



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

*“Análisis del posicionamiento del factor transcripcional
MEOX2 en el epigenoma del cáncer pulmonar: búsqueda de
nuevos blancos génicos involucrados en la resistencia a la
terapia oncológica pulmonar”*

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. LEONEL ARMAS LÓPEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO
Facultad de estudios superiores Iztacala, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. BLANCA ORTIZ QUINTERO
Instituto Nacional De Enfermedades Respiratorias, INER
COMITÉ TUTOR: DR. RAMCÉS FALFÁN VALENCIA
Instituto Nacional De Enfermedades Respiratorias, INER

México Cd. Mx., Noviembre 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.




LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 12 de junio de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **ARMAS LOPEZ LEONEL**, con número de cuenta **512025274**, con la tesis titulada "**Análisis del posicionamiento del factor transcripcional MEOX2 en el epigenoma del cáncer pulmonar: Búsqueda de nuevos blancos génicos involucrados en la resistencia a la terapia oncológica pulmonar**", realizada bajo la dirección del **DR. FEDERICO ÁVILA MORENO**:

Presidente: DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET
Vocal: DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ
Secretario: DRA. BLANCA ORTÍZ QUINTERO
Suplente: DR. LUIS ENRIQUE ARIAS ROMERO
Suplente: DR. JOAQUIN ALEJANDRO ZÚÑIGA RAMOS

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 18 de septiembre de 2017.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



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

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por la formación recibida durante mis estudios de Doctorado.

- ❖ Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de doctorado (becario CONACYT: 226096, CVU 294950).

- ❖ Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyecto FOSISS 2016-1: 00272655, así como de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) proyecto PAPIIT-DGAPA: IB202512, RR282512 y IN226317.

- ❖ Director de Tesis Dr. Federico Ávila Moreno.

- ❖ Comité Tutorial: Dr. Ramcés Falfán Valencia, Dra. Blanca Ortiz Quintero

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo gracias al apoyo y financiamiento otorgado por:

- ❖ Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Unidad de Biomedicina (UBIMED).
- ❖ Dirección de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

El trabajo experimental de esta tesis doctoral fue realizado en:

- ❖ Universidad Nacional Autónoma de México, FES-Iztacala. División de Investigación y Posgrado. Unidad de Biomedicina (UBIMED), Laboratorio 12. Bajo la dirección principal del doctor Federico Ávila Moreno profesor titular por la UNAM FES Iztacala, UBIMED.
- ❖ Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), Ismael Cosío Villegas, Unidad de Investigación,
- ❖ Centro Médico Siglo XXI, Laboratorio de Oncología Molecular a cargo de la Dra. Patricia Piña Sánchez

- ❖ Sinodales: Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet, Dra. Blanca Ortiz Quintero, Dra. Yolanda Irasema Chirino López, Dr. Luis Enrique Arias Romero, Dr. Joaquin Alejandro Zuñlga Ramos.
- ❖ M. en C. Carlos Peralta Álvarez, Dra. Abril Marcela Herrera Solorio, Biol. Priscila Pineda Villegas.

DEDICATORIAS

A Guadalupe Cortes

A Santiago Leonel Armas

A María Patricia López

A Agustín Armas

A María del Carmen López

A José Agustín Armas

ÍNDICE

ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Cáncer	2
1.2 Cáncer pulmonar	6
1.3 Esquemas terapéuticos en pacientes con cáncer pulmonar	7
1.3 Mecanismos de resistencia al tratamiento fármaco-oncológico	9
2. ANTECEDENTES	11
2.1 Genómica del cáncer pulmonar	11
2.2 Epigenómica y epigenética del cáncer pulmonar	12
2.2.1 Metilación del DNA Genómico	13
2.2.2 Alteraciones post-traduccionales del código de histonas en cáncer pulmonar ..	15
2.3 Aberraciones genético-epigenéticas de los Genes Homeobox (HOX).....	16
2.4 Aberraciones genético-epigenéticas del Factor Transcripcional Mesenchyme Homeobox 2 (MEOX2).....	17
2.5 Blancos génicos del factor transcripcional MEOX2 en cáncer pulmonar	18
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVOS	20
6.1 OBJETIVO GENERAL	20
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	21
8. MATERIALES Y MÉTODOS	22
8.1 Establecimiento y mantenimiento de cultivos celulares	22
8.2 Esquemas de tratamientos con fármacos anti-neoplásicos	23
8.3 Establecimiento de líneas celulares quimio-resistentes	23
8.4 Selección y procesamiento de muestras de tejido pulmonar derivado de pacientes.....	23
8.5 Fragmentación de la cromatina.....	24
8.5.1 Entrecruzamiento de la cromatina de líneas celulares y muestras de tejido pulmonar para ensayos de ChIP	24
8.5.2 Fragmentación de la cromatina a partir de las líneas celulares y muestras de tejido pulmonar en fresco.....	25
8.5.3 Purificación del DNA fragmentado por fenol-cloroformo	25
8.6 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	26
8.6.1 Lavado del complejo	26
8.6.2 Elución del complejo y reversión del entrecruzamiento	26
8.6.3 Purificación del DNA-IP	27
8.6.4 Verificación del producto Inmunoprecipitado	27
8.7 Amplificación genómica lineal (Whole Genome Amplification “WGA”)	27
8.7.1 Preparación de la biblioteca	28
8.7.2 Amplificación	28

8.8 Hibridación en microarreglos de DNA de alta resolución (3x720k Refseq)	
Nimblegen-Roche	29
8.8.1 Marcaje fluorescente del DNA-IP con Nimblegen Dual Color	29
8.8.2 Purificación y cuantificación de las muestras del DNA-IP.....	30
8.8.3 Hibridación del DNA-IP en microarreglo de secuencias promotoras	31
8.8.4 Lavado del microarreglo	31
8.8.5 Análisis bioinformático del microarreglo.....	32
8.9 Predicción de vías de señalización a partir de secuencias promotoras bajo la interacción MEOX2.....	33
8.10 Diseño de oligonucleótidos	33
8.11 Análisis cuantitativo y ensayos de validación por ChIP-qPCR.....	34
8.12 Ensayos de transfección y silenciamiento genético por siRNAs	34
8.13 Ensayos de viabilidad celular mediante MTS.....	34
8.14 Purificación de proteínas y ensayos de Western Blot	34
8.15 Ensayos de migración de células tumorales (Herida).....	35
8.16 Ensayos de migración (Transwell)	35
8.17 Ensayos clonogénicos de proliferación celular	36
8.18 Ensayos RT-qPCR y análisis de expresión de mRNA	36
8.19 Análisis estadístico.....	36
9. RESULTADOS	38
9.1 Análisis bioinformático, identificación de los blancos génicos del factor transcripcional MEOX2 y predicción de vías de señalización.	38
9.2 Identificación y validación de las regiones promotoras del gen GLI-1 de la vía Hh como en gen blanco de MEOX2 en carcinomas pulmonares derivados de pacientes y líneas celulares de cáncer pulmonar.....	46
9.3 Análisis del nivel de expresión del mRNA de los blancos génicos de MEOX2..	47
9.3.1 Expresión del mRNA en genes miembros de la vía de señalización Hh en condiciones basales (ausencia de fármacos oncológicos).....	47
9.4 Análisis de la respuesta al tratamiento farmacológico en líneas celulares de cáncer pulmonar.....	48
9.4.1 Viabilidad celular como respuesta a fármacos anti-neoplásicos en líneas celulares de cáncer pulmonar.....	48
9.4.2 Análisis de cambio en el perfil de expresión del mRNA en modelos de cáncer pulmonar, como respuesta a fármacos oncológicos	49
9.4.3 Análisis de cambios en el perfil transcripcional y epigenético en secuencias promotoras del gen GLI-1 como blanco génico de MEOX2 en presencia de fármacos oncológicos en cáncer pulmonar	55
9.4.4 Análisis de la capacidad de resistencia al fármaco oncológico cisplatino en líneas celulares de cáncer pulmonar.....	59
9.5 Participación de los factores de transcripción MEOX2 y GLI-1 en la quimio-resistencia del cáncer pulmonar	62
9.5.1 Análisis de la participación del eje transcripcional MEOX2-GLI-1 en la capacidad de quimio-resistencia (cisplatino) en cáncer pulmonar.	63
9.5.2 Análisis de cambios en el nivel de proteína de GLI-1 como blanco génico del factor transcripcional MEOX2 en líneas celulares de cáncer pulmonar.....	64
9.6 Análisis de la participación funcional de MEOX2 y GLI-1 en la proliferación celular del cáncer pulmonar.....	66
9.6.1 Ensayos de migración de células tumorales mediante la técnica de herida (Horizontal)	67
9.6.2 Ensayos de migración de células tumorales mediante el uso de cámaras Transwell (Vertical)	69
9.6.3 Análisis de la proliferación celular y formación de colonias mediante ensayos clonogénicos.....	70

9.7 Análisis de la co-expresión de MEOX2 y GLI-1 in situ en muestras de pacientes con cáncer pulmonar	71
9.8 Análisis del eje MEOX2-GLI-1 y su impacto en la supervivencia global de pacientes con cáncer pulmonar bajo esquemas de seguimiento clínico fármaco-oncológico	73
10. DISCUSIÓN.....	77
11. CONCLUSIONES.....	84
12. PERSPECTIVAS.....	85
14. ANEXOS	96

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1 OCTAVA COMISIÓN AMERICANA SOBRE EL CÁNCER TNM SISTEMA DE CLASIFICACIÓN.....	7
CUADRO 2 MEDIO DE CULTIVO.....	22
CUADRO 3. ESQUEMA DE TRATAMIENTO FÁRMACO-ONCOLÓGICO.....	23
CUADRO 4 BUFFER DE LISIS.....	25
CUADRO 5. CONDICIONES DE FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA.....	25
CUADRO 6. CONDICIONES DE PCR EN TIEMPO FINAL.....	27
CUADRO 7. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN (WGA1).....	28
CUADRO 8. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN (WGA3).....	28
CUADRO 9. CONDICIONES DE MARCAJE (NIMBLEGEN DUAL COLOR).....	29
CUADRO 10. CONDICIONES DE MASTER MIX PARA EL MARCAJE.....	30
CUADRO 11. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PREVIO A HIBRIDACIÓN.....	31
CUADRO 12. PREPARACIÓN, BUFFERS DE LAVADO DE MICROARREGLOS.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. SECUENCIAS PROMOTORAS BLANCO DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL MEOX2. FILTRADO DE DATOS USANDO UN FDR 0.1, EN PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR, EN COLOR NARANJA SE MUESTRA GLI-1 GEN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN HEDGEHOG.....	42
TABLA 2. ANÁLISIS MULTIVARIADO USANDO DATOS CLÍNICOS DE PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR. MODELO DE REGRESIÓN COX Y RIESGO RELATIVO (RR), CALCULADO CON UN C.I. DE 95%.....	73
TABLA 3. SECUENCIAS PROMOTORAS BLANCO DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL MEOX2, SE REALIZÓ USANDO UN FDR 0.2, EN PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR, EN COLOR NARANJA SE MUESTRA GLI-1 GEN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN HEDGEHOG.....	106
TABLA 4 COHORTE DE PACIENTES Y SEGUIMIENTO CLÍNICO DE PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR (N=90).....	109

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1: ESTRATEGIA EXPERIMENTAL. PASOS UTILIZADOS PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO EN UNA LÍNEA DE TIEMPO ESTABLECIDA POR LOS OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
ESQUEMA 2: FLUJO DE TRABAJO. SEGUIMIENTO DE PASOS EN LÍNEA TEMPORAL DESDE LA OBTENCIÓN DE LA MUESTRA HASTA LA VALIDACIÓN POR QPCR PARA LOS BLANCOS GÉNICOS DE MEOX2.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 REGULACIÓN EPIGENÉTICA (METILACIÓN DEL DNA).	14
FIGURA 2 REGULACIÓN EPIGENÉTICA (CÓDIGO DE HISTONAS)	16
FIGURA 3. FORMATO DE 3X720K ARREGLOS NIMBLEGEN	31
FIGURA 4 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO POR CGH DE MEOX2 Y RNA POLII.	39
FIGURA 5 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL EPIGENOMA DE CÁNCER PULMONAR.	40
FIGURA 6 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE BLANCOS DE MEOX2.	41
FIGURA 7 CONSTRUCCIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR A PARTIR DE ANÁLISIS DE PREDICCIÓN.	43
FIGURA 8 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DEL PROMOTOR DE GLI-1.	44
FIGURA 9 ANÁLISIS EPIGENÉTICO DE LA REGIÓN PROMOTOR DE GLI-1.	45
FIGURA 10 PROMOTOR DE GLI-1 DISEÑO <i>IN SILICO</i> DE POSIBLES SITIOS DE INTERACCIÓN DE MEOX2.	45
FIGURA 11 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE FACTORES TRANSCRIPCIONALES SOBRE LA REGIÓN PROMOTORA DE GLI-1.	46
FIGURA 12 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE MARCAS DE HISTONAS SOBRE LA REGIÓN PROMOTORA DE GLI-1.	47
FIGURA 13 ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN BASAL DEL MRNA EN MODELOS CELULARES DE CÁNCER PULMONAR.	48
FIGURA 14 ANÁLISIS DE LA TASA DE VIABILIDAD CELULAR DESPUÉS DEL RETO FARMACOLÓGICO.	49
FIGURA 15 ANÁLISIS DEL MRNA DE SHH EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER PULMONAR.	50
FIGURA 16 ANÁLISIS DE MRNA DE PTCH1 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER PULMONAR.	51
FIGURA 17 ANÁLISIS DE MRNA DE SMO EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER PULMONAR.	52
FIGURA 18 ANÁLISIS DE MRNA DE GLI-1 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER PULMONAR.	53
FIGURA 19 ANÁLISIS DE MRNA DE MEOX2 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER PULMONAR.	54
FIGURA 20 ANÁLISIS DE MRNA DE ABCG2 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER PULMONAR.	55
FIGURA 21 ANÁLISIS DEL CÓDIGO HISTÓNICO SOBRE EL PROMOTOR DE GLI-1 EN LÍNEAS CELULARES.	56
FIGURA 22 ANÁLISIS DEL CÓDIGO HISTÓNICO SOBRE EL PROMOTOR DE GLI-1 EN A549 FRENTE AL RETO FARMACOLÓGICO.	58
FIGURA 23 ANÁLISIS DEL CÓDIGO HISTÓNICO SOBRE EL PROMOTOR DE GLI-1 EN A427 FRENTE AL RETO FARMACOLÓGICO.	59
FIGURA 24 DETERMINACIÓN DE LA IC50 EN RESPUESTA A CISPLATINO EN LÍNEAS CELULARES.	60
FIGURA 25 RESISTENCIA A CISPLATINO EN LÍNEAS CELULARES.	61
FIGURA 26 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN A549 RESISTENTES A CISPLATINO.	61
FIGURA 27 PARTICIPACIÓN DE MEOX2 Y GLI-1 EN LA VIABILIDAD CELULAR BAJO EL TRATAMIENTO CON CISPLATINO.	62
FIGURA 28 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE MEOX2 Y GLI-1 MEDIANTE EL SILENCIAMIENTO DE MEOX2 EN TRATAMIENTOS CON CISPLATINO.	63
FIGURA 29 VALIDACIÓN DEL EFECTO DEL SILENCIAMIENTO GENÉTICO DE MEOX2.	64
FIGURA 30 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE MEOX2 SOBRE GLI-1 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER PULMONAR.	65
FIGURA 31 PARTICIPACIÓN DE MEOX2 COMO REGULADOR POSITIVO DE GLI-1 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER PULMONAR.	66
FIGURA 32 MIGRACIÓN CELULAR EN MODELOS CELULARES A549 Y A427.	68
FIGURA 33 MIGRACIÓN CELULAR EN A549 PARENTAL VS RESISTENTE.	68
FIGURA 34 MIGRACIÓN CELULAR DE A549 RESISTENTE Y SU EFECTO TRAS EL SILENCIAMIENTO DE MEOX2 Y GLI-1.	69

FIGURA 35 MIGRACIÓN CELULAR MEDIANTE EL USO DE CÁMARAS TRANSWELL Y EL SILENCIAMIENTO DE MEOX2 Y GLI-1 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER PULMONAR.	70
FIGURA 36 CAPACIDAD DE FORMACIÓN COLONIAS TRAS EL SILENCIAMIENTO DE MEOX2 Y GLI-1 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER PULMONAR.	71
FIGURA 37 ANÁLISIS DE LA PRESCIENCIA DE MEOX2 Y GLI-1 EN PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR.	72
FIGURA 38 ANÁLISIS DE LA PROGNOSIS DE SUPERVIVENCIA EN PACIENTES CON CARCINOMAS PULMONARES.	73
FIGURA 39 ANÁLISIS DE LA PROGNOSIS DE SUPERVIVENCIA EN PACIENTES CON ADENOCARCINOMAS PULMONARES.	74
FIGURA 40 ANÁLISIS DE LA PROGNOSIS DE SUPERVIVENCIA EN PACIENTES CON CARCINOMA PULMONAR CON TERAPIA DIRIGIDA Y EGFR NO MUTADO.	75
FIGURA 41 ANÁLISIS DE LA PROGNOSIS DE SUPERVIVENCIA EN PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR CON TERAPIA DIRIGIDA Y EGFR NO MUTADO.	75
FIGURA 42 ANÁLISIS DE LA PROGNOSIS DE SUPERVIVENCIA EN PACIENTES CON CARCINOMA PULMONAR CON TERAPIA DIRIGIDA Y EGFR MUTADO.	76

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1 DISEÑO DE PRIMERS EXPRESIÓN. SECUENCIA, TM Y TAMAÑO DEL AMPLICÓN DE CADA GEN DISEÑADO A SER VALIDADO	96
ANEXO 2 DISEÑO DE PRIMERS PROMOTOR. SECUENCIA, Y TAMAÑO DEL AMPLICÓN DE CADA GEN DISEÑADO A SER VALIDADO	96
ANEXO 3 DISEÑO DE PRIMERS PROMOTOR GLI-1. SECUENCIA, Y TAMAÑO DEL AMPLICÓN DE CADA GEN DISEÑADO A SER VALIDADO	97
ANEXO 4 DISEÑO DE PRIMERS DE EXPRESIÓN PARA EL GEN GLI-1	97
ANEXO 5 DISEÑO DE PRIMERS DE EXPRESIÓN PARA EL GEN MEOX2	98
ANEXO 6 DISEÑO DE PRIMERS DE EXPRESIÓN PARA EL GEN SHH	98
ANEXO 7 DISEÑO DE PRIMERS DE EXPRESIÓN PARA EL GEN SMO	99
ANEXO 8 DISEÑO DE PRIMERS DE EXPRESIÓN PARA EL GEN PTCH1	99
ANEXO 9 DISEÑO DE PRIMERS DE EXPRESIÓN PARA EL GEN ABCG2	100
ANEXO 10 DISEÑO DE PRIMERS DE EXPRESIÓN PARA EL GEN GAPDH	100
ANEXO 11 ESTIMACIÓN DE PICOS EN BASE A SU FDR PACIENTE 13	101
ANEXO 12 ESTIMACIÓN DE PICOS EN BASE A SU FDR PACIENTE 6	101
ANEXO 13 ESTIMACIÓN DE PICOS EN BASE A SU FDR PACIENTE 3	102
ANEXO 14 PATRÓN DE LA CROMATINA ANTES DE SU FRAGMENTACIÓN LÍNEAS A427 Y A549	102
ANEXO 15 PATRÓN DE LA CROMATINA DESPUÉS DE SU FRAGMENTACIÓN LÍNEAS A427 Y A549	103
ANEXO 16 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN A427 RESISTENTES A CISPLATINO	103
ANEXO 17 ANÁLISIS DE LA MIGRACIÓN CELULAR POR EL MÉTODO DE HERIDA EN CÉLULAS PARENTALES A549 BAJO SILENCIAMIENTO GENÉTICO.	104
ANEXO 18 ANÁLISIS DE LA MIGRACIÓN CELULAR POR EL MÉTODO DE HERIDA EN CÉLULAS PARENTALES A549 EXPUESTAS A CISPLATINO, BAJO SILENCIAMIENTO GENÉTICO.	104
ANEXO 19 ANÁLISIS DE LA MIGRACIÓN CELULAR POR EL MÉTODO DE HERIDA EN CÉLULAS PARENTALES A427 BAJO SILENCIAMIENTO GENÉTICO.	105
ANEXO 20 ANÁLISIS DE LA MIGRACIÓN CELULAR POR EL MÉTODO DE HERIDA EN CÉLULAS PARENTALES A427 EXPUESTAS A CISPLATINO, BAJO SILENCIAMIENTO GENÉTICO.	105

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

DNA	Deoxyribonucleic acid
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2
AC	Adenocarcinoma
AKT	Protein kinase B (PKB)/AKT
APC	Adenomatous polyposis coli
ATCC	American Type Culture Collection
AZA	Azacitidine
BHLHB2	Class E basic helix-loop-helix protein 40
BRMS1	Breast cancer metastasis suppressor 1
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CHFR	Checkpoint with fork head and ring finger domains, E3 ubiquitin protein ligase
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
CNV	Copy number variation
CpG	Cytosine phosphate Guanine
CTCF	CCCTC-binding factor (zinc finger protein)
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
DCLK1	Doublecortin-like kinase 1
DNA-IP	DNA Immunoprecipitado
DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
DNMT3A	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha
DNMT3B	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta
DNMTs	DNA Methyl Transferase
DRYAD	Dryad Digital Repository
DZNep	3-Deazaneplanocin A
E2F1	E2F transcription factor 1
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ENCODE	Encyclopedia of DNA Elements
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)
FDR	False discovery rate
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GAX	Growth arrest-specific Homeobox
GLI-1	GLI family zinc finger 1
GNB2	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2
H3K27	Histone 3 Lysine 27
H3K27Ac	Histone 3 Lysine 27 acetylation
H3K27me3	Histone 3 Lysine 27 methylation
H3K4me3	Histone 3 Lysine 4 methylation
H3k9me3	Histone 3 Lysine 9 methylation
HAT	Histone acetyltransferase
HCl	Hydrochloric acid
HDAC	Histone deacetylase
Hh	Hedgehog
HHEX	Hematopoietically expressed homeobox
HMT	Histone methyltransferase
HOX	Homeobox related genes
HOXA5	homeobox A5
HRP	Horseradish peroxidase
IGV	Integrative Genomics Viewer
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas
INK4a	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, multiple tumor suppressor 1
ITGA9	Integrin, alpha 9
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LiCl	Lithium chloride
LSCC	Lung squamous cell carcinoma
MEOX2	Mesenchyme homeobox 2
miRNAs	Micro-Ribonucleic acid
MLH1	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)
MMP24	Matrix metalloproteinase 24 (membrane-inserted)
mRNA	Messenger-Ribonucleic acid
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MTS	3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-carboximethoxyfenil) -2- (4-sulfo-fenil) 2H-tetrazolio
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
NaCl	Sodium chloride
NANOG	Nanog homeobox
NSCLC	Non-small cell lung cancer
OMS	Organización Mundial de la Salud
P-gp	P-glicoproteína
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
PROX	Prospero-related Homeobox
PRX1	Hiorodoxin peroxidase PRX1
PTCH1	Patched 1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RARB2	Retinoic acid receptor beta
RASSF1A	Ras association domain family member 1
RNA Pol II	RNA polymerase II
RPL15	Ribosomal protein L15
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SCLC	Squamous cell lung cancer
SCR	Scramble
SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
SETDB1	SET domain, bifurcated 1
SFN	Stratifin
SHH	Sonic hedgehog
SHOX2	Short stature homeobox 2
SIP1	Smad interacting protein 1
siRNAs	Small interfering RNA
SMO	Smoothened, frizzled family receptor
SOX17	SRY (sex determining region Y)-box 17
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2
TGF- β	Transforming growth factor beta
TKI's	Tyrosine kinase inhibitor
TN-C	Tenascina-C
TNM	Classification of Malignant Tumours
TWIST1	Twist homolog 1 (Drosophila)
UPL	Universal Probe Library
VSMCs	Vascular smooth muscle cells
WGA	Whole Genome Amplification
ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox 1
ZIC4	Zic family member 4

RESUMEN

Los factores de transcripción tipo Homeobox como Mesenquima Homeobox-2 (MEOX2), han sido asociados con la capacidad de resistencia a fármacos oncológicos, la progresión y/o prognosis clínica en pacientes con cáncer pulmonar, sin embargo, los mecanismos implicados, permanecen por ser dilucidados. En el presente trabajo se planteo analizar el posicionamiento del factor transcripcional MEOX2 y RNA Pol II sobre el epigenoma de tumores pulmonares, esto con el fin de identificar regiones promotoras de nuevos blancos génicos de MEOX2, los cuales probablemente estén asociados a la resistencia a fármacos oncológicos y pobre pronóstico. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), de marcas de histonas, así como RNA Pol II sobre carcinomas pulmonares de células no pequeñas (NSCLC), e hibridación en microarreglos de DNA de alta resolución, se identificó un perfil de secuencias promotoras mediante análisis bioinformático de manera significativa ($FDR \leq 0.1$, y $FDR \leq 0.2$) correspondientes a 13 y 78 genes. Se demostró que el factor transcripcional MEOX2 se posiciona en la región promotora de GLI-1 en la posición -2,192 a la -109 acompañada de RNA Pol II e histonas de activación H3K27Ac y H3K4me3. Mediante ensayos de silenciamiento genético por siRNAs se demostró que el eje MEOX2-GLI-1 se encuentra implicado en la resistencia al cisplatino de manera dosis-dependiente, así como involucrado en la migración y proliferación celular tumoral. Finalmente, el análisis de supervivencia de pacientes bajo tratamiento fármaco-oncológico permitieron confirmar que la expresión de GLI-1 dependiente de MEOX2, se encuentra asociada con la progresión clínica y pobre supervivencia global, esto realizado una cohorte de pacientes con diagnóstico NSCLC, EGFR-Wild Type, o EGFR-mutado bajo terapia dirigida por TKIs. En conclusión, nuestros resultados derivados del estudio del posicionamiento en el epigenoma de pacientes NSCLC, han permitido por primera vez identificar que la sobreexpresión del eje MEOX2-GLI-1 se encuentra biológica y clínicamente involucrada en la resistencia a fármacos derivados de platino y la capacidad de respuesta a terapia dirigida basada en inhibidores de tirosina cinasas (TKIs) del receptor EGFR en pacientes NSCLC.

ABSTRACT

Homeobox transcription factors such as Mesenchyme Homeobox-2 (MEOX2), have been associated with the capacity of resistance to oncological drugs, progression and/or clinical prognosis in lung cancer patients, however, the mechanisms involved, remain to be elucidated. In the present work, we propose to analyze the positioning of the transcription factor MEOX2 and RNA Pol II on the whole epigenome of lung cancer tumors, in order to identify promoter regions of new MEOX2 gene targets, which are probably associated with resistance to oncological drugs and poor prognosis. Chromatin immunoprecipitation (ChIP), histone marker assays, as well as RNA Pol II on non-small cell lung carcinomas (NSCLC), and hybridization in high resolution DNA microarrays, a profile of promoter sequences was identified by assay bioinformatics ($FDR \leq 0.1$, and $FDR \leq 0.2$) corresponding to 13 and 78 genes. It was shown that the transcriptional factor MEOX2 is positioned in the GLI-1 promoter region at position -2,192 at -109 accompanied by RNA Pol II and activation histones H3K27Ac and H3K4me3. Genetic silencing by siRNAs demonstrated that the MEOX2-GLI-1 axis is involved in dose-dependent resistance to cisplatin as well as involved in tumor cell migration and proliferation. Finally, the survival analysis of patients undergoing drug-oncology treatment confirmed that GLI-1-dependent expression of MEOX2 is associated with clinical progression and poor overall survival, a cohort of patients diagnosed with NSCLC, EGFR- Wild Type, or EGFR-mutated under TKIs-driven therapy. In conclusion, our results derived from the study of the positioning in the epigenome of NSCLC patients have allowed for the first time to identify that the overexpression of the MEOX2-GLI-1 axis is biologically and clinically involved in resistance to platinum-derived drugs and the capacity of response to targeted therapy based on EGFR receptor tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in NSCLC patients.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El cáncer se ha definido como el conjunto de factores genéticos, epigenéticos y estructurales que conducen hacia la transformación fenotípica y funcional celular en tejidos, epitelios y órganos [1]. Lo anterior explicado en parte al conjunto de desequilibrios y micro-aberraciones cromosómicas de alta complejidad que conducen a disminuir la homeóstasis celular, ampliamente descrita y clasificada por los trabajos realizados por Hanahan y Weinberg [1,2], conocidos como las marcas moleculares del cáncer, entre los que destacan:

-Mantenimiento de señalización favorable a la proliferación: Las células histológicamente normales requieren de señales de crecimiento, llamados mitógenos, los cuales actúan como mediadores entre estados activos de proliferación o estados de inactivación, estas señales son transmitidas vía transmembranal de célula a célula para completar la señalización. Estos factores intra o extracelulares intervienen sobre las células histológicamente normales promoviendo estados activos de proliferación, así mismo los oncogenes actúan promoviendo señales de crecimiento y proliferación celular sostenida y descontrolada [3]. Se ha documentado que RACK1 regula el crecimiento y la progresión del ciclo celular en cáncer pulmonar de células no pequeñas mediante la fosforilación de la proteína MCM7, RACK1 funciona como proteína de andamiaje entre AKT y MCM7, la sobreexpresión de esta proteína incrementa la fosforilación de MCM7 promoviendo la replicación del DNA y la proliferación celular en líneas celulares y cultivos primarios obtenidos de pacientes con cáncer pulmonar [4].

-Resistencia a los estímulos anti-crecimiento: En tejidos normales existen señales anti-proliferativas que operan para mantener la homeostasis celular mediante la quiescencia, estas señales se encuentran reguladas por inhibidores localizados en la matriz extracelular y la membrana celular, al igual que las señales de proliferación los inhibidores actúan mediante receptores transmembranales acoplados a vías de señalización intracelular, estos inhibidores tienen dos objetivos, forzar las células a salir del ciclo proliferativo hacia un estado quiescente o inducir estados post-mitóticos y muerte celular, en este sentido las células neoplásicas poseen insensibilidad a dichas señales de anti-crecimiento [5]. Los miRNAs son indispensables para la iniciación y progresión del cáncer, se han postulados como marcas del cáncer, sin embargo el estudio de un solo miRNA no es suficiente, se asume que la cooperación de distintos miRNAs regula vías oncogénicas y contribuyen a las marcas del cáncer, dos miRNAs mir-590 y mir-629 conocidos como onco-miRNAs tienen como blanco a PTEN supresor de tumor que regula el ciclo celular, esto repercute en la insensibilidad a señales de anticrecimiento [6].

-Evasión a señales de muerte celular programada: La capacidad de proliferación de una población celular neoplásica, no solo está determinada por la tasa de proliferación, si no también por la tasa de muerte celular, la muerte celular programada o apoptosis es la principal causa de disminución celular en un tejido específico, la evasión a la muerte celular resulta un mecanismo por el cual las células neoplásicas adquieren capacidad proliferativa descontrolada, aunado a la resistencia adquirida a fármacos, resultan la principal causa de la capacidad de evasión a la apoptosis en la mayoría de las neoplasias de origen epitelial [7]. La maquinaria apoptótica está compuesta por reguladores y componentes, estos reguladores se dividen en dos circuitos, uno que recibe y procesa señales de muerte extracelular (ligando de FAS /receptor de FAS) y otro que modula e integra las señales de origen intracelular, los dos culminan en la activación de caspasa 8 y 9 respectivamente, iniciando la cascada de proteólisis y llevando a muerte celular [8]

-La capacidad de inmortalización en base a mecanismos de replicación del DNA descontrolados: se han descrito tres mecanismos, mantenimiento de la proliferación, insensibilidad a las señales de crecimiento y resistencia a la apoptosis, estos mecanismos conducen a un desbalance en la capacidad proliferativa en cierto entorno celular, estos mecanismos deberían ser necesarios para mantener la homeostasis de un tejido normal, sin embargo las células de los mamíferos contienen un programa intrínseco de autonomía celular, que limita su multiplicación, las células neoplásicas adquieren de manera organizada mecanismos basados en la replicación del DNA, para mantener un estado replicativo descontrolado y mantener un grupo celular en estado proliferativo [9]. El alargamiento de telómeros es uno de los mecanismos de inmortalización celular, en la mayoría de las neoplasias humanas la telomerasa una ribonucleoproteína sintetiza nuevo DNA telomérico mediante la transcripción reversa de RNA, sin embargo se ha observado que ciertos tipos de neoplasias no llevan a cabo este mecanismo, como en los neuroblastomas donde inicialmente los telómeros son muy largos y proliferan más de 200 duplicaciones [10].

-Inducción de microambiente extracelular favorable al crecimiento neoplásico y angiogénesis: El oxígeno y los nutrientes suministrados por la vascularización son esenciales para la función celular y mecanismos de supervivencia, por lo que, las células de un tejido están obligadas a residir a corta distancia (100 μ m) de un vaso capilar, esto asegura el mantenimiento homeostático celular, las células neoplásicas promueven la angiogénesis formación de nuevos vasos sanguíneos para el mantenimiento de un estado proliferativo aberrante [11], las vesículas extracelulares son bicapas lipídicas que sirven de comunicación en el microambiente tumoral, transportando ácidos

nucleicos y proteínas a células distantes, promoviendo procesos de proliferación, migración y angiogénesis, se han vuelto potenciales blancos terapéuticos, para disminuir el transporte en el microambiente tumoral [12]

-Invasión y metástasis a diferentes sitios tisulares a la región de origen: Tarde o temprano la mayoría de las neoplasias malignas, conllevan a generar células pioneras con capacidad de movilidad hacia fuera del tumor, invadiendo tejidos adyacentes, viajar mediante el torrente sanguíneo a ubicaciones distales del origen primario y formar nuevas colonias. Estas células capaces de formar tumores distales al origen primario, son la causa del 90% de las muertes por cáncer en humanos [13]. Este fenómeno ha sido abordado ampliamente y todos los trabajos se han enfocado en disminuir la transición epitelio mesénquima, al inhibir distintos genes y RNA no codificante, ejemplo de esto el miR-182 se ha determinado con baja expresión en pacientes con cáncer pulmonar metastásico, y su sobreexpresión inhibe la migración y la invasión en modelos *in vitro* promoviendo la expresión de E-caderina y reduciendo los niveles de SNAiL, miR-182 regula negativamente la vía de MET disminuyendo la fosforilación de AKT [14].

Las seis marcas moleculares del cáncer antes descritas, han sido una aproximación a los mecanismos que explicaban en parte la génesis, mantenimiento y progresión de las enfermedades oncológicas, sin embargo, once años después se propusieron marcas emergentes, los cuales se describen a continuación:

-Inestabilidad cromosómica y aumento en procesos de mutación genética: La adquisición de múltiples mecanismos mencionados anteriormente son producto de alteraciones en los genomas de células neoplásicas, esto se debe a que ciertos genotipos mutantes les confieren una ventaja selectiva a sub-clonas celulares, permitiendo un estado proliferativo y eventualmente la localización tisular local. Por lo tanto, la progresión tumoral es el resultado de la adquisición genotípica mutante, en las distintas clonas generadas, que les confieren mayor capacidad proliferativa, inactivación de genes supresores de tumor, así como alteración de los mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA y modificación de histonas, los cuales modulan procesos celulares, [15].

