



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**ANÁLISIS DEL ESTADO DE ACTIVACIÓN DE LA
CROMATINA EN LA REGIÓN 7P21.1 DE
ADENOCARCINOMAS PULMONARES**

Que para obtener el título de:

Licenciado en Biología

PRESENTA:

Salma Gómez Ibarra

Director de tesis:

Dr. Federico Ávila Moreno

Unidad de Biomedicina (UBIMED) Laboratorio 12

Tesis Realizada con el Financiamiento de los Proyectos CONACYT-Ciencia Básica 53643; Proyectos B09-08, B21-08 (Dirección de Investigación, INER); y Proyectos UNAM, DGAPA-PAPIIT: IA201611, IB202512.

Los Reyes Iztacala, Edo. de México, Octubre 2012





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



ASESORES DE TESIS

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras

Dra. Leticia Moreno Fierros

M. en C. Irma Elena Dueñas García

Dr. Ramón Víctor Moreno Torres

SINODALES

PRESIDENTE:	DR. Jorge Eduardo Campos Contreras56
VOCAL:	DR. Leticia Moreno Fierros
SECRETARIO:	DR. Federico Ávila Moreno
SUPLENTE:	DR. Irma Elena Dueñas García
SUPLENTE:	DR. Ramón Víctor Moreno Torres

A G R A D E C I M I E N T O S

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

Mis Estudios para la Realización de Tesis fue Posible Gracias al Apoyo Otorgado por el Proyecto UNAM, PAPIIT: IB202512; así como el Apoyo Recibido como Becario UNAM-DGAPA, con número de folio: 205012.

“Cuando hay muchas cosas importantes en nuestra vida, es cuando la existencia se torna extraordinaria... cuando nos ponemos a pensar qué es lo que queremos... hay ocasiones en las que debemos deshacernos de algo. Lo más importante en nuestra vida son nuestros pensamientos y sentimientos...”

En el mundo hay tantas personas que poseen muchos objetivos... a los cuales se enfrentan expresando risas y llanto. Me pregunto... ¿cuántas de todas esas personas cumplieron sus anhelos?, después de cumplirlos... ¿se sintieron satisfechos?. Tal vez eso nadie lo sabrá... quizá la respuesta sea... después de todo, se trata de algo que debes decidir por tu cuenta.”

Hiroiyuki Takei

Agradecimientos

A mi tutor el Dr. Federico Ávila Moreno porque sin conocerme me dio la oportunidad de realizar este proyecto e integrarme a un equipo de trabajo, que sin duda ha marcado mi vida académica, y es el primer escalón de todo lo que falta.

A mis sinodales el Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras, a la Dra. Leticia Moreno Fierros y al Dr. Ramón Víctor Moreno Torres, que con su experiencia, opiniones y consejos, han dado un toque especial a este trabajo.

A la M. en C. Irma Elena Dueñas García que además de ser mi sinodal es mi madre académica, al igual que la M. en C. María Eugenia Heres- Pulido y la M. en C. Laura Castañeda, ya que no solo han estado ahí para formarme como profesional, han sido consejeras y amigas, por lo que siempre les guardaré un cariño especial.

Al Dr. Elías Piedra, porque sin saberlo dio la chispa que me hacía falta, me hizo creer en mis capacidades cuando más lo necesitaba, además de brindarme su sabiduría, cariño y apoyo.

A todos los profesores que me formaron, aquellos que dedican su tiempo, conocimiento y experiencia para que otros lleguemos a este momento. Aquellos que además de ser profesores han sido amigos.

A la FES- Iztacala por ser sede del conocimiento, por albergar a tantas personas maravillosas y ser mi segunda casa.

A la UNAM por ser lo que es, por permitirme aprender y entender, ya que en su regazo he crecido de muchas formas llegando a ser la persona que hoy soy.

Dedicatoria

A mis padres y hermanos que me permiten conocer lo maravillosa que es la vida. Ellos que solo han sabido darme amor, consejos. Me enseñaron a ser fuerte, cálida y decidida, por ellos soy la niña consentida y malcriada que hoy da el primer paso fuera de la burbuja. Mami aunque no te tenga cerca físicamente, de manera espiritual sé que estás conmigo. Papi, gracias por mostrarme que los sueños se convierte en realidad solo depende de uno mismo. A ti Víctor, aunque no lo digas sé que siempre estarás ahí, y yo estaré para ti, por tu nobleza y amor. Emiliano eres muy pequeño para saberlo pero iluminas mis malos ratos, gracias por tener esa chispa.

Mariana, ya te lo había dicho alguna vez y lo repito... “Eres la madrastra más buena onda que pueda haber en algún cuento de hadas”. Gracias por ser mi amiga y confidente, sobre todo por la rica comida. Sé que no ha sido fácil pero estamos juntos y al final del camino eso es lo que cuenta.

A mi tía Mayra y mi prima Jade, por su apoyo y amor, no sé que sería de mí sin ustedes, siempre están en mi corazón y les agradezco todo lo que han hecho por mí.

A Leonel y Carlos mis maestros, mis mejores amigos, mis hermanitos. Gracias por darme la oportunidad de compartir tantos momentos, por quererme y cuidarme. Me han enseñado de la ciencia y de la vida, sé que haberles vendido esos boletos fue el mejor negocio que he hecho.

A mis amigos Tania y Ariel, me alegra saber que juntos hemos llegado hasta aquí. Marlene, Rodrigo y Pablo, por ser parte de mi familia y apoyarme en este camino. Viry y Fernanda, jamás podré agradecerles que hayan llegado a mi vida, y me hicieran ser yo misma. Andy y Omar que en mis momentos de frustración han sido mis terapeutas. Y a ti Sandra Paola por ser mi todo, no puedo expresar lo que siento por ti, pero lo sabes... siempre estaremos juntas.

Finalmente a todos aquellos que no han sido nombrados pero que están en mi corazón y pensamientos, gracias.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABLAS	11
ÍNDICE DE GRAFICAS	12
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	13
RESUMEN	15
ABSTRACT	16
1 INTRODUCCIÓN	17
1.1 BASES MOLECULARES DEL CÁNCER	17
1.2 FACTORES GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS DEL CÁNCER	19
1.3 METILACIÓN DEL DNA	20
1.4 MODIFICACIÓN DE HISTONAS	21
2 ANTECEDENTES	24
2.1 CÁNCER PULMONAR	24
2.2 MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS AL CÁNCER PULMONAR	25
2.3 GENES HOMEBOX (HOX) EN CÁNCER PULMONAR	27
2.4 ALTERACIONES GENÉTICAS Y EPIGENÉTICAS EN EL CROMOSOMA 7	28
2.5 BLANCOS GÉNICOS EN LA REGIÓN 7P21.1 EN CÁNCER PULMONAR	30
2.6 CÓDIGO DE HISTONAS EN CÁNCER PULMONAR (H3K27)	32
3 JUSTIFICACIÓN	34
4 OBJETIVOS	35
4.1 OBJETIVO GENERAL	35
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	35

5	MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1	SELECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE TEJIDO PULMONAR DE PACIENTES	36
5.1.1	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	36
5.1.2	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	36
5.2	INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (ChIP)	36
5.2.1	ENTRECRUZAMIENTO Y FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA DE MUESTRAS DE TEJIDO SÓLIDO PARA CHIP	37
5.2.2	FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA POR SONICACIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS	38
5.2.3	PURIFICACIÓN DEL DNA SONICADO POR EL MÉTODO DE FENOL:CLOROFORMO	39
5.2.4	MÉTODO DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA ChIP	39
5.2.5	ELUSIÓN DEL COMPLEJO Y REVERSIÓN DEL ENTRECRUZAMIENTO	40
5.2.6	PURIFICACIÓN DEL DNA-IP	41
5.3	AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN <i>GAPDH</i>	41
5.4	MÉTODO DE AMPLIFICACIÓN TOTAL DEL GENOMA (WHOLE GENOME AMPLIFICATION “WGA”)	42
5.4.1	AMPLIFICACIÓN DEL MÉTODO, WGA1	42
5.4.2	PREPARACIÓN DE LA BIBLIOTECA	42
5.4.3	CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN	43
5.5	MÉTODO DE RE-AMPLIFICACIÓN DEL MÉTODO, WGA 3	44
5.6	VALIDACIÓN CUANTITATIVA POR PCR EN TIEMPO REAL	45
5.6.1	DISEÑO Y SELECCIÓN DE PRIMER’S UTILIZADOS PARA ENSAYOS DE VALIDACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL, SOBRE GENES ALOJADOS EN LA REGIÓN 7P21.1	45
5.6.2	CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL	
5.7	PRUEBA ESTADÍSTICA	46

6	RESULTADOS	47
6.1	RENDIMIENTO DEL MÉTODO DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA SOBRE TUMORES PULMONARES SÓLIDOS TIPO AD	47
6.2	ANÁLISIS DE CALIDAD DE LA CROMATINA INMUNO-PRECIPITADA (H3K27) MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN <i>GAPDH</i>	48
6.3	ANÁLISIS DEL RENDIMIENTO DE AMPLIFICACIÓN DE DNA-IP POR WGA 1 A PARTIR DE MUESTRAS PACIENTES	50
6.4	ANÁLISIS DE RE- AMPLIFICACIÓN DEL DNA-IP MEDIANTE WGA3	52
6.5	ANÁLISIS DE LA VALIDACIÓN CUANTITATIVA SOBRE SECUENCIAS PROMOTORAS DE GENES ALOJADOS EN LA REGIÓN 7P21.1	54
7	DISCUSIÓN	66
7.1	H3K27m3 COMO HERRAMIENTA PRONÓSTICO DE CÁNCER PULMONAR EN GENES <i>HOX</i>	66
7.2	EXPRESIÓN DE TWIST-1 EN CÁNCER PULMONAR DEBIDO A LA MARCA H3K27Ac	68
7.3	RIESGO DE CÁNCER PULMONAR RELACIONADO A FACTORES DE RIESGO, Y EL PAPEL DE <i>AhR</i> COMO MEDIADOR	70
8	CONCLUSIONES	73
9	BIBLIOGRAFÍA	74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Buffer de lisis	38
Cuadro 2. Condiciones de PCR en tiempo final para <i>GAPDH</i>	42
Cuadro 3. Condiciones de amplificación (WGA1)	43
Cuadro 4. Condiciones de amplificación (WGA3)	44
Cuadro 5. Diseño de primer's	45
Cuadro 6. Condiciones de PCR en tiempo real	46
Cuadro 7. Condiciones de alineamiento de PCR en tiempo real para los genes <i>EVX1</i>, <i>EVX2</i>, <i>MEOX2</i>, <i>AhR</i>, <i>TWIST-1</i> y <i>C-FOS</i>.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño epigenético en células normales y cancerosas.	23
Figura 2. Amplificación por PCR de la región promotora del gen <i>GAPDH</i> (Prueba de calidad del DNA-IP).	49
Figura 3. Amplificación lineal del DNA genómico correspondiente al DNA-IP por el método WGA1.	50
Figura 4. Amplificación lineal del DNA genómico correspondiente al DNA-IP/WGA1 por el método WGA3.	52
Figura 5. Amplificación por PCR tiempo real de la región promotora del gen <i>AhR</i>.	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación de pacientes con Cáncer pulmonar de tipo Adenocarcinoma	48
Tabla 2. Valores de cuantificación del DNA-IP amplificado por WGA1	51
Tabla 3. Valores de cuantificación del DNA-IP/WGA1 amplificado por el método WGA3	53

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Grafica 1. Análisis cuantitativo mediante amplificación por PCR para la secuencia promotora del gen <i>MEOX2</i>, en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD.	55
Grafica 2. Análisis cuantitativo mediante amplificación por PCR para la secuencia promotora del gen <i>EVX1</i>, en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD.	56
Grafica 3. Análisis cuantitativo mediante amplificación por PCR para la secuencia promotora del gen <i>EVX2</i>, en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD.	57
Grafica 4. Análisis cuantitativo mediante amplificación por PCR para la secuencia promotora del gen <i>AhR</i>, en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD.	58
Grafica 5. Análisis cuantitativo mediante amplificación por PCR para la secuencia promotora del gen <i>TWIST-1</i> inicial, en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD.	59
Grafica 6. Análisis cuantitativo mediante amplificación por PCR para la secuencia promotora del gen <i>TWIST-1</i> medio, en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD.	60
Grafica 7. Análisis cuantitativo mediante amplificación por PCR para la secuencia promotora del gen <i>C-FOS</i>, en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD.	61
Grafica 8. Amplificación por factor de riesgo del gen <i>MEOX2</i>	62
Grafica 9. Amplificación por factor de riesgo del gen <i>EVX1</i>	62
Grafica 10. Amplificación por factor de riesgo del gen <i>EVX2</i>	63
Grafica 11. Amplificación por factor de riesgo del gen <i>TWIST-1</i> inicial	64
Grafica 12. Amplificación por factor de riesgo del gen <i>TWIST-1</i> medio	65
Gráfica 13. Amplificación por factor de riesgo del gen <i>C-FOS</i>.	65

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AD	Adenocarcinoma
AhR	Receptor de aril hidrocarburos
AhRR	Represor de AhR
ARNT	Receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos
CBP	Proteína de unión a CREB
CGH	Hibridación Genómica Comparativa
ChIP	Inmunoprecipitación de Cromatina
CNV	Variación de número de copias
CpG	Citosina – Guanina
CYP1A1	Citocromo P450 1A1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA IP	Ácido desoxirribonucleico Inmunoprecipitado
DNMT's	DNA metil transferasas
dNTP's	Desoxiribunucleótidos trifosfato
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EVX1/EVX2	Even skipped homeotic
EZH2	Histona- Lisina N-metiltransferasa EZH2
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
HAT	Histona acetil-transferasas
HDAC	Desacetilasas de histonas
HMT's	Histona metil transferasas
HOX	Homeobox
H3	Histona 3
H4	Histona 4
H3K27Ac	Histona 3 Lisina 27 acetilada
H3K4me3	Histona 3 Lisina 4 trimetilada
H3K27me3	Histona 3 Lisina 27 trimetilada
H4K20	Histona 4 Lisina 20
IgG	Inmunoglobulina Tipo G

IT	Índice Tabaquico
MBD	Proteínas de Unión de grupos Metilos
<i>MEOX</i>	Mesenchyme homeobox
NaCl	Cloruro de Sodio
NSCLC	Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas
PBS	Buffer salino-fosfato
PCAF	Factor asociado a P300/CBP
PcG	Grupo de proteínas Polycomb
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PRC2	Complejo represivo Polycomb 2
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SCC	Cáncer de células escamosas
SCLC	Cáncer de pulmón de células pequeñas
SDS	Dodecil sulfato sódico
siRNAs	Ácido ribonucleico interferentes
SNP's	Polimorfismos genéticos de una sola base
T_m	Temperatura media
TN-C	Tenancina-C
TrxG	Grupo de proteínas Trithorax
<i>TWIS-1</i>	Twist-related protein 1
VSMCs	Células Vasculares de Músculo Liso
WGA	Amplificación Total del Genoma
XRE	Elemento de respuesta a Xenobióticos

RESUMEN

El cáncer pulmonar, representa la primera causa de muerte a nivel mundial, donde alteraciones genéticas y epigenéticas, entre ellas alteraciones del código de histonas determinan la pérdida del control transcripcional de marcadores tumorales, posiblemente asociados con la progresión y pronóstico de las enfermedades neoplásicas pulmonares. Basado en lo anterior, el análisis del balance en el código de histonas H3K27Ac vs H3K27me3 dependiente de la actividad del grupo polycomb y capaz de controlar transcripcionalmente regiones promotoras de blancos génicos, permitirá determinar su responsabilidad en la inducción y evolución clínica de pacientes con cáncer pulmonar. El presente proyecto se enfocó en el estudio de secuencias promotoras de potenciales marcadores de progresión histopatológica pulmonar localizados en la región citogenética 7p21.1, entre ellos *MEOX2*, *TWIST-1*, *AhR* y *EVX1*; así como determinar su posible asociación con la exposición a factores de riesgo ambiental. Para ello, se incluyeron muestras de tejido neoplásico pulmonar del tipo Adenocarcinoma, las cuales fueron divididas en 2 grupos, con exposición a factores de riesgo y sin exposición a factores de riesgo. A partir de ellas, se llevó a cabo la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina “ChIP”, se verificó la calidad del DNA-Inmunoprecipitado (DNA-IP), para que posteriormente, los DNA-IP de pacientes fueran amplificados y re-amplificados mediante métodos lineales de amplificación del genoma (WGA1-3). Posterior a ello, el análisis cuantitativo sobre las regiones promotoras permitió establecer la posible asociación del código de histonas con la exposición a factores de riesgo ambiental. El análisis cuantitativo evidenció la presencia de la marca histónica H3K27me3 sobre genes *HOX*-relacionados tanto *MEOX2*, *EVX1* como *EVX2*, en ambos grupos de pacientes, siendo mayor dicha marca histónica en pacientes con presencia de exposición a humo de leña. Mientras que la región promotora de *TWIST-1* destaca por su marca histónica H3K27Ac, en ambos grupos de pacientes. Dichos resultados sugieren que la regulación de *TWIST-1* como gen involucrado en la invasión y metástasis, no es dependiente de su relación con factores de riesgo ambiental. Por otro lado, los genes blanco *AhR* y *C-FOS*, no muestran diferencias importantes. Con lo anterior, podemos concluir que los factores de riesgo ambientales como el humo de leña promueven de forma importante alteraciones a nivel transcripcional, en genes *HOX-relacionados* probablemente involucrados en el desarrollo del cáncer pulmonar, mientras que genes de invasión y metástasis son independientes a dicho factor de riesgo ambiental.

ABSTRACT

Lung cancer is the leading cause of death at worldwide, where genetic and epigenetic alterations, including histone code alterations determine the loss of transcriptional control of tumor markers, possibly associated with the progression and prognosis of lung malignant diseases. Based on the above, the analysis of the balance in the histone code H3K27Ac vs. H3K27me3, are activity-dependent Polycomb group controlling the transcriptional activity at promoter regions at several target genes, that will determine its responsibility to conduct the clinical course of lung cancer patients. This project focused on the study of potential promoter sequences of pulmonary histopathological progression markers located in the cytogenetic region 7p21.1, including *MEOX2*, *TWIST-1*, *AhR* and *EVX1*, in addition to determinate its possible association with exposure to environmental risk factors. For this purpose, samples of lung adenocarcinomas, were divided into two groups, with and without exposure to risk factors. From them, the technique performed by chromatin immunoprecipitation "ChIP" quality was verified immunoprecipitated DNA (DNA-IP), that subsequently the IP DNA patients were re-amplified and re-amplified by amplification methods of the genome (WGA1-3). Following this, the quantitative analysis of the promoter regions allowed us to establish the possible association of the histone code with exposure to environmental risk factors. Quantitative analysis showed the presence of the histone mark H3K27me3 on *HOX*-related genes both *MEOX2*, *EVX1* as *EVX2*, in both groups of patients, being higher the mark histone in patients with presence of exposure to wood smoke. While the promoter region of *TWIST-1* stands by histone H3K27Ac, in both group of patients. These results suggest that the regulation of *TWIST-1* as a gene involved in invasion and metastasis, it is not dependent of environmental risk factors exposure. Furthermore, *AhR* and the target genes *C-Fos*, were not significant H3K27 code histone associated. With this, we can conclude that environmental risk factors such as wood smoke significantly promote transcriptional level alterations in *HOX*-related genes probably involved in lung cancer development, whereas genes of invasion and metastasis are independent the environmental risk factor.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 BASES MOLECULARES DEL CÁNCER

El proceso de carcinogénesis da inicio y progresa en torno a la acumulación de alteraciones en la secuencia primaria del DNA y/o niveles de expresión de un conjunto de genes indispensables para el mantenimiento de la homeostasis molecular reflejado en los mecanismos celulares de control del crecimiento-división celular y muerte por apoptosis. Un objetivo básico de la investigación molecular del cáncer, ha sido la identificación de todos aquellos genes implicados en el desarrollo tumoral que permitan elucidar su impacto a nivel funcional. A la fecha, se han descrito diversas alteraciones genéticas y moleculares que caracterizan a la célula tumoral, representando alteraciones en diversas vías de señalización, vías metabólicas como de regulación genética por ejemplo proliferación, apoptosis y angiogénesis, invasión y metástasis (Sánchez y Rosell, 2005).

La transformación maligna de una célula se debe en parte a la acumulación de mutaciones, deleciones, amplificaciones, variación en el número de copias, translocaciones, y/o aberraciones cromosómicas; así como de aquellas alteraciones en los mecanismos epigenéticos que controlan tales aberraciones en genes concretos, representando la clave molecular para entender el origen genético (Ríos y Hernández, 2001) o epigenético del cáncer (Sánchez y Rosell, 2005). Distintas anormalidades en la secuencia primaria del DNA y epigenéticas han sido descritas en genes que participan en principales vías de transducción de señales y bioquímicas; incluyendo genes del control del ciclo celular, detección y/o reparación del daño al DNA, muerte celular programada, apoptosis, factores de transcripción, moléculas de adhesión celular (Sánchez y Rosell, 2005).

Durante la última década se han clasificado un total de 6 procesos celulares alterados capaces de promover el desarrollo y mantenimiento de neoplasias a partir de células fisiológicamente normales, entre ellas: *i*) autosuficiencia en señales de crecimiento, *ii*) insensibilidad a señales de inhibición de crecimiento, *iii*) evasión de muerte celular programada (apoptosis), *iv*) potencial replicativo sin límite, *v*) angiogénesis continua y *vi*) invasión y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000). Aunado a lo anterior en la última

década Hanahan y Weinberg han incorporado 2 procesos celulares de vital importancia en el desarrollo de las neoplasias malignas, *vii*) reprogramación del metabolismo energético y *viii*) evasión de la respuesta inmune antitumoral. Adicionalmente se conoce que las neoplasias malignas exhiben mayores dimensiones de complejidad que las células histológicamente normales, lo cual provee características que favorecen un microambiente propio de mayor adaptación tumoral (Hanahan y Weinberg, 2011).

