



Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Participación de *Mesenchyme Homeobox* en
la quimiorresistencia del cáncer pulmonar.**

Tesis

que para obtener el título de

Biólogo

presenta

Daniel Mijail Juárez Rodríguez

Director de tesis: Dr. Federico Ávila Moreno

Tesis realizada bajo el financiamiento de los
proyectos aprobados (UNAM) DGAPA-PAPIIT
IB202512 y PAPIIT RR282512; proyecto 005364
del Fondo SEP-CONACYT de investigación
básica; proyecto B18-12 de la Dirección de
Investigación del INER.



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de
México, 2016.



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 está 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.



Presidente: Dr. Ignacio Peñalosa Castro

Vocal: Dra. Yolanda Irasema Chirino López

Secretario: Dr. Federico Ávila Moreno

Suplente: Dr. Santiago Martínez Calvillo

Suplente: Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés



Dedicatoria.

A mi familia.

Agradecimientos.

A Ari, Edna y su familia por su apoyo y hospitalidad.

A los integrantes de mis otros proyectos por su paciencia y perseverancia.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Ernesto, Oscar, Daniel, Ana Luz, Yutzil, Serene, Jorge, Rodrigo, Ana, Roberto, Leonel, Carlos y Marcela.

Al director de tesis, Dr. Federico Ávila Moreno.

A los profesores sobresalientes de los que he tenido la oportunidad de aprender: Dr. Ignacio Peñalosa Castro, Dr. Luis Alberto Fonseca Lazcano, Dr. Cesar Mateo Flores Ortíz, Prof. Dgorje Prokin...

Lo que tenemos que aprender lo aprendemos haciendo.

- **Aristóteles.**

No es un indicio de salud estar ajustado a una sociedad profundamente enferma.

– **J. Krishnamurti.**

They must find it difficult...

Those who have taken authority as the truth,
rather than truth as the authority.

- **G. Massey.**

Es la Natura un templo cuyos pilares vivos
alguna vez profieren balbucientes palabras;
allí el hombre atraviesa esos bosques de símbolos
que lo observan, mirándolo con ojos familiares.

Cual unos largos ecos que a distancia se funden
en una tenebrosa y profunda unidad,
vasta como la noche, como la luz inmensa,
se contestan perfumes, colores y sonidos
[...]

- Correspondencias, **C. Boudelaire.**

Índice

| | |
|---|-----------|
| Resumen | 1 |
| Introducción | 3 |
| Cáncer | 3 |
| Cáncer pulmonar | 4 |
| Células <i>Stem</i> del Cáncer (CSCs) | 5 |
| Búsqueda de marcadores de cáncer pulmonar..... | 7 |
| Factores de la transcripción (genes homeobox) en cáncer..... | 8 |
| <i>MEOX2</i> en CSCs y cáncer pulmonar | 10 |
| Quiescencia y transición epitelio-mesénquima..... | 14 |
| Planteamiento..... | 19 |
| Hipótesis | 20 |
| Objetivo General | 20 |
| Objetivos Particulares..... | 20 |
| Estrategia experimental | 21 |
| Materiales y métodos | 22 |
| Resultados | 27 |
| Análisis morfológico y de viabilidad celular <i>in vitro</i> en cáncer pulmonar | 27 |
| Análisis de la expresión basal de <i>MEOX2</i> y <i>TWIST1</i> | 28 |
| Análisis de la expresión inducible de <i>Meox2</i> mediante TGF- β 1..... | 29 |
| La expresión de <i>MEOX2</i> es dependiente de la densidad celular y la concentración de Suero Fetal Bovino (SFB) <i>in vitro</i> | 31 |
| Participación de <i>MEOX2</i> en la proliferación celular <i>versus</i> quiescencia | 33 |
| Determinación de <i>MEOX2</i> involucrado en proceso de apoptosis | 36 |
| <i>MEOX2</i> involucrado en proceso de la transición epitelio-mesenquima..... | 38 |
| Discusión | 42 |
| Conclusiones | 49 |
| Perspectivas | 51 |

| | |
|--------------------------------|-----------|
| Literatura citada | 52 |
| Abreviaturas | 67 |
| Glosario..... | 68 |
| Anexos | 69 |

Resumen

Con 1.8 millones de nuevos casos anuales y una mortalidad de 19.4% a nivel mundial, el cáncer pulmonar se coloca como el cáncer de mayor incidencia y mortalidad. Diversos estudios han identificado una subpoblación de células dentro de la masa tumoral que poseen una alta capacidad de formación de nuevos tumores tras su implantación, llamadas células troncales del cáncer (CSCs). Éstas además poseen características similares a las poblaciones de células troncales fisiológicas, como división celular lenta y resistencia a quimio y radioterapia. Al respecto, las pautas tradicionales de tratamiento basadas en quimioterapia probablemente fallan en eliminar CSCs, pues tienen como blanco las células tumorales en proliferación, por esto es probable que la regulación de la autorenovación y la quiescencia sea central en la patología de las CSCs. Hallazgos de nuestro grupo de investigación mostraron aumento en la variación del número de copias de *MEOX2* (gen involucrado en la quiescencia) y de la expresión génica (mRNA) de *MEOX2* y *TWIST1* (gen involucrado en la transición epitelio-mesénquima y quimiorresistencia) en muestras de pacientes con cáncer de pulmón, en relación con tejido pulmonar histológicamente normal. Por lo que este trabajo analizó la participación de *MEOX2* en la capacidad de quimiorresistencia en células de cáncer pulmonar *in vitro*, complementándolo con el análisis de marcadores moleculares de la transición epitelio-mesénquima asociados a la expresión de *MEOX2*. Esto mediante tratamientos que involucran la inducción ó inhibición de *MEOX2* (utilizando TGF- β 1 ó siRNAs) en tres modelos celulares de NSCLC frente a un reto farmacológico con cisplatino, analizando los niveles de mRNA por qPCR, de proteínas por Western Blot, y de proliferación celular y apoptosis por citometría de flujo.

Los resultados obtenidos mostraron: la confirmación de la dependencia de la expresión *MEOX2* a la densidad celular y al suero fetal bovino, la similitud de los patrones de

expresión entre *MEOX2* y E-cadherina y la consistente detección de altos niveles de mRNA de *MEOX2* en tumores sólidos de pacientes contra los de las tres líneas celulares utilizadas. Sin embargo, las evidencias obtenidas no permitieron apoyar la participación de *MEOX2* en mecanismos de quimiorresistencia en cáncer pulmonar.

Introducción

Cáncer

Diversas características celulares y moleculares definen al cáncer, entre ellas la capacidad de dividirse y proliferar de manera descontrolada, evadiendo mecanismos y procesos de control celular y tisular, por lo que suele desarrollarse un proceso de invasión hacia regiones tisulares adyacentes y diseminarse a diferentes órganos (este último proceso conocido como metástasis) (OMS, 2011). Sin embargo, destacan características adicionales que Hanahan y Weinberg han clasificado y llamado en el año 2000 como las marcas moleculares del cáncer, entre ellas destacan cinco: 1) mantenimiento de la señal proliferativa, 2) resistencia a muerte celular, 3) inducción de angiogénesis, 4) inmortalidad replicativa y 5) evasión de supresores de crecimiento. Debido al avance en la investigación del cáncer durante la última década, estos mismos autores en 2011 propusieron 4 nuevas características: 1) promoción tumoral causada por procesos inflamatorios, 2) inestabilidad genómica y mutación, 3) evasión del sistema inmune y 4) alteraciones del metabolismo energético celular (Hannahan y Weinberg, 2011).

De todos los tipos de cáncer, los de origen epitelial (conocidos como carcinomas) representan el 85%, y de entre éstos, los principales tipos de carcinoma por número de casos estimados en 2012 a nivel mundial son: cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de próstata (GLOBOCAN 2012). En ese mismo año se detectaron 1.8 millones de nuevos casos de cáncer pulmonar a nivel mundial, lo que por sí solo representa el 13% de todos los cánceres diagnosticados en ese año, con una mortalidad del 19.4%, en comparación con el cáncer de mama que posee una incidencia de 11.9% y una mortalidad de 6.4%, el cáncer de colon con una incidencia de 9.7% y mortalidad de 8.5%, y cáncer de prostata, con 7.8% y 3.7% respectivamente, colocando al cáncer de pulmón como el de mayor incidencia y mortalidad (*Ibídem*).

Histopatológicamente, el cáncer pulmonar está dividido en dos grupos: cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC por sus siglas en inglés) y cáncer pulmonar de células no-pequeñas (NSCLC). Mientras que el SCLC es el subtipo más agresivo y le corresponde del 10 al 15% del cáncer pulmonar, el grupo NSCLC representa el 85-95% de todos los casos, y este último grupo a su vez se encuentra subdividido en cuatro tipos histológicos: el tipo adenocarcinoma, el cáncer de células escamosas, el cáncer de células grandes y “otros”, por ejemplo los de origen neuroendócrino (Anglim *et al.* 2008).

Cáncer pulmonar

De acuerdo con reportes del GLOBOCAN en 2012, fueron registradas cerca de 8.2 millones de defunciones a nivel mundial, de las cuales el cáncer pulmonar ocupa la primera causa de mortalidad dentro de los padecimientos oncológicos (GLOBOCAN 2012) y posee altos índices de metástasis (Klein *et al.*, 1991). En México durante el periodo de 1998 a 2008, la tasa de mortalidad por cáncer se incrementó, pasando de 57.7 a 66.6 por cada 100 mil habitantes, destacando ligeras diferencias entre género, pues en el género femenino aumentó de 59.6 a 66.7 por cada 100 mil habitantes, mientras que en el género masculino el aumento fue de 55.6 a 66.5 cada 100 mil habitantes. En 2008, de acuerdo con la tasa de mortalidad observada de tumores malignos para la población mayor a 60 años, los tumores en tráquea, bronquios y pulmón presentan la tasa más alta (60.19 por cada 100 mil habitantes) (INEGI 2011). De acuerdo con registros del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) se cuantificó el efecto en términos económicos de las enfermedades atribuibles al consumo de tabaco en México durante el año 2004, señalando que el costo promedio anual por paciente con cáncer pulmonar ascendió a cerca de 150 mil pesos, mientras que los gastos totales generados por el IMSS debido a este padecimiento llegaron a poco más de 66 millones 800 mil pesos anuales (Reynales-

Shigematsu *et al.*, 2006). En relación a esto, para el control del cáncer pulmonar la quimioterapia juega un papel muy importante, en el que el agente más ampliamente utilizado para el tratamiento del NSCLC ha sido el cisplatino (Schiller *et al.* 2002). Sin embargo, su eficacia se ve mermada por el desarrollo de quimioresistencia, dificultando la completa erradicación de la enfermedad. Por este motivo, el entendimiento de los mecanismos que subyacen a esta patología es de vital importancia para el desarrollo de tratamientos más efectivos (Wang *et al.*, 2013).

Células *Stem* del Cáncer (CSCs)

Las poblaciones celulares neoplásicas han sido fenotípicamente descritas como razonablemente homogéneas hasta relativamente tarde en el curso de la progresión tumoral, cuando la hiperproliferación combinada con el incremento de la inestabilidad genética y epigenética dan lugar a distintas subpoblaciones clonales (Hanahan y Weinberg 2011). En años recientes se ha acumulado evidencia suficiente que señala la existencia de un nuevo tipo de células dentro de la masa tumoral, llamadas células troncales (*stem*) del cáncer (CSCs). Tales subpoblaciones de células, que comparten perfiles transcripcionales semejantes a poblaciones de células troncales fisiológicas, poseen una alta capacidad para formar nuevos tumores tras su implantación en ratones inmunodeficientes (Hannahan y Weinberg, 2011; Cho y Clarke, 2008; Lobo *et al.*, 2007). Esta definición funcional es complementada por la expresión de marcadores fenotípicos de CSCs normalmente expresados en las células troncales alojadas en tejidos epiteliales histológicamente normales (Al-Hajj *et al.*, 2003). Basado en lo anterior las CSCs han sido implicadas en la patogénesis de enfermedades malignas de origen hematopoyético (Reya *et al.*, 2001) y tumores sólidos entre otros cáncer de mama, tumores neuroectodermales (Gilbertson y Rich, 2007; Al-Hajj *et al.*, 2003), cáncer de colon (Ricci-Vitiani *et al.*, 2009),

glioma (Bao *et al.*, 2006), adenocarcinoma de páncreas (Dembinski y Krauss, 2009) y cáncer de pulmón (Zhang, *et al.*, 2012). Se ha descrito también que patrones de expresión aberrante de genes que codifican para factores de la transcripción logran inducir un estado celular semejante a células troncales (Mohammad y Baylin 2010). Dado que las células madre de adulto ya presentan un potencial replicativo ilimitado, se hipotetiza que la transformación de estas células logra constituirse en el origen de diversos tumores sólidos malignos (Blanpain y Fuchs, 2009; Kangsamaskin *et al.*, 2007). Las células troncales de vida larga tienen la oportunidad de acumular mutaciones genéticas de carácter oncogénico a través del tiempo, las cuales se derivan de fuentes mutagénicas comunes como la inflamación aguda y/o crónica, la radiación, agentes químicos y/o infecciones, a diferencia de las células de rápida proliferación y diferenciación (Dean, 2006; Woodward *et al.*, 2005). Se considera factible que las CSCs posean características comúnmente presentes en poblaciones celulares tipo troncal fisiológicamente normales, como una actividad metabólica diferencial (por ejemplo quiescencia), actividad específica de ciertas vías de señalización (como *NOTCH*, *SHH* y *WNT*) y regulación de ciertas características del ciclo celular (como evasión de la apoptosis), aunque de manera aberrante (Reya *et al.*, 2001; Jordan *et al.*, 2006). Dichas características han sido asociadas con el fenómeno de quimiorresistencia y alto potencial metastásico en células neoplásicas de tumores sólidos (Anderson *et al.*, 2007; Levina *et al.*, 2008).

Respecto a lo anterior las pautas tradicionales de tratamiento basadas en quimioterapia tienen como blanco las células tumorales en proliferación, probablemente fallando en eliminar CSCs de división lenta, las cuales deben ser erradicadas para proveer una sobrevivencia larga, libre de enfermedad (Visvader y Lindeman, 2008). Dadas las similitudes entre células troncales de adulto y CSCs, es probable que la regulación de

autorenovación y quiescencia pueda ser central en la patología de CSCs (Jordan *et al.*, 2006, Ricci-Vitiani *et al.*, 2008). En pulmón las células Clara han mostrado representar a las células troncales de las vías respiratorias, y han sido implicadas como el origen tumoral del grupo NSCLC. A este respecto Ceteci y colaboradores en 2012 investigaron en dicho tipo de células de un modelo murino el papel del gen E-cadherina, y observaron que la inactivación post-natal de E-cadherina afectaba su diferenciación celular y comprometía la regeneración de las vías respiratorias. Asimismo, la pérdida de su expresión en tejido pulmonar adulto llevaba a la expansión de las células troncales (*stem*) bronquiales y a una diferenciación celular disminuida asociada a la vía de señalización de *WNT*. Esto asociado a una proliferación celular fuera de control que dio lugar a una hiperplasia, y en algunos ratones, a la formación de tumores sólidos, los guió a la conclusión de que la pérdida de expresión de E-cadherina en estas células *stem* conduce a la formación de tumores cuando se mantienen mutaciones adicionales. Además, muchas de las vías de señalización intracelular en las células *stem* fisiológicas resultan también prominentes en las CSCs de pulmón, entre ellas las vías de *WNT*, *NOTCH* y *SHH* (O'Flaherty *et al.*, 2012), algunas de las cuales se han sugerido como probables marcadores de pronóstico y sobre-vida en cáncer pulmonar.

Búsqueda de marcadores de cáncer pulmonar

Existen distintos mecanismos moleculares que regulan la expresión genética en cáncer, entre ellos los genéticos y epigenéticos, sobre este último destacan la metilación del DNA en islas CpG de regiones promotoras por enzimas DNA metil-transferasas (Plass, 2002) y la participación de complejos proteicos que modifican químicamente los residuos amino-terminales de las histonas en la estructura de la cromatina (metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, biotinilación, ADP ribosilación) (Delage y

Dashwood, 2008), así como la regulación negativa de la expresión del RNAm por medio de miRNAs (*op. cit.*).

Basado en lo anterior, hace una década surgió la necesidad por el estudio del epigenoma del cáncer, caracterizado por cambios globales en la metilación del DNA, modificaciones en los patrones de histonas y diferentes perfiles de expresión de enzimas que modifican la estructura de la cromatina (Esteller, 2007). Asimismo, es cada vez más evidente que genes que participan en el desarrollo embrionario se encuentran aberrantemente expresados en las neoplasias malignas, y que el grado de malignidad se encuentra estrechamente relacionado con dicho patrón epigenético y transcripcional del control de la expresión genética (Mohammad y Baylin 2010). Como en otros tipos de cáncer, el de pulmón se encuentra afectado por el grado de metilación de las secuencias promotoras de genes, como *CDKN2A*, *RARB*, *APC* (Liloglou *et al.*, 2012), *DAPK*, *RASSF1*, *RASSF5*, y *PTEN*, asociados con alta recurrencia, ó *MGMT* y *p16*, cuya hipermetilación ha sido correlacionada con pobre supervivencia (Buckingham *et al.*, 2010). Así mismo, se ha mostrado que la hipermetilación global del genoma está asociada con la inestabilidad genómica, la sobreexpresión de transcritos aberrantes (Daskalos *et al.*, 2009), y pobre pronóstico en pacientes con cáncer pulmonar (Saito *et al.*, 2010) donde juegan un papel determinante la participación de factores de la transcripción, entre ellos los del tipo Homeobox.

Factores de la transcripción (genes homeobox) en cáncer

Los genes homeobox cuyos transcritos se traducen en factores de la transcripción contienen un dominio de unión a DNA de 60 aminoácidos (llamado homeodominio), que participan en la creación de patrones mesodermales y que dan lugar a los principales ejes antero-posterior y bilateral del cuerpo durante el desarrollo embrionario (Candia *et al.*,

1992). A pesar del gran número de estudios que han reportado la expresión desregulada de genes homeobox en cáncer, escasos trabajos han profundizado sobre su papel funcional en la carcinogénesis. Originalmente se pensaba que los genes homeobox eran activadores transcripcionales que promovían la oncogénesis a través de su sobreexpresión en células neoplásicas. Sin embargo, actualmente se sabe que la suma de cambios en la pérdida o ganancia de expresión de genes *HOX* están asociadas con tumorigénesis y progresión biológica del tumor, no obstante reportes de hace más de una década mencionaban la falta de relación o evidencia entre las propiedades transcripcionales de factores Homeobox con su capacidad de potencial oncogénico (Abate-Shen, 2002). Como ejemplo de ello, previamente se ha documentado que la expresión de los genes *HOX* y *MSX* (mutator S homolog homeobox) se encuentran generalmente restringidos a células indiferenciadas o proliferativas (*ibídem*), como ocurre en la formación de patrones tisulares durante la embriogénesis. Adicionalmente, los trabajos de Takahashi y Yamanaka en 2006 evidenciaron 4 factores de la transcripción indispensables en la inducción de pluripotencialidad en fibroblastos de ratón, entre ellos destaca el gen homeobox *SOX2* expresado en diferentes células progenitoras o troncales, mientras que adicionalmente se encuentra presente en un amplio espectro de enfermedades malignas promoviendo el crecimiento tumoral (Rodríguez-Pinilla *et al.*, 2007; Gangemi *et al.*, 2009; Ikushima *et al.*, 2009; Laga *et al.*, 2010). En contraste, los patrones de expresión de otras sub-familias de genes homeobox son consistentes con sus funciones como efectores positivos de la diferenciación, como *NKX3.1*, *CDX2* y *BARX2*, los cuales ven disminuida su expresión durante la carcinogénesis (Abate-Shen 2002), o bien el aumento en la expresión de miembros de la subfamilia de *MEOX* (*mesenchyme* homeobox), como ocurre para *MEOX2* durante la progresión histopatológica del cáncer pulmonar, así como su asociación con un pobre pronóstico y

resistencia al tratamiento oncológico *in vitro* y en pacientes con cáncer pulmonar (Ávila Moreno F, *et al.*, 2014).

