



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala



**IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES SUPRESORES DE TUMOR SORBS3  
Y PDLIM2 COMO NUEVOS BLANCOS EPIGENÉTICOS EN PACIENTES  
CON CÁNCER PULMONAR.**

Que para obtener el título de Licenciado en Biología

**PRESENTA:**

**Daniel Moreno Blas**

**Director de tesis:**

**Dr. Federico Ávila Moreno**

**Unidad de Biomedicina (UBIMED) Laboratorio 12**

Tesis realizada bajo el financiamiento del proyecto (UNAM) DGAPA-PAPIIT: IB202512.

Así como el desarrollo de los proyectos *B09-08*, *B21-08* y *B18-12*

(Dirección de Investigación, INER).



Los Reyes Iztacala, Edo. de México, Octubre de 2013.



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



---

---

## Director de Tesis

**Dr. Federico Ávila Moreno**

## Asesores de Tesis

**Dr. Luis Ignacio Terrazas**

**Dra. Yolanda Irasema Chirino López**

**Dr. Carlos Pérez Plasencia**

**Dr. Santiago Martínez Calvillo**

## Sinodales

**Presidente:**

**Dr. Luis Ignacio Terrazas**

**Vocal:**

**Dra. Yolanda Irasema Chirino López**

**Secretario**

**Dr. Federico Ávila Moreno**

**Suplente:**

**Dr. Carlos Pérez Plasencia**

**Suplente:**

**Dr. Santiago Martínez Calvillo**

*«Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto  
y pensar lo que nadie ha pensado todavía»*

**Albert Szent-Györgyi.**

# *Dedicatoria*

A mis padres Javier y Gloria que siempre han estado a mi lado y cuyo amor y apoyo no tienen límites. Por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Por los valores que me han inculcado y sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir. A mis hermanos Javier, Omar y Yessica por estar siempre presentes, acompañándome.

# *Agradecimientos*

A mis queridos amigos: Mayte, Abraham, Jacky, Liz, Marbella, Joana, Manlio, Carlos, Eduardo Dávalos, Zeidee, Eduardo Loya y Jasso, quienes me acompañaron en esta grandiosa práctica de campo que fue nuestra carrera, llenándola de vivencias que nunca olvidaré. Con ustedes viví una de las aventuras más increíbles que he tenido; ustedes me enseñaron como sobrevivir en el D.F., nuevas rutas en los micros y me mostraron varios lugares de su ciudad. Además, nos formamos juntos como biólogos, aprendiendo en las aulas buenas prácticas de laboratorio (Ácido sulfúrico, uso de autoclave y preparación de infusiones complejas de *Cymbopogon citratus*), así como un buen manejo de algunos modelos biológicos (*Drosophila melanogaster* y ratas Wistar).

Al grupo de investigación: Oscar, Mijail, Ana, Ernesto, Fernando, quienes se convirtieron rápidamente en excelentes amigos y con quienes compartí además de conocimiento un sinfín de alegrías en el laboratorio. A Leonel y a Carlos quienes emplearon varias horas de su tiempo en explicarnos las técnicas del laboratorio.

También quisiera expresar mi reconocimiento y mi gratitud a mi tutor el Dr. Federico Ávila Moreno por su apoyo, por compartir su conocimiento y por su guía durante el desarrollo de mi tesis ¿Qué haría un estudiante sin su tutor?

A Nalleli por ser una parte muy importante de mi vida, por encontrar la manera de alegrarme en los días que no me salía ningún experimento y por soportar aquellos días que me quedaba en el laboratorio hasta muy noche terminando mis experimentos. Por ser una excelente niña.

## ÍNDICE

<b>Resumen.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>10</b>
1.1. Cáncer.....	10
1.2. Características ( <i>Hallmarks</i> ) del cáncer.....	10
1.2.1. Autosuficiencia en señales de crecimiento.....	10
1.2.2. Evasión de señales de anti-crecimiento.....	11
1.2.3. Evasión de la apoptosis.....	11
1.2.4. Potencial replicativo ilimitado.....	12
1.2.5. Inducción de angiogénesis.....	12
1.2.6. Invasión de tejido y metástasis.....	13
1.2.7. Evasión del sistema inmune.....	14
1.2.8. Reprogramación del metabolismo energético.....	14
1.2.9. Inestabilidad genómica (cromosómica) y mutación.....	14
1.2.10. Inflamación.....	15
1.3. Epigenética y cáncer.....	15
1.3.1. Remodelación de la cromatina en cáncer.....	16
1.3.2. Modificación al código de histonas en cáncer.....	17
1.3.3. Metilación del DNA en cáncer.....	18
1.4. Cáncer de pulmón.....	18
1.5. Genes supresores de tumor en cáncer pulmonar.....	19
1.6. Búsqueda de nuevos genes supresores de tumor regulados epigenéticamente.....	20
1.7. SORBS3 y su regulación epigenética en cáncer.....	21
1.8. PDLIM2 y su regulación epigenética en cáncer.....	22

<b>2. Planteamiento del problema.....</b>	<b>23</b>
<b>3. Justificación.....</b>	<b>23</b>
<b>4. Hipótesis.....</b>	<b>24</b>
<b>5. Objetivos.....</b>	<b>25</b>
5.1. Objetivo general.....	25
5.2. Objetivos particulares.....	25
<b>6. Estrategia experimental.....</b>	<b>26</b>
<b>7. Materiales y métodos.....</b>	<b>27</b>
7.1. Obtención de muestras.....	27
7.2. Tratamiento de líneas celulares con 5'-aza-2'-deoxycitidina (5'-aza-dC) y Trichostatin A (TSA).....	27
7.3. Aislamiento de DNA y RNA.....	28
7.4. Transformación de DNA con bisulfito de sodio.....	28
7.5. Oligonucleótidos usados para PCR específica de metilación (MSP).....	29
7.6. PCR específica de metilación (MSP).....	29
7.7. Electroforesis.....	30
7.8. Síntesis de cDNA.....	30
7.9. Oligonucleótidos usados para expresión de mRNA en PCR tiempo real (qPCR).....	30
7.10. PCR tiempo real (qPCR) para análisis de expresión de mRNA.....	31
7.11. Análisis estadístico.....	31
<b>8. Resultados.....</b>	<b>32</b>
8.1. Disminución en la expresión del mRNA de los genes supresores de tumor SORBS3 y PDLIM2 en modelos celulares de cáncer pulmonar.....	32
8.2. La disminución de la expresión de SORBS3 y PDLIM2 en modelos celulares tipo adenocarcinoma pulmonar, es dependiente del silenciamiento	



epigenético mediado por metilación del DNA y acetilación de histonas.....	33
8.3. La represión epigenética en modelos celulares de cáncer pulmonar, correlaciona con pérdida de la expresión de mRNA de SORBS3 y PDLIM2 en carcinomas sólidos pulmonares derivados de pacientes.....	48
8.4. La represión epigenética de SORBS3 y PDLIM2 en pacientes con cáncer pulmonar es independiente de la exposición a factores de riesgo (humo de leña).....	50
<b>9. Discusión.....</b>	<b>54</b>
<b>10. Conclusiones.....</b>	<b>61</b>
<b>11. Perspectivas.....</b>	<b>62</b>
<b>12. Literatura citada.....</b>	<b>64</b>

## Resumen

El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por neoplasias malignas a nivel mundial. Diversas aberraciones a nivel genético se encuentran asociadas al desarrollo del cáncer, no obstante la presencia de modificaciones epigenéticas como patrones de metilación aberrante del DNA y modificaciones del código histónico son capaces de afectar la remodelación de la cromatina en diversos tipos de cáncer.

Nuestro grupo de investigación, mediante ensayos de hibridación genómica comparativa (CGH), para el estudio global del epigenoma en cáncer pulmonar, ha logrado identificar patrones de hipermetilación en regiones citogenéticas que contienen probables genes supresores de tumor, recientemente descritos. Permaneciendo desconocidos datos que confirmen tales aberraciones epigenéticas en cáncer pulmonar, tanto en modelos celulares in vitro como en tumores sólidos, asociado con datos clínicos de los pacientes. Por lo que, el presente trabajo analizó la correlación entre metilación del DNA y remodelación de la cromatina sobre la expresión del mRNA de SORBS3 y PDLIM2 en modelos celulares como en muestras de pacientes con cáncer pulmonar, mediante el uso del agente desmetilante (5'-aza-dC) e inhibidor de desacetilasas de histonas (TSA). Así mismo ensayos de PCR específica de metilación (MSP) y PCR en tiempo real fueron realizados. Confirmando que el silenciamiento epigenético de SORBS3 y PDLIM2 a nivel del mRNA, tanto en modelos celulares de cáncer pulmonar, de pacientes de origen caucásico y pacientes de origen mestizo mexicano; Así como, en tumores sólidos pulmonares del tipo adenocarcinoma, se deben al mecanismo de metilación del DNA, en sinergia de mecanismos de acetilación de histonas. En conclusión, los resultados demuestran que los genes supresores de tumor SORBS3 y PDLIM2, constituyen potenciales candidatos a marcadores epigenéticos para ser analizados durante la progresión neoplásica de tumores de origen epitelial, como es el cáncer pulmonar, como un evento temprano y/o tardío en cáncer pulmonar.

**Palabras claves:** Regulación epigenética, Gen Supresor de Tumor, Cáncer Pulmonar, SORBS3, PDLIM2.

## **1. Introducción**

### **1.1. Cáncer**

El cáncer es un sistema biológico complejo (Hanash, 2004) que comprende alteraciones a distintos niveles, tanto genético, epigenético, de regulación transcripcional y traducción de proteínas. Así como, a nivel de interacciones moleculares en vías de señalización (interactómica), mismas que involucran diferentes vías metabólicas (metabolómica). Tales alteraciones proveen a las células un conjunto de capacidades adquiridas durante las distintas etapas de la transformación neoplásica.

Al respecto Hanahan y Weinberg en el año 2000 y más reciente en 2011, han clasificado 10 propiedades de identidad molecular (*"Hallmarks of cancer"* por sus siglas en inglés) adquiridas y compartidas durante el desarrollo de la mayoría de los tipos del cáncer, en humanos. Al respecto, se enuncian las propiedades de identidad molecular del cáncer, tales como: (1) Mantenimiento de señalización proliferativa, (2) Evasión a mecanismos supresores de crecimiento, (3) Evasión de la apoptosis, (4) Potencial replicativo ilimitado, (5) Inducción de angiogénesis, (6) Invasión a tejidos vecinos y metástasis, (7) Evasión del sistema inmune, (8) Reprogramación del metabolismo energético, (9) Inestabilidad genómica e (10) Inflamación (Hanahan & Weinberg, 2011).

### **1.2. Características (*Hallmarks*) del Cáncer**

#### **1.2.1. Autosuficiencia en Señales de Crecimiento**

En condiciones de normalidad fisiológica las células requieren de señales de crecimiento que permitan transitar de un estado quiescente o de proliferación controlada hacia un estado proliferativo aberrante. Tales señales de crecimiento incluyen la participación de factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular y moléculas de adhesión/interacción célula-célula necesarias para la transmisión celular mediada por distintos tipos de receptores trans-membranales. Sin embargo, las células neoplásicas adquieren la capacidad de crecimiento y proliferación dependiente de sus propias señales de crecimiento, reduciendo así

su dependencia de estimulación mediada por el microambiente del estroma que lo rodea.

Para lograr dicha autonomía, la célula tumoral emplea distintas estrategias que incluyen la sobre-expresión de receptores a factores de crecimiento, confiriendo capacidad de hiper-respuesta a factores de crecimiento, sobre-expresión de factores de crecimiento y alteración de vías de señalización (Hanahan & Weinberg, 2000; Witsh *et al.*, 2010).

### **1.2.2. Evasión de Señales de Anti-crecimiento**

En tejido histológicamente normal, señales antiproliferativas operan para mantener la quiescencia celular y la homeostasis tisular. Existen dos tipos de señales antiproliferativas: inhibidores de crecimiento solubles e inhibidores inmovilizados (embebidos en la matriz extracelular y superficie de membrana celular del estroma). Tales señales son recibidas por medio de receptores trans-membranales que desencadenan cascadas de señalización.

Las señales antiproliferativas ejercen su acción al entrar a estado quiescente celular (Fase G0) y/o promoviendo -manteniendo- un estado de diferenciación celular. En respuesta a ello, las células tumorales inactivan o eliminan receptores a moléculas anti-crecimiento. Además de apagar la expresión de integrinas y moléculas de adhesión encargadas de enviar señales de anti-proliferación (Hanahan & Weinberg, 2000).

### **1.2.3. Evasión de la Apoptosis**

Alteraciones en el balance entre proliferación y apoptosis pueden conducir al desarrollo del cáncer. Por lo que, mecanismos intrínsecos de autodestrucción basados en la muerte celular programada o apoptosis adquieren relevancia fundamental (Igney & Krammer, 2002). La apoptosis puede ser iniciada por medio de receptores de muerte sobre la superficie celular (vía extrínseca) y la otra es mediada por la mitocondria (vía intrínseca). En ambas vías se activan las caspasas las cuales degradan los sustratos celulares y esto da lugar a cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis (Igney & Krammer,

2002; Cotter, 2009). Sin embargo, los tumores logran proliferar evadiendo la apoptosis mediante la sobre-expresión de moléculas anti-apoptóticas, entre ellos, miembros de la familia BCL2 (BCL2, BCL-XL, MCL1), FLIP, receptores solubles para ligandos de muerte (CD95, DcR3) e inhibidores de proteínas apoptóticas, entre ellas, Survivina, cIAP2, y ML-IAP. Además, de inactivar genes pro-apoptóticos como BAX y APAF1 (Igney & Krammer, 2002).

#### **1.2.4. Potencial Replicativo Ilimitado**

Toda célula en condiciones de normalidad histo-fisiológica posee un número limitado de divisiones celulares, en el rango de 60-70, una vez alcanzado este número la célula detiene el ciclo celular, entrando a un estado de senescencia y muere (muerte celular programada) (Igney & Krammer, 2002). De esta manera, la proliferación excesiva de un tejido normal es controlada. Este número finito de divisiones está determinado por la longitud de telómeros, dichas estructuras constituyen secuencias repetidas de 6 pares de bases localizadas al final de los cromosomas. Dichos telómeros se acortan entre cada ciclo celular -perdiendo entre 50 a 100 pb del DNA telomérico- debido a la incapacidad de la enzima DNA polimerasa para complementar la replicación del extremo 3' de los cromosomas durante cada fase S del ciclo celular (Blasco, 2005). Cuando la longitud de los telómeros alcanzan cierto límite, los sensores de daño al DNA son activados y detienen el ciclo celular o desvían los procesos celulares hacia el proceso de apoptosis (Igney & Krammer, 2002). Mientras que, en células tumorales la longitud de telómeros permanece intacta debido a la sobre-expresión y activación de la telomerasa (Stewart & Weinberg, 2006), cuya enzima es capaz de reconstruir los telómeros entre cada fase de replicación del ciclo celular (Blasco, 2005).

#### **1.2.5. Inducción de Angiogénesis**

Así como en tejido histológicamente normal, los tumores requieren de nutrientes y oxígeno, además de habilidad para excretar residuos metabólicos y dióxido de carbono (Bergers & Benjamin, 2003).

Para lograr esto, los tumores inducen angiogénesis, incrementando la expresión de activadores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Otros tumores pueden inactivar o inhibir la expresión de proteínas inhibitoras de angiogénesis como trombospondina-1, entre otras moléculas conocidas como “estatinas” donde se incluyen angiostatina, endostatina, canstatina y tumstatina; capaces de combinar ambas estrategias que permitan inducir angiogénesis necesario para el desarrollo tumoral (Bergers & Benjamin, 2003).

#### **1.2.6. Invasión y Metástasis**

El continuo incremento de la masa tumoral provoca la ruptura de la lámina basal (invasión de la matriz extracelular) y movilidad de células tumorales hacia vasos sanguíneos resultado del proceso de angiogénesis tumoral. En su conjunto contribuyen a la invasión de tejidos adyacentes y generación de nuevos nichos neoplásicos a distancia en el huésped asegurando nutrientes y espacios ilimitados (Bierie *et al.*, 2006; Albini & Sporn, 2007).

Entre otras estrategias, que utilizan las células tumorales para adquirir esta capacidad conocida como invasión y metástasis, ocurre a través de cambios en la expresión de moléculas involucradas en la adhesión célula-célula o adhesión célula-matriz extracelular. Como ejemplo, destaca la inactivación del sistema E-cadherina,  $\beta$ -catenina o CAMs por medio de alteraciones genéticas, represión transcripcional, o proteólisis del dominio de E-Cadherina extracelular, representando mecanismos recurrentes en diferentes tipos de cáncer. Adicional a ello, tiene lugar la inhibición de integrinas como moléculas de adhesión célula-matriz extracelular (Berx & van Roy, 2009).

Adicionalmente, participan la expresión de genes que codifican para proteasas e inactivación de genes inhibidores de proteasas. Las proteasas son proteínas que degradan la matriz extracelular. Al respecto, las células tumorales también pueden abrirse paso a través de vasos sanguíneos y capas de células epiteliales normales

contribuyendo a la capacidad invasiva de células tumorales sobre diferentes estructuras histológicas (Kalluri, 2003).

#### **1.2.7. Evasión del Sistema Inmune**

Evidencias experimentales han demostrado que deficiencias en el desarrollo o función de linfocitos T (LT) citotóxicos CD8, células T de ayuda CD4 o células NK (*Natural Killers*) favorecen la aparición del tumor, adicionalmente se ha demostrado que ratones inmunodeficientes de células T y células NK poseen mayor susceptibilidad al desarrollo de cáncer (Teng *et al.*, 2008).

Las células tumorales pueden evadir a los mecanismos de la respuesta inmune antitumoral, como ejemplo, las células tumorales evitan la infiltración de LT citotóxicos y células NK, mediante la producción de un ambiente inmuno-supresor conducido por TGF- $\beta$  entre otros factores inmunosupresores (Yang *et al.*, 2010).

#### **1.2.8. Reprogramación del Metabolismo Energético**

La proliferación descontrolada de las células neoplásicas requiere de ajustes en su metabolismo energético con la finalidad de aportar el combustible necesario para mantener la división y el crecimiento celular. En los tumores se observa un incremento en la tasa de captación de glucosa, la cuál es procesada en piruvato vía glucólisis aerobia, para que posteriormente dicho piruvato sea transformado en lactato, compuesto que ofrece múltiples ventajas al microambiente tumoral como disminución del pH extracelular, activación de proteasas capaces de degradar la matriz extracelular promoviendo el proceso de metástasis, remodelación del citoesqueleto, evasión de la apoptosis, etc. (Bradley *et al.*, 2011).

#### **1.2.9. Inestabilidad Genómica (Cromosómica) y Mutación**

La selección de los mecanismos de identidad molecular o características “*Hallmarks*” del cáncer, depende en gran medida del tipo y cantidad de alteraciones en el genoma de las células neoplásicas. En este sentido, la desregulación de la maquinaria de reparación del DNA en células tumorales, provoca aumento en la tasa de mutaciones espontaneas durante cada ciclo de

replicación. Determinadas mutaciones confieren una ventaja selectiva de células neoplásicas, permitiendo la proliferación descontrolada y la dominancia del tejido neoplásico (Hanahan & Weinberg, 2011).

#### **1.2.10. Inflamación**

Los procesos de inflamación contribuyen a la selección de múltiples marcas moleculares del cáncer, suministrando moléculas bioactivas al microambiente del tumor, incluyendo factores que mantienen la señalización proliferativa, factores de supervivencia que limitan la muerte celular, factores pro-angiogénicos, enzimas modificadoras de la matriz extracelular que facilitan la angiogénesis, invasión y metástasis (Coussens & Werb, 2002).

Adicional a ello, en algunos casos la inflamación se presenta en estadios tempranos de la progresión neoplásica, participando de manera activa en los procesos de transformación y desarrollo neoplásico de tumores sólidos como el pulmonar (Qian & Pollard, 2010).