En términos generales se sabe que en los procesos de carcinogénesis están involucrados 2 grandes grupos de genes; el primero de ellos los protooncogenes, que codifican para ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas, factores de crecimiento, receptores a factores de crecimiento, proteínas G, etcétera., los cuales en general promueven la proliferación celular. Diversas alteraciones, conducen a su transformación en oncogenes, capaces de orquestar la proliferación descontrolada, forzando la maquinaria celular y alterando la expresión de diversos factores de crecimiento (Ríos y Hernández, 2001).

El segundo grupo de genes integrado por genes supresores de tumores, que en condiciones de normalidad fisiológica controlan la proliferación celular. Mientras que su alteración o falla en su funcionamiento conduce a la pérdida de control en la tasa de proliferación celular, cuya característica destaca en neoplásicas malignas (Ríos y Hernández, 2001).

Al respecto, diversos factores de crecimiento producidos por un tipo celular, poseen la capacidad de estimular la proliferación de otros tipos celulares; mientras que poblaciones de células tumorales adquieren la habilidad por sintetizar factores de crecimiento, capaces de generar la activación de vías de señalización autocrina -retroalimentación positiva-; alcanzando su independencia a la estimulación del microambiente del tejido normal (Ej. Estroma). Además de ello, se conoce que un tejido normal, es capaz de generar señales de antiproliferación capaces de mantener la quiescencia celular y/o homeostasis del tejido circundante, por lo que las células cancerosas son capaces de evadir dichas señales antiproliferativas (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.2 FACTORES GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS DEL CÁNCER

La activación/desactivación de genes está controlada por mecanismos tanto genéticos como epigenéticos, existiendo interconexión entre ambos fenómenos o mecanismos. Por tanto, se considera al cáncer, como una respuesta al desbalance o alteraciones entre ambos mecanismos genético-epigenéticos, por lo que su estudio resulta complementario y necesario para entender enfermedades complejas como el cáncer. Por lo que, resulta obligado el estudio de regulación transcripcional en congruencia con sus mecanismos de control genético (secuencias promotoras, enhancers, insulators, etc); así como los mecanismos de regulación epigenética sobre las secuencias de control transcripcional, entre ellas modificaciones químicas –covalentes– de histonas y mecanismos de remodelación de la estructura de la cromatina (Valdespino y Valdespino, 2008).

Con base en lo anterior, el silenciamiento genético/epigenético está asociado con alteraciones en la metilación del promotor el cual de manera convencional conduce a la represión transcripcional. Así mismo, dicho silenciamiento puede ocurrir durante las etapas tempranas de la tumorigénesis; así como, en las etapas de la progresión neoplásica, lo cual conduce a la desactivación y/o sobre activación de diferentes vías de señalización intracelular (Baylin y Jones, 2007). Al respecto, el genoma de las células neoplásicas muestra simultáneamente desmetilación global del genoma, destacando a nivel de la cromatina pérdida global de la monoacetilación y trimetilación de la histona 4 (H4). Mientras que, en promotores de genes supresores de tumor, entre otros genes relacionados en el control del ciclo celular, proliferación, etc., existe hipermetilación en islas CpGs (dinucleótidos de citosina-guanina) (Esteller, 2006). Tales cambios son capaces de provocar alteraciones en la activación genética, así como inducir predisposición a la inestabilidad cromosómica con la pérdida del control de la replicación, un silenciamiento anormal de genes relacionados con la iniciación y progresión de tumores malignos. Estos últimos, involucrando genes supresores de tumores, factores de transcripción relacionados con el desarrollo y diferenciación celular, genes remodeladores de tejidos, genes de reparación de daño al DNA, genes de control del ciclo celular, genes antiapoptóticos, entre otras vías que favorecen el desarrollo de tumores (Ting *et al.*, 2006).

Respecto a los mecanismos de regulación epigenética destacan la hipermetilación de islas CpGs, que provocan silenciamiento de la transcripción de distintos genes supresores de tumores relacionados al desarrollo del cáncer. Cada subtipo de cáncer posee grupos específicos de genes susceptibles a metilación. Diferentes tipos de cáncer (gástrico, vesical, de colón, pulmonar y leucemias) ocurren con niveles elevados de DNMTs (DNA-metiltransferasas) involucradas en catalizar covalentemente la adición de grupos metilo a citosinas en el contexto de islas CpGs en secuencias promotoras (Stizaker *et al.*, 2004).

Por tanto, los cambios epigenéticos en cáncer involucran patrones alterados de la metilación de secuencias ricas en CpGs (Citosina-Guanina) en el DNA; modificaciones covalentes y no-covalentes de residuos de aminoácidos en las histonas, así como modificaciones de la estructura y modificación de la cromatina. En este sentido, la transformación neoplásica es un proceso multi-etapas, donde destacan ambos eventos tanto genéticos como epigenéticos (Valdespino y Valdespino, 2008).

1.3 METILACIÓN DEL DNA

La metilación del DNA es el mecanismo epigenético conocido más antiguo y estable que se correlaciona con patrones de represión genética. Esta modificación consiste en la adición enzimática de un grupo metilo al residuo de citosina de la cadena del DNA. Esta reacción es mediada por las DNA metil-transferasas (DNMTs) en la presencia del donador de metilos (S-adenosilmetionina, SAM), resultando en 5-metil-citosina. En mamíferos la metilación ocurre en dinucleótidos CpGs de mayor densidad localizados en regiones no codificantes con capacidad de regulación transcripcional (Valdespino y Valdespino, 2008).

En el caso de metilación *De Novo del DNA* en secuencias promotoras ricas en islas CpGs que conducen a la inactivación transcripcional, es catalizada por DNMT3a y DNMT3b (Schones y Zhao, 2008). En este sentido, la participación de las DNMTs juega un papel importante en la regulación génica y organización de la cromatina diferencial tanto en los eventos tempranos del desarrollo como la embriogénesis y gametogénesis, así como en

estadios tardíos de diferenciación terminal en tejido adulto. En condiciones fisiológicas puede observarse densa metilación en regiones citogenéticas o cromosómicas específicas (secuencias repetitivas inter o intragénicas, satelitales y/o centroméricas) con secuencias de alta densidad en CpGs; mientras que bajo nivel de metilación en secuencias promotoras (Valdespino y Valdespino, 2008). De tal modo que la metilación aberrante del DNA es una marca epigenética del cáncer bien establecida, de esta manera muchos genes logran ser inactivados en un solo tipo de neoplasia (Fig.1) (Schones y Zhao, 2008).

Datos recientes han demostrado que los cambios en los patrones de metilación del DNA en carcinomas pulmonares los de mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial, han sugerido la detección de más de 40 genes relacionados al cáncer pulmonar. Por tanto, el análisis de metilación de múltiples genes se propone sea usado como herramienta de alta especificidad para el diagnóstico y pronóstico del cáncer pulmonar (Jones P, 2002). Adicional a ello, se propone que el estudio de la cromatina a nivel del código de histonas en conjunto con sus perfiles de metilación de secuencias promotoras, pueden constituir marcadores tumorales de mayor potencial diagnóstico o pronóstico en pacientes oncológicos pulmonares.

1.4 MODIFICACIÓN DE HISTONAS

Las modificaciones de histonas funcionan mediante dos mecanismos. El primero es la interferencia en los contactos entre nucleosomas (unidad fundamental de la cromatina, compuesta de un octámero de histonas nucleares), en el cual quedan envueltas aproximadamente 147 pares de bases de DNA, capaces de compactar la cromatina, y el segundo es el reclutamiento de proteínas no histónicas (Kouzaridez, 2007).

Las distintas modificaciones de histonas y la combinación de ellas, conforman el denominado código de histonas, el cual es leído por proteínas que contienen dominios específicos de interacción (Delgado, 2009). Algunas modificaciones de la cromatina en regiones cromosómicas somáticas se han asociado con activación; mientras que otras a represión genética. Entre ellas, la acetilación y metilación de histonas, respectivamente (Delgado, 2009). Adicional a ello, el estado silente -inactivación- de la heterocromatina se

asocia de manera frecuente con niveles bajos de acetilación, mientras que, niveles elevados de metilación en los residuos de lisinas de histonas, entre los que destacan: H3K9, H3K27 y H4K20 (Kouzarides, 2007).

De manera contraria, el estado de activación de la cromatina se define por el aumento en el número de residuos de lisinas, en presencia de modificación química covalente de acetilación mediado por diferentes Acetil Transferasas de Histonas (HATs) (Santos y Caldas, 2005). Al respecto, el mecanismo de acetilación de histonas provoca fuertemente reducción en la afinidad de las histonas por el DNA, ello al neutralizar la carga positiva de los residuos de lisinas. De este modo, los nucleosomas son empaquetados con menor eficiencia, permitiendo que el DNA permanezca accesible a la maquinaria basal de la transcripción, así como proteínas reguladoras de la tasa transcripcional (Delgado, 2009).

En contraste, el mecanismo de metilación de histonas se encuentra catalizado por enzimas específicas que reconocen distintos residuos de aminoácidos, entre ellos lisinas. Al respecto, las enzimas responsables de metilar residuos de lisinas son metil-transferasas de histonas (HMTs) específicas de lisinas que contienen el dominio llamado SET (Santos y Caldas, 2005). Dicho dominio se encuentra constituido por una secuencia de 130 aminoácidos presente en proteínas que conforman el cromosoma, modulando la actividad genética (Jenuwein *et al.*, 1998). Dichas metil-transferasas de histonas son las responsables del perfil de metilación en la histona H3, en los diferentes residuos de lisina K4, K9, K27 y K36 (Santos y Caldas, 2005). En este sentido los residuos de lisinas pueden aceptar uno, dos o tres grupos metilo lo cual se traducirá en respuestas biológicas diferentes en intensidad o magnitud. En este sentido la metilación de histonas puede generar un efecto activador o represor de la transcripción. Sin embargo, un amplio consenso teórico y experimental, sustenta que la metilación de los residuos de histona H3K9, H3K27 y H4K20, se encuentran asociados con la represión transcripcional (Fig.1) (Kouzarides, T., 2007).

Adicionalmente se conoce que los promotores silenciados por hipermetilación del DNA, se encuentran generalmente asociados con modificaciones de histonas de hipo-acetilación en

residuos de lisina no solo en H3, sino en H4. De forma específica tri-metilación de H3K9 y H3K27, estableciendo una estructura de la cromatina represora (Gal-Yam *et al.*, 2008). Adicionalmente, se han propuesto algunas marcas de acetilación y/o metilación de histonas con valor pronóstico en ciertas neoplasias malignas (Seligson *et al.*, 2005). Ejemplo de ello, es la hipermetilación de secuencias promotoras de genes supresores de tumores, siendo un mecanismo frecuente en el silenciamiento génico, en muchos tipos de cáncer, como es el caso del gen retinoblastoma (*RB*), *p16*, *MLH1* o *BRCA1*, como ejemplos de genes supresores de tumores frecuentemente silenciados por dicho mecanismo (Delgado, 2009).

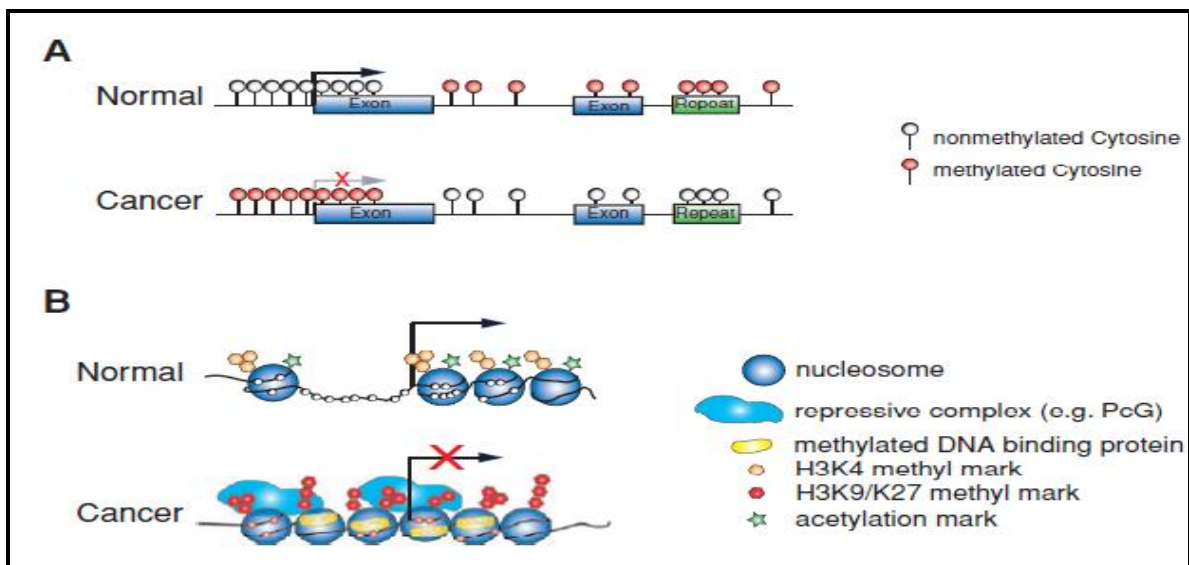


Figura 1. Diseño epigenético en células normales y cancerosas. A) Metilación del DNA. En células normales, casi todos los dinucleóticos CpG están metilados mientras que las islas CpGs, mayoritariamente las que se encuentran cerca de las regiones regulatorias 5' de los genes, no están metiladas. En células cancerosas, muchas islas CpG se hipermetilan, junto con el silenciamiento de su respectivo gen, mientras ocurre hipometilación global, mayoritariamente en elementos repetitivos. B) Cromatina y modificación de histonas. Los genes activos están asociados a la acetilación de las colas de histonas, por ejemplo la metilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4), y la depesión del nucleosoma en sus promotores. Los promotores de genes silenciados, se asocian a los nucleosomas, por la pérdida de acetilación y las marcas de metilación H3K4, en contraste con las marcas represivas de metilación, tales como la lisina 9 o 27 en la histona 3, las cuales reclutan complejos represores. Proteínas de unión al DNA metilado se unen al DNA metilado con la modificación histónica y las maquinarias de remodelación del nucleosoma. (Imagen tomada y Adaptada de Gal- Yam *et al.*, 2009).

2 ANTECEDENTES

2.1 CÁNCER PULMONAR

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo con más de 1 millón de muertes cada año, la cual se propone prevenir, con la reducción en la exposición al humo de tabaco. Sin embargo, las estadísticas a nivel mundial estiman que el 15% de los carcinomas pulmonares en hombres y 53% en las mujeres no son atribuibles al tabaco. En este sentido, las proyecciones actuales señalan que 25% de todos los casos de cáncer pulmonar, ocurrirán independientes de la exposición al tabaquismo a nivel mundial. Adicional a ello, el cáncer de pulmón en pacientes no fumadores ocupa la séptima causa de muertes por neoplasias malignas en el mundo, superando entre otros al cáncer de cérvix, páncreas y próstata (Sun *et al.*, 2007).

El cáncer de pulmón se clasifica como la enfermedad del fumador, ya que adicionalmente los esfuerzos por estudiar dicha enfermedad en pacientes no fumadores han sido limitados. No obstante, se estima que la proporción de cáncer pulmonar en pacientes no fumadores aumente durante los próximos años (Sun *et al.*, 2007).

Por otro lado, de acuerdo con la OMS, el cáncer de pulmón está clasificado en 2 grandes grupos, llamados Carcinomas Pulmonares de Células Pequeñas (SCLC, pos sus siglas en inglés) y Carcinomas Pulmonares de Células No Pequeñas (NSCLC). Siendo estos últimos clasificados en forma general en 3 grandes tipos histológicos con base a sus características clínico-patológicas: Carcinomas de Células Escamosas (SCC), Adenocarcinoma (AD) y Carcinomas de Células Grandes (LCC) (Sun *et al.*, 2007).

Respecto a lo anterior, se reconocen marcadores tumorales que permiten apoyar el establecimiento del diagnóstico histopatológico del cáncer pulmonar del grupo NSCLC, entre ellos el Antígeno Carcinoembrionario (CEA) como marcador plasmático asociado a tumores de origen epitelial como los carcinomas pulmonares; así mismo su elevado nivel se relaciona con la extensión y pronóstico de la enfermedad (<http://www.cfnavarra.es>). Otro marcador importante es el factor de la transcripción tiroideo 1 (TTF1) el cual juega un

papel importante en la homeóstasis y morfogénesis pulmonar (Yatabe *et al.*, 2002), por tanto es un marcador altamente específico para tumores pulmonares primarios, entre ellos del tipo adenocarcinoma “AD” (Reis-Filho *et al.*, 2000).

2.2 MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS AL CÁNCER PULMONAR

Aunque el cáncer pulmonar es comúnmente descrito como una enfermedad causada por la exposición a factores de riesgo ambiental, se consideran que ambos factores tanto genéticos, como epigenéticos juegan un papel destacado (Sun *et al.*, 2007).

Para el desarrollo de tecnologías de diagnóstico, basadas en marcadores moleculares, ha sido importante un mayor conocimiento sobre las alteraciones moleculares implicadas en el desarrollo de las neoplasias pulmonares. En este sentido ha sido imperativa la urgencia por desarrollar nuevas estrategias de detección y de tratamiento “terapéuticas” que permitan conducir a la búsqueda de alteraciones cromosómicas, microaberraciones, genéticas, epigenéticas que se traducen en alteraciones fenotípicas-funcionales asociadas al cáncer de pulmón. En este sentido, si bien son abundantes alteraciones en diferentes regiones cromosómicas y distintos genes involucrados en vías metabólicas relacionadas con la carcinogénesis pulmonar (Sánchez y Rosell, 2005), pocos son los estudios enfocados al análisis de los mecanismos epigenéticos que controlan los perfiles y niveles de expresión genética en el cáncer, con el objetivo de generar conocimiento sobre los mecanismos que intervienen en la expresión temprana o tardía de nuevos potenciales marcadores tumorales, que nos permitan mayor certeza para su empleo como instrumentos de valoración diagnóstica, pronóstica y terapéutica en pacientes con cáncer pulmonar.

Basado en lo anterior, resulta complicado interpretar en que tipo de alteraciones reside la mayor responsabilidad en la progresión del cáncer. Es decir, si son debidas a numerosas aberraciones cromosómicas, translocaciones cromosómicas, amplificaciones genéticas, pérdida de material genético –delección-, o bien la generación de mutaciones. O bien si el comportamiento de la neoplasia se debe en mayor medida a la pérdida del control epigenético de tales aberraciones genéticas, lo cual plantea la posibilidad de revertir cierto

grado de aberraciones epigenéticas mediante el uso de fármacos que modulen o frenen los mecanismos epigenéticos en la inducción, progresión y/o evolución de la neoplasia. En este sentido los cambios epigenéticos se encuentran guiados por enzimas consideradas blancos terapéuticos, basados en ello, en la última década se ha propuesto el uso de nuevos tratamientos epigenéticos en contra del cáncer (Ruíz y Villegas, 2007).

El conocimiento sobre la existencia de cambios epigenéticos en cáncer y su influencia en el desarrollo de tales padecimientos, han permitido el completo desarrollo de un nuevo acercamiento terapéutico, donde la meta es revertir el silenciamiento de los genes. En este sentido la FDA (United States Food and Drug Administration) en U.S.A., aprobó el llamado SAHA (ácido hidroxámico suberoilánilida), como inhibidor de deacetilasas de histonas con potencial antitumoral capaz de inducir muerte por apoptosis, usado para el tratamiento de linfoma cutáneo de células T (Jones y Baylin, 2007).

Adicional a ello, esfuerzos aislados han sido enfocados en identificar posibles genes o grupos de genes alterados epigenéticamente durante el proceso de carcinogénesis pulmonar (CITA). A este respecto algunos estudios han sido enfocados en describir alteraciones en los procesos de regulación epigenética-transcripcional comparando etapas del desarrollo fetal pulmonar en contraste de perfiles de metilación del DNA genómico en tejido pulmonar histológicamente normal de adulto y tejido neoplásico pulmonar, como modelo de estudio de biomarcadores asociados con etapa fetal en muestras de pacientes con cáncer, ya que con frecuencia la ontogenia de un tumor recapitula perfiles de transcripción del desarrollo embrionario. Sin embargo, poco se conoce sobre los cambios ocurridos en los perfiles de metilación durante el proceso de transformación neoplásica epitelial o mesenquimal en estado adulto en humanos (Cortese *et al.*, 2008).

Cortese y *Cols.*, en 2008 analizaron la expresión genética en tejido pulmonar fetal y adulto, identificando 354 genes con baja expresión y 99 genes sobreexpresados en pulmón fetal en contraste del tejido pulmonar de adulto. Dichos autores han sugerido que los genes sobreexpresados en tejido pulmonar fetal se encuentran principalmente involucrados con mecanismos de regulación y establecimiento de la matriz extracelular, lo cual se relaciona

con cambios dramáticos morfológicos necesarios durante los estadios de desarrollo canalicular y sacular del desarrollo pulmonar. Donde dichos patrones de expresión poseen similitud con lo ocurrido en neoplasias pulmonares de adulto en humanos, en las cuales destacan entre otros genes, factores de transcripción que pertenecen a la familia de los genes *HOMEODOMAIN* (Cortese *et al.*, 2008). Estos desempeñan un determinado papel entre ya que son una superfamilia de factores de transcripción implicados principalmente en el desarrollo embrionario. En humanos existen al menos 39 genes organizados en cuatro grupos genómicos (Cantile *et al.*, 2007).

