



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOMEDICINA

**“ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE lncRNAs EN LA INDUCCIÓN DE
QUIMIORRESISTENCIA EN TUMORES DE ORIGEN EPITELIAL”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biól. Ana Guadalupe Soto Valladares

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Federico Ávila Moreno
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

COMITÉ TUTOR: Dra. Patricia Piña Sánchez
Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Diego Julio Arenas Aranda†
Facultad de Medicina, UNAM

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOMEDICINA

**“ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE lncRNAs EN LA INDUCCIÓN DE
QUIMIORRESISTENCIA EN TUMORES DE ORIGEN EPITELIAL”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biól. Ana Guadalupe Soto Valladares

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Federico Ávila Moreno
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

COMITÉ TUTOR: Dra. Patricia Piña Sánchez
Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Diego Julio Arenas Aranda†
Facultad de Medicina, UNAM

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2016



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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de septiembre de 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **SOTO VALLADARES ANA GUADALUPE**, con número de cuenta 303872023, con la tesis titulada **"ANÁLISIS DE EXPRESIÓN IncRNAs EN LA INDUCCIÓN DE QUIMIORRESISTENCIA EN TUMORES DE ORIGEN EPITELIAL."**, realizada bajo la dirección del **DR. FEDERICO ÁVILA MORENO**:

Presidente: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS
Vocal: DR. JOAQUIN ALEJANDRO ZÚNIGA RAMOS
Secretario: DRA. PATRICIA PIÑA SÁNCHEZ
Suplente: DRA. ELENA ARECHAGA OCAMPO
Suplente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN

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



A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de enero de 2016.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgar la beca no. 508608

Por financiamiento de proyecto:

A la UNAM-DGAPA por 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, conducido por el Dr. Federico Avila Moreno.

A la Dirección de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) por el financiamiento del proyecto B18-12 aprobado por el comité de ciencia y bioética.

Al IMSS por el financiamiento FIS/IMSS/PROT/G13/1234.

A mi Tutor:

- Dr. Federico Ávila Moreno.

A mi comité tutorial:

- Dra. Patricia Piña Sánchez.
- Dr. Diego Arenas Aranda †

Agradecimientos a título personal

A mis padres

Gracias por su paciencia, apoyo y amor incondicional...Los amo!

A mi hermana

Por todas las aventuras que hemos vivido, te adoro!

A mi familia

Por estar siempre hombro con hombro y apoyarme en todas mis locuras!

A mi prima Ana Ayala Valladares

Por creer en mi; te extraño!

Al Dr. Federico Ávila Moreno y a la Dra. Patricia Piña Sánchez

Gracias por permitirme formar parte de su equipo y por su apoyo, sin el cual la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

Al laboratorio de Oncología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del IMSS y al laboratorio de Epigenómica del Cáncer de la UBIMED Fes Iztacala, donde se desarrolló este trabajo.

Al Dr. Alberto Monroy García del laboratorio de Inmunología del Cáncer

Por facilitar las líneas celulares derivadas de cáncer cérvicouterino.

Al jurado

Por sus valiosas observaciones.

A mis compañeros y amigos del laboratorio (Cecilia, Paco, Magda, Marlen, Cindy, Diana, Galo, Eduardo y Vicky).

Gracias por su apoyo académico, personal y por todos los momentos divertidos que hemos vivido.

A todos los guerreros que se enfrentan o enfrentaron al cáncer; en especial a mis seres queridos...

INDICE

RESUMEN	13
2. INTRODUCCIÓN	16
2.1 CÁNCER.....	16
2.2 TUMORES (NEOPLASIAS MALIGNAS) DE ORIGEN EPITELIAL... 16	
2.3 CÁNCER CERVICOUTERINO	16
2.4 CÁNCER PULMONAR	18
2.1. EPIDEMIOLOGÍA.....	21
2.3.1. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL CISPLATINO.....	23
2.3.1.1. Aductos y reconocimiento de daño en el DNA.....	23
2.3.1.2. Activación de puntos que controlan el ciclo celular.....	24
2.3.1.3. Activación de P53 y MAPK.	24
2.3.1.5. Inducción de apoptosis.	24
2.4. HETEROGENEIDAD TUMORAL	26
3. ANTECEDENTES	28
3.1 QUIMIORRESISTENCIA	28
3. 1. 2. MECANISMOS DE QUIMIORRESISTENCIA A CISPLATINO.....	28
3.2. RNAs NO CODIFICANTES.....	30
3. 2.1. RNAs no codificantes pequeños.....	30
3.2.1.1. miRNAs en cancer y quimiorresistencia.	31
3. 2. 2. RNAs no codificantes largos (lncRNA).....	31
3.2.2.1. LncRNAs asociados a cáncer.....	35
3. 2.2.2. Largos no codificantes en resistencia a tratamiento	36
4. JUSTIFICACIÓN	37
5. HIPÓTESIS	37
6. OBJETIVOS	38
6.1. OBJETIVO GENERAL	38
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	38
7.1 Selección de lncRNA's	39

7.2. Cultivos celulares in vitro	39
7.3. Ensayos de quimioresistencia a largo plazo in vitro	39
7.4. Ensayos de quimiorresistencia por Método de MTS in vitro.	39
7.5. Extracción de ácidos nucleicos.	40
7.6. Análisis de expresión génica mediante ensayos por RT-qPCR	40
7.7. Análisis de Expresión de Proteína mediante Ensayos por Inmunocitoquímica.	40
7.8. Análisis estadístico.....	41
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	42
9. RESULTADOS.....	43
Selección de lncRNA's	43
Inducción de modelos quimiorresistentes de cáncer de cérvix y cáncer de pulmón	49
Evaluación del inmunofenotipo tipo troncal quimiorresistente.....	62
Alteraciones en el perfil de expresión de lncRNAs en líneas celulares parentales respecto a líneas celulares quimiorresistentes.	83
10. DISCUSIÓN	92
11. CONCLUSIONES.....	104
12. PERSPECTIVAS.....	105
13. LITERATURA CITADA.....	106

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y mortalidad en países en vías de desarrollo.....	23
Figura 2. Vías involucradas en la citotoxicidad de Cisplatino.....	25
Figura 3. Hallmarks del cáncer y modelos de quimiorresistencia.....	27
Figura 4. Arquetipos funcionales de lncRNAs y regulación postranscripcional.....	35
Figura 5. Contexto genómico e isoformas de HOTAIR.....	48
Figura 6. Contexto genómico de UCA1.....	48
Figura 7. Contexto genómico de H19.....	49
Figura 8. Gráfica de la evolución en tiempo del modelo quimiorresistente inducible en modelos celulares de cáncer de cérvix frente a Cisplatino.....	50
Figura 9. Gráfica de la evolución en tiempo del modelo quimiorresistente inducible en modelos celulares de cáncer pulmonar frente a Cisplatino. A).....	52
Figura 10. Análisis de la viabilidad celular mediante ensayos de MTS de líneas celulares de cáncer de cérvix.....	55
Figura 11. Análisis de la viabilidad celular mediante ensayos de MTS de líneas celulares de cáncer de pulmón.....	58
Figura 12. Morfología celular de las líneas celulares parentales y quimiorresistentes de cáncer de cérvix.....	59
Figura 13. Morfología celular de las líneas celulares parentales y quimiorresistentes de cáncer de pulmón.....	60
Figura 14. Análisis de cambios en el diámetro celular en líneas celulares de cáncer cervicouterino.....	62
Figura 15. Análisis de expresión del marcador ABCG2 en líneas celulares HeLa parentales y quimiorresistente HeLa mediante inmunocitoquímica.....	64
Figura 16. Análisis de expresión de ABCG2 en líneas celulares CaSki parentales y quimiorresistente mediante inmunocitoquímica.....	65
Figura 17. Análisis de expresión de ABCG2 en líneas celulares A-427 parental y quimiorresistente inducible mediante inmunocitoquímica.....	66
Figura 18. Análisis de expresión de ABCG2 en líneas celulares parentales y quimiorresistentes de cáncer de pulmón A549 mediante inmunocitoquímica.....	67
Figura 19. Análisis de expresión de Oct4 en línea celular HeLa Parental y Quimiorresistente Mediante Inmunocitoquímica.....	69
Figura 20. Análisis de expresión de Oct4 en línea celular CaSki Parental y quimiorresistente Inducible Mediante Inmunocitoquímica.....	70
Figura 21. Análisis de Expresión de Oct 4 en Líneas Celulares Parentales y Quimiorresistente de Cáncer de Pulmón A427 mediante inmunocitoquímica.....	71
Figura 22. Análisis de Expresión de Oct 4 en Línea Celular A549 Parental y Quimiorresistente Mediante inmunocitoquímica. e.....	73
Figura 23. Análisis de Expresión de CD44 en Líneas Celulares HeLa Parentales y Quimiorresistente Mediante Inmunocitoquímica.....	74
Figura 24. Análisis de Expresión de CD44 en Línea Celular CaSki Parental y Quimiorresistente Mediante Inmunocitoquímica.....	75

Figura 25. Análisis de Expresión de CD44 en Línea Celular A427 Parental y Quimiorresistente Mediante Inmunocitoquímica.....	76
Figura 26. Análisis de Expresión de CD44 en Línea Celular A-549 Parentales y Quimiorresistente Mediante Inmunocitoquímica.....	77
Figura 27. Análisis de la Expresión de la Proteína ALDH en Línea Celular HeLa Parental y Quimiorresistente Mediante Inmunocitoquímica.).	79
Figura 28. Análisis de Expresión de la Proteína ALDH en Línea Celular CaSki Parental y Quimiorresistente Mediante Inmunocitoquímica.....	80
.Figura 29. Análisis de Expresión de ALDH en Líneas Celular A427 Parental y Quimiorresistente Mediante Inmunocitoquímica..	81
Figura 30. Análisis de Expresión de ALDH en Línea Celular A549 Parental y Quimiorresistente Mediante Inmunocitoquímica.....	82
Figura 31. Perfil de expresión de lncRNAs en la línea celular de cáncer de cérvix HeLa.....	85
Figura 32. Perfil de expresión de lncRNAs en la línea celular de cáncer de cérvix CaSki.....	87
Figura 33. Perfil de expresión de lncRNAs en la línea celular de cáncer de cérvix HeLa ante un reto farmacológico de cisplatino.,.....	88
Figura 34. Perfil de expresión de lncRNAs en las líneas celulares de cáncer de pulmón.,	90
Fig. Supl. 1. Expresión de HOTAIR entre líneas celulares de cáncer de cérvix.....	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de estadificación en cáncer de cérvix (FIGO, 2012).....	17
Tabla 2. Tratamientos de acuerdo a la etapa en cáncer de cérvix.	18
Tabla 3. Clasificación de estadificación en cáncer de pulmón (UICC, 1997).	19
Tabla 4. Tratamientos de acuerdo a la etapa en cáncer de pulmón.....	21
Tabla 5. Funciones, blancos o posibles blancos de los lncRNAs seleccionados en base al primer criterio.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 6. Funciones, blancos o posibles blancos de los lncRNAs seleccionados en base al segundo y tercer criterio.	46
Tabla Suplementaria 1. Tabla de las secuencias de oligos para evaluar la expresión de los lncRNAs.....	113

RESUMEN

El cáncer de pulmón representa el tipo de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en hombres; mientras que el cáncer de cérvix se ubica como el cuarto lugar en incidencia y mortalidad en mujeres a nivel mundial. En ambos casos a pesar de las terapias que existen, uno de los mayores obstáculos en la terapia oncológica es la resistencia farmacológica de las células tumorales. Diversas alteraciones genéticas y epigenéticas se han propuesto para abordar el reto de superar la resistencia al tratamiento fármaco-oncológico basado en platino en pacientes. Al respecto, en cáncer pulmonar se han descrito aberraciones de carácter genético, como epigenético entre este último destaca, patrones de metilación del DNA y código de histonas, así como la participación de RNAs largos no-codificantes involucrados en la escritura y lectura del código histónico y remodelación de la cromatina en cáncer, cuya función durante los procesos de adaptación y resistencia al tratamiento oncológico no ha sido dilucidada. Basado en lo anterior, en el presente trabajo fueron seleccionados un perfil de RNAs largos no codificantes (lncRNAs) algunos de los cuales se encuentran representados en diversos tipos de cáncer de origen epitelial entre ellos el CaCu y cáncer pulmonar. No obstante se desconoce si están involucrados en procesos de adaptación y resistencia a largo plazo al tratamiento oncológico por cisplatino; generando para ello líneas celulares de cáncer de cérvix y cáncer de pulmón resistentes a cisplatino a largo plazo (4, 6, 8 y 12 meses), evaluó la expresión de marcadores asociados al inmunofenotipo de células tipo troncal quimiorresistente para finalmente evaluar la expresión de un perfil de nueve lncRNAs asociados a cáncer.

Nuestros resultados indican que modificaciones en los perfiles y niveles expresión de lncRNAs en modelos celulares in vitro de cáncer pulmonar y cáncer de cérvix parentales y quimiorresistentes a cisplatino, probablemente, representan mecanismos epigenéticos transitorios en respuesta que contribuyen al proceso adaptativo de quimiorresistencia, el cual queda estable con variaciones a largo plazo durante 4, 6, 8 y 12 meses en presencia continua a cisplatino, sobresaliendo inducción y/o pérdida de UCA1 y Sox2OT en ambos tipos de tumores de origen

epitelial: cáncer pulmonar y cáncer de cérvix dondeUCA1 probablemente se encuentre asociado en CaCu a infección por HPV18+.

Palabras clave: lncRNA, pulmón, cérvix-uterino, cisplatino.

ABSTRACT

Lung cancer remains as the leading cause of death in both male and female genders, meanwhile cervical cancer is the fourth place by incidence and mortality in female gender at worldwide. In both cases despite therapy protocols, one of the greatest obstacles in cancer therapy is resistance mechanism in front of anti-cancer drugs. Diverse genetic and epigenetic alterations have been associated or involved in this drug resistance platinum-based cancer treatment in oncological patients.

At this regard, in lung cancer several genetic and epigenetic aberrations have been described, highlight DNA methylation and histone code modifications, as well as, long non-coding RNAs (lncRNAs) some of them involved in writing and reading mechanisms of the histone code and chromatin remodeling mechanisms, whose function through oncologic treatments and chemoresistance phenomena remains to be elucidated.

Based on that, in the present study a set of lncRNAs some of which overexpressed in several types of cancer of epithelial origin including cervical cancer and lung cancer, were selected. However is unknown it's involving in long-term adaptation chemoresistance process in front to cisplatin treatment. Therefore, at this study inducible chemoresistant cellular models from cervical cancer cells and lung cancer cells, were generated, in addition, the expression of cancer stem-like cell markers were evaluated and finally the expression of a profile of nine lncRNAs, was evaluated.

Our findings suggest that a lncRNA expression profile and expression level were inducible and modulated through an adaptive process by in vitro cultures 4, 6, 8, and 12 months, using lung cancer and cervical cancer cells in front to cisplatin. Highlighting such as the UCA1 and Sox2OT induction is involved in lung cancer chemoresistance mechanisms, meanwhile in cervical cancer it was quantified a UCA1 inducible and Sox2OT decreased expression pattern, where UCA1 is probably associated with HPV18+ viral infection.

Key words: lncRNA, lung, uterine cervix, cisplatin.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 CANCER

El cáncer es un grupo de enfermedades que se caracteriza por la división celular no controlada y la propagación de células anormales, los factores de riesgo externos asociados al cáncer son: el tabaco, infecciones por diversos organismos y una dieta no saludable, mientras los factores de riesgo internos son: mutaciones genéticas, hormonas y condiciones inmunológicas¹. El cáncer se encuentra dentro de las principales causas de muerte a nivel mundial, los tratamientos son: cirugía, radiación, quimioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia y en algunos casos terapia dirigida, el objetivo del tratamiento es la cura o prolongar la vida de los pacientes con enfermedad avanzada².

2.1.1. TUMORES (NEOPLASIAS MALIGNAS) DE ORIGEN EPITELIAL

Los carcinomas se originan a partir de tejidos epiteliales como la piel, también cubren y delimitan todos los órganos dentro del cuerpo y cavidades. Los carcinomas son el tipo de cáncer más común, aproximadamente el 85% de los casos de cáncer diagnosticados. Entre los distintos tipos de carcinoma, se encuentran³:

Carcinoma de células escamosas: comienza en células escamosas, como la piel o esófago.

Adenocarcinomas: comienzan en células glandulares.

Carcinoma transicional o urotelio: formado de células epiteliales que pueden hacerse más grandes o más pequeñas se encuentran en el revestimiento de la vejiga, uréteres y en parte de los riñones.

Carcinoma Basal: son formas de cáncer que se originan en la capa más profunda del epitelio.

2.1.2. CÁNCER CERVICOUTERINO

CLASIFICACIÓN ETAPAS

A principios de los años 70 Harald zur Hausen postuló por primera vez que la infección persistente con el Virus de Papiloma Humano (VPH) promueve el desarrollo del cáncer cervicouterino, ocupando actualmente el segundo lugar en incidencia y mortalidad en países en vías de desarrollo. ⁴

El diagnóstico en cáncer de cérvix se realiza mediante estudio histopatológico derivado de una biopsia dirigida, ya sea mediante colposcopia o mediante toma directa, si es que el tumor es visible. La estadificación se lleva a cabo utilizando la última modificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) en el año 2012, la cual se muestra en la tabla 1⁵.

Tabla 1. Clasificación de acuerdo a estudios clínicos en cáncer de cérvix (FIGO, 2012)

ETAPA	CARACTERÍSTICAS
I	Carcinoma estrictamente limitado al cuello uterino
IA	Identificado sólo microscópicamente. La invasión se limita a la invasión del estroma medida con una profundidad máxima de 5 mm (es decir ≤ 5 mm) y no mayor de 7 mm (es decir ≤ 7 mm).
IA1	Medida de invasión del estroma ≤ 3 mm de profundidad y ≤ 7 mm de diámetro
IA2	Medida de invasión del estroma > 3 mm pero ≤ 5 mm de profundidad y ≤ 7 mm de diámetro
IB1	Lesiones clínicas ≤ 4 cm en su dimensión mayor.
IB2	Lesiones clínicas > 4 cm en su dimensión mayor.
IIA	Sin participación parametrial Explicar brevemente el significado
IIA1	Participación parametrial obvio. La participación de los 2/3 superiores de la vagina, sin invasión del parametrio, ≤ 4 cm en su mayor dimensión
IIA2	Sin participación parametrial obvio. La participación de los 2/3 superiores de la vagina, sin invasión del parametrio, > 4 cm en su dimensión mayor
IIB	Complicación obvia del parametrio, pero no a la pared pélvica.
IIIA	Ninguna extensión en la pared lateral de la pelvis, pero la participación del tercio inferior de la vagina.
IIIB	Extensión a la pared pélvica o hidronefrosis o riñón con ausencia de función

IVA	Diseminación de tumor a los órganos pélvicos adyacentes.
IVB	Propagado a órganos distantes.

TRATAMIENTOS

Los tratamientos serán normados de acuerdo al estadio clínico (EC), el tratamiento para pacientes con EC tempranas el tratamiento ideal es el quirúrgico. Para pacientes con EC IA1 los tratamientos van desde conización (entre paréntesis indicar brevemente en qué consiste) hasta histerectomía y se obtiene una curación del 99-100%, en el caso de IA2-IB1 el tratamiento es histerectomía radical y la curación llega a ser del 85-90%. Las recurrencias en estas pacientes es del 10% a 25%, las cuales se presentan hasta en el 64% en los primeros dos años (6,8-14), y los sitios de presentación de recurrencias son: en la pelvis (60%), en la pelvis y a distancia (20%) y solamente a distancia (20%). El tratamiento establecido para las etapas localmente avanzadas (IB2 - IIA2 – IVA) es la quimio-radioterapia concomitante, y EC IVB el tratamiento con quimioterapia sistémica es el indicado (Tabla 2)³.

Tabla 2. Elección de tratamiento oncológico de acuerdo a la estadio clínico en cáncer de cérvix.

Etapa	Tratamiento
IA2-IB1	Histerectomía.
IIB-IIIB	Tratamiento neoadyuvante con quimioterapia.
IB2, IIA2, IVA	Quimio-radioterapia concomitante.
IVB	quimioterapia sistémica.

* Quimioterapia con Cisplatino, Carboplatino y Paclitaxel.

2.1.3. CANCER PULMONAR

El cáncer de pulmón es la primer causa de muerte en hombres y el segundo en mujeres a nivel mundial, con un estimado de 1.6 millones de muertes en el 2012⁵. El tabaquismo es el principal factor de riesgo y representa aproximadamente el 80%

de las muertes por cáncer de pulmón en hombres y el 50% en mujeres a nivel mundial, otro factor es la contaminación del aire, además la susceptibilidad genética juega un papel que contribuye al desarrollo de la enfermedad a edad temprana⁴

CLASIFICACIÓN ETAPAS

El cáncer de pulmón o carcinoma broncogénico se divide, para su estudio y tratamiento, en dos grandes grupos:

- Carcinoma de células pequeñas.
- Carcinoma de células no pequeñas: carcinoma escamoso, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y carcinomas combinados, con sus diferentes grados de diferenciación.

Cerca del 85 – 90% de los casos de cáncer de pulmón son de células no pequeñas, mientras que del 10-15% son de células pequeñas

6.

Para la estadificación del cáncer de pulmón se utiliza el sistema TNM acordada por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) la clasificación por estadios se muestra en la Tabla 3 ⁷.

Tabla 3. Clasificación de la estadificación del cáncer de pulmón (UICC, 1997).

ETAPA	CARACTERÍSTICAS
0	Carcinoma <i>in situ</i> .
IA	Tumor tres centímetros de diámetro mayor. Libre de metástasis ganglionares regionales. No se detectan metástasis a distancia.
IB	Tumor con cualquiera de los datos siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • > 3 cm de diámetro mayor. • Afectación de bronquio principal, pero a 2 cm o más de carina traqueal o principal. • Invasión de pleura visceral. • Atelectasia o neumonitis obstructiva que llega al hilio y que no afecta a todo el pulmón.

	Sin metástasis ganglionares regionales. No se detectan metástasis a distancia.
IIA	Tumor ≤ 3 cm de diámetro mayor, rodeado de pulmón o pleura visceral libre de signos broncoscópicos de invasión más proximal que el bronquio lobular. Metástasis en ganglios peribronquiales y/o hilares o laterales, incluida la extensión directa. No se detectan metástasis a distancia.
IIB	Tumor de cualquier tamaño: <ul style="list-style-type: none"> • Que invade directamente cualquiera de lo siguiente: pared torácica (incluido el surco superior), diafragma, pleura mediastínica o pericardio parietal. Libre de metástasis ganglionares regionales. No se detectan metástasis a distancia. • O • > 3 cm de diámetro mayor. • Afectación de bronquio principal, pero a 2 cm o más de carina traqueal o principal. Metástasis en los ganglios peribronquiales y/o hilares ipsolaterales, incluida la extensión directa. No se detectan metástasis a distancia.
IIIA	Tumor de cualquier tamaño: <ul style="list-style-type: none"> • que invade directamente cualquiera de lo siguiente: pared torácica (incluido el surco superior), diafragma, pleura mediastínica o pericardio parietal.
IIIB	Tumor de cualquier tamaño que: <ul style="list-style-type: none"> • Invade cualquiera de lo siguiente: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, cuerpo vertebral, carina; nódulos tumorales separados del tumor primario en el mismo lóbulo; tumor con derrame pleural o pericárdico maligno. • Metástasis en ganglios mediastínicos ipsolaterales y/o subcarinales. No se detectan metástasis a distancia. • O Metástasis en ganglios peribronquiales y/o hilares ipsolaterales, incluida la extensión directa. Metástasis en los ganglios mediastínicos ipsolaterales y/o subcarinales. Con metástasis en los ganglios mediastínicos contralaterales, hilares contralaterales, escalénicos o supraclaviculares (ipsolaterales o contralaterales). No se detectan metástasis a distancia.
IV	Cualquier característica de las antes mencionadas. Metástasis a distancia. Incluye nódulo tumoral en otro lóbulo, diferente del tumor primario.

ESQUEMAS TERAPÉUTICOS

Para cáncer de pulmón en estadios I, II y IIIA se recomienda intervención quirúrgica como tratamiento estándar, para carcinoma de células pequeñas en el caso de enfermedad extendida la terapia que se recomienda como opción de consenso es la quimioterapia paliativa; en el caso de carcinoma de células no pequeñas los pacientes en estadio I en los pacientes inoperables debe considerarse tratamiento con radioterapia radical y en caso de enfermedad extendida las combinaciones de fármacos sugeridas son cisplatino o carboplatino y etopósido. El cáncer de pulmón de células no pequeñas es el más común, las terapias que se aplican de acuerdo a las etapas se muestra en la tabla 3⁴.

Tabla 4. Esquemas de tratamiento de acuerdo a estadio en cáncer de pulmón.

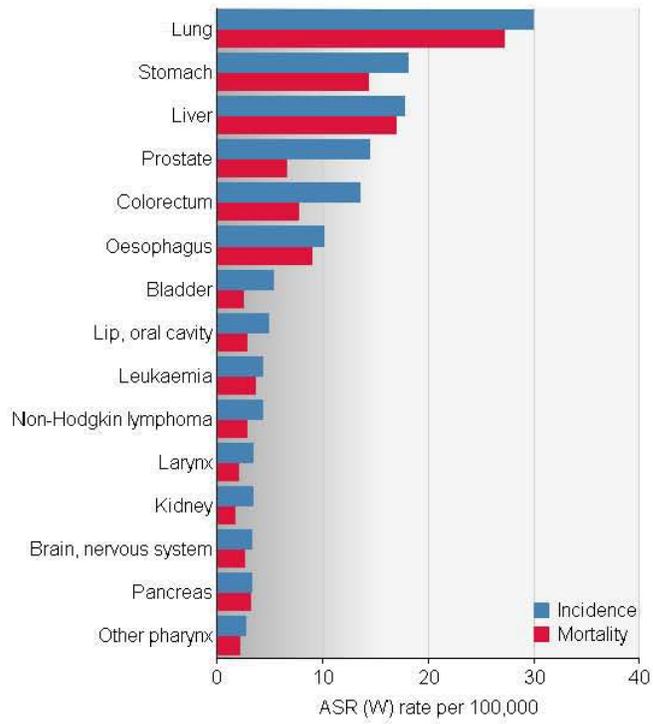
Etapas	Tratamiento
I	En pacientes inoperables debe considerarse radioterapia radical.
II	El tratamiento posquirúrgico con quimioterapia basada en cisplatino debe considerarse en aquellos casos que presenten una buena situación funcional.
III	En pacientes operables: quimioterapia prequirúrgica y la quimioterapia-radioterapia prequirúrgica con valoración post-quirúrgica. En pacientes no operables, la combinación de quimioterapia y radioterapia radical
IV	En pacientes en estadio IV, con estado funcional 0 y 1, se recomienda la quimioterapia.

* La quimioterapia debe incluir cisplatino (o carboplatino como segunda elección) en combinación con otro fármaco activo: vinorelbina, gemcitabina, paclitaxel y docetaxel.

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en hombres; mientras que en mujeres el cáncer de cérvix ocupa el segundo lugar después del de mama en México.⁸

A.



B.

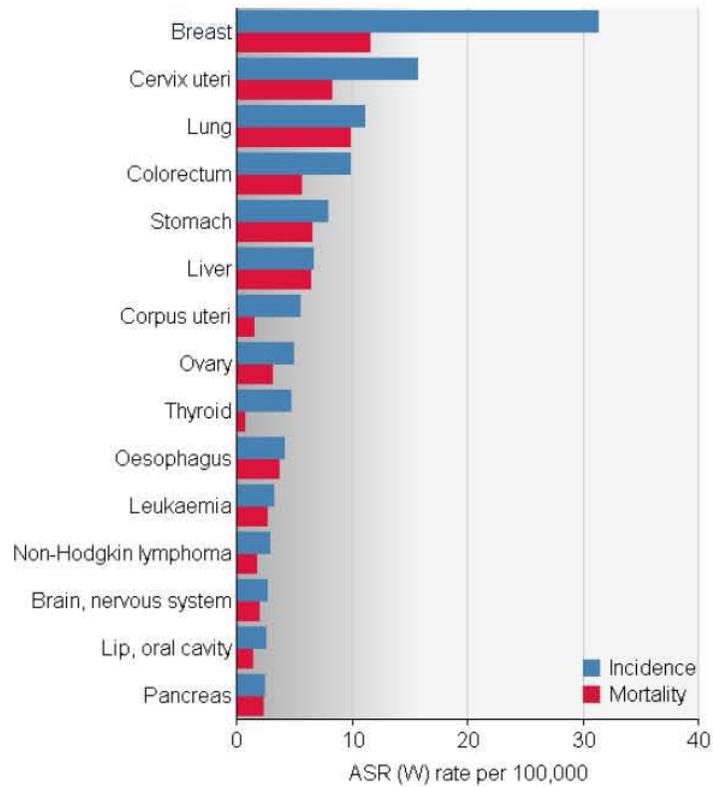


Figura 1. Incidencia y mortalidad en países en vías de desarrollo. Tasa de incidencia y mortalidad por cada 100,000 habitantes por año a nivel mundial en países en vías de desarrollo en hombres (A) y mujeres (B). Tomado de GLOBOCAN 2012, <http://globocan.iarc.fr/> (Consultado en Junio de 2015).

2.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL CISPLATINO.

El cisplatino (*cis*-diaminodicloroplatino) se activa mediante una serie de reacciones acuosas en las que se reemplazan los enlaces cloro-*cis* con moléculas de agua, la molécula hidratada es altamente reactiva, sin embargo cuando el cisplatino entra a las células es potencialmente vulnerable a la inactivación citoplasmática con muchos nucleófilos endógenos como glutatión (GSH), la metionina, la metalotioneína, y proteínas⁹. La citotoxicidad del cisplatino se atribuye principalmente a su interacción con sitios N7-nucleofílicos de las purinas en el ADN para formar entrecruzamientos intercatenarios DNA-proteína, DNA-DNA (entre cadenas) e intracatenarios¹⁰. Los mecanismos de citotoxicidad de cisplatino se resumen en la Figura 2.

2.3.1. Aduetos y reconocimiento de daño en el DNA.

En su mayoría los entrecruzamientos intracatenarios en el DNA son ApG y GpG. Existen cerca de veinte proteínas que pueden reconocer aduetos en el DNA, ejemplo de estas proteínas son hMSH2 y MutS que forman parte del complejo de reparación de mismatch, por otro lado las proteínas de reconocimiento de daño al DNA activan vías que permiten la apoptosis¹¹, otro mecanismo es que los aduetos en el DNA secuestran proteínas involucradas en la transcripción como: hUBF y TBP¹².

2.3.2. Activación de puntos de control en el ciclo celular.

El daño al DNA producido por el cisplatino activa diversas vías entre las que se encuentran la activación de los puntos de control dentro del ciclo celular, los cuales inducen temporalmente el arresto en la fase S, seguido de la inhibición de la quinasa dependiente de ciclina 1 A o B para afectar una detención duradera en la fase G2/M¹². Una vez que hay daño al DNA es necesaria la activación de mecanismo de reparación para la escisión de nucleótidos (NER), para remover los aductos y promover la sobrevivencia celular, de lo contrario, la célula sufrirá apoptosis¹³. Este proceso está íntimamente ligado con la molécula p53.2.3.1.4.

2.3.3. Activación de P53 y MAPK.

Para que se lleve a cabo la activación de p53, es necesario que se activen las quinasas involucradas en la activación del punto de control, llamadas ATM (ataxia telangiectasia mutada) y ATR (proteína ATM y Rad3), generalmente con el cisplatino se activa la quinasa ATR, la cual fosforila a p53 en la serina-15 para activar la proteína¹⁴, ATR también media la fosforilación de p53 por otras proteínas, por ejemplo CHK1 fosforila a p53 en la serina-20¹⁵. Se ha reportado que los tres miembros de las MAPK se activan después de la exposición a cisplatino y se ha sugerido que la activación de ERK es crítica para inducir la apoptosis. Sin embargo en otros reportes se observa que la activación de ERK y JNK por la exposición a cisplatino antagoniza la apoptosis, se ha propuesto que ambos efectos son posibles dependiendo del contexto celular y de la extensión del daño al DNA¹⁶.

2.3.4. Inducción de apoptosis.

La apoptosis se induce cuando el daño al DNA excede el límite y no puede ser reparado, se inicia el proceso de apoptosis, este proceso comienza con la translocación de la proteína pro-apoptótica Bax del citosol a la mitocondria inducida por el cisplatino, donde se activa la vía de caspasa 9- caspasa 3. Para que la apoptosis ocurra Bax debe incrementar en relación a su contraparte Bcl-2 (proteína anti-apoptótica)¹⁶.

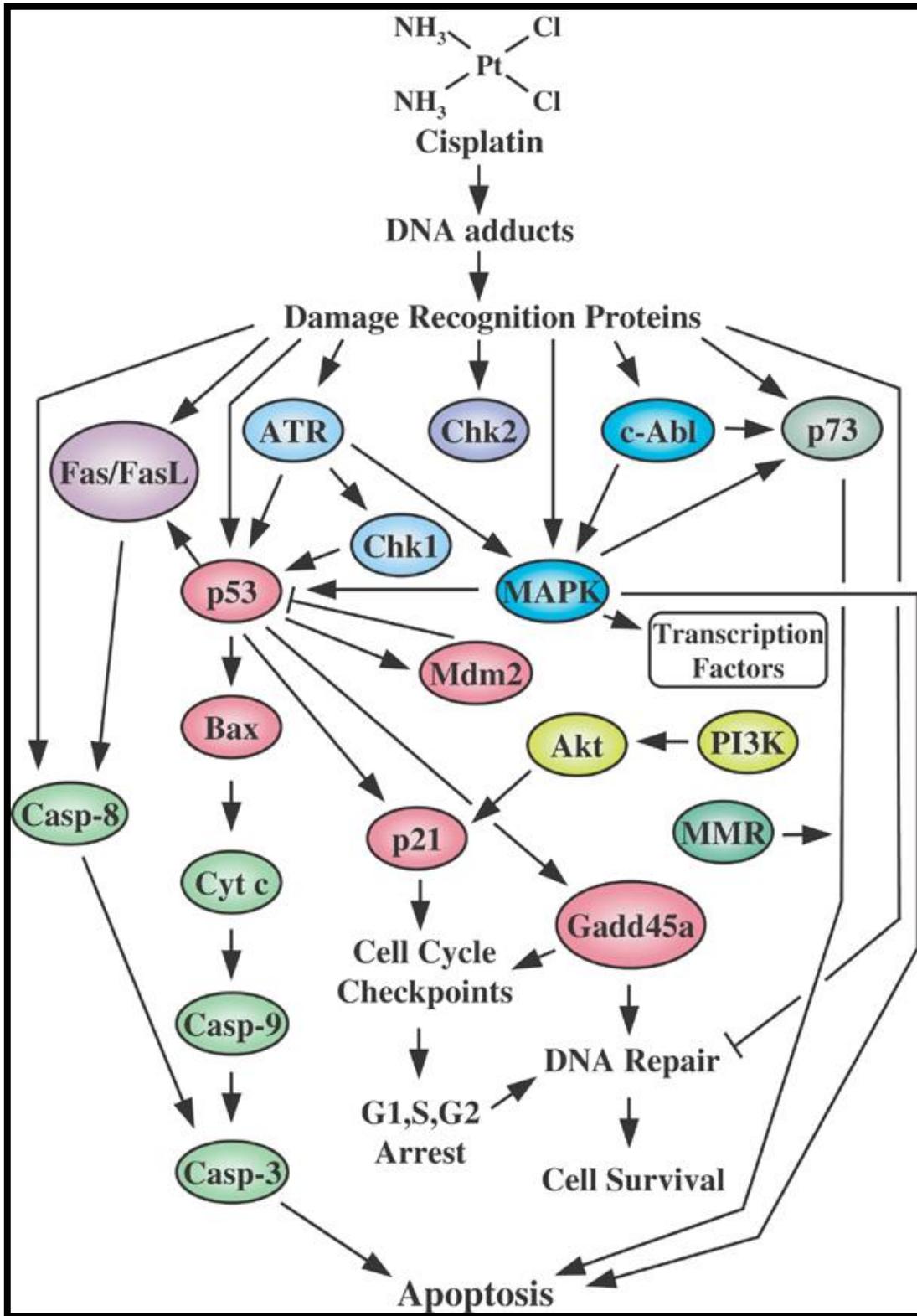


Figura 2. Vías involucradas en la citotoxicidad de Cisplatino. Tomada de Siddik, Z. H. et al., 2003.

