEN número de catalogo; 80004.

El cual especifica que para una extracción óptima se deben utilizar 30 μg de tejido fresco o de 15 a 20 μg de tejido congelado, el método utilizado para la extracción en su fase inicial corresponde al peso de 30 μg aproximadamente.

A continuación se indican las distintas fases del protocolo:

10.8.1 Extracción a partir de tejido fresco congelado.

Se disgregó este tejido en un mortero colocando nitrógeno líquido para evitar la degradación y éste se molió perfectamente hasta llegar a pulverizarlo, se colocó esta pulverización de tejido a un tubo eppendorf de capacidad de 2ml.



10.8.2 Extracción de RNAm.

Se colocó 600 μ l del buffer RLT y Mercaptanol 600:6, éste se preparó al momento ya que tiene que ser fresco y se colocó en el tubo eppendorf que contenía el tejido fresco pulverizado, el cual fue vortexeado por 1 min aproximadamente esto es para favorecer la lisis celular, se procedió pasar el contenido del tubo eppendorf a una columna que contiene el kit y se procedió a centrifugar a 10,000 rpm por un minuto se utilizó el líquido filtrado y recolectado a través de la columna.

La columna se pasó a un tubo nuevo eppendorf se selló, y se guardó a temperatura ambiente ya que se utilizó más adelante.

El líquido recolectado se le agregó 400 μ l de etanol absoluto y se procedió a mezclarlo con ayuda de una pipeta, se pasó este líquido a una columna de RNA (si este líquido contenía algún precipitado también se colocó en la columna), y se procedió a centrifugar a 10,000 rpm por 1 min.

El líquido filtrado y saliente a través de la columna se guardó a temperatura ambiente y se utilizó posteriormente.

En la columna se colocó 200 μ l del buffer RW1 y precedió a centrifugar a 10,000 rpm por 30seg, se desechó el sobrenadante y se volvió a lavar con 500 μ l de buffer RPE y se volvió a centrifugar a 10,000 rpm por 2 min, se desechó el sobrenadante, se volvió a centrifugar sin ningún buffer a máxima velocidad por 1 min para quitar el exceso de buffer, se procedió a pasar la columna a un tubo nuevo eppendorf de capacidad de 1.5 ml se dejó incubar por 5 min a temperatura ambiente transcurrido este tiempo se le colocó 15 μ l de agua libre de RNAsas, que contiene el Kit, el agua se colocó directamente a la membrana de la columna sin tocarla justo al centro de ésta posteriormente se procedió a centrifugar por 1 min esto con la finalidad de realizar un lavado se recomienda realizarlo por duplicado para que el rendimiento en recuperación del RNA sea el óptimo. El líquido obtenido contiene el RNA y se



procedió a guardarlo previo etiquetado a -20°C para su posterior cuantificación y uso.

10.8.3 Extracción del DNA.

Se retomó la columna que se guardó a temperatura ambiente y se le añadió $500\mu\text{l}$ del buffer AW1, y se centrifugó por 30 segundos a 10,000 rpm, se tiró el sobrenadante y se pasó la columna a un tubo nuevo que contenía el Kit, y se le colocó $500\mu\text{l}$ de buffer AW2 y se volvió a centrifugar a máxima velocidad por 2 minutos y se tiró el sobrenadante.

Se colocó la columna en un tubo nuevo eppendorf de capacidad de 1.5 ml y se agregó 20 ml de agua libre de RNAsas y dejó incubar por 5 min, a temperatura ambiente se hizo este paso dos veces. Una vez que transcurrió el tiempo se centrifugó por 1 min a 10,000 rpm, al término la fase líquida contiene el DNA el cual se procedió a etiquetar y almacenar a -20°C para su posterior cuantificación y uso.

10.8.4 Extracción de proteínas.

Se retomó el líquido que se guardó en el paso anterior, que está contenido en el eppendorf, se le agregó a este líquido $600\mu\text{l}$ de buffer APP y se mezcló vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Después se centrifugó por 10 minutos a máxima velocidad y se tiró el sobrenadante.

Se adicionó 500ml de etanol al 70% y volvió a centrifugar a máxima velocidad por 1 min nuevamente al tubo se retiró cuidadosamente el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur, se recomienda retirar todo el líquido posible del tubo.



Se dejó secar la pastilla en el tubo eppendorf, durante 5-10 min aproximadamente, posteriormente se incubó por 5 min a 95°C, para desnaturalizar las proteínas posteriormente se dejó incubar a temperatura ambiente, al término se centrifugó por 1 min a máxima velocidad, para eliminar residuos posibles con la finalidad de solubilizar la proteína. Al final las muestra fueron guardadas a -20°C.

10.9 Cuantificación e integridad del DNA, RNA.

El DNA fue cuantificado empleando un método espectrofotométrico (NanoDrop Spectrophotometer ND-1000), y llevaron a cabo ensayos de PCR en tiempo real para el análisis de validación del número de copias del DNA y expresión del RNAm.

10.10 Diseño de oligonucleótidos

Uno de los parámetros más importantes para tener éxito en la amplificación por PCR es el diseño de los oligonucleótidos cebadores (oligos o primers).

Se diseñaron oligonucleótidos convencionales empleando entre otros programas bio-informáticos: Vector Primer y File Builder (Applied Biosystems), tanto para el análisis del DNA en secuencias promotoras y expresión del RNAm mediante ensayos de PCR en tiempo final/tiempo real.

10.10.1 Diseño de primers;

➔ El diseño de los primers deberá incluir la amplificación de más de un exón, por lo que fueron diseñados de forma que la secuencia de al menos uno de los primers estuviera contenida en la unión de 2 exones o bien que los primers forward y reverse se encontraron en diferentes exones.



- Fueron seleccionados amplicones entre 100 a 250 pb.
- El tamaño GCs de la sonda y primers, contener entre 30-60%.
- Evitar secuencias que contengan 4 o más Gs continuas.
- Respecto a la Temperatura (T_m), se recomienda diseñar primers con una T_m , entre 55-60°C, o T_m cercanas, para el uso de condiciones de amplificación estándar, si es posible. La sonda debe tener T_m 10°C superior a la T_m de los primers.

- Primers: los últimos 5 nucleótidos del extremo 3' no deberá tener más de 2 Gs' y/o Cs para evitar la formación de dímeros de primers. Se deben evitar primers con complementariedad interna o formación de dímeros de primers.

- Los primers no deben contener G en el extremo 5' el cual actúa como un quencher natural.

- Los primers deberán ser específicos para la secuencia del gen de estudio, tener especial cuidado con la existencia de diferentes isoformas, diferentes transcritos debido a promotores o poli-adenilación alternativa, familias de genes de gran homología, pseudo-genes, se recomienda realizar una comparación de la secuencia del amplificado y de los primers contra todo el genoma para comprobar que es una secuencia única.

- Se recomienda analizar la estructura secundaria del amplificado y evitar las posibles estructuras secundarias, dichas estructuras deben tener un T_m inferior a T_m del par de primers.

Sobre la región de alta frecuencia ubicada en el brazo corto del cromosoma 7 "7p21.1" fueron seleccionados una lista de genes por sus características funcionales a nivel celular (ver anexo tabla **B**).

De esta lista se eligieron una serie de oligonucleótidos a partir de su temperatura de alineamiento, a partir de los cuales se realizó el análisis de CNV en la progresión neoplásica pulmonar, (tabla **1**), así como el análisis de expresión del RNAm en la progresión neoplásica pulmonar, (tabla **2**).



Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'	Tm Teo	Región	Tm Exp.	Tamaño
ZF12med	CATGGTCTACGAGATGCTAC ATACCGTGACTCTATTTCCC	57.2	7p22.1	55	232pb
MEOX2 med	GTCCAGCAGGAGATAGGAAG AGAGTGGGAGAGGTTGAAGC	60.4	7p22.1	55	205pb
TP13	GAGGTGCTGTCATATTTCTCC CTGGCAGGGAACAAAGGTAG	60.1	7p21.1	55	225pb
AG3	ACCCCTAACCCAGAGATTC ATCAGGAAAGCCTCCATTC	62.9	7p21.1	55	245pb
AHR	CAGTCCATTGGTTGTCTAC TTCCATTCCGTCTTCCTTG	59.4	7p15	55	252pb
HDAC9 med	AAGCAGTTCCTATTTCCC TGTCTGCAGCATATTCAG	60.5	7p21.1	55	304pb
TWIST1 med	GGGAGGACGAATTGTTAGAC CGAGGTCCAAAAGAAAGC	59.9	7p21.2	55	284pb
TWISNB	CGTAATGCAGCGAAAAGAGG GGCATGAGTAGCGACTGTTC	64.5	7p21.1	55	270pb
HNB1 ini	TTTTCTGGCGGGGTTATC AATTGCGGAAGGCTAGAGTC	65.7	7p15	55	205pb
CBX3 med	CTGAGGAGACTCCGGTAC CTACAGCTCAAGCCACATCC	62.6	7p15.2	62	120pb
EVX1 med	TCATCGGTGTTAGATCAAGG CAGCGAAGATGAAAGGAAAC	60.1	7p15-14	62	300pb
EVX2 med	GGCGCTGCATGATTAGGAC GAGGCGAGAAGAGACAAGTG	65.6	2q31.1	62	205pb

Tabla1, lista de oligonucleótidos empleados para el análisis de CNV en muestras de tejido que representan la progresión neoplásica pulmonar.

Oligonucleótidos	Secuencia	Tm Teo.	Región	Tm. Exp.	Tamaño
AHR	GGCCTGAACCTACAAGAAGG GGAAGAACATTCAAGTCCGG	53.7	7p15	60	215pb
TWIST1	GAGTCCGAGTCTTACGAG GAGCATTCTGACGCCTGAG	60	7p21.2	60	160pb
HDAC9	CGACAGCAAAAGCTTCTGTAG GATGTTCTTCGAAAACGACAGC	58	7p21.1	60	192pb
EVX1	CGAGTACCAGCACAGCAAAG GAAACGACACGACCATGAGC	63.2	7p15-14	60	270pb
MEOX2	TCCTGTGCTCCAACCTTTC CTTCTCAACCTCGTGTCTT	60.0	7p22.1	60	203pb
β -actina	CGACAGCAAAAGCTTCTGTAG GATGTTCTTCGAAAACGACAGC	59.1	7P15-12	60	210pb

Tabla 2, lista de oligonucleótidos empleados para el análisis de Expresión en muestras de tejido que representan la progresión neoplásica pulmonar.



10.10.2 Condiciones de amplificación por PCR en tiempo final y PCR en tiempo real.

PCR en tiempo real es un tipo de PCR cuantitativo que mide la cantidad de DNA o de RNAm en una muestra, o en una población de células, el tiempo real se utiliza comúnmente para determinar la expresión del RNAm de un gen, y el nivel de variación en número de la copia del RNAm durante ciertas condiciones.

Esta técnica se fundamenta en la propiedad de las DNA polimerasas para replicar hebras de DNA, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de DNA recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarse.

Las bases de la reacción de PCR intervienen tres segmentos de DNA: el segmento de doble cadena que queremos amplificar, y dos pequeños fragmentos de cadena sencilla, los oligonucleótidos, que tienen la misma secuencia que los extremos flanqueantes del DNA molde.

El primer paso necesario en este proceso de la síntesis es la desnaturalización del DNA puesto que el molde es una molécula de DNA de doble cadena, será necesaria la separación de éstas para que los oligos puedan acceder a sus secuencias complementarias y unirse a ellas en el siguiente paso, llamado de alineamiento, una vez que los oligos se han unidos a las cadenas, sirven como cebadores para la acción de la DNA polimerasa, la cual comienza a crear a partir de ellos nuevas cadenas de DNA complementarias, en el proceso de elongación, estos tres pasos consecutivos (desnaturalización, alineamiento y elongación) constituyen un ciclo de síntesis.

Para la cuantificación del DNA se midió en cada ciclo de PCR la cantidad de amplicón producido, la cuantificación del producto, se produce mediante la adición del fluorocromo (SYBR Green) que se une a la doble hebra del producto amplificado (amplicón) de forma cuantitativa, de forma que a mayor producto mayor fluorescencia será emitida. Esto permite cuantificar sólo



una secuencia por reacción pero tiene la ventaja de utilizar primers para su realización. El equipo empleado para el análisis de PCR en tiempo real fue de la marca AB Applied Biosystems, modelo Stepone con software V2.0.

A continuación se describen las condiciones de reacción para el uso de SyBR Green (Fermentas-USA) tabla 3.

<u>RACTIVOS</u> Marca FERMENTAS	<u>CANTIDAD</u>
SYBR Green	15ml
Primer	1ml
Templado (25ng/ml)	1ml
H2O	5.5ml
Volumen total por reacción	15ml

Tabla 3, condiciones utilizadas para el análisis de cada uno de los ciclos en la reacción de PCR en tiempo real, utilizando SYBR Green de Fermentas.

A continuación se describen las condiciones de reacción para el uso de SYBR Green (Applied Biosystems – USA) tabla 4.

<u>RACTIVOS</u> Marca APPLIED BIOSYSTEMS	<u>CANTIDAD</u>
SYBR Green	15ml
Primer	1ml
Templado (25ng/ml)	1ml
H2O	5.5ml
Volumen total por reacción	15ml

Tabla 4, condiciones utilizadas para el análisis de reacción por PCR en tiempo real, utilizando SYBR Green de la marca Applied Biosystems



En tabla 5, se muestran las condiciones de amplificación con respecto a su temperatura de alineamiento, empleando SYBR Green de la marca **Fermentas**.

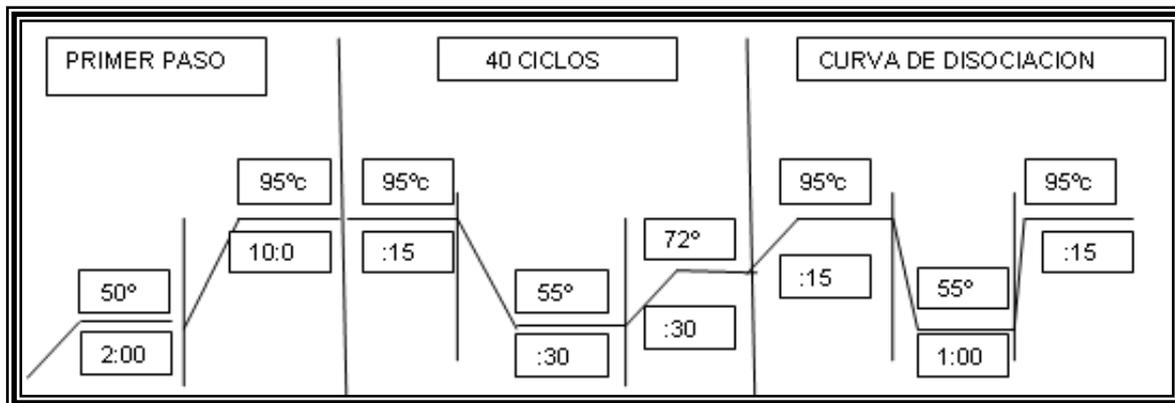


Tabla 5, condiciones utilizadas para la amplificación en el análisis de cada uno de los ciclos en la reacción de PCR en tiempo real.

En la tabla 6, se muestran las condiciones de amplificación con respecto a su temperatura de alineamiento empleando SYBRGreen de la marca **Applied Biosystems**.

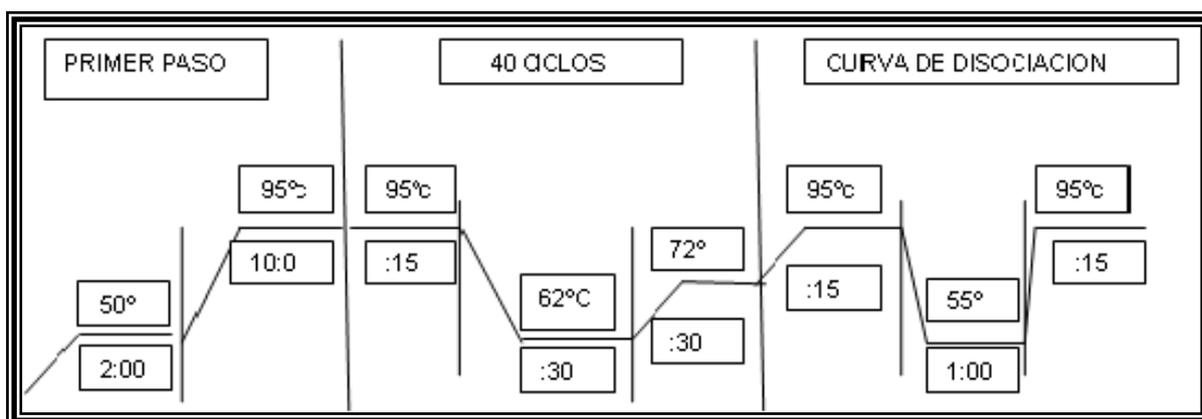


Tabla 6, condiciones utilizadas para la amplificación en el análisis de cada uno de los ciclos en la reacción de PCR en tiempo real.



11. Desarrollo de curvas de dilución estándar y validación de productos específicos mediante curvas de disociación por PCR en tiempo real.

Empleando el Ct, como valor matemático, permitió obtener resultados fiables, a fin de conocer la cantidad de DNA inicial. Para ello, adicionalmente es preciso realizar cálculos matemáticos de regresión lineal que permitió conocer la eficiencia de amplificación por PCR en tiempo real, a través de la construcción de curvas de dilución seriada llamadas curvas estándar de dilución.

La representación de la curva estándar se obtiene a partir de la obtención de lecturas con base logarítmica de fluorescencia respecto del tiempo (número de ciclo=Ct) y recta del calibrador, con un orden de magnitud que disminuye con respecto a la concentración de un DNA diploide control (200ng, 20ng, 2ng, y 0.2ng). De este modo, los valores de Ct obtenidos están en función de la cantidad del DNA diploide inicial, a partir de cuyos valores se establece la normalidad diploide del DNA en número de copias, a partir del cual los datos son extrapolados para conocer la variación de CNV de las muestras de pacientes con cáncer.

Para el desarrollo de la curva disociación también llamada curva de fusión en un solo producto específico, se emplearon, muestras de concentraciones de DNA iniciales, amplificadas mediante PCR en tiempo real, en un mismo experimento, empleando un fluorocromo de unión inespecífica a la doble hebra del DNA (generalmente SYBR Green), a partir del cual se identifican los fragmentos amplificados de DNA específicos de un fragmento amplificado de interés, cuyos resultados son obtenidos a partir de la observación de la curva de disociación de las muestras de DNA positivas y analizadas.

Lo anterior, permite el posterior empleo de técnicas de electroforesis para visualizar los productos amplificados de todas las muestras. Los rendimientos representados corresponden a “n” reacciones, cuya fiabilidad se



debe a la existencia de réplicas independientes por reacción, la fluorescencia se muestra en unidades arbitrarias de fluorescencia.

11.1 Ensayos *In Vitro* de Inhibición de la Metilación del DNA y Remodelación de la Cromatina.

La metilación del DNA es un proceso epigenético que participa en la regulación de la expresión génica. Los genomas de las células comparten cambios importantes en los niveles de metilación, que constituyen eventos tempranos en el desarrollo de algunos tumores, entre los que se encuentran, la inhibición de la transcripción, con la consecuente pérdida de la expresión de genes constitutivos e individuales y de genes supresores de tumores.

Se emplearon líneas celulares de cáncer pulmonar las cuales fueron estimuladas con los siguientes fármacos: **Acido Valproico** (AV), que posee la capacidad de inhibir desmetilasas de histonas (HDACs), e **Hidralazina** (HIDR) la cual induce principalmente inhibición de la metilación de *ново* del DNA.

Estos ensayos se realizaron con cultivo celular por 24 horas y por 96hrs con estímulos de los dos fármacos en concentraciones de Hidralazina con 5mM y 1mM y de Ácido Valproico con 5mM y 10mM, para los cuales se eligieron un grupo de genes por su función del cromosoma 7 que son MEOX2, AHR, HDAC9, TWIST1, EVX1, B-actina como gen endógeno-control para el desarrollo de análisis de normalización de la expresión genética de cada gen estudiado.

Un total de 22 tumores con su tejido normal adyacente neoplásico, y 22 muestras de tejido pulmonar derivado de bloques en parafina de diferentes patologías pulmonares fueron estudiados. Estas últimas obtenidas del departamento de patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias INER, cada muestra de tejido fue examinado por el patólogo para confirmar el diagnóstico definitivo de patología, y agrupados por grupo y tipo de lesión pulmonar.

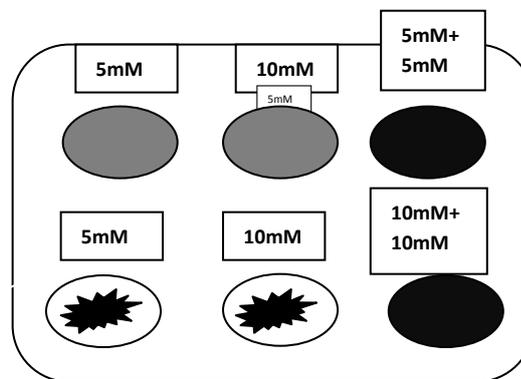


Por otro lado, fueron realizados ensayos de inhibición de la metilación del DNA sobre cultivos de las líneas celulares INER-37 e INER-51. Por periodos de 24hrs y 96hrs. En placas de 6 pozos, el cultivo se realizó con una población de 500,000 células por pozo aproximadamente.

Cada placa fue estimulada con:

- Hidralazina; inhibe la metilación del DNA reduciendo la metilación de *novo*. Se utilizó como concentración inicial de 1mM y 5mM.
- Ácido Valproico; causa inhibición de desacetilasas de histonas usadas en tumores causando re-inducción de la expresión del RNAm y proteínas. Se utilizó como concentración inicial de 5mM y final de 10mM.

La estimulación de las placas se realizó de la siguiente manera:



Hidralazina



Ácido Valproico



Mezcla Hidralazina y Acido Valproico.



Con relación a los tratamientos en combinación fueron empleadas las siguientes concentraciones: Un primer cultivo con la mezcla de 5mM de Ac. Valproico y 10mM de Hidralazina. Además de una mezcla con 10mM de Ac. Valproico y 10mM de Hidralazina. Para cada ensayo fueron incluidos cultivos en condiciones control libres de tratamiento, que incluyeron el uso del vehículo de dilución del fármaco (Etanol 70%).

Después del cultivo se recuperó el medio que contiene el botón celular se fijan en 1ml de trizol, y esto se hizo para cada uno de los pozos de la placa. Y se procesa para la extracción de DNA, RNA, Proteínas, cDNA y se procede a realizar una PCR en tiempo real.

Dichos ensayos fueron realizados por duplicado a diferentes tiempos de incubación el primero fue por 24 hrs, y el siguiente por 96 hrs para la línea celular INER-37 e INER-51.

12. Análisis estadístico

Para el estudio de correlación de aumento de CNV, Metilación y Expresión Relativa del RNAm, fueron empleadas prueba exacta de Fisher y análisis de covarianza para establecer diferencias estadísticas entre los distintos tipos de lesiones histológicas de pacientes y tratamientos de inhibición epigenética sobre líneas celulares in vitro, considerando estadísticamente significativas aquellas diferencias $p < 0.05$ aplicando pruebas de 2 colas, empleando para ello el programa estadístico SPSS (versión 11.0)

El método de análisis estadístico utilizado para el desarrollo de PCR en tiempo real fue basado en el análisis del $\Delta\Delta C_t$ mediante el cual se comparan ambos tanto el ΔC_t de la muestra problema con respecto a la muestra control o referencia, para ello fue necesario que la eficiencia de amplificación para todos los genes estudiados fueran similares, y con ello se obtuvieron los resultados para el análisis de CNV.



Otro método de análisis estadístico utilizado fue basado en el $\Delta\Delta C_t$, pero corregido o normalizado con genes de referencia o endógenos y con ello obtener el índice de expresión para muestras problema con respecto al índice de expresión de muestra control. Lo anterior tanto en ensayos de expresión de tejido pulmonar como en ensayos de expresión en líneas celulares de cáncer pulmonar.



13 Resultados

13.1. Identificación de CNV de alta frecuencia en el cromosoma 7

Análisis masivo del genoma realizados previamente por el grupo han indicado la presencia de aumento de CNV en carcinomas pulmonares de pacientes con diagnóstico definitivo de NSCLCs (Limón Rivas D. y Col 2011). Dicho análisis de CNV, tabla 7, indica alta frecuencia o prevalencia en la región 7p22.3-7p21.1 e incluso la región 7p15.3-p15.2 (Región con aumento de CNV indicada en color rojo).

UBICACION	COMIENZO	FIN	(bp)	REF SEC.	GEN SIMBOLO	FRECUENCIA EN CANCER
7p22.3	1573494	1576155	18891	NM_032302	PSMG3	68
7p22.3	1620631	1622854	117089	NR_001288	TFAMP1	72
7p22.3	1750632	1754116	99786	NM_001128636	ELFN1	72
7p22.1	6694588	6713091	26920	NM_006956	ZNF12	72
7p21.3	7188770	7250506	856449	NM_020156	C1GALT1	60
7p21.3	7643099	7724763	856449	NM_002947	RPA3	60
7p21.3	7974947	8095234	45496	NM_138426	GLCCII	60
7p21.2	13897380	13995289	3348707	NM_004956	ETV1	60
7p21.2	14151198	14847600	3348707	NM_004080	DGKB	60
7p21.1	15617361	15692833	3348707	NM_005924	MEOX2	60
7p21.1	16097683	16427472	3348707	NM_001101417	LOC729920	60
7p21.1	16652283	16712672	150674	NM_014038	BZW2	56
7p21.1	16759875	16790686	38005	NM_014399	TSPAN13	60
7p21.1	16797959	16811133	72616	NM_006408	AGR2	60
7p21.1	16865554	16888138	1213086	NM_176813	AGR3	60
7p21.1	17304831	17352299	1213086	NM_001621	AHR	60
7p21.1	18032924	18034011	1213086	NM_175886	PRPS1L1	60
7p21.1	18501893	19003517	651318	NM_178423	HDAC9	60
7p21.1	19121615	19123820	101430	NM_000474	TWIST1	60
7p21.1	19150929	19151569	101430	NM_152898	FERD3L	60
7p15.3	19701609	19715185	1364459	NM_001002926	TWISTNB	60
7p15.3	20653740	20761821	76919	NM_178559	ABCB5	60
7p15.3	20788419	20793030	113248	NM_182700	SP8	60
7p15.3	21434213	21520676	174422	NM_003112	SP4	60
7p15.3	21907041	21952042	832114	NM_018719	CDCA7L	60
7p15.3	22124432	22363058	832114	NM_012294	RAPGEF5	60
7p15.3	22733342	22738145	329685	NM_000600	IL6	56
7p15.2	26196080	26206938	124838	NM_002137	HNRNPA2B1	56
7p15.2	26207848	26219501	124838	NM_016587	CBX3	56
7p15.2	27099138	27102150	247715	NM_153620	HOXA1	56
7p15.2	27106497	27108919	247715	NM_006735	HOXA2	56
7p15.2	27112333	27120141	247715	NM_153632	HOXA3	56
7p15.2	27134650	27136924	247715	NM_002141	HOXA4	56
7p15.2	27147520	27149812	247715	NM_019102	HOXA5	56
7p15.2	27159862	27162821	247715	NM_006896	HOXA7	56
7p15.2	27168581	27171674	247715	NM_152739	HOXA9	56
7p15.2	27176734	27180480	247715	NM_018951	HOXA10	56
7p15.2	27203023	27206250	247715	NM_000522	HOXA13	56
7p15.2	27248688	27252717	247715	NM_001989	EVX1	56

Tabla 7, muestra la región de aumento de CNV de alta frecuencia en el brazo corto del cromosoma 7, donde se indica la localización de genes seleccionados para su estudio.



Lo anterior, mediante el uso de la plataforma de microarreglos SNP500K (Affymetrix), no obstante mediante el análisis *in silico* de la función de los genes ubicados en la región antes mencionada, a través del uso de la base de datos del Genome Browser y Genome Data Bases (Gene bank), fueron seleccionados genes indicados en color amarillo (tabla 7) y el diseño de oligonucleótidos para su validación en PCR en tiempo real (tabla 1).

13.2 Ensayos de validación de CNV mediante PCR en tiempo real.

Para el desarrollo de ensayos de validación en tiempo real, se realizó un pool de muestras de DNA de 6 individuos clínicamente sanos, a partir del cual se desarrollaron curvas estándar de amplificación para el análisis cuantitativo por PCR en tiempo real con la finalidad de establecer análisis de extrapolación de CNV para su posterior análisis estadístico.

Al comparar los porcentajes de Ct en cada uno de los genes analizados se observó que solo en cinco, de una lista de once genes (MEOX2, HDAC9, AHR, TWIST1, EVX1) presentan variación en el número de copias en la progresión neoplásica; Así mismo cabe mencionar que dichos genes fueron analizados con relación a un gen endógeno control propuesto como es EXV2, el cual está localizado en la región 2q31.1 en el cromosoma número 2.

Figura 2, muestra el valor de amplificación por PCR en tiempo real, el eje vertical nos indica unidades relativas de fluorescencia normalizada (ΔR_n) y el eje horizontal el tiempo o número de ciclos.

Figura 3, indica los valores de amplificación por PCR en tiempo real detectado cambios significativos en las unidades relativas de fluorescencia, así como las curvas de amplificación que determinan el valor Ct o ciclo umbral de amplificación empleado para la cuantificación tanto absoluta (Análisis de CNV) como relativa (Análisis de expresión). El cálculo del Ct se estima basado en la fase exponencial de la curva de amplificación.