-Generación de procesos pro-inflamatorios en tumores: Recientemente los patólogos han reconocido que algunos tumores sólidos están constituidos por células del sistema inmunológico, y por lo tanto reflejan condiciones inflamatorias que surgen en tejidos no neoplásicos. Con el avance en la mejora para la detección de marcadores celulares, se ha podido identificar con mayor seguridad la presencia de linfocitos y macrófagos en las lesiones neoplásicas, en tumores primarios existe infiltración de células de memoria tipo t específicamente Th1, se sugiere la presencia de células dendríticas maduras

en los nodos linfáticos adyacentes al tumor en centros germinales, se sugiere que estos centros sirvan como pronóstico para predecir la supervivencia y toma de decisiones en la terapia [16].

-Reprogramación del metabolismo energético: Una alta tasa de proliferación celular en las neoplasias no solo implica aumento en el tamaño de la masa tumoral, sino que también representa un desbalance en el metabolismo energético con el fin de impulsar el crecimiento y la división celular. Bajo condiciones aerobias, las células normales procesan la glucosa, primero al piruvato a través de la glicolisis en el citosol y después al dióxido de carbono en las mitocondrias, en condiciones anaerobias, se favorece la glucólisis y se envía relativamente poco piruvato a las mitocondrias que consumen oxígeno. Sin embargo, en células neoplásicas se ha observado una característica anómala del metabolismo energético de las células cancerosas, incluso en presencia de oxígeno las células neoplásicas pueden reprogramar el metabolismo de la glucosa, y la producción de energía, limitando su metabolismo energético en gran medida a la glicolisis [17].

-Evasión de la respuesta inmune antitumoral: Otro aspecto de amplio estudio ha sido el análisis de la formación de los tumores en el contexto de la respuesta inmunológica del huésped y sus mecanismos de evasión al sistema inmune, esto como mecanismo de resistencia a la erradicación de las células neoplásicas, tumores sólidos y/o micro metástasis, al respecto existe la teoría de la inmuno-vigilancia, en donde las células del sistema inmune se encuentran en constante monitoreo y son responsables de reconocer, eliminar y controlar posibles amenazas neoplásicas, sin embargo, las neoplasias han desarrollado mecanismos que les permiten evadir la detección de células del sistema inmune evitando así su erradicación del huésped [18].

El estudio del cáncer ha sido amplio y bajo un esquema de estudio dirigido, la asociación de un genoma susceptible o inestable en presencia de mutaciones de aparición estocástica en genes clave del control celular y otras funciones metabólicas y/o fisiológicas, han permitido explicar parcialmente la génesis, inducción, promoción y progresión de procesos neoplásicos [19,20]. De los mecanismos previamente mencionados, actualmente se estudia el papel de la respuesta inmune anti-tumoral deficiente-aberrante en el propio huésped la cual favorece la oncogénesis, así mismo se ha postulado que el factor ambiental está involucrado en estos procesos y se ha planteado la participación de factores evolutivos tales como la adaptación de una especie ante un ambiente que cambia de manera repentina, la evolución frente a ciertos patógenos, la limitada selección natural, y la adaptación hacia tasas reproductivas mayores a expensas de la salud, etc., [21–23]. Al respecto, se propone que los mecanismos epigenéticos y su regulación permiten que la oncogénesis tenga distintas vertientes y etapas, que son aprovechados en

fenómenos de adaptación frente a un ambiente nuevo que está en constante cambio, aunado a esto la combinación de factores inmunológicos locales y sistémicos conlleven al desarrollo de neoplasias en parte explicado por mecanismos como el desbalance de genes supresores de tumor y oncogenes, así como las mutaciones, la inestabilidad cromosómica y epigenómica [24–27] Ya que las neoplasias malignas son una de las mayores causas de mortalidad a nivel mundial y que la tasa de mortalidad aumentará en las próximas 2 décadas, el estudio y la caracterización de los mecanismos que están involucrados es de suma importancia, no solo para la investigación clínica, si no en beneficio de las personas que tienen este padecimiento [28,29].

1.2 Cáncer pulmonar

Se considera cáncer pulmonar a las neoplasias malignas de origen epitelial que tienen su origen primario en la región bronquio-pulmonar, dividiéndose en 2 grandes subgrupos o fenotipos; Carcinomas Pulmonares de Células Pequeñas (SCLC, por su siglas en inglés) que tienen la menor incidencia (10-15%) y los Carcinomas Pulmonares de Células No Pequeñas (NSCLC) los cual tiene la mayor incidencia (85-90%) entre todos los casos de cáncer pulmonar a nivel mundial, estos a su vez se dividen en 2 subfenotipos Adenocarcinomas (AC) siendo el de mayor incidencia, y Carcinoma de Células Escamosas (LSCC) [30,31]. El cáncer pulmonar es un problema de salud a nivel mundial, y de acuerdo con los datos obtenidos del GLOBOCAN y la OMS son las neoplasias malignas con mayor mortalidad en hombres y la segunda causa en mujeres, mientras que en ambos sexos representa la primera causa de muerte por neoplasias malignas, donde la esperanza de vida a 5 años es menor al 10% después de ser detectada, siendo las más agresivas y difícil de diagnosticar pese a los avances tecnológicos en la detección de imágenes de rayos X y resonancia magnética nuclear [29].

Los distintos fenotipos de las neoplasias pulmonares, son resultado de los múltiples desbalances genético-epigenéticos, así como, los factores ambientales que desembocan a la des-diferenciación de células y expansión clonal en los tejidos pulmonares, estos procesos secuenciales van desde un estado pre-maligno hacia el establecimiento de una neoplasia maligna tejido-especifica [32]. Existen distintos agentes ambientales que promueven la generación y mantenimiento de neoplasias pulmonares, entre ellos, el humo de leña, humo de tabaco, hidrocarburos aromáticos, asbestos; que promueven la inflamación de epitelios, entre ellos el pulmonar así como el estrés oxidativo y daño al DNA genómico [33–35].

Las alteraciones genéticas contribuyen al proceso oncológico, mostrando un establecimiento de mutaciones germinales y somáticas en genes implicados, en distintos procesos, como son la diferenciación celular, proliferación, angiogénesis, apoptosis, etc., [36,37], además de los factores anteriores, los mecanismos epigenéticos permiten el silenciamiento o activación de grupos de

genes o regiones citogenéticas, en los que se encuentran genes que regulan los procesos antes mencionados [38,39]. Todos estos mecanismos resultan inducibles, pues poseen la capacidad de ser reversibles, en la actualidad es de gran relevancia el estudio de estos mecanismos para el diagnóstico y/o tratamiento oportuno [40,41]. Lamentablemente, la exposición a múltiples factores de riesgo está asociado con alta mortalidad en pacientes con neoplasias pulmonares, donde el diagnóstico es tardío, así como el alto índice de falla en los esquemas de tratamiento terapéutico como una causa principal de alta mortalidad [42–44].

1.3 Esquemas terapéuticos en pacientes con cáncer pulmonar

La estratificación del cáncer pulmonar está de acuerdo al sistema Tumor, Nodo, Metástasis (TNM) en su octava edición, la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer Pulmonar (IASLC por sus siglas en inglés) analizó un total de 70,967 pacientes con NSCLC subdividiendo la categoría de T en función al tamaño del tumor [45], Los esquemas terapéuticos utilizados en las neoplasias pulmonares de tipo NSCLC entre ellos los adenocarcinomas, son mediante la TNM asignando un estadio clínico en base al tamaño del tumor así como la metástasis [46].

Cuadro 1 Octava Comisión Americana sobre el cáncer TNM sistema de clasificación

	N0	N1	N2	N3	M1a/N	M1b/N	M1c/N
T1a	IA1	IIB	IIIA	IIIB (2)	IVA	IVA	IVB
T1b	IA2	IIB	IIIA (2)	IIIB (1)	IVA	IVA	IVB
T1c	IA3	IIB	IIIA (4)	IIIB (4)	IVA	IVA	IVB
T2a	IB (1)	IIB (1)	IIIA	IIIB (6)	IVA	IVA	IVB
T2b	IIA	IIB (1)	IIIA (4)	IIIB (4)	IVA	IVA	IVB
T3	IIB (1)	IIIA (2)	IIIB (8)	IIIC (3)	IVA	IVA	IVB
T4	IIIA (4)	IIIA (4)	IIIB (7)	IIIC (5)	IVA	IVA	IVB

La resección quirúrgica y la quimioterapia adyuvante, es decir posterior a la cirugía es utilizada cuando se detecta de manera temprana y no hay diseminación del tumor esto generalmente en los estadios I, IIA, IIB, IIIA, en algunos casos se utiliza la terapia neo-adyuvante, quimioterapia previa a la cirugía; sin embargo, la falta de marcadores de diagnóstico y los síntomas asociados con otras enfermedades pulmonares, hacen difícil la detección temprana y más del 70% de los casos son detectados en etapas tardías impidiendo la resección quirúrgica y tratamientos curativos [47].

Cuando los pacientes son candidatos a quimioterapia existen esquemas asignados de primera y de segunda línea, los fármacos de primera línea más utilizados en la clínica para el tratamiento de cáncer pulmonar son los derivados del platino (cisplatino, carboplatino, etc.), durante décadas, el cisplatino se ha utilizado como el fármaco de primera línea para el tratamiento

de cáncer de pulmón avanzado y metastásico [48]. Sin embargo, el pronóstico para los pacientes con cáncer de pulmón avanzado sigue siendo pobre, con una mediana de supervivencia de 8-11 meses, una tasa de supervivencia a un año de 30-45%, y una supervivencia a 5 años <5% [49]. Un ciclo de cisplatino por lo general dura entre 3 y 4 semanas, el tratamiento usual es de 4 a 6 ciclos después de este período se evalúa la respuesta al fármaco, si la masa tumoral no reduce su tamaño a pesar de haber terminado los ciclos se habla de una posible resistencia al fármaco [50]. La resistencia adquirida después de la exposición prolongada al cisplatino se considera como una de las principales razones para el fracaso de la quimioterapia, por lo que la combinación de distintos fármacos en la clínica oncológica pretende disminuir esta resistencia, los fármacos utilizados son:

-Paclitaxel: Utilizado para el tratamiento de cáncer pulmonar, es uno de los fármacos que tienen como blanco el citoesqueleto, en específico la tubulina, pues se une a la subunidad beta estabilizando el microtúbulo polarizado, no permitiendo su despolimerización, bloqueando la mitosis e induciendo apoptosis o bien llevando el ciclo celular a fase G₀, en aquellos pacientes con enfermedad pulmonar intersticial el uso de paclitaxel mas carboplatino aumenta la seguridad y efectividad en pacientes con NSCLC, disminuyendo así los efectos secundarios [51].

-Doxorrubicina: Utilizado para el tratamiento de distintas neoplasias sólidas como las pulmonares, antibiótico de la familia de las antraciclinas, posee una estructura muy similar a la daunomicina, es un intercalante del DNA, el cual inhibe la biosíntesis de ácidos nucleicos, estabiliza la topoisomerasa II evitando que se libere la doble hélice y así deteniendo el proceso de replicación, induciendo la muerte celular, la principal desventaja del uso de la doxorrubicina es la toxicidad acumulativa que conduce a una insuficiencia cardiaca, en el tratamiento del NSCLC provee una respuesta entre el 30% y 50%, en combinación con Acacetin un flavonoide incrementa la citotoxicidad en cáncer pulmonar [52].

-Etopósido: Fármaco utilizado en el tratamiento de neoplasias derivado de la planta podofilo (*Podophyllum notatum*) es una podofilina la cual inhibe la acción de la topoisomerasa II, evitando la condensación correcta de los cromosomas, arretando el ciclo celular en fase G₀, si bien la combinación de etopósido con cisplatino aumenta la respuesta en un 52% en SCLC, en un meta análisis realizado con 9 estudios y un total de 2317 pacientes se evaluaron los efectos adversos de las combinaciones etopósido (E) con cisplatino (P), carboplatino (C) e irinotecán (I), resultando que la combinación EC muestra la mayor toxicidad hematológica, mientras que la combinación IP tiene una menor incidencia en la toxicidad [53].

La combinación de distintos fármacos prevé disminuir los efectos adversos y tóxicos que tiene el cisplatino sobre tejidos adyacentes clínicamente sanos, reducir la resistencia oncológica y/o potenciar el efecto citotóxico en células neoplásicas [46,54]. Ejemplo de estas combinaciones son:

Esquemas de tratamientos con Carboplatino-Paclitaxel combinado con Bevacizumab ha tenido una tasa de respuesta del 76%, aumentando la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global de 8.4 meses y 22.2 meses respectivamente [55].

La combinación de Cisplatino-etopósido se encuentra en un estudio de fase I de SCLC, los 20 pacientes ingresados al estudio presentaron efectos secundarios la tasa de respuesta mejoró en un 52% [56].

Para mejorar la calidad de vida de los pacientes con neoplasias pulmonares y disminuir la resistencia oncológica desarrollada por la exposición de estos fármacos se han intentado con pobres resultados, nuevos esquemas terapéuticos basados en la modificación de las dosis y combinaciones de fármacos oncológicos, sin embargo no se ha tenido resultados satisfactorios [57]. Existen otros esquemas de tratamiento o terapia dirigida, la cual se basa en bloquear distintas vías de señalización, una de las terapias mayormente utilizadas en la clínica oncológica, son los inhibidores de los dominios de Tirosina Kinasa (TKIs) del Receptor del Factor de Crecimiento Epitelial (EGFR), como Gefitinib y Erlotinib de primera generación y Afatinib de segunda generación [58], sin embargo, se ha demostrado que la exposición prolongada a estos TKI's alrededor de 10-14 meses induce la mutación *de novo* en el exon 20 Thr790Met (T790M) la cual es responsable del 60% de los casos de resistencia, fármacos de tercera generación como el Osimertinib se han utilizado en la clínica en aquellos pacientes que tienen la mutación T790M [59] derivada de la exposición a fármacos de primera y segunda generación de TKI's, sin embargo la mutación Cys797Ser (C797S) en el exon 20 es la mutación mas conocida que induce resistencia a Osimertinib [60].

1.3 Mecanismos de resistencia al tratamiento fármaco-oncológico

La quimiorresistencia es la capacidad celular de sobrevivir a retos farmacológicos, en el que están involucrados múltiples procesos moleculares, farmacocinéticos y farmacodinámicos propios de las células neoplásicas [61], este fenómeno ha sido analizado y descrito desde las primeras aproximaciones con fármacos antineoplásicos para el tratamiento del cáncer [62].

Los mecanismos de resistencia a fármacos se enfocan a la prevención de la muerte y proliferación de células tumorales, así como el crecimiento de tumores pulmonares, lo anterior explicado mediante el aumento de las tasas de eflujo de fármacos, reparación de daño en el DNA, alteraciones en el microambiente tumoral y en metabolismo de fármacos, así como la inhibición de la muerte celular [63–65].

-Eflujo de fármacos: Constituye el principal mecanismo de resistencia, este actúa inhibiendo la acción de los fármacos sobre su blanco, el eflujo puede ser modulado por distintas proteínas transportadoras de membrana, las cuales regulan el paso de los fármacos al exterior celular, dentro de estas destacan las bomba de eflujo P-glicoproteína (P-gp), bombas de ATP entre otras [66].

-Reparación del daño al DNA: El daño al DNA por quimioterapia puede ser por un mecanismo directo por fármacos a base de platino o como mecanismo indirecto por inhibidores de la topoisomerasa, en ambos casos conduciendo a la muerte celular o la senescencia. La reparación del daño en el DNA y la prevención de la muerte celular inducen el arresto del ciclo celular, lo que permite reparar el daño. En cáncer, el arresto del ciclo celular para la reparación del daño al DNA se ve interrumpida por mutaciones o pérdida de función en genes supresores de tumores como p53. Al menos una vía de reparación del daño al DNA es a menudo desregulada en cáncer [67].

-Microambiente tumoral y el metabolismo de los fármacos: El mantenimiento del microambiente está involucrado en los procesos de estrés oxidativo, la resistencia modula mecanismos metabólicos, energéticos y estromales [68,69].

-Las mutaciones e inestabilidad cromosómica: Las mutaciones pueden cambiar el efecto del fármaco terapéutico teniendo una distinta respuesta en proteínas río arriba o abajo del blanco específico, incluso en la misma vía o en vías paralelas de señalización, lo cual resulta en la activación de la proliferación o la inhibición de la muerte celular [70,71], dentro de estas se han abordado las mutaciones en oncogenes de vías de señalización como los son K-RAS, ERK, mTOR, etc. [72],

La resistencia a fármacos de primera línea, como lo es el cisplatino o derivados del platino se observa en la mayoría de los pacientes con cáncer pulmonar, a pesar de todos los esfuerzos sumados por comprender cuales son los mecanismos involucrados en la resistencia adquirida al cisplatino, hasta la fecha no están totalmente comprendidos. Los mecanismos sugeridos son la disminución de la absorción del fármaco, el eflujo del fármaco, aumento en la reparación del daño al DNA, inactivación de vías apoptóticas [73,74]. El avance en la identificación de genes mediante la secuenciación ha permitido en este año revelar el transcriptoma de la línea celular A549 resistente a Cisplatino respecto a la parental, identificando 1,214 genes expresados diferencialmente, 656 a la alza y 558 a la baja, tras el análisis de datos se encontró en los genes pertenecientes a la vía PI3K / AKT, regulación del citoesqueleto, activación de cinasas y adhesiones focales en A549, con lo cual se pretende disminuir la resistencia a este tipo de fármacos [75].

La terapia personalizada no es la excepción, esta se basa en personalizar un tratamiento en tumores con un fenotipo específico, y mutaciones genéticas que

impulsan la supervivencia y la progresión tumoral, la mayoría de los pacientes que son candidatos a este tipo de terapia presentan un tipo de resistencia dentro del primer año, los inhibidores de la tirosina cinasa, terapia endocrina / hormonal, entre otros son los que presentan mayor resistencia en cáncer de pulmón de células no pequeñas, próstata, mama y melanoma [76].

Se han identificado mutaciones en EGFR en pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas, los cuales tienen una respuesta a inhibidores de EGFR, a pesar de la respuesta a estos inhibidores, más del 90% de los pacientes tiene una recaída, se desconoce cual es el mecanismo de resistencia a este tipo de fármacos, los pacientes con EGFR mutante tienen buena respuesta a gefitinib o erlotinib, sin embargo hay ocasiones que incluso después de la remisión completa estos pacientes presenten recaída, tras el análisis de la secuencia de DNA del gen EGFR en la nueva masa tumoral, presenta una segunda mutación un cambio de aminoácidos de treonina a metionina en la posición 790 (T790M) de la proteína EGFR, los avances en el modelamiento estructural y bioquímico mostraron que esta segunda mutación conlleva a la resistencia [70,77].

2. ANTECEDENTES

2.1 Genómica del cáncer pulmonar

La suma de mutaciones azarosas a lo largo del desarrollo neoplásico, logra trazar una línea génica conservada de activación sobre oncogenes y desactivación en genes supresores de tumor en el tejido neoplásico pulmonar. Algunos de ellos, comprenden la amplificación y aumento en el número de copias (CNV) de los oncogenes MYC en tumores SCLC, mutaciones puntuales en regiones que codifican para el oncogén RAS en NSCLC en particular del tipo adenocarcinoma ha sido el interés en las últimas décadas para el estudio a nivel genómico las neoplasias pulmonares [78].

El avance en técnicas genómicas permiten ampliar el estudio de este tipo de neoplasias, una de ellas la hibridación genómica comparativa (CGH), ha sido utilizada para la identificación de alteraciones genéticas tempranas en la progresión neoplásica pulmonar en tumores tipo adenocarcinoma, tales como aumento en el CNV de genes localizados en el locus 7q21.3-q22, donde se encuentran localizados *SERPINE1* involucrado en la migración celular, *GNB2* que promueve la progresión y metástasis de neoplasias de NSCLC; *STI3* involucrado en la progresión neoplásica entre otros. En todos ellos, se ha propuesto un aumento de CNV en pacientes con cáncer pulmonar los cuales tienen mal pronóstico y pobre supervivencia [79].

Mediante la utilización de plataformas de alta resolución y análisis masivo del genoma como la secuenciación masiva del DNA y microarreglos basados en DNA, se ha logrado identificar mediante el estudio de 200 muestras de distintas neoplasias, entre ellas carcinomas pulmonares de células no-pequeñas, aberraciones estructurales en el cromosoma 3, entre ellas inserciones y alto

nivel de metilación en diversos genes entre otros: *MINT24*, *BHLHB2*, *RPL15*, *RARbeta1*, *ITGA9*, *RBSP3*, *BVS*, *ZIC4*, sugiriendo su participación en el comportamiento biológico del tumor. La metilación de estos loci genéticos fue confirmada mediante PCR específica de metilación y secuenciación por bisulfito de sodio [80], sugiriendo su probable papel como nuevos marcadores regulados epigenéticamente asociados al diagnóstico y/o tratamiento de carcinomas pulmonares.

2.2 Epigenómica y epigenética del cáncer pulmonar

La epigenética (del griego *epi*, *en* o *sobre*- genética) es la suma de reacciones químicas y modificaciones pos-traduccionales que modifican la actividad del DNA sin alterar la secuencia primaria. Las marcas epigenéticas pueden ser heredables, una de las características principales es la regulación reversible e inducible, es decir las marcas pueden modificarse dependiendo de las necesidades celulares. [81]

Las modificaciones epigenéticas más estudiadas en cáncer pulmonar son:

-La metilación del DNA: la adición de un grupo metilo en el carbono 5 de la citosina, esta reacción es catalizada por tres principales DNA metiltransferasas (DNMTs) responsable de la metilación de *nov*o durante el desarrollo (DNMT3A y DNMT3B), o el mantenimiento de la metilación después de la replicación del DNA (DNMT1 asistida por DNMT3A y DNMT3B) [82], a la fecha se ha desarrollado un panel para la detección y pronóstico de NSCLC que consta del perfil de metilación de DNA de 6 genes (*CDO1*, *HOXA9*, *AJAP1*, *PTGDR*, *UNCX*, y *MARCH11*), este set de genes fue detectado en el 92.2% (83/90) de neoplasias pulmonares en un estadio IA, en muestras de suero se obtuvo una detección del 72.1% (31/41), este resultado fue similar en muestras de efusión pleural, siendo así que la metilación de regiones promotoras pueden ser utilizadas como bio-marcadores de detección temprana [83].

-Cambio en el código de histonas: La regulación mediada por el intercambio de marcas de histonas ha sido ampliamente estudiada, las distintas modificaciones entre las que destacan la metilación y la acetilación en los residuos de lisinas promueven la apertura y cierre de la cromatina, existen distintas enzimas encargadas de modular el perfil epigenético, las acetiltransferasa de histonas (HAT), las desmetilasas de histonas (HDAC), las metiltransferasa de histonas (HMT), son algunas de las enzimas encargadas de la regulación epigenética mediada por código de histonas [84], se sabe que distintos agentes externos como el humo de cigarro afecta los perfiles de expresión de estas enzimas, un estudio realizado en pacientes fumadoras, no fumadoras y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), identificó un incremento en las HAT, HMT y proteínas con dominio SET, y una desregulación en HDAC2, HDAC4, HAT1, PRMT1, y AURKB, así como una

inducción de H3K56ac y H4K12ac inducidas por humo de cigarro, afectando múltiples vías de señalización en respuesta al humo de cigarro [85].

2.2.1 Metilación del DNA Genómico

La metilación del DNA es la modificación epigenética más estudiada y se restringe a la región del DNA llamado dinucleótidos CpG, es decir, la citosina seguida por un residuo de guanina. Se ha demostrado que la hipermetilación del DNA es responsable del silenciamiento génico, promoviendo la iniciación y el desarrollo de la carcinogénesis [86].

Recientemente se ha determinado que la metilación del DNA del gen *MLH1* correlaciona con la respuesta clínica al tratamiento con cisplatino después de la resección quirúrgica en NSCLC, por lo que la metilación de *MLH1* puede convertirse en un potencial biomarcador de terapia individualizada para pacientes con NSCLC [87].

La hipometilación global de las secuencias de DNA y la hipermetilación focal en CpGs se pueden determinar en las primeras etapas de la tumorigénesis, la metilación constituye un enfoque atractivo para la detección temprana de cáncer. Distintos estudios han reportado el potencial de evaluar la metilación en DNA circulante para el diagnóstico de cáncer de pulmón. En uno de ellos se encontró que en diversas regiones promotoras de genes tienen un perfil de metilación diferencial entre pacientes con cáncer de pulmón y controles, en los que destaca *SHOX2*, *DCLK1*, *SEPT9* y receptor de ácido retinoico B2 (*RARB2*) [88–91].

La metilación del DNA puede ser indicativo de la agresividad tumoral y del riesgo de recurrencia después de la resección quirúrgica y/o quimioterapia. La importancia pronóstica de la metilación del DNA circulante a nivel promotor se ha descrito en varios estudios, aunque la mayoría de ellos evalúan los cánceres en estadio tardío. La detección en la metilación de los genes *BRMS1* y *SOX17* en pacientes con NSCLC inoperable, tiene un impacto negativo sobre la supervivencia. Por el contrario, la metilación de *SFN* correlaciona con un menor riesgo de muerte, además de su valor de diagnóstico, la metilación de *DCLK1* también se asoció con una menor supervivencia [92,93].

La predicción y el seguimiento de la respuesta al tratamiento, es de suma importancia para los oncólogos, la detección del DNA circulante metilado refleja la carga tumoral para el seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia, ejemplo de ello es la alta metilación en los promotores de *APC* y *RASSF1A* dentro de las 24 horas después de la terapia con cisplatino consistente con la muerte celular debido a la quimioterapia, la metilación de *SHOX2*, *RASSF1A* y *RARB2* ha demostrado potencial para monitorear la recurrencia de la enfermedad después de la cirugía y la quimioterapia. También se ha investigado el valor del DNA circulante metilado para predecir la respuesta al tratamiento. Los pacientes sin metilación en el promotor de *CHFR* tiene mayor supervivencia al recibir inhibidores de la tirosina cinasa, como

2.2.2 Alteraciones post-traduccionales del código de histonas en cáncer pulmonar

Otro aspecto evaluado son las modificaciones post-traduccionales en las regiones promotoras de distintos ligandos de quimocinas (CXCL1, 2, 8) y sus receptores (CXCR1/2) en donde se observa desregulación en NSCLC en comparación con tejido normal con excepción de CXCL3. CXCL8 y CXCR1/2 que resultan ser epigenéticamente regulada por modificaciones de las histonas después de la traducción [100].

Existen moléculas responsables del silenciamiento inadecuado así como la sobre-activación de genes, lo cual repercute en el acceso de la maquinaria transcripcional a sus genes blanco, a través de modificaciones químicas tanto del DNA, como secuencias de aminoácidos de histonas y proteínas remodeladoras de la cromatina, acetil-transferasa de histonas (HAT), desacetilasas de histonas (HDAC), metil-transferasa de histonas (HMTs), así como desmetilasas de histonas. Alteraciones en los procesos de regulación de tales enzimas conllevan al mal funcionamiento celular y eventualmente hacia la progresión neoplásica, lo cual hace importante el estudio de los mecanismos de regulación epigenética en cáncer pulmonar [101].

La terapia epigenética basada en inhibidores de remodeladores de la cromatina se ha enfocado en la metilación de la histona 3 en la lisina 27, H3K27, regulada por EZH2 que es la subunidad catalítica del complejo represivo policomb 2 (PRC2). La trimetilación de H3K27 por EZH2 conduce al silenciamiento de genes por PRC2 los cuales están implicados en la diferenciación de células madre y el desarrollo embrionario. EZH2 está sobre expresado en una variedad de neoplasias, incluyendo NSCLC. 3-Deazaneplanocin-A (DZNep) es un inhibidor de EZH2 que actúa como represor disminuyendo los niveles de trimetilación de H3K27 (H3K27me₃), se ha observado que la terapia epigenética con 3-deazaneplanocina-A inhibe el crecimiento de cáncer de mama y NSCLC [102].

En la figura 2 se muestra la regulación transcripcional mediada por un perfil genético de código de histonas, en el panel A) en la Histona 3 los residuos de lisina 4 y 27 se encuentran trimetilados y acetilados respectivamente, esta configuración epigenética, permite el desensamble nucleosomal y exponer la región promotora, para que los factores de transcripción puedan unirse a la al DNA y activar la transcripción. En el panel B) en la histona 3 los residuos de lisina 9 y 27 se encuentran trimetilados en ambos casos, esto impide el desensamble nucleosomal y que la cromatina se relaje impidiendo la unión de los factores de transcripción con el DNA, reprimiendo la actividad transcripcional. El balance epigenético se encuentra en constante movimiento, y estos cambios permiten una reprogramación epigenética.

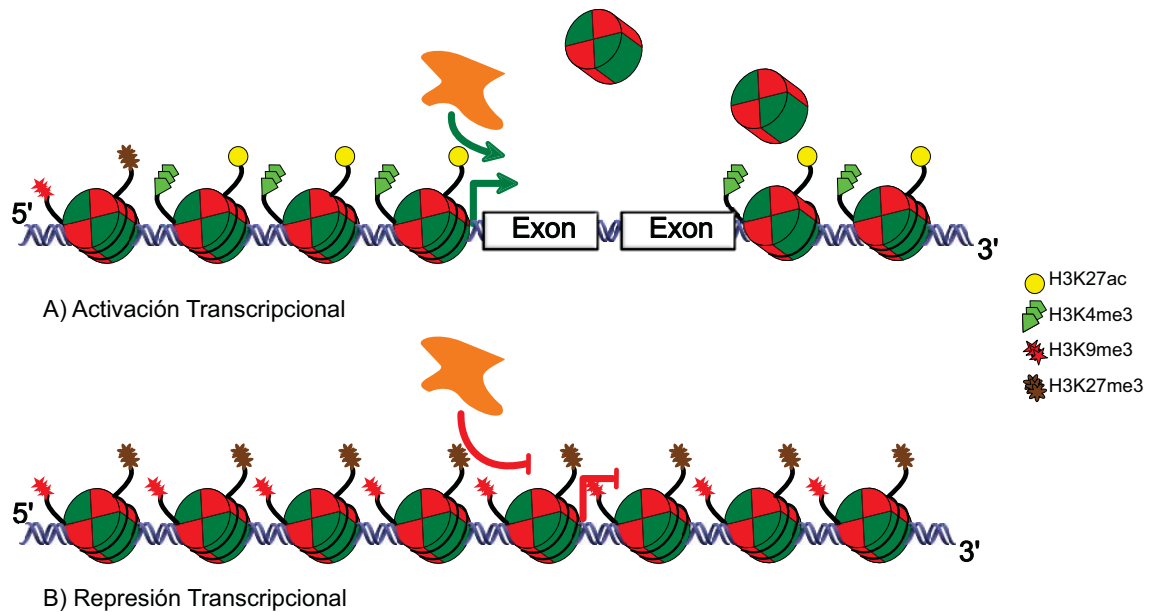


Figura 2 Regulación epigenética (código de histonas)

2.3 Aberraciones genético-epigenéticas de los Genes Homeobox (HOX)

Algunos de los mecanismos que se ven afectados en cáncer, afectan la expresión de ciertos genes que participan en el control del desarrollo embrionario, reflejo de un proceso de des-diferenciación celular en cáncer. Algunos de estos genes, son miembros del grupo de genes HOX (*Homeobox related genes*), los cuales en su mayoría permanecen apagados en etapa adulta, y elevan su expresión en cáncer, y el cáncer pulmonar no es la excepción [103].

Los genes Homeobox codifican para una familia de factores de transcripción que juegan un papel decisivo en la embriogénesis y la diferenciación celular. La familia de proteínas Homeobox se caracterizan por que todos sus miembros poseen un dominio de unión a proteína (hélice-vuelta-hélice) llamado homeodominio, aparte de este homeodominio los miembros de esta familia comparten un sitio de unión a DNA muy conservado de 60 aminoácidos [104].

Los genes HOX han sido estudiados en sus diferentes grupos: *HOXA* ubicados en el cromosoma 7, los genes *HOXB* ubicados en el cromosoma 17, los genes *HOXC* ubicados en el cromosoma 12 y los genes *HOXD* ubicados en el cromosoma 2 [105,106]. Mientras que otras subfamilias de genes relacionados a Homeobox se han descrito recientemente:

PRX (*Paired-related Homeobox*) que es necesario para el desarrollo de la arteria pulmonar. Esta función se logra a través de trans-activación de *PRX1* del promotor de Tenascina-C (TN-C), una glicoproteína de la matriz extracelular [107]. La sobre-regulación de *PRX1* en el cáncer de pulmón se ha propuesto como posible blanco terapéutico, así como a nivel pronóstico [108].

PROX (*Prospero-related Homeobox*) se expresa en un subconjunto de células endoteliales que conforman los vasos linfáticos. Se ha demostrado mediante la deficiencia de PROX que en ratones PROX1^{-/-}, los embriones no desarrollan un sistema linfático normal, a pesar de que están implicados en la vasculogénesis y angiogénesis [107]. También se ha observado en distintas neoplasias entre ellas, cáncer de colon, mama, melanomas y cáncer pulmonar [109].

HHEX (*Hematopoietically expressed Homeobox*) involucrado en la diferenciación de hemangioblastos en células endoteliales y hematopoyéticas. La expresión de HHEX se encuentra implicada en la formación de angioblastos y desarrollo de la red vascular, por lo que se ha propuesto como un marcador temprano de células precursoras endoteliales [107]. HHEX muestra deslocalización de la proteína en carcinomas de mama, pues en tejido normal se localiza en núcleo y citoplasma, mientras que en el tumor se observa reducción en la fracción nuclear [110].

MEOX (*Mesenchyme Homeobox*) regulador clave de la función de las células vasculares. En células vasculares de músculo liso (VSMCs) su expresión se limita a las células senescentes y por esta razón también es conocido como *growth arrest-specific Homeobox* (GAX). La expresión de MEOX2 esta desregulada en respuesta a mitógenos *in vitro* y en lesiones de células endoteliales *in vivo* [107]. Recientemente se ha observado su sobre-expresión en tejido pulmonar fetal y tejido neoplásico pulmonar comparado con tejido pulmonar normal y adyacente a las neoplasias pulmonares [111].