***MEOX2* en CSCs y cáncer pulmonar**

Por su cercanía filogenética, la familia de genes *MEOX* (*mesenchyme homeobox*) se encuentra dentro del tipo de genes homeobox, a su vez dentro de la clase de genes ANTP específica para animales (García-Fernández, 2005), al igual que las familias de genes *EVX*, *HOX* y *PARAHOX* (Dush y Martin, 1992). Sin embargo aún se desconoce con absoluta certeza la funcionalidad del gen *MEOX2* en el cáncer, también llamado *GAX* (por las siglas en inglés de *growth arrest-specific homeobox*). No obstante la presencia de *MEOX2* ha sido relacionada con procesos anti-angiogénicos y anti-inflamatorios, cuyas evidencias han apoyado su definición funcional como un gen supresor de tumor. Al respecto, Gorski en 1993 expuso células no-neoplásicas vasculares de músculo liso (VSMC) obtenidas de rata a diferentes concentraciones del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), evaluando que la expresión de *GAX* (o *MEOX2*) fue negativamente afectado por la presencia de suero fetal bovino en condiciones de cultivo *in vitro*, en contraste fue posible detectar aumento en su expresión durante la inducción de quiescencia provocada por ausencia de PDGF *in vitro*.

Por otra parte, Patel y colaboradores, en 2005 demostraron mediante ensayos de tipo EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) que *GAX* impedía la unión del factor transcripcional NF-κB (actuando como factor proangiogénico en células endoteliales y pro-inflamatorio en células del sistema inmune) a sus secuencias genéticas promotoras blanco. Adicionalmente, mediante el uso de microarreglos de expresión de RNAm y ensayos de inducción controlada de *MEOX2* mediante su transfección por adenovirus, demostró alteraciones en los patrones de expresión genética entre los que destacan:

MADH7/SMAD7 (con aumento de 4.3 veces (inducido por TGF- β 1, y capaz por degradar a TGF β R1), TNF- α induced protein 3 con disminución de 6.4 veces (involucrado en procesos de apoptosis extrínseca), *SELE* (E-selectina) con disminución cercana a 62.6 veces (adhesión celular) y el factor de crecimiento *CXCL1* con disminución de -238.9 veces (involucrado en el crecimiento de tumores como melanoma y cáncer de mama, inflamación y quimiotaxis).

Sin embargo, Wu y colaboradores en 2005 describieron los efectos angiogénicos directos de *MEOX2* sobre células endoteliales de cerebro humano. Al respecto los autores demostraron que la menor expresión de *MEOX2* en dichas células endoteliales derivadas de pacientes con Alzheimer (etapas Braak V y VI) se encuentra involucrada con la pobre formación de tubos capilares *in vitro* en contraste con la expresión de células del grupo control (etapas Braak 0 y I). Asimismo *MEOX2* fue implicado en la formación de tubos capilares bajo condiciones de hipoxia, actividad esencial en la formación y progresión de tumores (Hanahan y Weinberg, 2000).

Por otro lado, el estudio de Ohshima en 2009 mostró que *MEOX2* se encuentra deletado en algunos tumores de Wilms (una de las malignidades pediátricas más comunes), y propone que la pérdida de este gen podrían causar la progresión de dichos tumores. Asimismo, analizando el grado de metilación del DNA en 3 islas CpG, demostraron en 4 tumores y 3 líneas celulares derivadas de tumores Wilms, menor expresión de *MEOX2* solo durante la pérdida de metilación de la isla CpG del primer exón. Por el contrario, mediante el uso de microarreglos de DNA genómico y análisis de hibridación genómica comparativa, empleando muestras de cáncer pulmonar fue posible detectar no sólo aumento en el número de copias de los genes *AHR*, *MEOX2* y *TWIST1*, sino variaciones en patrón y nivel de metilación de secuencias promotoras (Álvarez, 2010 Tesis

Especialidad Oncología Torácica), siendo previamente *TWIST1* relacionado a fenómenos de la transición epitelio mesenquima (EMT) y quimioresistencia (Wen-Lei *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2004). Datos similares han sido recientemente encontrados por nuestro grupo de investigación, donde ambos genes *MEOX2* y *TWIST1* localizados en la región citogenética 7p21, poseen no sólo alteraciones genéticas sino epigenéticas, entre ellas alteraciones en los niveles de metilación del DNA y recambio aberrante del código de histonas H3k27me3 y H3k4me3 asociados a quimioresistencia y pobre pronóstico en cáncer pulmonar (Ávila Moreno *et al.*, 2014). Adicionalmente, el trabajo generado por nuestro grupo de investigación (Armas López L. 2011, Tesis Maestría en Ciencias) ha propuesto describir los blancos genéticos (secuencias promotoras) del factor *MEOX2* mediante una estrategia de análisis masivo del epigenoma, con el objetivo de identificar y profundizar sobre el posible papel central de *MEOX2* en los procesos de control transcripcional en cáncer pulmonar. A este respecto, nuestro grupo de investigación ha profundizado sobre diversas evidencias que señalan a *MEOX2* como el factor transcripcional capaz de posicionarse transcripcionalmente en secuencias promotoras de genes miembros de vías de señalización embrionaria, entre ellas Sonic Hedgehog en carcinomas sólidos pulmonares participando en la capacidad de resistencia innata al tratamiento por fármacos oncológicos, (Armas López L, 2016 tesis doctoral), así como, en la respuesta y pronóstico clínico frente a esquemas de terapia dirigida en pacientes con cáncer pulmonar (Armas López *et al.*, 2016 sometido a publicación).

Por otra parte, en el estudio masivo del genoma realizado por Frullanti y colaboradores (2011) se identificaron polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en 600 pacientes con adenocarcinoma de pulmón, evidenciando al SNP en rs10278557, con localización en el cromosoma 7 en la región intrónica del gen *MEOX2*, como una asociación estadística importante, vinculándolo con el riesgo de progresión clínica en pacientes con cáncer

pulmonar del grupo NSCLC. Adicionalmente, estudios sobre el estado de metilación de secuencias promotoras del gen *MEOX2* (Cortese *et al.* 2008) identificaron aumento en la metilación del gen *MEOX2* en células tumorales pulmonares, en contraste con células pulmonares en estadio fetal y tejido pulmonar de adulto histológicamente normal, postulándose como un probable marcador de detección temprana en cáncer pulmonar.

Aunado a lo anterior, el mecanismo de quiescencia asociado a *MEOX2* ha sido abordado en condiciones de normalidad histológica a través de un conjunto de estudios medulares realizados por Gorski en 1993, Valcourt en 2007 e Irelan en 2009; destacando la inducción de quiescencia en fibroblastos, la cual se regula bajo 3 mecanismos: *i*) privación de mitógenos, *ii*) inhibición por contacto y *iii*) pérdida de adhesión, destacando un perfil transcripcional propio. Sin embargo, existe un cuarto programa transcripcional inducido por la sobreexpresión de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, como *p21* y *p16^{INK4a}* (Coller *et al.*, 2006). Basado en lo anterior, Irelan y colaboradores (2006) transfectaron (infectaron) diferentes líneas celulares humanas (U2OS células de ostrosarcoma, IMR90 fibroblastos de pulmón, WI38 fibroblastos, HEK293 queratinocitos) con retrovirus que sobreexpresan *MEOX2*, logrando inducción de arresto celular de manera similar a lo sucedido con la exposición a retrovirus que sobreexpresan el oncogen *RAS*, el cual se sabe que puede activar este mecanismo (Ohtani *et al.*, 2001). Posteriormente, al agregar el mismo retrovirus con *MEOX2* en fibroblastos, por medio de western blot observaron aumento en la expresión de *p16^{INK4a}*, capaz de inhibir la proliferación. Posteriormente, en fibroblastos transfectados con retrovirus/*MEOX2*, mediante inmunoprecipitación de Meox2 y ensayos de amplificación del DNA por PCR semicuantitativo sobre la secuencia promotora de *p16*, los autores demostraron la unión de *MEOX2* a secuencias promotoras de *p16*, sugiriendo así la inducción de arresto celular a través de la activación de la transcripción de *p16^{INK4a}* mediado por la actividad del factor

transcripcional *MEOX2*. Por su parte, Valcourt en 2007 sugiere que *MEOX2* interactúa con *SMAD3* y *SMAD4* en la vía de señalización de TGF- β para activar al gen pro-apoptótico *p21* en líneas celulares HaCaT (queratinocitos), NMuMG (células epiteliales no-neoplásicas de mama) y MCF-7 (células de cancer de mama) a través de la unión al promotor del gen *p21*. Así mismo, se demostró que TGF- β 1 aumenta la expresión de *MEOX2* en células HaCaT y NMuMG, por lo cual se intentó discernir si *MEOX2* participa en el fenómeno de la transición epitelio-mesénquima en células no-neoplásicas HaCaT y NMuMG evaluando la expresión de E-cadherina (utilizada comunmente como marcador del fenotipo epitelial), bajo cuyas evidencias los autores deducen que *MEOX2* no participa en el establecimiento de la EMT, no obstante dichos resultados se aprecian poco concluyentes. Por ejemplo: **1)** La recuperación o aumento de los niveles del mRNA de *MEOX2* coincide con la “segunda ola” de expresión de factores de transcripción inducidos por TGF- β 1 (como *SNAIL* o *TWIST1*), los cuales regulan genes críticos para la EMT. **2)** La expresión ectópica de *MEOX2* (mediante adenovirus) no aumentó los niveles de E-cadherina en los 2 modelos celulares utilizados (HaCaT y NMuMG). **3)** El uso de inhibidores proteosomales agrega un grado de incertidumbre no cuantificable a la regulación fisiológicamente normal de los genes y proteínas involucrados en la EMT, lo anterior no permite distinguir con claridad si *MEOX2* se encuentra o no involucrado en el fenómeno EMT.

Quiescencia y transición epitelio-mesénquima

Durante el desarrollo embrionario y postnatal, la reorganización del tejido, curación de heridas y carcinogénesis, las células epiteliales pierden de forma estable o transitoria su polaridad epitelial adquiriendo un fenotipo mesenquimal (Janda *et al.*, 2002), el cual se encuentra caracterizado en neoplasias por el incremento en la capacidad de invasión,

metástasis, quimiorresistencia y evasión del sistema inmune (Kurimoto *et al.*, 2016). La molécula TGF- β ha sido ampliamente implementada en la inducción de la transición epitelio-mesénquima (Thiery, 2002), y recientemente se ha observado que sus efectos en conjunto con el uso de FGF-2 en líneas de adenocarcinoma de pulmón (PC-9 y HCC827) reduce la sensibilidad a los fármacos gefitinib y cisplatino (*op. cit.*). Así mismo, en el estudio de Janda y colaboradores en 2002, la exposición de células epiteliales mamarias de ratón (que sobre-expresan el oncogen *RAS*) a la molécula de TGF- β , resultó en la pérdida progresiva de la morfología epitelial y reducción en la expresión de marcadores epiteliales, incluyendo citoqueratinas y E-cadherina. Al mismo tiempo tales células transformadas adquirieron la expresión de marcadores mesenquimales, como Vimentina, y adquirieron morfología fusiforme semejante a fibroblastos, todas éstas características propias del fenómeno de la EMT. Efectos similares se han observado en líneas celulares de NSCLCs (A549 y HCC4006), donde también se ha observado una mayor migración celular en contraste con las células que no han sufrido EMT (Koeck *et al.*, 2016). Adicional a los cambios morfológicos, las células en proceso de transición comienzan a producir su propio TGF- β , promoviendo un proceso autocrino de estimulación, permitiendo mantener el fenotipo mesenquimal por periodos prolongados incluso posterior al retiro del tratamiento *in vitro* con TGF- β (Oft *et al.*, 1996). Así mismo, ha sido reportado que el mantenimiento de la señalización de TGF- β a través de retroalimentación positiva logra un papel destacado en el mantenimiento de la expresión de la integrina $\alpha_v\beta_6$ (con bajos niveles en tejido epitelial normal y sobreexpresada durante el desarrollo embrionario, heridas y tumores epiteliales), así mismo se ha descrito que el proceso de la EMT ocurre en células tumorales de origen epitelial (carcinomas) en humano (Van Aarsen *et al.*, 2008). La vía de señalización por TGF- β resulta una vía fundamental, compleja y finamente regulada, que desarrolla un papel importante durante el desarrollo embrionario,

la vida post-natal y adulta, todo ello en el contexto de alteraciones en el epigenoma (Kubiczkova *et al.*, 2012; Mohammad y Baylin, 2010). Paradójicamente, TGF- β es capaz de promover y suprimir la formación de tumores, destacando ampliamente los efectos antiproliferativos y apoptóticos, por lo que se ha descrito a TGF- β como supresor de tumor en epitelio normal, inhibiendo la proliferación celular e induciendo la apoptosis. No obstante, durante la progresión del cáncer, el tumor frecuentemente evita las actividades supresoras, beneficiándose de dicha ventaja durante la aparición de mutaciones en componentes de señalización que inhiben la respuesta antiproliferativa. Ello permite que el tumor emplee a TGF- β como factor oncogénico induciendo la motilidad, invasión, metástasis, así como el proceso de transición epitelio-mesénquima (*op. cit.*). Además, durante la progresión del tumor, la sensibilidad a efectos de TGF- β se pierde frecuentemente, mientras que en estadios neoplásicos avanzados TGF- β promueve la formación neoplásica, por lo que células malignas adquieren resistencia a efectos supresores de TGF- β , ya sea por mutación y/o inactivación de receptores de TGF- β , así como alteraciones de la vía de señalización a través de moléculas SMADs (Kubiczkova *et al.*, 2012). A este respecto, a menudo se observan niveles elevados de TGF- β 1 en muchos tipos de cáncer en correlación con pobre pronóstico en pacientes, ejemplos de ellos: carcinoma hepatocelular, cáncer de colon, próstata, pulmón y cáncer de mama (Teicher *et al.*, 2001; *op. cit.*). Resulta interesante hacer notar que Bierie y colaboradores en 2008, observaron en células de cáncer de mama de un modelo murino, que la pérdida de señalización de la vía de TGF- β resultaba en el incremento de la expresión de *CXCL1*, que como ya se mencionó anteriormente, es el mayor blanco de represión de *MEOX2*. Adicionalmente, otros estudios sugieren que TGF- β es uno de los reguladores críticos de los procesos de inflamación; relacionado a esto se piensa que el proceso de metástasis es coordinado entre células tumorales y las células del hospedero a través de

mecanismos de inflamación (Mareel y Leroy, 2003). Los efectos proinflamatorios y prometastásicos de TGF- β son regulados a través de la vía de NF- κ B, considerado uno de los reguladores maestros de la inflamación y control de la expresión de vías de proliferación y supervivencia celular (Rahman y Fazal 2011). Así mismo, TGF- β induce a la baja la expresión de NF- κ B, como se ha mostrado en tejido intestinal, estimulando de forma directa la actividad transcripcional del promotor de *I κ B- α* *in vitro*. Sin embargo, la molécula SMAD7 mantiene alta actividad de NF- κ B al bloquear la señalización de TGF- β 1 (Monteleone *et al.*, 2004), formando un bucle que mantiene regulada la transcripción de estas dos moléculas.

En células del grupo NSCLC la expresión elevada de TGF- β se correlaciona con la progresión clínica del padecimiento oncológico (Sterlacci *et al.*, 2011). Así mismo, se ha propuesto que la expresión y niveles circulantes elevados de TGF- β representan un factor de prognosis el cual podría servir como prueba de diagnóstico complementario en la detección de cáncer de pulmón (González-Santiago *et al.*, 2011). Al respecto, el estudio de Xu y colaboradores en 2011 demostró que en células A549 de adenocarcinoma pulmonar, el knockdown de *T β RII* (receptor de TGF- β II) provoca supresión de la proliferación celular, invasión y metástasis, mientras que induce procesos apoptóticos. Así mismo, Jeon y colaboradores en 2008 observaron correlación entre menor supervivencia de pacientes con cáncer pulmonar, con la presencia de SMAD6, molécula que contribuye a la progresión del cáncer pulmonar al promover el crecimiento mediado por TGF- β , lo cual quedó demostrado al evaluar el knockdown de *SMAD6* resultando en incremento del índice de apoptosis en células de cáncer pulmonar del grupo NSCLC H1299.

Por otro lado, altos niveles de TGF- β son secretados en otros tipos de cáncer, como en las células de mieloma múltiple (MM), así como por células estromales de médula ósea

(CEMO) (Urashima *et al.*, 1996). La secreción de TGF- β aumenta con relación al estado de diferenciación de las células B, mientras que el incremento en la producción de TGF- β es seguido por el aumento en la secreción de interleucina 6 (IL-6) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en muestras CEMO (*Ibidem*). En este contexto TGF- β resulta el mayor inductor de IL-6 y VEGF, dos citocinas importantes en MM y relacionadas con proliferación celular, mientras que en contraste este mismo factor inhibe la proliferación y secreción de Ig en células B normales (Urashima *et al.*, 1996). Con relación a ello, al bloquear la acumulación nuclear de SMAD2/3 (perteneciente a la vía de TGF- β) mediante el uso de SD-208 (T β RI *kinase inhibitor*) se disminuye la producción de IL-6 y VEGF, reduciendo la migración celular, e inhibiendo el crecimiento del MM, lo cual adicionalmente conduce a resistencia a fármacos oncológicos (Hayashi *et al.*, 2004).

