



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PERFIL DE METILACIÓN DEL GENOMA EN MODELOS CELULARES DE CÁNCER
PULMONAR, USO DE UNA PLATAFORMA DE ALTA RESOLUCIÓN EN SUB-MEGABASES,
PARA LA BÚSQUEDA DE NUEVOS MARCADORES EPIGENÉTICOS EN CARCINOMAS
PULMONARES DE CÉLULAS NO-PEQUEÑAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

GONZAGA PÉREZ MARÍA DEL ROSARIO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. CLAUDIA MARÍA GARCÍA CUELLAR

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. CARLOS PÉREZ PLASENCIA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, D.F. ENERO, 2016



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

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PERFIL DE METILACIÓN DEL GENOMA EN MODELOS CELULARES DE CÁNCER
PULMONAR, USO DE UNA PLATAFORMA DE ALTA RESOLUCIÓN EN SUB-MEGABASES,
PARA LA BÚSQUEDA DE NUEVOS MARCADORES EPIGENÉTICOS EN CARCINOMAS
PULMONARES DE CÉLULAS NO-PEQUEÑAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

GONZAGA PÉREZ MARÍA DEL ROSARIO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. CLAUDIA MARÍA GARCÍA CUELLAR

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. CARLOS PÉREZ PLASENCIA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, D.F. ENERO, 2016

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 17 de febrero de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (Biología Experimental)** de la alumna **GONZAGA PÉREZ MARÍA DEL ROSARIO** con número de cuenta **93299484**, con la tesis titulada **"PERFIL DE METILACIÓN DEL GENOMA EN MODELOS CELULARES DE CÁNCER PULMONAR, USO DE UNA PLATAFORMA DE ALTA RESOLUCIÓN EN SUB-MEGABASES, PARA LA BÚSQUEDA DE NUEVOS MARCADORES EPIGENÉTICOS EN CARCINOMAS PULMONARES DE CÉLULAS NO-PEQUEÑAS"**, realizada bajo la dirección del **DR. FEDERICO ÁVILA MORENO**:

Presidente: DRA. ANNIE PARDO CEMO
Vocal: DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA
Secretario: DRA. CLAUDIA MARÍA GARCÍA CUELLAR
Suplente: M. EN C. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA
Suplente: DR. CARLOS PÉREZ PLASENCIA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 03 de noviembre de 2015



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e Instituciones que han contribuido a que este trabajo se llevara a cabo.

⇒ Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

⇒ A CONACYT por el otorgamiento de la beca para estudios de posgrado (Número de Becario: 294445).

⇒ A la UNAM-DGAPA por el financiamiento aprobado para el presente trabajo a través de los proyectos IACOD-PAPIIT IA201611, PAPIIT IB202512 y PAPIIT RR282512; así como al proyecto número 5364 aprobado por el Fondo SEP-CONACYT de investigación básica, bajo la conducción del Dr. Federico Ávila Moreno como responsable principal.

⇒ A la Dirección de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) "Ismael Cosío Villegas" por el financiamiento y aprobación del proyecto B18-12 por parte del comité de ciencia y bioética del INER.

⇒ A mi tutor, el Dr. Federico Ávila Moreno por la concepción del proyecto, diseño experimental, revisión, discusión y asignación de financiamiento al presente trabajo de tesis a través de la UNAM, Fondo SEP-CONACYT y Dirección de Investigación del INER.

⇒ A mi Comité Tutorial, la Dra. Claudia María García Cuellar y el Dr. Carlos Pérez Plasencia por su valiosa contribución en la discusión y asesoramiento técnico en ensayos de hibridación en microarreglos académicos SMRT-27k empleados para el presente proyecto.

⇒ A los miembros del jurado, Dra. Annie Pardo Cemo, Dr. Alfredo Hidalgo Miranda, Dra. Claudia María García Cuellar, Dr. Moisés Eduardo Selman Lama y Dr. Carlos Pérez Plasencia por su revisión y valiosas contribuciones al texto de tesis.

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO

- ⇒ Al Dr. Wam Lam y su grupo de investigación en The University of British Columbia, Cancer Agency en Vancouver Canadá por las facilidades otorgadas para la adquisición de los microarreglos de DNA genómico SMRT-Arrays 27k en sub-megabases.

- ⇒ Al Dr. Raúl Barrera por la donación de líneas celulares INER-51 e INER-37 establecidas a partir de efusión pleural maligna de pacientes con diagnóstico de cáncer pulmonar primario, bajo atención médica en el INER.

DEDICATORIAS

A Dios y a la vida por permitirme concluir esta etapa, seguir adelante y estar junto a la gente que amo.

A mis padres por su amor y apoyo incondicional.

A mi hermana Miriam quien siempre ha estado a mi lado en las buenas y en las malas, por disfrutar y festejar conmigo mis victorias y aliviar mis derrotas. Mil gracias por todo lo que me has dado.

A mi hermano Faustino; a pesar que, ya no estás físicamente siempre estarás con nosotros. Fuiste un ejemplo de superación, te quiero hermano.

A mis amigos por estar siempre presentes.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Cáncer	4
1.2. Cáncer Pulmonar y Tipos Histológicos	5
1.3. Alteraciones Genéticas y Epigenéticas en Cáncer Pulmonar	8
1.4. Metilación del DNA	11
1.4.1 Hipometilación del DNA	12
1.4.2 Hipometilación del DNA en cáncer	13
1.4.3 Hipometilación del DNA como indicador diagnóstico y pronóstico en cáncer	13
1.5 Hipermetilación del DNA	14
1.5.1 Hipermetilación del DNA en cáncer pulmonar	14
1.5.2 Hipermetilación del DNA como indicador diagnóstico y pronostico	17
II. ANTECEDENTES	20
2.1 Búsqueda de nuevos marcadores epigenéticos hipermetilados en cáncer pulmonar	20
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
IV. OBJETIVO GENERAL	27
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	27
V. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1 Cultivos y Líneas celulares	28
5.2 Extracción de Ácidos Nucleicos	29
5.3 Hibridación Genómica Comparativa Empleando Microarreglos SMRT (Submegabases Resolution Tiling-set)	29

5.3.1	Plataforma utilizada	29
5.3.2	Preparación del DNA	29
5.3.3	Marcaje del DNA con Alexa Fluor® 555 and Alexa Fluor® 647 dyes	31
5.3.4	Purificación de la reacción de marcaje	32
5.3.5	Hibridación con el microarreglo SMRT	33
5.4	Análisis de Imagen y Análisis Bioinformático	33
	VI.RESULTADOS	34
6.1	Análisis por CGH entre pacientes con cáncer pulmonar	34
6.2	Perfil de metilación adenocarcinoma pulmonar (Línea celular A- 427, Hombre caucásico de 52 años con derrame pleural maligno)	36
6.3	Perfil de metilación adenocarcinoma pulmonar (Línea celular INER-51 Masculino mestizo mexicano de 51 años, INER. derrame pleural de paciente no tratado)	42
6.4	Perfil de metilación adenocarcinoma pulmonar (Línea celular INER-37 Femenino mestizo mexicano de 48 años, INER. Derrame pleural de paciente no tratado)	49
6.5	Identificación de regiones citogenéticas hipermetiladas compartidas entre muestras de cáncer pulmonar tipo AD caucasico y mestizo-mexicano	57
6.6	Propuesta de regiones hipermetiladas para su posterior exploración y validación como objetivos de diagnóstico en cáncer pulmonar	66
	VII. DISCUSIÓN	69
	VIII. CONCLUSIONES	74
	IX.PERSPECTIVA	75
	X. LITERATURA CITADA	76

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Tumor clonal	5
FIGURA 2. Cambios morfológicos en el epitelio bronquial	6
FIGURA 3. Representación gráfica de los cambios morfológicos de la progresión neoplásica pulmonar reconocida por la OMS	7
FIGURA 4. Cambios genéticos y epigenéticos comúnmente observados en cáncer	9
FIGURA 5. Principales mecanismos epigenéticos	10
FIGURA 6. Purificación del DNA marcado	32
FIGURA 7. Comparación del perfil de metilación en cáncer pulmonar.	35
FIGURA 8. Análisis del perfil de metilación de Línea Celular de Cáncer Pulmonar A-427	36
FIGURA 9. Visualización de los datos normalizados en logR2 en el software CGH-Explorer v3.2 de A-427	37
FIGURA 10. Región hipermetilada contiene un gen (C7orf33), cercano al telómero (A-427)	41
FIGURA 11. Análisis del perfil de metilación de Línea Celular de Cáncer Pulmonar INER-51	42
FIGURA 12. Visualización de los datos normalizados en logR2 en el software CGH-Explorer v3.2 de INER-51	43
FIGURA 13. Análisis del perfil de metilación de Línea Celular de Cáncer Pulmonar INER-37	50
FIGURA 14. Visualización de los datos normalizados en logR2 en el software CGH-Explorer v3.2 de INER-37	51
FIGURA 15. Patrón de metilación del DNA del cromosoma 1	66
FIGURA 16. Patrón de metilación del DNA del cromosoma 8	68

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Líneas celulares de cáncer de pulmón.	28
TABLA 2. Condiciones de la reacción enzimática.	30
TABLA 3. Condiciones de la reacción enzimática sensible a metilación.	30
TABLA 4. Condiciones de la reacción de marcaje.	31
TABLA 5. Continuación del protocolo de la reacción de marcaje	32
TABLA 6. Datos obtenidos del análisis en el software CGH-Explorer v3.2 de A-427. BAC's con un índice de fluorescencia $>2.5 \log R^2$ (Hipermetilados)	38
TABLA 7. Datos obtenidos del análisis en el software CGH-Explorer v3.2 de A-427. BAC's con un índice de fluorescencia $-2.0 \log R^2$ (Hipometilados)	39
TABLA 8. Regiones insertadas en BAC's con perfil de Hipermetilación de A-427.	40
TABLA 9. Regiones insertadas en BAC's con perfil de hipometilación de A-427	41
TABLA 10. Datos obtenidos del análisis en el software CGH-Explorer v3.2 de INER-51. BAC'S con un índice de fluorescencia $>2.0 \log R^2$ (Hipermetilados)	44
TABLA 11. Datos obtenidos del análisis en el software CGH-Explorer v3.2 de INER-51. BAC'S con un índice de fluorescencia $-1.0 \log R^2$ (Hipometilados)	45
TABLA 12. Regiones insertadas en BACs con perfil de Hipermatilación de INER-51.	46
TABLA 13. Regiones insertados en BACs hipometilados de INER-51.	47
TABLA 14. Genes relevantes por su función hipermetilados en la línea celular INER-51.	48

TABLA 15. Datos obtenidos del análisis en el software CGH-Explorer v3.2 de INER-37. BAC's con un índice de fluorescencia $\geq 2.0 \log_2$ hipermetilados.	51
TABLA 16. Datos obtenidos del análisis en el software CGH-Explorer v3.2 de INER-37. BAC'S con un índice de fluorescencia $-2.0 \log_2$ (Hipometilados)	53
TABLA 17. Regiones insertados en BACs hipermetilados de INER-37	54
TABLA 18. Regiones insertados en BACs hipometilados de INER-37	55
TABLA 19. Genes relevantes hipermetilados en la línea celular INER-37	56
TABLA 20. Regiones compartidas con A-427 e INER-37 hipermetiladas	58
TABLA 21. Genes relevantes hipermetilados en la líneas celulares A-427 e INER-37	61

RESUMEN

El cáncer pulmonar representa la primera causa de muerte a nivel mundial debida a neoplasias malignas; tan solo en Estados Unidos de Norteamérica (U.S.A) en 2009 fueron registrados 213,380 nuevos casos y 158,086 muertes, mientras que en 2014 se estimaron 224,210 nuevos casos y 159,260 muertes. El cáncer pulmonar se clasifica en 2 grandes grupos SCLC y NSCLC, (Small Cell Lung Carcinoma y Non Small Cell Lung Cancer, respectivamente por sus siglas en inglés). El grupo NSCLC representa aproximadamente el 85% de todos los casos de cáncer pulmonar. Adicionalmente su tasa de sobre-vida global a cinco años representa menos del 15%, principalmente debido al diagnóstico tardío de la enfermedad pulmonar. La ausencia de marcadores tempranos de alta especificidad y sensibilidad, a distintos niveles tanto de expresión del RNAm como proteína, ha obligado a orientar esfuerzos de investigación enfocados al estudio de mecanismos de regulación epigenética, tales como alteraciones en los patrones de metilación del DNA genómico como probables marcadores de diagnóstico temprano, los cuales adicionalmente podrían explicar el desarrollo de aberraciones moleculares en la transformación neoplásica pulmonar. En general, se ha descrito hipometilación global del genoma en células tumorales en contraste de células histológicamente normales, debido principalmente a desmetilación generalizada de dinucleótidos CpGs dispersos a lo largo del genoma; así como hipermetilación local de regiones promotoras. En este sentido, evidencias sugieren que la metilación de novo en islas CpG induce el silenciamiento de genes supresores de tumor, como paso crítico en la transformación de las células tumorales. Por lo que, se propone que la descripción de perfiles de hipermetilación e hipometilación, permitirá identificar y proponer un conjunto de genes y/o regiones genéticas como posibles marcadores epigenéticos para su posterior validación como probables biomarcadores de diagnóstico y/o terapéuticos en cáncer pulmonar.

En este contexto, el presente trabajo estuvo enfocado en la descripción del patrón de metilación global del DNA genómico en líneas celulares establecidas de pacientes con cáncer pulmonar, tanto caucásicos como Mestizos-Mexicanos. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de hibridación genómica comparativa mediante el uso de una plataforma de microarreglos de DNA genómico en submegabases (Submegabases Resolution Tiling-set, SMRT-27k) la cual contiene aproximadamente 32,433 segmentos del genoma humano clonados en BACs (Cromosomas Artificiales Bacterianos) logrando una resolución de 80 kb entre BACs. El DNA genómico de células de cáncer pulmonar fue tratado bajo la combinación de 4 enzimas de restricción sensibles a metilación, las cuales cubren cerca

del 50-80% de sitios CpGs susceptibles de metilación a lo largo del genoma, mismas que incluyen a secuencias promotoras. De este modo, se analizó el epigenoma con base en la detección de patrones de hipermetilación versus hipometilación en el genoma neoplásico pulmonar. Posterior a ello, nuestro análisis bioinformático se enfocó en la identificación de regiones citogenéticas con alto nivel de significancia de hipermetilación e hipometilación, destacando entre otras regiones citogenéticas: 1q32.1 y 8p21.3; las cuales contienen importantes genes como supresores de tumor y oncogenes, bajo modulación epigenética por metilación del DNA y variación del código de histonas como recientemente, nuestro grupo ha demostrado.

ABSTRACT

Lung cancer is the leading cause of death worldwide due to malignant neoplasms; only in the United States of America (USA) in 2009 were registered 158,086 new cases and 213,380 deaths, while 224,210 new cases and 159,260 deaths were estimated in 2014. Lung cancer is classified in 2 large SCLC and NSCLC groups (Small Cell Lung Carcinoma and Non Small Cell Lung Cancer, respectively). The NSCLC group represents approximately 85% of all lung cancer cases. Additionally its rate of global survival to five years is less than 15%, mainly to late diagnosis of the disease. The need of markers with high specificity and sensitivity at various levels of both mRNA and protein expression, has obliged to guide efforts to epigenetics regulation mechanisms such as alterations in the patterns of genomic DNA methylation as probable markers from diagnosis early, which may further explain molecular aberrations during pulmonary neoplasia transformation. Generally, it described global hypomethylation of the genome of tumor cells in contrast histologically normal cells, mainly to generalized demethylation of widely throughout the genome dinucleotides CpGs; as well as local hypermethylation of discrete regions of genes located in promoter sequences. In this regard, evidence suggests that de novo methylation of CpG islands induce silencing of tumor suppressor genes, as a critical step in tumor formation.

In this context, this work is focused on the description of the pattern of global methylation of genomic DNA in cell lines derived from lung cancer patients, both Caucasians as Mexican-Mestizo. For this, they conducted experiments comparative genomic hybridization using a platform microarray genomic DNA in submegabases (Submegabases Resolution Tiling, SMRT-27k) which contains approximately 32,433 fragments cloned in BACs (Bacterial Artificial Chromosome) with resolution 80 kb between BACs. The genomic DNA of lung cancer cells was treated under the combination of 4 enzymes methylation-sensitive restriction, which cover about 50-80% of CpGs susceptible to methylation sites along the genome, there of which include promoter sequences. Thus, the epigenome was analyzed based on the detection of hypermethylation patterns versus hypomethylation in neoplastic lung genome. Subsequent to this, our bioinformatic analysis focused on identifying cytogenetic regions with high significance level of hypermethylation and hypomethylation, highlighting among other cytogenetic regions: 8p21.3 and 1q32.1; which contain important genes as tumor suppressors and oncogenes, under epigenetic modulation of DNA methylation and histone code variation as our group has recently shown.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

Actualmente, se asume que el cáncer es el resultado de alteraciones en una célula que modifican su potencial de crecimiento, la respuesta a los mecanismos de control y función. Estos cambios pueden implicar mutaciones en uno o más genes, anormalidades cromosómicas graves o anomalías en la transcripción genética que conducen a la des-diferenciación y alteración de las propiedades de crecimiento de la célula. La proliferación de la célula transformada genera un crecimiento maligno (<http://www.cancer.gov/about-cancer>).

Por otro lado, diferentes estudios de biología celular y molecular han relacionado el proceso de mutagénesis con el de carcinogénesis, basados en la evidencia de que la mayoría de los cánceres humanos están ligados a la exposición a factores externos que ocasionan mutaciones en células somáticas y/o germinales y pueden transformar las células normales en células tumorales. Los agentes responsables de esta transformación pueden ser químicos como el tabaco, asbesto, arsénico, cadmio, cromo, etc., físicos como las radiaciones ionizantes, o biológicos como los virus de DNA o RNA (Mollberg *et al*, 2011).

Existen mecanismos para reconocer o destruir las células mutantes; sin embargo, cuando una célula mutante tiene ventaja en la proliferación celular, genera una clona anormal que dará origen a la neoplasia como se observa en la figura 1. El modelo de la carcinogénesis es muy complejo y probablemente el desarrollo de las neoplasias no se deba únicamente a cambios en el DNA, sino a otros factores tales como resistencia y susceptibilidad del huésped a la expresión de la mutación y a la interacción del genoma con agentes ambientales. En su conjunto, estas mutaciones se acumulan para transformar un genoma de una condición genéticamente normal hacia una entidad celular con características malignas (<http://www.cancer.gov/cancertopics>).

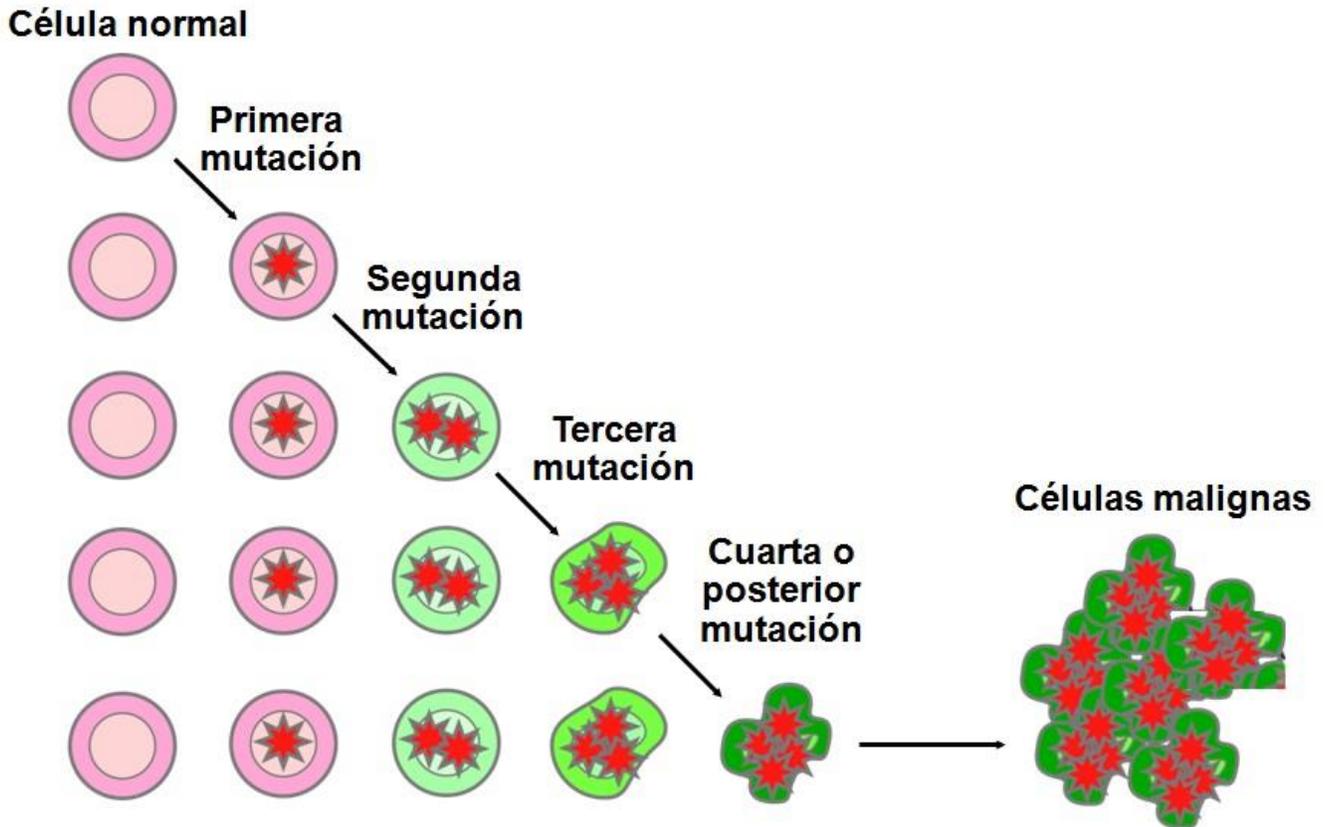


FIGURA 1. Tumor clonal. Cuando una célula adquiere una mutación, transfiere esa mutación a su progenie durante el crecimiento y la división celular. Debido a que las células con mutaciones relacionadas al cáncer tienen la tendencia a proliferar más que las células normales, los candidatos celulares para las mutaciones adicionales crecen en número. Las mutaciones continúan acumulándose y son copiadas a las células descendientes. Si una célula finalmente adquiere suficientes mutaciones para convertirse en tumoral, se derivarán de esa célula transformada individual, subsecuentes células tumorales (modificada de <http://cancer.gov/cancertopics/understandingcancer>).

1.2. Cáncer Pulmonar y Tipos Histológicos

El cáncer pulmonar continúa como la primera causa de mortalidad a nivel mundial causadas por neoplasias malignas; tan solo en Estados Unidos de Norteamérica (U.S.A) en 2009 fueron registrados 213,380 nuevos casos y 158,086 muertes; mientras que para el 2014 se presentaron 228,190 nuevos casos y 159,480 muertes (Siegel, 2013, <http://seer.cancer.gov>). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2004, la clasificación histológica de cáncer pulmonar comprende dos grandes subgrupos histológicos: carcinomas pulmonares de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés) comprendiendo el 15% de los casos y carcinomas pulmonares de células no pequeñas (NSCLC, por sus

siglas en inglés), este último incluye carcinomas de células grandes y sus variantes (LCC), carcinomas de células escamosas o epidermoides (SCC), y adenocarcinomas (AD), siendo los carcinomas tipo AD los de mayor incidencia comparado con los carcinomas del tipo SCC (Travis *et al*, 2004; Sechler *et al*, 2013).

Por otro lado, en relación a LCC y carcinomas neuroendocrinos de células grandes estos son tumores de alto grado con pobre prognosis, los cuales progresan a partir de carcinoides atípicos y SCLC, considerados de intermedio y de alto grado de malignidad, respectivamente, en el contexto de los tumores neuroendocrinos pulmonares (Travis *et al*, 2004).

En la clasificación de la OMS de 1999 y 2004, solo se había reconocido tres lesiones preneoplásicas pulmonares: displasia bronquial escamosa y carcinoma in situ (CIS) como se observa en la figura 2, precedentes de los carcinomas de células escamosas bronquiales y carcinoma basaloide, la hiperplasia adenomatosa atípica (AAH) representando la condición preneoplásica para un grupo de adenocarcinomas, llamado carcinoma bronquioloalveolar (BAC), e hiperplasia de células neuroendocrinas pulmonar idiopática difusa (DIPNECH), un precursor propuesto de tumores carcinoides. Sin embargo, en el 2011 la nueva Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC, por sus siglas en inglés)/Sociedad Torácica Americana (ATS, por sus siglas en inglés)/Sociedad Respiratoria Europea (ERS, por sus siglas en inglés) en la Clasificación de Adenocarcinomas de Pulmón se añade la Adenocarcinoma in situ (AIS) como una nueva lesión preneoplásica pulmonar; en la mayoría de los casos, las células tumorales son del tipo no mucinosos, con una proliferación de neumocitos tipo II o de células claras (Travis *et al*, 2004; Lantuéjoul *et al*, 2009; William *et al*, 2011).



FIGURA 2. Cambios morfológicos en el epitelio bronquial. Estos cambios morfológicos incluyen hiperplasia, metaplasia escamosa, displasia en varios grados (medio, moderado y severo) (Figura modificada de Lantuéjoul *et al*, 2009).

Los cambios morfológicos en el epitelio bronquial incluyen hiperplasia, metaplasia escamosa, displasia en varios grados (medio, moderado y severo) y CIS. La hiperplasia bronquial, la cual comprende células basales o caliciformes y metaplasia escamosa representa cambios reactivos comunes, estos cambios morfológicos se encuentra resumidos en las figuras 3. La displasia media es considerada como una lesión de bajo grado, mientras que la displasia moderada y severa, y CIS están consideradas una condición preneoplásica de alto grado, con un riesgo significativo para el desarrollo de cáncer (Lantuéjoul *et al*, 2009).