2.4 Aberraciones genético-epigenéticas del Factor Transcripcional Mesenchyme Homeobox 2 (MEOX2)

La regulación de MEOX2 es a través de mecanismos epigenéticos post-transcripcionales, como los miRNAs. Las evidencias indican que miR-221 induce la sobreexpresión de MEOX2, de manera indirecta desregulando transcripcionalmente su inhibidor. El inhibidor natural de MEOX2, es codificado por el gen llamado *SIP1/ZEB2*, conocido como un miembro (δ EF-1) de la familia que pertenece a los factores nucleares llamados dedos de zinc. Se sabe que ZEB2 actúa principalmente como un represor transcripcional, además de identificar y confirmar múltiples sitios de unión ZEB2 capaces de bloquear la transcripción de MEOX2 [112]. En el mismo sentido mediante microarreglos de alta densidad se encontró un aumento en CNV en las regiones citogenéticas 7p21.3, 7p21.1 en muestras de pacientes con cáncer pulmonar, este aumento solo se observaba en neoplasias con un estadio IIIB y IV, no así en el tejido adyacente a la región tumoral. Los factores de transcripción con aumento en CNV (MEOX2 y TWIST1) fueron evaluados a nivel de mRNA y perfil epigenético, encontrando que para MEOX2 la sobreexpresión del mRNA está asociado a un perfil bajo de H3K27me3 y viceversa, los pacientes con cáncer pulmonar que tienen sobreexpresión de MEOX2 tienen supervivencia de 10

meses, mientras que aquellos pacientes con baja expresión la supervivencia global es mayor a los 90 meses [113].

2.5 Blancos génicos del factor transcripcional MEOX2 en cáncer pulmonar

A la fecha son escasos los estudios enfocados al estudio e identificación de los blancos génicos regulados por MEOX2 en cáncer pulmonar.

Las escasas evidencias sobre MEOX2 como regulador transcripcional, indican la activación en forma directa sobre el promotor del gen supresor de tumores p16 *INK4a*. Se ha observado la pérdida de la función de este gen en diversos tipos de neoplasias [114,115]. Adicionalmente, se sabe que *INK4a* posee un papel clave en el control del ciclo celular inhibiendo de forma directa a las cinasas dependientes de ciclinas 4 y 6; previniendo la interacción con ciclinas tipo E y D. De esta forma *INK4a* impide que la proteína RB sea fosforilada a través del heterodímero de Ciclina E/D con CDK 4/6. Es decir en ausencia de fosforilación a través de CDK4/6, sobre RB, esta sigue unida a E2F1, lo que impide que este factor sea activado, dando una señal decisiva en la transición de la fase G0/G1 hacia la fase S del ciclo celular, impidiendo la replicación celular, disminuyendo así la progresión del ciclo celular en cáncer. [116].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dada la importancia de MEOX2 y la evidencia de su contribución a la patogénesis del cáncer pulmonar es necesario identificar las interacciones génicas blanco y su asociación funcional como factor transcripcional en el desarrollo embrionario y cáncer. El presente trabajo propone identificar y describir las posibles interacciones génicas blanco, así como validar de forma cuantitativa algunos de estos blancos génicos regulados transcripcional y epigenéticamente. Basado en lo anterior, es posible evaluar y proponer su posible relevancia oncológica como potencial marcador temprano y/o posible blanco terapéutico en cáncer pulmonar.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el cáncer pulmonar es la primera causa de muerte por neoplasias malignas a nivel mundial, y el subtipo histológico NSCLC tiene una incidencia del 80% de todos los casos por neoplasias pulmonares, esto debido a la falla en el tratamiento y/o resistencia al cisplatino como fármaco de primera línea, es importante identificar las alteraciones genéticas y/o epigenéticas que conllevan a la génesis y progresión de este tipo de neoplasias, si bien las mutaciones han contribuido al entendimiento de la patogénesis pulmonar no lo han podido explicar del todo, sin embargo los blancos génicos de los factores de transcripción y las modificaciones postraduccionales como el código de histonas han sido estudiadas recientemente, el aumento en los niveles de expresión de MEOX2 acompañado de código de histonas bajo en H3K27me3 correlaciona con poca supervivencia en pacientes con cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma, hasta la fecha se desconocen los blancos génicos de dicho factor de transcripción, por lo que el presente trabajo se enfoca en determinar los blancos génicos de MEOX2 y su reprogramación epigenética derivada de la exposición a cisplatino y su impacto en la supervivencia global en pacientes con NSCLC.

5. HIPÓTESIS

MEOX2 regula los niveles de expresión de sus blancos génicos, mediante el posicionamiento de RNA POL II y un código de histonas, que se reprograma tras el reto farmacológico de cisplatino. El silenciamiento a su vez aumenta la capacidad de migración y formación de colonias de líneas celulares de cáncer pulmonar. Por otro lado MEOX2 y sus blancos génicos se coexpresan en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma, e impacta en la supervivencia global con estatus de EGFR mutado y no mutado.

6. OBJETIVOS

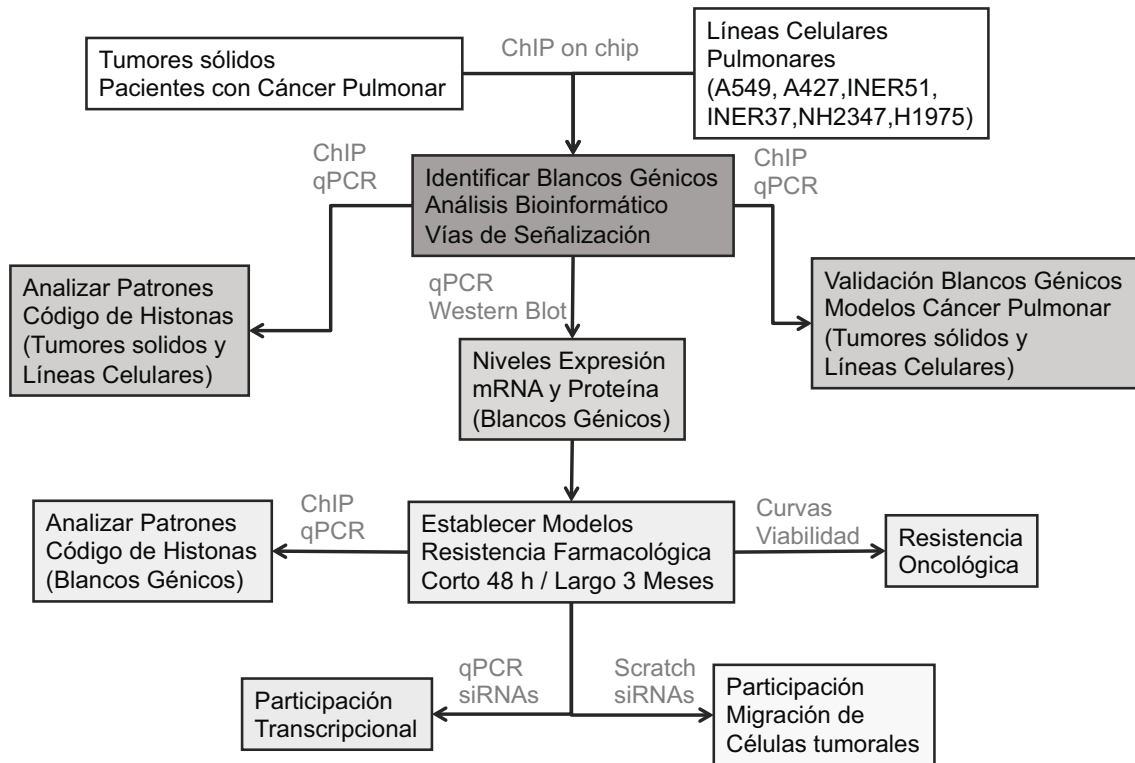
6.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los blancos génicos de MEOX2 involucrados en la resistencia al tratamiento oncológico mediado por cisplatino, mediante el análisis funcional del epigenoma en pacientes y modelos experimentales de cáncer pulmonar de células no pequeñas.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar los blancos génicos del factor transcripcional MEOX2, mediante análisis del epigenoma y la validación cuantitativa de secuencias promotoras derivadas de carcinomas pulmonares de pacientes y líneas celulares de cáncer pulmonar.
2. Determinar los niveles de expresión de mRNA de los blancos génicos de MEOX2, comparando entre origen étnico las líneas celulares de origen caucásico (A549, A427) y de origen mestizo mexicano (INER37 e INER51).
3. Analizar la interacción de MEOX2, RNA POL II y código de histonas (H3K4me3, H3K9me3, H3K27ac y H3K27me3) en secuencias promotoras de los blancos génicos de MEOX2, en líneas celulares que presenten mayores niveles de expresión.
4. Determinar si el tratamiento con cisplatino induce un cambio en el código de histonas (H3K4me3, H3K9me3, H3K27ac y H3K27me3) en las secuencias promotoras de los blancos génicos de MEOX2.
5. Determinar si MEOX2 regula la expresión de sus blancos génicos en ausencia y presencia de cisplatino en las líneas con estatus de EGFR no mutado (A549, A427) y EGFR mutado (H1975).
6. Analizar si el silenciamiento de MEOX2 altera la migración y la formación de colonias en las líneas con estatus de EGFR no mutado (A549, NH2347) y EGFR mutado (H1975).
7. Evaluar si existe co-expresión de MEOX2 y sus blancos génicos en muestras de pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas.
8. Analizar la supervivencia global de MEOX2 y sus blancos génicos en pacientes con cáncer pulmonar con un estatus de EGFR mutado y no mutado.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Esquema 1: Estrategia experimental. Pasos utilizados para la realización del proyecto en una línea de tiempo establecida por los objetivos particulares.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Establecimiento y mantenimiento de cultivos celulares

Fueron empleadas 6 líneas celulares de tipo adenocarcinoma para la estandarización de técnicas y desarrollo del proyecto de doctorado.

Las líneas celulares INER51 e INER37 fueron aisladas de pacientes mexicanos bajo atención médica en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratoria (INER) [117,118]. Por otro lado las líneas A549, A427, NH2347 y H1975 de origen caucásico generadas y registradas comercialmente por American Type Culture Collection (ATCC).

Empleando para ello las siguientes condiciones de cultivo, mediante el uso de cajas T-75, T-25 y placas de 6 y 96 pozos, a 37°C, 5% de CO₂ y humedad relativa de 5% en medio RPMI-1640, reconstituido a partir de polvo de la marca biowest (USA) añadiendo 2 g. de Bicarbonato de Sodio de la marca GIBCO® (Auckland, NZ) y pH ajustado a 7.4 mediante HCl 1N, a continuación se muestran las proporciones y concentraciones empleadas para el uso del medio de cultivo:

Cuadro 2 Medio de cultivo. Preparación de 500 mL para uso en cultivos de líneas celulares y muestras de tejido en fresco

Componente	Concentración	Porcentaje %	Volumen en mL.
Medio RPMI-1640		85.4	425
Suero Fetal bovino		10	50
Penicilina/Streptomina	25 mg	0.1	2.5
L-Glutamina 100 mM	2 mM	1	5
Piruvato Sodio 7.5%	1 mM	1	5
Hepes Buffer 1M	25 mM	2.5	12.5

Los ensayos fueron realizados a 48 horas, se sembraron las células y se dejaron adherir por 12 horas y se agregó fármaco. Para los tratamientos monofármaco (Cisplatino 8 μ M y Doxorubicina 100 nM) se dejaron 48 horas sin cambiar el medio de cultivo o fármaco, para los tratamientos combinados (Doxo-Cis y Cis-Doxo) a las 24 horas se retiró el fármaco anterior, y posteriormente se aplicó fármaco y medio de cultivo nuevo. Se inició con una densidad celular de 40,000 células por cm³ dependiendo del experimento a realizar se sembraron en cajas T-75 para los ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina, en cajas T-25 para los ensayos de expresión, en placas de 6 pozos para extracción de proteínas y silenciamiento genético mediante el uso de siRNAs y placas de 96 pozos para ensayos de viabilidad celular mediante MTT. Los ensayos fueron realizados por triplicado, para así determinar por análisis estadístico una diferencia significativa.

8.2 Esquemas de tratamientos con fármacos anti-neoplásicos

Se trataron bajo distintos estímulos farmacológicos:

- Control
- Cisplatino 8 μ M de la marca SIGMA (cat No. 479306-1G)
- Doxorubicina 100 nM de la marca SIGMA (cat No. D1515-10 MG)
- Combinación 1 (Doxorubicina 100 nM + Cisplatino 8 μ M)
- Combinación 2 (Cisplatino 8 μ M + Doxorubicina 100 nM)

Cuadro 3. Esquema de tratamiento fármaco-oncológico.

		Duración del Tratamiento					
Horas		0	12	0	24	24	48
Condiciones	Control						
	Cis 8						
	Doxo 100						
	Doxo-Cis						
	Cis-Doxo						
	RPMI-1640				Cisplatino 8 μ M		Doxorubicina 100 nM

Se realizaron cultivos por periodos de 48 horas. Posteriormente, fueron cosechadas con Tripsina-EDTA 3x de la marca Biowest (México, USDA Approved), se agregó 1 mL de tripsina e incubó 1 min a 37 °C para desprender la población de células. Se calculó la viabilidad celular mediante el colorante vital de exclusión azul de tripano.

8.3 Establecimiento de líneas celulares quimio-resistentes

Se determinó por ensayos de MTT la dosis letal 50 (IC50 e IC25) de las células parentales, tras esto se incubaron durante 48 horas con la IC50 e IC25 correspondiente a cada línea, al terminó de las 48 horas se cambió con medio libre de fármaco por 48 horas, este modelo se estableció por 15 días y al término se realizó un nuevo ensayo de MTT para evaluar aquellas células tratadas con la IC50 e IC25 hayan adquirido una resistencia al cisplatino, teniendo una IC50 e IC25 superior a las células parentales.

8.4 Selección y procesamiento de muestras de tejido pulmonar derivado de pacientes

La obtención y selección de muestras se realizó bajo la estrecha colaboración con el departamento de cirugía del INER, obteniendo tanto muestra del tejido neoplásico, como tejido pulmonar histológicamente normal adyacente a la neoplasia, cuando era permitido.

Los tejidos tras una línea de transporte fue llevado al laboratorio en 25 mL., de medio RPMI 1640 libre de suero.

Mediante el uso de material quirúrgico estéril, el tejido tumoral y tejido histológicamente normal fue procesado en medio de cultivo reconstituido con 10% de suero fetal bovino, posteriormente el tejido fue diseccionado en espejo (2 fragmentos simétricos) los cuales fueron destinados a diferentes métodos de análisis, un fragmento fue destinado para su fijación en el reactivo HOPE® para su posterior procesamiento en parafina, a fin de realizar su análisis histopatológico y confirmación de lesión neoplásica o libre de neoplasia.

El fragmento de tejido restante fue dividido en fragmentos pequeños y destinado para su procesamiento de purificación de cromatina o DNA, así como su almacenamiento en nitrógeno líquido mediante crioviales (marca Corning) con capacidad de 2.0 mL para su posterior uso.

8.5 Fragmentación de la cromatina

8.5.1 Entrecruzamiento de la cromatina de líneas celulares y muestras de tejido pulmonar para ensayos de ChIP

El tejido fresco o congelado en trozos pequeños (3 mm^3) fue pulverizado en mortero mediante el uso de nitrógeno líquido, después se transfirió a tubos de 15 mL al igual que los cultivos celulares confluentes, aproximadamente 3 millones de células se lavaron con 10 mL de PBS 1X frío, inmediatamente las células y el tejido fueron incubados con formaldehído a concentración final del 1% (270 μL) de formaldehído se incubó 15 min. Con movimiento a temperatura ambiente.

Para detener la reacción de entrecruzamiento se añadió glicina de la marca Merck (Darmstadt, Alemania) a concentración final de 0.125 M. e incubó con movimiento a temperatura ambiente durante 10 min.

Las células fueron lavadas con 10 mL de PBS frío (2 veces), se agregó 5 mL de PBS y se rasparon con un gendarme estéril (en el caso de las células adherentes) y se transfirieron a tubos de 15 mL, las muestras de tejido fresco y células fueron centrifugadas en una centrifugadora de la marca eppendorf (modelo 5804 Westbury, NY, U.S.A) a 2500 rpm, 4 ° C durante 15 min.

Se tomó el sobrenadante y se lavó la pastilla celular con 10 mL de PBS 1X frío. Las células y el tejido se resuspendieron en 800 μL de buffer de lisis con inhibidores de proteasas e incubaron 45 min en hielo, posterior a ello, se separó una alícuota de 50 μL de cromatina no fragmentada, para la cuantificación del DNA asociado a la cromatina.

Cuadro 4 Buffer de lisis.

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

Inhibidor de proteasas Complete Mini de la marca Roche® (Indianápolis, IN, U.S.A) 1 pastilla por cada 10 mL de buffer de lisis, aforado a 25 mL con agua destilada estéril.

8.5.2 Fragmentación de la cromatina a partir de las líneas celulares y muestras de tejido pulmonar en fresco

Se utilizó un sonicador de la marca ultrasonic processor (Modelo GE 601, USA) bajo los siguientes parámetros de fragmentación:

Cuadro 5. Condiciones de fragmentación de la cromatina

Amplitud	Watts	Nº de pulsos	Tiempo del pulso s
60	95-100	10	20

Todo el tiempo de sonicación las muestras se mantuvieron en hielo, después de los ciclos de fragmentación las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm., durante 15 min a 4 °C, se generaron alícuotas del sobrenadante cuidando de no tocar el fondo del tubo con restos celulares, los cuales fueron desechados.

Fueron almacenadas alícuotas de 100 µL en ultra-congelador a -80 °C para su posterior uso, se purificó 1 alícuota de 50 µL de cromatina fragmentada y 1 alícuota de cromatina sin fragmentar por el método de fenol-cloroformo, para el análisis de integridad y cuantificación.

8.5.3 Purificación del DNA fragmentado por fenol-cloroformo

A partir de alícuotas previas de 50 µL c/u del DNA fragmentado y no fragmentado, se agregó 5 µL de proteinasa K (stock 0.02 mg/mL) de la marca Qiagen (Maryland, USA) e incubó a 65 °C por 1 hora en el termociclador, después se agregó 1 volumen de Fenol:Cloroformo de la marca Invitrogen (USA) se mezcló para su posterior incubación por 5 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm. a 4 °C por 5 min, se tomó la fase acuosa (fase superior) y se transfirió a un tubo nuevo.

Se agregó 2 volúmenes de isopropanol frío de la marca SIGMA (USA) y se dejó precipitar el DNA toda la noche a -80 °C.

Al término de la precipitación se centrifugó a 13,000 rpm a 4 °C por 45 min se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla de DNA 3 veces con 300 µL de etanol al 70% (grado biología molecular) de la marca SIGMA (Sheboygan Falls, WI, USA), al término se resuspendió en un volumen de 50 µL de agua libre de nucleasas y se procedió a la cuantificación.

8.6 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Se utilizó el kit de inmunoprecipitación EZ magna ChIP proteína G cat. 17-409 de la casa comercial Millipore siguiendo las indicaciones del proveedor mencionando las modificaciones a continuación: cada IP se realizó a partir de 12 µg de cromatina y dependiendo de la cuantificación se llevó a un volumen final de 450 µL (incluyendo cromatina y buffer de dilución) y agregó 2.25 µL de inhibidor de proteasas. Para cada muestra se incluyó el uso de anticuerpos anti-H3K27Ac (cat.ab4729, Lot.GR71158-2), anti-H3k27me3 (cat.ab6002, Lot.GR77445-3), anti-H3K4me3 (cat.ab8580, Lot.GR68224-1), anti-H3k9me3 (cat.ab8898, Lot.GR47224-2), anti-RNA Pol II CTD fosforilada (cat.ab5131, Lot.GR59740-1) de la marca Abcam, anti-MEOX2 (cat.sc-81971, Lot.C2714) de la marca SantaCruz Biotechnology y control negativo anti-IgG de ratón de la marca Millipore.

Por cada ensayo de inmunoprecipitación se agregó la concentración de 1 µg de anticuerpo más 20 µL de perlas magnéticas acopladas a proteína G, se incubó a 4 °C toda la noche con agitación-rotación empleando un mezclador *DYNAL*[®] *modelo 10111* (New Hyde Park, NY, USA) con velocidad aproximada de 35 rpm. Al término de la incubación las pastillas derivadas de perlas magnéticas acopladas a proteína G fueron aisladas del resto del sobrenadante mediante el uso de un magneto (12-tube magnet) de la marca QIAGEN (USA).

8.6.1 Lavado del complejo

El complejo (perlas-anticuerpo-cromatina) se lavó y resuspendió en 500 µL de cada una de las siguientes soluciones amortiguadoras (buffer) en frío usando el siguiente orden e incubando durante 5 minutos c/u, con agitación seguido del método de separación magnética: Buffer bajo en sales (Low salt immune complex); Buffer alto en sales (High salt immune complex); Buffer cloruro de litio (LiCl immune complex); Buffer TE. Todos parte del kit de la marca Millipore.

8.6.2 Elución del complejo y reversión del entrecruzamiento

A cada tubo, se agregó 100 µL buffer ChIP elución y 1 µL proteinasa K (stock 0.02 mg/mL) e incubaron a 62 °C durante 2 horas con agitación, para inactivar la proteinasa K, se incubó a 95 °C durante 10 minutos en baño seco, al terminar se dejó enfriar las muestras a temperatura ambiente aproximadamente 5 min, por último se separaron las perlas magnéticas mediante el uso del magneto, y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo.

8.6.3 Purificación del DNA-IP

A la solución previa de 100 µL de DNA Inmunoprecipitado (IP) fue añadido 500 µL de buffer de unión mezclando con agitación, esta solución se transfirió a la columna con tubo colector, para centrifugar durante 1 minuto a 13,000 rpm desechando la fase líquida, posteriormente se agregó 500 µL de buffer de lavado a la columna y centrifugó durante 1 minuto a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante y repitió este paso 2 veces más, la columna se colocó en un tubo nuevo y agregaron 25 µL de agua libre de nucleasas en la membrana de la columna e incubó por 5 min.

Por último, la columna fue centrifugada durante 1 minuto a 13,000 rpm desechando la columna y recuperando el DNA para su cuantificación.

8.6.4 Verificación del producto Inmunoprecipitado

Después de cuantificar se utilizaron 10 ng de DNA IP purificado y se llevó a un volumen de 10 µL para realizar PCR de punto final bajo las siguientes condiciones de reacción en un volumen final de 20 µL

Cuadro 6. Condiciones de PCR en tiempo final

REACTIVO (concentración)	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
MgCl ₂ 25 mM	1.2 µL	1.5 mM
Buffer PCR 10x	2.0 µL	1X
dNTP's Mix 2.0 mM	4.0 µL	0.4 mM
Control Primers	0.8 µL	10 µM
Taq polimerasa	0.2 µL	1.0 U
DNA	10 µL	10 ng
H ₂ O	1.8 µL	-----
Vol. total	20 µL	20 µL

Se utilizó un termociclador de la marca: Axigen, (modelo: Maxigene Gradient USA), con el siguiente programa de amplificación: Desnaturalización inicial 94 °C 1min, desnaturalización 94°C 30 s, alineamiento 59°C 30 s, elongación 72°C 30 s (35 ciclos) y una extensión final 72 °C 5min.

El producto amplificado de 166 pb fue verificado en geles de agarosa (Fermentas, USA) al 1.5%, además del uso del marcador de peso molecular de DNA 100 pb plus (Fermentas, USA).

8.7 Amplificación genómica lineal (Whole Genome Amplification "WGA")

Para la amplificación se utilizó el kit comercial GenomePlex® Whole Genome Amplification (WGA 2) de la marca SIGMA (USA) siguiendo las indicaciones del fabricante con modificaciones estandarizadas en el laboratorio que a continuación se describen:

8.7.1 Preparación de la biblioteca

Para preparar la biblioteca se utilizó una solución de 20 ng de DNA IP en 10 μL de agua libre de nucleasas, 2 μL de buffer de preparación de librería 1X y 1 μL de solución estabilizadora de librería, la mezcla previa se homogenizó y centrifugó brevemente, se incubó a 95 °C durante 2 minutos en termociclador y se dejó enfriar en hielo aproximadamente 5 min, posteriormente se agregó 1 μL de enzima de preparación de librería haciendo un volumen total de 15 μL , se homogenizó y colocó en el termociclador incubando de la siguiente manera: 16°C durante 20 min, 24°C durante 20 min, 37°C durante 20 min, 75°C durante 5 min, 4°C indeterminado.

8.7.2 Amplificación

Fue preparada una mezcla de reacción como se indica a continuación, siendo añadida sobre el volumen de 15 μL de la reacción previamente mencionada.

Cuadro 7. Condiciones de amplificación (WGA1)

REACTIVO Stock	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Master Mix amplification 10X	7,5 μL	-----
WGA <i>polimerasa</i>	5 μL	12.5 U
H ₂ O .	47,5 μL	-----
Vol. total	75 μL	75 μL

Con la micropipeta fue resuspendida la mezcla y centrifugó brevemente, para su posterior incubación mediante las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial 95°C 3 min, desnaturalización 94°C 15 s, alineamiento / extensión 65°C 5 min. (14 ciclos).

Al término de los ciclos el DNA amplificado se purificó por columnas (MiniElute[®] Qiagen, USA) siguiendo el protocolo sin modificación, resuspendiendo en 22 μL de agua libre de nucleasas.

En geles de agarosa al 1.5 % se verificó el producto amplificado en un rango de 100-1000 pb, las muestras purificadas IP se re-amplificaron por el kit comercial GenomePlex[®] WGA Re-amplification (WGA3) de la marca SIGMA (USA) siguiendo las indicaciones del fabricante con modificaciones estandarizadas en el laboratorio: a partir de una solución de 500 ng se resuspendió en 10 μL de agua libre de nucleasas, se preparó un master mix y se añadieron los siguientes reactivos a los 500 ng de DNA-WGA1.

Cuadro 8. Condiciones de amplificación (WGA3)

REACTIVO Stock	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Master Mix amplification 10X	7,5 µL	-----
dNTP mix 10 mM	3.0 µL	0.4 mM
WGA <i>polimerasa</i>	5 µL	12.5 U
H ₂ O .	49,5 µL	-----
Vol. total	75 µL	75 µL

Se resuspendió, centrifugó y se colocó en termociclador empleando las siguientes condiciones de incubación: Desnaturalización inicial 95°C 3 min, desnaturalización 94°C 15 s, alineamiento/extensión 65°C 5 min. (14 ciclos). Después de completar los ciclos el DNA re-amplificado se purificó por fenol-cloroformo (previamente descrito), resuspendiendo en 200 µL de agua libre de nucleasas, se verificó su integridad en geles de agarosa al 1.5% los productos amplificados en un rango de 100-1000 pb.

8.8 Hibridación en microarreglos de DNA de alta resolución (3x720k Refseq) Nimblegen-Roche

Se utilizaron microarreglos de alta resolución en formato 3x720K los cuales permiten la hibridación de muestras tejido fresco y/o líneas celulares. Los microarreglos contienen 3 secciones de 720,000 sondas de DNA c/u, las cuales representan 30,893 transcritos y 22,542 regiones promotoras.

La longitud por sonda es de 50-75 pb conteniendo 100 pb de espacio entre sonda, capaces de representar 3,200 pb río arriba (upstream) y 800 pb río abajo (downstream) a partir del sitio de inicio de la transcripción, los microarreglos están diseñados para determinar regiones no repetitivas en el genoma humano, incluye regiones promotoras, elementos enhancer, unión de factores de transcripción, así como regiones bajo el control de modificación de histonas, basado en versión publicada del ensamble del genoma humano (UCSC genome browser, HG18).

8.8.1 Marcaje fluorescente del DNA-IP con Nimblegen Dual Color

El marcaje fluorescente de las muestras de DNA-IP fue realizado empleando el Kit comercial NimbleGen Dual-Color DNA Labeling de la marca Roche® (Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se utilizaron los DNA amplificados por WGA obtenidos a partir de *anti-RNA Pol II* y *anti-MEOX2*, 1 µg de ambos DNA-IP se llevó a un volumen de 40 µl, esto se realizó con la menor cantidad de luz posible, mezclando de la siguiente forma:

Cuadro 9. Condiciones de marcaje (NimbleGen Dual Color)

Reactivo	Cy5 Nonameros (Rojo)	Cy3 Nonameros (Verde)
Solución de Nonameros	40 µL	40 µL
DNA	40 µL	40 µL
Agua cbp. 44 µL	4 µL	4 µL

Las muestras fueron incubadas a 98°C por 10 min, e inmediatamente colocadas en hielo 5 min, protegiendo de la luz e incubando en hielo cada tubo.

Cuadro 10. Condiciones de Master mix para el marcaje

Reactivo	Panomer 647 (Rojo)	Panomer 555 (Verde)
10mM dNTP Mix	18 µL	18 µL
Exo-Klenow Fragment (3'→5' exo-) 50U/µL	2 µL	2 µL
Volumen final	20 µL	20 µL

Cuidadosamente se mezcló pipeteando y se centrifugó; al término se incubaron durante 3 horas a 37°C protegiendo de la luz, por último, se añadió 10 µl del buffer de paro (0.5 M EDTA). Las muestras fueron colocadas en hielo.

8.8.2 Purificación y cuantificación de las muestras del DNA-IP

A cada muestra se agregó 11.5 µL de NaCl 5M y 110 µL de isopropanol frío se homogenizó y dejó incubar toda la noche a -20°C, protegido de la luz, las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm durante 20 min, se decantó el sobrenadante cuidando de no perder la pastilla de DNA (pellet) y se lavó con 500 µl de etanol al 70% en frío y se resuspendió en un tubo nuevo.

Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min, se eliminó el sobrenadante mediante el uso de pipeta y se dejó secar la pastilla por espacio de 20 min, mediante el uso del desecador de la marca SpeedVac (USA) en frío a 4 °C, protegido de la luz, una vez desecadas las muestras fueron brevemente centrifugadas y se re-hidrató cada pastilla de DNA en 25 µL de agua libre de nucleasas, se cuantificaron las muestras en un espectrofotometro de la marca Biotek modelo EPOCH (USA).

Basados en la concentración, se calculó el volumen de cada muestra que equivalía a un total de 34 µg ambas muestras derivadas del DNA-IP mediante el uso de anticuerpos *anti-RNA Pol II* y *anti-MEOX2*, fueron combinadas en un tubo de 1.5 mL, la pastilla se dejó secar nuevamente por 20 min, en el concentrador por vacío (SpeedVac) a 4°C, protegiendo de la luz.

8.8.3 Hibridación del DNA-IP en microarreglo de secuencias promotoras

La pastilla se resuspendió en 5.6 μL de agua libre de nucleasas, mediante ligera agitación y breve centrifugación.

Para la hibridación se utilizó el kit comercial de hibridación de la marca NimbleGen Roche[®] (Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuadro 11. Preparación de muestras previo a hibridación

Solución de hibridación master mix para una laminilla	Arreglo 3X720K
Buffer de Hibridación 2X	35 μL
Componente de Hibridación A	14 μL
Oligo de alineamiento	1.4 μL
Total	50.4 μL

La mezcla de hibridación (master mix) se agregó a los 5.6 μL de DNA conteniendo ambos fluoróforos, se agitó ligeramente y centrifugó brevemente para mezclar las 2 soluciones, posteriormente se incubó a 95°C durante 5 min, protegiendo de la luz, al término se incubó a 42°C en la cámara de hibridación 20 min, antes de cargarse sobre el microarreglo.

Como se muestra a continuación fue colocado el mixer HX3 de la marca Roche[®] (Alemania) sobre el micro-arreglo 3X720:

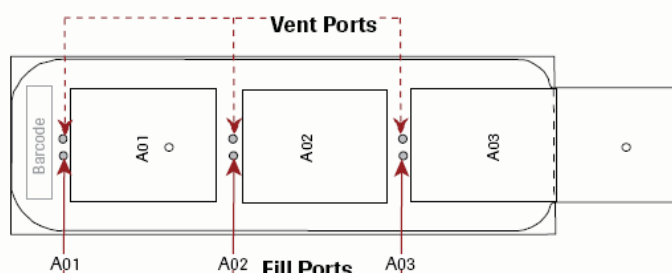


Figura 3. Formato de 3X720K arreglos NimbleGen

Para cada sección del microarreglo se cargaron 18 μL de la muestra previamente preparada mediante el uso de micropipeta en posición horizontal. Para evitar la evaporación se colocó la cubierta adhesiva indicada en el protocolo (cover slip) por cada orificio de carga para posteriormente hibridar incubando durante 48 horas a 42°C.

8.8.4 Lavado del microarreglo

Antes de empezar con el lavado se prepararon los buffers de la siguiente manera:

Cuadro 12. Preparación, buffers de lavado de microarreglos

Lavado para un arreglo	Buffer I	Buffer I, II y III
Agua VWR	243 m.	24.3 mL
10X Buffer I, II y III	27 mL	2.7 mL
1M DTT	27 mL	2.7 mL
Total	270 mL	27 mL

Para facilitar la eliminación del mixer, se calentó el buffer de lavado I a 42°C, manteniendo el resto de las soluciones de lavado a temperatura ambiente.

El mixer fue retirado con la ayuda de la herramienta de desmontaje mediante el uso del buffer I a 42 °C, el microarreglo se lavó durante 10-15 segundos para eliminar el buffer de hibridación.

Vigorosamente se lavó por 3 min el micro-arreglo en las distintas soluciones amortiguadoras (buffer I, II y III) a temperatura ambiente empleando el volumen de 27 mL, en un tubo Falcon® de 50 mL.

Al término de los lavados los microarreglos fueron sometidos a centrifugación por 2 min a 1,500 rpm., empleando la centrífuga desecadora de la marca Roche® NimbleGen (Alemania).

Por último se obtuvieron las imágenes del micro-arreglo mediante el lector o scanner de la marca Gene Pix modelo 4000a (USA).

8.8.5 Análisis bioinformático del microarreglo

Para el análisis de hibridación del micro-arreglo se utilizó el programa o software NimbleScan versión 2.6, y se procedió en una primera etapa a obtener las imágenes por canal de Fluorescencia 635 nm y 532 nm (imágenes) en el programa NimbleScan.

Ambas imágenes fueron alineadas por separado, ajustando brillo y contraste así como almacenadas en canales separados en formato tif.

Para el análisis de datos de CHIP on chip se generan varios formatos de reportes conteniendo la información por canales de fluorescencia por separado como a continuación brevemente se describen dichos reportes:

Pairs reports (.pair): Provee la secuencia, la sonda y la intensidad de la señal de los datos para un solo canal.

Probe reports (.probe): Provee la secuencia, la sonda y la intensidad de la señal de los datos para múltiples canales.

GFF report (General Feature Format, .gff): Provee un formato de intercambio para los datos de la base genómica, sustituible para la visualización en el programa NimbleGen SignalMap versión 1.9.

Una vez generados los distintos reportes se realizó una escala de datos Log₂-Ratio, estos se generaron a partir de los reportes anteriormente indicados (*pair* y *probe*), el índice generado (ratio) de los canales fue obtenido mediante la fórmula 532/635, esto nos generó un archivo con el nombre de (MEOX 2_ratio.gff), el cual contiene el índice para ambos canales.

A partir de este archivo se procedió a la búsqueda de picos representativos que tengan un mayor índice de fluorescencia, el cual nos generó un archivo con el nombre (MEOX 2_ratio_peaks.gff).