2.3 GENES *HOMEODOMAIN* (*HOX*) EN CÁNCER PULMONAR

Algunos genes involucrados en el desarrollo embrionario pertenecen a los llamados genes *HOX*, que forman parte de una familia de genes que codifican para factores de transcripción (genes *HOMEODOMAIN*), caracterizados por un dominio común de 60 aminoácidos, llamado homeodominio, a través del cual tales proteínas interactúan a nivel del DNA en secuencias promotoras (Cillo *et al.*, 2001). En este sentido se conoce que los genes *HOX* contribuyen al establecimiento de un patrón espacio-temporal que se manifiesta durante el desarrollo del eje anteroposterior dando cauce a la simetría bilateral de metazoos, como ocurre en eucariotas superiores. Una sorprendente característica de los genes *HOX* es su disposición física en el genoma, organizados en tandem, en total 4 grupos distribuidos en 4 cromosomas, constituyendo los llamados complejos *HOX*. Es decir, que tal organización en el genoma responde a su selección evolutiva es esencial para el desarrollo embrionario (Cuenca *et al.*, 2006).

Los genes *HOX* han sido estudiados en sus diferentes clusters de genes: *HOXA* localizados en el cromosoma 7, genes *HOXB* ubicados en el cromosoma 17, genes *HOXC* localizados en el cromosoma 12 mientras que los genes *HOXD* en el cromosoma 2 (Lewis, 1978). Dentro de esta familia de genes *HOX*, algunas subfamilias han cobrado importancia destacando los miembros de la familia *MEOX*, entre ellos *MEOX2* el cual participa en la miogénesis de vertebrados, mientras que su mutación en ratones puede ser asociada con anomalías esqueléticas y craneofaciales (Entrez Gen, 2009). Otro ejemplo, es el, patrón

de expresión de *EVX1* durante la embriogénesis de ratón, el cual ha mostrado consistencia con su participación en el establecimiento del eje antero-posterior en organismos cordados, metazoos, etcétera (Faiella *et al.*, 1991).

Mientras que *HOXB3* y *HOXD3* parecen estar involucrados en la angiogénesis y en la diferenciación de células endoteliales. *HOXD3* es expresado con mayor intensidad en células de alta proliferación regulada por efecto del Factor de Crecimiento de Fibroblastos Básico (bFGF). Se piensa que *HOXD3* está relacionado con la actividad migratoria o invasiva de las células endoteliales, mientras que *HOXB3* actúa sobre la subsiguiente morfogénesis de los nuevos vasos sanguíneos formados. Cluster del *HOXA* ubicado en el cromosoma 7. Estas observaciones han llevado a sugerir que los genes *HOX* relacionados, llevan a cabo actividades complementarias dentro de un mismo tejido (Hernández *et al.*, 2006).

2.4 ALTERACIONES GENÉTICAS Y EPIGENÉTICAS FRECUENTES DEL CROMOSOMA 7 EN CÁNCER PULMONAR

La posibilidad de que los cambios en la variación del número de copias del DNA se deban a sitios frágiles de recombinación genómica relacionados con la carcinogénesis pulmonar; ha llevado a la descripción de la variación en el número de copias como factor importante del desarrollo del cáncer pulmonar de alta frecuencia, entre ellas microaberraciones del cromosoma 14 y 7 (Weir BA *et al.*, 2007). Al respecto, aberraciones cromosómicas como la trisomía del cromosoma 7 se ha propuesto como prueba de gabinete que forme parte del diagnóstico temprano de pacientes NSCLC, ya que es posible su detección en tejido pulmonar pre-maligno (Lee *et al.*, 1987).

Los análisis de hibridación genómica comparativa han revelado diversos desequilibrios en NSCLCs, donde la región 7q11.2 ha sido uno de los sitios más frecuentes de amplificación del DNA genómico (Balsara *et al.*, 2002). A este respecto, derivado del estudio masivo del DNA genómico se ha llegado a consolidar la posibilidad de identificar marcadores genéticos asociados con la predicción de respuesta al tratamiento oncológico y sobrevida de

pacientes con cáncer broncogénico. Identificando la presencia de alteraciones estructurales y epigenéticas, posiblemente tempranas y/o tardías en la región 7p22, 7p21, 7p15 y cromosoma 14 en cáncer pulmonar (Weir *et al.*, 2007; Cerecedo *et al.*, 2009).

Adicional a ello, se ha propuesto de manera reciente la identificación de aberraciones estructurales frecuentes en el DNA genómico como el aumento en la variación del número de copias (CNV); así como variaciones en el patrón de metilación de secuencias promotoras, para diversos genes residentes de la región citogenética 7p21.1, entre ellos el gen *AhR* (Álvarez, 2010), cuya región citogenética muestra aberraciones estructurales de alta frecuencia en la progresión del cáncer pulmonar, posiblemente debidas a alteraciones epigenéticas en los perfiles de metilación del DNA genómico en cáncer pulmonar (Cerecedo *et al.*, 2009).

Por otra parte, reportes relativamente recientes señalan al aumento de CNV, capaces de inducir sobre-expresión genética; aunque también independientes del aumento de CNV (Cerecedo *et al.*, 2009). Entre ellas alteraciones de la región subtelomérica 7p22.3-p22.1 dependientes de CNV, mientras que la región 7p15.2 (subcentromérica) sea independiente de CNV e incluso independiente de metilación de secuencias promotoras, prevaleciendo un estado de activación dependiente de la remodelación de la cromatina, a partir de patrones de acetilación de histonas, como lo indican resultados obtenidos en tumores de origen epitelial (Stransky, *et al.*, 2006).

Aunado a lo anterior, es importante señalar que resultados recientes indican alteraciones como aumento en CNV de alta frecuencia en las regiones subteloméricas 7p22.3-p22.1 y 7p21.3-p21.1; así como subcentroméricas 7p15.3 y 7p15.2, durante la progresión neoplásica pulmonar. Siendo parcialmente responsables de CNV y cambios epigenéticos de promover la sobre expresión de nuevos posibles marcadores tumorales genético-epigenéticos tempranos o de nivel pronóstico de pacientes con cáncer pulmonar (Cerecedo *et al.*, 2009; Ávila, *et al.*, 2012).

2.5 BLANCOS GÉNICOS DENTRO DE LA REGIÓN 7P21.1 EN CÁNCER PULMONAR

En cáncer pulmonar, se han identificado micro-aberraciones estructurales del DNA como el aumento de CNV, así como cambios epigenéticos metilación del DNA y cambios en el código de histonas que se reflejan en la sobre-expresión de genes posiblemente involucrados en la progresión neoplásica pulmonar. Entre ellos, destacarían genes ubicados en las regiones sub-telómericas 7p21.3, 7p21.1; así como subcentroméricas 7p15.3, las cuales muestran cierto grado de correlación entre el aumento de CNV, con aumento en los niveles de expresión génica (RNAm y proteína) (Ávila, *et al.*, 2012).

En las regiones sub-telómericas antes mencionadas, ha sido posible identificar genes como *MEOX2* y *EVX1*, pertenecientes a la subfamilia de genes *HOMEBOX* ubicados en ambas regiones, 7p21.1 y 7p15.3, respectivamente. En 2008, Cortese y Cols., mediante el análisis de expresión diferencial comparando tejido pulmonar fetal y tejido pulmonar histológicamente normal de adulto, se logró identificar a *MEOX2* con un patrón de metilación aberrante en pacientes con cáncer pulmonar, cuyo patrón muestra semejanzas con tejido pulmonar fetal. Posteriormente en 2009, Ohshima y Cols., proponen a *MEOX2* como posible gen supresor de tumores, inactivado por metilación a nivel del promotor.

Adicionalmente, estudios recientes han demostrado que los niveles de metilación de genes *HOX* relacionados como *EVX2* en tumores pulmonares poseen un alto grado de metilación del promotor, por lo que, se propone que este gen pueda considerarse como un nuevo biomarcador de etapas tempranas del desarrollo o de valoración pronóstica en pacientes con cáncer pulmonar (Ji *et al.*, 2011).

Adicionalmente, genes localizados en la misma región sub-telómerica 7p21.1, destacan *TWIST-1* y *AhR*. *TWIST-1* involucrado en promover la metástasis e inducir la Transición Epitelial-Mesenquimal (EMT) (Eckert *et al.*, 2011), el cual recientemente se ha propuesto como posible blanco genético de regulación transcripcional del factor *MEOX2* (Armas López, *et al.*, 2011). Basado en lo anterior, reportes previos indican que la expresión de

TWIST-1 se encuentra directamente asociado con el grado de malignidad en pacientes con melanomas, neuroblastomas, cáncer de próstata, y cáncer gástrico; así como en modelos de xenotransplantes en modelos murinos (Yang y Cols., 2004).

Adicional a ello, HUI y Cols., (2009) afirman que la alta expresión de *TWIST-1* en cáncer de pulmón está asociada con procesos de diferenciación. Por lo que, *TWIST-1* se ha propuesto como un biomarcador de progresión en cáncer pulmonar. Al respecto, adicionalmente Lee y Cols., (2010) sugieren a *TWIST-1* como pieza clave en la Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT) en muchos otros tipos de cáncer incluyendo el pulmonar del grupo NSCLC.

Por otro lado, respecto al gen *AhR*, este juega un papel crítico en la respuesta a componentes xenobióticos derivados de la exposición ambiental, como mediador de la carcinogénesis iniciado por compuestos volátiles tales como B[a]P (benzo[a]pireno); un carcinógeno ambiental asociado a cáncer pulmonar (Shimizu *et al.*, 2000). Lo cual respalda la participación de *AhR* con un posible efecto potenciador de la toxicidad genética, así como un potenciador de la carcinogénesis pulmonar mediada por la exposición al humo de cigarro (Dertinger *et al.*, 2001).

Nuestro grupo de investigación realiza trabajo experimental en muestras de pacientes libres de factores de riesgo como bajo exposición a factores de riesgo ambiental entre ellos, humo de leña y tabaquismo. Al respecto, el trabajo experimental de Álvarez Morán (Tesis de posgrado, UNAM 2010), como Armas López (Tesis de Maestría, 2011), han demostrado alteraciones genético-epigenéticas que conducen a la participación del factor transcripcional *MEOX2*, como probable responsable de conducir procesos de transformación y progresión neoplásica de carcinomas pulmonares tipo Adenocarcinoma. Además de demostrar que *MEOX2* aumenta su capacidad de unión a diversas secuencias promotoras, entre ellas de forma autocrina a su propio promotor en pacientes con exposición a humo de leña; Así como con secuencias promotoras de los *EVX1* y *TWIST-1* (Armas López, 2011), proponiendo su capacidad de regular vías de señalización tipo

embrionaria a nivel transcripcional en pacientes con cáncer pulmonar (Armas López *et al.*, 2012), y posiblemente epigenética a nivel del código de histonas.

2.6 CÓDIGO DE HISTONAS EN CÁNCER PULMONAR (Participación de H3K27)

Aunque las proteínas llamadas histonas poseen isoformas en su contenido de aminoácidos, todas ellas pueden adquirir modificaciones químicas covalentes basadas en acetilación, fosforilación, metilación, etc., en los residuos de aminoácidos localizados en las colas de histonas, los cuales permiten un contacto regulado con el DNA subyacente. En este sentido, las enzimas que traducen dichas modificaciones ubicadas en las colas de histonas poseen alta especificidad dependiente de la posición. Indicando que las distintas modificaciones en las colas de histonas inducen interacciones afines a proteínas asociadas a la cromatina, donde modificaciones en la misma cola de histonas, pueden ser interdependientes y generar combinaciones posibles en los nucleosomas (Jenuwein y Allis, 2009).

Las distintas modificaciones químicas de las histonas actúan de forma combinada para formar el denominado “código de histonas”, el cual es leído por proteínas que contienen dichos dominios específicos de interacción como las HDACs (desacetilasas de histonas), PPTasas (proteínas fosfatasas), HATs (acetil transferasas de histonas), HMTs (metil transferasas de histonas) y HDMs (desmetilasas de histonas). Dicho conjunto de proteínas son los elementos efectores que inician respuestas biológicas de activación o represión de la transcripción, condensación cromosómica, etc. La localización de una modificación se encuentra altamente regulada, lo cual es crucial para lograr sus efectos de regular los niveles de transcripción (Delgado, 2009).

En este sentido el silenciamiento epigenético en células neoplásicas se encuentra parcialmente mediado por dos tipos de modificaciones en la histona H3, en el residuo de la lisina 27, en su carácter de trimetilación (H3K27me₃). A este respecto, en cáncer de colon se ha descrito que H3K7me₃, es empleado como un mecanismo de silenciamiento epigenético (Kondo *et al.*, 2008). Mientras que, su modificación hacia perfiles de acetilación (H3K27ac), representa modificaciones que prevalecen en secuencias enhancers

o potenciadoras de la transcripción. Por lo que, dicha modificación puede hacer distinción entre regiones activas o inactivas de acuerdo con la expresión de genes proximales (Creyghton *et al.*, 2010), significando un balance entre represión y activación de la transcripción a nivel de la cromatina.

A este respecto, surge la hipótesis del código de histonas, donde el código de histonas posiblemente permita la predicción de respuestas biológicas de las neoplasias, lo cual permitiría la posibilidad de predecir la respuesta de las neoplasias frente a su entorno, incluyendo su capacidad de respuesta al tratamiento oncológico, incluyendo su posible respuesta frente a esquemas de resección quirúrgica curativa. Sobre la base de los conocimientos actuales, es probable que existan nuevas posibilidades e implicaciones para la biología y enfermedades en el ser humano, incluyendo el cáncer y envejecimiento (Jenuwein y Allis, 2009).

Zinn R *et al* (2007), reportaron que la hipermetilación del promotor de *hTERT* (subunidad catalítica de la enzima telomerasa) está directamente relacionada con la marca inactiva de la cromatina H3K27me3, causando el silenciamiento de dicho gen en muchos tipos de cáncer, entre ellos el pulmonar.

Basado en todo lo anterior, la marca H3K27me3 está asociada con amplio número de secuencias promotoras de genes supresores de tumor, con niveles de hipermetilación en células que integran a la neoplasia (Schlesinger *et al.*, 2007; Ohm *et al.*, 2007), por lo que, la mayoría de la neoplasias pulmonares muestran desequilibrio en los procesos de regulación de las proteínas encargadas de la regulación de H3K27, como son EZH2, SUZ12 y EED (Bracken *et al.*, 2003), miembros del grupo Polycomb (PcG). Ejemplo de ello, es *HOXA9* (gen silenciado por PcG), que en células cancerosas frecuentemente es silenciado a través de hipermetilación de su promotor y H3K27, en correlación con la sobreexpresión de EZH2 y SUZ12 (Reynolds *et al.*, 2006).

Dicho evento de sobreexpresión de EZH2 perteneciente al complejo Polycomb en carcinomas pulmonares y posiblemente en lesiones precursoras pulmonares, sugiere que la

desregulación de los complejos Polycomb ocurren desde etapas tempranas del desarrollo neoplásico pulmonar (Breuer *et al.*, 2004). Lo que evidencia que la presencia del código histónico H3K27, está directamente relacionada con los blancos génicos (arriba) previamente descritos en adenocarcinomas pulmonares. Adicionalmente, Hussain y *Cols* (2009), han mencionado que la exposición al humo de cigarro induce alteraciones epigenéticas relacionadas con la activación de la maquinaria Polycomb en cáncer pulmonar.

3 JUSTIFICACIÓN

No debemos restar importancia a una de las enfermedades más importantes en la actualidad a nivel mundial, el cáncer de pulmón. Por lo que, gran parte de las investigaciones se enfocan a la búsqueda de blancos génicos que nos permitan contribuir, diseñar o establecer estrategias terapéuticas que permitan solución al control y/o erradicación de este tipo de enfermedades malignas. Dentro de tales líneas de investigación, nuestro grupo ha sugerido que existen una serie de alteraciones que poseen una estrecha participación con el desarrollo y progresión del cáncer pulmonar. Sin embargo, no se sabe con exactitud si esto tiene un origen o conducción genético o epigenético, o si dependen de manera mutua en el progreso de la enfermedad. Por lo que, en el presente trabajo se propone identificar si algunos de estos potenciales marcadores del cáncer pulmonar, tales como *EVX1*, *EVX2*, *MEOX2*, *TWIST-1* y *AhR*, poseen un patrón epigenético basado en su código de histonas, que permitan sugerir el comportamiento biológico y/o clínico de las neoplasias pulmonares. Así como, sus rasgos asociados con la exposición epidemiológica a factores de riesgo ambiental, como son la acetilación y/o metilación del residuo de la lisina 27 en la histona 3 (H3K27). Por lo que el presente trabajo propone analizar las marcas epigenéticas H3K27Ac versus H3K27me3, las cuales se sabe se encuentran directamente relacionadas con la regulación de las regiones promotoras localizadas en potenciales blancos génicos, asociados al desarrollo del cáncer pulmonar.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Analizar el estado de activación del código de histonas H3K27 en la región promotora de los genes *MEOX2*, *EVX1*, *AhR* y *TWIST-1*, localizados en la región citogenética 7p21.1., en pacientes con carcinomas pulmonares, asociados con la exposición factores de riesgo.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Seleccionar muestras de tejido neoplásico pulmonar de pacientes en base a criterios de inclusión entre ellos factores de riesgo de exposición ambiental.
- Establecer y desarrollar métodos de fragmentación e Inmuno-Precipitación de la Cromatina (ChIP), a partir de tejido neoplásico pulmonar sólido mediante el uso de anticuerpos anti-H3k27m3 y anti-H3K27Ac.
- Obtener y analizar la Amplificación Total del Genoma inmunoprecipitado mediante el uso de métodos lineales de amplificación del genoma (Whole Genome Amplification “WGA”).
- Analizar mediante ensayos de validación cuantitativa por PCR en tiempo real, la marca de histonas de activación (H3K27Ac) *Versus* represión (H3K27me3) en secuencias promotoras de los genes *MEOX2*, *EVX1*, *AhR*, *TWIST-1* localizados en la el locus genético 7p21.1
- Establecer mediante análisis estadístico posible correlación entre la exposición a factores de riesgo y alteraciones en los patrones de activación de la cromatina.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 SELECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE TEJIDO PULMONAR DE PACIENTES

La obtención de muestras fue realizada en estrecha colaboración con el departamento de cirugía del INER, obteniendo muestras de tejido neoplásico, y tejido pulmonar histológicamente normal adyacente a la neoplasia. Las muestras de pacientes ingresadas al estudio fueron divididos en 2 grupos de pacientes. El primer grupo de pacientes libres de exposición a factores de riesgo; mientras que el segundo grupo se consideró bajo exposición a humo de leña y/o en combinación con tabaquismo de índice tabáquico $10 <$.

5.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Diagnostico Histopatológico Definitivo de Cáncer Pulmonar
- Carcinoma Pulmonar Primario Tipo Adenocarcinoma
- Grupo de Pacientes Libres de Factores de Riesgo
- Grupo de Pacientes Bajo Exposición a Humo de Leña y/o Tabaquismo (índice Tabáquico $10 <$).

5.1.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Carcinoma Secundario a Pulmón
- Muestra Deficiente en Cantidad y Calidad
- Pacientes Menores a 35 años
- Negar su Ingreso al Estudio

5.2 INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (ChIP)

Las técnicas utilizadas de Inmunoprecipitación de la cromatina, Amplificación Genómica Lineal y Validación por PCR tiempo real, fueron realizadas siguiendo las instrucciones de los fabricantes con algunas modificaciones previamente estandarizadas durante el trabajo de Armas López, 2011.

La inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP) es un método bioquímico usado principalmente para determinar la localización en el genoma de histonas químicamente modificadas, así como de otras proteínas tales como factores activadores o represores de la transcripción. Dicha técnica consiste en el uso de un anticuerpo el cual reconozca el epítipo antigénico de la proteína de interés de forma individual como bajo la interacción de otras proteínas que conforman a la cromatina (Esteller, *et al.* 2001).

Por lo tanto el método de ChIP consta básicamente de 2 pasos, entrecruzamiento con formaldehído del DNA en interacción con las proteínas unidas a éste, lo cual permita mantener las interacciones proteína-proteína que *in vivo* se han establecido, así como las interacciones proteína-DNA seguido de la inmunoprecipitación de los complejos proteína-DNA mediante anticuerpos específicos a partir de extractos de cromatina fragmentada. Las secuencias específicas de DNA inmunoprecipitadas a partir de la cromatina son entonces amplificadas por PCR para determinar su nivel de enriquecimiento o presencia en las muestras correspondientes obtenidas por cada anticuerpo empleado (Kuo *et al.*, 1999).

Se utilizó el kit comercial EZ-Magna ChIP™ G de la marca Milipore (Temecula, CA, U.S.A) siguiendo las indicaciones del fabricante con modificaciones estandarizadas previamente por nuestro grupo de investigación (Armas, 2011).

5.2.1 ENTRECruzamiento Y FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA DE MUESTRAS DE TEJIDO SÓLIDO PARA CHIP

El tejido (en fresco o congelado) en trozos pequeños (3mm^3) fue pulverizado en mortero mediante el uso de nitrógeno líquido, después fue transferido a tubos de 15ml., posterior a ello e inmediatamente el tejido se incubó con formaldehído como a continuación se indica.

A temperatura ambiente se añadieron 10 ml de PBS 1X frío de la marca US Biological (Swampscott, MA) a concentración final de 1% (270 μ L) de formaldehído e incubó por 15 min a temperatura ambiente.