Adicionalmente, TGF- β representa uno de los reguladores endógenos negativos más importantes de la hematopoyesis, modulando la proliferación, diferenciación y función de todos los tipos de linfocitos, macrófagos y células dendríticas, regulando así la inmunidad innata y adquirida (Yang *et al.*, 2010). En contraste, hallazgos experimentales publicados por Kulkarni y colaboradores en 1993, mostraron que en ratones adultos, la administración de altas dosis de anticuerpo neutralizante para TGF- β durante 12 semanas bajo exposición continua, así como la exposición de por vida a T β RII soluble (receptor II de TGF- β) en ratones transgénicos, no afectó de manera significativa la salud de la población murina estudiada. Lo cual sugiere que los tratamientos anti-TGF- β (o la inhibición de alguno de los elementos de la vía) sean relativamente seguros, y puedan emplearse como esquemas de tratamiento en conjunto con medicamentos tradicionales (enfocados de manera preferente con la erradicación de las células neoplásicas en división) constituyendo probables esquemas terapéuticos contra mecanismos de

quimiorresistencia y/o reincidencia del cáncer en pacientes del grupo NSCLC, así como otros padecimientos oncológicos.

Planteamiento

Evidencias recientes obtenidas por nuestro grupo de investigación señalan la pertinencia en profundizar sobre la participación de factores de transcripción tipo Homeobox, entre ellos *MEOX2* en fenómenos de quimioresistencia del cancer pulmonar. Así como, la participación de *MEOX2* inducible mediante el estímulo por TGF- β , cuya citocina se encuentra desregulada en cáncer. Recientemente, se ha demostrado la inducción de *MEOX2* mediada por TGF- β 1, cuya vía de señalización desarrolla funciones ambivalentes en procesos neoplásicos malignos (Pardali y Moustakas 2007; Kubiczkova *et al.*, 2012). Aunque se ha relacionado comúnmente a *MEOX2* como un posible gen supresor de tumor, su participación a través de la vía TGF- β , así como en la inducción de quiescencia, pérdida de expresión de integrinas y posible inducción de *TWIST1* indican que probablemente *MEOX2* forme parte de los mecanismos de quimioresistencia en cáncer pulmonar, e incluso que se encuentre involucrado en la transición del fenotipo mesenquimal, contribuyendo a procesos de migración, invasión y metástasis tumoral.

Hipótesis

-*MEOX2* promueve mecanismos de quimiorresistencia en el cáncer pulmonar de células no pequeñas.

Objetivo General

-Analizar la participación de *MEOX2* en la capacidad de quimiorresistencia en células de cáncer pulmonar de células no pequeñas *in vitro*.

Objetivos Particulares

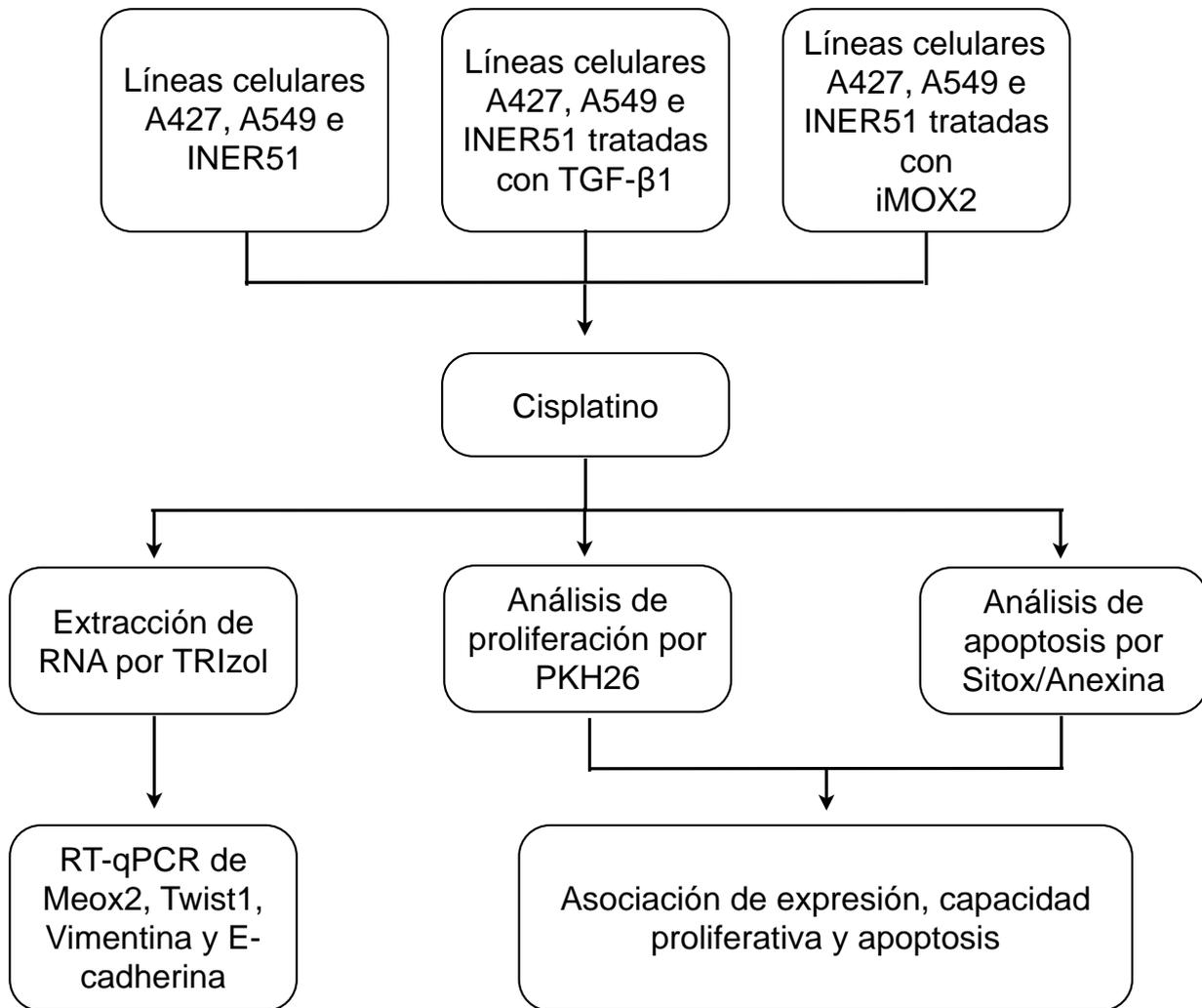
-Analizar tres modelos celulares *in vitro* con base en la expresión de *MEOX2* en cáncer pulmonar de células no pequeñas (líneas celulares A549, A427 e INER51).

-Analizar la inducción de la expresión de *MEOX2* mediante el uso de TGF- β 1 y su posible impacto en los niveles de proliferación celular.

-Evaluar la capacidad de quimiorresistencia *in vitro* en respuesta al silenciamiento de *MEOX2* mediante el uso de siRNAs y su posible impacto en la muerte celular por apoptosis.

-Analizar la posible correlación de capacidad de quimiorresistencia con la expresión de marcadores moleculares asociados con el fenotipo de la transición epitelio-mesénquima (*TWIST1*, Vimentina y E-cadherina), dependiente de *MEOX2*.

Estrategia experimental



Materiales y métodos

Modelos celulares

Se utilizaron las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas de origen caucásico A427 y A549, obtenidas del *American Type Culture Collection* (ATCC), y la línea celular de adenocarcinoma de células no pequeñas de origen mestizo mexicano INER51, establecida dentro de la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) (Ponce de León & Barrera, 2005; De Lucio *et al.*, 2005). Las muestras de tejido tumoral se obtuvieron del banco de muestras de nuestro grupo de investigación. Así mismo, se utilizaron como control de expresión células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de donantes sanos separadas por Ficoll.

Cultivos celulares

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI 1640 adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 0.1% de Gentamicina/Penicilina, 1% de L-Glutamina, 1% de Piruvato de Sodio y 2.5% de Buffer HEPES, en condiciones de 37°C y 5% de CO₂ (cultivo estándar). Debido a que la expresión de *MEOX2* a mostrado ser suero-dependiente, 48 horas antes de cualquier medición o experimento fueron incubadas en medio con 3% de SFB con el fin de facilitar la detección de *MEOX2* (cultivo tratamiento). El conteo y viabilidad celular se realizaron en una cámara de Neubauer por azul de tripano.

Tratamientos

Cada línea fue dividida en 2 grupos: 1) tratamiento con cisplatino y 2) control negativo. A su vez estos grupos se dividieron en 3 subgrupos: **I)** TGF- β 1, **II)** RNAi de *MEOX2* (iMx) y **III)** control negativo siRNA *scramble*.

Tratamiento farmacológico por cisplatino

Las concentraciones de cisplatino fueron obtenidas a partir de curvas de citotoxicidad realizadas por nuestro grupo de investigación, las cuales se encuentran en la sección de anexos.

Inducción de *MEOX2* por TGF- β 1

Se administraron a las líneas celulares 7.5 ng/ml de TGF- β 1 analizando cambios en la expresión del RNAm de *MEOX2* en tiempos (16, 24 y 48 h) posterior a su administración. La concentración y tiempo de mayor inducción se emplearon como referencia para el desarrollo de ensayos y análisis final correspondiente.

Silenciamiento genético de *MEOX2* por siRNAs

Los siRNAs de *MEOX2* y Scramble se obtuvieron de *Santa Cruz Biotechnology, INC* (“MOX-2 siRNA (h): sc-106233” y “Control siRNA (Fluorescein Conjugate)-A sc-36869”) y fueron transfectados mediante *Lipofectamine 2000* de *Invitrogen*.

Extracción de RNA y proteínas

La extracción de RNA y proteínas se realizó siguiendo el protocolo de *TRIzol* de *Invitrogen*. La concentración de RNA de las muestras fue determinada utilizando los espectrofotómetros *NanoDrop ND-1000 UV* ó *Epoch™ Microplate*. Se determinó el cociente 260/280 para observar la pureza del RNA tomando como valor aceptable $A_{260/280} > 1.8$. Para la concentración de proteínas se usó el método de Bradford (*Sigma-Aldrich*) en una placa de 96 pozos leyendo en un equipo *Epoch™*.

Análisis de expresión por RT-qPCR

El cDNA de cada muestra fue sintetizado a partir de 2 µg de RNA siguiendo el protocolo del kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* de Roche®. Se utilizó el software en línea “Probe Finder” de Roche® para el diseño de los *primers* y la elección de las sondas Taqman y posteriormente los *primers* fueron corroborados utilizando la herramienta en línea de BLAST desde el sitio del NCBI. Todos fueron sintetizados por Sigma Aldrich. (tabla de oligonucleótidos en la sección de anexos).

PCR en tiempo real

Para los PCR en tiempo real se utilizó el kit *Probe Master* y el termociclador *Light Cycler 480* de Roche® en un volumen final de 10µl y 100ng de cDNA totales por pozo. El programa de temperaturas fue el siguiente: pre-incubación: 3 min a 95°C 1 ciclo, amplificación: 10 s a 95°C, 17 s a 60°C, 30 s a 72°C por 40 ciclos, enfriamiento: 10 s a 40°C por un ciclo. Para corroborar la amplificación de algunos transcritos por qPCR, se realizó electroforesis en geles de agarosa de baja electro-endosmosis (marca *Roche*) al 3%.

Western Blot

Se realizó electroforesis de las proteínas en geles al 12% de poliacrilamida y stack agregando de 20 a 30µg de proteína por pozo en una solución 1:1 con buffer de carga (Laemmli Sample Buffer de BIO-RAD y β-Mercaptoetanol de Sigma-Aldrich) y se corrieron a 80 V por 20 min (stack) y posteriormente 130 V por 1 h 20 min. Se transfirió a membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm BIO-RAD con ayuda del equipo *Turbo Transblot* por 13 min a 25 V y 1.5 A. Se utilizó rojo de Ponceau para corroborar la transferencia de

proteínas y se lavó con PBS-Tween. Se bloqueó con 5% de leche en polvo descremada sin grasa *Svelty* en PBS-Tween, agitando durante 2 h. Se lavó 3 veces por 10 min con PBS-Tween en agitación rápida. Se incubó con anticuerpo primario (GAPDH 1:3000, β -actina 1:3000, Meox2 1:1500, Twist1 1:1500) y se dejó incubando en agitación baja durante la noche a 4°C posteriormente se realizaron 5 lavados de 10 min con PBS-Tween en agitación alta y 2 lavados con PBS para incubar con anticuerpo secundario (Anti-mouse 1:10000, Anti-rabbit 1:10000) por 2 h. Se lavó 5 veces con PBS-Tween, 2 veces con PBS y una con agua destilada. Se agregó 250 μ l de Luminol + su catalizador y se reveló con el equipo "C-Digit" de LI-COR. Para el *stripping* se colocaron las membranas dentro bolsas de plástico selladas con solución de *stripping* por 30 min en agua a 55 °C y se lavó 3 veces con PBS-Tween por 5 min para comenzar de nuevo con los bloqueos (tabla de soluciones en la sección de anexos).

Análisis de proliferación celular mediante colorante PKH26

Para los ensayos de proliferación se usó el fluorocromo anfifílico PKH26 de la marca comercial Sigma Aldrich, capaz de intercalarse en la membrana plasmática, mismo que al aumentar el número de mitosis disminuye su intensidad de fluorescencia en las poblaciones celulares en proceso de división. El protocolo se realizó de la siguiente forma: Lavado de 2,000,000 de células en medio sin SFB, centrifugado a 400g por 5 min, decantar sobrenadante, formar "suspensión celular 2x" agregando 250 μ l de Diluent C al botón de células, formar "solución de marcaje 2x" agregando 1 μ l de PKH26 en 250 μ l de Diluent C (en otro tubo), mezclar la "suspensión celular 2x" en la "solución de marcaje 2x", incubar de 1 a 5 min, detener marcaje añadiendo 2.5 ml de medio completo (SFB10%), Centrifugar a 400 g por 10 min y decantar el sobrenadante, lavar 3 veces resuspendiendo en 10 ml de medio completo, centrifugando a 400 g por 5 min y descartando el

sobrenadante (cambiar a un tubo nuevo después del primer lavado), resuspender a la concentración deseada. La lectura de las muestras se realizó en el citómetro *FACS calibur* en el canal FL2.

Análisis de apoptosis (Anexina V contra Sytox)

Los ensayos de apoptosis se llevaron a cabo mediante la tinción con el kit de Anexina V y Sytox de BD Pharmingen™ según lo indica su protocolo.

Análisis estadístico

Se realizó prueba de t de student para dos poblaciones independientes con un valor de significancia no menor a $p < 0.05$ utilizando el programa *StatPlus*. Los análisis ANOVA multifactorial balanceado o desbalanceado (según se indique) se realizaron basándose en el procedimiento de Cohen (2002) con un valor de significancia no menor a $p < 0.05$.

Resultados

Análisis morfológico y de viabilidad celular *in vitro* en cáncer pulmonar

Con el fin de establecer las condiciones basales de morfología y expresión de marcadores moleculares en modelos celulares de cáncer pulmonar, en primer lugar fueron analizadas las características morfológicas, de viabilidad, adhesión y tiempo de duplicación celular en condiciones estándar de homeostasis. En la figura 1 se puede observar que las células INER51 presentan una morfología más alejada del fenotipo epitelial en contraste con las líneas celulares A549 y A427. También, el análisis con azul de tripano sobre líneas celulares evidenció a INER51 como la línea con menores índices de viabilidad y adhesión con 90.48% y 46.33%, seguida de A427 con 94.73% y 87.1%, respectivamente, y destacando A549 como la de mayor viabilidad (97.25%) y adhesión, con un 100% de las células viables adheridas (Fig. 2A). Así mismo, nuestro análisis demostró que el tiempo de duplicación celular para las células INER51 mostró la mayor tasa de duplicación, mientras que los modelos celulares restantes, de la casa comercial ATCC, mostraron una tasa de duplicación celular similar (Fig. 2B).

A549

A427

INER51

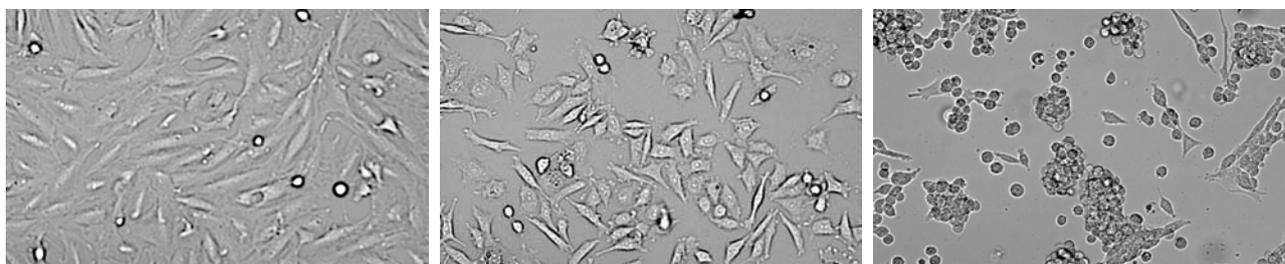
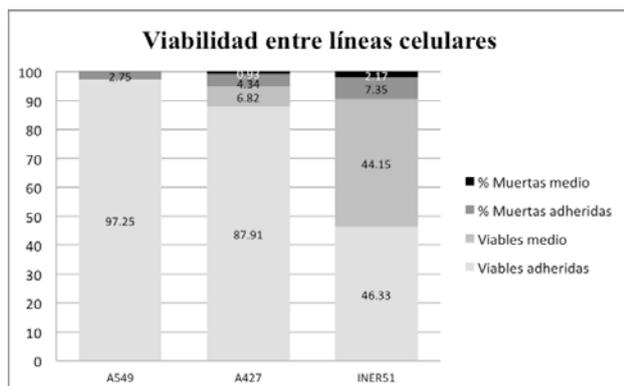


Fig. 1. Microfotografías (40x) de modelos celulares de cáncer pulmonar en condiciones de cultivo *in vitro* estándar (ver materiales y métodos).

A)



B)

| | A549 | A427 | INER51 |
|-----|---------|---------|---------|
| T75 | 49.65 h | 45.1 h | 32.68 h |
| T25 | 24.35 h | 24.93 h | 17.07 h |

Fig. 2. A) Viabilidad celular expresada en porcentaje de células adheridas o células en suspensión en el medio de cultivo. B) Tiempo de duplicación celular *in vitro* obtenido a partir del cultivo celular inicial de 2 millones de células para cajas de cultivo T75 (n=2) y 666 mil células para T25 (n=3).

Análisis de la expresión basal de *MEOX2* y *TWIST1*

Con el fin de conocer los niveles de expresión de los modelos celulares en referencia a células normales, se analizó la expresión comparativa de *MEOX2* y *TWIST1* en células de cáncer pulmonar (INER51, A549 y A427) bajo condiciones basales de suero fetal (SFB 10%) en contraste con un grupo de células no neoplásicas derivadas de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). La expresión de *MEOX2* mostró diferencias significativas en todos los modelos celulares contra las PBMCs de donantes sanos (INER51 $p < 0.05$, A427 y A549 $p < 0.01$; n=2) (Fig. 3). Mientras que inesperadamente, respecto al nivel de expresión de *TWIST1*, las células de cáncer pulmonar no mostraron diferencias significativas en contraste con las PBMCs, aunque su expresión se encontraba cerca del límite de significancia (INER51 $p = 0.05325$, A427 $p = 0.06834$ y A549 $p = 0.05956$; n=2) (Fig. 4).