### **1.3. Epigenética y Cáncer**

Bajo el contexto de los procesos de selección de los mecanismos moleculares del cáncer propuestos por Hanahan y Weinberg (2000 y 2011), resulta importante destacar que, para lograr dichas características, se ha propuesto que las células tumorales cuentan con tres mecanismos principales de inactivación de genes supresores de crecimiento: **(1)** Ganancia/perdida de información genética, **(2)** Mutación del material genético y **(3)** Alteración (perdida) de los patrones de balance epigenético (Markl *et al.*, 2001). Por esta razón, cambios en los patrones epigenéticos en células tumorales han sido objeto de amplias investigaciones con resultados prometedores para el desarrollo de estrategias alternativas de tratamiento en contra del cáncer. El campo de la biología enfocado al estudio de los mecanismos de regulación transcripcional conocido como epigenética, ha permitido el avance en el conocimiento de los patrones moleculares-epigenéticos heredables responsables del control de la transcripción, que no involucran cambios en la secuencia lineal del DNA (Portela & Esteller, 2010). En este sentido,



al menos 3 mecanismos pueden ser reconocidos como principales responsables de la regulación epigenética, tales como: *i)* Remodelación de la estructura de la cromatina, *ii)* Modificaciones químicas covalentes en colas de histonas y *iii)* Patrones de metilación del DNA (Portela & Esteller, 2010; Timp & Feinberg, 2013; Muers, 2013).

Tales mecanismos son capaces de alterar el índice transcripcional y el silenciamiento genético; así como mecanismos de reparación y replicación del DNA; además de orquestar señales necesarias para la progresión del ciclo celular y mantenimiento de la estructura de secuencias teloméricas (Gonzalo, 2010).

### **1.3.1 Remodelación de la Cromatina en Cáncer**

La estructura de la cromatina es regulada generalmente por dos grupos de complejos, entre ellos destacan aquellos capaces de modificar covalentemente las colas de histonas y aquellos encargados de remodelar la estructura de los nucleosomas, bajo mecanismos ATP-dependientes (Wilson & Roberts, 2011). Ambos mecanismos cooperan de forma eficiente para regular de forma transitoria la estructura de la cromatina desempeñando un papel esencial en el control de la expresión genética. Sin embargo, en diferentes tipos de cáncer se ha reportado una alta frecuencia de mutaciones, deleciones o silenciamiento de la expresión de factores remodeladores de la cromatina, tales como: ARID1A, ARID1B, ARID2, CHD1, CHD5, PBRM1, ATRX, DAXX, SMARCD1, SNF5 y BRG1 (Wong *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2008; Wu, 2012; Timp & Feinberg, 2013), lo cual puede generar un estado de “inestabilidad epigenética” debido a alteraciones en la estructura de la cromatina, afectando índices de expresión del RNAm y perturbando la programación del control del ciclo y diferenciación celular. Tales cambios de índole epigenética, sólo pueden ser comparables con trastornos generados por la inestabilidad cromosómica a nivel genómico, contribuyendo de forma selectiva al desarrollo y establecimiento de las neoplasias malignas (Wilson & Roberts, 2011).

### **1.3.2 Modificación al Código de Histonas en Cáncer**

Las histonas juegan un papel fundamental como parte de los mecanismos de regulación epigenética. Al respecto, las modificaciones químicas covalentes de las histonas, tienen lugar en la unidad mínima funcional de organización de la cromatina constituida por el nucleosoma, integrado de aproximadamente 148pb de DNA enrollado 1.7 vueltas alrededor de un octámero de histonas, el cual se compone de 2 subunidades de cada histona H2A, H2B, H3 y H4 (Luger *et al.*, 2012).

En este sentido las modificaciones químicas covalentes ocurren en el extremo N-terminal no-estructurado o colas de histonas, que se extienden fuera del núcleo del octámero histónico. Al respecto, las modificaciones potenciales de histonas incluyen acetilación, metilación, fosforilación, ADP-ribosilación, ubiquitinación, sumoilación y biotilación (Portela & Esteller, 2010). Ocurriendo la mayoría de estas modificaciones en los residuos de lisina, arginina y serina. En este sentido, la alteración más prominente en las colas de histonas en células tumorales resulta en la pérdida de acetilación, cuya acción es mediada por enzimas Desacetilasas de Histonas (HDACs) (Rius & Lyko, 2012).

A este respecto y con relación al estado transcripcional, el genoma humano puede dividirse en eucromatina, la cual se encuentra activa transcripcionalmente y heterocromatina inactiva transcripcionalmente. La eucromatina está caracterizada por altos niveles de acetilación y tri-metilación en las colas de histonas H3K4, H3K36 y H3K79 favoreciendo estructuras laxas de la cromatina, mientras que la heterocromatina está caracterizada por bajos niveles de acetilación y altos niveles de metilación en H3K9, H3K27 y H4K20 provocando una cromatina altamente compacta que impide la unión de factores de transcripción a su sitio blanco y por consiguiente reprimiendo a nivel transcripcional la expresión génica (Minucci & Giuseppe, 2006; Ellis *et al.*, 2009; Cedar & Bergman, 2009). Siendo, uno de los mecanismos epigenéticos usados por las células tumorales para inactivar transcripcionalmente a genes supresores de tumor, evitando el proceso de tumorigenesis (Portela & Esteller, 2010).

### **1.3.3 Metilación del DNA en Cáncer**

La metilación del DNA es la modificación epigenética mejor conocida, desempeñando en parte el control de la expresión genética (Issa & Kantarjian, 2009). Dicha modificación ocurre de forma casi exclusiva en la posición 5' del anillo de la citosina dentro del contexto de di-nucleótidos CpG, mediante la adición de un grupo metilo, capaz de formar 5-metil-citosina (Portela & Esteller, 2010).

Los di-nucleótidos CpG tienden a agruparse en regiones conocidas como islas CpG, definidas como regiones con extensión aproximada entre 200 y 500 pb con un contenido de G+C de al menos 50%. A menudo estas islas CpG se encuentran asociadas con el sitio TSS, aunque también son encontradas en regiones genéticas codificantes y regiones intergénicas (Portela & Esteller, 2010; Heyn & Esteller, 2012; Timp & Feinberg, 2013; Muers, 2013).

En este sentido, los patrones de metilación del DNA genómico de mamíferos son mantenidos por la enzima DNA metiltransferasa 1 (DNMT1), capaz de metilar DNA hemi-metilado, asegurando el mantenimiento de patrones de metilación del DNA genómico durante la replicación del DNA. Mientras que las enzimas DNMT3A y DNMT3B son capaces de metilar completamente el DNA no-metilado y hemi-metilado, es decir llevando a cabo metilación *de novo* del genoma (Li, *et al.*, 2012). La metilación del DNA es descrita comúnmente como una marca epigenética de “silenciamiento” que constituye un evento frecuente en el desarrollo, diferenciación y homeostasis tisular (Bergman & Cedar, 2013). En células tumorales se observa una pérdida global del patrón de metilación del DNA e hipermetilación regional, específicamente en secuencias promotoras con islas CpG (Heyn & Esteller, 2012; Bergman & Cedar, 2013). Adicional a ello, evidencias recientes reportan que en cáncer patrones aberrantes de metilación del DNA en secuencias promotoras afectan negativamente un conjunto de genes supresores de tumor (Singh *et al.*, 2013).

### **1.4. Cáncer de Pulmón**

De todos los tipos de neoplasias malignas, el cáncer pulmonar representa la primera causa de muerte por neoplasias malignas, a nivel mundial (Jemal *et al.*,

2011). En México, ocupa la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en hombres; mientras que en mujeres el cuarto lugar (INEGI, 2012).

El cáncer pulmonar representa neoplasias de origen epitelial, cuyos carcinomas se han clasificado en 2 grupos neoplásicos principales: *i)* carcinomas pulmonares de células pequeñas (SCLC) y *ii)* carcinomas pulmonares de células no-pequeñas (NSCLC); siendo este último conformado por los tipos histológicos adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide) y carcinoma de células grandes (Minna *et al.*, 2002).

Al respecto, se menciona que el tipo histológico de mayor incidencia es el adenocarcinoma tanto en México como a nivel mundial, en ambos géneros, con mayor frecuencia en pacientes no-fumadores, así como en pacientes de corta edad (Minna *et al.*, 2002).

Adicional a ello, cabe mencionar que la mayoría de los casos por cáncer pulmonar son diagnosticados en estadíos clínicos avanzados, por lo que, resultan altos los índices de invasión y metástasis en pacientes, así como diversos síndromes para-neoplásicos (Minna *et al.*, 2002). Por lo que, en su mayoría los pacientes desarrolla enfermedad metastásica con pobre pronóstico y sobrevida a 5 años, menor del 15% (Cimino *et al.*, 2012).

### **1.5 Genes Supresores de Tumor en Cáncer Pulmonar**

Adicional a la capacidad por mantener señales de autonomía replicativa y estimuladoras de crecimiento, las células tumorales también eluden mecanismos de regulación negativa de la proliferación celular (Hanahan & Weinberg, 2011). En este sentido tales mecanismos son dependientes del funcionamiento de genes supresores de tumor. Entre ellos, destacan los genes supresores de tumor canónicos que codifican para las proteínas RB y TP53, quienes funcionan como nodos de control central sobre proliferación o senescencia/apoptosis (Hanahan & Weinberg, 2011).

En cáncer pulmonar se han descrito distintos genes supresores de tumor silenciados por mecanismos de regulación epigenética, como metilación del DNA, entre ellos: p16, RASSF1A, FHIT, APC, ACIN1, CCND2, CDH1, CDH13, MGMT,

MLH1, MYO18B, PGR, PTEN, RARB, WIF1, SOCS3, SPARC, TIMP3, NEUROD1, HAND1, ZNF423, REST, SLC5A8 y muchos otros genes (Zochbauer-Muller *et al.*, 2002; Kerr *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2012; Selamat *et al.*, 2012; Kalari *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2013). Los patrones de metilación del promotor de genes supresores de tumor en sangre periférica y en esputo, actualmente están siendo explorados como potenciales biomarcadores de riesgo de cáncer y transformación neoplásica, así como de diagnóstico temprano en pacientes con cáncer pulmonar (Tan *et al.*, 2013; Hubers *et al.*, 2013). Al respecto, como se ha mencionado, los mecanismos epigenéticos reversibles sobre la metilación del DNA, sugiere el desarrollo de estrategias terapéuticas capaces de reactivar genes silenciados por metilación como los genes supresores de tumor (Zochbauer-Muller *et al.*, 2002).

Al respecto, en la actualidad diversas líneas de investigación oncológica, se enfocan a catalogar alteraciones en los patrones de metilación del DNA genómico, en particular específicas del cáncer pulmonar, ello mediante el establecimiento de modelos celulares derivados de muestras de tejido neoplásico pulmonar de pacientes con cáncer pulmonar, identificando gran número de genes metilados diferencialmente en distintos tipos histológicos del cáncer pulmonar, entre ellos: HOXA1, POU3F3, LHX1, CFB, GRB7 y PROM2; así como miR-9-3, miR-193 por mencionar sólo algunos (Kerr *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2012; Selamat *et al.*, 2012; Heller *et al.*, 2012; Kalari *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2013).

No obstante lo anterior, los avances sobre el control, combate y erradicación del tumor en pacientes, implica un reto constante que involucra la búsqueda de nuevas vías de señalización y/o candidatos a genes supresores de tumor centrales en el desarrollo y evolución clínica en pacientes con cáncer pulmonar.

### **1.6 Búsqueda de Nuevos Genes Supresores de Tumor Regulados Epigenéticamente**

Con relación a lo anterior, nuestro grupo de investigación mediante el empleo de herramientas de análisis global de metilación del genoma, ha identificado patrones de metilación aberrantes del DNA genómico en modelos celulares de cáncer pulmonar (Cerecedo *et al.*; 2009; Datos en proceso, 2013). A este respecto,

mediante ensayos de hibridación genómica comparativa (CGH), se han identificado patrones de hipermetilación en regiones citogenéticas (en submegabases) que incluyen a potenciales genes supresores de tumor, entre ellos: SORBS3 y PDLIM2 (Cerecedo et al; 2009; Datos en proceso, 2013). Por lo que, hasta el momento no existen datos que confirmen dicho mecanismo de regulación epigenética sobre estos genes supresores de tumor en pacientes con cáncer pulmonar.

No obstante, a continuación se describen las principales evidencias que apoyan la función de SORBS3 y PDLIM2, como genes supresores de tumor objeto de estudio para el presente trabajo, así como sus posibles mecanismos de regulación epigenética en cáncer.

### **1.7 SORBS3 y su Regulación Epigenética en Cáncer**

El gen SORBS3 se localiza en el brazo corto del cromosoma 8 (Chr:8p) en la banda 21.3 (Chr:8p21.3) y codifica para una proteína conocida como vinexina, la cual posee tres dominios SH3. Se ha descrito que esta proteína juega un papel importante en la adhesión celular, organización del citoesqueleto y transducción de señales mediadas por el factor de crecimiento epidermal (EGF), participando en la vía de señalización *c-Jun Kinase/Stress-Activated Protein Kinase* “JNK/SAPK” (Kioka *et al.*, 1999; Akamatsu *et al.*, 1999; Nagata *et al.*, 2009). Asimismo, se ha reportado que la proteína vinexina posee un papel clave en la migración celular (Mizutani *et al.*, 2007; Kioka *et al.*, 2010; Roessler *et al.*, 2012). Recientemente, se ha descrito que vinexina interacciona directamente con AKT inhibiendo la vía de señalización bajo el control de AKT (Chen *et al.*, 2013), cuya vía se encuentra sobre-activada en distintos tipos de cáncer controlando la resistencia a la muerte celular por apoptosis, proliferación y crecimiento celular, metabolismo energético de glucosa, motilidad celular y angiogénesis (Testa & Tschlis, 2005); razones por las que constituye un excelente candidato a blanco terapéutico en cáncer.

En este contexto, se ha reportado disminución en los niveles de expresión del mRNA de vinexina, en carcinomas de ovario, así como en líneas celulares de

fibroblastos NIH3T3 y 3Y1, ambas transformadas mediante transfección con el oncogén v-Src (Hough *et al.*, 2000; Umemoto *et al.*, 2009).

Adicional a esto, análisis recientes mediante ensayos por CGH en carcinoma hepatocelular (HCC) derivados de pacientes, han demostrado disminución del número de copias en Chr:8p, en correlación con bajos niveles de expresión de SORBS3. Mientras que, ensayos de sobre-expresión de SORBS3 en líneas celulares xenotransplantadas en modelos *in vivo* -ratones inmunodeficientes SCID-, redujeron significativamente el crecimiento de tumores implantados, evidenciando a SORBS3, como gen supresor de tumor (Roessler *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de tales evidencias, permanece desconocida la participación de SORBS3, en neoplasias malignas de origen pulmonar, así como su regulación epigenética en tumores sólidos de pacientes.

### **1.8 PDLIM2 y su Regulación Epigenética en Cáncer**

El gen PDLIM2 también conocido como MYSTIQUE o SLIM, se ubica en contigüidad al gen SORBS3 dentro de la región citogenética Chr:8p21.3. MYSTIQUE codifica para una proteína conocida como PDLIM2, constituida por un dominio N-terminal PDZ y un dominio C-terminal LIM (Loughran *et al.*, 2005; Elkins *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que PDLIM2 está implicado en la adhesión y migración celular (Torrado *et al.*, 2004). Mientras que, también es capaz de controlar la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (subunidad p65), STAT1 y STAT4, por medio del secuestro intranuclear y posterior degradación vía proteosoma (Tanaka *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2007; Qu *et al.*, 2010a; Qu *et al.*, 2010b). Este mecanismo resulta de gran importancia para lograr contrarrestar el desarrollo del cáncer asociado a inflamación; ya que la activación constitutiva de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y STAT, son considerados factores esenciales para el crecimiento y progresión tumoral; así como un primer paso hacia la transformación maligna en los procesos de “carcinogénesis” (Hanahan & Weinberg, 2011; Demaria *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2012; Narayan & kumar, 2012).

Asimismo, estudios recientes reportan que el gen PDLIM2, se encuentra reprimido a nivel del mRNA en líneas celulares de cáncer de colon y cáncer de mama (tanto positivas como negativas a receptores de estrógenos), así como en leucemias de células T (ATL) y líneas celulares de leucemia de células T (TL-Om1). Al respecto, los autores demuestran que la hipermetilación del promotor de PDLIM2, es el mecanismo responsable del silenciamiento de PDLIM2, demostrado mediante ensayos de inhibición epigenética por 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-dC) -agente inhibidor de DNA metiltransferasas- (Yan *et al.*, 2009; Qu *et al.*, 2010a; Qu *et al.*, 2010b). Al mismo tiempo, estudios *in vivo* han demostrado que tumores de alta expresión de PDLIM2, poseen crecimiento tumoral significativamente menor que aquellos tumores con ausencia de expresión de PDLIM2, sugiriendo que la expresión de PDLIM2 posee función supresora de tumor (Qu *et al.*, 2010a; Qu *et al.*, 2010b).

En resumen a pesar de tales evidencias ambos genes supresores de tumor, SORBS3 y PDLIM2, permanecen por ser analizados en términos de su expresión y regulación epigenética en pacientes con cáncer pulmonar.

### **Planteamiento del problema**

Antecedentes previos de nuestro grupo de investigación señalan aberraciones en el patrón de metilación global del genoma en modelos celulares de carcinoma pulmonar derivados de pacientes (Cerecedo *et al.*, 2009), destacando hipermetilación de secuencias citogenéticas ubicadas en la región Chr:8p21.3 (Datos en proceso, 2013), donde se localizan los genes supresores de tumor SORBS3 y PDLIM2. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes que indiquen, si alteraciones epigenéticas se encuentran presentes o involucradas en carcinomas pulmonares de pacientes, asociados a factores clínicos de riesgo. Razón por la que, el estudio de patrones de expresión del RNA en correlación con patrones de metilación del DNA y/o acetilación del código de histonas tanto en modelos celulares, como en muestras de pacientes con cáncer pulmonar, permitirá evidenciar y confirmar si ambos genes constituyen potenciales marcadores epigenéticos tempranos y/o tardíos en pacientes con cáncer pulmonar.



## **2. Justificación**

Durante los procesos de carcinogénesis en tejido pulmonar, las células tumorales adquieren alteraciones en los patrones de metilación del DNA y mecanismos de recambio del código histónico de la cromatina. Tales procesos de silenciamiento epigenético podrían causar alteraciones en la expresión de genes supresores de tumor como SORBS3 y PDLIM2 promoviendo la proliferación celular, migración y metástasis, como ha sido reportado en otros tipos de cáncer de origen epitelial, entre ellos cáncer de colón, cáncer de mama, leucemia y carcinomas hepatocelulares. Datos recientes de nuestro grupo, apoyan la posible participación de los genes supresores de tumor de SORBS3 y PDLIM2, como marcadores epigenéticos en neoplasias pulmonares en humanos.

## **3. Hipótesis**

Mecanismos de hipermetilación del DNA genómico en la región citogenética Chr:8p21.3, provocará represión epigenético-transcripcional en la expresión de los genes supresores de tumor SORBS3 y PDLIM2, constituyendo nuevos indicadores epigenéticos de evolución neoplásica asociada a factores clínicos de riesgo en pacientes.