Para detener la reacción de entrecruzamiento se añadió glicina de la marca Merck (Darmstadt, Alemania) a concentración final de 0.125 M., (0.938 g/L) e incubando a temperatura ambiente durante 10 min.

Las muestras fueron centrifugadas mediante el uso de una centrifuga de la marca eppendorf (modelo 5804 Westbury, NY, U.S.A) a 2500 rpm, 4°C durante 15 min. Se tomó el sobrenadante y se lavó la pastilla celular con 10 ml de PBS 1x frío. Esto se repitió 2 veces.

El tejido se resuspendió en 800 µL de buffer de lisis con inhibidores de proteasas y se incubó 45 min en hielo, posterior a ello, se separó una alícuota de 50 µL de cromatina no sonicada, para obtener la cuantificación del DNA asociado a la cromatina total por muestra de cada paciente.

Reactivo (concentración final)	Solución stock	Volumen para preparar 25 mL
HEPES-KOH 50 mM pH7.5	1M	1.5 mL
NaCl 140 mM	5M	0.7 mL
EDTA 1 mM pH8	0.5M	0.05 mL
Triton X-100 1%	20%	1.25 mL
Sodium Deoxycholate 0.1%	10%	0.25 mL
SDS 0.1%	20 %	0.125 mL

Cuadro 1. Buffer de lisis. Buffer utilizado para llevar a cabo la lisis celular de las muestras biológicas de cáncer pulmonar.

Nota: Utilizar inhibidor de proteasas Complete Mini de la marca Roche® (Indianápolis, IN, U.S.A) 1 pastilla por cada 10 ml., de buffer de lisis y aforar a 25 ml., con agua destilada estéril.

5.2.2 FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA POR SONICACIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se utilizó el sonicador de la marca ultrasonic processor (Modelo GE 601, U.S.A). Utilizando los siguientes parámetros:

Amplitud	Watts	N° de pulsos	Tiempo del pulso seg.
60	95-100	10	20

Posterior al tiempo de sonicación las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm., durante 15 min a 4°C, se realizaron alícuotas del sobrenadante cuidando no tocar el fondo del tubo con restos celulares, los cuales fueron desechados. Se almacenaron 7 alícuotas de 100µL c/u en ultra-congelador de la marca REVCO modelo ULTI7863-A12(U.S.A) a 80°C, para su uso posterior. Se purificó una alícuota de 50 µL de cromatina sonicada y 1 alícuota de cromatina libre de sonicación por el método de fenol- cloroformo-Alcohol Isoamilico, para realizar el análisis de integridad y cuantificación.

5.2.3 PURIFICACIÓN DEL DNA SONICADO POR FENOL: CLOROFORMO

A partir de alícuotas previas de 50 µL c/u, tanto del DNA sonicado como no sonicado, fueron adicionados de 5 µL de proteinasa K (stock 0.02 mg/µL) de la marca Qiagen (Maryland, U.S.A) e incubaron a 65°C por 1 hora, en termociclador, después se agregó 1 volumen de fenol:cloromorfo de la marca Invitrogen (U.S.A) y se mezcló para su posterior incubación por 5 min a temperatura ambiente.

Posteriormente dichas muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm., durante 5 min. a 4°C, tomando la fase acuosa (fase superior) y transfiriendose a 1 tubo nuevo. A este se agregaron 2 volúmenes de isopropanol frío marca SIGMA (U.S.A) y 1.5 µL (stock 0.02 mg/µL) de glicógeno de la marca Fermentas (U.S.A), dejando precipitar el DNA toda la noche a -80 °C.

Al término de la precipitación las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm., durante 45 min. A 4°C, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla de DNA con 700 µL de etanol de la marca SIGMA (Sheboygan Falls, WI, U.S.A) al 70% de 2 a 3 veces. Al final la muestra de DNA se resuspendió en un volumen de 25 µL de agua libre de nucleasas.

5.2.4 INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA ChIP

Cada IP se realizó a partir de 10 µg., de cromatina y dependiendo de la cuantificación se llevó a un volumen final de 500 µL (incluyendo cromatina y buffer de dilución) y 2.25 µL

de inhibidor de proteasas. Para cada paciente se incluyó el uso de anticuerpos anti-H3k27m3, anti-H3K27Ac, y como control negativo anticuerpo anti-IgG de ratón.

Por cada ensayo de inmunoprecipitación se agregó la concentración correspondiente de anticuerpo más 20 μ L de perlas magnéticas acopladas a proteína G en resuspensión.

Para el uso de ambos anticuerpos anti-H3k27m3 y anti-H3K27Ac fueron añadidos 2.5 μ g de anticuerpo por tubo, y para el control negativo, anti-IgG de ratón se emplearon 2.0 μ g de anticuerpo por tubo.

Posteriormente se incubo a 4°C toda la noche con agitación-rotación empleando un mezclador DYNAL® modelo 10111 (New Hyde Park, NY, U.S.A) con velocidad aproximada de 35 rpm. Las pastillas derivadas de perlas magnéticas acopladas a proteína G fueron aisladas del resto del sobrenadante mediante el uso de un imán (12-tube magnet) de la marca QIAGEN (U.S.A).

El complejo (perlas- anticuerpo- cromatina) fue lavado y resuspendido a 500 μ L., en cada una de las siguientes soluciones amortiguadores (buffer) en frío usando el siguiente orden e incubando durante 5 minutos c/u, con agitación seguido del método de separación magnética y desechando el sobrenadante:

- I. Amortiguador o buffer de lavado (*Low salt immune complex*)
- II. Amortiguador o buffer de lavado (*High salt immune complex*)
- III. Amortiguador o buffer de lavado (*LiCl Immune complex*)
- IV. Amortiguador o Buffer TE

5.2.5 ELUCIÓN DEL COMPLEJO Y REVERSIÓN DEL ENTRECRUZAMIENTO

A cada tubo se le agregó 100 μ L buffer CHIP elución y 1 μ L de proteinasa K (stock 0.02 mg/ μ L) y fueron incubados a 62 °C durante 2 horas con agitación.

Posteriormente se incubaron a 95°C durante 10 minutos en termociclador, y al terminar se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente aproximadamente 5 min.

Por último se separaron las perlas magnéticas mediante el uso del magneto, y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo.

5.2.6 PURIFICACIÓN DEL DNA-IP

A la solución en suspensión previamente mencionada de 100 μ L de DNA Inmunoprecipitado (IP) se le añadieron 500 μ L del amortiguador o buffer de unión mezclando con agitación, esta mezcla se transfirió a la columna empleando tubo colector, y posteriormente se centrifugó durante 30 segundos a 13000 rpm., desechando la fase líquida.

Posteriormente fueron agregados 500 μ L del reactivo de lavado sobre la columna, centrifugando durante 30 segundos a 13000 rpm, desechando el sobrenadante repitiendo este paso 2 veces.

La columna se colocó en un tubo nuevo y se le agregó 25 μ L de agua libre de nucleasas sobre la membrana o columna e incubó por 5 min. Al término, sobre la columna se centrifugó durante 30 segundos a 13000 rpm, desechando la columna y recuperando el DNA (fase acuosa) para su cuantificación e índice de pureza mediante el uso de NanoDrop (marca Thermo scientific, modelo ND-1000, U.S.A).

5.3 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN *GAPDH*

Con el objeto de evidenciar la presencia de secuencias promotoras en el DNA-IP, posterior a la cuantificación del DNA-IP, 10ng de DNA purificado fueron llevados a un volumen de 4 μ L, se preparó una mezcla de PCR (master mix) bajo las siguientes condiciones de reacción en un volumen final de 20 μ L.

Reactivo (concentración)	Volumen	Concentración final
MgCl ₂ 25mM	1.2 µL	1.5 mM
Buffer PCR 10x	2.0 µL	1 X
dNTP's Mix 2.0 mM	4.0 µL	0.4 mM
Control Primers	1.0 µL	10 µM
Solución Q	4.0 µL	5x
Taq Polimerasa	0.2 µL	1.0 U
DNA	4 µL	10 ng
H ₂ O	3.6 µL	-----
Vol. Total	20 µL	20 µL

Cuadro 2. Condiciones de PCR en tiempo final para la amplificación de secuencia promotora del gen *GAPDH*.

Fue utilizado un termociclador de la marca: Axigen, (modelo: Maxigene Gradient U.S.A).

Con el siguiente programa:

Desnaturalización inicial	94°C 1 min.	} 42 ciclos Amplicon para <i>GAPDH</i> 166 pb.
Desnaturalización	94°C 20 sec.	
Alineamiento	60°C 30 sec.	
Extensión	72°C 30 sec.	
Extensión final	72°C 5 min.	

El producto amplificado de 166 pb fue verificado en geles de agarosa al 1.5% (Primers de la marca Millipore, U.S.A., KIT EZ Magna ChIP 17-409) además del uso del marcador de peso molecular de DNA 100 pb plus (marca Fermentas, U.S.A).

5.4 AMPLIFICACIÓN TOTAL DEL GENOMA (WHOLE GENOME AMPLIFICATION “WGA”)

5.4.1 AMPLIFICACIÓN DEL MÉTODO, WGA1

Para la amplificación se utilizó el kit comercial GenomePlex[®] Whole Genome Amplification (WGA 1) de la marca SIGMA (U.S.A) siguiendo las indicaciones del fabricante con modificaciones estandarizadas en el laboratorio que a continuación se describen:

5.4.2 PREPARACIÓN DE LA BIBLIOTECA

Para preparar la biblioteca se utilizó una solución de 10ng de DNA IP en suspensión de 10 µL de agua libre de nucleasas, 2 µL de buffer de preparación de librería 1X, y 1 µL de solución estabilizadora de librería.

La mezcla previa se homogenizó con firmeza y centrifugó brevemente, se incubó a 95°C durante 2 minutos en termociclador y posteriormente se dejó enfriar la muestra en hielo aproximadamente por 5 min.

Posteriormente se agregó 1 µL de enzima de preparación de librería en un volumen total de 14 µL, se homogenizó fuertemente y se colocaron las muestras en un termociclador empleando las siguientes condiciones de incubación, previo a su amplificación:

16°C durante 20 minutos
 24°C durante 20 minutos
 37°C durante 20 minutos
 75°C durante 5 minutos
 4°C tiempo indeterminado

5.4.3 AMPLIFICACIÓN

Se preparó una mezcla de reacción como se indica a continuación (Cuadro 3), la cual se añadió al volumen de 14 µL de la reacción previamente descrita.

Reactivo Stock	Volumen	Concentración Final
Master Mix amplification 10X	7.5 µL	-----
WGA polimerasa	5 µL	12.5 U
H ₂ O	48.5 µL	-----
Volumen total	75 µL	75 µL

Cuadro 3. Condiciones de amplificación (WGA 1)

Dicha mezcla fue resuspendida y homogeneizada con sumo cuidado mediante la ayuda de micro-pipeta, y centrifugó brevemente, para su posterior incubación empleando las siguientes condiciones de amplificación:

Desnaturalización inicial 95°C 3 min.
 Desnaturalizar 94°C 15 seg. } 14 ciclos
 Alineamiento/ extensión 65°C 5 min. }

Al termino, el DNA amplificado fue purificado mediante el uso de columnas (MiniElute® Qiagen, U.S.A) siguiendo el protocolo del fabricante sin modificación, resuspendiendo en 40 µL de agua libre de nucleasas.

En geles de agarosa al 1.5% fueron verificados los productos de amplificación, los cuales fueron en un rango de 100-1000 pb.

Las muestras purificadas IP fueron re-amplificadas mediante el kit comercial GenomePlex[®] WGA Reamplification (WGA3) de la marca SIGMA (U.S.A) siguiendo las indicaciones del fabricante con modificaciones estandarizadas en el laboratorio como a continuación se describen:

5.5 RE-AMPLIFICACIÓN DEL MÉTODO, WGA 3

A partir del DNA amplificado previamente mediante el método WGA-1, este fue re-amplificado mediante el uso del método WGA3 a partir de una solución de 200 ng en suspensión de 10 µL de agua libre de nucleasas.

Se preparó una solución (master mix) con los siguientes reactivos, sobre los 200 ng de DNA amplificados por WGA1.

Reactivo Stock	Volumen	Concentración Final
Master Mix amplification 10X	7.5 µL	-----
dNTP's Mix 10 mM	3.0 µL	0.4 mM
WGA <i>polimerasa</i>	5 µL	12.5 U
H ₂ O	49.5 µL	-----
Volumen total	75 µL	75 µL

Cuadro 4. Condiciones de re-amplificación (WGA3)

Dicha solución se resuspendió, centrifugó brevemente y fue colocada en el termociclador empelando las siguientes condiciones de incubación:

Desnaturalización inicial	95°C 3 min.	} 4 ciclos
Desnaturalizar	94°C 15 seg.	
Alineamiento/ extensión	65°C 5 min.	

Posterior a completar los ciclos de re-amplificación el DNA fue método de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, ello en resuspensión de 200 µL de agua libre de nucleasas.

Al termino, mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% se verificaron los productos de re-amplificación lineal en rango de 100-1000 pb.

5.6 ENSAYOS DE VALIDACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL

5.6.1 PRIMER'S UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS DE VALIDACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL

Los juegos de primer's (oligonucleotidos) para las secuencias promotoras de los genes *EVX1*, *EVX2*, *MEOX2*, *AhR*, *TWIST-1* y *C-FOS* fueron diseñados mediante el uso de los programas de análisis de predicción de secuencias para PCR OLIGO y VECTOR NT. La secuencia de los primer's para el promotor del gen *C-FOS* fue tomada del kit llamado MAGnify™ Chromatin Immunoprecipitation System de la marca INVITROGEN (U.S.A) con número de catalogo 49-2029. Todos los primer's fueron sintetizados por SIGMA-ALDRICH (U.S.A).

Gen	Secuencia (5'-3')	Tm Teo	Región	Tm Exp.	Tamaño
<i>EVX1</i>	TCATCGGTGTTAGATCAAGG CAGCGAAGATGAAAGGAAAC	60.1	7p15-14	62	300pb
<i>MEOX2</i>	GTCCAGCAGGAGATAGGAAG AGAGTGGGAGAGGTTGAAGC	60.4	7p22.1	55	205pb
<i>TWIST</i> <i>distal 5'</i>	GGGAGGACGAATTGTTAGAC CGAGGTCCAAAAAGAAAGC	59.9	7p21.2	55	284pb
<i>TWIST</i> <i>proximal</i> <i>3'</i>	TGAGACATCACCCACTGTGTAGA ACTTACCAAACCTCCTGCTTAACAA	59.9	7p21.2	55	275pb
<i>C-FOS</i>	TTAGGACATCTGCGTCAGCAGGTT TCTCGTGAGCATTTTCGAGTTCCT	70.5	14q24.3	55	120
<i>EVX2</i>	GGCGCTGCATGATTAGGAC GAGGCGAGAAGAGACAAGTG	60.1	2q31.1	62	205pb

Cuadro 5. Diseño de primer's. Secuencia, región y tamaño del amplicon de cada gen diseñado a ser validado.

5.6.2 CONDICIONES DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LAS SECUENCIAS PROMOTORAS DE LOS GENES *EVX1*, *EVX2*, *MEOX2*, *AhR*, *TWIST-1* y *C-FOS*

Se utilizó el kit comercial Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix de la marca Fermentas (U.S.A) preparando en frío (sobre hielo) una mezcla de reacción (master mix)

añadiendo todos los componentes (excepto el DNA) diseñada para reacciones de amplificación de 15 μ L.

Reacción	Concentración Final	Volumen
Maxima SYBR Green qPCR	2X	7.5 μ L
Primer's 10 μ M	0.5 μ M	0.75 μ L
DNA	30 ng	4 μ L
H ₂ O	15 μ L	2.75 μ L
Volumen Total	15 μ L	15 μ L

Cuadro 6. Condiciones de Amplificación por PCR en tiempo real.

El DNA de cada muestra problema (20 ng/reacción) fue agregada a cada pozo de la placa previamente diseñada, así mismo para la construcción de la curva estándar respectiva fue utilizado DNA proveniente de un pool de individuos sanos cuyos valores fueron 0.01 ng, 0.1 ng, 1.0 ng, 10 ng, 100 ng. Ello, debido a que se trata de ensayos de cuantificación absoluta, por lo cual se requiere el desarrollo de curvas estándar.

El master mix antes mencionado, se mezcló suavemente y agregó un volumen de 10 μ L a la placa, posteriormente se centrifugó la placa durante 5 minutos a 1800 RPM a 4°C, al término la placa previamente sellada con micro-film fue llevada al equipo de PCR en tiempo real de la marca ROCHE modelo The LightCycler® 480 Real-Time PCR System mediante el uso de las siguientes condiciones de amplificación (Cuadro 7).

Gen	Desnaturalización Inicial (10 min)	Desnaturalización (15 seg)	Alineamiento (30 seg)	Extensión (30 seg)	N° de ciclos
<i>EVX1</i>	95 °C	95 °C	62°C	72°C	65
<i>EVX2</i>	95 °C	95 °C	62°C	72°C	65
<i>MEOX2</i>	95 °C	95 °C	55°C	72°C	65
<i>AhR</i>	95 °C	95 °C	55°C	72°C	65
<i>TWIST-1</i>	95 °C	95 °C	55°C	72°C	65
<i>C-FOS</i>	95 °C	95 °C	55°C	72°C	65

Cuadro 7. Condiciones de alineamiento de PCR en tiempo real para *EVX1*, *EVX2*, *MEOX2*, *AhR*, *TWIST-1* y *C-FOS*.

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Fueron empleadas, prueba exacta Fisher y análisis de covarianza para establecer diferencias estadísticas entre los grupos de pacientes propuestos para el estudio, considerando estadísticamente significativas aquellas diferencias con $P \leq 0.05$ aplicando prueba de dos colas.

6 RESULTADOS

6.1 RENDIMIENTO DEL MÉTODO DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA SOBRE TUMORES PULMONARES SÓLIDOS TIPO AD

Las muestras de carcinomas pulmonares fueron seleccionadas e ingresadas al estudio a partir del análisis de los datos clínicos de los pacientes con diagnóstico histopatológico definitivo de adenocarcinoma pulmonar, cuyos datos y características clínicas de los pacientes se describen en la Tabla 1. Donde destaca la presencia y ausencia de exposición a factores de riesgo ambiental como principal elemento de análisis cualitativo en pacientes. Dichas características clínicas describen en parte los criterios de inclusión empleados para los pacientes mencionados previamente en la sección de materiales y métodos.

Los métodos de Inmunoprecipitación de la cromatina fueron realizados utilizando los anticuerpos anti-H3K27trimetilado (H3K27me3) y anti-H3K27Acetilado (H3K27Ac), además del uso de un anticuerpo anti-IgG, como control negativo.

Para lo cual, durante el proceso de inmunoprecipitación fue necesario contar al menos con 10µg de cromatina fragmentada, previamente cuantificada por un método espectrofotométrico en este caso NanoDrop. Al finalizar el método de IP, las concentraciones y rendimiento del DNA-IP, fueron ordenados incluyendo las características clínicas de los pacientes (Tabla 2).

Al respecto podemos observar que los valores de rendimiento y cuantificación del DNA-IP, son similares entre ambos grupos de pacientes con exposición a humo de leña y pacientes libres de exposición a factores de riesgo. A este respecto, los valores del DNA-IP a partir del empleo del anticuerpo anti-H3k27me3, muestran un rendimiento de purificación en un rango de 1 ng/µL a 5 ng/µL. Así mismo, los valores del DNA-IP mediante el uso del anticuerpo anti-H3K27Ac muestran el mismo rango de rendimiento (1 ng/µL a 5 ng/µL). En contraste con los valores negativos de cuantificación obtenidos a partir del uso del anticuerpo anti-IgG como control negativo, los cuales en todos los casos mostraron una concentración con valores negativos de cuantificación (Tabla 2).

Tabla 1. Relación de pacientes con Cáncer pulmonar de tipo Adenocarcinoma

No. Registro	Sexo	Edad	Tipo Histológico	IT	Exposición a factores de riesgo
GCH170209	Fem.	74	AD BD bronquioalveolar	0	Humo de leña (crónico)
AEE101007	Fem.	71	AD PD	(-)	Humo de leña, petróleo
GOMJ300609	Fem.	64	AD mixto necrosis y cavitación	0	Humo de leña
GHM291008	Fem.	63	AD Muco productor	(-)	Humo de leña
PMA230408	Fem.	59	AD BD	0	Humo de leña (crónico)
DSE201008	Fem.	70	AD BD	4	(-)
MGG140809	Fem.	55	AD BD	0	(-)
GMR080708	Fem.	47	AD MD Mucoprodutor	(-)	(-)
SPN020309	Fem.	41	AD Muco productor	0	(-)
RSCL300109	Fem.	38	AD BD	(-)	(-)

AD (Adenocarcinoma); BD (Bien diferenciado); MD (Moderadamente Diferenciado); PD (Pobrementemente Diferenciado).

6.2 ANÁLISIS DE CALIDAD DE LA CROMATINA INMUNO-PRECIPITADA (H3K27) MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *GAPDH*

Con el objetivo de evaluar la eficiencia en los métodos de fragmentación y calidad de las muestras del DNA-IP, se realizaron ensayos de PCR empleando para ello juego de primers dirigidos contra la región promotora del gen *GAPDH*, para confirmar la presencia de fragmentos de secuencias promotoras posterior a la fragmentación de la cromatina. En la Fig.2., se observa el resultado representativo (4 pacientes), donde fue posible detectar en

todos los casos la amplificación de la región promotora del gen *GAPDH*, como se indica en el siguiente orden: carril 1 DNA-IP H3K27Ac, carril 2 DNA-IP H3K27me3, carril 3 control negativo anti IgG. Al respecto, se observa la amplificación del fragmento esperado de 166pb en las muestras problema a partir del DNA-IP, mientras que ausencia de amplificación para el control negativo de IP, mediante el anticuerpo anti-IgG, lo cual indica alto nivel de especificidad de los anticuerpos empleados durante el método IP.