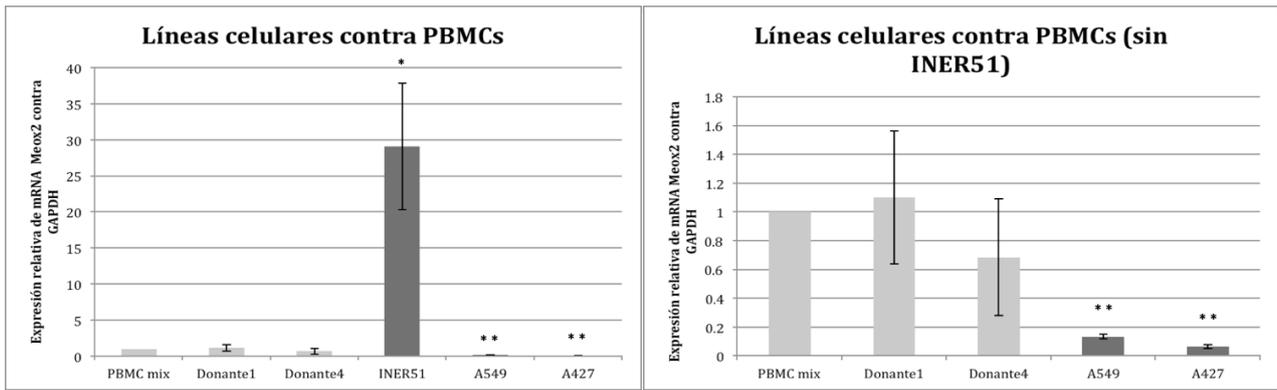


Fig. 3. Análisis de expresión de *MEOX2* mediante qPCR (SYBR Green) en PBMCs y líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón. Se muestran resultados representativos; n=2 *p<0.05 y **p<0.01.

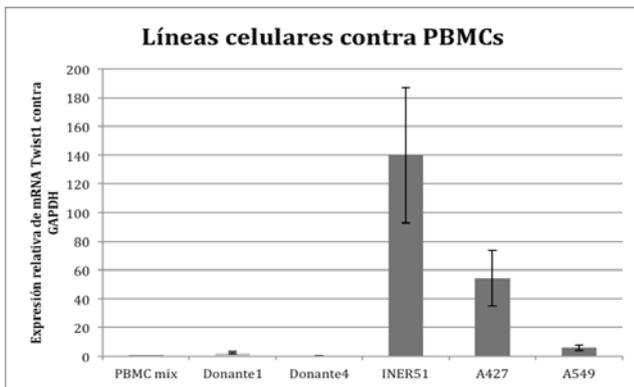


Fig. 4. Análisis de expresión de *TWIST1* mediante qPCR (SYBR Green) en PBMCs y líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón. Se muestran resultados representativos; n=2.

Análisis de la expresión inducible de Meox2 mediante TGF-β1

Fueron evaluados los niveles inducibles de *MEOX2* mediante el empleo *in vitro* de TGF-β1, analizando los niveles de expresión a las 16, 24 y 48 horas posterior a la aplicación de la citocina, mostrando aumento del transcrito a las 16 h post-inducción con TGF-β1 en células A427 con respecto a su control negativo libre de TGF-β1, mientras que se observó el nivel máximo de expresión a las 48 h en ausencia de suero y TGF-β1 (Fig. 5A n=3,

$p < 0.01$), siendo esta la única línea con un patrón de expresión fuera del esperado. En el caso de la línea celular INER51, el nivel máximo de expresión de *MEOX2* ocurrió a las 24 h en presencia de TGF- β 1 (Fig. 5B $n=3$, $p < 0.01$). Debido a dificultades técnicas para identificar niveles cuantificables del transcrito de *MEOX2* en células A-549, se optó por evaluar la detección de *MEOX2* a nivel de proteína, evidenciando su nivel máximo de expresión a las 24 h en presencia de TGF- β 1 (Fig. 6).

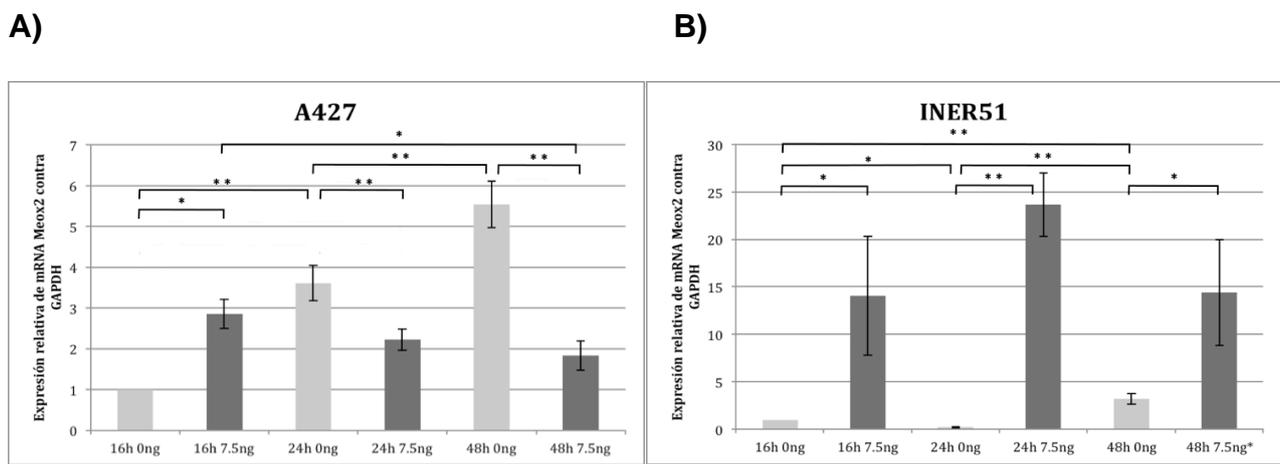


Fig. 5. Análisis de expresión de *MEOX2* mediante qPCR (SYBR Green) en A) células A427 y B) células INER51 bajo tratamiento con TGF- β . Muestra “48h 7.5ng” con $n=2$ de un total de $n=3$; * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

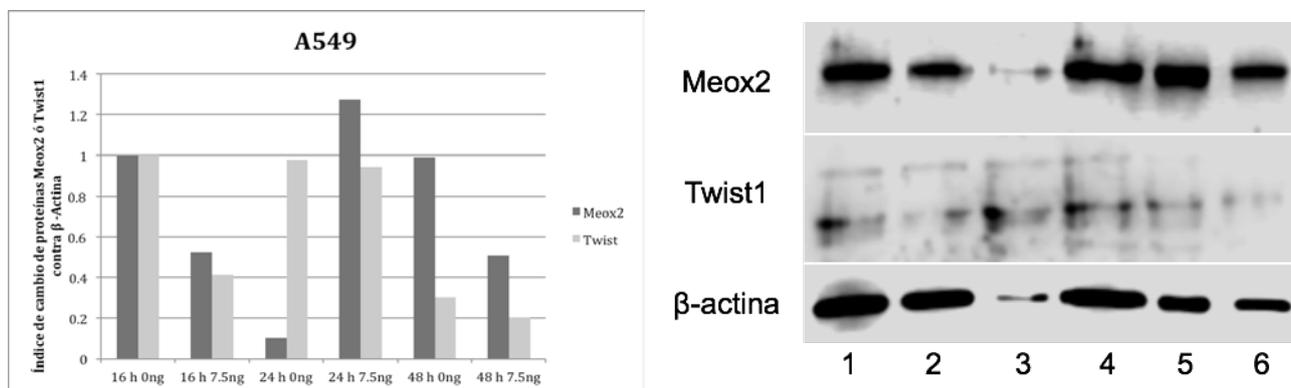


Fig. 6. Análisis cuantitativo de expresión de proteína MEOX2 y TWIST1. Valores normalizados contra β -actina, empleando células A549 bajo tratamiento con TGF- β 1

(izquierda). Gel de acrilamida correspondiente (derecha). Carriles: 1) 16 h 0 ng, 2) 16 h 7.5 ng, 3) 24 h 0 ng, 4) 24 h 7.5 ng, 5) 48 h 0 ng y 6) 48 h 7.5 ng. (n=1).

La expresión de *MEOX2* es dependiente de la densidad celular y la concentración de Suero Fetal Bovino (SFB) *in vitro*

Para demostrar que la expresión de *MEOX2* es dependiente de la concentración de suero en condiciones *in vitro*, de manera inicial decidimos demostrar que la expresión de *Meox2* pudiera ser afectada por la densidad celular. Por tal motivo se realizaron cultivos celulares a distintas confluencias en presencia de 2 concentraciones de SFB, logrando detectar en células A427 un aumento significativo en la expresión de *MEOX2* durante el incremento en la densidad celular a 3 % SFB, mientras que a 10 % SFB no se observó dicho cambio. Además se detectó el aumento de *MEOX2* bajo el tratamiento con 3 % SFB en comparación con el tratamiento a 10 % SFB (Fig. 7 con n=3 p<0.01; Fig. 8 n=2). Cabe mencionar que no fue posible detectar el transcrito de *MEOX2* en células A549 e INER51 bajo los tratamientos señalados.

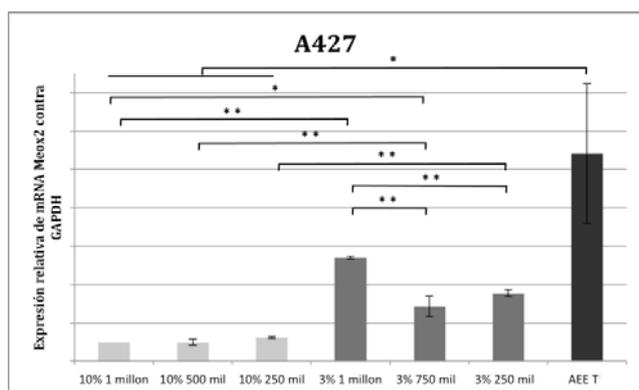


Fig. 7. Análisis de expresión relativa de *MEOX2* en células A427 mediante ensayos por qPCR empleando reacciones de amplificación por SYBR Green. Fue utilizado mRNA de tumor sólido pulmonar de paciente (AEE T) como control de expresión. Muestras “3% 750 mil”, “3% 250 mil” y “AEE T” con n=2 de un total de n=3; *p<0.05 y **p<0.01.

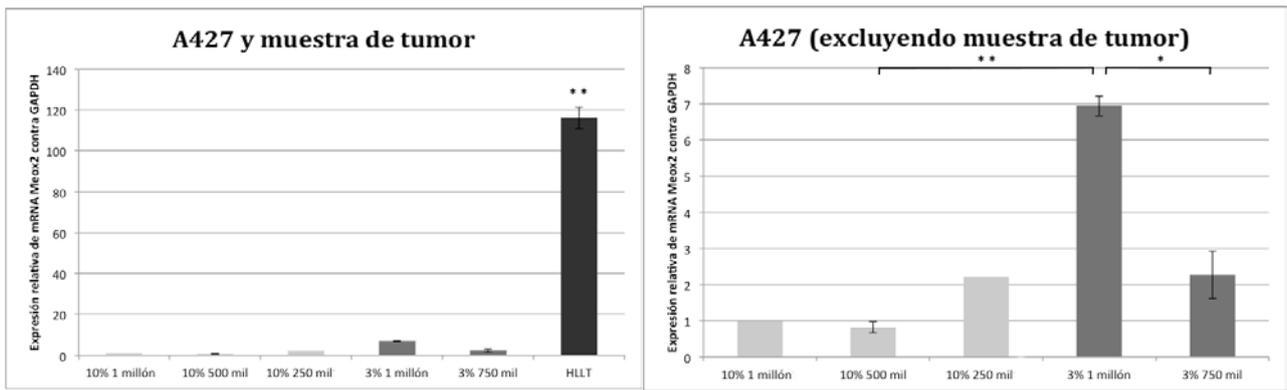


Fig. 8. Análisis de expresión de relativa de *MEOX2* en células A427 mediante ensayos por qPCR empleando sondas UPL. Fue utilizado mRNA de tumor sólido pulmonar de paciente (HLL T) como control de expresión. Muestras “10% 1 millón” y “10% 250 mil” con n=1 de un total de n=2; *p<0.05 y **p<0.01.

Participación de *MEOX2* en la proliferación celular *versus* quiescencia

Con la finalidad por establecer si *MEOX2* participa en el proceso de inducción de quiescencia celular, se estimó el nivel de proliferación en respuesta al estímulo por TGF- β 1, a 48 y 96 horas mediante marcaje con el colorante vital de integración en membranas lipídicas PKH26. Al respecto, fue establecido el umbral de detección celular en relación con el tamaño y granularidad celular para discernir con mayor detalle cambios en el marcaje fluorescente. No obstante no fueron observados cambios significativos en los niveles de proliferación en presencia del estímulo por TGF- β 1, en contraste con el control negativo en las 3 líneas celulares de cáncer pulmonar (Figs. 9, 10 y 11).

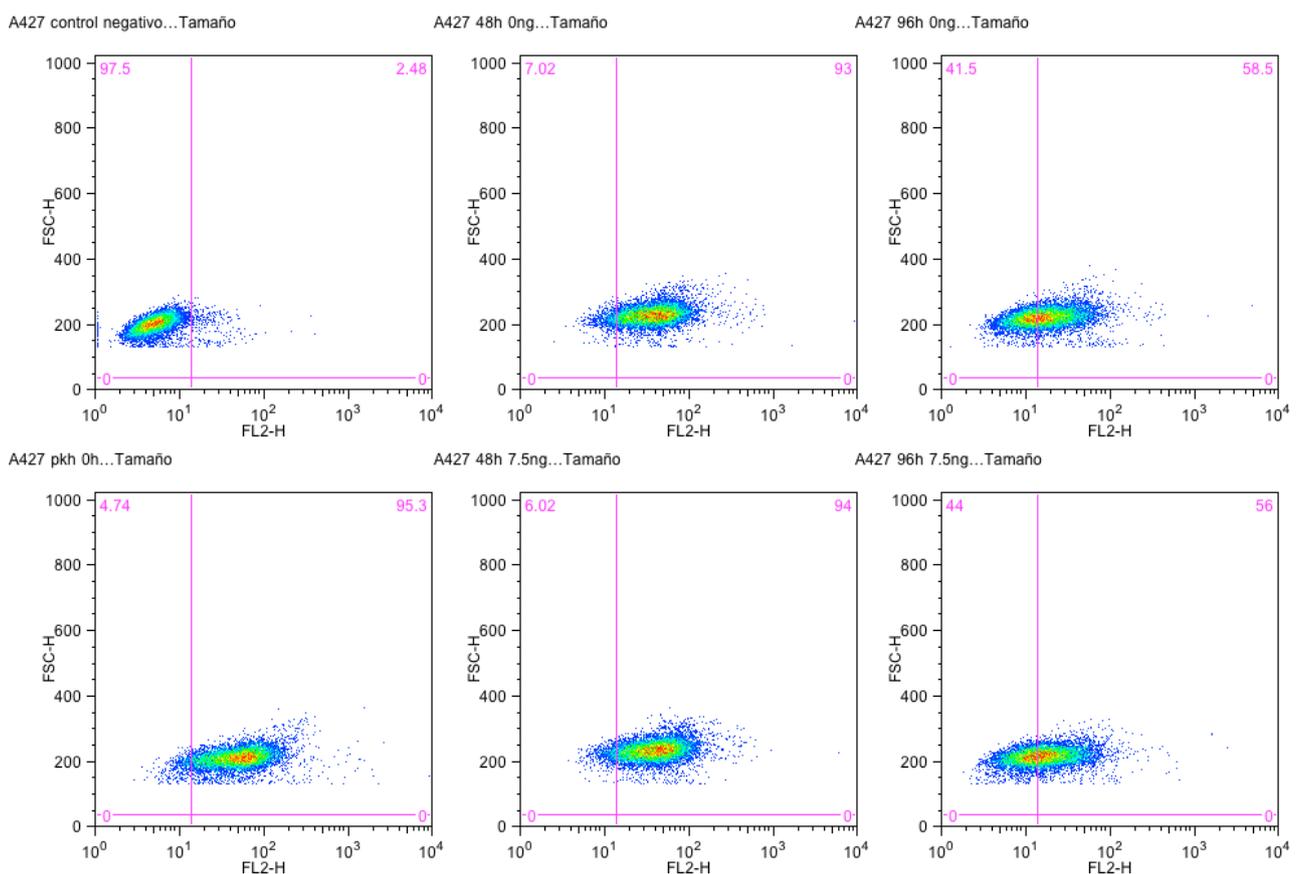


Fig. 9. Análisis de proliferación de células A427 en ausencia (panel superior) y presencia (panel inferior) de TGF- β 1 a 0, 48 y 96 h.

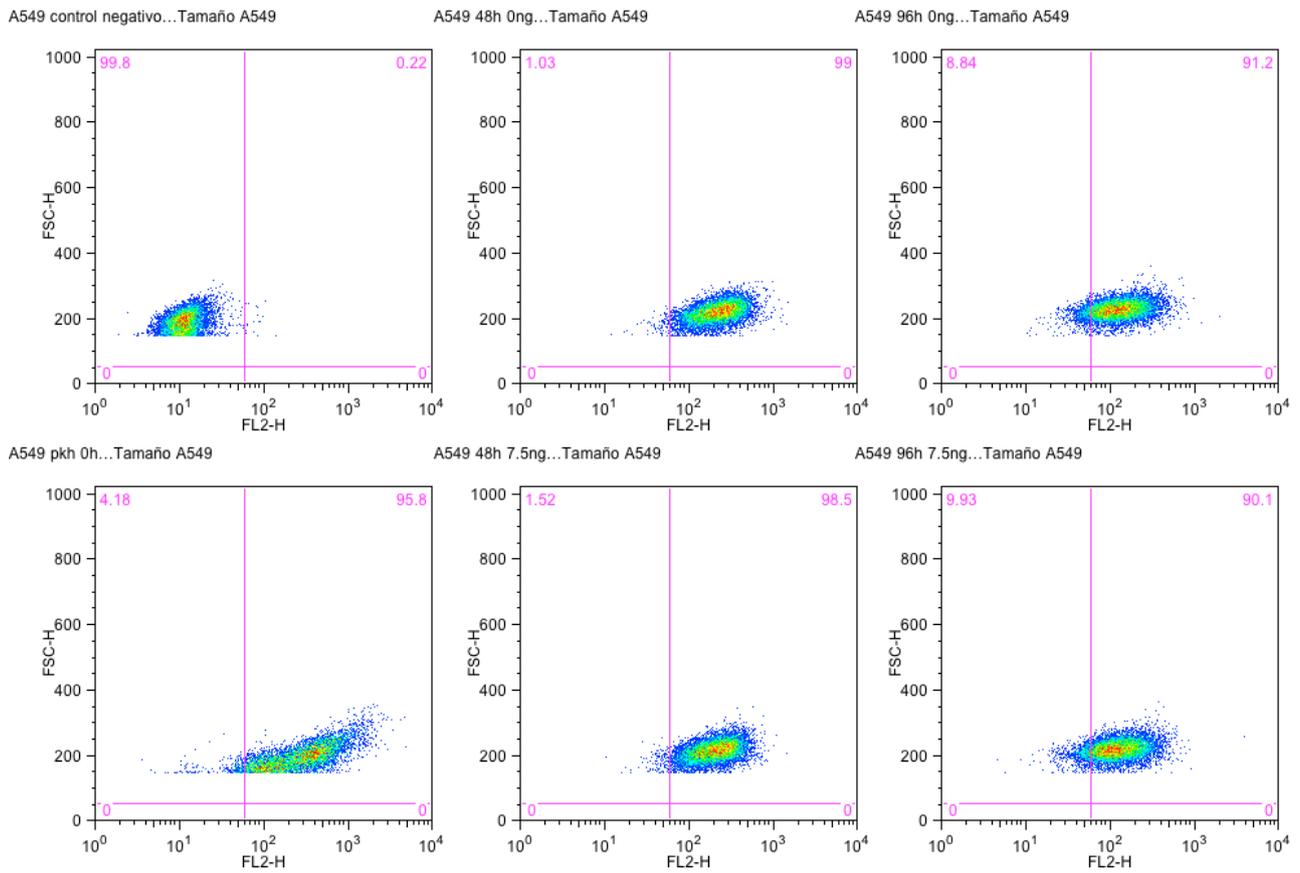


Fig. 10. Análisis de proliferación de células A549 en ausencia (panel superior) y presencia (panel inferior) de TGF- β 1 a 0, 48 y 96 h.