2.4. HETEROGENEIDAD TUMORAL

Se han propuesto diez “hallmarks” que son capacidades distintivas del cáncer que permiten el crecimiento, tumoral y diseminación metastásica, entre las que se encuentran: la proliferación sostenida, desregulación energética, evasión de supresores de crecimiento, evasión de la respuesta inmune, inmortalidad replicativa, inflamación, activación de invasión y metástasis, angiogénesis, inestabilidad genómica y evasión de la muerte celular. Los tratamientos dirigidos se pueden clasificar de acuerdo a sus efectos en las capacidades “hallmarks” (Figura 3A), sin embargo la respuesta clínica es generalmente transitoria siendo seguida por la recurrencia, se ha observado que en respuesta a la terapia las células de cáncer utilizan distintos mecanismos para seguir teniendo capacidades “hallmark” particulares¹⁷, lo cual responde a la existencia de la heterogeneidad tumoral, y en ese sentido la quimioterapia actúa como una presión selectiva favoreciendo las clonas resistentes. A partir de estas observaciones, se han propuesto dos modelos que podrían estar participando en la resistencia a terapia, el modelo estocástico y el modelo jerárquico (Ver Figura 3B y C).

En el modelo estocástico poblaciones celulares que conforman el tumor tienen la capacidad de modular o adaptar su resistencia o bien responder con base en su resistencia intrínseca (Figura 3B), mientras que en el modelo jerárquico apoya la hipótesis donde una pequeña subpoblación celular con características tipo troncales (Figura 3C), se caracterizan por su habilidad para formar tumores, auto-renovarse, así como mayor capacidad proliferativa, además pueden dar origen a tumores con alta potencial invasor y metastásico; así mismo se han asociado con la resistencia a terapia en diversos tumores¹⁸

A.

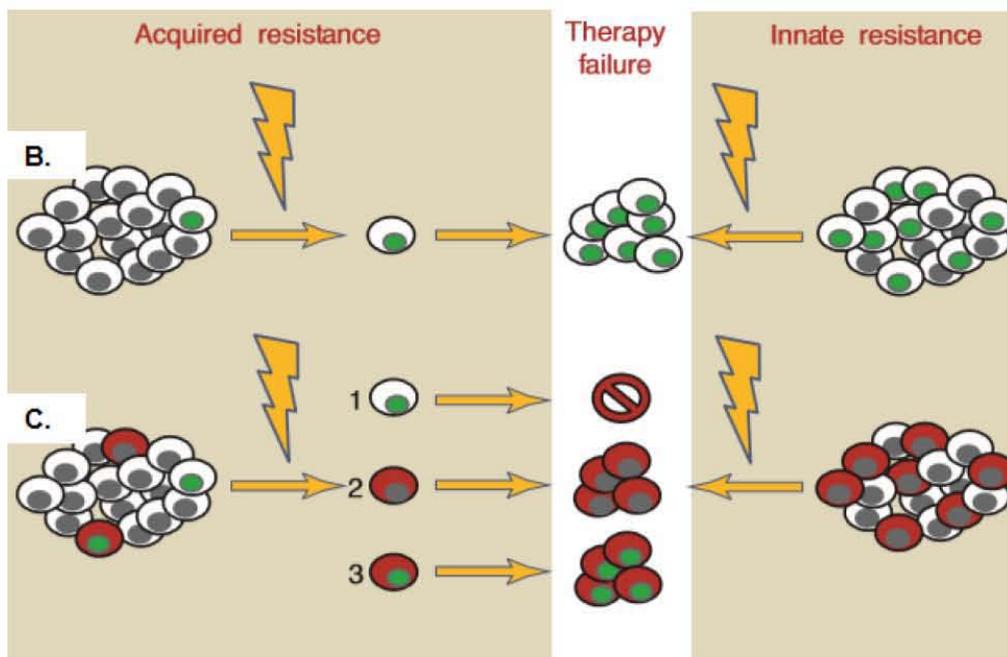
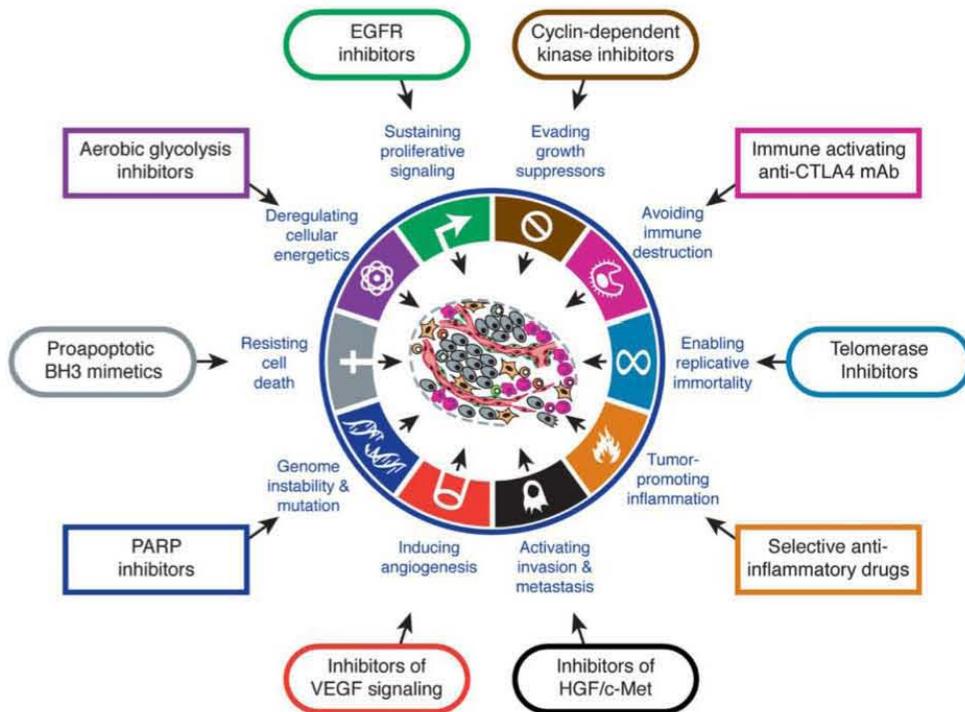


Figura 3. Hallmarks of cáncer y modelos de quimioresistencia. A) Hallmarks del cáncer y esquemas de terapias blanco asociadas capacidades a hallmarks del cáncer. Tomado y

adaptado de Hanahan, D., y Weinberg, R. A. 2011. B) Modelo estocástico en la resistencia a terapia. C) Modelo jerárquico en resistencia a terapia. Tomado y adaptado de Crea, F., et al., 2011.

3. ANTECEDENTES

3.1 QUIMIORRESISTENCIA

Aun con los avances en los tratamientos para el cáncer, la quimioterapia continua siendo un componente importante del tratamiento para el cáncer, sin embargo la resistencia del tumor a quimioterapéuticos es común y en cáncer metastásico el 90% de las veces la terapia falla¹⁹. En pacientes con cáncer de cérvix en etapas tempranas después del tratamiento quirúrgico se obtiene una curación del 99% al 100%, mientras que para las pacientes en etapa IA y IB la recurrencia es del 10% a 25 % y en el 64% de los casos se presentan en los primeros dos años. El tratamiento establecido para las etapas localmente avanzadas (IB2 - IIA2 – IVA) es la quimio-radioterapia concomitante, siendo el cisplatino el agente radio-sensibilizador más utilizado, el tratamiento concomitante de cisplatino y radioterapia presenta mejores resultados tanto en control de la enfermedad con una reducción del riesgo de recurrencia entre el 30 y 50% en comparación con radio-terapia únicamente³. Esta información sugiere que dentro de los factores de recurrencia podrían participar los mecanismos de resistencia molecular a cisplatino.

En el caso del cáncer de pulmón el porcentaje de sobre vida a 5 años en pacientes en etapa I es del 75%, en etapa II es del 35%, en etapa III es del 15% y en etapa IV es menor al 5%.²⁰

3. 1. 2. MECANISMOS DE QUIMIORRESISTENCIA FRENTE A CISPLATINO.

El cis-Diamminodicloroplatino (II) (cisplatino o cis-DDP) es un agente quimioterapéutico ampliamente utilizado exhibe una actividad antitumoral significativa contra distintos tipos de cáncer entre los que se encuentran el cáncer de cérvix y cáncer de pulmón, sin embargo la principal limitación en el uso del cisplatino contra el cáncer es la alta incidencia en la quimiorresistencia.²¹

Existen diversos mecanismos asociados a la resistencia a terapia, algunas de las moléculas involucradas en la quimiorresistencia, son marcadores del inmunofenotipo troncal del cáncer, lo cual concuerda con el modelo jerárquico²².

En cancer de cérvix, entre los marcadores de troncalidad asociados a la quimiorresistencia identificados hasta el momento destacan: ALDH1, SOX2, Bcrp1, CD133, CD44, CD49f, CK17, Oct4²³

Mientras que los marcadores de troncalidad asociados a quimiorresistencia reportados en cáncer de pulmón destacan: ABCG2, CD133, CD44, ALDH, SOX2 y Oct4²⁴.

Al respecto ABCG2 es un gen localizado en el locus 4q22, que a diferencia de otros transportadores ABC que usualmente se expresan en la membranas celulares, ABCG2 se localiza predominantemente en la membrana plasmática²⁵.

Los mecanismos de regulación molecular de ABCG2 permanecen no del todo descritos, sin embargo se han identificado elementos de respuesta a estrógenos en el promotor de ABCG2, otras hormonas que también estimulan la expresión de ABCG2 son la progesterona y la prolactina ²⁶ABCG2 es uno de los transportadores más importantes en la resistencia a múltiples fármacos y muchos de los sustratos de ABCG2 son fármacos comúnmente utilizados en la terapia para el cáncer²⁷

La proteína Oct4 u Oct3/4 también conocida como Pou5f1 es un factor de transcripción se ha encontrado en ovocitos, en embriones de ratón preimplantados, en el ectodermo de la gástrula (pero no en otras capas germinales) y células germinales primordiales, así como en las células madre embrionarias pero no en sus hijas diferenciadas, se ha sugerido que es un gen requerido para la totipotencialidad. En cáncer se ha observado la expresión de Oct4 en algunas células, pero no en tejido normal²⁸. En quimiorresistencia se ha sugerido que Oct4 regula positivamente a TCL1 que consecuentemente deriva en la activación de AKT y de esta manera tener un efecto anti-apoptótico, una vía alterna es la de Oct4-TCL1-AKT-ABCG2, lo cual también resultaría en el incremento de la quimiorresistencia⁷⁷.

La glicoproteína CD44 que tiene actividad de receptor “homing” de leucocitos, tiene distintas variantes, actúa como un factor de remodelación de tejido regulando la adhesión de la matriz extracelular de célula a célula y la migración celular. Este antígeno se ha utilizado como marcador de células troncales del cáncer, en cáncer de mama, ovario, colon, páncreas y cabeza y cuello²⁴.

El papel de CD44 en resistencia a terapia no ha sido del todo descrita sin embargo se ha establecido el mecanismo mediante el cual CD44 participa en la resistencia a tratamiento mediante la regulación positiva de MDR1²⁹, en otros reportes se ha asociado a la quimiorresistencia mediante la regulación de positiva de Bcl-xL³⁰.

ALDH pertenece a la superfamilia de proteínas que comprende un grupo de enzimas que metaboliza una gran variedad de aldehídos endógenos y exógenos se ha detectado su expresión de células troncales normales y de cáncer en mama y colon²⁴. El retinol y sus derivados juegan un papel importante en el crecimiento, diferenciación y apoptosis celular, son utilizados en distintos tratamientos, también es utilizado para mejorar la respuesta a la quimioterapia, el retinol es oxidado por la ALDH en un proceso irreversible⁸¹.

3.2. RNAs NO CODIFICANTES

Los RNAs no codificantes son RNAs que son transcritos, pero no se traducen a una proteína, sin embargo, regulan expresión de otros genes. Los RNAs no codificantes se dividen en dos grandes grupos: RNAs no codificantes pequeños y RNAs no codificantes largos.

3. 2.1. RNAs no codificantes pequeños.

Los RNAs no codificantes pequeños, son RNAs menores a 200 nucleótidos. Muchos de los RNAs no codificantes pequeños se asocian a proteínas para formar complejos ribo-nucleoproteicos, los cuales se clasifican en distintos tipos de acuerdo a su función:^{31,32}, entre ellos:

- miRNAs (microRNA's): Son RNAs de cadena sencilla que se doblan para formar un RNA de doble cadena y después de ser procesados se unen al complejo RISC para regular la traducción mediante el mRNA.
- siRNA (snmRNA): Son RNAs que regulan a genes específicos mediante una secuencia complementaria, esta regulación es postranscripcional.
- PiRNAs: Interactúan con las proteínas PIWI para la regulación de la cromatina y el silenciamiento de transposones. Los Scan RNAs son un tipo de piRNAs.
- snRNAs: incluyen RNAs del spliceosoma,
- snoRNAs: Están involucrados en la modificación de RNA ribosomal
- StRNA: RNA pequeño temporal por ejemplo: lin-4 y let-7 *Caenorhabditis elegans*.

3.2.1.1. miRNAs en cáncer y quimiorresistencia.

Al respecto, recientemente diversos miRNAs han sido identificados asociados a eventos de quimiorresistencia frente a diversos esquemas fármaco-oncológicos.

Entre ellos, la expresión de mir-125b involucrado como marcador predictivo de quimiorresistencia en cáncer de mama³³, mir-298 asociado con resistencia al tratamiento por doxorubicina (Adriamicina) en cáncer de mama³⁴; mientras que mir-221 en pacientes con cáncer de mama, bajo esquemas de quimioterapia adyuvante³⁵.

En contraste, otros miRNAs se han reportado asociados con reversión de quimiorresistencia frente al tratamiento por taxoles (Docetaxel), tales como mir-100b y mir-200b, entre otro tipo de tumores de origen epitelial, como en adenocarcinomas pulmonares^{36,37}. Así como mir-22 en líneas celulares de cáncer de colon y recto³⁸.

3. 2. 2. RNAs no codificantes largos (lncRNA).

3.2.2.1 Características de lncRNAs.

Los RNAs no codificantes largos (lncRNAs) son aquellos mayores a 200 nucleótidos. Esta clase de RNAs incluye ncRNAs intergénicos, pseudogenes y muchos RNAs antisentido, la mayoría de los lncRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II, sufren la adición de la CAP en el extremo 5', sufren splicing y están poliadenilados como los mRNAs³⁹, sólo una minoría de este grupo es transcrita por la RNA polimerasa III⁴⁰.

Algunos de los criterios utilizados para diferenciar entre los lncRNAs y mRNAs son la longitud del marco de lectura abierto. El consorcio FANTOM utiliza un punto de corte de 300 ntds para ayudar a identificar mRNAs, sin embargo, hay algunos lncRNAs que se han confundido con RNAs codificantes, como Xist que tiene un marco de lectura abierto de 298 nucleótidos, por otra parte con un punto de corte de 300 ntds⁴¹, las proteínas menores a 100 amino ácidos en tamaño podrían ser clasificados como ncRNAs de manera incorrecta⁴². Otro criterio utilizado para diferenciar a los lncRNAs de los mRNAs es si el marco de lectura abierta es conservado, esta es una característica de mRNAs.⁴³

En la actualidad existen diversas herramientas para evaluar el potencial codificante de un transcrito que toman en cuenta tanto la longitud del marco de lectura abierto como el hecho de que este conservado⁴⁴.

Se han asociado con funciones regulatorias tanto de genes codificantes como de otros no codificantes. Recientemente se han descrito 111, 685 lncRNAs de 23,000 que se estima existen y sólo el 9% (9,625 lncRNAs) ha sido caracterizado⁴⁵.

Los lncRNAs tienen funciones a nivel transcripcional y postranscripcional. Algunas de sus funciones postranscripcionales son las siguientes:

Las funciones transcripcionales de los lncRNAs se clasifican en cuatro arquetipos: *señalización, guía, señuelo y andamiaje*.

Señalización. En este arquetipo el lncRNA funciona como señal en diversos procesos biológicos⁴⁶.

Un ejemplo de este arquetipo es *Xist*, la transcripción de este lncRNA sirve de señal para la inactivación de algunas regiones del uno de los cromosomas X en las

hembras, *Xist* es activado por una proteína llamada *Jpx*, mientras que en el cromosoma X que permanecerá activo *Xist* es inhibido por otro lncRNA llamado *Tsix*⁴⁷.

Guía. En este arquetipo el lncRNA funciona reclutando remodeladores de la cromatina hacia un locus específico, esta función puede ser en *cis* o en *trans*⁴⁶.

Un ejemplo de lncRNA que tiene la función de guía en *cis* es HOTTIP, es un RNA que se transcribe en el extremo 5' del locus HOXA, se une al complejo WDR5/MLL promoviendo la marca de histonas H3K4me3 y la transcripción en el locus HOXA (Ver Figura 4)⁴⁸.

Señuelo. Esta función se lleva a cabo cuando un lncRNA se une a la proteína blanco y de esta manera evita que dicha proteína realice su función⁴⁶.

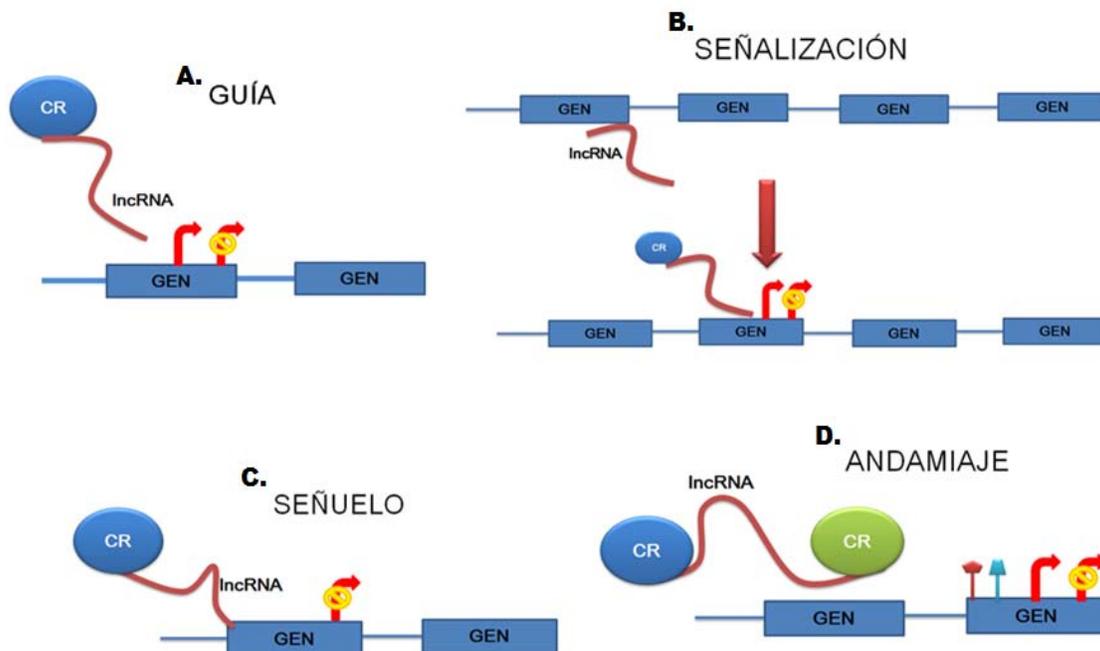
El lncRNA *PANDA* tiene la función de señuelo, este lncRNA es inducido de manera dependiente de *p53*, *PANDA* se expresa en respuesta a daño a DNA e interactúa con el factor en *NF- κ B* para limitar la expresión de genes pro-apoptóticos, la delección de *PANDA* en fibroblastos humanos ocasiona que los fibroblastos sean más sensibles a apoptosis después de ser expuestos a doxorubicina⁴⁹.

Andamiaje. En este arquetipo el lncRNA sirve de puente entre dos distintos complejos remodeladores de la cromatina, para establecer distintas marcas de histonas en un locus⁴⁶.

HOTAIR es un lncRNA que tiene la función de andamiaje, este lncRNA se une a dos distintos complejos remodeladores de la cromatina, en el extremo 5' se une a PRC2, mientras que en el extremo 3' se une al complejo LSD1/CoREST/REST, proporcionando superficies de unión para ensamblar las enzimas que modificaran las histonas, en este caso ambos complejos remodeladores establecen marcas de histonas de represión, el complejo PRC2 promueve la marca H3K27me3 y el complejo LSD1/CoREST/REST que promueve la desmetilación de la marca H3K4me2⁷².

La regulación postranscripcional mediada por lncRNAs se resume en la figura 4E) y puede ser de la siguiente manera⁵⁰:

1. Regulación de del splicing alternativo, un ejemplo de este tipo de regulación es MALAT1, ya que influencia la distribución de proteínas SR.
2. Protegiendo el mRNAs. El lncRNA se hibrida con el mRNA y previene el decaimiento del mensajero.
3. Decaimiento para mRNAs. Se promueve el decaimiento del mensajero mediante, la unión del lncRNA a la proteína STAU1.
4. Represión de la traducción. Reprime la traducción mediante la unión complementaria del lncRNA al mRNA y el reclutamiento de los represores traduccionales Rck and Fmrp.
5. Activación de la traducción. El lncRNA se une al mensajero y ayuda a reclutar ribosomas.
6. RNAs esponja: el lncRNA se une a la secuencia semilla del miRNA blanco y evita que realice su función.



E.

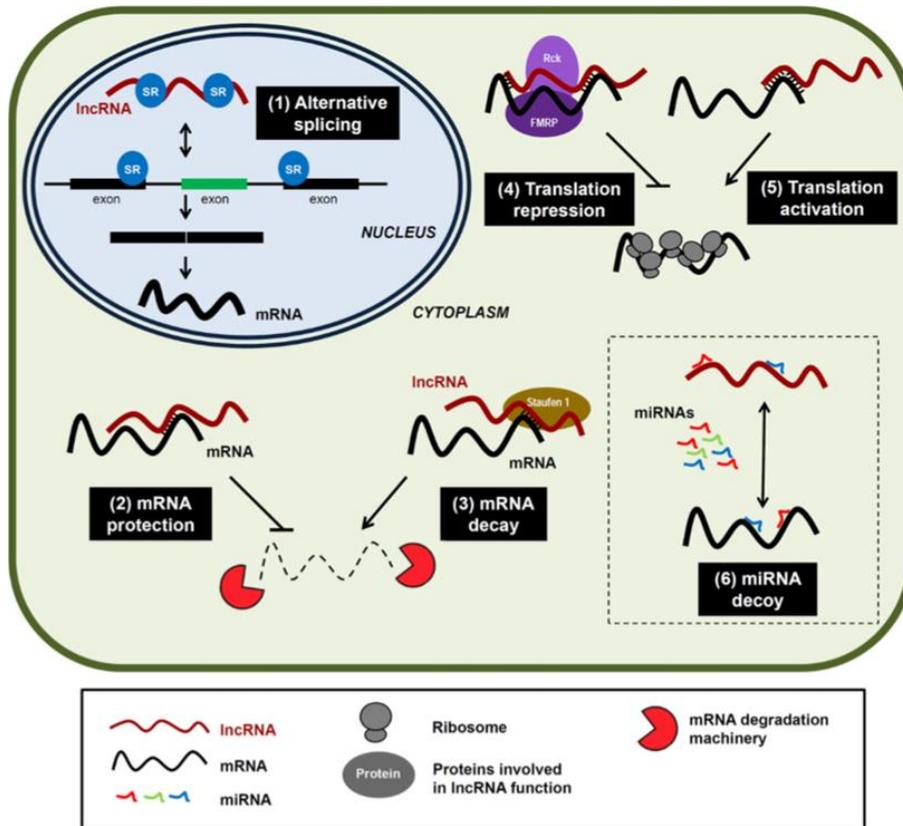


Figura 4. Arquetipos funcionales de lncRNAs y regulación postranscripcional. A) Arquetipo de guía. B) Arquetipo de señalización. C) Arquetipo de señuelo. D) Arquetipo de andamiaje. E) regulación postranscripcional mediada por lncRNAs (Inciso E tomado de Yoon, J. H., et, al., 2013).

3.2.2.1. lncRNAs asociados a cáncer

Los lncRNAs han sido asociados diversos procesos biológicos, entre los cuales se encuentra el cáncer.

Se ha descrito el perfil *in silico* del transcriptoma de lncRNA en cáncer, con base en el análisis de 272 librerías de SAGE (Serial Analysis Genome Expression), registrando 2,649 lncRNA de los cuales se identificaron patrones de expresión aberrante en diversos tipos de cáncer, entre ellos: pulmón, mama y cerebro; destacando: *AC058791.1*, *CTA-55110.1*, *NCRNA00263*, *AC080037.2*, *AC012652.1*, *RP11-18C24.6*, *RP11-238K6.1*, y *SNHG1*; así como otros previamente reportados como *MALAT*; *NEAT1*, *HOTAIR* y *H19*⁵¹.

En 2011 se analizó in silico la expresión de lncRNAs de datos obtenidos a partir de 274 librerías de SAGE en 26 tejidos comparando cáncer *versus* tejidos normales, encontrando alterada la expresión de diversos lncRNAs en cáncer¹⁴.

En el caso de cérvix se ha descrito el perfil de expresión de lncRNAs en tejidos con distintos grados de neoplasias y tejidos normales, se construyeron cuatro librerías para evaluar el perfil de expresión de los tejidos no neoplásicos, tres para tejidos con neoplasia intraepitelial cervical grado 1 (CIN1), tres para las neoplasias intraepiteliales cervicales grado 2 (CIN2) y seis para grado 3 (CIN3), llegando a un consenso de trece lncRNAs diferencialmente expresados en los tres distintos grados de neoplasias *versus* normales, la mayoría de los lncRNAs reportados como diferencialmente expresados aún no habían sido descritos, sin embargo los lncRNAs descritos reportados son: MIAT, WWTR1, RUSC1 y PVT1⁵².

3. 2.2.2. LncRNAs en resistencia a tratamiento oncológico

Uno de los primeros lncRNAs reportados en resistencia a fármacos es H19, el cual se reportó en resistencia a doxorubicina en cáncer hepatocelular ello mediante la regulación positiva de MDR1. Mientras que *CUDR (UCA 1)* es otro lncRNA reportado en quimiorresistencia, el cual ha sido descrito sobreexpresado en cáncer de vejiga, además se ha reportado su participación en la resistencia a doxorubicina⁵³ y cisplatino esta última mediante la regulación a la alta de Wnt6. Recientemente se reportó la regulación a la baja de p21 mediada por HOTAIR en resistencia a cisplatino en NSCLC⁵⁴, esta asociación entre p21 y HOTAIR se ha reportado asociada a radio-resistencia en cáncer de cérvix⁵⁵.

4. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón y cáncer de cérvix ocupan los primeros lugares en incidencia y mortalidad en países en vías de desarrollo, así como en países desarrollados a nivel mundial. A pesar de los avances en el tratamiento oncológico con respuesta adecuada en etapas iniciales del tratamiento en los pacientes, uno de los principales obstáculos resulta en la persistencia del fenómeno de resistencia a fármacos oncológicos. Al respecto, uno de los probables elementos involucrados se encuentran representados por mecanismos de regulación epigenética, recientemente abordado por la participación de algunos lncRNAs durante el fenómeno de quimiorresistencia, por lo que, nuestro grupo de investigación enfocado al estudio de mecanismos epigenéticos en cáncer y resistencia al tratamiento, se ha propuesto necesario el estudio e identificación de lncRNAs en este proceso de resistencia al tratamiento fármaco-oncológico, para su posible explotación científica en la oncología epitelial.

5. HIPÓTESIS

Alteraciones epigenéticas representadas por lncRNAs en modelos celulares de cáncer pulmonar y cáncer de cérvix ocurren como resultado del reto farmacológico continuo a cisplatino, el estudio de un perfil de lncRNAs en el proceso de quimiorresistencia inducible a largo plazo en modelos celulares in vitro permitirá determinar la participación de un patrón de lncRNAs involucrado en los mecanismos de quimiorresistencia del cáncer pulmonar y cáncer de cérvix.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar alteraciones en la expresión de un perfil de lncRNAs, durante el fenómeno de quimiorresistencia inducible a largo plazo en modelos celulares *in vitro* derivados de tumores de origen epitelial.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Seleccionar lncRNAs de acuerdo a lo reportado en la literatura.
2. Establecer modelos de quimiorresistencia *in vitro* basado en cisplatino en líneas celulares de carcinomas pulmonares y cervicouterino.
3. Analizar el inmuno-fenotipo quimiorresistente tipo troncal de modelos celulares.
4. Identificar cambios en el perfil de expresión de lncRNAs candidatos de manera comparativa entre modelos celulares quimiorresistentes versus parentales.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Selección de lncRNAs in silico

Para la selección de los lncRNAs se establecieron tres criterios: el primero consistió en consultar la literatura sobre lncRNAs desregulados en cáncer, el segundo criterio consistió en consultar los reportes que existentes de lncRNA 's en quimiorresistencia y como último criterio, se tomó en cuenta las funciones reportadas para dichos lncRNAs.

7.2. Cultivos celulares in vitro

Las líneas celulares de cérvix (HeLa, Caski) y de pulmón (A549 y A427) fueron adquiridas en la ATCC (American Type Culture Collection). Las líneas de cérvix fueron expuestas a tres distintas concentraciones de Cisplatino (1µM, 1.5 µM y 2 µM), mientras que las de pulmón fueron expuestas a sólo a una concentración de Cisplatino (5 µM). Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco, BRL, Grand Island NY) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y de gentamicina en una atmósfera a 5% de CO₂ con humedad a 37°C.

7.3. Ensayos de quimiorresistencia inducida a largo plazo in vitro

Las concentraciones del fármaco se establecieron tomando en cuenta la morfología observada al microscopio, la confluencia celular y la proliferación mediante el conteo celular, en base a estos criterios fue que se determinó las concentraciones finales a las cuales fueron expuestas las células a cisplatino.

Las líneas celulares de cáncer de cérvix (HeLa y CaSki) fueron expuestas a una concentración inicial de 1µM de cisplatino y posteriormente se aisló una fracción del cultivo para exponerla a 1.5µM de cisplatino, mientras que para las líneas celulares de pulmón (A427 y A549) la concentración inicial fue de 1.5µM de cisplatino, posteriormente tomando en cuenta los criterios de estabilidad antes mencionados, se escalaron las concentraciones hasta llegar a una concentración máxima de 5µM.

7.4. Ensayos de viabilidad celular para determinar quimiorresistencia por Método de MTS in vitro.

Las células fueron sembradas en platos de 96 pozos (3×10^3 células por pozo) por triplicado, a las 24hrs se expusieron a un reto farmacológico con distintas concentraciones de cisplatino ($0\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $17\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$, $53\mu\text{M}$, $95\mu\text{M}$ y $169\mu\text{M}$, a las 48 horas se agregaron $20\mu\text{l}$ de la solución MTS (sigma, MO, USA) y después de un periodo de 1- 4 horas se leyó la absorbancia a 490nm en cada pozo utilizando un espectrofotómetro (EPOCH) para poder evaluar la viabilidad celular y obtener la IC50.

7.5. Extracción de ácidos nucleicos.

El RNA total de las líneas celulares fue extraído utilizando TRIZOL (Invitrogen, USA) y RNeasy Plus Universal mini kit (QIAGEN).

7.6. Análisis de expresión génica mediante ensayos por RT-qPCR

Para los ensayos de RT-qPCR, el RNA se retrotranscribió a cDNA a partir de $1\mu\text{g}$ de RNA total con el kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosy tipo troncal). El análisis de RT-qPCR realizado utilizando Light Cycler480 Probes Master y sondas UPL (ROCHE), todos los protocolos fueron realizados siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ver las condiciones y las secuencias de los oligos utilizados para analizar la expresión de los distintos lncRNAs ver Tabla suplementaria 1 y 2.

7.7. Análisis de expresión de proteína mediante ensayos por inmunocitoquímica.

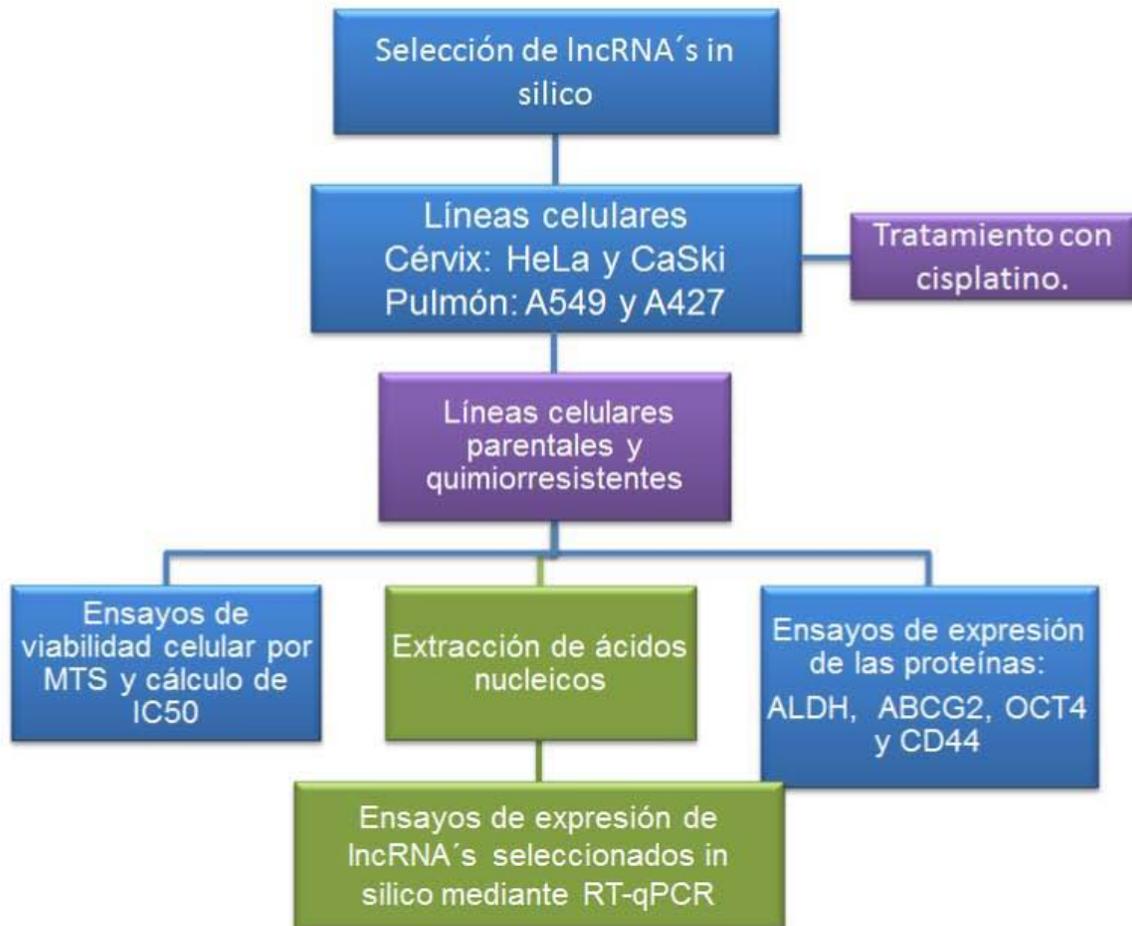
Se realizaron arreglos con las líneas celulares (parentales y tratadas) de cérvix y de pulmón y se realizó inmunocitoquímica para evaluar marcadores (CD133, ABCG2, CD44, ALDH) asociados a células tipo troncal del cáncer. Se realizó inmunocitoquímica, con las siguientes especificaciones: Titulación del cuerpo 32 minutos, contraste: hematoxilina 4min, post contraste: bluing. El análisis de las imágenes se realizó con el programa de Image J mediante los pluggins de immunoratio e immunomembrane, mediante los cuales se evalúa el número de células teñidas con diaminobencidina en un total de cinco campos por cada marcador.