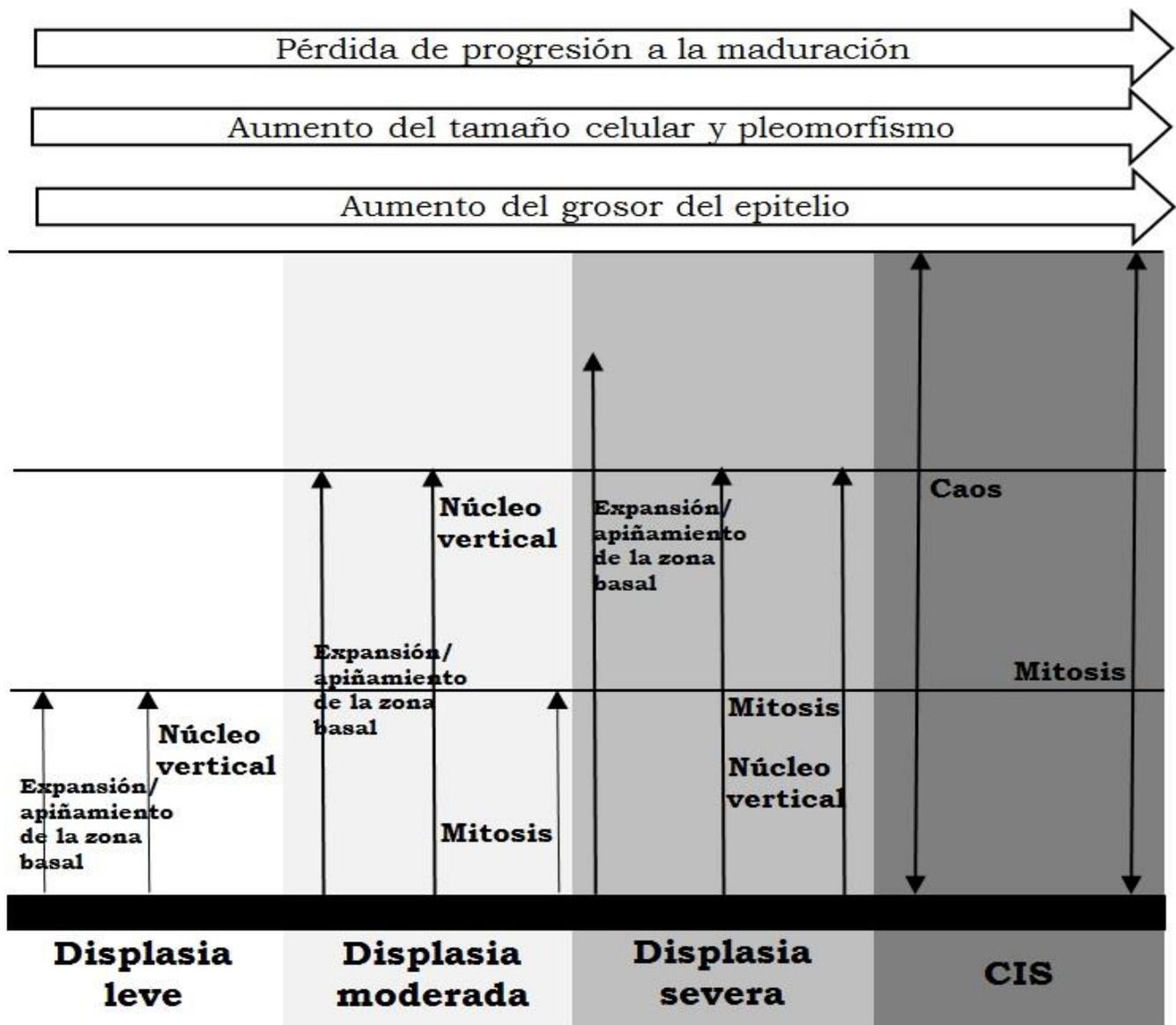


FIGURA 3. Representación gráfica de los cambios morfológicos de la progresión neoplásica pulmonar reconocida por la OMS (Figura modificada de Kerr, 2001).

Los NSCLC representan cerca del 85% de todos los casos de cáncer pulmonar. A pesar, de los esfuerzos realizados en la predicción y diagnóstico en etapas tempranas, el pronóstico continúa siendo muy pobre con tasas de sobre-vida a cinco años del 54% en pacientes estadio clínico I al 10% para en pacientes estadio III, mientras que la tasa de sobre-vida global es menor del 15% (American Cancer Society, Atlanta: 2008; Metodieva, 2008, Sechler *et al*, 2013).

Por otro lado, el tratamiento más efectivo para el grupo NSCLC continúa siendo la resección quirúrgica; sin embargo, el 70% de pacientes NSCLC son diagnosticados en estadios avanzados de la enfermedad por lo que son considerados tumores no resecables con metástasis nodal y visceral al momento del diagnóstico, el cual es confirmado en términos generales mediante la toma de biopsias y citologías (Metodieva, 2008; William *et al*, 2011).

1.3. Alteraciones Genéticas y Epigenéticas en Cáncer Pulmonar

La relación que existe entre los cambios morfológicos del epitelio normal hacia el preneoplásico y lesiones neoplásicas, resulta de la acumulación de múltiples eventos genéticos complejos conocidos como aberraciones a nivel genómico, conduciendo hacia la iniciación, desarrollo y mantenimiento del cáncer pulmonar, estas alteraciones corresponden a mutaciones puntuales, amplificaciones, deleciones, translocaciones, polisomias y modificaciones epigenéticas que afectan al árbol bronquial de las vías aéreas superiores (en la figura 4 se esquematiza las interacciones genéticas y epigenéticas en el desarrollo de cáncer), el cual se expone de forma difusa a los daños resultantes de carcinógenos; por ejemplo, el humo del tabaco (Lantuéjoul *et al*, 2009).

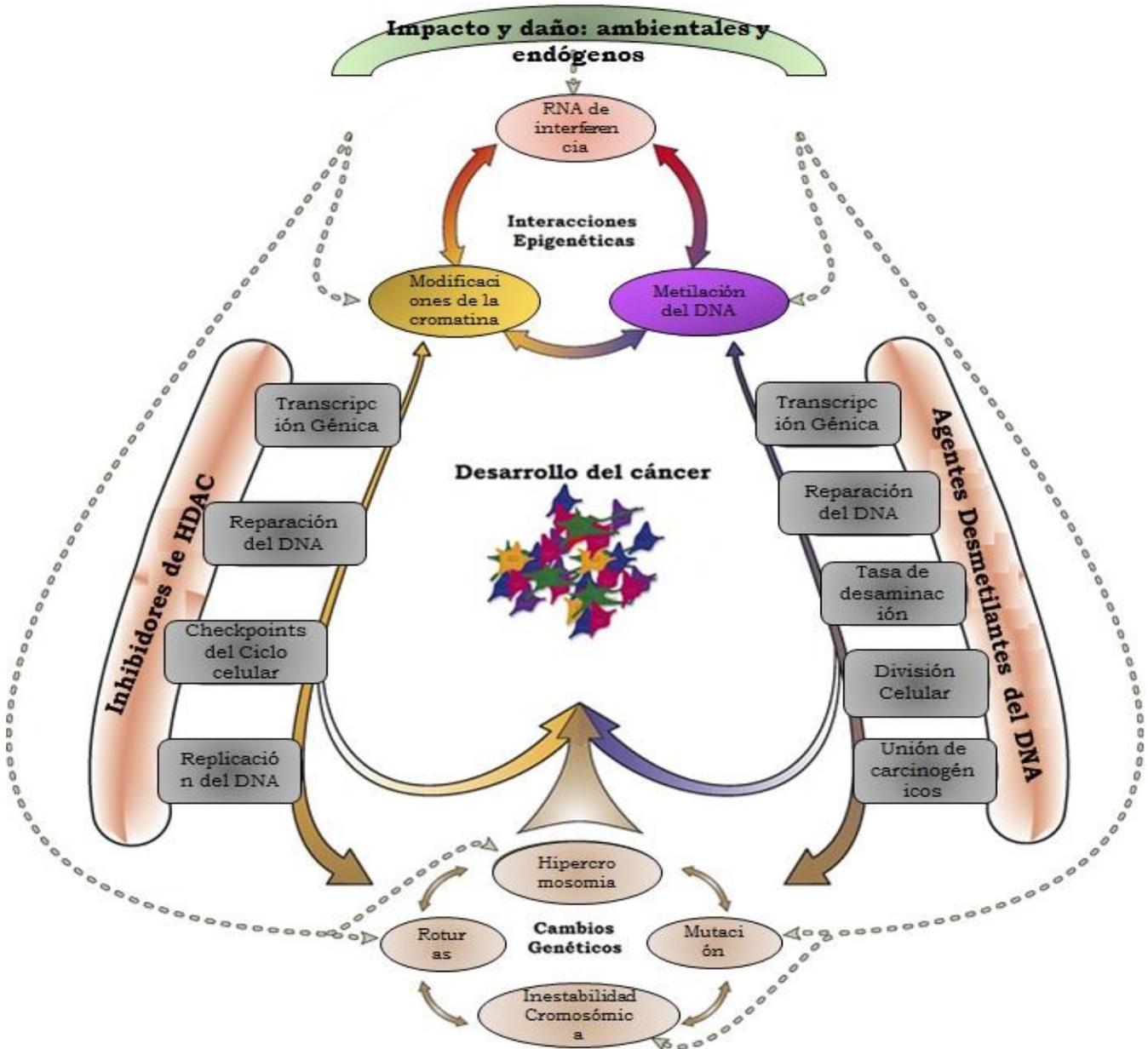
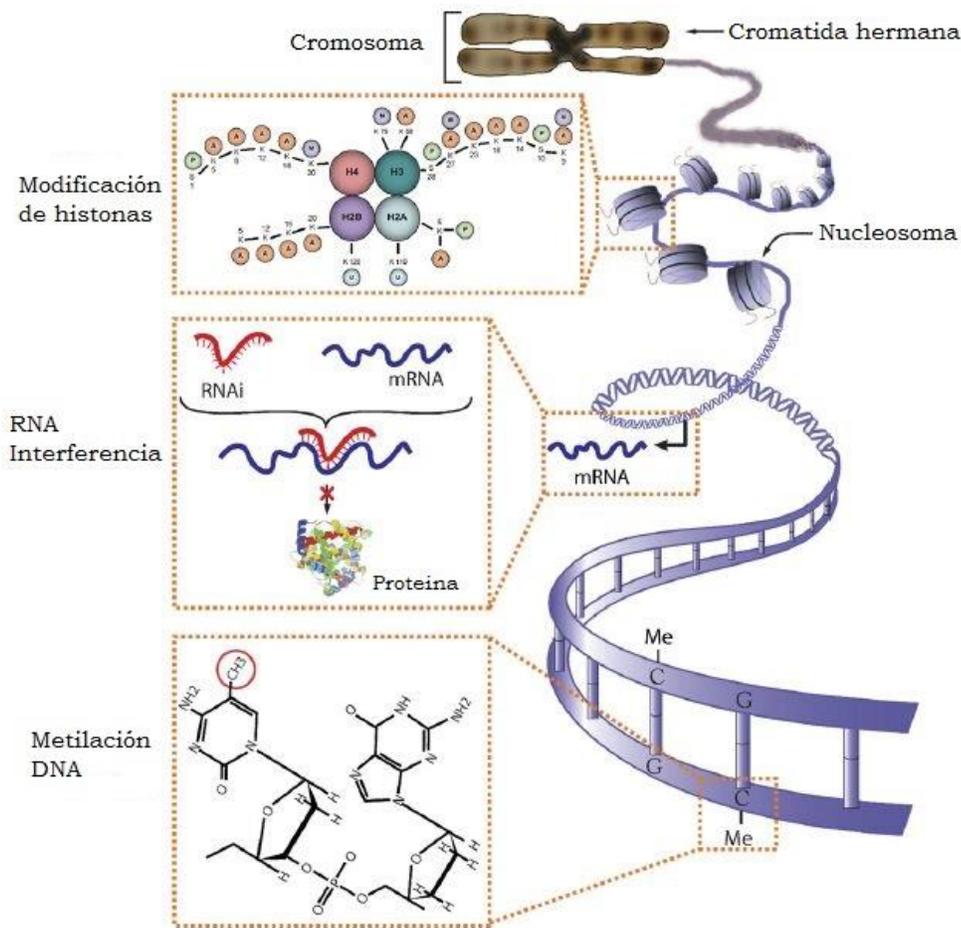


FIGURA 4. Cambios genéticos y epigenéticos comúnmente observados en cáncer (Figura modificada de Sawan *et al*, 2008).

A este respecto, entre el 80-90% del cáncer pulmonar es atribuido a carcinógenos del humo del tabaco el cual se estima que contiene alrededor de 4,800 componentes químicos, 20 de ellos con propiedades ampliamente oncogénicas, entre los cuales se encuentran hidrocarburos aromáticos

políciclicos y nitrosamina-(metilnitrosamino)1-(piridil) 1-butanoma involucrados en la formación de aductos en el DNA (Sawan *et al*, 2008).

Sin embargo, estudios epidemiológicos han mostrado que menos del 11% de fumadores desarrollan cáncer, sugiriendo determinantes ambientales y/o de carácter genético adicionales (Lantuéjoul *et al*, 2009). Sin embargo, recientemente, se estudian el conjunto de cambios epigenéticos como eventos moleculares tempranos y frecuente presentes en distintos tipos de cáncer.



El concepto genética se refiere a la información transmitida sobre la base de la secuencia lineal del DNA que integra a un gen, en contraste el concepto de epigenética se ocupa del estudio de los patrones moleculares ocurridos sobre la secuencia lineal del DNA como patrones de herencia de la información basada en patrones y niveles de expresión, libres de cambios en la secuencia lineal primaria del DNA

FIGURA 5. Principales mecanismos epigenéticos. Modificaciones post-traduccionales de las histonas como acetilación, metilación y fosforilación. RNA pequeños no codificantes que se asocian a los RNAm's silenciando su expresión. La metilación del DNA es una modificación covalente, en el cual un grupo metil es transferido de S-adenosil metionina al carbono 5 de la citosina por la familia de enzimas DNMTs (Figura modificada de Sawan *et al*, 2008).

a nivel genético. Los mecanismos epigenéticos incluyen: 1) alteraciones del estado de metilación del DNA dentro de islas CpG, con hipermetilación en las islas CpG dentro de regiones promotoras de genes supresores de tumor guiando a su silenciamiento; 2) modificaciones covalentes en el N-terminal de las histonas, 3) mecanismos de remodelación de la cromatina (complejos multi-proteicos asociados a RNAs largos no-codificantes); así como 4) mecanismos post-transcripcionales de regulación génica por microRNAs (miRNA), en figura 5 se esquematizan algunos de estos eventos (Esteller, 2008).

1.4. Metilación del DNA

La metilación del DNA es la adición bioquímica de un grupo metil (CH₃) a un nucleótido. En mamíferos, la adición ocurre predominantemente en el nucleótido citosina, especialmente en el contexto de dinucleótidos citosina-guanina (CpG). Esta reacción enzimática es llevada a cabo después de la síntesis del DNA y es ejecutada por una familia de enzimas llamadas DNA metiltransferasas (DNMTs). La DNMT1 está asociada con el complejo de replicación y responsable para la metilación y la no metilación del DNA (metilación de *ново*) y el mantenimiento de patrones de metilación del DNA pre-existente en la célula. La DNMT3A y DNMT3B son DNMTs *de novo* (Rhee *et al*, 2000). La distribución de CpGs en genomas de vertebrados, no es uniforme, se encuentra localizados en regiones cortas o grupos (500-2000 pb) llamadas islas CpG, y están localizadas principalmente en regiones promotoras, aproximadamente la mitad de todos los genes en humanos. Sin embargo, la mayor parte de segmentos CpGs están localizados en bajas densidades dentro de regiones intergénicas o de intrones en el DNA, particularmente dentro de secuencias y elementos “móviles” llamados transposones (Esteller, 2008).

En células bajo normalidad fisiológica, las secuencias repetitivas del DNA están altamente metiladas, mientras que las islas CpG se encuentran no-metiladas, lo cual permite que los genes sean expresados en presencia de activadores transcripcionales necesarios. Sin embargo, en casos específicos, las regiones promotoras de los genes se encuentran metiladas en las células histológicamente normales como parte del proceso de desarrollo normal: ejemplo de ello resultan los genes improntados, como el cromosoma X, y genes que promueven el compromiso de diferenciación tejido-específico de línea germinal. La impronta genómica es un proceso que involucra la adquisición de un estado cerrado de la cromatina e hipermetilación del DNA en solo uno de los alelos en línea germinal, en machos y hembras,

conduciendo la expresión monoalélica. Un fenómeno similar, es la compensación de dosis génica, donde también, se encuentra relacionada la metilación del DNA de las islas CpG en uno de los cromosomas X en mujeres, donde sólo una de las dos copias está activa. A pesar que la metilación del DNA no es ampliamente usada para regulación “normal” de la expresión génica, y existan redes moleculares más complejas y especializadas para llevar a cabo este objetivo, frecuentemente, la metilación del DNA cumple con este propósito. Por otro lado, la metilación ha sido postulada como un mecanismo para el silenciamiento de genes de tejido específico en aquellos tipos celulares en los que no se deben expresar.

1.4.1 Hipometilación del DNA

En el genoma normal, muchas islas CpG se encuentran no metiladas y están asociadas a la expresión de genes, mientras que, los otros CpG se encuentran dispersos a lo largo del genoma y en su mayoría están metilados (Baylin *et al*, 2000). La desmetilación es un proceso que elimina los patrones previos de metilación. Ocurre principalmente durante el desarrollo pre-implantacional, y en general, durante todo el desarrollo. Se puede producir mediante dos procesos: 1) Desmetilación pasiva, se produce una reducción gradual de los niveles de metilación debido a la ausencia de metilación de mantenimiento a lo largo de sucesivas rondas de replicación. La desmetilación pasiva se produce de forma natural a lo largo del proceso de envejecimiento humano (Liu *et al*, 2003). Sin embargo, este tipo de desmetilación también se puede favorecer con el tratamiento con fármacos inhibidores de las enzimas DNMTs, como por ejemplo con 5-AZA-C (Jones y Taylor, 1980); 2) La desmetilación activa, se produce de forma independiente de la replicación del DNA, debido a la intervención de enzimas específicas. Se han propuesto tres mecanismos bioquímicos para explicar la desmetilación del DNA: a) Escisión de las bases metiladas por una glicosilasa. b) Escisión del nucleótido metilado. c) Sustitución directa del grupo metil por un átomo de hidrógeno (Kress *et al*, 2003). Algunos ejemplos de desmetilación activa es la desmetilación global del genoma paterno en el cigoto de pollo (Mayer *et al*, 2000) y la desmetilación global del genoma durante la diferenciación de mioblastos de ratón (Jost y Jost, 1994).

1.4.2 Hipometilación del DNA en cáncer

En el proceso de carcinogénesis la primera observación reportada fue la hipometilación global del genoma. La hipometilación global se produce al principio de la carcinogénesis y predispone a las células a la inestabilidad genómica y a otros cambios genéticos. Esto quizás permite que las células tumorales se adapten a su entorno local y promueve la metástasis (Suter *et al*, 2004). Este proceso de pérdida de metilación fue observada en gran número de estudios desde el año 1983 en cáncer de pulmón y colon en contraste de su tejido histológicamente normal adyacente, así como en diferentes enfermedades malignas comparadas con diferentes tejidos en edad post-natal, demostrando que, en conjunto los niveles de 5m-C a nivel genómico están disminuidos en tejidos tumorales malignos. La hipometilación ocurre en regiones intergénicas, intrónicas, DNA satélite, en secuencias SINEs, LINEs (Short Interspersed Nuclear Elements y Long Interspersed Nuclear Elements, respectivamente por sus siglas en inglés) y retrovirus endógenos, los cuales se encuentran normalmente silenciados; es decir hipermetiladas, en todas las células para mantener la estabilidad cromosómica (Wild y Flanagan, 2010). Así mismo, el proceso de hipometilación de estas secuencias en células somáticas y germinales a nivel global o gen-específico induce la activación de elementos genéticos móviles (Ejemplo: SINE, LINE, Alu) y la sobre-expresión de ciertos genes que incrementan la inestabilidad mediante dos mecanismos: la inducción de mutaciones y la recombinación cromosómica, las cuales favorecen el desarrollo y progresión neoplásica (Wilson *et al*, 2007).

1.4.3 Hipometilación del DNA como indicador diagnóstico y pronóstico en cáncer

La hipometilación se ha sugerido como un posible marcador en el diagnóstico y pronóstico; en estudios en de la hipometilación del DNA en regiones satélite en algunas enfermedades como distrofia muscular, síndrome ICF (síndrome de inmunodeficiencia y anomalías faciales) y en diferentes tipos de cáncer Algunos retrovirus endógenos están desmetilados en algunos tipos de cáncer como por ejemplo cáncer de ovario, testículo, vejiga, en todos estos casos la hipometilación es directamente proporcional con el grado de malignidad y con frecuencia se asocia con la expresión, lo que sugiere que podría usarse como un posible biomarcador de la progresión en estos tipos de cáncer (Wilson *et al*, 2007). Los elementos SINEs y LINEs poseen un promotor fuerte y codifican para una enzima integrasa lo que favorece su inserción, la hipometilación de secuencias LINEs se ha observado en cáncer de colon y próstata, sin embargo no se ha demostrado correlación con el estadio clínico del tumor, mientras que

en cáncer de ovario, mama, urotelial y leucemias, la hipometilación se correlaciona e incrementa con el grado de malignidad (Wilson *et al*, 2007; Wild y Flanagan, 2010).

1.5 Hipermetilación del DNA

La hipermetilación del DNA es un proceso reversible que ocurre naturalmente, que regula la expresión de genes; como se menciona anteriormente, es esencial para el desarrollo embrionario, la impronta genómica, la inactivación del cromosoma X y la supresión de secuencias de DNA repetitivas. Las regiones promotoras hipermetiladas resulta en baja expresión o el silenciamiento de la transcripción génica y en consecuencia el silenciamiento de genes supresores de tumor a través de la hipermetilación del DNA. Esta aberrante hipermetilación de las islas CpG de los promotores es un mecanismo alternativo de la inactivación génica que contribuye a la biología de varias neoplasias humanas. La metilación del DNA genómico se ha visto aumentar con la edad, quizás la metilación del DNA es una lesión molecular que confiere una predisposición al cáncer con la edad (Esteller, M., 2008).

1.5.1 Hipermetilación del DNA en cáncer pulmonar

La importancia de la metilación en islas CpG es la inactivación funcional de genes supresores de tumor, se estimó que entre el 0.5% y 3% de todos los genes tienen promotores ricos en CpGs y están inactivados por metilación del DNA en estadios avanzados en cáncer pulmonar; por lo que en un inicio los estudios epigenéticos estuvieron enfocados a el análisis de un pequeño conjunto de genes (Shiraishi *et al*, 2002). Siendo los genes más estudiados que incluyen a *RARB*, *CDKN2A*, *TIMP3*, *MGMT*, *DAPK*, *CDH1*, *CDH13* y *RASSF1A* (Zochbauer-Muller *et al*, 2001). Entre otros genes investigados en NSCLC primario incluyen; por ejemplo, *ASC/TMS1*, *FHIT*, *hSRBC*, *TSLC1* y *DAL-1* (Zochbauer-Muller *et al*, 2002). En conclusión, estas investigaciones demuestran que el nivel y patrones de metilación de genes relacionados a cáncer es un evento frecuente en la patogénesis del cáncer pulmonar.

La metilación del DNA, también puede ser detectada en muestras de sangre, esputo, cepillados bronquiales y lavados bronquio-alveolares (BAL) de pacientes con cáncer pulmonar. Una gran ventaja de estas muestras es que pueden ser obtenidas por una vía no invasiva o mínimamente invasiva (Heller *et al*, 2010). Estos estudios, describen la frecuencia de metilación de genes; por ejemplo, *MGMT*, *p16*, *DAPK*, *APC*, *CDH13*, *FHIT*, *RAR β -2* y *RASSF1A*, en muestras de plasma y en el correspondiente tumor

primario. Mientras que en algunos de estos estudios, la frecuencia de metilación en muestras de plasma fueron más bajas comparadas con el tumor primario (Hsu *et al*, 2007, Belinsky *et al*, 2005).

Diferentes genes han sido encontrados hipermetilados en muestras de esputo de pacientes con cáncer pulmonar; estos genes son: *hMLH1*, *p16*, *CDH13*, *DAPK*, *LAMC2*, *MGMT*, *PAX5 α* , *PAX5 β* , *RASSF1A* (Belinsky *et al*, 2005). Otros genes frecuentemente metilados en pacientes NSCLC son *ASC/TMS1*. En este sentido la metilación de *ASC/TMS1* fue observada en 14% de tumores primarios y el 17% de muestras de esputo de estadio 1 en NSCLC, sin embargo un 60% en tumores primarios y 41% de muestras de esputo de estadios más tardíos en NSCLC sugiriendo que la metilación de *ASC/TMS1* es un marcador de etapas tardías en cáncer pulmonar (Machida *et al*, 2006).

Shivapurkar y colaboradores analizaron patrón de metilación de 11 genes en tumores primarios del grupo NSCLCs, en tejido adyacente de tejido pulmonar no-maligno, en células mononucleares de sangre periférica de pacientes libre de neoplasia, en muestras de esputo de pacientes con cáncer y donantes clínicamente sanos como controles. El gen *3-OST-2* mostró altos niveles de metilación en tumores comparados con niveles bajos de metilación en tejidos control. También reportan que los análisis cuantitativos de metilación de los genes *3-OST-2*, *RASSF1A*, *p16* y *APC* en muestras de esputo son biomarcadores potenciales en etapas tempranas para pacientes con cáncer pulmonar (Shivapurkar *et al*, 2007).

En 2009, Han y colaboradores investigaron la metilación de *DAPK*, *RASSF1A* y *PAX5 β* en condensado del aire espirado de pacientes con cáncer pulmonar y en individuos control. Clasificados en tres grupos, fumadores, ex fumadores y no fumadores; la metilación de *RASSF1A* fue diferente con respecto a la condición del fumador. Los ex fumadores con un mayor nivel de metilación, en comparación a los no fumadores. La metilación de sitios CpGs específicos del promotor de *DAPK* y *PAX5 β* fue asociado con el estadio del cáncer pulmonar (Han *et al*, 2009).

En estudios recientes, Ostrow y colaboradores determinaron la frecuencia de metilación del promotor de cuatro genes supresores de tumor (*RAR β* , *NISCH*, *KIF1 α* y *DCC*) en plasma de pacientes con anomalías en el pulmón detectadas bajo el rastreo de tomografía computarizada (TC). Examinaron el DNA de 93 muestras de plasma de pacientes mediante PCR específico de metilación cuantitativo (QMSP). Dando como resultado el 73% de muestras de pacientes con tumor hipermetilación en al menos un gen (Ostrow *et al*, 2010). Mientras que Begun y colaboradores analizaron el nivel de metilación del promotor de 15 genes (*APC*, *AIM1*, *Cyclin D2*, *CALCA*, *CDH1*, *DCC*, *p16*, *MGMT*, *RASSF1*, *MINT31*, *Cyclin A1*, *ESR1*, *HIC1*, *PGP9.5*, y *TIMP3*) examinando el tumor y su contraparte de

DNA en suero de 10 pacientes con cáncer de pulmón primario mediante PCR específico de metilación cuantitativo (QMSP) para identificar posibles marcadores. Al respecto, ensayos independientes sobre 6 genes tales como *APC*, *CDHI*, *MGMT*, *DCC*, *RASSF1A*, y *AIM1* mostraron hipermetilación con mayor frecuencia. Lo cual fue validado para su aplicación a nivel diagnóstico mediante el empleo de 76 muestras de DNA derivadas de suero, indicando hipermetilación en *APC* y *CDHI* con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.27$, $P 0.01$) (Begum *et al*, 2011).