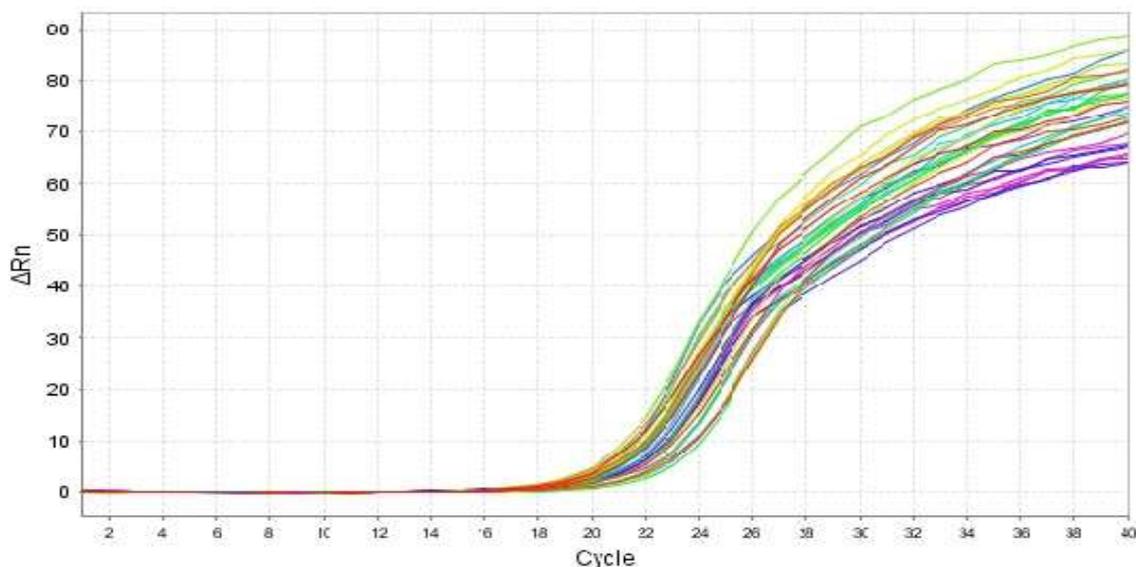


Figura 2, amplificación en PCR en tiempo real de diferentes muestras neoplásicas (curvas en colores) y con ello conocer el valor del ciclo justo donde se empieza su amplificación.

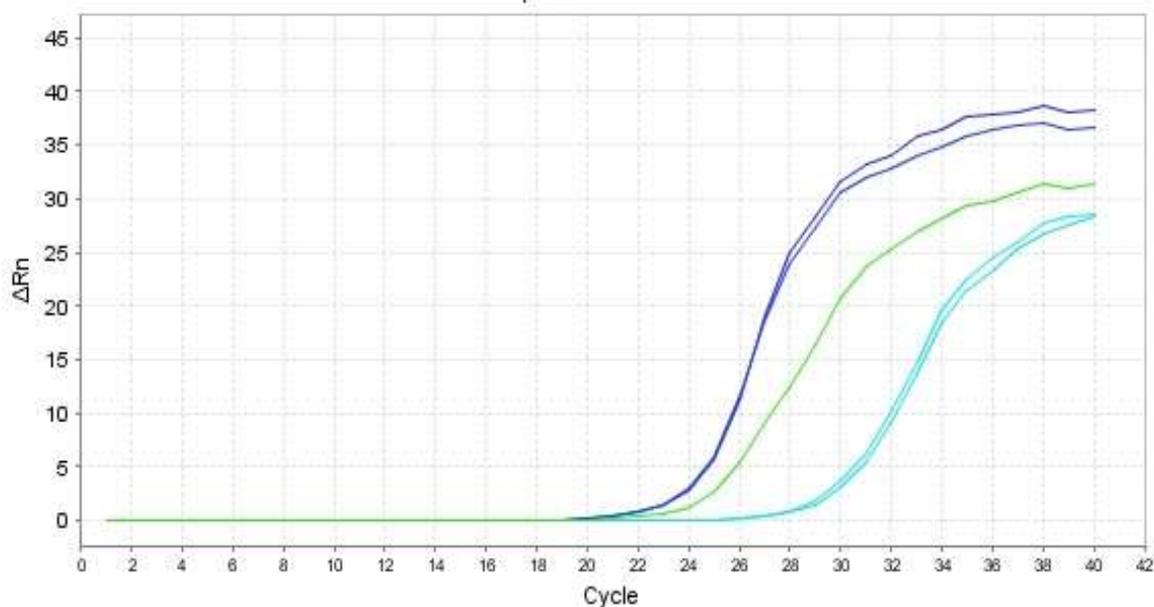


Figura 3, amplificación de PCR en tiempo real en muestras neoplasicas pulmonares (Tumor pulmonar en tonalidad azul marino, en tonalidad verde claro muestras de precursora y en muestras de tejido pulmonar normal adyacente en color azul claro), el cual nos determina el valor de Ct para conocer la cuantificación en cada una de las muestras analizadas.



Adicional con lo anterior, fue importante verificar la amplificación de un producto específico en PCR en tiempo real, mediante curvas de disociación del producto único amplificado (a), así como las curvas de amplificación de dilución seriado curva estándar de DNA diploide para su posterior análisis (b), mientras que análisis de regresión lineal logarítmica de la curva estándar y sus valores de eficiencia de amplificación (c) figura 4.

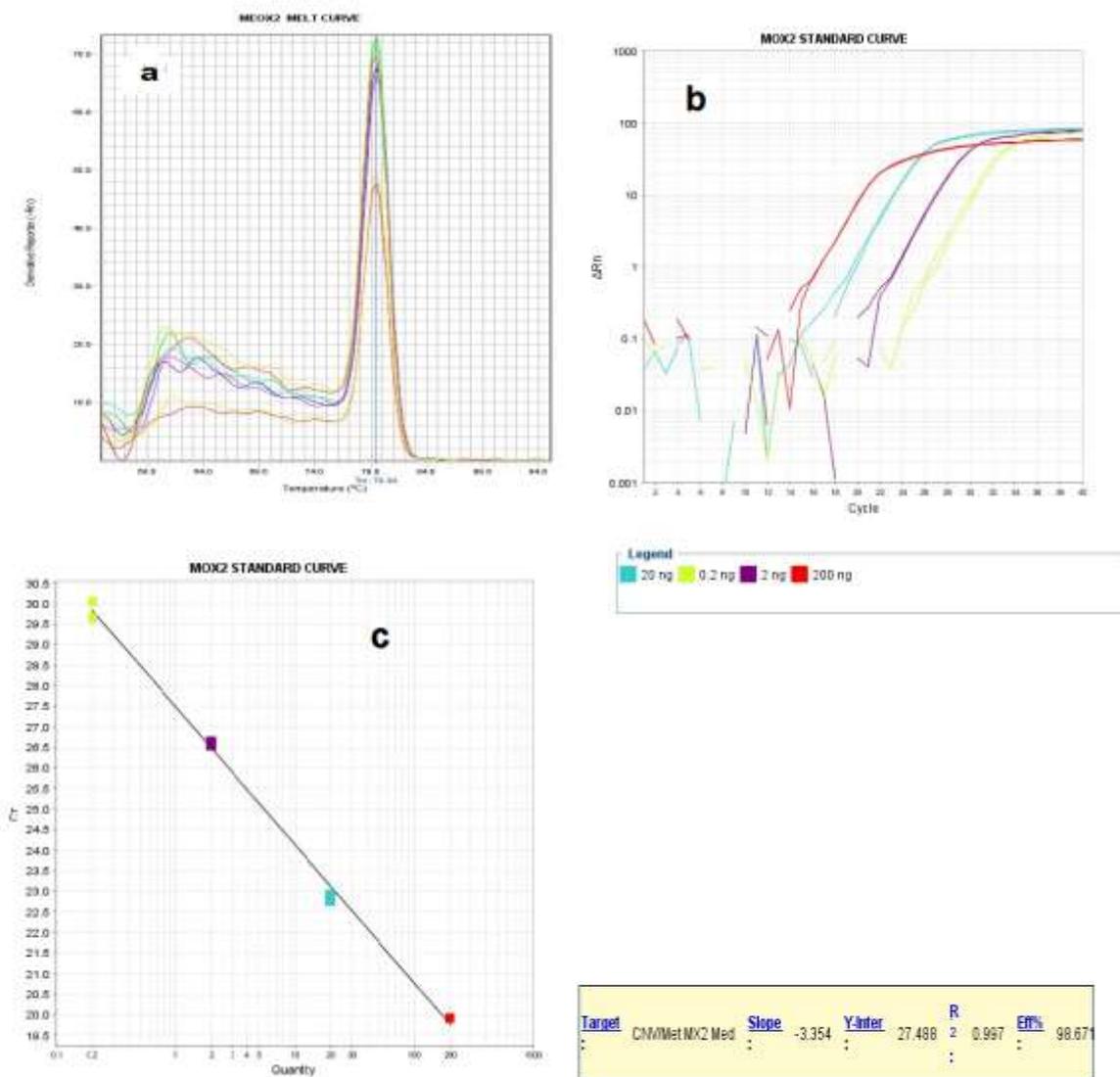


Figura 4. curva de disociación para el gen MEOX2 que indica la amplificación de un producto específico, así como la construcción de curvas estándar basadas en la dilución serial del DNA, para el desarrollo de análisis de eficiencia de amplificación y pendiente de regresión lineal logarítmica para PCR en tiempo real para los oligonucleótido estudiado.



Análisis de curvas de disociación, curvas Estándar y regresión lineal para curvas de eficiencia de amplificación, fueron realizados mediante el uso de DNA obtenido de células mononucleares de sangre periférica a partir de dos muestras o pools de DNA constituido de seis donantes clínicamente sanos cada uno, respectivamente. Lo anterior para el desarrollo de PCR en tiempo real para cada gen propuesto en el presente estudio (tabla. 7). Todos los ensayos de amplificación mostraron porcentajes de eficiencia de amplificación superiores a 98%, con pendientes entre el rango de -3.0 y -3.5, un coeficiente de regresión lineal (R^2) de 0.99 (figura 4).

- ➔ **Nota:** Cabe mencionar que a menor Ct de amplificación obtenido por PCR en tiempo real sobre el DNA genómico, esto indica mayor variación del número de copias (CNV); mientras que a mayor resulta en menor CNV.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de ensayos de validación por PCR para el estudio de la variación en el número de copias (CNV) de genes localizados en la región 7p21.1 y 7p21.3, entre ellos: MEOX2, HDAC9, AHR, TWIST1, HNB1, EVX1; así como EVX2 localizado en el cromosoma 2. Los resultados representan la media \pm la desviación estándar (S.D.) del valor de Ct, obtenido ordenado por grupos de estudio, como se muestra en la figura 4.

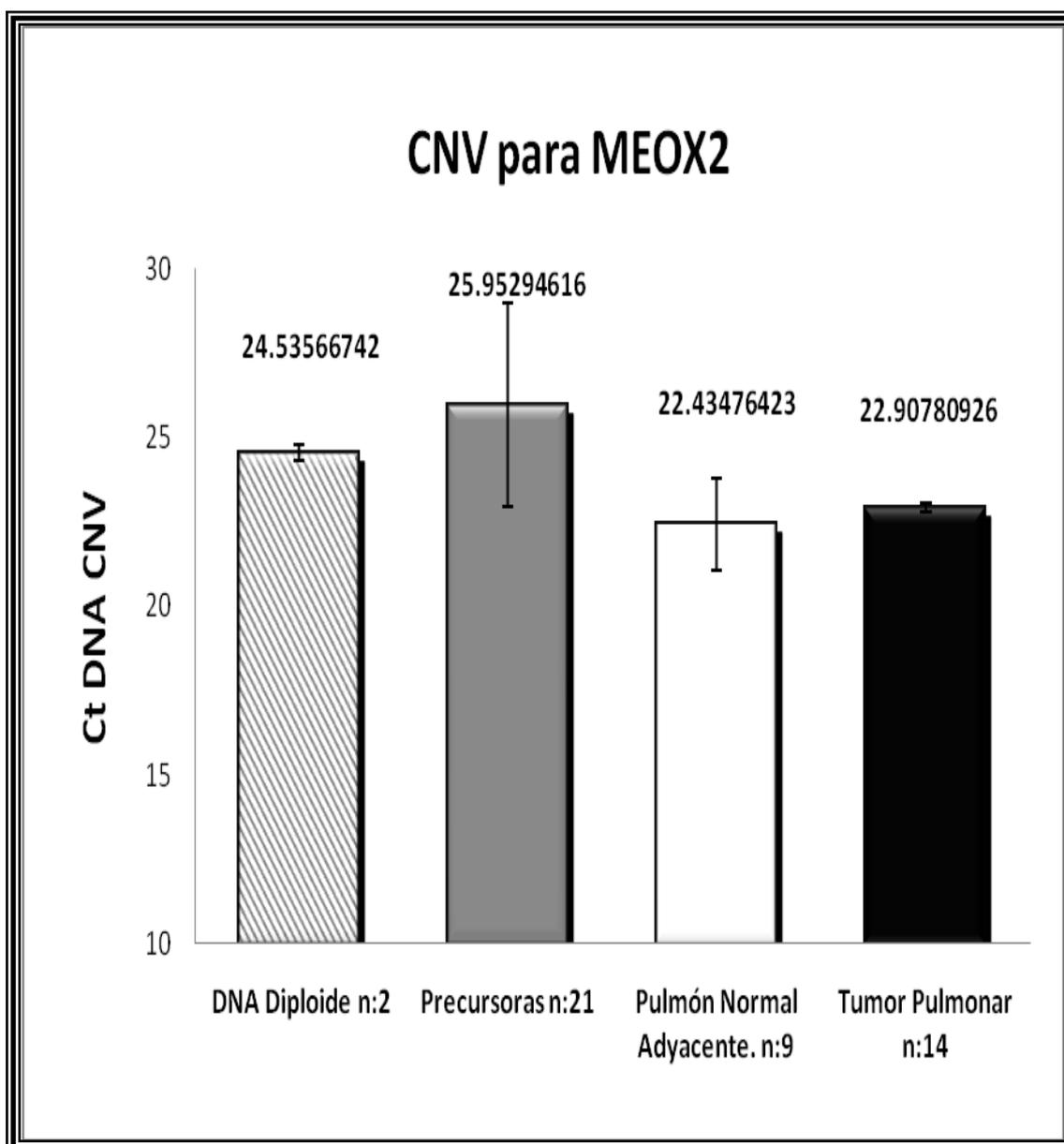


Figura 5, análisis de CNV para el gen MEOX2, mediante ensayos de PCR en tiempo real, donde las muestras de DNA Diploide (2 pools de DNA contruidos a partir de 6 donantes c/u) n=2 en color gris a rayas, lesiones precursoras en color gris n=21, tejido pulmonar normal adyacente a la neoplasia en color blanco n=9, y tumores pulmonares en color negro n=14.

En la figura 5, se observa aumento de CNV tanto en tumores pulmonares (22.9078) como en tejido pulmonar histológicamente normal adyacente a la neoplasia (22.4347), representado mediante el análisis del valor del Ct obtenido por PCR tiempo real, todo ello en contraste con el nivel de amplificación obtenido del DNA diploide de donantes clínicamente sanos. Cabe mencionar que de igual forma aumento de CNV fueron detectados en las líneas celulares A-427, INER-37 e INER-51 (datos no mostrados).

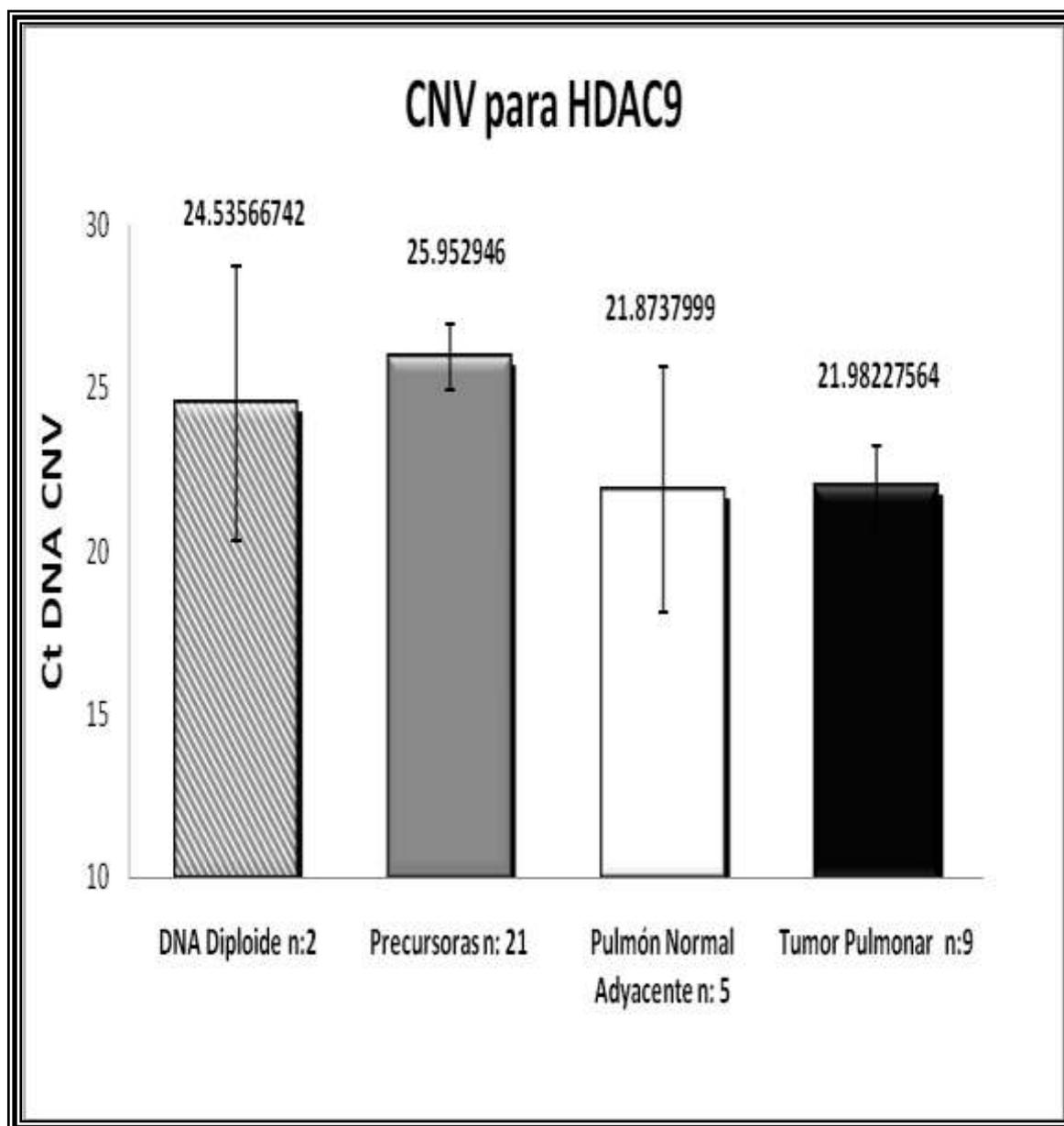


Figura 6, análisis de CNV para el gen HDAC9, mediante ensayos de PCR en tiempo real, donde las muestras de DNA Diploide n=2 (2 pools de DNA contruidos a partir de 6 donantes c/u) en color gris a rayas, lesiones precursoras en color gris n=21, pulmón normal adyacente a la neoplasia en color blanco n=5, y tumores pulmonares en color negro n=9.

En la figura 6, se observa aumento de CNV en tumores pulmonares (21.9822), como en tejido pulmonar histológicamente normal adyacente a la neoplasia (21.8737), representado mediante el análisis de Ct por PCR tiempo real, respecto del nivel de amplificación obtenido del DNA diploide de donantes clínicamente sanos. Así mismo, aumento de CNV fueron detectados en las líneas celulares A-427, INER-37 e INER-51 (datos no mostrados).

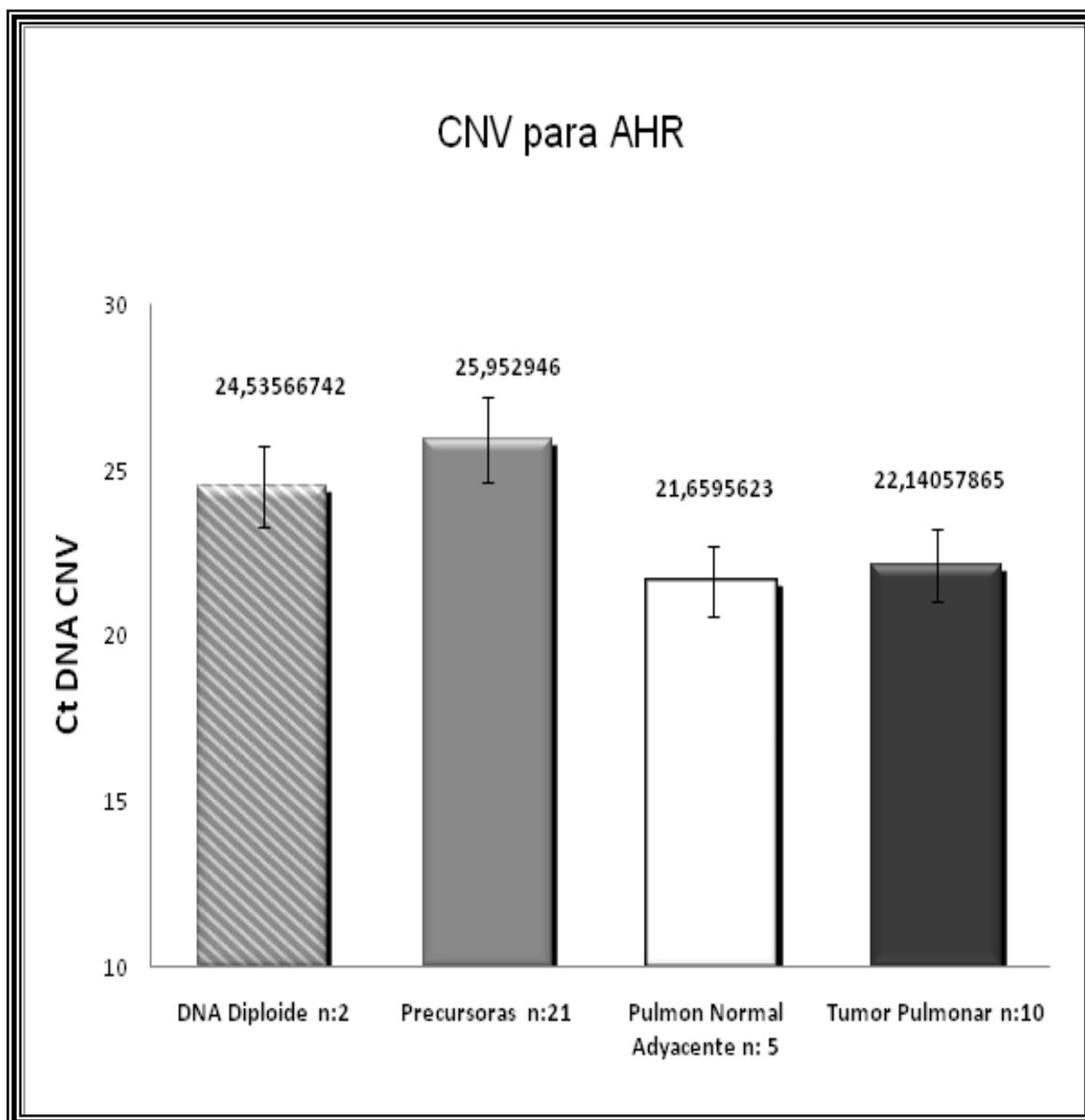


Figura 7, análisis de CNV para el gen AHR, mediante ensayos de PCR en tiempo real, donde las muestras de DNA Diploide n=2 (2 pools de DNA construido a partir de 6 donantes c/u) en color gris a rayas, lesiones precursoras en color gris n=21, tejido pulmonar normal adyacente a la neoplasia en color blanco n=5, y tumores pulmonares en color negro n=10.

En la figura 7, se observa aumento de CNV tanto en tumores pulmonares (22.1405), como en tejido pulmonar histológicamente normal adyacente a la neoplasia (21.6595), representado mediante el análisis de Ct por PCR tiempo real, respecto del nivel de amplificación obtenido al analizar el DNA diploide de células de sangre periférica de donantes clínicamente sanos. Adicionalmente, aumento de CNV fueron detectados en las líneas celulares A-427, INER-37 e INER-51 (datos no mostrados).

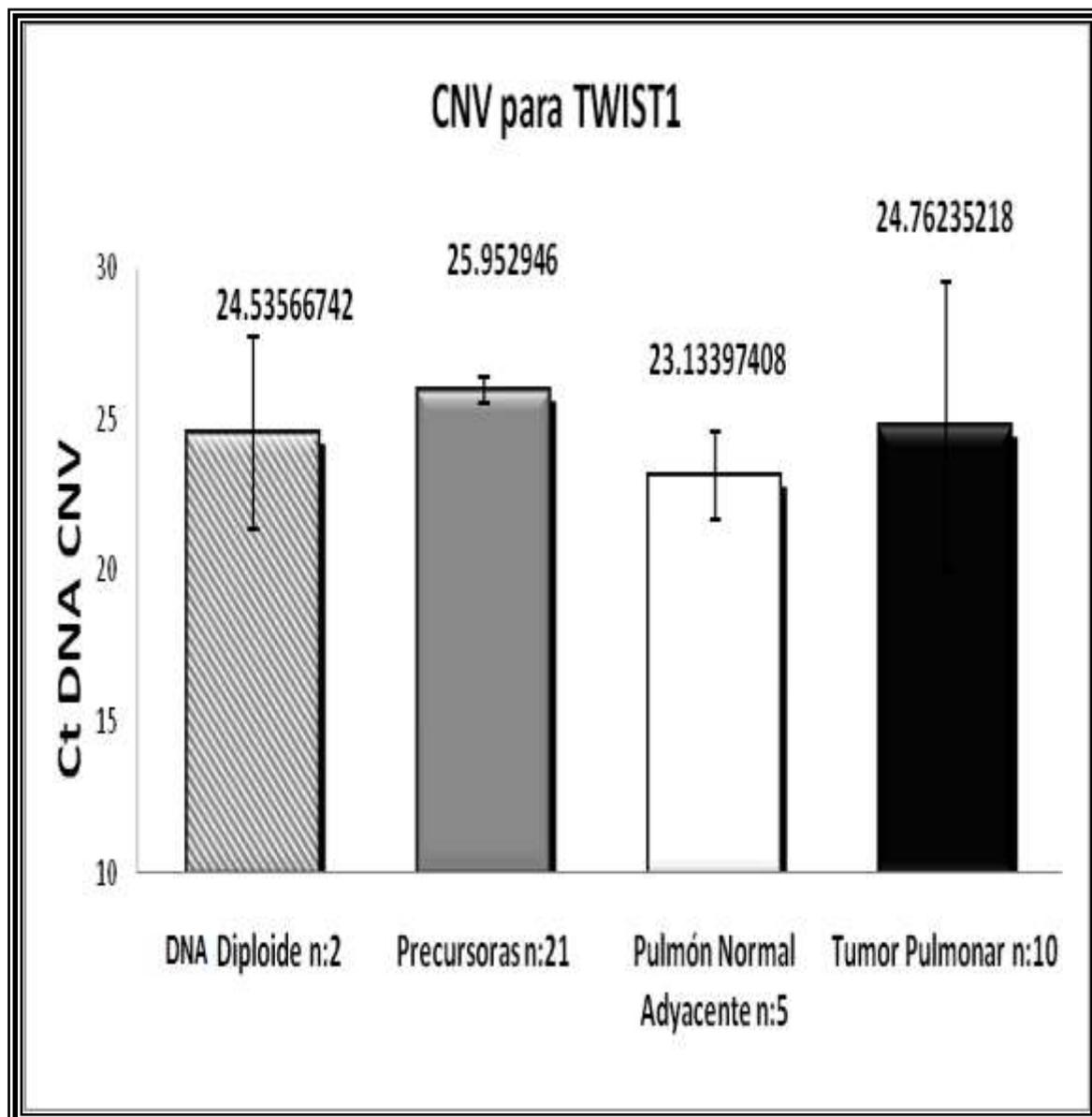


Figura 8, análisis de CNV para el gen TWIST1, mediante ensayos de PCR en tiempo real, donde las muestras de DNA Diploide n=2 (2 pools de DNA construido a partir de 6 donantes c/u) en color gris a rayas, lesiones precursoras en color gris n=21, tejido pulmonar normal adyacente a la neoplasia en color blanco n: 5, y tumores pulmonares en color negro n: 10.

En la figura 8, se observa aumento de CNV en tejido pulmonar histológicamente normal adyacente a la neoplasia (23.1339), representado mediante el análisis de Ct por PCR tiempo real, respecto del nivel de amplificación obtenido al analizar DNA diploide de donantes sanos. Siendo de igual forma detectado aumento de CNV en las líneas celulares A-427, INER-37 e INER-51 (datos no mostrados).