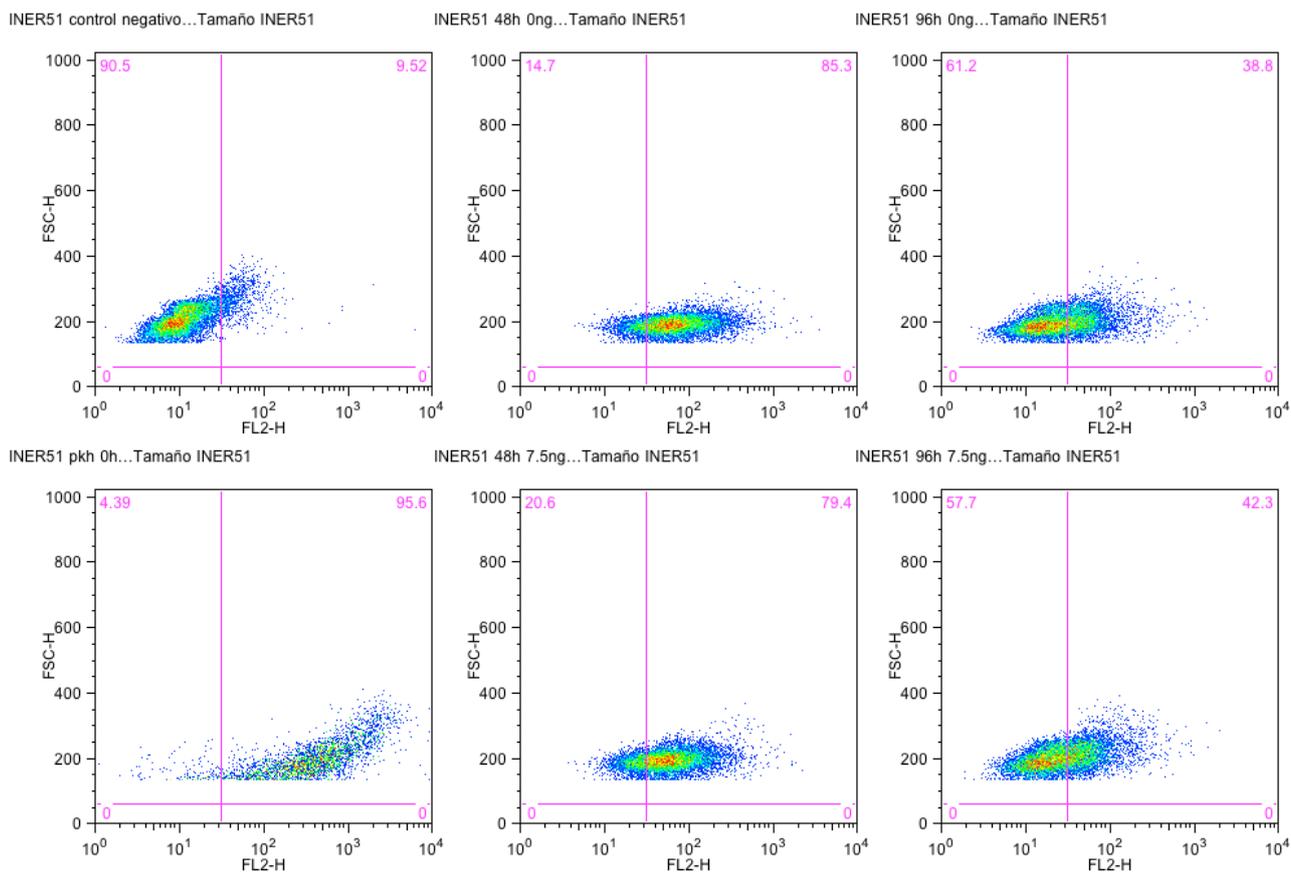


Fig. 11. Análisis de proliferación de células INER51 en ausencia (panel superior) y presencia (panel inferior) de TGF- β 1 a 0, 48 y 96 h.

Determinación de *MEOX2* involucrado en proceso de apoptosis

Para determinar la participación de *MEOX2* en el proceso de apoptosis, fueron realizados ensayos celulares bajo el silenciamiento transitorio de *MEOX2* mediante el uso de RNA interferente iMx2, con el cual se logró determinar un ligero aumento (7%) en la apoptosis tardía en células A427, en contraste de su control negativo (iScramble). Mientras que en presencia del fármaco cisplatino, los ensayos de silenciamiento por iMx2 aumentan de manera discreta el porcentaje (6.4%) de células en apoptosis tardía (Fig. 12).

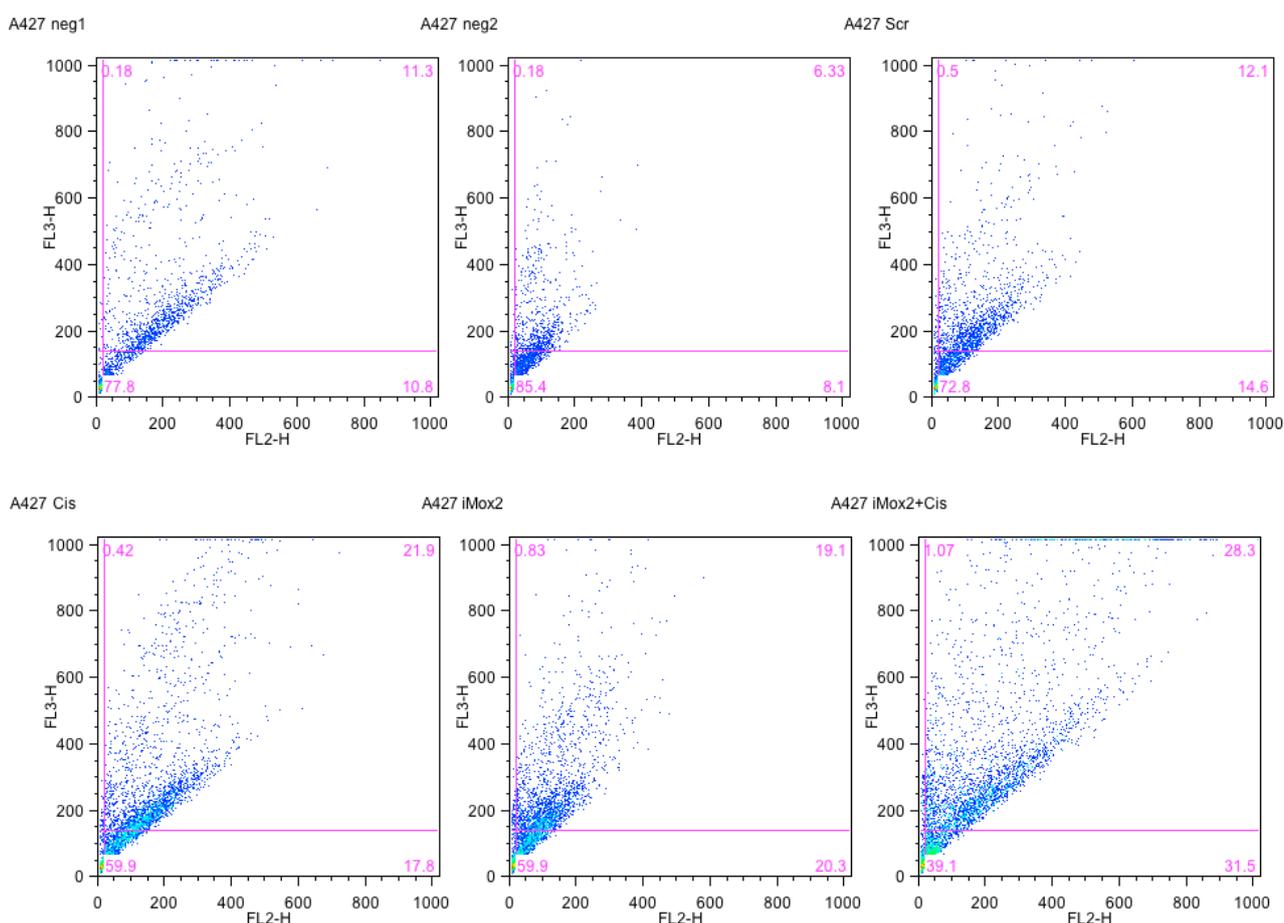


Fig. 12. Análisis de apoptosis en células A427 en ausencia y presencia de cisplatino en combinación con RNA interferente en contra de *MEOX2* (neg = negativo, Scr = scramble, Cis = cisplatino e iMox2= interferente de *MEOX2*).

Respecto a la línea celular A549 (Fig. 13), nuestros ensayos de RNA interferente en contra de *MEOX2* lograron aumentar de manera discreta el porcentaje de células en apoptosis tardía con respecto al control (1.5%), mientras que en presencia de cisplatino (C.L. 5) elevó el nivel de apoptosis tardía 7.2%, aunque al aumentar la dosis (C.L. 25) no fue posible detectar aumento en apoptosis adjudicada al silenciamiento de *MEOX2*. Cabe mencionar que debido a problemas técnicos fue imposible obtener una población inicial de células INER51 con marcaje homogéneo, por lo que se optó por omitir esta prueba para dicha línea celular.

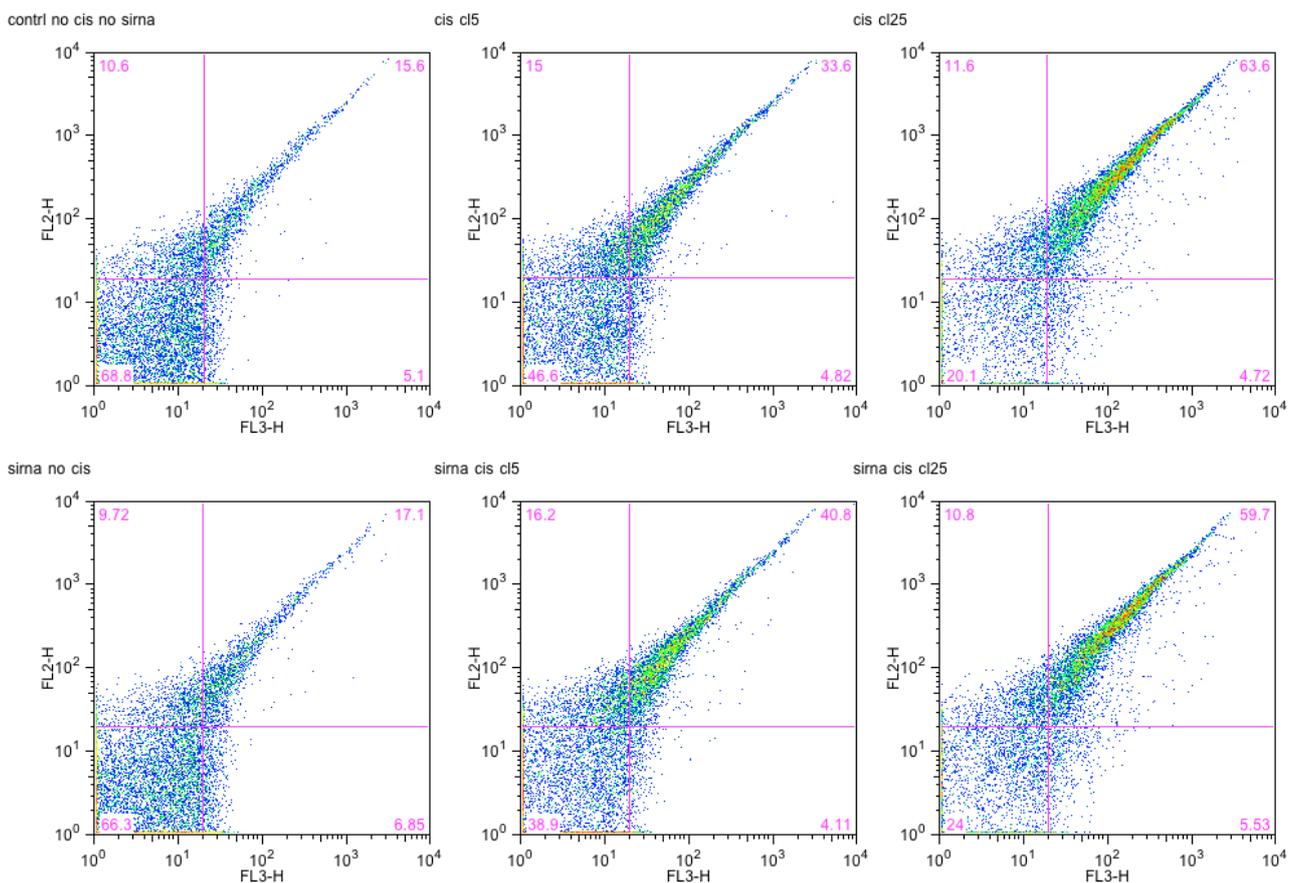


Fig. 13. Análisis de apoptosis en células A549 en ausencia y presencia de cisplatino en combinación con RNA interferente de *MEOX2* “iMx2” (neg = negativo, Scr = scramble, Cis = cisplatino e iMx2 = interferente de *MEOX2*).

***MEOX2* involucrado en proceso de la transición epitelio-mesenquima**

Durante el desarrollo del presente trabajo de tesis fue posible establecer y analizar células A549 resistentes a cisplatino en nuestro laboratorio. Al respecto se analizaron los niveles de expresión de las proteínas de *MEOX2* y Vimentina, no obstante no fue posible identificar diferencias estadísticamente significativas, como se puede observar con el valor promedio de tres replicas experimentales en la figura 14.

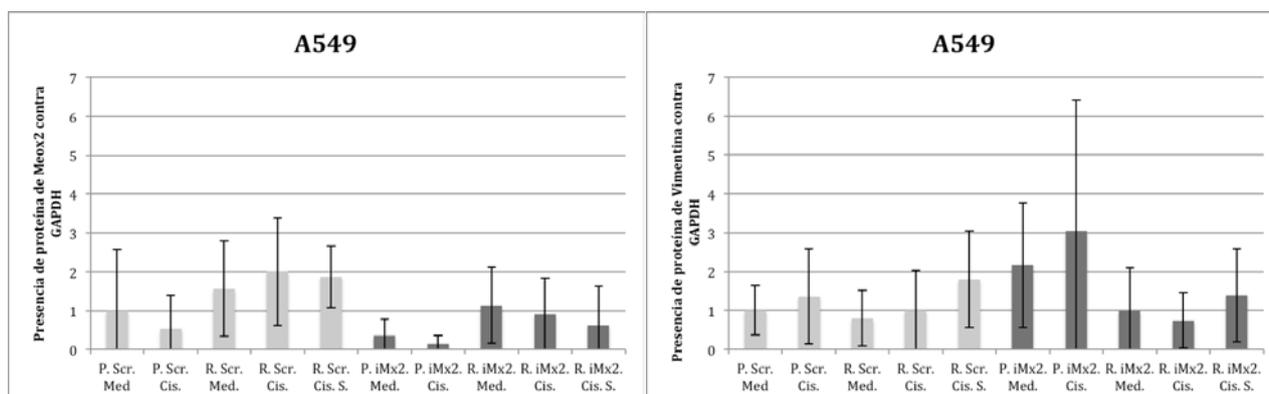


Fig. 14. Análisis de expresión de proteína de *MEOX2* (gráfica izquierda) y Vimentina (gráfica derecha) en células de cáncer pulmonar parentales y quimioresistentes A549, bajo tratamiento con RNA interferente para *MEOX2* y su combinación con cisplatino (n=3, sin diferencias significativas). (P = Parental, R = Resistente, Scr = Scramble, iMx2 = interferente para *MEOX2*, Cis = Cisplatino, Med = Medio de cultivo, S = tratamiento constante con cisplatino).

Al respecto, en la figura 15 se muestran a mayor detalle los resultados del experimento anterior, donde se puede observar el revelado por Western Blot de *MEOX2*, Vimentina y la proteína de referencia GAPDH.