## 4. Objetivos

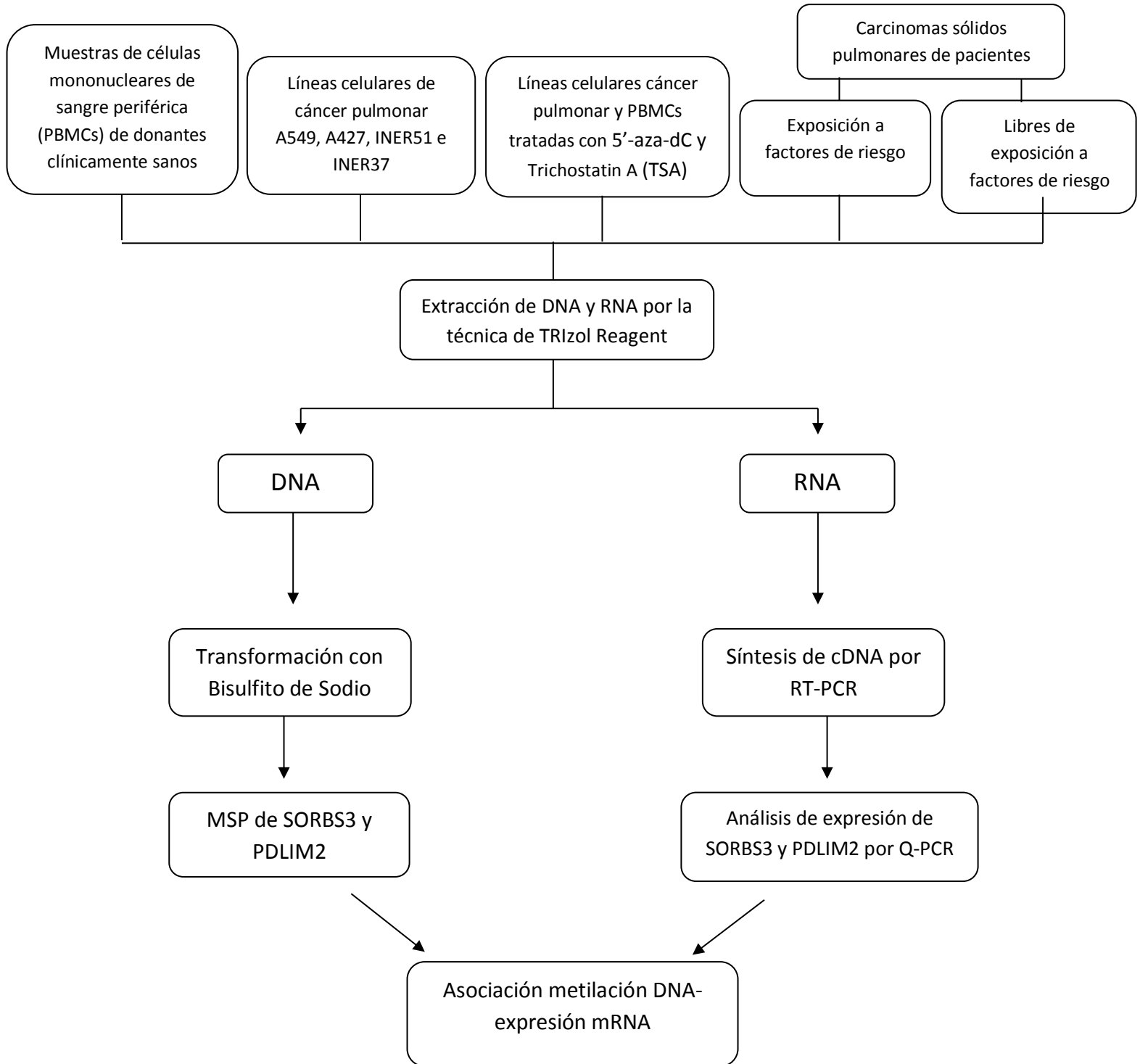
### 5.1. Objetivo General

Analizar el nivel de expresión de mRNA de SORBS3 y PDLIM2, y sus mecanismos de regulación epigenética, como la metilación del DNA y la acetilación de histonas, en modelos celulares *in vitro* y en tumores sólidos de pacientes con cáncer pulmonar.

### 5.2. Objetivos Particulares

1. Analizar el nivel de expresión de mRNA de los genes SORBS3 y PDLIM2 en modelos celulares de carcinomas pulmonares, en comparación con células mononucleares de sangre periférica (PBMC's) como muestras no-neoplásicas.
2. Analizar la relación entre metilación del DNA y modificación de histonas, mediante ensayos de inhibición epigenética *in vitro* sobre la expresión de los genes SORBS3 y PDLIM2.
3. Determinar cualitativamente, mediante ensayos MSP, los niveles de metilación de las secuencias promotoras de los genes SORBS3 y PDLIM2 en modelos celulares de cáncer pulmonar.
4. Analizar mediante ensayos de expresión relativa del mRNA de SORBS3 y PDLIM2, la participación de mecanismos de silenciamiento epigenético tanto en modelos celulares *in vitro*, como en muestras de tumores sólidos pulmonares derivados de pacientes.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 7. Materiales y Métodos

### 7.1. Obtención de muestras

- Se consiguieron muestras de sangre periférica de donantes sanos del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Las cuales se trataron para extraer las células mononucleares (PBMC) que fueron utilizadas para ensayos posteriores.
- Se utilizaron las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar de células no pequeñas de origen caucásico A549 y A427 obtenidas del ATCC y las líneas celulares de adenocarcinoma de células no pequeñas de origen mestizo mexicano INER51 e INER37 establecidas dentro de la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) (Ponce de León & Barrera, 2005; De Lucio *et al.*, 2005). Se cultivaron en medio RPMI 1640 adicionado con 10% de suero fetal bovino, 0.1% de Gentomicina, 1% de L-Glutamina, 1% de Piruvato de Sodio y 2.5% de Hepes, en condiciones de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
- Las muestras de tejido pulmonar sano y tumoral se obtuvieron del banco de muestras de nuestro grupo de investigación.

### 7.2. Tratamiento de las líneas celulares con 5'-aza-2'-desoxicitidina (5'-aza-dC) y Trichostatin A (TSA)

Para el tratamiento de las líneas celulares (A549, A427, INER37 e INER51) con los inhibidores epigenéticos (5'-aza-dC y TSA) (Sigma), se incubaron 200,000 células en 2mL de medio de cultivo por pozo en cajas de 6 pozos, por 48 horas. Se trataron con una concentración de 5'-aza-dC (4µM), TSA (300nM), Aza/TSA (4µM/300nM) y con DMSO al 10% para el grupo control (ya que los inhibidores fueron disueltos en este solvente). El medio de cultivo fue cambiado a las 24 horas con la misma concentración de su respectivo inhibidor.

### 7.3. Aislamiento de DNA y RNA

La extracción de DNA y RNA se realizó siguiendo el protocolo de TRIzol Reagent (Invitrogen). La concentración de las muestras fue determinada usando los espectrofotómetros NanoDrop ND-1000 UV y Epoch™ Microplate. Se determinó el cociente 260/280 para ver la pureza del DNA tomando como valor aceptable  $A_{260/280}$  de 1.6 - 1.8 para DNA y  $A_{260/280} > 1.8$  para RNA.

### 7.4. Transformación de DNA con Bisulfito de Sodio

Las metilaciones de las citosinas del DNA pueden ser cuantificadas mediante el uso de técnicas moleculares como la técnica de bisulfito de Na<sup>+</sup>, en las cuales se inducen polimorfismos de nucleótidos sencillos a partir de nucleótidos no metilados en islas específicas y permite la conservación de las citosinas metiladas. Las islas de nucleótidos tratadas son reconocidas y amplificadas por PCR específico para metilaciones, donde las bases convertidas en uracilo a partir de citosina son reconocidas como timinas, permitiendo la cuantificación apropiada de las bases metiladas conservadas (Yang *et al.*, 2004).

El DNA previamente aislado se trató con la técnica de bisulfito de sodio para convertir todas las citosinas no metiladas en uracilo. Para ello se realizó lo siguiente:

Se diluyó DNA (hasta 2 µg) en 20µl con H<sub>2</sub>O destilada, después se agregaron 85 µl de Mix de Bisulfito y 35µl de Buffer de Protección de DNA. Se mezcló vigorosamente (la solución se tornará de color verde a azul después de adicionar el buffer de protección, indicando correcto pH) y se colocó en el termociclador programado de la siguiente manera:

Paso	Tiempo	Temperatura (°C)
Desnaturalización	5 min	95
Incubación	25 min	60
Desnaturalización	5 min	95
Incubación	85 min	60
Desnaturalización	5 min	95
Incubación	175 min	60
Hold	∞	20

Una vez terminada la reacción, se agregaron 560µl de Buffer BL y se mezcló vigorosamente, se transfirió la mezcla a columna EpiTect y centrifugó 1min a 13,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y añadieron 500µl de Buffer BW, posteriormente centrifugar 1 min a 13,000 rpm. se descartó el sobrenadante y se agregaron 500µl de Buffer BD y se incubó por 15min a temperatura ambiente. Después se centrifugó 1 min a 13,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 500µl de Buffer BW y se centrifugó 1 min a 13,000 rpm. Se repitió el paso 9. Posteriormente se centrifugó una vez más por 1min a 13,000 rpm sin agregar ningún buffer, con la finalidad de eliminar cualquier residuo líquido. Se incubó por 5 min a 56 °C en termoblock, permitiendo la evaporación de cualquier residuo líquido, después se agregaron 25µl de Buffer de elución directamente a la membrana de la columna. Se incubó 5min a temperatura ambiente y eluyó el DNA centrifugando por 1 min a 12,000 rpm. Finalmente se almacenó a 2-8 °C.

#### 7.5. Oligonucleótidos usados para PCR específica de metilación (MSP)

	Secuencia	Tamaño del producto
<b>SORBS3</b>		
Sentido Metilado	5'-TAGATTCGAGATTTAAATTTTCGTTC-3'	200 pb
Antisentido Metilado	5'-CATCCCTACCCGACTACTACC-3'	
Sentido No Metilado	5'-TTTAGATTTGAGATTTAAATTTTGTGT-3'	200 pb
Antisentido No Metilado	5'-TCCCTACCCAACACTACTACCTAACAC-3'	
<b>PDLIM2</b>		
Sentido Metilado	5'-CGGTTTCGGGATTATATGGGC-3'	150 pb
Antisentido Metilado	5'-ACCTAACTACCGCTCACCTATCCG-3'	
Sentido No Metilado	5'-GGGTGGTTTTGGGATTATATGGGT-3'	150 pb
Antisentido No Metilado	5'-CTCACCTAACTACCACTCACCTATCCAAC-3'	

#### 7.6. PCR específica de metilación (MSP)

Para realizar la técnica de MSP se prepararon reacciones con un volumen total de 20µl utilizando el kit de Taq DNA polymerase de QIAGEN. Cada reacción

conteniendo una concentración final 1X de Buffer como a continuación se describe: MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, Solución Q 1X, dNTP's 0.4mM, Corel Load 1µl (QIAGEN), oligonucleótidos para ensayos de MSP a una concentración final de 1µM, 15 ng de DNA transformado por bisulfito, Taq pol 0.5U y agua inyectable (Plasti-Estéril, México). Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 5 min a 95°C 1 ciclo, 30s a 95°C 40 ciclos, 30s a 60°C (SORBS3 3'M y 3U), 61°C (PDLIM2 3'M) y 59°C (PDLIM2 3'U) 40 ciclos, 45s a 72°C 40 ciclos, 5 min a 72°C 1 ciclo y enfriamiento por tiempo indefinido a 4°C.

### 7.7. Electroforesis

Los productos de PCR fueron separados usando un gel de agarosa a una concentración de 3% a 80V, 500mA por 35 min. La intensidad de amplicones fue obtenida mediante el análisis desitométrico de bandas empleando el programa GelAnalyzer 2010a.

### 7.8. Síntesis de cDNA

El cDNA de cada una de las muestras fue sintetizado a partir de 1µg de RNA siguiendo el protocolo de High Capacity RNA to cDNA Kit (Applied Biosystems).

### 7.9. Oligonucleótidos usados para Expresión de mRNA en PCR tiempo real (qPCR)

	Secuencia	Tamaño del producto
<b>SORBS3</b>		
Sentido	5'-CACCAAGACGAGATGCTTCC-3'	75 pb
Antisentido	5'-GTGCTTGACAGAGGGCTTG-3'	
<b>PDLIM2</b>		
Sentido	5'-CACTGACCGGCTCAAAGG-3'	95 pb
Antisentido	5'-GATGGGCGTGTGGAAATC-3'	
<b>GAPDH</b>		
Sentido	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	66 pb
Antisentido	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	

### 7.10. PCR tiempo real (qPCR) para análisis de expresión de mRNA

Se prepararon reacciones con un volumen total de 15µl usando el kit de KAPA SYBR Fast Universal. Cada reacción conteniendo una concentración final 1X de SYBR Master Mix, oligonucleótidos de expresión del mRNA a 200nM, 1µl de cDNA y agua inyectable. Se utilizó el termociclador Light Cycler 480 programado de la siguiente manera, pre-incubación: 3 min a 95°C 1 ciclo, Amplificación: 10s a 95°C, 17s a 60°C, 30s a 72°C por 40 ciclos, Temperatura de disociación del DNA (Melting Curve) 5s a 95°C, 1 min a 65°C y 97°C continuo por 1 ciclo; así como Temperatura de enfriamiento: 10s a 40°C por 1 ciclo.

### 7.11. Análisis estadístico

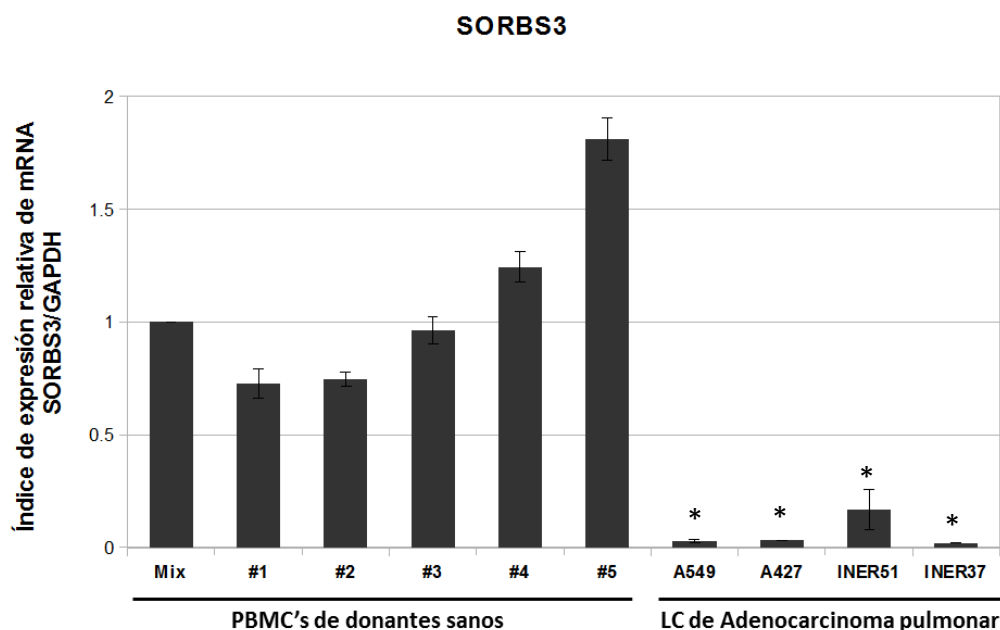
Para los ensayos de expresión relativa de SORBS3 y PDLIM2 en modelos celulares de adenocarcinoma pulmonar en condiciones basales y en muestras de tejido de pulmón de pacientes se realizó la prueba de *t* para dos poblaciones independientes con un valor de significancia de  $p < 0.01$  (El nivel de expresión de mRNA de cada modelo celular en condiciones basales fue comparado con el promedio de la expresión de mRNA de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de los 5 donantes estudiados, asimismo el promedio de mRNA del tejido tumoral de los pacientes se comparó con el promedio de la expresión de mRNA del tejido normal), mientras que para los resultados de expresión de mensajero en líneas celulares tratadas con 5'-aza-dC y TSA se realizó un análisis de variancia (ANOVA) junto con la prueba de Fisher para determinar diferencias significativas, entre los tratamientos con un valor de significancia estadística  $p < 0.05$ .



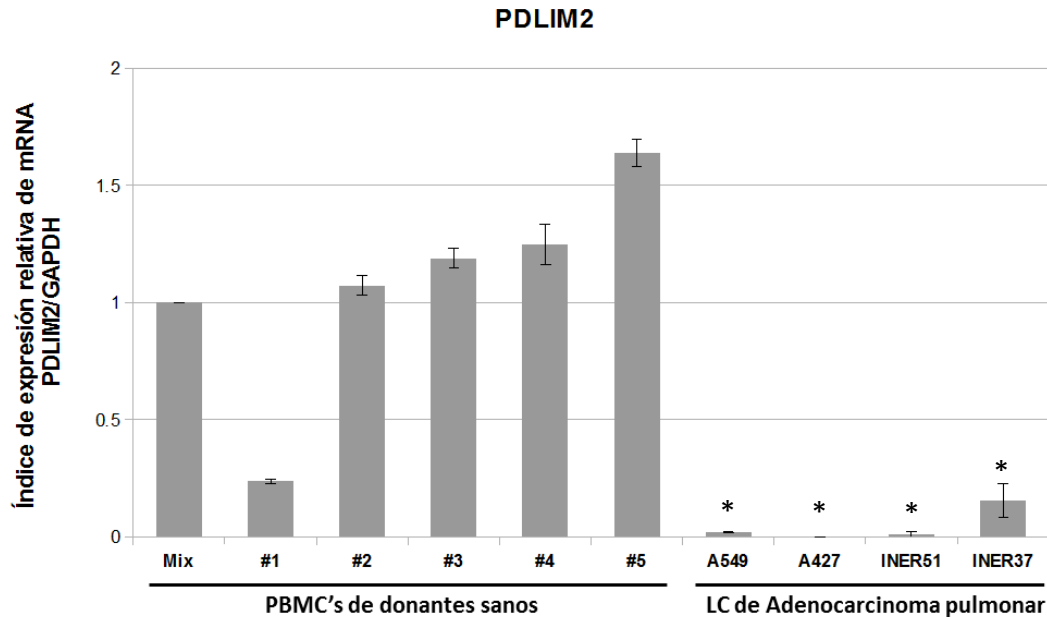
## 8. Resultados

### 8.1. Disminución en la Expresión del mRNA de los Genes Supresores de Tumor SORBS3 y PDLIM2 en Modelos Celulares de Cáncer Pulmonar.

El análisis de expresión relativa del mRNA de los genes supresores de tumor de SORBS3 y PDLIM2 en diferentes modelos celulares de cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma (A549, A427, INER51 e INER37), mostró disminución de la expresión genética, en comparación con células no-neoplásicas empleando para ello células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de 5 donantes clínicamente sanos. Al respecto, los niveles de expresión del mRNA para SORBS3 y PDLIM2 mostraron reducción estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) en todos los modelos celulares de cáncer pulmonar incluidos en el estudio (Figuras 1 y 2).



**Figura 1.** Análisis de expresión relativa del mRNA para el gen SORBS3 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y líneas celulares (LC) de adenocarcinoma pulmonar, mediante ensayos por Q-PCR y normalización sobre el gen endógeno GAPDH. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=2$ ;  $*p < 0.01$ ).



**Figura 2.** Análisis de expresión relativa del mRNA para el gen PDLIM2 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y líneas celulares (LC) de adenocarcinoma pulmonar, mediante ensayos por Q-PCR y normalización sobre el gen endógeno GAPDH. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=2; \*p < 0.01).

## **8.2. La Disminución de la Expresión de SORBS3 y PDLIM2 en Modelos Celulares Tipo Adenocarcinoma Pulmonar, Es Dependiente del Silenciamiento Epigenético Mediado por Metilación del DNA y Acetilación de Histonas.**

Con el objetivo de analizar los mecanismos posibles de la represión en la expresión de SORBS3 y PDLIM2 en los 4 modelos celulares de cáncer pulmonar incluidos en el estudio, se analizó la participación de la metilación del DNA y mecanismos de remodelación de la cromatina, como principales mecanismos epigenéticos de control transcripcional de supresores de tumor en células neoplásicas (Portela & Esteller, 2010). Para ello, los modelos celulares A549, A427, INER51 e INER37 fueron tratados con el inhibidor de DNA-metiltransferasas (DNMT's) 5'-aza-2'-desoxicitidina (5'-aza-dC), así como con el inhibidor de desacetilasas de histonas (HDAC's) Trichostatin A (TSA), para su posterior análisis cuantitativo de expresión del mRNA y estado de metilación del

promotor de ambos SORBS3 y PDLIM2, mediante ensayos de PCR específica de Metilación (MSP).