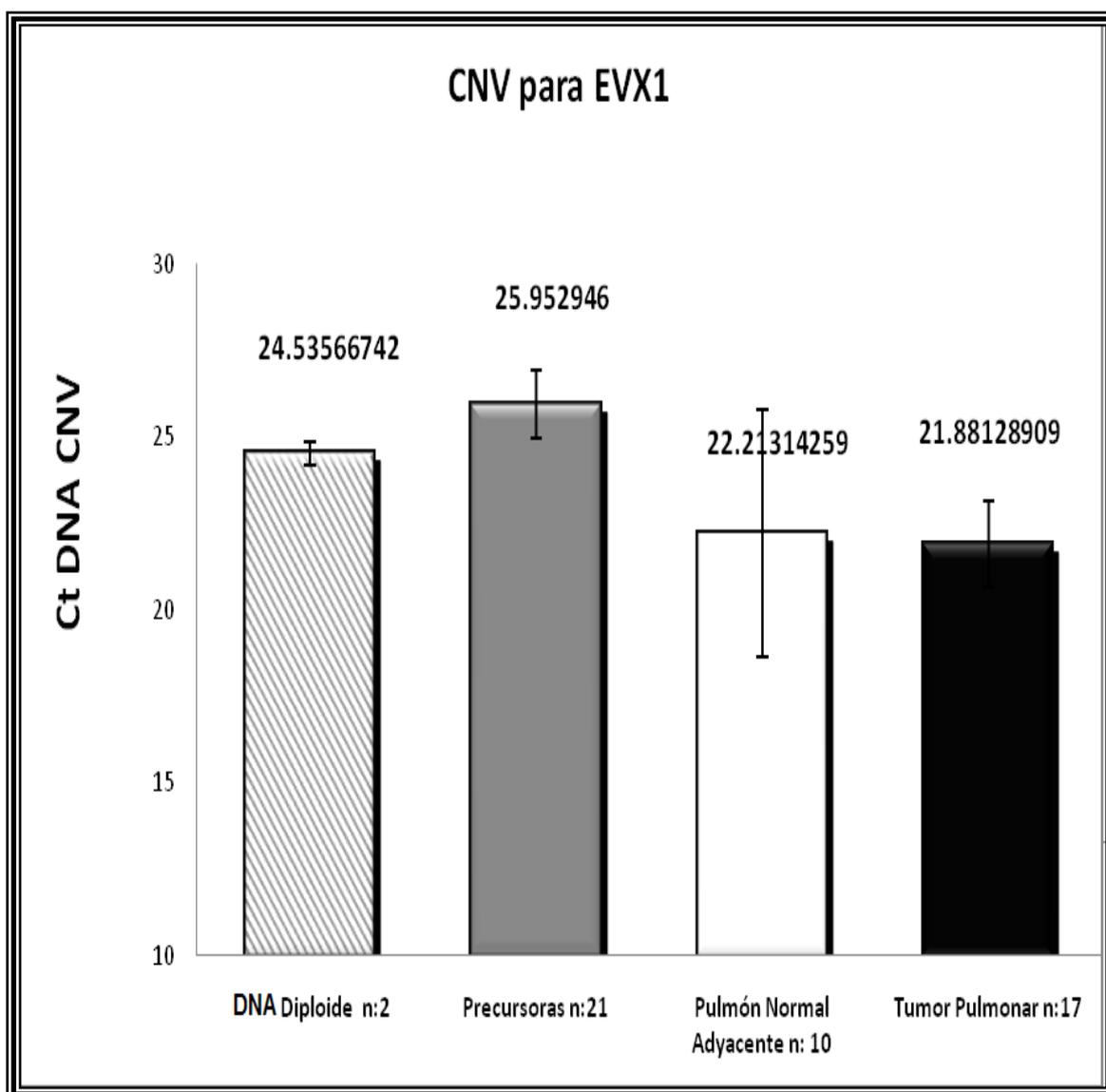


Figura 9, análisis de CNV para el gen EVX1, mediante ensayos de PCR en tiempo real, donde se indican las muestras de DNA Diploide n=2 (2 pools de DNA construido a partir de 6 donantes c/u) en color gris a rayas, lesiones precursoras en color gris n=21, tejido pulmonar normal adyacente a la neoplasia en color blanco n=10, y tumores pulmonares en color negro n=17.

En la figura 9, se observa una tendencia al aumento de CNV en tejido pulmonar histológicamente normal adyacente a la neoplasia (22.2131), como en los tumores pulmonares (21.8812), siendo solo este último estadísticamente significativo mediante el análisis de Ct por tiempo real, con respecto del nivel de amplificación obtenido en muestras de DNA diploide control e incluso frente a lesiones precursoras, donde no se observaron cambios en los niveles de expresión del RNAm. Adicionalmente aumento de CNV fueron detectados para las líneas celulares A-427, INER-37 e INER-51 (datos no mostrados).

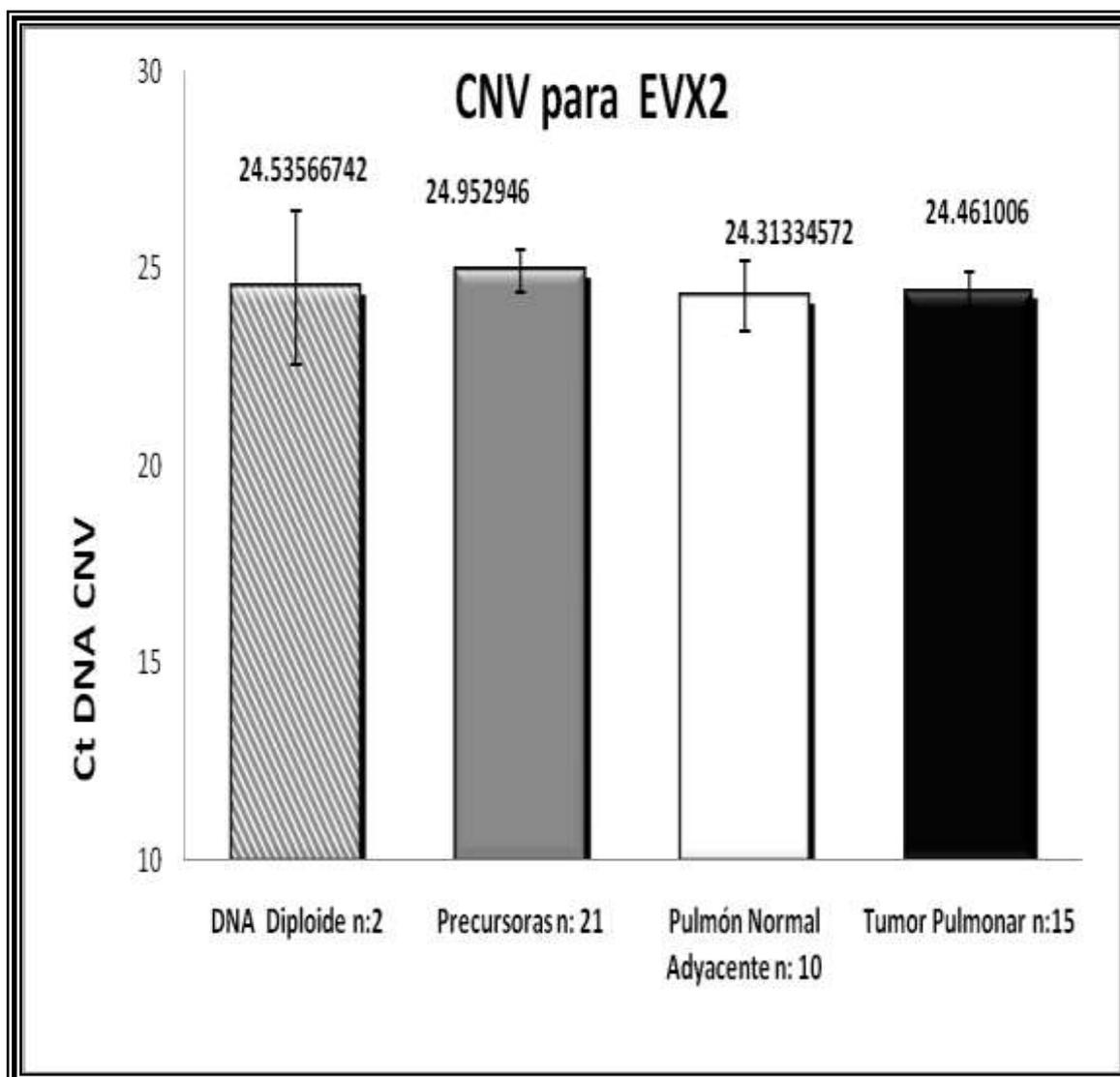


Figura 10, análisis de CNV para el gen EVX2, mediante ensayos de PCR en tiempo real, donde se indican las muestras de DNA Diploide n=2 (2 pools de DNA construido a partir de 6 donantes c/u) en color gris a rayas, lesiones precursoras en color gris n=21, tejido pulmonar normal adyacente a la neoplasia en color blanco n=10, y tumores pulmonares en color negro n=15.

Por último respecto al análisis de CNV para el gen EVX2 localizado en el cromosoma 2, en la figura 10, se muestran ausencia de cambios en CNV, representado mediante el análisis de Ct por tiempo real, comparando el nivel de amplificación obtenido a partir del DNA diploide. El análisis del gen EVX2 fue utilizado como gen endógeno control que permitiera la comparación con genes de una región citogenética fuera de la región 7p21.1 y dado que no existen reportes de alteraciones de CNV para dicho gen EVX2. Tal resultado confirma que los cambios observados en el aumento de CNV para los genes



propuestos en el presente estudio son debidos a alteraciones de tipo genético en lesiones del cáncer pulmonar y no debido a errores metodológicos.

Respecto a lo anterior, es importante señalar que resulta sorprendente el aumento de CNV en pulmón normal adyacente a la neoplasia en la mayoría de los casos excepto en el gen propuesto como endógeno control EVX2 fuera de la región citogenética 7p21.1; mientras que el comportamiento de lesiones precursoras pulmonares es muy semejante al observado en el DNA diploide obtenido de sangre periférica de donantes clínicamente sanos.

Debido a lo anterior, resultó importante estudiar los niveles de expresión de estos y otros genes residentes de la región 7p21.1., que pudieran o no depender del aumento de CNV o bien de otros mecanismos de regulación epigenética. Por lo que, a continuación se indican los ensayos del análisis de expresión genética de los genes seleccionados de la región 7p21.1 y 7p21.3 entre ellos: MOX2, HDAC9, AHR, TWIST1, EVX1 todos ellos normalizados contra el gen endógeno **β -actina**.



A continuación se describe el resultado de las condiciones de amplificación y ciclaje para el análisis de expresión del RNAm, por PCR en tiempo real (figura 11).

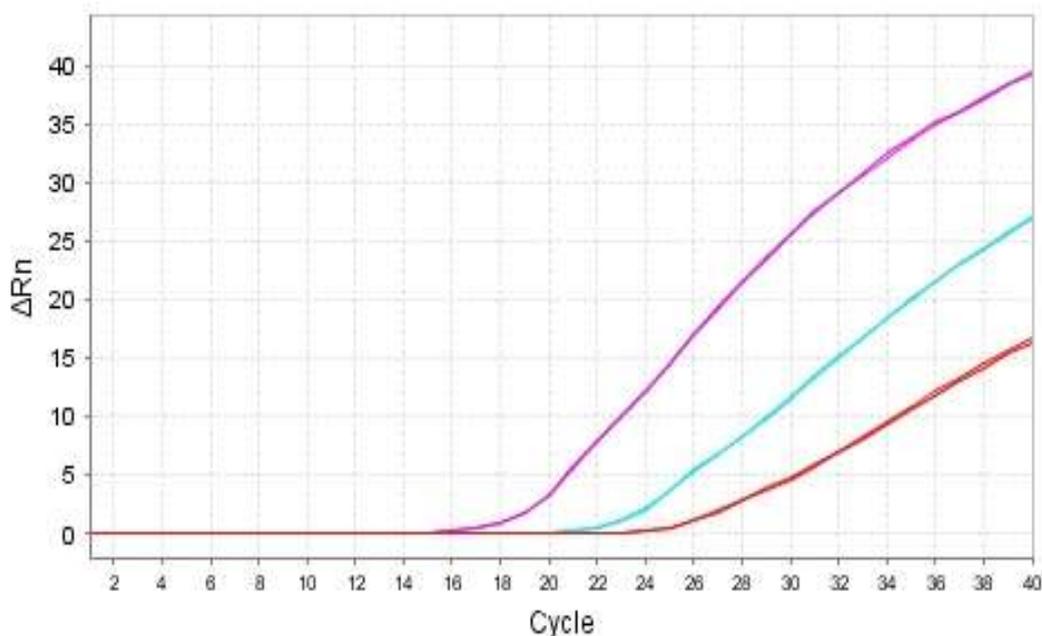


Figura 11, amplificación del RNAm de muestras neoplásicas pulmonares (tumor pulmonar en tonalidad rosa, precursora en color azul y pulmón normal adyacente en tonalidad rojo), el cual nos determina valor del Ct para conocer la cuantificación en cada una de las muestras analizadas para cada juego de Oligonucleotido empleado.

13.3 Análisis de expresión del RNAm de genes en la región 7p21.1 en cáncer pulmonar.

Los ensayos de PCR en tiempo real, se realizaron mediante el análisis de muestras que representan la progresión neoplásica pulmonar, así como también el análisis de dos líneas celulares de cáncer pulmonar tipo AD llamadas INER-37 e INER-51 las cuales se utilizaron como modelo de estudio in vitro del cáncer pulmonar, a partir de las que fue sintetizado cDNA.

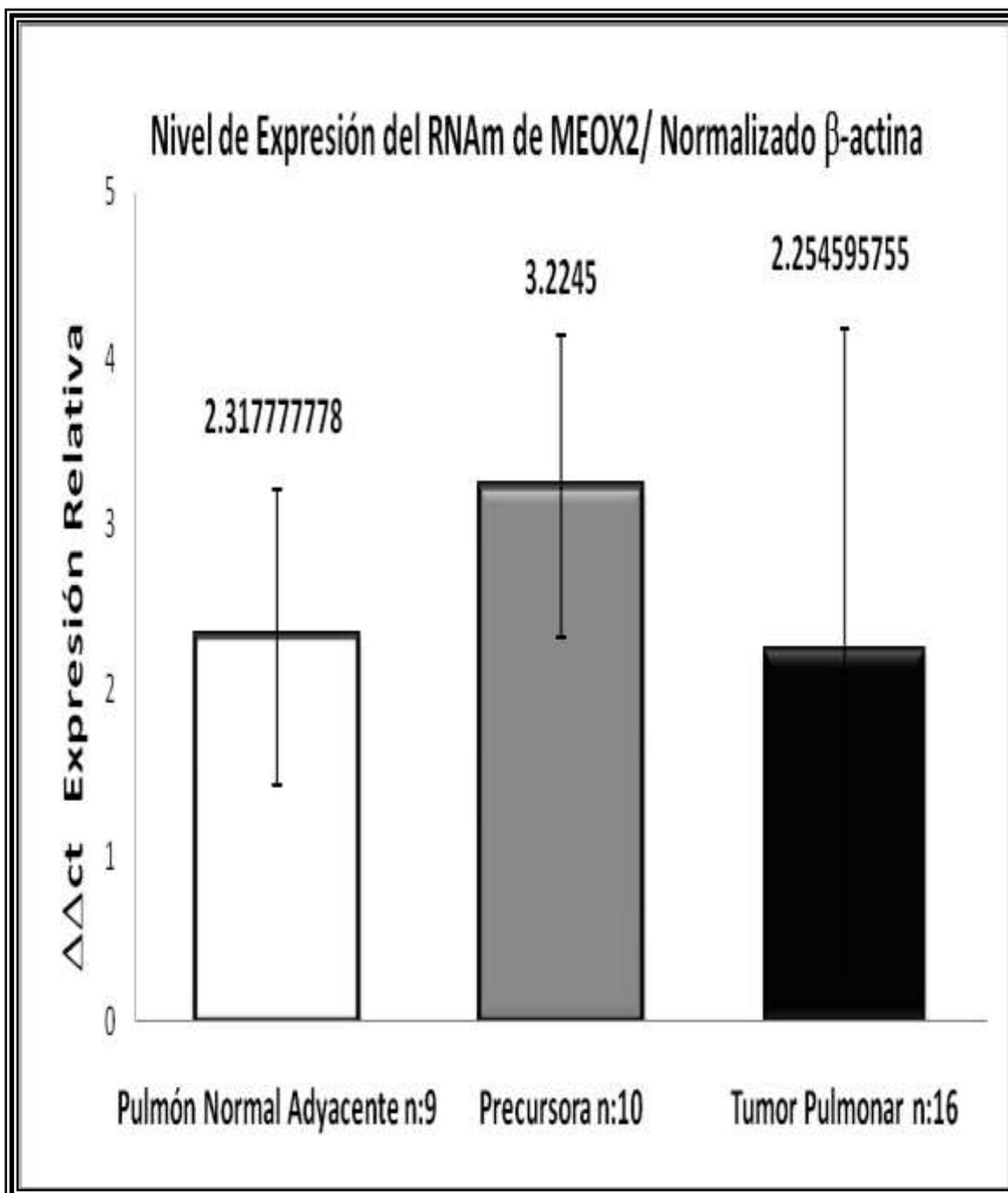


Figura 12, análisis de expresión que muestra el índice relativo de expresión normalizado contra β actina, para el gen MEOX2, mediante ensayos de PCR en tiempo real, donde se indican 3 grupos de muestras en estudio, tejido pulmonar normal adyacente a la neoplasia en color blanco n= 9, lesiones precursoras pulmonares en color gris n=10, y tumores pulmonares en color negro n=16.

En la figura 12, podemos observar una tendencia de aumento en la expresión del RNAm del gen MEOX2 en lesiones precursoras pulmonares, ya que presenta mayor nivel en la media de expresión relativa ($\Delta\Delta C_t = 3.2245$), cuyos valores se encuentran normalizados contra β actina.

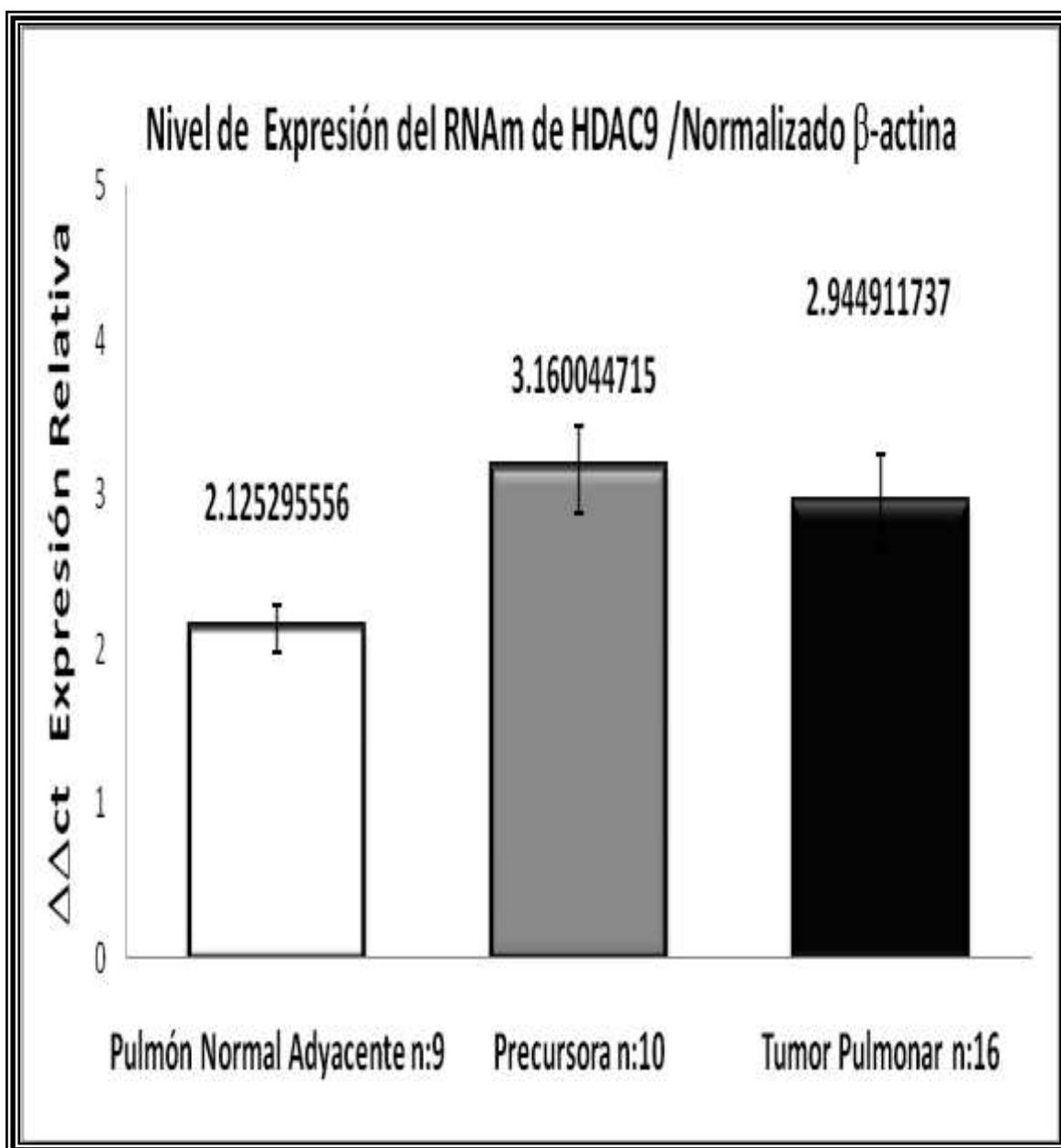


Figura 13, análisis de expresión que muestra el índice relativo de expresión normalizado contra β actina, para el gen HDAC, mediante ensayos de PCR en tiempo real, donde se indican 3 grupos de muestras en estudio, tejido pulmonar normal adyacente a la neoplasia en color blanco n= 9, lesiones precursoras pulmonares en color gris n= 10, y tumores pulmonares en color negro n= 16.

En la figura 13, podemos observar una tendencia de aumento en la expresión del RNAm del gen HDAC9 tanto en lesiones precursoras como tumor pulmonar, ya que presenta mayor nivel en la media de expresión relativa ($\Delta\Delta Ct=3.1600$ y 2.9449 , respectivamente), con relación al tejido histológicamente normal, en cuyo caso todos los valores se encuentran normalizados contra β actina.

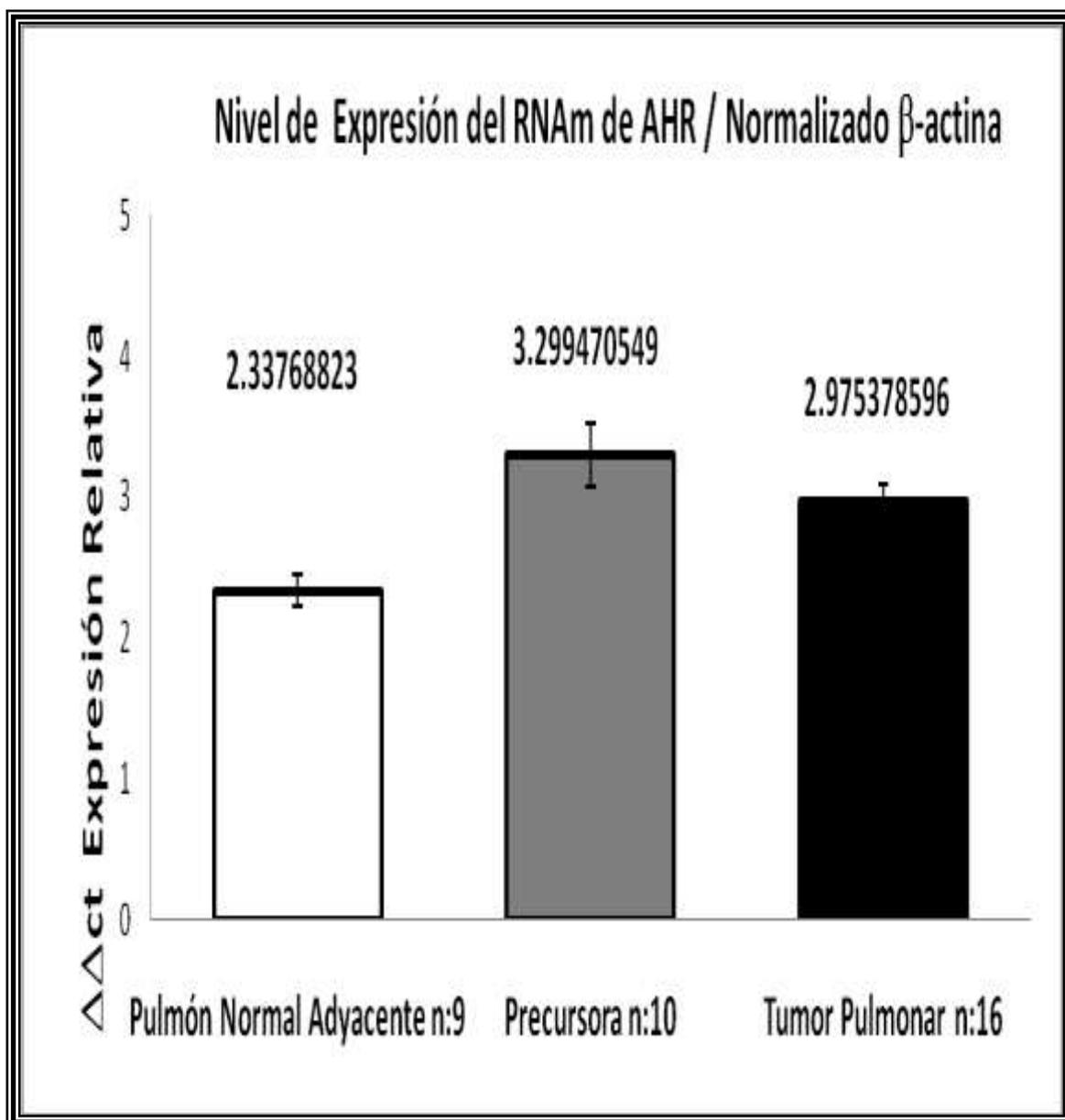


Figura 14, análisis de expresión que muestra el índice relativo de expresión normalizado contra β actina, para el gen AHR, mediante ensayos de PCR en tiempo real, donde se indican 3 grupos de muestras en estudio, tejido pulmonar normal adyacente a la neoplasia en color blanco n= 9, lesiones precursoras pulmonares en color gris n= 10, y tumores pulmonares en color negro n= 16.

Al igual que en la figura anterior, en la figura 14, podemos observar una tendencia de aumento en la expresión del RNAm del gen AHR tanto en lesiones precursoras como tumor pulmonar, ya que presentan mayor nivel en la media de expresión relativa ($\Delta\Delta\text{Ct}=3.2994$, y $\Delta\Delta\text{Ct}=2.9753$, respectivamente), con relación al tejido histológicamente normal, todos los valores se encuentran normalizados contra β actina.

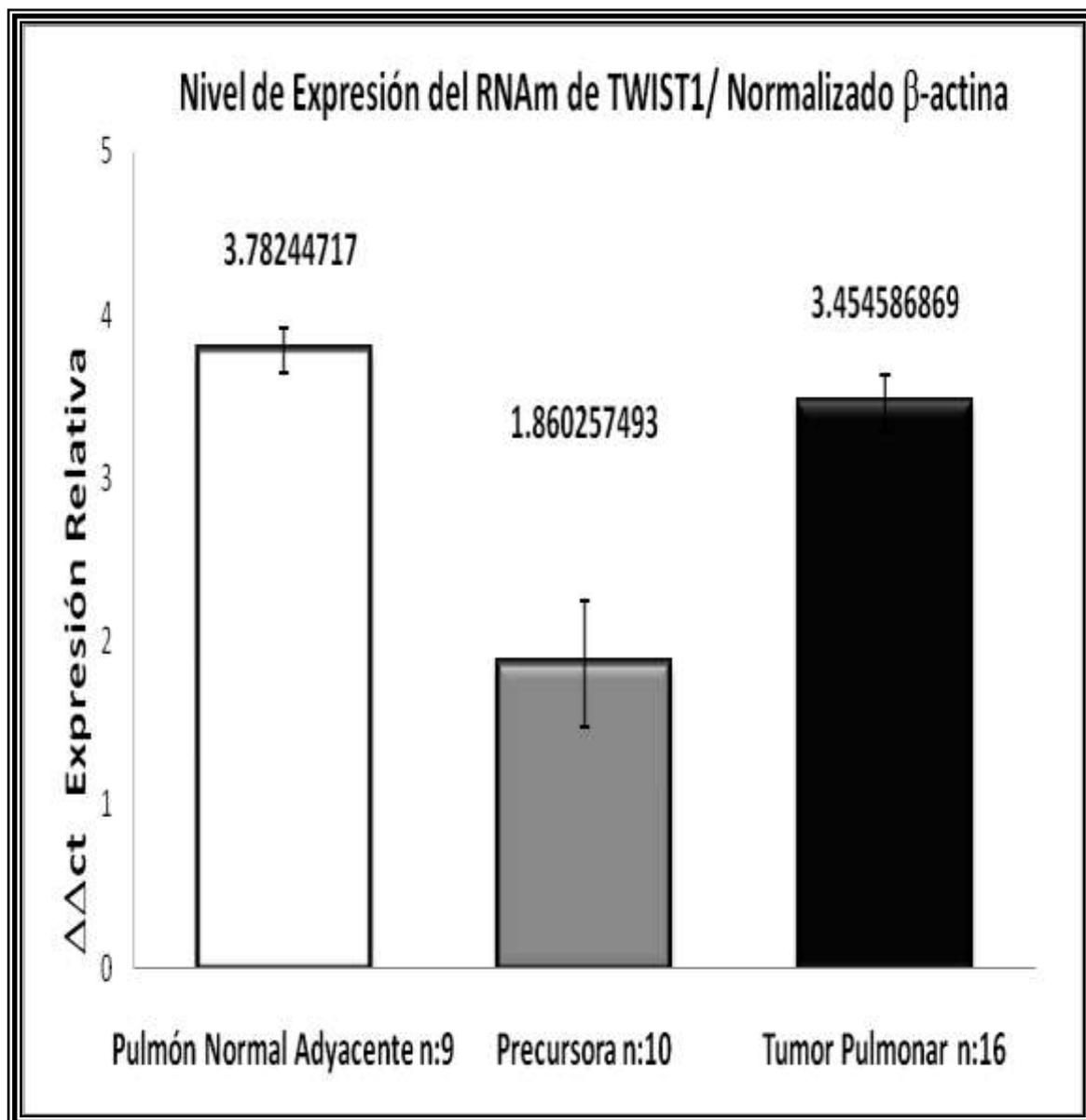


Figura 15, análisis de expresión que muestra el índice relativo de expresión normalizado contra β actina, para el gen TWIST1, mediante ensayos de PCR en tiempo real, donde se indican 3 grupos de muestras en estudio, tejido pulmonar normal adyacente a la neoplasia en color blanco n=9 lesiones precursoras pulmonares en color gris, n=10 lesiones y tumores pulmonares en color negro n=16.