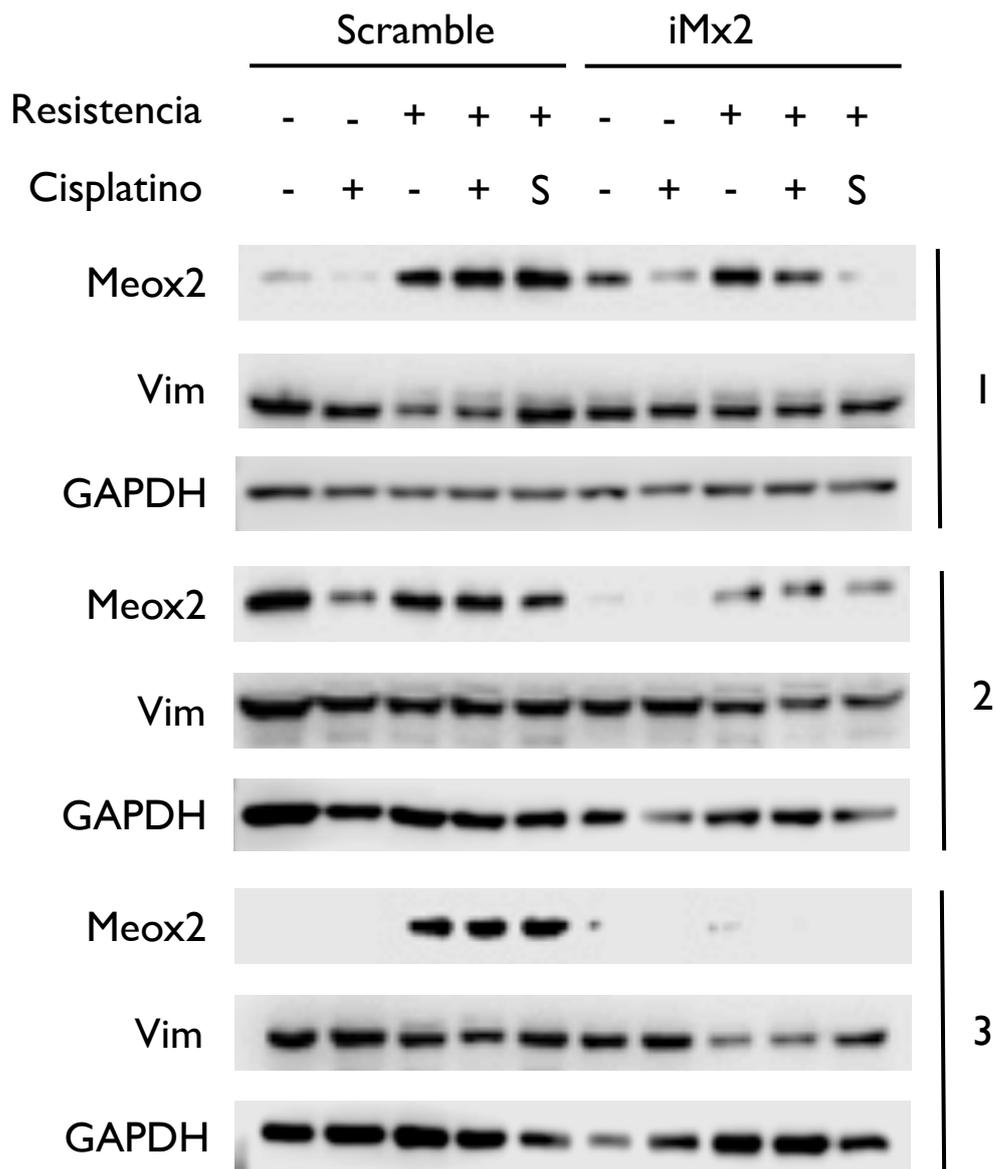


Fig. 15. Análisis por Western Blot de células A549 parental y resistente a cisplatino, bajo tratamiento con interferente de *MEOX2* y/o cisplatino (C.L. 10). A la derecha se indica el número de replica biológica. S = tratamiento constante con cisplatino.

Cabe mencionar que debido a dificultades en la detección de E-cadherina, se analizó su expresión bajo curvas de densidad celular y presencia de SFB para determinar si el SFB induce también cambios en E-cadherina al igual que en Meox2. Al respecto, nuestros hallazgos indicaron que la expresión detectable de E-cadherina y *MEOX2*, mostró ser dependiente del SFB y la densidad celular en células de cáncer pulmonar A427 y A549,

detectando aumento en su expresión al reducir el porcentaje de SFB, y reducción en la expresión al aumentar la confluencia celular (Figs. 16, 17 y 18), mientras que no fue posible detectar diferencias significativas en células INER51 bajo tratamiento alguno (Fig. 19).

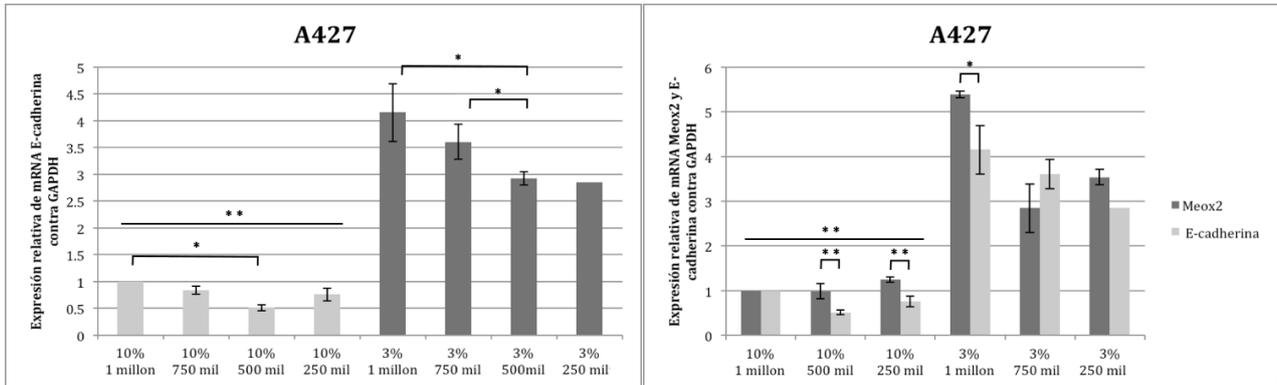


Fig. 16. Izquierda: Análisis de expresión de E-cadherina mediante qPCR (SYBR Green) en células A427 bajo condiciones de SFB y densidad celular. Muestra “3% 250 mil” con n=1 de un total de n=3. Derecha: Comparación de expresión de E-cadherina contra *MEOX2* del mismo ensayo (correspondiente a la figura 7). Muestras “3% 750mil” y “3% 250 mil” con n=2 para *MEOX2* de un total de n=3; *p<0.05 y **p<0.01.

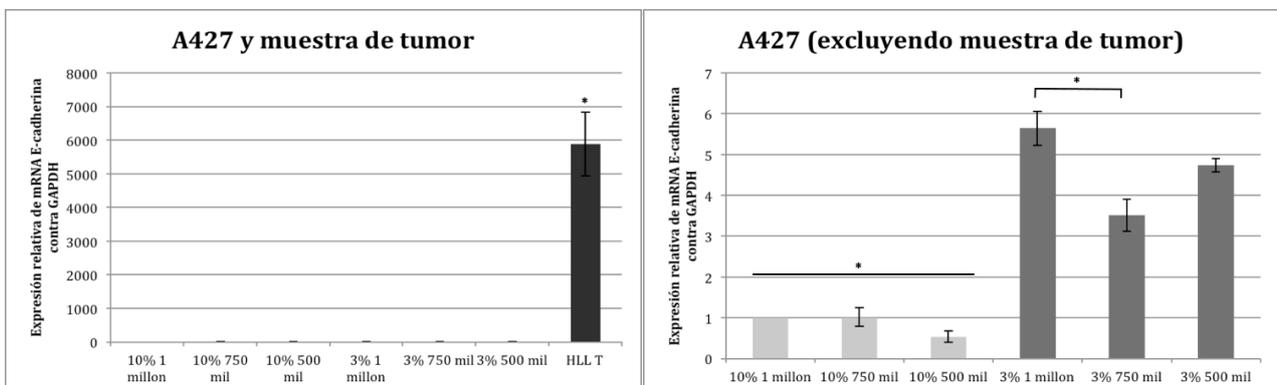


Fig. 17. Análisis de expresión de E-cadherina mediante qPCR (Sondas) en células A427 bajo distintas condiciones de SFB y densidad celular. Izquierda: Se incluye muestra

tumoral de paciente (HLL T) como control de expresión. Derecha: Se excluye muestra tumoral para observar a detalle las muestras restantes; n=2 *p<0.05.

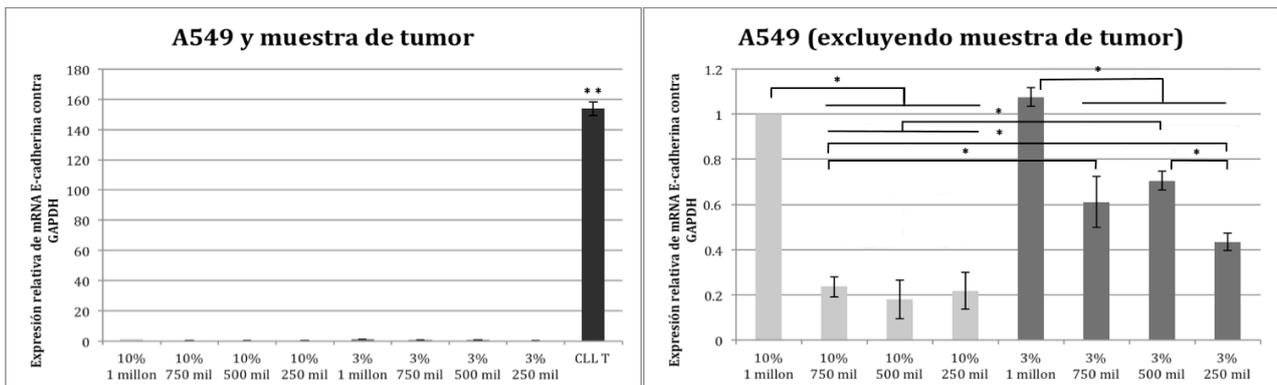


Fig. 18. Análisis de expresión de E-cadherina mediante qPCR (Sondas) en células A549 con distintas condiciones de SFB y densidad celular. Izquierda: Se incluye muestra tumoral de paciente (CLL T) como control de expresión. Derecha: Se excluye muestra tumoral para observar a detalle las muestras restantes; n= 2 *p<0.05 y **p<0.01.

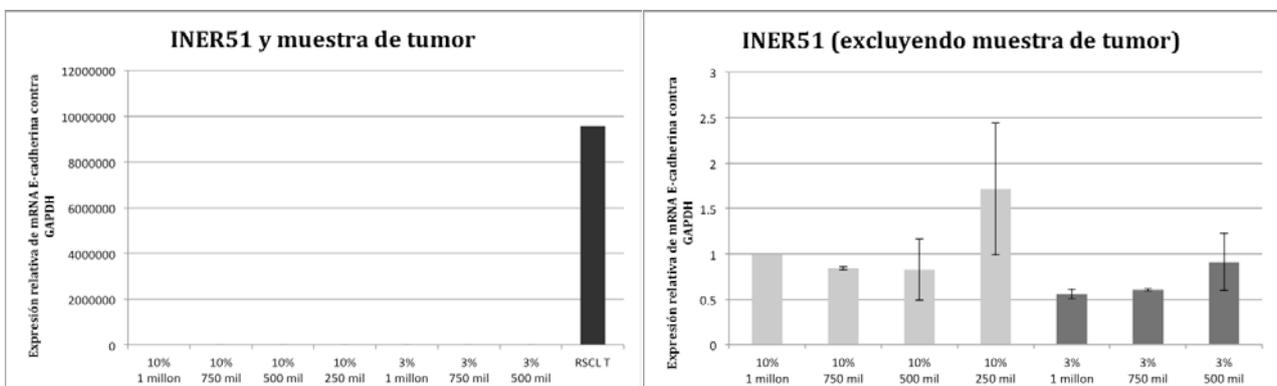


Fig. 19. Análisis de expresión de E-cadherina mediante qPCR (Sondas) en células INER51 con distintas condiciones de SFB y densidad celular. Izquierda: Se incluye muestra tumoral de paciente (RSCL T) como control de expresión (única muestra con n=1). Derecha: Se excluye muestra tumoral para observar a detalle las muestras restantes; n=2.

Discusión

En contraste con las líneas celulares derivadas de paciente caucásicos (con alrededor de 90 a 100%) apenas la mitad de las células viables de la línea INER51 se encuentren adheridas a la superficie de la caja de cultivo (Figs. 1 y 2A), lo cual difiere del fenotipo comúnmente utilizado para el estudio de *MEOX2* (Chen *et al.*, 2014; Cunnington *et al.*, 2013; Douville *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2005; Pearlman *et al.*, 1998; Gorski *et al.*, 1993). Todas las líneas presentaron diferencias significativas en la expresión de *MEOX2* en comparación con células normales (PBMCs) de donantes sanos (Fig. 3), aunque INER51 mostró mayor expresión, de manera similar a lo ya observado en pacientes con NSCLC (Ávila-Moreno *et al.*, 2014), mientras que las líneas de pacientes caucásicos mostraron menor expresión, lo cual podría deberse a algún mecanismo de regulación epigenética, siendo necesaria aún una confirmación experimental para estos modelos celulares. Recientemente, un estudio relacionó directamente la presencia de *MEOX2* con la falta de adherencia en adipocitos perivasculares (PVAC) mediante la inhibición de IGF-1 y de las vías de FAK y Pyk2 (Liu *et al.*, 2014), lo cual podría explicar el por qué del fenotipo semiadherente de la línea INER51. Sin embargo, ese mismo estudio mostró que la presencia de *MEOX2* aumentó la cantidad de células en fase G0 y G1, lo que contrasta con el menor tiempo de duplicación observado en INER51 (Fig. 2B), por lo que resultaría interesante indagar más sobre este fenómeno. Adicionalmente, aunque los niveles en el transcrito de *TWIST1* en los tres modelos celulares no presentaron diferencias significativas (Fig. 4), los datos se encontraron muy cerca del límite de significancia (INER51 $p < 0.05325$, A427 $p < 0.06834$ y A549 $p < 0.05956$). En relación a esto, un artículo publicado por nuestro grupo de investigación mostró que existe sobre expresión de estos 2 genes en pacientes con NSCLC (Ávila-Moreno *et al.*, 2014), por lo que la expresión de ambos genes en las líneas celulares de cáncer pulmonar podría ser

significativamente distinta en contraste con las PBMCs, mas el tamaño de la muestra hubiese sido insuficiente y pueda ser necesario un mayor tamaño muestral para corroborarlo.

Mediante TGF- β 1 se logró apreciar un pico máximo de inducción de *MEOX2* a las 24 h post estimulación en las líneas INER51 (a nivel de mRNA) y A549 (a nivel de proteína) (Figs. 5B y 6), siendo este un comportamiento ya observado en líneas de células normales inmortalizadas de epitelio mamario (NMuMG) y queratinocitos (HaCat) (Valcourt *et al.*, en 2007). Por otra parte, la estimulación con TGF- β 1 en A427 no sólo no aumentó la expresión del transcrito en el rango de tiempo estimado, sino que la disminuyó (Fig. 5A), de manera similar al mecanismo de regulación reportado en la curación de heridas en la piel y tejido cardiaco en el cual la expresión *MEOX2* es inhibida vía *ZEB2* por TGF- β 1, este último a su vez induciendo proliferación (Chen *et al.*, 2014; Cunnington *et al.*, 2013). Una posible explicación para el contraste entre estos 2 patrones de expresión podría ser una diferencia en los niveles del gen *Ski*, el cual inhibe a TGF- β 1 y a *ZEB2*, promoviendo así la presencia de *MEOX2* (*op. cit.*; *op. cit.*). Es notable que la presencia de las proteínas de TWIST1 y *MEOX2* en A549 tenga un patrón más o menos similar a través del tiempo frente a la inducción con TGF- β 1, donde ambas remontaron sus niveles a las 24 h (Fig. 6). Dicha similitud reafirmaría la relación de estos 2 genes, hallada con anterioridad por nuestro grupo de investigación, a nivel de mRNA y/o proteína (Ávila-Moreno *et al.*, 2014).

La dependencia de suero y otros factores de crecimiento en la expresión de *MEOX2* ya había sido documentada en VSMCs de rata y HUVECs (Gorski *et al.*, 1993; Patel *et al.*, 2005) y sólo había sido especulada en la inhibición del crecimiento debido a inhibición por contacto (*op. cit.*). En el presente trabajo se confirman la dependencia de SFB para la

expresión de *MEOX2* en células neoplásicas, y además se confirma la sospecha de la relación entre su expresión y la densidad celular (Figs 7 y 8), aunque esta última sólo fue posible observarla a 3% de SFB y no a 10%, probablemente debido a que las señales de contacto intercelular no sean suficientes para contrarrestar la inhibición de *Meox2* provocada por esta concentración de factores de crecimiento. Además de esto, se observó que los niveles de *MEOX2* en las dos distintas muestras de tumores fueron mayores que en las líneas celulares (Figs 7 y 8), lo cual podría explicarse debido a la mayor densidad celular en los tumores, pues a diferencia de las condiciones en los cultivos monocapa, éstos presentan un contacto célula-célula tridimensional. Aunado a esto, la forma desordenada del crecimiento produce comúnmente hipoxia dentro del microambiente tumoral (Brahimi-Horn *et al.*, 2007) y se ha observado que esta condición induce la presencia de *MEOX2* confiriendo resistencia a los bajos niveles de oxígeno (Wu *et al.*, 2005), y ésta a su vez, otorgándole resistencia a la quimio- y la radioterapia (*op. cit.*, Gu *et al.*, 2015). Además, no sería extraño encontrar a un gen relacionado con la quiescencia como *MEOX2* en un tumor, pues uno de los mecanismos de este estado para hacer reversible el arresto celular es la supresión de la diferenciación terminal (Coller *et al.*, 2006).

No se detectaron cambios en los niveles de proliferación atribuidos a la inducción de *MEOX2* por medio de TGF- β 1 en ninguno de los modelos celulares bajo las condiciones utilizadas (Figs. 9, 10 y 11). Aún más, hasta las 96h bajo tratamiento con TGF- β 1 no se logró observar un gran cambio en la proliferación de A427 (Fig. 9), a pesar de que su patrón de expresión coincide con el reportado en la curación de heridas en la piel y tejido cardiaco, en el cual el uso de TGF- β 1 promueve la proliferación celular (Chen *et al.*, 2014; Cunnington *et al.*, 2013). Esto puede deberse a que TGF- β 1 por sí solo no sea suficiente para inducir proliferación bajo escases de mitógenos, o bien, las condiciones de sus vías

de señalización sean propicias para su actividad como represor de la proliferación, pues esta citocina puede actuar de ambas maneras (Pardali y Moustakas 2007; Kubiczkova *et al.*, 2012).

Por otra parte se sabe que la quiescencia activa muchos mecanismos de protección (Sang *et al.*, 2010; Moore y Lyle 2011), mas los resultados obtenidos mostraron únicamente cambios marginales entre los niveles de apoptosis frente al reto farmacológico y en conjunto con el silenciamiento de *MEOX2* (Figs. 12 y 13). Quizás la población celular quiescente presente podría ser muy pequeña, pues se sabe que las células stem (tanto normales como neoplásicas) forman sólo un pequeño porcentaje de la población total (Tian *et al.*, 2012; Pece *et al.*, 2010; Reya *et al.*, 2001). Esto explicaría la dificultad en la detección de *MEOX2* tanto a nivel de RNA como de su proteína, y reafirma el por qué Valcourt y colaboradores en 2007 se vieron forzados a utilizar inhibidores del proteosoma para detectarla.

No se lograron observar diferencias significativas en la presencia de proteínas de *MEOX2* entre células resistentes y parentales con o sin cisplatino, ni con tratamiento de interferente de *MEOX2* (Fig. 14 y 15). Los resultados obtenidos en el presente trabajo contrastan con los hallazgos relativamente recientes de nuestro grupo de investigación donde se demostró no solo la amplificación en la región citogenética 7p21.1 donde residen los genes *MEOX2* y *TWIST1*, sino que la sobre-expresión de *MEOX2* en correlación con la dismunición de las marcas de represión del código de histonas H3K27me3, así como ensayos de silenciamiento genético mediante siRNAs anti-*MEOX2* participan en la capacidad de resistencia frente a fármacos oncológicos en células de cáncer pulmonar (Ávila-Moreno *et al.*, 2014). El hecho de que en esta ocasión no se hayan observado diferencias entre tratamientos con interferente de *MEOX2*, y la gran

dificultad con la que se logró revelar, podrían indicar una falta de sensibilidad, pues como se mencionó con anterioridad, es probable que los niveles de *MEOX2* sean muy bajos, y sea necesario el uso de inhibidores del proteosoma para mejorar su detección. Por otra parte, los niveles de Vimentina parecen no tener un rol significativo en la quimiorresistencia de A549, pues su presencia permaneció estable bajo todos los tratamientos (Fig. 14 y 15). Si bien su presencia ha sido relacionada inversamente con la expresión de *MEOX2* (Cunnington *et al.*, 2013), quizás la ausencia de este último no sea suficiente para inducir aumento de Vimentina y requiera otro tipo de señales promesenchimales, por ejemplo TGF- β 1 ó SOX2 (Vervoort *et al.*, 2013).