Las proteínas ABCG2, y CD44 se evaluaron con la herramienta “pluggin” inmunomembrana, el análisis le otorga un valor arbitrario a la expresión de proteína, tomando en cuenta el número de membranas positivas e intensidad de la expresión. La expresión de CD44 en las líneas celulares de pulmón se analizó mediante la herramienta inmunomembrana para obtener un análisis representativo. Mientras que las proteínas ALDH y Oct4 se evaluó con el programa immunoratio, el cual otorga un porcentaje a la expresión de acuerdo al número de células positivas.

7.8. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 6.0. Los datos fueron analizados mediante pruebas de t y ANOVA de una vía. Los valores de $P \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



9. RESULTADOS

9.1. Selección de lncRNAs

Con el objetivo de seleccionar lncRNAs involucrados en cáncer y potencialmente en mecanismos de quimiorresistencia, se llevó a cabo un análisis bibliográfico asociado con alteraciones en perfiles de expresión de lncRNAs en diferentes neoplasias de origen epitelial, entre ellas cáncer de cérvix y cáncer pulmonar, así mismo se llevó a cabo análisis in silico y bioinformático para la identificación de secuencias para transcritos de lncRNAs. Para ello, con base en los arquetipos funcionales descritos a la fecha para lncRNAs fueron tomados en cuenta aquellos lncRNAs cuyo mecanismo funcional (guía y/o andamiaje) que pudiera estar involucrado en conducir patrones de expresión genética durante la progresión oncológica y/o quimiorresistencia a fármacos de tratamiento de primera línea como cisplatino.

Al respecto, el primer criterio a evaluar consistió en analizar perfiles y niveles de expresión de lncRNAs reportados en diferentes cohortes de pacientes y/o modelos celulares in vitro de cáncer de origen epitelial, para ello fueron consultados diferentes reportes, entre ellos los datos depositados del perfil de expresión del transcriptoma sobre diferentes tipos de cáncer mediante la técnica de SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), a través del cual Gibb y cols., en 2011 demostraron la expresión diferencial de miles de transcritos destacando la sobre-expresión de los siguientes lncRNAs: MALAT1, H19, NEAT1, SNHG1, etc., sobre tejidos de 19 tipos de cáncer, en contraste con tejido epitelial histológicamente normal¹⁸. Adicionalmente, Gibb, y cols., en 2012 demostraron el nivel de expresión de lncRNA en neoplasias intraepiteliales cervicales (CIN, por sus siglas en inglés). Al respecto demostraron la presencia de un perfil de expresión diferencial de lncRNAs a lo largo de la progresión histopatológica de CaCu, destacando trece lncRNAs con mayor significancia estadística (tasa de falso descubrimiento Benjamini-Hochberg corregida $P < 0,05$ y 2 veces o más la expresión diferencial entre normal y CIN) en términos de su expresión en los distintos grados de CIN, con respecto a tejidos epiteliales histológicamente normales¹⁹ (Tabla 5).

Basado en lo anterior y en nuestra búsqueda informática fue seleccionado NEAT1 el cual representa un lncRNA de 22.7kb, el cual se ha descrito asociado al arquetipo funcional de andamiaje para la formación de los cuerpos subnucleares paraspeckle, los cuales están involucrados en la regulación de la expresión génica mediante la retención nuclear de RNA y regulando la tasa transcripcional o dirigiendo el splicing⁵⁶. Así mismo, NEAT1 ha sido previamente reportado sobre-expresado en cáncer de próstata, leucemia y cáncer de pulmón⁵⁷

Por otro lado, Malat1 representa un lncRNA con longitud de 8.7kb, el cual se ha reportado participando en el mantenimiento de la integridad de las proteínas paraspeckle y asociado con Suz12⁵⁸, la sobreexpresión de este lncRNA en cáncer se ha reportado en diversos tejidos entre los cuales se encuentran pulmón, riñón, glioma, próstata y recientemente en cáncer de cérvix asociado con la expresión de las oncoproteínas E6/E7⁵⁹.

Adicionalmente SNHG1 el cual mide 1.1kb, es sobre-expresado en cáncer así mismo ha sido reportado asociado a cuerpos ribosomales¹⁸. Mientras que MIAT presenta cuatro isoformas de longitud de aproximadamente de 10kb. En ambos casos, ha sido reportada su inhibición en neoplasias intraepiteliales cervicales grado I, grado II y grado III, en contraste de tejido epitelial normal¹⁹.

Por otro lado, el lncRNA PVT1 posee una longitud de 1.7kb, el cual se encuentra asociado a genes que regulan la formación de la matriz extracelular. En cáncer hepatocelular y colorectal se ha reportado la sobre-expresión, además ha sido asociado con la expresión del oncogen C-Myc^{60, 61, 62}.

Tabla 5. Síntesis del arquetipo funcional, y blancos génicos de lncRNAs seleccionados para el presente estudio con base en diferentes reportes, cohortes de pacientes y/o modelos celulares derivados de tumores de origen epitelial.

IncrRNA	Arquetipo	Función	Target	Justificación
NEAT1	Andamiaje	Formación de los cuerpos subnucleares paraspeckle	Proteínas paraspeckle	IncrRNA's con expresión alterada en distintos tipos de cáncer y en el trabajo de SAGE ⁵¹ .
MALAT1	Guía y andamiaje	Formación de los cuerpos paraspeckle e interacción con PRC2 (Complejo Represor Polycomb 2)	Proteínas paraspeckle N-cadherina, E.cadherina, fibronectina, Zeb1, 2, MAPK3, 8, 9, 10, NNMT, MEK1, 2, ROD1, ROBO1, ABCA1, CXCL5, CCT4, ADAMTS12, BMPER.	
SNHG1	-----	Localizado en el citoplasma y asociado con ribosomas.	-----	
MIAT/RNCR2	-----	Parece a mantener la expresión de Oct4 para mantener la pluripotencialidad en ESC.	-----	IncrRNAs que tiene expresión alterada en CIN ⁵²
PVT1	Guía	Regula a los genes involucrados en la formación de la matriz extracelular	COL4A1, FN1, PAI1, TGFB1, C-Myc	

El segundo criterio tomado para la selección de nuevos IncRNAs, fue el análisis de la función (Tabla 6), al respecto fueron seleccionados IncRNAs de importancia biológica como Sox2OT el cual presenta seis isoformas, todas ellas con longitud alrededor de 3kb. Sox2OT es un IncRNA el cual ha sido asociado con la inducción de la expresión de los factores reprogramadores de células troncales como Sox2 y Oct4 quienes actúan como factores de transcripción en la pluripotencialidad celular, además se han reportado sobre-expresados en eventos de resistencia a fármacos^{63, 64}.

Por último el tercer criterio tomado en cuenta para la selección de los IncRNAs fue su posible asociación con eventos de resistencia a fármacos oncológicos (Tabla 6).

Al respecto, fueron seleccionados tres IncRNAs previamente reportados asociados a quimiorresistencia, uno de ellos es UCA1 (RNA Asociado a Carcinoma Epitelial Urotelial 1), este IncRNA presenta dos isoformas, de 1.4kb y 2.2kb de longitud. Se ha reportado sobre-expresión en distintos tipos de cáncer como gástrico, hepatocelular, mama y principalmente en cáncer de vejiga⁶⁵, en este último se ha

asociado con proliferación⁶⁶, también se ha propuesto como biomarcador en la progresión del cáncer de vejiga, al respecto se ha reportado asociado con resistencia a doxorubicina mediante la inhibición de apoptosis y recientemente con resistencia a cisplatino potenciando la proliferación celular^{67, 68}.

Otro lncRNA que ha sido previamente reportado en quimiorresistencia es H19 con longitud de 2.3kb y sobre-expresado en cáncer hepático, cáncer de ovario, músculo, pulmón y vejiga, así mismo asociado a quimiorresistencia frente a doxorubicina mediante la inducción de MDR1 e inhibición de miRNAs^{69,70}.

Por último, fue seleccionado HOTAIR (RNA Transcrito Antisentido de HOX) recientemente asociado a quimiorresistencia, sin embargo ampliamente estudiado en cáncer de mama, el cual presenta tres isoformas con longitud del transcrito principal de 2.369kb, así mismo presente en la región intergénica entre HOXC11 y HOXC12, donde se transcribe con dirección antisentido⁷¹. Se ha reportado desempeñando la función de andamiaje, uniéndose a dos distintos complejos remodeladores de la cromatina, en el extremo 5' al complejo Polycomb-2 (PRC2) mientras que en el extremo 3' a LSD1/CoREST⁷², así mismo sobre-expresado en diversos tipos de cáncer entre los que se encuentran, mama, pulmón, y recientemente sobre-expresado en CaCu, entre otros⁷³, actualmente se ha reportado su participación frente a la resistencia a diversos fármacos como doxorubicina, cisplatino, así como radio-resistencia mediante la regulación puntos de control del ciclo celular^{54, 55}.

Tabla 6. Síntesis del arquetipo funcional, y blancos génicos de lncRNAs seleccionados para el presente estudio con base en diferentes reportes previos de quimiorresistencia en tumores de origen epitelial.

IncrRNA	Arquetipo	Función	Target	Justificación
SOX2OT	Guía	Probablemente regulación dirigida hacia Sox2 u Oct4, individual o sinérgicamente.	Sox2, Oct4, EZH2	IncrRNA elegido por su función
UCA1/CUDR	-----	Isoforma 2,2 kb provoca la resistencia a la apoptosis inducida por drogas.	AKT, AKT3, ARNT2, ATM, BCR, CDKN2B, CREB, CRKLEP300, EPAS1, FAS, FGF1, FN1, FZD5, LAM3, MAOK1, PDGFB, PRKAR2A, SUFU, PTGS2, TGFβ1, WNT5A, P21 y WNT6	IncrRNAs asociados a distintos tipos de cáncer y a resistencia a fármacos.
HOTAIR	Guía y andamiaje	Transcrito intergénico del locus HOXC, interactúa con proteínas del grupo PRC2, para reprimir a la expresión de genes.	HOXA5, MMP1, MMP3, MMP9, PTEN, VEGFA, WIFI, HER2 HOXD10 P21, P27 etc...	
H19	Señuelo (esponja)	Promueve la proliferación celular	miR-let7, E-cadherina, BAX, HMGA2, COL2A, miR200A, miR200B y miR200C, miR-429, miR, miR-675, COL2A1, HMGA2, Vimentina.	

Posteriormente, se diseñaron oligonucleótidos con base en análisis bioinformático in silico del contexto genómico y diferentes isoformas de lncRNAs, con la finalidad por detectar la expresión de todas las isoformas posibles. Ejemplo de este procedimiento o estrategia experimental, en figura 5 se muestra el contexto genómico y distintas isoformas del transcrito de HOTAIR, ampliamente reportados en cáncer y asociado a quimiorresistencia, el cual fue incluido como control de expresión de lncRNAs en cáncer. En figura 6 se muestra el contexto genómico del lncRNA UCA1, mientras que en figura 7 se muestra el contexto genómico del lncRNA H19 previamente reportados en quimiorresistencia (Ver Secuencias de oligonucleótidos en Tabla Suplementaria 2).

HOTAIR

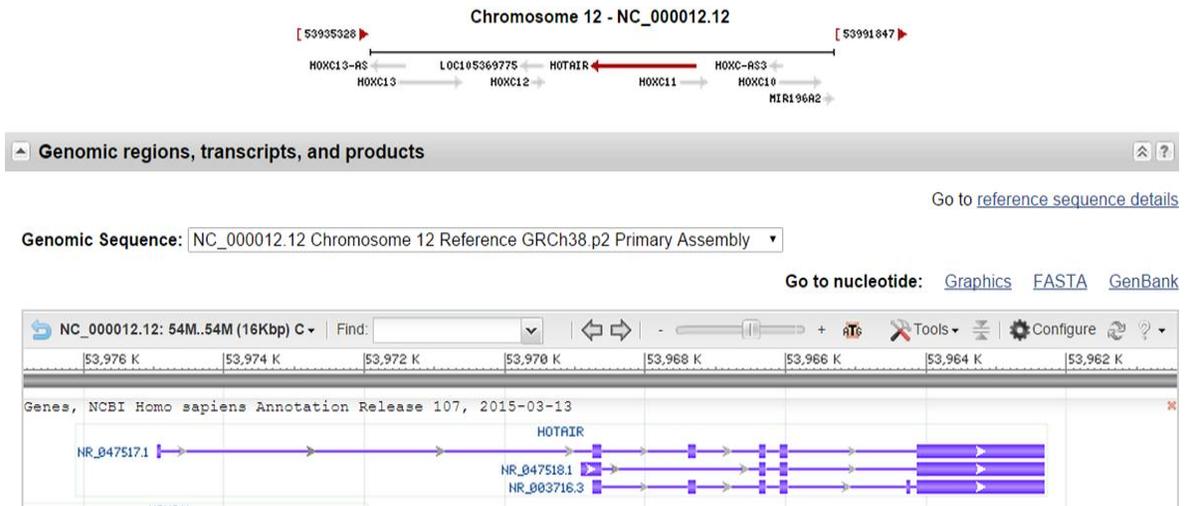


Figura 5. Contexto genómico e isoformas de HOTAIR. Imagen que representa el cromosoma y región citogenética donde se localiza HOTAIR, así como longitud e isoformas del transcrito de HOTAIR. Tomado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, septiembre 2015

UCA1

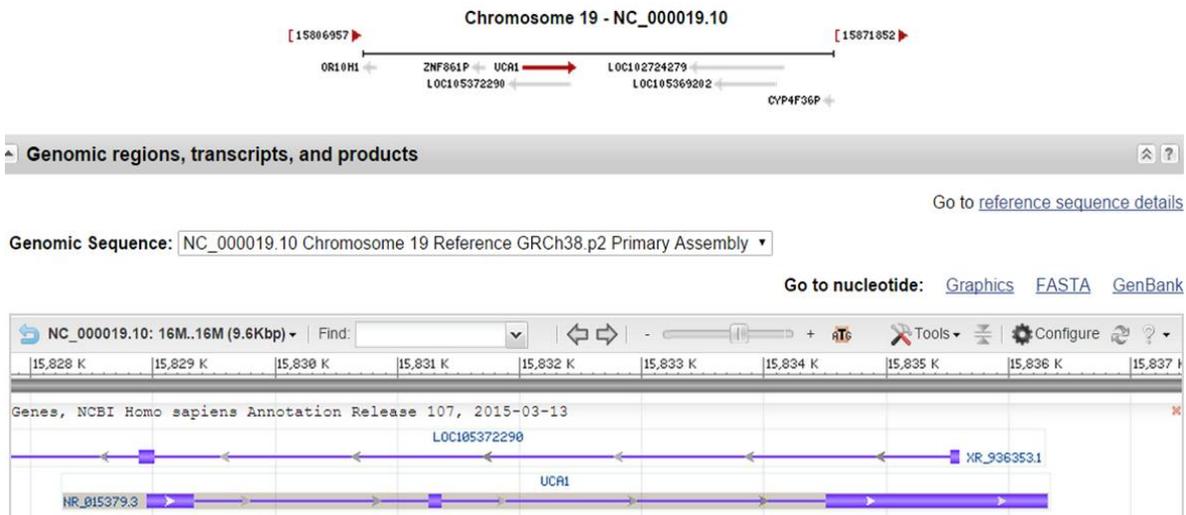


Figura 6. Contexto genómico de UCA1. Imagen que representa el cromosoma y región citogenética donde se localiza UCA1, así como longitud del transcrito. Tomado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, septiembre 2015

H19

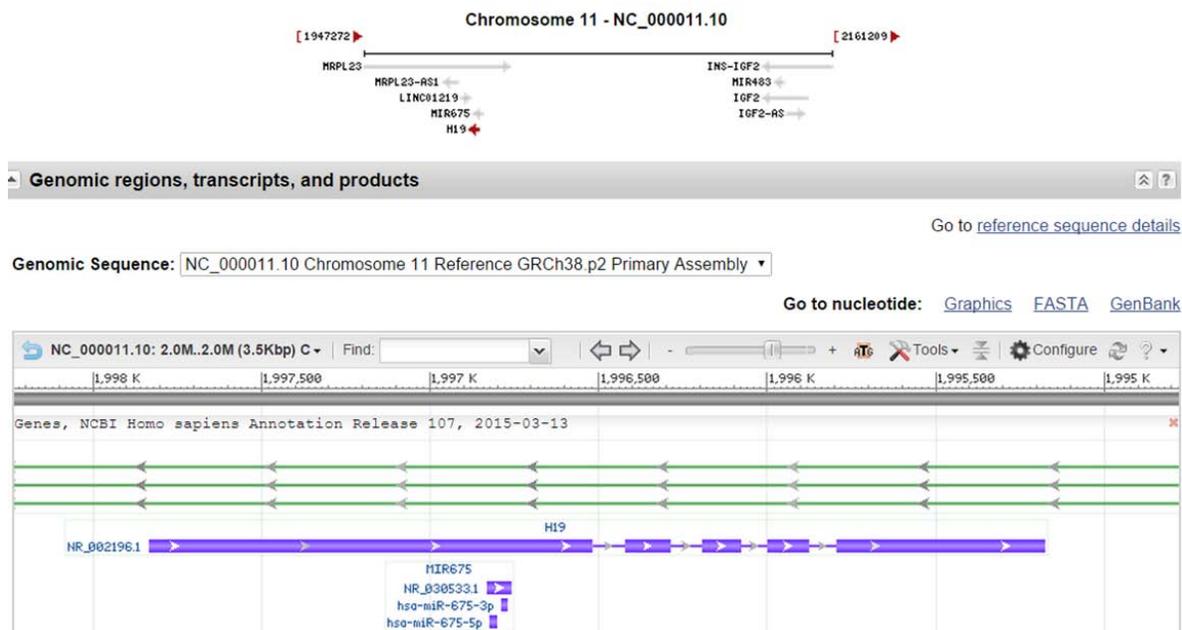


Figura 7. Contexto genómico de H19. Imagen que representa el cromosoma y región citogenética donde se localiza H19, así como longitud del transcrito. Tomado de National Center for Biotechnology Information, 2015. Tomado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, septiembre 2015

9.2. Inducción y caracterización de modelos celulares quimiorresistentes de cáncer de cérvix y cáncer pulmonar

Con la finalidad de evaluar procesos de adaptación y memoria epigenética a corto y largo plazo en tumores de origen epitelial, se establecieron modelos celulares de cáncer de cérvix resistentes a ocho meses de exposición continua a cisplatino empleando dos concentraciones: $1\mu\text{M}$ y $1.5\mu\text{M}$; en los modelos celulares de cáncer de cérvix HeLa (HPV18) y CaSki (HPV16), posterior a lo cual se evaluaron diferencias en el perfil y nivel de expresión de lncRNAs frente a las diferentes concentraciones de cisplatino a largo plazo, para ello fueron evaluados los tiempos de seis y ocho meses. En la figura 8A se muestra el proceso inducible de quimiorresistencia a largo plazo en línea celular HeLa resistente a $1\mu\text{M}$, mientras a

que figura 8B muestra el proceso inducible de quimiorresistencia de línea celular CaSki resistente a concentración de 1 μ M de Cisplatino.

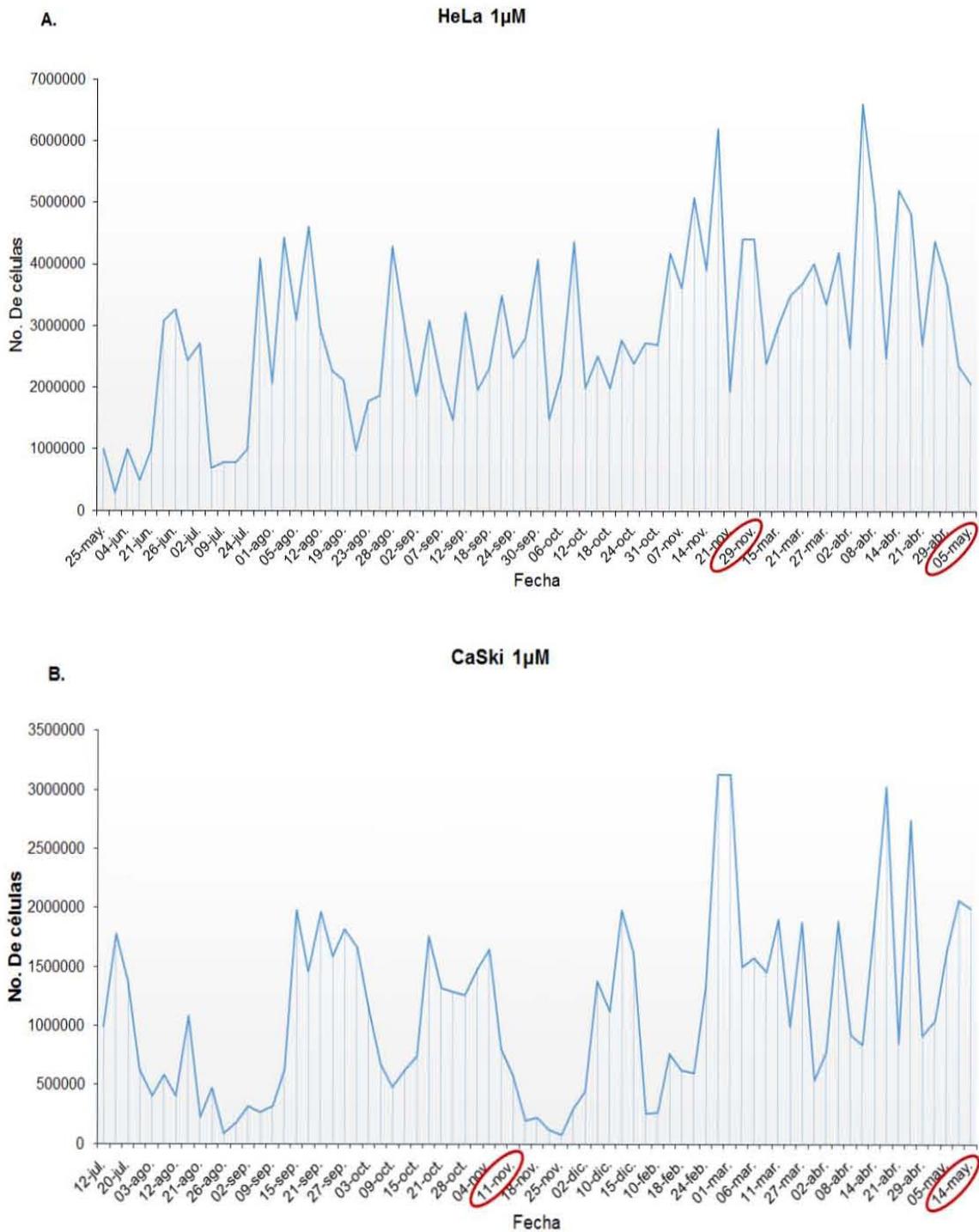
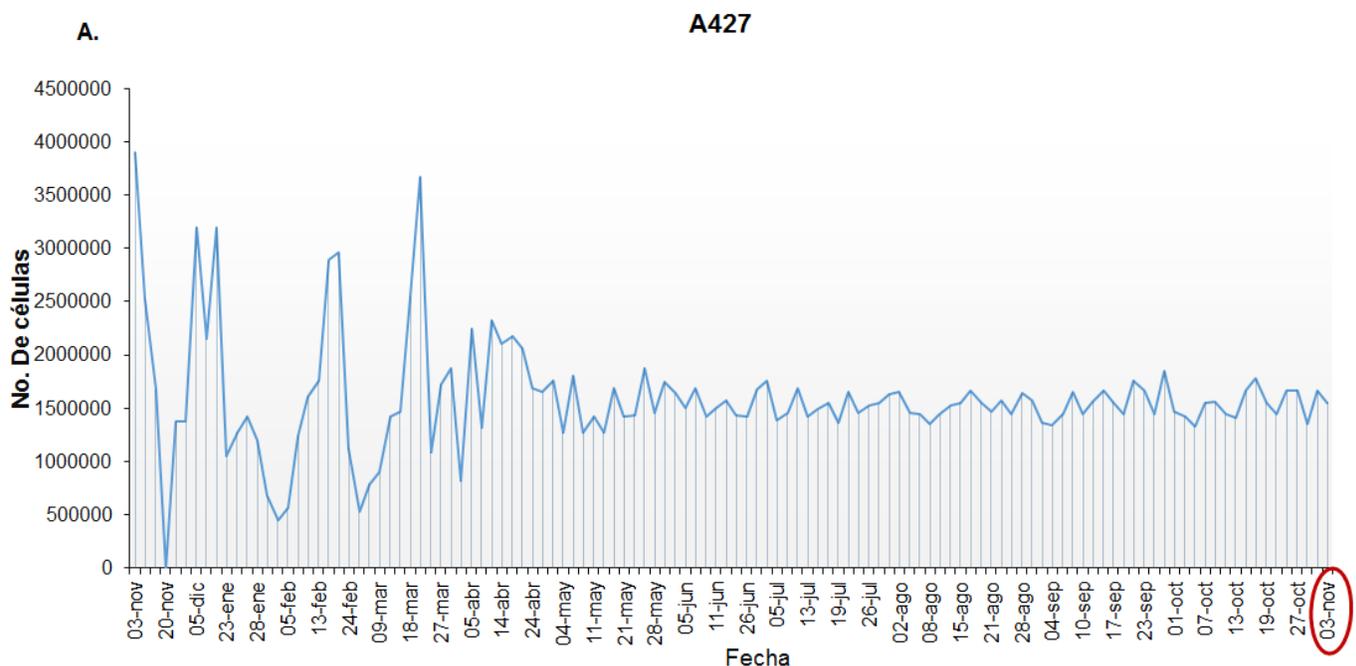


Figura 8. Gráfica de la evolución en tiempo del modelo quimiorresistente inducible en modelos celulares de cáncer de cérvix frente a Cisplatino. A) Gráfica en la que se

muestra un periodo de tiempo de la inducción y el establecimiento del modelo resistente en la línea celular HeLa a 1µM de Cisplatino. B) Gráfica en la que se muestra un periodo de tiempo de la inducción y el establecimiento del modelo resistente en la línea celular CaSki a 1µM de Cisplatino. Las fechas en las que se colectaron células para la extracción de ácidos nucleicos, se indican con un círculo rojo.

Por otra parte, también se establecieron modelos celulares de cáncer de pulmón resistentes a doce meses de exposición continua a cisplatino frente a concentraciones de 5µM. En figura 9A se muestra el seguimiento (meses) del del proceso de inducción del modelo celular resistente a cisplatino en células A-427, mientras que en figura 9B, se muestra el tiempo de inducción del modelo celular resistente a cisplatino en modelo celular de cáncer pulmonar A-549.

Cabe mencionar que las concentraciones de cisplatino aplicadas al modelo inducible de quimioresistencia fueron seleccionadas con base en el análisis de curvas de viabilidad celular frente a cisplatino, a partir del cual fueron determinadas las concentraciones de inhibición 50 (IC:50).



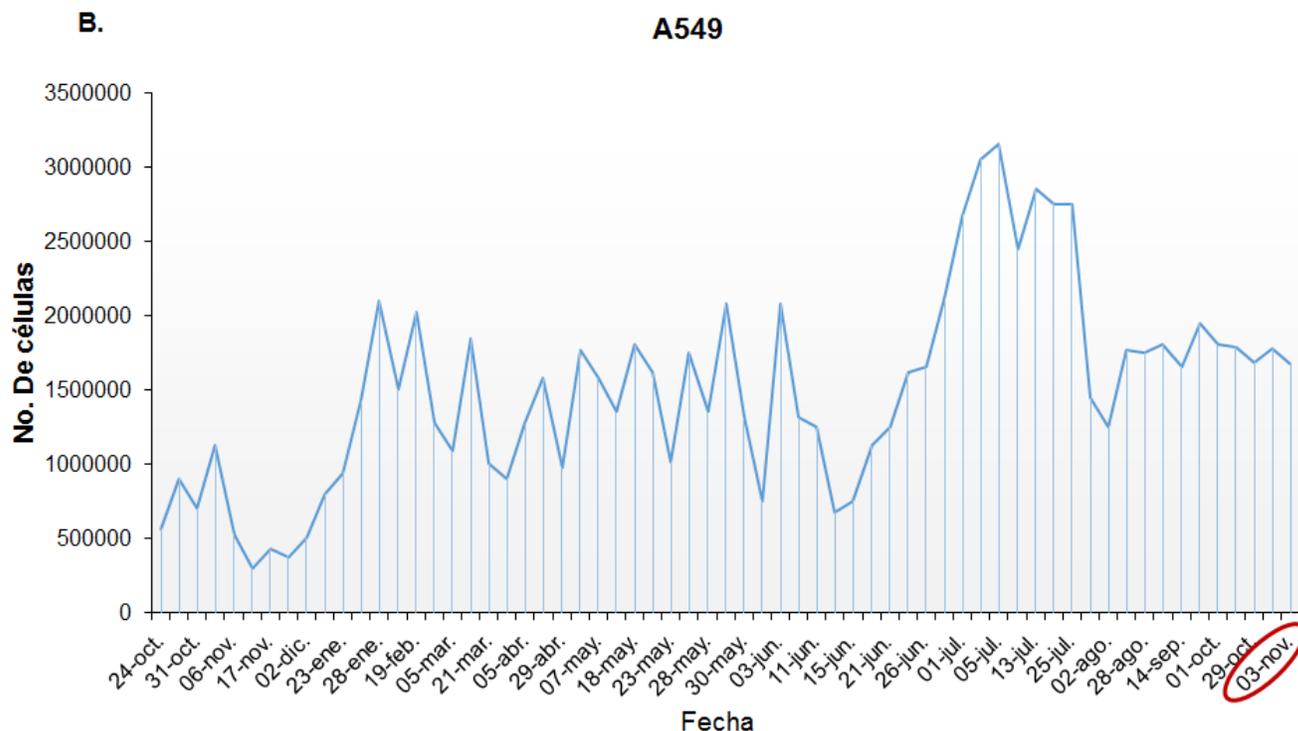


Figura 9. Gráfica de la evolución en tiempo del modelo quimiorresistente inducible en modelos celulares de cáncer pulmonar frente a cisplatino. A) Gráfica en la que se muestra el periodo de tiempo de inducción y establecimiento del modelo celular resistente en células A427 frente a 5 μ M de cCisplatino. B) Gráfica que muestra el periodo de adaptación y establecimiento del modelo resistente en línea celular de cáncer pulmonar A549 frente a 5 μ M de cisplatino. Es señalado el tiempo en meses donde se colectaron líneas celulares para su análisis de extracción y expresión, con círculos en rojo.

9.2.1. Cálculo de la concentración inhibitoria 50 (IC50) de Cisplatino para las líneas celulares parentales y quimiorresistentes

Con el objetivo de demostrar diferencias en el fenómeno de quimiorresistencia inducible a largo plazo, fueron realizados ensayos de viabilidad celular mediante MTS en líneas celulares parentales y quimiorresistentes de cáncer de cérvix y cáncer pulmonar. Al respecto se obtuvieron valores de IC50 frente a cisplatino para determinar la capacidad de quimiorresistencia innata y adquirida entre líneas celulares parentales y resistentes (inducibles).

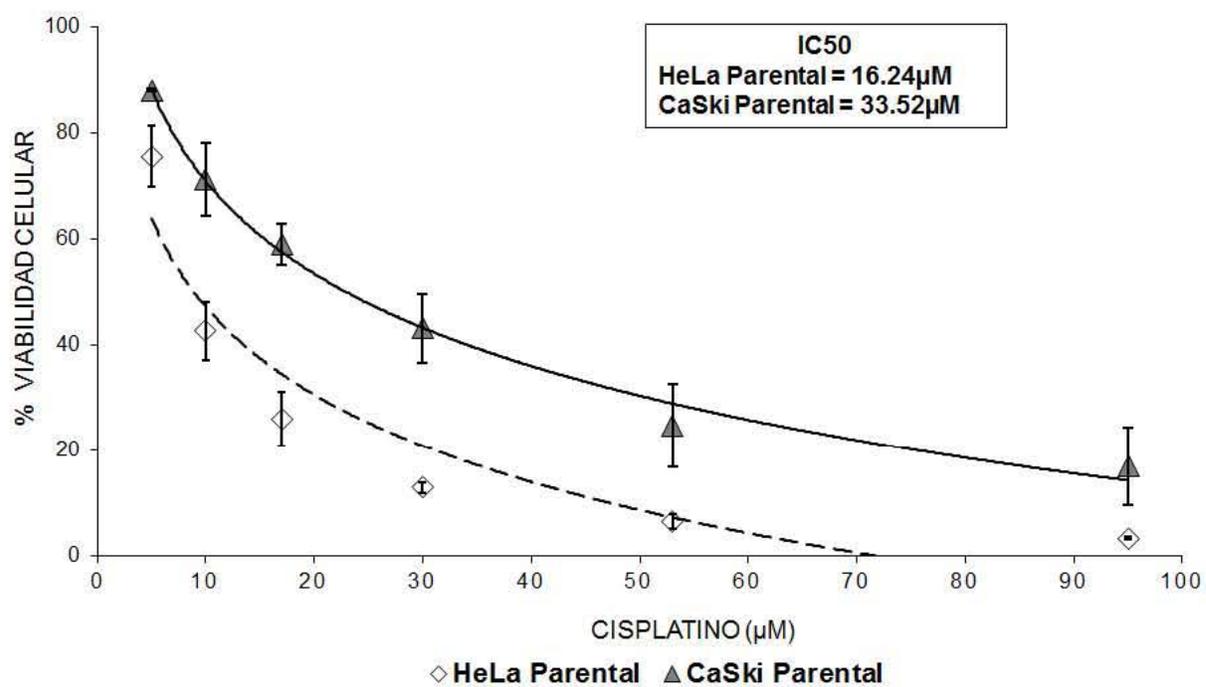
Nuestro análisis de contraste mediante de IC50 de cisplatino obtenida para cada línea celular de cáncer de cérvix HeLa y CaSki parentales permitió determinar que células CaSki parental poseen IC50 de 33.52 μ M, de mayor resistencia comparado con HeLa parental la cual posee IC50 de 16.24 μ M (Figura 10A).

Mientras que nuestro análisis en HeLa parental (16.2 μ M) en contraste de HeLa (inducible) expuesta a 1 μ M de Cisplatino (HeLa 1 μ M) mostró una IC50 de 36.55 μ M; mientras que HeLa expuesta a 1.5 μ M (HeLa 1.5 μ M) fue de 49.58 μ M (Figura 10B). Con lo cual, se determinó que el modelo celular HeLa parental es menos resistente que los modelos celulares quimioresistentes inducibles a largo HeLa 1 μ M y HeLa 1.5 μ M.