Los picos fueron detectados por la intensidad y alineamiento de 4 sondas (min probe > valor de corte "cutoff peak"), usando una ventana de deslizamiento de 500pb (sliding window), el valor de corte (cutoff) fue evaluado como un

porcentaje hipotético máximo definido como ($\text{mean}+6[\text{standard deviation}]$), para obtener los datos del índice (ratio) se realizaron 20 veces aleatoriamente para evaluar la probabilidad de falsos positivos False Discovery Rate (FDR por sus siglas en inglés), y a cada pico fue asignado un valor FDR, un valor $\text{FDR} \leq 0.2$ indica un pico de fluorescencia verdadero (interacción física de alta probabilidad proteína-DNA), mientras que un valor de $\text{FDR} \geq 0.2$ indica un posible falso positivo.

Los parámetros usados de valor de corte (cutoff) fueron del 95%, dicho valor de corte alto corresponde a la detección de picos de fluorescencia más astringente lo cual es reflejado en el valor de FDR.

Ya que se obtuvieron los picos se procedió a posicionarlos (mapearlos) generando un archivo en formato Excel, que nos proporcionó información como: ID del pico de fluorescencia del gen, cromosoma, posición genómica inicial y final, índice de fluorescencia, FDR del pico de fluorescencia, nombre del gen, número de acceso al GenBank, descripción y sinónimo.

8.9 Predicción de vías de señalización a partir de secuencias promotoras bajo la interacción MEOX2.

La selección de genes blanco de MEOX2 se realizó mediante análisis de jerarquía y probabilidad de falsos positivos además de análisis *in silico* de expresión génica fueron seleccionados genes probablemente relacionados funcionalmente con la capacidad de regulación transcripcional ante MEOX2 en cáncer pulmonar. Ello mediante el análisis de predicción de rutas metabólicas involucradas o rutas de señalización, utilizando bases de datos como KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y el uso de herramientas bioinformáticas en línea, entre ellas: <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/option.php>. Se utilizaron parámetros estadísticos, un método hipergeométrico y múltiples pruebas de ajuste entre ellas Bonferroni, utilizando un nivel de significancia de 0.05 y un número mínimo de genes por categoría: 2.

8.10 Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos para expresión fueron diseñados mediante el uso de programas bioinformáticos de análisis de predicción de secuencias como ProbeFinder versión 2.45 para Humano, ROCHE. Los oligonucleótidos para las regiones promotoras fueron diseñados utilizando programas bioinformáticos como Primer 3 Plus y VECTOR NT. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados y purificados desalados con la escala de la síntesis de 0.05 M por Sigma-Aldrich (USA). (ANEXO 1-3)

8.11 Análisis cuantitativo y ensayos de validación por ChIP-qPCR

El DNA-IP obtenido de las muestras de tejido fresco y líneas de células fueron analizados mediante qPCR y sub-análisis de cuantificación absoluta utilizando LightCycler 480 System (Roche, Mannheim, Alemania), SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Fermentas, Foster City, CA, EE.UU. y / o SYBR Green KAPA, Foster City, CA, EE.UU.) mediante el uso de oligonucleótidos dirigidos para los genes blanco, se utilizaron 20 ng. de DNA-IP por reacción, se comparó mediante curvas de calibración de diluciones seriadas de DNA nativo (DNA diploide de 8 personas clínicamente sanas) derivado de células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos a concentraciones de 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0.1 ng y 0.01 ng.

Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial 95°C 10 min, desnaturalización 95°C 15 s; alineamiento 55°C 30 s; extensión a 72°C 30 s (40 ciclos).

8.12 Ensayos de transfección y silenciamiento genético por siRNAs

Se utilizó RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) dirigidos contra MEOX2 (sc-106233) y GLI-1 (sc-37911) y un siRNA no relacionado con mRNA humano como un control negativo (sc-37007 y SC-44230) todos los siRNAs fueron obtenidos de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EE.UU.). Los cultivos de celulares con 3×10^5 células fueron cultivadas con medio RPMI-1640, y 3% de SFB libres de antibióticos, se incubaron en placas de 6 pozos durante 12 horas, se utilizó Lipofectamine® como reactivo de transfección (Life Technologies Corporation, Invitrogen, Foster City, CA, EE.UU.) y siRNAs a una concentración final 50 nM, en ausencia o presencia de 8 μ M de cisplatino en un volumen total de 1000 μ l. El silenciamiento se evaluó a las 48 horas posterior a la transfección.

8.13 Ensayos de viabilidad celular mediante MTS

El análisis de viabilidad celular se realizó utilizando 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfo-fenil) 2H-tetrazolio (MTS) (Promega, Madison, WI, EE.UU.) en ausencia o presencia de distintas concentraciones de cisplatino. En placas de 96 pozos se sembraron 2500 células en un volumen total de 200 μ l. de medio de cultivo RPMI-1640, durante 48 horas y posteriormente se incubaron con 20 μ l. de MTS durante 3 horas a 37 °C, se tomó una lectura a una longitud de onda de 490nm, se restó el fondo mediante un blanco sin células ni fármaco. y se graficó en forma de porcentaje.

8.14 Purificación de proteínas y ensayos de Western Blot

Las proteínas totales se extrajeron y se purificaron por el método de Trizol (Invitrogen), se resuspendió en SDS al 5% con inhibidores de proteasa (mini

completa, Roche, Indianapolis, IN, EE.UU.), y se cuantificó la proteína de mediante el kit comercial DC Protein (Bio -Rad). Se utilizaron 30 µg de proteínas totales para electroforesis vertical en geles de acrilamida al 10 y 12%, a 120 volts por 120 min; y luego se transfirieron a membranas de nitrocelulosa usando método de transferencia en cámara húmeda a 300 mAMP; la eficacia de la transferencia fue confirmada por Rojo de Ponceu (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.). Las membranas se bloquearon con PBS 1X-Tween 20 al 0.1% con 5% de leche baja en grasa y se incubaron a 4 °C durante toda la noche con anticuerpos (GLI-1) (Rockland y Abcam) 1:1500, (MEOX2) 1:1500, (B-actina) 1:3000, o (GAPDH) 1:3000 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EE.UU.), se lavaron 3 veces con PBS 1X-Tween 20 al 1% por 10 min, a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron durante 2 h con anticuerpo secundario (HRP anti-ratón / anti conejo HRP) 1:10,000 y PBS 1X-Tween 20 al 0.1% con 5% de leche baja en grasa a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con PBS 1X-Tween 20 al 1% por 10 min, y un lavado adicional de agua destilada. Las membranas se revelaron con 300 µl de Super Signal West Femto máxima sensibilidad (Thermo Scientific) se incubó 1 min a temperatura ambiente y se reveló usando el escáner C-Digit (LI-COR, Nebraska, EE.UU.), los cambios de relación se calcularon utilizando el programa Image Studio (versión 4.0.21).

8.15 Ensayos de migración de células tumorales (Herida)

La técnica de herida (800 µM aproximadamente) se llevó a cabo sobre células cultivadas en monocapa por 8 hrs, empleando 2×10^5 células por pozo en placa de 24 pozos. Los cultivos celulares fueron privados de FSB por las siguientes 48 horas. Para remover las células despegadas los cultivos fueron lavados con PBS 1X 3 veces luego de la realización de la herida. Se tomaron fotografías (40X) a 0, 24, 36 y 48 horas post-herida. Fue cuantificada el área de herida, con el programa Image J, empleando la aplicación “Duplicate”, permitiendo el análisis cuantitativo del área de la herida. Posterior a ello, los pasos “Process”, “binary” and “make binary”, permitieron la transformación de pixeles a código binario para la cuantificación del área seleccionada. Finalmente ajustes en la escala “set scale”, and “analyze particles” permitieron la obtención de sumatorias y representación cuantitativa de migración celular expresada en porcentaje.

8.16 Ensayos de migración (Traswell)

Placas de 6 pozos (Corning) pre-incubados 6 h a 37°C, fueron sembradas con densidad celular de 3×10^4 células por pozo, por triplicado. Posterior a su adherencia toda la noche la población celular fue transfectada con siRNAs correspondientes, por 6 horas. Posteriormente, 25,000 células transfectadas fueron transferidas y sembradas en la cámara superior traswell, mientras que

en la parte inferior se agregó medio RPMI suplementado con 10% de SFB empleando placas de 24 pozos. El tiempo total del cultivo fue de 48 horas, a 37°C y 5% de CO², al término las células adheridas a los insertos traswell fueron cuidadosamente fijadas con metanol al 70% y teñidas con 0.1% de cristal violeta y lavadas con agua corriente, mientras que montados empleando entellan sobre laminillas. Las imágenes fueron tomadas mediante microscopio en campo claro con aumento total de 100X.

8.17 Ensayos clonogénicos de proliferación celular

Placas de 6 pozos fueron sembradas a una densidad de 300,000 células por pozo. Posterior a su adherencia toda la noche, fueron transfectadas 6 horas mediante siRNAs correspondientes. Posteriormente células fueron transferidas y sembradas por triplicado en placas de 6 pozos a una densidad de 10,000 y en placas de 12 pozos a una densidad de 5,000. Las poblaciones celulares fueron cultivadas entre 6 a 21 días a 37°C y 5% de CO², al término las células fijadas con metanol y ácido acético (3:1, v/v), fueron teñidas con 0.5% de cristal violeta y lavadas con agua corriente. El crecimiento de las colonias fue cuantificado mediante el uso de la herramienta plugin de ImageJ Colony Area [119].

8.18 Ensayos RT-qPCR y análisis de expresión de mRNA

Se utilizó el método TRIzol (Invitrogen, California, USA) para la extracción y purificación total de mRNA, mientras que la síntesis de cDNA se generó a partir de 2 µg de RNA total utilizando el sistema de transcripción inversa ImProm-II. Mientras que la detección de expresión de mRNA se realizó utilizando el kit Probe Master (Roche, Alemania) y sondas de hidrólisis (Universal Probe Library "UPL", Roche, Alemania) mediante el uso del equipo de PCR en tiempo real LightCycler® 480 (Roche, Alemania) Siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles de expresión del mRNA se normalizaron bajo la detección de GAPDH como gen endógeno, mientras que los análisis de expresión se llevaron a cabo mediante el método $\Delta\Delta T$.

Se usaron secuencias de oligonucleótidos y sondas UPL en las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 10 s, alineamiento a 60°C durante 17 s y extensión a 72°C durante 1 s. Los oligonucleótidos se diseñaron usando el programa ProbeFinder versión 2.51 (Roche, Alemania) y sintetizados por SIGMA-ALDRICH (EE.UU.).

8.19 Análisis estadístico

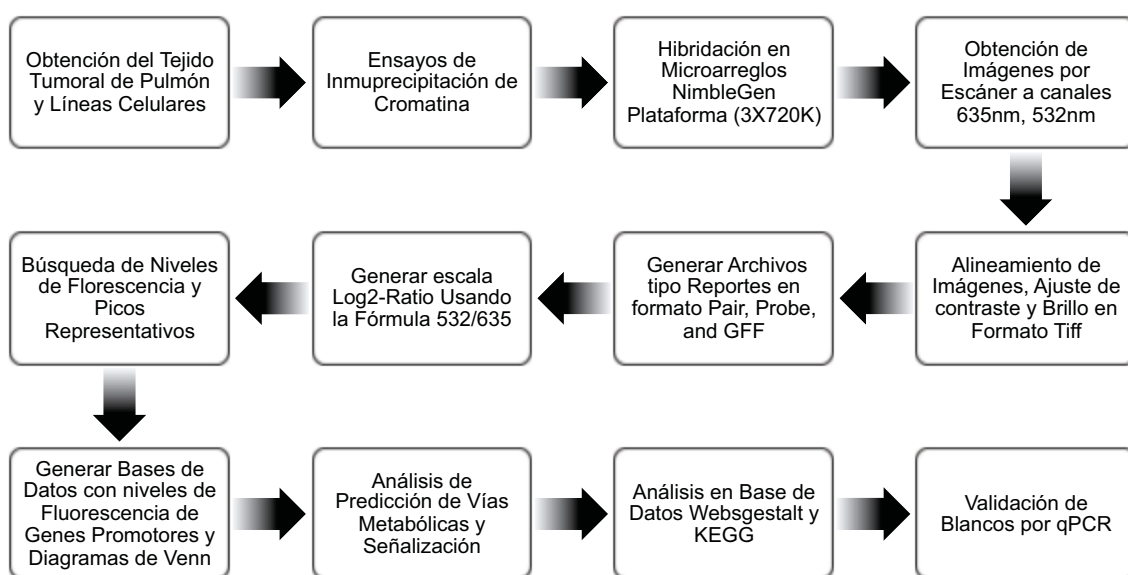
Fueron empleadas, prueba exacta Fisher y análisis de covarianza para establecer diferencias estadísticas entre ambos grupos de pacientes,

considerando estadísticamente significativas aquellas diferencias con $p \leq 0.05$ aplicando prueba de una sola vía con comparaciones múltiples utilizando Dunnett y Turkey, así como t de student . Para ello, se empleó el software SPSS (versión 11.0) y GraphPad Prism (versión 5.0).

9. RESULTADOS

9.1 Análisis bioinformático, identificación de los blancos génicos del factor transcripcional MEOX2 y predicción de vías de señalización.

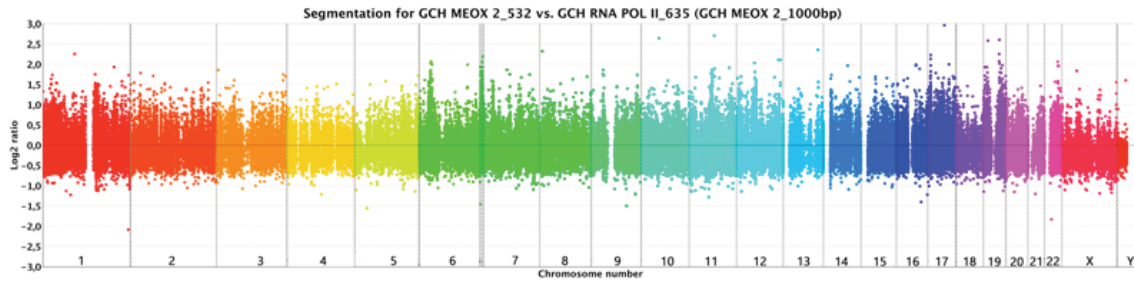
El análisis del epigenoma asociado a MEOX2 revelado en pacientes con cáncer pulmonar, muestra perfiles distintos de asociación del factor de transcripción con regiones promotoras. En el esquema 2 se muestra la serie de pasos que se realizaron desde la obtención de la muestra hasta la validación por qPCR.



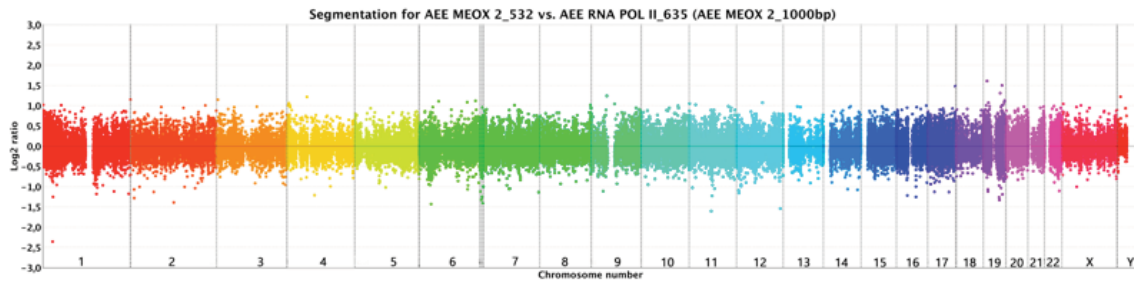
Esquema 2: Flujo de trabajo. Seguimiento de pasos en línea temporal desde la obtención de la muestra hasta la validación por qPCR para los blancos génicos de MEOX2.

El filtrado de los datos genómicos obtenidos a partir del microarreglo nos presenta un co-posicionamiento de los factores de transcripción MEOX2 y RNA POLII, para determinar un índice se realizó un análisis de Hibridación Genómica Comparativa (CGH) por sus siglas en inglés, mostrando el genoma completo, ejemplificando cada cromosoma de un color distinto, en el eje de las Y se muestra la intensidad de fluorescencia en logaritmo de base 2 (Log2-RATIO), en el paciente 13 se muestra mayor señal en la región superior lo que corresponde a una mayor interacción de MEOX2 con regiones promotoras, por el contrario el paciente 3 se muestra una señal de enriquecimiento en la región inferior lo que significa mayor interacción de la RNA POLII con regiones promotoras, en el paciente 6 se muestra un enriquecimiento de ambos factores de transcripción, teniendo una interacción con la misma intensidad en una misma región promotora.

Paciente - 13



Paciente - 6



Paciente - 3

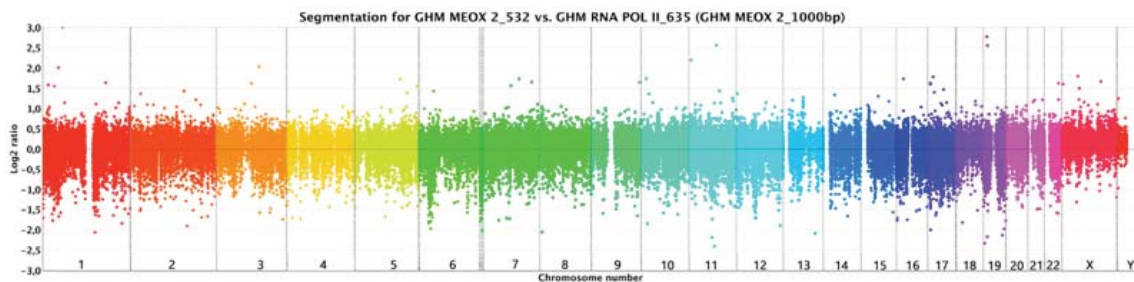


Figura 4 Análisis bioinformático por CGH de MEOX2 y RNA POLII, en el genoma de pacientes con cáncer pulmonar. Análisis del ideograma obtenido por CGH, mostrando la intensidad de los picos de fluorescencia de los canales (532/635), el cual representa el enriquecimiento de MEOX2 (532 parte superior) y RNA POL II (635 parte inferior) a lo largo del genoma de pacientes con cáncer pulmonar.

La visualización informática de datos en plataformas como el programa Integrative Genomics Viewer (IGV) por sus siglas en inglés, nos permite la comparación de datos publicados previamente por grupos de investigación especializados en el estudio del epigenoma, en este sentido los datos obtenidos en el instituto Broad concuerdan con los datos obtenidos en nuestro laboratorio, pues al comparar bases de datos del proyecto ENCODE para la línea celular A549 (adenocarcinoma pulmonar) bajo la técnica de CHIP-Seq, se muestran perfiles de fluorescencia similares en el genoma completo de proteínas y modificaciones post-traduccionales en las que destacan: CTCF en azul, marcas de activación H3K4me3 y H3K27Ac en verde, marcas de represión H3k9me3 y H3k27me3 en rojo y los datos obtenidos de IP en el laboratorio (azul claro y azul rey), permitiendo observar el enriquecimiento de MEOX2 y RNA POLII en regiones promotoras de genes posiblemente involucrados en las neoplasias pulmonares de pacientes mexicanos.

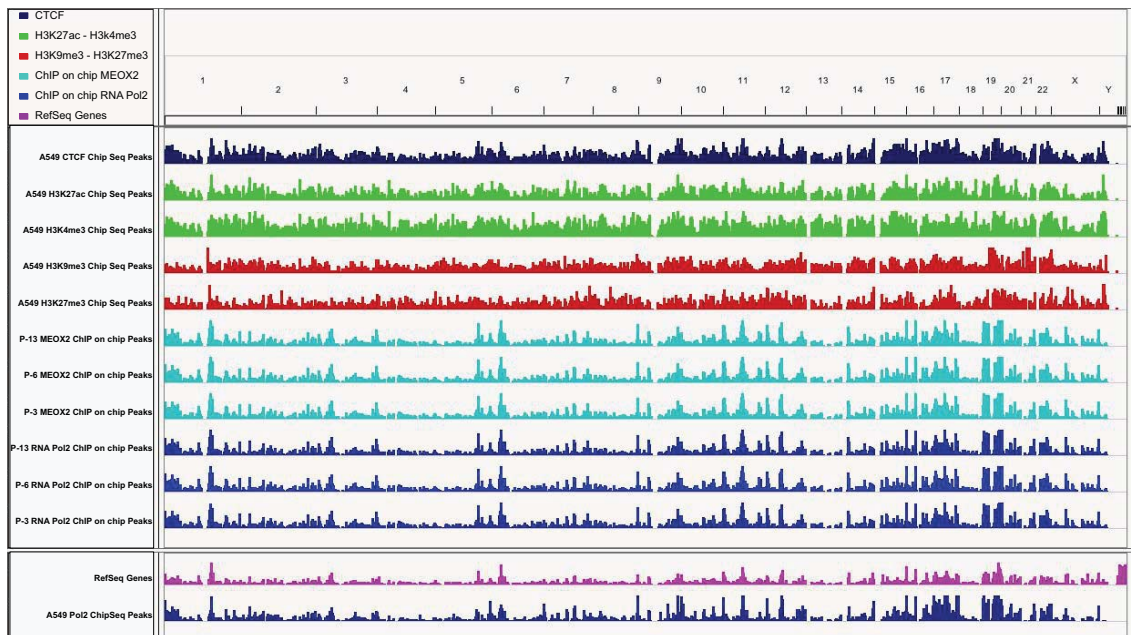


Figura 5 Análisis bioinformático del epigenoma de cáncer pulmonar. Ideograma que muestra la intensidad de fluorescencia de los picos de distintas marcas de regulación epigenética tomadas de la base de datos del laboratorio Broad depositadas en ENCODE de la línea celular A549, CTCF (azul oscuro), marcas de histonas de activación H3K4me3 and H3K27Ac (verde), marcas de histonas de represión H3K27me3 and H3K9me3 (rojo); MEOX2 (turquesa) y RNA POL II (azul) de pacientes con cáncer pulmonar derivados de nuestro estudio; así como el transcriptoma (rosa) y RNA POL II (azul) tomadas de la base de datos del laboratorio HudsonAlpha depositadas en ENCODE de la línea celular A549. Los datos obtenidos del ENCODE corresponde a ensayos por ChIPSeq y los datos del presente trabajo por CHIP on chip, utilizando el visualizador “IGV Viewer (versión 2.3.60)”.

Posterior al análisis bioinformático se realizaron pruebas estadísticas, para determinar el nivel de significancia de los picos por la intensidad de fluorescencia mediante el análisis de False Discovery Rate (FDR) por sus siglas en inglés, y así determinar una firma genética entre los pacientes sometidos a la IP y posterior hibridación en microarreglos, esto fue simplificado en diagramas de Venn con un valor de corte de FDR=0.2 y FDR=0.1. Encontrando en FDR=0.1 un total de 1724 genes para el paciente 3, 3486 genes para el paciente 6 y 5419 genes para el paciente 13, a continuación se agruparon aquellos genes que se compartían entre los pacientes dando como resultado 13 genes compartidos, este nivel estadístico se amplió a FDR=0.2 encontrándose 3347 genes para el paciente 3, 5536 genes para el paciente 6 y 6787 genes para el paciente 13, en este análisis se encontró una firma de 78 genes compartidos entre los 3 pacientes con cáncer pulmonar.

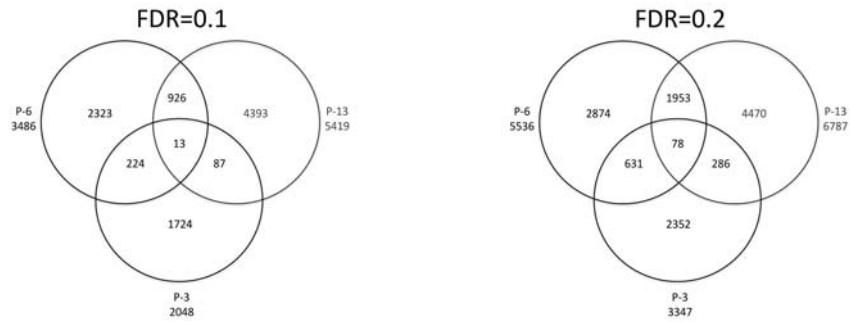


Figura 6 Análisis bioinformático de blancos de MEOX2. Análisis jerárquico y distribución de genes compartidos, diagramas de Venn FDR=0.1 y FDR=0.2 donde se muestra las blancos de MEOX2 en pacientes con cáncer pulmonar tras la IP.

Al realizar un análisis de los genes compartidos se encontraron funciones distintas, genes que codifican proteínas de membrana, genes que codifican proteínas involucradas en la degradación de la matriz extracelular (MMP24) y factores de transcripción (ZEB1 y GLI-1) involucrados en transformación oncológica y la malignidad, entre otros.

Con el fin de darle un significado molecular, los genes resultantes al análisis con el valor de corte de FDR=0.2 se construyeron vías de señalización con los genes, utilizando herramientas bioinformáticas como el Websalt, que con su base de datos nos permitió identificar aquellos genes representados con un valor de FDR=0.2, y construir vías de señalización que posiblemente este involucradas en la iniciación, mantenimiento y progresión de las neoplasias malignas, dando como resultado vías de tipo embrionario como son TGF- β , Notch, WNT, Hedgehog, entre otras, sin embargo poco se había estudiado la participación de la vía de señalización Hedgehog en neoplasias pulmonares y el mediador principal de la vía es GLI-1 un factor de transcripción que modula la actividad de la propia vía, y se ha asociado con carcinomas de tipo neuronal y ha sido poco explorado en neoplasias de tipo epitelial, aunado a que se encuentra dentro de los 13 genes con un valor FDR=0.1.

Tabla 1. Secuencias promotoras blanco del factor transcripcional MEOX2. Filtrado de datos usando un FDR 0.1, en pacientes con cáncer pulmonar, en color naranja se muestra GLI-1 gen de la vía de señalización Hedgehog.

PICO ID	CHR	PICO INICIO	PICO FINAL	PICO SCORE	PICO FDR	CADENA SENTIDO	# ACCESO	DESCRIPCIÓN
7382	chr15	560960 34	560967 40	0.575148	0.09818	-	NM_170697	ALDH1A2
1291	chr20	118434 14	118446 12	0.570716	0.02392	+	NM_014962	BTBD3
7629	chrX	331394 18	331398 11	0.559561	0.09625	-	NM_004006	DMD
905	chrX	135054 343	135055 220	0.606675	0.0393	+	NM_001449	FHL1
1023	chr12	561350 01	561354 72	0.596296	0.07544	+	NM_005269	GLI-1
1353	chr3	111506 83	111510 68	0.563425	0.07544	+	NM_001098 213	HRH1
3098	chr6	119711 930	119712 915	0.422957	0.0462	-	NM_005907	MAN1A1
7208	chr20	332768 79	332773 32	0.585966	0.08287	+	NM_006690	MMP24
2583	chr4	717885 04	717888 88	0.878884	0.01453	+	NM_001130 709	RUFY3
4816	chr2	159530 737	159531 771	0.705989	0.04685	+	NM_033394	TANC1
726	chr5	170667 431	170667 978	0.631767	0.03231	+	NM_021025	TLX3
2331	chr8	874239 14	874245 06	0.567401	0.03991	+	NM_007013	WWP1
3276	chr10	316444 44	316451 40	0.448939	0.06282	+	NR_024285	ZEB1

En la figura 7 se muestra la vía de señalización Hedgehog, en rojo se muestran aquellos genes en los que MEOX2 y RNA POLII tienen una interacción física con su región promotora, esta imagen generada a partir de los datos obtenidos del paciente 6 muestra que más del 60% de los genes de la vía se encuentran bajo una posible regulación transcripcional de MEOX2, es de gran relevancia esta vía ya que los productos finales participan en la señalización de otras vías involucradas en neoplasias de tipo epitelial como WNT y TGF- β .

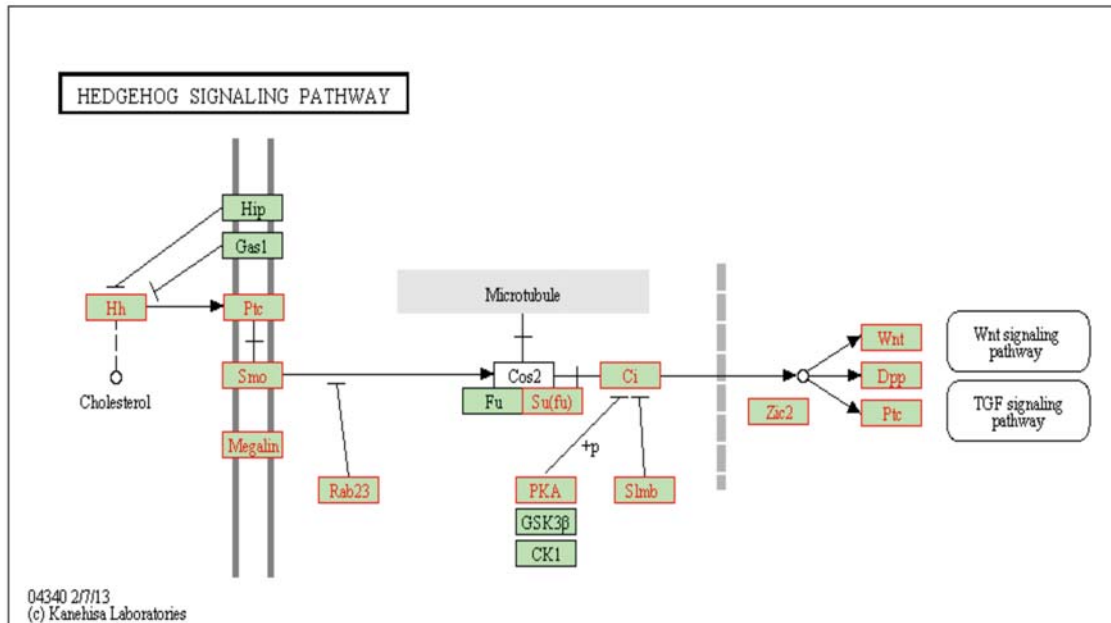


Figura 7 Construcción de vías de señalización celular a partir de análisis de predicción. Datos obtenidos por CHIP on chip de MEOX2 y RNA POL II de regiones promotoras de pacientes con cáncer pulmonar con un valor de $FDR \leq 0.2$, (imagen representativa tomada del paciente 6, AEE5536gensymbol.txt) bajo los siguientes parámetros: Organismo: *Homo sapiens*, Tipo de Id: símbolo del gen, referencia: genoma, i.e. Lista de genes, estadística: Hypergeométrica, Nivel de significancia: .05, MTC: Corrección Bonferroni, Mínimo: 2

En la figura 8 se muestra la interacción de MEOX2 sobre la región promotora de GLI-1, mostrando que en los 3 pacientes hay un co-posicionamiento de MEOX2 y RNA POL II mostrada por el nivel de fluorescencia y el corte estadístico, en el paciente 6 y 13 marcados en color rojo (≥ 0.05) y en el paciente 3 marcado en color naranja (≤ 0.05), al realizar un análisis de predicción *in silico* de sitios de unión de MEOX2 sobre los 4000pb (3200pb río arriba y 800pb río abajo) con el programa TFSearch se encontraron 12 posibles regiones de interacción, se validaron cuantitativamente 7 regiones de interacción en las cuales había un pico de relevancia estadística aproximadamente a las -2000 pb y las -200 pb con relación al sitio de inicio de la transcripción.

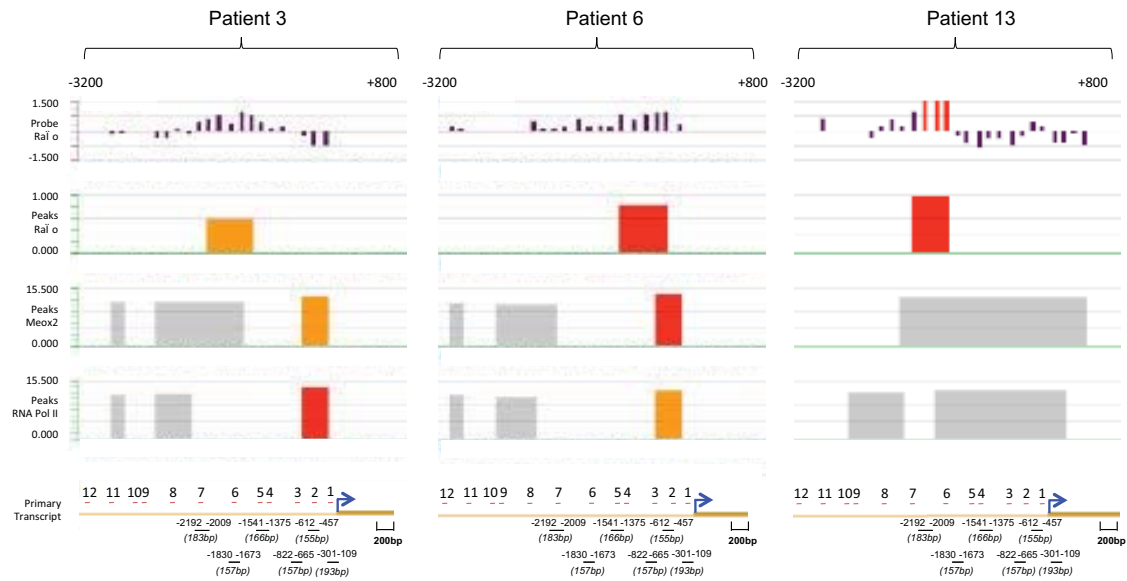


Figura 8 Análisis bioinformático del promotor de GLI-1. Análisis de la región promotora de GLI-1 en pacientes con cáncer pulmonar, donde se muestra la intensidad de Fluorescencia de los picos de MEOX2 y RNA POL II en los pacientes 3, 6 y 13, se muestra 12 posibles sitios de unión de MEOX2 en la región promotora de GLI-1, 7 regiones fueron analizadas cuantitativamente. Escala 200 bp.

El análisis de la región citogenética del cromosoma 12 donde se encuentra el locus de GLI-1 muestra un perfil epigenético en la región promotora de GLI-1, los datos derivados del proyecto ENCODE en A549 muestra un enriquecimiento de CTCF (azul) en la región promotora y de las marcas de activación H3K4me3 y H3K27Ac (verde), mientras que hay una ausencia de marcas de represión, mostrándose un promotor posiblemente activo, los resultados obtenidos en el laboratorio muestran un posicionamiento de MEOX2 y RNA POL II en la región promotora de GLI-1 similar a los datos obtenidos de la RNA POL II de la línea A549, esto permite visualizar los pacientes mexicanos con cáncer pulmonar y su posible regulación epigenética mediada por un código de activación de histonas.



Figura 9 Análisis epigenético de la región promotor de GLI-1. Análisis bioinformático de marcas de regulación epigenética sobre la región promotora de GLI-1, donde se muestra CTCF (azul oscuro), H3K4me3 and H3K27Ac (verde), H3K27me3 and H3K9me3 (rojo) (ENCODE); MEOX2 y RNA POL II (negro), transcriptoma (rosa) y RNA POL II (azul) de la línea celular A549. Los datos obtenidos utilizando el visualizador “IGV Viewer (versión 2.3.60)

Para evaluar cuantitativamente la región promotora de GLI-1 se diseñaron 12 juegos de oligonucleótidos, en la figura 10 se muestra el diseño, tamaño y posición de estos para evaluar cuantitativamente la región promotora de GLI-1, seleccionando las 7 regiones cercanas al sitio de inicio de la transcripción, debido al valor estadístico obtenido tras los ensayos de IP de MEOX2 y de RNA POL II.