Por otro lado, Schmidt y colaboradores analizaron la frecuencia de metilación de *SHOX2*, el cual ha sido previamente identificado como marcador de discriminación entre tumor y tejido histológicamente normal pulmonar. Esta identificación se llevó mediante el uso de Hibridación de Metilación Diferencial (DMH, por sus siglas en inglés). El ensayo de metilación fue basado en PCR de tiempo real en aspirados bronquiales de 523 pacientes (242 controles, 281 casos). La metilación del DNA de *SHOX2* permitió distinguir entre enfermedades malignas y benignas de pulmón, por ejemplo abscesos infecciosos, enfermedades obstructivas pulmonares, sarcoidosis, esclerodermia, estenosis con una alta especificidad (68% de sensibilidad [IC 95% 62 a 73%], 95% de especificidad [IC 95% 91 a 97%]) (Schmidt *et al*, 2010).

van der Drift y colaboradores analizaron el valor diagnóstico del *RASSF1A* por medio del análisis de metilación en lavados bronquiales de pacientes no diagnosticados por broncoscopia con sospecha de cáncer pulmonar. Analizaron 129 muestras de pacientes con cáncer de pulmón y 28 muestras de sujetos sanos como control mediante PCR específica de metilación cuantitativa (QMSP). En sus resultados muestran que el 40 % de pacientes con cáncer pulmonar tienen tumor periférico y 17 pacientes no tuvieron un diagnóstico por broncoscopia y de este subgrupo el 24% se encontró hipermetilado *RASSF1A* (van der Drift *et al*, 2012).

Toyooka y colaboradores investigaron las frecuencias de metilación de 8 genes en un gran número de tumores pulmonares consistiendo de carcinomas de células pequeñas (SCLC), NSCLC y carcinoides bronquiales. La frecuencia de metilación de *APC*, *CDHI3* y *p16* fueron significativamente más altos en NSCLC comparado con tumores neuroendocrinos. En cuanto, a la frecuencia de metilación de los genes *RASSF1A*, *CDHI* y *RAR β -2* fueron más altos en SCLCs comparados con los carcinoides. El nivel de metilación de todos los genes estudiados, fue significativamente más alto en SCLCs en comparación a los carcinoides (Toyooka *et al*, 2001). En otro estudio, Hsu y colaboradores, reportaron que también existen diferencias en la metilación entre subtipos de NSCLC; las frecuencias de metilación de *APC* y *CDHI3* fueron significativamente más altas en adenocarcinomas que en carcinomas de células

escamosas. Y la metilación de p16 fue detectada frecuentemente en carcinomas de células escamosas que en adenocarcinomas (Hsu *et al*, 2006).

1.5.2 Hipermetilación del DNA como indicador diagnóstico y pronóstico

Un impacto de la metilación en la prognosis ha sido reportado para varios genes en NSCLC. En el 2000, Tang y colaboradores reportaron que la metilación de *DAPK* está asociada con la sobrevida en pacientes en estadio I de NSCLC y más tarde confirmado por Lu y colaboradores (Lu *et al*, 2004). Burbee y colaboradores (Burbee *et al*, 2001) reportaron que la metilación de *RASSF1A* como un parámetro pronóstico desfavorable; también observado por Kim y colaboradores, y Tomizawa y colaboradores en pacientes en estadio I con adenocarcinomas (Kim *et al*, 2004; Tomizawa *et al*, 2002). Toyooka y colaboradores reportaron que la metilación de *p16* fue significativamente relacionada a una prognosis desfavorable en pacientes con adenocarcinomas. Yanagawa y colaboradores reportaron los genes *RASSF1A* y *RUNX3* fueron identificados ser de relevancia de pobre prognosis cuando se encuentran metilados en estadios I en pacientes con NSCLC (Yanagawa *et al*, 2007). Seng y colaboradores estudiaron 5 genes (*DLEC1*, *MLH1*, *RARβ*, *RASSF1A* y *BLU*) localizados en la región 3p; la metilación de *DLEC1* se encontró ser un marcador independiente de pobre sobrevida en tanto en la población total de estudio como en pacientes con carcinomas de células escamosas. La metilación de *Hmlh1* tuvo un impacto en la prognosis en pacientes con carcinomas de células grandes (Seng *et al*, 2008).

Anteriormente Schmidt y colaboradores analizaron la metilación del promotor de *SHOX2*, mostrando que es un marcador fiable en cáncer de pulmón en aspirados bronquiales de pacientes. Recientemente Kneip y colaboradores desarrollaron un ensayo basado en plasma para validar la posible aplicación de *SHOX2* como biomarcador. Utilizaron PCR en tiempo real cuantitativa para analizar la metilación de DNA de *SHOX2* en 411 muestras de plasma. En un primer estudio (20 pacientes en estadio IV con cáncer de pulmón y 20 controles) para mostrar la viabilidad de detectar el biomarcador *SHOX2* en la sangre. El resultado dio que la metilación del DNA de *SHOX2* puede ser usado como un biomarcador para distinguir entre el tumor maligno y los controles con una sensibilidad de 60% y una especificidad del 90%. Ubicando a *SHOX2* como un biomarcador prometedor basado en la metilación del DNA para el diagnóstico de cáncer pulmonar (Kneip *et al*, 2011).

Zhang y colaboradores exploraron el nivel de la metilación de 20 genes por PCR específico de metilación (MSP) en 78 muestras de NSCLC con su tejido normal adyacente, así como en 110 NSCLC en estadios I/II y 50 plasmas libres de cáncer. Los resultados muestran que nueve genes (*APC*, *CDH13*, *KLK10*, *DLEC1*, *RASSF1A*, *EFEMP1*, *SFRP1*, *RARβ* y *p16INK4A*) mostraron una frecuencia significativamente alta en NSCLC comparada con el tejido normal; mientras que otros genes (*RUNX3*, *hMLH1*, *DAPK*, *BRCA1*, *p14ARF*, *MGMT*, *NORE1A*, *FHIT*, *CMTM3*, *LSAMP* y *OPCML*) mostraron sensibilidad o especificidad relativamente baja. Los nueve genes validados en tejido también mostraron una alta frecuencia de hipometilación específico de tumor en plasma de NSCLC comparado con plasmas libres de cáncer y un grupo de cinco de genes (*APC*, *RASSF1A*, *CDH13*, *KLK10* y *DLEC1*) alcanzando una sensibilidad de 83.64% y una especificidad de 74.0% para el diagnóstico de cáncer pulmonar. Encontraron que pacientes con hipermetilación de cuatro genes o más con una pobre sobre-vida libre de progresión de 2 años (Zhang *et al*, 2011).

Recientemente, Yang y colaboradores estudiaron el nivel de metilación del gen *BRMS1* en 325 muestras de NSCLC. Analizaron la asociación entre la metilación de *BRMS1* y la información epidemiológica y clínica disponible incluyendo género, fumador, edad y tipo histológico o el estadio del tumor. Obtuvieron como resultado que 152 muestras fueron identificadas hipermetiladas (46.77%). La metilación del promotor de *BRMS1* estuvo presente solamente en 6 muestras (8.42%) de tejido adyacente normal. Los pacientes con una historia de fumador tuvo una correlación positiva con la tasas de metilación de *BRMS1*. La comparación de los grupos no metilados y metilados, mostraron que este último tiene el nivel más bajo de expresión del RNAm de *BRMS1*. Los pacientes con un nivel alto de expresión del RNAm de *BRMS1* tienen significativamente mejor sobre-vida en general que los de tuvieron una baja expresión (Yang *et al*, 2011).

En este estudio, Dietrich y colaboradores analizaron la habilidad de la metilación del DNA de los biomarcadores *PITX2* y *SHOX2* para predecir la enfermedad con éxito en pacientes con cáncer de pulmón se evaluó. Ensayos de PCR en tiempo real, PCR específico de metilación cuantitativa (HeavyMethyl) fueron utilizados para medir la metilación del DNA de *PITX2* y *SHOX2* de DNA tratado con bisulfito en tejido fijado en formalina y en parafina de 474 muestras de pacientes con cáncer pulmonar. La alta metilación de *PITX2* y *SHOX2* fue un pronóstico significativo de la sobre-vida libre de progresión. Las muestras con una baja metilación ya sea de *PITX2* y/o *SHOX2* mostraron significativamente un alto riesgo de la progresión del cáncer comparado con las muestras con una alta

metilación de ambos genes. Estos datos sugieren la metilación del DNA de *PITX2* y *SHOX2* como un biomarcador pronóstico para la progresión en pacientes con NSCLC (Dietrich *et al*, 2012).

II. ANTECEDENTES

2.1 Búsqueda de nuevos marcadores epigenéticos hipermetilados en cáncer pulmonar

Recientemente, una nueva era en la detección de patrones y niveles de metilación del DNA ha comenzado con el análisis de la metilación a nivel genómico con el desarrollo de técnicas para el análisis a gran escala. Costello y colaboradores en 2000, reportaron en promedio 600 islas CpG's que son blancos para la metilación en células tumorales; abriendo una pauta para los investigadores, que comenzaron a interesarse en el desarrollo de nuevas técnicas para investigar no solo la metilación del DNA de genes individuales, sino también a gran escala del genoma (Heller *et al*, 2010).

Al respecto los primeros reportes de Dai y colaboradores, que utilizaron la técnica RLGS (Restriction Landmark Genomic Scanning), donde analizaron 1,184 islas CpG e identificaron 11 genes, los cuales están metilados diferencialmente en cáncer pulmonar comparado con su tejido adyacente. Dos de estos genes (GNAL y *MP3B*) mostraron metilación en más del 50% de los tumores analizados. Mientras que Brena y colaboradores, empleando también RLGS (Restriction Landmark Genomic Scanning, por sus siglas en inglés), encontraron 47 genes metilados, tanto en AD como SCC, permitiendo diferenciar ambos subgrupos histológicos; con dicho estudio identificaron la metilación de *OLIG1* como un nuevo biomarcador pronóstico en cáncer pulmonar. Recientemente, Park y colaboradores realizaron una búsqueda a nivel genómico para identificar loci metilados diferencialmente entre 26 tejidos tumorales y tejido adyacente no tumoral del mismo paciente utilizando también RLGS; dando como resultado 229 loci hipermetilados, en el cual, el gen de la familia de Transportadores de Solutos 5, Miembro 8 (*SLC5A8*) es uno de los genes hipermetilados, conocido como un gen supresor de tumores (Park *et al*, 2013).

Fukasawa y colaboradores utilizaron una técnica basada también en enzimas (Hpa II y Msp I) para examinar el estado de metilación de seis líneas celulares de NSCLC. Dando como resultado que alrededor del 10.9% de 288 genes relacionados a cáncer se encontraron hipermetilados en las líneas celulares examinadas; entre los cuales, destacan: *HIC1*, *IRF7*, *ASC*, *RIPK3*, *RASSF1A*, *FABP3*, *PRKCDBP* y *PAX3*. En un análisis más detallado de tumores primarios indicó que la frecuencia de hipermetilación fue alta para *PAX3* (86%) y *ASC* (82%) en todos los tipos de tumores, y *RIPK3* (57%) en carcinomas de células pequeñas (Fukasawa *et al*, 2006). También, Goto y colaboradores analizaron 6157 islas CpG utilizando otro dúo de enzimas de restricción: Xma I y Sma I en 20 mesoteliomas malignas y 20 adenocarcinomas pulmonares. Revelando un promedio de 387 genes (6.3%) y 544 genes

(8.8%) estaban hipermetilados en mesoteliomas malignas y adenocarcinomas, respectivamente. En un análisis de agrupamiento jerárquico mostró que ambos tumores tienen patrones de metilación diferencial característicos cada uno, siendo mayor en adenocarcinomas. Entre los genes hipermetilados, tres (*TMEM30B*, *KAZALD1* y *MAPK13*) se encontraron específicamente metilados solamente en mesotelionas proponiéndose como potenciales marcadores de diagnóstico (Goto *et al*, 2009). Otra técnica basada en enzimas para el análisis de metilación, deleciones y amplificaciones es el microarreglo de clones NotI (NMA, NotI Microarrays, por sus siglas en inglés), ya que los sitios de reconocimiento de esta enzima están asociados a islas CpG y genes; esta técnica fue utilizada por Dmitriev y colaboradores, en la cual hibridaron 40 muestras de tumor con su contraparte de tejido normal de NSCLC, 28 SCC y 12 AD, 44 genes mostraron frecuencias de metilación/delección en el 15% de las muestras; entre estos genes se encuentran supresores de tumor: *RBSP3* (*CTDSPL*), *VHL* y *THR3*; la mayoría de los genes encontrados no habían sido reportados previamente en cáncer pulmonar, por ejemplo, *MINA*, *RPL32*, *EPH3*, *LOC285205*, *FGD5*, *UBE2E2*, *ROP3*, *LRRC3B*, *CGGBP1*, *NBEAL2* y *LOC285375*. Dmitriev y colaboradores sugieren un grupo de 19 biomarcadores: *ANKRD28*, *BHLHE40*, *CGGBP1*, *RBSP3*, *EPH3*, *FGD5*, *FOXP1*, *GORASP1/TTC21*, *IQSEC1*, *ITGA9*, *LOC285375*, *LRRC3B*, *LRRN1*, *MITF*, *NKIRAS1/RPL15*, *TRH*, *UBE2E2*, *VHL* y *WNT7A*, que permiten la detección temprana; que participan en la progresión neoplásica, metástasis y permiten discriminar entre SCC y AD con una sensibilidad y especificidad de 80-100% (Dmitriev *et al*, 2012).

Como se menciona anteriormente, la metilación es reversible utilizando inhibidores de las DNMTs como Aza-dC. Basada en esta observación, se desarrolló un método indirecto para identificar un amplio rango de genes metilados desconocidos (Suzuki *et al*, 2002). En este ensayo, los patrones de expresión génica de células tratadas con Aza-dC y su contraparte células no tratadas fueron comparadas para su análisis en microarreglos de expresión. Shames y colaboradores compararon la expresión en siete tumores de NSCLC y tres líneas celulares bronquial-epitelial humano antes y después del tratamiento con Aza-dC identificaron 132 genes metilados específicamente de tumor y otros fueron involucrados en vías moleculares específicas, cuya pérdida de expresión contribuye al desarrollo de un fenotipo maligno. Además, 45 genes fueron validados por MSP en muestras de carcinomas pulmonares primarios y en tejido adyacente no maligno, en el cual 31 muestras se encontraron estar metiladas solo en tumores. Proponen 7 genes con relevancia clínica: *ALDH1A3*, *BNC1*, *CCNA1*, *CTSZ*, *LOX*, *MSX1* y *NRCAM* (Shames *et al*, 2006).

Zhong y colaboradores con el objetivo de comprender mejor los cambios epigenéticos, contribuir e identificar nuevos biomarcadores en cáncer de pulmón, combinaron la inhibición farmacológica de la metilación del DNA y la desacetilación de histonas en 4 líneas celulares de NSCLC (A549, NCI-H358, NCI-H292, A427) antes y después del tratamiento con Aza-dC y TSA en perfiles de expresión empleando microarreglos de alto rendimiento de expresión génica (U-133A GeneChip, Affymetrix). Dando como resultado 226 genes sobre-regulados por los tratamientos, tres de ellos: *NNAT* (Neuronatina), *MT3* (Metalotioneína 3) y *CST6* (Cistatina E/M) frecuentemente hipermetilados y transcripcionalmente downregulated en líneas celulares y tumores, los cuales tienen un papel importante en el crecimiento, sugiriendo un papel importante en la patogénesis en cáncer pulmonar (Zhong *et al*, 2007).

Por otro lado Bibikova y colaboradores; utilizaron la conversión por bisulfito combinado con la tecnología BeadArray (Illumina GoldenGate™ methylation assay); con la cual analizaron el perfil de metilación de 1,536 sitios CGIs de 371 genes relacionados a cáncer, en líneas celulares neoplásicas de diferentes tipos histológicos de cáncer de pulmón, comparado con su tejido normal adyacente. Identificaron genes de interés clínico incluyendo *ASCL2*, *CDH13*, *HOXA5*, *HOXA11*, *NPY*, *RUNX3*, *TERT* y *TP73*. De estos genes *CDH13*, *HOXA5*, *RUNX3* y *TP73* que se han asociado con la progresión del tumor en varios tipos de cáncer, incluyendo de pulmón. El gen de la transcriptasa reversa telomerasa (*TERT*) se observó estar inactivo en células diferenciadas, pero reactivada en células tumorales. También se reportó estar metilado en cáncer cervical y su correlación con pobre prognosis. En cuanto al neuropeptido (*NPY*) mostró estar hipermetilado en 19 de las 23 muestras de adenocarcinomas analizadas y tener muy bajo nivel de metilación en el tejido adyacente, no se había reportado en cáncer (Bibikova *et al*, 2006). Christensen y colaboradores utilizaron la misma técnica para comparar el perfil de la metilación en adenocarcinomas y en mesoteliomas malignos, en un análisis de locus-por-locus compararon la metilación del DNA, mostrando un loci de 1266 CpG tenían una diferencia significativa de metilación entre ambos tumores, con el 61% de metilación en adenocarcinoma, identificando en este loci genes involucrados en la regulación del ciclo celular, respuesta al daño de DNA, en la señalización de PTEN y la vía de señalización de apoptosis (Christensen *et al*, 2009).

Weber y colaboradores establecieron una estrategia para aislar fragmentos de DNA metilado mediante la inmunoprecipitación de DNA metilado (MeDIP, por sus siglas en inglés) usando un anticuerpo anti-5-metil-citosina, combinado con la tecnología de microarreglos (MeDIP-Chip), utilizando esta tecnología en líneas celulares de carcinoma de colón SW48 y de mucosa de colón

normal, obtuvieron los patrones de metilación del DNA del genoma e identificando 22 genes hipermetilados, donde se observó metilación diferencial en tejido de colon normal para los genes *ALX4*, *ZNF677* y *LOC283514*; la acumulación diferencial de metilación relacionado con la edad se observado para otros gene y predisponiendo al desarrollo de cáncer (Weber *et al*, 2005).

Recientemente, se publicó un estudio en el cual realizaron una búsqueda de metilación de islas CpG a gran escala a través del genoma en muestras de tumores y su correspondiente tejido libre de neoplasia de 101 pacientes con NSCLC de estadios I-III, utilizando inmunoprecipitación de DNA metilado combinado con análisis en microarreglos (MeDIP-chip). Identificaron 477 genes metilados específicamente de tumores, la mayoría involucrados en la regulación de la transcripción génica y adhesión celular. En un análisis más específico para la detección de la metilación de genes seleccionados, dio como resultado la identificación de *HOXA2* y *HOXA10* como posibles biomarcadores pronósticos para SCC (Heller *et al*, 2013).

Un abordaje similar es el ensayo de recuperación de islas CpG metiladas (MIRA, por sus siglas en inglés), el cual permite aislar fragmentos de DNA metilado utilizando proteínas recombinantes como MBD2b/MDB3L; dicha técnica desarrollada y empleada por Rauch y colaboradores, permitió analizar el estado de metilación en tumores primarios pulmonares de cinco pacientes con estadio clínico I del tipo SCC; dicho análisis se llevó a cabo en microarreglos de islas CpG conteniendo 237,000 sondas de oligonucleótidos (cubriendo 27,800 islas CpGs, Agilent) y en microarreglos de DNA con una resolución de 100 pb (HG18Tiling-Set17 y 8 HG18Tiling-Set19, NimbleGen) para el estudio de los cromosomas 6, 7 y 8, permitió validar la metilación de 12 potenciales genes como marcadores en 20 muestras de tumor tipo SCC derivados de pacientes de estadios I, II y III, con su respectivo tejido normal adyacente, permitiendo identificar la metilación en el 100% de las muestras en 8 genes como: *OTX1*, *BARHL2*, *MEIS1*, *OC2*, *PAX6*, *IRX2*, *TFAP2A* y *EVX2*, todos ellos probablemente asociados con la progresión histopatológica y clínica de pacientes con cáncer pulmonar (Rauch *et al*, 2008).

En un publicación reciente, Kwon y colaboradores examinaron la metilación del DNA de SCC de pulmón a escala genómico utilizando la técnica MIRA y el Analizador Genoma (GA) Illumina, el cual, es un secuenciador de última generación. Para el análisis de expresión con el microarreglo utilizaron 21 muestras de tejido normal y tejido tumoral de pacientes con SCC; y para el análisis de la metilación del genoma completo por GA se utilizaron 3 muestras de tejido normal y de tejido tumoral (SCC). Se identificaron seis genes: *CCDC37*, *CYTL1*, *CDO1*, *SLIT2*, *LMO3* y *SERPINB5*, que están

regulados por la metilación del DNA y sugieren su valor como moléculas blanco para estudios posteriores en SCC (Kwon *et al*, 2012).

La identificación de eventos genéticos y epigenéticos implicados en la carcinogénesis ha sido facilitada por la aplicación de plataformas de microarreglos de alta resolución y de alto rendimiento. Utilizando estas técnicas, Son y colaboradores combinaron perfiles de número de copias de DNA y patrones de metilación en 20 muestras de tejido tumoral y tejido normal adyacente de pacientes con NSCLC utilizando técnicas basadas en microarreglos. En el análisis de metilación de DNA en 1505 CpG autosómicos que están asociados con 807 genes relacionados a cáncer, identificaron 6 y 9 loci con niveles altos y bajos de metilación, respectivamente; en el tejido tumoral en comparación con el tejido normal de pacientes con AD. En las muestras de pacientes con SCC se identificaron 3 loci con alto nivel y 7 loci con bajo nivel de metilación de DNA comparado con el tejido normal, con el análisis de perfiles combinado identificaron a *HOXA9* como un posible candidato potencial para la patogénesis y el diagnóstico de pacientes con NSCLC (Son *et al*, 2011). En otro estudio, realizado por Lokk y colaboradores tuvo como objetivo la identificación de biomarcadores candidatos de metilación, a nivel genómico, en las primeras etapas de NSCLC. Para el análisis de metilación del DNA utilizaron muestras de 48 pacientes con estadio I de NSCLC y 18 muestras de tejido de pulmón libre de cáncer, usando un microarreglo que cubre 27578 CpGs en 14495 genes; correlacionaron los cambios de la metilación de DNA con la expresión y llevaron a cabo un análisis de sobre-vida. Observaron hipermetilación de 496 CpG's en 379 genes e hipometilación de 373 CpG's en 335 genes de NSCLC. Como resultado del análisis de sobre-vida encontraron 10 CpG's en 10 genes, en los cuales el nivel de metilación difiere en los distintos grupos de sobre-vida (Lokk *et al*, 2012). Se ha reportado en cáncer de colon que un subconjunto de tumores sufren una alta tasa de metilación de DNA en promotores de un gran número de loci, los cuales, referido como fenotipo metilador de islas CpG (CIMP, por sus siglas en inglés). En cáncer pulmonar, no se había evaluado marcadores de metilación que pudieran predecir los subgrupos más ampliamente metilados (CIMP); por lo que, Shinjo y colaboradores evaluaron el estado de metilación en 41 muestras de AD utilizando un análisis MCAM (Microarreglo de Amplificación de islas CpG Metiladas); entre 6157 genes en el microarreglo, seleccionaron 1156 genes que son comúnmente metilados en un 10% de los AD y se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico, se identificó el estado de metilación del DNA de 6 marcadores CIMP [*CCNA1*, *ACAN*, *GFRA1*, *EDARADD*, *MGC45800* y *p16 (CDKN2A)*] en un total de 128 tumores pulmonares tipo AD (Shinjo *et al*, 2012).

Varias estrategias han sido descritas para diferenciar las citosinas metiladas y no metiladas en el marco de la epigenómica basado en microarreglos. Estas técnicas están basadas en el enriquecimiento del DNA metilado y/o en la modificación del DNA por bisulfito de sodio. Una técnica para aislar secuencias de DNA metilado es la digestión del DNA con endonucleasas de restricción no-sensibles y sensibles a metilación para su posterior purificación ya sea por marcaje con biotina o ligación de adaptadores, seguido de amplificación por PCR (Esteller, 2008).

Utilizando estas estrategias de alto rendimiento cientos de genes han sido identificados estar metilados en tumores. Así como, también los patrones diferenciales de metilación entre muestras de tumor y tejido normal; y metilación diferencial entre tipos histológicos.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los cambios en el patrón de metilación del DNA, en células tumorales inducen entre otros, dos grandes fenómenos moleculares: 1) la hipometilación global del genoma y 2) la hipermetilación local de regiones discretas situadas en secuencias promotoras de genes codificantes. En este sentido, quizás la hipermetilación en islas CpG represente el evento epigenético mejor estudiado relacionado al desarrollo del cáncer (Esteller, 2005; Pogribny y Rusyn, 2013). Al respecto, hace más de una década diversas evidencias consolidaron un primer consenso donde la metilación de novo de islas CpG de alta densidad en regiones promotoras conduce al silenciamiento de genes supresores de tumor, quizás representando un paso crítico para la transformación maligna o progresión tumoral (Rhee *et al*, 2000, Pogribny y Rusyn, 2013).

Si bien actualmente diversos estudios sugieren que metilación del DNA no representa obligadamente silenciamiento genético, diversas evidencias señalan que los cambios en los patrones metilación del DNA genómico están involucrados en etapas iniciales de la transformación tumoral presente desde lesiones precursoras o estados preneoplásicos. Mientras que en pacientes con cáncer, alteraciones en dichos patrones de metilación del DNA están asociadas significativamente con la diferenciación del tumor, la agresividad del tumor y el pobre pronóstico en pacientes. Por lo que se ha propuesto que bajo condiciones preneoplásicas los cambios en los patrones de metilación del DNA prevalecen y progresan rápidamente promoviendo el control biológico de las neoplasias malignas (Balgkouranidou *et al*, 2013).

En este contexto, el presente proyecto se planteó el desarrollo de un trabajo descriptivo del epigenoma (perfil de metilación global del DNA) en células de cáncer pulmonar para la identificación de segmentos genéticos y/o genes codificantes que representen probables nuevos marcadores epigenéticos a partir de células de cáncer pulmonar derivadas de pacientes mestizos Mexicanos y caucásicos, empleando para ello una plataforma de análisis del masivo del epigenoma basada en microarreglos en submegabases (SMRT-27k).