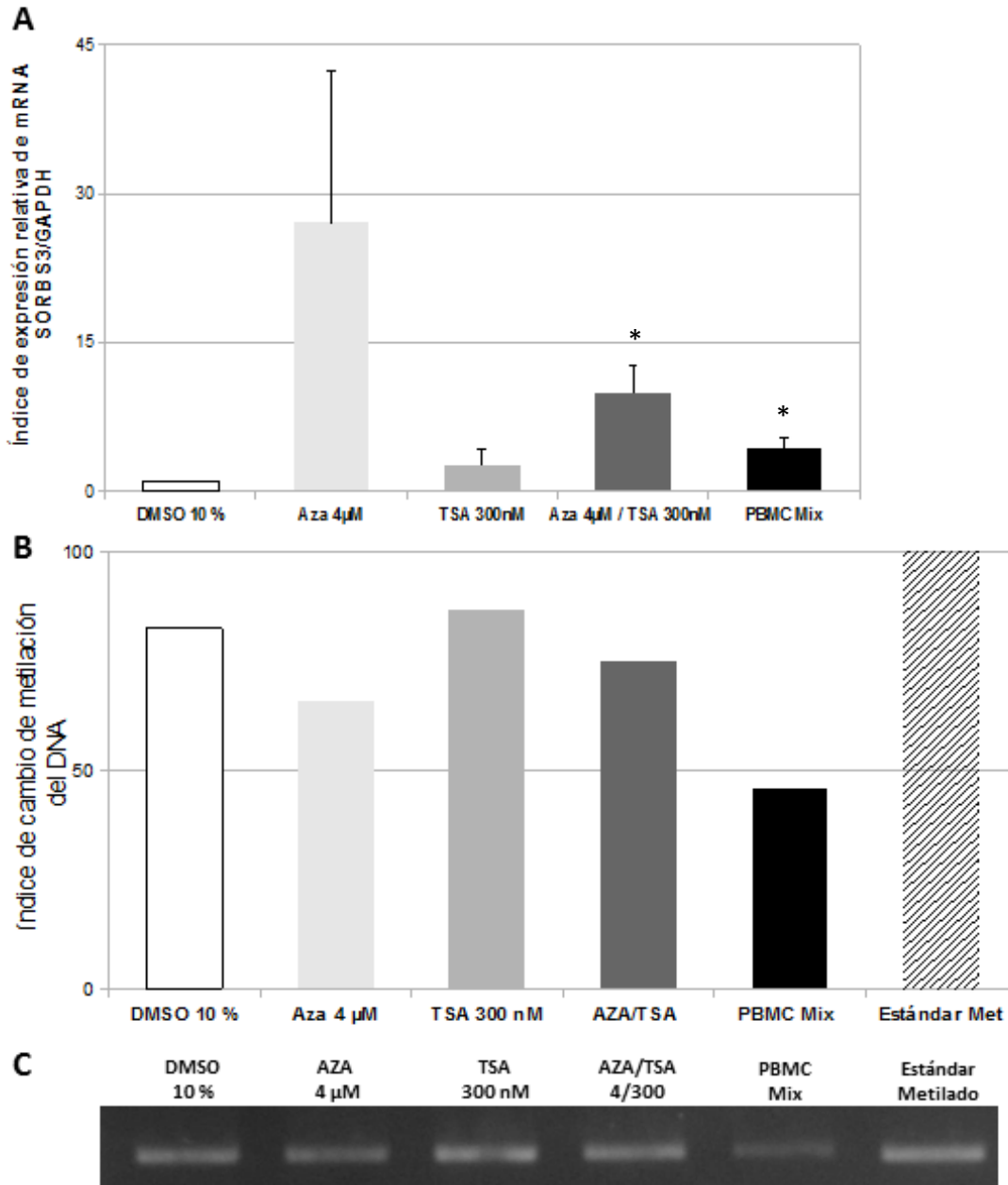
Al respecto, en primera instancia, resulta importante destacar que ambos modelos celulares A549 y A427, bajo condiciones basales -libres de tratamiento epigenético- indicados como tratamiento “control negativo” (DMSO 10%), mostraron hipermetilación en la región promotora de SORBS3, al presentar productos de amplificación en nivel de metilación semejantes al control positivo del DNA-metilado estándar 100% (EpiTect Control DNA methlyated, QIAGEN) (Figuras 3B, 3C, 4B y 4C). Adicionalmente, cabe mencionar que en el modelo celular INER51 resultó imposible determinar el estado de metilación para ambos genes SORBS3 y PDLIM2, llevando a cabo múltiples repeticiones sin éxito, como se muestra en las figuras 6B-C.

Lo anterior probablemente sea debido a aberraciones citogenéticas propias del modelo celular, que no permiten el alineamiento de oligonucleotidos con su secuencia blanco. Por otro lado, se observó hipermetilación en la región promotora de PDLIM2 en ambos modelos celulares A549 y A427 (Figuras 7B-C y Figuras 8B-C); mientras que hipometilación en INER37 (Figuras 9B-E). Cabe mencionar que nuestro modelo celular INER37 fue el único donde fue posible detectar amplificación de secuencias no-metiladas mediante oligos para PDLIM2. Mientras que el empleo de oligonucleótidos para SORBS3 no-metilado mostró deficiencias para su amplificación, incluyendo el uso de controles del DNA estándar No-Metilado (EpiTect Control, QIAGEN). Razón por la que, resultados derivados del análisis de alelos no-metilados para SORBS3 y PDLIM2, fueron excluidos del presente trabajo, no obstante actualmente nuestro grupo lleva a cabo análisis confirmatorios de metilación, mediante secuenciación-bisulfito de sodio (Seq-Bis).

Adicional a ello, tratamientos con inhibidores epigenéticos 5'-aza-dC [4 $\mu$ M] provocaron inducción en la expresión del mRNA de SORBS3 en A549, en contraste con el grupo control DMSO10%. Siendo 6 veces mayor ( $\bar{x}$ = 27.09  $\pm$  15.28), comparado con células no-neoplásicas como PBMC's ( $\bar{x}$ = 4.304  $\pm$  0.961) (Figura 3A). Asimismo, el efecto causado por la combinación 5'-Aza/TSA provocó

inducción de SORBS3 ( $\bar{x}= 9.874 \pm 2.861$ ), aunque en menor nivel comparado con el tratamiento único de 5'-Aza. Sin embargo, en ambos casos poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.05$ ), con respecto al control negativo (DMSO 10%), en proporción dos veces mayor que la expresión normalizada de una mezcla de RNAm de PBMCs de 5 donantes sanos (Figura 3A). Adicionalmente, el tratamiento por TSA no generó cambios significativos en la expresión de SORBS3 ( $\bar{x}= 2.631 \pm 1.657$ ) en A549 (Figura 3A). Adicional a ello, dicha inducción del mRNA en A549 correlaciona con disminución del nivel de metilación de SORBS3, observado mediante tratamiento por 5'-Aza [4 $\mu$ M] y combinación Aza/TSA (Figuras 3B-C). Sugiriendo que la metilación del DNA posee mayor influencia sobre el silenciamiento epigenético de SORBS3 en el modelo celular A549.

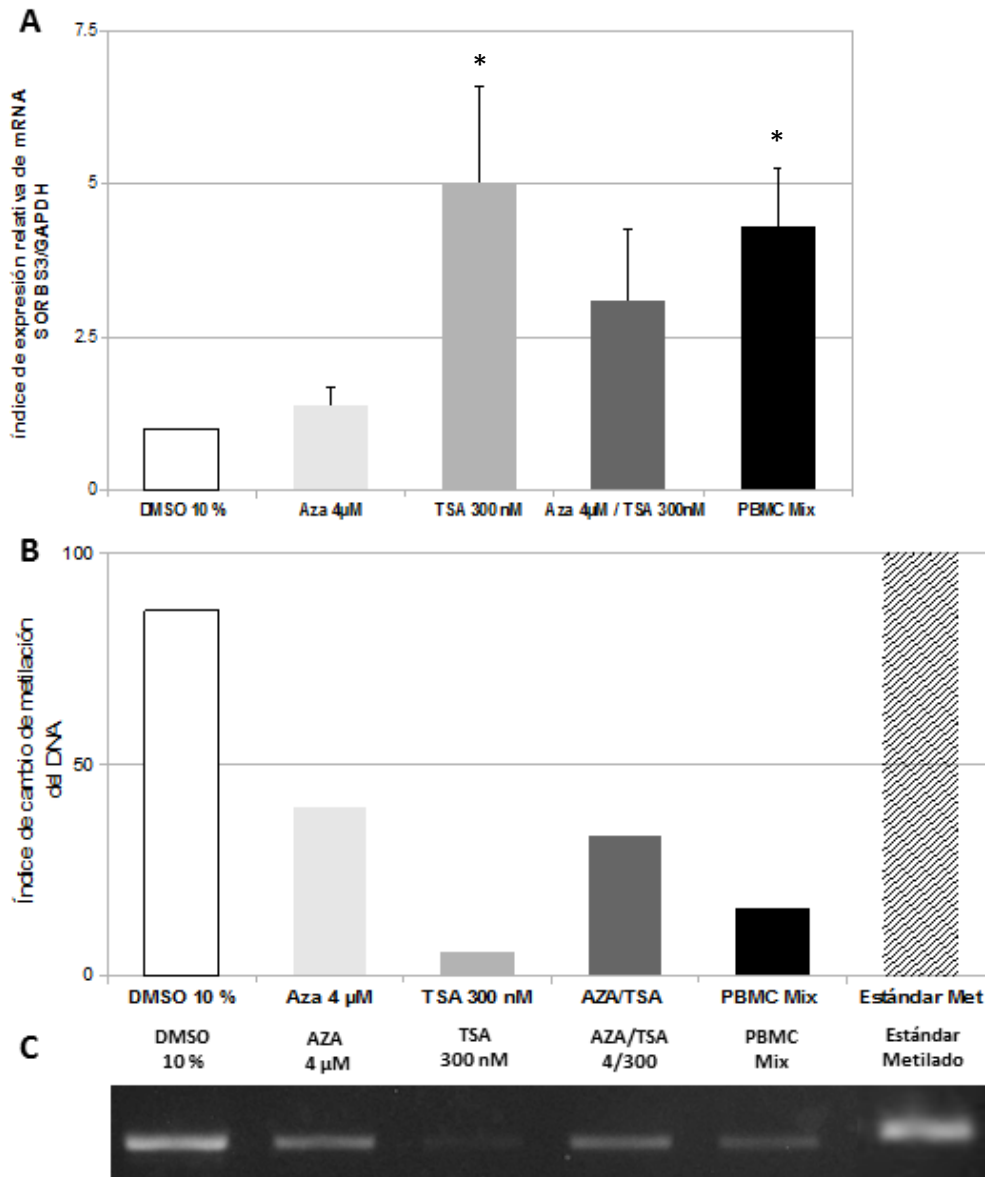
## SORBS3-A549



**Figura 3.** Análisis de expresión relativa del mRNA y correlación cualitativa de metilación por MSP para el gen SORBS3, sobre el modelo celular de cáncer pulmonar A549 bajo tratamiento con inhibidores epigenéticos 5'-aza-dC y TSA. (A) Expresión relativa del mRNA de SORBS3 normalizada sobre el gen endógeno GAPDH. Datos representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=2; \*p <0.05); (B) Porcentaje de cambio del nivel de metilación mediante análisis densitométrico sobre amplicones del DNA metilado de SORBS3, empleando el programa GelAnalyzer; (C) Amplificación de fragmentos del DNA metilado del promotor de SORBS3 mediante ensayos por MSP.

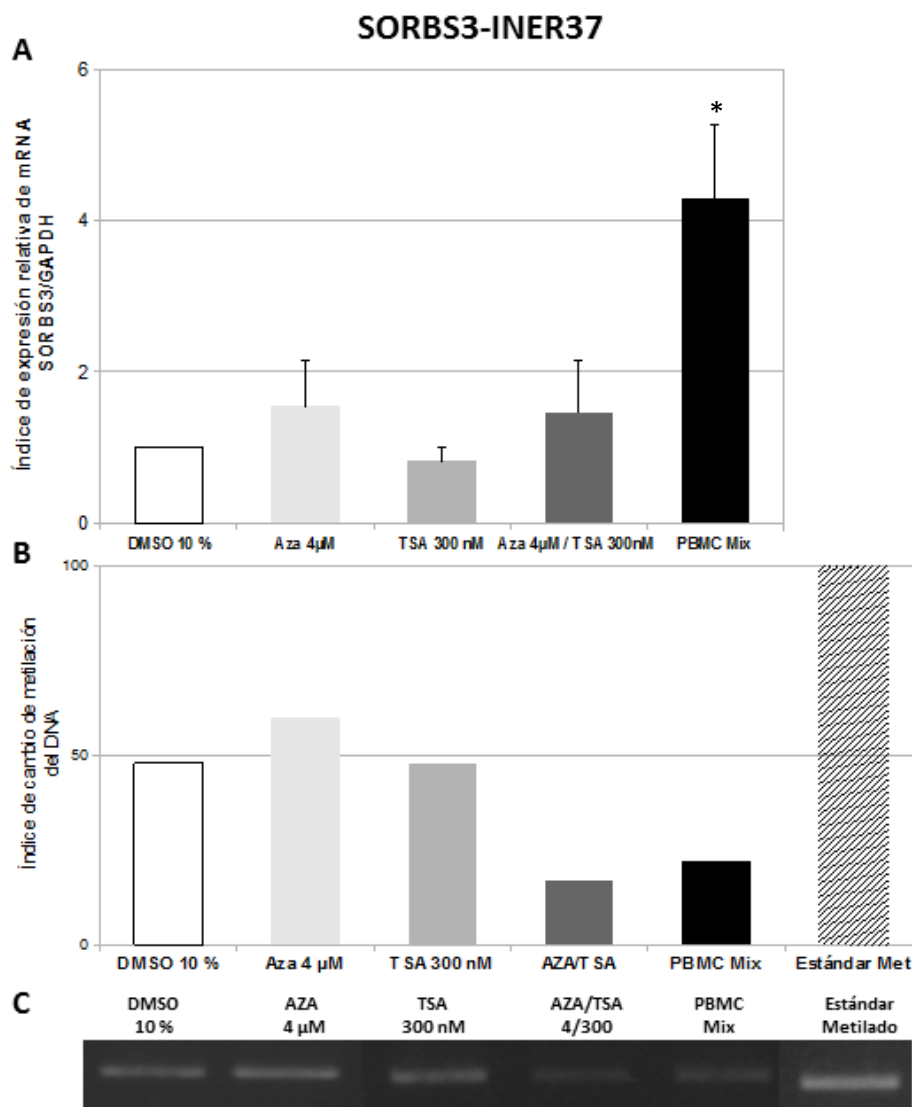
Por otro lado, el análisis del modelo celular A427 muestra un efecto contrario, es decir se observa un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la expresión del mRNA de SORBS3 bajo tratamiento con TSA 300nM ( $\bar{x} = 5.021 \pm 1.573$ ), en contraste con 5'-Aza [ $4\mu\text{M}$ ] ( $\bar{x} = 1.385 \pm 0.302$ ) (Figura 4C). En este sentido la combinación Aza/TSA también causó inducción de SORBS3 ( $\bar{x} = 3.086 \pm 1.169$ ), aunque no de manera significativa, llama la atención que el nivel de expresión alcanzado por TSA 300nM fue ligeramente superior al mostrado por PBMC's ( $\bar{x} = 4.304 \pm 0.961$ ), sugiriendo restauración en la expresión de SORBS3 con TSA 300nM en A427 (Figura 4A). Lo anterior en correlación con la caída del nivel de metilación del promotor de SORBS3 provocado por TSA 300nM (Figuras 4B-C), incluso menor del nivel mostrado por PBMC's, sugiriendo que mecanismos de remodelación de la cromatina constituyen el mecanismo epigenético de mayor influencia como mecanismo de represión transcripcional de SORBS3 en el modelo celular A427.

## SORBS3-A427



**Figura 4. Análisis de expresión relativa del mRNA y correlación cualitativa de metilación por MSP para el gen SORBS3, sobre el modelo celular de cáncer pulmonar A427 bajo tratamiento con inhibidores epigenéticos 5'-aza-dC y TSA. (A)** Expresión relativa del mRNA de SORBS3 normalizada sobre el gen endógeno GAPDH. Datos representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=2; \*p <0.05); **(B)** Porcentaje de cambio del nivel de metilación mediante análisis densitométrico sobre amplicones del DNA metilado de SORBS3, empleando el programa GelAnalyzer; **(C)** Amplificación de fragmentos del DNA metilado del promotor de SORBS3 mediante ensayos por MSP.

Por otra parte, no fue posible detectar inducción significativa de la expresión de SORBS3 en el modelo celular INER37, en presencia de tratamiento epigenético alguno (Figura 5A). Adicional a ello, el promotor de SORBS3 en INER37 bajo condiciones basales mostró 50% de metilación con respecto al DNA-estándar 100% metilado (Figuras 5B-C), sugiriendo metilación parcial de SORBS3 en el modelo celular de cáncer pulmonar INER37.

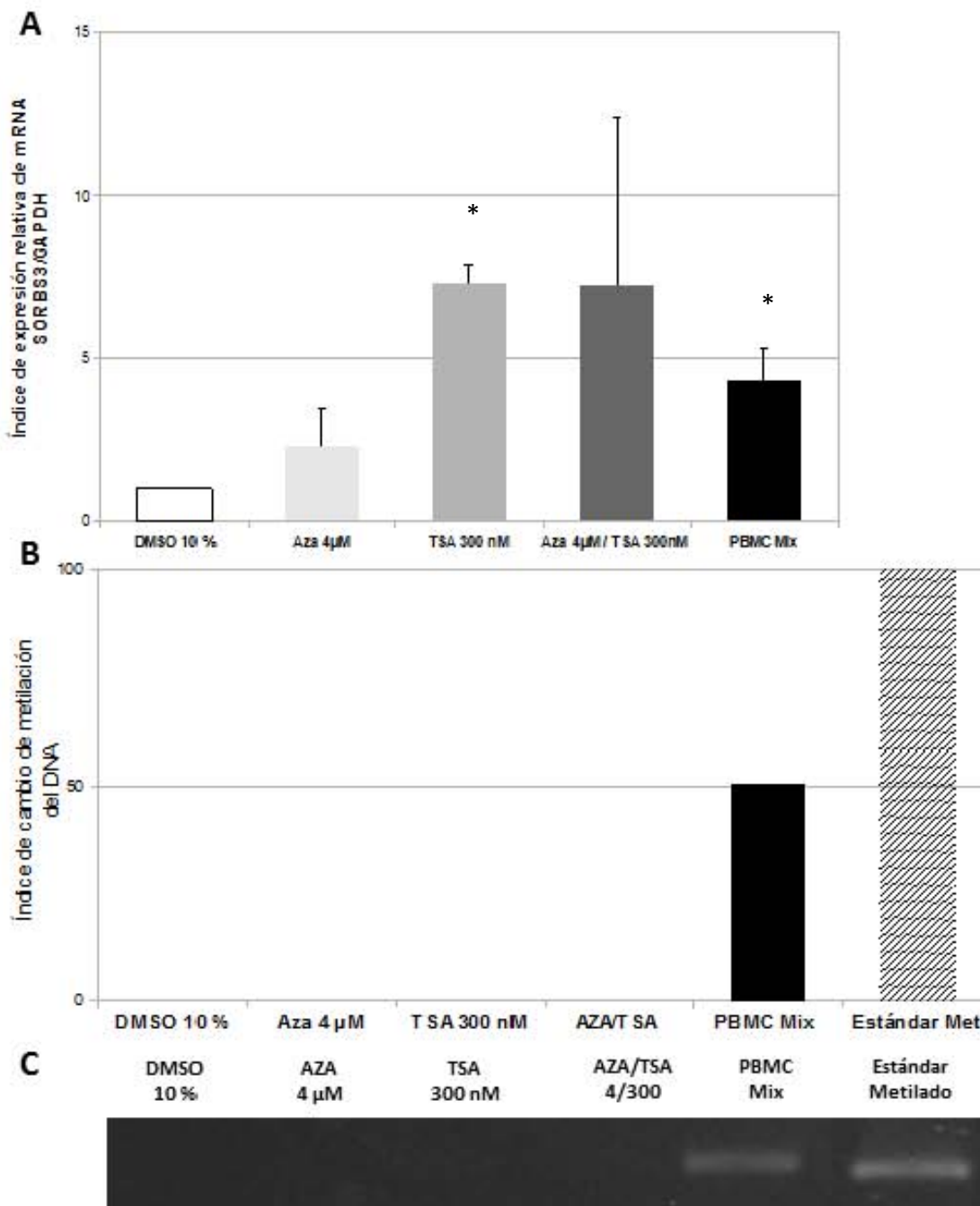


**Figura 5. Análisis de expresión relativa del mRNA y correlación cualitativa de metilación por MSP para el gen SORBS3, sobre el modelo celular de cáncer pulmonar INER37 bajo tratamiento con inhibidores epigenéticos 5'-aza-dC y TSA.** (A) Expresión relativa del mRNA de SORBS3 normalizada sobre el gen endógeno GAPDH. Datos representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=2; \*p <0.05); (B) Porcentaje de cambio del nivel de metilación mediante análisis densitométrico sobre amplicones del DNA metilado de SORBS3, empleando el programa GelAnalyzer; (C) Amplificación de fragmentos del DNA metilado del promotor de SORBS3 mediante ensayos por MSP.