En la figura 15, en contraste con la figura anterior (figura 14), podemos observar una tendencia en la disminución del índice de expresión relativa del RNAm para el gen TWIST1 en lesiones precursoras con $\Delta\Delta Ct = 1.860$, en contraste de tumores pulmonares y tejido pulmonar histológicamente normal adyacente a la neoplasia con valores de expresión relativa $\Delta\Delta Ct = 3.4545$ y $\Delta\Delta Ct = 3.78$, respectivamente.

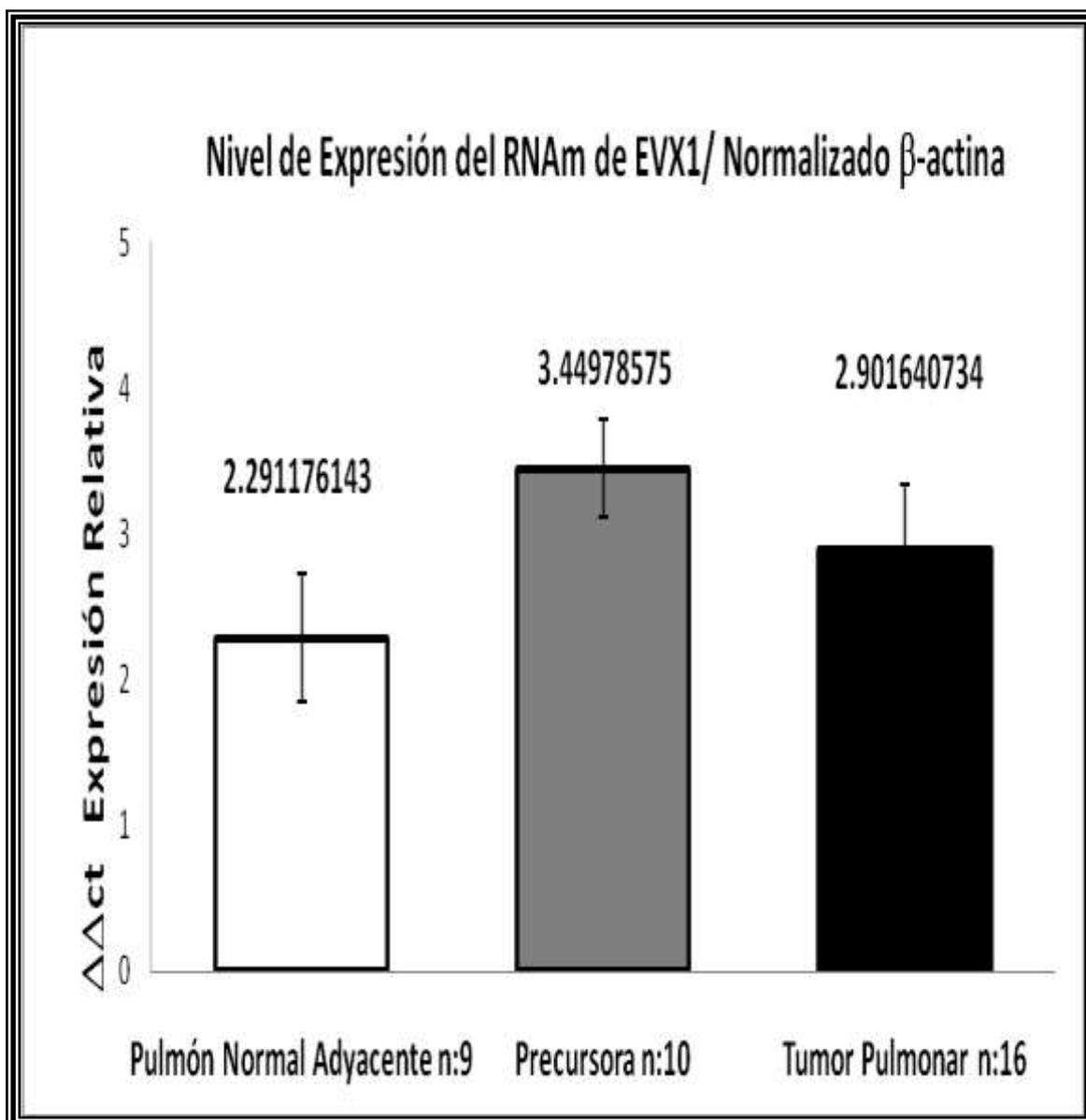


Figura 16, análisis de expresión que muestra el índice relativo de expresión normalizado contra β actina, para el gen EVX1, mediante ensayos de PCR en tiempo real, donde se indican 3 grupos de muestras en estudio, tejido pulmonar normal adyacente a la neoplasia en color blanco n=9, lesiones precursoras pulmonares en color gris n=10, y tumores pulmonares en color negro n=16.

En la figura 16, en contraste con la figura anterior (figura 15), podemos observar una tendencia de aumento en la expresión del RNAm para el gen EVX1 la cual destaca en lesiones precursoras ($\Delta\Delta Ct= 3.4497$), mientras que en menor grado en tumor pulmonar ($\Delta\Delta Ct= 2.9016$), comparado con tejido pulmonar histológicamente con valores promedio de expresión relativa de $\Delta\Delta Ct= 2.2911$).



Respecto a todo lo anterior, llama la atención que pese a mostrar aumento de CNV tanto en tejido histológicamente normal como en tejido de tumores pulmonares, en contraste de lesiones precursoras pulmonares, las tendencias de expresión del RNAm, sean diferentes en los distintos tipos de lesiones ingresadas al presente estudio. Dicho lo cual, nuestro siguiente objetivo fue determinar la posible participación de posibles mecanismos de regulación epigenética (metilación del DNA o modificación química de histonas por acetilación). Por lo que, ensayos de inhibición de la metilación e inhibición de desacetilasas de histonas *in vitro* fueron realizados sobre muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD (INER-37 e INER-51), en cuyos ambos casos poseen aumento de CNV. Sin embargo, datos preliminares de análisis de su epigenoma indican diferencias en cuanto al nivel de metilación del DNA genómico (datos en preparación). Todo lo anterior, con el fin de encontrar posibles grados de correlación de aumento de CNV o regulación epigenética sobre los niveles de expresión del RNA en muestras de pacientes con cáncer pulmonar.



13.4 Ensayos In vitro de Inhibición de la Metilación de secuencias y desacetilasas de histonas sobre líneas celulares de cáncer pulmonar.

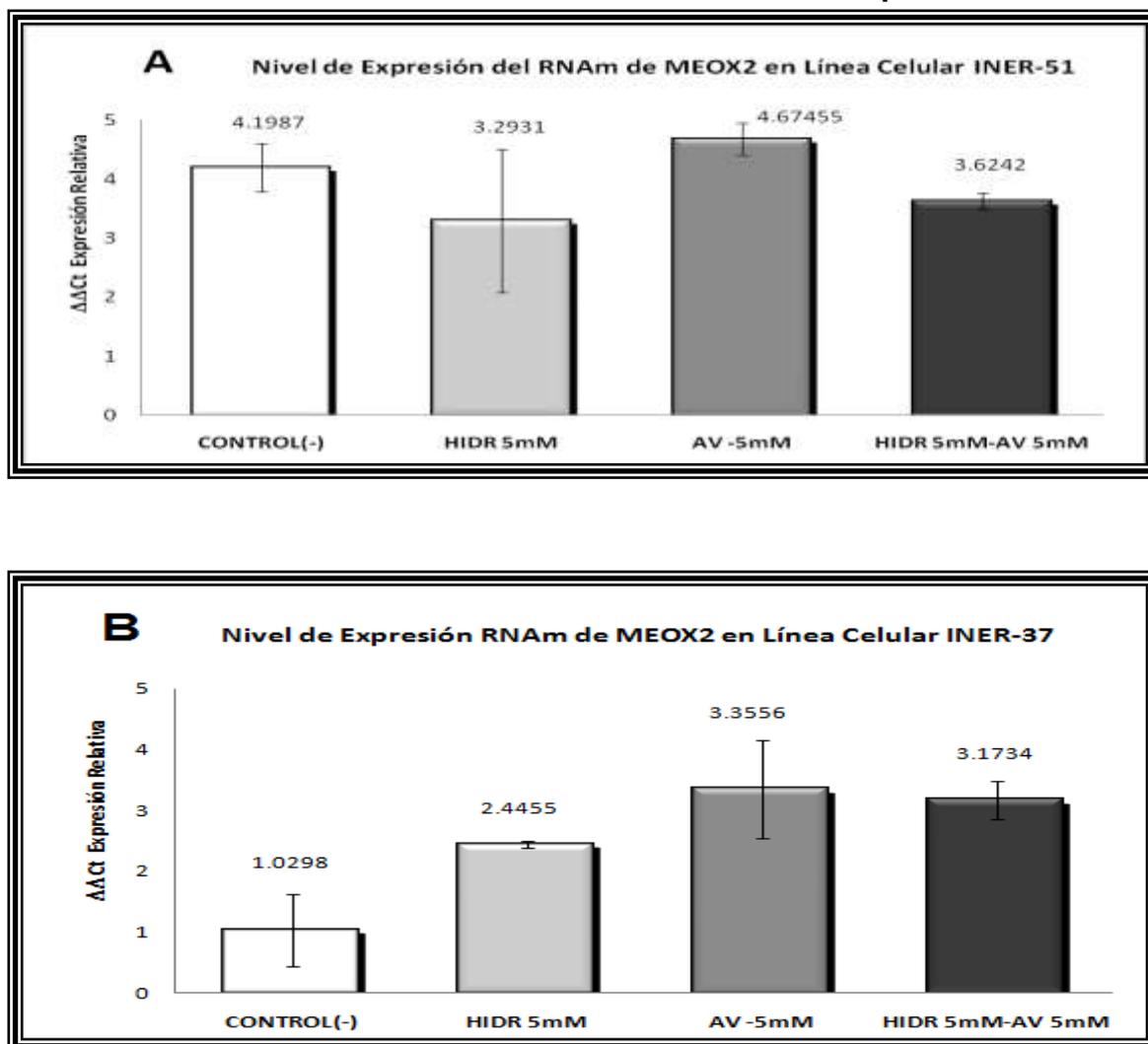


Figura 17, análisis de expresión para el gen MEOX2, mediante ensayos de PCR en tiempo real, sobre las muestras de las líneas celulares tipo AD pulmonar; INER-51(A) e INER-37(B); en color blanco el control negativo libre de tratamiento, bajo tratamiento Hidralazina (HIDR) concentración 5Mm color gris claro, Acido Valproico (AV) concentración 5Mm en color gris oscuro, mientras que un tratamiento combinando de ambos HIDR 5mM, y AV 5Mm en color negro, el cultivo celular *in vitro* se realizó por 96 hrs.

En la figura 17, podemos observar el análisis *in vitro* del cultivo en ambas líneas celulares con HIDR y AV, representado mediante el análisis del índice de Expresión relativa $\Delta\Delta C_t$ por PCR en tiempo real, puede apreciarse que la expresión el gen MEOX2 es dependiente de mecanismos de regulación epigenética, tanto con el uso de Hidralazina como Ácido Valproico en la línea celular INER-37 (B) con valor promedio de expresión relativa de 3.35; mientras que la expresión de MEOX2 en la línea celular INER-51 al parecer muestra ser dependiente del aumento de CNV alcanzado valores promedio de expresión relativa de entre 4.19 y 4.67, tanto en ausencia como en presencia de tratamiento con AV, respectivamente (A).

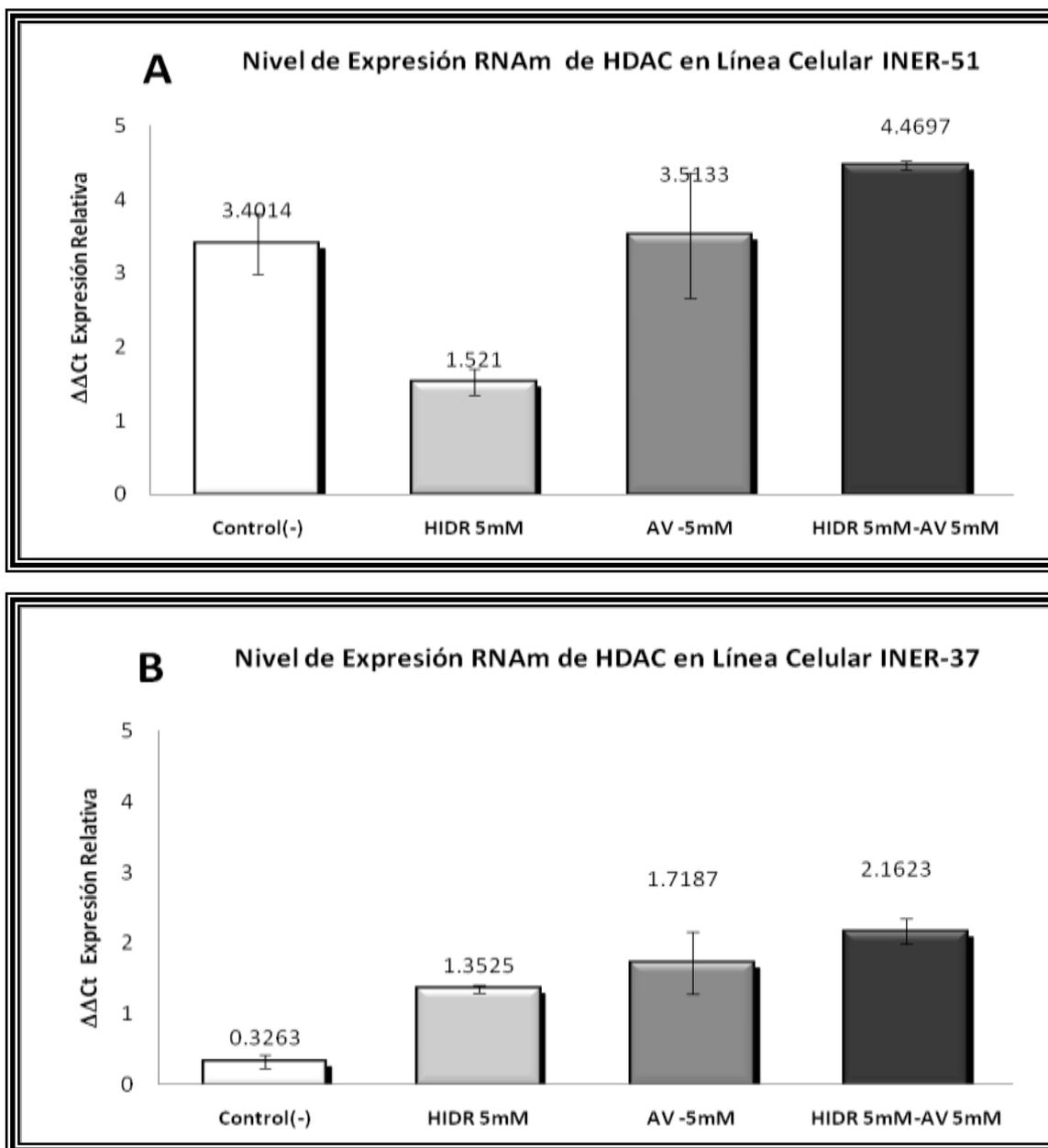


Figura 18, análisis de expresión para el gen AHR, mediante ensayos de PCR en tiempo real, sobre las muestras de líneas celulares tipo AD pulmonar; INER-51(A) e INER-37(B), en color blanco como control negativo libre de tratamiento, bajo tratamiento Hidralazina (HIDR) concentración 5Mm color gris claro; Acido Valproico (AV) concentración 5Mm en color gris oscuro, mientras que un tratamiento combinando de HIDR 5mM y AV 5Mm en color negro, el cultivo celular *in vitro* se realizó por 96 hrs.

En la figura 18, casi semejante en tendencia al gen MEOX2, la expresión del gen HDAC9 en la línea celular INER-37 (B) es dependiente de mecanismos de regulación epigenética observado con el uso de ambos tratamientos tanto HIDR como AV (a partir de valores promedio de expresión relativa hasta alcanzar 2.16). Mientras que la expresión de HDAC9 en la línea celular INER-51 (A) muestra de forma mayoritaria ser dependiente de CNV, no obstante podemos observar un efecto sinérgico de expresión cuando se administra de forma combinada el tratamiento HIDR+AV.

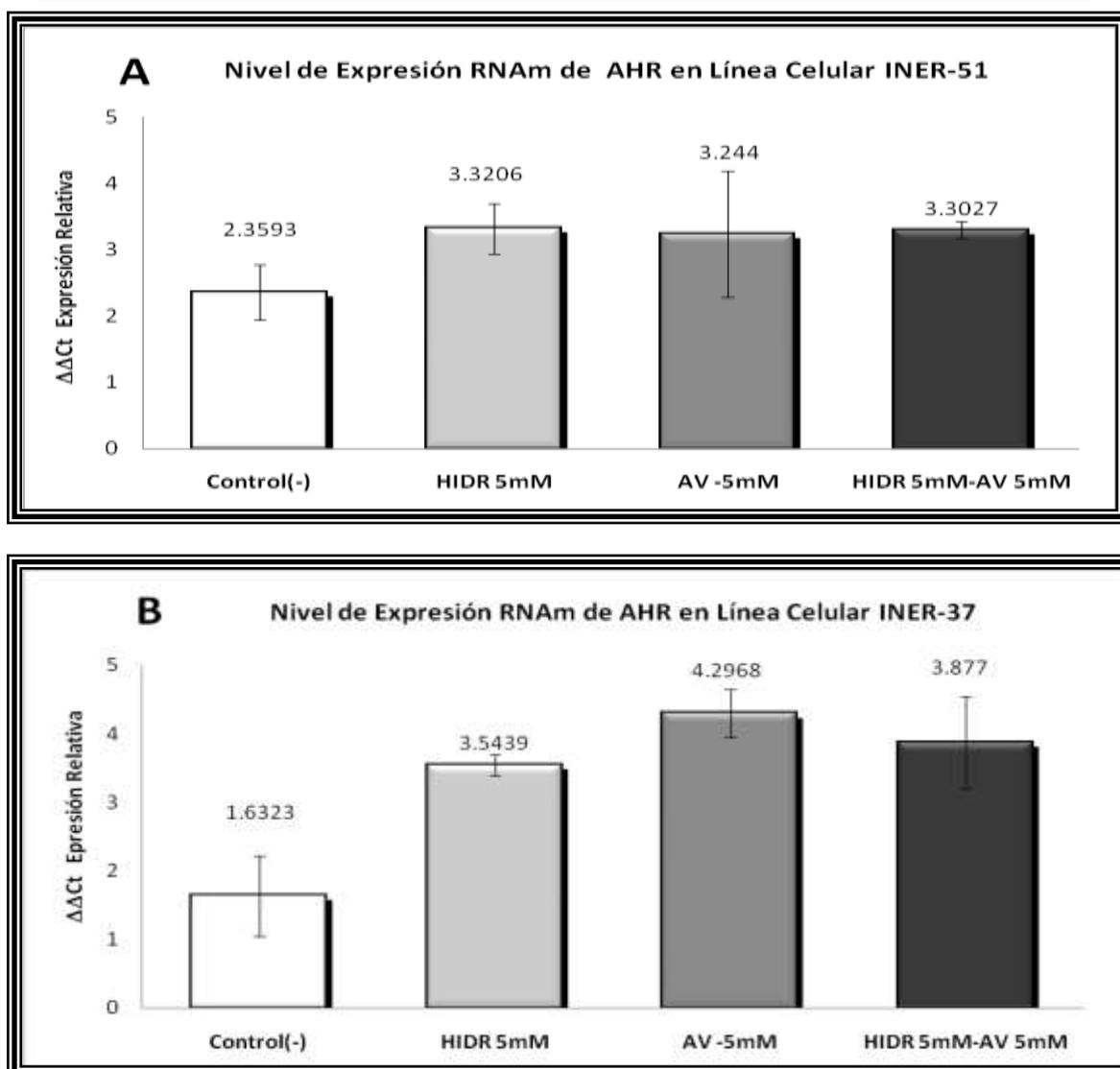


Figura 19, análisis de expresión para el gen AHR, mediante ensayos de PCR en tiempo real, sobre las muestras de líneas celulares tipo AD pulmonar; INER-51(A) e INER-37(B), en color blanco como control negativo libre de tratamiento, bajo tratamiento Hidralazina (HIDR) concentración 5Mm color gris claro; Acido Valproico (AV) concentración 5Mm en color gris oscuro, mientras que un tratamiento combinando de HIDR 5mM y AV 5mM en color negro, el cultivo celular *in vitro* se realizó por 96 hrs.

En la figura 19, podemos observar el análisis *in vitro* del cultivo de ambas líneas celulares tratadas con HIDR y AV, representado mediante el análisis del índice de expresión el $\Delta\Delta\text{Ct}$ por PCR en tiempo real, a través del cual se observa que la expresión del RNAm del gen AHR es mayoritariamente dependiente de mecanismos de regulación epigenética observado con el uso ambos fármacos. No obstante continua siendo preponderante el efecto de regulación epigenética sobre la línea celular INER-37(B) alcanzando valores promedio de expresión relativa de $\Delta\Delta\text{Ct}= 3.54$ hasta alcanzar $\Delta\Delta\text{Ct}= 4.29$ (B), comparado con niveles de expresión en condiciones control con $\Delta\Delta\text{Ct}= 1.63$. Mientras que, la expresión de AHR es parcialmente dependiente de CNV y metilación del DNA/modificación química de histonas en la línea celular INER-51 (A) alcanzando valores de $\Delta\Delta\text{Ct}= 3.3$ a partir de condiciones control con $\Delta\Delta\text{Ct}= 2.3$.

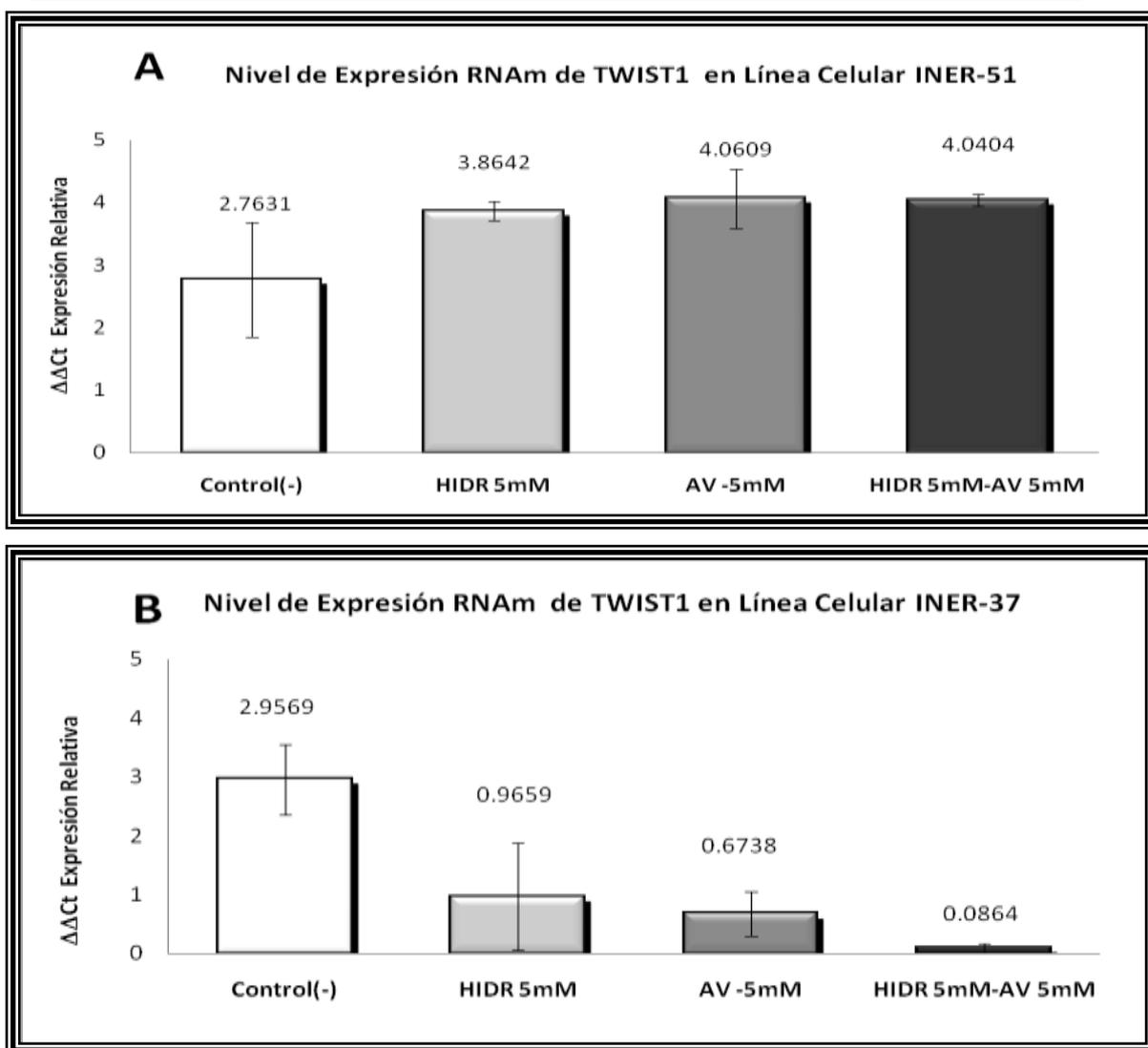


Figura 20, análisis de expresión para el gen TWIST1, mediante ensayos de PCR en tiempo real, sobre las muestras de líneas celulares tipo AD pulmonar; INER-51 (A) e INER-37 (B), en color blanco como control negativo libre de tratamiento, bajo tratamiento Hidralazina (HIDR) concentración 5Mm color gris claro, Acido Valproico (AV) concentración 5Mm en color gris oscuro, mientras que un tratamiento combinando de HIDR 5mM y AV 5Mm en color negro, el cultivo celular *in vitro* se realizó por 96 hrs.

En la figura 20, podemos observar que el tratamiento con HIDR y AV, causa un efecto adverso sobre la línea celular INER-37 (B) disminuyendo los valores de expresión relativa hasta $\Delta\Delta Ct = 0.08$, a partir de niveles de expresión control con $\Delta\Delta Ct = 2.95$ para el gen TWIST1, mientras que, de forma contraria la expresión del gen TWIST1 permanece mayoritariamente dependiente de CNV en la línea celular INER-51 (A), con valores promedio de expresión relativa de $\Delta\Delta Ct = 4.06$ a partir de valores de expresión en condiciones control con $\Delta\Delta Ct = 2.76$, señalando su parcial dependencia de aumento de CNV y metilación del DNA, acetilación de histonas.