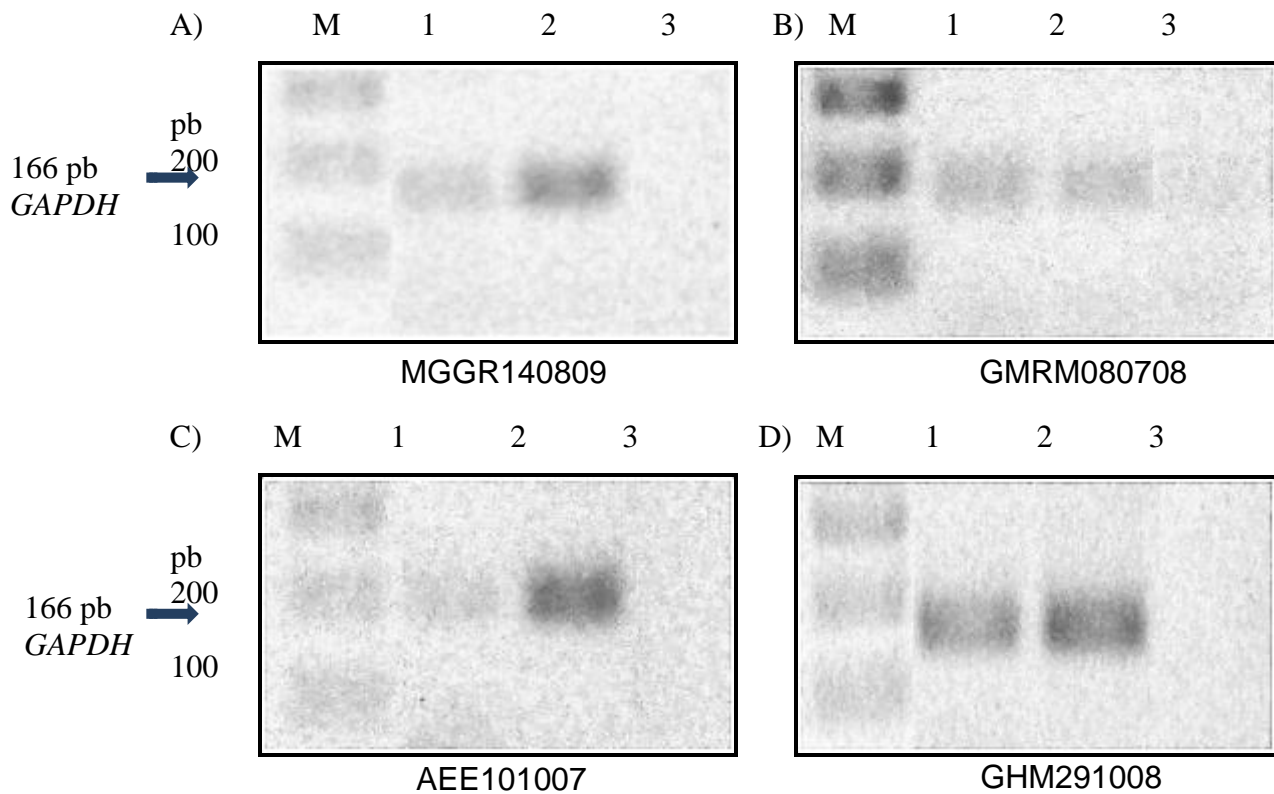


Figura 2. Amplificación por PCR de la región promotora del gen *GAPDH* (Prueba de calidad del DNA-IP). Muestras representativas del DNA-IP de 4 pacientes con cáncer pulmonar. Carril 1 IP H3K27Ac, carril 2 IP H3K27 me3, carril 3 IgG negativo. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%.

6.3 ANÁLISIS DEL RENDIMIENTO DE DNA-IP POR WGA 1 A PARTIR DE MUESTRAS DE PACIENTES

Se realizaron métodos de amplificación lineal del genoma (WGA1) de los segmentos del DNA-IP para ambos grupos de pacientes con la finalidad de alcanzar una concentración detectable del DNA-IP, para su posterior uso en ensayos cuantitativos de PCR en tiempo real.

A partir de las muestras de carcinomas pulmonares de pacientes ingresados al estudio, se llevó a cabo la amplificación del DNA-IP, al respecto en Fig.3 se muestran resultados representativos de 4 pacientes, donde se puede observar: carril 1 amplificación del DNA-IP a partir de H3K27Ac, donde en todos los casos muestran reducida amplificación; mientras que en carril 2 se muestra el DNA-IP mediante el uso de H3K27me3 con mayor nivel de amplificación comparado con H3K27Ac. Lo cual sugiere, mayor rendimiento en el método de amplificación WGA1, el cual proviene del DNA-IP anti-H3K27me3. En Tabla 2 se muestran los valores resultantes del método WGA1, en promedio para el DNA-IP anti-H3K27Ac se genero un rendimiento hasta 10 veces mayor a la concentración del DNA-IP inicial por paciente; mientras que para el DNA-IP anti-H3K27me3 se obtuvo un rendimiento hasta 20 veces mayores el valor inicial (Tabla. 2).

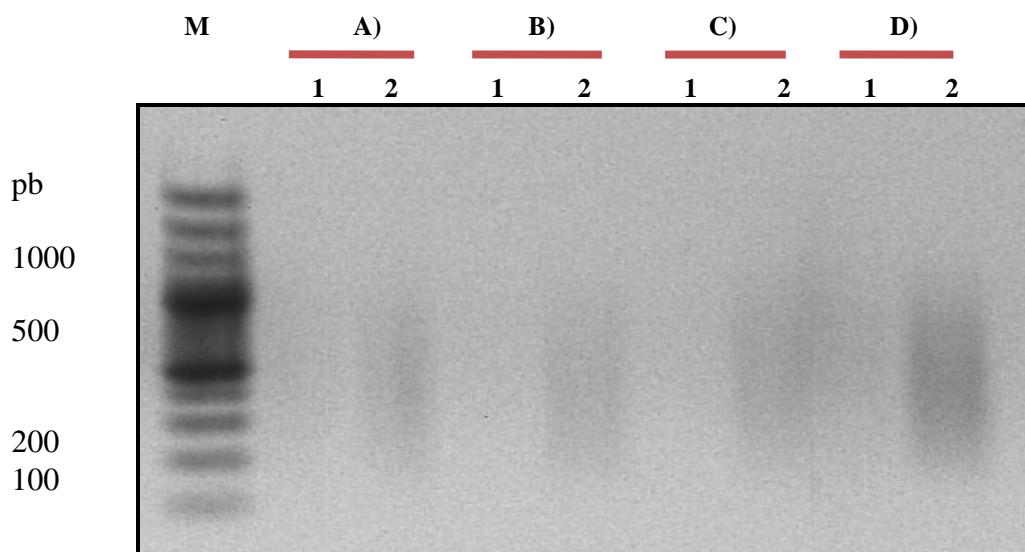


Figura 3. Amplificación total del DNA genómico correspondiente al DNA-IP por el método WGA1. Resultado representativo de 4 pacientes con cáncer pulmonar tipo AD. Amplificación total a partir de 10 ng de DNA-IP. Carril 1, IP de H3K27Ac, carril 2, IP de H3K27me3. A) Paciente PMA230408, B) Paciente GOMJ300609, C) Paciente GCH170209, y D) Paciente DSE201008. Electroforesis en gel de agarosa 2.5%.

Tabla 2. Valores del rendimiento (cuantificación) del DNA-IP amplificado por el método WGA1. Muestras de pacientes con cáncer pulmonar, amplificación lineal a partir de 10ng de DNA-IP a partir de anti-H3K27Ac y anti-H3K27me3.

No. Registro	IT	Exposición otros agentes	Inmunoprecipitación			Whole Genome Amplification (WGA1)	
			Anti-H3K27Ac	Anti-H3K27me3	Anti- IgG Negativo	H3K27Ac	H3k27me3
GCH170209	0	Humo de leña (crónico)	3.39ng/μL	4.39ng/μL	-0.19 ng/μL	15.84ng/μL	39.29ng/μL
AEE101007	(-)	Humo de leña, petróleo	3.42ng/μL	4.63ng/μL	-0.28 ng/μL	5.0ng/μL	34.99ng/μL
GOMJ300609	0	Humo de leña	2.92ng/μL	2.85ng/μL	-0.19 ng/μL	19.33ng/μL	68.62ng/μL
GHM291008	(-)	Humo de leña	1.88ng/μL	4.56ng/μL	-1.01 ng/μL	43.07ng/μL	63.88ng/μL
PMA230408	0	Humo de leña (crónico)	3.58ng/μL	3.41ng/μL	-0.19 ng/μL	35.55ng/μL	71.52ng/μL
DSE201008	4	(-)	3.51ng/μL	3.06ng/μL	-0.19 ng/μL	30.69ng/μL	73.67ng/μL
MGGR140809	0	(-)	4.34ng/μL	4.27ng/μL	-0.28 ng/μL	12.22ng/μL	33.62ng/μL
GMRM080708	(-)	(-)	2.06ng/μL	1.51ng/μL	-1.01 ng/μL	8.54ng/μL	67.16ng/μL
SPN020309	0	(-)	2.31ng/μL	2.57ng/μL	-1.01 ng/μL	13.93ng/μL	73.28ng/μL
RSCL300109	(-)	(-)	3.08ng/μL	5.66ng/μL	-1.09 ng/μL	32.10ng/μL	123.59ng/μL

6.4 ANÁLISIS DE RE-AMPLIFICACIÓN DEL DNA-IP MEDIANTE WGA3

Con el objetivo de dar sensibilidad a los métodos posteriores de análisis cuantitativo de la cromatina mediante ensayos de PCR en tiempo real, fue necesario el desarrollo de ensayos de re-amplificación (WGA3) a partir del DNA-IP (WGA1). Al respecto en Fig.4 se observa en carriles 1 WGA3 anti-H3K27Ac, mientras que en carriles 2 WGA3 anti-H3K27me3. En contraste con los ensayos por WGA1 donde se muestran diferencias en rendimiento entre anti-H3K27Ac versus anti-H3K27me3, para los ensayos WGA3 se pierden dichas diferencias. En Tabla 3, se muestran los valores de amplificación por WGA3, los cuales en promedio para ambos anti-H3K27Ac y anti-H3K27me3 poseen un rendimiento de 30 veces mayor al rendimiento obtenido por el método WGA1. A este respecto los ensayos obtenidos muestran una concentración suficiente para el desarrollo de ensayos de validación cuantitativa, así como su posible uso en micro-arreglos de regiones promotoras, o como lo indica el objetivo del presente proyecto el análisis cuantitativo del perfil de activación del código histónico mediante PCR en tiempo real.

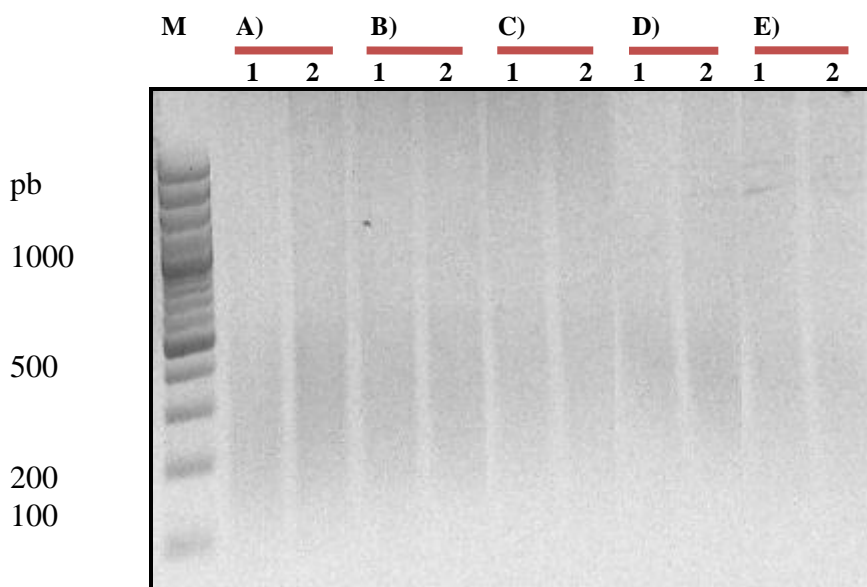


Figura 4. Amplificación total del DNA genómico correspondiente al DNA-IP/WGA1 mediante el método WGA3. Resultado representativo de 4 pacientes con cáncer pulmonar tipo AD. Resultado de amplificación total a partir de 10 ng de DNA-IP/WGA1, carril 1 WGA3 de H3K27Ac, carril 2 WGA3 de H3K27me3. A) Paciente GMRM080708, B) Paciente PMA230408, C) Paciente GOMJ300609, D) Paciente GCH170209, E) Paciente DSE201008. Electroforesis en gel de agarosa 2.5%.

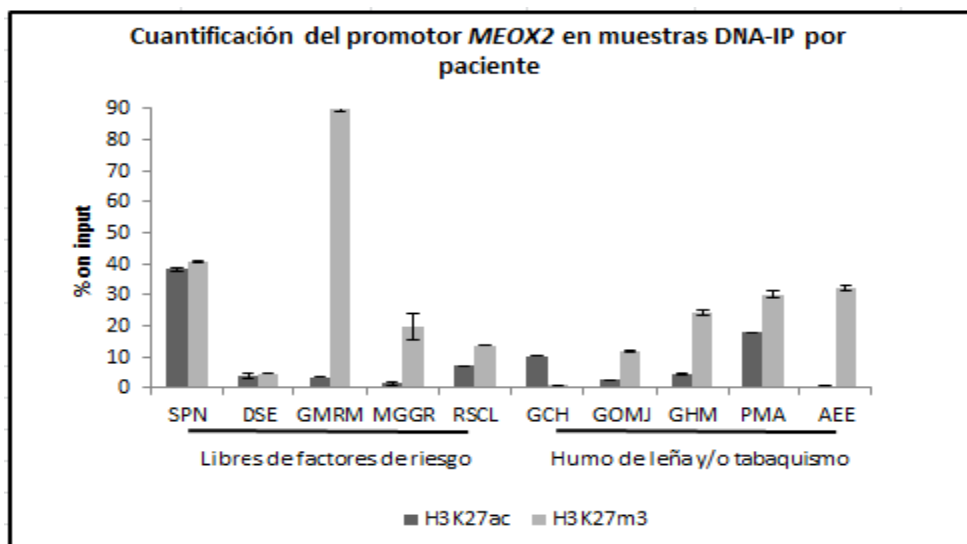
Tabla 3. Valores de cuantificación del DNA-IP/WGA1 amplificado por el método WGA3. Muestras de pacientes con cáncer pulmonar, amplificación por PCR a partir de 10ng de DNA-IP/WGA1, tanto anti-H3K27Ac como anti-H3K27me3.

No. Registro	IT	Exposición otros agentes	Inmunoprecipitación			Whole Genome Amplification (WGA1)		Whole Genome Re-Amplification (WGA3)	
			Anti-H3K27Ac	Anti-H3K27me3	Anti-IgG	H3K27Ac	H3k27me3	H3K27Ac	H3k27me3
GCH170209	0	Humo de leña (crónico)	3.39ng/μL	4.39ng/μL	-0.19 ng/μL	15.84ng/μL	39.29ng/μL	480.72ng/μL	544.94ng/μL
AEE101007	(-)	Humo de leña, petróleo	3.42ng/μL	4.63ng/μL	-0.28 ng/μL	5.0ng/μL	34.99ng/μL	960.35ng/μL	424.26ng/μL
GOMJ300609	0	Humo de leña	2.92ng/μL	2.85ng/μL	-0.19 ng/μL	19.33ng/μL	68.62ng/μL	321.01ng/μL	442.47ng/μL
GHM291008	(-)	Humo de leña	1.88ng/μL	4.56ng/μL	-1.01 ng/μL	43.07ng/μL	63.88ng/μL	1222.53ng/μL	742.73ng/μL
PMA230408	0	Humo de leña (crónico)	3.58ng/μL	3.41ng/μL	-0.19 ng/μL	35.55ng/μL	71.52ng/μL	174.03ng/μL	166.55ng/μL
DSE201008	4	(-)	3.51ng/μL	3.06ng/μL	-0.19 ng/μL	30.69ng/μL	73.67ng/μL	564.94ng/μL	627.76ng/μL
MGGR140809	0	(-)	4.34ng/μL	4.27ng/μL	-0.28 ng/μL	12.22ng/μL	33.62ng/μL	880.31ng/μL	774.38ng/μL
GMRM080708	(-)	(-)	2.06ng/μL	1.51ng/μL	-1.01 ng/μL	8.54ng/μL	67.16ng/μL	113.49ng/μL	348.53ng/μL
SPN020309	0	(-)	2.31ng/μL	2.57ng/μL	-1.01 ng/μL	13.93ng/μL	73.28ng/μL	875.72ng/μL	788.25ng/μL
RSCL300109	(-)	(-)	3.08ng/μL	5.66ng/μL	-1.09 ng/μL	32.10ng/μL	123.59ng/μL	878.26ng/μL	651.38ng/μL

6.5 ANÁLISIS DE VALIDACIÓN SOBRE SECUENCIAS PROMOTORAS DE GENES ALOJADOS EN LA REGIÓN 7P.21.1

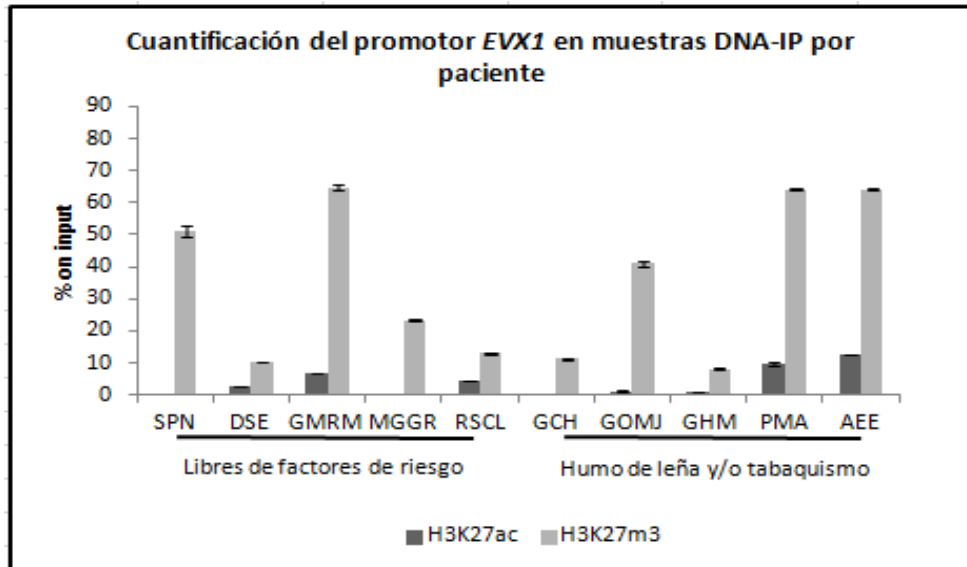
A partir de las muestras del DNA-IP antes indicadas, resultantes del método WGA3, fueron realizados ensayos de validación cuantitativa por PCR en tiempo real, donde se logró verificar la amplificación de secuencias específicas de las regiones promotoras de los genes *MEOX2*, *TWIST-1*, *AhR*, *EVX1*, *EVX2*, y *C-FOS*, en ambos grupos de pacientes con cáncer pulmonar de tipo adenocarcinoma.

En la Gráfica 1, se observan los resultados de amplificación de la región promotora del gen *MEOX2*, al respecto podemos observar que en ambos grupos de pacientes amplifica la región promotora de *MEOX2*. Sin embargo, es mayor al inmunoprecipitar el código histónico H3K27me3, obteniendo un valor máximo de 90%, cuyo valor es mayor al código histónico H3K27Ac, en todas las muestras de pacientes. Es importante hacer notar que los pacientes GMRM y SPN pertenecientes al grupo de pacientes libres de factores de riesgo, poseen valores muy elevados, probablemente indicando el efecto de otros factores de riesgo, entre ellos genéticos o ambientales no considerados en el análisis del presente estudio, ya que, si bien los valores detectados en el grupo de pacientes expuestos a humo de leña son altos, estos se muestran homogéneos, en contraste del grupo de pacientes libres de factores de riesgo.