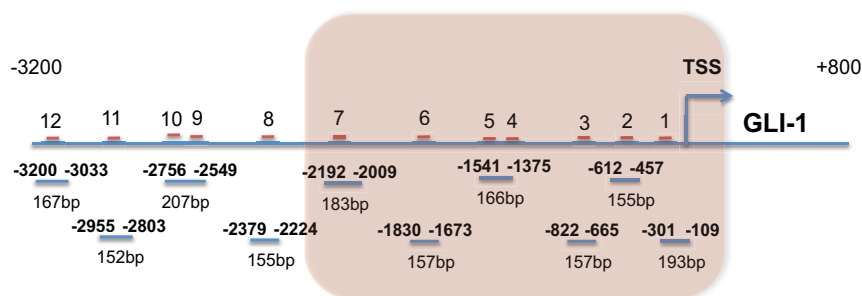


Figura 10 Promotor de GLI-1 diseño *in silico* de posibles sitios de interacción de MEOX2. En base a los Hotspots de los sitios de interacción de MEOX2 en los pacientes con cáncer pulmonar, se realizó una predicción de sitios de unión a lo largo del promotor proximal de GLI-1, encontrándose 12 sitios de posible interacción de MEOX2, se analizaron 7 regiones para mapear la región promotora de GLI-1.

9.2 Identificación y validación de las regiones promotoras del gen *GLI-1* de la vía *Hh* como en gen blanco de *MEOX2* en carcinomas pulmonares derivados de pacientes y líneas celulares de cáncer pulmonar.

Los 7 sitios de interacción de *MEOX2* con la región promotora de *GLI-1* se evaluaron mediante ChIP-qPCR en una cohorte de 13 pacientes y 2 líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar (A549 y A427). En la figura 11 se muestra los niveles de enriquecimiento de *MEOX2* y RNA POL II, mostrando el posicionamiento de *MEOX2* en 2 regiones una cercana en las -2000 pb (1-2) y otra en las -700 pb (4), coincidiendo con el perfil de RNA POL II teniendo picos máximos en esas mismas 2 regiones para los pacientes y las líneas celulares.

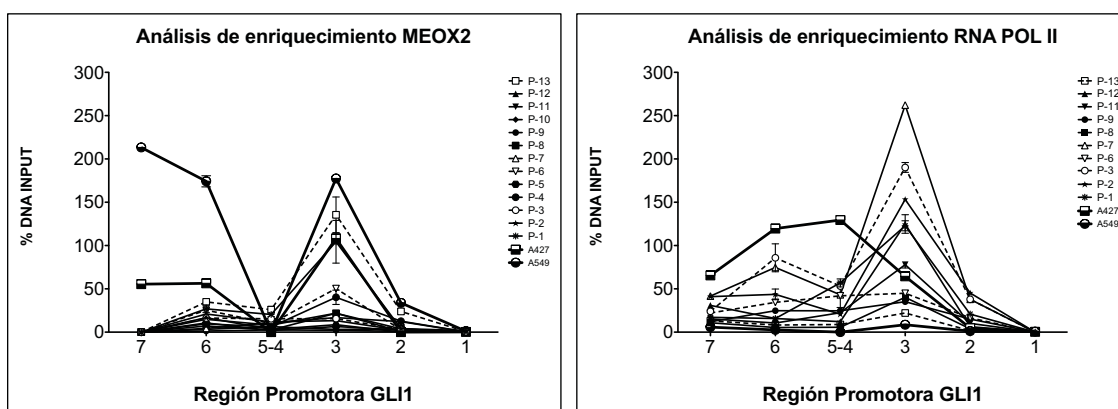


Figura 11 Análisis cuantitativo de factores transcripcionales sobre la región promotora de *GLI-1*. Análisis de enriquecimiento de *MEOX2* y RNA POL II, en 7 segmentos de la región promotora de *GLI-1*, en 13 pacientes con cáncer pulmonar y dos líneas celulares de adenocarcinoma (A549, A427)

Con el fin de evaluar el perfil epigenético de la región promotora de *GLI-1* se realizaron ensayos de ChIP-qPCR de H3K27Ac y H3K4me3, siendo las marcas presentes en las bases de datos del proyecto ENCODE para la línea celular A549. Encontrándose un enriquecimiento de H3K27Ac a lo largo de la región promotora desde los -2000 pb hasta cerca de las -250 pb en los pacientes y las líneas celulares, para la marca H3K4me3 el enriquecimiento es similar a lo observado con *MEOX2* y RNA POL II en la región cercana a las -700 pb pero en menor medida, mostrando así una asociación de marcas de activación de la cromatina y el posicionamiento de *MEOX2* y RNA POL II posiblemente como un mecanismo de regulación transcripcional de forma activa.

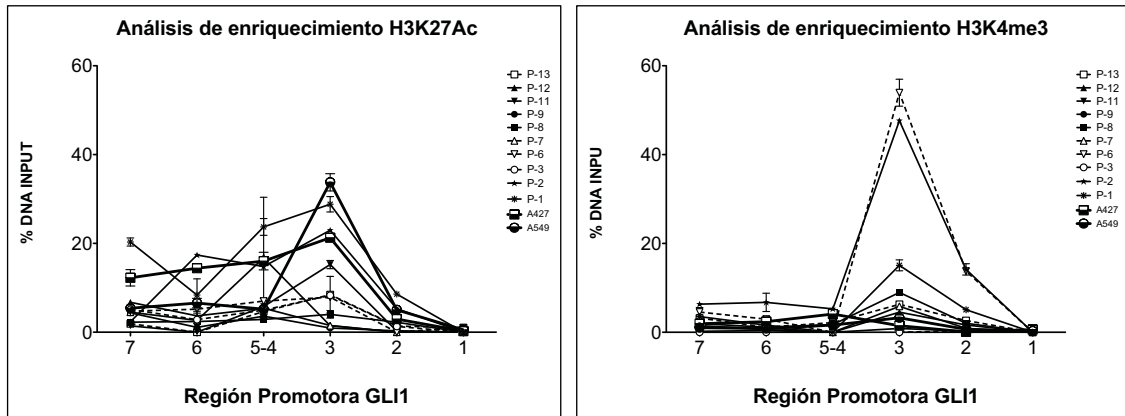


Figura 12 Análisis cuantitativo de marcas de histonas sobre la región promotora de GLI-1. Análisis de enriquecimiento de H3K27Ac y H3K4me3, en 7 segmentos de la región promotora de GLI-1, en 13 pacientes con cáncer pulmonar y dos líneas celulares de adenocarcinoma (A549, A427)

9.3 Análisis del nivel de expresión del mRNA de los blancos génicos de MEOX2.

Se evaluó el nivel de mRNA de los genes principales de la vía de señalización Hedgehog, esto mediante ensayos de qPCR con sondas de hidrólisis permitiendo detectar el mensajero maduro para cada gen que participan en la vía en distintas líneas de cáncer pulmonar.

9.3.1 Expresión del mRNA en genes miembros de la vía de señalización Hh en condiciones basales (ausencia de fármacos oncológicos)

Se realizó el análisis denominado “ $\Delta\Delta CT$ ”, para obtener los valores relativos de expresión de 4 líneas celulares A549 y A427 (de origen caucásico), INER51 e INER 37 (derivadas de pacientes mexicanos) ajustando con un gen de referencia como GAPDH, y tomando como control la mezcla de los 4 RNAs de las líneas celulares. En la figura 13 se observa el perfil de expresión basal de los genes implicados en la vía, mostrando que A549 tiene los niveles de expresión más altos de los genes *SHH*, *SMO*, *GLI-1* y *ABCG2* gen blanco de GLI-1 siendo significativo el incremento comparado con el control, en contraste la línea celular A427 presenta los niveles más bajos de expresión de *SHH*, *PTCH1*, *SMO* y *GLI-1*. En cuanto a las líneas derivadas de pacientes mexicanos solo en la INER37 se observa un aumento en la expresión de *PTCH1* y *SMO*, y una disminución en *ABCG2*, mientras que INER51 no muestra cambios en los niveles de expresión.

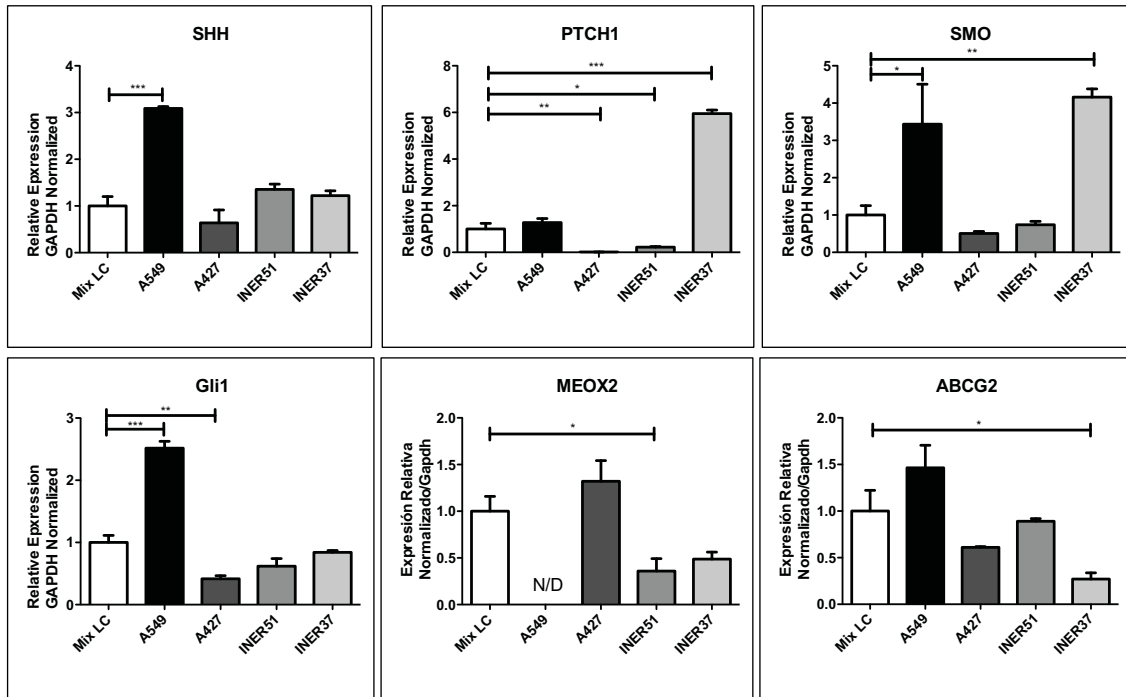


Figura 13 Análisis del patrón de expresión basal del mRNA en modelos celulares de cáncer pulmonar. Expresión relativa normalizado con GAPDH, se tomó como control la mezcla del RNA de las líneas celulares ajustándolo a 1. Las imágenes representan el resultado de 3 experimentos independientes, se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una sola vía, con pruebas de comparación múltiple de Dunnett siendo significativo * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

9.4 Análisis de la respuesta al tratamiento farmacológico en líneas celulares de cáncer pulmonar.

Con la finalidad de evaluar el efecto de distintos fármacos oncológicos utilizados en la clínica, para el tratamiento de cáncer pulmonar, las líneas celulares se sometieron a distintos retos farmacológicos con fármacos de primera línea como lo es el Cisplatino y Doxorubicina, estos son utilizados en el tratamiento de neoplasias malignas de tipo epitelial, además de simular el efecto de pacientes que no responden al tratamiento por una posible resistencia al fármaco se establecieron modelos de resistencia a largo plazo, sometiendo el cultivo celular a la constante exposición a Cisplatino incrementando la dosis hasta volver a las células resistentes.

9.4.1 Viabilidad celular como respuesta a fármacos anti-neoplásicos en líneas celulares de cáncer pulmonar

4 modelos celulares se utilizaron para evaluar la tasa de células vivas después del reto farmacológico, esto graficado en forma de porcentaje tomando como 100% el cultivo celular que no fue sometido a tratamiento, para el análisis se evaluó la exclusión del colorante vital azul de tripano. En la figura 14 se que observa las líneas celulares de origen caucásico tienen una mayor viabilidad celular después de la exposición al fármaco, A549 entre el 50 y 60% mientras

que la A427 presenta más de 50% de células vivas después de los retos farmacológicos, mientras que las líneas derivadas de pacientes mexicanos son más susceptibles a los retos farmacológicos mostrando una menor viabilidad correspondiente al 50% 48 horas después del tratamiento farmacológico, se utilizaron como concentración para Cisplatino 8 μ M y para Doxorubicina 100 nM. se realizaron combinaciones para simular lo que se practica en la clínica invirtiendo el orden de los fármacos para evaluar el efecto en los cultivos celulares pero no se encontró diferencia en las combinaciones.

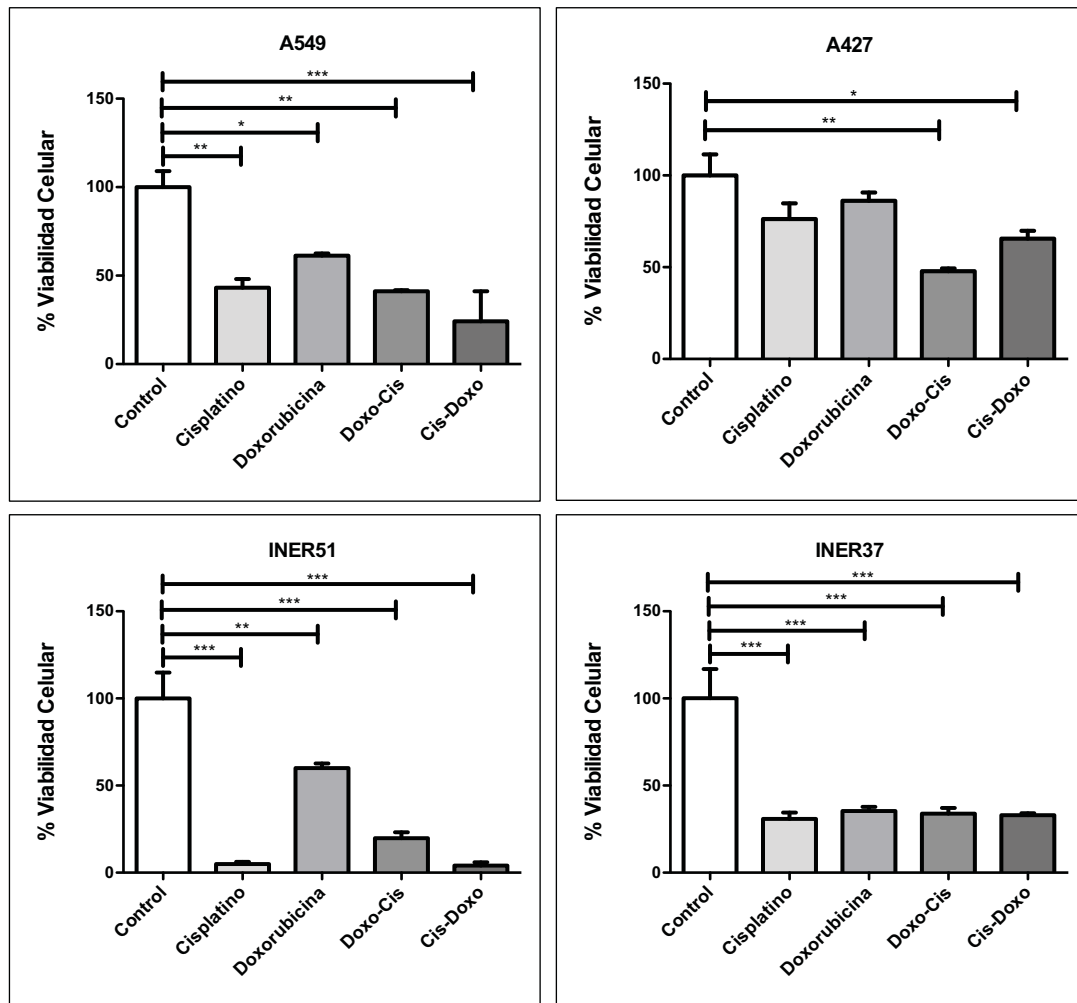


Figura 14 Análisis de la tasa de viabilidad celular después del reto farmacológico. Se evaluó la tasa de viabilidad mediante el conteo por azul de tripano, se tomó como control las células sin exposición a fármaco, se utilizó Cisplatino 8 μ M, Doxorubicina 100nM, y combinaciones durante 48 horas, imagen representativa de 3 experimento independientes, se realizó una ANOVA de una sola vía, con pruebas de comparación múltiple de Dunnett siendo significativo *p<0.05, **p≤ 0.01, ***p≤ 0.001

9.4.2 Análisis de cambio en el perfil de expresión del mRNA en modelos de cáncer pulmonar, como respuesta a fármacos oncológicos

Se evaluaron los niveles de expresión de los genes que participan en la vía de señalización Hedgehog, en los modelos celulares analizados, con respecto al

gen SHH cuyo producto es iniciador de la vía, la figura 15 muestra una disminución significativa en el tratamiento combinado de Cis-Doxo solo en el modelo A549, mientras que en los demás modelos y tratamientos no se observa diferencia alguna.

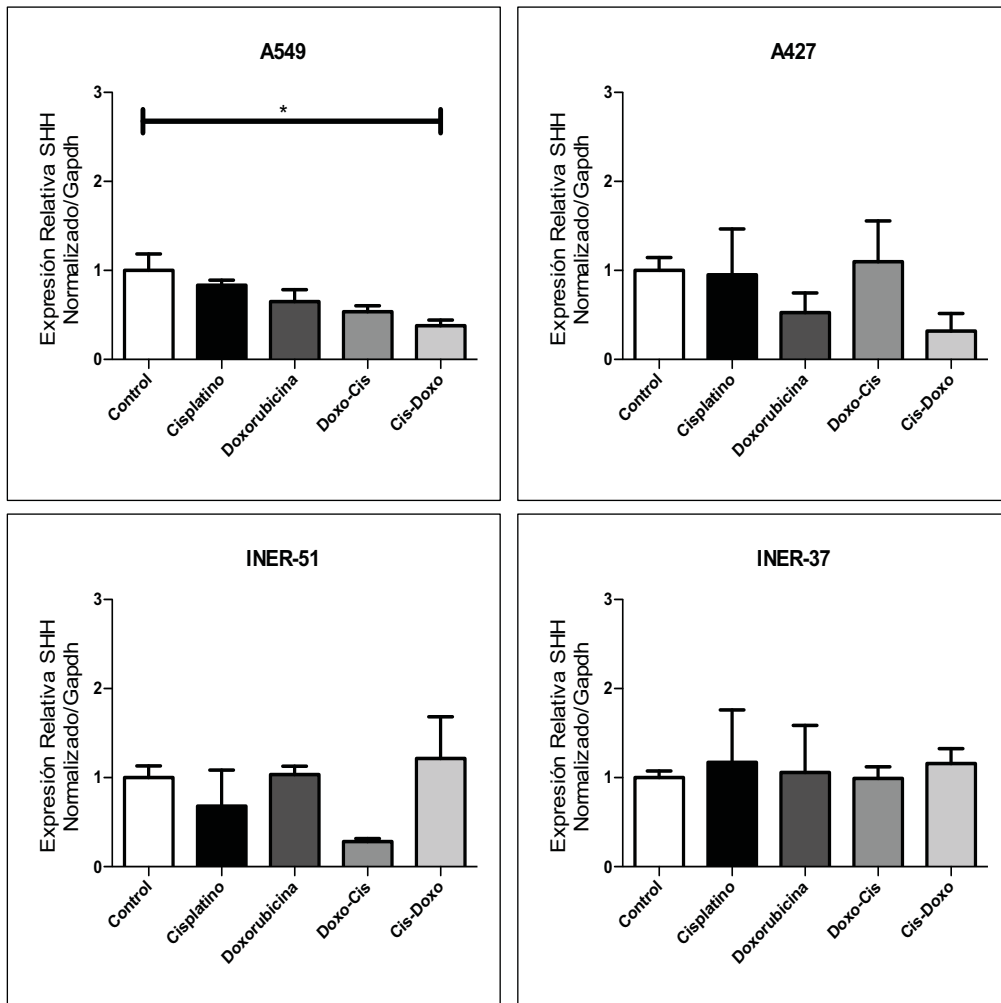


Figura 15 Análisis del mRNA de SHH en líneas celulares de cáncer pulmonar. Ensayos de qPCR utilizando sondas de hidrólisis normalizando con GAPDH, las imágenes representa 3 ensayos independientes, se realizó ANOVA de una sola vía, con pruebas de comparación múltiple de Dunnett siendo significativo $*p < 0.05$

Al analizar los cambios en los niveles de expresión del gen PTCH1, que codifica al primer receptor reportado que posee 12 dominios transmembranales, se observa una disminución significativa en los tratamientos combinados en la línea A549, en la línea INER51 se observa una disminución en todos los tratamientos oncológicos, sin embargo ni en la línea A427 ni en la INER37 se observan diferencias significativa (Figura 16).

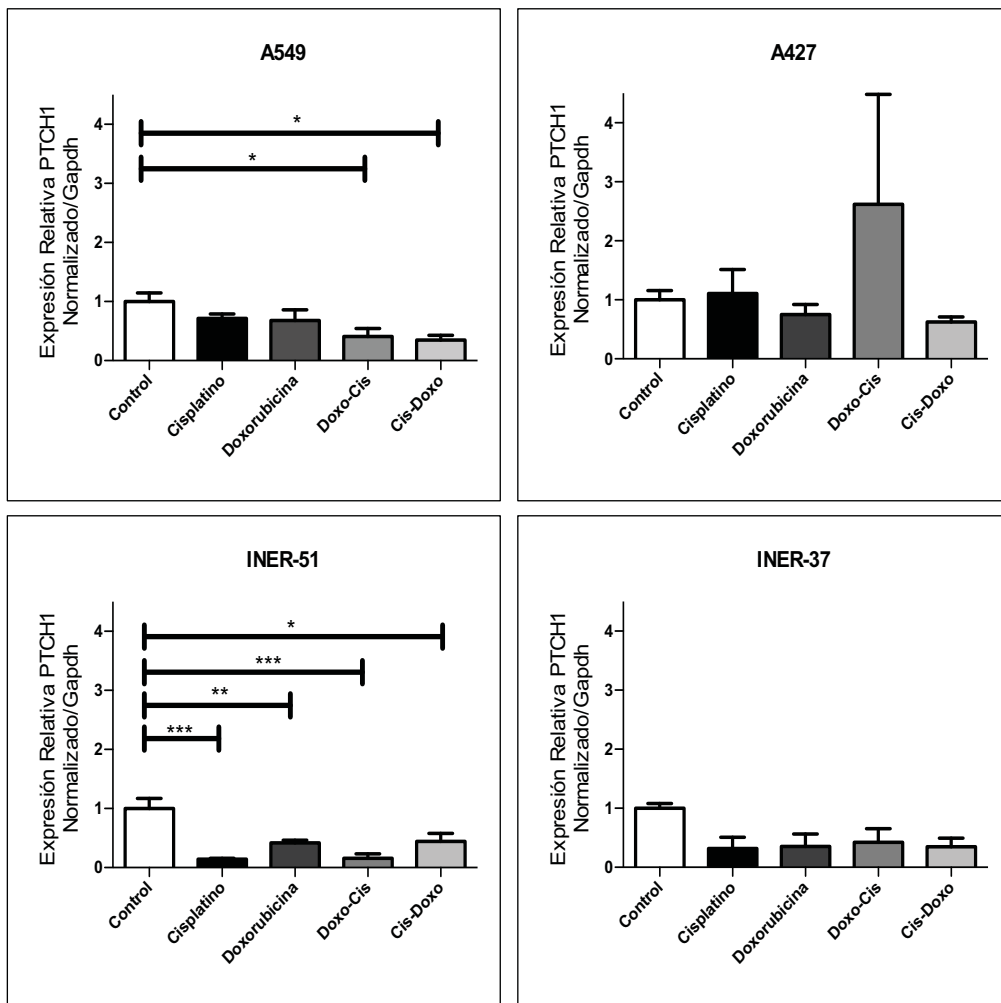


Figura 16 Análisis de mRNA de PTCH1 en líneas celulares de cáncer pulmonar. Ensayos de qPCR utilizando sondas de hidrólisis normalizando con GAPDH, las imágenes representa 3 ensayos independientes, se realizó ANOVA de una sola vía, con pruebas de comparación múltiple de Dunnett siendo significativo * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

Para el gen SMO, que codifica al segundo receptor reportado que posee 7 dominios transmembranales, el análisis de qPCR no muestra ninguna diferencia significativa para los tratamientos farmacológicos, ni para las líneas celulares (Figura17).

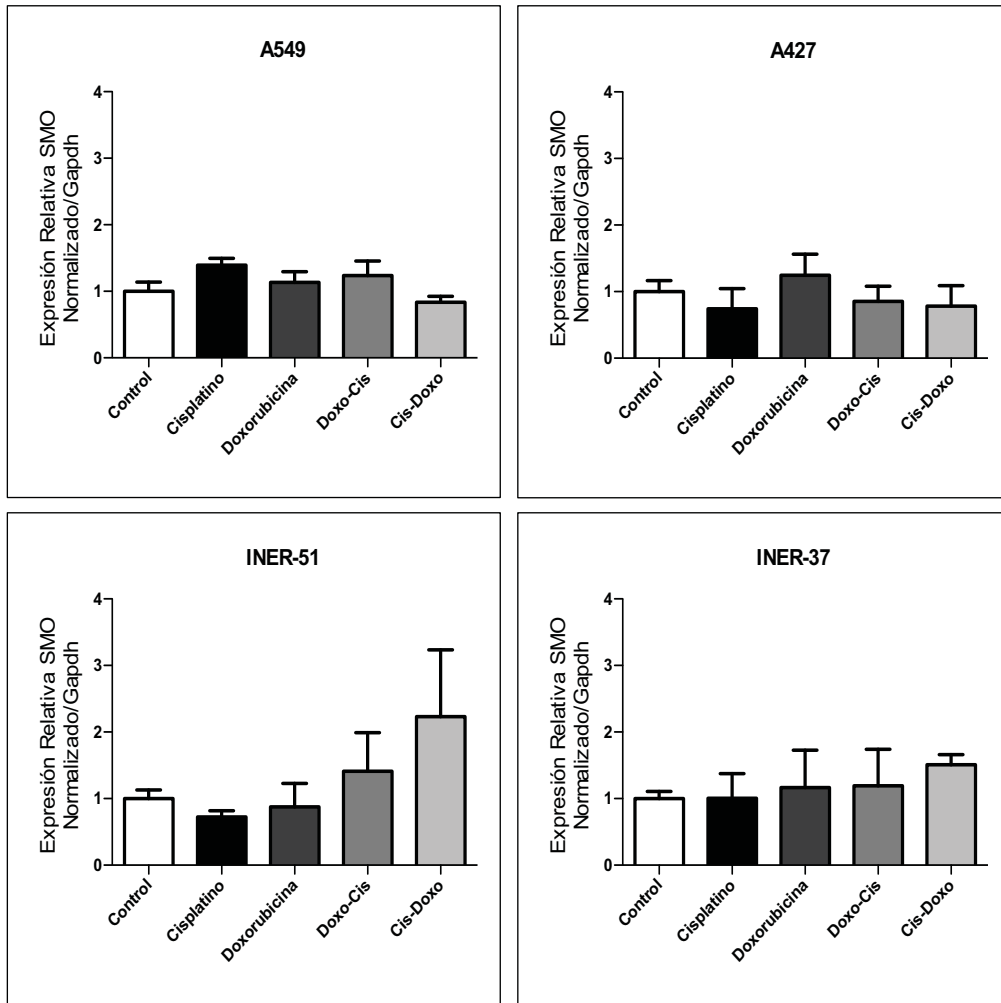


Figura 17 Análisis de mRNA de SMO en líneas celulares de cáncer pulmonar. Ensayos de qPCR utilizando sondas de hidrólisis normalizando con GAPDH, las imágenes representa 3 ensayos independientes, se realizó ANOVA de una sola vía, con pruebas de comparación múltiple de Dunnett siendo significativo $*p < 0.05$

Respecto al gen GLI-1 último gen y efector de la vía Hedgehog, un factor de transcripción que tiene una regulación autocrina, no se observaron cambios significativos en los patrones de expresión en los diferentes modelos y tratamientos farmacológicos, sin embargo la línea A549 tiene una tendencia al aumento del mRNA en los tratamientos independientes (Figura18).

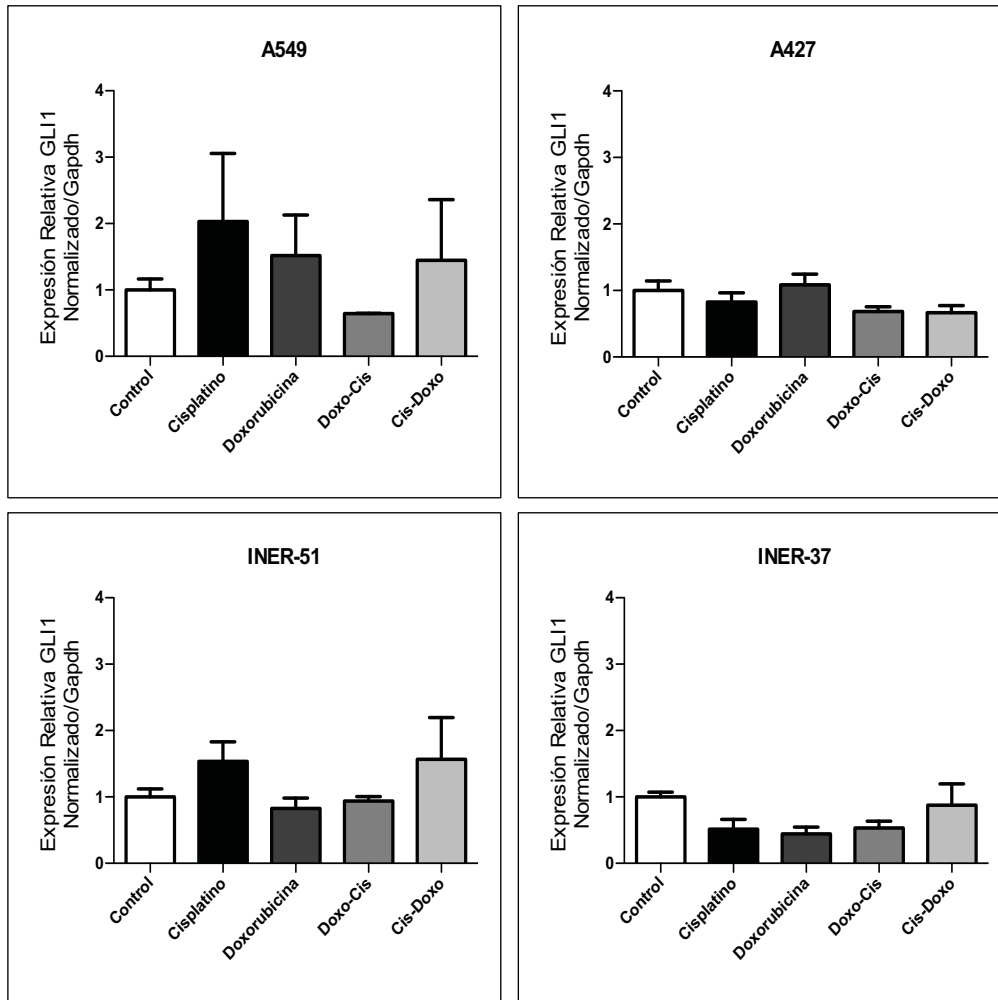


Figura 18 Análisis de mRNA de GLI-1 en líneas celulares de cáncer pulmonar. Ensayos de qPCR utilizando sondas de hidrólisis normalizando con GAPDH, las imágenes representa 3 ensayos independientes, se realizó ANOVA de una sola vía, con pruebas de comparación múltiple de Dunnett siendo significativo $*p < 0.05$

El análisis de MEOX2 gen de relevancia clínica y posible regulador de la vía Hedgehog no se observan diferencia significativas en los modelos de estudio ni tampoco en los tratamientos farmacológicos.(Figura19).

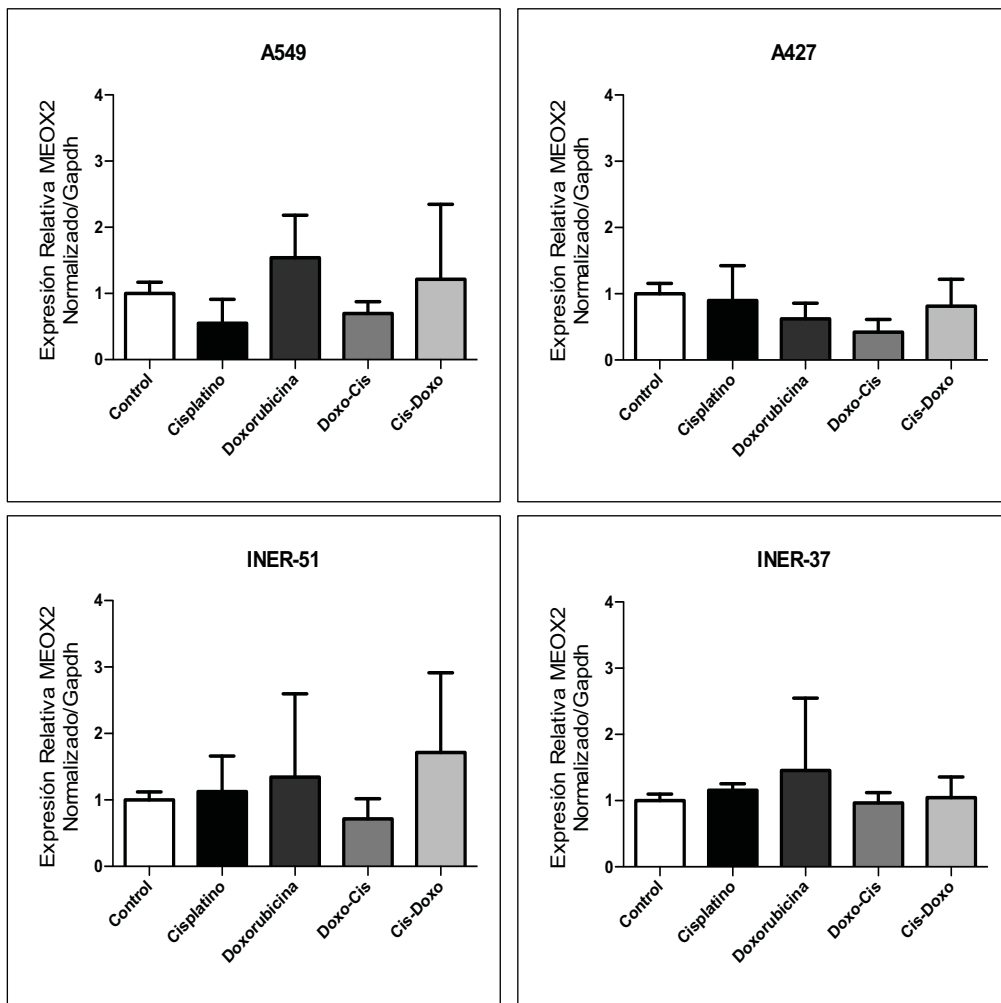


Figura 19 Análisis de mRNA de MEOX2 en líneas celulares de cáncer pulmonar. Ensayos de qPCR utilizando sondas de hidrólisis normalizando con GAPDH, las imágenes representa 3 ensayos independientes se realizó ANOVA de una sola vía, con pruebas de comparación múltiple de Dunnett siendo significativo $*p < 0.05$

El análisis del patrón de expresión del gen ABCG2 blanco de GLI-1, no muestra cambios significativos en los modelos celulares, sin embargo es de destacar una tendencia en las líneas caucásicas hacia la alza, mientras que en la líneas derivadas de pacientes mexicanos se observa un disminución en la INER51.