IV. OBJETIVO GENERAL

- ▶ Obtener el perfil de metilación global del genoma en modelos celulares de cáncer pulmonar para la identificación de probables nuevos marcadores epigenéticos por metilación del DNA.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ▶ Analizar el patrón de metilación global del DNA genómico en las líneas celulares de cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma A-427, INER-51 e INER-37 mediante el uso de Microarreglos de DNA de alta resolución en sub-megabases a través de ensayos de restricción enzimática sensible a metilación del DNA.
- ▶ Desarrollar análisis bioinformático para la identificación de regiones genéticas con aberraciones en el patrón de metilación del DNA.
- ▶ Identificar y proponer un conjunto de genes o regiones genéticas de importancia funcional como nuevos probables marcadores epigenéticos en cáncer pulmonar para su posterior análisis de validación epigenética.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivos y Líneas celulares

Se utilizaron tres líneas celulares: A-427 obtenida del ATCC (American Type Culture Collection), INER-51 e INER-37 (de Lucio *et al*, 2005; Ponce de León *et al*, 2005; Zapata *et al*, 2007) establecidas en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER; cultivadas en RMPI-1640 complementado con 10% (V/V) de suero fetal bovino (SFB) a 37° C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂, alcanzando una confluencia de ~ 90 %. En la tabla 1 se describen las características de las líneas celulares.

TABLA 1. Líneas celulares de cáncer de pulmón.

NOMBRE	CLASIFICACIÓN	SUBTIPO	ORIGEN
A-427	NSCLC	Adenocarcinoma	ATCC, Hombre caucásico de 52 años con derrame pleural maligno.
INER-51	NSCLC	Adenocarcinoma	INER, Masculino mestizo mexicano de 51 años, derrame pleural de paciente no tratado.
INER-37	NSCLC	Adenocarcinoma	INER, Femenino mestizo mexicano de 48 años, derrame pleural de paciente no tratado.

Se realizaron cultivos por periodos de 48 horas; después de este tiempo los cultivos fueron cosechados: primero se lavaron las células con PBS IX y se agregó 3ml de Tripsina 0.25% en PBS (biowest SAS), y se incubó por 1 minuto a 37°C. Posteriormente se inactivó la tripsina con medio RMPI-1640.

5.2 Extracción de Ácidos Nucleicos

El DNA genómico de las líneas celulares fue extraído utilizando el kit AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El DNA y RNA fueron cuantificados utilizando el NanoDrop N1000 (ThermoScientific). El DNA y RNA fueron almacenados a -20°C .

5.3 Hibridación Genómica Comparativa Empleando Microarreglos SMRT (Submegabases Resolution Tiling)

5.3.1 Plataforma utilizada

Se utilizó una plataforma de microarreglos en submegabases SMRT-27k que contiene 32,433 fragmentos clonados en BACs (Cromosomas Bacterianos Artificiales) con una resolución de 80 kb que cubre 1.5 veces el genoma humano en un solo experimento, cada BAC está por duplicado (Ishkanian *et al*, 2004).

5.3.2 Preparación del DNA

2.0 μg de DNA de cada una de las líneas celulares A-427, INER-51 e INER-37 se sometieron a corte con 10 U de la enzima de restricción MseI (New England Biolabs) a 37°C durante toda la noche en una reacción de 20 μl , esta primera digestión se llevó a cabo por duplicado; una de las muestra de cada línea celular fue utilizado para la hibridación como DNA hipermetilado enriquecido (mediante ensayo de restricción enzimática sensible a metilación) y la otra muestra como DNA de referencia (No-metilado). Esta enzima digiere todo el DNA en pequeños fragmentos entre 300-1500 pb, ya que su sitio de reconocimiento (T↓TAA) raramente ocurre en regiones ricas en GpC, por lo que las islas CpG permanecen intactas después de la restricción. En la tabla 2 se muestra las condiciones de la reacción enzimática.

TABLA 2. Condiciones de la reacción enzimática.

REACTIVOS	A-427		INER-51		INER-37	
	DNA Enriquecido	DNA No-metilado	DNA Enriquecido	DNA No-metilado	DNA Enriquecido	DNA No-metilado
BUFFER 2	2 µl					
MseI	1 µl					
DNA (2 µg)	3 µl	3 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Agua c.b.p 20 µl	14 µl	14 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

El siguiente paso fue la ligación con 1 µl del adaptador universal (linker) H-12 (5'- TAA TCC CTC GGA) a concentración inicial de 10 µM y se incubó 4 horas con 1 µl la enzima T₄ ligasa (New England Biolabs) en 30 µl de reacción a 16° C. La reacción es inhibida a 65° C por 15 minutos (Hou *et al*, 2003).

La muestra de DNA (Enriquecido) fue digerido con la combinación de cuatro enzimas sensibles a metilación: HpaII, Hinp1I (Hin6I), HpyCH4 IV y AciI (SsiI) (New England Biolabs), la incubación se llevó a cabo a 37°C por 6 horas (Tabla 3). Los fragmentos genómicos que contienen sitios metilados protegidos de la restricción enzimática fueron sometidos a una amplificación mediante el uso de oligonucleótidos linker-PCR (Schumacher *et al*, 2006).

TABLA 3. Condiciones de la reacción enzimática sensible a metilación.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD
Buffer 1	10X	6 µl
BSA	10X	6 µl
ACi I	10,000 unidades/ml	2 µl
HinP1 I	10,000 unidades/ml	2 µl
HpyCH4 IV	10,000 unidades/ml	2 µl
Hpa II	10,000 unidades/ml	2 µl
DNA	*****	30 µl
Agua c.b.p	*****	10 µl
Volumen Final		60 µl

- Se incubo a 37°C por 4 horas.
- Después de la incubación de 4 horas se añadió 1 µl más de cada enzima.
- Se volvió a incubar a 37°C por 2 horas.
- Se inactivaron las enzimas a 70°C por 15 minutos.

La reacción de PCR fue llevada en 100 µl con 5.0 µl iniciador H-24 (5'- AGG CAA CTG TGC TAT CCG AGG GAT) a una concentración inicial de 10 µM, 1 µl de la enzima Taq DNA polimerasa y 2.5 µl de dNTPs con una concentración inicial de 10 mM). La reacción de PCR fue purificada por métodos estándar (Fenol-cloroformo) y cuantificados por NanoDrop 1000 (ThermoScientific). La muestra de DNA de referencia (No-metilado) de cada línea celular no fue sujeto a corte con las enzimas de restricción sensibles a metilación [HpaII, Hin6I (Hinp1I), Hpy- CH4IV y AciI (SsiI)] esta fue marcada directamente.

5.3.3 Marcaje del DNA con Alexa Fluor® 555 and Alexa Fluor® 647 dyes

Se marcó 2.0 µg de DNA metilado enriquecido y el DNA de referencia (DNA No-metilado) de cada una de las líneas celulares, se utilizó el kit BioPrime® Plus Array CGH Genomic Labeling System (INVITROGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación se describe el protocolo utilizado (Tabla 4 y 5):

TABLA 4. Condiciones de la reacción de marcaje.

REACTIVO	Alexa Fluor® 647 (ROJO)	Alexa Fluor® 555 (VERDE)
Solución de Nanomeros	20 µl	20 µl
DNA (2 µg)	20 µl	20 µl
Agua c. b. p. 44 µl	4 µl	4 µl

- Las muestras se incubaron a 95°C por 10 minutos e inmediatamente se colocaron en hielo 5 minutos.
- Esto se realizó protegiendo las muestras de la luz.

- El siguiente paso fue adicionar:

TABLA 5. Continuación del protocolo de la reacción de marcaje.

REACTIVO	Alexa Fluor® 647 (ROJO)	Alexa Fluor® 555 (VERDE)
Mix dNTPs (Alexa Fluor® 555-aha-dCTP/ Alexa Fluor® 647-aha-dCTP)	5 µl	5 µl
Enzima Exo-Klenow	1 µl	1 µl
Volumen final	50 µl	50 µl

- Se mezcló cuidadosamente y se centrifugo brevemente.
- Se incubo a 37 °C por 6 horas, las reacciones fueron protegidas de la luz.
- Se añadió 5 µl del buffer de paro a las muestras y se colocaron sobre hielo.

5.3.4 Purificación de la reacción de marcaje

El DNA metilado enriquecido y el DNA de referencia (DNA No-metilado) marcados fueron purificados por columna (MicroSpin G-50, ilustra GE Healthcare) y fueron cuantificados por NanoDrop 1000 se utilizó la opción de Microarray. Se describe brevemente el protocolo (Figura 6):



- Preparación de la columna: después de re-suspender el líquido de la columna se rompió la base y se colocó en un tubo vacío.
- Se centrifugo por 1 min. a 735 G.
- Se descartó el líquido resultante de la centrifugación, en la columna se observó un bisel (como describe el fabricante), con mucho cuidado, dentro del bisel se colocó la muestra de DNA marcado.

FIGURA 6. Purificación del DNA marcado.
Principio básico de las columnas ilustra MicroSpin G-50.

5.3.5 Hibridación con el microarreglo SMRT

Ambas muestras de DNA marcado fueron mezcladas y secadas por vacío utilizando un roto concentrador (Savant DNA SpeedVac, ThermoScientific). El DNA marcado y concentrado, fue resuspendido en una mezcla de buffer de hibridación DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics), 25 mg/ml de tRNA y DNA de esperma de salmón. La mezcla de la hibridación fue cargada en el microarreglo SMRT y cubierto con un cubre-objeto. El microarreglo fue colocado en una cámara húmeda sellada con papel parafilm e incubado por 16 horas a 37° C en una incubadora estándar. El cubre-objeto fue removido por inmersión del microarreglo en una solución de lavado 2XSSC y 0.5% de SDS. El microarreglo fue lavado dos veces por 5 minutos a 42° C en la solución de lavado 2XSSC, 0.5% SDS, seguido por dos lavados en una solución de 0.5XSSC y un lavado en agua mQ. El microarreglo fue secado por centrifugación.

5.4 Análisis de Imagen y Análisis Bioinformático

La imagen del microarreglo fue adquirida con el escáner GenePix 4000A (USA). La imagen adquirida fue analizada con el software GenePix Pro 5.0. La normalización fue dada por el cociente de la intensidad de la señal de la muestra metilada enriquecida y la muestra input. Se llevó a cabo el análisis de los datos (promedio, rango, autocorrelación y correlación) en Excel (Microsoft). Fueron generados archivos con las anotaciones en Log₂ relativas a los niveles de fluorescencia. Adicionalmente el análisis bioinformático fue realizado empleando el software CGH-Explorer versión 3.1., para la identificación y selección de secuencias metiladas y no metiladas en el genoma. La búsqueda de las regiones se realizó con base en la anotación del genoma humano con fecha Mar. 2006 (NCBI36/hg18) Assembly publicada en UCSC GENOME BROWSER.

VI. RESULTADOS

6.1 POR CGH ENTRE PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR

Para analizar el perfil de metilación en cáncer pulmonar se utilizaron tres líneas celulares derivadas de adenocarcinomas; la línea celular A-427 (AD, Hombre caucásico de 52 años con derrame pleural maligno, 1973, ATCC), INER-51 (AD, Masculino Mestizo-Mexicano de 51 años, INER. Derrame pleural de paciente no tratado) e INER-37 (AD, Femenino Mestizo-Mexicano de 48 años, INER. Derrame pleural de paciente no tratado). Como se menciona anteriormente, varios métodos se basan en enzimas de restricción, las cuales se utilizan para enriquecer secuencias metiladas o no metiladas proporcionando un perfil de metilación. Utilizando esta técnica basada en enzimas de restricción Kron y colaboradores, y Liu y colaboradores encontraron que la hipermetilación del Factor de crecimiento transformante Beta 2 (*TGFβ2*) y el gen Homeobox D3 (*HOXD3*) fueron identificados como biomarcadores potenciales de la progresión del cáncer de próstata (Kron *et al*, 2009; Liu *et al*, 2011). En cuanto a la plataforma utilizada en este trabajo fue el microarreglo SMRT-27 que abarca aproximadamente el genoma completo; fue diseñado para detectar alteraciones pequeñas de 50 kb de tamaño (Coe *et al*, 2007). Fadlelmola y colaboradores realizaron un estudio basado en la plataforma SMRT utilizando para la búsqueda líneas celulares derivadas de linfoma de Hodgkin (KMH2 y L428) y líneas celulares derivadas de Linfoma anaplásico de células grandes (DEL y SR-786) para identificar, en alta resolución, el número de copias de genes alterados que pudieran estar involucrados en la patogénesis de linfoma de Hodgkin (HL) y Linfoma anaplásico de células grandes (ALCL). Duplicaciones y deleciones en el número de copias de genes se observaron en varios cromosomas en las cuatro líneas celulares investigadas. Estas alteraciones, no sólo confirmaron, aberraciones de regiones cromosómicas previamente publicados en HL y ALCL, sino también identificaron 9 regiones nuevas. Se identificaron varias regiones de amplificación en varios loci no identificados anteriormente, permitiendo la detección de regiones de pérdida o ganancia en el número de copias pequeñas de aproximadamente 40-80 kb (Fadlelmola *et al*, 2008). El microarreglo puede identificar microamplificaciones y microdeleciones; por lo que, sugerimos que el empleo de ambas metodologías permite tener una mayor representación de regiones que podrían estar participando en cáncer pulmonar.

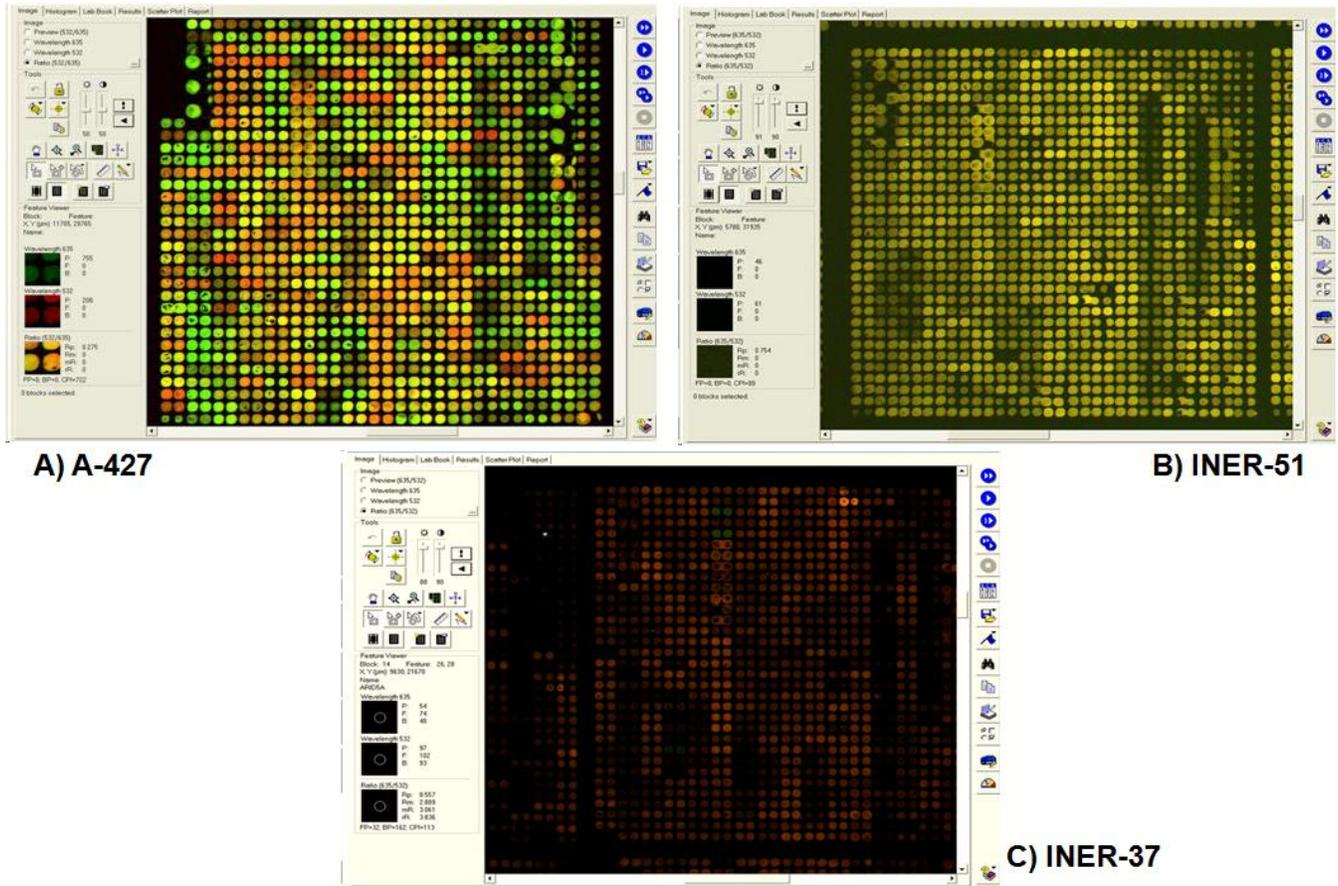


FIGURA 7. Comparación del perfil de metilación en cáncer pulmonar. Imágenes obtenidas del escáner GenPix 4000A del CGH con el microarreglo SMRT-27 de la línea celular A-427, INER-51 e INER-37; el color rojo denota hipermetilación y el color verde denota hipometilación.

En la figura 7 se observan las tres hibridaciones con los microarreglos SMRT-27 de las líneas celulares: A-427, INER-51 e INER-37; la línea celular A-427 muestra un de perfil de metilación heterogéneo, se observan spots rojos y verdes (hipermetilación e hipometilación, respectivamente), así como también colores intermedios (naranja y amarillo), mostrando diferentes niveles de metilación (figura 7A). La línea celular INER-51 muestra un perfil de metilación homogéneo, se observan spots de color verde y amarillo (figura 7B), de manera general, la línea INER-51 se encuentra hemi-metilada (Es decir, una cadena de DNA metilada y la otra no. La acción de las DNA metiltransferasas de mantenimiento ocasiona que el DNA sea metilado al inicio de la replicación, sólo la cadena nueva es metilada, por lo que los patrones son heredados de una manera semiconservativa y pueden ser heredados en la población celular. En el humano, las ADN metiltransferasas con actividad de novo, DNMT3A y

DNMT3B, adicionan un grupo metilo a la citosina del dinucleótido CpG no metilado, creando un nuevo CpG altamente hemimetilado) (Ehrlich y Lacey, 2013).

En contraste, en la línea celular INER- 37 (figura 7C) se observan spots de color rojo; mostrando una tendencia a la hipermetilación.

6.2 PERFIL DE METILACIÓN ADENOCARCINOMA PULMONAR (LÍNEA CELULAR A-427, HOMBRE CAUCÁSICO DE 52 AÑOS CON DERRAME PLEURAL MALIGNO)

En la figura 8 se muestra la imagen de la hibridación obtenida por el escáner GenPix4000A, los datos fueron normalizados sobre una base de \log_2 . Se obtuvieron 32,281 posiciones de spots, obteniéndose 45 posiciones de spot con un alto índice de fluorescencia ($>2.5 \log R_2$, hipermetilados) y 152 posiciones de spots con un índice de fluorescencia menor a $-2.0 \log R_2$ (hipometilados).

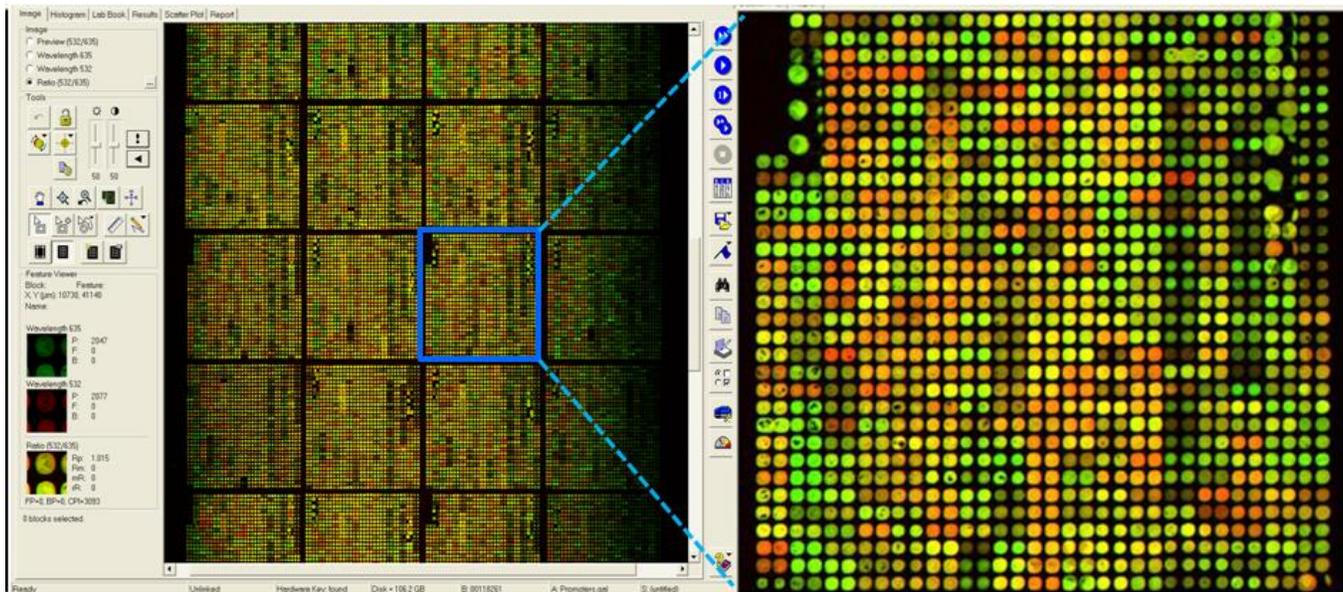


FIGURA 8. Análisis del perfil de metilación de Línea Celular de Cáncer Pulmonar A-427. A) La imagen obtenida del escáner GenPix 4000A de la línea celular A-427. B) Un acercamiento de un solo cuadrante del microarreglo SMRT-27, donde se observa con mayor detalle el perfil de metilación de la línea celular A-427.

En la figura 9, se muestran los datos visualizados en el software CGH-Explorer, donde cada spot representa a la región que se localiza en el BAC y su nivel de metilación de acuerdo al índice de fluorescencia. Los spots que se encuentran más alejados de la línea basal tanto en la parte superior como inferior, representan los spots hipermetilados ($>2.5 \log R2$) y los spots hipometilados ($-2.0 \log R2$), respectivamente.

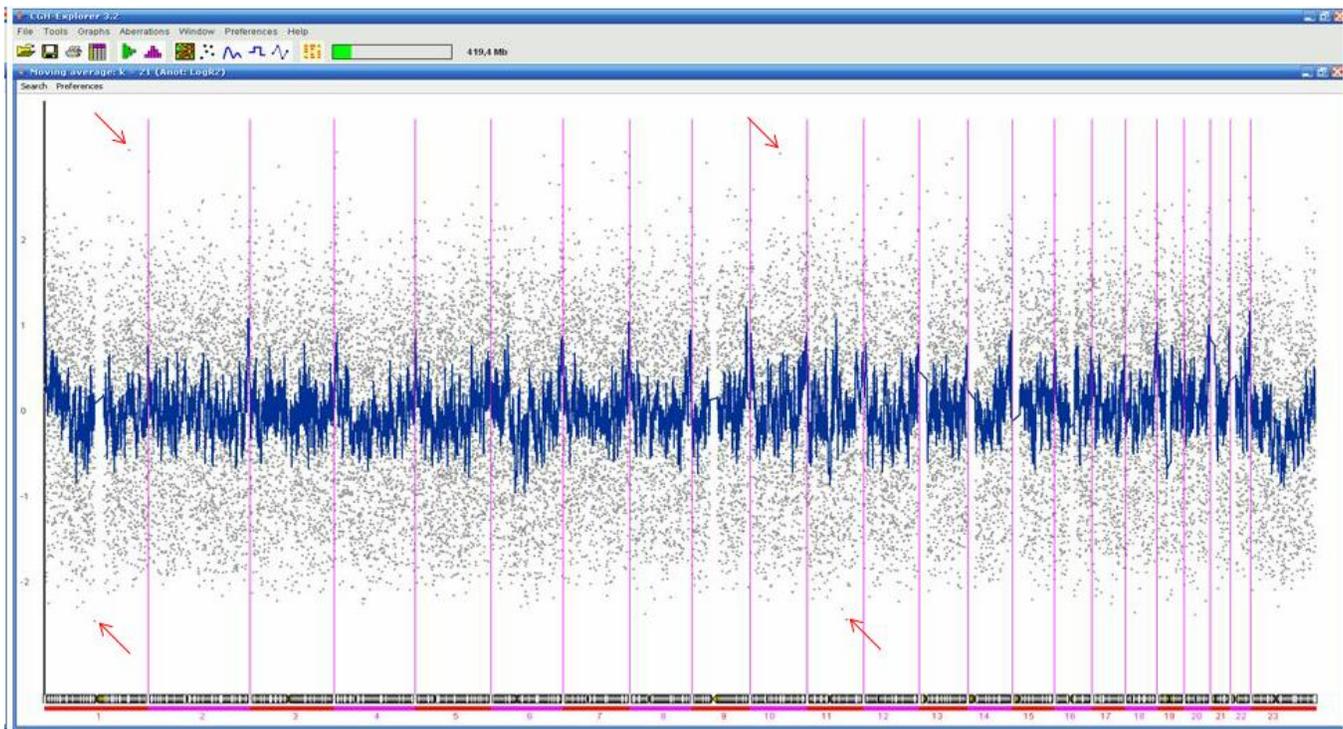


FIGURA 9. Visualización de los datos normalizados en $\log R2$ en el software CGH-Explorer v3.2 de A-427. En la parte inferior se observa los cromosomas 1-22, XY y los spots representan a los BACs, las flechas rojas señalan ejemplos de segmentos genéticos (spots) con un índice de fluorescencia $>2.5 \log R2$ así como segmentos (spots) hipometilados con índice de fluorescencia $-2.0 \log R2$.

En la tabla 6 y 7 se observan los datos numéricos extraídos del análisis en el software CGH-Explorer, donde cada spot es ordenado de acuerdo a su nivel de metilación (mayor y menor índice de fluorescencia, respectivamente). Mostrando ejemplos representativos, observándose el número de cromosoma, la región donde se localiza el BAC, el nombre del clon (BAC) y el índice de fluorescencia.

TABLA 6. Datos obtenidos del análisis en el software CGH-Explorer v3.2 de A-427. BAC's con un índice de fluorescencia >2.5 logR2 (Hipermetilados).

Chr	nucl	Name	LogR ₂
1	201278003	N0805B14	3.042
4	5035888	N0326O23	3.018
7	147822149	N0185C24	3.017
10	71228470	N0318P09	3.001
7	157007524	M2041J20	2.997
6	125671629	N0324H19	2.997
13	77191894	N0188A23	2.944
12	34297760	N0190B24	2.936
20	31104625	N0734L12	2.91
7	72412825	N0590H03	2.896
9	35317929	N0192I12	2.89
13	64402707	N0261A01	2.874
6	168286138	N0503C24	2.863
3	67896272	N0365L22	2.848
4	1997037	N0318G06	2.834
1	58698038	N0206P01	2.808
2	1842728	N0163G21	2.79
7	148934800	F0589F15	2.774
12	117334296	N0183N05	2.739
10	134369054	N0033G05	2.731
22	35960300	N0515J23	2.728
11	2748206	N0494F04	2.697
7	115959728	N0564A14	2.686
8	22375631	N0459E05	2.664
6	139553128	M2180K06	2.657
6	160721089	M2310B05	2.639
12	8982046	N0536M06	2.625

TABLA 7. Datos obtenidos del análisis en el software CGH-Explorer v3.2 de A-427. BAC's con un índice de fluorescencia $-2.0 \log R_2$ (Hipometilados).