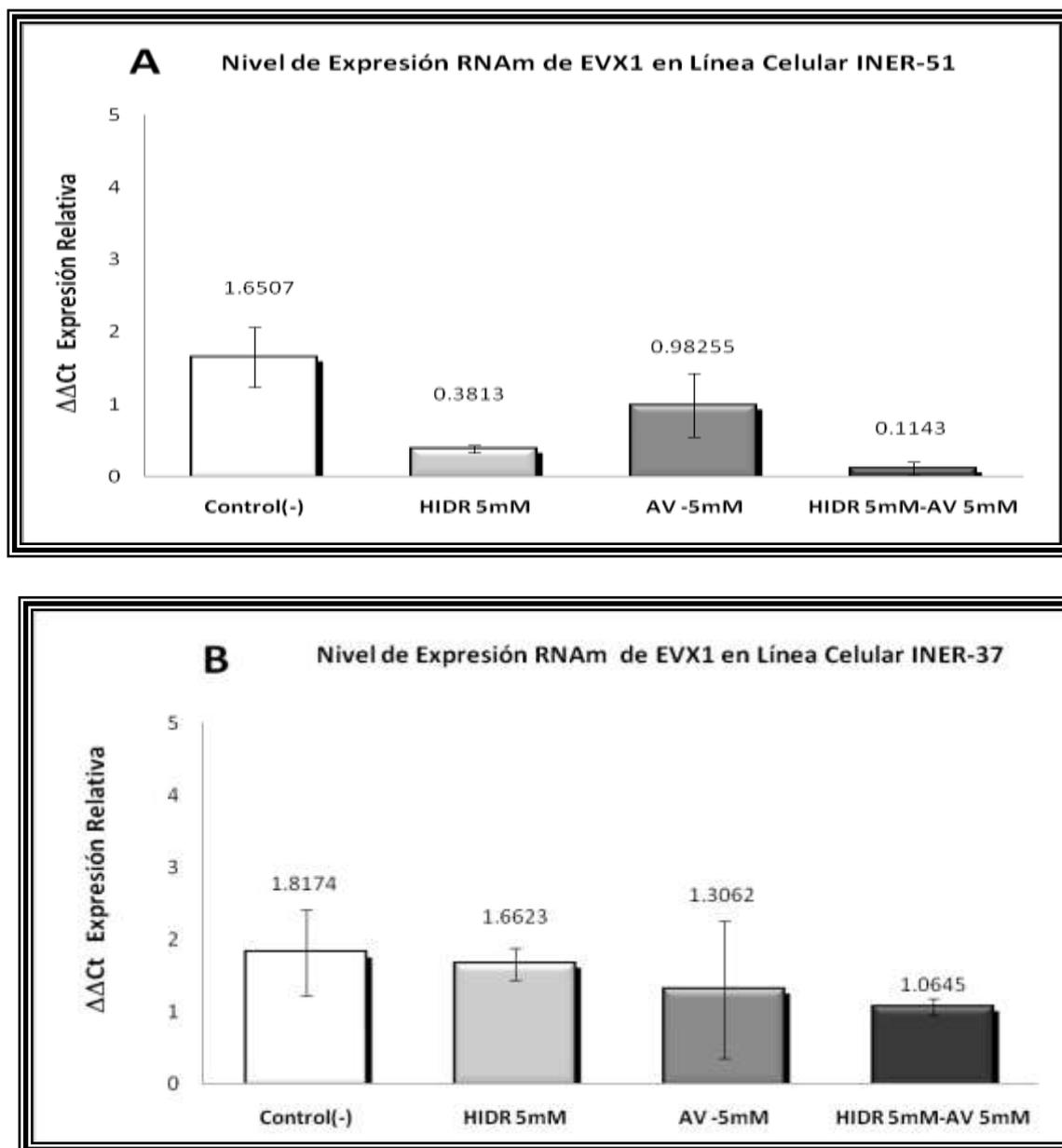


Figura 21, análisis de expresión para el genEVX1, mediante ensayos de PCR en tiempo real, sobre las muestras de líneas celulares tipo AD pulmonar; INER-51 (A) e INER-37 (B), en color blanco como control negativo libre de tratamiento, y bajo tratamiento Hidralazina (HIDR) concentración 5Mm color gris claro, Acido Valproico (AV) concentración 5Mm en color gris oscuro, mientras que un tratamiento combinando de HIDR 5mM y AV 5Mm en color negro, el cultivo celular *in vitro* se realizó por 96 hrs.

En la figura 21, podemos observar que el tratamiento con ambos HIDR y AV, causa un efecto adverso en ambas líneas celulares de cáncer pulmonar, destacando el efecto adverso sobre INER-51 (A) provocando casi abatimiento en la expresión del RNAm para el gen EVX1, cabe mencionar que la expresión del RNAm del gen EVX1, se mantiene con discreta disminución, al inhibir tanto metilación del DNA como actividad de des-acetiladas de histonas, dicho efecto sobre la línea celular contrasta con lo previamente observado para genes antes analizados como MEOX2, AHR y TWIST1.



Todo lo anterior, a partir del estudio de las líneas celulares de cáncer pulmonar INER-51 e INER-37, indicó que se logró determinar que a concentraciones bajas de AV e HDR los mecanismos de regulación epigenética se encuentran activos probablemente a nivel de su secuencia promotora observando que a mayor concentración del fármaco existe una disminución o apagado en la expresión probablemente debido a hipermetilación del promotor o remodelación de la cromatina, cuyos resultados a concentraciones de 10Mm y 5Mm pueden verse en las figuras de anexos (C, D, E, F, G, H, I, J, K, L).



14. Discusión

El cáncer de pulmón años atrás se consideraba exclusivo de personas de la tercera edad, sin embargo hoy en día se presenta con mayor frecuencia en personas de corta edad, por lo que se sugiere brindar más atención a este grave problema de salud pública, principalmente a las alteraciones que existen a nivel genético, que pueden heredarse de generación en generación, y que dichas alteraciones se manifiestan en alteraciones en los mecanismos de expresión génica bajo la influencia de alguna agresión externa que involucra al medio ambiente sobre el individuo. Por ello, la investigación experimental es una herramienta muy importante en nuestros días para profundizar en la comprensión de los mecanismos celulares tanto genéticos como epigenéticos que nos permitan a mediano plazo proponer la posible detección temprana del cáncer pulmonar, en beneficio de mayor sobre-vida y calidad de vida del paciente.

La presente tesis representa la fase inicial de un estudio que pretende describir y analizar las alteraciones genéticas y epigenéticas de mayor frecuencia en nuestra población específicamente CNV, metilación de secuencias de promotoras; así como su relación con los patrones de expresión del RNAm bajo la influencia tanto de factores internos del individuo como externos ambientales, en la búsqueda de marcadores que nos conlleven a la posible detección temprana del cáncer pulmonar.

Respecto a la obtención y procesamiento de muestras de tejido pulmonar, estas actividades se llevaron a cabo de forma exitosa mediante la colaboración con el departamento de cirugía, así como el departamento de patología este último con la revisión histológica del tejido y emisión del diagnóstico definitivo por un patólogo especialista. Lo cual permitió la selección de muestras de tejido para su ingreso al estudio. Ello a pesar que las muestras fijadas mediante formol-parafina mostraron baja calidad del DNA, posterior a su extracción y purificación.



Cabe mencionar que muestras de DNA con alto grado de degradación fueron eliminadas del estudio, principalmente aquellas muestras derivadas del archivo del departamento de patología preservadas mediante fijación por formaldehído. En contraste muestras procesadas mediante el método de fijación Hope-parafina o muestras de tejido en fresco por congelación permitieron mayor rendimiento en términos de calidad de resultados sobre el análisis de CNV del DNA genómico y expresión del RNAm.

Al respecto nuestros resultados indicaron la confirmación del aumento de CNV, principalmente en muestras de tumor pulmonar, así como en muestras de tejido histológicamente normal adyacente a la neoplasia pulmonar. Lo cual llama la atención y es congruente con datos previamente reportados que indican, aumento en CNV en tejido neoplásico y tejido circundante en correlación con niveles de expresión incluso de forma independiente del nivel de metilación (Castillo SD y col 2010).

Diversas pruebas experimentales han demostrado, que el aumento de CNV para un gen determinado, puede o no correlacionar con aumento en la expresión del RNAm, posiblemente bajo el control del nivel de metilación de su secuencia promotora. Lo cual, dependiendo de la función del gen, éste podría repercutir en las funciones celulares del cáncer y/o evolución clínica de los pacientes como ha sido previamente sugerido en tumores pulmonares tipo AD (Barbara A. Weir y Col 2007, Ávila Moreno F y Col 2011).

Por otro lado, con el fin de identificar aquellas alteraciones en la expresión génica de carcinomas pulmonares, el análisis por PCR cuantitativo en Tiempo Real, permitió determinar los niveles de expresión en genes de la región citogenética 7p21.1 en Aprox., 21 tumores pulmonares con su tejido histológicamente normal adyacente a la neoplásia, muestras de lesiones precursoras pulmonares; así como tres líneas celulares de pacientes con cáncer pulmonar y con ello observar la posible correlación entre aumento de CNV y su regulación epigenética (Metilación o remodelación de la cromatina), tomando como antecedente alteraciones en dicha región del cromosoma 7 (Garnis y Col 2006).



El análisis de expresión demuestra que algunos genes de forma preponderante dependen del aumento de CNV tales como: MEOX2, AHR y EVX1. Mientras que el patrón y niveles de expresión del RNAm para HDAC9 y TWIST1, sugiere ser independiente CNV, en particular el gen TWIST1 para el cual en pacientes no existe aumento significativo de CNV comparado con el DNA diploide control. Sugiriendo su dependencia epigenética de expresión como lo sugieren reportes previos (Garnis y Col, 2006).

El análisis de la expresión génica en los tumores pulmonares, permite no solo profundizar sobre el conocimiento de vías de señalización activas en este tipo de tumor, sino establecer sistemas de definición para su pronóstico y de perfil genético, utilizados en la posible detección precoz de este tumor, además este tipo de estudios han permitido desarrollar el uso y adecuación de nuevos fármacos oncológicos incluso tipo neoadyuvantes (Felsenfeld G. y Col, 2003).

Con el fin de describir las diferencias en los niveles de expresión posiblemente ocurridas en la progresión neoplásica pulmonar, se propuso el análisis de grupos de genes localizados en la región 7p21.1 como lesión de alta frecuencia en tumores pulmonares en nuestra población. Al respecto, los análisis de expresión pareado en muestras de tejido pulmonar normal adyacente y tumores pulmonares, nos permitió intentar validar su efecto a nivel de su expresión génica en un modelo celular in vitro como líneas celulares del cáncer pulmonar.

Décadas atrás los estudios de expresión génica parecían considerar únicamente la necesidad de lograr atraer a las RNA polimerasas a regiones cercanas al sitio de inicio de la transcripción, para llevar a cabo la expresión del transcrito de gen específico. Así como, el micro-ambiente en el cual deben ocurrir la mayoría de los eventos de regulación del control de la progresión del ciclo celular, replicación y reparación del DNA así como de recombinación, impronta genética; sin embargo actualmente deben ser considerados otros mecanismos que dan lugar al contexto de la remodelación de la cromatina (Garnis y Col, 2006).



Por tanto y de manera integral respecto a la transmisión de la información genética, principalmente codificada en la molécula del DNA, no puede entenderse sin una parcial o total dependencia de los procesos de regulación epigenética, entre ellos la metilación del DNA en secuencias promotoras e intergénicas no promotoras, así como algunos segmentos del DNA que forman parte del marco abierto de lectura de algunos genes.

Los mecanismos de regulación de la expresión génica se manifiestan bajo dos posibles vías: *i)* de forma directa al impedir la unión de factores de transcripción e *ii)* indirecta proporcionando una estructura “cerrada” de la cromatina (Salozhin SV y Col, 2005). A este respecto la hipermetilación del DNA se encuentra involucrada con el silenciamiento de genes, cuyo mecanismo es parcialmente responsable de la compactación de la cromatina debido al reclutamiento continuo de HDACs, a través de la interacción con proteínas con dominios MBD (Methyl Binding Domain). Mientras que, la hipometilación correlaciona con aumento en la expresión del RNAm de genes posiblemente involucrados en procesos de invasión y metástasis del cáncer (Shhulz W. y Col 2005).

Por lo que, respecto a lo anterior la pérdida de metilación del DNA genómico (hipometilación), como evento primario del proceso de transformación neoplásica, se ha reportado frecuentemente asociado de forma proporcional con la severidad de enfermedades neoplásicas malignas (Robertson KD. y Col 2005). Por lo que, se ha propuesto que la maquinaria de metilación y sus consecuencias contribuyen en sí mismo como un posible marcador esencial en el desarrollo del cáncer pulmonar situado con el mismo nivel de importancia que los eventos genéticos o ambientales (Roman G. y Col 2005).

Adicional a lo anterior, la participación de la dinámica nuclear en la regulación de la expresión génica, la cual consiste en procesos de relocalización tanto regiones de la cromatina, cómo de factores de transcripción en zonas de la heterocromatina o eucromatina, se ha descrito representan



mecanismos represión o activación de la expresión génica (O' Brien. y Col 2003), incluidos en cáncer.

Aunque existen pocos trabajos que valoren el de metilación o estado de activación compactación de la cromatina presente tanto en la progresión neoplásica pulmonar como en modelos celulares *in vitro*, el objeto del presente trabajo fue analizar la dependencia de mecanismos de metilación del DNA o remodelación de la cromatina en cáncer pulmonar. Para ello resultados en líneas celulares de cáncer pulmonar permitió sugerir que secuencias promotoras para los genes MEOX2, AHR y EVX1 se encuentran mayoritariamente hipometiladas en la línea celular INER-51. Mientras que Hipermetilación en secuencias CpGs de promotores para los mismos genes en la línea celular INER-37 provoca baja expresión independientemente del aumento de CNV, como ha sido reportado para genes supresores de tumor (Roman G. y Col 2005).

Como se esperaba, el agrupamiento jerárquico de niveles de expresión génica en muestras de cáncer pulmonar, dieron como resultado aumento en la expresión de genes como: MEOX2, AHR, TWIST1, EVX1, lo que hace posible que el estudio en la expresión de estos y otros genes cercanos o relacionados al locus 7p21.1 permita determinar su vinculación estrecha al aumento de CNV comportamiento epigenético aberrante en cáncer (Castillo SD. y Col 2010), permitiendo predecir el comportamiento de tumores de pacientes, de forma temprana en la progresión o de nivel pronóstico.

Por lo que, los análisis de cultivo *in vitro* de líneas celulares de cáncer pulmonar de pacientes mexicanos, mostraron mayor dependencia de CNV cuando sus secuencias promotoras mostraron niveles bajos de metilación del DNA. Observando el aumento significativo en los niveles de expresión génica, en presencia de tratamiento a concentraciones bajas de ambos fármacos, al inhibir la metilación como la remodelación de la cromatina.

Debido a los efectos observados, podemos sugerir en nuestros modelos experimentales demostrar que modificaciones de las histonas se encuentran



epigenéticamente ligadas a la metilación del DNA (Garnis y Col 2006), lo cual nos lleva a mencionar que la línea celular INER-51 es dependiente del mecanismo de regulación genética en la región 7p21.1; mientras que dependientes de regulación epigenética (metilación como remodelación de la cromatina) en la línea celular INER-37 como quedó demostrado con el uso AV e HIDR.



15. Conclusiones

- Ensayos de validación cuantitativa por PCR en tiempo real demostraron aumento de CNV para genes residentes de la región 7p21.1, tanto en tejido neoplásico pulmonar como en tejido pulmonar histológicamente normal.
- Se observó aumento de CNV entre otros genes como MEOX2, HDAC9, AHR y EVX1, mientras que variaciones no significativas de CNV para el gen TWIST1, localizado en la misma región 7p21.1. Mientras que ausencia de CNV para el gen EVX2 (localizado en la región 2q31.1) gen Homeobox relacionado con EVX1 como MEOX2.
- Lesiones precursoras pulmonares no muestran aumento significativo de CNV para todos los genes aquí estudiados; sin embargo poseen aumento en los niveles de expresión para los genes MEXO2, HDAC9, AHR, y EVX1, lo cual contrasta con la disminución en los niveles de expresión del gen TWIST-1, sugiriendo que el primer grupo de genes (MEOX2, HDAC9, AHR, y EVX1) poseen expresión temprana en la progresión histopatológica pulmonar de manera independiente de aumento de CNV.
- El análisis de inhibición de la metilación *In vitro* de la expresión génica en lesiones neoplásicas pulmonares demostró que la expresión de MEOX2, HDAC9, y AHR, son parcialmente dependientes del aumento de CNV como de su regulación epigenética por metilación del DNA/Acetilación de histonas. Mientras que la expresión de los genes TWIST y EVX1, muestran mayor dependencia de los mecanismos de regulación epigenética, de forma independiente del aumento de CNV,



ello mediante el análisis *in vitro* con el uso de AV e HIDR sobre líneas celulares derivadas de pacientes bajo atención médica en el instituto con cáncer pulmonar (INER-37 e INER-51).

- Los ensayos de inhibición *in vitro* con AV sugieren que los mecanismos de activación de la cromatina estrechamente ligados a los perfiles de metilación del DNA genómico ocurren como eventos tempranos en la progresión histopatológica pulmonar, mientras que en lesiones pulmonares neoplásicas malignas, emplean ambos mecanismos de regulación transcripcional tanto CNV como epigenéticos.



16. Perspectivas

El avance tecnológico mediante el uso de análisis masivo del genoma así como métodos de análisis epigenético está contribuyendo de forma importante la comprensión de la regulación transcripcional de potenciales nuevos marcadores de la biología del cáncer. Por lo que, el desarrollo de análisis genómico en la población, debiera ir acompañado de estudios regulación epigenética como es el uso de agentes inhibidores de modificaciones epigenéticas como posibles tratamientos adyuvantes del cáncer.

El presente estudio contribuye en parte al análisis genómico de las neoplasias pulmonares, con la idea de identificar aberraciones citogenéticas más frecuentes en nuestra población de pacientes. Por lo que adicionalmente nuestro grupo de investigación sobre cáncer pulmonar, trabaja en el estudio del epigenoma lo cual permita el estudio amplio de la regulación tanto genética como epigenética de las neoplasias pulmonares, con el objeto de identificar la expresión de nuevos posibles marcadores tempranos o tardíos para el desarrollo de pruebas de diagnóstico temprano o pronóstico en los pacientes oncológicos, bajo atención médica pulmonar en los institutos nacionales de salud como el INER, e INCAN en colaboración con las unidades de investigación biomédica de la UNAM.



17. Referencias bibliográficas

- Abdi EA, Goel R, Bishop S, Bain GO. Peripheral carcinoid tumours of the lung: a clinico pathological study, *Journal Surg Oncol*;39(3):190-6 (1988).
- Agrawal A, Murphy RF, Agrawal DK, *Modern Pathology*. 20; 711-721 (2007).
- Arenas F, Recilla F. Genome- Epigenome in lung Cancer. *Gac Méd Méx.*, 138: 6 : 547-555 (2002).
- Armour TA, Sismani C, Cross G. Measurement of locus copy number by hybridization with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res*, 28; 605-609 (2000).
- Ávila-Moreno F, Limón Rivas DA, Armas López L, López Bujanda ZA, Serrano Ramírez R, Hidalgo Miranda A, Uribe Figueroa L, Piña Sánchez P, Ortiz Quintero B, Urrea Ramírez F, Rivera Rosales RM, Vázquez Manríquez E, Peña Mirabal E, Ávalos Bracho A, Morales Gómez J, Vázquez Minero C, Guzmán de Alba E, Tellez Becerra JL. Alterations In Copy Number Variation, Methylation Profiling Of Promoters And Gene Expression Levels In The Subtelomeric Region 7p21.3-p21.1, As Probable New Genetic Markers In Lung Cancer Patients. *Gene Chrom Cancer* 2011. Manuscript in Advanced.
- Bach PB, Cramer LD, Warren JL, Begg CB. Racial differences in the treatment of early-stage lung cancer. *England Journal Medic* 341; 1198-205 (1999).
- Barbara AW. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature*.6: 450(7171); 893-8. (2007).
- Baumgarther FJ. *Cardiothoracic surgery*. 3rd, ed. USA: Landes Bioscience. 195-222 (2003).
- Bin XU, Louw J, Shawn L, Van R. Strong association of *de novo* copy number mutations with sporadic schizophrenia. *Nature* 40, 7; 880-885 (2008).
- Bosetti, Malvezzi M, Chatenoul L, Negri E, Levi , La Vecchia C. *Oncology*, 16: 489-511(2005).
- Brambila E. The new world health Organization Classification of Lung tumours. *Eur Respir J*, 18: 1059-1068 (2001).
- Burbee DG, Forgacs E, Zochbauer MS, Shivakumar L, Fong K, Gao B, Randle D, Kondo M, Virmani A, Bader S, Sekido Y, Latif F, Milchgrub S, Toyooka S, Gazdar AF, Lerman MI, Zabarovsky E, White M, Minna JD, J. *National Cancer Institut*. 93; 691-699 (2001).



- Castillo SD, Angulo B, Suarez GA, Melchor L, Medina PP, Sanchez VL, Torres LJ, Pita G, Benitez J, Sanchez CM. Gene amplification of the transcription factor DP1 and CTNND1 in human lung cancer. *J Pathol* 222(1):89-98 (2010).
- Chavez B, Perez P, Perez C, Carrasco L, Rangel L. Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines. *Cancer Cell International* 6; 2 1-9 (2006).
- Cho EK. Array-based comparative genomic hybridization and copy number variation in cancer research. *Cytogenet Genome*, 115; 262-272 (2006).
- Christopher J. Fang Z, Eric Y, Matthew G. Histone Deacetylase is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 39; 36734-36741 (2001).
- Clare S, Jenny Z, Ben D, Susan J. Transcriptional Gene Silencing Promotes DNA hypermethylation through a Sequential change in chromatin Modifications in Cancer cell, *Cancer* 64; 3871-3877 (2004).
- Cortese R, Hartmann O, Berlin K, Eckhar F, Correlative gene expression and DNA methylation profiling in lung development nominate new biomarkers in lung cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40: 1494–1508 (2008).
- Detich N, Bovenzi V, Moshe S. Valproate Induces Replication Independent Active DNA Demethylation. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 30; 27586-27592 (2003).
- Douglas TR, Uwe S, Michael BE, Charles MP, Christian R, Paul S, Vishwanath I. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nature Genetics* 24; 227-235 (2000).
- Dustin E, Schones, Keji Z. Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nature*, 9; 179-191 (2008).
- Eichler, EE. Vompleting the map of human genetic variation *Nature* 447; 161-165 (2005).
- Engelman AJ, Kreshnik Z, Tetsuya M, Youngchul S. Met- Amplification Leads to GEFITINIB Resistance in Lung Cancer by Activating ERBB3 Signaling. *Sciencie* 316: 1039-1042 (2007).
- Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG, *Cancer Res* 69; 793-797 (1999).



- Fasco MJ, Hurteau G, J Spivado. Gender dependent expression of alpha and beta estrogen receptor in human non-tumor and tumor lung tissue, *Cell Endocrinal* 188; 125-140 (2002).
- Felsenfeld G, Gruudine M. Controlling the double helix *Nature* 421: 448-453 (2003).
- Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD. Lung cancer 9 *Molecular biology of lung cancer- clinical implications. Thorax* 58:10; 892-900 (2003).
- Freeman JL. Copy number variation: new insights in genome diversity *Genome* 16; 949-961 (2006).
- Fuentes V, Sixto B, Corona M. Tumores Carcinoides del pulmón. *Ann Thorac Surg* 39(2):11; 5-23 (2000).
- Garnis C. Chromosome 5p aberrations are early events in lung cancer: implication of glial cell line-derived neurotrophic factor in disease progression. *Oncogene*; 24(30):4806-4812 (2005).
- Goldstraw P, Crowley J, Chansky K. International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee; Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *Journal Thorac Oncology* 2:706-714 (2007).
- Gorlova OY, Weng S, Zhang Y, Amos CI, Spitz MR, Aggregation of cancer among relatives of never-smoking lung cancer patients. *International Journal of Cancer*, 121: 111-118 (2007).
- Guo J, Burguer M, Nimmrich I, Maiers S, Becker E, Gene B. Differential DNA methylation of gene promoters in small B-cell lymphomas *Am. J Clin Pathol*, 124:430-439(2005).
- Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *British Medical Journal* 315: 7114; 980-988 (1997).
- Hung RJ. CYP1A1 and GSTN1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a pooled analysis. *Carcinogenesis*, 24: 875-882 (2003).
- Jakobsson MW, Scholz SI, Raphael G, Vanliere J. Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations. *Nature* 451; 998-1003 (2008).
- Jaques SB, Xavier E, Stylianou EA. Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Genetics*, 8; 639-646 (2007).



- Jean PI. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature*. 4; 988-993 (2004).
- Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer Statistics. *CA Cancer J, Clin*, 54: 8-29 (2004).
- Kawai H. Estrogen receptor alpha and beta are prognostic factors in non-small cell lung cancer. *Cancer* 11; 5084-5089 (2005).
- Keith DR. DNA Methylation and human disease. *Nature*, 6; 597-610 (2005).
- Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, Zheng S, Christiani DC, Wain JC, Mark EJ, Kelsey KT. *Oncogene*, 20; 1765-1770 (2003).
- Kim EH, Park AK, Dong SM, Ahn JH, Park WY. Global analysis of CpG methylation reveals epigenetic control of the radiosensitivity in lung cancer cell lines. *Oncogene* 19; 29(33):4725-31 (2010).
- Kulpa J, Wójcik E, Reinfuss M, Koodziejcki L. *Clinical Chemistry*. 48;1931-1937 (2002).
- Lau KS. Three-gene Prognostic classifier for Early-Stage Non Small Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*; 25(35):5562-5569 (2007).
- Lee JA, Lupski JR. Genomic Rearrangements and gene copy number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron*, 52; 103-121 (2006).
- Liu WB, Jin-Yi L, Lin A, Zi YZ, Yan-Hong Z. Epigenetic Silencing of Cell Cycle Regulatory Genes During 3-Methylcholantrene and Diethylnitrosamine Induced Multistep Rat Lung Cancer. *Molecular Carcinogenesis* 49:556-565 (2010).
- Lui WB, Lui JY, Ao I, Zhou ZY, Zhou YH, Cui ZH, Cao J. Epigenetic silencing of cell cycle regulatory genes during 3-methylcholanthrene and diethylnitrosamine induce multistep rat lung cancer. *Mol Carcinog* 49(6):556-65 (2010).
- Luk C. Molecular cytogenetic analysis of non-smallcell lung carcinoma by spectral karyotyping and comparative genomic hybridization. *Cancer Gene Cytogenet*; 125(2):87-99 (2001).
- Martin G, Saverio M, Ping Z, Oliver HK. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cell. *Molecular Biology Organization* 20, 24; 6969-6978 (2001).
- Matakidou A, Eisen T, Houiston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer. *Cancer* 93: 825-833 (2005).
- Miho M, Suzuki BA. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Genetics* 9, 465-476 (2008).



- Ming S, Gao ST. The relationship between the TSLC1 silencing and DNA methylation in human lung cancer cell. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 13(5):464-9 (2010).
- Mitsuyoshi N. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Elsevier* 278; 25-31 (2001).
- Mollerup S, Jorgensen K, Berge G, Haugen A. Expression of estrogen receptors alpha and beta in human lung tissue and cell lines, *Lung Cancer*, 37, 155-159 (2002).
- Nikliński J, Niklińska W, Laudanski J, Chyczewska E, Chyczewski L. Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 34; suppl 2: S53-S58 (2001).
- O'Brien TP, Bult CJ, Cremer C, Grunze M, Knowles BB, Langowski J, McNally J. Genome function and nuclear architecture: from gene expression to nanoscience. *Genome Res* 13:1029-1041 (2009).
- O'Reilly KM, Mclaughlin AM, Beckett WS, Sime PJ. Asbestos-related lung disease. *American Family Physician* 75:5; 683-688 (2007).
- Oliver HK, Ping Z, Heather PO, Martin G. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *Molecular Biology Organization* 22,13;3411-3420 (2003).
- Paliwal A, Thomas V, Krais A, Cyrill C. Aberrant DNA Methylation Links Cancer Susceptibility Locus 15q25.1 to Apoptotic Regulation and Lung Cancer. *Cancer* 70(7):2779-2788 (2010).
- Paliwal A, Thomas V, Annette K, Cyrille C, Marie PC. Aberrant DNA Methylation Links Cancer Susceptibility Locus 15q25.1 to Apoptotic Regulation and Lung Cancer. *Cancer Research* 70(7):2779-2788 (2010).
- Palmisano WA, Krume KP, Grimes MJ, Winters SA, Toyota M, Esteller M, Joste N, Baylin SB. Belinsky S.A. *Cancer Res*. 63;4620-4625 (2003).
- Parkin DM, Bray F, Pisani P. Global Cancer Statistics. *CA Cancer* 55, 74-108 (2002).
- Paul PA, Todd AA. DNA methylation-base biomarkers for early detection of non-small cell lung cancer: an update. *Molecular Cancer* 7:81 (2008).
- Pei J, Binaifer RB, Wu LS, Edward G. Genomic Imbalances in Human Lung Adenocarcinomas and Squamous Cell Carcinomas. *Genes, Chromosomes y Cancer* 31: 282-287 (2001).
- Peter AJ, Stephen BB. The Epigenomics of Cancer. *Cell* 128; 683-692 (2007).
- Peter WL. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Publishing Cancer* 3; 253-266 (2003).