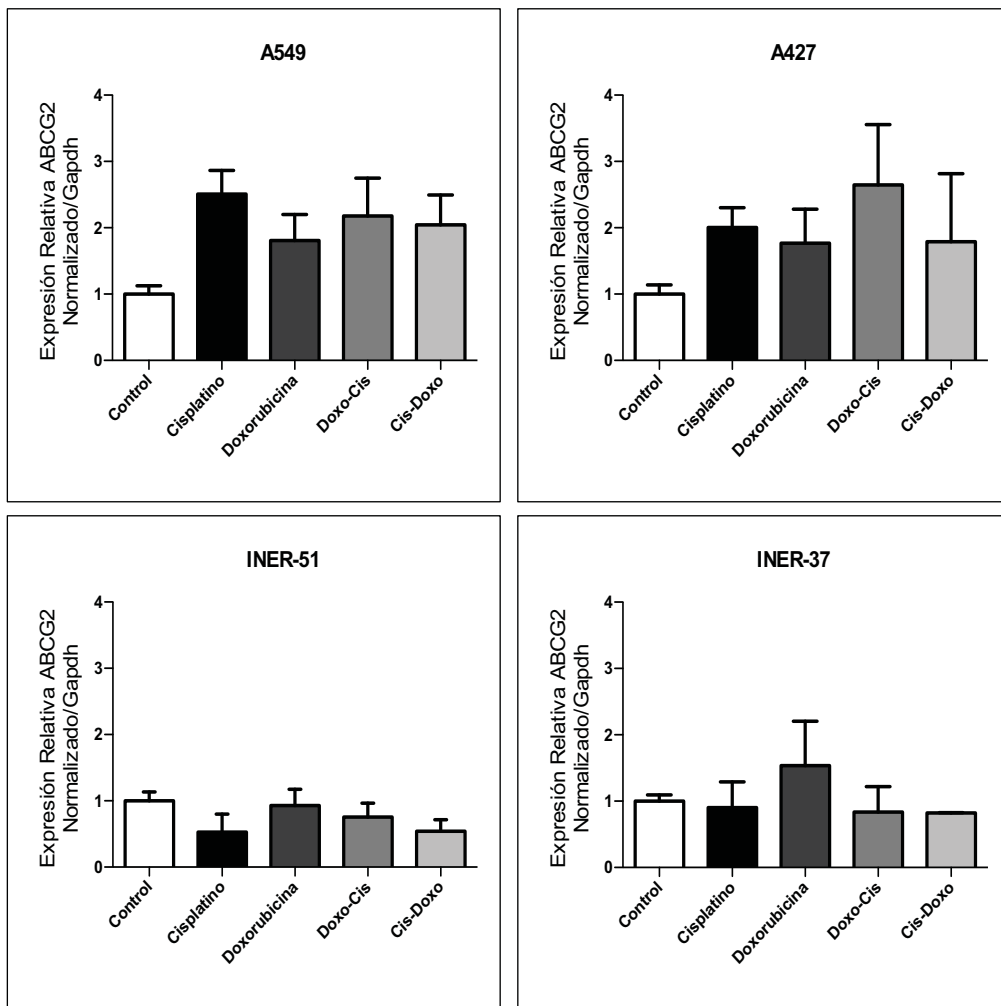


Figura 20 Análisis de mRNA de ABCG2 en líneas celulares de cáncer pulmonar. Ensayos de qPCR utilizando sondas de hidrólisis normalizando con GAPDH, las imágenes representa 3 ensayos independientes se realizó una ANOVA de una sola vía, con pruebas de comparación múltiple de Dunnett siendo significativo * $p < 0.05$

9.4.3 Análisis de cambios en el perfil transcripcional y epigenético en secuencias promotoras del gen GLI-1 como blanco génico de MEOX2 en presencia de fármacos oncológicos en cáncer pulmonar

Para analizar el perfil epigenético asociado a marcas de activación (H3K4me3 y H3K27Ac) y de represión (H3K9me3 y H3K27me3) se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con anticuerpos específicos para estas marcas, adicionalmente se incluyo a MEOX2 y RNA POL II, para evidenciar el enriquecimiento sobre la región promotora de GLI-1, cerca del sitio de inicio de la transcripción, esto en las líneas celulares A549 y A427, donde se observo un enriquecimiento de MEOX2 en las regiones 7, 6 y 3 en una escala de 200% sobre el valor del DNA input, en la línea A427 en las mismas regiones pero en un 100% sobre el input, A549 no presenta enriquecimiento de la RNA POL II, mientras que A427 se muestra un enriquecimiento de hasta 150% sobre el input en la región 7 a la región 2.

En cuanto a las marcas de activación la A549 solo presenta un enriquecimiento de hasta 40% en la región 3, mientras que la A427 tiene un enriquecimiento del 20% de la región 7 a la región 2, en cuanto a la marca H3K4me3 es muy discreto el enriquecimiento menor al 10% en ambas líneas, para las marcas de represión H3K27me3 el enriquecimiento es de un 15% de las regiones 7 a 2 en las 2 líneas, mientras que para H3K9me3 en A549 se observa un incremento de la región 7 a la 2 con un pico máximo de 40% en la región, en cuanto a la A427 se observa un enriquecimiento menor al 15% respecto al input (Figura 21).

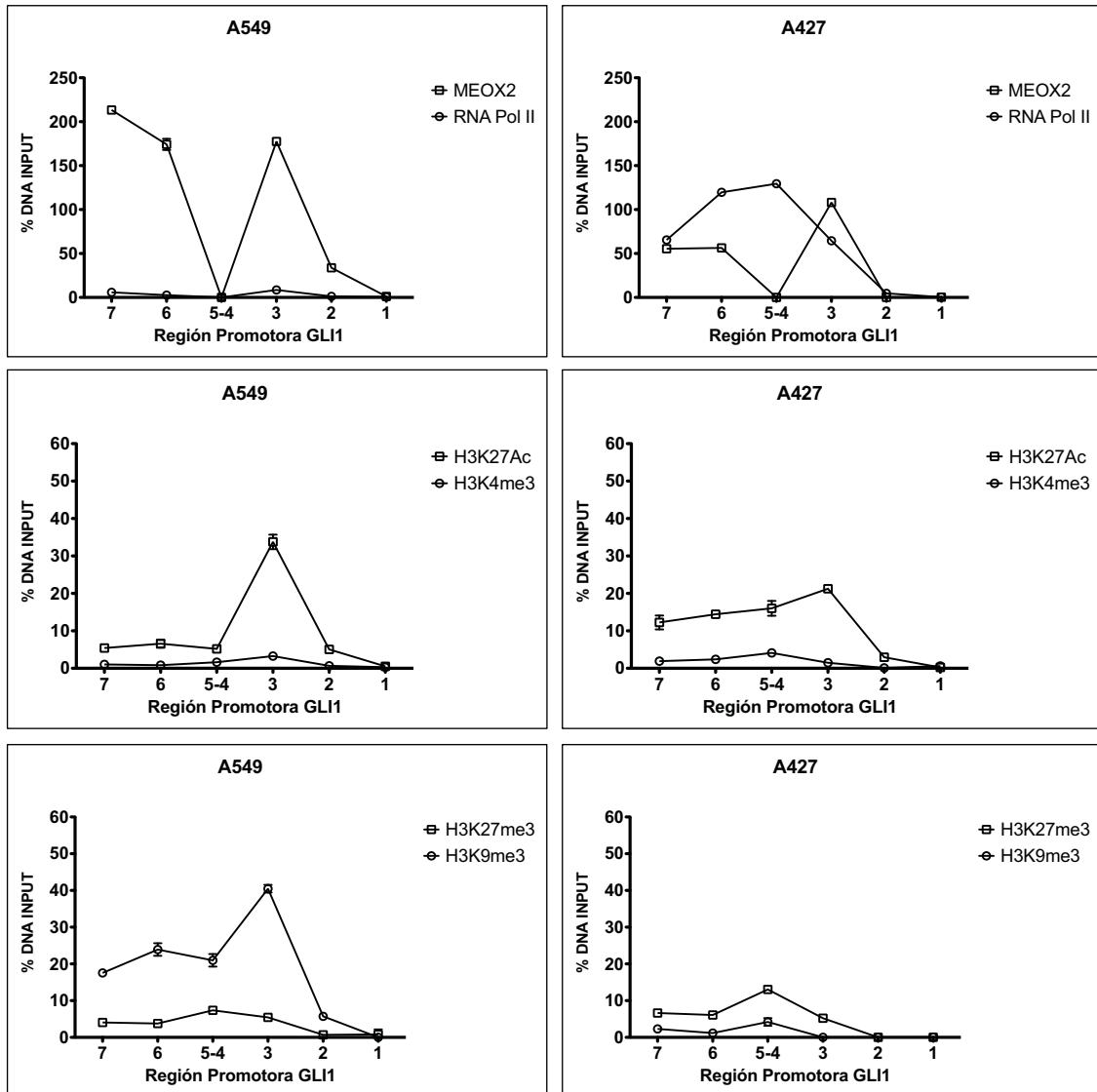


Figura 21 Análisis del código histónico sobre el promotor de GLI-1 en líneas celulares. Ensayos de ChIP-qPCR de marcas de histonas tomando como control DNA no IP, las gráficas representan 3 experimentos independientes expresadas en %.

Para evaluar la remodelación epigenética mediada por fármacos de primera línea utilizados para el tratamiento de cáncer pulmonar, se utilizó cisplatino con un concentración de 8 μ M en un lapso de 48 horas, en las líneas A549 y A427, siendo las mismas marcas inmunoprecipitadas anteriormente, en la figura 22

se muestra la línea A549 y la región promotora de GLI-1, tras el reto farmacológico no se pierde el enriquecimiento de MEOX2 en las regiones 7, 6 y 3, mientras que para la RNA POL II hay un incremento de hasta un 60% sobre el input después del reto farmacológico desde la región 7 hasta la región 2, en cuestión a las marcas de activación H3K4me3 hay un enriquecimiento después del tratamiento desde la región 6 a la región 1 siendo más evidente en la región 3 con un 50% sobre el input, en contraste H4K27Ac hay una disminución en todas las regiones, en cuestión a las marcas de represión H3K9me3 hay un enriquecimiento tras el reto farmacológico con un pico máximo de hasta 90% sobre el input en la región 3, mientras que para H3K27me3 se mantienen los niveles de enriquecimiento respecto al control, esto sugiere una reprogramación epigenética en la región promotora de GLI-1, promoviendo un estado de cromatina bivalente, derivado del estrés citotóxico del cisplatino.

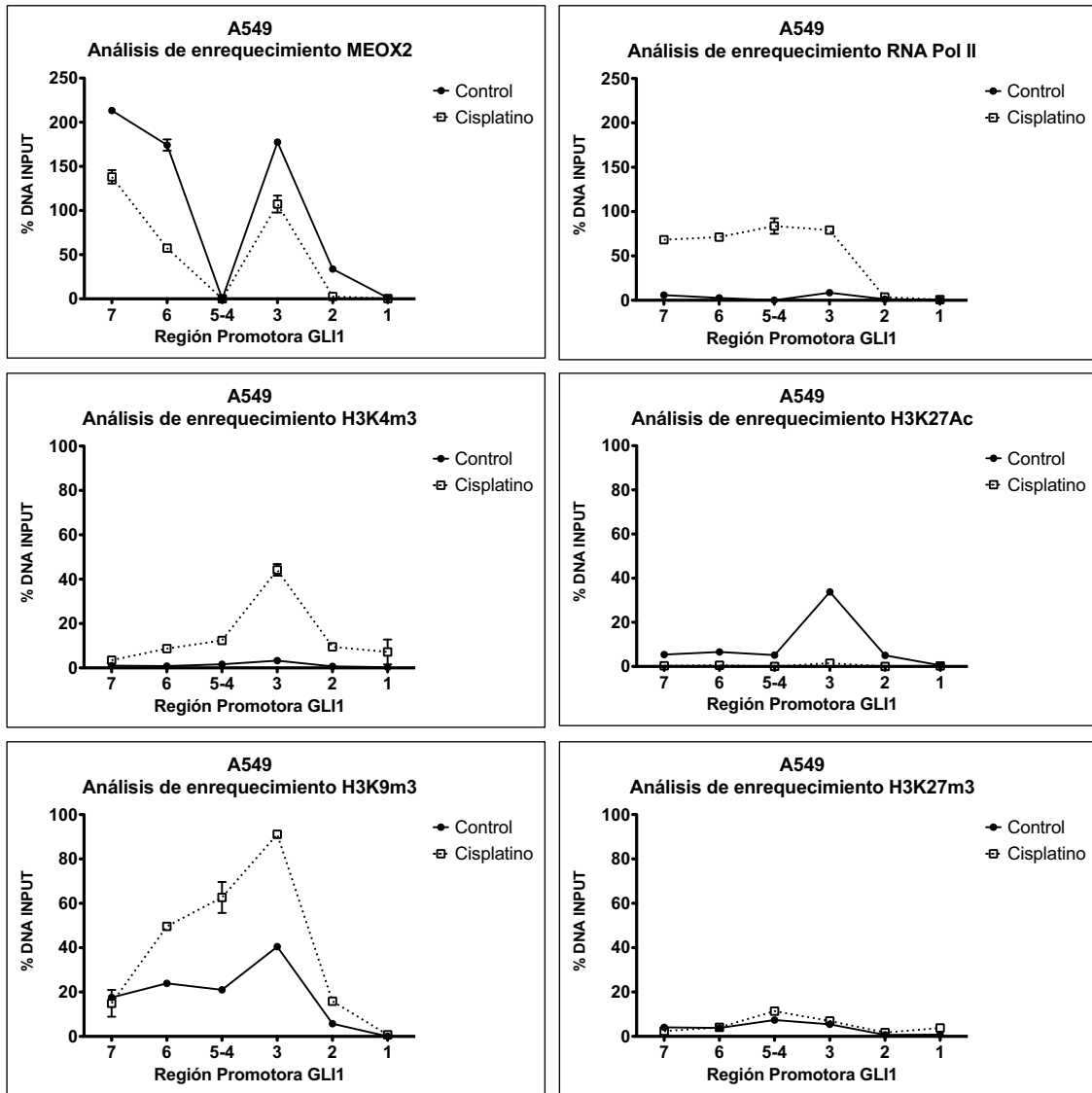


Figura 22 Análisis del código histónico sobre el promotor de GLI-1 en A549 frente al reto farmacológico. Ensayos de ChIP-qPCR de marcas de histonas tomando como control DNA no IP, reto farmacológico con cisplatino 8 μ M. A 48 horas, las imágenes representan 3 experimentos independientes expresadas en %.

La línea celular A427 mostrada en la figura 23 muestra valores de enriquecimiento de MEOX2 muy similares en la región 6 y 3, de igual manera la RNA POL II de la región 7 a la región 2, teniendo un incremento en la región 3 de hasta 150% sobre el input, en cuestión a las marcas de activación H3K4me3 no se observan cambios, al igual que la marca H3K27Ac una ligera disminución del 20% al 5% sobre el input tras el reto con cisplatino en la región 7 a la 2, en cuestión a las marcas de represión hay un enriquecimiento de H3K9me3 tras el reto farmacológico de la región 7 a la región 2 con un aumento máximo de hasta 50% sobre el input en la región 3, en cuanto a H3K27me3 no hay diferencia tras el tratamiento oncológico se mantiene en un 20% sobre el input, sugiriendo una reprogramación a un estado de represión transcripcional debido al estrés citotóxico del cisplatino.

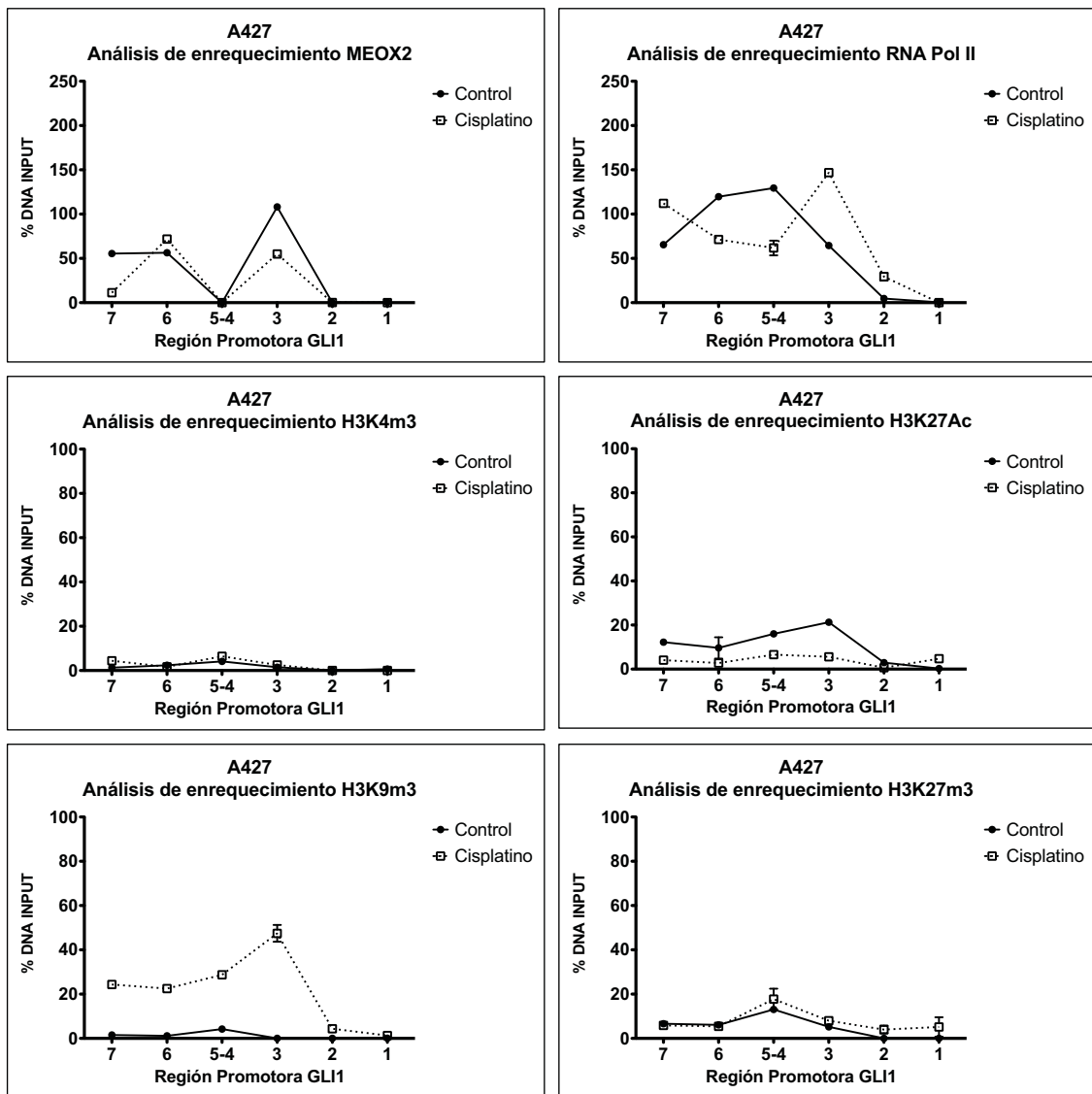


Figura 23 Análisis del código histónico sobre el promotor de GLI-1 en A427 frente al reto farmacológico. Ensayos de ChIP-qPCR de marcas de histonas tomando como control DNA no IP, reto farmacológico con cisplatino 8 μ M. Se realizó a 48 horas, las imágenes representan 3 experimentos independientes expresadas en %.

9.4.4 Análisis de la capacidad de resistencia al fármaco oncológico cisplatino en líneas celulares de cáncer pulmonar.

Para evaluar la capacidad de respuesta a fármacos oncológicos de primera línea en cáncer pulmonar como lo es el Cisplatino, se midió la actividad de deshidrogenasas en 4 modelos celulares mediante ensayos de MTT un método indirecto para evaluar la actividad metabólica, se utilizó una dosis creciente de cisplatino en un rango de 0.1 μ M a 100 μ M siendo las líneas derivadas de pacientes caucásicos (A549 y A427) las que tienen una mayor resistencia al fármaco con una IC50 en promedio de 20 μ M, mientras que las líneas celulares derivadas de pacientes mexicanos son mucho más sensibles y tienen una IC50 en promedio de 9 μ M. (Figura 22).

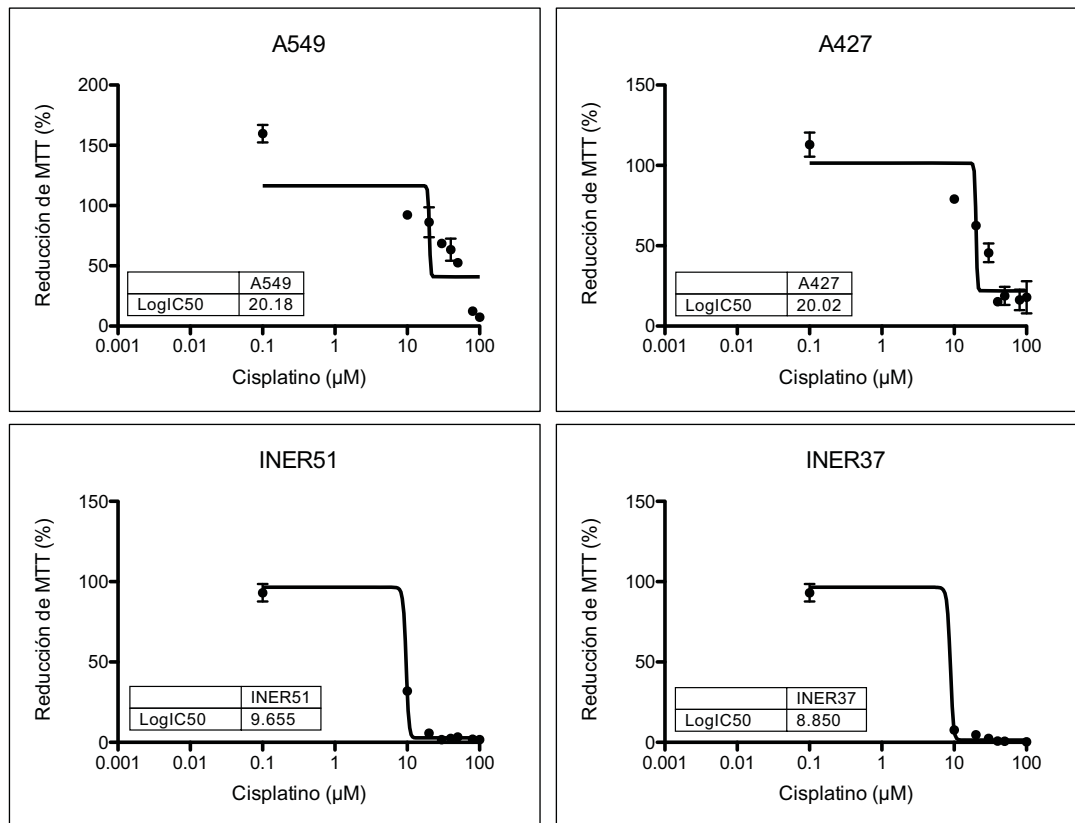


Figura 24 Determinación de la IC50 en respuesta a cisplatino en líneas celulares. Ensayos para evaluar la actividad de deshidrogenasas mediante MTT utilizando cisplatino en dosis crecientes, ensayos realizados a 48 horas, se determinó la IC50 mediante una regresión no lineal log(inhibidor) VS respuesta.

Para evidenciar la resistencia a fármacos oncológicos se utilizaron los parámetros previamente obtenidos de las IC50 de las líneas celulares, utilizando A549 con una IC50 de 20.18 µM y la INER37 con una IC50 de 8.85 µM, teniendo un reto farmacológico de Cisplatino continuo a una concentración IC25 10.10 µM y 4.42 µM respectivamente durante 15 días, mostrando al término de este periodo en la línea A549 un incremento en la IC50 teniendo un valor final de 49.97 µM. incrementándose cerca del doble el valor inicial, mientras que para la línea INER37 al término de los 15 días tubo un valor final de 29.65 µM. teniendo un incremento casi de 4 veces la IC50 inicial, estableciendo así líneas celulares resistentes a Cisplatino (Figura 25).

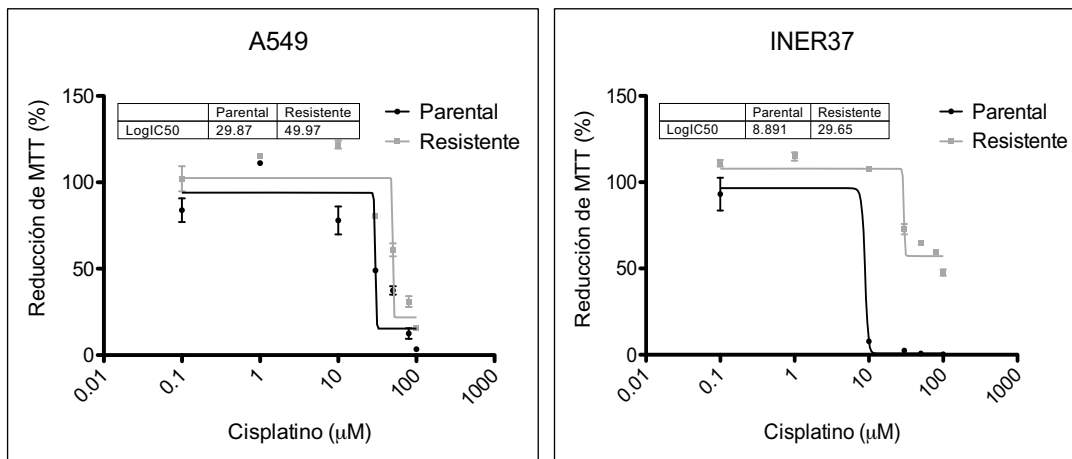


Figura 25 Resistencia a cisplatino en líneas celulares. Generación de líneas resistentes a cisplatino tras el reto constante farmacológico durante 15 días, se utilizó la IC₂₅ 10.10 µM. y 4.425 µM. Respectivamente. Ensayos para evaluar la actividad de deshidrogenasas mediante MTT utilizando cisplatino en dosis crecientes, ensayos realizados a 48 horas, se determinó la IC₅₀ mediante una regresión no lineal log(inhibidor) VS respuesta.

En la figura 26 se muestran los cambios a nivel de proteína de las células parentales y resistentes a Cisplatino, en las cuales se observa un incremento en los niveles de expresión en A549 respecto a la proteína de GLI-1, siendo significativo el cambio cuando se utiliza el fármaco a 48 horas en las células resistentes, en contraste para MEOX2 se observa una disminución en los niveles de expresión de la proteína para las células resistentes a Cisplatino, tanto en condiciones de control como con exposición a 48 horas de Cisplatino.

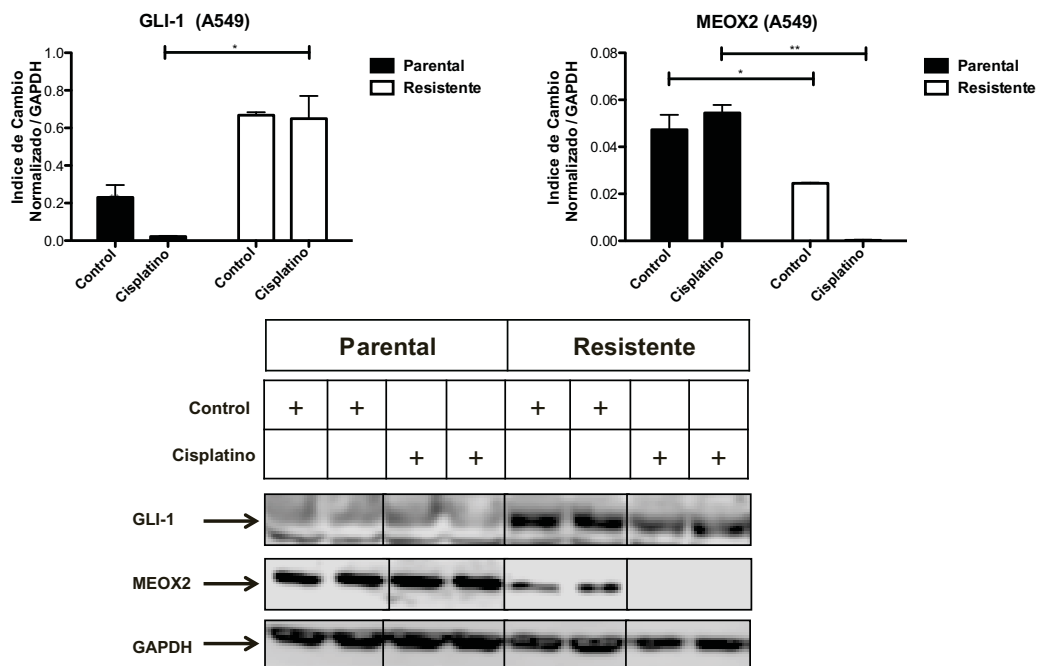


Figura 26 Análisis de la expresión de proteínas en A549 resistentes a cisplatino. Análisis por WesternBlot normalizando las muestras con GAPDH, como control células parentales, se utilizaron los títulos GLI-1 (1:500), MEOX2 (1:1500) y GAPDH (1:300) imagen representativa de 3 experimentos independientes, se realizó una *t de student* siendo significativo * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$

9.5 Participación de los factores de transcripción MEOX2 y GLI-1 en la quimio-resistencia del cáncer pulmonar

Para evidenciar la participación transcripcional de MEOX2 sobre los blancos génicos, como GLI-1 y su participación en la actividad de deshidrogenasas y su capacidad de resistencia a fármaco oncológico, se evaluó por MTT la respuesta ante Cisplatino bajo la supresión de la expresión génica de MEOX2, GLI-1 y su combinación (iMX/iGL) mediante el uso de RNA interferentes, en la figura 27 se muestra las líneas celulares de cáncer pulmonar, en donde en A549 se observa una disminución en la IC50 con el silenciamiento de MEOX2 (16.75 μ M), GLI-1 (10.07 μ M) y en la combinación (9.54 μ M), siendo la condición de combinación e inhibición de GLI-1 las que tienen mayor efecto en la actividad de deshidrogenasas con un IC50 de 10 μ M en promedio, comparada con una secuencia aleatoria que no reconoce ningún mRNA mensajero, así mismo en la línea celular A427 aunque el efecto es menor también hay una disminución en la IC50 del silenciamiento génico de MEOX2 (10.44 μ M), GLI-1 (17.88 μ M) y combinación (16.98 μ M), siendo MEOX2 donde se observa mayor efecto con respecto al control, en cuanto a la línea celular NH2347 solo se observa una disminución de la actividad de deshidrogenasas en el silenciamiento de MEOX2 y la combinación, teniendo una IC50 de 1.08 μ M y 1.36 μ M respectivamente, en la línea celular H1975 no se observa ningún cambio en ningún silenciamiento genético.

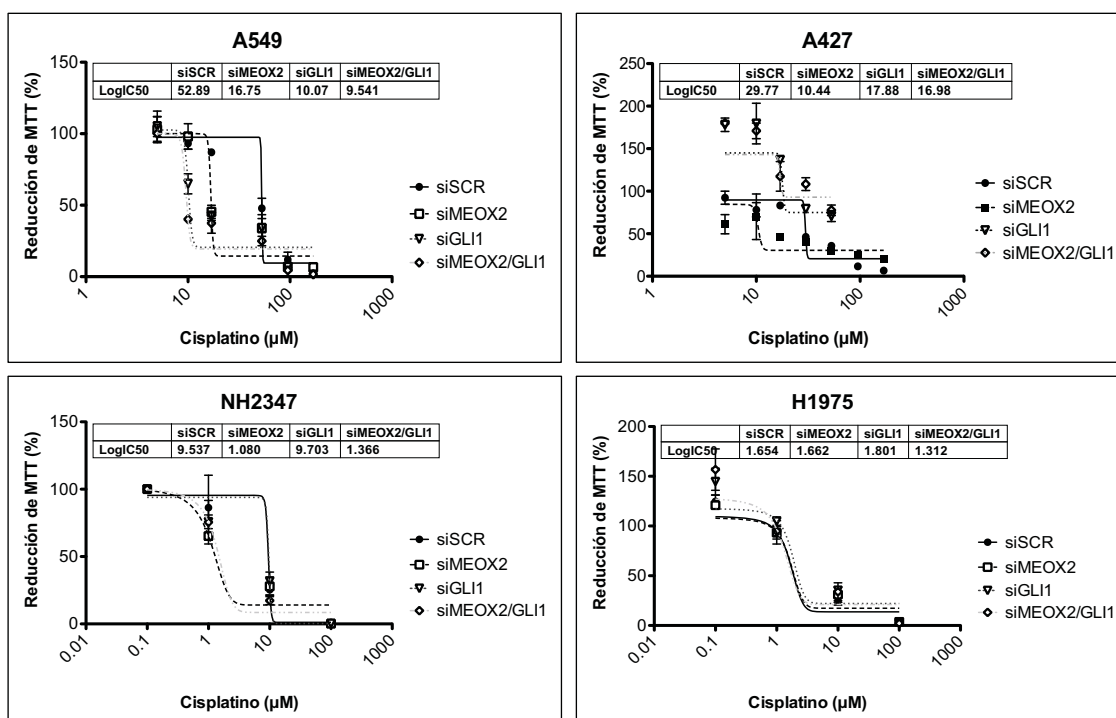


Figura 27 Participación de MEOX2 y GLI-1 en la viabilidad celular bajo el tratamiento con cisplatino. Ensayos para evaluar la actividad de deshidrogenasas mediante MTT utilizando cisplatino en dosis crecientes, ensayos realizados a 48 horas, utilizando siRNAs específicos, se determinó la IC50 mediante una regresión no lineal log(inhibidor) vs respuesta.

9.5.1 Análisis de la participación del eje transcripcional MEOX2-GLI-1 en la capacidad de quimio-resistencia (cisplatino) en cáncer pulmonar.