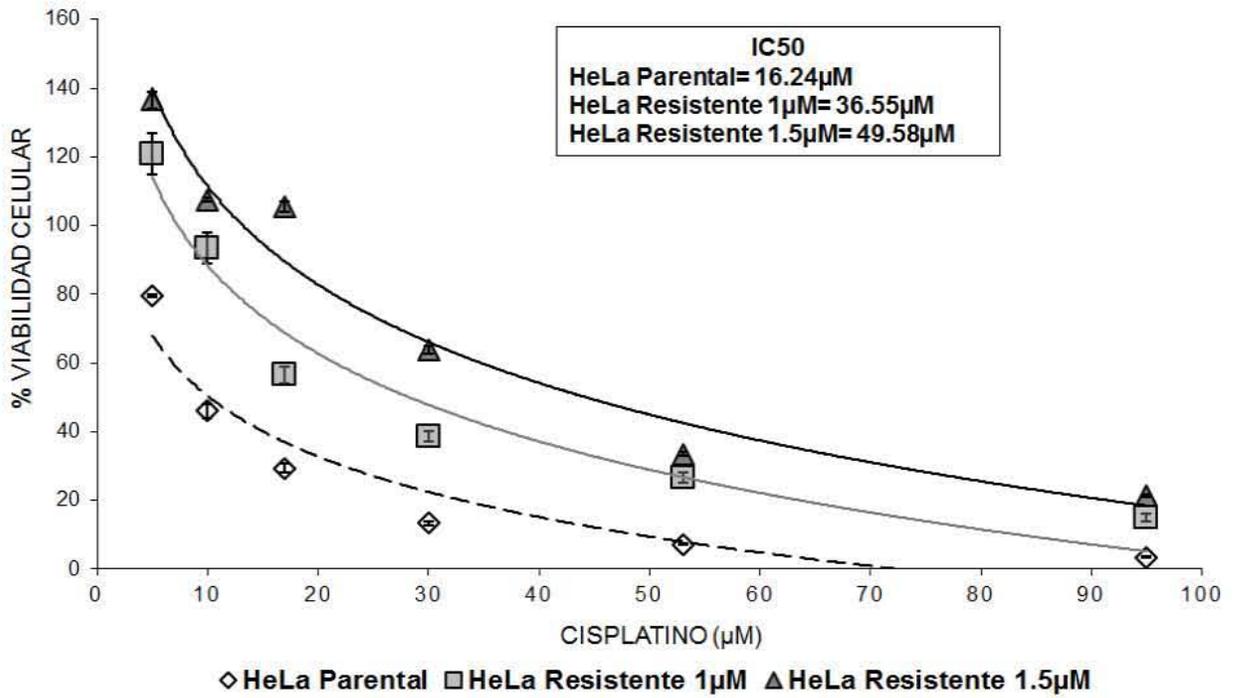
Posteriormente, se determinó la IC50 de Cisplatino en CaSki parental (33.52 μ M) en contraste de CaSki expuesta a 1 μ M de cisplatino (CaSki 1 μ M) la cual fue 54.99 μ M; mientras que CaSki tratada por 1.5 μ M (CaSki 1.5 μ M) mostro IC50 de 69.67 μ M (Figura 10C). Con lo anterior, se determinó el éxito del modelo inducible de quimioresistente a largo plazo en CaSki 1 μ M y CaSki 1.5 μ M.

Respecto a lo anterior, nuestros resultados confirmaron el aumento en la capacidad de quimiorresistencia inducible a largo plazo por Cisplatino en cáncer de cérvix y cáncer pulmonar.

A.



B.



C.

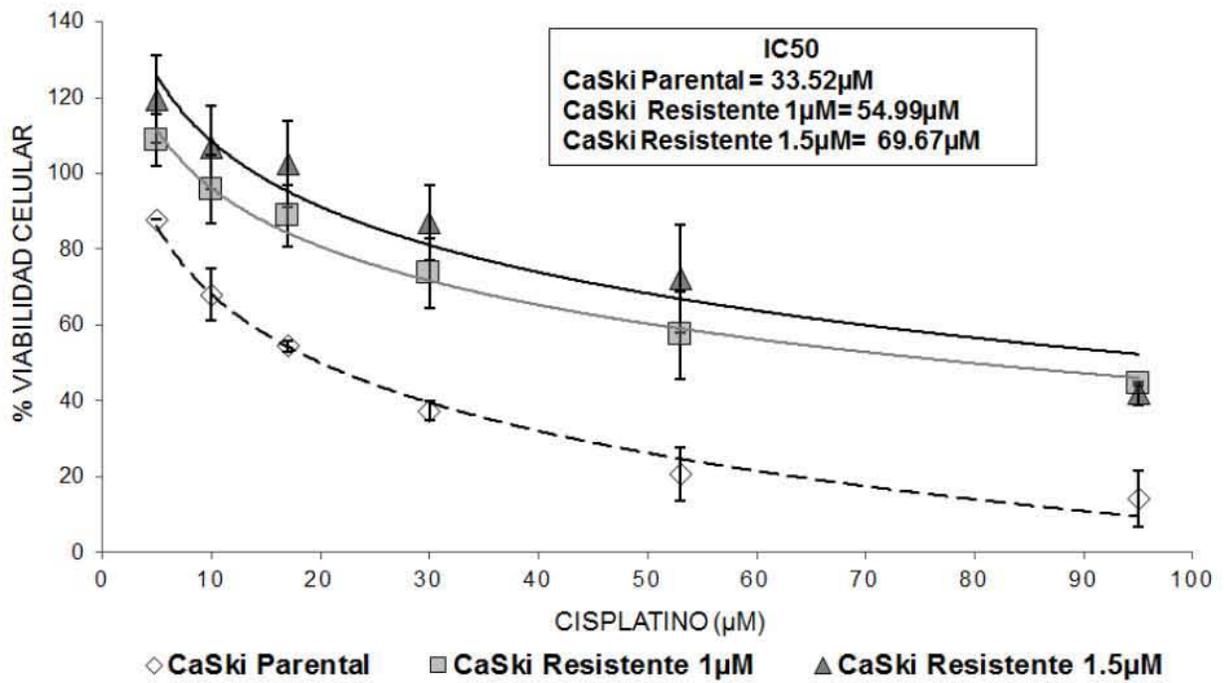


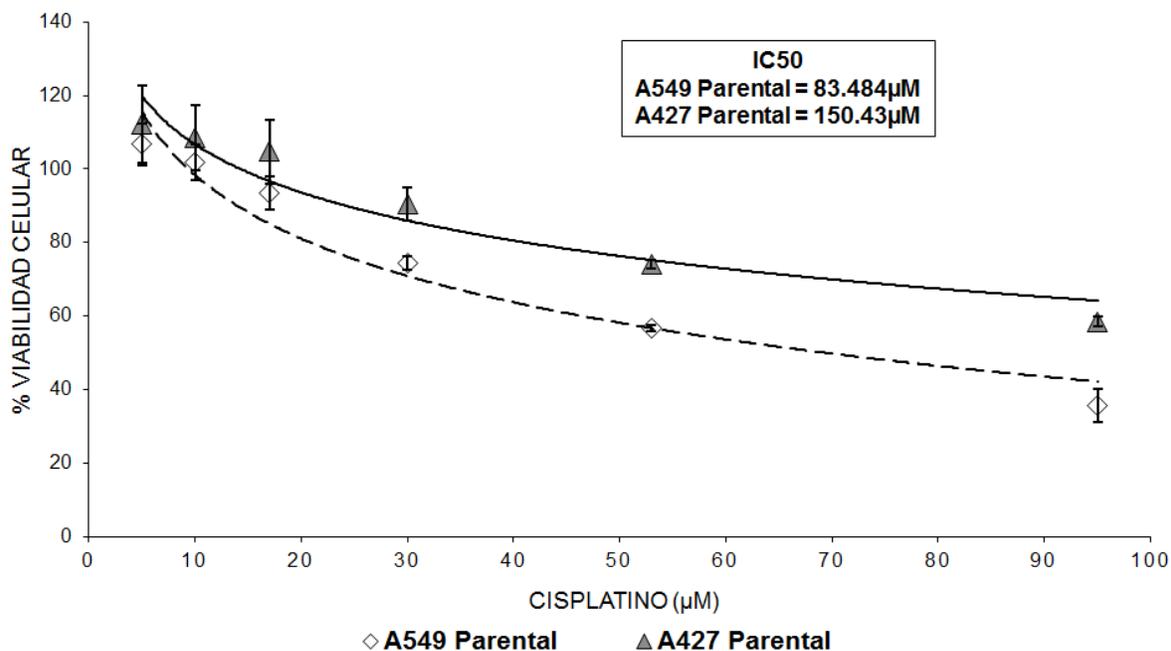
Figura 10. Análisis de la viabilidad celular mediante ensayos de MTS. A) Viabilidad celular e IC50 de las líneas celulares de cáncer de cervicouterino parentales (n=3). B)

Viabilidad celular e IC₅₀ de HeLa parental, HeLa1 μ M y HeLa1.5 μ M (n=2). C) Viabilidad celular e IC₅₀ de CaSki parental, CaSki 1 μ M y CaSki 1.5 μ M (n=2). Se determinó que las líneas celulares HeLa y CaSki expuestas a fármaco son significativamente más resistentes que sus respectivas líneas celulares parentales, esto se determinó mediante ANOVA (p \leq 0.05), así mismo se indica la desviación estándar (S.D.) en cada punto de las curvas.

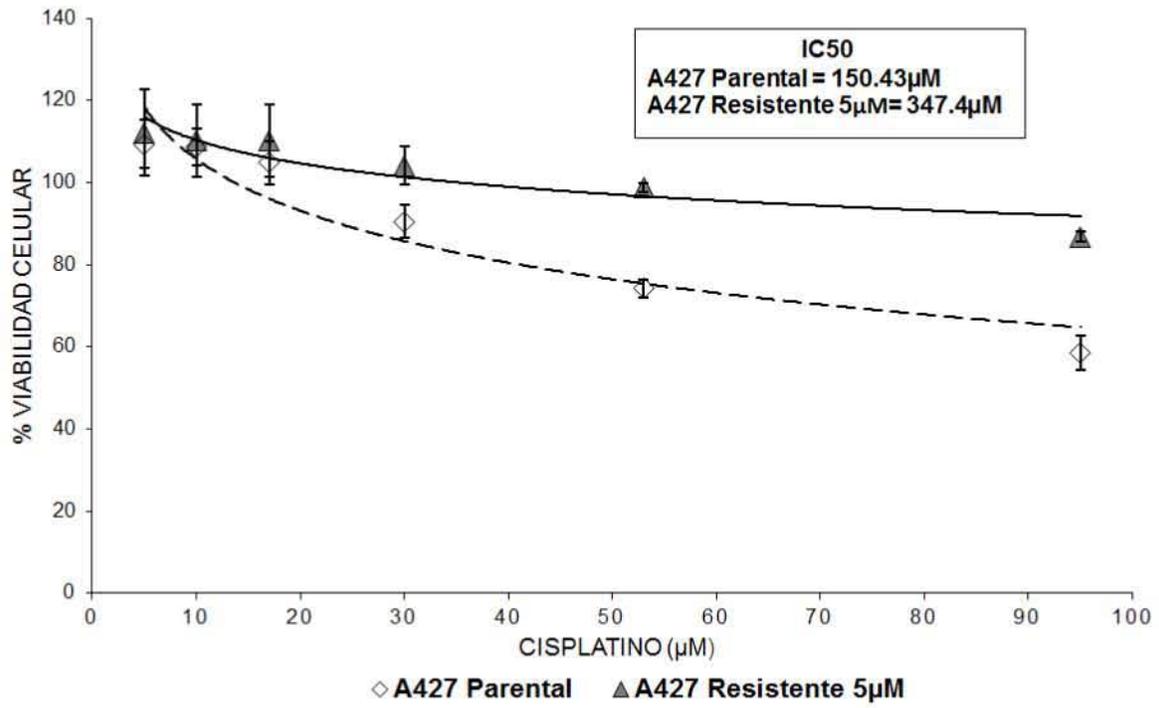
Nuestro análisis de IC₅₀ frente a Cisplatino determino que las líneas celulares de cáncer de pulmón A427 parental y A549 parental fueron de 150.43 μ M y de 83.48 μ M, respectivamente, permitiendo concluir que el modelo celular A-427 parental es más resistente que A-549 parental (Figura 11A).

Al comparar la IC₅₀ de A427 parental (150.43 μ M) con IC₅₀ obtenida para A427 expuesta a 5 μ M de Cisplatino (347.4 μ M), así como la IC₅₀ de A549 parental (83.484 μ M) respecto de A549 5 μ M (301.94 μ M) (Figura 11B y C), se determinó que los modelos celulares inducibles a largo plazo poseen mayor capacidad de resistencia a cisplatino comparado con modelos celulares parentales.

A.



B.



C.

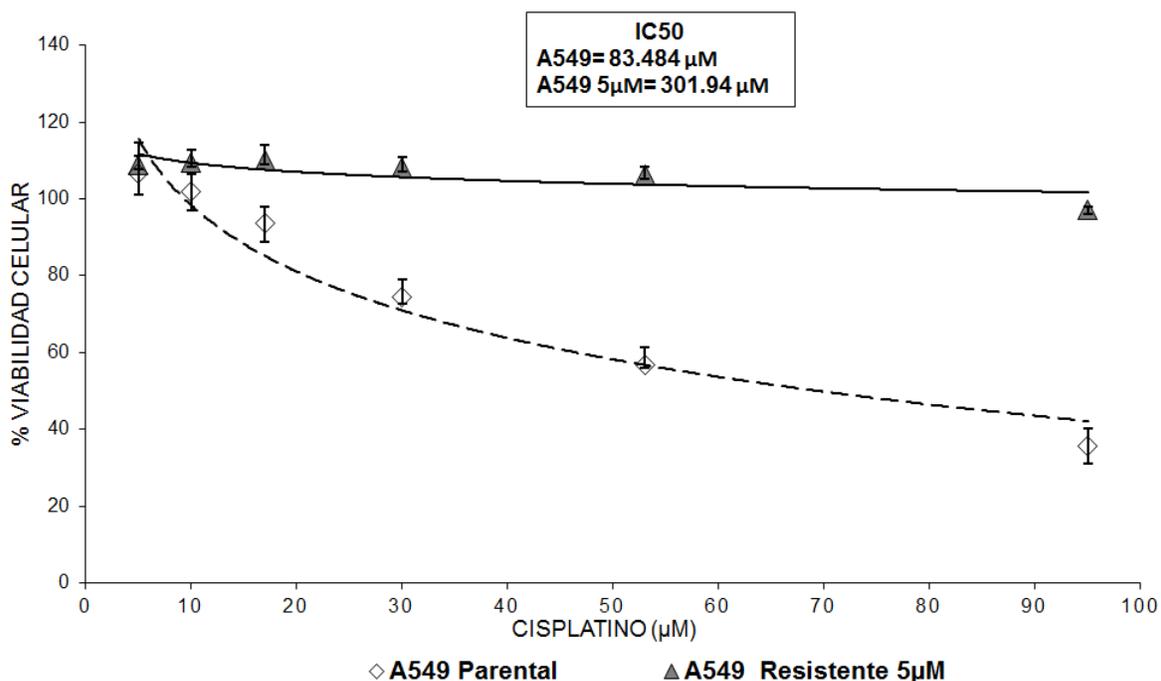


Figura 11. Análisis de la viabilidad celular mediante ensayos de MTS. A) Viabilidad celular e IC₅₀ de las líneas parentales de pulmón (n=1). B) Viabilidad celular e IC₅₀ de A427 parental versus A427 5 μM (n=1). C) Viabilidad celular e IC₅₀ de A549 parental versus A549 5 μM (n=1). Se determinó que la línea celular A549 expuesta a cisplatino es significativamente más resistente que la línea celular parental mediante prueba de t ($p < 0.05$), así mismo se indica el error estándar (S.E.) en cada punto de las curvas.

9.2.2. Quimiorresistencia Inducible a Largo Plazo Promueve Cambios Morfológicos en Ambos Cáncer de Cérvix y Cáncer Pulmonar

Con el objeto de evaluar cambios celulares en nuestros modelos quimioresistentes, se llevaron a cabo el análisis morfológico de células parentales y quimioresistentes mediante la medición del diámetro celular comparando modelos celulares parentales y quimioresistentes mediante el uso de microscopía óptica con aumento final de 40X, se determinó que modelos celulares quimioresistentes de cáncer de cervix (HeLa y CaSki) (Figura 12) y cáncer de pulmón (A427 y A549) aumentaron su tamaño significativamente con respecto de las líneas celulares parentales (Figura 13).

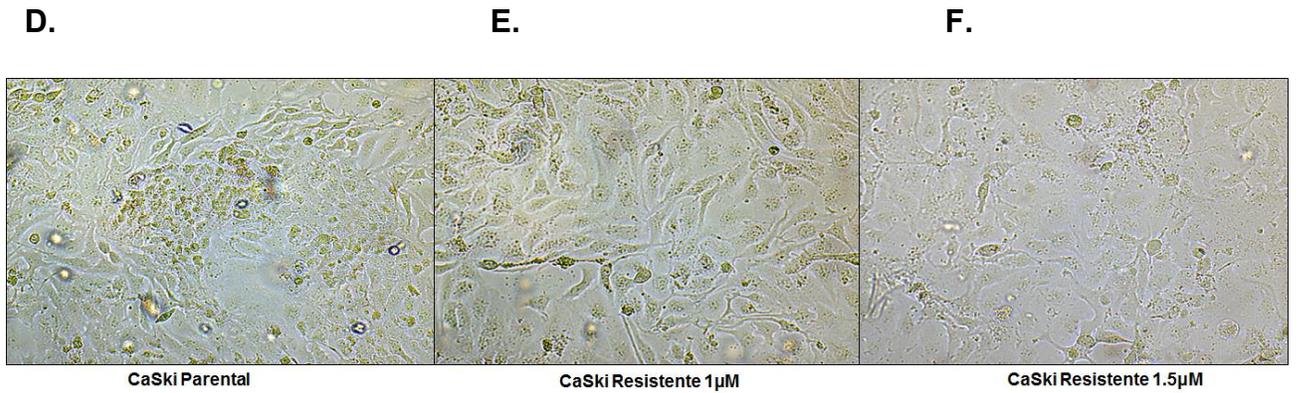
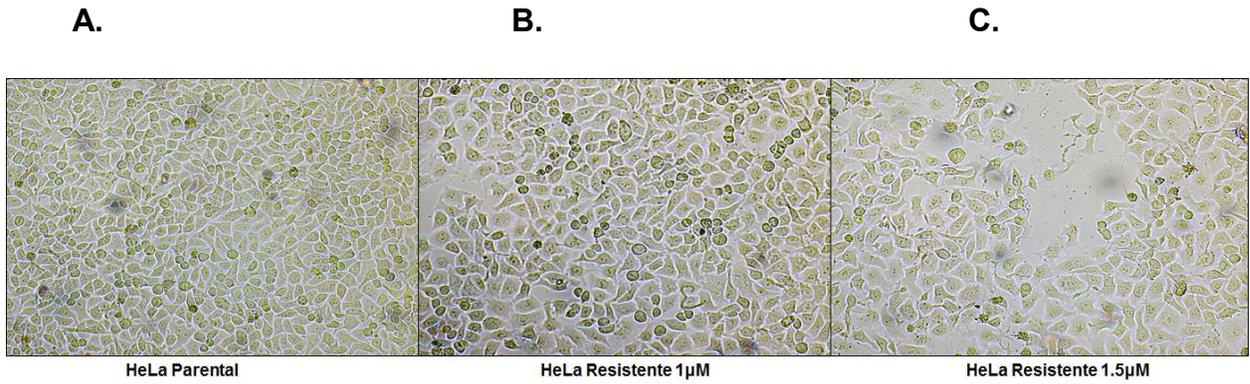


Figura 12. Morfología celular de las líneas celulares parentales y quimiorresistentes de cáncer de cérvix. A) HeLa parental, B) HeLa 1µM, C) CaSki parental, D) CaSki 1µM.

A.

B.

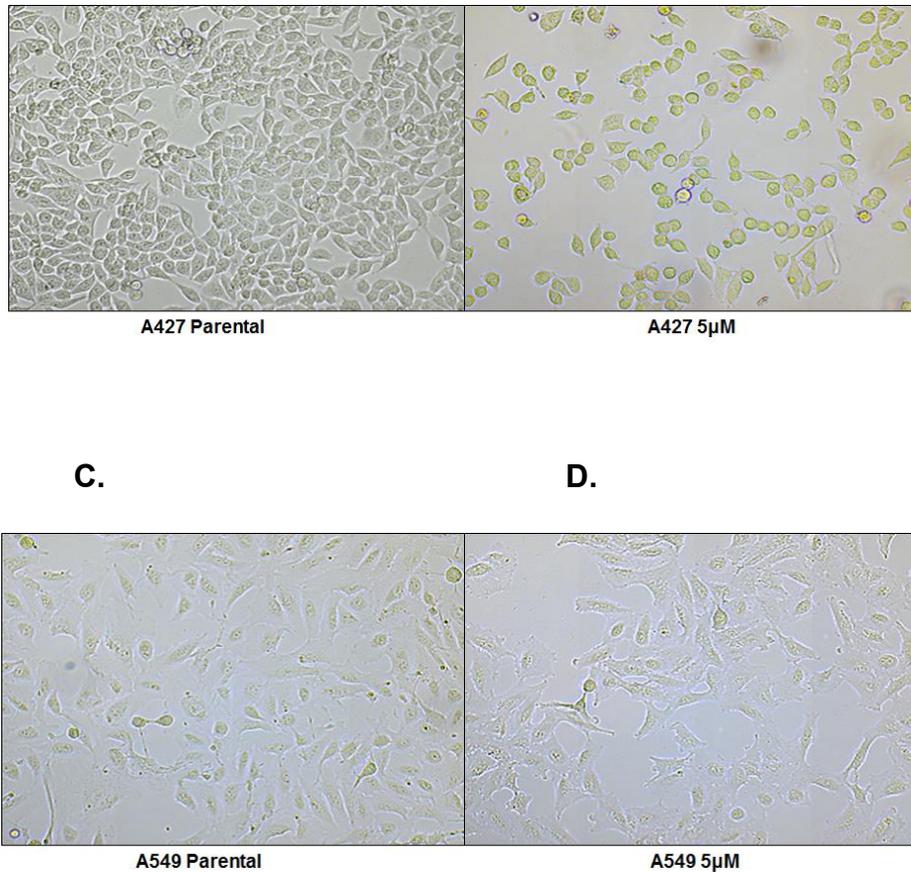


Figura 13. Morfología celular de las líneas celulares parentales y quimiorresistentes de cáncer de pulmón. A) A427 parental B) A427 5µM, C) A549 parental, D) A549 5µM.

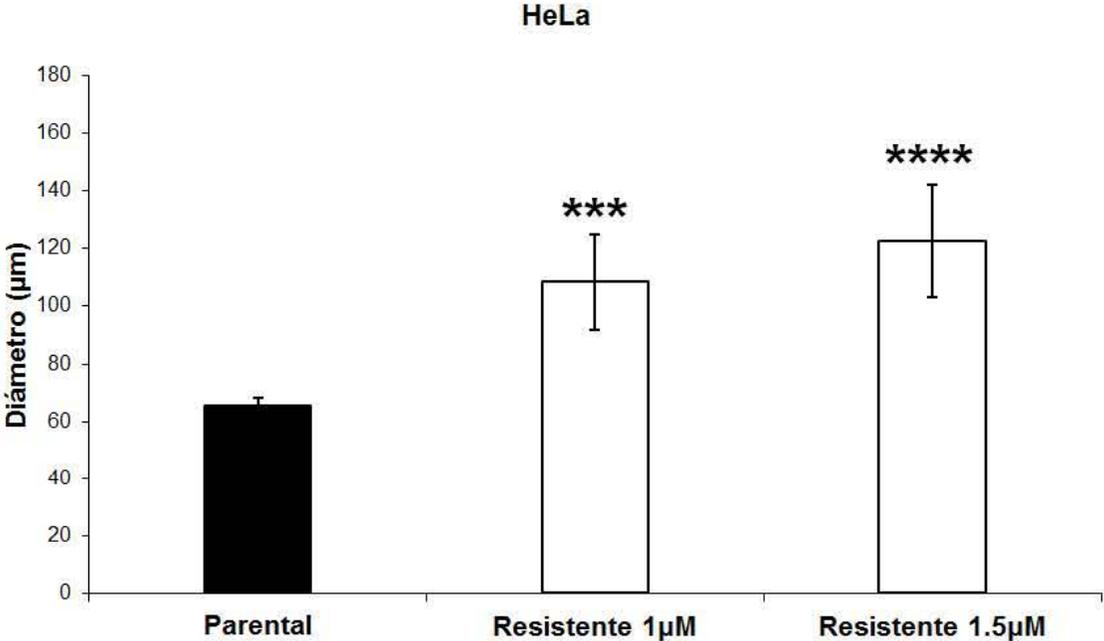
El análisis microscópico del diámetro en líneas celulares de cáncer de cérvix quimiorresistentes a cisplatino, con respecto a líneas celulares parentales determinó que en todos los casos el diámetro de líneas celulares quimiorresistentes se incrementó con respecto a su línea celular parental.

Al respecto el diámetro de HeLa 1µM en promedio incrementó 0.6 veces, mientras que su longitud en HeLa 1.5µM aumento 1.1 veces, con respecto a HeLa parental.

Mientras que respecto del CaSki parentales y quimiorresistentes se observó que la línea CaSki 1µM incrementó 0.5 veces respecto a la parental, mientras que CaSki 1.5µM incrementó su diámetro 0.4 veces respecto a la parental.

En resumen nuestros modelos celulares quimiorresistentes a diferentes concentraciones de Cisplatino en HeLa y CaSki incrementaron su tamaño, con respecto a su línea celular parental (Figura14).

A.



B.

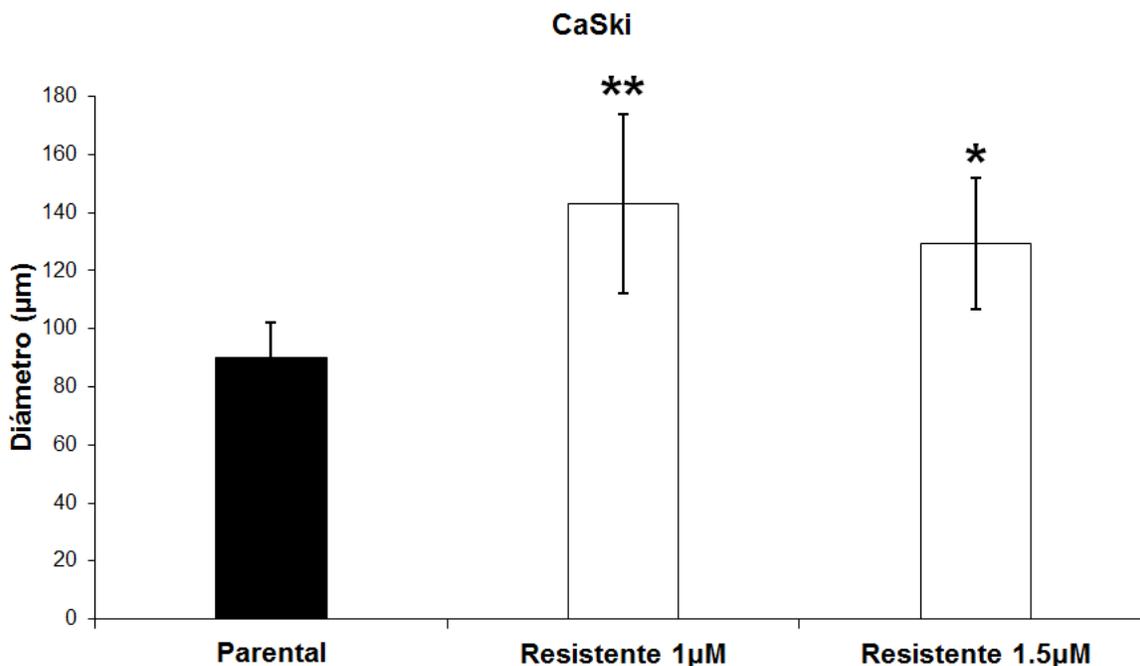


Figura 14. Análisis del cambio en el diámetro celular en líneas celulares de cáncer cervicouterino. Análisis de cambios en longitud celular .A) En gráfica se muestra la longitud de células parentales, con respecto a células quimiorresistentes de cáncer de cérvix HeLa. B) En gráfica se muestra longitud de células parentales, con respecto a quimiorresistentes de líneas celulares de cáncer de cérvix CaSki. Se determinó que la longitud del diámetro de líneas celulares HeLa y CaSki expuestas a fármaco es significativamente mayor comparado con células parentales (Prueba de ANOVA con * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). Se indica la desviación estándar (S.D.) en cada caso.

9.3. Alteraciones en el Inmunofenotipo de Células Tipo Troncal Quimiorresistentes del Cáncer

Se evaluó la expresión a nivel de proteína de cuatro marcadores asociados a células tumorales quimiorresistentes previamente identificados como posibles marcadores de células troncales del cáncer de cérvix y cáncer pulmonar, destacando las proteínas ABCG2, Oct4, CD44 y ALDH.

Nuestro análisis de expresión de marcadores nucleares fue realizado sobre microfotografías obtenidas a partir de ensayos de inmunocitoquímica en líneas celulares parentales y quimiorresistentes, empleando para ello la aplicación del immunoratio dentro del programa image J, el cual nos permitió detectar expresión de la proteína en el área nuclear, otorgando un valor en porcentaje del nivel de expresión de proteína.

Mientras que para el caso de las proteínas a nivel de membrana se utilizó la herramienta llamada immunomembrane del programa de Image J, el cual detecta la intensidad de la reacción en membrana celular asignando criterios de valor numérico de 0-10 representando la suma de los dos criterios mencionados.

Se analizaron un total de cinco microfotografías (5 campos, 10X) sobre cada modelo celular tanto parental como quimiorresistente, y se obtuvo la media a partir de valores obtenidos de microfotografías para cada marcador, además del cálculo de su desviación estándar.

9.3.1. Cambios en la Expresión del Marcador ABCG2 en Líneas Celulares Quimiorresistentes Inducibles

Con el objeto de evaluar la proteína ABCG2 en modelos celulares parentales y quimiorresistentes de cáncer de cérvix y cáncer de pulmón, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica empleando un anticuerpo dirigido contra ABCG2, posteriormente se tomaron microfotografías y el análisis de expresión en membrana fue realizado mediante la aplicación immunomembrane del programa Image J.

A partir de las microfotografías, se obtuvo la media obtenida a partir de los valores de expresión de la proteína ABCG2 por cada línea celular quimiorresistente de cáncer de cérvix HeLa, siendo en promedio de 3.2, mientras que en células parentales no fue detectada su expresión de la proteína (Figura 15), esto permitió observar que la expresión de la proteína ABCG2 se incrementa en la línea celular quimiorresistente HeLa sometida a 1 μ M de cisplatino.

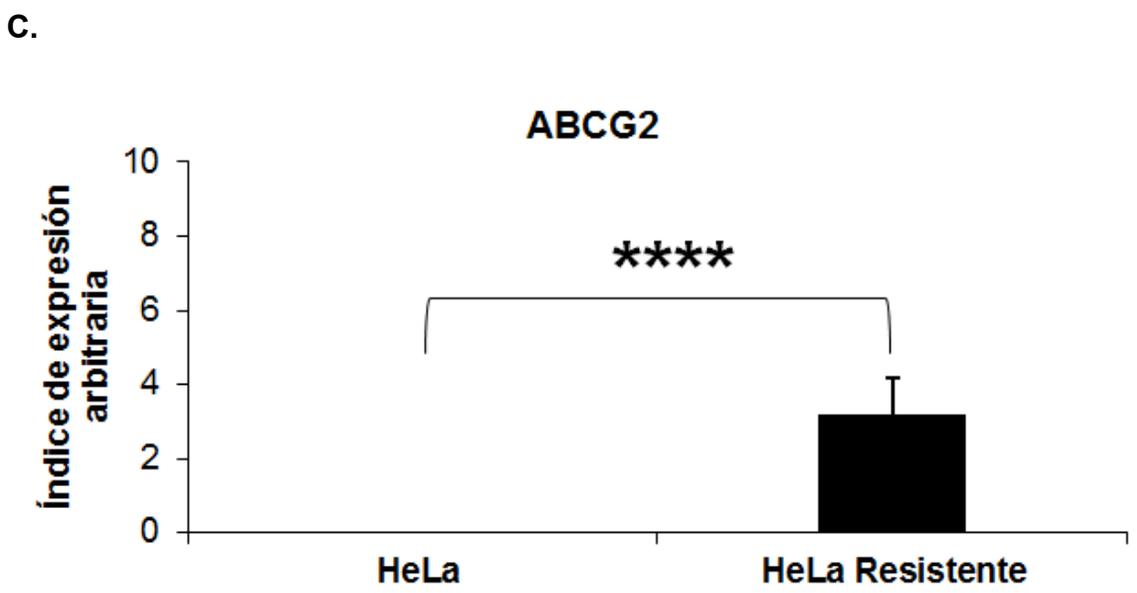
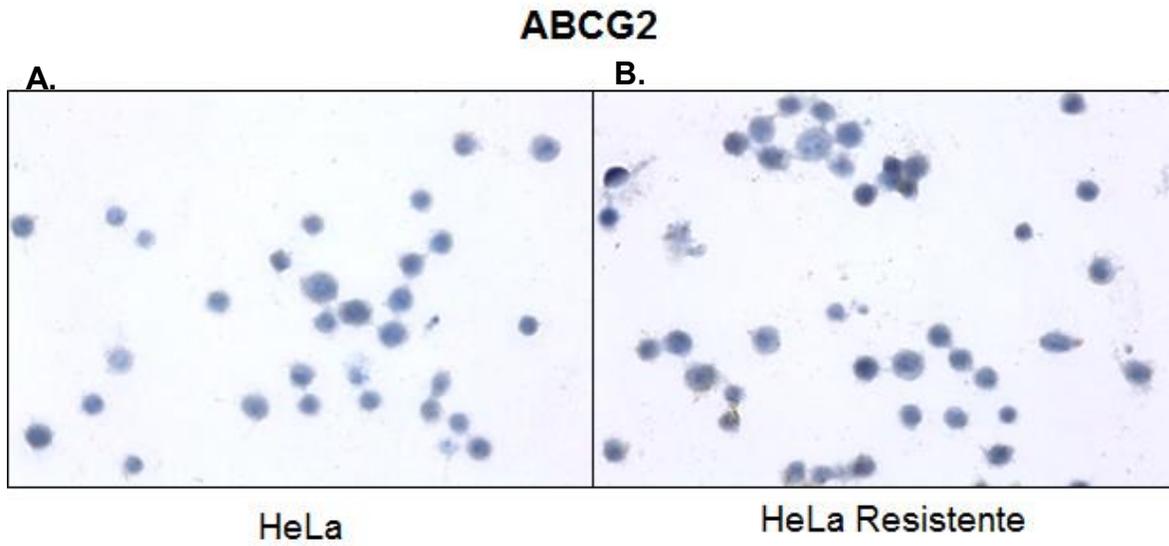


Figura 15. Análisis de Expresión del Marcador ABCG2 en Líneas Celulares HeLa Parentales y Quimiorresistente Mediante Inmunocitoquímica. A) y B) Imagen de la expresión de ABCG2 en HeLa parental expresión de ABCG2 en líneas celulares HeLa parental y HeLa resistente a 1µM de cisplatino. C) Gráfica que representa el índice de expresión arbitrario de ABCG2. En la gráfica se muestran las medias de la línea celular parental y la línea celular resistente +/- S.D., se determinó aumento en la expresión de la proteína ABCG2 en células HeLa resistentes con respecto a su línea celular parental aplicando prueba t de Student ($p < 0.0001$).

Posteriormente se realizó el análisis de la expresión de ABCG2 mediante la toma de microfotografías obtenidas a partir de líneas celulares parental y

quimiorresistente a 1 μ M de CaSki; sin embargo no fue posible detectar niveles de expresión de la proteína ABCG2 tanto en líneas celulares parental como resistente a cisplatino (Figura 16).

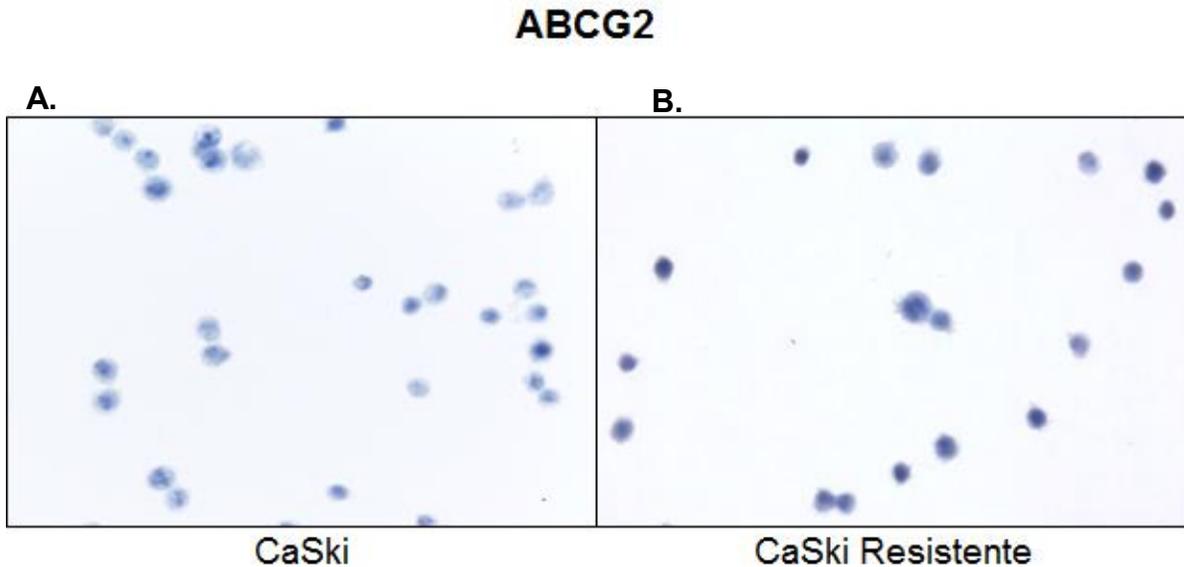


Figura 16. Análisis de Expresión de ABCG2 en Líneas Celulares CaSki Parentales y Quimiorresistente Mediante Inmunocitoquímica. A) Imagen del análisis de expresión de ABCG2 en CaSki parental, B) Imagen del análisis de expresión de ABCG2 en CaSki resistente a 1 μ M de cisplatino.