Chr	nucl	Name	LogR ₂
1	118986907	M2025H04	-2.462
11	94165964	N0590B12	-2.444
20	26037789	N0739J21	-2.39
8	36066943	N0748H05	-2.377
18	22314809	N0634O14	-2.364
11	83063649	N0727A23	-2.322
1	77485792	N0417K02	-2.298
6	71308395	N0120O24	-2.292
23	64616310	N0753P06	-2.29
6	86604108	N0486D20	-2.259
17	45980024	N0104O05	-2.258
4	67698514	N0234L24	-2.255
1	10809955	N0594M07	-2.254
1	92341185	N0597G17	-2.239
12	83645863	N0789N19	-2.232
3	63099946	N0224F06	-2.227
20	51166027	N0260O01	-2.226
6	108110816	N0143H22	-2.217
10	42516353	N0118G16	-2.215
19	24058808	N0630I12	-2.211
15	47058290	N0761G02	-2.211

Se analizaron 13 clones con un alto índice de fluorescencia $>2.5 \log R_2$, en la base de datos obtenida del análisis de la imagen del microarreglo, se buscó la ubicación del clon de acuerdo a su nombre, se realizó una búsqueda automática en la anotación del genoma humano del Mar. 2006 (NCBI36/hg18) Assembly en UCSC Genome Browser. Los resultados de la búsqueda se muestran en la tabla 8. Los genes que se encuentran ubicación dentro de las regiones hipermetiladas tiene diferentes

funciones celulares como en interacciones entre célula-matriz (*CHI3L1*, *CHIT1*), en la adhesión celular (*PPFIA4*, *COL13A1*, *MYBPH*, *CYTL1*), comunicación celular (*ADORA1*) y factores de transcripción (*MYOG*). La mayoría de estos genes no han sido reportados en cáncer pulmonar. En cuanto a las regiones teloméricas o muy cercanas al telómero se encontró un gen (*C7orf33*) dicho gen codifica para una proteína de 177 aminoácidos no caracterizada. Dichas regiones se encuentran hipermetiladas, de acuerdo a reportes previos (Wolffe *et al*, 1999; Garcia-Cao *et al*, 2004; Grewal *et al*, 2007), como se observa en la figura 10.

TABLA 8. Regiones insertadas en BAC's con perfil de Hipermetilación de A-427.

CROMOSOMA	NOMBRE CLON	logR2	Localización	Genes
1	N0805B14	3.042	1q32.1	<i>ADORA1</i> , <i>PPFIA4</i> , <i>MYBPH</i> , <i>CHI3L1</i> , <i>CHIT1</i> , <i>MYOG</i> .
4	N0326O23	3.018	4p16.2 – p16.1	<i>STK32B</i> , <i>CYTL1</i>
7	N0185C24	3.017	7q36.1	<i>C7orf33</i>
10	N0318P09	3.001	10q21.3 – q22.1	<i>COL13A1</i>
6	N0324H19	2.977	6q22.31	*****
7	M2041J20	2.977	7q36.3	<i>PTPRN2</i>
13	N0261A01	2.944	13q21.32	*****
12	N0183N05	2.936	12q24.23	*****
8	N0459E05	2.666	8p21.3	<i>PPP3CC</i> , <i>PDLIM2</i> , <i>SORBS3</i> , <i>KIAA1967</i>
13	N0188A23	2.944	13q22.3	<i>SLAIN1</i>
12	N0190B24	2.936	12p11.1	*****
6	N05003C24	2.863	6q27	*****
3	N0365L22	2.848	3p14.1	*****

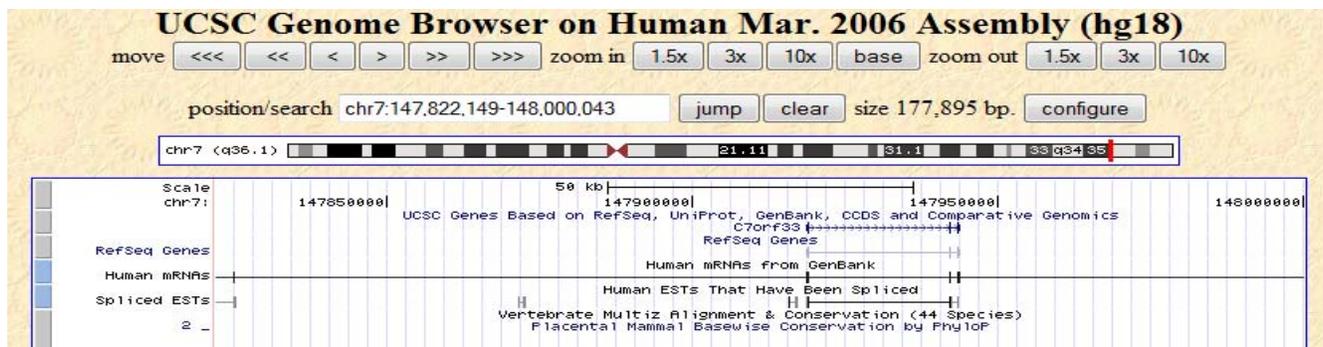


FIGURA 10. Región hipermetilada contiene un gen (*C7orf33*), cercano al telómero (A-427). El nombre del BAC es N0185C24 con índice de fluorescencia de 3.01.

En cuanto a las regiones hipometiladas se analizaron 12 clones, los genes ubicados dentro de estas regiones (Tabla 9), también tienen papeles biológicos importantes como la adhesión y migración celular (*AMOTZ1*), participando en canales de transporte (*KCTDI*, *DLG2*), en la señalización celular (*SMAP1*, *CACNAIG*), en la remodelación de la cromatina (*COPS2*, *SECISBP2*, *SCML4*), factores de transcripción (*ZNF254*) y como receptores para la excreción de aniones orgánicos (*ABCC3*).

TABLA 9. Regiones insertadas en BAC's con perfil de hipometilación de A-427.

CROMOSOMA	NOMBRE CLON	logR2	LOCALIZACIÓN	GENES
18	N0634O14	-2.36	18q11.2	<i>KCTDI</i>
11	N0727A23	-2.32	11q14.1	<i>DLG2</i>
6	N0120O24	-2.29	6q13	<i>FAM135A</i> , <i>C6orf57</i> , <i>SMAP1</i>
17	N0104O05	-2.72	17q21.33	<i>CACNAIG</i> , <i>ABCC3</i>
15	N0761G02	-2.67	15q21.1	<i>COPS2</i> , <i>SECISBP2</i>
19	N0630I12	-2.67	19p12	<i>ZNF254</i>
10	N0118G16	-2.67	10q11.21	*****
6	N0143H22	-2.68	6q21	<i>SCML4</i>

1	M2025H04	-2.92	1p12	*****
11	N0590B12	-2.92	11q21	<i>AMOTZ1</i>
20	N0739J21	-2.85	20p11.1	*****
8	N0748H05	-2.83	8p12	*****

6.3 PERFIL DE METILACIÓN ADENOCARCINOMA PULMONAR (LÍNEA CELULAR INER-51 MASCULINO MESTIZO MEXICANO DE 51 AÑOS, INER. DERRAME PLEURAL DE PACIENTE NO TRATADO)

En la figura 11 se muestra la imagen de la hibridación obtenida por el escáner GenPix4000A, los datos fueron normalizados sobre una base de \log_2 . Se obtuvieron 26098 posiciones de spots, obteniéndose 10 posiciones de spot con un alto índice de fluorescencia ($>2.0 \log_2$, hipermetilados) y 9165 posiciones de spots con un índice de fluorescencia menor a $0 \log_2$ (hemimetilados).

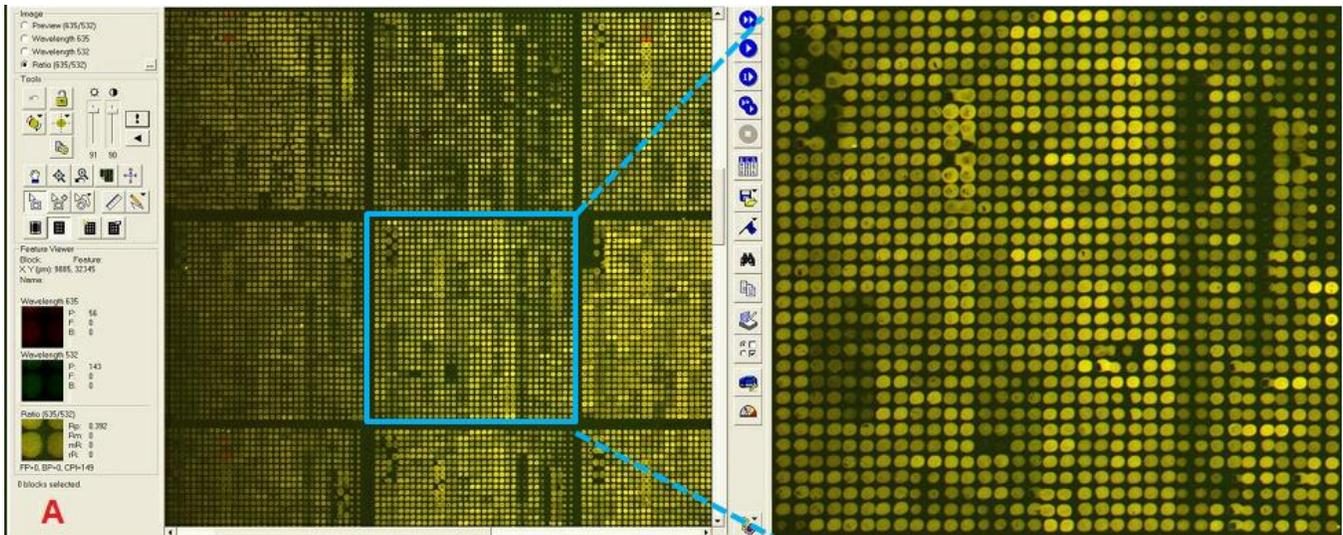


FIGURA 11. Análisis del perfil de metilación de Línea Celular de Cáncer Pulmonar INER-51. A) La imagen obtenida del escáner GenPix 4000A de la línea celular INER-51. **B)** Un acercamiento de un solo cuadrante del microarreglo SMRT-27, donde se observa con mayor detalle el perfil de metilación de la línea celular INER-51.

En la figura 12, se muestran los datos visualizados en el software CGH-Explorer, donde cada spot representa a la región que se localiza en el BAC y su nivel de metilación de acuerdo al índice de fluorescencia. Los spots que se encuentran más alejados de la línea basal tanto en la parte superior como inferior, representan los spots hipermetilados ($>2.0 \log R_2$) y los spots hemimetilados ($0 \log R_2$), respectivamente.

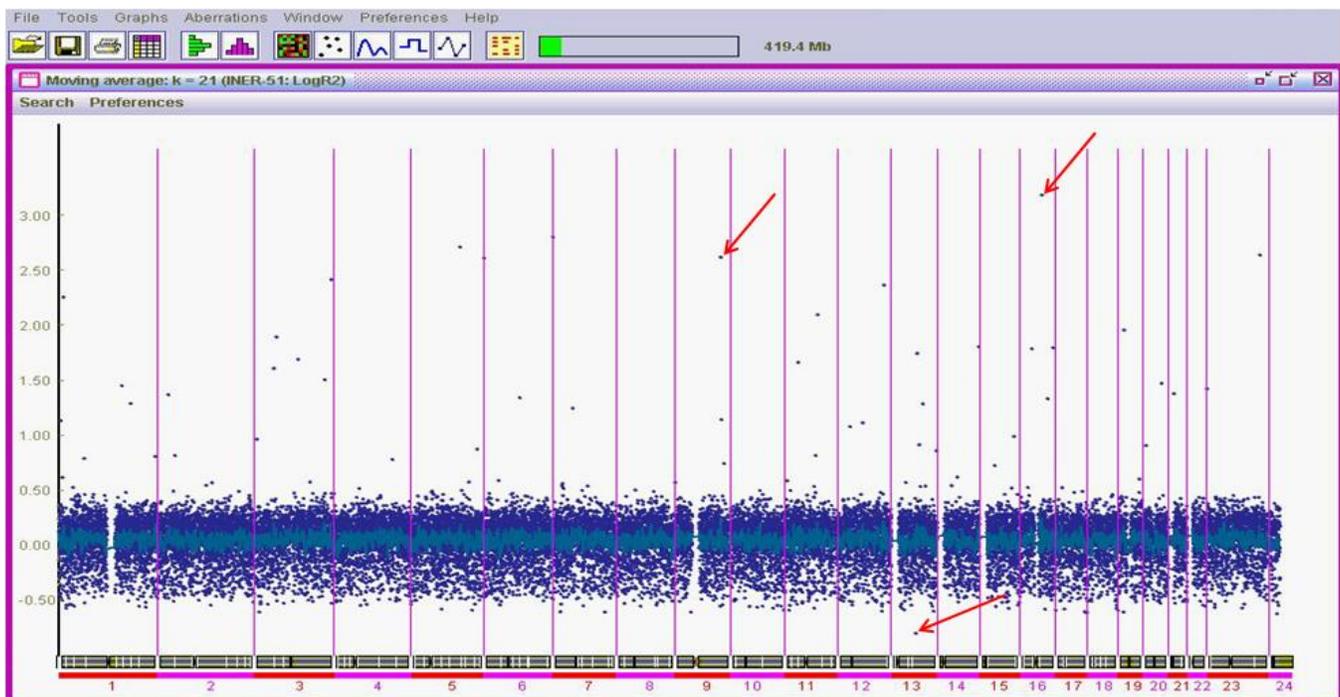


FIGURA 12. Visualización de los datos normalizados en $\log R_2$ en el software CGH-Explorer v3.2 de INER-51. En la parte inferior se observa los cromosomas 1-22, XY y los spots representan a los BACs, las flechas rojas señalan ejemplos de segmentos genéticos (spots) con un índice de fluorescencia $>2.0 \log R_2$, y también segmentos (spots) hipometilados con un índice de fluorescencia menor a $1.0 \log R_2$.

En la tabla 10 y 11 se observan los datos numéricos extraídos del análisis en el software CGH-Explorer, donde cada spot es ordenado de acuerdo a su nivel de metilación (mayor y menor índice de fluorescencia, respectivamente). Se muestra ejemplos representativos, donde se observa el número de cromosoma, la región donde se localiza el BAC, el nombre del clon (BAC) y el índice de fluorescencia.

TABLA 10. Datos obtenidos del análisis en el software CGH-Explorer v3.2 de INER-51.

BAC'S con un índice de fluorescencia >2.0 logR2 (Hipermetilados).

Chr	nucl	Name	LogR2
16	53815595	N0676D06	3.184
7	1659347	N0808J07	2.806
5	122162982	N0807H23	2.715
23	130639149	N0676D10	2.643
9	115013082	N0676D12	2.618
5	180327555	N0676D21	2.616
3	190562620	N0675P12	2.417
12	113398624	N0675O11	2.365
1	12255345	N0675L06	2.255
11	82454249	N0812L03	2.098
19	15715114	N0806P05	1.955
3	54658752	N0674P14	1.891
14	103868187	N0675H01	1.803
16	80907943	N0806J24	1.795
16	28691561	N0674B07	1.786
13	63631918	N0808L13	1.745
3	107857352	N0808B02	1.690
11	34721829	N0805H07	1.663
3	48019635	N0808N18	1.608
3	175413349	N0806K08	1.506
20	46483616	N0674K09	1.472
1	156359741	N0806E24	1.449
23	648293	N0808D08	1.420
21	14574560	N0675D22	1.376
2	28171716	N0674J24	1.367

6	90070633	N0806J11	1.341
16	67670222	N0807H04	1.333
1	178699573	N0675H14	1.288
13	78433322	N0805F14	1.283
7	51057999	N0807G04	1.244

TABLA 11. Datos obtenidos del análisis en el software CGH-Explorer v3.2 de INER-51.

BAC'S con un índice de fluorescencia $-1.0 \log R2$ (Hipometilados).

Chr	Nucl	Name	LogR2
13	60921053	N0109J06	-0.807
24	20407171	N0005N03	-0.628
17	77722926	N0286M19	-0.620
9	39294216	N0605F06	-0.614
7	131548564	N0540B11	-0.613
3	11157328	N0622I12	-0.612
19	14553152	M2415M01	-0.611
17	72397834	N0531G04	-0.610
7	19521250	N0606I09	-0.610
13	105102379	N0606A09	-0.603
12	108602948	M2360J23	-0.603
16	88294755	N0616F21	-0.596
5	151000941	N0256K03	-0.595
18	76096564	N0656E08	-0.594
10	133638550	N0605B17	-0.594
11	11490516	M2192D17	-0.593
13	32613180	N0379M14	-0.591
17	21290430	N0208N09	-0.588
5	74130693	N0605M18	-0.587
16	62756658	N0238M01	-0.585

15	71621870	N0757I10	-0.581
18	73008845	N0711F02	-0.580
13	25399541	N0553I05	-0.579
10	106889424	N0165P09	-0.578
23	87026219	N0258J23	-0.577
1	18674688	N0657C12	-0.576
11	73098882	N0555B08	-0.576
23	18291319	N0656N22	-0.573
10	67739869	N0615P14	-0.567
1	217497791	N0270A06	-0.566

Se analizaron 14 clones con un alto índice de fluorescencia $>2.0 \log R2$ de la base de datos obtenida del análisis de la imagen del microarreglo, se buscó la ubicación del clon de acuerdo a su nombre, se realizó una búsqueda automática en la anotación del genoma humano del Mar. 2006 (NCBI36/hg18) Assembly en UCSC Genome Browser. Los resultados de la búsqueda se muestran en la tabla 12.

TABLA 12. Regiones insertadas en BACs con perfil de Hipermetilación de INER-51.

CROMOSOMA	NOMBRE CLON	logR2	LOCALIZACIÓN	GENES
16	N0676D06	3.184	16q12.2	<i>IRX6</i>
7	N0808J07	2.806	7p22.3	<i>ELFN1, MAD1L1</i>
5	N0807H23	2.715	5q23.2	<i>SNX24</i>
X	N0676D10	2.646	Xq26.2	<i>LOC286467</i>
9	N0676D12	2.618	9q32	<i>FKBP15, SLC31A1, CDC26, RNF183, WDR31, BSPRY</i>
5	N0676D21	2.616	5q35.3	<i>BTNL3, BTNL9</i>

3	N0675P12	2.417	3q28	*****
12	N0675O11	2.365	12q24.21	*****
1	N0675L06	2.255	1p36.22	<i>VPS13D</i>
11	N0812L03	2.098	11q14.1	<i>PCF11, ANKRD42</i>
19	N0806P05	1.955	19p13.12	<i>CYP4F24P, OR10H5, OR10H1, UCA1, CYP4F2, CYP4F11</i>
3	N0674P14	1.891	3p14.3	<i>CACNA2D3</i>
14	N0675H01	1.803	14q32.33	*****
16	N0806J24	1.795	16q23.3	*****

De las regiones hipometiladas se analizaron 14 clones en la anotación del genoma humano del Mar. 2006 (NCBI36/hg18) Assembly en UCSC Genome Browser. Los resultados de la búsqueda se muestran en la tabla 13.

TABLA 13. Regiones insertados en BACs hipometilados de INER-51.

CROMOSOMA	NOMBRE CLON	logR2	LOCALIZACIÓN	GENES
13	N0109J06	-0.807	21q21.31	*****
Y	N0005N03	-0.628	Yq11.222	*****
17	N0286M19	-0.62	17q25.3	<i>CCDC57, SLC16A3, CSNK1D, CD7, SECTM1</i>
9	N0605F06	-0.614	9p13.1	<i>FAM75A2, FAM75A1, LOC653501, ZNF658B</i>
7	N0540B11	-0.613	7q32.3	<i>PLXNA2</i>
3	N0622I12	-0.612	3p25.3	<i>HRH1, ATG7</i>

19	M2415M01	-0.611	19p13.12	<i>CLEC17A, ZNF333, EMR2, EMR3,</i>
17	N0531G04	-0.61	17q25.2	<i>MGAT5B</i>
13	N0606A09	-0.603	13q33.2	*****
16	N0616F21	-0.596	16q24.3	<i>SPATA2L, C16orf7, LOC100128881, ZNF276, FANCA, SPIRE2</i>
5	N0256K03	-0.595	5q33.1	<i>SPARC, ATOX1, G3BP1</i>
18	N0656E08	-0.594	18q23	<i>PARD6G</i>
11	M2192D17	-0.593	11p15.3	<i>GALNTL4, MIR4299I</i>
13	N0379M14	-0.591	13q13.1	<i>STARD13</i>

De las regiones analizadas en la anotación del genoma humano del Mar. 2006 (NCBI36/hg18) Assembly en UCSC Genome Browser se seleccionaron tres genes y un RNA no codificante, que tienen importancia biomédica por su participación en la progresión o mantenimiento en diferentes tipos de cáncer, los genes seleccionados se muestran en la tabla 14.

TABLA 14. Genes relevantes por su función hipermetilados en la línea celular INER-51.

Cromosoma	Gene	Función
7	<i>MAD1L1</i> mitotic deficient-like (yeast). <i>MAD1</i> arrest 1	Participa en la regulación del ciclo celular y en la mitosis. Se ha asociado a la transformación celular, cáncer de colon, linfomas, melanomas, cáncer de próstata.
9	<i>SLC31A1</i> solute carrier family 31 (copper transporters),	Participa en el transporte y unión del ion cobre, componente de la membrana plasmática.

	member 1.	
19	<i>UCA1</i> urothelial cancer associated 1 (non-protein coding)	Un RNA no codificante, asociado como biomarcador en cáncer de vejiga.
3	<i>CACNA2D3</i> calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 3	Se asociado a cáncer de riñón y participa en la vía de señalización de MAPK.

6.4 PERFIL DE METILACIÓN ADENOCARCINOMA PULMONAR (LÍNEA CELULAR INER-37 FEMENINO MESTIZO MEXICANO DE 48 AÑOS, INER. DERRAME PLEURAL DE PACIENTE NO TRATADO)

En la figura 13 se muestra la imagen de la hibridación obtenida por el escáner GenPix4000A, los datos fueron normalizados sobre una base de \log_2 . Se obtuvieron 26,373 posiciones de spots, obteniéndose 60 posiciones de spot con un alto índice de fluorescencia ($\geq 2.0 \log R_2$, hipermetilados) y 6 posiciones de spots con un índice de fluorescencia menor a $-2.0 \log R_2$ (hipometilados).

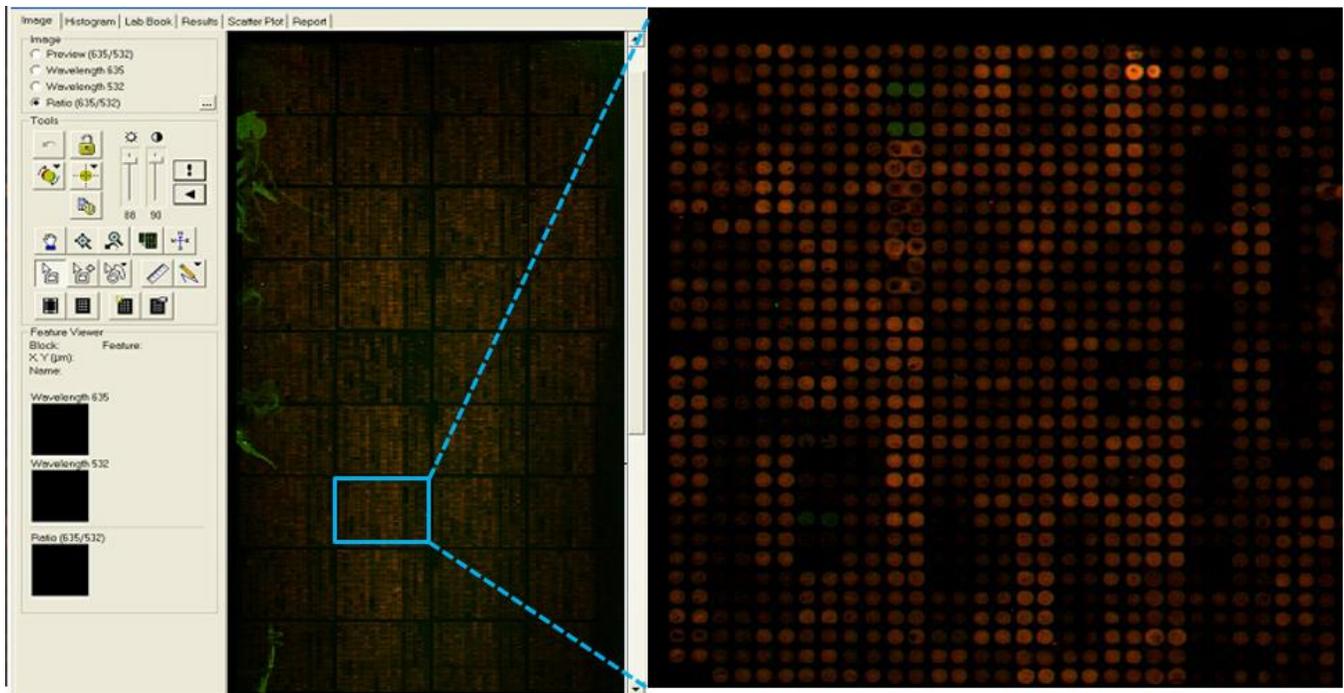


FIGURA 13. Análisis del perfil de metilación de Línea Celular de Cáncer Pulmonar INER-37. A) La imagen obtenida del escáner GenPix 4000A de la línea celular INER-37. **B)** Un acercamiento de un solo cuadrante del microarreglo SMRT-27, donde se observa con mayor detalle el perfil de metilación de la línea celular INER-37.

En la figura 14, se muestran los datos visualizados en el software CGH-Explorer, donde cada spot representa a la región que se localiza en el BAC y su nivel de metilación de acuerdo al índice de fluorescencia. Los spots que se encuentran más alejados de la línea basal tanto en la parte superior como inferior, representan los spots hipermetilados ($\geq 2.0 \log R2$) y los spots hipometilados ($-2.0 \log R2$), respectivamente.