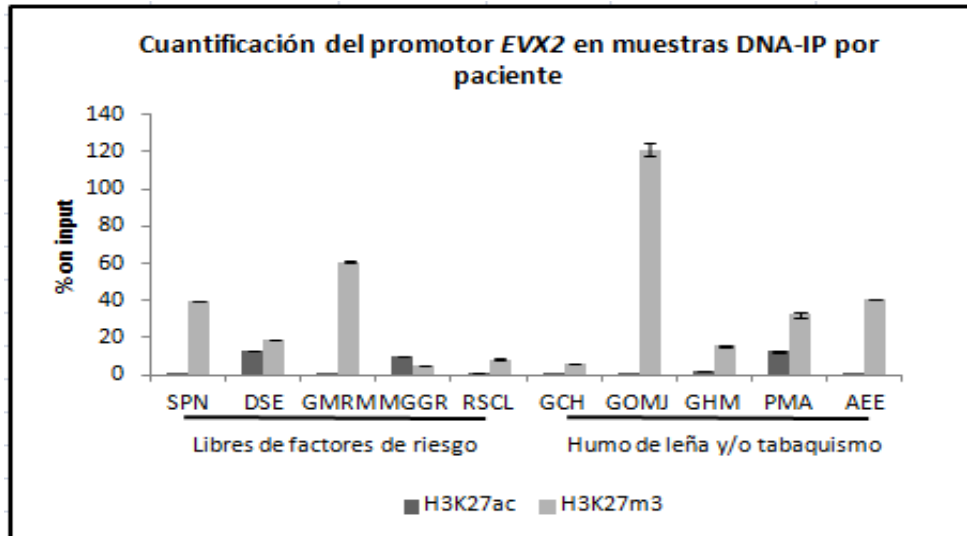
Gráfica 1. Análisis cuantitativo mediante la amplificación por PCR en tiempo real para la secuencia promotora del gen *MEOX2*, en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD. Valores de amplificación representados en porcentaje tomando como referencia de 100% de amplificación a partir del DNA-Input (DNA genómico de cada paciente) es decir DNA sonicado, no-IP por cada paciente. Adicionalmente los valores obtenidos estuvieron basados en la cuantificación absoluta a través de Curva Estándar mediante el uso de DNA control (pool de DNA proveniente de individuos clínicamente sanos).

En la gráfica 2, se muestra la amplificación de la secuencia promotora del gen *EVXI*, donde en ambos grupos de pacientes se observa el mismo comportamiento, es decir la inmunoprecipitación de H3K27me3, es notablemente mayor en contraste de la inmunoprecipitación con H3K27Ac, siendo estas diferencias más evidentes para el caso de *EVXI* comparado con *MEOX2*, no obstante su estrecha relación como genes tipo *HOMEBOX*. A este respecto, observamos cuatro pacientes con valores superiores de 50% con valores máximos de 64% correspondientes a DNA-IPs “H3K27me3”, mientras que para el caso de los DNA-IPs de H3K27Ac los valores máximos muestran 13%.



Gráfica 2. Análisis cuantitativo mediante la amplificación por PCR en tiempo real para la secuencia promotora del gen *EVX1*, en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD. Valores de amplificación representados en porcentaje tomando como referencia de 100% de amplificación a partir del DNA-Input (DNA genómico de cada paciente) es decir DNA sonicado, no-IP por cada paciente. Adicionalmente los valores obtenidos estuvieron basados en la cuantificación absoluta a través de Curva Estándar mediante el uso de DNA control (pool de DNA proveniente de individuos clínicamente sanos).

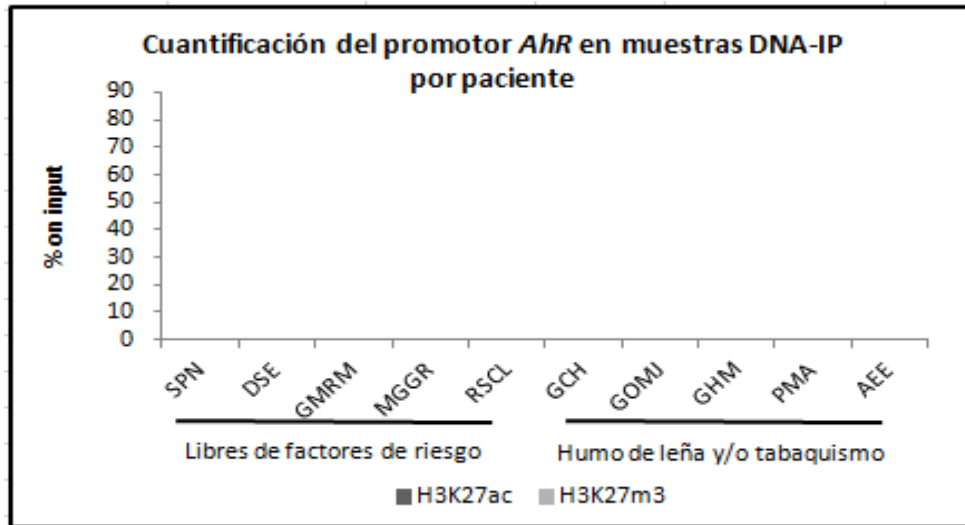
Adicionalmente, se muestra la misma tendencia para los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo del promotor del gen *EVX2*, mostrando que los valores para la inmunoprecipitación de H3K27me3 superan de manera significativa la marca asociada con H3K27Ac, resultando evidente que solo el paciente GOMJ del grupo humo leña posee un valor de hasta 121%, respecto a su propio DNA-Input como se muestra en la Gráfica 3. Llamando la atención que el nivel de amplificación de secuencias promotoras, es menor asociado al código histónico H3K27Ac en ambos grupos de pacientes, con valores menores a 13%, de manera semejante para el caso del gen *EVX1*, miembros de la misma subfamilia tipo *HOMEBOX*.



Gráfica 3. Análisis cuantitativo mediante la amplificación por PCR en tiempo real para la secuencia promotora del gen *EVX2*, en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD. Valores de amplificación representados en porcentaje tomando como referencia de 100% de amplificación a partir del DNA-Input (DNA genómico de cada paciente) es decir DNA sonicado, no-IP por cada paciente. Adicionalmente los valores obtenidos estuvieron basados en la cuantificación absoluta a través de Curva Estándar mediante el uso de DNA control (pool de DNA proveniente de individuos clínicamente sanos).

Por otro lado, contrario a lo anterior el análisis de amplificación cuantitativa sobre la región promotora del gen *AhR*, mostro nula detección y/o cuantificación en ambos grupos de pacientes.

En un primer momento nuestro análisis consideró la obtención de posibles errores metodológicos de amplificación; ya que ninguno de los pacientes mostró amplificación cuantitativa (Gráfica 4). Sin embargo, lo anterior fue descartado, al momento de evidenciar amplificación de *AhR*, sobre las muestras del DNA Input de los pacientes analizados, a través de PCR en tiempo real, lo cual fue confirmado mediante ensayos de electroforesis en geles de agarosa. A este respecto en Figura 5, se observa que no fue posible inmunoprecipitar secuencias promotoras para el gen *AhR*, indicando que no se debió a errores metodológicos de amplificación por PCR en tiempo real, ver figura 4A y 4B, donde se muestra el producto de amplificación de aproximadamente 252pb.



Gráfica 4. Análisis cuantitativo mediante la amplificación por PCR en tiempo real para la secuencia promotora del gen *AhR*, en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD. Valores de amplificación representados en porcentaje tomando como referencia de 100% de amplificación a partir del DNA-Input (DNA genómico de cada paciente) es decir DNA sonicated, no-IP por cada paciente. Adicionalmente los valores obtenidos estuvieron basados en la cuantificación absoluta a través de Curva Estándar mediante el uso de DNA control (pool de DNA proveniente de individuos clínicamente sanos).

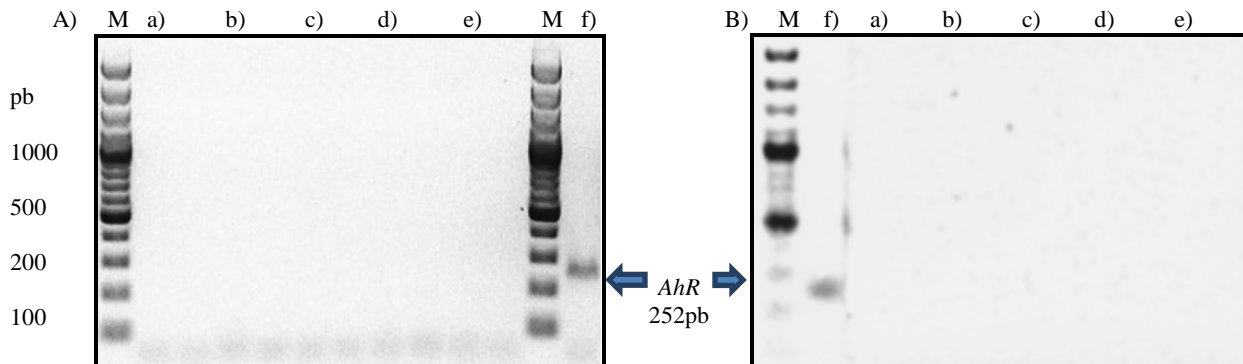
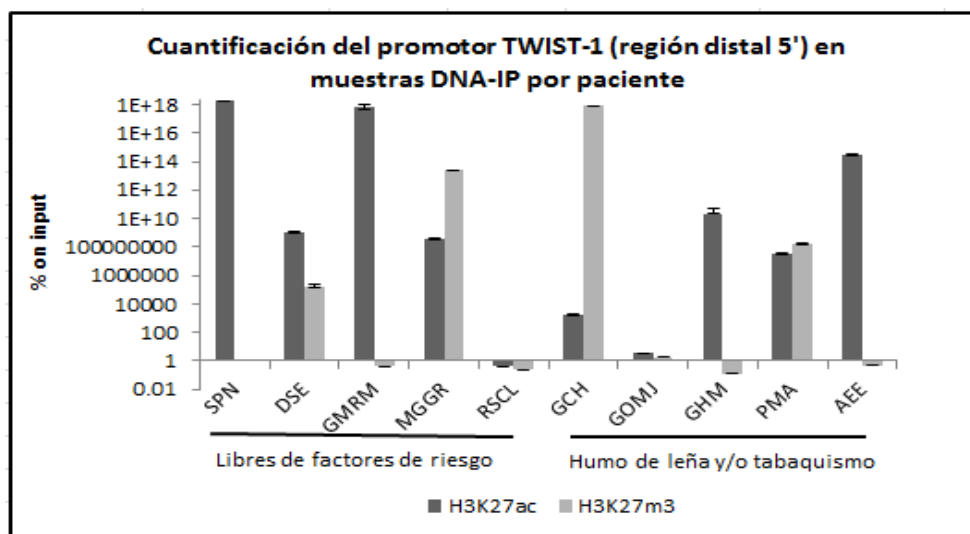


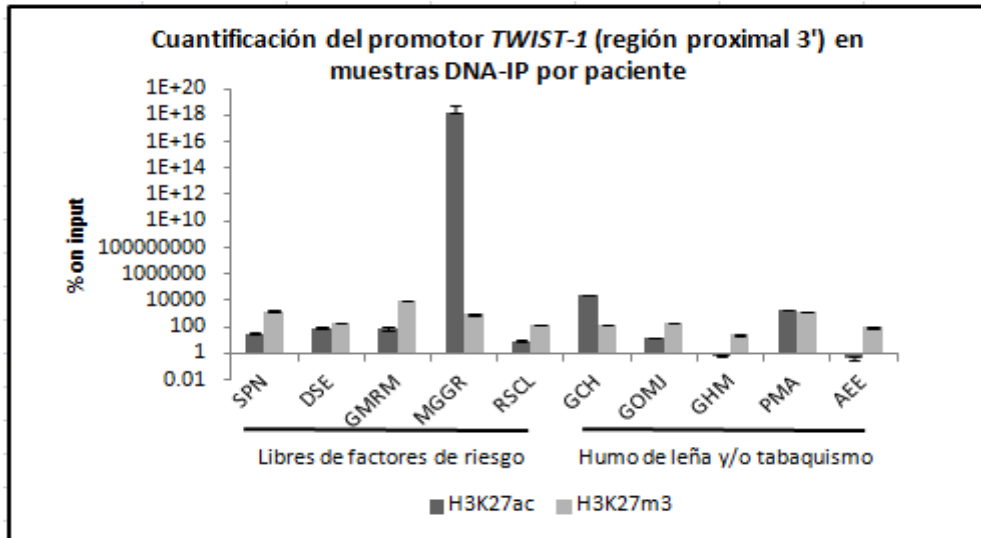
Figura 5. Amplificación por PCR tiempo real de la región promotora del gen *AhR*. Muestras representativas del DNA-IP de pacientes con cáncer pulmonar. **A)** Productos de amplificación por PCR en tiempo real a partir del DNA-IP anti-H3K27Ac, **B)** productos de amplificación por PCR en tiempo real a partir del DNA-IP anti-H3K27me3, se muestra el resultado representativo de 5 pacientes. Carril a) Paciente GCH170209, b) Paciente GOMJ300609, c) Paciente GHM291008, d) Paciente PMA230408, e) Paciente AEE101007, f) INPUT GOMJ 300609. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. La flecha señala el producto de amplificación de la secuencia promotora del gen *AhR* a partir del DNA-InPut de los pacientes señalados.

Por otro lado, para el análisis cuantitativo sobre las secuencias promotoras del gen *TWIST-1*, fueron diseñados 2 juegos de oligonucleótidos, dirigidos el primero sobre la región llamada distal al sitio de inicio de la transcripción (5') y otro sobre la región media o proximal (3'). Los resultados obtenidos para la región distal 5' del promotor permiten observar valores altos en porcentaje de amplificación respecto del DNA Input, en prácticamente todos los pacientes (Gráfica 5), sobresaliendo un código histórico enriquecido para H3K27Ac, destacando su carácter contrario a las tendencias previamente observadas para los genes miembros de las subfamilias de genes HomeoBox, entre ellos *MEOX2*, *EVX1*, *EVX2*.

Mediante el análisis cuantitativo de la región 3', se muestra que el código histórico H3K27Ac también es mayor que H3K27me3, aunque en diferente magnitud que la región 5' (Gráfica 6). Adicionalmente, fue posible identificar que algunos pacientes como MGGR y GCH, poseen un comportamiento contrario al resto de pacientes, es decir un código histórico mayor para H3K27me3, independientemente del grupo de estudio (Gráfica 5 y 6).

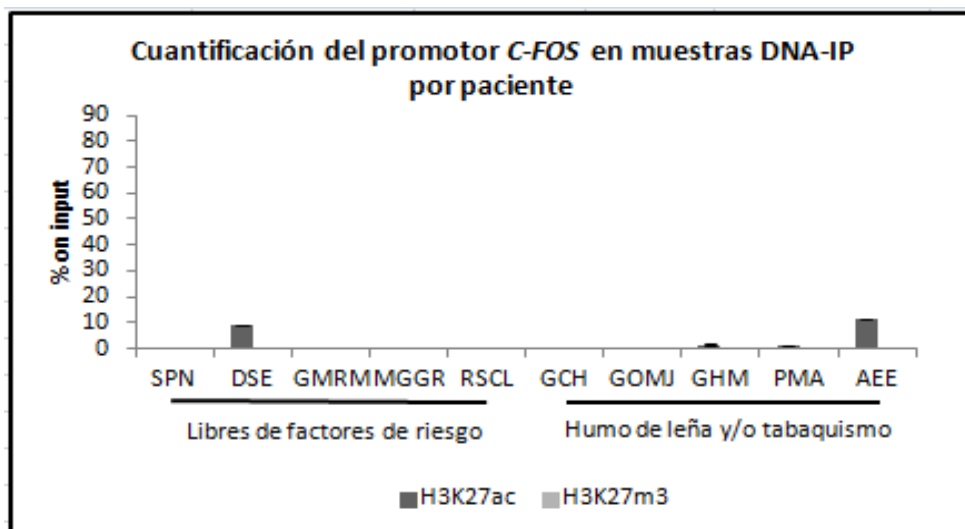


Gráfica 5. Análisis cuantitativo mediante la amplificación por PCR en tiempo real para la secuencia promotora del gen TWIST-1 (región distal 5'), en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD. Valores de amplificación representados en porcentaje tomando como referencia de 100% de amplificación a partir del DNA-Input (DNA genómico de cada paciente) es decir DNA sonicado, no-IP por cada paciente. Adicionalmente los valores obtenidos estuvieron basados en la cuantificación absoluta a través de Curva Estándar mediante el uso de DNA control (pool de DNA proveniente de individuos clínicamente sanos).



Gráfica 6. Análisis cuantitativo mediante la amplificación por PCR en tiempo real para la secuencia promotora del gen *TWIST-1* (región proximal 3'), en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD. Valores de amplificación representados en porcentaje tomando como referencia de 100% de amplificación a partir del DNA-Input (DNA genómico de cada paciente) es decir DNA sonicado, no-IP por cada paciente. Adicionalmente los valores obtenidos estuvieron basados en la cuantificación absoluta a través de Curva Estándar mediante el uso de DNA control (pool de DNA proveniente de individuos clínicamente sanos).

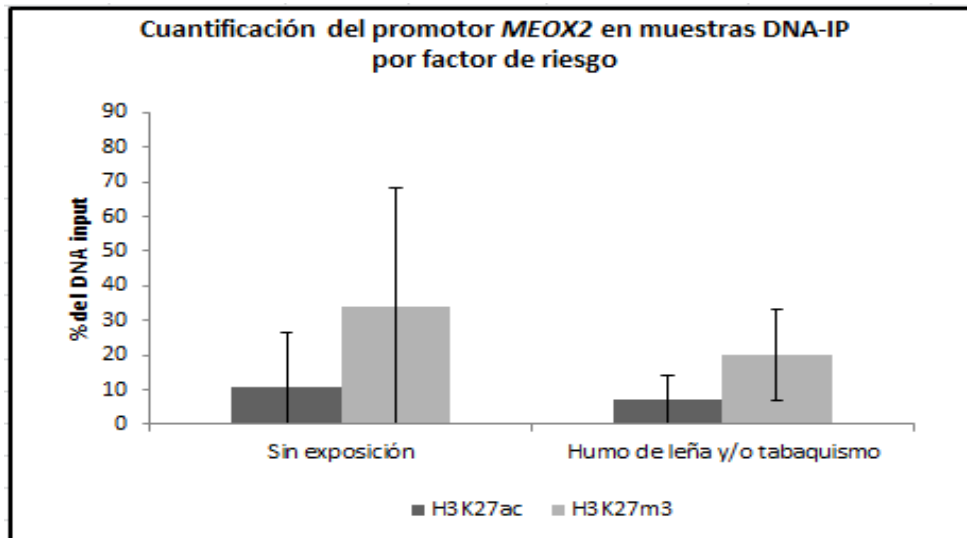
Por otro lado, fue considerado el estudio de otra región promotora fuera de la región 7p21.1, objetivo del presente trabajo, por lo que ensayos realizados sobre la región promotora del gen *C-FOS*, mostraron prácticamente la ausencia de un código histónico H3K27me3, mientras que valores mínimos basales para H3K27Ac. En la Gráfica 7 se muestran valores del DNA-IP para H3K27Ac los cuales no superan el 12%, mientras que el código histónico H3K27me3, es nulo.



Gráfica 7. Análisis cuantitativo mediante la amplificación por PCR en tiempo real para la secuencia promotora del gen *C-FOS*, en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD. Valores de amplificación representados en porcentaje tomando como referencia el 100% de amplificación del DNA-Input (DNA genómico) por paciente, es decir DNA sonicado, no-IP por cada paciente. Adicionalmente los valores obtenidos, estuvieron basados en la cuantificación absoluta a través de Curvas Estándar con el uso de DNA control (pool proveniente de individuos sanos).

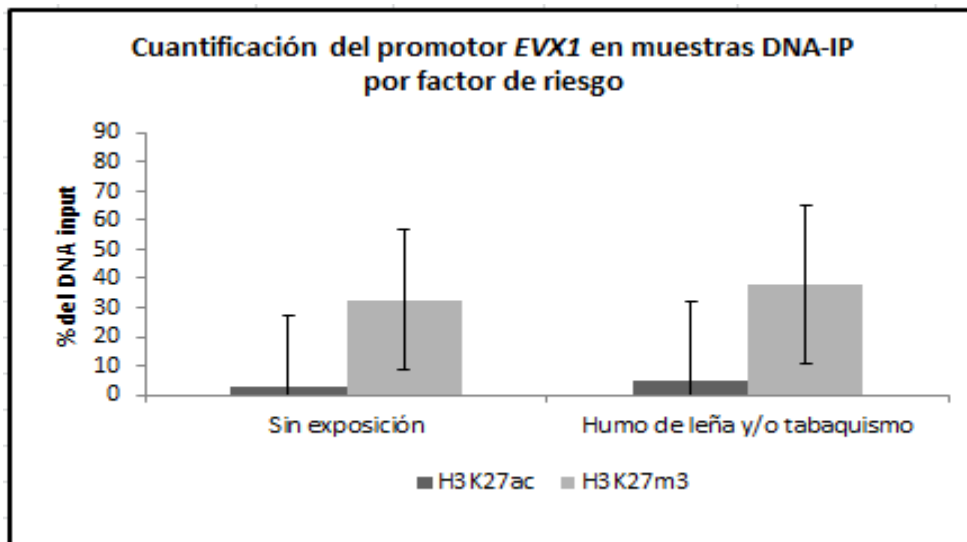
Basado en todo lo anterior, fueron analizados los valores promedio del porcentaje de amplificación a partir del DNA Input, sobre las diferentes secuencias promotoras, agrupados por pacientes en presencia o ausencia de exposición a factores de riesgo.

En la Gráfica 8, se muestran los valores de la amplificación promedio de la región promotora de *MEOX2*, posterior a su inmunoprecipitación, evidenciando que ambos grupos de pacientes poseen un menor código histónico H3K27Ac en interacción con el promotor de *MEOX2*, cuya interacción es mayor con H3K27me3, donde la exposición a humo de leña muestra un porcentaje de 19.9%, en contraste más bajo que pacientes libres de factores de riesgo con 33.8%.