- Petersen D. Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer* ; 57 (12): 2331-2335 (1997).
- Ponce LA, Barrera RR. Los cambios en la P-glicoproteína, actividad están mediados por el crecimiento de una línea celular tumoral como esteroides multicelulares. *Cancer Cell International*, 5;5:20-20 (2005).
- Rauch TA, Zhong X, Wu X, Wang M, Kernstine KH, Wang Z, Riggs AD. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 105: 1; 252-257 (2008).
- Recillas F, Escamilla M. *Mensaje Bioquímico vol. XXVIII.*, 173-201 (2002).
- Redon R, Shumpei I, Fitch R, Feuk L, George H, Andrews D, Heike F. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 23; 444 (7118): 444 - 454 (2006).
- Richard A. Goldsby TJ. *Inmunología* 5 edi. pag: 531-554(2004).
- Robertson KD. DNAmethylation and human disease. *Nature Rew Genet.*; 6:597-610 (2005).
- Rocha R, Mora GML, Hernandez MJ, Dueñas GA, Morroy GA. Hidralazina, Ácido Valproico E Interferon- γ Incrementan la expresión de moléculas de reconocimiento inmune en células tumorales de cáncer cévico uterino. *Mediagraphic*, pag; 80 2006.
- Rodenhiser D, Malvezzi M, Chatenoud L, Negri E, Levi F. La vecchia C. *Annals of Oncology*, 16: 489-511 (2005).
- Roman GJ, Jimenez VA, Agirre X, Barrios M, Castillejos JA. Metilación del ADN en oncohematología. *Hematologia* 90;27-36 (2005).
- Ronen AS, Blackhall FH, Shepherd FA, Tsao MS. Mutations in non-small-cell lung carcinomas: a review. *Clinical Lung Cancer* 8:1; 30-38 (2006).
- Ronen AS, Bradley PC, Suzanne KL, Gilda CS, Chang-Qi Z, Strumpf D, Wam LL, Ming ST. Genomic markers for malignant progression in pulmonary adenocarcinoma with bronchioloalveolar features. *PNAS* 105, 29; 10155-10160 (2009).
- Rosti G, Bevilacqua G, Bidoli P, Portalone L, Santos A, Genestreti G. Small cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 17; 5-10 (2006).
- Ruiz A, Cabezón M^aP, Lloret SB, Lara CP. *Cáncer de Pulmón*. 1: 1-15 (2004).
- Salozhin SV, Prokhorchuk EB, Georgiev GP. Methylation of DNA of the Major Epigenetic Markers. *Boichemistry*. 70:525-532. (2005).



- Sathyanarayana UG, Toyooka S, Padar A, Takahashi T, Brambilla E, Manna JD, Gazdar AF. *Clinical Cancer Research* , 9; 2665-2672 (2003).
- Schulz W. Qualified Promised: DNA methylation assays for the detection and classification of human cancers. *Biomed Biotechnol.* 3:227-229 (2005).
- Schwartz AG. Nuclear estrogen receptor beta in lung cancer expression and survival differences by sex. *Cancer Res*; 11: 7280-7287 (2005).
- Sebat J. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305, 525-528 (2004).
- Sebat J. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*, 316; 445-449 (2007).
- Sonabe M. Mutations in the epidermal growth factor receptor gene are linked to smoking-independent, lung adenocarcinoma. *British Journal of Cancer*; 93, 355-363 (2005).
- Sophie S, Joan H, Adi FG. Lung cancer in never smokers a different disease. *7: 778-790* (2007).
- Stabile LP. Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor alpha and beta show biological. *Cancer* 52, 2141-2150 (2002).
- Stephen L, Jennifer M, William W, Timon PH, Raj CB, Wan LL. Integrative genomic and gene expression analysis of chromosome 7 identified novel oncogene loci in non-small cell lung cancer. *Genome* 51:1032-1039 (2008).
- Steven A, Belinsky. Gene-Promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nature* 4; 1-11 (2004).
- Steven AM, David MA. Copy-Number variation and association studies of human disease. *Nature Genetics* 39; 537-542 (2007).
- Stransky N, Vallot C, Reyal F, Bernard IP, Gil DS, Segraves R, Rycker Y, Elvin P, Cassidy A, Spraggon C, Graham A, Southgate J, Asselain B, Allory Y. Regional copy number-independent deregulation of transcription in cancer . *Nature Genetics* 12, 38: 1386-1396 (2006).
- Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: a review. *Journal of clinical oncology*, 25: 5; 561-570 (2007).
- Tammemagi CM, Neslund-Dudas C, Simoff M, Kvale P. Smoking and lung cancer survival: the role of comorbidity and treatment. *Chest* 125:1; 27-37 (2004).



- Tibor R, Wang Z, Xinmin Z, Zhong X, Wu X, Lau KS, Kemp H, Arthur DR, Gerd PP. Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay. PNAS 104, 13: 5527-5532 (2007).
- Toledo GD, Travis LB, Devesa SS. Lung Cáncer. Cancer 75; 191-202 (1995).
- Tong L, Spitz MR, Fueger JJ, Amos CA. Cancer 78:5; 1004-1010 (1996).
- Tsou J, Hagen J, Carpenter C. Laird OI. DNA Methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis. Oncogene. 21; 5450-5461 (2002).
- Virmani AK, Tsou JA, Siegmund KD, Shen L, Long TI, Laird PW, Gazdar AF. Cáncer, 11; 291-297 (2002).
- Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. Science 286: 481-486 (1999).
- Wong KK. A comprehensive analysis of common copy number variations in the human genome. Genet. 80; 91-104 (2007).
- Zhou W. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2, smoking and lung cancer risk. Cancer 12: 359-365 (2003).
- Zochbauer MS, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Cancer, 61; 249-255 (2001).
- Zur HH. Papilloma viruses in human cancers. Proc Assoc 111: 581-587 (1998).



18. ANEXOS

Tabla **A**, clasificación TNM para neoplasia pulmonares: comparación entre la sexta y séptima edición (Tomado y Adaptado de Cerecedo Zapata M. y Col, 2009).

T	TUMOR PRIMARIO	
	SEXTA EDICION	SEPTIMA EDICION
TX	El tumor primario no puede ser evaluado o la presencia del tumor se sugiere por la presencia de células malignas en esputo o lavado bronquial o no ha sido visualizado en imagen o broncoscopia	Sin cambios
T0	No evidencia de tumor primario	Sin cambios
Tis	Carcinoma in situ	Sin cambios
T1	Tumor que mide menos o igual a 3 cm en su eje mayor rodeado por pulmón o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal que el bronquiolo, no en bronquio principal.	Sin cambios
T1a	No existe	Tumor que mide menos o igual a 2 cm en su eje mayor
T1b	No existe	Tumor que mide más de 2 cm y menos o igual a 3 cm en su eje mayor
T2	Tumor que mide más de 3 cm en su eje mayor o tumor que tiene alguna de las siguientes características; involucra bronquio principal a más de 2 cm de la carina, invade pleura visceral o está asociada con atelectasias o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar, pero no involucra el pulmón entero.	Tumor que mide más de 3 cm y menos o igual a 7 cm en su eje mayor o tumor que tiene alguna de las siguientes características; involucra bronquio principal a más de 2cm de carina, invade pleura visceral o está asociada con atelectasias o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar, pero no involucra el pulmón entero, (si presenta alguna de estas características y mide menos de 5 será clasificado como T2a).
T2a	No existe	Tumor que mide más de 3 cm y menos o igual a 5 cm en su eje mayor
T2b	No existe	Tumor que mide más de 5 cm y menos o igual a 7 cm en su eje mayor.
T3	Tumor de cualquier tamaño que invade pared toraxica diafragma, nervio frénico, pleura mediastinica, pericardio parietal o tumor en el bronquio	Tumor mayor de 7 cm o que invade, pared torácica, diafragma nervio frénico, pleura mediastinal pericardio parietal a menos de 2 cm de la carina principal, pero sin involucrarla, o asociada a atelectasias o nódulo (s) separado (s) del tumor en el mismo lóbulo.
T4	Tumor de cualquier tamaño que invade pared toraxica	Tumor de cualquier tamaño que invade alguna de las siguientes estructuras; mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpos vertebrales, carina o que presenta nódulo(s) separados del tumor en un diferente lóbulo ipsilateral.



Continuación tabla A.

N	LINFONODOS REGIONALES	
	SEXTA EDICION	SEPTIMA EDICION
NX	Los linfonodos regionales no pueden ser evaluados	Sin cambios
NO	Sin presencia de metástasis a linfonodos regionales	Sin cambios
N1	Metástasis a linfonodos ipsilaterales peribronquiales, hiliares y/o intrapulmonares incluyendo los envueltos por extensión directa.	Sin cambios
N2	Metástasis en linfonodos mediastinales y/o subcarinales ipsilaterales.	Sin cambios
N3	Metástasis en linfonodos mediastinales contralaterales, hiliares contralaterales, escalenos o supraclaviculares.	Sin cambios
M	METASTASIS	
	SEXTA EDICION	SEPTIMA EDICION
MX	La metástasis a distancia no pueden ser valoradas	Sin cambios
M0	Sin metástasis a distancia	Sin cambios
M1	Metástasis a distancia	Sin cambios
M1a	No existe	Nódulo (s) separados del tumor en un lóbulo contralateral; tumor con nódulos pleurales o derrame pleural o (pericardio) maligno.
M1b	No existe	Metástasis a distancia.



Tabla **B**, donde se observa la lista de oligonucleótidos diseñados para el análisis de CNV y Metilación, los cuales están, ubicados en el cromosoma 7 de la región de alta frecuencia, de los cuales se seleccionaron algunos genes por su importancia a nivel celular para su posterior estudio.

<i>Oligonucleótidos</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Tm Teo.</i>	<i>Región</i>	<i>Tm Exp</i>	<i>Tamaño</i>
EVX1 fin-s EVX1 fin-as	CCAGCGGTACTGTAATGACG GGTTGCAAGAGGGAGAAAG	63.1 61.4	7p15-14	60	270pb
EVX1 med-s EVX1 med-as	TCATCGGTGTTAGATCAAGG CAGCGAAGATGAAAGGAAAC	60.1 61.3	7p15-14	60	300pb
MX2 ini-s MX2 ini-as	GGAATCAGGGTGCTAGGTTG CCCAGAGAACTGCTTTCAGG	63.3 63.8	7p22.1	60	297pb
MX2med-s MX2med-as	GTCCAGCAGGAGATAGGAAG AGAGTGGGAGAGGTTGAAGC	60.4 62.4	7p22.1	60	205pb
TWT1 ini-s TWT1 ini-as	TGAGACATCACCCACTGTGTAG ATTCGTCCTCCCAAACCATTC	62.7 65.9	7p21.1	60	275pb
TWT1med-s TWT1med-as	GGGAGGACGAATTGTTAGAC CGAGGTCCAAAAGAAAGC	59.9 61.3	7p21.1	60	284pb
AH med-s AH med-as	CAGTCCATTGGTTGTCTAC TTCCATTCCGTCTTCCTTG	59.4 62.6	7p15	60	252pb
CBX3 med-s CBX3 med-as	CTGAGGAGACTCCGGTCAC CTACAGCTCAAGCCACATCC	62.6 62.4	7p15.2	60	120pb
CBX3 fin-s CBX3 fin-as	CCTTCGGATGTGGCTTGAG CATCTGAAGCACCACCAGC	65.8 64.6	7p15.2	60	130pb
A2B1 ini-s A2B1 ini-as	TTTTCTGGCGGGGGTTATC AATTGCGGAAGGCTAGATGC	65.7 62.2	7p15	60	205pb
A2B1 fin-s A2B1 fin-as	AAGTAACGTCGGTACTGTGTC TGCTCGAGAAACAACCTCTG	58.1 59.2	7p15	60	258pb
HDAC9 ini-s HDAC9 ini-as	ACCCTAGCAGCCTGAAGAAC AGACCTGGACACTTTTCCC	62.3 60.5	7p21.1	60	293pb
HDAC9 med-s HDAC9 med-as	AAGCACGTTCTATTTCCC TGTCTGCAGCATATTCAG	60.5 60.0	7p21.1	60	304pb
AG3 ini-s AG3 ini-as	ACCCCTAACCCAGAGATTC ATCAGGAAAGCCTCCATTC	62.9 60.6	7p21.1	60	245pb
TWTNB fin-s TWTNB fin-as	CGTAATGCAGCGAAAAGAGG GGCATGAGTAGCGACTGTTC	64.5 62.4	7p21.1	60	270pb
TPA13-s TPA13-as	GAGGTGCTGTCATTTTCTCC CTGGCAGGGAACAAAGGTAG	60.1 63.5	7p21.1	60	225pb
ZF12 med-s ZF12med-as	CATGGTCTACGAGATGCTAC ATACCGTGA CTCTATTTCCC	57.2 57.0	7p22.1	60	232pb
ZF12 fin-s ZF12fin-as	GTCACGGTATTTGTCCTGGG CAAAGCCTGGGA ACTAGGG	64.1 63.4	7p22.1	60	214pb
EVX2 fin-s EVX2 fin-as	GCCTTCCTCCTCACTTGTC CTTCCGATCCCGAGATGTC	61.4 64.6	2q31.1	60	202pb
GADPH 200	AGGTGGAGCGGGCTAGC TTTTGCGGTGGAAATGTCCT	64.7 66.4	2p13.31	60	200pb

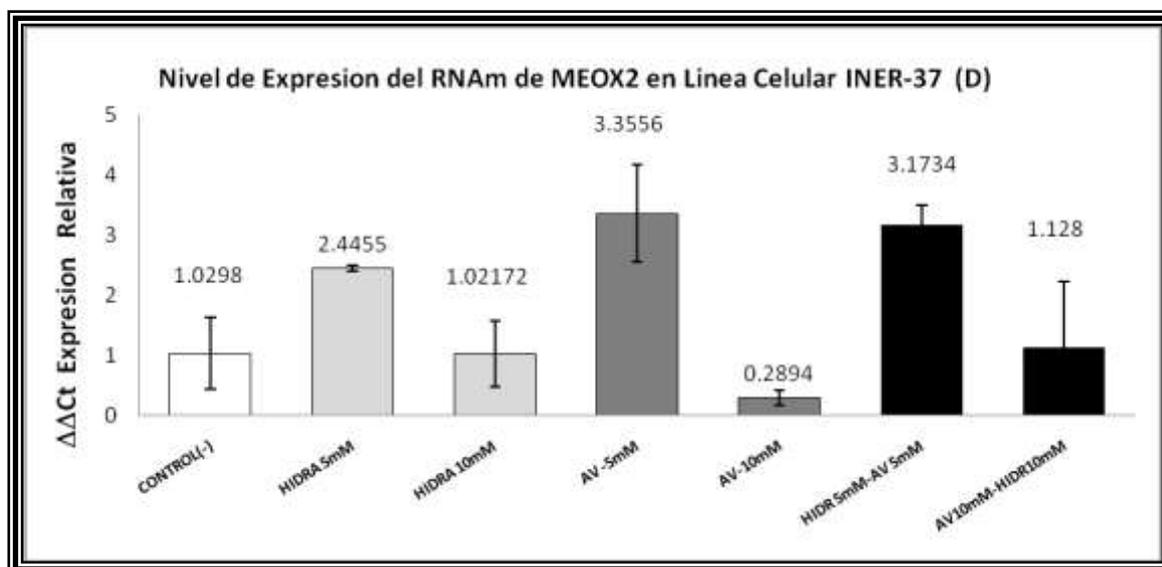
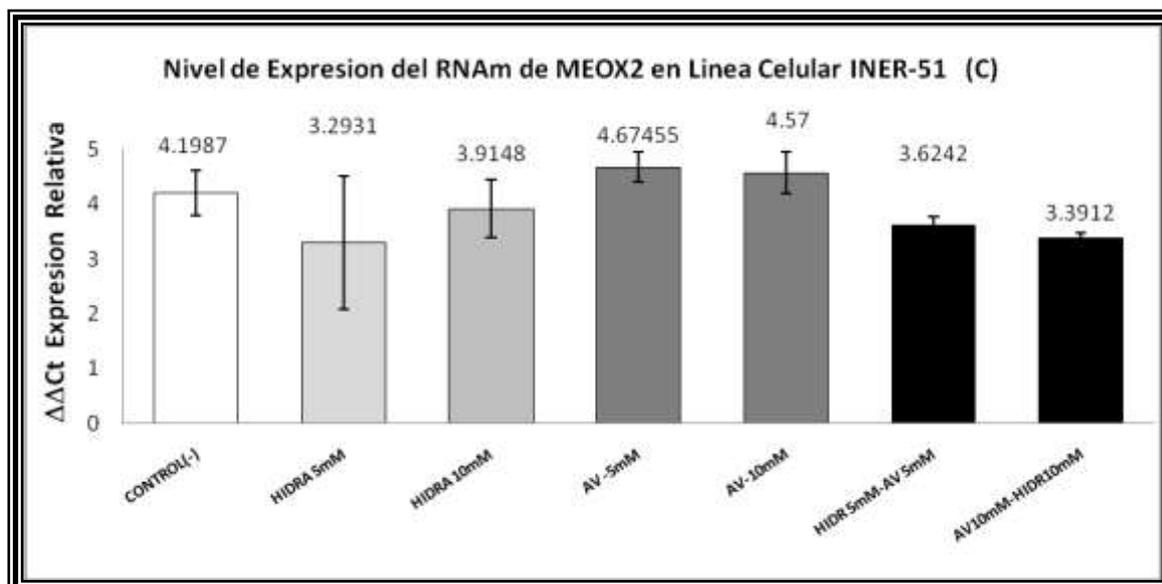


Figura C,D, análisis de expresión para el gen MEOX2, mediante ensayos de PCR en tiempo real, sobre las muestras de las líneas celulares tipo AD pulmonar; INER-51 e INER-37, en color blanco como control negativo libre de tratamiento, bajo tratamiento Hidralazina (HIDR) concentración 5mM y 10mM color gris claro; Acido Valproico (AV) concentración 5mM y 10mM, en color gris oscuro, mientras que un tratamiento combinando de HIDR 5mM + AV 5mM y HIDR 10mM + AV 10mM en color negro, el cultivo celular *in vitro* se realizó por 96 hora.

En la figura C, D, podemos observar el análisis *in vitro* del cultivo en ambas líneas celulares con HIDR y AV, representado mediante el análisis del índice de expresión relativa $\Delta\Delta C_t$ por PCR en tiempo real, puede apreciarse el aumento en la expresión para el gen MEOX2, en concentraciones bajas (5mM), dependiente del mecanismos de regulación epigenética, con el uso de Hidralazina y Ácido Valproico.

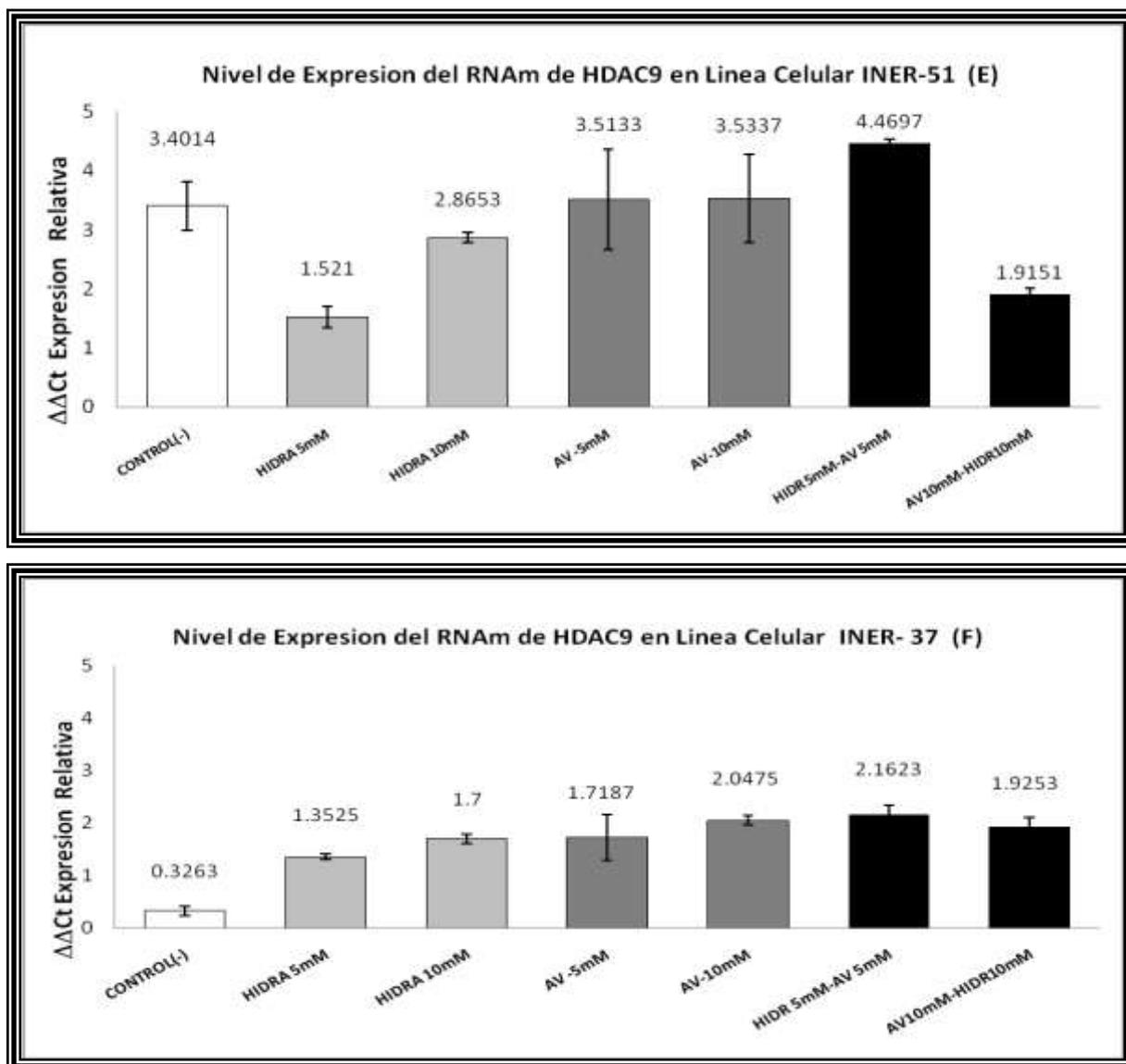


Figura E, F. Análisis de expresión para el gen HDAC9, mediante ensayos de PCR en tiempo real, sobre las muestras de las líneas celulares tipo AD pulmonar; INER-51 e INER-37, en color blanco como control negativo libre de tratamiento, bajo tratamiento Hidralazina (HIDR) concentración 5Mm y 10Mm color gris claro; Acido Valproico (AV) concentración 5Mm y 10Mm, en color gris oscuro, mientras que un tratamiento combinando de HIDR 5mM - AV 5mM HIDR 10mM - AV 10mM en color negro, el cultivo celular *in vitro* se realizó por 96 hrs.

En la figura E, F, podemos observar el análisis *in vitro* del cultivo en ambas líneas celulares con HIDR y AV, representado mediante el análisis del índice de expresión el $\Delta\Delta C_t$ por PCR en tiempo real, puede apreciarse el aumento en la expresión para el gen HDAC9, en concentraciones bajas (5Mm), dependiente del mecanismos de regulación epigenética, con el uso de Hidralazina y Ácido Valproico.

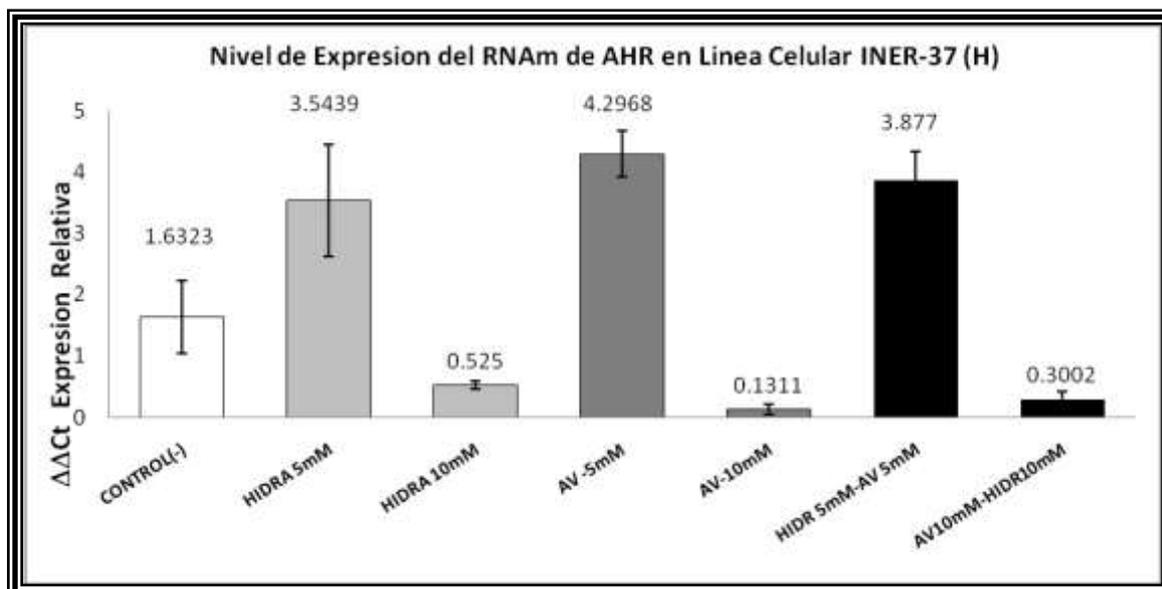
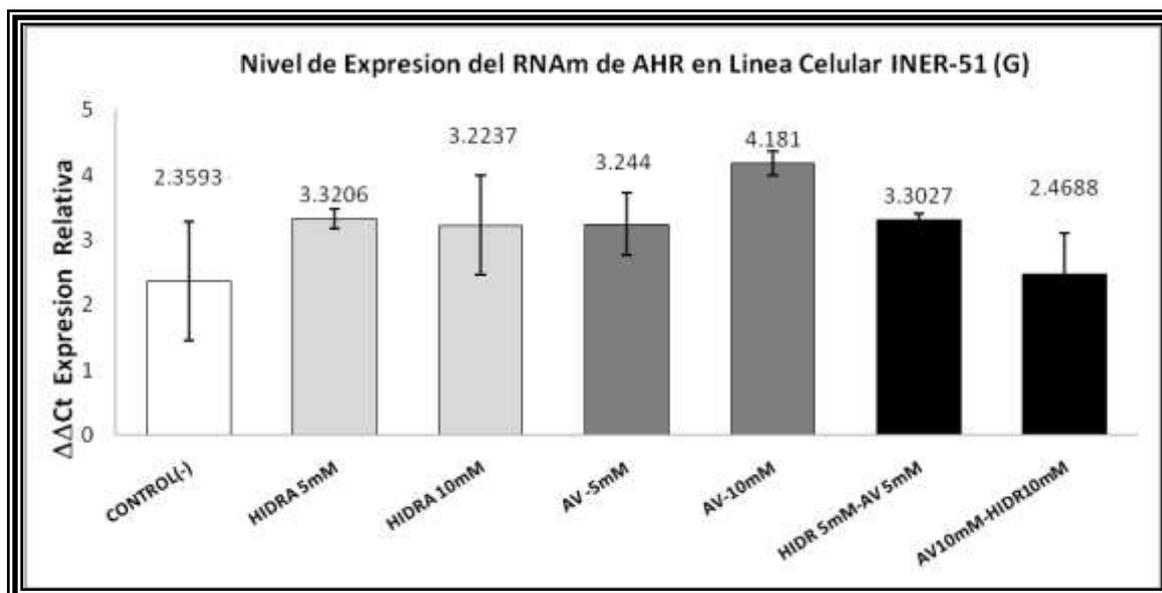


Figura G,H. Análisis de expresión para el gen AHR, mediante ensayos de PCR en tiempo real, sobre las muestras de las líneas celulares tipo AD pulmonar; INER-51 e INER-37, en color blanco como control negativo libre de tratamiento, bajo tratamiento Hidralazina (HIDR) concentración 5Mm y 10Mm color gris claro; Acido Valproico (AV) concentración 5Mm y 10Mm, en color gris oscuro, mientras que un tratamiento combinando de HIDR 5mM - AV 5mM HIDR 10mM - AV 10mM en color negro, el cultivo celular *in vitro* se realizó por 96 hrs.

En la figura G, H, podemos observar el análisis *in vitro* del cultivo en ambas líneas celulares con HIDR y AV, representado mediante el análisis del índice de expresión el $\Delta\Delta C_t$ por PCR en tiempo real, puede apreciarse el aumento en la expresión para el gen AHR, en concentraciones bajas (5Mm), dependiente del mecanismos de regulación epigenética, con el uso de Hidralazina y Ácido Valproico.