Al realizar el análisis de expresión de la proteína ABCG2 en líneas celulares de cáncer de pulmón se determinó que el modelo celular quimiorresistente A-427, tiene escasa diferencia en la expresión alcanzando un valor de 5.6, cuyo nivel de expresión de la proteína respecto a su línea parental con un valor de expresión de 5.8, (Figura 17).

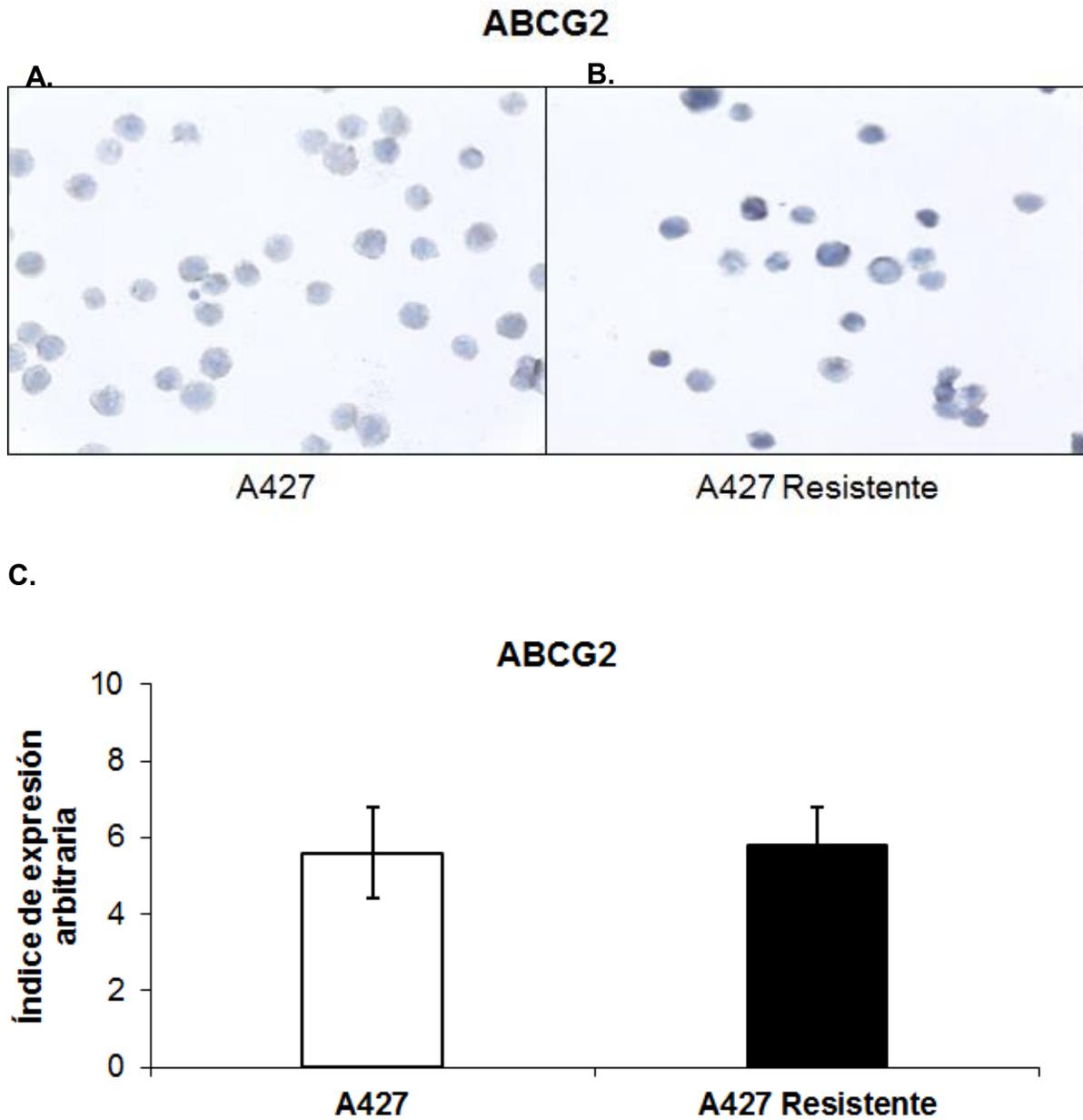


Figura 17. Análisis de Expresión de ABCG2 en Línea Celular A-427 Parental y Quimiorresistente Inducible Mediante Inmunocitoquímica. A) Imagen del nivel de expresión de ABCG2 en A-427 parental, B) Imagen del Nivel de Expresión de ABCG2 en Modelo Celular A-427 Resistente a 5 μ M de cisplatino. C) Gráfica que representa la expresión de ABCG2 en líneas celulares A427 parental y A427 resistente a 5 μ M de cisplatino. En la gráfica se muestran las medias de la línea celular parental y la línea celular resistente +/- S.D.

El análisis de microfotografías a partir de inmunocitoquímica en líneas celulares parental y quimiorresistente mostró escasas diferencias no significativas en la expresión de la proteína ABCG2 entre células quimiorresistentes con respecto a células parentales (Figura 18).

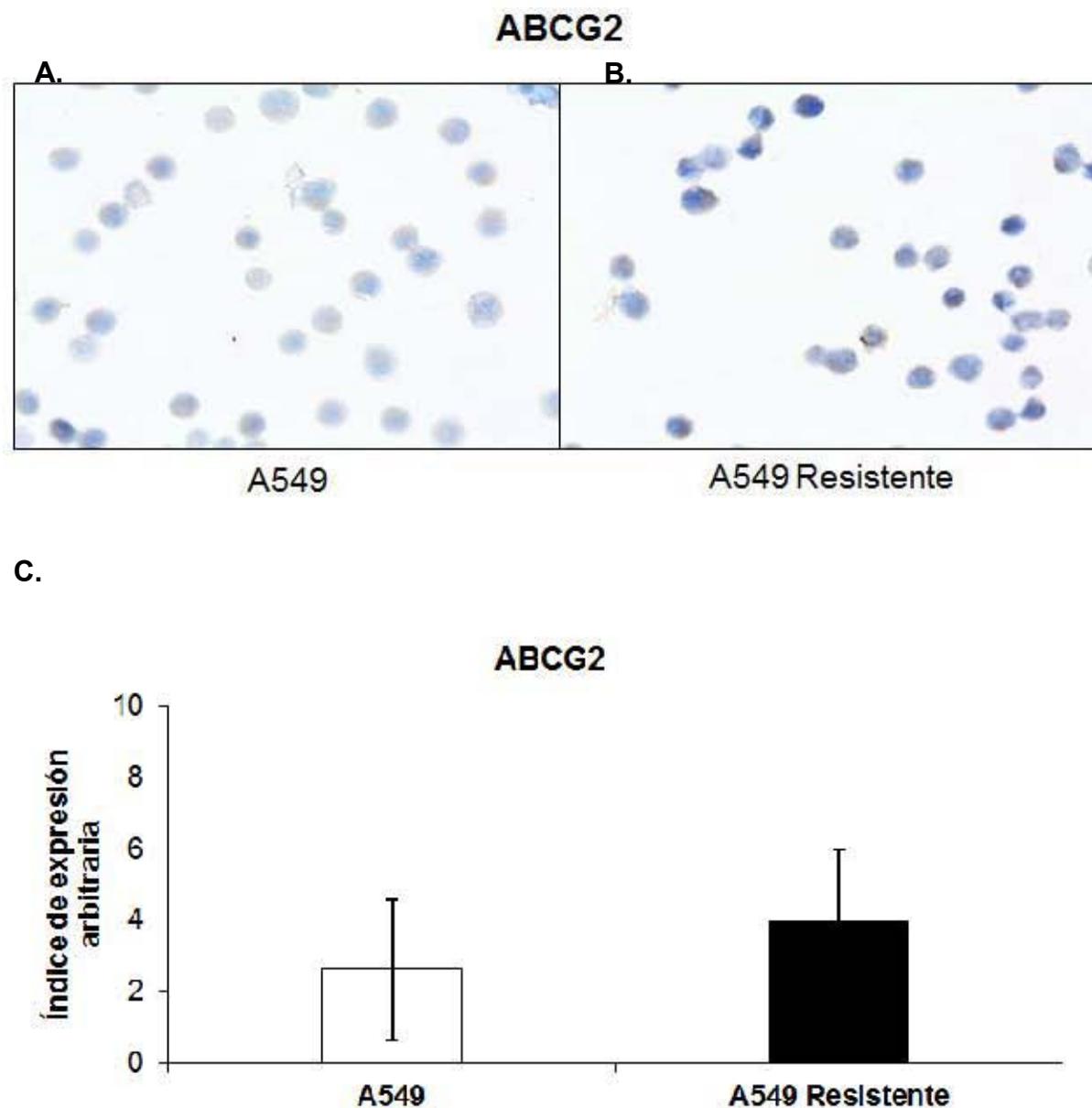
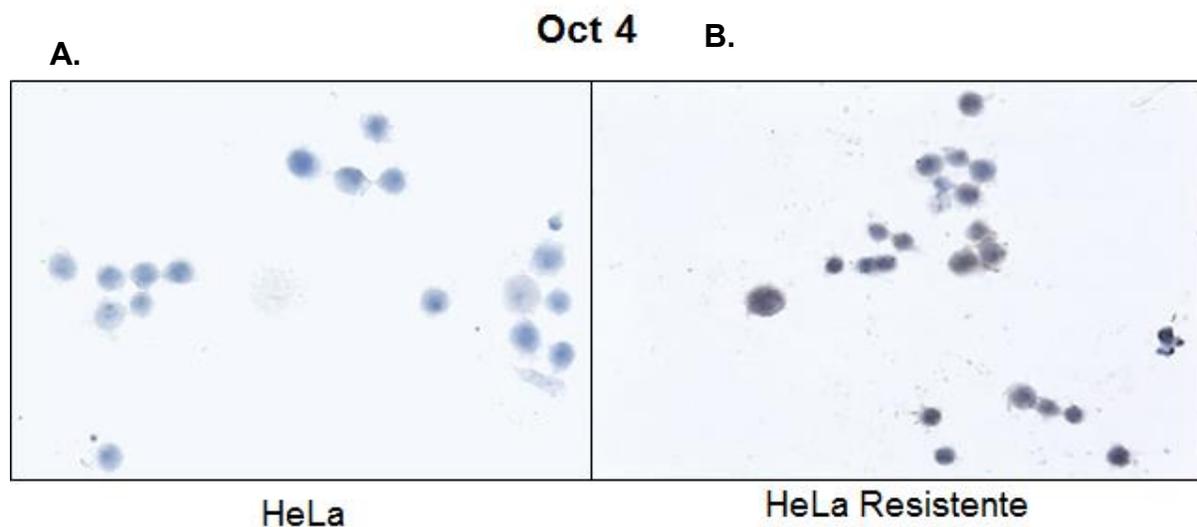


Figura 18. Análisis de Expresión de ABCG2 en Líneas Celulares Parentales y Quimiorresistentes de Cáncer de Pulmón A549 Mediante Inmunocitoquímica. A) Imagen que Representa la Expresión de ABCG2 en A549 parental, B) Expresión de ABCG2 en A549 resistente a 5µM de cisplatino. C) Gráfica que Representa el Nivel de Expresión de ABCG2 en Líneas Celular A549 Parental y A549 Resistente a 5µM de cisplatino. En la

gráfica se muestran las medias de la línea celular parental y la línea celular resistente +/- S.D.

9.3.2. Alteraciones en la Expresión de Oct 4 en Líneas Celulares Quimiorresistentes Inducibles

Nuestro análisis para evaluar Oct4 en células parentales y quimiorresistentes en cáncer de cérvix y cáncer de pulmón, se realizó empleando anticuerpo dirigido a Oct 4 y empleo de la herramienta del immunoratio del programa Image J. A partir de los datos derivados del análisis de imagen se determinó que 0.42% de las células HeLa parentales expresan Oct4; mientras que en células HeLa quimiorresistentes a 1µM se detectó un aumento cercano al 16% de células Oct 4 positivas (Figura 19).



C.

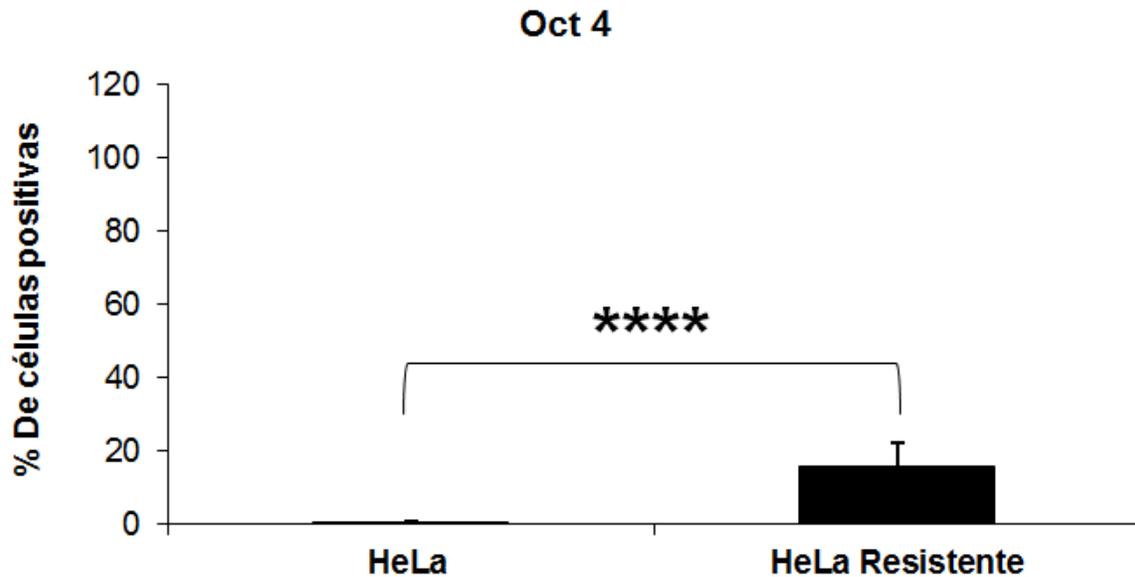
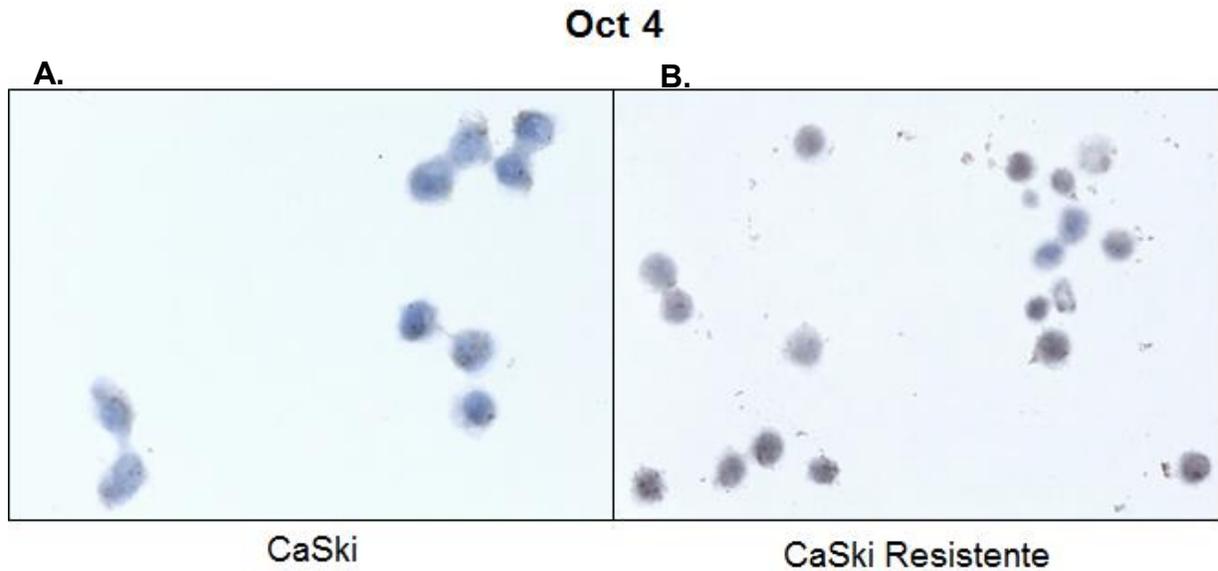


Figura 19. Análisis de Expresión de Oct4 en Líneas Celulares HeLa Parentales y Quimiorresistente Mediante Inmunoquímica. A) Oct 4 en HeLa parental B) Oct4 en HeLa resistente a 1 μ M de cisplatino. C) Gráfica que representa la expresión de Oct 4 en las líneas celulares HeLa parental y quimiorresistente. En la gráfica se muestran las medias de la línea celular parental y la línea celular resistente +/- S.D., se determinó aumento en la expresión de proteína Oct4 en línea celular HeLa resistente con respecto a su parental, con diferencias estadísticamente significativas aplicando prueba t de Student ($p < 0.0001$).

Adicionalmente en células CaSki se determinó un aumento en la expresión de Oct4 cercanos al 39% en células quimioresistentes a 1 μ M de cisplatino, en contraste de su línea celular parental con 3.32%. Esto permitió confirmar el incremento en la inducción de la proteína Oct-4 en células resistentes a cisplatino (Figura 20).



C.

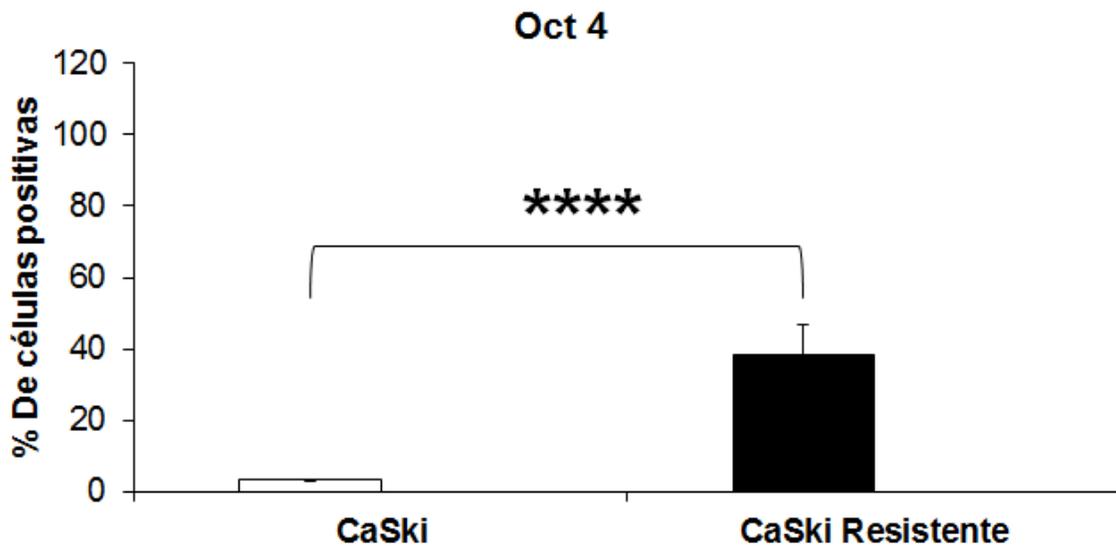


Figura 20. Análisis de Expresión de Oct4 en Línea Celular CaSki Parental y Quimiorresistente Inducible Mediante Inmunocitoquímica. A) Oct4 en CaSki parental B) Oct4 en CaSki resistente a $1\mu\text{M}$ de cisplatino C) Gráfica que representa la expresión de Oct 4 en líneas celulares CaSki parental y quimiorresistente. En la gráfica se muestran las medias de la línea celular parental y la línea celular resistente \pm S.D., se determinó el aumento en la expresión de Oct4 en células CaSki resistentes con respecto a su línea celular parental aplicando prueba t de Student ($p < 0.0001$).

Quimiorresistente Inducible. En la gráfica se muestran las medias de la línea celular parental y la línea celular resistente +/- S.D.

Adicionalmente, el porcentaje de expresión de la proteína Oct4 obtenido para la línea celular de cáncer de pulmón A549 parental fue de 96.22%, mientras que para la línea celular quimiorresistente fue de 98.78%, sin embargo no existen diferencias significativas (Figura 22).

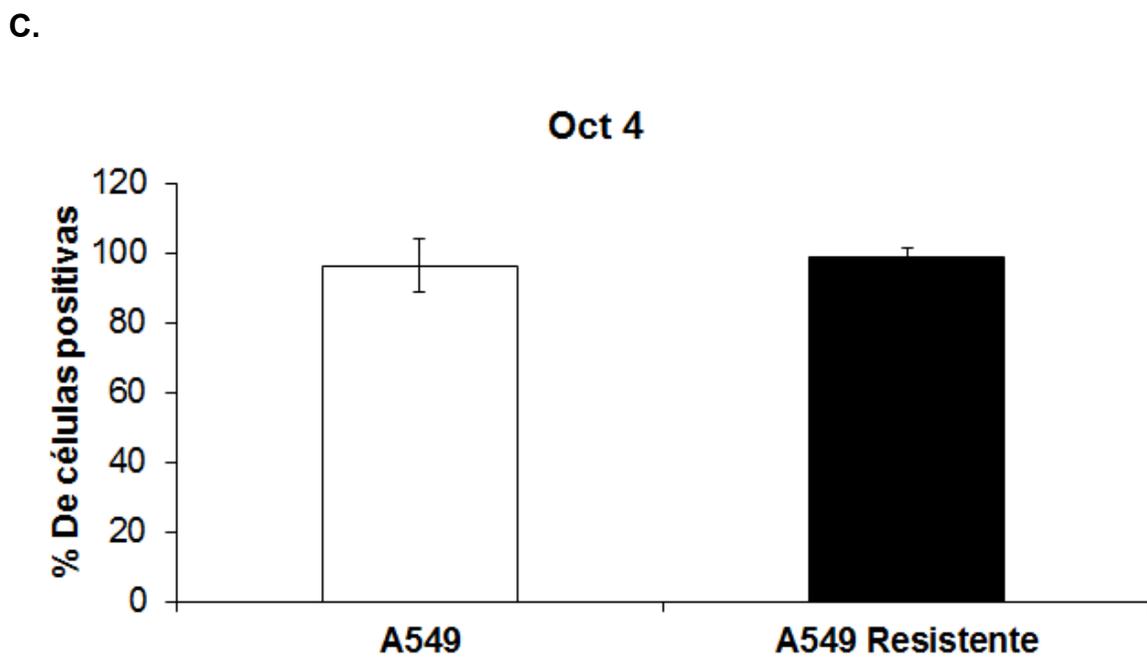
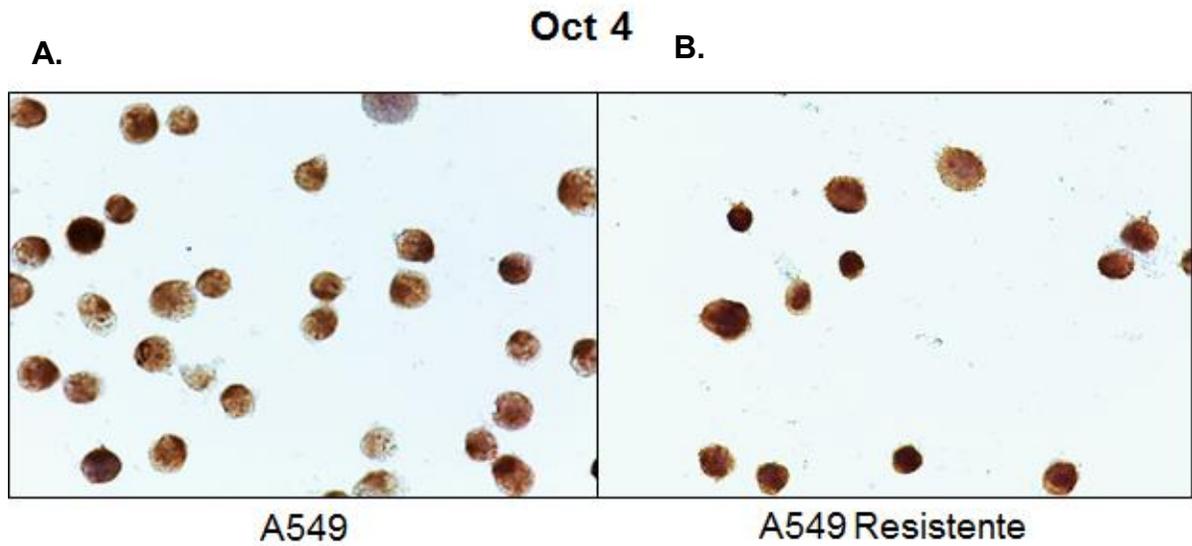
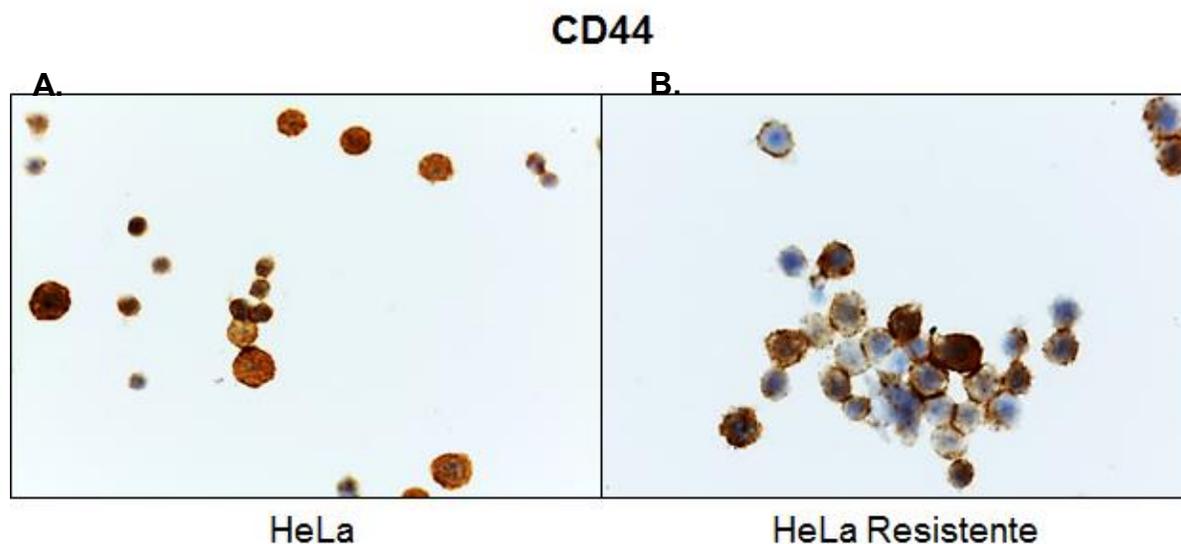


Figura 22. Análisis de Expresión de Oct 4 en Línea Celular A549 Parental y Quimiorresistente Mediante inmunocitoquímica. A) Oct4 en A549 parental B) Oct4 en A549 resistente a 5 μ M de cisplatino. C) Gráfica que Representa la Expresión de la proteína de Oct4 en ambos modelos celulares A549 parental y quimiorresistente inducible. En la gráfica se muestran las medias de la línea celular parental y la línea celular resistente +/- S.D.

9.3.3 Expresión de CD44 en líneas celulares quimiorresistentes inducibles

Nuestros análisis para evaluar CD44 en modelos celulares parentales y quimiorresistentes de cáncer de cérvix y cáncer de pulmón, mediante el uso de anticuerpo dirigido a CD44, y empleando la aplicación immunoratio del programa Image J, permitió identificar que la línea celular de cáncer de cérvix HeLa, CD44 se expresó en cerca del 100% de células parentales, mientras que modelo quimiorresistente no mostró cambios significativos con el 97.5% de células CD44 positivas (Figura 23).



C.

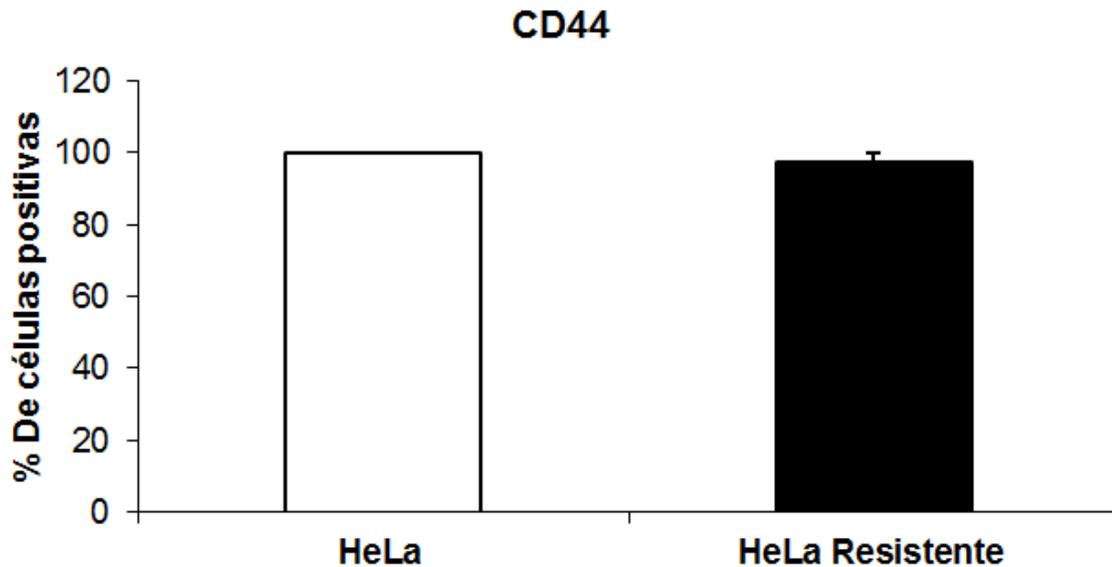


Figura 23. Análisis de Expresión de CD44 en Líneas Celulares HeLa Parentales y Quimiorresistente Mediante Inmunocitoquímica. A) CD44 en HeLa parental B) CD44 en HeLa resistente a $1\mu\text{M}$ de cisplatino. C) Gráfica que representa la expresión de la proteína de CD44 en células HeLa parental y quimiorresistente. En la gráfica se muestran las medias de la línea celular parental y la línea celular resistente \pm S.D.

Mientras que nuestro análisis de expresión de la proteína CD44 en línea celular CaSki parental y quimiorresistente, evidenció cambios en la inducción del modelo celular quimiorresistente a cisplatino con cerca del 81% de células CD44 positivas, con respecto a su línea celular parental en la cual no fue posible detectar niveles del expresión (Figura 24).

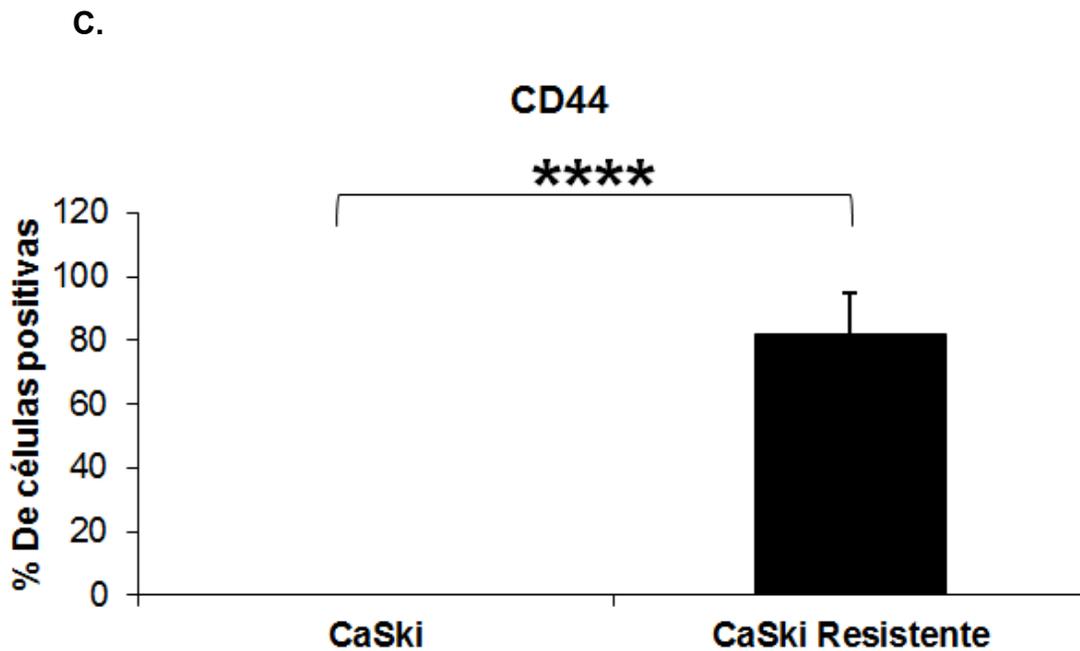
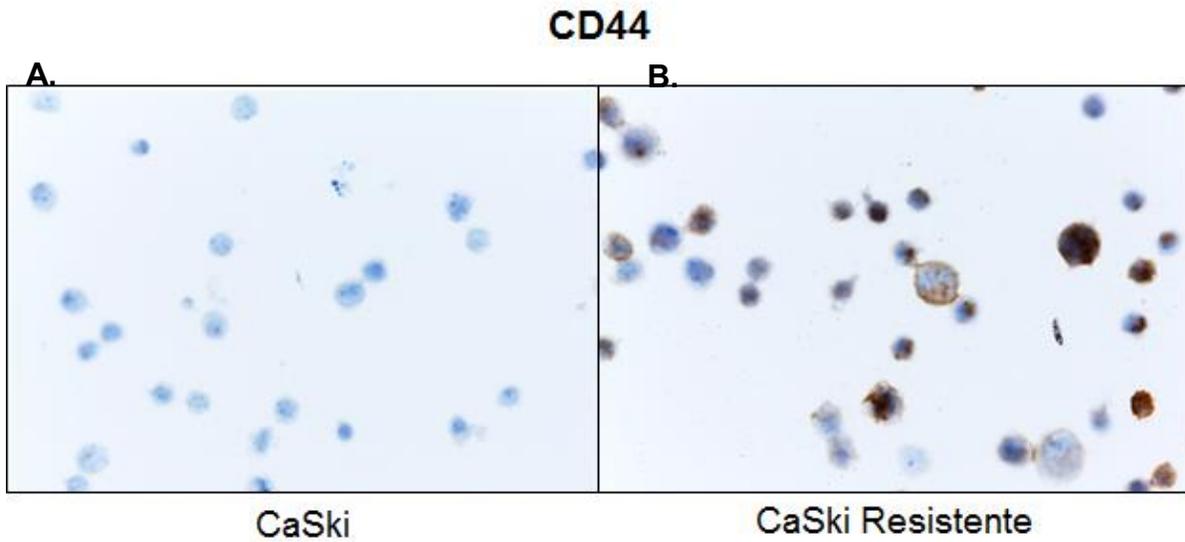


Figura 24. Análisis de Expresión de CD44 en Línea Celular CaSki Parental y Quimiorresistente Mediante Inmunoquímica. A) CD44 en CaSki parental B) CD44 en CaSki resistente a 1µM de cisplatino. C) Gráfica que representa la expresión de proteína de CD44 en CaSki parental y quimiorresistente. En la gráfica se muestran las medias de la línea celular parental y la línea celular resistente +/- S.D., se determinó el incremento de la expresión de la proteína CD44 en la línea celular CaSki resistente con respecto a su línea celular parental aplicando prueba t de Student ($p < 0.0001$).