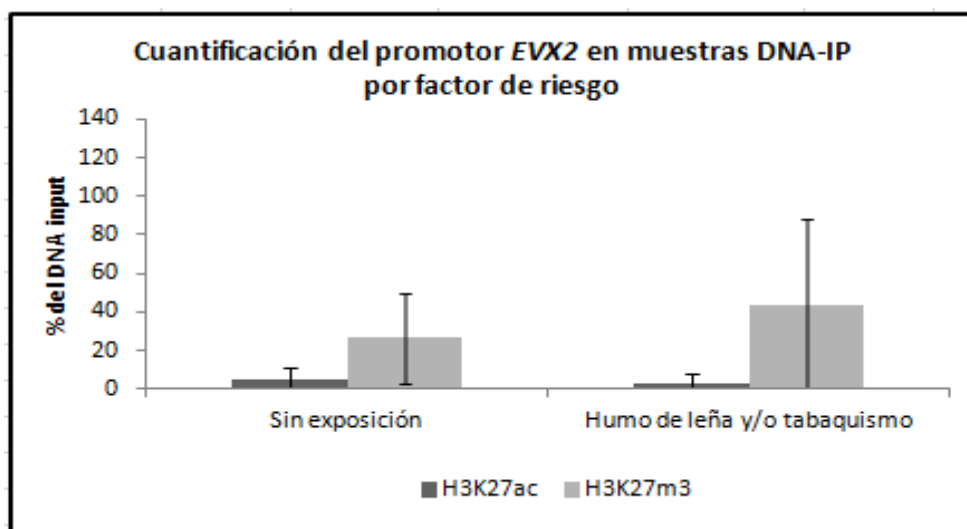
Gráfica 8. Análisis cuantitativo mediante la amplificación por PCR en tiempo real de la secuencia promotora del gen *MEOX2*, en grupos de pacientes libres de exposición y exposición al humo de leña. Valores de amplificación representados tomando como referencia el 100% de amplificación del DNA-Input (DNA genómico) por cada paciente y grupos de pacientes.

Por otra parte en la Gráfica 9, se muestra el análisis del promotor *EVX1*, el cual confirma el comportamiento antes mencionado, donde los porcentajes de amplificación que representan el código histónico H3K27me3 son mayoritarios en ambos grupos de pacientes, con 32.6% y 37.7%, libres y en presencia de factores de riesgo, respectivamente.



Gráfica 9. Análisis cuantitativo mediante la amplificación por PCR en tiempo real de la secuencia promotora del gen *EVX1*, en grupos de pacientes libres de exposición y exposición al humo de leña. Valores de amplificación representados tomando como referencia el 100% de amplificación del DNA-Input (DNA genómico) por cada paciente y grupos de pacientes.

A este respecto, al igual que para el promotor *EVX1* (Gráfica 10), se muestra el análisis del código histónico del promotor del gen *EVX2*, los cuales resultan con el mismo comportamiento, mayoritariamente para H3K27me3, donde el grupo expuesto a humo de leña posee un porcentaje mayor de 43.2%, comparado con el grupo libres de exposición a factores de riesgo con 26.7%; con la misma tendencia observada para el grupo de genes *HOX* relacionados como *EVX2* y *MEOX2*.

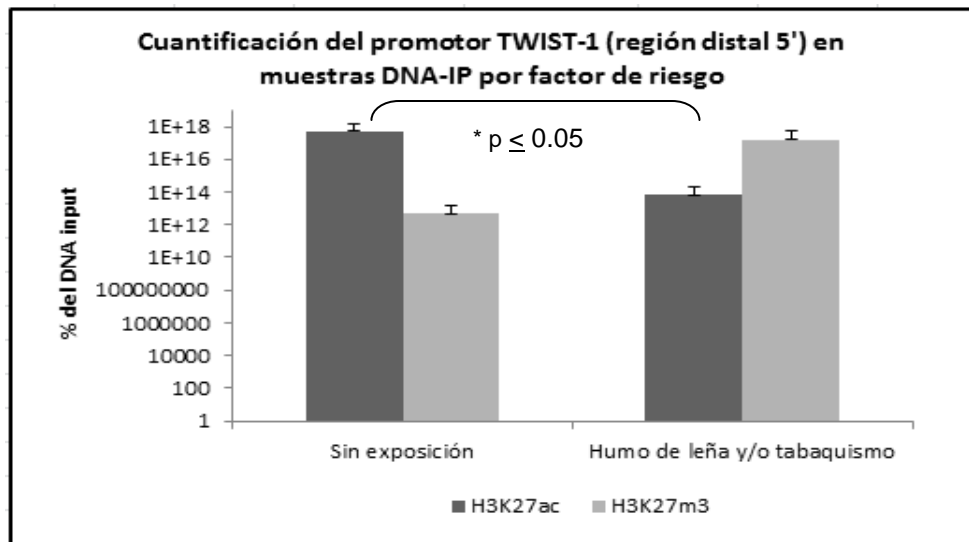


Gráfica 10. Análisis cuantitativo mediante la amplificación por PCR en tiempo real de la secuencia promotora del gen *EVX2*, en grupos de pacientes libres de exposición y exposición al humo de leña. Valores de amplificación representados tomando como referencia el 100% de amplificación del DNA-Input (DNA genómico) por cada paciente y grupos de pacientes.

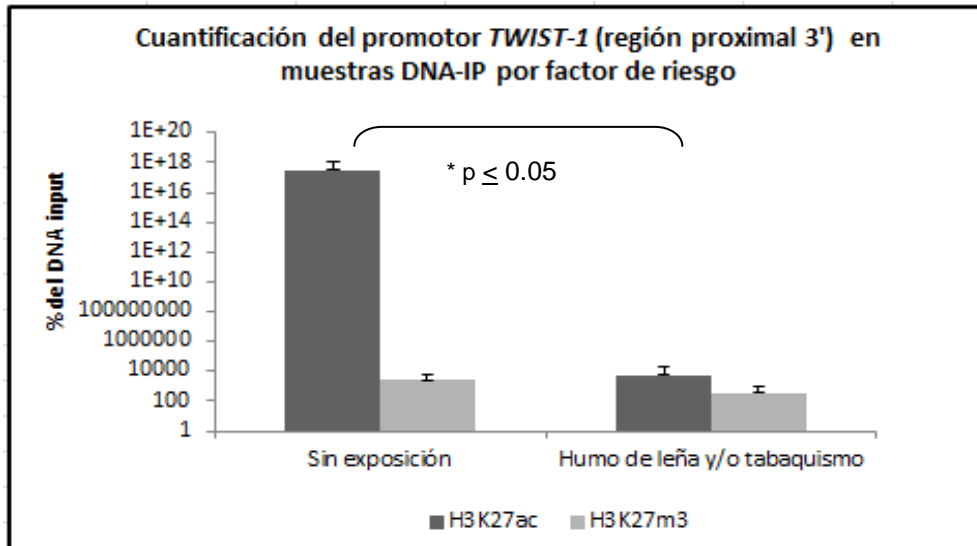
En contraste los resultados obtenidos para el caso de secuencias promotoras del gen *TWIST-1*, demuestra que la región distal 5' poseen un código histónico en promedio mayoritario para H3K27Ac en pacientes libres de factores de riesgo, mientras que mayoritario para H3K27me3 en pacientes con exposición a humo de leña (Gráfica 11). No obstante, la tendencia de H3K27Ac (Gráfica 11) parece deberse al comportamiento del paciente MGGR, el cual posee un valor muy elevado en comparación a los demás pacientes del grupo (ver Gráfica 6).

Adicional a ello, el análisis cuantitativo de la región proximal 3' del gen *TWIST-1* muestra que prevalece el código histónico H3K27Ac para ambos grupos de pacientes (Gráfica 12). Adicional a todo lo anterior, es importante mencionar que los valores en porcentaje de

amplificación respecto de los valores Input, del promotor de *TWIST-1* en ambas regiones distal y proximal, son extremadamente altos sugiriendo que el gen *TWIST-1* se encuentra sobre-regulado a nivel epigenético de manera preponderante en la cromatina por el código histónico H3K27Ac, principalmente en la región 3' cercana al sitio de inicio de la transcripción en ambos grupos de pacientes.

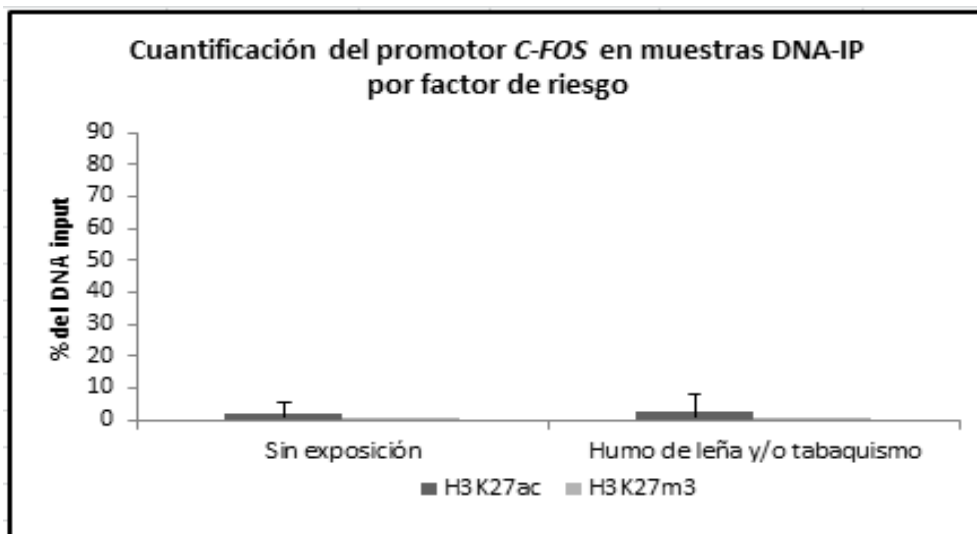


Gráfica 11. Análisis cuantitativo mediante la amplificación por PCR en tiempo real de la secuencia promotora distal (5') del gen *TWIST-1*, en grupos de pacientes libres de exposición y exposición a humo de leña. Valores de amplificación representados tomando como referencia el 100% de amplificación del DNA-Input (DNA genómico) por cada paciente y grupos de pacientes. *Análisis estadístico $p \leq 0.05$.



Gráfica 12. Análisis cuantitativo mediante la amplificación por PCR en tiempo real de la secuencia promotora proximal (3') del gen *TWIST-1*, en grupos de pacientes libres de exposición y exposición a humo de leña. Valores de amplificación representados tomando como referencia el 100% de amplificación del DNA-Input (DNA genómico) por cada paciente y grupos de pacientes. *Análisis estadístico $p \leq 0.05$.

Por otro lado, el análisis del promotor *C-FOS*, mostró que a pesar de poseer un código histónico favorecido para H3K27Ac, dicho código está poco representado para ambos grupos de pacientes, comparado con el análisis de los genes arriba descritos en este trabajo, por lo que, este gen probablemente es regulado a través de otro mecanismo epigenético de control o código histónico (Gráfica 13).



Gráfica 13. Análisis cuantitativo mediante la amplificación por PCR en tiempo real de la secuencia promotora del gen *C-FOS*, en grupos de pacientes libres de exposición y exposición al humo de leña. Valores de amplificación representados tomando como referencia el 100% de amplificación del DNA-Input (DNA genómico) por cada paciente y grupos de pacientes.

7 DISCUSIÓN

7.1 H3K27m3 COMO HERRAMIENTA PRONÓSTICO DE CÁNCER PULMONAR EN GENES HOX

La detección de niveles alto de metilación (hipermetilación) del DNA es considerado una herramienta prometedora de diagnóstico vs pronóstico en cáncer, debido a la frecuencia con la que eventos aberrantes de metilación están presentes en el desarrollo de neoplasias malignas, ocurriendo desde etapas tempranas del proceso de tumorigénesis, en distintos tipos de cáncer y modelos específicos de hipermetilación (Gal-Yam, *et al* 2008). Diversos datos indican que las múltiples islas CpG dentro de las secuencias promotoras de los genes *HOX* y cercanos a genes *HOMEBOX* relacionados son blancos frecuentes de metilación en cáncer y en particular cáncer pulmonar (Rauch *et al.*, 2007). Así mismo, se han descrito la presencia de marcas de acetilación Vs metilación de histonas, asociados con valor pronóstico en pacientes (Seligson *et al.*, 2005).

Durante la embriogénesis y organogénesis, los genes *HOX* realizan funciones de proliferación y diferenciación celular. Al respecto, se ha propuesto que diversos mecanismos del desarrollo embrionario se manifiestan nuevamente en tejido adulto favoreciendo el desarrollo de ciertos tipos de cáncer. Lo anterior, en razón que ambos procesos del desarrollo involucran cambios en el balance entre proliferación celular y diferenciación. Por lo que, ha resultado una constante biológica encontrar que diversos genes de la familia *HOX*, muestren perfiles de expresión aberrantes en una variedad de tumores malignos, incluyendo el pulmonar (Chen y Saraswati, 2003).

En condiciones de normalidad fisiológica en tejido adulto los genes *HOX* mantienen silenciada su expresión, atribuido principalmente a los complejos de represión transcripcional llamados grupo Polycomb (PcG), a través de PCR2 (Complejo Represivo Polycomb 2), el cual media la metilación en la histona H3 lisina 27. A este complejo lo comprenden de forma destacada tres proteínas principales EZH2, EED y SUZ12. Respecto de EZH2, la cual contiene un dominio con actividad de metiltransferasa de histona

(HMTase), funciona como subunidad catalítica de PRC2 (Shen X *et al.*, 2008), llevando a cabo la metilación en el residuo H3K27, capaz de participar en el silenciamiento transcripcional de genes HOX (Kouzarides, 2007).

En células neoplásicas, la presencia del complejo PRC2 conlleva al reclutamiento de las DNA metiltransferasas, destacando la metilación *de novo* del DNA. Dichas evidencias sugieren que el tumor posee mecanismos específicos de metilación, sugiriendo eventos de re-programación epigenética, lo cual en condiciones de normalidad fisiológica mantendrá su mecanismo de represión sobre genes de carácter embrionario (Schlesinger *et al.*, 2006).

Adicionalmente, un consenso teórico concibe que un perfil de heterocromatina silente involucra la presencia de niveles bajos de acetilación, mientras que niveles elevados de metilación en los residuos H3K27 de histonas (Kouzarides, 2007). En el presente trabajo la amplificación de los promotores de los genes EVX1, EVX2, MEOX2, mostraron la presencia frecuente de metilación en la lisina 27 de la histona 3 (H3K27), por lo que nuestros resultados sugieren que PRC2 mantiene su posible influencia como mecanismo represor de la transcripción. Aunado a que dicho estado de activación de la cromatina, responde a niveles de hipermetilación en las secuencias promotoras, como mencionan Gal-Yam, y *Cols.*, (2008) cuyos promotores silenciados por hipermetilación del DNA están generalmente asociados a modificaciones de histonas como la hipoacetilación en residuos de lisinas en ambas histonas H3 y H4; así como hipermetilación de H3K9 o H3K27, que median la formación de una estructura de la cromatina represora.

Lo anterior, responde a la relación funcional entre metilación del DNA y modificaciones de histonas, mediada por proteínas de unión al DNA metilado (Methyl-CpG-binding domain proteins, MBD) capaces de reclutar a complejos desacetilasas de histonas y metiltransferasas de histonas (Klose y Bird, 2006).

Al respecto Schlesinger y *Cols.*, en 2006, demostraron que la modificación de histonas se encuentra específicamente asociada con metilación de islas CpG en células tumorales de cáncer de colon, además afirman que un alto porcentaje de genes metilados del cáncer están

pre-marcados con H3K27 además de otros componentes del grupo Polycomb. Dichas marcas epigenéticas son también altamente específicas, por lo que, el mismo gen no parece ser selectivamente asociado a otra modificación de histonas represiva. Por lo que, además es posible que el sistema EZH2 contribuya a su vez hacia la metilación *de novo* en los mismos segmentos genéticos de neoplasias malignas (McGarvey *et al.*, 2006). Finalmente, tales estudios indican que los genes regulados epigenéticamente mediante la participación del grupo Polycomb representan el principal patrón de metilación del DNA en cáncer. De manera similar, la metilación de novo puede ser disparada por un incremento en los componentes PRC2, como rasgo común en distintos tipos de neoplasias malignas (Schlesinger *et al.*, 2007).

No obstante, nuestros hallazgos sugieren que los genes HOX relacionados (MEOX2 y EVX1) localizados en la región citogenética 7p21.1 y 7p15.3, respectivamente, poseen preferentemente un código histónico H3K27me3, preponderante sin embargo ambos genes, superan dicho código histónico sobreexpresando perfiles del RNAm, comparado con tejido pulmonar histológicamente normal (Ávila Moreno *et al.*, 2012).

7.2 EXPRESIÓN DE TWIST-1 EN CÁNCER PULMONAR DEBIDO A LA MARCA H3K27Ac

Actualmente se ha determinado que el código histónico H3K27Ac y H3K27me3 mantienen perfiles dinámicos antagónicos y complementarios durante los procesos del desarrollo embrionario. Mientras que, H3K27Ac está presente en altos niveles durante etapas tempranas del desarrollo embrionario, estos niveles decrecen al mismo tiempo que incrementa H3K27me3, en etapas posteriores del desarrollo. Al respecto también se ha demostrado que el complejo de proteínas activadoras de la cromatina llamadas Trithorax (TRX), también son requeridas para mantener niveles normales de H3K27Ac, sugiriendo que la función de anti-silenciamiento guiado por TRX depende de la capacidad de potenciar y/o mantener niveles de acetilación en H3K27 (Tie *et al.*, 2009).

En el caso de los genes *HOX*, estos han mostrado que mantienen una marca de trimetilación en H3K27, lo cual está directamente relacionado con metilación del DNA en la región promotora, debido a la participación de los componentes PRC2. A este respecto, nuestros datos indican respecto a TWIST-1, porcentajes elevados de acetilación de H3K27, proporcionalmente rebasando la detección cuantitativa del propio DNA genómico endógeno (Input) (Gráfica 11 y 12).

La marca H3K27Ac indica activación de la transcripción, lo cual en TWIST-1 es notablemente elevada como se observa, lo cual permite explicar o sugiere elevada expresión de TWIST-1 en tejido pulmonar neoplásico, lo cual es congruente con diversos estudios que revelan su participación como potenciados de la invasión y metástasis, cuyo evento es frecuente en pacientes con cáncer pulmonar (HUI *et al.*, 2009).

Una probable explicación a dicho comportamiento se debe a que TWIST es capaz de unirse a dominios (2) HAT (acetiltransferasa de histonas) independientes, p300 y p300/CBP- asociado al factor PCAF (proteína asociada a 300/CBP), regulando de forma directa su actividad HAT, ya que se conoce que p300 y PCAF preferencialmente acetilan a histonas H3 y H4 (Hamamori *et al.*, 1999). Por otro lado, P300 y CBP en su papel de coactivadores de la actividad HAT pertenecientes al grupo Trithorax (TrxG), funcionan como antagonistas del silenciamiento realizado por el grupo PcG (Tie *et al.*, 2009).

Respecto a P300 y CBP poseen dominios comunes y funciones colectivas (p300/CBP), expresan y regulan un amplio espectro de actividades biológicas como diferenciación celular, control del ciclo celular, apoptosis y tumorigenesis. P300/CBP, son reclutadas hacia promotores específicos capaces de reclutar segundos activadores transcripcionales como PCAF, como MyoD, NF- κ B, GATA-1 y p53, cuyas funciones son críticas para llevar a cabo funciones biológicas fundamentales para la célula tumoral. Al respecto, se ha demostrado, que TWIST interactúa con el dominio HAT y es capaz de inhibir la actividad acetiltransferasa de p300 y PCAF, lo cual genera reducción general en la acetilación de histonas en el genoma (Hamamori *et al.*, 1999).

Lo anterior explica, en parte los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que al disminuir la presencia de H3K27Ac, H3K27me3 está presente en los genes blanco de PcG. Así mismo, reportes previos sugieren que las modificaciones de histonas están asociados de forma crítica con diversos elementos de reclutamiento en Trans de la transcripción (Wang *et al.*, 2008).

7.3 RIESGO DE CÁNCER PULMONAR RELACIONADO A FACTORES DE RIESGO, Y EL PAPEL DE *AhR* COMO MEDIADOR

Aunque el humo de tabaco está considerado el mayor agente inductor del cáncer pulmonar, otros factores pueden desarrollar dicha patogénesis. En países en desarrollo, la exposición a humo de leña y otros combustibles sólidos son utilizados para cocinar y calentar alimentos (Delgado *et al.*, 2005).

A este respecto, los resultados obtenidos indican aumento cuantitativo en los porcentajes del código histónico H3K27me3 para la región promotora de los genes *EVX1* y *EVX2*, en pacientes con exposición a factores de riesgo, mientras que en menor proporción para la región promotora de *MEOX2*, además de mayor presencia de H3k27me3 en el grupo de pacientes libres de factores de riesgo, posiblemente debido a su alta presencia en un par de pacientes (GMRM y MGGR). No obstante un análisis detallado, muestra que las cuantificaciones de pacientes con factores de riesgo son constantes y mayores comparado al grupo de pacientes libres de factores de riesgo.

Por otro lado, la inmunoprecipitación del código histónico H3K27 en la región promotora del gen *TWIST-1*, posee niveles muy altos (comportamiento exponencial) en ambos grupos de pacientes, sugiriendo que su regulación no depende totalmente de su relación a factores de riesgo ambiental.

Probablemente indicando que las personas expuestas a humo de leña poseen incremento al riesgo por desarrollar cáncer pulmonar, y mayor actividad metastásica comparado de aquellos pacientes libres de exposición a dicho factor de riesgo. Lo anterior, plantea un

especial interés en el género femenino, debido a su alta exposición a dichos agentes volátiles durante su actividad en el hogar. Al respecto, un estudio realizado con 11,640 individuos de tres continentes confirmó la asociación entre el uso de carbón empleado durante la actividad de cocción en el hogar y el riesgo al desarrollo de cáncer pulmonar, lo que provee evidencia epidemiológica respecto del uso de leña relacionado con el incremento de padecer cáncer pulmonar (Hosgood *et al.*, 2010).