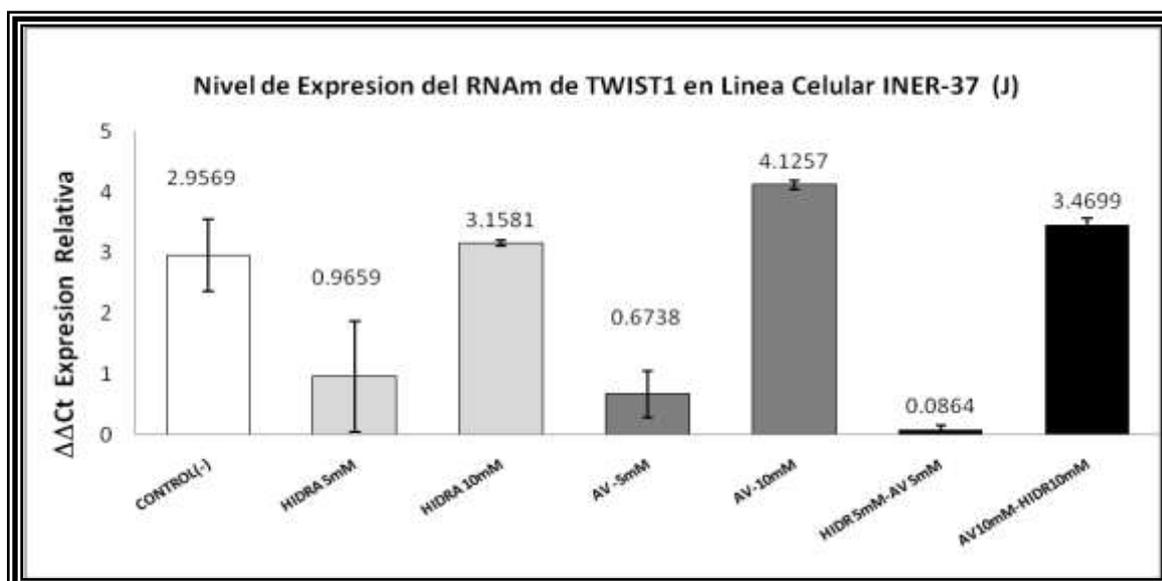
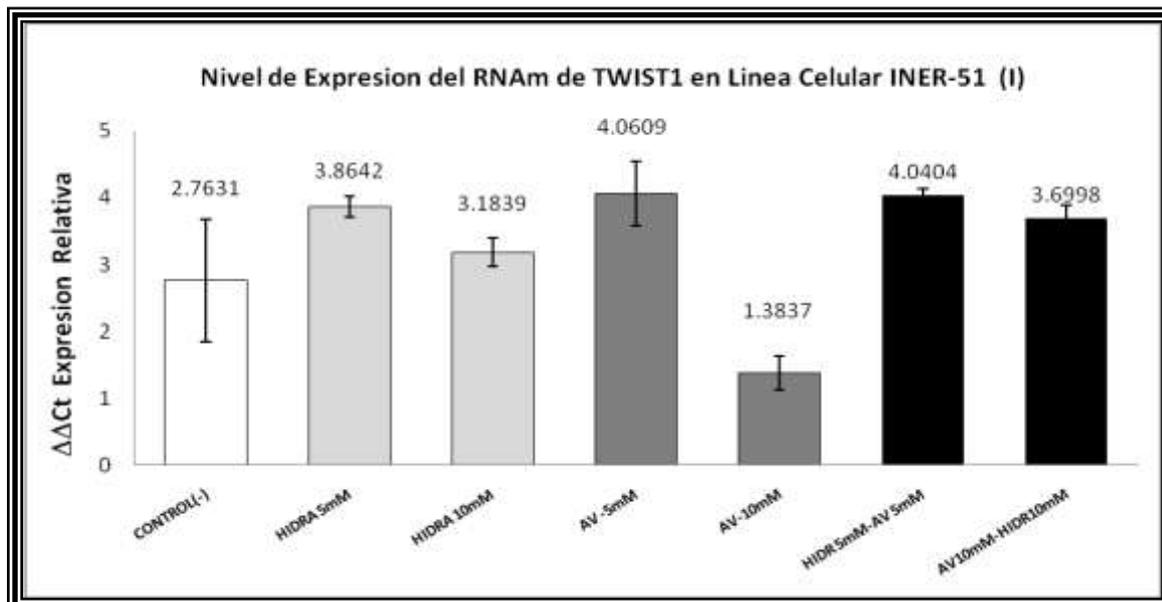


Figura I,J. Análisis de expresión para el gen TWIST1, mediante ensayos de PCR en tiempo real, sobre las muestras de las líneas celulares tipo AD pulmonar; INER-51 e INER-37, en color blanco como control negativo libre de tratamiento, bajo tratamiento Hidralazina (HIDR) concentración 5Mm y 10Mm color gris claro; Acido Valproico (AV) concentración 5Mm y 10Mm, en color gris oscuro, mientras que un tratamiento combinando de HIDR 5mM - AV 5mM HIDR 10mM - AV 10mM en color negro, el cultivo celular *in vitro* se realizó por 96 hrs.

En la figura I, J, podemos observar el análisis *in vitro* del cultivo en ambas líneas celulares con HIDR y AV, representado mediante el análisis del índice de expresión el $\Delta\Delta C_t$ por PCR en tiempo real, puede apreciarse el aumento en la expresión para el gen TWIST1, en concentraciones altas (10Mm), dependiente del mecanismos de regulación epigenética, con el uso de Hidralazina y Ácido Valproico.

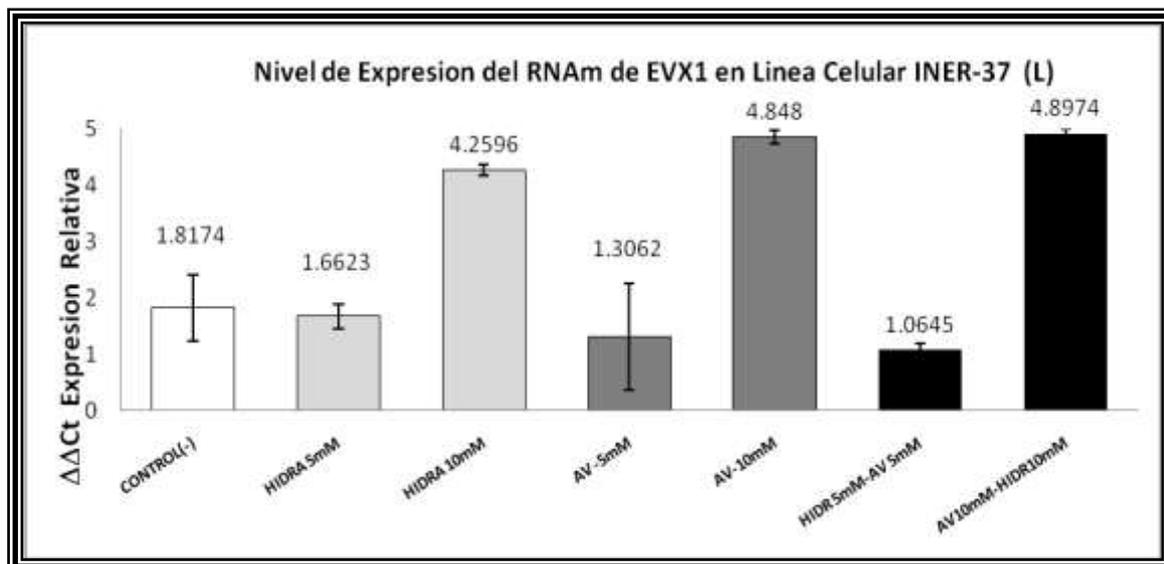
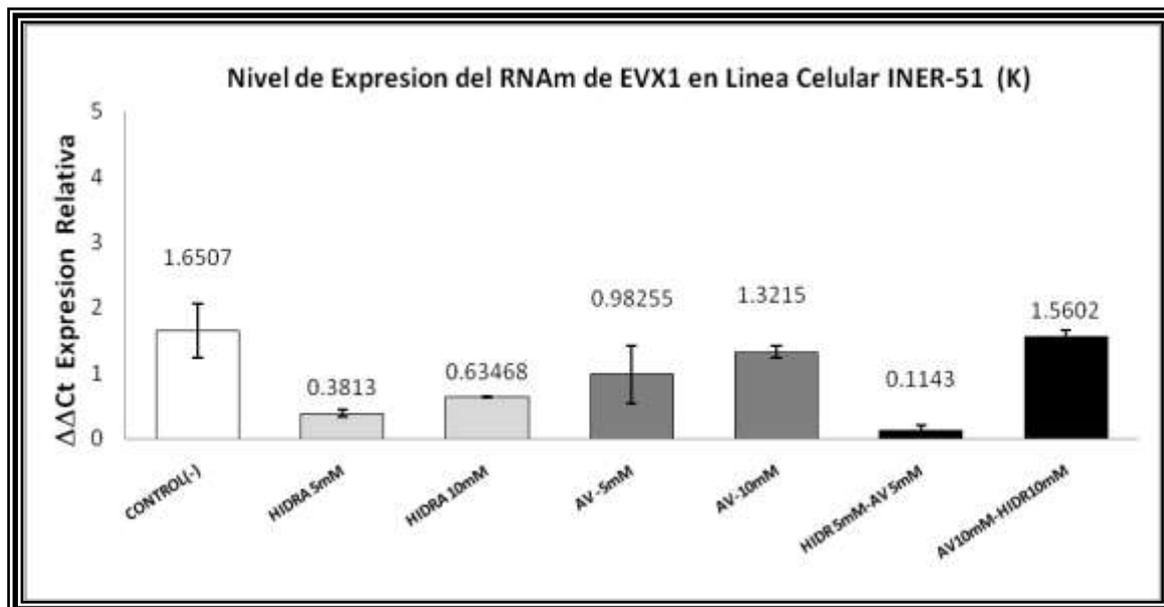
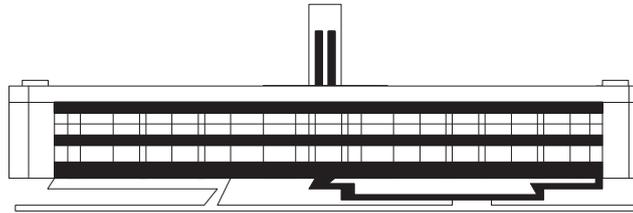


Figura K,L. Análisis de expresión para el gen EVX1, mediante ensayos de PCR en tiempo real, sobre las muestras de las líneas celulares tipo AD pulmonar; INER-51 e INER-37, en color blanco como control negativo libre de tratamiento, bajo tratamiento Hidralazina (HIDR) concentración 5Mm y 10Mm color gris claro; Acido Valproico (AV) concentración 5Mm y 10Mm, en color gris oscuro, mientras que un tratamiento combinando de HIDR 5mM - AV 5Mm HIDR 10mM - AV 10Mm en color negro, el cultivo celular *in vitro* se realizó por 96 hrs.

En la figura K, L, podemos observar el análisis *in vitro* del cultivo en ambas líneas celulares con HIDR y AV, representado mediante el análisis del índice de expresión el $\Delta\Delta\text{Ct}$ por PCR en tiempo real, puede apreciarse el aumento en la expresión para el gen EVX1, en concentraciones altas (10Mm), dependiente del mecanismos de regulación epigenética, con el uso de Hidralazina y Ácido Valproico.



18.1 PUBLICACION CIENTIFICA DERIVA DEL TRABAJO DE TESIS.



Oncología clínica, genómica y epigenómica en cáncer broncogénico.

RAFAEL SERRANO-RAMÍREZ‡
CÉSAR MISAEL CERECEDO-ZAPATA‡
DIEGO LIMÓN RIVAS‡
ROSARIO GONZAGA PÉREZ‡
ALDO ÁLVAREZ MORÁN[§]
JOSÉ LUIS TÉLLEZ BECERRA[§]
FEDERICO ÁVILA-MORENO‡,II

* Artículo apoyado por el Proyecto de Investigación Básica.
CONACYT # 53643.

‡ Departamento de Investigación en Microbiología, Unidad de
Investigación. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
Ismael Cosío Villegas (INER).

§ Subdirección de Cirugía, INER.

II Departamento de Investigación en Bioquímica, Unidad de
Investigación, INER.

Trabajo recibido: 05-XI-2009; aceptado: 09-II-2010

Conflicto de intereses: ninguno

RESUMEN

El cáncer broncogénico continúa siendo un grave problema de salud pública en México y a nivel mundial, ocupando la primera causa de muerte por neoplasias malignas en ambos géneros. Dicho panorama es debido a la falta de un diagnóstico

Palabras clave: temprano, motivada por la baja especificidad del cuadro clínico y la escasa sensibilidad de los métodos diagnósticos en etapas tempranas. Los carcinomas pulmonares se dividen en dos grupos:

Key words: Lung carcinomas pulmonares de células pequeñas y carcinomas pulmonares de células no-pequeñas, siendo este último el más frecuente con 80% de los casos.

Entre los factores de riesgo asociados destacan: tabaquismo, exposición a asbesto, radiación, hidrocarburos policíclicos, PM_{2.5}, PM₁₀, etc., así como factores protectores como la alta ingesta de boro, terapia de reemplazo hormonal y consumo abundante de frutas y vegetales, estos últimos actualmente en controversia. Con relación al inicio del tratamiento químico y/o radioterapéutico, el paciente debe ser estadiado conforme a la clasificación TNM, donde se distinguen dos grupos, aquéllos be-

ABSTRACT

Bronchogenic carcinoma remains a serious public health problem in Mexico and worldwide, representing the first cause of death due to malignant neoplasms in both genders. This situation is motivated by the lack of an early diagnosis due to the low specificity of clinical data and the low sensitivity of diagnostic methods in early stages. Lung carcinomas are divided in two groups: small cell lung carcinomas and non-small cell lung carcinomas, the last being the most frequent type comprising 80% cases. Associated risk factors include: tobacco habit, exposure to asbestos, radiation, polycyclic hydrocarbons, PM_{2.5}, PM₁₀, etc., as well as protective factors such as a high ingestion of boron, hormone replacement therapy and abundant intake of fruits and vegetables, though these last are still in controversy. With relation to the beginning of chemotherapy and/or radiotherapy, the patient must be staged according to TNM classification, where two groups are distinguished, those benefited by surgery and those with unresectable tumors. Although several internationally described therapeutic schemes exist, until now they offer no significant advantages over those recommended by the American Society of Clin-

neficiados por cirugía y aquéllos con tumores considerados irsecables. A pesar de distintos esquemas terapéuticos internacionalmente descritos, ninguno a la fecha ofrece ventajas significativas sobre los recomendados por la Sociedad Americana de Oncología Clínica. Sin embargo, se tienen resultados alentadores provenientes de la investigación básica y clínica que, mediante el uso de herramientas de análisis masivo del genoma, han identificado marcadores genéticos y epigenéticos predictores de respuesta al tratamiento, sobrevida, recaídas, etc., mismos que están en espera de ser aceptados como normadores del tratamiento en carcinoma broncogénico.

ONCOLOGÍA PULMONAR

Cáncer pulmonar

El cáncer pulmonar es un grave problema de salud pública a nivel mundial debido a su alta incidencia y letalidad. En México, causa altos costos económicos, tanto para instituciones del sector salud como del sector productivo con un costo anual promedio por paciente mayor a \$100 mil, de acuerdo con proyecciones del sector salud en 2001. Dichas estimaciones por paciente a nivel nacional, incluyen entre otros gastos, atención hospitalaria especializada, servicios de oncología clínica, quirúrgica y quimioterapia.¹ Este panorama es debido, en parte, a la incapacidad de los servicios de salud para ofrecer un diagnóstico y tratamiento oportunos. Al respecto, se sabe que un paciente diagnosticado en estadios clínicos tempranos, con hallazgo radiográfico de imagen de tórax de nódulo pulmonar solitario asintomático, posee mayor índice de respuesta a tratamiento tanto quirúrgico como quimio y/o radioterapéutico cercano al 70%. En contraste, sólo el 15% de pacientes responden parcialmente en estadios avanzados con pobre índice de sobrevida de acuerdo con reportes de Estados Unidos México.³ Reportes de Estados Unidos (1997) han señalado un índice de sobrevida de cinco años (clasificación TNM, sexta edición) cercano al 5% para el estadio clínico IIIB y prácticamente nulo (1%) para estadios IV; en contraste con el alto índice de sobrevida alcanzado por pacientes diagnosticados en estadios clínicos tempranos IA

ical Oncology. Nevertheless, there are encouraging results from basic and clinical research that through massive genome analysis have identified genetic and epigenetic markers associated with the prediction of response to therapy, survival, relapses, etc., and that await to be accepted as guiders for the treatment of bronchogenic carcinoma.

(61%); IB (38%); y IIA (34%), mientras que para estadios IIB y IIIA son de 24 y 13%, respectivamente.²

Estos datos, desde el punto de vista epidemiológico, se relacionan con diversas causas de exposición a factores de riesgo, aunado a la baja especificidad del cuadro clínico de los pacientes debido, en parte, a la baja sensibilidad de los métodos diagnósticos empleados durante la etapa asintomática. Así, en la actualidad no se ofrece solución alguna, lo que conlleva a altos índices de mortalidad y baja eficiencia terapéutica.

Tipos histológicos

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer pulmonar puede dividirse en dos grandes grupos: carcinomas pulmonares de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés) y carcinomas pulmonares de células no-pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés). Los cuales y de acuerdo con distintos reportes señalan al grupo NSCLC con cerca del 80% de todos los casos de cáncer pulmonar, integrado a su vez por tres tipos histopatológicos principales: carcinoma de células grandes (LCC), carcinomas epidermoides o carcinomas de células escamosas (SCC) y adenocarcinomas (AD); abarcando el SCC y AD, cerca del 85% de todos los casos de NSCLC.⁴ En México, dicha incidencia se conserva de acuerdo con datos del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas.⁵

No obstante que SCC y AD poseen diferencias en cuanto a la evolución clínica de los pacien-

tes y/o asociación a factores de riesgo como el tabaco,⁶ los esfuerzos clínico-quirúrgicos y terapéuticos permanecen genéricos y ampliamente inefectivos, muy lejos de contrarrestar los elevados índices de mortalidad y pobres índices de sobrevida.

Hoy, la clasificación histopatológica de tumores pulmonares y pleurales propuesta por la OMS y la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer Pulmonar (conocida como WHO/IASLC [realizada en 1999]), considera a esta neoplasia como un conjunto de tumores epiteliales.⁷ Esta clasificación incluye tanto lesiones precursoras como preinvasoras, las cuales juegan un papel interesante en el cáncer pulmonar al representar lesiones del epitelio bronquial con capacidad de progresar hacia los principales tipos histológicos de cáncer pulmonar; p. ej., la hiperplasia adenomatosa atípica comúnmente encontrada en zonas periféricas del pulmón, representa el precursor de tumores tipo AD en el 23.2% de los casos, no obstante su alta heterogeneidad histológica.⁷

En nuestro país, estudios retrospectivos (1971 a 1990) sobre la prevalencia del tipo histopatológico señalaron en una muestra de 923 casos del Hospital General de México para el género masculino, 34.2% del tipo SCC y 28.4% del AD; mientras que en el femenino, 28.9% correspondieron a SCC y 38.9% al AD.⁸

Estimaciones del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas durante un período de 40 años muestran un cambio en el tipo histológico predominante, como el reemplazo del tipo histológico SCC por el tipo AD. Dicho análisis incluyó pacientes bajo atención médica a partir de 1957 a 1996, encontrando que la incidencia de AD se modificó gradualmente por década, representando en 1957-1966, 21%; 1967-1976, 14%; 1977-1986, 41%; alcanzando en 1987-1996, 62%. En contraste, el tipo SCC disminuyó su incidencia durante el mismo período de tiempo a partir del 61%, pasando por 36%, hasta alcanzar 26%.

sulta congruente con la reportada a nivel mundial con la disminución en la predominancia del tipo histológico SCC y aumento del tipo AD.¹⁰ En México, en datos más recientes (2000 a 2002), se confirma también esta apreciación con el 49% de casos del tipo AD; 19%, SCC; 16%, SCLC; y 14%, metastáticos no-primarios pulmonares.²

Adicional al diagnóstico histopatológico de neoplasias pulmonares, se ha intentado predecir el tipo histológico de lesiones neoplásicas bronquiales a partir de estudios de imagen; sin embargo, este método ha mostrado una mínima certeza sobre los resultados definitivos que ofrece el estudio histopatológico de una biopsia pulmonar.²

Epidemiología en cáncer pulmonar

En 2005, a nivel mundial, fueron reportadas aproximadamente 7.6 millones de defunciones por algún tipo de cáncer, considerando 40% de estas muertes prevenibles. En México, ese mismo año, las defunciones por esta causa fueron aproximadamente de 64 mil personas, de ellas 37 mil fueron menores de 70 años; con base a esto, proyecciones de la OMS habían señalado que para ese año, el cáncer provocaría alrededor de 12.5% del total de muertes en México.¹¹

El cáncer de pulmón, bronquios y tráquea ocupa el segundo lugar de incidencia en ambos géneros;¹² sin embargo, mundialmente⁶ incluyendo a Estados Unidos¹² y México,⁸ el cáncer pulmonar se ubica como la neoplasia de mayor letalidad, ocupando la primera causa de muerte por neoplasias malignas en ambos sexos,^{8,12,13} reafirmando hoy como un serio problema de salud pública. La incidencia de esta patología neoplásica se presenta en orden de mayor a menor en Estados Unidos, Nueva Zelanda, Reino Unido, Holanda, África y el sur de Asia. Mientras que al separar al género femenino, este orden de incidencia cambia, siendo Estados Unidos, Canadá y Dinamarca los países con mayor incidencia; y Francia, Japón y España los de menor incidencia.¹⁴

En México reportes de 2002, han indicado una tasa de mortalidad por neoplasias malignas de 57.1 por cada 100 mil habitantes, cifra que aumentó en 2004 a 61 por cada 100,000;⁵ para 2007 fue la tercera causa de muerte con 65,112 defunciones de un total de 514,420, oficialmente reportadas.¹⁵ Durante ese mismo año en el estado de Chiapas, las neoplasias malignas ocuparon el primer lugar como causa de mortalidad, para el resto de las entidades federativas dicho grupo de patologías se encontraban entre los tres primeros lugares como causa de mortalidad.¹⁵ Adicionalmente, mientras el cáncer pulmonar representa

la primera causa de muerte por tumores malignos constituyendo el 11.8% de todas las muertes ocurridas por neoplasias malignas, ésta representó una tasa de mortalidad de 6.6 por cada 100 mil habitantes en 1998.5 Sin embargo, al limitarse a personas mayores de 65 años, la tasa representó 87.9 por cada 100 mil habitantes en el 2000; y 85.8 por cada 100 mil habitantes en 2004. Al compararse con otras patologías neoplásicas y no-neoplásicas ocupa el décimo lugar en causas de muerte en personas mayores de 65 años.¹⁶

En general, reportes del año 2001 pronosticaban para el 2010, la existencia de más de 10 mil muertes anuales en nuestro país a causa del cáncer pulmonar, lo cual sería posible si se tomara en cuenta el aumento de la esperanza de vida, pues el grupo de edad más afectado es la población cercana, en promedio, a los 75 años, además de tomar en cuenta el incremento en el consumo de tabaco;¹⁷ esto contrarresta con los datos proporcionados por otros autores, quienes señalan una disminución en la incidencia para hombres a partir de 1990 y para mujeres en 1980.¹⁸

Con base en lo anterior, es posible considerar que la falta de un diagnóstico oportuno, casi siempre ocurre en estadios clínicos avanzados IIIb y IV, deja sin oportunidad de resección quirúrgica curativa al paciente;¹³ explicando con ello, la alta tasa de mortalidad y el pobre índice de sobrevida a cinco años, en promedio menor al 14%,¹⁹ índice que contrasta con neoplasias de origen no pulmonar, cuyos índices de sobrevida son superiores al 60%; también contrasta con pacientes diagnosticados por hallazgo exploratorio en estadio clínico I de cáncer pulmonar, cuya tasa de sobrevida a cinco años es cercana al 70% con respuesta favorable a la terapia y menor tasa de recurrencia poscirugía.²⁰

Factores de riesgo en cáncer pulmonar

Los reportes epidemiológicos, en términos generales, destacan su principal relación con el tabaco, observando un desfase de aproximadamente 20 años entre el aumento del índice de tabaquismo y el momento de aparición de sintomatología o aparición de nuevos casos de cáncer pulmonar. Esto se ha demostrado a través del análisis en países donde el tabaquismo ha aumentado en

mujeres y que, sin embargo, muestran baja incidencia de neoplasias pulmonares, a diferencia de otros países donde su consumo sociocultural es más antiguo y constituyen regiones de alta incidencia dentro del mismo género femenino.¹⁴ Esta relación contrasta paradójicamente en la población femenina de China que muestra bajos índices en el consumo del tabaco, pero alto número de casos de cáncer pulmonar, probablemente atribuido a factores de riesgo adicionales o predisposición genética.¹⁴

Dicha correlación epidemiológica en cáncer pulmonar ha considerado el estudio de distintas variantes, como inicio, duración y tipo de tabaco consumido, siendo los dos primeros criterios los más importantes, observando un aumento de 8 a 15 veces la probabilidad del desarrollo de cáncer pulmonar en hombres, y de 2 a 10 veces el riesgo en mujeres. De igual modo, al suspenderse el tabaquismo es posible observar disminución en el riesgo de desarrollar cáncer pulmonar, alcanzando valores estadísticamente significativos posterior a cinco años, lo que de ningún modo logra alcanzar valores de riesgo de individuos no consumidores activos de tabaco.¹⁴ Mundialmente, incluido México, en los últimos años se ha propuesto un alto grado de correlación entre tabaquismo y desarrollo de carcinomas pulmonares tipo SCC.^{6,21}

Actualmente, en un estudio realizado a través de metaanálisis por Taylor et ál muestran una relación causal entre el tabaquismo pasivo y cáncer pulmonar en el género femenino, dicho análisis arrojó una razón de momios de 1.27 (IC95% 1.17-1.37).¹⁰ No obstante, destacan otros factores de riesgo, entre ellos la exposición ocupacional y laboral-habitacional como es la exposición a asbestos que combinada con el tabaquismo, multiplica el riesgo de cáncer pulmonar y mesotelioma.¹⁴ Otro factor de riesgo es la radiación, como sucede en sobrevivientes a explosiones o accidentes por radiación atómica y tratamientos radioterapéuticos, así como la exposición a partículas alfa emitidas por gas radón, tanto en la industria minera como en zonas conurbadas.¹⁴ También, la contaminación del aire en espacios cerrados, secundario al uso de calentadores y cocción de alimentos a altas temperaturas, es la posible causa del alto índice de cáncer broncogé-

nico en mujeres del continente asiático principalmente en China provocado por el uso de aceites vegetales no refinados, que eleva niveles de benzopireno.¹⁴

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos derivados de la combustión de materia orgánica son propuestos como participantes en la carcinogénesis pulmonar. Cabe señalar que los compuestos policíclicos aromáticos modificados a su forma procarcinogénica, tales como derivados del diolepóxido a través de los miembros de la familia del citocromo P450, poseen capacidad de unión covalente al DNA en la posición N2 de la base nitrogenada guanina y N6 en adenina.²² A este respecto, nuestro grupo de investigación, recientemente ha propuesto la identificación de aberraciones estructurales del DNA (aumento en la variación del número de copias), así como variaciones en el patrón de metilación de secuencias promotoras del gen AHR residente de la región citogenética 7p21.1, región con aberraciones estructurales de alta frecuencia en la progresión del cáncer pulmonar (datos enviados a publicación). La proteína del gen AHR posee la capacidad de actuar como receptor a nivel citoplasmático de intermediarios de hidrocarburos aromáticos y, posteriormente, como factor transcripcional involucrado en la modificación de los niveles de expresión de distintos genes, entre otros aquellos que codifican para enzimas de fase I y II metabolizadoras de agentes xenobióticos, como CYP1A1, etc. De acuerdo con nuestros resultados, alteraciones en estos genes probablemente generen presión de selección desde etapas tempranas del desarrollo neoplásico pulmonar, potenciados por la exposición a factores de riesgo ambientales como los derivados de hidrocarburos aromáticos.

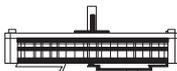
Por otro lado, diferentes estudios han sugerido la posible correlación entre la dieta y el desarrollo de cáncer broncogénico. Entre las más estudiadas destaca la relación con el consumo de frutas y verduras; a este respecto, las evidencias no dejan clara una conclusión. En 1996, el estudio CARET concluye que la suplementación de la dieta con beta-carotenos aumenta el riesgo de desarrollar cáncer pulmonar.²³ Sin embargo, otro estudio realizado en 200 en más de 400,000 personas, concluye que la alta ingesta de umbe- líferas (representado principalmente por zanaho-

ria rica en beta-caroteno) es un factor protector para cáncer pulmonar.²⁴ Asimismo, el alto consumo de boro provoca aumento en los niveles de 17-beta-estradiol, semejante al factor protector causado por la terapia de reemplazo hormonal estrogénica para cáncer pulmonar.²⁵ Contrariamente, el consumo de café²⁶ y la obesidad asociado a múltiples causas de morbimortalidad, aumentan el riesgo de cáncer pulmonar reforzado por el consumo de tabaco.²⁷

En otro aspecto, destacan la participación de distintas partículas respirables PM_{2.5} y PM₁₀ (llamadas así por su diámetro en micrómetros) con capacidad carcinogénica y genotóxica. Ambas derivadas de diversos materiales, entre otros: cristales de sílice (cuarzo y cristobalita), fibras de asbesto y polvos de algunos tipos de madera, etc., son consideradas como factores de riesgo ocupacional-ambiental capaces de transformar vías de transducción de señales, proliferación celular y aumento de especies reactivas del oxígeno, tanto a nivel local como sistémico durante la respuesta inflamatoria a través de NFκB y AP-1 miembros de la vía de activación de MAPKs.²⁸ Asimismo, causan daño estructural al DNA genómico evidenciado en líneas celulares de cáncer pulmonar²⁹ y sobreactivación in vitro de células de la respuesta inmune innata derivadas de pacientes con afecciones pulmonares.³⁰

Cirugía y tratamiento oncológico en cáncer pulmonar

Una vez establecido el diagnóstico de cáncer pulmonar, el siguiente paso es determinar el estadio clínico bajo el cual se norma el tratamiento y pronóstico,³¹ siendo, al respecto, la interpretación anatomopatológica sólo una herramienta confirmatoria del diagnóstico y el tipo histopatológico del paciente, con limitaciones respecto al factor pronóstico. Al momento de establecer la estadificación se identifican dos grupos de pacientes, aquéllos con tumores quirúrgicamente resecables, o pacientes con tumores no-resecables. Lo cual permite la toma de decisión frente a procedimientos adicionales, como son los esquemas de quimioterapia, radioterapia, tratamientos paliativos, etc.,³² e impacto en el pronóstico y sobrevida de los pacientes.