Adicionalmente nuestro análisis de expresión de la proteína CD44 en líneas celulares parental y quimiorresistente de cáncer pulmonar A-427, se determinó la falta de diferencias significativas, ya que en ambos grupos de células fueron cercanas al 100% células CD44 positivas (Figura 25).

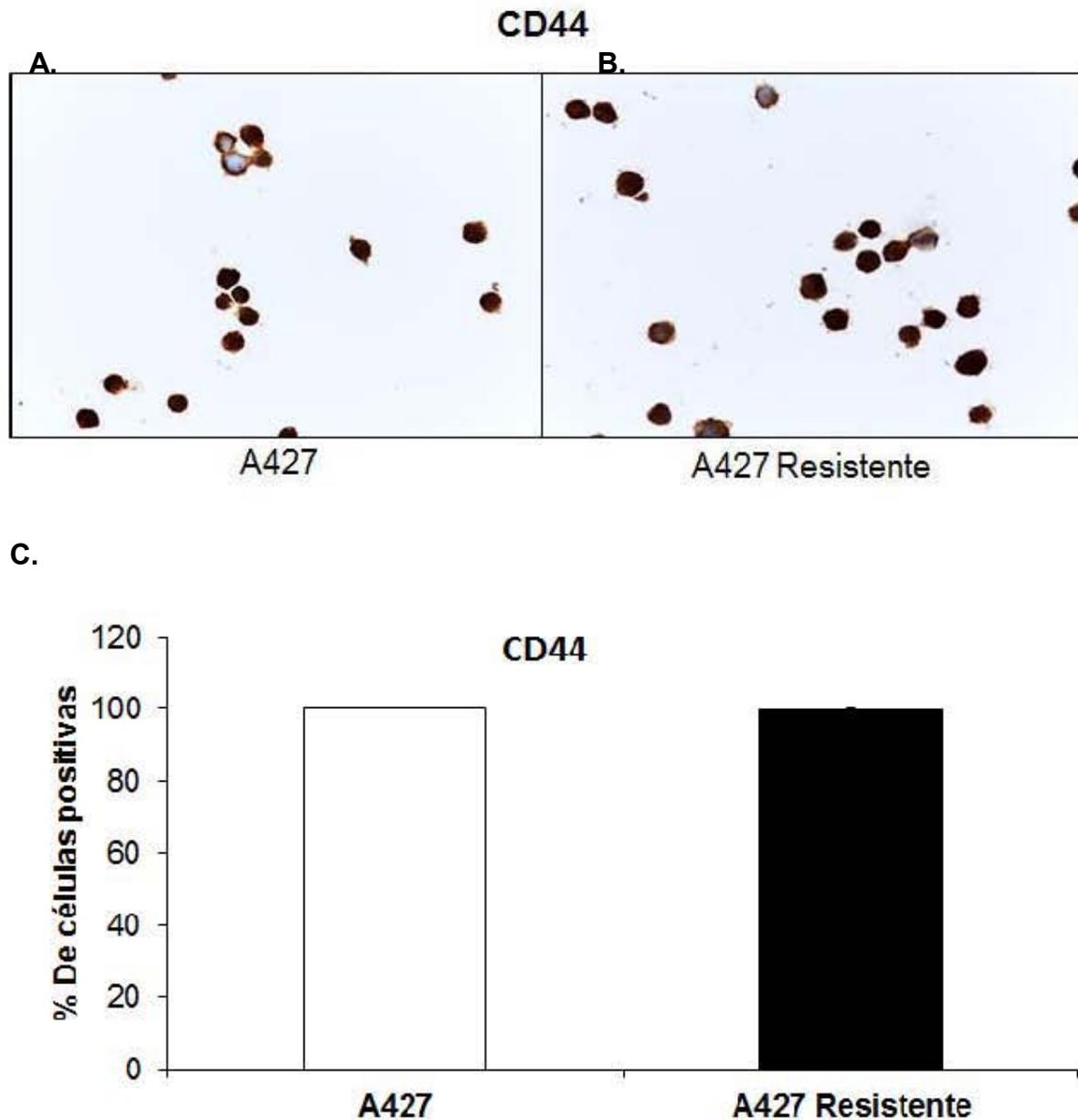


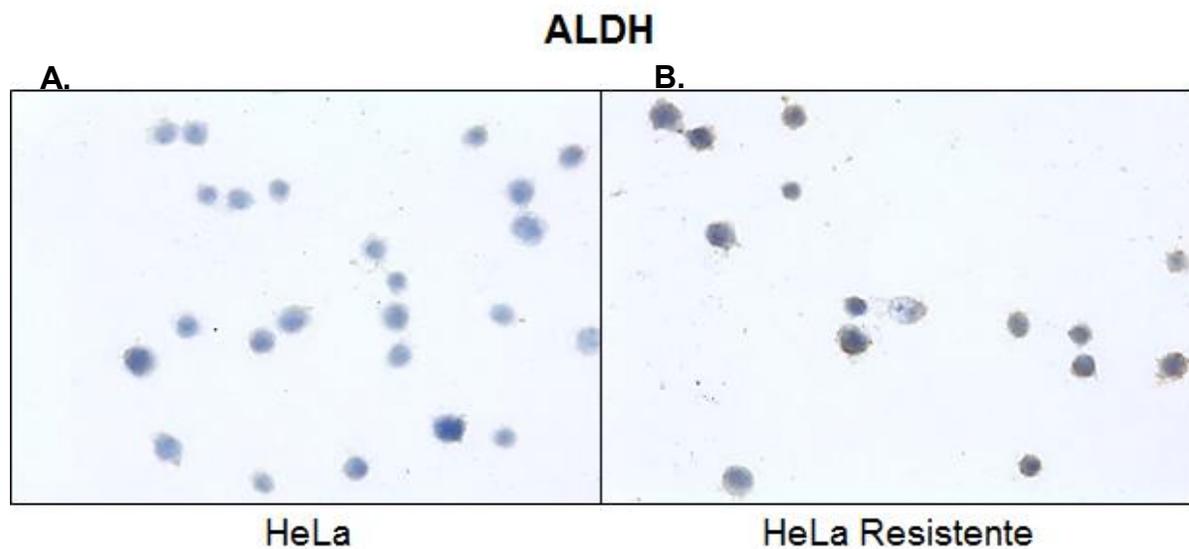
Figura 25. Análisis de Expresión de CD44 en Línea Celular A427 Parental y Quimiorresistente Mediante Inmunocitoquímica. A) CD44 en Células A427 Parental B) CD44 en A-427 resistente a 5 μ M de cisplatino. C) Gráfica que Representa la Expresión de CD44 entre Células A-427 Parental y Quimiorresistente. En la gráfica se muestran las medias de la línea celular parental y la línea celular resistente +/- S.D.

A549 resistente a 5µM de cisplatino. C) Gráfica que Representa la expresión de CD44 en A549 parental y quimiorresistente. En la gráfica se muestran las medias de la línea celular parental y la línea celular resistente +/- S.D, se determinó el incremento de la expresión de la proteína CD44 en células A549 resistentes a cisplatino con respecto a su parental aplicando una prueba t de Student ($p < 0.0001$).

9.3.4. Cambios en la Expresión de ALDH en Células Quimiorresistentes Inducibles

Para evaluar ALDH en los modelos parentales y quimiorresistentes de cáncer de cérvix y cáncer de pulmón, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica con un anticuerpo dirigido a ALDH, posteriormente se tomaron microfotografías y la expresión de la proteína fue evaluada tomando en cuenta el análisis obtenido con la aplicación immunoratio del programa Image J.

Nuestro análisis determinó incremento en la expresión de la proteína ALDH en modelo celular quimiorresistente con cerca de 14.48% de células positivas, con respecto a su línea celular parental donde se detectó 5% células ALDH positivas (Figura. 27).



C.

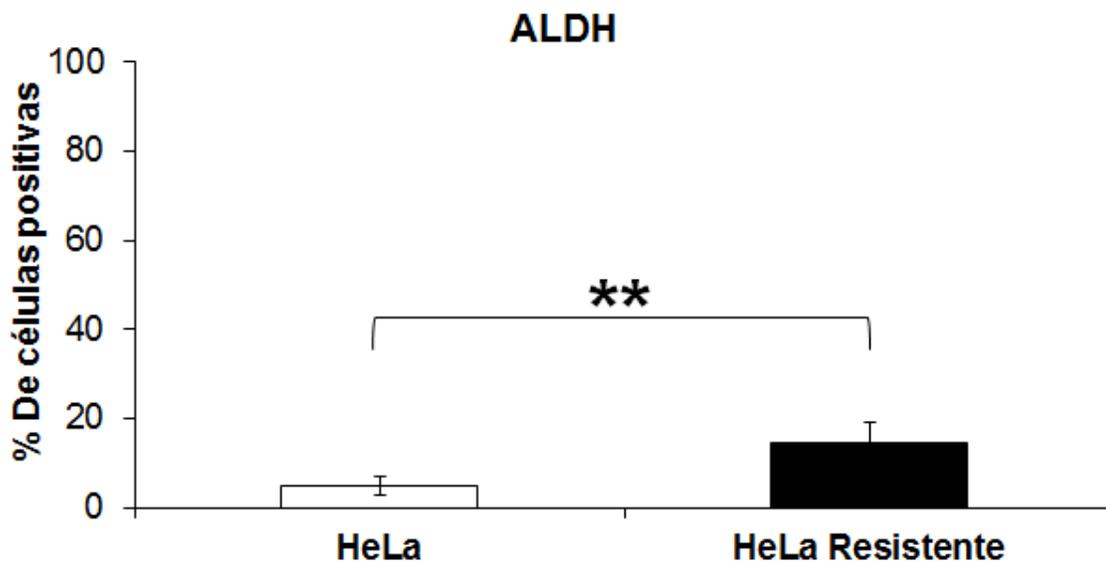


Figura 27. Análisis de la Expresión de la Proteína ALDH en Línea Celular HeLa Parental y Quimiorresistente Mediante Inmunocitoquímica. Expresión de la proteína ALDH en líneas celulares HeLa parental y quimiorresistente mediante inmunocitoquímica. A) Expresión de ALDH en HeLa parental B) Expresión de ALDH en HeLa resistente a 1 μ M de cisplatino. C) Gráfica que Representa la expresión de la proteína de ALDH en HeLa parental y quimiorresistente. En la gráfica se muestran las medias de la línea celular parental y la línea celular resistente +/- S.D., se determinó el incremento de la expresión de la proteína ALDH en línea celular HeLa resistente con respecto a su parental aplicando una prueba t de Student ($p < 0.01$).

Adicionalmente nuestro análisis en líneas celulares CaSki parental y quimiorresistente, identifico aumento en el porcentaje de células ALDH positivas de 89.92%, en contraste de 29.74% de células positivas para ALDH en línea celular parental (Figura. 28).

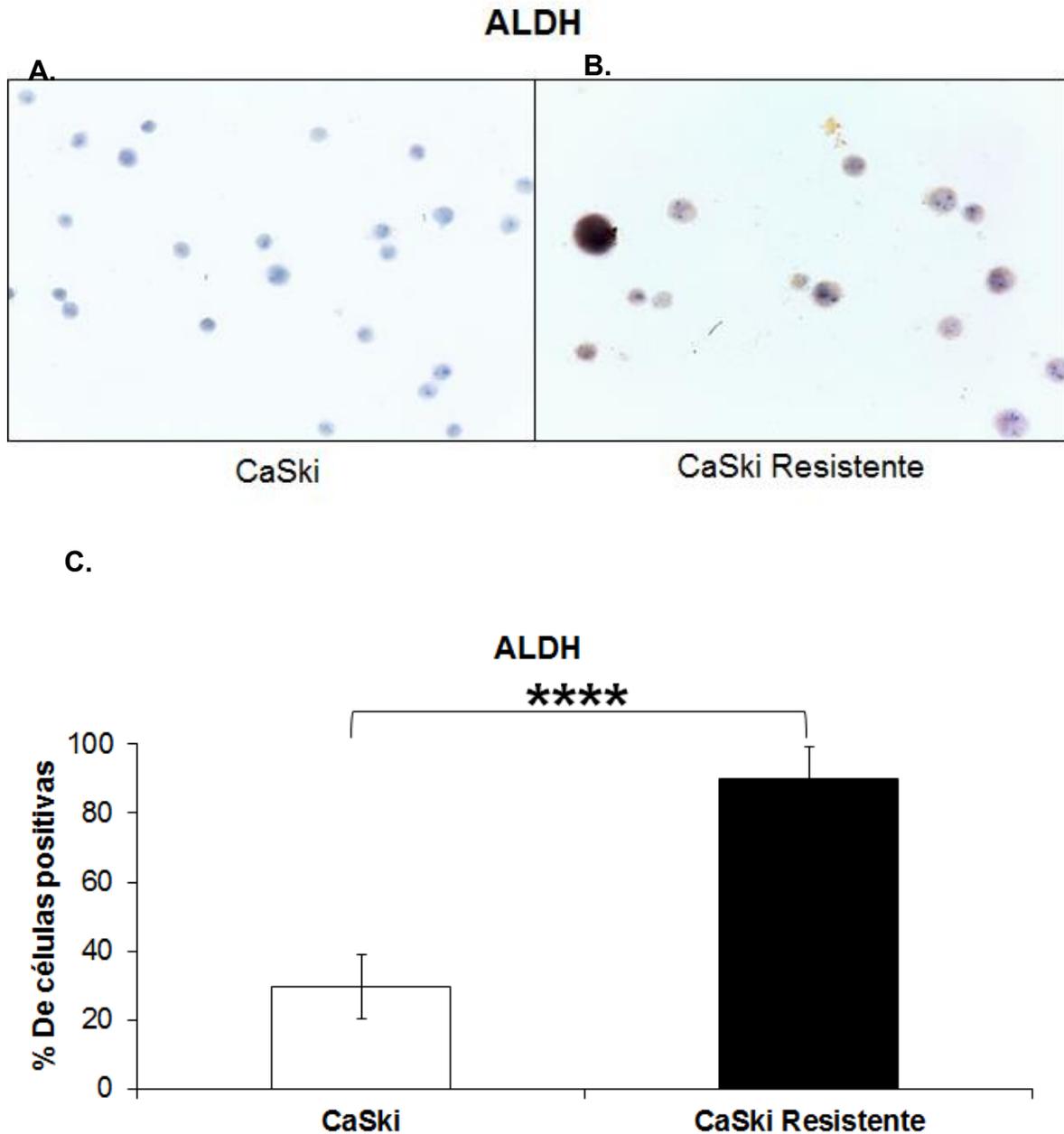
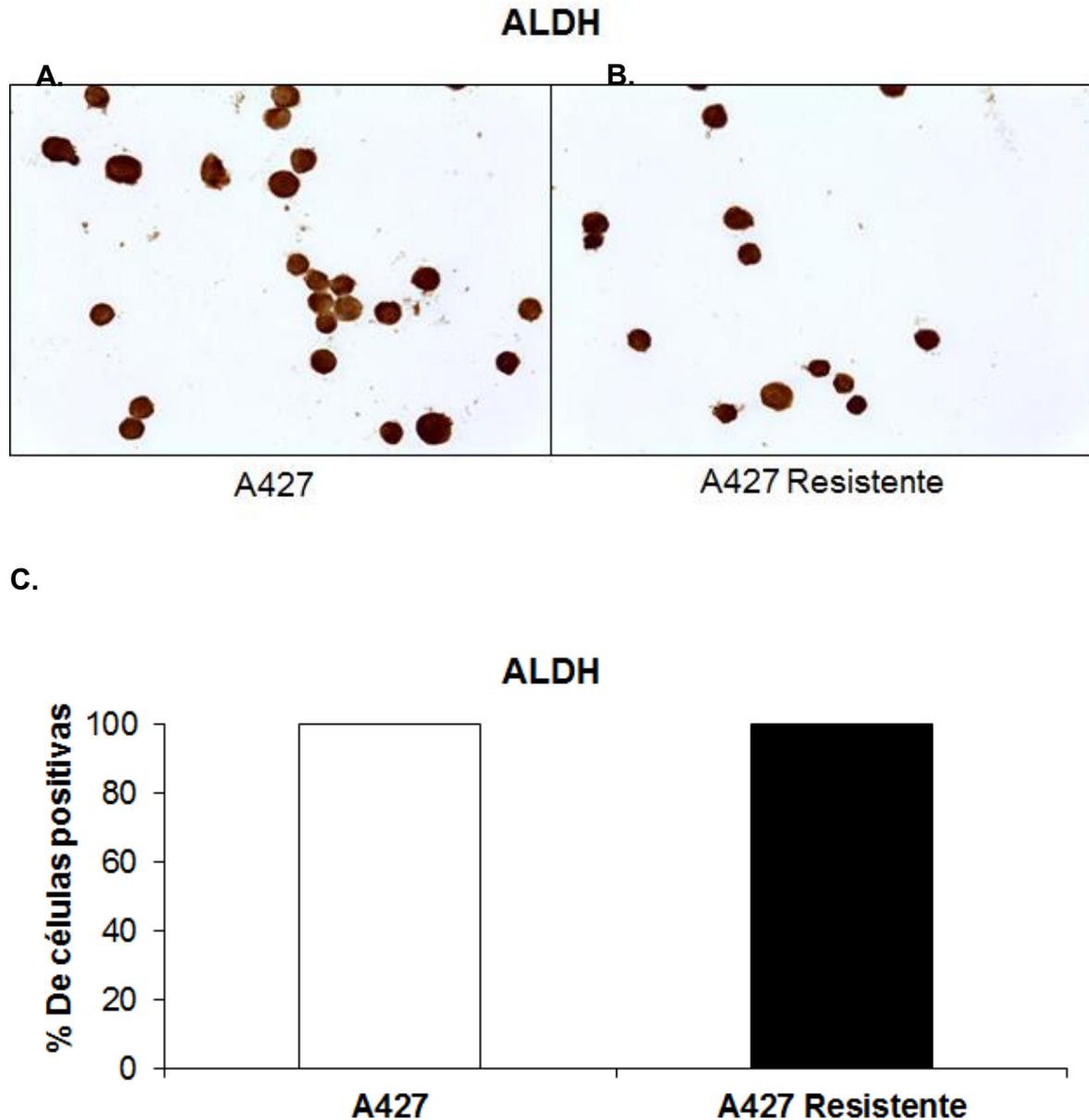


Figura 28. Análisis de Expresión de la Proteína ALDH en Línea Celular CaSki Parental y Quimiorresistente Mediante Inmunocitoquímica. A) Expresión de ALDH en CaSki parental B) Expresión de ALDH en CaSki resistente a 1 μ M de cisplatino. C) Gráfica que Representa la Expresión de la Proteína de ALDH en CaSki Parental y Quimiorresistente. En la gráfica se muestran las medias de la línea celular parental y la línea celular resistente +/- S.D., se determinó Incremento en la Expresión de ALDH en Línea Celular CaSki resistente con respecto a su Parental Aplicando Prueba t de Student ($p < 0.0001$).

Nuestro análisis de expresión de ALDH en línea celular de cáncer de pulmón A-427 parental y quimiorresistente, no se detectaron diferencias en la expresión de ALDH, en ambos casos el porcentaje de células positivas fue cercano 100% (Figura. 29).



.Figura 29. Análisis de Expresión de ALDH en Líneas Celular A427 Parental y Quimiorresistente Mediante Inmunocitoquímica. A) Expresión de la proteína ALDH en A427 parental. B) Expresión de la proteína ALDH en A427 resistente a 5µM de cisplatino. C) Gráfica que representa la expresión de la proteína ALDH en A427 parental y quimiorresistente. En gráfica se muestran las medias de la línea celular parental y la línea celular resistente +/- S.D.

Posteriormente nuestro análisis de expresión de ALDH en las líneas celulares A549 parental y quimiorresistente, arrojó que no hay diferencias significativas en la expresión de ALDH en la línea quimiorresistente (97.2%) respecto la parental (97.2%) (Figura 30).

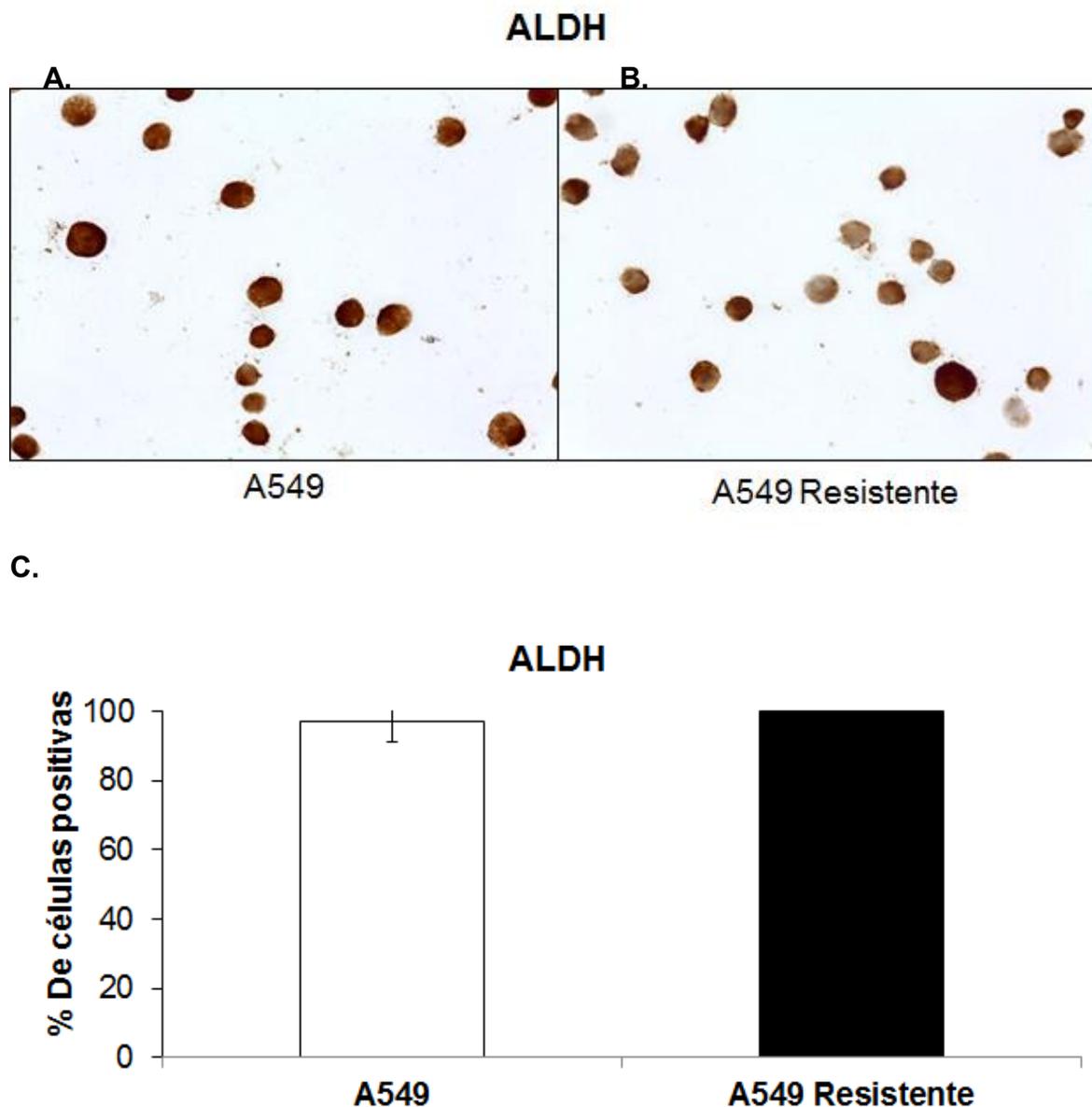


Figura 30. Análisis de Expresión de ALDH en Línea Celular A549 Parental y Quimiorresistente Mediante Inmunocitoquímica. A) Expresión de la proteína ALDH en A549 parental. B) Expresión de la proteína ALDH en A549 resistente a 5 μ M de cisplatino. C) Gráfica que Representa la expresión de la proteína ALDH en Células A549 parental y

quimiorresistente. En gráfica se muestran las medias de la línea celular parental y la línea celular resistente +/- S.D.

9.4. Alteraciones en perfil y nivel de expresión de lncRNAs en modelos celulares de CaCu quimiorresistentes inducibles a largo plazo

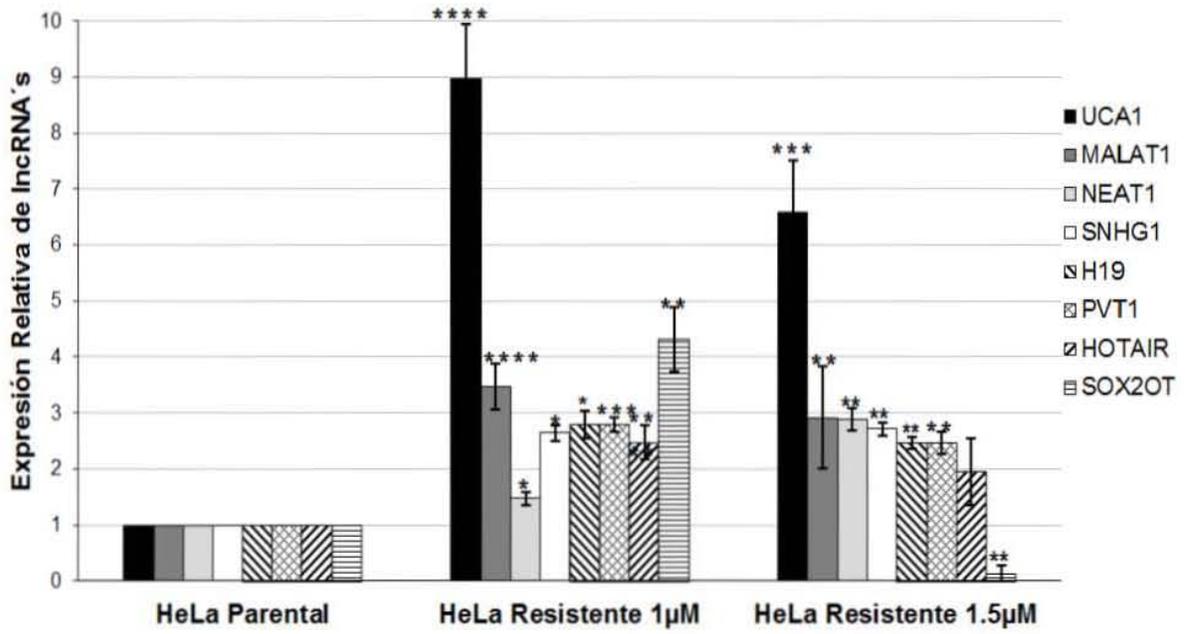
En líneas celulares de cáncer cervicouterino, fue evaluado el perfil de expresión de lncRNAs a diferentes tiempos de inducción de resistencia in vitro a cisplatino, por lo que el perfil de expresión en línea celular HeLa quimiorresistente fue evaluado a seis y ocho meses de tratamiento por Cisplatino, mientras que el perfil de expresión en células CaSki quimiorresistente inducibles fue evaluado a cuatro y ocho meses.

A este respecto los perfiles de expresión en células HeLa a seis meses se detectó inducción de la expresión de la mayoría de lncRNAs con excepción de NEAT1 el cual mantiene su nivel expresión semejante al basal en células HeLa 1 μ M, mientras que SOX2OT disminuye en HeLa 1.5 μ M. Adicionalmente el lncRNA con mayor inducción resulta UCA1 con ocho veces mayor expresión en células quimiorresistentes con respecto a su línea celular parental (Figura 31 A).

Adicionalmente, nuestro análisis a ocho meses de exposición a Cisplatino evidenció que la mayoría de lncRNAs poseen niveles de expresión basal, sin embargo destaca el nivel de inducción de UCA1, el cual se expresa cuatro veces más en HeLa 1 μ M, así mismo incremento en la expresión en células HeLa 1.5 μ M quimiorresistentes con respecto a su parental (Figura 31A).

Por su parte, H19 se expresa una magnitud mayor en células HeLa 1 μ M y HeLa 1.5 μ M quimiorresistentes con respecto a su parental, por ultimo HOTAIR fue posible detectar su inducción en cerca de 1.5 veces mayor en HeLa 1 μ M y 0.4 veces mayor en HeLa 1.5 μ M, con respecto a su línea celular parental (Figura 31B). A este respecto, es de llamar la atención la pérdida de la expresión de SOX2OT desde 4 meses a 1.5 μ M, y 8 meses probablemente representando un proceso de adaptación dependiente del tiempo de inducción y concentración de cisplatino (Figura 31A-B).

A.



B.

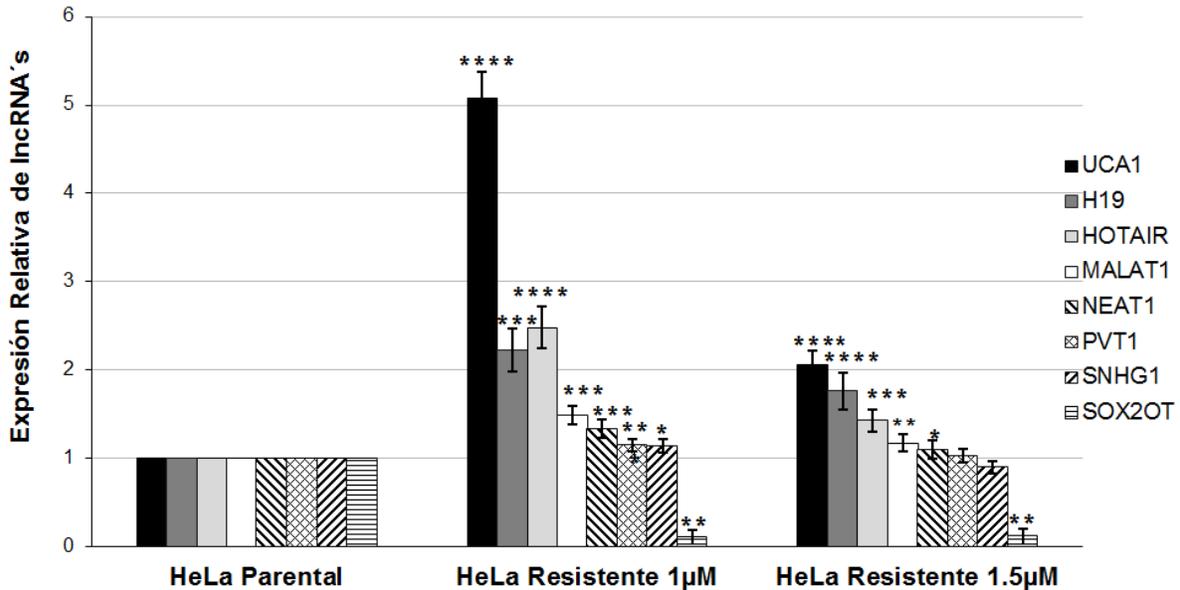


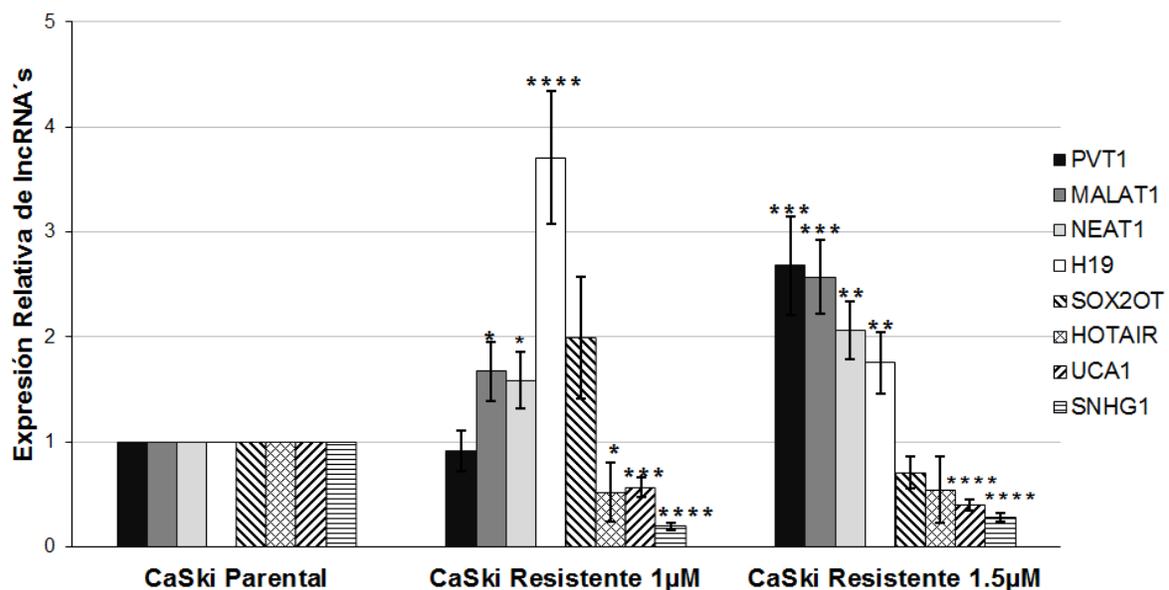
Figura 31. Cambios en el perfil de expresión de lncRNAs en células parentales y líneas celulares quimiorresistentes a largo plazo de cáncer de cérvix HeLa. A) Perfil de expresión de lncRNAs en HeLa parental y quimiorresistente a 1µM y 1.5µM a seis meses de exposición a Cisplatino. B) Perfil de expresión de lncRNAs en HeLa parental y quimiorresistente a 1µM y 1.5µM a ocho meses de exposición a Cisplatino. Los valores de expresión en células parentales se encuentran normalizadas a uno mediante el uso del gen endógeno U1, ensayos por triplicado. En las gráficas se muestran las medias de la línea celular parental y las líneas celulares resistente +/- S.D., se determinaron diferencias significativas del perfil de expresión entre ambas líneas celulares HeLa resistentes con respecto a su línea celular parental, mediante ANOVA de una vía (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, **** P<0.0001).

Adicionalmente, respecto al perfil de expresión obtenido en líneas celulares parentales y quimiorresistentes de CaSki a cuatro meses de inducción a resistencia a cisplatino fue posible detectar aumento en la expresión de MALAT1 cerca de 0.7 veces en CaSki 1µM con respecto a su parental. La expresión de NEAT1 fue 0.6 veces mayor, mientras que la expresión de H19 fue mayor 2.7 veces en contraste de su parental de manera similar en el modelo de CaSki resistente a 1µM de cisplatino fue expresado 1 veces mayor respecto a su parental, mientras que la expresión de SNHG1, UCA1 y HOTAIR disminuyó de manera significativa (Figura 32A).

Adicionalmente, respecto del perfil de expresión en células CaSki resistentes a 1.5µM de cisplatino fue posible detectar la expresión inducible de PVT1, MALAT1, NEAT1, H19, mientras que disminución de Sox2OT, HOTAIR, UCA1 y SNHG1, cuyos cambios representando diferencias estadísticamente significativas (Figura 32A).

Por otro lado, al evaluar el perfil de expresión a ocho meses de quimiorresistencia inducible, fue posible detectar que la mayoría de lncRNAs no muestran cambios en el nivel de expresión semejante a su nivel basal en células parentales, excepto para SNHG1 el cual disminuye su expresión en cerca de 50% para CaSki 1µM y CaSki 1.5µM, así como disminución de H19 en cerca del 70% en células CaSki 1µM y cerca de 80% en CaSki 1.5µM (Figura 32B), cuyo perfil de expresión contrasta de manera importante con el mismo modelo celular quimio resistente a 4 meses de inducción (Figura 32A).

A.



B.