Se realizaron ensayos de tiempo real para la detección de mRNAs maduros de los genes MEOX2 y GLI-1 tras el silenciamiento de MEOX2 y saber su impacto en la regulación de blancos génicos en condiciones control y Cisplatino. Para las líneas celulares A549 y A427 se observa una disminución en los niveles de mRNA de MEOX2 tanto en condiciones de silenciamiento de MEOX2 control y cisplatino, corroborando el efecto del silenciamiento genético de este gen, y solo en la línea A427 hay una disminución significativa del mRNA cuando se utiliza el silenciamiento y cisplatino, mientras que en la línea A549 no hay diferencias tras el silenciamiento en ambas condiciones, en la línea celular H1975 no fue posible la detección de mRNA maduro de MEOX2, posiblemente a que esta línea no exprese dicho gen o los niveles sean indetectables por el equipo. Al evaluar a GLI-1 se observa una disminución significativa en la condición del silenciamiento de MEOX2 y cisplatino casi en su totalidad para la línea A549, mientras que para la A427 hay una disminución de hasta un 70% en relación al control, para la línea celular H1975 la cual no fue posible detectar MEOX2 no se observa una disminución del mRNA de GLI-1 tanto en condiciones control como de reto farmacológico a cisplatino (Figura 28).

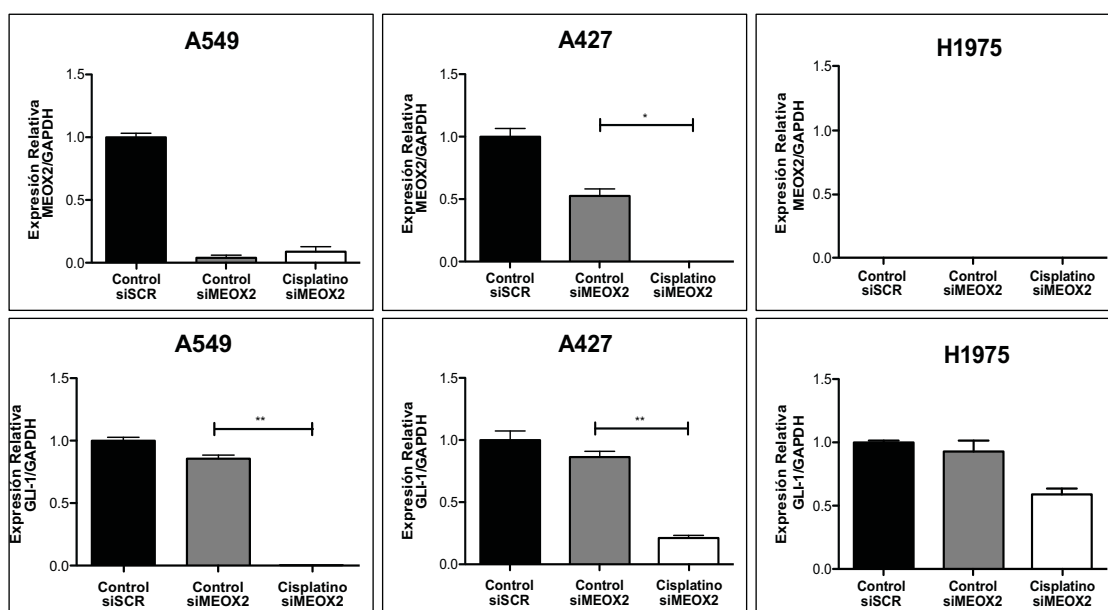


Figura 28 Análisis de expresión de MEOX2 y GLI-1 mediante el silenciamiento de MEOX2 en tratamientos con cisplatino. Ensayos de qPCR utilizando sondas de hidrólisis normalizando con GAPDH, las imágenes representa 3 ensayos independientes, se realizó una *t de student* siendo significativo * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$

9.5.2 Análisis de cambios en el nivel de proteína de GLI-1 como blanco génico del factor transcripcional MEOX2 en líneas celulares de cáncer pulmonar

Al observar el posicionamiento de MEOX2, RNA POL II y marcas epigenéticas de activación (H3K27Ac y H3K4me3) sobre la región promotora de GLI-1, se sugirió que esté bajo un posible control transcripcional de MEOX2, por lo que se realizaron ensayos de silenciamiento genético para evidenciar los niveles de proteína por WesternBlot en la línea celular A427 (figura 29), mostrando una disminución en la proteína de GLI-1 de manera significativa tras el silenciamiento de MEOX2 corroborando el efecto del silenciamiento genético y lo previamente observado a nivel de mRNA.

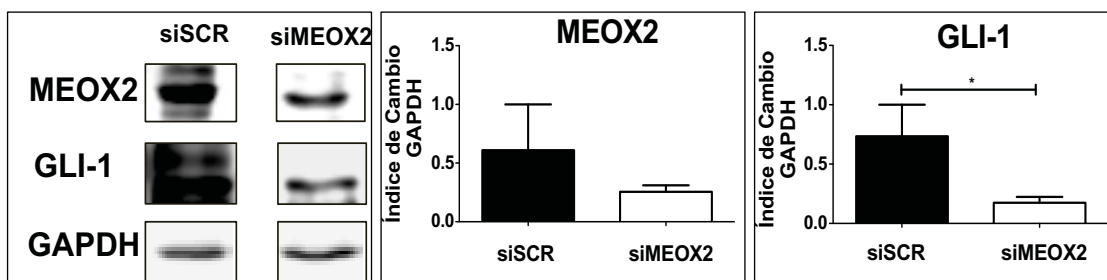


Figura 29 Validación del efecto del silenciamiento genético de MEOX2. Análisis por WesternBlot normalizando las muestras con GAPDH, como control un siRNA scramble, se utilizaron los títulos GLI-1 (1:500), MEOX2 (1:1500) y GAPDH (1:300) imagen representativa de 3 experimentos independientes, se realizó una *t de student* siendo significativo * $p < 0.05$

Para evaluar el efecto del cisplatino y su participación en la regulación transcripcional, se realizaron ensayos en A549 y A427, de silenciamiento genético de MEOX2 y exposición a fármaco, mostrando disminución de GLI-1 bajo el silenciamiento de MEOX2 frente al reto farmacológico en concentraciones de $8\mu\text{M}$. comparado con la secuencia control, esto es similar en la línea A427 (Figura 30).

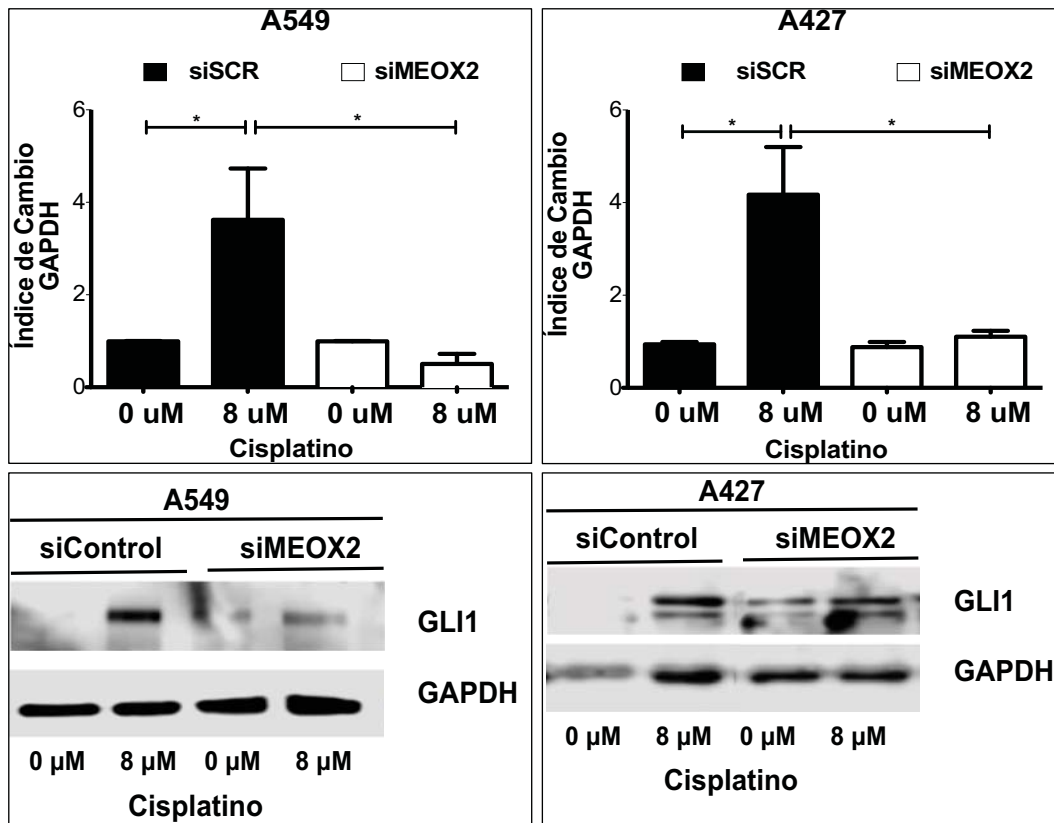


Figura 30 Regulación transcripcional de MEOX2 sobre GLI-1 en Líneas celulares de cáncer pulmonar. Análisis por WesternBlot normalizando las muestras con GAPDH, como control siRNA scramble, el reto con cisplatino 8µM se realizó a 48 horas. se utilizaron los títulos GLI-1 (1:500), MEOX2 (1:1500) y GAPDH (1:300) imagen representativa de 3 experimentos independientes, se realizó una *t de student* siendo significativo * $p < 0.05$

También se evaluó el silenciamiento de MEOX2, GLI-1 y la combinación en la línea celular A549 y H1975. Teniendo como resultado en la línea A549 para la proteína de GLI-1 una disminución en el silenciamiento de MEOX2, GLI-1 y combinación en las condiciones control, no se observó esto en la condición con cisplatino, en cuanto a la línea H1975 solo se observa una disminución de la proteína en el silenciamiento de GLI-1 y combinación en condiciones control, mientras que para la condición de cisplatino no se observan cambios significativos. En cuanto a los niveles de proteína de MEOX2 la línea celular A549 tiene una disminución significativa de la proteína tras el silenciamiento de MEOX2, GLI-1 y combinación en las condición de control, sin embargo este efecto no se ve en la condición con cisplatino, para la línea H1975 no se pudo detectar la proteína ni en condiciones control ni tratamiento, esto igual que en el mRNA mensajero (figura 31).

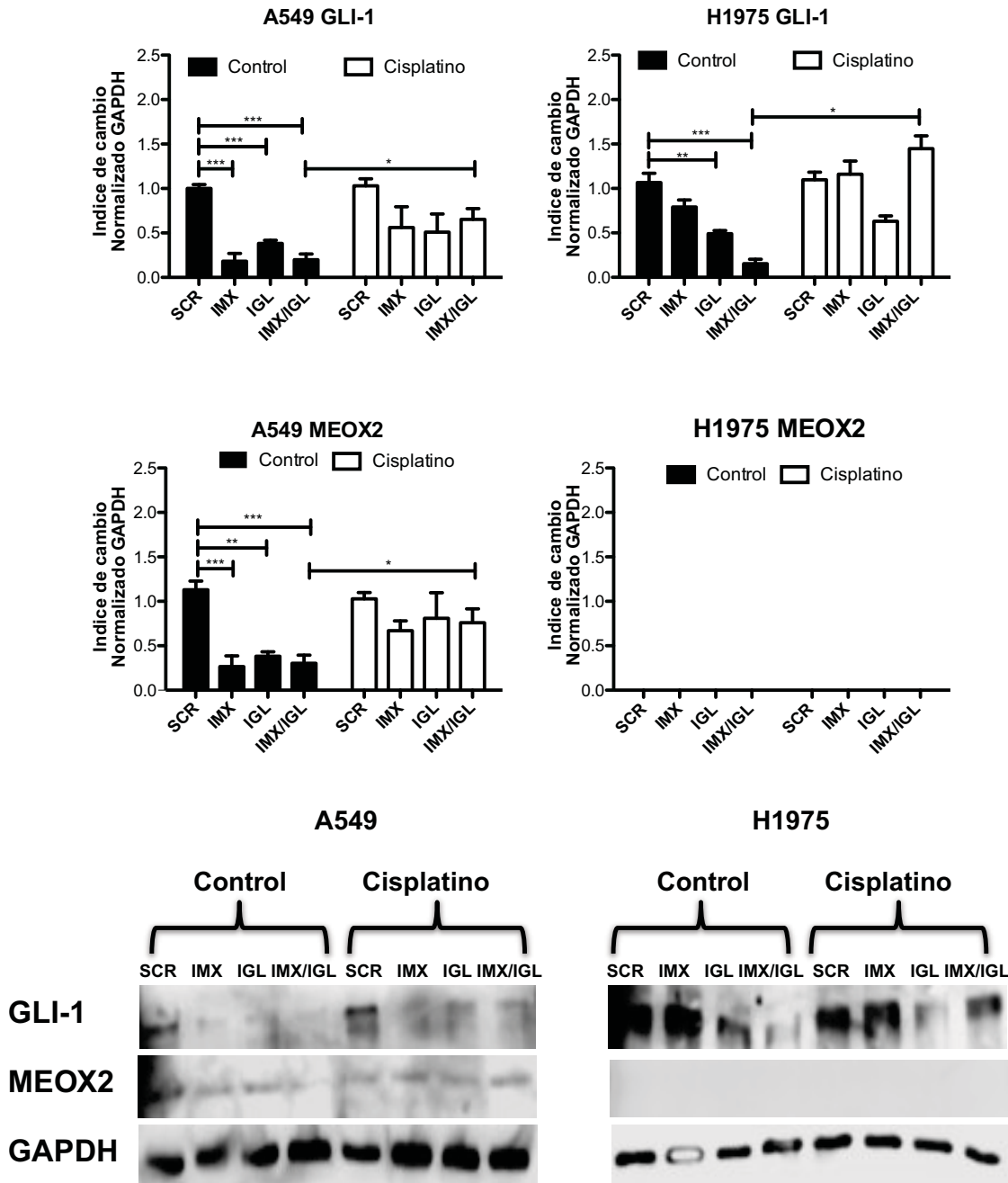


Figura 31 Participación de MEOX2 como regulador positivo de GLI-1 en Líneas celulares de cáncer pulmonar. Análisis por WesternBlot normalizando las muestras con GAPDH, como control siRNA *scramble*, el reto con cisplatino 8µM se realizó a 48 horas. se utilizaron los títulos GLI-1 (1:500), MEOX2 (1:1500) y GAPDH (1:300) imagen representativa de 3 experimentos independientes, se realizó una ANOVA de una sola vía, con pruebas de comparación múltiple de Dunnett y una *t de student* siendo significativo * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

9.6 Análisis de la participación funcional de MEOX2 y GLI-1 en la proliferación celular del cáncer pulmonar

La estrategia utilizada para evaluar la participación de MEOX2 y GLI-1 fue la movilidad celular, y la capacidad de formar colonias, esto con el objetivo de analizar el impacto de MEOX2 como regulador transcripcional y GLI-1 como blanco génico de MEOX2.

9.6.1 Ensayos de migración de células tumorales mediante la técnica de herida (Horizontal)

Se analizó la capacidad de migración celular de los modelos celulares A549 y A427, utilizando la técnica de herida en condiciones de confluencia al 100% utilizando condiciones como control y reto con cisplatino a 48 horas, en la figura 32 se muestra el resultado a 0, 24 y 48 horas después de realizar la herida en el cultivo confluyente, se observa un aumento en la capacidad de migración de la línea celular A549 cuando es incubada con cisplatino comparada con el control, este aumento significativo es observado de 24 a 48 horas, de manera contraria en la línea celular A427 no muestra diferencia entre condiciones, tanto en el control como aquella incubada con cisplatino a 24 y 48 horas.

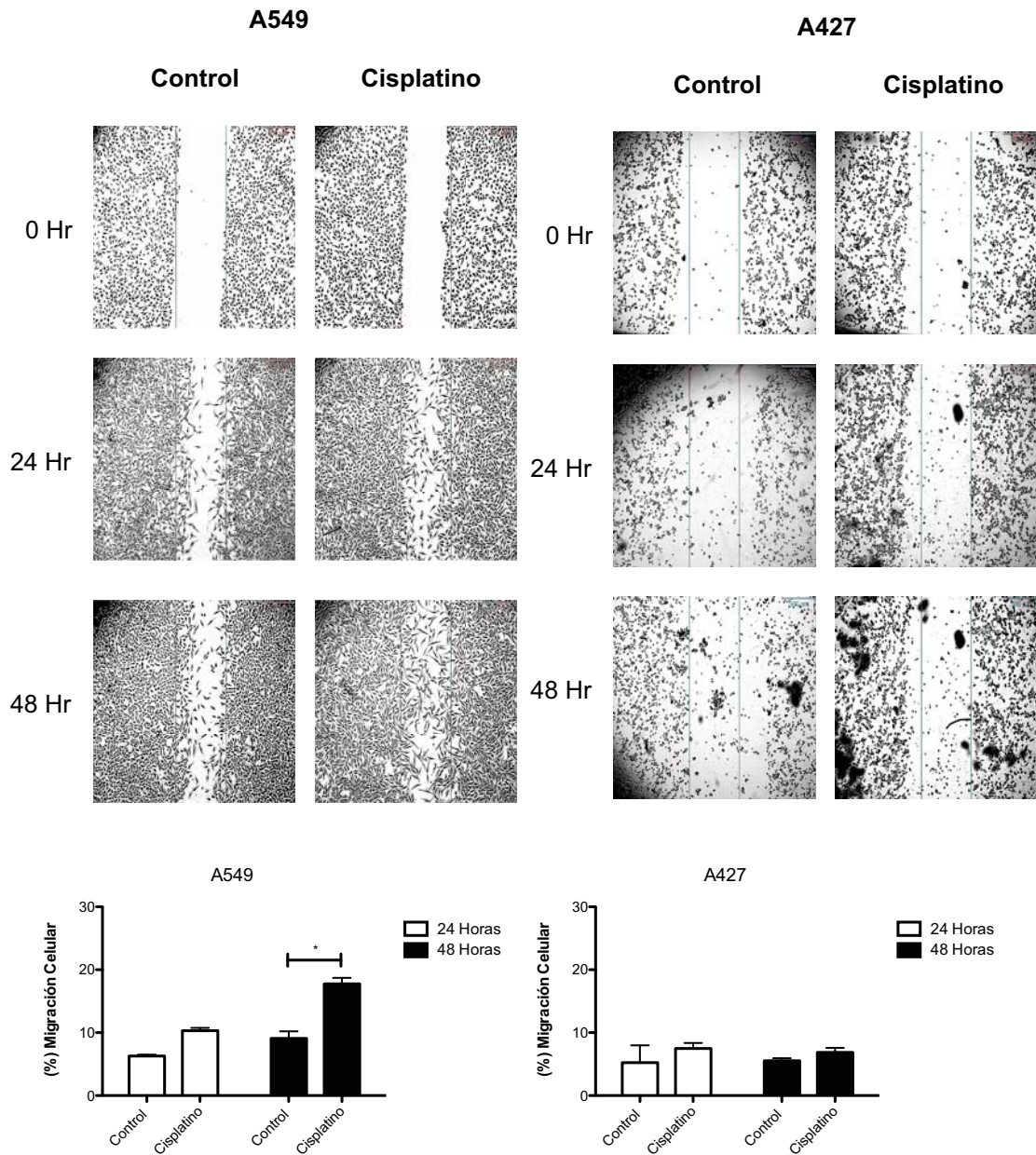


Figura 32 Migración celular en modelos celulares A549 y A427. Análisis de la movilidad celular mediante la herida en un cultivo celular en monocapa, el reto con cisplatino 8 μ M se realizó a 48 horas, se utilizó como control células sin tratamiento, imagen representativa de 3 experimentos independientes, se realizó ANOVA de una sola vía, con pruebas de comparación múltiple de Dunnett siendo significativo * $p < 0.05$

Dado que solo en la línea celular A549 se observó la capacidad de migración, se evaluó la línea A549 resistente a cisplatino, en la figura 33 se muestra como la línea resistente tiene una mayor capacidad de migración a 24 a 48 horas teniendo un incremento de manera significativa, comparada con la línea parental.

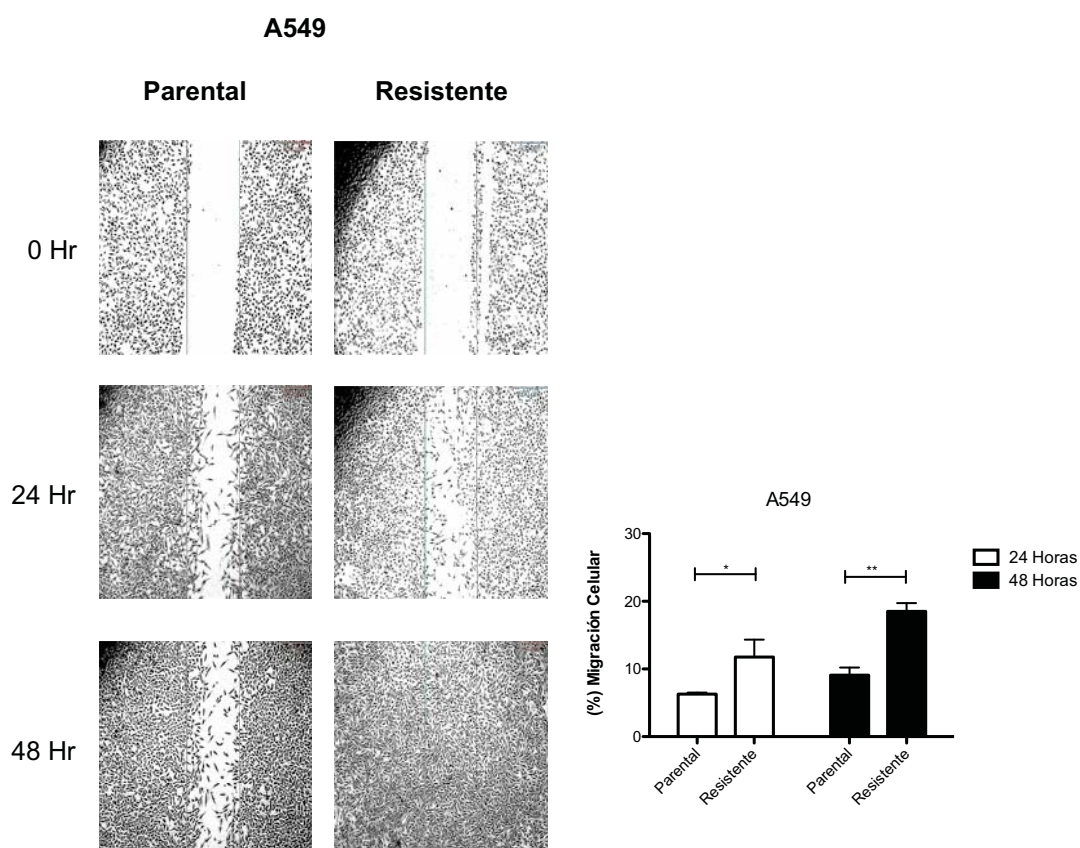


Figura 33 Migración celular en A549 parental vs resistente. Análisis de la movilidad celular mediante la herida en un cultivo celular en monocapa, el reto con cisplatino 8 μ M se realizó a 48 horas, se utilizó como control células parentales, imagen representativa de 3 experimentos independientes, se realizó una ANOVA de una sola vía, con pruebas de comparación múltiple de Dunnett siendo significativo * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$

La línea celular A549 resistente a cisplatino tiene una mayor capacidad de migración, para evaluar el impacto de MEOX2 y GLI-1 en el fenómeno de migración se realizaron ensayos de silenciamiento genético utilizando siRNAs específicos para inhibir MEOX2, GLI-1 y combinación, mostrando como resultado al tiempo de 24 horas una disminución significativa de la migración celular tras el silenciamiento de MEOX2 y no así en los demás tratamientos, sin embargo al término de las 48 horas se observa una disminución en las condiciones de silenciamiento de MEOX2 y combinación de MEOX2 y GLI-1

respecto al control, mientras que para el silenciamiento de GLI-1 no se observa diferencia significativa con respecto a la secuencia *scramble*, pero si una diferencia significativa respecto al silenciamiento de MEOX2 y combinación (figura 34).

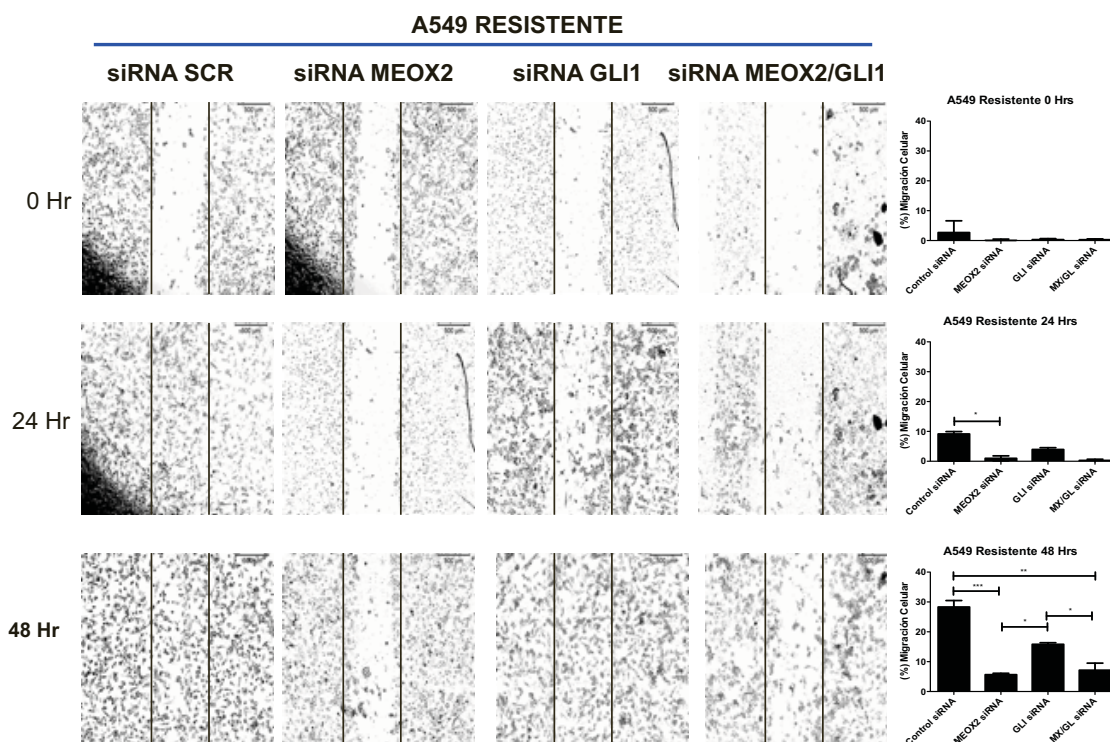


Figura 34 Migración celular de A549 resistente y su efecto tras el silenciamiento de MEOX2 y GLI-1. Análisis de la movilidad celular mediante la herida en un cultivo celular en monocapa, el reto con cisplatino 8 μM se realizó a 48 horas, se utilizó como control siRNA *scramble*, imagen representativa de 3 experimentos independientes, se realizó una ANOVA de una sola vía, con pruebas de comparación múltiple de Dunnett siendo significativo * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

9.6.2 Ensayos de migración de células tumorales mediante el uso de cámaras Transwell (Vertical)

No en todas las líneas celulares se puede evaluar la migración mediante la técnica de herida esto debido a que no llegan a formar una monocapa y tener una confluencia de 100%, debido a esto se utilizaron cámaras *transwell* que permiten evaluar la migración de modo vertical al atravesar una membrana con un poro de 8 μM , de la parte superior (medio sin Suero Fetal Bovino) a la parte inferior (medio con Suero Fetal Bovino), estos ensayos fueron realizados bajo el esquema de silenciamiento previo en tres líneas celulares de cáncer pulmonar, A549, NH2347 y H1975. Las líneas celulares A549 y NH2347 tienden a una disminución en la migración muy similar, en las condiciones con silenciamiento genético MEOX2, GLI-1 y combinación siendo mayor en el silenciamiento doble reduciendo cerca de la mitad la migración comparada con la secuencia *scramble*, para la línea celular H1975 la cual no expresa MEOX2 se observa una disminución significativa en la migración en las condiciones de

silenciamiento de GLI-1 y combinación, mientras que la condición de silenciamiento de MEOX2 no se observan diferencias significativas (figura 35).

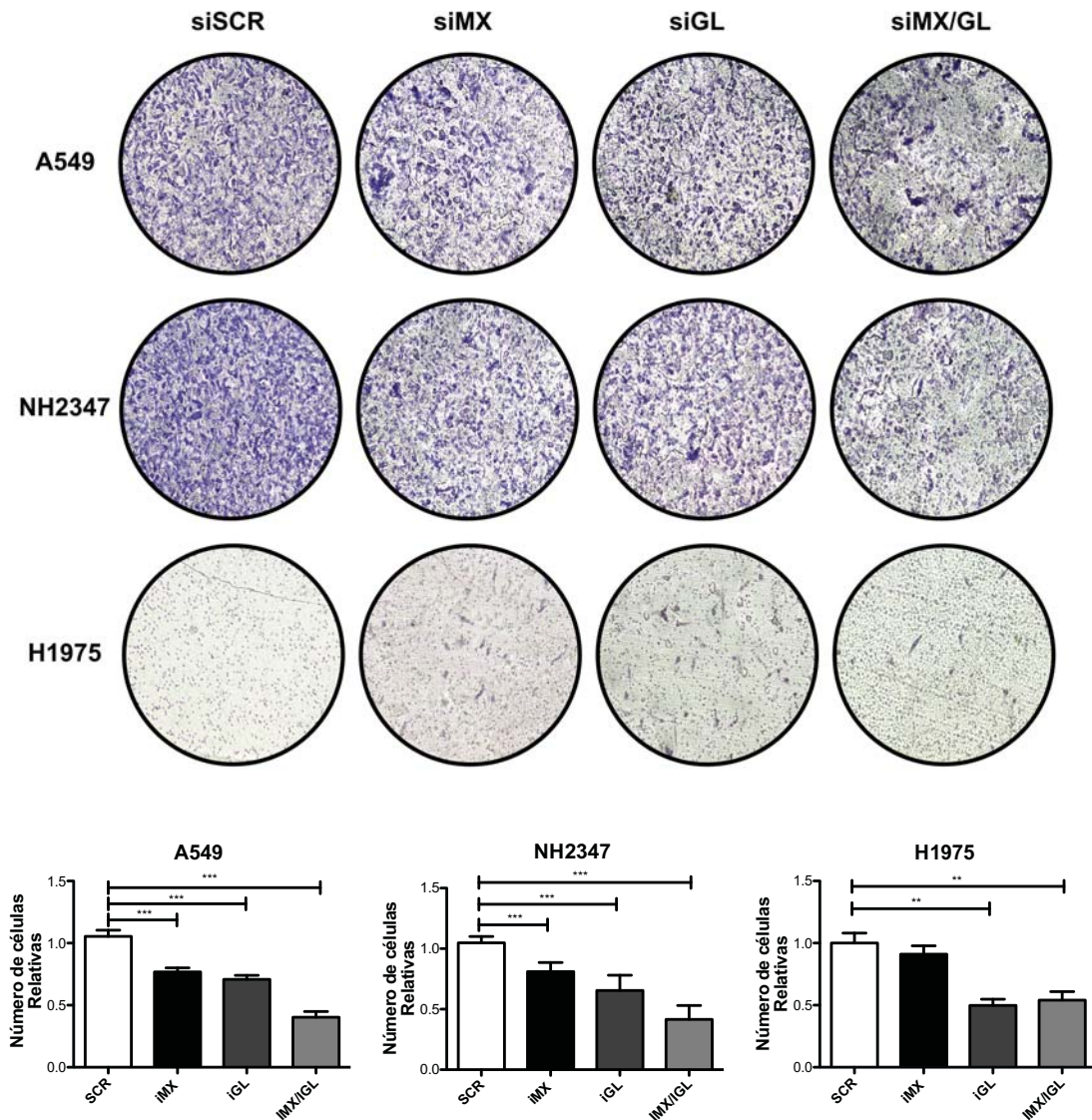


Figura 35 Migración celular mediante el uso de cámaras Transwell y el silenciamiento de MEOX2 y GLI-1 en líneas celulares de cáncer pulmonar. Análisis de la movilidad celular mediante cámaras Transwell, el reto con cisplatino 8 μ M se realizó a 48 horas, se utilizó como control siRNA *scramble*, imagen representativa de 3 experimentos independientes, se realizó una ANOVA de una sola vía, con pruebas de comparación múltiple de Dunnett siendo significativo * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

9.6.3 Análisis de la proliferación celular y formación de colonias mediante ensayos clonogénicos

Para evaluar la capacidad clonogénica se evaluaron las líneas celulares A549, NH2347 y H1975 utilizando 5,000 células en placas de 12 pozos y 10,000 células en placas de 6 pozos. Mostrando que las líneas celulares A549 y NH2347 tienen una disminución de manera significativa en el número de colonias tras el efecto del silenciamiento genético de MEOX2, GLI-1 y combinación siendo esta última condición la que tiene un mayor efecto en la disminución en la formación de colonias, mientras que la línea celular H1975

solo hay una disminución significativa tras el silenciamiento de GLI-1 y un tendencia no significativa en el silenciamiento combinado, en el silenciamiento de MEOX2 no se observan cambios significativos, esto previamente observado en los ensayos de migración celular (Figura 36).