Es interesante que tanto en modelos celulares de cáncer de pulmón (Figs. 16) como en muestras tumorales de pacientes (*MEOX2* Figs. 7 y 8 contra E-Cadherina Figs. 17, 18 y 19), la expresión entre *MEOX2* y E-cadherina mantiene un patrón similar, lo cual reafirma la relación de *MEOX2* con el fenotipo epitelial incluso en células neoplásicas, pero también se puede apreciar que los niveles de sus mRNAs fueron mucho mayores en las distintas muestras tumorales de pacientes que en los modelos celulares, lo que probablemente indicaría que las condiciones de factores de crecimiento, densidad celular y concentración de oxígeno del cultivo celular puedan no reflejar fielmente las modificaciones transcripcionales de las neoplasias *in vivo*, y sea necesario ajustar las condiciones del cultivo celular. Dejando esto a un lado, al igual que la expresión de *MEOX2* (Figs. 7 y 16) la de E-cadherina también fue dependiente de la densidad celular y el porcentaje de SFB en el medio, tanto en A427 y A549 (Figs. 16, 17 y 18), mientras que en INER51 no se presentaron cambios significativos (Fig. 19), lo que indica una anormalidad en las vías de señalización epitelial de esta línea, y podría estarse reflejando en el hecho de que la mitad de su población se encuentra en suspensión a pesar de ser derivada de tejido epitelial. Al respecto, se sabe que las uniones entre puentes de E-

cadherina entre células resulta en la transmisión de señales antiproliferativas, y que esta función se pierde en la mayoría de las neoplasias epiteliales mediante mecanismos como la inactivación por mutación, la inhibición transcripcional o la proteólisis de su dominio extracelular (Christofori y Semb, 1999), siendo este último mecanismo quizás el de mayor importancia en INER51, pues explicaría su insensibilidad al contacto intercelular (Fig. 19), su suspensión en el medio (Fig. 2A) y su rápida proliferación (Fig. 2B).

Es importante mencionar que si bien la expresión de E-cadherina resultó estar asociada con la de *MEOX2*, también es posible detectar la expresión de *TWIST1* tanto líneas celulares como en carcinomas sólidos pulmonares derivados de pacientes (Ávila-Moreno *et al.*, 2014), lo cual resultaría paradójico pues se sabe que *TWIST1* reduce la expresión de E-cadherina (Yang *et al.*, 2004). Además de la estrecha relación que se mencionó con anterioridad, tanto *MEOX2* como E-cadherina comparten represores como *ZEB1* y *ZEB2*, que al igual que *TWIST1* son activados por TGF- β 1 (Xu *et al.*, 2009). Ejemplo de esto se observa en un estudio reciente en células de NSCLC (HCC4006) resistentes al oncofármaco erlotinib. En dicha línea resistente, que presenta aumento en la vía de TGF- β 1, se observa un incremento en los niveles de mRNA de *TWIST1* y un aumento sustancial en los de *ZEB1* (que como se mencionó anteriormente inhibe a Meox2), lo que se ve reflejado en la expresión de los genes bajo su control, aumento de Vimentina y disminución de E-cadherina, en comparación con la línea control no resistente (Yoshida *et al.* 2016). Sin embargo, en otro estudio se observó que al inducir quiescencia y posteriormente EMT mediante 5-fluorouracilo, los niveles de expresión de E-cadherina aumentaban, así como los de marcadores mesenquimales como Vimentina, *SLUG* y *NCAD*, además de los niveles de *ZEB1*, represor de E-cadherina y *MEOX2* (Dai *et al.*, 2016), mostrando cierta similitud con los resultados obtenidos en este trabajo.

Por último, debido a que en el presente estudio solo se detectaron cambios marginales en los niveles de apoptosis de los tres modelos celulares de NSCLC pulmonar bajo tratamiento con cisplatino en conjunto con ensayos de silenciamiento de *MEOX2*, y a que no se encontraron diferencias significativas en los niveles de proteína de *MEOX2* entre células parentales y resistentes a cisplatino, las evidencias no permiten apoyar los hallazgos de nuestro grupo de investigación en los que se ha demostrado que *MEOX2* participa en fenómenos de quimiorresistencia frente a cisplatino en modelos *in vitro* de cáncer pulmonar (Ávila-Moreno, *et al.*, 2014). Adicionalmente, un estudio en el mismo año mostró que la sobreexpresión de *E2F1* en la línea celular de cáncer gástrico SGC7901/DPP resistente a cisplatino, conduce al aumento en la resistencia a fármacos oncológicos como cisplatino, doxorubicina y 5-fluorouracilo, en correlación con aumento en la expresión de *ZEB1* y *ZEB2*, y disminución de la expresión de *MEOX2* (Yan *et al.*, 2014). Sin embargo, existe otro estudio por nuestro grupo de investigación, actualmente en proceso de publicación, en el cual se muestra la participación del eje transcripcional *MEOX2-GLI1* en la resistencia a la terapia fármaco-oncológica, a su vez asociado con pobre sobre-vida y pronóstico en pacientes con cáncer pulmonar (Armas-López, *et al.*, sometido a publicación 2016).

Conclusiones

1. -Todas las líneas presentaron diferencias significativas en la expresión de mRNA de *MEOX2* en comparación con células normales (PBMCs) de donantes sanos (INER51 mostró mayor expresión mientras que A549 y A427 mostraron menor expresión).
2. -Los niveles del transcrito de *TWIST1* en células de cáncer pulmonar no presentaron diferencias significativas comparados con los de PBMCs.
3. -TGF- β 1 induce la expresión de *MEOX2* a 24 h post-estimulación en células de cáncer pulmonar INER51 y A549, mientras que la disminuye gradualmente en células A427.
4. -Se confirma la dependencia de SFB y densidad celular *in vitro* para la expresión de *MEOX2* en células neoplásicas de cáncer pulmonar.
5. -Se detectó expresión elevada de mRNA de *MEOX2* en tumores sólidos de pacientes en comparación con los modelos celulares *in vitro*.
6. -La inducción de *MEOX2* mediante TGF- β 1 no mostró cambios apreciables en la proliferación de los modelos celulares de cáncer pulmonar bajo las condiciones utilizadas en el presente estudio.
7. -Se detectaron cambios marginales entre los niveles de apoptosis frente al reto farmacológico por efecto del silenciamiento de *MEOX2*.
8. -No fue posible determinar diferencias significativas en la expresión de proteína de *MEOX2* entre células de cáncer pulmonar resistentes a cisplatino y parentales.
9. -No fue posible determinar diferencias significativas en la presencia de proteínas de Vimentina entre células resistentes a cisplatino y parentales, en ausencia y presencia de *MEOX2*.

- 10.–La expresión de E-cadherina mantiene un patrón similar a *MEOX2* tanto en células de cáncer pulmonar, como en tumores sólidos obtenidos de pacientes.
- 11.–Las evidencias obtenidas en el presente trabajo no permiten apoyar la participación de *MEOX2* en mecanismos de quimiorresistencia en modelos celulares de cáncer pulmonar.

Perspectivas

Los resultados obtenidos en los ensayos de inducción de *MEOX2* mediante TGF- β 1 en los 3 modelos celulares, sugieren identificar los elementos de la vía de TGF- β 1 encargados de la activación de *MEOX2*, siendo una posibilidad la identificación por medio de inmunoprecipitación de los elementos adheridos a las secuencias promotoras de este gen, para posteriormente validarlos por medio de su inhibición y el correspondiente análisis de expresión de *MEOX2*. De igual manera, sería interesante estudiar si en células neoplásicas, al igual que se mantuvo la sensibilidad a SFB y densidad celular, se mantiene la inducción de *MEOX2* bajo condiciones de hipoxia y este a su vez le confiera resistencia hipoxica a la malignidad. Un ensayo así podría requerir únicamente de un ambiente bajo en oxígeno, la inhibición de *MEOX2* y el análisis de la proliferación celular.

Por otra parte, un análisis de la expresión y/o proteínas de elementos clave de la vía de TGF- β 1 en ausencia, presencia y sobreexpresión de *MEOX2* sería útil para vislumbrar si la inducción de este último gen por TGF- β 1 tiene como resultado el enrobustecimiento del programa transcripcional asociado a esta vía, o si por el contrario se encuentra inhibiéndola formando un bucle autoregulatorio. Además, la estrecha relación entre la expresión de *MEOX2* y E-cadherina sugiere la posibilidad de que *MEOX2* pudiera estar induciendo a E-cadherina, o bien, que ambos genes sean inducidos por un programa celular en común, por lo que el análisis de los niveles de E-cadherina bajo condiciones de sobreexpresión de *MEOX2* podría ser de interés en el estudio de la EMT, en la cual tanto E-cadherina como TGF- β 1 poseen un papel representativo.

Literatura citada

- 1) Abate-Shen, Cory. 2002 “Deregulated homeobox gene expression in cancer: Cause or consequence?” *Nat. Rev. Can.* 2, 777–785.
- 2) Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., Clarke, M.F. 2003. “Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells”. *PNAS* www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0530291100.
- 3) Alvarez-Moran, A. M. 2010 “Epigenómica en la progresión de carcinomas pulmonares: búsqueda de marcadores tempranos y tardíos regulados por hipermetilación asociado a factores de riesgo”. Tesis sub-especialidad en cardiología torácica. Tutor Federico Ávila Moreno. Fac. Med. UNAM.
- 4) Anderson, K.M., Darweesh, M., Jajah, A., Tsui, P., Guinan, P., Rubenstein, M. 2007. “Does Homeobox-related "Positional" Genomic Information Contribute to Implantation of Metastatic Cancer Cells at Non-random Sites?” *Anticancer Res.* 27: 2141–2154.
- 5) Anglim, P.P., Alonzo, T.A., Laird-Offringa, I.A., 2008. “DNA methylation-based biomarkers for early detection of non-small cell lung cancer: an update” *Mol. Can.* 7, 1–13.
- 6) Armas-López L. 2011. “Identificación de los blancos génicos, asociados al factor transcripcional mesenchyme homeobox 2 (MEOX2) en cáncer pulmonar”. Tesis de maestría. IPN. Tutor Federico Ávila Moreno. México D.F.
- 7) Armas-López, L. 2016. “Análisis de la re-programación epigenética de los blancos génicos de mesenchyme homeobox-2 involucrados en la quimioresistencia y migración celular del cáncer pulmonar”. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Posgrado en

Ciencias Biológicas, FES-Iztacala, UNAM. Tutor Federico Ávila Moreno. En proceso de titulación.

8) Armas-López L, Piña-Sánchez P, *et al.*, Christiani DC, Zúñiga-Ramos J, Ávila Moreno F. (Somenido a publicación 2016). “Epigenomic Study Identifies A Novel Mesenchyme Homeobox2-GLI1 Transcription Axis Involved In Drug Resistance, Overall Survival and Therapy Prognosis in Lung Cancer Patients”.

9) Ávila-Moreno F, Armas-López L, *et al.*, Maldonado-Lagunas V, Santillán-Doherty P, Piña-Sánchez P, Zúñiga-Ramos J. 2014. “Overexpression of MEOX2 and TWIST1 is associated with H3K27me3 levels and determines lung cancer chemoresistance and prognosis”. PLoS ONE 9(12): e114104. doi:10. 1371/journal.pone.0114104.

10) Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., Rich, J.N. 2006. “Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response”. *Nature*, 444, 756–760.

11) Bendall, A. J., Abate-Shen, C. 2000. “Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development”. *Gene*, 247, 17–31.

12) Bierie, B., Stover, D.G., Abel, T.W., Chytil, A., Gorska, A.E., Aakre, M., Forrester, E., Yang, L., Wagner, K.U., Moses, H.L. 2008. “Transforming growth factor-beta regulates mammary carcinoma cell survival and interaction with the adjacent microenvironment”. *Cancer Res*, 68, 1809–1819.

13) Blanpain, C., Fuchs, E. 2009. “Epidermal homeostasis: a balancing act of stemcells in the skin,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10 (3), 207–217.

- 14) Boncinelli, E., Mallamaci, A., Lavgogna, G. 1994. "Vertebrate homeobox genes". *Genetica* 94, 127–140.
- 15) Brahim-Horn, M. C., Chiche, J., Pouyssegúr, J. 2007. "Hypoxia and cancer". *J. Mol. Med.* 85:1301–1307. DOI 10.1007/s00109-007-0281-3.
- 16) Bristow, R.G., Hill, R.P. 2008. "Hypoxia and metabolism: Hypoxia, DNA repair and genetic Instability". *Nat. Rev. Cancer*, 8, 180–192.
- 17) Buckingham, L., Penfield Faber, L., Kim, A., Liptay, M., Barger, C., Basu, S., Fidler, M., Walters, K., Bonomi, P., Coon, J. 2010. "PTEN, RASSF1 and DAPK site-specific hypermethylation and outcome in surgically treated stage I and II nonsmall cell lung cancer patients". *Int. J. Cancer* 126, 1630–1639.
- 18) Candia, A. F., Hu J., Crosby J., Lalley P. A., Noden D., Nadeau J. H. y Wright C. V. E. 1992. "Mox-1 and Mox-2 define a novel homeobox gene subfamily and are differentially expressed during early mesodermal patterning in mouse embryos". *Development* 116: 1123–1136.
- 19) Ceteci, F., Ceteci, S., Zanucco, E., Thakur, C., Becker, M., El-Nikhely, N., Fink, L., Seeger, W., Savai, R., Rapp, U. R. 2012. "E-cadherin controls bronchiolar progenitor cells and onset of preneoplastic lesions in mice". *Neoplasia*. 14(12), 1164–1177.
- 20) Chen, Y., Rabson, A. B., Gorski, D. H. 2010. "MEOX2 regulates nuclear factor- κ B activity in vascular endothelial cells through interactions with p65 and I κ B β " *Cardiovas. Res.* 87, 723–731.

- 21) Chen, Y., Gorski, D. H. 2008. "Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5" *Blood*, 111: 1217–1226
- 22) Cho, R.W., Clarke, M.F. 2008. "Recent advances in cancer stem cells". *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 1–6.
- 23) Cohen, B. H. 2002. "Calculating a factorial ANOVA from means and standard deviations". *Understanding statistics*, 1(3), 191–203.
- 24) Coller, H. A., Sang, L., Roberts J.M. 2006. "A New Description of Cellular Quiescence" *PLoS Biol* 4(3), e83
- 25) Cortese, R., Hartmann, O., Berlin, K., Eckhardt, F. 2008. "Correlative gene expression and DNA methylation profiling in lung development nominative new biomarkers in lung cancer", *Int. J. Biochem. Cell Bio.*, 40, 1494-1508.
- 26) Dai, Y., Wang, L., Tang, J., Cao, P., Luo, Z., Sun, J., Kiflu, A., Sai, B., Zhang, M., Wang, F., Li, G. y Xiang, J. 2016. "Activation of anaphase-promoting complex by p53 induces a state of dormancy in cancer cells against chemotherapeutic stress". *Oncotarget*. 7 (18), 25478–25492.
- 27) Daskalos, A., Logotheti, S., Markopoulou, S., Xinarianos, G., Gosney, J. R., Kastania, A. N., Zoumpourlis, V., Field, J. K., Liloglou, T., 2011. "Global DNA hypomethylationinduced DeltaNp73 transcriptional activation in non-small cell lung cáncer". *Cancer Lett.* 300. 79–86.

- 28) Daskalos, A., Nikolaidis, G., Xinarianos, G., Savvari, P., Cassidy, A., Zakopoulou, R., Kotsinas, A., Gorgoulis, V., Field, J. K., Liloglou, T. 2009 “Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in nonsmall cell lung cancer”. *Int. J. Cancer*, 124. 81–87.
- 29) Davidson, D. 1995. “The function and evolution of Msx genes: pointers and paradoxes”. *Trends Genet.* 11, 405–411.
- 30) De Lucio B., Manuel V. y Barrera-Rodríguez R. 2005. “Characterization of human NSCLC cell line with innate etoposide-resistance mediated by cytoplasmic localization of topoisomerase II alpha”. *Cancer Sci.* 96(11):774-783.
- 31) Dean, M. 2006. “Cancer stem cells: redefining the paradigm of cancer treatment strategies,” *Mol. Interv.*, 6 (3) 140–148.
- 32) Delage, B., Dashwood, R.H. 2008 “Dietary Manipulation of Histone Structure and Function”. *Annu. Rev. Nutr.* 28, 347–66.
- 33) Dembinski, J. L., Krauss, Stefan. 2009. “Characterization and functional analysis of a slow cycling stem cell-like subpopulation in pancreas adenocarcinoma” *Clin. Exp. Metastasis*, 26,611–623.
- 34) Dush, M. K., Martin, G. R. 1992. “Analysis of mouse Evx genes: Evx-1 displays graded expression in the primitive streak”. *Dev. Biol.* 151, 273–287.
- 35) Esteller, M. 2007. “Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps”. *Nat. Rev. Genet.* 8:286–98.

- 36) Frullanti, E., Galvan, A., Falvella, F.S., Manenti, G., Colombo, F., Vannelli, A., Incarbone, M., Alloisio, M., Nosotti, M., Santambrogio, L., Gonzalez-Neira, A., Pastorino, U., Dragani, T.A. 2011. "Multiple Genetic Loci Modulate Lung Adenocarcinoma Clinical Staging", *Clin. Cancer Res.*, 17, 2410-2416.
- 37) Gangemi, R. M., Griffero, F., Marubbi, D., Perera, M., Capra, M. C., Malatesta, P., Ravetti, G. L., Zona, G. L., Daga, A. Y Corte, G. 2009. "SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity". *Stem Cells*, 27, 40–48.
- 38) García-Fernández, J. 2005. "Hox, ParaHox, ProtoHox: facts and guesses". *Heredity* 94, 145–152.
- 39) Garcia-Fernández, J. 2005, "The genesis and evolution of homeobox gene clusters". *Nat. Rev. Genetics*, 6, 881–892.
- 40) Gilbertson, R.J., and Rich, J.N. (2007). "Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche". *Nat. Rev. Cancer* 7, 733–736.
- 41) GLOBOCAN 2012: Estimated cancer, mortality, incidence & prevalence worldwide in 2012 "Fact sheets by population" <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx> [18 Sep 15]
- 42) González-Santiago, A.E., Mendoza-Topete, L.A., Sánchez-Llamas, F., Troyo-Sanromán, R., Gurrola-Díaz, C.M. 2011. "TGF- β 1 serum concentration as a complementary diagnostic biomarker of lung cancer: establishment of a cut-point value". *J Clin. Lab. Anal.* 25, 238–243.