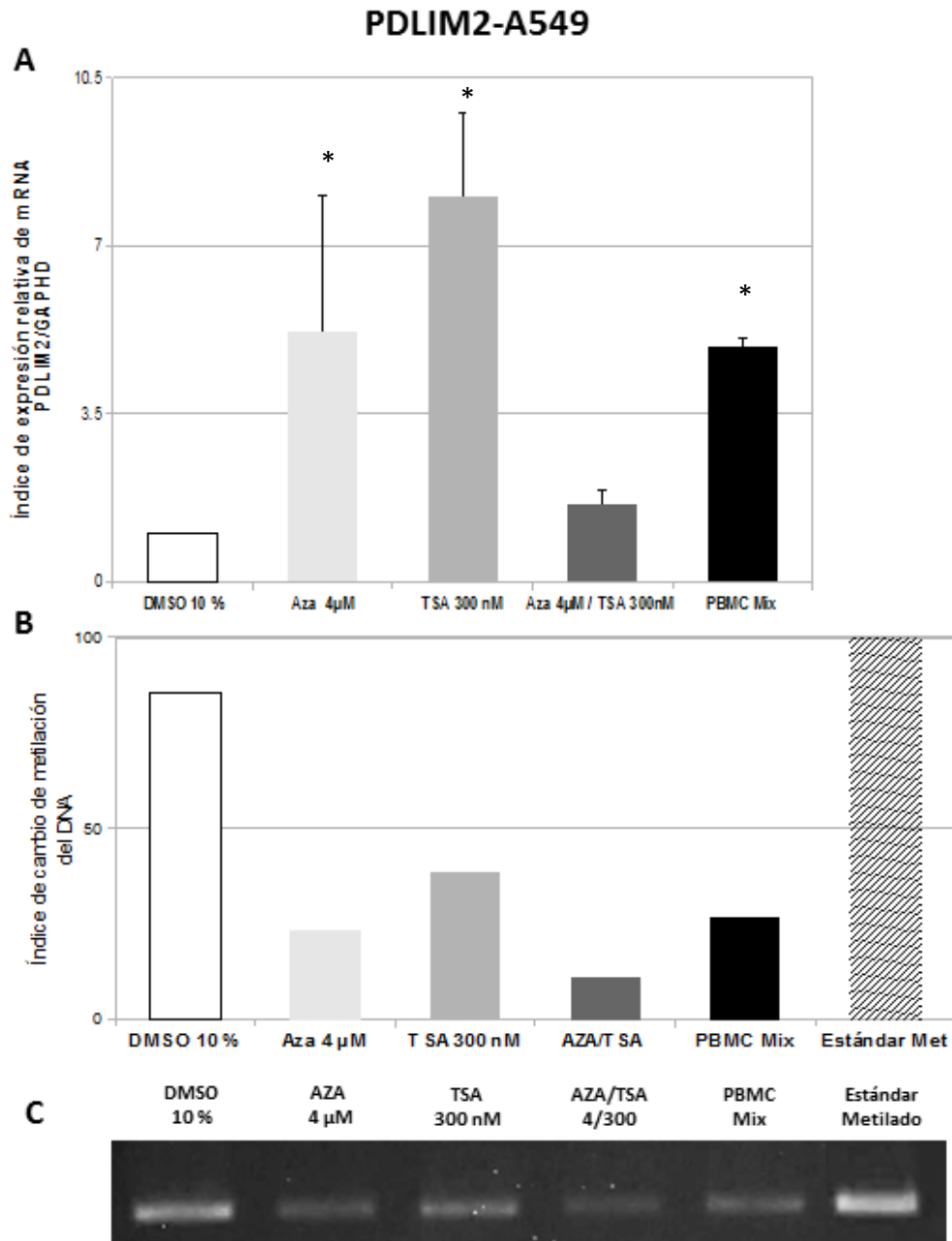
En contraste, el modelo celular INER51 mostró aumento significativo de la expresión de SORBS3 bajo tratamiento por TSA 300nM ( $\bar{x}= 7.284 \pm 0.599$ ); así como bajo tratamiento de combinación 5-Aza/TSA ( $\bar{x}= 7.248 \pm 5.125$ ) (Figura 6A). Adicional a ello, el nivel de expresión inducido por TSA 300nM fue casi dos veces mayor que la expresión observada en PBMC's ( $\bar{x}= 4.304 \pm 0.961$ ), sugiriendo restauración de la expresión del mRNA de SORBS3 en INER51, a través de mecanismos de remodelación de la cromatina como mecanismo epigenético de silenciamiento de SORBS3. Sin embargo, experimentalmente no fue posible detectar el estado de metilación mediante MSP sobre este modelo celular de cáncer pulmonar (Figuras 6B y 6C). Al respecto, hemos logrado determinar aquellos mecanismos epigenéticos involucrados en la capacidad de regular la expresión transcripcional de SORB3.

## SORBS3-INER51



**Figura 6. Análisis de expresión relativa del mRNA y correlación cualitativa de metilación por MSP para el gen SORBS3, sobre el modelo celular de cáncer pulmonar INER51 bajo tratamiento con inhibidores epigenéticos 5'-aza-dC y TSA. (A)** Expresión relativa del mRNA de SORBS3 normalizada sobre el gen endógeno GAPDH. Datos representan la media ± desviación estándar (n=2; \*p <0.05); **(B)** Porcentaje de cambio del nivel de metilación mediante análisis densitométrico sobre amplicones del DNA metilado de SORBS3, empleando el programa GelAnalyzer; **(C)** Amplificación de fragmentos del DNA metilado del promotor de SORBS3 mediante ensayos por MSP.

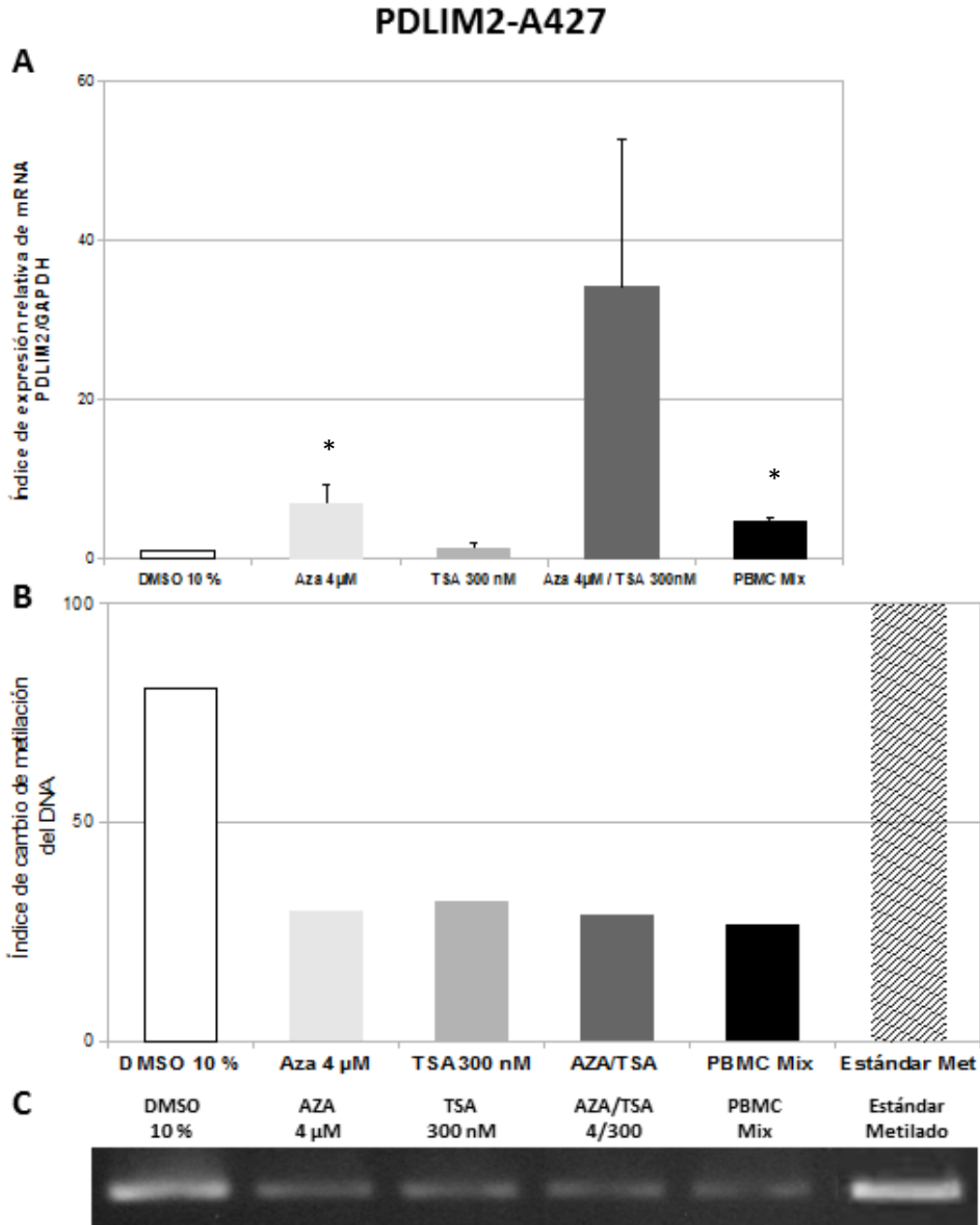
Asimismo, los resultados sobre el gen PDLIM2 permitieron evidenciar que el tratamiento con 5'-Aza [4 $\mu$ M] incrementó la expresión del mRNA de PDLIM2 en el modelo celular A549 ( $\bar{x}$ = 5.216  $\pm$  2.812), alcanzado niveles semejantes a células no-neoplásicas "PBMC's" ( $\bar{x}$ = 4.89  $\pm$  0.171) (Figura 7A). De la misma manera, se observó inducción en la expresión de PDLIM2 ( $\bar{x}$ = 8.027  $\pm$  1.736) bajo tratamiento con TSA [300nM], alcanzando casi 2 veces el nivel de expresión de PBMC's, mientras que el uso de combinación Aza/TSA, no indujo un aumento significativo ( $\bar{x}$ = 1.628  $\pm$  0.294) (Figura 7A). Lo anterior, en correlación con disminución en los niveles de metilación del promotor de PDLIM2 observado en el modelo A549 bajo tratamiento por 5'-Aza y TSA, observado mediante la amplificación por PCR específica de metilación (MSP), donde el producto de amplificación es similar al obtenido en células no-neoplásicas PBMC's (Figuras 7B-C).



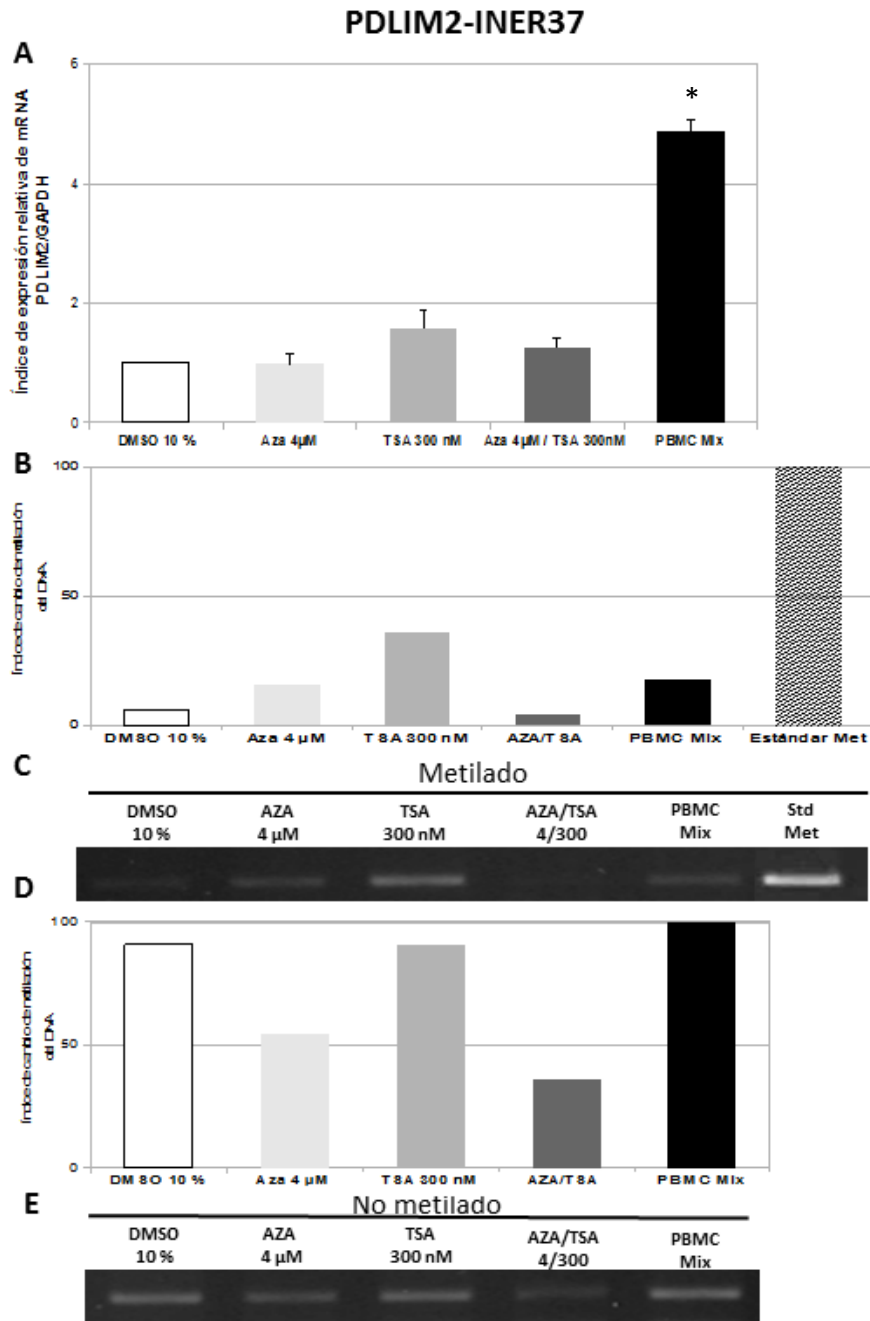
**Figura 7. Análisis de expresión relativa del mRNA y correlación cualitativa de metilación por MSP para el gen PDLIM2, sobre el modelo celular de cáncer pulmonar A549 bajo tratamiento con inhibidores epigenéticos 5'-aza-dC y TSA. (A)** Expresión relativa del mRNA de PDLIM2 normalizada sobre el gen endógeno GAPDH. Datos representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=2$ ;  $*p < 0.05$ ); **(B)** Porcentaje de cambio del nivel de metilación mediante análisis densitométrico sobre amplicones del DNA metilado de PDLIM2, empleando el programa GelAnalyzer; **(C)** Amplificación de fragmentos del DNA metilado del promotor de PDLIM2 mediante ensayos por MSP.

Adicionalmente, respecto al modelo celular A427 el tratamiento bajo 5'-Aza [4 $\mu$ M] restauró la expresión del mRNA de PDLIM2 ( $\bar{x}$ = 7.014  $\pm$  2.35), alcanzando niveles comparables al mix de PBMC's ( $\bar{x}$ = 4.89  $\pm$  0.171). Mientras que el tratamiento con TSA [300nM] no fue capaz de modificar el nivel de expresión de PDLIM2 ( $\bar{x}$ = 1.428  $\pm$  0.530) (Figura 8A). Al respecto, de manera sorprendente, la combinación Aza/TSA incrementó los niveles del mRNA de PDLIM2 ( $\bar{x}$ = 34.24  $\pm$  18.53) de hasta 7 veces el nivel de expresión observado sobre el mix de PBMC's (Figura 8A). Lo anterior, sugiere una cooperación entre ambos mecanismos epigenéticos para mantener el silenciamiento transcripcional de PDLIM2 en A427. Adicionalmente, nuestros resultados por MSP en este modelo celular muestran disminución del nivel de metilación del promotor de PDLIM2 bajo las 3 combinaciones del tratamiento (Figuras 8B-C).

En contraste, el modelo celular INER37 bajo tratamiento alguno fue imposible detectar inducción significativa del nivel de expresión del mRNA para PDLIM2 (Figura 9A) llama la atención que el promotor de PDLIM2 muestre metilación parcial del DNA, al identificar escasa amplificación mediante el uso de oligonucleótidos para secuencias metiladas (Figuras 9B-C), en contraste del nivel alto de amplificación logrado sobre DNA estándar 100% metilado. Adicional a ello, destacando que sólo este modelo celular mostró amplificación de secuencias no metiladas, mediante ensayos por MSP para el gen PDLIM2, identificando una banda más intensa en contraste con secuencias metiladas (Figuras 9D-E), sugiriendo que el promotor de PDLIM2 se encuentra parcialmente metilado en el modelo celular INER37.

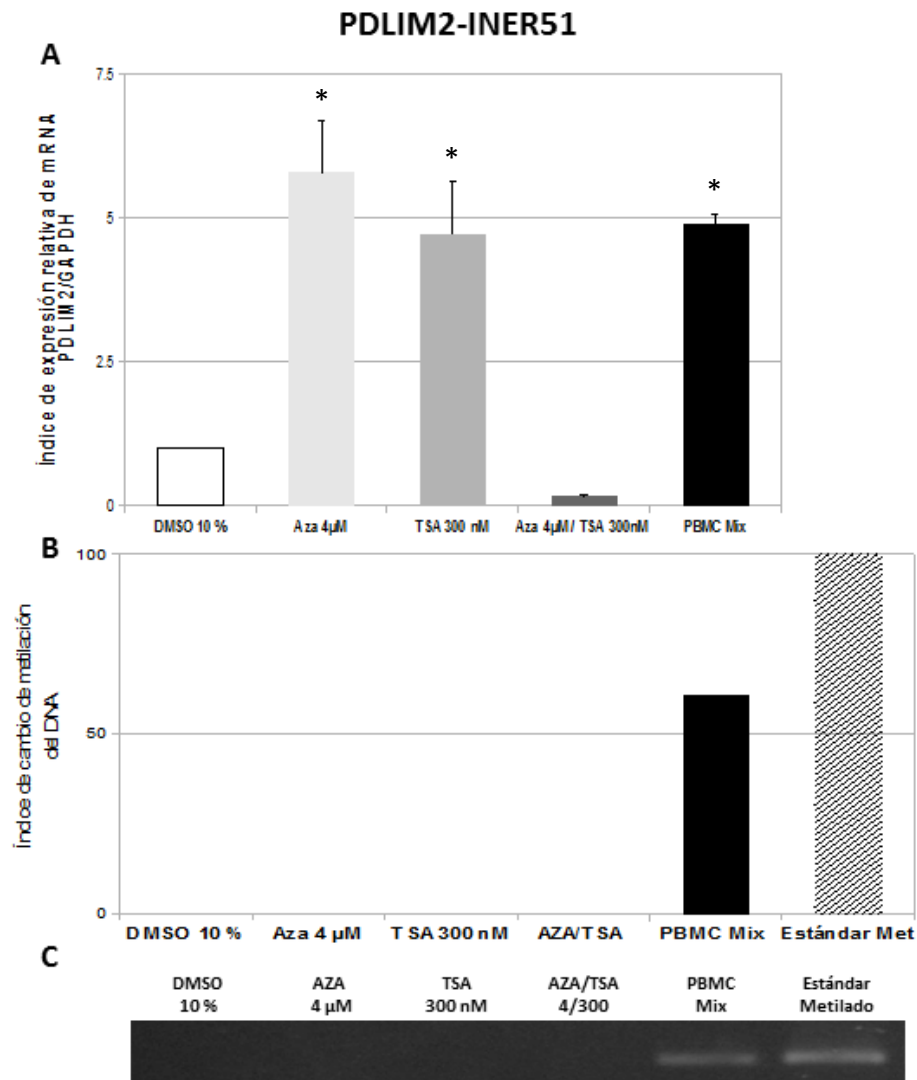


**Figura 8.** Análisis de expresión relativa del mRNA y correlación cualitativa de metilación por MSP para el gen PDLIM2, sobre el modelo celular de cáncer pulmonar A427 bajo tratamiento con inhibidores epigenéticos 5'-aza-dC y TSA. (A) Expresión relativa del mRNA de PDLIM2 normalizada sobre el gen endógeno GAPDH. Datos representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=2; \*p <0.05); (B) Porcentaje de cambio del nivel de metilación mediante análisis densitométrico sobre amplicones del DNA metilado de PDLIM2, empleando el programa GelAnalyzer; (C) Amplificación de fragmentos del DNA metilado del promotor de PDLIM2 mediante ensayos por MSP.