Adicionalmente, datos portados por Delgado y Cols., (2005), mostró que la incidencia de cáncer pulmonar es mayor en mujeres, comparado con hombres, así mismo un alto porcentaje de cáncer pulmonar fue asociado con la exposición a humo de leña, en comparación al porcentaje asociado con humo de tabaco en mujeres.

Debido a lo anterior, la IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer) (2010), ha concluido que las emisiones de la combustión de carbón son potentes pro-carcinogénicos para humanos, por lo que su uso y asociación evaluado en siete estudios epidemiológicos, ha sido incluido dentro de las ponderaciones que ha establecido el Consorcio Internacional para el Estudio del Cáncer Pulmonar (ILCCO) (Hosgood *et al.*, 2010).

Basado en lo anterior, logra razonablemente lógico pensar que por tal motivo, el gen *AhR* tendría una participación importante, ya que este participa como mediador en la respuesta a compuestos xenobióticos liberados durante la combustión de leña, como el benzo[a]pireno. Por el contrario, nuestros resultados demuestran que el gen *AhR*, no se encuentra regulado por el código histónico H3K27 en pacientes con cáncer pulmonar. A este respecto, tales hallazgos son semejantes a los indicados por Cauchi y Cols. (2001), quienes mediante el estudio de polimorfismos genéticos para la región promotora del gen *AhR*, demostró cierta susceptibilidad al cáncer pulmonar para el gen *CYP1A1*, mediante el análisis de casos-contrroles en población francesa. Encontrando 2 polimorfismos y una variante alélica para el gen *AhR*, concluyendo que ninguno de estos, está involucrado en la susceptibilidad a desarrollar cáncer pulmonar debido a la expresión de *CYP1A1*. Adicional a ello, Mimura y Cols., (1999), han mencionado que esto podría deberse a la inhibición de *AhR* por el represor *Ahr* (*AhRR*), en el cual la activación de *AhR*, mediada por xenobióticos induce la

expresión del gen *AhRR* a través de la unión a XRE (elemento de respuesta a xenobióticos), como un complejo heterodimerico con *ARNT*. La inducción de *AhRR* podría inhibir, la función *AhR* por competencia con éste por la actividad de unión entre *ARNT* (receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos) y XRE, no obstante ello no explica la falta de un código histónico H3K27. Por otra parte, podría pensarse que este gen está siendo regulado por otro código histónico, ya que Cui y cols. (2009) reportaron que en hígado de ratón existen altos niveles de H3K4me2(marca de activación) en ausencia de la señal represora H3K27me3, este último mostrando un bajo enriquecimiento con respecto al locus génico de *AhR*, en contraste al enriquecimiento de la marca H3K4me2. De manera que esto incrementa la expresión de mRNA de *AhR*, por lo que concluyen que la marca H3K4me2 es la encargada de regular la expresión de *AhR* en hígado de ratón. Se conoce que en tejido pulmonar de ratones, *AhR* tiene una expresión enriquecida muy parecida a la de hígado, por lo que podría estar regulado de manera similar que en hígado por H3K4me2.

Caso similar es el visto en *C-Fos* en el que no se encontró una asociación con el código histónico estudiado en este proyecto, pero en la literatura se ha relacionado la expresión de dicho gen con la acetilación de la histona 4 (H4Ac) en tejido como el hipocampo de rata (Dyrvig *et al.*, 2012). Posiblemente este gen se regule por un código histónico distinto, lo que se ajusta a lo encontrado en este trabajo, donde H3K27 no está asociado a este gen.

8 CONCLUSIONES

- Se comprobó que *MEOX2*, *EVX1* y *EVX2* están alterados transcripcionalmente bajo perfiles de tri-metilación en la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3).
- Debido a la marca H3K27me3 y posiblemente la metilación de secuencias promotoras en los genes *MEOX2*, *EVX1* y *EVX2*, pueden ser blancos génicos potenciales a nivel pronóstico en el desarrollo y comportamiento de las neoplasias pulmonares asociadas con la exposición a factores de riesgo en pacientes.
- *TWIST-1* mostró estar regulado transcripcionalmente mediante la acetilación mayoritaria en la lisina 27 de la histona 3 (H3K27Ac), en pacientes con cáncer pulmonar, independientemente de su exposición a factores de riesgo.
- La marca H3K27Ac que muestra *TWIST-1*, podría explicar el aumento sostenido en la capacidad invasión y metástasis implicada en el diagnóstico-pronóstico de pacientes con adenocarcinomas pulmonar.
- *AhR* no amplificó en las muestras de DNA-IP a partir del uso de los anticuerpos dirigidos en contra de H3K27me3 y H3K27Ac, lo cual sugiere que dicho código histónico no posee un papel de regulación epigenético en las neoplasias pulmonares.
- Los factores de riesgo ambientales como el humo de leña promueven de forma importante alteraciones a nivel transcripcional tanto en genes *HOX* relacionados como otros genes asociados a la región 7p21.1, asociada con el desarrollo del cáncer pulmonar.
- La regulación epigenética de *TWIST-1*, pareciera no estar relacionada con la exposición a factores de riesgo ambientales, ya que fue posible detectar un código histónico enriquecido para ambos H3K27Ac como H3K27me3, en ambos pacientes, tanto en presencia y ausencia de factores de riesgo ambiental, como el humo de leña y tabaco.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez MA. (2010). **Epigenómica en la progresión de carcinomas pulmonares: búsqueda de marcadores tempranos y tardíos regulados por hipermetilación asociado a factores de riesgo.** Tesis de posgrado. UNAM-INER.
2. Armas López L. (2011). **Identificación de los blancos génicos, asociados al factor transcripcional mesenchyme homeobox 2 (MEOX2) en cáncer de pulmón.** Tesis de Maestría. IPN.
3. Ávila-Moreno F, Armas López L, Álvarez Moran AM, Limón Rivas DA, López Bujanda Z, Gómez Ibarra S, Hidalgo Miranda A, Piña Sánchez P, Ortiz Quintero B, Urrea Ramírez F, Rivera Rosales RM, Vázquez Manríquez E, Peña Mirabal E, Morales Gómez J, Vázquez Minero C, Téllez Becerra JL, Ávalos Bracho A, Guzmán de Alba E, Santillán Doherty P, Zúñiga Ramos J. (2012). **Lack Correlation Between High Frequency Copy Number Variation and DNA Promoter Sequence Methylation are Exceed by Histone Code Modifying Controlling the Expression of Probably New Tumor Markers at Subtelomeric Region 7p21.1, in Lung Cancer Patients.** Mol Cancer 2012. Enviado.
4. Balsara BR, Testa JR. (2002). **Chromosomal imbalances in human lung cancer.** Oncogene 2002;21:6877-6883.
5. Baylin SB, Jones PA. (2007) **Epigenetic determinants of cancer.** En: Allis CD, Junuwein MT, Rinberg D, Editors. Epigenetics. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2007;457-475.
6. Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. (2003). **EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer.** EMBO J 2003;22:5323-35.
7. Breuer RH, Snijders PJ, Smit EF, et al. (2004). **Increased expression of the EZH2 polycomb group gene in BMI-1- positive neoplastic cells during bronchial carcinogenesis.** Neoplasia 2004;6:736-43.
8. Cantile M., Schiavo G., Terraciano L. y Cillo C. (2007). **The HOX Gene Network as a Potencial Target of Cancer Therapy.** Current Cancer Therapy Reviews, 2007, Vol. 3, No. 1.
9. Cauchi S., Stücker I., Solas C., Laurent- P. P., Cénéé S., Hémon D., Jacquet M., Kremers P., Beaune P., Massaad-M. L. (2001). **Polymorphism of human aryl hydrocarbon receptor (AhR) gene in a French population: relationship with CYP1A1 inducibility and lung cancer.** Carcinogenesis vol.22 no.11 pp.1819-1824.

10. Cerecedo- Zapata CM., Limón R. D., Gonzaga P. R., Serrano- Ramírez R., Álvarez M. A., Téllez B. LJ., Ávila- Moreno F. (2009). **Oncología clínica, genómica y epigenómica en cáncer broncogénico, Parte 1.** Rev. Inst. Nac. Enf. Resp. Mex. Vol 22- Numero 3. 217-229.
11. Cerecedo- Zapata CM., Limón R. D., Gonzaga P. R., Serrano- Ramírez R., Álvarez M. A., Téllez B. LJ., Ávila- Moreno F. (2009). **Oncología clínica, genómica y epigenómica en cáncer broncogénico, Parte 2.** Rev. Inst. Nac. Enf. Resp. Mex. Vol 22- Numero 4. 316-327.
12. Chen H. y Sukumar S. (2003). **HOX Genes Emerging Stars in Cancer.** Landes Bioscience. Cancer Biology & Therapy 2:5, 524-525.
13. Cillo C., Cantile M., Faiella A., Boncinelli E. (2001). **Homeobox Genes in Normal and Malignant Cells.** JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY 188:161-169 (2001).
14. Cortese R., Hartmann O., Berlin K., Eckhardt F. (2008). **Correlative gene expression and DNA methylation profiling in lung development nominate new biomarkers in lung cancer.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 40 (2008) 1494–1508.
15. Creyghtona P.M., Chenga A. W., Welsteda G. G., Kooistrac T., Careya B. W., Steinea E. J., Hannaa J., Lodatoa M. A., Framptona G.M., Sharpd P. A., Boyere L.A., Younga R. A. and Jaenisch R. (2010). **Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state.** PNAS. Vol. 107 | no. 50 | 21931–21936.
16. Cuenca-López M.D., Becerra J., Muñoz C. R., Navarro F.A. (2007). **Encuentros en la biología.** Depto. Biología Molecular y Biquímica, Facultad de Ciencias, 29071 Málaga. nº 115.
17. Cui Y, Yeager R, Zhong X y Klaassen C. (2009). **Ontogenic expression of hepatic Ahr mRNA is associated with histone H3K4 di-methylation during mouse liver development.** Toxicology Letters 189 (2009) 184–190.
18. Delgado J., Martinez L., Sánchez T., Ramírez A., Iturria C., Gónzales-A G. (2005). **Lung Cancer Pathogenesis Associated With Wood Smoke Exposure.** DOI 10.1378/chest. 128.1.124. pp 124-131.
19. Delgado V. M.D. (2009). **Modificaciones de la cromatina, regulación génica y cáncer.** REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA. Farmacia 11 28004 Madrid. Spain. <http://www.ranf.com>.

20. Dertinger S.D., Nazarenko D.A., Silverstone A.E., y Gasiewicz T.A. (2001). **Aryl hydrocarbon receptor signaling plays a significant role in mediating benzo.** *Carcinogenesis*, 22. Pp 171-177.
21. Dyrvig M, Hansen H, Christiansen S, Woldbye D, Mikkelsen D y Lichota J. (2012). **Epigenetic regulation of Arc and c-Fos in the hippocampus after acute electroconvulsive stimulation in the rat.** *Brain Research Bulletin* 88 (2012) 507–513.
22. Eckert M.A, Lwin T.M., Chang A.T., Kim J., Danis E., Ohno-Machado L., Yang J. (2011). **Twist1-Induced Invasiveness Promotes Tumor Metastasis.** *Cancer Cell* 19, 372–386, March 15, 2011 ©2011 Elsevier Inc.
23. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. (2001). **A gen hypermethylation profile of human cancer.** *Cancer Res* 61:3225-9.
24. Esteller M. (2006). **The necessity of a human epigenome project.** *Carcinogenesis* 2006;27:1121-1125.
25. Gal-Yam Einav Nili, Saito Yoshimasa, Egger Gerda, and Peter A. Jones. (2008). **Cancer Epigenetics: Modifications, Screening, and Therapy.** *The Annual Review of Medicine*. *Annu. Rev. Med.* 2008.59:267-280.
26. Hamamori Y., Sartorelli V., Ogryzko V., Puri P., Wu H-Y., Wang J., Nakatani Y. Kedes L. (1999). **Regulation of Histone Acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH Protein Twist and Adenoviral Oncoprotein E1A.** *CELL Volume 96, Issue 3, 5 February 1999, 405–413.*
27. Hanahan D. y Weinberg R. A. (2000). **The Hallmarks of cancer.** *Cell*. Vol. 100, 57-70.
28. Hanahan D. y Weinberg R.A. (2011). **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011. Mar 04, 144: (55) : 646–74.
29. Hernández P. O., Marrero A. y Rodríguez P. JC. (2006). **¿Qué son los genes Hox? Su importancia en la enfermedad vascular y renal.** *Nefrología*. Vol. 26. Num. 2.
30. Hosgood H.D., Boffetta P., Greenland S., Lee Y. C., McLaughlin J., Seow A., Duell E.J., Andrew A.S., Zaridze D., Szeszenia-Dabrowska N., Rudnai P., Lissowska J., Fabiánová E., Mates D, Bencko V., Foretova L., Janout V., Morgenstern H., Rothman N., Hung R. J., Brennan P., Lan Q. (2010). **In-home coal and wood use and lung cancer risk: a pooled analysis of the International Lung Cancer Consortium.** *Int J Cancer*. Dec;118(12):1743-7. Epub 2010 Sep 15.

31. HUI L., LIU B., ZHAO L., ZHANG S., ZHOU B., QIU X., CUI Z. (2009). **High Expression of Twist Is Positively Correlated with the Differentiation of Lung Cancer.** *Chin J Lung Cancer*, April 2009, Vol.12, No.4: 294-299.
32. Hussain M, Rao M, Humphries AE, Hong JA, Liu F, Yang M, Caragacianu D, Schrupp DS. (2009). **Tobacco Smoke Induces Polycomb-Mediated Repression of Dickkopf-1 in Lung Cancer Cells.** *Cancer Res.* 2009 Apr 15;69(8):3570-8.
33. Jenuweina T., G. Laiblea, R. D. y Reuterb G. (1998). **SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin.** *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 54, 80–93.
34. Jenuweina T. y Allis D. C. (2001). **Translating the histone code.** *Science.* Vol. 293.
35. Ji M., Guan H., Shi B., Hou P. (2011). **Concomitant hypermethylation of multiple genes in non-small cell lung cancer (NSCLC).** *FOLIA HISTOCHEMICA ET CYTOBIOLOGICA.* Vol. 49, No. 1, 2011. pp. 132–141.
36. Jones P.A. (2000). **DNA methylation and cancer.** *Oncogenes* 21, 5358-5360. Nature Publishing Group.
37. Jones P. A. y Baylin S. B. (2007). **The epigenomics of cancer.** *Cell.* 128, 682- 692, Elsevier Inc.
38. Klose, R. J., y Bird, A. P. (2006) **Genomic DNA methylation: the mark and its mediators.** *Trends Biochem Sci* 31, 89-97.
39. Kondo Y., Shen L., Cheng A., Ahmed S., Bumber Y., Charo C., Yamochi T., Urano T., Furukawa K., Kwabi- Addo B., Gold B., Sekido Y., Huang T., Issa JP. (2008). **Gene silencing in cancer by H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation.** *Nature Genetics* 40-741- 750.
40. Kouzarides T. (2007). **Chromatin modifications and their function.** *Cell* 128, 693-705.
41. Kuo MH y Allis CD. (1999). **In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein: DNA associations in a chromatin environment.** *Methods.* 19 (3):425-33.
42. Lee J. H., Park W. Y., Jeong S. M., Lee M. K., Kim Y. D., Shin D. H., Lee C. H. (2010). **Relationship between the Endogenous Hypoxic Markers Hypoxia Inducible Factor-1, Carbonic Anhydrase IX, and Epithelial Mesenchymal Transition Regulator TWIST Expression in Non-small Cell Lung Cancer.** *The Korean Journal of Pathology* 2010; 44: 469-76.

43. Lee JS, Pathak S, Hopwood V, Tomasovic B, Mullins TD, Baker FL, Spitzer G, Neidhart JA. (1987). **Involvement of chromosome 7 in primary lung tumor and nonmalignant normal lung tissue.** *Cancer Res* 47:6349-6352, 1987.
44. Lewis E. B. (1978). **A gene complex controlling segmentation in Drosophila.** *Nature* 276:565±570.
45. Martínez E., Marcos M., Dominguez MA., Arias F., Villafranco E., Dueñas M. T. **Marcadores tumorales circulantes con valor pronóstico.** *Anales del Sistema Sanitario de Navarra.* 24(S1): 53-62. Consultado en línea, 15 de octubre de 2012. www.cfnavarra.es.
46. McGarvey, K.M. *et al.* (2006). **Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state.** *Cancer Res.* 66,3541–3549.
47. Mimura J., Ema M., Sogawa K. Fujii-KY. (1999). **Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function.** *Genes Dev.,* 13, 20-25.
48. Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, et al. (2007). **A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing.** *Nat Genet* 2007;39:237–42.
49. Rauch T., Wang Z., Zhan X., Zhong X., Wu X., Lau K. S., Kernstine H. K., Riggs A. D., and Gerd P. P. (2007). **Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay.** *PNAS.* Vol. 104, no. 13. 5527-5532.
50. Rauch TA, Zhong X, Wu X., Wang, M., Kernstine, K. H., Wang, Z., Riggs, A. D., Pfeifer, G. P. et al. (2008). **High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:252–257.
51. Reynolds PA, Sigaroudinia M, Zardo G, et al. (2006). **Tumor suppressor p16INK4A regulates polycomb-mediated DNA hypermethylation in human mammary epithelial cells.** *J Biol Chem* 2006;281:24790–802.
52. Reish- Filho JS., Carrilho C., Valenti C., Lertáo D., Ribeiro SG., Schmitt FC. (2000). **Is TTF1 a good immunohistochemical marker to distinguish primary form metastatic lung adenocarcinomas?.** *Pathol Res Pract,* 196 (12): 835-40.
53. Ríos H. M.A y Hernández M. M. (2001). **LOS GENES SUPRESORES DE TUMORES Y EL CÁNCER.** Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. *Rev Cubana Oncol* 2001;17(1):65-71.

54. Ruiz A. J. y Villegas P. R. (2007). **Terapia epigenética en el cáncer**. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía; Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, España.
55. Sánchez-Céspedes M. y Rosell E.S. (2005). **CÁNCER DE PULMÓN**. Curso de la ESO en español. Auditorio Centro Nacional de Investigación Oncológicas (CNIO). Melchor Fernández Almagro, 328029 Madrid.
56. Schlesinger Y., Straussman R., Keshet I., Farkash S., Hecht M., Zimmerman J., Eden E., Yakhini Z., Ben-Shushan E., Reubinoff B.E, Bergman Y., Simon I. y Howard Cedar. (2007). **Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer**. *Nature Genetics*. Vol. 31. No. 2. 232-236.
57. Schones D. E. y Zhao K. (2008). **Genome-Wide Approaches to Studying Chromatin Modifications**. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 9. 179- 191.
58. Seligson, D. B., Horvath, S., Shi, T., Yu, H., Tze, S., Grunstein, M., y Kurdistani, S. K. (2005). **Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence**. *Nature* **435**, 1262-1266.
59. Shen X., Liu Y., Hsu Y.J., Fujiwara Y., Kim J., Mao X., Yuan G.C., y Orkin S.H. (2008). **EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency**. Published as: *Mol Cell*. 2008 November 21; 32(4): 491–502.
60. Shimizu Y., Nakatsuru Y., Ichinose M., Takahashi Y., Kume H., Mimura J., Fujii-Kuriyama Y. y Ishikawa T. (2000). **Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor**. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 97. Pp 779-782.
61. Stizaker C, Song JZ, Davidson B, Clark SJ. (2004). **Transcriptional gene silencing promotes DNA hypermethylation through a sequential change in chromatin modifications in cancer cells**. *Cancer Res* 2004; 64:3871-3877.
62. Stransky N., Vallot C., Reyal F., Bernard-Pierrot I., Gil Diez de Medina., Segreaves R., Yann de Rycke., Elvin P., Cassidy A., Spraggon C., Graham A., Southgate J., Asselain B., Allory Y., Abbou CC., Albertson DG., Thiery JP., Chopin DK., Pinke Dl., Radvanyi F. (2006). **Regional copy number-independent deregulation of transcription in cancer**. *Nature Genetics* - 38, 1386 – 1396.
63. Sun S., Schiller J.H. and Gazdar F.A. (2007). **Lung cancer in never smokers a different disease**. *Nature Reviews Cancer*, Volumen 7. University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA. Pág. 778-790.

64. Tie F., Banerjee R., Stratton C., Prasad-Sinha J., Stepanik V., Zlobin A., Diaz M., Scacheri P., Harte P. (2009). **CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes *Drosophila* Polycomb silencing.** *Development* 136. doi:10.1242/dev.037127, 3131-3141.
65. Ting AH, McGarvey KM, Baylin SB. (2006). **The cancer epigenoma-components and functional correlates.** *Genes Dev* 2006; 20:3215-3227.
66. Valdespino V., Valdespino C. P. (2008). **Mecanismos epigenéticos celulares y sus alteraciones en cáncer.** GAMO Vol. 7 Núm. 3, mayo – junio 2008: 80-92. México, D.F.
67. Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J. A., Schones, D., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Peng, W., Zhang, M. Q. et al. (2008). **Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome.** *Nat. Genet.* 40, 897-903.
68. Weir BA, Woo MS, Getz G, et al. (2007). **Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma.** *Nature.* 2007;450:893-898.
69. Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). **Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis.** *Cell* 117, 927–939.
70. Yatabe Y., Mitsudomi T., Takahashi T. (2002). **TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas.** *American Journal of Surgical Pathology: Volume 26 - Issue 6 - pp 767-773.*
71. Zinn R, Pruitt K, Eguchi S, Baylin S, Herman J. (2007). **hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site.** *Cancer Res* 67: 194–201.