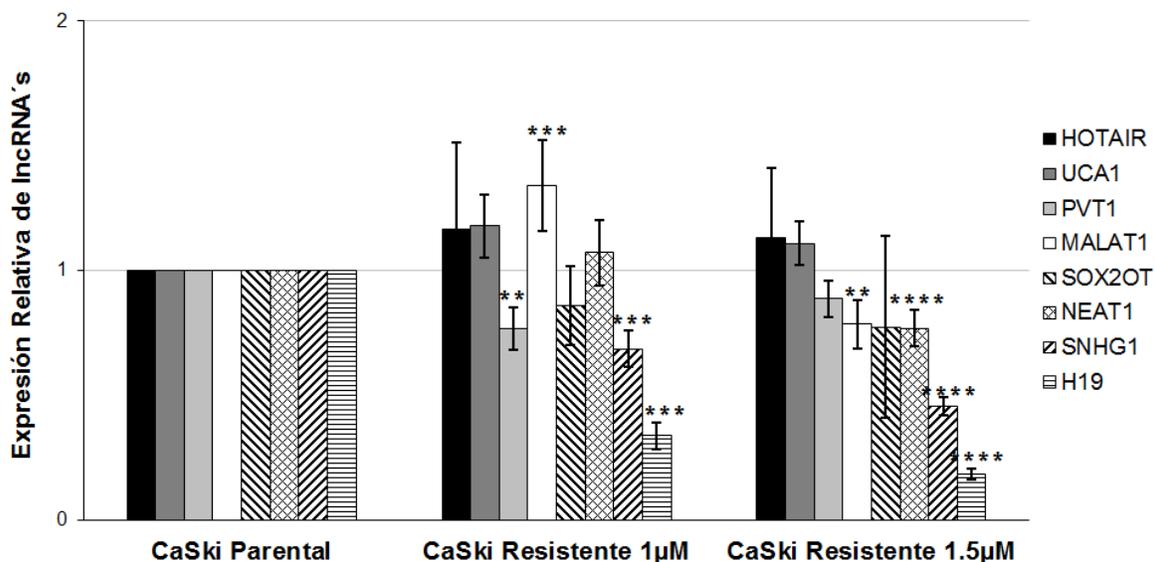


Figura 32. Cambios en el perfil de expresión de lncRNAs en células parentales y quimiorresistentes a largo plazo de cáncer de cérvix CaSki. A) Perfil de expresión de lncRNAs en CaSki parental y quimiorresistente a 1µM y 1.5µM a cuatro meses de exposición a cisplatino. B) Perfil de expresión de lncRNAs en CaSki parental y quimiorresistente a 1µM y 1.5µM a ocho meses de exposición a Cisplatino. Línea celular parental normalizada mediante el uso del gen endógeno U1, expresión basal ajustada a 1 en células parentales, mediante ensayos por triplicado. En las gráficas se muestran las medias de la línea celular parental y las líneas celulares resistente +/- S.D., se determinaron las diferencias significativas del perfil de expresión en líneas celulares CaSki resistentes con respecto a su línea celular parental, mediante el uso de ANOVA de una vía (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, **** P<0.0001),

Posteriormente, con el objeto de evaluar cambios en la expresión de lncRNAs a corto plazo frente a exposición a cisplatino, evaluamos el perfil de expresión en células HeLa parental durante un reto farmacológico por Cisplatino a 48 horas, observando que el uso de concentraciones 2µM y 5µM de cisplatino no provoca cambios significativos sobre la mayoría de lncRNAs con respecto de su nivel de expresión basal. Mientras que destaca de manera importante la inducción de UCA1 y HOTAIR con tres y dos veces una magnitud mayor, respectivamente, durante su exposición por 48 hrs a 8µM de cisplatino. Mientras que, de manera destacada fue

posible detectar disminución de 50-70% en la expresión SNHG1 en células expuestas a 2µM, 5µM y 8µM de cisplatino (Figura 33).

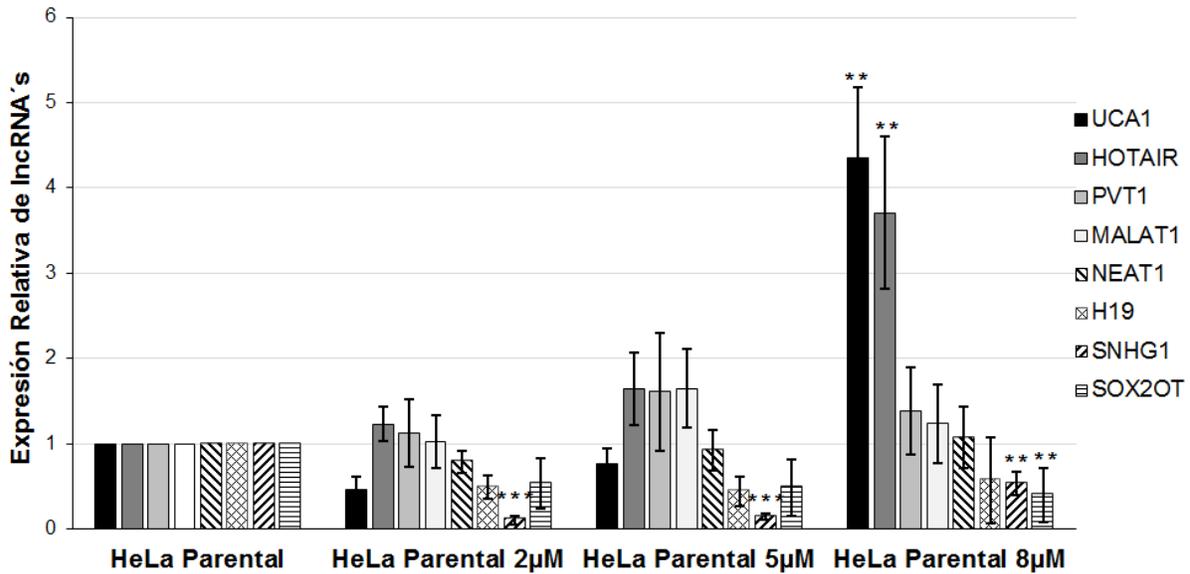


Figura 33. Perfil de expresión de lncRNAs en línea celular parental de cáncer de cérvix HeLa frente a reto farmacológico de cisplatino de corto plazo (48 hrs). Línea celular HeLa parental expuesta a 2µM, 5µM y 8µM de cisplatino. Expresión basal en línea celular parental ajustada a uno, y normalizada mediante el gen endógeno U1, ensayos por triplicado. Se determinó que la línea celular HeLa parental expuesta a reto farmacológico por 48 horas empleando concentraciones de 2µM, 5µM y 8µM de cisplatino disminuye la expresión de SNHG1, mientras que concentraciones de 8µM provoca aumento en la expresión de UCA1 y HOTAIR de manera estadísticamente significativa con respecto a su línea celular parental libre de fármaco, mediante el uso de ANOVA de una vía (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, **** P<0.0001). En las gráficas se muestran las medias de la línea celular parental y las líneas celulares expuestas 48hrs a distintas concentraciones de cisplatino +/- S.D.

9.5. Alteraciones en el perfil y nivel de expresión de lncRNAs en células quimiorresistentes inducibles de cáncer pulmonar

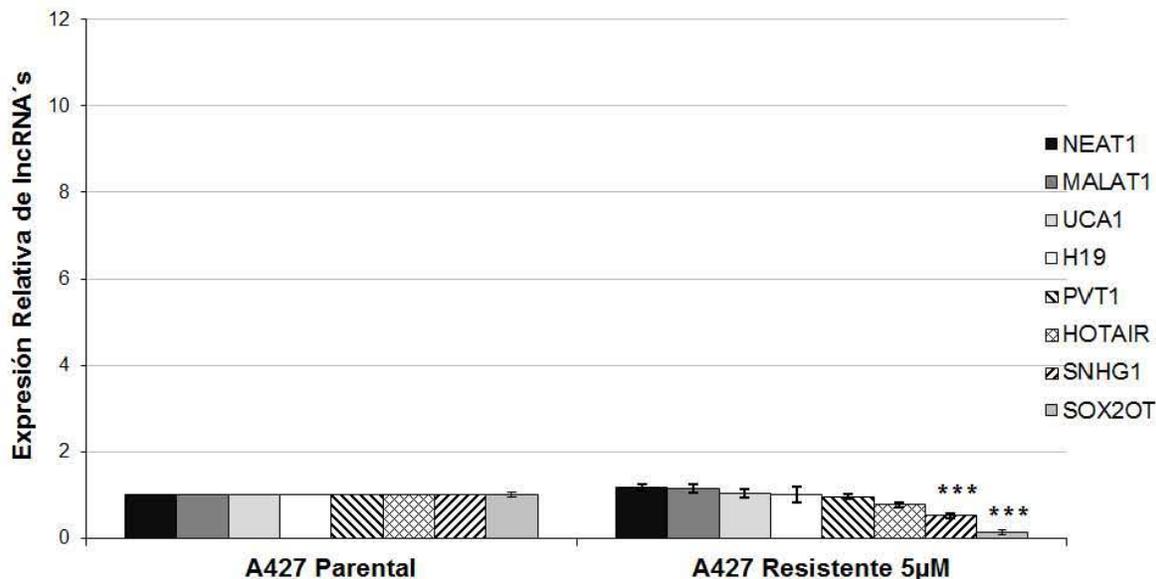
Nuestro análisis de expresión en células de cáncer pulmonar A-427 quimiorresistentes inducibles a doce meses señaló que la mayoría de lncRNAs estudiados en el presente trabajo no mostraron cambios en la expresión con

respecto de su línea celular parental. Mientras que fue posible detectar mínimas variaciones en la expresión de HOTAIR (Figura 34A).. Sin embargo, destaca la significativa disminución en la expresión de SNHG1 en cerca del 50%, mientras que disminución del 90% en la expresión de Sox2OT en células quimiorresistentes A-427 con respecto de su línea celular parental (Figura 34A).

Por otra parte, respecto del perfil y nivel de expresión para el modelo celular de cáncer de pulmón A-549 resistente a doce meses fue posible detectar la expresión inducible de prácticamente todos los lncRNAs incluidos al presente trabajo destacando Sox2Ot con aumento en la expresión de hasta doce veces superior comparado con células parentales, así como UCA1 con aumento en la expresión de hasta diez veces superior con respecto a su línea celular parental (Figura 34B). Adicionalmente, logró ser detectable un aumento moderado en la expresión inducible de los lncRNAs SNHG1, MALAT y H19 (Figura 34B)

Los datos obtenidos en ambos modelos celulares, sugieren que las células recurren a distintos mecanismos para adaptarse a la exposición a cisplatino a largo plazo en líneas celulares independientemente del origen epitelial.

A.



B.

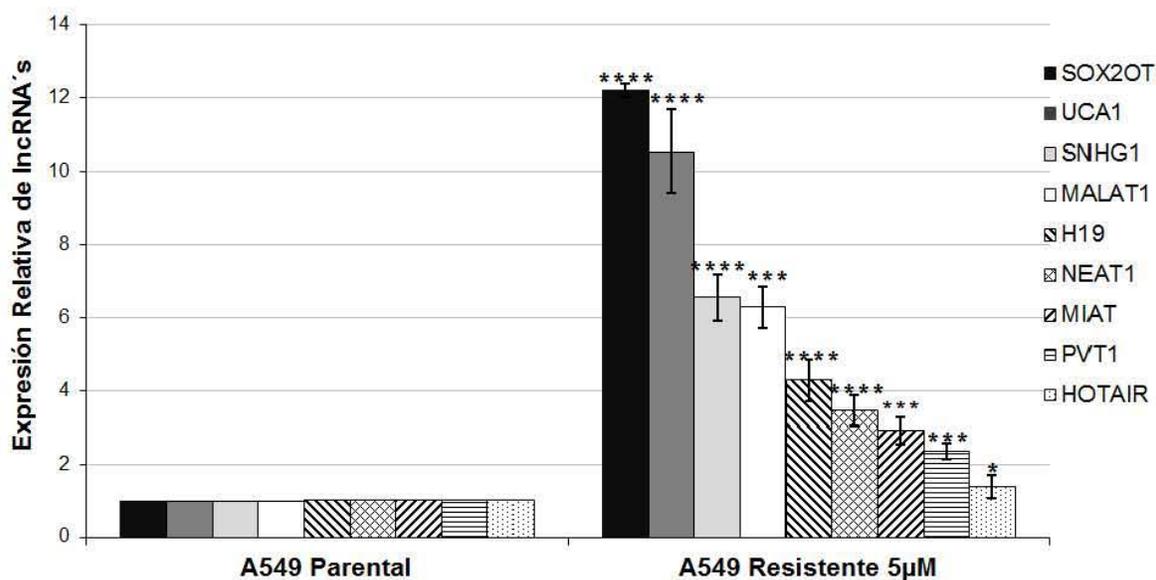


Figura 34. Perfil de expresión de lncRNAs en líneas celulares parentales y modelos de cáncer de pulmón quimiorresistente a largo plazo (doce meses) A) Perfil de expresión de lncRNAs en A427 parental versus A427 5µM. B) Perfil de expresión de lncRNAs en A549 parental versus A549 5µM. Línea celular parental ajustada a uno,

expresión normalizada mediante gen endógeno U1, ensayos por triplicado. . En las gráficas se muestran las medias de la línea celular parental y la línea celular resistente +/- S.D., se determinaron diferencias significativas del perfil de expresión en líneas celulares A427 y A549 resistentes a cisplatino con respecto a su parental, aplicando prueba de t (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, **** P<0.0001).

10. DISCUSIÓN

En cáncer son diversos los mecanismos de resistencia a fármacos oncológicos como fenómeno de escape de células tumorales frente al tratamiento oncológico, asegurando su permanencia en el huésped, cuyo término se conoce con el nombre de resistencia a la quimioterapia o “quimiorresistencia”⁷⁴ Una estrategia adecuada para el estudio de los mecanismos de quimiorresistencia ha sido el empleo de líneas celulares con capacidad de quimiorresistencia innata y adquirida frente a fármacos basados en cisplatino, entre ellos cáncer de cérvix y pulmón, donde la participación de lncRNAs constituye una manifestación de adaptación del tumor frente al esquema de tratamiento oncológico⁷⁵.

Un primer acercamiento al fenómeno de quimiorresistencia es el desarrollo de ensayos farmacológicos de citotoxicidad por la técnica de MTS, donde nuestros resultados evidenciaron la capacidad de resistencia innata a cisplatino entre líneas celulares parentales. Al respecto, se determinó que el índice de letalidad de 50% sobre la población (IC50) para líneas celulares CaSki es mayor en contraste de línea celular HeLa (ver Figura 10). Al respecto nuestros datos confirman lo previamente reportado por García-López y cols, cuyos autores identificaron que la línea celular CaSki presenta mayor resistencia innata respecto a la línea celular HeLa⁷⁶. Adicionalmente nuestro trabajo analizó la quimiorresistencia innata entre líneas celulares de cáncer de pulmón A549 y A427, determinando que el índice IC50 para la línea celular A427 fue mayor comparado con línea celular A549, cabe mencionar que este es el primer reporte de la resistencia innata de A427 con respecto a células A549.

Adicionalmente un objetivo del presente trabajo fue promover o establecer modelos celulares de mayor capacidad quimiorresistente o considerada adquirida, para ello líneas celulares de cáncer de cérvix, expuestas a cisplatino de manera continua en meses desarrollaron un mayor índice IC50 comparado con su líneas celulares parentales (ver Figura 10). Al respecto, en modelo de celular de HeLa se alcanzó quimiorresistencia con índice de IC50 3.05 veces mayor a células parentales.

Mientras que, en el caso de células CaSki la IC50 fue 2.05 veces mayor que células CaSki parental. Por otra parte, fueron comparados el índice IC50 frente a cisplatino para las líneas celulares de cáncer pulmonar parental, detectando que las líneas celulares A427 y A549 desarrollaron 2.3 y 3.6 veces más, respectivamente la capacidad de resistencia en contraste de líneas celulares parentales. Se ha reportado que al generar líneas celulares quimiorresistentes de pulmón entre las que se encuentra A549, al ser expuestas a 5µM de cisplatino durante seis meses, la resistencia a cisplatino incrementa hasta 15 veces respecto a la parental⁸⁷.

Así mismo, en ambos casos de cáncer de cérvix y cáncer pulmonar, se detectó que el diámetro celular en líneas celulares de cáncer de cérvix quimiorresistentes fue mayor en HeLa y CaSki, con relación a su contraparte parental, siendo este el primer reporte del incremento en el diámetro en las líneas celulares quimiorresistentes.

Frente a lo anterior algunos mecanismos involucrados en el proceso de resistencia a cisplatino intrínseca o adquirida han destacado: la absorción de fármaco o eflujo, la inactivación de cisplatino por moléculas que contienen azufre, alteraciones en la expresión de oncogenes y supresores de tumor, así como mecanismos de reparación de daño al DNA⁷⁷. Algunas de las moléculas involucradas en los distintos mecanismos de resistencia a terapia son utilizadas como marcadores de células troncales del cáncer⁷⁸, por lo tanto en el presente trabajo se evaluó la expresión de proteínas propuestas para la identificación del inmunofenotipo troncal del cáncer, que además pudieran estar contribuyendo a la resistencia a cisplatino en modelos celulares de cáncer de cérvix y pulmón.

Respecto a lo anterior, el primer marcador evaluado experimentalmente ha sido ABCG2, el cual se ha reportado sobre-expresado durante la resistencia a fármacos generalmente quimioterapéuticos⁷⁹.

En este trabajo incorporamos el análisis de expresión de ABCG2 en líneas celulares CaSki parental y quimiorresistente, sin embargo no fueron detectados cambios en la expresión de la proteína ABCG2; mientras que en línea celular HeLa quimiorresistente, fue posible detectar inducción en la expresión de la proteína ABCG2 con respecto a línea celular parental. Mientras que, los resultados obtenidos

en línea celular HeLa concuerda con lo reportado en cultivos celulares tridimensionales o esferoides (3D) provenientes de cultivos primarios de pacientes con cáncer de cérvix, y cultivados en condiciones de troncalidad, en donde las que expresan mayores niveles de ABCG2, presentan mayor resistencia a doxorubicina en relación a las negativas a la expresión de ABCG2⁸⁰. Así mismo, también se ha reportado que células HeLa seleccionadas por expulsar el colorante Hoechst 33342, poseen mayor resistencia a radioterapia y quimioterapia en contraste de aquellas células que no expulsan Hoechst 33342⁸¹. Así mismo, frente a resistencia a cisplatino se ha reportado incremento en la expresión de ABCG2⁸². Todo lo anterior resulta contrario respecto a los resultados obtenidos en el presente trabajo donde la expresión de ABCG2 no cambia en línea celular quimiorresistente A427 mientras que en línea celular quimiorresistente A549 la expresión de ABCG2 disminuye, aunque no de manera significativa.

Otro marcador utilizado para identificar a células tipo troncal del cáncer es Oct4, el cual es un factor de transcripción involucrado en la pluripotencialidad. Se reportado su expresión en condiciones de normalidad en ambas células troncales embrionarias y en células troncales de adulto⁸³. En el presente trabajo logramos determinar el incremento en la expresión de Oct4 en las líneas celulares resistentes a cisplatino de cáncer de cérvix (HeLa y CaSki), en congruencia con reportes previos en células HeLa resistentes a doxorubicina y cisplatino, en las que se ha observado el incremento de la expresión tanto de Oct4 como ABCG2⁸⁴. En cáncer de pulmón se reportado la sobre-expresión de Oct4 en línea celular A549 resistente a cisplatino, con respecto a su línea parental⁸⁵, sin embargo, en el presente trabajo, se detectó que la expresión de Oct4 en células tanto parentales como resistentes de ambas líneas celulares A427 y A549 es extremadamente elevada

Por otro lado, CD44 es una glicoproteína de superficie multi-estructural y multifuncional, implicada en procesos de inflamación y se ha propuesto como un marcador de células troncales del cáncer en distintos tipos de cáncer, entre los que se encuentran, cáncer de mama, próstata, pulmón y cérvix⁸⁶. En cáncer de cérvix se ha reportado que durante ensayos de formación de cuerpos esferoides cultivados

in vitro en condiciones de troncalidad se induce incremento de células CD44+ adquiriendo la capacidad de resistencia a doxorubicina⁵⁴; de manera semejante se ha reportado el incremento en la expresión de CD44 en células HeLa resistentes a diferentes fármacos quimioterapéuticos entre ellos cisplatino⁵⁸. Adicionalmente el incremento en la expresión de CD44 detectado en línea celular CaSki resistente concuerda con lo reportado⁵⁸; sin embargo en la línea celular HeLa resistente no se detectaron diferencias en la expresión de CD44 respecto a su línea celular parental.

Adicional a lo anterior, se ha reportado que al generar líneas celulares de cáncer de pulmón (A549, SKMES-1, MOR, H460) resistentes a cisplatino, incrementa la expresión de distintos marcadores fenotípicos de troncalidad entre los que se encuentra CD44⁸⁷, lo cual concuerda con datos obtenidos en el presente trabajo en línea celular A549 resistente, donde se detectó el incremento en la expresión de la proteína CD44 respecto a su línea celular parental, sin embargo en línea celular A427 resistente no se detectaron diferencias en la expresión de CD44 con relación a su línea celular parental.

Mientras que respecto de la expresión de la enzima ALDH se ha observado tanto en células histológicamente normales como en células tipo troncal del cáncer; sin embargo niveles altos de expresión de ALDH en cáncer correlaciona con la capacidad de resistencia a fármacos oncológicos⁸⁸. En cáncer de cérvix se ha reportado que al generar in vitro cuerpos esferoides de células HeLa incrementa la expresión de marcadores de células tipo troncal del cáncer, entre los que se encuentra ALDH favoreciendo la resistencia a cisplatino⁸⁹. Al respecto nuestros datos evidencian el aumento en los niveles proteicos de ALDH en líneas celulares de cérvix resistentes (HeLa y CaSki), con respecto a líneas celulares parentales.

Reportes previos han demostrado un incremento en la actividad de ALDH en líneas celulares de cáncer pulmonar (A549, MOR y H460) resistentes a cisplatino en relación con sus líneas celulares parentales⁶¹. En contraste en este trabajo no encontramos diferencia entre líneas celulares resistentes A549 y A427 con respecto a líneas celulares parentales. No obstante este posible contraste responde a que el presente trabajo evaluó los niveles proteicos en lugar de la actividad de ALDH.

Por otro lado, se ha documentado ampliamente que el control de la expresión genética ocurre también a través de la participación epigenética del patrón de lncRNAs a través de mecanismos transcripcionales o bien a nivel postranscripcional⁵⁰. Así mismo se ha reportado su participación en la modulación diversos procesos biológicos como ciclo celular, diferenciación, apoptosis, daño al DNA, entre otros. La expresión de lncRNAs se ha asociado a procesos de carcinogénesis, mientras que reportes del año 2013 indicaban escasos reportes sobre su participación en mecanismos de quimiorresistencia⁹⁰.

Nuestro proyecto iniciado en el año 2012 propuso el estudio del lncRNA UCA1 sobre-expresado en distintos tipos de cáncer entre ellos, cáncer de mama, cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer colorectal y cáncer de vejiga⁹¹. Mientras que, la sobre-expresión de UCA1 ha sido asociada con proliferación e invasión tumoral. Ejemplo de ello, se ha reportado en cáncer de mama donde la expresión de UCA1 sugiere promueve el crecimiento tumoral mediante la regulación negativa de p27⁹². Así mismo, en cáncer de vejiga se ha propuesto la sobre-expresión de UCA1 como un marcador de recurrencia⁹³. En nuestro caso al evaluar la expresión de UCA1 en las líneas celulares resistentes de cáncer de cérvix y cáncer pulmonar, los hallazgos demostraron que líneas celulares CaSki (cérvix) y A427 (pulmón) resistentes a cisplatino no mostraron diferencias en la expresión, con respecto a su línea parental; en contraste en línea celular HeLa quimiorresistente el lncRNA UCA1 posee la mayor expresión a largo plazo a 6 y 8 meses de exposición a cisplatino. Adicionalmente un reto farmacológico dosis respuesta demuestra que UCA1 es el lncRNA con mayor inducción en células parentales, alcanzó su pico máximo frente a 8 μ M de cisplatino.

Mientras que en línea celular A549 resistente UCA1 representa el segundo lncRNA con mayor expresión (Ver figuras: 31, 32, 33 y 34). Al respecto, los resultados obtenidos en líneas celulares resistentes HeLa y A549 concuerdan con reportes en cáncer de vejiga, donde detectan incremento de la expresión de UCA1 en líneas celulares resistentes a cisplatino y se propone que su participación en la resistencia farmacológica ocurre a través de la regulación positiva de Wnt6⁹⁴. Una posibilidad

es que UCA1 podría estar participando en la resistencia a cisplatino en cáncer de cérvix y cáncer de pulmón mediante la regulación positiva de la vía de señalización Wnt6.

Por otro lado, recientemente se reportó la sobre-expresión de Sox2OT en cáncer hepatocelular⁹⁵, cáncer de mama, esófago y cáncer de pulmón. A este respecto en cáncer de mama y esófago se ha demostrado que la expresión de Sox2OT correlaciona con la expresión de Sox2 y Oct4, sugiriendo la participación de Sox2OT regulando de manera positiva a Sox2 y Oct4^{96, 97}. Adicionalmente en muestras cáncer de pulmón de células no pequeñas ha sido reportado que la alta expresión del lncRNA Sox2OT correlaciona con pobre sobrevida global⁹⁸. Sin embargo, nuestro proyecto permitió advertir que la expresión de Sox2OT disminuye en líneas celulares quimiorresistentes CaSki y HeLa frente a 1.5µM de cisplatino a 4 y 6 meses de exposición al fármaco. Mientras que esta condición aberrante fue más significativa a 8 meses de exposición al fármaco disminuyendo su expresión en ambas líneas celulares bajo ambas concentraciones 1µM y 1.5µM; así como frente a condiciones de reto farmacológico por 48h en línea celular HeLa parental.

Sin embargo, llama la atención que la expresión de Sox2OT incrementa en líneas celulares resistentes CaSki y HeLa solo frente a 1µM a mediano plazo de exposición a 4 y 6 meses frente a cisplatino, respectivamente (Ver figuras 31, 32 y 33), sugiriendo que la sobre-expresión a bajas concentraciones de cisplatino y corto plazo de exposición in vitro, constituya un mecanismo de adaptación temprano a la resistencia.

Por su parte en líneas celulares de cáncer de pulmón A427 resistente, también se detectó disminución de la expresión de Sox2OT, en contraste de línea celular A549 resistente quien incrementó su expresión, siendo únicamente en este modelo celular donde la expresión de Sox2OT resulto mayor con respecto a su parental (Ver Figura 34). Estos resultados representan el primer reporte donde se propone la participación de Sox2OT probablemente asociado a mecanismos de adaptación tiempo y dosis respuesta en la quimiorresistencia adquirida, por lo que se propone a Sox2OT como probable blanco de tratamiento frente a cisplatino, donde

probablemente la sobre-expresión de Sox2OT regula negativamente a Sox2 y/o Oct4; lo anterior contrario a reportes previos^{93, 94}.

Por otro lado, el lncRNA HOTAIR ha sido ampliamente reportado involucrado en regular la expresión de diversos genes, mediante su interacción a complejos remodeladores de la cromatina entre ellos LSD1/CoREST y PRC2⁷¹. Al respecto se ha reportado sobre-expresión asociada con pobre pronóstico y metástasis en diversos tipos de cáncer, entre ellos cáncer de mama, cáncer de pulmón, próstata, hepático, cáncer de cérvix, gástrico, entre otros⁹⁹.

A este respecto HOTAIR se ha reportado sobre-expresado en muestras de cáncer de cérvix en contraste de tejido histológicamente normal adyacente, además su expresión se encuentra asociada con metástasis a nódulos linfáticos y estadios avanzados de la enfermedad¹⁰⁰. En el presente trabajo logramos determinar que la expresión de HOTAIR en las líneas celulares de cáncer de cérvix disminuye en línea celular CaSki resistente a 1 μ M y 1.5 μ M de cisplatino a cuatro meses de exposición, mientras que a 8 meses no se observaron cambios en la expresión, respecto a su parental (Ver figura 32). Sin embargo, en línea celular HeLa resistentes frente a concentraciones de 1 μ M y 1.5 μ M se detectó incremento en la expresión de HOTAIR con respecto a la parental, a 6 y 8 meses de exposición a cisplatino (Ver figura 31). Además se observó incremento en la expresión de HOTAIR de manera dosis dependiente frente a reto farmacológico de 48 horas en línea celular HeLa parental siendo las células expuestas a una concentración de 8 μ M, las que presentan mayor inducción de la expresión de HOTAIR (Ver figura 33). Nuestros resultados en líneas celulares HeLa y CaSki concuerdan con lo reportado por Kim, Hee Jung y cols., en 2014, quienes determinan la expresión de HOTAIR en distintas líneas celulares de cáncer de cérvix, entre ellas HeLa y CaSki, observando mayor expresión en HeLa con respecto a CaSki (Ver Fig, Supl. 1), en tejidos de cáncer de cérvix también se ha observado que hay mayor expresión de HOTAIR en adenocarcinomas respecto a tumores escamosos¹⁰¹.

Así mismo dichos datos de expresión de HOTAIR en HeLa quimiorresistente, concuerdan con lo reportado en fenómenos de radioresistencia donde se observó

que al transfectar HOTAIR en línea celular C33A (cáncer de cérvix con poca expresión de HOTAIR) que la expresión de la proteína p21 disminuye e incrementa la radioresistencia; mientras que cuando se inhibe HOTAIR en HeLa, incrementa la expresión de la proteína p21 y disminuye la radioresistencia⁵⁵.

Adicionalmente, nuestro análisis de expresión en las líneas celulares de cáncer pulmonar parentales y resistentes demostró que en ambas líneas celulares resistentes la expresión de HOTAIR es inducible, mientras que los niveles basales de expresión de HOTAIR es reducida. Tales hallazgos concuerdan con lo reportado en muestras de cáncer de pulmón donde su asociación con metástasis, correlaciona con pobre supervivencia libre de enfermedad. Al respecto se ha sugerido su participación en la resistencia a cisplatino, ello a partir de ensayos realizados en línea celular de cáncer pulmonar A549, donde la inducción de HOTAIR frente a cisplatino (3 μ M) se ha observado la disminución de la proteína p21 sugiriendo un mecanismo de regulación epigenética mediante el reclutamiento del complejo PRC2 y el establecimiento de la marca H3K27me3 en la región del promotor de p21⁵⁴.

Por lo anterior el presente trabajo se sugiere que HOTAIR podría estar participando en la resistencia a cisplatino en líneas celulares HeLa (cáncer de cérvix), A427 y A549 (cáncer de pulmón) mediante la regulación a la baja de la proteína p21 mediante su interacción con el complejo remodelador de la cromatina PRC2 y el establecimiento de la marca H3K27me3.

Mientras que otro lncRNA que ha sido reportado en distintos tipos de cáncer es MALAT1, el cual se ha reportado sobre-expresado en cáncer de pulmón, hígado, riñón, mama, cáncer de cérvix, de colon, vejiga y osteosarcoma, dicho transcrito se asocia a la regulación del splicing alternativo contribuyendo a la función de las proteínas paraspeckle en la transcripción o procesamiento de transcritos¹⁰². En cáncer de cérvix se ha detectado la sobre-expresión de MALAT1 en carcinomas, con respecto a tejido normal adyacente; mediante ensayos funcionales en línea celular CaSki se reportó la correlación entre la infección por HPV y MALAT1, al inhibir la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 disminuyó la expresión de MALAT1¹⁰³. Los datos del presente trabajo muestran que la expresión de MALAT1

incrementa en las líneas celulares resistentes respecto de línea celular parental CaSki a cuatro meses exposición continua al fármaco, mientras que a ocho meses la expresión de MALAT1 no se modifica con respecto a la línea celular parental. En línea celular HeLa la expresión de MALAT1 incrementa en las células resistentes a seis y ocho meses de exposición a cisplatino. Un estudio previo demostró que al inhibir MALAT1 en células CaSki disminuye la capacidad de invasión e incrementa la expresión de caspasas 8, 3, y Bax, mientras que disminuye la expresión de Bcl-2¹⁰⁴. Sugiriendo lo anterior que MALAT1 participa en el proceso de quimiorresistencia mediante la inducción de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y la represión de proteínas pro-apoptóticas como caspasas 8, caspasa 3 y Bax.

Nuestros resultados indican que la línea celular A427 quimiorresistente no modifica la expresión de MALAT1. Sin embargo en línea celular A549 resistente la expresión de MALAT1 incrementa en relación a su parental. Estos datos concuerdan con el incremento en la expresión de MALAT1 reportado en línea celular de cáncer de pulmón H460 resistente a cisplatino e incremento en la expresión de marcadores de inmunofenotipo troncal del cáncer¹⁰⁵.

H19 es un lncRNA sobre-expresado en distintos tipos de cáncer entre ellos cáncer hepático, además de órganos reproductivos en etapas tempranas del desarrollo así mismo se ha reportado su inducción en condiciones de hipoxia, ya que es regulado negativamente por p53¹⁰⁶. Adicionalmente se ha descrito que la inducción de H19 altera el perfil de expresión de genes involucrados en metástasis y angiogénesis¹⁰⁷. Así mismo, se ha demostrado su regulación positiva por el factor de transcripción *c-Myc* en cáncer de mama y pulmón¹⁰⁸ mientras que reportes previos han demostrado correlación entre la expresión de H19 y E2F1 en cáncer de mamá¹⁰⁹. Nuestro trabajo demostró el incremento en la expresión de H19 en las líneas celulares resistentes a cisplatino HeLa a seis y ocho meses, mientras que lo mismo ocurre en línea celular CaSki resistente a cuatro meses exposición al fármaco; no obstante el reto farmacológico en la línea celular HeLa provoca disminución de la expresión. Lo cual sugiere que H19 podría estar participando de manera preferente en el proceso de adaptación de quimiorresistencia a largo plazo. Mientras que en línea celular A427

quimiorresistente no hay cambios en el nivel de expresión. Sin embargo en línea celular A549 quimiorresistente se incrementa la expresión de H19. Respecto a todo lo anterior el incremento en la expresión de H19 en las líneas celulares resistentes a cisplatino concuerdan con lo reportado en líneas celulares resistentes a doxorubicina de cáncer hepático, donde al inhibir la expresión de H19 mediante oligos anti-sentido, disminuye la expresión de MDR1 glicoproteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos¹¹⁰.

Por otro lado, se ha reportado la amplificación de la región 8q24 en distintos tipos de cáncer, en dicha región se localizan los genes PVT1, c-Myc, CCDC26 y GSDMC⁶⁵. Reportes previos señalan que el incremento en el número de copias de PVT1 es fundamental para el incremento en los niveles de la proteína c-Myc, esto quiere decir que la ganancia de PVT1 es necesaria para la conducción de c-Myc en cáncer¹¹¹. Al evaluar la expresión de PVT1 en las líneas celulares de cáncer de cérvix demostramos la inducción de su expresión en la línea celular HeLa resistente a 6 meses de exposición al fármaco. Mientras que a 8 meses no se detectaron diferencias, con respecto a su línea parental para el caso de línea celular CaSki resistente a 1.5µM a 4 meses de exposición al fármaco.

En líneas celulares de cáncer de pulmón A427 resistente la expresión de PVT1 no se modificó con respecto a su parental, sin embargo A549 resistente incrementa la expresión de PVT1 en relación a su parental. Nuestros registros del incremento de PVT1 en líneas celulares quimiorresistentes concuerdan con lo reportado en cáncer gástrico, donde se ha reportado la sobre expresión de PVT1 en tejidos y líneas celulares de cáncer gástrico resistentes a cisplatino contribuyen a la quimiorresistencia mediante la regulación positiva de la vía mTOR/ HIF1α/ MDR1 y MRP1¹¹². Por lo que, en el presente trabajo se propone evaluar la regulación positiva de la vía mTOR/ HIF1α/ MDR1 y MRP1 mediada por PVT1 en la resistencia a cisplatino en cáncer de pulmón y cáncer de cérvix, dicho aspecto se espera abordar como perspectiva del presente trabajo.