**Figura 9. Análisis de expresión relativa del mRNA y correlación cualitativa de metilación del DNA mediante ensayos MSP para el gen PDLIM2, análisis del modelo celular INNER-37 bajo tratamiento con inhibidores epigenéticos 5'-aza-dC y TSA. (A) Expresión relativa del mRNA de PDLIM2 normalizada sobre el gen endógeno GAPDH. Datos representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=2; \*p < 0.05); (B) Porcentaje de cambio del nivel de metilación mediante análisis densitométrico sobre amplicones del DNA metilado de PDLIM2, empleando el programa GelAnalyzer; (C) Amplificación de fragmentos del DNA metilado del promotor de PDLIM2 mediante ensayos por MSP. (D) Porcentaje de cambio del DNA-no metilado mediante análisis densitométrico de amplicones del DNA no-metilado de PDLIM2; (E). Estado de metilación del promotor de PDLIM2 en INNER-37 analizado mediante el uso de oligonucleótidos de MSP, para secuencias no-metiladas.**

Adicional a lo anterior, fue evaluado el efecto de inhibidores de metilación del DNA como 5'-Aza [4 $\mu$ M] e inhibidores de desacetilasas de histonas por TSA [300nM], con el objetivo de restaurar la expresión inducible de PDLIM2 de manera significativa, alcanzando un nivel del mRNA en el modelo celular INER-51 similar al detectado en muestras no-neoplásicas de PBMC's derivado de 4-5 donantes clínicamente sanos (Figura 10A). Sin embargo, como se había mencionado previamente, no fue posible determinar con éxito el estado de metilación de este modelo celular (Figuras 10B-C), aunque datos en proceso nos indican hipometilación de su genoma (datos no mostrados).

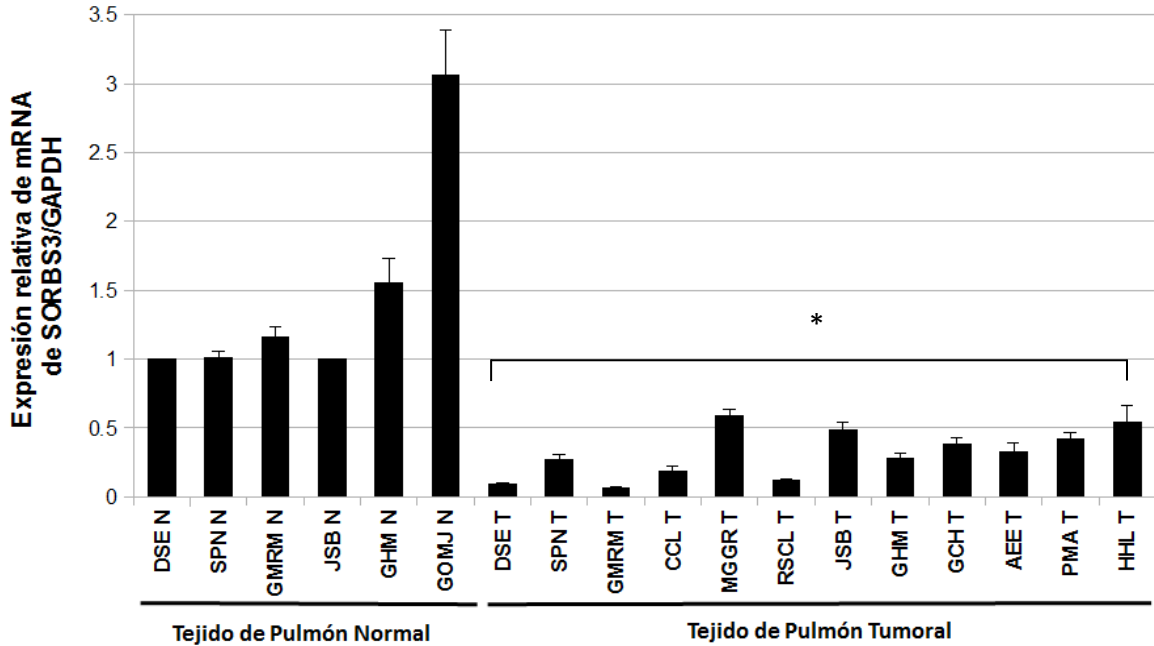




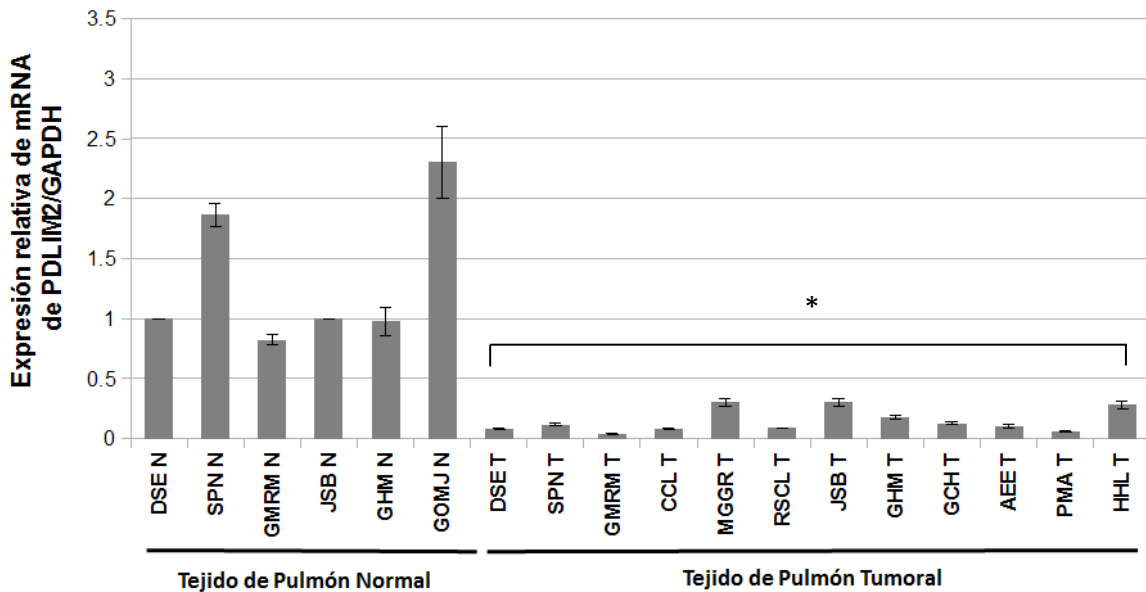
**Figura 10. Análisis de expresión relativa del mRNA y correlación cualitativa de metilación del DNA mediante ensayos MSP para el gen PDLIM2, análisis del modelo celular INER-51 bajo tratamiento con inhibidores epigenéticos 5'-aza-dC y TSA.** (A) Expresión relativa del mRNA de PDLIM2 normalizada sobre el gen endógeno GAPDH. Datos representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=2; \*p <0.05); (B) Porcentaje de cambio del nivel de metilación mediante análisis densitométrico sobre amplicones del DNA metilado de PDLIM2, empleando el programa GelAnalyzer; (C) Amplificación de fragmentos del DNA metilado del promotor de PDLIM2 mediante ensayos de MSP.

### ***8.3. La Represión Epigenética en Modelos Celulares de Cáncer Pulmonar, Correlaciona con la Pérdida de la Expresión de mRNA de SORBS3 y PDLIM2 en Carcinomas Sólidos Pulmonares Derivados de Pacientes.***

Con el objetivo de encontrar correlación entre los 4 modelos celulares de cáncer pulmonar incluidos en el presente estudio con muestras de tumores pulmonares derivados de pacientes, se llevó a cabo un análisis de expresión de SORBS3 y PDLIM2 en carcinomas sólidos pulmonares en fresco. Para ello, fueron incluidos en el estudio los análisis de expresión de tumores sólidos obtenidos de 13 pacientes. A partir de los cuales se logró detectar que ambos genes SORBS3 y PDLIM2 poseen niveles de expresión relativa del mRNA significativamente ( $p < 0.01$ ) menores en tejido neoplásico, comparado con tejido histológicamente normal, incluso detectado bajo el análisis pareado (Normal y Tumor) por paciente (Figuras 11 y 12).



**Figura 11.** Análisis de expresión relativa del mRNA para el gen SORBS3 en tejido pulmonar histológicamente normal y tejido tumoral derivado de pacientes con cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma, empleando para ello análisis de normalización mediante detección del gen endógeno GAPDH. Datos representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=2; \*p < 0.01).



**Figura 12.** Análisis de expresión relativa del mRNA para el gen PDLIM2 en tejido pulmonar histológicamente normal y tejido tumoral derivado de pacientes con cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma, empleando para ello análisis de normalización mediante detección del gen endógeno GAPDH. Datos representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=2; \*p < 0.01).

#### **8.4. La represión Epigenética de SORBS3 y PDLIM2 en Pacientes con Cáncer Pulmonar es Independiente de la Exposición a Factores de Riesgo (Humo de Leña).**

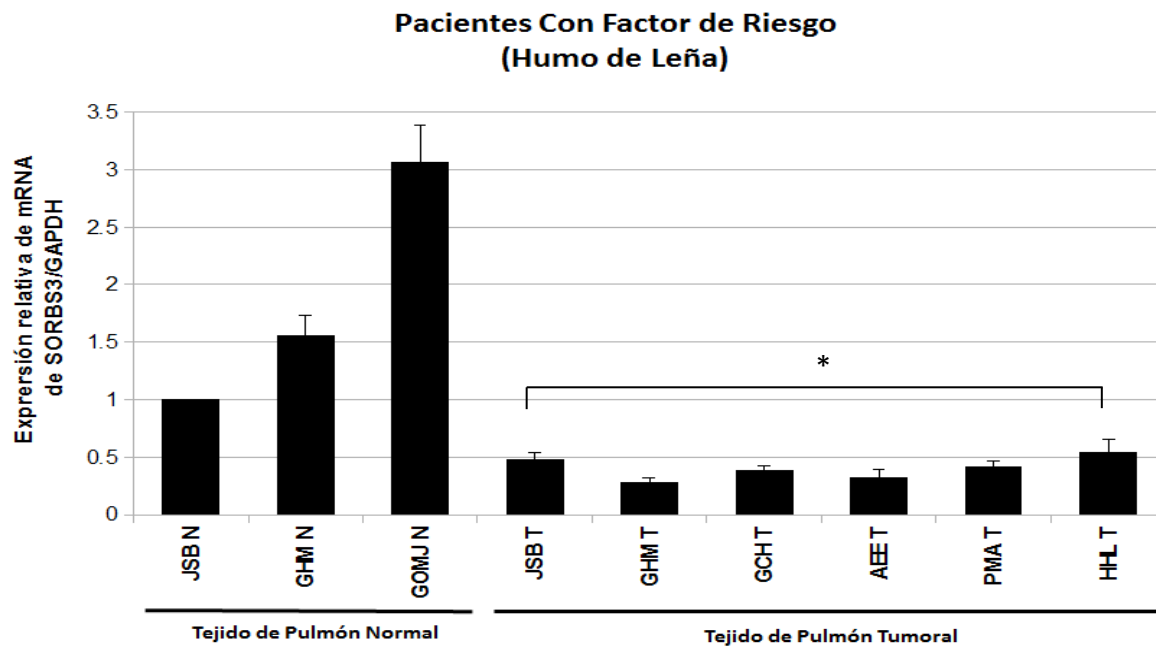
Con el propósito de postular a SORBS3 y PDLIM2 como probables nuevos blancos moleculares en pacientes con cáncer pulmonar, se llevó a cabo el análisis de expresión del mRNA para SORBS3 y PDLIM2, sobre dos grupos de pacientes: *i)* pacientes con cáncer pulmonar bajo exposición a humo de leña y *ii)* pacientes con cáncer pulmonar libres de exposición a factores ambientales de riesgo, cuyos datos de pacientes se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Lista de pacientes con cáncer pulmonar en presencia y ausencia de factores de riesgo ambiental.

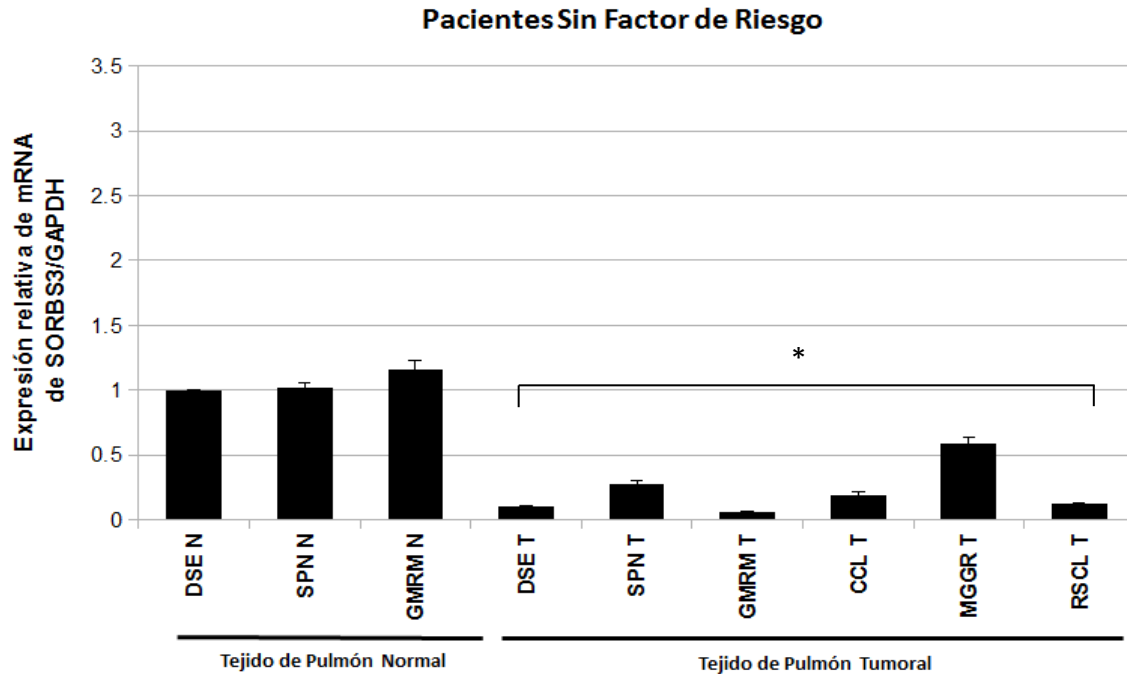
Numero Registro	Edad	Tipo Histológico	Sexo	Estadio	Exposición
JSB300309	75	Adenocarcinoma	Femenino	IV	Humo de leña
GHM291008	63	Adenocarcinoma	Femenino	IV	Humo de leña
GCH170209	74	Adenocarcinoma	Femenino	IV	Humo de leña
AEE101007	71	Adenocarcinoma	Femenino	IIIB	Humo de leña
PMA230408	59	Adenocarcinoma	Femenino	IV	Humo de leña
HHL011107	49	Adenocarcinoma	Femenino	IV	Humo de leña
GOMJ300609	64	Adenocarcinoma	Femenino	IIIB	Humo de leña
DSE201008	70	Adenocarcinoma	Femenino	IV	(-)
SPN020309	41	Adenocarcinoma	Femenino	IIIB	(-)
GMRM080708	47	Adenocarcinoma	Femenino	IV	(-)
CCL010408	48	Adenocarcinoma	Masculino	IV	(-)
MGGR140809	55	Adenocarcinoma	Femenino		(-)
RSCL300109	38	Adenocarcinoma	Femenino	IV	(-)

Con base en lo anterior, se determinaron los niveles de expresión de SORBS3 y PDLIM2, ratificando que la represión epigenética observada en modelos celulares de cáncer pulmonar, se encuentra ampliamente representada en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD, ello de forma independiente con la exposición a factores de riesgo entre ellos, humo de leña (Figuras 13, 14, 15 y 16) lo que sugiere dos posibles hipótesis: *i)* las aberraciones epigenéticas de SORBS3 y PDLIM2, ocurren desde etapas tempranas, manteniéndose hasta etapas tardías y *ii)* dichas aberraciones epigenéticas de SORBS3 y PDLIM2, ocurren posterior a

los procesos tempranos de carcinogénesis pulmonar, destacando que en ambos escenarios constituyen un mecanismo celular-epigenético conservado en pacientes con cáncer pulmonar, de manera independiente a su exposición ambiental, probablemente ubicándolos como potenciales marcadores epigenéticos del cáncer pulmonar.



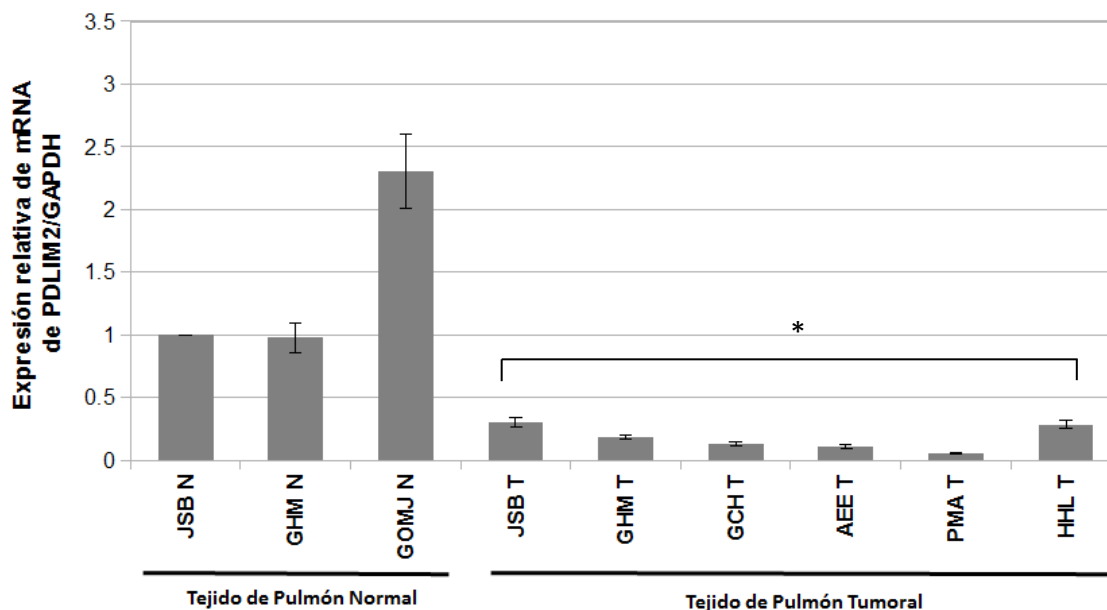
**Figura 13.** Análisis de expresión relativa del mRNA para el gen SORBS3 en tejido pulmonar histológicamente normal y tejido tumoral derivado de pacientes con cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma, bajo exposición a factores de riesgo (Humo de Leña), empleando para ello análisis de normalización contra del gen endógeno GAPDH. Datos representan la media ± desviación estándar (n=2; \*p < 0.01).



**Figura 14.** Análisis de expresión relativa del mRNA para el gen SORBS3 en tejido pulmonar histológicamente normal y tejido tumoral derivado de pacientes con cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma, libres de factores de riesgo, empleando para ello análisis de normalización contra del gen endógeno GAPDH. Datos representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=2; \*p < 0.01).