- 43) Gorski, D.H., Lepage, D.F., Patel, C.V., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. y Walsh, K. 1993. "Molecular Cloning of a Diverged Homeobox Gene That Is Rapidly Down-Regulated during the G₂/G₁ Transition in Vascular Smooth Muscle Cells". *Mol. and Cell. Biol.*, 3722-3733
- 44) Gu, Q., He, Y., Ji, J., Yao, Y., Shen, W., Luo, J., Zhu, W., Cao, H., Geng, Y., Xu, J., Zhang, S., Cao, J., y Ding, W. 2015. "Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and reactive oxygen species (ROS) mediates radiation-induced invasiveness through the SDF-1 α /CXCR4 pathway in non-small cell lung carcinoma cells". *Oncotarget*, 6 (13), 10893–10907.
- 45) Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2000. "The hallmarks of cancer," *Cell*, 100 (1) 57–70.
- 46) Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2011 "Hallmarks of Cancer: The Next Generation" *Cell* 144, 646–674
- 47) Hayashi T, Hideshima T, Nguyen AN, Munoz O, Podar K, Hamasaki M, Ishitsuka K, Yasui H, Richardson P, Chakravarty S, et al: "Transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor down-regulates cytokine secretion and multiple myeloma cell growth in the bone marrow microenvironment". *Clin Cancer Res* 2004, 10:7540–7546.
- 48) Ikushima, H., Todo, T., Ino, Y., Takahashi, M., Miyazawa, K., y Miyazono, K. 2009. "Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors". *Cell Stem Cell*, 5, 504–514.
- 49) Janda, E., Lehmann, K., Killisch, I., Jechlinger, M., Herzig, M., Downward, J., Beug, H., Grunert, S., "Ras and TGF cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways" *Cell Biol.* 156299-314, 2002.

- 50) Jeon, H-S., Dracheva, T., Yang, S-H., Meerzaman, D., Fukuoka, J., Shakoori, A., Shilo, K., Travis, W.D., Jen, J. "SMAD6 contributes to patient survival in non-small cell lung cancer and its knockdown reestablishes TGF-beta homeostasis in lung cancer cells". *Cancer Res* 2008, 68:9686–9692.
- 51) Jordan, C. T., Guzman, M. L., Noble, M. 2006. "Cancer stem cells," *New England Journal of Medicine*, vol. 355, no. 12, pp. 1253–1261.
- 52) Kangsamaksin, T., Heui, J. P., Trempus, C. S., Morris, R. J. 2007. "A perspective on murine keratinocyte stem cells as targets of chemically induced skin cancer," *Molecular Carcinogenesis*, vol. 46, no. 8, pp. 579–584.
- 53) Koeck, S., Amann, A., Huber, J. M., Gamerith, G., Hilbe, W., y Zwierzina, H. 2016. "The impact of metformin and salinomycin on transforming growth factor β -induced epithelial-to-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cell lines". *Oncol. Lett.* 11, 2946-2952.
- 54) Krumlauf, R., 1994. "Hox genes in vertebrate development". *Cell* 78, 191–201 (1994).
- 55) Kubiczkova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., Sevcikova, S. 2012. "TGF-beta -- an excellent servant but a bad master" *Journal of Translational Medicine* 2012, 10:183 doi:10.1186/1479-5876-10-183.
- 56) Kulkarni, A.B., Huh, C.G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Ward, J.M. y Karlsson, S. 1993. "Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death". *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:770–774.

- 57) Kurimoto, R., Iwasawa, S., Ebata, T., Ishiwata, T., Sekine, I., Tada, Y., Tatsumi, K., Koide, S., Iwama, A., y Takiguchi, Y. 2016. "Drug resistance originating from a TGF- β /FGF-2-driven epithelial-to-mesenchymal transition and its reversion in human lung adenocarcinoma cell lines harboring an EGFR mutation". *Inter. J. of Oncol.* 48, 1825-1836.
- 58) Laga, A. C., Lai, C.Y., Zhan, Q., Huang, S. J., Velazquez, E. F., Yang, Q., Hsu, M., y Murphy, G. F. (2010). "Expression of the embryonic stem cell transcription factor SOX2 in human skin: Relevance to melanocyte and merkel cell biology". *The American Journal of Pathology*, 176, 903–913.
- 59) 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. doi:10.1371/journal.pone.0003077
- 60) Levy, L., Hill, C.S. 2006. "Alterations in components of the TGF-beta superfamily signalling pathways in human cancer". *Cyt. Gr. Fact. Rev* 2006, 17:41–58.
- 61) Liloglou T., Bediaga, N. G., Brown, B. R. B., Field, J. K., Davies, M. P. A 2012 "Epigenetic biomarkers in lung cáncer". *Cancer Lett.* Vol. 342 Issue 2 pags. 200-212. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.04.018>
- 62) Liu P., Feng J., Kong F., Lua Q., Xu H., Menga J., y Jiang Y. 2014. "Gax inhibits perivascular preadipocyte biofunction mediated by IGF-1 induced FAK/Pyk2 and ERK2 cooperative pathways". *Cel. Sign.* 26 (2014) 3036–3045.
- 63) Maconochie, M., Nonchev, S., Morrison, A., Krumlauf, R. 1996. "Paralogous Hox genes: function and regulation". *Ann. Rev. Genet.* 30, 529–556.

- 64) Mareel, M., Leroy, A. 2003. "Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion." *Physiol Rev* 2003, 83:337–376.
- 65) Mohammad, H.P., Baylin, S.B. 2010, "Linking cell signaling and the epigenetic machinery" *Nat. Ame.* (Commentary).
- 66) Monteleone, G., Mann, J., Monteleone, I., Vavassori, P., Bremner, R., Fantini, M., Del Vecchio Blanco, G., Tersigni, R., Alessandroni, L., Mann, D., *et al.* 2004 "A failure of transforming growth factor-beta1 negative regulation maintains sustained NF-kappaB activation in gut inflammation". *J Biol Chem*, 279:3925–3932.
- 67) Moore, N., Lyle, S. 2011. "Quiescent, Slow-Cycling StemCell Populations in Cancer: A Review of the Evidence and Discussion of Significance". *Journal of Oncology*, Volume 2011, Article ID 396076, 11 páginas doi:10.1155/2011/396076
- 68) O'Flaherty, J.D., Barr, M., Fennell, D., Richard, D., Reynolds, J., O'Leary, J., O'Byrne, K. 2012. "The cancer stem-cell hypothesis: its emerging role in lung cancer biology and its relevance for future therapy". *J. Thorac Oncol.* 2012 Dec;7(12):1880-90. doi:10.1097/JTO.0b013e31826bfbc6.
- 69) Oft, M., Peli, J., Rudaz, C., Schwarz, H., Beug, H., Reichmann, E. 1996. "TGF- β and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells" *Genes Dev.* 10:2462-2477,1996.
- 70) Ohshima, J., Haruta, M., Arai, Y., Kasai, F., Fujiwara, Y., Ariga, T., Okita, H., Fukuzawa, M., Hata, J., Horie, H., Kaneko, Y. 2009. "Two Candidate Tumor Suppressor Genes, MEOX2 and SOSTDC1, Identified in a 7p21 Homozygous Deletion Region in a Wilms Tumor" *Genes, Chromosomes & Cancer* 48:1037–1050.

- 71) Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T. J. G., Stinson, J. A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A. D., Peters, G., y Hara, E. 2001. "Opposing effects of Ets and Id proteins on p16^{INK4a} expression during cellular senescence" *Nature* 409: 1067–1070.
- 72) Pardali, K. y Moustakas, A. 2007. "Actions of TGF- β as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer". *Biochimica et Biophysica Acta* 1775, 21–62.
- 73) Patel, S., Leal, A.D., Gorski, D.H. 2005. "The Homeobox Gene Gax Inhibits Angiogenesis through Inhibition of Nuclear Factor-kB–Dependent Endothelial Cell Gene Expression", *Cancer Res* 65, 1414–1424.
- 74) Plass, C. 2002 "Cancer epigenomics" *Human Molecular Genetics*, 2002, Vol. 11, No. 20 2479–2488
- 75) Ponce de León V. y Barrera-Rodríguez R. 2005. "Changes in P-glycoprotein activity are mediated by the growth of a tumour cell line as multicellular spheroids". *Cancer Cell Int.* 7; 5(1):1–13.
- 76) Rahman, A. y Fazal, F. 2011. "Blocking NF-kB: An Inflammatory Issue". *Proc. Am. Thorac. Soc.* Vol 8. pp 497–503, 2011. DOI: 10.1513/pats.201101-009MW.
- 77) Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., Weissman, I. L. 2001. "Stem cells, cancer, and cancer stem cells," *Nature*, 414 (6859) pp. 105–111.
- 78) Ricci-Vitiani, L., Pagliuca, A., Palio, E., Zeuner, A., de Maria, R. 2008. "Colon cancer stem cells," *Gut*, 57 (4), 538–548.

- 79) Ricci-Vitiani, L., Fabrizi, E., Palio, E., de Maria, R. 2009. "Colon cancer stem cells," *J. of Mol. Med.*, 87(11), 1097–1104.
- 80) Rodriguez-Pinilla, S. M., Sarrio, D., Moreno-Bueno, G., Rodriguez-Gil, Y., Martinez, M. A., Hernandez, L., Hardisson, D., Reis-Filho, J. S., y Palacios, J. 2007. "Sox2: A possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer". *Mod. Pathol.* 20, 474–481.
- 81) Saito, K., Kawakami, K., Matsumoto, I., Oda, M., Watanabe, G., Minamoto, T. 2010. "Long interspersed nuclear element 1 hypomethylation is a marker of poor prognosis in stage IA non-small cell lung cancer", *Clin. Cancer Res.* 16 (2010) 2418–2426.
- 82) Schiller, J. H., Harrington, D., Belani, C. P., Langer, C., Sandler, A., Krook, J., Zhu, J. M., Johnson, D.H. 2002. "Eastern Cooperative Oncology Group Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer". *N. Engl. J. Med.* 346,92–98.
- 83) Sterlacci, W., Wolf, D., Savic, S., Hilbe, W., Schmid, T., Jamnig, H., Fiegl, M., Tzankov, A. 2011. "High transforming growth factor β expression represents an important prognostic parameter for surgically resected non-small cell lung cancer". *Hum. Pathol.*, 43(3), 339–349.
- 84) Takahashi, K. y Yamanaka S. 2006. "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors". *Cell*, 126, 663-676.
- 85) Teicher, B. A. 2001. "Malignant cells, directors of the malignant process: role of transforming growth factor-beta". *Cancer Meta. Rev.*, 20,133–143.

- 86) Thiery, J.P. "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression". *Nat Rev Cancer*, 2:442–454.
- 87) Tian T., Zhang Y., Wang S., Zhou J., y Xu S. 2012. "Sox2 enhances the tumorigenicity and chemorresistance of cancer stem-like cells derived from gastric cancer". *J Biomed Res.* 26(5), 336–345.
- 88) Urashima, M., Ogata, A., Chauhan, D., Hatziyanni, M., Vidriales, M.B., Dedera, D.A., Schlossman, R.L., Anderson, K.C. "Transforming growth factor-beta1: differential effects on multiple myeloma versus normal B cells". *Blood* 87, 1928–1938.
- 89) Valcourt, U., Thuault, S., Pardali, K., Heldin, C.H., Moustakas, A. 2007. "Functional role of Meox2 during the epithelial cytostatic response to TGF- β ", *Mol. Onc.*, 1, 55-71.
- 90) Van Aarsen, L.A., Leone, D.R., Ho, S., Dolinski, B.M., McCoon, P.E., LePage, D.J., Kelly, R., Heaney, G., Rayhorn, P., Reid, C., Simon, K.J., Horan, G.S., Tao, N., Gardner, H.A., Skelly, M.M., Gown, A.M., Thomas, G.J., Weinreb, P.H., Fawell, S.E., Violette, S.M. 2008. "Antibody-mediated blockade of integrin alpha v beta 6 inhibits tumor progression in vivo by a transforming growth factor-beta-regulated mechanism". *Cancer Res.* 68(2):561-70.
- 91) Visvader, J. E., Lindeman, G. J. 2008. "Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions," *Nature Reviews Cancer*, 8(10) 755–768.
- 92) Wang, H., Zhang, G., Zhang, H., Zhang, F., Zhou, B., Ning, F., Wang, H., Cai, S., Du, J. 2003. "Acquisition of epithelial–mesenchymal transition phenotype and cáncer stem cell-

like properties in cisplatin-resistant lung cancer cells through AKT/ β -catenin/Snail signaling pathway” *Euro. J. of Pharm.* 723(2014),156–166.

93) Wen-Lei, Z., Yan, W., Xian-Lu, Z., Yun-Song, Z., Zheng-Tang, C. 2008. “Short interfering RNA directed against TWIST, a novel zinc finger transcription factor, increases A549 cell sensitivity to cisplatin via MAPK/mitochondrial pathway”. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 369, 1098–1102.

94) Woodward, W. A., Chen, M. S., Behbod, F., Rosen, J. M. 2005. “On mammary stem cells,” *J. of Cell Sci.*, 118 (16) 3585–3594, 2005.

95) Wu, Z., Guo, H., Chow, N., Sallstrom, J., Bell, R.D., Deane, R., Brooks, A.I., Kanagala, S., Rubio, A., Sagare, A., Liu, D., Li, F., Armstrong, D., Gasiewicz, T., Zidovetzki, R., Song, X., Hofman, F., Zlokovic, B.V. 2005. “Role of the MEOX2 homeobox gene in neurovascular dysfunction in Alzheimer disease” *Nat. Med.* 11(9) doi:10.1038/nm1287.

96) Xu, C-C., Wu, L-M., Sun, W., Zhang, N., Chen, W-S., Fu, X-N. 2011. “Effects of TGF- β signalling blockade on human A549 lung adenocarcinoma cell lines”. *Mol. Med. Rep.* 4, 1007–1015.

97) Xu, J., Lamouille, S. y Derinck, R. 2009. “TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition”. *Cell Res.* 19(2) 156–172. doi:10.1038/cr.2009.5.

98) Yan, L-H., Wei, W-Y., Cao, W-L., Zhang, X-H., Xie, Y-B., y Xiao, Q. 2014. “Overexpression of E2F1 in human gastric carcinoma is involved in anti-cancer drug resistance”. *B. M. C. Cancer*, 14, 904 1–10.

- 99) Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., Weinberg, R.A. 2004. "Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis". *Cell*, 117, 927–939.
- 100) Yang, L., Pang, Y., Moses, H.L. 2010. "TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression". *Trends Immunol.*, 31:220–227.
- 101) Yoshida, T., Song, L., Bai, Y., Kinose, F., Li, J., Ohaegbulam, K. C., Muñoz-Antonia, T., Qu, X., Eschrich, S., Uramoto, H., Tanaka, F., Nasarre, P., Gemmill, R. M., Roche, J., Drabkin, H. A., Haura, E.B. 2016. "ZEB1 Mediates Acquired Resistance to the Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer". *PLoS ONE* 11(1): e0147344. doi:10.1371/journal.pone.0147344
- 102) Zhang, S., Wang, Y., Mao, J-H, Hsieh, D., Kim, I-J., *et al.* 2012. "Inhibition of CK2a Down-Regulates Hedgehog/Gli Signaling Leading to a Reduction of a Stem-Like Side Population in Human Lung Cancer Cells". *PLoS ONE* 7(6): e38996. doi:10.1371/journal.pone.0038996.

Abreviaturas

| | |
|--------|--|
| CEMO | Células estromales de la médula ósea. |
| C.L. | Concentración letal. |
| CSCs | Células <i>stem</i> del cáncer (<i>Cancer Stem Cells</i>). |
| EMSA | (Electrophoretic Mobility Shift Assay). |
| EMT | Transición epitelio-mesenquima (<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>). |
| HUVECs | Células humanas endoteliales de la vena umbilical (<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>). |
| miRNAs | Micro RNAs. |
| MM | Mieloma múltiple. |
| MOI | Multiplicidad de infección (<i>Multiplicity Of Infection</i>). |
| NSCLC | Cáncer pulmonar de células no pequeñas (<i>Non-Small Cell Lung Carcinoma</i>). |
| SCLC | Cáncer pulmonar de células pequeñas (<i>Small Cell Lung Carcinoma</i>). |
| SNP | Polimorfismo de un solo nucleótido (<i>Single Nucleotide Polimorfism</i>). |
| PBMCs | Células mononucleares de sangre periférica (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>). |

| | |
|-------|--|
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas (<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>). |
| VEGF | Factor de crecimiento endotelial vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>). |
| VSMCs | Células vasculares de músculo liso (<i>Vascular Smooth Muscle Cells</i>). |

Glosario

Anoikis: Tipo de muerte celular programada que es inducida en células que dependen de anclaje cuando se separan de la matriz extracelular que las rodea.

Multiplicidad de infección: El número aproximado de partículas de bacteriófagos que infectan a una célula bacteriana en un experimento específico.

Stem (células): Células madre, células progenitoras, células troncales.

Anexos

| | | | | | | |
|---|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| Línea Celular | A427 | | A549 | | INER51 | |
| Concentración Letal (CL) | CL10 | CL25 | CL10 | CL25 | CL10 | CL25 |
| Concentración de Cisplatino (μg) | 5.111 μM | 13.467 μM | 9.537 μM | 25.705 μM | 2.787 μM | 7.218 μM |

Tabla A1. Concentración de cisplatino según CL por línea celular.

| | |
|-----------------------|---|
| Solución PBS-Tween | 0.1% de Tween en solución PBS 1x |
| Solución de Bloqueo | 5% de leche en polvo descremada sin grasa (Svelty) en solución PBS-Tween. |
| Solución de Stripping | 3.2ml TRIS pH 6.8 0.5M, 5ml SDS 10%, 125 μl de β -Mercaptoetanol, 16.75ml de Agua destilada. |

Tabla A2. Soluciones de Western Blot.

| Gen | Secuencia | Tamaño del amplicón | Número de sonda |
|-------------|--------------------------|---------------------|-----------------|
| Meox2 | | | |
| Sentido | ctggatctcactgaaagacaggt | 126nt | #17 |
| Antisentido | tcccttttcacattcaccag | | |
| Twist1 | | | |
| Sentido | aaggcatcactatggactttctct | 96nt | #6 |
| Antisentido | gccagttgatcccagtatattt | | |
| Vimentina | | | |
| Sentido | gaccagctaaccaacgacaaa | 100nt | #39 |

| | | | |
|-------------|------------------------|-------|-----|
| Antisentido | gaagcatctcctcctgcaat | | |
| E-cadherina | | | |
| Sentido | agatccatttcttggtctacgc | 140nt | #39 |
| Antisentido | tgtgagcaattctgcttggga | | |
| GAPDH | | | |
| Sentido | agccacatcgctcagacac | 66nt | #60 |
| Antisentido | gcccaatcgaccaaattcc | | |

Tabla A3. Oligonucleótidos utilizados para PCR de mRNA.