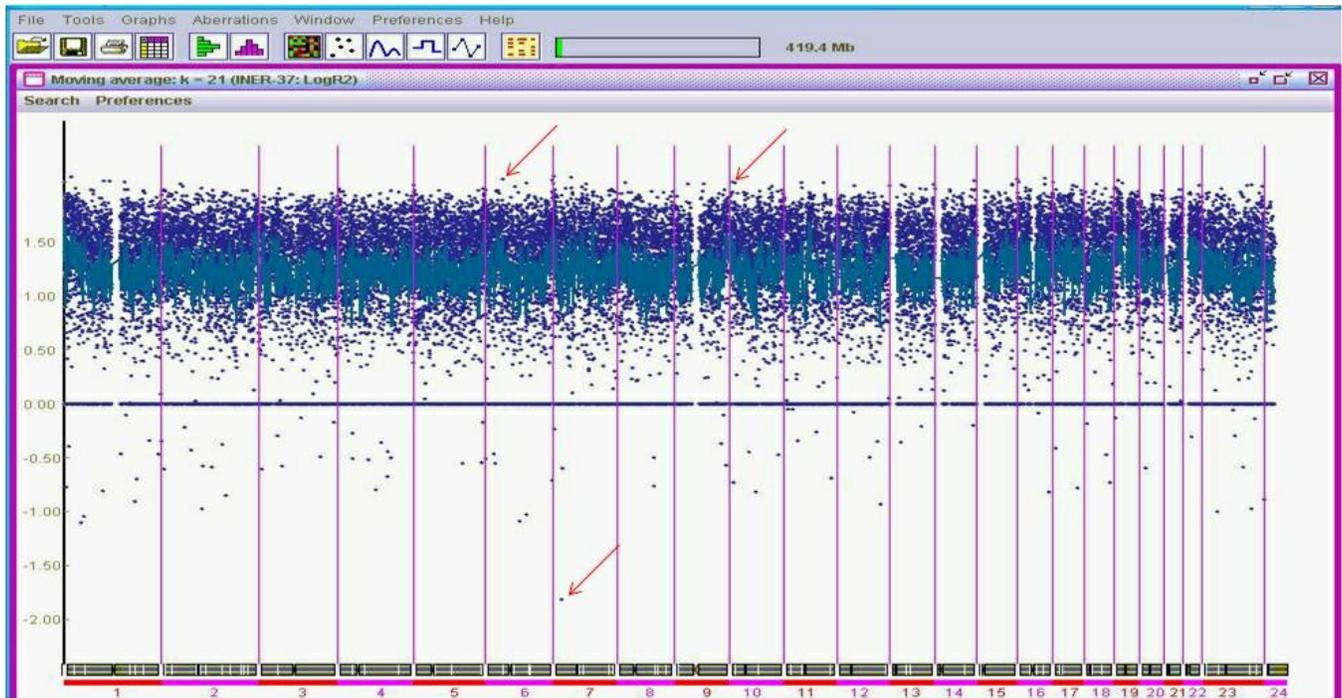


FIGURA 14. Visualización de los datos normalizados en logR2 en el software CGH-Explorer v3.2 de INER-37. En la parte inferior se observa los cromosomas 1-22, XY y los spots representan a los BACs, las flechas rojas señalan ejemplos de spots con un índice de fluorescencia ≥ 2.0 logR2 y el spot hipometilado con un índice de fluorescencia menor a 2.0 logR2.

En la tabla 15 y 16 se observan los datos numéricos extraídos del análisis en el software CGH-Explorer, donde cada spot es ordenado de acuerdo a su nivel de metilación (mayor y menor índice de fluorescencia, respectivamente). Mostrando ejemplos representativos, observándose el número de cromosoma, la región donde se localiza el BAC, el nombre del clon (BAC) y el índice de fluorescencia.

TABLA 15. Datos obtenidos del análisis en el software CGH-Explorer v3.2 de INER-37. BAC's con un índice de fluorescencia ≥ 2.0 logR2 hipermetilados.

Chr	nucl	Name	LogR2
7	927404	N0369D24	2.115
1	17736561	N0017H21	2.109
7	43612377	N0800O18	2.108

16	70105188	N0715L02	2.095
6	43142068	N0359J16	2.089
6	167953319	N0359F23	2.080
19	10488683	N0586L12	2.075
14	98277030	N0136M08	2.074
1	99299847	N0331P23	2.072
1	114364265	N0517B05	2.067
10	7651036	N0340H05	2.062
1	151033418	N0749D14	2.061
17	1048319	N0804G18	2.061
16	2937343	N0133K15	2.060
8	22684782	N0364H17	2.056
11	44297745	M2016H03	2.056
11	100096316	N0515J12	2.056
10	12947355	N0462F15	2.054
19	19592986	N0315A22	2.054
6	102177387	N0543M18	2.054
7	671961	N0306H02	2.047
9	72659080	N0517M04	2.046
15	88117242	N0693F05	2.045
2	47583605	N0436K12	2.044
18	31249384	N0424P14	2.043
7	81343937	N0459E23	2.042
9	33783561	N0464P07	2.042
16	69987226	N0359J15	2.040
13	111896322	M2195J01	2.038

TABLA 16. Datos obtenidos del análisis en el software CGH-Explorer v3.2 de INER-37. BAC'S con un índice de fluorescencia $-2.0 \log R2$ (Hipometilados).

Chr	Nucl	Name	LogR2
7	21002453	N0010N15	-1.814
1	42090132	N0558M13	-1.102
6	85284054	N0356O11	-1.086
1	48537391	N0715D13	-1.046
6	103098720	N0281F21	-1.024
23	36461497	N0626A17	-1.0
2	100432705	N0285I04	-0.974
23	123115337	N0013E05	-0.972
12	108623750	N0558G19	-0.934
1	177893870	N0762A17	-0.906
2	161113662	N0182K03	-0.849
16	79056040	N0149P20	-0.819
10	65498482	N0033K18	-0.816
1	97184452	N0626C12	-0.809
4	96077226	N0125P21	-0.800
17	62423324	N0009N10	-0.780
1	5469674	N0033M12	-0.771
8	94807807	N0638I14	-0.760
10	9067773	N0027D05	-0.730
18	66722065	N0011I21	-0.730
6	166329059	M2055P06	-0.707
1	182984801	N0070N10	-0.697
11	119823508	N0081I13	-0.688
4	124909171	N0093L09	-0.676
2	5181081	N0129I01	-0.602
3	8933995	N0019E08	-0.601
7	22320340	N0692K08	-0.598

20	15728919	N0022E15	-0.596
2	126623616	N0704N17	-0.587
23	100739804	N0201K13	-0.584

Se analizaron 14 clones con un alto índice de fluorescencia ≥ 2.0 logR2, en la base de datos obtenida del análisis de la imagen del microarreglo, se buscó la ubicación del clon de acuerdo a su nombre, se realizó una búsqueda automática en la anotación del genoma humano del Mar. 2006 (NCBI36/hg18) Assembly en UCSC Genome Browser. Los resultados de la búsqueda se muestran en la tabla 17.

TABLA 17. Regiones insertados en BACs hipermetilados de INER-37.

CROMOSOMA	NOMBRE CLON	logR2	LOCALIZACIÓN	GENES
7	N0369D24	2.115	7p22.3	<i>ADAP1</i> , <i>COX19</i> , <i>CYP2W1</i> , <i>C7orf50</i> , <i>GPR146</i> .
1	N0017H21	2.109	1p36.13	<i>ARHGEF10L</i>
7	N0800O18	2.108	7p13	<i>STK17A</i> , <i>C7orf44</i> .
16	N0715L02	2.095	16q22.3	<i>CHST4</i> , <i>TAT</i> , <i>MARVELD3</i> , <i>PHLPP2</i> .
6	N0359J16	2.089	6p21.1	<i>KLC4</i> , <i>PTK7</i> , <i>CUL9</i> , <i>SRF</i> .
6	N0359F23	2.080	6q27	<i>MLLT4</i> , <i>KIF2</i> .
19	N0586L12	2.075	19p13.2	<i>ATG4D</i> , <i>KRII</i> , <i>CDKN2D</i> , <i>SLC44A2</i> , <i>ILF3</i> .
14	N0136M08	2.074	14q32.2	*****
1	N0331P23	2.072	1p21.3 – p21.2	*****

1	N0517B05	2.067	1p13.2	<i>SYT6</i> .
10	N0340H05	2.062	10p14	<i>ITIH5, ITIH2</i> .
17	N0804G18	2.061	17p13.3	<i>TUSC5, YWHAE</i> .
8	N0364H17	2.056	8p21.3	<i>PEBF4</i> .
1	N0749D14	2.061	1q21.3	<i>LCE1C, LEC1B, LEC1A, LCE6A, SMCP, IVL</i> .

De las regiones hipometiladas se analizaron 14 clones en la anotación del genoma humano del Mar. 2006 (NCBI36/hg18) Assembly en UCSC Genome Browser. Los resultados de la búsqueda se muestran en la tabla 18.

TABLA 18. Regiones insertados en BACs hipometilados de INER-37.

CROMOSOMA	NOMBRE CLON	LOGR2	LOCALIZACIÓN	GENES
7	N0010N15	- 1.814	7p15.3	*****
1	N0558M13	- 1.102	1p34.2	<i>HIVEP3</i>
6	N0356O11	- 1.086	6q14.3	*****
1	N0715D13	- 1.046	1p33	<i>SPATA6</i>
6	N0281F21	- 1.024	6q16.3	*****
X	N0626A17	- 1.0	Xp21.1	*****
2	N0285I04	- 0.974	2q11.2	<i>NMS, PDCL3</i>
X	N0013E05	- 0.972	Xq25	*****
12	N0558G19	- 0.934	12q24.11	<i>C12orf34, MGCI4436, TRPV4</i>
1	RO53L09	- 0.906	1q25.2	<i>TDRD5, FAM163A</i>

2	N0182K03	- 0.849	2q24.2	*****
16	N0149P20	- 0.819	16q23.2	<i>MIR548H4, DYNLRB2, CDYL2</i>
10	N0033K18	- 0.816	10q21.3	*****
1	N0626C12	- 0.809	1p21.3	<i>DPYD</i>

De las regiones analizadas en la anotación del genoma humano del Mar. 2006 (NCBI36/hg18) Assembly en UCSC Genome Browser se seleccionaron tres genes que tienen importancia biomédica por su participación en la progresión o mantenimiento en diferentes tipos de cáncer, los genes seleccionados se muestran en la tabla 19.

TABLA 19. Genes relevantes hipermetilados en la línea celular INER-37.

Cromosoma	Gene	Función
7	<i>CYP2W1</i> cytochrome P450, family 2, subfamily W, polypeptide 1	Codifica un miembro de la superfamilia de citocromo P450 de enzimas. Las proteínas P450 son mono-oxigenasas que catalizan reacciones involucradas en el metabolismo de fármacos y síntesis de colesterol, esteroides y lípidos. Asociado a diferentes tipos de cáncer.
16	<i>PHLPP2</i> PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 2	Con actividad catalítica, hidrolasa, unión al ion manganeso y a iones metálicos.
6	<i>PTK7</i> PTK7 protein tyrosine kinase 7	Receptor de proteínas tirosinas quinasas traduce señales extracelulares. Quizás tiene una función como molécula en la adhesión celular. Es expresado en cáncer de colon, pero no en

		tejido normal.
6	<i>MLLT4</i> myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 4	El gen ha sido asociado a neoplasias de mama, de ovario; cistadenocarcinomas, leucemias. Participa en diferentes vías como uniones adherentes, migración transendotelial de leucocitos y en procesos como adhesión celular, transducción de señales, señalización de célula a célula.

6.5 IDENTIFICACIÓN DE REGIONES CITOGENÉTICAS HIPERMETILADAS COMPARTIDAS ENTRE MUESTRAS DE CÁNCER PULMONAR TIPO AD CAUCASICO Y MESTIZO-MEXICANO

Los resultados obtenidos de la hibridación genómica comparativa con los microarreglos SMRT-27 de las tres líneas celulares A-427, INER-37 e INER-51 permiten ver que los perfiles de metilación entre cada una de las líneas celulares son diferentes (ver figura 7); como se menciona anteriormente, la línea celular A-427 muestra un perfil de metilación heterogéneo (figura 7A); en la línea celular INER-37 (figura 7C) muestra una tendencia a la hipermetilación y la línea INER-51 se encuentra hemimetilada (figura 7B). En este contexto se realizó una búsqueda de regiones que se compartieran entre las tres líneas celulares utilizando Excel; para llevar a cabo este objetivo se utilizó como referencia la línea celular A-427, en la cual se tomaron 50 puntos con un alto índice de fluorescencia (rango 3.0 a 2.0 logR2, hipermetilados), obteniéndose como resultado que la línea celular INER-37 comparte regiones con A-427, presentando spots con un alto índice de fluorescencia entre 2.0 – 1.3 logR2 hipermetilados; en contraste con la línea celular INER-51, la cual se encuentra hemimetilada, los resultados de esta búsqueda se encuentra en la tabla 20.

TABLA 20. Regiones compartidas con A-427 e INER-37 hipermetiladas.

CROMOSOMA	NOMBRE CLON	LOCALIZACIÓN	GENES
13	N0518D18	13q11- q12.11	*****
6	N0503C24	6q27	*****
3	N0365L22	3p14.1	*****
9	N0517P03	9q21.33 – q22.1	<i>CTSL3, C9orf79, AX748084, AK510510.</i>
17	N0796J19	17p11.2	<i>MPRIP.</i>
2	N0495E11	2q14.3	*****
10	N0702C24	10q26.3	<i>C10orf93.</i>
12	N0577L23	1213.2	<i>MUCL1.</i>
22	N0515J23	22q13.1	<i>RAC2, CYTH4, ELFN2.</i>
11	N0494F04	11p15.5 – p15.4	<i>KCNQ1, KCNQ1DN, CDKN1C, SLC22A18, PHLDA2, NAP1L4.</i>
2	N0702K16	2q31.2	<i>TTN, CCDC141.</i>
8	N0459E05	8p21.3	<i>PPP3CC, PDLIM2, SORBS3, KIAA1967.</i>
22	N0751L10	22q13.31	<i>TBC1D22A.</i>
11	N0128H22	11q13.1	<i>ARL2, SAC3D1, ARL2-SNX15, NAALADL1, SNX15, CDCA5, ZFPL1, C11orf2, TM7SF2, SYVN1, ZNHIT2, MRPL49.</i>
12	N0536M06	12p13.31	<i>PHC1, M6PR, KLRC1, A2M.</i>
7	N0134M01	7q36.3	<i>RBM33.</i>
5	N0211F05	5q33.1	<i>PDE6A, SLC26A2, TIGD6, HMGXB3.</i>
13	N0517P22	13q21.31	*****

6	M2180K06	6q24.1	<i>TXLNB.</i>
1	M2390G19	1p36.33 – p36.32	<i>MORN1, RER1, PEX10</i>
13	N0517L15	13q32.1	<i>HS6ST3.</i>
20	N0734L12	20q11.21	<i>C20orf85, C20orf86.</i>
1	N0736G09	1p36.32	<i>ACTRT2.</i>
6	M2310B05	6q25.3	<i>SLC22A3, LPAL2, LPA.</i>
10	N0033G05	10q26.3	<i>INPP5A, NKX6-2, C10orf92.</i>
12	M2094C14	12p13.33	<i>FAM138D, IQSEC3, LOC574538.</i>
1	N0206P01	1p32.2 – p32.1	<i>OMA1, TACSTD2.</i>
21	M2053G20	21q22.3	<i>TRPM2, LRRC3, TSPEAR, C21orf99, KRTAP10.</i>
4	M2067O23	4p16.1	*****
7	N0590H03	7q11.23	<i>FZD9, BAZ1B, BCL7B.</i>
9	N0192I12	9p13.3	<i>UNC13B, ATP8B5P, RUSC2.</i>
9	N0369B07	9q21.32	<i>KIF27, C9orf64, HNRNPK, MIR7-1, RMI1.</i>
4	N0213G21	4p14	<i>FLJ13197, KLF3, TLR10, TLRI, TLR6.</i>
7	M2041J20	7q36.3	<i>PTPRN2, MIR153-2.</i>
5	N0158M10	5q31.1 – q31.2	<i>TGFBI, SMAD5OS, SMAD5.</i>
10	N0204P17	10q25.3	<i>ABLIMI.</i>
13	N0188A23	13q22.3	<i>SLAIN1.</i>
12	N0752I20	12q21.33	*****
18	M2130J04	18q21.1	<i>ACAA2, SCARNA17, MYO5B.</i>

9	M2103H07	9q31.1	<i>C9orf126, RNF20, GRIN3A, PPP3R2.</i>
Y	N0339O03	Yp11.2	<i>TTY18, TTY19.</i>
15	N0360J18	15q13.1	<i>FAM189A1, TJPI.</i>
7	F0589F15	7q36.1	<i>ZNF767.</i>
16	N0794D07	16p13.3	<i>SYNGR3, ZNF598, NPW, SLC9A3R2, NTHL1, TSC2, PKD1, MIR1225, MIR3180-5.</i>
20	M2165O09	20p12.2	*****
2	N0751B04	2q35	<i>RUFY4.</i>
10	N0385N23	10p14	<i>ITIH5.</i>
X	N0797H09	Xq26.2	<i>MBNL3, HS6ST2.</i>

Las regiones que se muestran en amarillo se encuentran hipermetiladas tanto en A-427 (con índice de fluorescencia de 2,66 para la región Chr8:22,375,631-22,536,291 y 2,97 para la región Chr7:157,007,524-157,128,933, respectivamente) como en INER-37 con un índice de fluorescencia de 2.82 Chr8:22,375,631-22,536,291 y 2.64 para Chr7:157,007,524-157,128,933. Los genes que se encuentran dentro de los BACs (clones) tienen diferentes funciones como transducción de señales (*PDE6A, IQSEC3, TACSTD2, UNC13B, HNRNPK, SMAD5*), de unión a ácidos nucleicos y reguladores transcripcionales (*ZFPL1, PHC1, RBM33, TIGD6, HMGXB3, NKX6-2, LRRC3, BAZ1B, RMI1, KLF3*), en el ciclo celular y la reorganización del citoesqueleto (*RAC2, TTN, SAC3D1, CDCA5, KIF27, ABLIMI*), proteínas estructurales (*MRPL49, HS6ST3, ACTRT2, KRTAP10-5, BCL7B, RUSC2, SLAIN1, SCARNA17, MYO5B*), en el plegamiento y transporte de proteínas (*CYTH4, SNX15, M6PR, A2M, ATP8B5P*), con actividad de proteasas (*CTSL3, NAALADL1, SYVN1, LPA, OMA1*), con actividad GTPasa (*TBC1D22A, ARL2*), en la adhesión celular (*TSPEAR, TGFBI*), transportadores de iones (*KCNQ1, SLC22A18, SLC22A3*), sistema inmune (*KLRC1, TLR10, TLR6, TLRI*), un gen que tiene bajo nivel de expresión en cáncer pulmonar (*C20orf85*) y genes que se han asociado a diferentes neoplasias (*MUCL1, C11orf2, TM7SF2, ANKRD30BP2, FZD9, C9orf64*).

TABLA 21. Genes relevantes hipermetilados en la líneas celulares A-427 e INER-37.

Cromosoma	Gene	Función
11	<i>SLC22A18</i> solute carrier family 22, member 18	El gen se ha asociado a diferentes enfermedades (síndrome de Beckwith-Wiedemann, neoplasias de mama, pulmón, rabdomiosarcoma 1, tumor de Wilms) y participa en diferentes procesos (excreción, respuesta a drogas, transporte de iones, transporte de tetraciclina). Las proteínas tienen funciones moleculares (actividad de transportador de cationes orgánicos, actividad de cotransportador, tetraciclina:actividad antiportador de hidrógeno) y se localizan en varios compartimientos (proteína integral de membrana, membrana plasmática, retículo endoplasmático, membrana del retículo endoplasmático, extracelular).
11	<i>PHLDA2</i> pleckstrin homology-like domain, family A, member 2	El gen está localizado en un cluster de genes improntados sobre el cromosoma 11p15.5, es considerado una importante región como gen supresor de tumor. Alteraciones en esta región se ha asociado con el síndrome de Beckwith-Wiedemann, tumor de Wilms, rabdomiodarcoma, carcinoma adrenocortical, cáncer pulmonar, de cerebro, de ovario y mama. Participa en apoptosis e impronta genómica. Las proteínas se localizan en el núcleo.
11	<i>NAPIL4</i> nucleosome assembly protein 1-like 4	Se ha probado que el gen está asociado al síndrome Beckwith-Wiedemann y participa en el ensamble de nucleosomas. Las proteínas tienen funciones en el desensamble de proteínas y se localiza en el complejo de ensamble de la cromatina, citoplasma, núcleo extracelular. Interacciona con CSNK2A1, CSNK2A2, HIST1H2AE, HIST2H2BE, HIST2H4A, HIST3H3.

11	<i>ARL2</i> ADP-ribosylation factor-like 2	El gen codifica una proteína de unión a GTP pequeña de la superfamilia RAS, con función de factor ADP-ribosilación (ARF). Participa en el transporte intracelular, en el plegamiento de la tubulina, comunicación celular, transducción de señales mediado por GTPasas pequeñas, en la cascada de señalización intracelular. Las proteínas tienen actividad inhibitoria de GTPasa, actividad de transporte, unión a GTP, unión a nucleótidos y se localiza en el citosol, membrana, citoplasma. Interacciona con ARL2BP, PDE6D, PPP2R1B, PPP2R2B, PPP2R2C, RABAC1, SLC25A4, TBCD, UNC119.
5	<i>SLC26A2</i> solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2	El gen está asociado a enfermedades como Acondrogenesis IB, Atelosteogenesis II, displasia Diastrófica, variante de hueso-plastispondílico, displasia Epifiseal múltiple 4, Exostoses, Hereditario múltiple Osteocondroplasias y participa como transportador de sulfato. Las proteínas tienen actividad de portador de sulfato, actividad de transportador y se localiza en la membrana plasmática.
20	<i>C20orf85</i> chromosome 20 open reading frame 85	Un análisis serial de estudios de expresión génica guió a la identificación de un nuevo gen c20orf85, el cual, está presente en el epitelio pulmonar normal pero ausente o en bajos niveles en cáncer de NSCLC primarios y en líneas celulares de cáncer pulmonar. Este gen fue llamado LLC1 (Low in Lung Cancer 1). Contiene un 70% de GC's en su promotor (Hong <i>et al</i> , 2007).
1	<i>TACSTD2</i> tumor-associated calcium signal transducer 2	El gen está asociado a Amiloidosis, neoplasia colorectal, distrofias corneales hereditarias, neoplasia pulmonares y participa en la proliferación celular, transducción de señales vinculados a receptores de superficie celular, percepción visual,

		respuesta a estímulos. La proteína tiene actividad de receptor y se localiza en el citosol y membrana.
7	<i>FZD9</i> frizzled homolog (Drosophila) 9	El gen está asociado a carcinomas de células basales, transformación celular neoplásica, cáncer colorectal, neoplasia pulmonar, síndrome de Williams, participa en la vía de señalización Wnt, en el desarrollo del sistema nervioso, en la señalización de receptores acoplados a proteínas G, en el aprendizaje y/o memoria, en el desarrollo de órganos, proliferación de neuroblastos, transducción de señales vinculado a receptores de superficie celular. La proteína tiene actividad de receptor Wnt, actividad de receptor acoplados a proteínas G, actividad de receptor de 7TM no acoplados a proteínas G y se localiza en la membrana plasmática. Interacciona con MDGI, WNT1.
9	<i>C9orf64</i> chromosome 9 open reading frame 64	Se identificaron islas CpG's en promotores con aberrante metilación en cáncer de ovarios, se llevó a cabo un rastreo a nivel genómico para diferenciar fragmentos de DNA metilados utilizando un análisis diferencial sensible a metilación (MS-RDA). Por MS-RDA se aislaron 185 fragmentos de DNA específicamente metilados en la línea celular de cáncer de ovario (ES-2), comparado con la línea celular de epitelio normal de ovario (HOSE6-3), y 33 de ellas derivan de islas CpG's en promotores. Fueron analizadas 10 líneas celulares de cáncer de ovario por PCR específico de metilación, donde 7 (<i>GPR150</i> , <i>LOC222171</i> , <i>PRTFDC1</i> , <i>LOC339210</i> , <i>ITGA8</i> , <i>C9orf64</i> y <i>HOXD11</i>) de las 33 islas CpG's se encuentran hipermetiladas en una o más de las 10 líneas celulares (Cain <i>et al</i> , 2007).

9	<p><i>HNRNPK</i> heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</p>	<p>El gen se ha asociado a diferentes enfermedades como Estenosis aórtica valvular, cardiopatías, neoplasias de colón, isquemia miocárdica, Síndromes Paraneoplásicos y participa en procesos de transducción de señales, procesamiento del RNAm, splicing. La proteína tiene función como unión a proteína, unión a RNA, unión a DNA y se localiza en citoplasma, en el complejo heterogéneo nuclear ribonucleoproteína, nucleoplasma, núcleo, spliceosoma. Interacciona con CEBPB, CNNM3, CSK, DDX1, DIDO1, FYN, GRAP2, HMGB1, HNRPK, HNRPL y ECH1.</p>
5	<p><i>TGFBI</i> transforming growth factor, beta- induced, 68kDa</p>	<p>El gen se ha asociado a diferentes enfermedades como amiloidosis, artritis reumatoide, cicatriz hipertrófica, enfermedades de la córnea y participa en la proliferación celular, regulador negativo de la adhesión, percepción visual, respuesta a estímulos. La proteína tiene función de unión a integrinas, unión a proteínas y se localiza en el espacio extracelular, citoplasma, membrana, matriz extracelular. Interacciona con COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, FN1.</p>
5	<p><i>SMAD5</i> <i>SMAD</i> family member 5</p>	<p>El gen se ha asociado con Leucemia promielocítica aguda, neoplasias de hígado, participa en vía de ALK en miocitos cardiacos, en la vía de señalización TGF-β, transducción de señales, en la señalización deBMP, desarrollo embrionario, diferenciación de eritrocitos, en la regulación positiva de la transcripción del promotor de la RNA polimerasa II, en la regulación de la transcripción dependiente de DNA. La proteína participa como receptor de la señalización, factor transcripcional, activador transcripcional y se localiza en la</p>

		membrana, núcleo intracelular. Interacciona con ACVR1, BCAT1, BMP6, CXXC5, ELAC1-SMAD4, FLNA, GDF6, PPIL4-ZC3H12D, RBM14-TMEM137-RBM4, RNF103-VPS24.
18	<i>MYO5B</i> myosin VB	Se realizó un análisis a nivel genómico de islas CpG's asociadas a promotores utilizando una amplificación de islas CpG's (MCA) acoplado a un análisis diferencial representativo (RDA) con microarreglos de promotores de DNA en leucemias de linfoblastos aguda (ALL). Se identificaron 65 blancos potenciales de metilación con MCA/RDA, y 404 con MCA/array. Se identificaron 36 (77%) genes compartidos tanto por MCA/RDA como MCA/array. La distribución de estos genes fue uniformemente en todos los cromosomas autosómicos. Funcionalmente. 303 de estos genes están agrupados en 18 vía moleculares. De los 36 genes compartidos fueron validados 31 y 26 fueron confirmados estar hipermetilados en todas las líneas celulares. El análisis de expresión de 8 de estos genes fue epigenéticamente moduladas por agentes desmetilantes y/o inhibidores de HDAC en líneas celulares de leucemia. Posteriormente, la metilación del DNA de 15 genes (<i>GIPC2</i> , <i>RSPO1</i> , <i>MAG11</i> , <i>CAST1</i> , <i>ADCY5</i> , <i>HSPA4L</i> , <i>OCN</i> , <i>EFNA5</i> , <i>MSX2</i> , <i>GFPT2</i> , <i>GNA14</i> , <i>SALL1</i> , <i>MYO5B</i> , <i>ZNF382</i> y <i>MN1</i>) fue validada en todas las muestras (Kuang <i>et al</i> , 2008).