Respecto del lncRNA NEAT1 este forma una estructura estable y elongada con las proteínas paraspeckle a nivel nuclear, la cual se sugiere podría estar modulando

negativamente el proceso de apoptosis en respuesta al estrés¹¹³, además se ha reportado la inducción de NEAT1 mediante HIF-2 α en condiciones de hipoxia¹¹⁴, además de sobre-expresión en cáncer hepatocelular¹¹⁵. Los datos obtenidos por nuestro grupo señalan que la expresión de NEAT1 es inducible en líneas celulares de cáncer de cérvix HeLa resistente a seis meses y CaSki resistente a 4 meses de exposición a cisplatino, respectivamente. Además de su inducción en la línea celular A549 quimiorresistente con respecto a su línea celular parental. No obstante en líneas celulares parentales, frente a reto farmacológico de corto plazo (48hrs), no cambió su expresión. Respecto a todo lo anterior, nuestros datos de quimiorresistencia concuerdan con lo previamente reportado en cáncer de próstata donde NEAT1 se sobre-expresa en modelos celulares resistentes expuestos a docetaxel durante seis meses a un año¹¹⁶. Basado en lo anterior, en estudios posteriores se requiere evaluar la participación de NEAT1 en la inhibición apoptosis para demostrar que es mediante este mecanismo que participa en la resistencia a cisplatino en cáncer de cérvix y cáncer de pulmón, ya que se ha reportado que al inhibir NEAT1 en fibroblastos, incrementa la apoptosis¹¹³.

Por ultimo respecto del lncRNA SNHG1, ha sido reportado sobreexpresado en tumores sólidos de cáncer gástrico, en cáncer mama y pulmón, además se ha sugerido que es regulado negativamente por p53¹¹⁷.

El presente trabajo demostró que la expresión de SNHG1 en líneas celulares resistentes de cáncer de cérvix CaSki disminuye tanto a 4 meses como a 6 meses; mientras que líneas celulares resistentes de HeLa solo a 6 meses la expresión de SNHG1 se incrementa. Sin embargo, a 8 meses y frente a reto farmacológico de exposición a cisplatino durante 48 horas en la línea celular HeLa parental, la expresión de SNHG1 disminuye. Por lo que a la fecha, el presente trabajo representa el primer reporte sobre la expresión inducible de SNHG1 en cáncer de cérvix y quimiorresistencia.

Adicionalmente en la línea celular resistente de cáncer de pulmón A427 la expresión de SNHG1 disminuye, mientras que en línea celular resistente A549 la expresión de SNHG1 se incrementó. Al respecto, SNHG1 se ha reportado

sobreexpresado en líneas celulares de cáncer de pulmón respecto a líneas celulares histológicamente normales del epitelio bronquial¹¹⁸, sin embargo, el presente trabajo constituye el primer reporte que demuestra la sobreexpresión de SNHG1 durante el fenómeno de quimiorresistencia a largo plazo.

Mientras que a la fecha el lncRNA MIAT se ha reportado regulando el destino celular de retina en mamíferos, y su expresión asociada a enfermedades cardíacas¹¹⁹. En su momento Gibb A. E. y cols. en 2012 reportaron la expresión diferencial de 13 lncRNAs en los distintos grados de neoplasia intraepitelial cervical dependiendo del espesor de la lesión (CIN 1, CIN 2 y CIN 3) respecto a tejido normal adyacente, entre los lncRNAs con expresión diferencial se encuentra MIAT el cual se expresa en tejido normal, mientras que en lesiones neoplásicas se pierde su expresión²⁹. Nuestro trabajo permitió demostrar la ausencia de MIAT en todas las líneas celulares de cáncer de cérvix parentales como resistentes; así como en línea celular A427 resistente y parental. Sin embargo en línea A549 resistente incrementó su expresión con respecto a su parental, por tal motivo se sugiere que MIAT podría estar participando en el proceso de quimiorresistencia en pulmón, siendo este el primer reporte de la sobre-expresión de MIAT en quimiorresistencia

11. CONCLUSIONES

1. Fue posible estudiar de forma reproducible el proceso de adaptación (quimioresistencia) a corto y largo plazo 4, 6 y 8 meses en cultivos in vitro del cáncer cervical uterino y cáncer pulmonar..
2. Células de cáncer cérvicouterino CaSki poseen mayor capacidad de quimiorresistencia en contraste con células HeLa, mediante ensayos de viabilidad celular por MTT y determinación de IC50
3. Células de cáncer pulmonar A427 poseen mayor capacidad de quimiorresistencia en contraste de células A549, mediante ensayos de viabilidad celular por MTT y determinación de IC50.
4. Análisis de expresión de marcadores de fenotipo determino aumento en la expresión de todos los marcadores estudiados asociados a células tipo troncal en al menos un modelo celular quimioresistente (Marcador ABCG2 en Células HeLa y CD44 en Células CaSki). ES CONFUSO!!!! REDACTAR DE NUEVO!!
5. Análisis del inmuno-fenotipo en células de cáncer pulmonar indetifico la expresión inducible del marcador CD44 durante el proceso de adaptación a cisplatino (quimioresistencia).
6. Análisis de expresión del perfil de lncRNAs, identifico la mayor expresión inducible del lncRNA UCA1 en células quimioresistentes HeLa y A549, durante el proceso de adaptación (quimioresistencia) a largo plazo (INDICAR MESES).
7. La expresión del lncRNA Sox2OT disminuye en células quimioresistentes dependientes de la concentración y tiempo de administración de cisplatino, a lo largo del proceso de adaptación (quimioresistencia), excepto en células de cáncer pulmonar A549.

12. PERSPECTIVAS

1. Determinar si la participación de UCA1 en cáncer de cérvix y cáncer de pulmón es determinante el proceso de inducción/adaptabilidad en el proceso de quimiorresistencia y si este ocurre a través de la regulación positiva de Wnt6 y/o regulación negativa de p27.
2. Evaluar la participación funcional de Sox2OT en la capacidad de quimiorresistencia en cáncer de pulmón mediante ensayos de silenciamiento y/o sobre-expresión.
3. Determinar si la función de MIAT es tejido específica en modelos celulares de cáncer de cérvix y pulmón.
4. Evaluar cambios en la actividad o participación de la enzima ALDH en modelos celulares quimiorresistentes de cáncer de cérvix y cáncer de pulmón.

13. LITERATURA CITADA.

¹ American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. Atlanta: American Cancer Society; 2015.

² Siegel, R., DeSantis, C., Virgo, K., Stein, K., Mariotto, A., Smith, T., ... & Ward, E. (2012). Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 62(4), 220-241.

³ http://www.aboutcancer.com/lung_to_brain_1107.jpg [Accessed 11 Ago. 2015].

⁴ Kollar, D. (2012). HPV and Cervical Cancer.

⁵ Montalvo Esquive Gonzalo I, Coronel Martínez Jaime Alberto, Zermeño Adriana Alvarado, Cantú de León David F. , Flores Alatraste Daniel, Ortega Rojo Andrea, González Enciso Aarón, Ortíz D., Muñoz González David E., Robles Flores Juan U., Solorza Luna Gilberto, Mota García Aida, Gallardo Rincón Dolores, Morales Vázquez, Cetina Pérez M. y Herrera Gómez A. Oncoguía. Instituto Nacional de Cancerología.

⁶ Stünzi, H., Head, K. W., & Nielsen, S. W. (1974). Tumours of the lung. *Bulletin of the World Health Organization*, 50(1-2), 9.

⁷ Bordoy, J. C., Cardona, L. M., Martín, A. G., Cabrera, I. H., Vicens, J. M. L., Montosa, J. X. & Capdevila, R. V. (2008). Oncoguía de pulmón Cataluña.

⁸ Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., ... & Bray, F. (2014). GLOBOCAN 2012 v1. 0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.

⁹ Kelland LR. (2000). *Drugs*, 59 (Suppl4), 1–8.

-
- ¹⁰ Eastman A. (1987b). *Pharmacol. Ther.*, 34, 155–166.
- ¹¹ Huang JC, Zamble DB, Reardon JT, Lippard SJ and Sancar A. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10394–10398.
- ¹² He Q, Liang CH and Lippard SJ. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 5768–5772.
- ¹³ Bullock AN and Fersht AR. (2001). *Nat. Rev. Cancer*, 1, 68–76.
- ¹⁴ Appella E and Anderson CW. (2001). *Eur. J. Biochem.*, 268, 2764–2772.
- ¹⁵ Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y and Prives C. (2000). *Genes Dev.*, 14, 289–300.
- ¹⁶ Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), 7265-7279.
- ¹⁷ Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- ¹⁸ Crea, F., Duhagon, M. A., Farrar, W. L., & Danesi, R. (2011). Pharmacogenomics and cancer stem cells: a changing landscape?. *Trends in pharmacological sciences*, 32(8), 487-494.
- ¹⁹ Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *The Journal of pathology*, 205(2), 275-292.
- ²⁰ Guía de práctica clínica para la detección, diagnóstico y tratamiento del cáncer pulmonar de células no pequeñas. México; Instituto Mexicano del Seguro Social
- ²¹ Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., ... & Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31(15), 1869-1883.

²² Dawood, S., Austin, L., & Cristofanilli, M. (2014). Cancer Stem Cells: Implications for Cancer Therapy. *Oncology (Williston Park, NY)*, 28(12)

²³ Chhabra, R. (2015). Cervical cancer stem cells: opportunities and challenges. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 1-9.

²⁴ Perona, R., López-Ayllón, B. D., de Castro Carpeño, J., & Belda-Iniesta, C. (2011). A role for cancer stem cells in drug resistance and metastasis in non-small-cell lung cancer. *Clinical and Translational Oncology*, 13(5), 289-293.

²⁵ Rocchi, E., Khodjakov, A., Volk, E. L., Yang, C. H., Litman, T., Bates, S. E., & Schneider, E. (2000). The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane. *Biochemical and biophysical research communications*, 271(1), 42-46.

²⁶ Wang, H., Lee, E. W., Zhou, L., Leung, P. C., Ross, D. D., Unadkat, J. D., & Mao, Q. (2008). Progesterone receptor (PR) isoforms PRA and PRB differentially regulate expression of the breast cancer resistance protein in human placental choriocarcinoma BeWo cells. *Molecular pharmacology*, 73(3), 845-854.

²⁷ Robey, R. W., Polgar, O., Deeken, J., To, K. W., & Bates, S. E. (2007). ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(1), 39-57.

²⁸ Tai, M. H., Chang, C. C., Olson, L. K., & Trosko, J. E. (2005). Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 26(2), 495-502.

²⁹ Misra, S., Ghatak, S., & Toole, B. P. (2005). Regulation of MDR1 expression and drug resistance by a positive feedback loop involving hyaluronan, phosphoinositide 3-kinase, and ErbB2. *Journal of Biological Chemistry*, 280(21), 20310-20315.

-
- ³⁰ Cain, J. W., Hauptschein, R. S., Stewart, J. K., Bagci, T., Sahagian, G. G., & Jay, D. G. (2011). Identification of CD44 as a surface biomarker for drug resistance by surface proteome signature technology. *Molecular Cancer Research*, 9(5), 637-647.
- ³¹ Collins, L. J., Schönfeld, B., & Chen, X. S. (2011). The epigenetics of non-coding RNA. In *Handbook of epigenetics: the new molecular and medical genetics* (pp. 49-61). Academic.
- ³² Eddy, S. R. (2001). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nature Reviews Genetics*, 2(12), 919-929.
- ³³ Wang H, Tan G, Dong L, Cheng L, Li K, Wang Z, Luo H. Circulating MiR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer. *PLoS One*. 2012;7(4):e34210.
- ³⁴ Bao L, Hazari S, Mehra S, Kaushal D, Moroz K, Dash S. Increased expression of P-glycoprotein and doxorubicin chemoresistance of metastatic breast cancer is regulated by miR-298. *Am J Pathol*. 2012 Jun;180(6):2490-503.
- ³⁵ Zhao R, Wu J, Jia W, Gong C, Yu F, Ren Z, Chen K, He J, Su F. *Onkologie*. Plasma miR-221 as a predictive biomarker for chemoresistance in breast cancer patients who previously received neoadjuvant chemotherapy. 2011;34(12):675-80. doi: 10.1159/000334552.
- ³⁶ Feng B, Wang R, Song HZ, Chen LB. MicroRNA-200b reverses chemoresistance of docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cells by targeting E2F3. *Cancer*. 2012 Jul 1;118(13):3365-76. doi: 10.1002/cncr.26560.
- ³⁷ Feng B, Wang R, Chen LB. MiR-100 resensitizes docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cells (SPC-A1) to docetaxel by targeting Plk1. *Cancer Lett*. 2012 Apr 28;317(2):184-91.

-
- ³⁸ Li J, Zhang Y, Zhao J, Kong F, Chen Y. Overexpression of miR-22 reverses paclitaxel-induced chemoresistance through activation of PTEN signaling in p53-mutated colon cancer cells. *Mol Cell Biochem*. 2011 Nov;357(1-2):31-8.
- ³⁹ Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*. 10(3):155–159.
- ⁴⁰ Pagano, A., Castelnuovo, M., Tortelli, F., Ferrari, R., Dieci, G., & Cancedda, R. (2007). New small nuclear RNA gene-like transcriptional units as sources of regulatory transcripts.
- ⁴¹ Okazaki, Y., Furuno, M., Kasukawa, T., Adachi, J., Bono, H., Kondo, S., .& Kanai, A. (2002). Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature*, 420(6915), 563-573.
- ⁴² Borsani, G., Tonlorenzi, R., Simmler, M. C., Dandolo, L., Arnaud, D., Capra, V., ... & Ballabio, A. (1991). Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature*, 351(6324), 325-329.
- ⁴³ Clamp, M., Fry, B., Kamal, M., Xie, X., Cuff, J., Lin, M. F., ... & Lander, E. S. (2007). Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19428-19433.
- ⁴⁴ Dinger, M. E., Pang, K. C., Mercer, T. R., & Mattick, J. S. (2008). Differentiating protein-coding and noncoding RNA: challenges and ambiguities. *PLoS Comput Biol*, 4(11), e1000176.
- ⁴⁵ Volders, P. J., Verheggen, K., Menschaert, G., Vandepoele, K., Martens, L., Vandesompele, J., & Mestdagh, P. (2015). An update on LNCipedia: a database for annotated human lncRNA sequences. *Nucleic acids research*, 43(D1), D174-D180.

⁴⁶ Wang, K. C., & Chang, H. Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Molecular cell*, 43(6), 904-914.

⁴⁷ Tian, D., Sun, S., & Lee, J. T. (2010). The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell*, 143(3), 390-403.

⁴⁸ Wang, K. C., Yang, Y. W., Liu, B., Sanyal, A., Corces-Zimmerman, R., Chen, Y., ... & Chang, H. Y. (2011). A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature*, 472(7341), 120-124.

⁴⁹ Hung, T., Wang, Y., Lin, M. F., Koegel, A. K., Kotake, Y., Grant, G. D., ... & Chang, H. Y. (2011). Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nature genetics*, 43(7), 621-629.

⁵⁰ Yoon, J. H., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2013). Posttranscriptional gene regulation by long noncoding RNA. *Journal of molecular biology*, 425(19), 3723-3730.

⁵¹ Gibb EA, Vucic EA, Enfield KS, Stewart GL, Lonergan KM, Kennett JY, Becker-Santos DD, MacAulay CE, Lam S, Brown CJ, Lam WL. Human cancer long non-coding RNA transcriptomes. *PLoS One*. 2011;6(10):e25915.

⁵² Gibb EA, Becker-Santos DD, Enfield KS, Guillaud M, Niekerk Dv, Matisic JP, Macaulay CE, Lam WL. Aberrant Expression of Long Noncoding RNAs in Cervical Intraepithelial Neoplasia. *J Gynecol Cancer* 2012;22: 1557Y1563

⁵³ Tsang WP, Wong TW, Cheung AH, Co CN, Kwok TT. Induction of drug resistance and transformation in human cancer cells by the noncoding RNA CUDR. *RNA* (2007), 13:890–898.

⁵⁴ Liu, Z., Sun, M., Lu, K., Liu, J., Zhang, M., Wu, W., & Wang, R. (2013). The Long Noncoding RNA HOTAIR Contributes to Cisplatin Resistance of Human Lung

Adenocarcinoma Cells via downregulation of p21WAF1/CIP1 Expression. *PLoS one*, 8(10), e77293.

⁵⁵ Jing, L., Yuan, W., Ruofan, D., Jinjin, Y., & Haifeng, Q. (2014). HOTAIR enhanced aggressive biological behaviors and induced radio-resistance via inhibiting p21 in cervical cancer. *Tumor Biology*, 1-9.

⁵⁶ Bond, C. S., & Fox, A. H. (2009). Paraspeckles: nuclear bodies built on long noncoding RNA. *The Journal of cell biology*, 186(5), 637-644.

⁵⁷ Clemson, C. M., Hutchinson, J. N., Sara, S. A., Ensminger, A. W., Fox, A. H., Chess, A., & Lawrence, J. B. (2009). An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Molecular cell*, 33(6), 717-726.

⁵⁸ Fan, Y., Shen, B., Tan, M., Mu, X., Qin, Y., Zhang, F., & Liu, Y. (2014). TGF- β -Induced Upregulation of malat1 Promotes Bladder Cancer Metastasis by Associating with suz12. *Clinical Cancer Research*, 20(6), 1531-1541.

⁵⁹ Jiang, Y., Li, Y., Fang, S., Jiang, B., Qin, C., Xie, P., & Li, G. (2014). The role of MALAT1 correlates with HPV in cervical cancer. *Oncology letters*, 7(6), 2135-2141.

⁶⁰ Ding, C., Yang, Z., Lv, Z., Du, C., Xiao, H., Peng, C., ... & Zheng, S. (2015). Long non-coding RNA PVT1 is associated with tumor progression and predicts recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *Oncology Letters*, 9(2), 955-963.

⁶¹ Takahashi, Y., Sawada, G., Kurashige, J., Uchi, R., Matsumura, T., Ueo, H., ... & Mimori, K. (2014). Amplification of PVT-1 is involved in poor prognosis via apoptosis inhibition in colorectal cancers. *British journal of cancer*, 110(1), 164-171.

⁶² Tseng, Y. Y., Moriarity, B. S., Gong, W., Akiyama, R., Tiwari, A., Kawakami, H. & Bagchi, A. (2014). PVT1 dependence in cancer with MYC copy-number increase. *Nature*, 512(7512), 82-86.

⁶³ Amaral, P. P., Neyt, C., Wilkins, S. J., Askarian-Amiri, M. E., Sunkin, S. M., Perkins, A. C., & Mattick, J. S. (2009). Complex architecture and regulated expression of the Sox2ot locus during vertebrate development. *Rna*, 15(11), 2013-2027.

⁶⁴ Leung, E. L. H., Fiscus, R. R., Tung, J. W., Tin, V. P. C., Cheng, L. C., Sihoe, A. D. L., ... & Wong, M. P. (2010). Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PloS one*, 5(11), e14062.

⁶⁵ Huang, J., Zhou, N., Watabe, K., Lu, Z., Wu, F., Xu, M., & Mo, Y. Y. (2014). Long non-coding RNA UCA1 promotes breast tumor growth by suppression of p27 (Kip1). *Cell death & disease*, 5(1), e1008.

⁶⁶ Wang, Y., Chen, W., Yang, C., Wu, W., Wu, S., Qin, X., & Li, X. (2012). Long non-coding RNA UCA1a (CUDR) promotes proliferation and tumorigenesis of bladder cancer. *International journal of oncology*, 41(1), 276-284.

⁶⁷ Tsang, Wing Pui, et al. "Induction of drug resistance and transformation in human cancer cells by the noncoding RNA CUDR." *Rna* 13.6 (2007): 890-898.

⁶⁸ Fan, Yu, et al. "Long non-coding RNA UCA1 increases chemoresistance of bladder cancer cells by regulating Wnt signaling." *FEBS Journal* 281.7 (2014): 1750-1758

⁶⁹ Tsang, W. P., and T. T. Kwok. "Riboregulator H19 induction of MDR1-associated drug resistance in human hepatocellular carcinoma cells." *Oncogene* 26.33 (2007): 4877-4881.

⁷⁰ Tsang, Wing Pui, et al. "Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer." *Carcinogenesis* 31.3 (2010): 350-358.

⁷¹ Rinn, John L., et al. "Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs." *Cell* 129.7 (2007): 1311-1323

⁷² Tsai, Miao-Chih, et al. "Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes." *Science* 329.5992 (2010): 689-693.

⁷³ Prensner, John R., and Arul M. Chinnaiyan. "The emergence of lncRNAs in cancer biology." *Cancer discovery* 1.5 (2011): 391-407.

⁷⁴ Bush, J. A., & Li, G. (2002). Cancer chemoresistance: the relationship between p53 and multidrug transporters. *International journal of cancer*, 98(3), 323-330.

⁷⁵ Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics*, 12(12), 861-874.

⁷⁶ García-López P., Rodríguez-Dorantes, M., Pérez-Cárdenas, E., Cerbon, M., & Mohar-Betancourt, A. (2004). Synergistic effects of ICI 182,780 on the cytotoxicity of cisplatin in cervical carcinoma cell lines. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 53(6), 533-540.

⁷⁷ Kartalou, M., & Essigmann, J. M. (2001). Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 478(1), 23-43.

⁷⁸ Jiang, W., Peng, J., Zhang, Y., Cho, W., & Jin, K. (2012). The implications of cancer stem cells for cancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 13(12), 16636-16657.

⁷⁹ Ding, X. W., Wu, J. H., & Jiang, C. P. (2010). ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. *Life sciences*, *86*(17), 631-637.

⁸⁰ Feng, D., Peng, C., Li, C., Zhou, Y., Li, M., Ling, B., ... & Tian, Z. (2009). Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncology reports*, *22*(5), 1129-1134.

⁸¹ Qi, W., Zhao, C., Zhao, L., Liu, N., Li, X., Yu, W., & Wei, L. (2014). Sorting and identification of side population cells in the human cervical cancer cell line HeLa. *Cancer Cell Int*, *14*(1), 3.

⁸² Levina, V., Marrangoni, A. M., DeMarco, R., Gorelik, E., & Lokshin, A. E. (2008). Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. *PloS one*, *3*(8), e3077.

⁸³ Tai, M. H., Chang, C. C., Olson, L. K., & Trosko, J. E. (2005). Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis*, *26*(2), 495-502.

⁸⁴ Wang, X. Q., Ongkeko, W. M., Chen, L., Yang, Z. F., Lu, P., Chen, K. K., ... & Fan, S. T. (2010). Octamer 4 (Oct4) mediates chemotherapeutic drug resistance in liver cancer cells through a potential Oct4–AKT–ATP-binding cassette G2 pathway. *Hepatology*, *52*(2), 528-539.

⁸⁵ Teng, Y., Wang, X., Wang, Y., & Ma, D. (2010). Wnt/ β -catenin signaling regulates cancer stem cells in lung cancer A549 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, *392*(3), 373-379.

⁸⁶ Klonisch, T., Wiechec, E., Hombach-Klonisch, S., Ande, S. R., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K., & Los, M. (2008). Cancer stem cell markers in common cancers—therapeutic implications. *Trends in molecular medicine*, *14*(10), 450-460.

⁸⁷ Barr, M. P., Gray, S. G., Hoffmann, A. C., Hilger, R. A., Thomale, J., O'Flaherty, J. D., .. & O'Byrne, K. J. (2013). Generation and characterisation of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell lines displaying a stem-like signature. *PloS one*, *8*(1), e54193.

⁸⁸ Januchowski, R., Wojtowicz, K., & Zabel, M. (2013). The role of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in cancer drug resistance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *67*(7), 669-680.

⁸⁹ Wang, L., Guo, H., Lin, C., Yang, L., & Wang, X. (2014). Enrichment and characterization of cancer stem-like cells from a cervical cancer cell line. *Molecular medicine reports*, *9*(6), 2117-2123.

⁹⁰ Tang, J. Y., Lee, J. C., Chang, Y. T., Hou, M. F., Huang, H. W., Liaw, C. C., & Chang, H. W. (2013). Long noncoding RNAs-related diseases, cancers, and drugs. *The Scientific World Journal*, 2013.

⁹¹ Chen et al., LncRNADisease: a database for long-non-coding RNA-associated diseases. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan 1;*41*(D1):D983-6.

⁹² Huang, J., Zhou, N., Watabe, K., Lu, Z., Wu, F., Xu, M., & Mo, Y. Y. (2014). Long non-coding RNA UCA1 promotes breast tumor growth by suppression of p27 (Kip1). *Cell death & disease*, *5*(1), e1008.

⁹³ Wang, X. S., Zhang, Z., Wang, H. C., Cai, J. L., Xu, Q. W., Li, M. Q., ... & Chen, W. F. (2006). Rapid identification of UCA1 as a very sensitive and specific unique marker for human bladder carcinoma. *Clinical cancer research*, *12*(16), 4851-4858.

-
- ⁹⁴ Fan, Y., Shen, B., Tan, M., Mu, X., Qin, Y., Zhang, F., & Liu, Y. (2014). Long non-coding RNA UCA1 increases chemoresistance of bladder cancer cells by regulating Wnt signaling. *FEBS Journal*, 281(7), 1750-1758.
- ⁹⁵ Shi, X. M., & Teng, F. (2015). Up-regulation of long non-coding RNA Sox2ot promotes hepatocellular carcinoma cell metastasis and correlates with poor prognosis. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(4), 4008.
- ⁹⁶ Askarian-Amiri, M. E., Seyfoddin, V., Smart, C. E., Wang, J., Kim, J. E., Hansji, H., ... & Leung, E. Y. (2014). Emerging role of long non-coding RNA SOX2OT in SOX2 regulation in breast cancer.
- ⁹⁷ Shahryari, A., Rafiee, M. R., Fouani, Y., Oliae, N. A., Samaei, N. M., Shafiee, M., & Mowla, S. J. (2014). Two Novel Splice Variants of SOX2OT, SOX2OT-S1, and SOX2OT-S2 are Coupregulated with SOX2 and OCT4 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Stem Cells*, 32(1), 126-134.
- ⁹⁸ Hou, Z., Zhao, W., Zhou, J., Shen, L., Zhan, P., Xu, C., ... & Yan, J. (2014). A long noncoding RNA Sox2ot regulates lung cancer cell proliferation and is a prognostic indicator of poor survival. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 53, 380-388.
- ⁹⁹ Axelsdottir, E. (2014). The RNA HOTAIR Promotes Chromatin Alteration in Cancer. *Journal of Young Investigators*, Vol. 26, 3, 9-16.
- ¹⁰⁰ Huang, L., Liao, L. M., Liu, A. W., Wu, J. B., Cheng, X. L., Lin, J. X., & Zheng, M. (2014). Overexpression of long noncoding RNA HOTAIR predicts a poor prognosis in patients with cervical cancer. *Archives of gynecology and obstetrics*, 290(4), 717-723.
- ¹⁰¹ Li, Jing, et al. "A high level of circulating HOTAIR is associated with progression and poor prognosis of cervical cancer." *Tumor Biology* 36.3 (2015): 1661-1665.

¹⁰² Gutschner, T., Hämmerle, M., & Diederichs, S. (2013). MALAT1—a paradigm for long noncoding RNA function in cancer. *Journal of molecular medicine*, 91(7), 791-801.

¹⁰³ Jiang, Y., Li, Y., Fang, S., Jiang, B., Qin, C., Xie, P., ... & Li, G. (2014). The role of MALAT1 correlates with HPV in cervical cancer. *Oncology letters*, 7(6), 2135-2141.

¹⁰⁴ Guo, F., Li, Y., Liu, Y., Wang, J., Li, Y., & Li, G. (2010). Inhibition of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in CaSki human cervical cancer cells suppresses cell proliferation and invasion. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 42(3), 224-229.

¹⁰⁵ Lopez-Ayllon, B. D., Moncho-Amor, V., Abarategi, A., Cáceres, I. I., Castro-Carpeño, J., Belda-Iniesta, C., ... & Sastre, L. (2014). Cancer stem cells and cisplatin-resistant cells isolated from non-small-lung cancer cell lines constitute related cell populations. *Cancer medicine*, 3(5), 1099-1111.

¹⁰⁶ Matouk, I.J.; Mezan, S.; Mizrahi, A.; Ohana, P.; Abu-Lail, R.; Galun, E.; Hochberg, A. The oncofetal H19 RNA connection: Hypoxia, p53 and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 2010, 1803, 443–451.

¹⁰⁷ Matouk, I., Ayeshe, B., Schneider, T., Ayeshe, S., Ohana, P., de-Groot, N., ... & Galun, E. (2004). Oncofetal splice-pattern of the human H19 gene. *Biochemical and biophysical research communications*, 318(4), 916-919.

¹⁰⁸ Baryshte-Lovejoy, D.; Lau, S.K.; Boutros, P.C.; Khosravi, F.; Jurisica, I.; Andrulis, I.L.; Tsao, M.S.; Penn, L.Z. The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis. *Cancer Res.* 2006, 66, 5330–5337.

¹⁰⁹ Berteaux, N.; Lottin, S.; Monté, D.; Pinte, S.; Quatannens, B.; Coll, J.; Hondermarck, H.; Cury, J.J.; Dugimont, T.; Adriaenssens, E. H19 mRNA-like noncoding RNA promotes breast cancer cell proliferation through positive control by E2F1. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 29625–26636

¹¹⁰ Tsang, W. P., & Kwok, T. T. (2007). Riboregulator H19 induction of MDR1-associated drug resistance in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene*, 26(33), 4877-4881.

¹¹¹ Tseng, Y. Y., Moriarity, B. S., Gong, W., Akiyama, R., Tiwari, A., Kawakami, H., ... & Bagchi, A. (2014). PVT1 dependence in cancer with MYC copy-number increase. *Nature*, 512(7512), 82-86.

¹¹² Sang, H., Liu, H., Xiong, P., & Zhu, M. (2015). Long non-coding RNA functions in lung cancer. *Tumor Biology*, 1-11.

¹¹³ Hirose, T., Virnicchi, G., Tanigawa, A., Naganuma, T., Li, R., Kimura, H., ... & Pierron, G. (2014). NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. *Molecular biology of the cell*, 25(1), 169-183.

¹¹⁴ Choudhry, H., Albukhari, A., Morotti, M., Hider, S., Moralli, D., Smythies, J., ... & Mole, D. R. (2014). Tumor hypoxia induces nuclear paraspeckle formation through HIF-2 α dependent transcriptional activation of NEAT1 leading to cancer cell survival. *Oncogene*.

¹¹⁵ Guo, S., Chen, W., Luo, Y., Ren, F., Zhong, T., Rong, M.,... & Chen, G. (2015). Clinical implication of long non-coding RNA NEAT1 expression in hepatocellular carcinoma patients. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(5), 5395.

-
- ¹¹⁶ Marín-Aguilera, M., Codony-Servat, J., Kalko, S. G., Fernández, P. L., Bermudo, R., Buxo, E., & Mellado, B. (2012). Identification of docetaxel resistance genes in castration-resistant prostate cancer. *Molecular cancer therapeutics*, *11*(2), 329-339.
- ¹¹⁷ Yu, F., Bracken, C. P., Pillman, K. A., Lawrence, D. M., Goodall, G. J., Callen, D. F., & Neilsen, P. M. (2015). p53 Represses the Oncogenic Sno-MiR-28 Derived from a SnoRNA. *PloS one*, *10*(6), e0129190
- ¹¹⁸ You, J., Fang, N., Gu, J., Zhang, Y., Li, X., Zu, L., & Zhou, Q. (2014). Noncoding RNA small nucleolar RNA host gene 1 promote cell proliferation in nonsmall cell lung cancer. *Indian journal of cancer*, *51*(7), 99.
- ¹¹⁹ Rapicavoli, N. A., Poth, E. M., & Blackshaw, S. (2010). The long noncoding RNA RNCR2 directs mouse retinal cell specification. *BMC developmental biology*, *10*(1), 49.

ANEXO: FIGURA Y TABLA SUPLEMENTARIAS.

LncRNA	Primers	Tm °	Posición	Amplicón	Sonda
NEAT1	F: actgaaagatgggcgtca R: taaggggcagcgaaggat	F: 59 R: 60	F: 2642 - 2660 R: 2685 - 2702	61 ntd	84
MALAT1 / NEAT 2	F: gacccttcaccctcacc R: tatggatcatgcccacaag	F: 60 R: 59	F: 7829 - 7846 R: 7871 - 7890	62 ntd	71
H19	F: ttacttctccacggagtcg R: gagctggtagcaccattt	F: 60 R: 59	F: 1500 - 1519 R: 1566 - 1585	86 ntd	46
HOTAIR	F: gccttccctgctactgtg R: cccttcgctcctgtaattc	F: 60 R: 59	F: 42 - 61 R: 116 - 135	94 ntd	12
SNHG1	F: ccataactccactcgtgtctg R: taaaggctcatgacgggaac	F: 59 R: 60	F: 898 - 919 R: 944 - 963	66 ntd	83
MIAT/RNCR2 (Gomafu)	F: cacaagagccctctgcact R: ttggtaccctgtgatgc	F: 60 R: 59	F: 129 - 148 R: 237 - 255	129 ntd	49
PVT1	F: cccaaggaacatctaccaa R: gatggtccaagggcttc	F: 59 R: 60	F: 722 - 742 R: 820 - 839	118 ntd	1
SOX2OT	F: ccttctcagggtgtagatcacctat R: aacagagctgcttgaagtgagg	F: 60 R: 59	F: 286 - 311 R: 376 - 399	114 ntd	33
U1	F: ccctgctccagtcgctatc R: ccacgtccgtctgattcc	F: 60 R: 60	F: 235 - 253 R: 308 - 325	91 ntd	83

Tabla Suplementaria 1. Tabla de las secuencias de oligos. Secuencias, Tm, posición y tamaño del amplicón de los oligos y sonda utilizada para evaluar la expresión de los lncRNAs.

Proceso	T°	Tiempo (segundos)	Ciclos
Pre-incubación	95	10	1
Amplificación	95	10	45
	60	30	
	72	1	
Enfriamiento	40	30	1

Tabla Suplementaria 2. Tabla de las condiciones para la amplificación. En esta tabla se muestran las temperaturas, el tiempo y los ciclos en cada paso de la amplificación

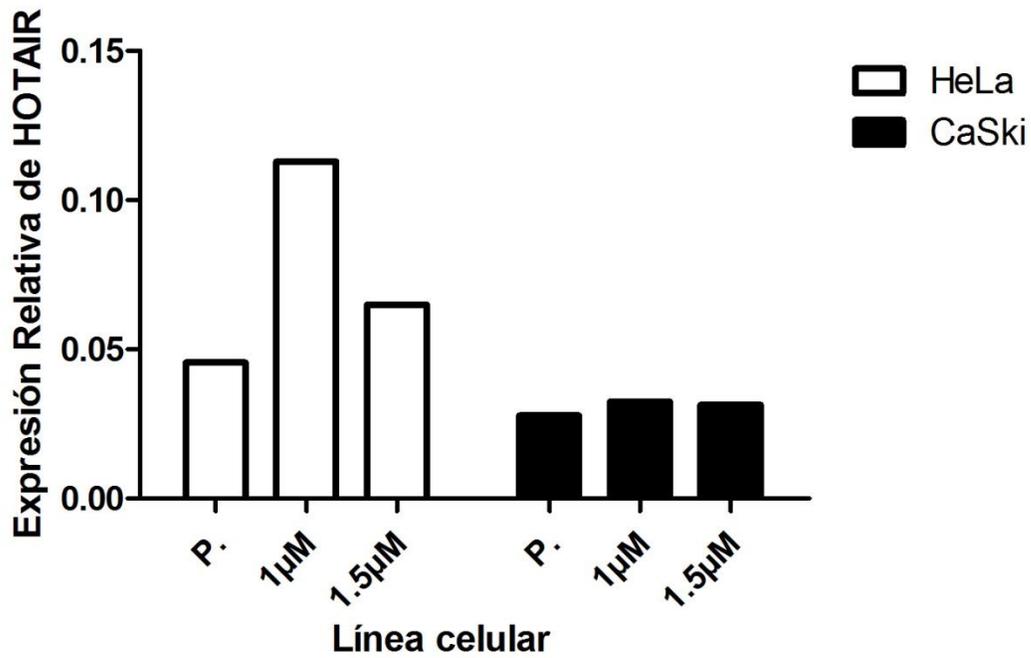


Fig. Suplementaria 1. Expresión de HOTAIR entre líneas celulares de cáncer de cérvix. Expresión de HOTAIR en las líneas celulares de cáncer cérvix parentales y resistentes a Cisplatino de HeLa y CaSki, P.= Parental, 1 μM= cultivos celulares resistentes a 1 μM, 1.5 μM= cultivos celulares resistentes a 1.5 μM.