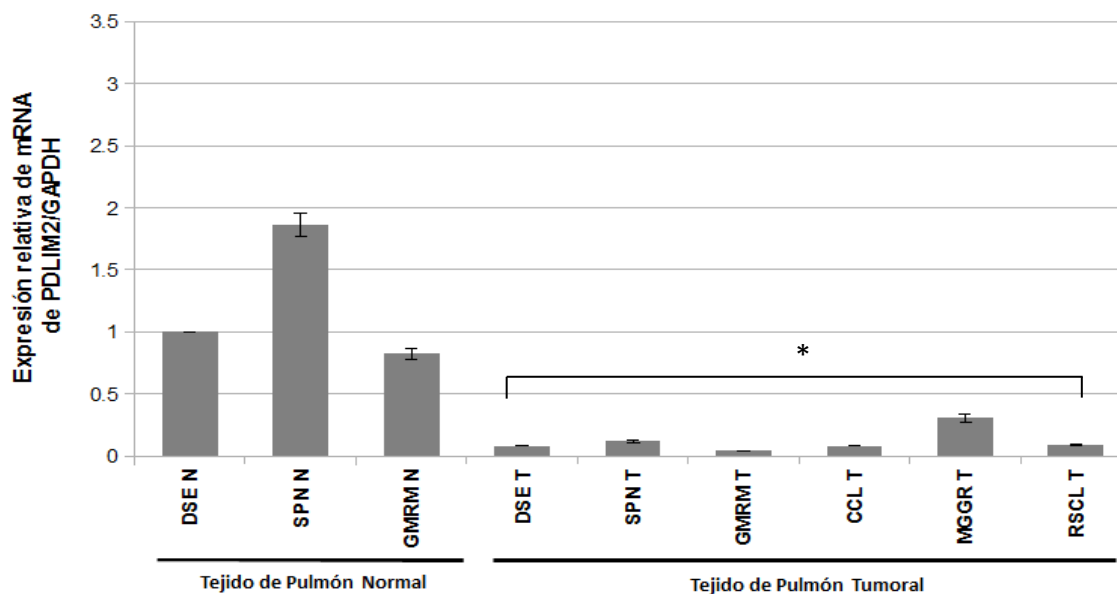
Cabe destacar que la expresión del mRNA de SORBS3 disminuye significativamente ( $p < 0.01$ ) en tejido tumoral de ambos grupos de pacientes, tanto en presencia como ausencia de factores de riesgo ambiental, entre ellos el humo de leña (Figuras 13 y 14). Asimismo, se observa represión transcripcional para el gen PDLIM2 en ambos grupos de pacientes (Figuras 15 y 16), en contraste de SORBS3, quienes muestran mayor represión epigenética en el grupo de pacientes libres a factores de riesgo (Figura 14).

### Pacientes Con Factor de Riesgo (Humo de Leña)



**Figura 15.** Análisis de expresión relativa del mRNA para el gen PDLIM2 en tejido pulmonar histológicamente normal y tejido tumoral derivado de pacientes con cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma, bajo exposición a factores de riesgo (Humo de Leña), empleando para ello análisis de normalización contra del gen endógeno GAPDH. Datos representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=2; \*p < 0.01).

### Pacientes Sin Factor de Riesgo



**Figura 16.** Análisis de expresión relativa del mRNA para el gen PDLIM2 en tejido pulmonar histológicamente normal y tejido tumoral derivado de pacientes con cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma, libres a factores de riesgo, empleando para ello análisis de normalización contra del gen endógeno GAPDH. Datos representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=2; \*p < 0.01).

## 9. Discusión

Los resultados demuestran la existencia de represión epigenética sobre la expresión del mRNA de ambos genes supresores de tumor SORBS3 y PDLIM2, en 2 modelos celulares de cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma de origen caucásico A549 y A427; así como 2 modelos celulares derivados de pacientes de origen mestizo mexicano INER37 e INER51. No obstante, resultados previos han reportado disminución en la expresión del mRNA de SORBS3 en líneas celulares de fibroblastos transformadas por v-Src (Umamoto *et al.*, 2009), en tumores de cáncer de ovario (Hough *et al.* 2000); así como, en pacientes con hepatocarcinomas (Roessler *et al.*, 2012). Asimismo se ha descrito disminución en los niveles del mRNA de PDLIM2 en modelos celulares de leucemia (Yan *et al.*, 2009), líneas celulares de cáncer de colon (Qu *et al.*, 2010b) y cáncer de mama, en ambos receptor de estrógenos negativas y positivas (Qu *et al.*, 2010a) sin embargo, nuestros resultados son los primeros en demostrar represión transcripcional de SORBS3 y PDLIM2 en modelos celulares de cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma.

Al respecto una posible explicación sobre la disminución en la expresión de SORBS3, está centrada en la función biológica que desarrolla la proteína vinexina, codificada por el gen SORBS3, capaz de inhibir la vía de señalización de AKT (Chen *et al.*, 2013) la cual se encuentra hiperactiva en la mayoría de los tipos de cáncer promoviendo proliferación, supervivencia y crecimiento celular, así como angiogénesis del tumor (Testa & Tsiichlis, 2005). Por lo tanto, para el tumor resulta necesario inactivar transcripcionalmente a SORBS3 evitando que interfiera con el silenciamiento de la vía AKT. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes que asocien el silenciamiento de SORBS3 con la hiperactivación de la vía de señalización AKT y la progresión tumoral.

Adicional a ello, otra probable explicación del silenciamiento transcripcional-epigenético de SORBS3 se encuentra centrada sobre la expresión de vinexina, capaz de aumentar la activación de la vía de señalización JNK/SAPK (Akamatsu *et al.*, 1999). En este sentido, se ha reportado que JNK se encarga de inducir muerte celular mediada por el supresor de tumores p53 (Sabatini *et al.*, 2005). No

obstante, no existen datos que permitan relacionar a SORBS3 con la activación de la vía JNK/SAPK en cáncer.

Adicional a ello, es posible interpretar que la disminución del mRNA de PDLIM2 en los modelos celulares de cáncer pulmonar (A549, A427, INER51 e INER37) resulta indispensable para impedir que la proteína PDLIM2 inhiba la activación constitutiva de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (subunidad p65), STAT1 y STAT4, a través del secuestro intranuclear y su posterior degradación proteosomal, como se ha descrito en distintos tipos de cáncer (Tanaka *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2007; Qu *et al.*, 2010a; Qu *et al.*, 2010b). Sin embargo, hasta el momento no existen datos que permitan confirmar que dicho mecanismo suceda en pacientes con cáncer pulmonar.

Nuestro análisis de expresión del mRNA de SORBS3 y PDLIM2 sobre modelos celulares de cáncer pulmonar tipo de adenocarcinoma pulmonar (A549, A427, INER51 e INER37), permitió describir que la existencia de represión transcripcional ocurre a través de mecanismos de regulación epigenética, ya sea dependientes de metilación del DNA, y/o dependientes de mecanismos de remodelación de la cromatina, dependientes de la actividad de HDACs. Al respecto, en primera instancia y con base a los resultados de la técnica de PCR específica de metilación “MSP” se demostró que el gen SORBS3 se encuentra hipermetilado en dos líneas celulares de cáncer pulmonar “A549 y A427”, sugiriendo que la metilación del DNA constituye el mecanismo responsable de la represión transcripcional, probablemente como se ha demostrado para otros genes supresores de tumor, como *MLH1*, *TIMP3* o *p16* para otros tipos de cáncer (Cameron *et al.*, 1999; Ghosal *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2007; Walton *et al.*, 2008). No obstante, cuando se tratan tales modelos celulares con 5’aza-dC, inhibidor de DNMT’s, sólo es posible observar un aumento en la expresión del mRNA de SORBS3 en A549, confirmando que este mecanismo epigenético por metilación del DNA es dominante sobre los mecanismos de remodelación de la cromatina. Mientras que el resto de los modelos celulares estudiados como A427 e INER51, poseen como principal mecanismo de represión transcripcional de SORBS3, la actividad de HDACs o remodelación de la cromatina, ya que es posible observar



incremento del nivel del mRNA de SORBS3, cuando estas líneas celulares son tratadas mediante TSA, como agente inhibidor de HDACs, en contraste del tratamiento con 5'aza-dC, sugiriendo que la promoción de hiperacetilación de histonas modifica la estructura de la cromatina conduciendo la inducción transcripcional del silenciamiento de SORBS3. Al respecto, este hallazgo resulta interesante, ya que diversos autores reportan que la desacetilación de histonas por tratamiento con TSA es incapaz de inducir la re-expresión de genes silenciados por hipermetilación de secuencias promotoras (Cameron *et al.*, 1999; Ghosal *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2007; Walton *et al.*, 2008). No obstante, contribuyen en favor del conocimiento de la reactivación epigenética mediante el uso de TSA, como previamente se ha demostrado por diversos autores (Xiong *et al.*, 2005; Ou JN, *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013), resultando en controversia respecto al efecto causado por TSA sobre modelos celulares de cáncer. Por otro lado, destaca que ninguno de los tratamientos empleados permitió reactivar la expresión de SORBS3 de manera significativa sobre el modelo celular INER37, asimismo evidenciado de manera preliminar a través de la técnica de MSP, que su promotor se encuentra parcialmente metilado. Sugiriendo la presencia de un mecanismo de represión adicional al epigenético, entre ellos mecanismos de carácter post-transcripcional, como la acción de RNAs pequeños no codificantes, como los micro-RNAs (miRNA) regulando negativamente la expresión genética de SORBS3 en el modelo celular INER37. Ejemplo de ello es la acción descrita de miR-199a el cual reprime la expresión de HIF1 $\alpha$  en células de carcinoma pulmonar del grupo NSCLC (Ding *et al.*, 2013). En suma, la represión transcripcional de SORBS3 por metilación del DNA ocurre en A549 mientras que la remodelación de la cromatina es el mecanismo con mayor influencia sobre la represión de SORBS3 en ambos modelos celulares A427 e INER51.

Por otro lado, destaca que el gen PDLIM2 se encuentra hipermetilado en ambos modelos celulares A549 y A427, en congruencia con otros autores quienes reportan que PDLIM2 posee hipermetilación de su promotor en modelos celulares de cáncer de colon y cáncer de mama, en leucemias de células T (ATL) y en líneas celulares del tipo ATL (TL-Om1) (Yan *et al.*, 2009; Qu *et al.*, 2010a; Qu *et*

*al.*, 2010b). En cambio dentro del modelo celular INER37, PDLIM2 se encuentra parcialmente metilado, de acuerdo al método de PCR específica de metilación (MSP). Sin embargo, PDLIM2 hipermetilado en el modelo celular A549 muestra dependencia de ambos mecanismos de regulación epigenética tanto por mecanismos de remodelación de la cromatina, como metilación del DNA cuando dicho modelo celular es tratado mediante 5'aza-dC y TSA de manera independiente, como también sucede sobre el modelo celular INER51. Lo cual sugiere en ambos casos la cooperación dinámica de estos mecanismos epigenéticos, como previamente se ha demostrado sobre otros genes supresores de tumor (Cameron *et al.*, 1999; Ghosal *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2007; Walton *et al.*, 2008), destacando por primera vez la presencia de dicho mecanismo en modelos celulares del cáncer pulmonar sobre el gen supresor de tumor PDLIM2.

Sin embargo, contrario a lo anterior llama la atención que el tratamiento combinado por Aza/TSA no aumente sinérgicamente el nivel de expresión de PDLIM2, sugiriendo un efecto adverso provocado por la inhibición de DNMT's en combinación de inhibición de HDAC's, probablemente a través de la activación de un inhibidor putativo de la transcripción de PDLIM2 en cáncer pulmonar, como se ha descrito previamente como posible mecanismo de represión transcripcional mediante el uso combinado por 5-Aza/TSA sobre la expresión del receptor de andrógenos (AR) en modelos celulares *in vitro* de cáncer de próstata DU-145 y PC-3 (Walton *et al.*, 2008).

Por otro lado, en el modelo celular A427 sucede todo lo contrario a lo observado en ambos modelos celulares A549 e INER51. Donde se detecta una inducción de la expresión de PDLIM2 siete veces sobre el nivel de expresión mostrado por PBMC's, ello en presencia de tratamiento por 5'aza/TSA. Del mismo modo, el tratamiento con 5'aza-dC, provocó inducción no significativa en la expresión de PDLIM2. Lo cual sugiere que, en los modelos celulares A549, INER51 y A427, ambos mecanismos: metilación del DNA, como remodelación de la cromatina por enzimas desacetilasas de histonas "HDACs" cooperan de forma dinámica al silenciar transcripcionalmente a PDLIM2. Estos hallazgos, confirman las

evidencias de varios autores quienes reportan que la metilación del DNA, constituye el mecanismo principal de represión para PDLIM2 en diversos tipos de cáncer, entre ellos cáncer de colón, cáncer de mama y leucemias tipo ATL (Yan *et al.*, 2009; Qu *et al.*, 2010a; Qu *et al.*, 2010b). Sin embargo, dichos autores no evaluaron niveles superiores de organización epigenética, como es la remodelación de la cromatina, la cual funciona de manera cooperativa con la metilación del DNA genómico para reprimir transcripcionalmente a PDLIM2 en líneas celulares del tipo adenocarcinoma, siendo resultados no descritos hasta el momento por ningún autor.

Al respecto, el modelo celular INER37 no mostró inducción de la expresión del mRNA de PDLIM2 y SORBS3. En este sentido, una probable explicación del fenómeno es la descrita por Zhao y colaboradores en 2005, quienes observaron silenciamiento del gen MGMT, en presencia de hipometilación del DNA en secuencias promotoras. Por lo que examinaron posibles mecanismos involucrados en el silenciamiento, concluyendo que la dimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3k9me2) así como la unión de proteínas de unión a CpG's metiladas (MeCP2) son capaces de influir de forma determinante en el silenciamiento de MGMT (Zhao *et al.*, 2005). Lo cual sugiere que estos mecanismos epigenéticos pudieran estar involucrados en la represión transcripcional de SORBS3 y PDLIM2, en el modelo celular INER37, cuyos mecanismos no fueron evaluados en el presente proyecto. Aunque, también existe la posibilidad de que la expresión del mRNA de ambos genes en INER37 este siendo regulada por la acción de los miRNAs (Ding *et al.*, 2013), cuyo mecanismo resultaría de amplio interés evaluar.

En conclusión, la represión transcripcional de PDLIM2 contempla la cooperación, entre ambos mecanismos tanto metilación del DNA, como remodelación de la cromatina en los modelos celulares A549, A427 e INER51.

Por otro lado, en la actualidad permanecen vigentes dos modelos epigenéticos que permiten explicar la represión transcripcional (Curradi *et al.*, 2002; Cedar & Bergman, 2009).

Respecto a lo anterior, el primer modelo describe como el DNA hipermetilado recluta proteínas de unión a citosinas metiladas, las cuales a su vez reclutan a HDAC's, provocando estructuras de la cromatina altamente condensadas en favor de la inactivación transcripcional (Curradi *et al.*, 2002). Por lo que, inhibidores de HDAC's como el TSA, bajo algunas condiciones no permiten activación transcripcional (Figura 3A), ya que al parecer no resulta suficiente descompactar a la cromatina, sino acompañarlo con disminución de hipermetilación del DNA, mediante inhibidor de DNA metiltransferasas (5'-Aza). Por lo que, evitamos la metilación del DNA, así como eventos epigenéticos posteriores activando la transcripción genética (Figura 3A).

El segundo modelo sugiere que el primer paso para la represión transcripcional constituye el reclutamiento de enzimas metiltransferasas de histonas, así como presencia de HDACs en sitios de genes en proceso de inactivación, provocando compactación de la cromatina capaz de inactivar genes localizados en dicha región, asimismo con el objetivo de mantener establemente la represión en dicho sitio, complejos proteicos reclutan DNA metil-transferasas al sitio requerido, provocando hipermetilación del DNA complementando la represión transcripcional (Cedar & Bergman, 2009; Ou JN, *et al.*, 2007). Por esta razón, cuando tratamos a células con 5'-Aza, bajo ciertas condiciones no resulta posible inducir activación transcripcional (Figuras 4A y 6A), debido al efecto sumatorio o sinérgico independiente involucrando tanto HDAC's como DNMTs para lograr activación transcripcional (Figuras 4A y 6A).

Adicional al fenómeno descrito en modelos celulares *in vitro*, hemos demostrado que la represión transcripcional de ambos genes supresores de tumor, sucede también en tumores sólidos pulmonares derivados de pacientes con cáncer pulmonar. A este respecto, Hough y colaboradores (2000) han reportado disminución del mRNA de SORBS3 en tumores de ovario; así como en hepatocarcinomas (HCC) (Roessler *et al.*, 2012). Sin embargo, los resultados del presente estudio describen por primera vez el fenómeno de represión transcripcional de SORBS3 en tumores sólidos de pacientes con cáncer pulmonar.

De la misma manera, se han reportado niveles bajos del mRNA de PDLIM2 en pacientes con leucemias del tipo ATL (Yan *et al.*, 2009), así como en líneas celulares de cáncer de colon y mama (Qu *et al.*, 2010a; Qu *et al.*, 2010b). Sin embargo, los resultados del presente trabajo describen por primera vez la disminución de la expresión del mRNA de PDLIM2 en tumores sólidos derivados de pacientes con cáncer pulmonar, de manera preliminar al parecer de forma independiente de la exposición a factores de riesgo ambiental.

Por último, se ha descrito que las causas del cáncer pulmonar se atribuyen al efecto estocástico causado por factores de riesgo ambiental, tales como humo de leña, tabaco o derivados de compuestos de arsénico, compuestos aromáticos, níquel, asbestos, polvos de sílice y otros agentes carcinógenos. No obstante, existen reportes de pacientes con cáncer pulmonar libres de exposición a factores de riesgo (Field & Withers, 2012). Con el propósito de describir y proponer a los genes SORBS3 y a PDLIM2 como candidatos a marcadores epigenéticos en cáncer pulmonar, fueron analizados dos grupos de pacientes con cáncer pulmonar, tales como: *i)* pacientes con exposición a humo de leña y *ii)* pacientes libres a factores de riesgo. De manera sorprendente la comparación del perfil de expresión del mRNA entre tumores derivados de pacientes con exposición a humo de leña y libres a factores de riesgo mostró escasas diferencias; identificando represión transcripcional de los genes supresores de tumor SORBS3 y PDLIM2 en ambos grupos de pacientes. Dicho hallazgo resulta de gran importancia en la oncología molecular, ya que sugiere que aún en presencia de un ambiente libre de humo de leña, se conduce al desarrollo de la represión transcripcional de los genes supresores de tumor SORBS3 y PDLIM2, como factores claves en el desarrollo de la tumorigenesis pulmonar.

En resumen, con base en el análisis de expresión y ensayos de metilación del DNA, el estudio de modelos celulares de cáncer pulmonar y carcinomas sólidos pulmonares, permiten proponer a los genes supresores de tumor SORBS3 y PDLIM2 como probables nuevos marcadores epigenéticos del cáncer pulmonar.

## 10. Conclusiones

- ✚ El análisis epigenético reveló que ambos genes supresores de tumor SORBS3 y PDLIM2, se encuentran reprimidos a nivel de mRNA, en diferentes modelos celulares de cáncer pulmonar (A549, A427, INER51 e INER37) *in vitro*.
- ✚ El análisis cualitativo de metilación de la secuencia promotora del gen SORBS3, identificó hipermetilación de los modelos celulares de cáncer pulmonar (A549 y A427).
- ✚ Se demuestra que el mecanismo de mayor influencia asociado con represión transcripcional-epigenética del gen SORBS3, es el mecanismo de metilación del DNA en secuencias promotoras del modelo celular A549.
- ✚ La hipermetilación del promotor de SORBS3 y la remodelación de la cromatina representan el mecanismo epigenético dominante sobre la represión transcripcional en los modelos celulares A427 e INER51.
- ✚ PDLIM2 se encuentra hipermetilado en modelos celulares A549 y A427; mientras que INER37, probablemente posee metilación parcial.
- ✚ Mecanismos sinérgicos de metilación del DNA y acetilación de histonas en la cromatina, influyen en la represión dinámica de PDLIM2, en 3 de 4 modelos celulares de cáncer pulmonar (A549, A427 e INER51).
- ✚ Ambos genes supresores de tumor SORBS3 y PDLIM2 se encuentran silenciados epigeneticamente en tumores sólidos derivados de pacientes con cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma, independientemente de su exposición a factores de riesgo ambiental.