De los genes que se encontraron en las regiones insertadas en los BACS, se seleccionaron 13 genes importantes por su función fisiológica y participación en diferentes enfermedades y neoplasias, como se muestra en la tabla 21.

6.6 PROPUESTA DE REGIONES HIPERMETILADAS PARA SU POSTERIOR EXPLORACIÓN Y VALIDACIÓN COMO OBJETIVOS DE DIAGNOSTICO EN CÁNCER PULMONAR

Fueron seleccionados 4 genes (figura 15 y 16) para su posterior análisis de validación cuantitativa del porcentaje y frecuencia de metilación de su promotor para la posible búsqueda de marcadores epigenéticos en cáncer pulmonar. El primer gen llamado *ADORA1* (también llamado *RDC7*, *A(AI)R*, figura 15); el cual, se encuentra en el cromosoma 1, pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Es un receptor de adenosina, la actividad de este receptor es mediado por proteínas G, el cual inhibe la adenilil ciclasa, participa en varias vías y procesos como en la señalización de célula a célula, inducción de apoptosis por señales extracelulares, en la respuesta inflamatoria, en el desarrollo del sistema nervioso, fagocitosis y transducción de señales. Se asociado a diferentes enfermedades como ansiedad, hipertensión, resistencia a insulina, obesidad. Provee protección contra daño pulmonar por isquemia-perfusión y se ha visto a estar asociado a cáncer de mama.

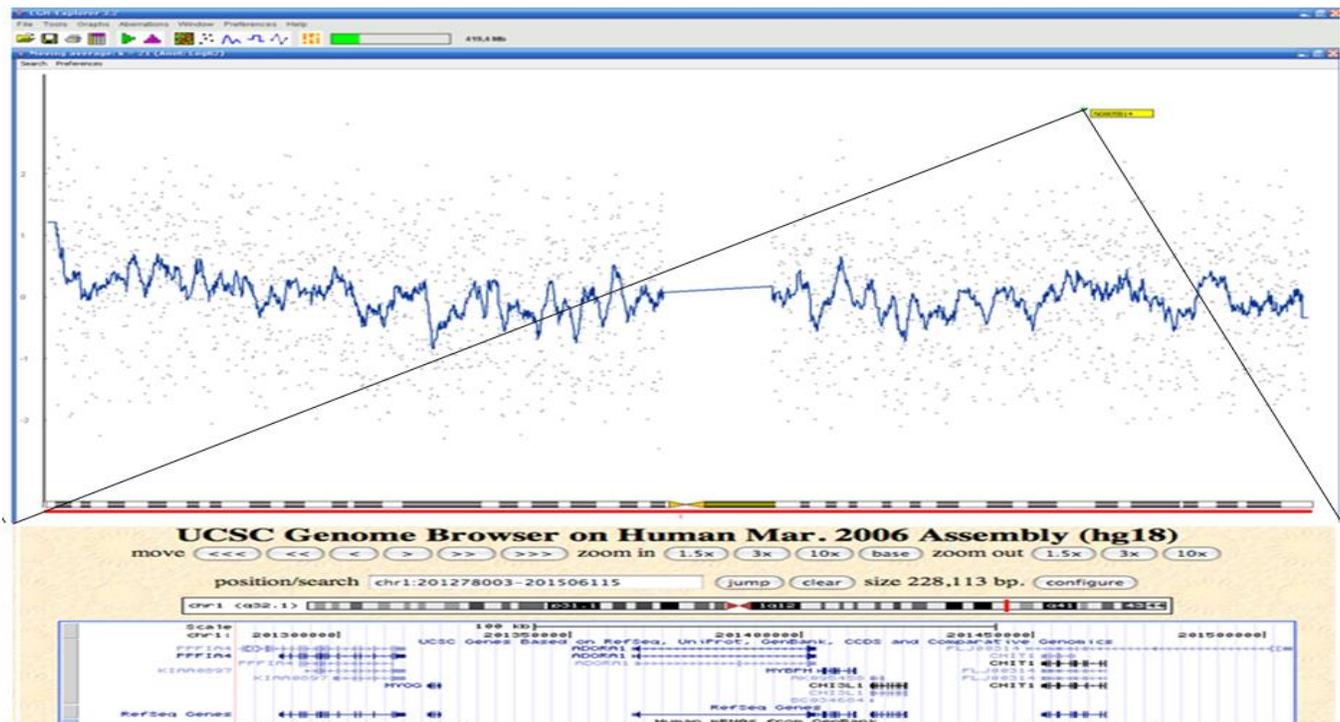


FIGURA 15. Patrón de metilación del DNA del cromosoma 1. Esquema mostrando una región la región 1q32.1 y la señal de alto índice de fluorescencia mostrando hipermetilación.

En el cromosoma 8 se encuentra los genes *PPP3CC*, *SORBS3* y *PDLIM2*, figura 15. El gen *PPP3CC* pertenece a la familia de fosfatasa PPP, subfamilia PP-2B. Participa en diferentes vías como apoptosis, dirige a los axones, en la vía de señalización de receptores de células B, en la vía de señalización de BCR, en la vía de señalización del calcio, en el control de la biogénesis del esqueleto por HDAC y cinasa dependiente de calcio/calmodulina (caMK). Las proteínas tienen funciones moleculares como unión a calmodulina, actividad hidrolasa, unión al ión hierro, unión a iones metálicos y se localiza en citoplasma, matriz extracelular, núcleo y en el complejo calcineurina. Varios estudios lo asocian a esquizofrenia y a cáncer de colon (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/index.html>).

El gen *SORBS3* (también conocido como *SCAM-1*, *SCAM1*, *SH3D4*, *VINEXINA β* y *VINEXINA*), codifica dos isoformas vinexina alfa y beta que se unen a vinculina; el gen participa en diferentes procesos como en la regulación positiva de la organización del citoesqueleto y su biogénesis, la regulación positiva de la formación de fibras por estrés, la adhesión de célula-sustrato, la regulación negativa de la transcripción del promotor de la RNA polimerasa II, la regulación positiva de la cascada de la vía MAPKKK. La proteína tiene funciones moleculares como componente estructural del citoesqueleto, interaccionan con vinculina, con factores de transcripción y se localiza en adhesiones focales, núcleo, citoplasma y citoesqueleto (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/index.html>).

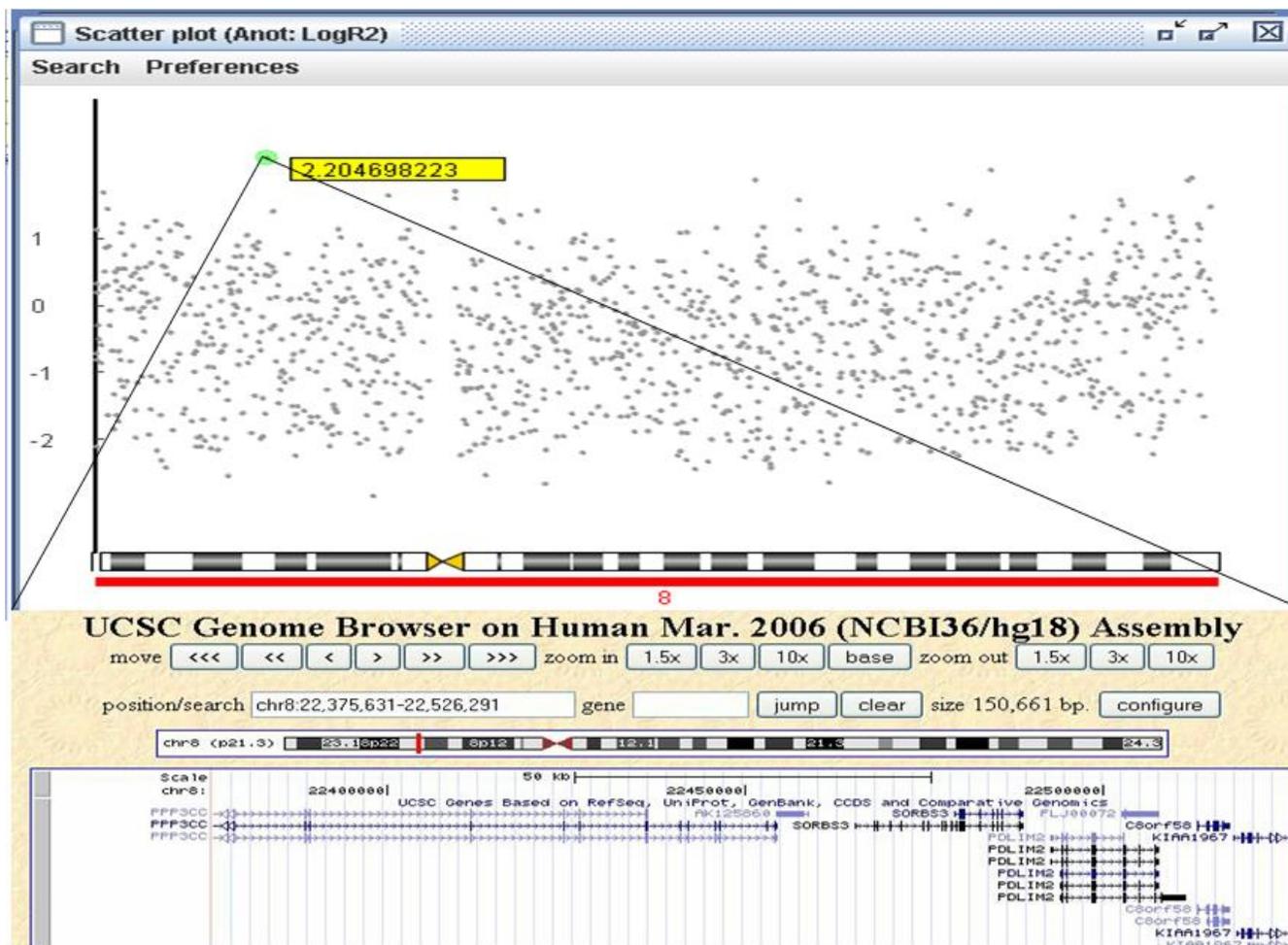


FIGURA 16. Patrón de metilación del DNA del cromosoma 8. Esquema mostrando una región la región 8p21.3 y la señal de alto índice de fluorescencia mostrando hipermetilación.

El gen *PDLIM2* produce tres isoformas: Mystique 1, 2 y 3, es una proteína adaptadora localizada junto con la actina en el citoesqueleto que promueve la adhesión celular. Es necesaria para la capacidad migratoria de células epiteliales. Su sobre-expresión promueve la adhesión celular a colágeno y fibronectina. Quizás contribuye a la capacidad migratoria celular del tumor. Se localiza en citoplasma y núcleo. En varios estudios de ha sugerido ser un supresor de tumor (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Asembly/index.html>).

VII. DISCUSIÓN

Con aproximadamente 14.1 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes por cáncer ocurrieron en el 2012 a nivel mundial; el cáncer de pulmón es el más común y la principal causa de muertes relacionados a cáncer en el mundo (Torre *et al*, 2015). Tan solo en Estados Unidos se estimó un total de 1,665,540 nuevos casos de cáncer y 585,720 muertes por cáncer en 2014. Entre los hombres; el cáncer de pulmón, próstata y colorrectal, y en las mujeres el cáncer de pulmón, mama y colorrectal siguen siendo las causas más frecuentes de muerte por cáncer. Con 159,260 de muertes estimadas de cáncer de pulmón (Siegel *et al*, 2014).

Fumar es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer pulmonar; sin embargo, el 25% de todos los casos en el mundo que desarrollan cáncer pulmonar no son fumadores. Aproximadamente el 85% de casos nuevos de cáncer pulmonar son NSCLC, del cual el 40% de pacientes presentan estadio IV y la sobre-vida a 5 años se estima que es menor al 1%. El tratamiento principal de NSCLC metastásico es paliativo, el uso de terapias sistémicas que incluyen la radio- y quimioterapia y más recientemente, los agentes biológicos que se dirigen a componentes genéticos específicos (Lamparella *et al*, 2013, DeSantis *et al*, 2014).

La tumorigénesis es un proceso progresivo complejo y multifactorial de la transformación de células normales a células malignas. Se caracteriza por la acumulación de múltiples fenotipos hereditarios específicos del cáncer, que incluyen señalización proliferativa persistente, resistencia a la muerte celular, la evasión de la supresión del crecimiento, la inmortalidad replicativa, respuesta inflamatoria, la des-regulación del metabolismo, la inducción de la angiogénesis que quizás da como resultado la metástasis; los cuales, son causados por alteraciones en la estructura genómica a través de cambios en la secuencia del DNA y/o alterando el número de copias de genes, afectando la expresión genética y/o su función (Rhee *et al*, 2000; Esteller, M., 2008). Por otra parte, se ha sugerido que las alteraciones epigenéticas juegan un papel fundamental o incluso más importante en el desarrollo de tumores. Estas alteraciones epigenéticas son cambios en los patrones de metilación de citosinas en el DNA, cambios en la estructura de la cromatina y cambios en la abundancia de RNA pequeños (Rhee *et al*, 2000; Esteller, M., 2008). El reconocimiento del papel fundamental de las alteraciones epigenéticas en el cáncer ha dado como resultado la identificación de anomalías epigenéticas que se sugiere pueden utilizarse como biomarcadores potenciales para el diagnóstico molecular del cáncer, pronóstico de sobre-vida o como tratamiento (González de Castro *et al*, 2013; Schmalfluss y Kolominsky-Rabas, 2013).

Como se mencionó anteriormente, los primeros estudios se centraron en el estado de metilación de genes individuales; sin embargo, el reciente desarrollo de métodos de alto rendimiento ha proporcionado una gran cantidad de información que nos ayudará a entender como los cambios epigenéticos contribuyen a la tumorigénesis de pulmón. Fue en este contexto, que el trabajo se centró en el análisis del perfil global de hipermetilación e hipometilación de líneas celulares tipo AD derivadas de cáncer pulmonar, estos resultados preliminares proponen un conjunto de genes aún no estudiados en cáncer pulmonar como candidatos para su análisis posterior como posibles marcadores diagnósticos o pronóstico en cáncer pulmonar; para ello, se utilizó el método basado en la combinación de enzimas de restricción sensibles a metilación; en conjunto con la plataforma del microarreglo SMRT-27 que contiene 32,433 fragmentos clonados en BACs (Cromosomas Bacterianos Artificiales) con una resolución de 80 kb que cubre 1.5 veces el genoma humano en un solo experimento, cada BAC está por duplicado (Ishkanian *et al*, 2004) como se menciona en materiales y métodos. La plataforma ha sido utilizada principalmente por el grupo de trabajo del Doctor Wan L. Lam; por ejemplo, Garnis y colaboradores describieron y compararon el genoma de 28 modelos celulares de NSCLC usados comúnmente, derivados de 18 adenocarcinomas (AD), 9 carcinomas de células escamosas (SCC) y 1 carcinoma de células grandes. El análisis en una plataforma de alta resolución proporciono alteraciones detallada de cada uno de los modelos celulares revelando nuevas regiones de duplicación y deleción. Por ejemplo, en el cromosoma 7 identificaron 6 regiones con alteraciones implicadas en la presencia de múltiples oncogenes. La comparación entre carcinomas de células escamosas y AD revelo alteraciones compartidas en ambos subtipos como pérdida de 3p y ganancia de 5p (Garnis *et al*, 2006). En otro estudio utilizando el microarreglo SMRT-27 examinaron el genoma de un grupo de líneas celulares de cáncer cervical. Identificaron 27 regiones con alteraciones en el número de copias involucradas en la tumorigénesis. El mapeo de la ganancia de 3q asociada con la progresión identifico una región con alteraciones que alberga distintos genes previamente reportados en cáncer. También se identificaron regiones nuevas de duplicación, incluyendo co-duplicación de los genes *Birc* y *MMP* en 11q22 (Lockwood *et al*, 2007). En este sentido, en un estudio posterior Lockwood y colaboradores abordaron la pregunta, si la amplificación del DNA es un mecanismo molecular para la conducción de la oncogénesis. Para contestar esta pregunta compararon 104 líneas celulares representando diversos orígenes tisulares para identificar genes que residen en “hotspots” de amplificación. Identificaron 3431 amplicones representando 10% de tipo hematológico y 36% de tipo epitelial. Identificaron 135 “hotspots” con 538 genes que participan en la proliferación, apoptosis y genes dependientes de linaje. La

integración de la dosis génica con los datos de expresión validó el impacto de los eventos de amplificación novedosos tanto en líneas celulares como en muestras clínicas. Un ejemplo son los componentes múltiples “río abajo” de la vía de señalización de la familia EGFR, incluyendo CDK5, AKT1 y SHC1, se encuentran sobre-expresados como resultado directo de la amplificación génica en cáncer pulmonar (Lockwood *et al*, 2008). Con el desarrollo de microarreglos utilizando BACs (Cromosomas Bacterianos Artificiales) como blancos para la hibridación ha facilitado el descubrimiento y el mapeo fino de nuevas alteraciones genómicas permitiendo la rápida identificación de genes. Con este contexto, utilizamos la plataforma SMRT-27.

La línea celular A-427 mostró un perfil de metilación heterogéneo; la línea celular INER-51 mostró un perfil de metilación homogéneo, se observaron spots de color verde y amarillo de manera general, por lo que la línea INER-51 se encuentra hemimetilada. En contraste, con la línea celular INER-37 se observaron spots de color rojo mostrando una tendencia a la hipermetilación como se observa en la figura 12. El perfil de metilación diferencial de cada línea celular, quizás se deba a los diferentes factores de riesgo involucrados como la edad, el género, la raza y la enfermedad pulmonar pre-existente que son contribuyentes importantes. Por otro lado, se ha reportado, que tumores múltiples en el mismo paciente no necesariamente comparten un perfil genómico idéntico; esto ha sugerido que los genes específicos de linaje; los cuales desempeñar papeles importantes en los procesos de desarrollo normales tales como la organogénesis o la homeostasis del tejido, que permanecen expresados o se amplifican durante una condición patológica adquirida, son cruciales para el mantenimiento de la enfermedad (Garraway y Sellers, 2006; Kadara *et al*, 2012). Siguiendo este modelo, nuestros resultados podrían sugerir un enfoque alternativo; es decir, en un análisis más detallado, quizás la identificación de marcadores que sean específicos de linaje y que pueden guiar a estrategias de tratamiento personalizado.

En la línea celular A-427 se analizaron 13 clones con un alto índice de fluorescencia $>2.5 \log R_2$; los resultados se muestran en la tabla 5. Los genes que se encuentran dentro de las regiones hipermetiladas tiene diferentes funciones celulares como en interacciones entre célula-matriz, en la adhesión celular, comunicación celular y factores de transcripción. En cuanto a las regiones hipometiladas se identificaron 12 clones, los genes ubicados dentro de estas regiones (Tabla 6), también tienen papeles biológicos importantes como la adhesión y migración celular, en la señalización celular, en la remodelación de la cromatina. En cuanto a la línea celular INER-51 se analizaron 14 clones con un alto índice de fluorescencia $>2.0 \log R_2$ los resultados se muestran en la tabla 11, de las regiones hipometiladas se analizaron 14 clones los resultados se muestran en la tabla 12; se seleccionaron tres

genes y un RNA no codificante, que tienen importancia biomédica por su participación en la progresión o mantenimiento en diferentes tipos de cáncer (*MAD1L1*, *SLC31A1*, *CACNA2D3* y *UCA1*). En la línea celular INER-37 se analizaron 14 clones con un alto índice de fluorescencia $\geq 2.0 \log R2$, los resultados se muestran en la tabla 16, en cuanto a las regiones hipometiladas se analizaron 14 clones los resultados se muestran en la tabla 17.

Nuestros resultados son similares a los obtenidos en un estudio reciente donde La Red de Investigación del genoma del cáncer (The cáncer Genome Atlas Research Network) en un análisis integral abarcando número de copias, mutaciones somáticas, secuenciación del RNA mensajero, expresión de RNA mensajero y análisis de la metilación de promotores de 178 tumores de SCC de pulmón. Para el análisis de metilación utilizaron dos tipos de plataformas HM27K y HM450K (Illumina Infinium) basado en la modificación del DNA por bisulfito de sodio sus resultados muestran los CpGs hipermetilados: *ADORA1*, *PPP3CC*, *PDLIM2*, *SORBS3*, *CYP2W1*, *PTK7*, *MAD1L1*, *CACNA2D3*, *CHI3L1*, *COL13A1*, entre otros; los cuales también encontramos hipermetilados en nuestro análisis. En cuanto, a los regiones hipometilados se encuentran: *KCTD1*, *DLG2*, *FAM135A*, *CACNA1G*, *SCML4*, *CCDC57*, *SLC16A3*, *SECTM1*, *PLXNA2*, *EMR3*, *MIR548H4*, entre otros (The cáncer Genome Atlas Research Network, 2012). Rauch y colaboradores reportaron hipermetilación en *PDLIM2*, *PTPRN2*, *MAD1L1*, *CSNK1D*, *SYT6* (Rauch *et al*, 2008) genes que también encontramos hipermetilados en nuestro estudio.

En la búsqueda de regiones compartidas entre las tres líneas celulares; se utilizó como referencia la línea celular A-427, se obtuvo como resultado que solamente la línea celular INER-37 comparte regiones con A-427; los resultados se muestran en la tabla 21. Este resultado nos sirvió como punto de partida para identificar posibles genes que sugieren un valor significativo para estudios posteriores. En este contexto, se realizó una búsqueda en la literatura; por lo que, fueron seleccionados 4 genes de acuerdo a su función (figura 14 y 15): el primer gen llamado *ADORA1* (también llamado *RDC7*, *A(A1)R*), *PPP3CC*, *SORBS3* y *PDLIM2* (Qu *et al*, 2012; Roessler *et al*, 2012; Sacchetti *et al*, 2013). En el año 2009 Rauch y Pfeifer en una revisión retomaron resultados previos, en los antecedentes se menciona su estrategia: el método MIRA basado en la alta afinidad del complejo de la proteína MBD2b/MBD3L1 por dinucleótidos CpG metilados en combinación de microarreglos. Utilizaron MIRA en combinación con microarreglos de DNA con una resolución de 100 pb (HG18Tiling-Set17 y 8 HG18Tiling-Set19, NimbleGen) para analizar los cambios de la metilación del DNA asociados a tumor. En estos microarreglos, fue evidente que secuencias cerca de los centrómeros y telómeros de

cromosomas individuales (cromosomas 6, 7 y 8) se encuentran altamente metilados que otras regiones del cromosoma. Al hacer un acercamiento a una resolución mayor, se identificaron varias islas CpGs hipermetiladas en cada brazo del cromosoma 8; entre los cuales se encuentran *SORBS3*, *PDLIM2*, *C8orf58*, *DBC2*, y *RIN3* (Pfeifer y Rauch, 2009). Estos hallazgos colocan al gen *PDLIM2* como un excelente candidato para su posterior análisis de validación cuantitativa de metilación de su promotor en cáncer pulmonar. También confirma que la plataforma utilizada en nuestro análisis; a pesar que su principal uso ha sido la identificación de duplicación, amplificación y delección del DNA, en este estudio preliminar, es una herramienta confiable en el análisis de la metilación del DNA en combinación con enzimas de restricción sensibles a metilación.

Con todo lo anterior, el presente trabajo contribuyo de manera preliminar hacia el objetivo de identificar y proponer alteraciones epigenéticas por metilación del DNA genómico como posibles nuevos marcadores epigenéticos en cáncer pulmonar; por lo que, nuestro grupo de investigación trabaja actualmente en la validación de diferentes candidatos surgidos del empleo de una plataforma de análisis masivo del genoma en sub-megabases, lo cual permite su posible aplicación al diagnóstico y/o pronostico en pacientes con cáncer pulmonar.

VIII. CONCLUSIONES

1. Nuestros resultados confirman que el uso de plataformas de microarreglos en sub-megabases (SMRT-27k) han sido una herramienta útil para la identificación de nuevas regiones citogenéticas discretas para el estudio de posibles blancos genéticos y epigenéticos sobre secuencias promotoras, con resultados en calidad semejante a los obtenidos por otros grupo de investigación empleando plataformas masivas de mayor resolución como los arreglos “HG18-Tiling, NimbleGen” de secuencias promotoras en cáncer pulmonar.
2. Aunque se alcanzó adecuadamente nuestro objetivo, el número de muestras ingresado al presente estudio obliga a desarrollar el análisis de validación sobre una cohorte mayor de muestras de cáncer pulmonar del grupo NSCLC; sin embargo, la información generada proporcionó un panorama del epigenoma (landscape) por primera vez en muestras derivadas de pacientes con cáncer pulmonar incluyendo pacientes mestizos mexicanos.
3. El perfil de metilación del DNA en líneas celulares de cáncer pulmonar no sólo permitió la identificación de cambios en el perfil de metilación del DNA en NSCLC, sino que proporcionó información valiosa para futuros análisis del epigenoma entre líneas celulares y tumores sólidos de probable relevancia clínica en cáncer pulmonar.
4. Se identificaron genes con aberraciones de hiper e hipo-metilación del DNA no reportados previamente en cáncer pulmonar.
5. Identificamos y proponemos segmentos citogenéticos que contienen a probables nuevos marcadores epigenéticos en cáncer pulmonar destacando los genes *ADORA1*, *PPP3CC*, *SORBS3* y *PDLIM2*; los cuales actualmente se encuentran en proceso de validación por nuestro grupo de investigación UNAM-INER, para su empleo enfocado al diagnóstico temprano y pronóstico en pacientes con cáncer pulmonar.