Con relación a lo anterior, diversos reportes basados en la estadificación TNM señalan al diagnóstico en estadios tempranos con mayor margen de curabilidad, al mostrar índices de sobrevida a cinco años superiores al 40%, lo que contrasta con pacientes estadificados en estadios tardíos con tumores no resecables y sobrevida en promedio menor a 1 año.³³

El SCLC es considerado como una enfermedad sistémica al momento de su manifestación sintomática. Cerca de dos tercios de los casos presentan enfermedad fuera del tórax e involucran al menos un órgano. Debido a que no se pueden identificar las micrometástasis, la quimioterapia es considerada la primera línea de tratamiento. Por ello, la clasificación TNM no es usada para el grupo SCLC.³⁴

En relación con la NSCLC, la estadificación realizada a través del sistema TNM (sexta edición) identifica cuatro estadios subdivididos, los tres primeros en A y B, siendo los estadios IA, IB, IIA y IIB estadísticamente con mayor beneficio a través de la intervención quirúrgica. No obstante, ciertos casos en estadios IIIA pueden ser viables a resección quirúrgica, en cuyo caso es obligado el uso coadyuvante de quimioterapia y radioterapia, mientras que estadios IIIB y IV son considerados inoperables.³² Actualmente se ha propuesto la séptima edición para clasificación TNM y estadios clínicos. En la Tabla I se muestra la comparación de la sexta y séptima edición de la clasificación TNM; y en la Tabla II, la estadificación de acuerdo con la séptima edición TNM comparada con la sexta edición.³⁵

Con base a lo anterior, el impacto de la cirugía oncopulmonar sobre el índice de sobrevida de pacientes oncológicos depende principalmente del estadio clínico de éstos; siendo en estadio I, 50%; estadio II, 30%; estadios IIIA y IIIB, 17% y 5%, respectivamente; mientras que en estadio IV, el índice de sobrevida es nulo.

El uso de quimioterapia en pacientes cuya resección pueda ser completa; al respecto, un estudio multicéntrico en pacientes con tumores resecados totalmente, demostró que el tratamiento de quimioterapia en combinaciones de cisplatino con alguno de los siguientes fármacos: vindesina, vinblastina, vinorelbina o etopósido aumentó la sobrevida a cinco años en prome-

dio del 5%, en contraste de aquellos pacientes con ausencia de quimioterapia adyuvante.³⁶ Sobre ello, se ha intentado determinar diferencias sobre el éxito de la cirugía de acuerdo con la raza, etnicidad, etc.; sin embargo, la única diferencia probable es la falta de acceso a los servicios de salud y, por consecuencia, el acceso al tratamiento médico-quirúrgico. Concluyendo que la sobrevida entre pacientes de raza blanca y negra resulta similar.³³

En 2003, la Sociedad Americana de Oncología Clínica edita la actualización del tratamiento no quirúrgico para pacientes con diagnóstico NSCLC considerados inoperables. Para pacientes en estadio III, recomienda el inicio de quimioterapia basada en derivados del platino en combinación con radiación torácica, pues dicha combinación ha demostrado beneficiar la sobrevida de los pacientes en contraste con aquellos que están bajo un solo esquema de terapia.³² Mientras que para pacientes en estadio IV, sólo deberá iniciarse tratamiento con quimioterapia, ya que ha demostrado sostener la sobrevida de estos pacientes. Entre ellos, la primera línea de quimioterapia recomienda una combinación de dos fármacos, uno derivado del platino y otro fármaco libre de platino por no más de 6 ciclos, debiendo suspenderse al 4 ciclo en pacientes que no responden al tratamiento. A este respecto, se recomienda como tratamiento de segunda línea el docetaxel (miembro de los taxanos, análogo de paclitaxel) para pacientes que han progresado a pesar de la primera línea de tratamiento con derivados del platino, este tratamiento resulta benéfico en lo que respecta a sobrevida de pacientes que previamente han recibido tratamiento con esquemas combinados y con derivados del platino.^{32,37} En caso de falla con doxacetel se recomienda su remplazo con gefitinib³² o erlotinib (ambos inhibidores de tirosin-cinasa en EGFR) debido a la alta presencia de EGFR en carcinomas broncogénica

Dicha recomendación se comprueba en un estudio que arroja índices de sobrevida a 1 año del 33% en pacientes tratados con erlotinib, contra 22% del grupo placebo otorgando mejoría en la calidad de vida del paciente bajo previa segunda línea de tratamiento.³⁸ Al separar los grupos, se observó mejor respuesta en asiáticos, mujeres, tumores tipo AD y pacientes no fumadores.³⁸ Se

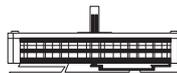


Tabla I. Clasificación TNM para neoplasias pulmonares: comparación entre la sexta y séptima edición.

T	Tumor primario	
	Sexta edición	Séptima edición
Tx	El tumor primario no puede ser evaluado o la presencia del tumor se sugiere por la presencia de células malignas en esputo o lavado bronquial o no ha sido visualizado en imagen o broncoscopía	Sin cambios
T0	No evidencia de tumor primario	Sin cambios
Tis	Carcinoma in situ	Sin cambios
T1	Tumor que mide menos o igual a 3 cm en su eje mayor rodeado por pulmón o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal que el bronquiolo principal, no en bronquio principal	Sin cambios
T1a	No existente	Tumor que mide menos o igual a 2 cm en su eje mayor
T1b	No existente	Tumor que mide más de 2 cm y menos o igual a 3 cm en su eje mayor
T2	Tumor que mide más de 3 cm en su eje mayor o tumor que tiene alguna de las siguientes características: involucra bronquio principal a más de 2 cm de la carina, invade pleura visceral o está asociada con atelectasias o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hiliar, pero no involucra el pulmón entero	Tumor que mide más de 3 cm y menos o igual a 7 cm en su eje mayor o tumor que tiene alguna de las siguientes características: involucra bronquio principal a más de 2 cm de la carina, invade pleura visceral o está asociada con atelectasias o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hiliar, pero no involucra el pulmón entero, (si presenta alguna de estas características y mide menos de 5 cm será clasificado como T2a)
T2a	No existente	Tumor que mide más de 3 cm y menos o igual a 5 cm en su eje mayor
T2b	No existente	Tumor que mide más de 5 cm y menos o igual a 7 cm en su eje mayor
T3	Tumor de cualquier tamaño que invade, pared torácica, diafragma, nervio frénico, pleura mediastinal, pericardio parietal o tumor en el bronquio principal a menos de 2 cm de la carina principal, pero sin involucrarla, o asociada a atelectasias o neumonitis obstructiva del pulmón entero	Tumor mayor de 7 cm o que invade, pared torácica, diafragma, nervio frénico, pleura mediastinal, pericardio parietal o tumor en el bronquio principal a menos de 2 cm de la carina principal, pero sin involucrarla, o asociada a atelectasias o neumonitis obstructiva del pulmón entero o nódulo(s) separado(s) del tumor en el mismo lóbulo
T4	Tumor de cualquier tamaño que invade alguna de las siguientes estructuras: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpos vertebrales, carina o derrame pleural o pericárdico maligno o que presenta nódulo(s) separados del tumor en un diferente lóbulo ipsilateral	Tumor de cualquier tamaño que invade alguna de las siguientes estructuras: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpos vertebrales, carina o que presenta nódulo(s) separados del tumor en un diferente lóbulo ipsilateral

Continuación Tabla I.

N			Linfonodos regionales	
	Sexta edición		Séptima edición	
NX	Los linfonodos regionales no pueden ser evaluados		Sin cambios	
N0	Sin presencia de metástasis a linfonodos regionales		Sin cambios	
N1	Metástasis a linfonodos ipsilaterales peribronquiales, hiliares y/o intrapulmonares incluyendo los envueltos por extensión directa		Sin cambios	
N2	Metástasis en linfonodos mediastinales y/o subcarinales ipsilaterales		Sin cambios	
N3	Metástasis en linfonodos mediastinales contralaterales, hiliares contralaterales, escalenos o supraclaviculares		Sin cambios	
M			Metástasis	
	Sexta edición		Séptima edición	
MX	Las metástasis a distancias no pueden ser valoradas		Sin cambio	
M0	Sin metástasis a distancia		Sin cambio	
M1	Metástasis a distancia		Sin cambio	
M1a	No existente		Nódulo(s) separados del tumor en un lóbulo contralateral; tumor con nódulos pleurales o derrame pleural o (pericárdico) maligno	
M1b	No existente		Metástasis a distancia	

Adaptada de: Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, (referencia 35).

Tabla II. Estadificación clínica de neoplasias pulmonares de acuerdo con la descripción T/M entre la sexta y séptima edición.

T/M 6a., edición	T/M 7a., edición	N0	N1	N2	N3
T1 (menor o igual a 2 cm)	T1a	IA	IIA	IIIA	IIIB
T1 (más de 2 a 3 cm)	T1b	IA	IIA	IIIA	IIIB
T2 (menor o igual a 5 cm)	T2a	IB	IIIB→IIA*	IIIA	IIIB
T2 (más de 5 a 7 cm)	T2b	IB→IIA	IIIB	IIIA	IIIB
T2 (mayor a 7 cm)		IB→IIIB	IIIB→IIIA	IIIA	IIIB
T3 (invasión)	T3	IIIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4 (nódulos en mismo lóbulo)		IIIB→IIIB	IIIB→IIIA	IIIB→IIIA	IIIB
T4 (extensión)				IIIB	IIIB
M1 (pulmón ipsilateral)				IV→IIIB	IV→IIIB
T4 (derrame pleural)	M1a	IIIB→IV	IIIB/IV	IIIB→IV	IIIB→IV
		IV	IV	IV	IV
M1 (pulmón contralateral)					
M1 (distante)	M1b	IV	IV	IV	IV

* La flecha en negritas indica el cambio entre la sexta edición y la séptima nueva clasificación, clasificación recientemente propuesta.

Adaptada de: Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, (referencia 35).

ha intentado estudiar medicamentos agregados al esquema combinado, basado en derivados del platino como el erlotinib, que en combinación con carboplatino y paclitaxel no ofrece ventajas en la sobrevida, en comparación con el esquema original carboplatino-paclitaxel en pacientes sin tratamientos previos. Sin embargo, en pacientes nunca fumadores existe aparente mejora en la sobrevida.³⁹ Otro medicamento que se ha agregado al doble esquema es el bevacizumab. El tratamiento de paclitaxel con carboplatino y bevacizumab, anticuerpo dirigido en contra de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), es capaz de aumentar la sobrevida significativamente contra el tratamiento inicial de paclitaxel-carboplatino. La sobrevida a 1 año mediante esquema triple alcanza 51% contra el 44% del esquema doble; y a 2 años de 23% contra 15%, respectivamente. Sin embargo, el esquema triple con bevacizumab presenta mayores efectos adversos particularmente fiebre, neutropenia y hemorragia pulmonar.⁴⁰

En contraste, pacientes que no reciben tratamiento alguno presentan sobrevida en promedio de cuatro a cinco meses e índice de sobrevida a 1 año del 10%,⁴¹ datos que son escasamente menores a los obtenidos de pacientes sometidos a quimioterapia;⁴² empero, el impacto de estos esquemas terapéuticos se ve reflejado en la mejora de su calidad de vida y disminución de síntomas.⁴³ Se ha tratado aún sin éxito establecer algún esquema basado en citostáticos que otorgue a los pacientes aumento de sobrevida como puede observarse en un estudio comparativo de cuatro esquemas quimioterapéuticos, basados en cisplatino y paclitaxel, cisplatino y gemcitabine, cisplatino y docetaxel, así como cisplatino y paclitaxel, bajo el estudio de un total de 1,155 pacientes, organizados en grupos de 290 pacientes por esquema. Observando valores promedio de sobrevida de 7.9 meses y una tasa de sobrevida a 1 año de 33%. Mientras que a 2 años es de 11%, sin haber diferencias significativas entre los 4 esquemas.⁴⁴ Otros esquemas estudiados son cisplatino con pemetrexed y cisplatino con gemcitabine, entre los cuales se encontró para el primer esquema sobrevida a 1 año de 43.5% y a 2 años de 18.9%. Para el segundo esquema se observó sobrevida a 1 año de 41.9% y a 2 años

de 14%. Al comparar ambos esquemas existe mejor tolerancia al primero, con mejor respuesta para tipos histológicos no escamosos.⁴⁵ También, se ha comparado docetaxel contra pemetrexed y gefitinib como segunda línea de tratamiento, encontrando que los efectos en sobrevida son similares, pero con menor presencia de efectos adversos para pemetrexed y mejor tolerancia para gefitinib, motivo por el cual pueden ser propuestos como esquema de segunda línea de tratamiento.^{46,47} Indicaciones sobre el inicio de tratamiento quimioterapéutico y/o radiación para estadios III y IV señalan su comienzo inmediato al diagnóstico y/o estadificación del tumor no-resecable, debido al rápido deterioro del estado general del paciente en detrimento de beneficios del tratamiento.³² Al respecto, la radioterapia puede ser empleada no sólo como tratamiento curativo, sino también de manera paliativa, dicha terapia puede usarse como tratamiento de radiación de haz externo (TRHE) o endobronquial llamada braquiterapia endobronquial (BEB).⁴⁸

En estadios avanzados las acciones terapéuticas se limitan a controlar los síntomas y mantener la calidad de vida que se ve seriamente afectada por la oclusión bronquial bajo lo cual, el tratamiento en contra de dicha oclusión puede basarse en el uso de diversas estrategias, entre ellas: THRE, BEB, resección láser, criocirugía, electrocauterio, cirugía endobronquial y colocación de stent endoluminal. Se ha evaluado al TRHE como paliativo en pacientes con NSCLC avanzados ya que controla parcialmente los síntomas del tumor intratorácico, aunque aún permanece ambigua su efectividad y tolerancia al tratamiento en pacientes.⁴⁸ Con relación a BEB ha sido empleada para un mejor control local, incluso en combinación con otros tratamientos, este procedimiento cuenta con ventajas teóricas de mayor dosis de radiación al tumor, disminución rápida de la dosis precisa y adaptabilidad a la forma del tumor. La BEB se aplica en dos modalidades, intraluminal e intersticial. La intersticial es utilizada al momento de la resección quirúrgica y es colocada por vía percutánea o toracoscópica. Se divide en dosis bajas, intermedias y altas, siendo la dosis baja 1 Gy/h y dosis alta mayor a 10 Gy/h, ambas, con dosis totales de 20 a 40 Gy. Al respecto, se recomienda aplicación de 2 a 4 tratamientos con interva-

lo de una semana. Las complicaciones de este tratamiento son hemoptisis masiva, fístulas traqueoesofágicas, broncoespasmo, estenosis bronquial y bronquitis por radiación, las evidencias al comparar ambos métodos, TRHE y BEB, señalan que TRHE es más efectiva como tratamiento paliativo que la BEB.⁴⁸

Análisis masivo del genoma: marcadores genéticos para la elección y respuesta al tratamiento, pronóstico y sobrevida en cáncer broncogénico

En la actualidad se desarrollan múltiples expectativas a futuro sobre la elección del tratamiento basado en diversas alteraciones genéticas detectadas en el tumor. Tales estudios están bajo investigación básica a través del análisis masivo del DNA genómico (genómica y epigenómica) e investigación preclínica aplicada fase I y fase II, permanecen en espera de establecerse como normadores del tratamiento en cáncer broncogénico.³² Estudios recientes que incorporan dichas tecnologías de alto rendimiento para el estudio del genoma en cáncer y su correlación a nivel funcional de respuesta al tratamiento, han consolidado el camino que posiblemente aportará la medicina genómica y epigenómica sobre la oncología clínica pulmonar.

Respecto a lo anterior, en un estudio reciente publicado por Sos et ál,⁴⁹ analizó el perfil genómico (mediante Affymetrix 250K) de 84 líneas celulares de cáncer pulmonar (AD, SCC, LCC). El cual mostró cierto grado de semejanza al ser comparado con 371 tumores pulmonares primarios tipo AD,⁵⁰ registrando el impacto terapéutico que a nivel celular in vitro causó el uso de 12 fármacos. Entre otros, algunos vigentes en la práctica oncológica como: erlotinib, dasatinib, sunitinib, esto permitió correlacionar su efecto con la presencia de mutaciones previamente descritas en oncogenes asociados al cáncer pulmonar como son: KRAS, EGFR, BRAF, NRAS y PIK3CA, observando alto grado de quimiorresistencia. También fue posible detectar mayor eficacia del fármaco 17-AAG, miembro de los llamados antibióticos antitumorales, disminuyendo la alta tasa de proliferación celular tumoral, independientemente del tipo de alteraciones genéti-

cas en los diferentes genes estudiados. Análisis como éstos sugieren que los NSCLC poseen un grado de susceptibilidad heterogéneo a distintos agentes quimioterapéuticos, además de correlacionar resultados de ensayos in vitro de alto grado de similitud con ensayos clínicos in vivo, permitiendo la identificación de grupos de pacientes con capacidad de respuesta alta, baja o nula al tratamiento oncológico pulmonar.⁴⁹

Distintos marcadores genéticos han sido evaluados en cuanto a la predicción de respuesta al esquema quimioterapéutico más adecuado a través de distintos tipos de neoplasias como en cáncer de mama; la asociación entre la amplificación de ERBB2,50 con alta eficacia al tratamiento con trastuzumab; en leucemia mieloide crónica con traslocación de BCR/ABL, con mayor respuesta a imatinib.⁵¹ Mientras que para tumores estromales gastrointestinales y melanomas con mutación en cKIT, existe eficacia al uso de inhibidores de EGFR, como gefitinib y erlotinib.⁵²

Sin embargo, es ampliamente conocido que dichos fármacos pierden efectividad frente a mutaciones en EGFR, tanto en su región extracelular como intracelular en tumores pulmonares. Por lo que dichas alteraciones genéticas comienzan a posicionarse como fuertes predictores de sensibilidad a inhibidores de EGFR. Al respecto, mutaciones de KRAS, se consideran como indicador de sensibilidad al fármaco 17-AAG, actualmente bajo evaluación de fase I y fase II, al igual que tumores con aumento del número de copias de los genes ABL2 y SRC, con alta sensibilidad a inhibidores de SRC/ABL como dasatinib.⁴⁹

Así, derivado de estudios de análisis masivo del DNA genómico ha llegado a consolidarse la identificación de marcadores genéticos con la predicción de respuesta a la terapia y sobrevida de pacientes con cáncer broncogénico. Respecto a lo anterior, un estudio orientado al análisis de expresión masivo del RNAm, ha sido posible identificar la sobreexpresión de aproximadamente 158 genes potencialmente predictivos en pacientes NSCLC, tanto de etapas clínicas tardías como tempranas, permitiendo el agrupamiento de pacientes en términos pronósticos y sobrevida.⁵³ Dicho estudio realizado en Ontario Cancer Institute, Canadá, incluyó el análisis masivo de 165 muestras de tejido pulmonar de una cohorte de

pacientes con diagnóstico NSCLC, de las cuales 147 muestras ingresaron al análisis de validación cuantitativo por PCR (del inglés, polymerase chain reaction) en tiempo real. Dicho estudio concluyó una posible huella génica basada en la sobreexpresión de tres genes de alta penetrancia,

con aumento en la sobrevida, básicamente detectados en estadios clínicos tempranos E1 y E1I.⁵³ Cabe destacar la ubicación citogenética del gen STX1A en la región 7q11.23, así como del gen HIF1A en la región 14q23.2, ambas regiones recientemente confirmadas como regiones de alta frecuencia a través de estrategias de análisis masivo y plataformas de análisis para el estudio de secuencias polimórficas (SNPs) (SNP-arrays "Affymetrix 250K o 500K"). Identificando la presencia de alteraciones estructurales y epigenéticas, posiblemente tempranas o tardías del DNA genómico de alta frecuencia en la región 7p22, 7p21 y 7p15 (datos enviados para publicación) y cromosoma 14⁵⁴ en cáncer pulmonar. Con relación al gen STX1A, destaca su previa identificación a nivel pronóstico en una cohorte de pacientes del estado de Michigan, Estados Unidos, con diagnóstico histopatológico tipo AD.⁵⁵

Finalmente, análisis masivos para la expresión génica han identificado alrededor de 672 genes asociados con actividad invasiva en cáncer pulmonar.⁵⁶ Mientras que un análisis reciente sobre una cohorte de 125 pacientes asiáticos de Taiwan-China con diagnóstico NSCLC (60 AD, 52 SCC y 13 otros tipos), señaló la sobreexpresión de 485 genes con un coeficiente de variación superior al 3%, que posterior al análisis de regresión univariado (Cox test), identificó 16 genes con cierto grado de correlación hacia reaparición de tumores pulmonares a cinco años poscirugía. De ellos, 12 genes se confirmaron de riesgo, mientras que 4 correlacionaron con protección. Dichos resultados fueron validados estadísticamente empleando pruebas de rango y correlación mediante estimaciones cuantitativas por PCR en tiempo real. Concluyendo una huella de 5 genes (DUSP6, MMD, STAT1, ERBB3 y LCK) como indicadores de sobrevida en dos grupos de pacientes de bajo y alto riesgo en cáncer pulmonar.⁵⁷ Así, el desarrollo de pruebas de carácter genético permanecen en espera de ser incorporados a los

procedimientos de diagnóstico en la oncología broncopulmonar.

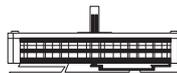
Agradecimientos

A CONACYT, por el financiamiento otorgado con el proyecto de investigación básica, número 53643.

REFERENCIAS

1. Reynales-Shigematsu LM, Juárez-Márquez SA, Valdés-Salgado R. Costos de atención médica atribuibles al tabaquismo en el IMSS, Morelos. *Salud Pública Mex* 2005;47:451-457.
 2. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997;111:1710-1717.
 3. Alva LLF, Corcho VA, García-Sancho FC, et ál. Epidemiología del cáncer pulmonar en México; hallazgos por imagen. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2003; 16:197-204.
 4. Nikliński J, Niklińska W, Laudanski J, Chyczewska E, Chyczewski L. Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001;34 Suppl 2:S53-S58.
 5. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. Compendio: mortalidad y morbilidad 2001. Secretaría de Salud, Epidemiología. 2001. Fecha de Consulta: 10 de agosto, 2009. Accesible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/RHNM.htm>
 6. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers a different disease. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:778-790.
 7. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* 2001;18:1059-1068.
 8. Ramírez CE, Cicero SR, Zúñiga CG, Novelo V, Navarro F, Casanova JM. El cáncer broncogénico en el Hospital General de México. Estudio de dos décadas. *Salud Pública Mex* 1995;37:155-161.
 9. Medina-Morales F, Salazar-Flores M. Frecuencia y patrón cambiante del cáncer pulmonar en México. *Salud Pública Mex* 2000;42:333-336.
 10. Taylor R, Najafi F, Dobson A. Meta-analysis of studies of passive smoking and lung cancer: effects of study type and continent. *Int J Epidemiol* 2007;36:1048-1059. WHO Global Infobase.
- Fecha de consulta: 18 de agosto, 2009. Accesible en: <http://www.who.int/infobase/cancer.aspx>
12. Jemal A, Siegel R, Ward E, et ál. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96.
 13. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2002;52:23-47.
 14. Stewart BW, Kleihues P, editors. *World Cancer Report 2003*. International Agency for Research on Cancer Press. Lyon, France. 2003. Accesible en: www.who.int/oral_health/media/en/orh_report03_en.pdf

15. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Boletín de estadísticas vitales, 2007. Fecha de consulta: 21 de septiembre, 2009. Accesible en: www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/continuas/vitales/boletin/2007/boletin_vitales_07.pdf
16. Sistema Nacional de Información en Salud. Información de mortalidad 2000-2005. Fecha de consulta: 15 de agosto, 2009. Accesible en: <http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html>
17. Franco-Marina F, Villalba-Caloca J. La epidemia de cáncer pulmonar en México. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2001;14:207-214.
18. Tovar-Guzmán VJ, López-Antuñano FJ, Rodríguez-Salgado N. Tendencias de la mortalidad por cáncer pulmonar en México, 1980-2000. *Rev Panam Salud Pública* 2005;17:254-262.
19. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Samuels A, Murray T, et al; American Cancer Society. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004;54:8-29.
20. Harpole DH Jr, Herndon JE 2nd, Wolfe WG, Iglehart JD, Marks JR. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression. *Cancer Res* 1995;55:51-56.
21. Medina MF, Salazar FM, García-Sancho MC, Franco MF. Epidemiología descriptiva del cáncer pulmonar en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México, 1997-2000. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2002;15:149-152.
22. Harvey RG. Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry and carcinogenicity. Cambridge (UK): Cambridge University Press; 1991.
23. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, et al. Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1550-1559.
24. Wright ME, Park Y, Subar AF, et al. Intakes of fruit, vegetables, and specific botanical groups in relation to lung cancer risk in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Am J Epidemiol* 2008;168:1024-1034.
25. Mahabir S, Spitz MR, Barrera SL, Dong YQ, Eastham C, Forman MR. Dietary boron and hormone replacement therapy as risk factors for lung cancer in women. *Am J Epidemiol* 2008;167:1070-1080.
26. Tang N, Wu Y, Ma J, Wang B, Yu R. Coffee consumption and risk of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer* 2009;67:17-22.
27. Kabat GC, Kim M, Hunt JR, Chlebowski RT, Rohan TE. Body mass index and waist circumference in relation to lung cancer risk in the Women's Health Initiative. *Am J Epidemiol* 2008;168:158-169.
28. Knaapen AM, Borm PJ, Albrecht C, Schins RP. Particles and lung cancer. Part A: mechanisms. *Int J Cancer* 2004;109:799-809.
29. Sánchez-Pérez Y, Chirino YI, Osornio-Vargas AR, et al. DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM10) of urban air pollutants. *Cancer Lett* 2009;278:192-200.
30. Sierra-Vargas MP, Guzmán-Grenfell AM, Blanco-Jiménez S, et al. Airborne particulate matter PM2.5 from Mexico City affects the generation of reactive oxygen species by blood neutrophils from asthmatics: an in vitro approach. *J Occup Med Toxicol* 2009;4:17. Publisher online: doi: 10.1186/1745-6673-4-17.
31. Silvestri GA, Tanoue LT, Margolis ML, Barker J, Detterbeck F; American College of Chest Physicians. The noninvasive staging of non-small cell lung cancer: the guidelines. *Chest* 2003;123(1 Suppl):147S-156S.
32. Pfister DG, Johnson DH, Azzoli CG, et al; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003. *J Clin Oncol* 2004;22:330-353.
33. Bach PB, Cramer LD, Warren JL, Begg CB. Racial differences in the treatment of early-stage lung cancer. *N Engl J Med* 1999;341:1198-205.
34. Baumgartner FJ. Cardiothoracic surgery. 3rd. ed. USA: Landes Bioscience; 2003.p.195-222.
35. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, et al; International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee; Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2007;2:706-714.
36. Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Piagnon JP, Vansteenkiste J; International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2004;350:351-360.
37. Shepherd FA, Dancy J, Ramalau R, et al. Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000;18:2095-2103.
38. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005;353:123-132.
39. Herbst RS, Prager D, Hermann R, et al; TRIBUTE Investigator Group. TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:5892-5899.
40. Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2542-2550.
41. Rapp E, Pater JL, Willan A, et al. Chemotherapy can prolong survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer report of a Canadian multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 1988;6:633-641.
- et al. Mitomycin, ifosfamide, and cisplatin in unresectable non-small-cell lung cancer: effects on survival and quality of life. *J Clin Oncol* 1999;17:3188-3194.
43. Marino P, Pampallona S, Preatoni A, Cantoni A, Invernizzi F. Chemotherapy vs. supportive care in advanced non-small-cell lung cancer. Results of a meta-analysis of the literature. *Chest* 1994;106:861-865.
44. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, et al; Eastern Cooperative Oncology Group. Comparison of four che-



- motherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002;346:92-98.
45. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, et ál. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3543-3551.
46. Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV, et ál. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004;22:1589-1597.
47. Cufer T, Vrdoljak E, Gaafar R, Erensoy I, Pemberton K; SIGN Study Group. Phase II, open-label, randomized study (SIGN) of single-agent gefitinib (IRESSA) or docetaxel as second-line therapy in patients with advanced (stage IIIb or IV) non-small-cell lung cancer. *Anticancer Drugs* 2006;17:401-409.
48. Cardona AF, Reveiz L, Ospina EG, Ospina V, Yepes A. Braquiterapia endobronquial paliativa para el cáncer de pulmón de células no pequeñas. En: *La Biblioteca Cochrane Plus*. Número 2, 2008. Fecha de consulta: 12 de agosto, 2009. Accesible en: <http://mrw.interscience.wiley.com/Cochrane/clsysrev/articles/CD004284/frame.html>
49. Sos ML, Michel K, Zander T, et ál. Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions. *J Clin Invest* 2009;119:1727-1740.
50. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et ál. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-792.
51. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et ál. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001;344:1038-1042.
52. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et ál. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-1500.
53. Lau SK, Boutros PC, Pintilie M, et ál. Three-gene prognostic classifier for early-stage non small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:5562-5569.
54. Weir BA, Woo MS, Getz G, et ál. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* 2007;450:893-898.
55. Beer DG, Kardias SL, Huang CC, et ál. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2002;8:816-824.
56. Chen JJ, Peck K, Hong TM, et ál. Global analysis of gene expression in invasion by a lung cancer model. *Cancer Res* 2001;61:5223-5230.
57. Chen HY, Yu SL, Chen CH, et ál. A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2007;356:11-20.

✉ Correspondencia:

Dr. Federico Ávila Moreno, Unidad de Investigación. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. Calzada de Tlalpan 4502, colonia Sección XVI. México, D.F., 14080
 Correo electrónico:
 favila@iner.gob.mx;
 favila@cinvestav.mx