## 11. Perspectivas

Los resultados de este trabajo aportan un nuevo entendimiento sobre el silenciamiento de genes supresores tumor en carcinomas pulmonares. Asimismo, sugieren definir experimentalmente la responsabilidad de SORBS3 y/o PDLIM2 en la formación de colonias tumorales y migración tumoral *in vitro*; así como determinar su participación en procesos de transformación y progresión tumoral *in vivo* mediante ratones inmuno-comprometidos; O bien mediante el empleo de modelos de progresión tumoral de origen epitelial, como el cáncer pulmonar donde a la fecha, no existen evidencias sobre su participación en procesos de carcinogénesis.

Por otra parte, resulta importante determinar cuantitativamente el estado de metilación de SORBS3 y PDLIM2, como marcadores epigenéticos en pacientes, mediante ensayos de secuenciación del promotor (Seq-Bis) o bien mediante la técnica de High Resolution Melting (HRM) (Q-PCR-Bis) en muestras de pacientes en distintas etapas clínicas de la enfermedad neoplásica pulmonar. No obstante, resulta difícil el análisis de muestras de tejido pulmonar en fresco, en fases tempranas, por lo que se sugiere realizar el estudio de modelos de progresión neoplásica pulmonar en ratones; así como evaluar el nivel de metilación a lo largo de la transformación neoplásica hasta su fase tardía; lo cual nos permitirá conocer en que momento del desarrollo tumoral ocurre el silenciamiento epigenético por metilación de SORBS3 y PDLIM2 en cáncer pulmonar. Adicional a ello, se propone la posibilidad de detectar la hipermetilación del DNA en circulación sanguínea, o fluidos biológicos como saliva, materia fecal y orina en pacientes, como lo describe Maxwell y colaboradores en 2009; en contraste del uso de métodos quirúrgicos invasivos en pacientes.

Adicionalmente, resulta importante realizar estudios epigenéticos completos sobre la región citogenética de SORBS3 y PDLIM2, que permitan determinar el código histórico de control transcripcional, como H3K9me3 y H3K4me3, así como H3k27me3 y H3K27Ac al igual que proteínas de unión al DNA en regiones CpG's

metiladas (MeCP2), probablemente involucrados en el silenciamiento transcripcional de la región Chr:8p21.3 en cáncer pulmonar.



## 12. Literatura citada

1. Akamatsu M., Aota S., Suwa A., Ueda K., Amachi T., Yamada K.M., Akiyama S.K. & Kioka N. 1999. Vinexin forms a signaling complex with Sos and modulates epidermal growth factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activities. *J Biol Chem* 274 (50):35933-35937.
2. Albini A. & Sporn M.B. 2007. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer*. 7(2):139-147.
3. Berges G. & Benjamin E. L. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Rev. Cancer* 3: 401-410.
4. Bergman Y. & Cedar H. 2013. DNA methylation dynamics in health and disease. *Nat. Struct. & Mol. Biol.* 20 (3): 274-281.
5. Berx G. & Van Roy F. 2009. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1.
6. Bierie B. & Moses H.L. 2006. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 506-520.
7. Blasco M.A. 2005. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* 6(8):611-622.
8. Bradley A.W., Chimenti M., Jacobson M.P. & Barber D.L. 2011. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nature Rev. Cancer* 11: 671-677.
9. Cameron E.E., Bachman K.E., Myöhänen S., Herman J.G. & Baylin S.B. 1999. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21 (1):103-107.
10. Carvalho R.H., Haberle V., Hou J., van Gent T., Thongjuea S., van Ijcken W., Kockx C., Brouwer R., Rijkers E., Sieuwerts A., Foekens J., van Vroonhoven M., Aerts J., Grosveld F., Lenhard B. & Philipsen S. 2012. Genome-wide DNA methylation profiling of non-small cell lung carcinomas. *Epigenetics Chromatin.* 22; 5(1):9.

11. Cedar H. & Bergman Y. 2009. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet.* 10 (5):295-304.
12. Cerecedo Z.C.M., R.P. Gonzaga, R.D.A. Limón, A. Álvarez, J.L. Téllez, C. Pérez & F. Ávila-Moreno. 2009. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 22 (4): 316-327.
13. Chen K., Gao L., Liu Y., Zhang Y., Jiang D.S., Wei X., Zhu X.H., Zhang R., Chen Y., Yang Q., Kioka N., Zhang X.D. & Li H. 2013. Vinexin- $\beta$  protects against cardiac hypertrophy by blocking the Akt-dependent signalling pathway. *Basic Res Cardiol* 108 (2): 2-14.
14. Cimino Y., Costes A., Damotte D., Validire P., Mistou S., Cagnard N., Alifano M., Regnard J.F., Chiocchia G., Fridman S.C. & Tourneur L. 2012. FADD protein release mirrors the development and aggressiveness of human non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 106, 1989-1996.
15. Coussens L.M. & Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature.* 420 (6917):860-867.
16. Curradi M., Izzo A., Badaracco G. & Landsberger N. 2002. Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Mol Cell Biol.* 22 (9):3157-3173.
17. de Lucio B., Manuel V. & Barrera-Rodríguez R. 2005. Characterization of human NSCLC cell line with innate etoposide-resistance mediated by cytoplasmic localization of topoisomerase II alpha. *Cancer Sci.* 96(11):774-783.
18. Demaria M., Misale S., Giorgi C., Miano V., Camporeale A., Campisi J., Pinton P. & Poli V. 2012. STAT3 can serve as a hit in the process of malignant transformation of primary cells. *Cell Death Differ* 19 (8):1390-1397.
19. Ding G., Huang G., Liu H.D., Liang H.X., Ni Y.F., Ding Z.H., Ni G.Y. & Hua H.W. 2013. MiR-199a suppresses the hypoxia-induced proliferation of non-small cell lung cancer cells through targeting HIF1 $\alpha$ . *Mol Cell Biochem.* 10, 1795-1803.

20. Ellis L., Atadja P.W. & Johnstone RW. 2009. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther.* 8(6):1409-1420.
21. Elkins J.M., Gileadi C., Shrestha L., Phillips C., Wang J., Muniz J.R. & Doyle D.A. 2010. Unusual binding interactions in PDZ domain crystal structures help explain binding mechanisms. *Protein Science* 19 (4):731-741.
22. Field W.R. & Withers L.B. 2012. Occupational and Environmental Causes of Lung Cancer. *Clin Chest Med* 33 681-703.
23. Ghoshal K., Datta J., Majumder S., Bai S., Dong X., Parthun M. & Jacob S.T. 2002. Inhibitors of histone deacetylase and DNA methyltransferase synergistically activate the methylated metallothionein I promoter by activating the transcription factor MTF-1 and forming an open chromatin structure. *Mol Cell Biol* 22 (23):8302-8319.
24. Gonzalo S. 2010. Epigenetic alterations in aging. *J Appl Physiol* 109: 586-597.
25. Hanahan D. & R.A. Weinberg. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57-70.
26. Hanahan D. & R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144: 646-674.
27. Hanash S. 2004. Integrated global profiling of cancer. *Nature Rev Cancer* 4: 638-643.
28. Heller G., Weinzierl M., Noll C., Babinsky V., Ziegler B., Altenberger C., Minichsdorfer C., Lang G., Döme B., End-Pfützenreuter A., Arns B.M., Grin Y., Klepetko W., Zielinski C.C. & Zöchbauer-Müller S. 2012. Genome-wide miRNA expression profiling identifies miR-9-3 and miR-193a as targets for DNA methylation in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res.* 15; 18(6):1619-1629
29. Heyn H. & Esteller M. 2012. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet.* 13 (10):679-692.
30. Hough C.D, Sherman-Baust C.A., Pizer E.S., Montz F.J., Im D.D, Neil B. Rosenshein N.B., Kathleen R. Cho K.R., Riggins G.J., & Morin P.J. 2000. Large-Scale Serial Analysis of Gene Expression Reveals Genes

- Differentially Expressed in Ovarian Cancer. *Cancer Research* 60, 6281-6287.
31. Hubers A.J., Prinsen C.F., Sozzi G., Witte B.I. & Thunnissen E. 2013. Molecular sputum analysis for the diagnosis of lung cancer. *Br J Cancer*. 6; 109(3):530-537.
  32. Igney F.H. & Krammer P.H. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2 (4):277-288.
  33. INEGI. 2012. Estadísticas de Mortalidad. Cubos dinámicos. Procesó **INEGI**.
  34. Issa J.P & Kantarjian H.M. 2009. Targeting DNA methylation. *Clin Cancer Res* 15: 3938-3946.
  35. Jemal A., Bray, M. Melissa, J. Ferlay, E. Ward & D. Forman. 2011. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90.
  36. Jones, P.A. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Rev. Genet.* 13 (7): 484-492.
  37. Kalari S., Jung M., Kernstine K.H., Takahashi T. & Pfeifer G.P. 2013. The DNA methylation landscape of small cell lung cancer suggests a differentiation defect of neuroendocrine cells. *Oncogene*. 32(30):3559-3568.
  38. Kalluri R. 2003. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 3(6):422-433.
  39. Kerr K.M., Galler J.S., Hagen J.A., Laird P.W. & Laird-Offringa I.A. 2007. The role of DNA methylation in the development and progression of lung adenocarcinoma. *Dis Markers*. 23 (1-2):5-30.
  40. Kioka N., S. Sakata, T. Kawauchi, T. Amachi, S.K. Akiyama, K. Okazaki, C. Yaen, K.M. Yamada & S. Aota. 1999. Vinexin: a novel vinculin-binding protein with multiple SH3 domains enhances actin cytoskeletal organization. *J Cell Biol* 144: 59-69.
  41. Kioka N, T. Ito, H. Yamashita, N. Uekawa, T. Umemoto, S. Motoyoshi, H. Imai, K. Takahashi, H. Watanabe, M. Yamada & K. Ueda. 2010. Crucial role of vinexin for keratinocyte migration in vitro and epidermal wound healing in vivo. *Exp Cell Res* 316(10): 1728-1738.

42. Li M., Liu G.H. & Izpisua Belmonte J.C. 2012. Navigating the epigenetic landscape of pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13 (8):524-535.
43. Liu N., Zhao L.J., Li X.P., Wang J.L., Chai G.L. & Wei L.H. 2012. Histone deacetylase inhibitors inducing human cervical cancer cell apoptosis by decreasing DNA-methyltransferase 3B. *Chin Med J (Engl)* 125 (18):3273-3278.
44. Loughran G., Healy N.C., Kiely P.A., Huigsloot M., Kedersha N.L. & O'Connor R. 2005. Mystique is a new insulin-like growth factor-I-regulated PDZ-LIM domain protein that promotes cell attachment and migration and suppresses Anchorage-independent growth. *Mol Biol Cell* 16 (4):1811-1822.
45. Luger K., Dechassa M.L. & Tremethick D.J. 2012. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13 (7):436-447.
46. Markl I.D., Cheng J., Liang G., Shibata D., Laird P.W. & Jones P.A. 2001. Global and gene-specific epigenetic patterns in human bladder cancer genomes are relatively stable in vivo and in vitro over time. *Cancer Res* 61 (15):5875-5884.
47. Medina P.P., Romero O.A., Kohno T., Montuenga L.M., Pio R., Yokota J. & Sanchez-Cespedes M. 2008. Frequent BRG1/SMARCA4-inactivating mutations in human lung cancer cell lines. *Hum Mutat* 29: 617-622.
48. Meng C.F., Zhu X.J., Peng G. & Dai D.Q. 2007. Re-expression of methylation-induced tumor suppressor gene silencing is associated with the state of histone modification in gastric cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 13 (46):6166-6171.
49. Minna J.D., Roth J.A. & Gazdar A.F. 2002. Focus on lung cancer. *Cancer cell* 1, 49-52.
50. Minucci S. & Pelicci P.G. 2006. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer.* 6(1):38-51.
51. Mizutani K, H. Ito, I. Iwamoto, R. Morishita, T. Deguchi, Y. Nozawa, T. Asano & K.I. Nagata. 2007. Essential roles of ERK-mediated

- phosphorylation of vinexin in cell spreading, migration and anchorage-independent growth. *Oncogene* 26(50): 7122-7131.
52. Muers M. 2013. Disentangling DNA methylation. *Nature Review Genetic* 14, 519.
53. Nagata K., H. Ito, I. Iwamoto, R. Morishita & T. Asano. 2009. Interaction of a multi-domain adaptor protein, vinexin, with a Rho-effector, Rhotekin. *Med Mol Morphol* 42(1): 9-15.
54. Narayan C. & Kumar A. 2012. Constitutive over expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, NF- $\kappa$ B, and Stat3 is a potential cause of lung tumorigenesis in urethane (ethyl carbamate) induced Balb/c mice. *J Carcinog.* 9:1-10.
55. Ou J.N., Torrisani J., Unterberger A., Provençal N., Shikimi K., Karimi M., Ekström T.J. & Szyf M. 2007. Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces global and gene-specific DNA demethylation in human cancer cell lines. *Biochem Pharmacol.* 1; 73(9):1297-1307.
56. Park J.Y., Kim D., Yang M., Park H.Y., Lee S.H., Rincon M., Krehling J., Plass C., Smiraglia D.J., Tockman M.S. & Kim S.J. 2013. Gene silencing of SLC5A8 identified by genome-wide methylation profiling in lung cancer. *Lung Cancer.* 79(3):198-204.
57. Ponce de León V. & Barrera-Rodríguez R. 2005. Changes in P-glycoprotein activity are mediated by the growth of a tumour cell line as multicellular spheroids. *Cancer Cell Int.* 7; 5(1):1-13.
58. Portela A. & Esteller M. 2010. Epigenetic modifications and human Disease. *Nat Biotechnol* 28, (10):1057-1068.
59. Qu Z., J. Fu, P. Yan, J. Hu, S. Cheng & G. Xiao. 2010a. Epigenetic Repression of PDZ-LIM Domain-containing Protein 2. Implications for the biology and treatment of breast cancer. *J. Biol. Chem* 285 (16): 11786-11792.
60. Qu Z., P. Yan, J. Fu, J. Jiang, M.J. Grusby, T.E. Smithgall & G. Xiao. 2010b. DNA methylation-dependent repression of PDZ-LIM domain-containing protein 2 in colon cancer and its role as a potential therapeutic target. *Cancer Res* 70(5): 1766-1772.

61. Qian B.Z., & Pollard J.W. 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39-51.
62. Rius M. & Lyko F. 2012. Epigenetic cancer therapy: rationales, targets and drugs. *Oncogene*. 31 (39):4257-4265.
63. Roessler S., Long E.L., Budhu A., Chen Y., Zhao X., Ji J., Walker R., Jia H.L., Ye Q.H., Qin L.X., Tang Z.Y., He P., Hunter K.W., Thorgeirsson S.S., Meltzer P.S. & Wang X.W. 2012. Integrative Genomic Identification of Genes on 8p Associated With Hepatocellular Carcinoma Progression and Patient Survival. *Gastroenterology* 142 (4): 957-966.
64. Sabatini N., Di Giacomo V., Rapino M., Rana R., Garaci G. & Cataldi A. 2005. JNK/p53 mediated cell death response in K562 exposed to etoposide-ionizing radiation combined treatment. *J Cell Biochem* 95 (3):611-619.
65. Secretaría de Salud México. 2000. Mortalidad general y mortalidad general por sexos.
66. Selamat S.A., Chung B.S., Girard L., Zhang W., Zhang Y., Campan M., Siegmund K.D., Koss M.N., Hagen J.A., Lam W.L., Lam S., Gazdar A.F. & Laird-Offringa I.A. 2012. Genome-scale analysis of DNA methylation in lung adenocarcinoma and integration with mRNA expression. *Genome Res.* 22, 1197-1211.
67. Singh V., Sharma P. & Capalash N. 2013. DNA methyltransferase inhibitors as epigenetic therapy for cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 13(4): 379-399.
68. Stewart S.A & Weinberg R.A. 2006. Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22: 531-557.
69. Tan S., Sun C., Wei X., Li Y., Wu Y., Yan Z., Feng F., Wang J. & Wu Y. 2013. Quantitative assessment of lung cancer associated with genes methylation in the peripheral blood. *Exp Lung Res.* 39 (4-5):182-190.
70. Tanaka T., Soriano M.A. & Grusby M.J. 2005. SLIM is a nuclear ubiquitin E3 ligase that negatively regulates STAT signaling. *Immunity* 22 (6):729-736.
71. Tanaka T., Grusby M.J. & Kaisho T. 2007. PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF-kappaB activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit. *Nature Immunology* 8 (6): 584-591.

72. Teng M.W.L., Swann J.B., Koebel C.M., Schreiber R.D., & Smyth M.J. 2008. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J. Leukoc. Biol.* 84, 988-993.
73. Testa J.R. & Tsichlis P.N. 2005. AKT signaling in normal and malignant cells. *Oncogene* 24 (50):7391-7393.
74. Timp W. & Feinberg P.A. 2013. Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host. *Nature Review Cancer*, 13:497-510.
75. Torrado M., Senatorov V.V., Trivedi R., Fariss R.N. & Tomarev S.I. 2004. Pdlim2, a novel PDZ-LIM domain protein, interacts with alpha-actinins and filamin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45 (11):3955-3963.
76. Umemoto T., Inomoto T., Ueda K., Hamaguchi M. & Kioka N. 2009. v-Src mediated transformation suppresses the expression of focal adhesion protein vinexin. *Cancer Letters* 279, 22-29.
77. Walton T.J., Li G., Seth R., McArdle S.E., Bishop M.C. & Rees R.C. 2008. DNA demethylation and histone deacetylation inhibition co-operate to re-express estrogen receptor beta and induce apoptosis in prostate cancer cell-lines. *Prostate* 68 (2):210-222.
78. Wilson B.G. & Roberts C.W. 2011. SWI/SNF nucleosoma remodellers and cancer. *Nat Rev Cancer.* 11 (7):481-492.
79. Witsch E., Sela M. & Yarden Y. 2010. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)* 25, 85-101.
80. Wojdacz T.K., Dobrovic A. & Hansen L.L. 2008. Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nature Protocols* 3 (12): 1903-1908.
81. Wong A.K., Shanahan F., Chen Y., Lian L., Ha P., Hendricks K. & Ghaffari S., et al. 2000. BRG1, a component of the SWI-SNF complex, is mutated in multiple human tumor cell lines. *Cancer Res* 60: 6171-6177.
82. Wu J.I. 2012. Diverse functions of ATP-dependent chromatin remodeling complexes in development and cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*; 44(1):54-69.



83. Xiong Y., Dowdy S.C., Podratz K.C., Jin F., Attewell J.R., Eberhardt N.L. & Jiang S.W. 2005. Histone deacetylase inhibitors decrease DNA methyltransferase-3B messenger RNA stability and down-regulate de novo DNA methyltransferase activity in human endometrial cells. *Cancer Res* 65 (7):2684-2689.
84. Yan P., Z. Qu, C. Ishikawa, N. Mori & G. Xiao. 2009. Human T-Cell Leukemia Virus Type I- Mediated Repression of PDZ-LIM Domain-Containing Protein 2 Involves DNA Methylation But Independent of the Viral Oncoprotein Tax. *Neoplasia* 11, 1036-1041.
85. Yang A.S., Estécio M.R.H., Doshi K., Kondo Y., Tajara E.H. & Issa J.P. 2004. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acid Res.* 32 (3): 1-6.
86. Yang L., Pang Y., & Moses H.L. 2010. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 31, 220-227.
87. Yoon S., Woo S.U., Kang J.H., Kim K., Shin H.J., Gwak H.S., Park S. & Chwae Y.J. 2012. NF- $\kappa$ B and STAT3 cooperatively induce IL6 in starved cancer cells. *Oncogene* 31 (29):3467-3481.
88. Zhao W., Soejima H., Higashimoto K., Nakagawachi T., Urano T., Kudo S., Matsukura S., Matsuo S., Joh K. & Mukai T. 2005. The essential role of histone H3 Lys9 di-methylation and MeCP2 binding in MGMT silencing with poor DNA methylation of the promoter CpG island. *J Biochem.* 137 (3): 431-440.
89. Zöchbauer-Müller S., Minna J.D. & Gazdar A.F. 2002. Aberrant DNA methylation in lung cancer: biological and clinical implications. *Oncologist.* 7 (5): 451-457.