IX. PERSPECTIVA

A pesar de la creciente información sobre genes como potenciales candidatos afectados por patrones aberrantes de metilación del DNA en cáncer, existen numerosos blancos en espera de ser confirmados y validados. No obstante, la aplicación de tecnologías de alta resolución para el análisis masivo del epigenoma basada en microarreglos en “Tiling” o secuenciación masiva de nueva generación del genoma, nuestros resultados mediante el uso de plataformas de microarreglos en sub-megabases nos permitió la identificación de probables nuevos biomarcadores presentes en cáncer pulmonar. En este primer acercamiento, para la caracterización del perfil de metilación del DNA en cáncer pulmonar se identificaron regiones hipermetiladas e hipometiladas; empleando líneas celulares establecidas en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER-51 e INER-51); permitiendo describir por primera vez alta similitud del epigenoma en líneas celulares del tipo AD pulmonar, confirmando que estos modelos celulares resultan excelentes modelos para el estudio funcional epigenético en pacientes con cáncer pulmonar en México, adicional al uso de muestras celulares de origen caucásico, para su posible análisis de contraste clínico donde el tejido pulmonar es limitado. El presente trabajo permitió identificar y proponer entre otros, a cuatro genes: *ADORAI*, *PPP3CC*, *SORBS3* y *PDLIM2* que con base en su función reportada probablemente constituyan nuevos indicadores moleculares y epigenéticos involucrados en la progresión y pronóstico del cáncer pulmonar, en proceso de validación por nuestro grupo de investigación UNAM-UBIMED e Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas.

X. LITERATURA CITADA

1. American Cancer Society Cancer facts and figures (2008). American Cancer Society; Atlanta: 2008.
2. Balgkouranidou, I., Liloglou, L., Lianidou, E. (2013). Lung cancer epigenetics: emerging biomarkers. *Biomarkers in Medicine*. **7**(1), 49-58.
3. Baylin, S. B., Belinsky, S. A., Herman, J. G. (2000). Aberrant methylation of gene promoters in cancer—Concepts, misconcepts, and promise. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**:1460-1461.
4. Belinsky, S. A., Klinge, D. M., Dekker, J. D., Smith, M. W., Bocklage, T. J., Gilliland, F. D., Crowell, R. E., Karp, D. D., Stidley, C. A., Picchi, M. A. (2005). Gene promoter methylation in plasma and sputum increases with lung cancer risk. *Clinical Cancer Research*. **11**:6505-6511.
5. Begum, S., Brait, M., Dasgupta, S., Ostrow, K. L., Zahurak, M., Carvalho, A. L., Joseph A. Califano, J. A., Goodman, S. N., William H. Westra, W. H., Obaidul Hoque, M. O., Sidransky, D. (2011). An Epigenetic Marker Panel for Detection of Lung Cancer Using Cell-Free Serum DNA. *Clinical Cancer Research*. **17**(13): 4494–503.
6. Bibikova, M., Lin, Z., Zhou, L., Chudin, E., Garcia, E. W., Wu, B. (2006). High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Research*. **16**:383-393.
7. Brena, R. M., Morrison, C., Liyanarachchi, S., Jarjoura, D., Davuluri, R. V., Otterson, G. A. (2007). Aberrant DNA methylation of OLIG1, a novel prognostic factor in non-small cell lung cancer. *PLoS Med*. **4**:e108.
8. Burbee, D. G., Forgacs, E., Zöchbauer-Müller, S., Shivakumar, L., Fong, K. M., Gao, B., Randle, D., Kondo, M., Virmani, A., Bader, S., Sekido, Y., Latif, F., Milchgrub, S., Toyooka, S., Gazdar, A. F., Lerman, M. I., Zbarovsky, E., White, M., Minna, J. D. (2001). Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *Journal of the National Cancer Institute*. **93**:691-699.
9. Cai, L. Y., Abe, M., Izumi, S., Imura, M., Yasugi, T., Ushijima, T. (2007). Identification of PRTFDC1 silencing and aberrant promoter methylation of GPR150, ITGA8 and HOXD11 in ovarian cancers. *Life Sciences*. **80**(16):1458-65.
10. Cheung, H-H., Lee, T-L., Rennert, O. M., Chan, W. Y. (2009). DNA methylation of cancer genome. DNA methylation of cancer genome. *Birth Defects Research Part C Embryo Today*. **87**(4):335-50.

11. Christensen, B. C., Marsit, C. J., Houseman, E. A., Godleski, J. J., Longacker, J. L., Zheng, S., Yeh, R-F., Wrensch, M. R., Wiemels, J. L., Karagas, M. R., Bueno, R., Sugarbaker, D. j., Nelson, H. H., Wiencke, J. K., Kelsey, K. T. (2009). Differentiation of Lung Adenocarcinoma, Pleural Mesothelioma, and Nonmalignant Pulmonary Tissues Using DNA Methylation Profiles. *Cancer Research*. **69**(15):6315-6321.
12. Coe B.P., Ylstra B., Carvalho B., Meijer G.A., Macaulay C., Lam W.L. (2007). Resolving the resolution of array CGH. *Genomics*. **89**:647-653.
13. Costello, J. F., Fruhwald, M. C., Smiraglia, D. J., Rush, L. J., Robertson, G. P., Gao, X., Wright F. A., Feramisco, J. D., Peltomäki, P., Lang, J. C., Schuller, D. E., Yu, L., Bloomfield, C. D., Caligiuri, M. A., Yates, A., Nishikawa, R., Su Huang, H., Petrelli, N. J., Zhang, X., O'Dorisio, M. S., Held, W. A., Cavenee, W. K., Plass, C. (2000). Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nature Genetics*. **24**:132-138.
14. Dai, Z., Lakshmanan, R. R., Zhu, W. G., Smiraglia, D. J., Rush, L. J., Fruhwald, M. C. (2001). Global methylation profiling of lung cancer identifies novel methylated genes. *Neoplasia*. **3**, 314-323.
15. de Lucio B, M. 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):774-83.
16. DeSantis, C. E., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Siegel, R. L., Stein, K. D., Kramer, J. L., Alteri, R., Robbins, A. S., Jemal, A. (2014). Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*. **64**(4):252-71.
17. Dietrich, D., Hasinger, O., Liebenberg, V., Field, J. K., Kristiansen, G., Soltermann, A. (2012). DNA methylation of the homeobox genes PITX2 and SHOX2 predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients. *Diagnostic molecular pathology*. **21**(2):93-104.
18. Dmitriev, A. A., Kashuba, V. I., Haraldson, K., Senchenko, V. N., Pavlova, T. V., Kudryavtseva, A. V., Anedchenko, E. A., Krasnov, G. S., Pronina, I. V., Loginov, V. I., Kondratieva, T. T., Kazubskaya, T. P., Braga, E. A., Yenamandra, S. P., Ignatjev, I., Ernberg. I., Klein, G., Lerman, M. I., Zabarovsky, E. R. (2012). Genetic and epigenetic analysis of non-small cell lung cancer with NotI-microarrays. *Epigenetics*. **7**(5):502-513.
19. Ehrlich, M., Lacey, M. (2013). DNA hypomethylation and hemimethylation in cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **754**:31-56.

20. Esteller, M. Ed. (2008). 2 Epigenetics and cancer DNA Methylation. Epigenetics in Biology and Medicine. New York: CRC Press.
21. Fadlelmola, F. M., Zhou, M., d Leeuw, R. J., Dosanjh, N. S., Harmer, K., Huntsman, D., Lam, W. L., Banerjee, D. (2008). Sub-megabase resolution tiling (SMRT) array-based comparative genomic hybridization profiling reveals novel gains and losses of chromosomal regions in Hodgkin Lymphoma and Anaplastic Large Cell Lymphoma cell lines. *Molecular Cancer*. **7**(2):1-13.
22. Fukasawa, M., Kimura, M., Morita, S., Matsubara, K., Yamanaka, S., Endo, C., Sakurada, A., Sato, M., Kondo, T., Horii, A., Sasaki, H., Hatada, I. (2006). Microarray analysis of promoter methylation in lung cancers. *Journal of Human Genetics*. 51:368–374.
23. Garnis, C., Lockwood, W. W., Vucic, E., Ge, Y., Girard, L., Minna, J. D., Gazdar, A. F., Lam, S., MacAulay, C., Lam, W. L. (2006). *International Journal of Cancer*. **118**(6):1556-64.
24. Garraway, L. A., Sellers, W. R. (2006). Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer. *Nature Reviews Cancer*. 6:593-602.
25. Gonzalez de Castro, D., Clarke, P. A., Al-Lazikani, B., Workman, P. (2013). Personalized cancer medicine: molecular diagnostics, predictive biomarkers, and drug resistance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. **93**(3):252-9.
26. Goto, Y., Shinjo, K., Kondo, Y., Shen, L., Toyota, M., Suzuki, H., Gao, W., An, B., Fujii, M., Murakami, H., Osada, H., Taniguchi, T., Usami, N., Kondo, M., Hasegawa, Y., Shimokata, K., Matsuo, K., Hida, T., Fujimoto, N., Kishimoto, T., Issa, J. J., Sekido, Y. (2009). Epigenetic Profiles Distinguish Malignant Pleural Mesothelioma from Lung Adenocarcinoma. *Cancer Research*. 69:9073-9082.
27. Han, W., Wang, T., Reilly, A. A., Keller, S. M., & Spivack, S. D. (2009). Gene promoter methylation assayed in exhaled breath, with differences in smokers and lung cancer patients. *Respiratory Research*. 10:86.
28. Heller, G., Babinsky, V. N., Ziegler, B., Weinzierl, M., Noll, C., Altenberger, C., Müllauer, L., Dekan, G., Grin, Y., Lang, G., End-Pfützenreuter, A., Steiner, I., Zehetmayer, S., Döme, B., Arns, B. M., Fong, K. M., Wright, C. M., Yang, I. A., Klepetko, W., Posch, M., Zielinski, C. C., Zöchbauer-Müller, S. (2013). Genome-wide CpG island methylation analyses in non-small cell lung cancer patients. *Carcinogenesis*. **34**(3):513-521.

29. Heller, G., Zielinski, C.C., Zöchbauer-Müller, S. (2010). Lung cancer: From single-gene methylation to methylome profiling. *Cancer Metastasis Rev.* 29:95-107.
30. Hong, K. M., Yang, S. H., Chowdhuri, S. R., Player, A., Hames, M., Fukuoka, J., Meerzaman, D., Dracheva, T., Sun, Z., Yang, P., Jen, J. (2007). Inactivation of LLC1 gene in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer.* **120**(11):2353-8.
31. Hou, P., Ji, M., Ge, C., Shen, J., Li, S., He, N., Lu, Z. (2003). Detection of methylation of human p16(Ink4a) gene 5'-CpG islands by electrochemical method coupled with linker-PCR. *Nucleic Acids Research.* **31**(16):e92.
32. Hsu, H. S., Chen, T. P., Hung, C. H., Wen, C. K., Lin, R. K., Lee, H. C., Wang, Y. C. (2007). Characterization of a multiple epigenetic marker panel for lung cancer detection and risk assessment in plasma. *Cancer.* 110:2019–2026.
33. <http://seer.cancer.gov>.
34. <http://www.cancer.gov/cancertopics>.
35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>
36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/index.html>
37. Ishkanian, A. S., Malloff, C. A., Watson, S. K., DeLeeuw, R. J., Chi, B., Coe, B. P., Snijders, A., Albertson, D. G., Pinkel, D., Marra, M. A., Ling, V., MacAulay, C., Lam, W. L. (2004). A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nature Genetics.* **36**(3):299-303.
38. Jemal, a., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011). Global Cancer Statistics. *CA: a cancer journal for clinicians.* **61**(2):69-90.
39. Jones, P. A., Taylor, S. M. (2003). Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell.* **20**(1):85-93.
40. Jost, J. P., Jost, Y. C. (1994). Transient DNA demethylation in differentiating mouse myoblasts correlates with higher activity of 5-methyldeoxycytidine excision repair. *J Biol Chem.* **269**(13):10040-3.
41. Kadara, H., Kabbout, M., Wistuba, I. I. (2012). Pulmonary adenocarcinoma: A renewed entity in 2011. *Respirology.* 17:50–65.
42. Kerr, K. M. (2001). Pulmonary preinvasive neoplasia. *J Clin Pathol.* 54:257-271.

43. Kim, H., Kwon, Y. M., Kim, J. S., Lee, H., Park, J. H., Shim, Y. M., Han J, Park, J., Kim, D. H. (2004). Tumor-specific methylation in bronchial lavage for the early detection of non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 22:2363-2370.
44. Kneip, C., Schmidt, B., Seegebarth, A., Weickmann, S., Fleischhacker, M., Liebenberg, V., Field, J. K., Dietrich, D. (2011). SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer in plasma. *Journal of Thoracic Oncology*. 6(10):1632-8.
45. Kress, C., Thomassin, H., Grange, T. (2001). Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted? *FEBS Lett*. 494(3):135-40.
46. Krypuy, C., Wodjacz, T. K., Dobrovic, A, (2008). Rapid High-Throughput Methylation Analysis Using the LightCycler® 480 System. *Biochemica*. 1:11-13.
47. Kron, K., Pethe, V., Briollais, L., Sadikovic, B., Ozcelik, H., Sunderji, A., Venkateswaran, V., Pinthus, J., Fleshner, N., van der Kwast, T., Bapat, B. (2009). Discovery of Novel Hypermethylated Genes in Prostate Cancer Using Genomic CpG Island Microarrays. *PLoS ONE* 4(3):e4830.
48. Kwon, Y-J., Lee, S. J., Koh, J. S., Kim, S. H., Lee, H. W., Kang, M. C., Bae, J. B., Kim, Y-J., Park, J. H. (2012). Genome-Wide Analysis of DNA Methylation and the Gene Expression Change in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 7(1): 20-33.
49. Kuang, S. Q., Tong, W. G., Yang, H., Lin, W., Lee, M. K., Fang, Z. H., Wei, Y., Jelinek, J., Issa, J. P., Garcia-Manero, G. (2008). Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 22(8):1529-38.
50. Lamparella, N., Barochia, A., Almokadem, S. (2013). Impact of genetic markers on treatment of non-small cell lung cancer. *Advances in experimental medicine and biology*. 779:145-64.
51. Lantuéjoul, S., Salameire, D., Salon, C., Brambilla, E. (2009). Pulmonary preneoplasia – sequential molecular carcinogenetic events. *Histopathology*. 54:43-54.
52. Li, S., Hursting S.D., Davis, B.J., McLachlan, J.A., Barret, J.C. (2003). Environmental Exposure, DNA Methylation, and Gene regulation. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 983:161-169.
53. Liang, G., Gonzalgo, M.L., Salem, C., Jones, P.A. (2002). Identification of DNA methylation differences during tumorigenesis by methylation-sensitive arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Methods*. 27:150-155.
54. Liu L., Wylie, R. C., Andrews, L. G., Tollefsbol, T. O. (2003). Aging, cancer and nutrition: the DNA methylation connection. *Mech Ageing Dev*. 124(10-12):989-98.

55. Liu, L., Kron, K. J., Pethe, V. V., Demetrashvili, N., Nesbitt, M. E., Trachtenberg, J., Ozcelik, H., Fleshner, N. E., Briollais, L., van der Kwast, T., Bapat, B. (2011). Association of tissue promoter methylation levels of APC, TGF β 2, HOXD3 and RASSF1A with prostate cancer progression. *International Journal of Cancer*. 129:2454-2462.
56. Lockwood, W. W., Coe, B. P., Williams, A. C., MacAulay, C., Lam, W. L. (2007). Whole genome tiling path array CGH analysis of segmental copy number alterations in cervical cancer cell lines. *International Journal of Cancer*. **120**(2):436-43.
57. Lockwood, W. W., Chari, R., Coe, B. P., Girard, L., Macaulay, C., Lam, S., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Lam, W. L. (2008). DNA amplification is a ubiquitous mechanism of oncogene activation in lung and other cancers. *Oncogene*. **27**(33):4615-24.
58. Lokk, K., Vooder, T., Kolde, R., Valk, K., Vosa, U., Roosipuu, R., Milani, L., Fischer, K., Koltsina, M., Urgard, E., Annilo, T., Metspalu, A., Tonisson, N. (2012). Methylation Markers of Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One*. **7**(6):e39813.
59. Lu, C., Soria, J. C., Tang, X., Xu, X. C., Wang, L., Mao, L., Lotan, R., Kemp, B., Bekele, B. N., Feng, L., Hong, W. K., Khuri, F. R. (2004). Prognostic factors in resected stage I non-small-cell lung cancer: a multivariate analysis of six molecular markers. *Journal of Clinical Oncology*. 22:4575-4583.
60. Machida, E. O., Brock, M. V., Hooker, C. M., Nakayama, J., Ishida, A., Amano, J., Picchi, M. A., Belinsky, S. A., Herman, J. G., Taniguchi, S., Baylin, S. B. (2006). Hypermethylation of ASC/TMS1 is a sputum marker for late-stage lung cancer. *Cancer Research*. 66:6210-6218.
61. Mollberg, N., Surati, M., Demchuk, C., Fathi, R., Salama, A. K., Husain, A. N., Hensing, T., Salgia, R. (2011). Mind-mapping for lung cancer: Towards a personalized therapeutics approach. *Advances in Therapy*. **28**(3): 173–194.
62. Metodieva, S.N. (2008). Angiogenesis and non small cell lung cancer. *BJMG*. **11**(2):3-10.
63. Ostrow, K. L., Hoque, M. O., Loyo, M., Brait, M., Greenberg, A., Siegfried, J. M., Grandis, J. R., Davis, A. G., Bigbee, W. L., Rom, W., Sidransky, D. (2010). Molecular analysis of plasma DNA for the early detection of lung cancer by quantitative methylation-specific PCR. *Clinical Cancer Research*. 2010: 16:3463–72.
64. Parka, J. Y., Kimb, D., Yangc, M., Parka, H. Y., Haak-Lee, S., Rincona, M., Kreahlinga, Y., Plasse, C., Smiragliae, D. J., Tockmana, M. S., Kim, S-J. (2013). Gene silencing of SLC5A8 identified by genome-wide methylation profiling in lung cancer. *Lung Cancer*.79:198-204.

65. Pfeifer, G. p., Rauch, T. A. (2009). DNA methylation patterns in lung carcinomas. *Seminars in Cancer Biology*. 181-187.
66. Pogribny, I. P., Rusyn, I. (2013). Environmental Toxicants, Epigenetics, and Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 754:215-32.
67. 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 International*. 5(1):20.
68. Qu, Z., Fu, J., Ma, H., Zhou, J., Jin, M., Mapara, M. Y., Grusby, M. J., Xiao, G. (2012). PDLIM2 restricts Th1 and Th17 differentiation and prevents autoimmune disease. *Cell & Bioscience*. 2(1):23.
69. Rauch, T. A., Zhong, X., Wu, X., Wang, M., Kernstine, K. H., Wang, Z. (2008). High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:252-257.
70. Rhee, I., Jair, K. W., Yen, R. W., Lengauer, C., Herman, J. G., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Baylin, S. B., Schuebel, K. E. (2000). CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature*. 404:1003-1007.
71. 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.e12.
72. Sacchetti, E., Scassellati, C., Minelli, A., Valsecchi, P., Bonvicini, C., Pasqualetti, P., Galluzzo, A., Pioli, R., Gennarelli, M. (2013). Schizophrenia susceptibility and NMDA-receptor mediated signalling: an association study involving 32 tagSNPs of DAO, DAOA, PPP3CC, and DTNBP1 genes. *BMC Medical Genetics*. 14:33.
73. Sawan, C., Vaissière, T., Murr, R., Herceg, Z. (2008). Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutation Research*. 642:1-13.
74. Schmidt, B., Liebenberg, V., Dietrich, D., Schlegel, T., Kneip, C., Seegebarth, A., Flemming, N., Seemann, S., Distler, J., Lewin, J., Tetzner, R., Weickmann, S., Wille, U., Liloglou, T., Raji, O., Walshaw, M., Fleischhacker, M., Witt, C., Field, J. K. (2010) SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates. *BMC Cancer*. 10:600.

75. Schmalfluss, F., Kolominsky-Rabas, P. L. (2013). Personalized medicine in screening for malignant disease: a review of methods and applications. *Biomarker Insights*. 8:9-14.
76. Schumacher, A., Kapranov, P., Kaminsky, Z., Flanagan, J., Assadzadeh, A., Yau, P., Virtanen, C., Winegarden, N., Cheng, J., Gingeras, T., Petronis, A. (2006). Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications. *Nucleic Acids Research*. **34**(2):528–542.
77. Sechler, M., Cizmici, A. D., Sreedevi, A., Van Scoyk, M., Brzezinski, C., Kelley, N., Bikkavilli, R. K., Winn, R. A. (2013). Non-small-cell lung cancer: molecular targeted therapy and personalized medicine – drug resistance, mechanisms, and strategies. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 6:25-36.
78. Seng, T. J., Currey, N., Cooper, W. A., Lee, C. S., Chan, C., Horvath, L., Sutherland, R. L., Kennedy, C., McCaughan, B., Kohonen-Corish, M. R. (2008). DLEC1 and MLH1 promoter methylation are associated with poor prognosis in non-small cell lung carcinoma. *British Journal Of Cancer*. **99**(2):375-82.
79. Shames, D. S., Girard, L., Gao, B., Sato, M., Lewis, C. M., Shivapurkar, N., Jiang, A., Perou, C. M., Kim, Y. H., Pollack, J. R., Fong, K. M., Lam, C. L., Wong, M., Shyr, Y., Nanda, R., Olopade, O. I., Gerald, W., Euhus, D. M., Shay, J. W., Gazdar, A. F., Minna, J. D. (2006). A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies. *PLoS Medicine*. 3:e486.
80. Shinjo, K., Okamoto, Y., An, B., Yokoyama, T., Takeuchi, I., Fujii, M., Osada, H., Usami, N., Hasegawa, Y., Ito, H., Hida, T., Fujimoto, N., Kishimoto, T., Sekido, Y., Kondo, Y. (2012). Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with distinct clinical characters of lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis*. **33**(7):1277-1285.
81. Shiraishi, M., Sekiguchi, A., Terry, M. J., Oates, A. J., Miyamoto, Y., Chuu, Y. H., Munakata, M., Sekiya, T. A. (2002). Comprehensive catalog of CpG islands methylated in human lung adenocarcinomas for the identification of tumor suppressor genes. *Oncogene*. 21:3804–3813.
82. Shivapurkar, N., Stastny, V., Suzuki, M., Wistuba, I. I., Li, L., Zheng, Y., Feng, Z., Hol, B., Prinsen, C., Thunnissen, F. B., Gazdar, A. F. (2007). Application of a methylation gene panel by quantitative PCR for lung cancers. *Cancer Letter*. 247:56-71.
83. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*. **64**(1):9-29.

84. Son, J. W., Jeong, K. J., Jean, W. S., Park, S. Y., Jheon, S., Cho, H. M., Park, C. G., Lee, H. Y., Kang, J. (2011). Genome-wide combination profiling of DNA copy number and methylation for deciphering biomarkers in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Letters*. **311**(1):29-37.
85. Suzuki, H., Gabrielson, E., Chen, W., Anbazhagan, R., van Engeland, M., Weijnenberg, M. P., Herman, J. G., Baylin, S. B. (2002). A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nature Genetics*. 31:141-149.
86. Suter, C. M., Martin, D. I., Ward, R. L. (2004). Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue. *Int. J. Colorectal. Dis.* 19:95-101.
87. The Cancer Genome Atlas Research Network. (2012). Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 489:519-524.
88. Tomizawa, Y., Kohno, T., Kondo, H., Otsuka, A., Nishioka, M., Niki, T., Yamada, T., Maeshima, A., Yoshimura, K., Saito, R., Minna, J. D., Yokota, J. (2002). Clinicopathological significance of epigenetic inactivation of RASSF1A at 3p21.3 in stage I lung adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*. 8:2362-2368.
89. Torre, L. A., Bray F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*. **65**(2):87-108.
90. Toyooka, S., Toyooka, K. O., Maruyama, R., Virmani, A. K., Girard, L., Miyajima, K., Harada, K., Ariyoshi, Y., Takahashi, T., Sugio, K., Brambilla, E., Gilcrease, M., Minna, J. D., Gazdar, A. F. (2001). DNA methylation profiles of lung tumors. *Molecular Cancer Therapeutics*. **1**(1):61-7.
91. Travis, W.D., Brambilla, E., Muller-Hermelink, H.K., Harris C.C. Eds. (2004). WHO classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: IARC Press.
92. UCSC Genome Browser <http://hgdownload.cse.ucsc.edu/gold>
93. van der Drift, M. A., Prinsen, C. F., Knuiman, G. J., Janssen, J. P., Dekhuijzen, P. N., Thunnissen, F. B. (2012) Diagnosing peripheral lung cancer: the additional value of the Ras-association domain family 1A gene methylation and Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog mutation analyses in washings in nondiagnostic bronchoscopy. *Chest*. **141**(1):169–175
94. Weber, M., Davies, J. J., Wittig, D., Oakeley, E. J., Haase, M., Lam, W. L. (2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature Genetics*. 37:853-862.

95. Wild, L., Flanagan, J. M. (2010). Genome-wide hypomethylation in cancer may be a passive consequence of transformation. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1806**(1):50-7.
96. William, D., Travis, M. D. (2011). Pathology of Lung Cancer. *Clinics in Chest Medicine*. **32**(4):669-692.
97. Wilson, A. S., Power, B. E., Molloy, P. L. (2007). DNA hypomethylation and human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1775**:138-162.
98. Wolffe, A. P., Matzke, M. A. (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science*. **286**:481-486.
99. Yanagawa, N., Tamura, G., Oizumi, H., Kanauchi, N., Endoh, M., Sadahiro, M., Motoyama, T. (2007). Promoter hypermethylation of RASSF1A and RUNX3 genes as an independent prognostic prediction marker in surgically resected non-small cell lung cancers. *Lung Cancer*. **58**:131-138.
100. Yang, J., Shen, Y., Liu, B., Tong, Y. (2011). Promoter methylation of BRMS1 correlates with smoking history and poor survival in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*. **74**:305-309.
101. Zapata-Benavides, P., Saavedra-Alonso, S., Zamora-Avila, D., Vargas-Rodarte, C., Barrera-Rodríguez, R., Salinas-Silva, J., Rodríguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, R., Trejo-Avila, L. (2007). Mouse mammary tumor virus-like gene sequences in breast cancer samples of Mexican women. *Intervirology*. **50**:402-407.
102. Zhang, Y., Wanga, R., Song, H., Huang, G., Yi, J., Zheng, Y., Wang, J., Chen, L. (2011). Methylation of multiple genes as a candidate biomarker in non-small cell lung cancer. *Cancer Letters*. **303**:21-28.
103. Zhong, S., Fields, C. R., Su, N., Pan, Y. X., & Robertson, K. D. (2007). Pharmacologic inhibition of epigenetic modifications, coupled with gene expression profiling, reveals novel targets of aberrant DNA methylation and histone deacetylation in lung cancer. *Oncogene*. **26**:2621-2634.
104. Zochbauer-Muller S, Fong, K. M., Virmani, A. K., Geradts, J., Gazdar, A. F., Minna, J. D. (2001). Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res*. **61**:249-255.
105. Zöchbauer-Müller, S., Minna, J. D., Gazdar, A. F. (2002). Aberrant DNA methylation in lung cancer: biological and clinical implications. *Oncologist*. **7**(5):451-7.