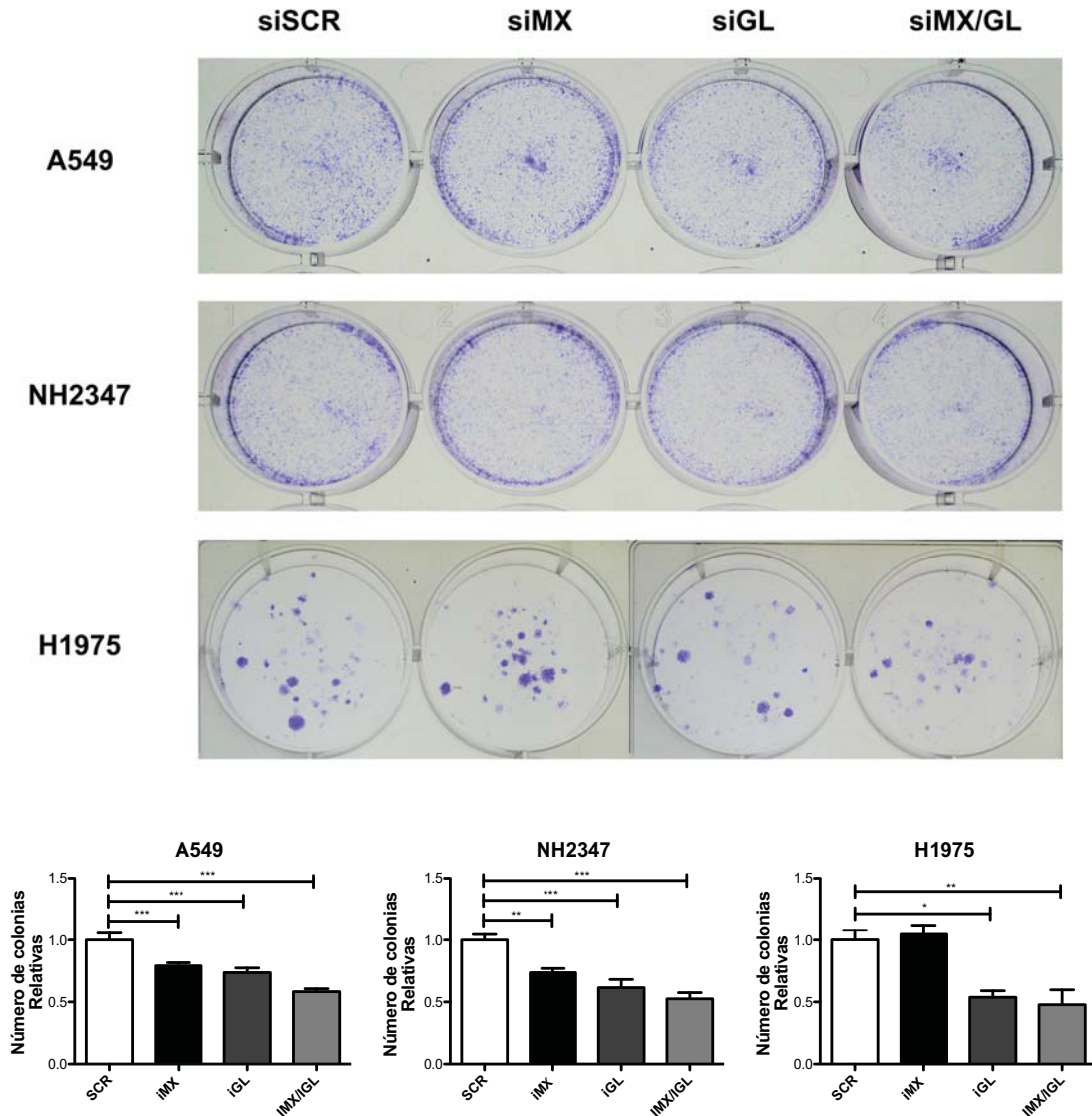


Figura 36 Capacidad de formación colonias tras el silenciamiento de MEOX2 y GLI-1 en líneas celulares de cáncer pulmonar. Análisis de la capacidad de formar colonias, mediante la expansión clonal, reto con cisplatino 8 μ M se realizó a 48 horas, se utilizó como control siRNA scramble, imagen representativa de 3 experimentos independientes, se realizó una ANOVA de una sola vía, con pruebas de comparación múltiple de Dunnett siendo significativo * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

9.7 Análisis de la co-expresión de MEOX2 y GLI-1 in situ en muestras de pacientes con cáncer pulmonar

Con el propósito de evaluar la expresión de MEOX2 y GLI-1 en pacientes con cáncer pulmonar, se realizaron ensayos de Inmunohistoquímica sobre cortes

en parafina de carcinomas sólidos pulmonares para evaluar la presencia de las proteínas, identificando correlación en la expresión entre ambas proteínas. Los niveles de expresión de MEOX2 y GLI-1 es diferencial, hay pacientes con alta expresión de MEOX2 y GLI-1 tanto pacientes con una menor expresión, sin embargo estos niveles correlacionan aquellos pacientes que presentan baja expresión de MEOX2 también presentan baja expresión de GLI-1, así también en pacientes cuya expresión es alta se observa en las 2 proteínas (Figura 37).

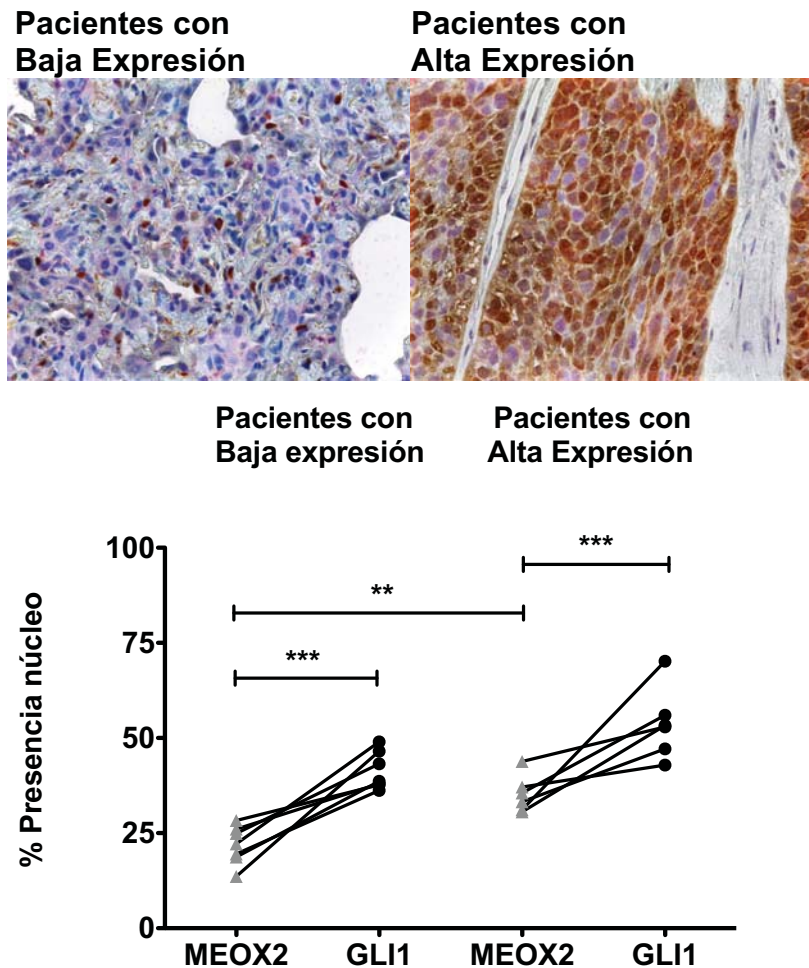


Figura 37 Análisis de la presencia de MEOX2 y GLI-1 en pacientes con cáncer pulmonar. Análisis de intensidad de marcadores mediante Inmunohistoquímica doble marcaje MEOX2-DAB y GLI-1-FA, en grupos de pacientes con cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma n=23, se realizó una ANOVA de una sola vía, con pruebas de comparación múltiple de Tukey siendo significativo * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$

Se realizó un análisis multivariado para identificar diferencias significativas entre diferentes características de los paciente, tomado en cuenta la edad, genero, tabaquismo, calidad de vida (ECOG), estadio clínico y niveles de expresión de MOEX2 y GLI-1, encontrándose una diferencia significativa en los niveles de expresión de MEOX2 con un valor de $p < 0.05$.

Tabla 2. Análisis multivariado usando datos clínicos de pacientes con cáncer pulmonar. Modelo de regresión Cox y riesgo relativo (RR), calculado con un C.I. de 95%.

	Riesgo Relativo	95% .I.C	p
Edad	1.013	0.99 – 1.04	0.709
Genero	1.145	0.53 – 2.5	0.73
Tabaquismo	1.063	0.53 – 2.5	0.873
ECOG	1.227	0.82 – 1.8	0.323
Estadio Clínico	1.138	0.74 – 1.7	0.354
Expresión MEOX2	2.04	1.02 – 4.1	0.046*
Expresión GLI-1	1.73	0.889 – 3.4	0.106

9.8 Análisis del eje MEOX2-GLI-1 y su impacto en la supervivencia global de pacientes con cáncer pulmonar bajo esquemas de seguimiento clínico fármaco-oncológico

Para evaluar la importancia de MEOX2 y GLI-1 y su impacto en aquellos pacientes con cáncer pulmonar, se realizaron curvas de supervivencia a 60 meses, encontrándose en la figura 38 una diferencia significativa con un valor de $p=0.009$ y $p=0.002$ para MEOX2 y GLI-1 respectivamente, teniendo una menor supervivencia aquellos pacientes que tienen niveles altos de expresión de estas proteínas, mientras que para los pacientes que presentan una menor expresión tiene una supervivencia mayor a los 60 meses, en ambas proteínas.

Pacientes con carcinomas pulmonares

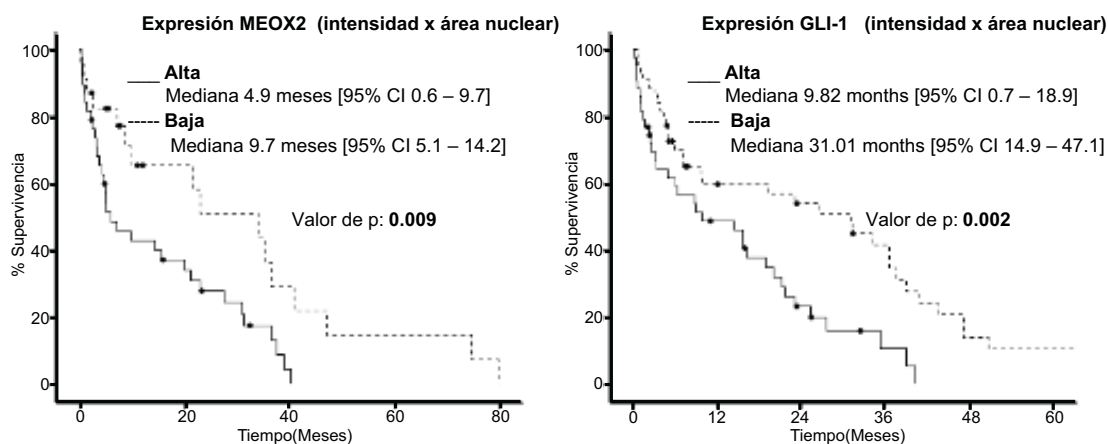


Figura 38 Análisis de la prognosis de supervivencia en pacientes con carcinomas pulmonares. Supervivencia en pacientes con baja y alta expresión de MEOX2 y GLI-1, expresado en supervivencia global a 60 meses $n=90$ (Log Rank “Mantel-Cox” $p=0.009$ y $p=0.002$)

Realizando un análisis en aquellos pacientes que solo tengan el tipo histológico de adenocarcinoma pulmonar solo se observa una diferencia significativa en GLI-1, con un valor de $p=0.002$, teniendo una supervivencia mayor a 60 meses en aquellos pacientes con menor expresión de GLI-1, mientras que para

MEOX2 no hay diferencia significativa, sin embargo aquellos pacientes que tienen menor expresión de MEOX2 también tiene una supervivencia mayor a los 60 meses.

Pacientes con adenocarcinomas pulmonares

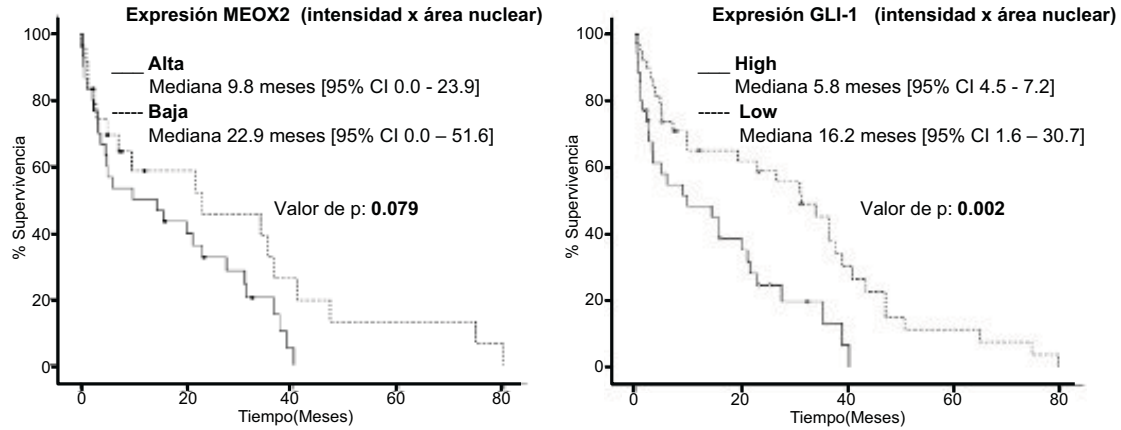


Figura 39 Análisis de la **prognosis de supervivencia en pacientes con adenocarcinomas pulmonares**. Supervivencia en pacientes con baja y alta expresión de MEOX2 y GLI-1, expresado en supervivencia global a 60 meses n=72 (Log Rank “Mantel-Cox” p=0.079 y p=0.002)

Es de gran importancia la mutación en EGFR en pacientes con cáncer pulmonar, debido a la posibilidad de responder mejor o no a terapia dirigida con fármacos capaces de inhibir proteínas tirosina cinasa (TKI’s), y así evitar cascadas de señalización y transcripción de genes involucrados en el mantenimiento de las neoplasias, se realizaron curvas de supervivencia para aquellos pacientes que no tienen una mutación en EGFR (figura 40) y están bajo tratamiento con terapia dirigida con TKI’s, teniendo una diferencia significativa con un valor de p=0.002 los niveles de expresión de GLI-1 con una supervivencia de 35 meses aquellos pacientes con alta expresión y más de 60 meses en pacientes con baja expresión, para MEOX2 no se observa diferencia significativa.

Pacientes con carcinomas pulmonares con EGFR no mutado

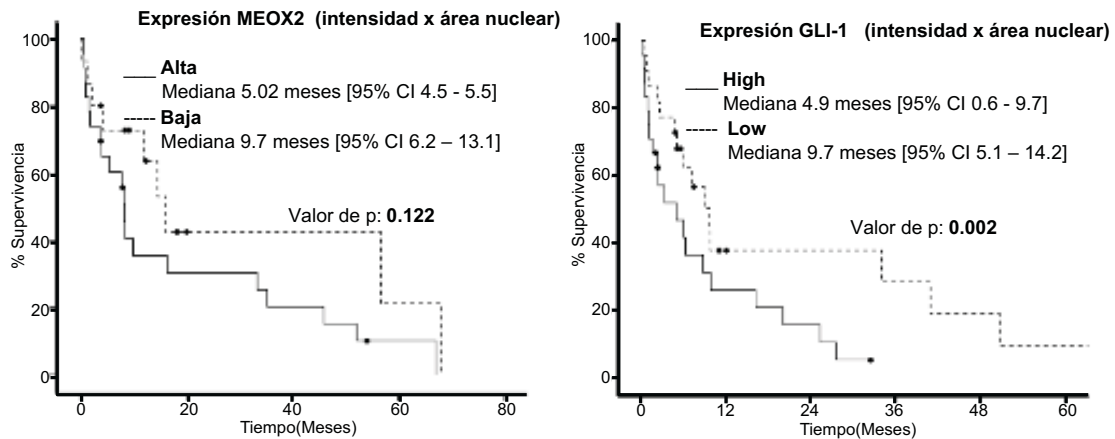


Figura 40 Análisis de la prognosis de supervivencia en pacientes con carcinoma pulmonar con terapia dirigida y EGFR no mutado. Supervivencia en pacientes con baja y alta expresión de MEOX2 y GLI-1, expresado en supervivencia global a 60 meses bajo tratamiento dirigido con TKI's en pacientes con EGFR NO mutado n=54 (Log Rank "Mantel-Cox" p=0.122 y p=0.002)

En aquellos pacientes con cáncer pulmonar de tipo histológico adenocarcinoma y que no tengan una mutación en EGFR y estén bajo tratamiento de terapia dirigida con TKI's, se realizó curvas de supervivencia teniendo como resultado una diferencia significativa para GLI-1 con un valor de p=0.006, mostrando un valor promedio de supervivencia de 35 meses aquellos pacientes con alta expresión, mientras que para aquellos que tienen una menor expresión la supervivencia es mayor a los 60 meses, mientras que para MEOX2 no se observan una diferencia significativa.

Pacientes con adenocarcinomas pulmonares con EGFR no mutado

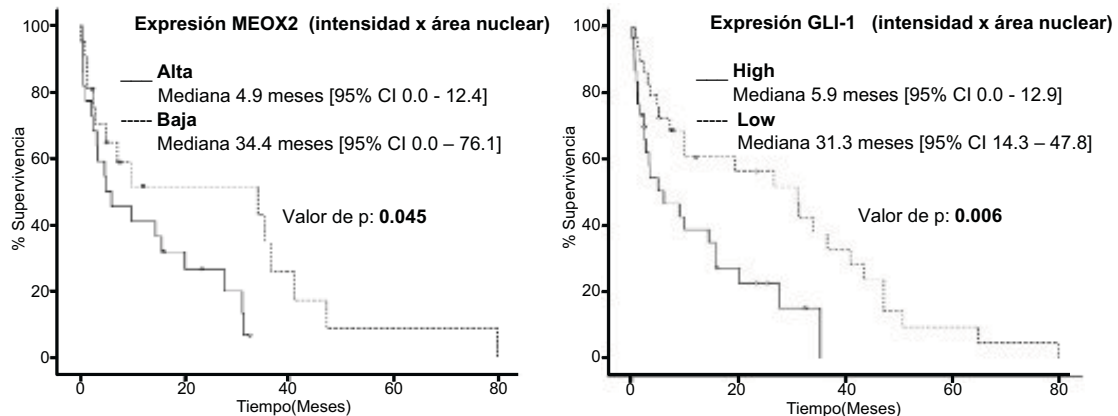


Figura 41 Análisis de la prognosis de supervivencia en pacientes con adenocarcinoma pulmonar con terapia dirigida y EGFR no mutado. Supervivencia en pacientes con baja y alta expresión de MEOX2 y GLI-1, expresado en supervivencia global a 60 meses bajo tratamiento dirigido con TKI's en pacientes con EGFR no mutado n=45 (Log Rank "Mantel-Cox" p=0.045 y p=0.006)

En los pacientes con carcinomas pulmonares con un estatus de mutación en el gen EGFR y que estén bajo tratamiento de TKI's, se realizaron curvas de supervivencia para el gen MEOX2 con un valor de $p=0.024$ y para GLI-1 un valor de $p=0.011$, si bien no se muestra una diferencia significativa, se observa una tendencia en ambos genes pues para MEOX2 la sobre vida es de 36 meses en promedio mientras que para GLI-1 la supervivencia promedio es de 37 meses, esto para aquellos pacientes que tienen una menor expresión de ambos genes.

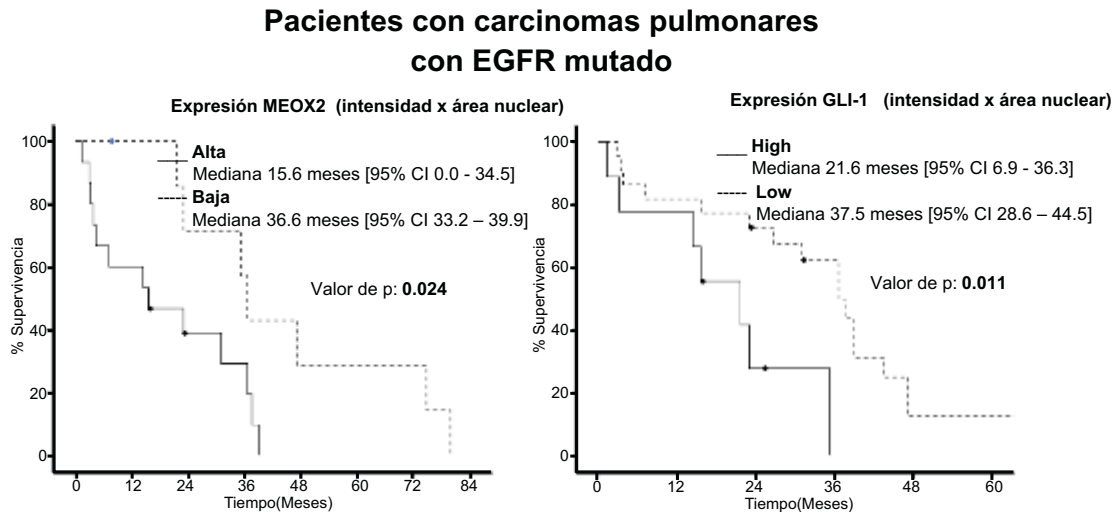


Figura 42 Análisis de la prognosis de supervivencia en pacientes con carcinoma pulmonar con terapia dirigida y EGFR mutado. Supervivencia en pacientes con baja y alta expresión de MEOX2 y GLI-1, expresado en supervivencia global a 60 meses bajo tratamiento dirigido con TKI's en pacientes con EGFR mutado $n= 36$ (Log Rank "Mantel-Cox" $p=0.024$ y $p=0.011$)

10. DISCUSIÓN

Desde la década pasada, se han denotado las diferencias entre los perfiles de expresión y los patrones de metilación de distintos factores de transcripción tipo HOX entre ellos MEOX2, tanto en tejido pulmonar fetal como en carcinomas pulmonares, proponiendo junto con otros factores de transcripción como posibles biomarcadores en el desarrollo histopatológico pulmonar [111], sin embargo existe poca información que respalde esta hipótesis, nuestro grupo de investigación fue el primero en asociar la sobreexpresión de MEOX2 y marcas epigenéticas relacionadas con cierre o apertura de la cromatina, determinando así la quimiorresistencia y la supervivencia en pacientes con cáncer pulmonar [113], haciendo notar la importancia de la expresión de MEOX2 en la prognosis en pacientes con cáncer pulmonar, informes recientes sugieren la sobre expresión de factores de transcripción tipo HOX y la asociación de eventos epigenéticos constituyen nuevos mecanismos de resistencia a fármacos, estos, deben ser tomados en cuenta en el momento de la toma de decisiones en la aplicación de tratamientos con fármacos de primera o segunda línea [120].

El estudio de los blancos génicos de MEOX2 permitió identificar los procesos moleculares y celulares en los que se encuentran involucrados, estos genes forman parte de vías de señalización de desarrollo embrionario como WNT, TGF- β , NOTCH y Hedgehog (Hh) entre otras, esto ha permitido abrir la perspectiva a un nuevo eje transcripcional que conduce al mantenimiento de neoplasias pulmonares [121].

Muestras de tres pacientes a los que se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina acoplado a microarreglos (ChIP on chip) mostraron un perfil de interacciones del índice MEOX2/RNA Pol II en regiones promotoras, a pesar de que las muestras son del tipo histológico de adenocarcinomas los blancos génicos se comparten entre los pacientes según el análisis estadístico, 78 genes con un FDR 0.2, 13 genes con un valor FDR 0.1 y 2 genes con un valor FDR 0.05. El estudio del epigenoma es una herramienta para identificar posibles marcadores de diagnóstico, pronóstico y tratamiento en este sentido Rauch en el 2007 utilizó el análisis masivo de marcas epigenéticas como lo es la metilación en islas CpG, para la identificación de 12 posibles marcadores de diagnóstico temprano en cáncer pulmonar, consolidándose como una herramienta de búsqueda de nuevos biomarcadores en la detección temprana y/o tratamiento de neoplasias pulmonares [122].

Recientemente en datos obtenidos del epigenoma de MEOX2 en muestras de pacientes con cáncer pulmonar, han sido depositados en el repositorio de base de datos científicos en su plataforma digital nombrada DRYAD mediante el número de acceso: <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.rm7dd>. Esto permite a toda la comunidad científica, analizar los datos obtenidos por nuestro laboratorio y formular nuevas preguntas de investigación.

Con los datos obtenidos del análisis bioinformático de los blancos génicos de MEOX2, se construyeron vías de señalización que estuvieran modulando genéticamente y/o epigémicamente la respuesta al tratamiento, la vía de señalización Hedgehog había sido poco estudiada en cáncer pulmonar, sin embargo en los últimos cinco años ha habido un auge en la participación de GLI-1 como factor de transcripción en distintas neoplasias epiteliales entre ellas pulmonares, se ha propuesto que es capaz de unirse a la región promotora de ABCG2 y aumentar su expresión lo cual conlleva a tener un mayor eflujo de fármaco y adquirir un fenotipo de resistencia esto en células de linfoma tipo B [123].

Cuando se realizó un análisis a la región promotora de GLI-1, identificamos mediante análisis bioinformático picos de fluorescencia del índice de MEOX2/RNA Pol II que van desde un FDR de 0.05 hasta 1, siendo así una posible regulación transcripcional, al realizar un análisis de predicción de posibles sitios de interacción el software TF Search identificó 12 posibles sitios de unión, por lo que procedimos a su validación y a mapear la región promotora en una longitud de 2000 pb. La región promotora de GLI-1 se encuentra delimitada por marcas de activación de cromatina como lo es H3K27Ac y H3K4me3 en pacientes con cáncer pulmonar, esto también mostrado en los datos obtenidos del proyecto ENCODE en A549, con lo cual se consolida el primer análisis epigenético en la región promotora de GLI-1 en pacientes con cáncer pulmonar.

Para las líneas celulares A549 y A427 el posicionamiento de MEOX2 y RNA Pol II concuerdan con los datos obtenidos de marcas de activación esto en datos publicados por el proyecto ENCODE, sin embargo en la línea celular A549 los datos obtenidos en el laboratorio muestran también un patrón de cromatina cerrada por H3K9me3 en la región promotora de GLI-1, estos datos son similares a lo observado por Victoria E. Villegas y colaboradores en el 2014 donde identifican el posicionamiento de H3K27me3 y RNA Pol II en la región promotora de GLI-1 [124]. El posicionamiento de MEOX2, RNA Pol II, H3K4me3 y H3K27Ac en la región promotora de GLI-1, sugiere un control activo transcripcionalmente, ya que un enriquecimiento en la región promotora ha sido postulada como promotor activo de la transcripción y MEOX2 podría estar regulando de manera positiva a GLI-1 [125].

Para determinar si los genes de la vía de señalización Hh estaban sobre expresados en las líneas celulares de cáncer pulmonar, se evaluó el mRNA de *SHH*, *PTCH1*, *SMO*, *GLI-1* y *ABCG2*, obteniendo como resultado una sobre expresión de todos los genes en A549 en comparación con la A427 y las líneas INER, esto es similar a lo obtenido por Yuan Z en el 2007, donde además de la A549 también analizaron HOP-62 y H322M ambas líneas celulares de NSCLC [126]. Se analizaron los niveles de mRNA de los genes de la vía bajo la

exposición de fármacos de primera línea utilizados para el tratamiento de cáncer pulmonar, como lo es cisplatino, doxorubicina y combinaciones, debido a que estos fármacos se utilizan en la clínica para el tratamiento de cáncer pulmonar con mayor frecuencia en el país, y se obtuvo una disminución del mRNA solo en *SHH* y *PTCH1* en A549 en la combinación de los 2 fármacos, el tratamiento a 48 horas no modifica los patrones de expresión de los genes de la vía Hh, sin embargo esto si es observado en pacientes que presentan resistencia a cisplatino aumentando los niveles de expresión de los genes incrementando la actividad de la vía Hh en pacientes con cáncer pulmonar [127].

Para evidenciar el efecto del cisplatino en las líneas celulares y evaluar epigenéticamente la región promotora de *GLI-1*, se inmunoprecipitaron 2 marcas de activación H3K4me3 y H3K27Ac y 2 marcas de represión H3K9me3 y H3K27me3, así como RNA Pol II y *MEOX2*, para determinar el perfil epigenético en respuesta al tratamiento con cisplatino, mostrando en *MEOX2* una ocupación en 2 regiones del promotor una a -2000 pb y otra a -700 pb, sugiriendo una posible dimerización como factor de transcripción, sin embargo en ambas líneas A549 y A427 existe un doble posicionamiento de marcas de activación y represión, en la región promotora de *GLI-1*, denominada por varios autores como cromatina bivalente, Bernhart SH y colaboradores el año pasado realizaron un estudio donde demuestran que el cambio en la cromatina bivalente conlleva al incremento en la expresión de genes involucrados en el desarrollo, entre ellos los genes tipo Homeobox y su implicación en cáncer, concluyendo que los cambios en el estado de bivalencia de la cromatina están ligados a la tumorigénesis [128].

El cisplatino como mecanismo de acción es intercalante del DNA y formación de aductos, donde la RNA Pol II no puede continuar con la transcripción, la replicación no se lleva a cabo y la célula es llevada a apoptosis, estos aductos también tienen impacto en la remodelación de la cromatina, la unión de *MEOX2* en la región promotora de *GLI-1* no se ve afectada tras el reto con cisplatino a 48 horas en ambas líneas celulares, con respecto a la RNA Pol II hay un aumento en solo en la línea A549 posiblemente aumentando la tasa transcripcional posterior al reto con cisplatino, en cuestión a la marca H3K27me3 no hay diferencia en ambas líneas, en la línea A549 hay tres eventos que hay que señalar: un aumento de la marca H3K4me3 disminución de H3K27Ac y un aumento de la marca H3K9me3 tras el reto con cisplatino manteniendo el estado bivalente de la cromatina, posiblemente debido al aumento de las enzimas que trimetilan la lisina 9 como lo es SETDB1 y SETDB2 estas enzimas participan como moduladores en mecanismos de migración celular y metástasis, esto descrito por Wu PC y colaboradores donde en 2014 demostraron que *KMT1E/SETDB1* actúa como supresor de metástasis y se encuentra desregulado en células con alta metástasis en tumores de

pulmón [129], tras el reto con cisplatino la reprogramación epigenética en la región promotora de GLI-1 y el posible aumento de las enzimas SETDB1 y 2 impidan la proliferación celular y la migración celular mediada por la vía Hh.

Se determinó la IC50, dosis a la cual el 50% de las células están muertas y se encontró que las células obtenidas en el ATCC tiene una IC50 de 20 μM mientras que las líneas derivadas de pacientes mestizo mexicanos tiene una IC50 de 10 μM en promedio, siendo estas últimas las más sensibles al tratamiento con cisplatino, por lo que se pretendió generar líneas resistentes a cisplatino, con el objetivo de comparar los patrones de proteínas en aquellas células sensibles y resistentes, existen varios métodos de generación de líneas resistente, nosotros utilizamos la técnica utilizada por Barr, M.P y cols, descrita en el 2013, que consta en determinar la IC50 de la línea parental y posteriormente tratar las células con la IC50 en un periodo de 72 horas, y posteriormente mantener las células con la IC25 en un periodo mínimo de 6 meses, para generar la línea resistente [130], lo que nos permitió tener líneas celulares de 6 meses de exposición al cisplatino con una IC50 de 49 μM en promedio, siendo el doble de la IC50 de la línea parental para la línea A549 y una IC50 de 29.65 μM siendo tres veces más resistente que la línea parental en la INER37.

Al realizar los análisis de WesternBlot de las líneas parentales y resistentes obtuvimos un perfil de sobre expresión de GLI-1 en aquellas células resistentes, y una disminución en MEOX2 en las células resistentes, las mutaciones estocásticas que adquieren las células con una exposición continua a fármacos como cisplatino, modifican los patrones de expresión de diferentes proteínas, disminuyen la capacidad de muerte celular mediada por la apoptosis, aumentan la clogenicidad, incrementan marcadores de tipo troncal como NANOG, OCT4 y SOX2, aumentando también marcadores de la transición epitelio-mesenquimal [131]. Una posible explicación a la disminución de los niveles de proteína de MEOX2 es la metilación en regiones promotoras de DNA, se ha observado una correlación positiva entre hipermetilación de islas CpG's y el incremento en la resistencia a fármacos, esto se ha observado en pacientes con cáncer de ovario tardío, y demostrado por Meng Li en el 2009 al volver resistente una línea celular de cáncer de ovario (A2780) tras 5 rondas de exposición a cisplatino observando una disminución en los niveles de mRNA de distintos genes entre ellos MEOX2, los autores sugieren la metilación de *novo* como un posible mecanismos de silenciamiento estocástico en las líneas resistentes a cisplatino y/o carboplatino [132].

Para evaluar la participación funcional de MEOX2 y su impacto en los blancos génicos como GLI-1, se realizó el silenciamiento genético de estos genes y un doble silenciamiento, esto con el fin de evaluar una regulación de MEOX2 sobre GLI-1, en las líneas celulares A549 y A427, existe una disminución de la IC50 con respecto al *scramble* del silenciamiento de MEOX2 de tener una IC50

de 53 y 30 μM para la A549 y A427 respectivamente, a 16 y 10 μM , esto posiblemente debido al fondo genético de cada línea, para A549 existe mutación de TGFB2 regulador de la proliferación y POU5F1B regulador de pluripotencialidad, a demás se ha demostrado una sobreexpresión de ABCG2 en poblaciones de A549 resistentes teniendo un fenotipo tipo troncal del cáncer [133], esto incide en la capacidad de resistencia al fármaco, donde la sobreexpresión de MEOX2 está asociado con la quimiorresistencia a cisplatino, al silenciarlo con un siRNA disminuye la IC50 disminuyendo también la resistencia a cisplatino [113], con respecto al silenciamiento de GLI-1 también hay una disminución de la IC50 de 10 y 17 μM respectivamente, GLI-1 regula de manera positiva a CCND1 y CCND2 los cuales actúan formando un complejo con Cdk4 y/o Cdk6 modulando la transición de la fase G1/S del ciclo celular, también regula a FOXF1, FOXL1 factores transcripcionales involucrados en la proliferación celular [134], cuando se utiliza un silenciamiento doble no se observa un efecto aditivo pues la IC50 es similar a lo obtenido del silenciamiento de GLI-1, esto debido a una posible competencia por el siRNA con los liposomas o una inhibición catalítica de los siRNAs en el mensajero, esto no está confirmado y no hay registro en la literatura que pueda estar pasando.

En las línea celular NH2347 es el primer registro en la literatura sobre un efecto de MEOX2 en la respuesta a cisplatino, sin embargo una disminución tras el siRNA de MEOX2, esta línea celular tiene mutaciones en TP53, BMI1 reguladores de la proliferación celular y GLI-3 represor de la vía Hh, con respecto a la línea H1975 no se observa diferencias en la IC50 tal vez producto de la falta de detección de niveles tanto de mRNA como de proteína de MEOX2, lo cual se sugiere una mutación estocástica en el gen que lo codifica, sin embargo no existe ningún antecedente de mutación de MEOX2 en esta línea.

En este estudio se ha demostrado que MEOX2 y GLI-1 están involucrados en procesos de proliferación celular y quimiorresistencia a cisplatino, sin embargo no se descarta la posibilidad de resistencia a otro tipo de fármacos como inhibidores de TKI's, se ha determinado los niveles de mRNA de ambos genes y se ha determinado una regulación transcripcional de MEOX2 sobre GLI-1, esto debido a que MEOX2 se posiciona en su región promotora al igual que marcas de una cromatina bivalente mediada por H3K4me3 y H3K9me3, esto pudiera tener una respuesta a la exposición a un fármaco oncológico donde las células pueden dirigirse hacia un proceso de senescencia o proliferación celular, esto se ha observado en pacientes cuyo tratamiento puede remover una población de células tumorales o la selección de células con un fenotipo troncal y promover la resistencia a fármacos, resultando en una regulación positiva de MEOX2 sobre el mensajero de GLI-1, que disminuyen aún más los niveles de mensajero cuando se utiliza cisplatino a 48 horas, posicionando a MEOX2 como un regulador de la proliferación y quimiorresistencia mediada por GLI-1. Los genes HOX, una súperfamilia conservada en distintas especies

están involucrados en varios procesos oncológicos, un ejemplo de ello es la regulación del gen HOXA5, un regulador maestro de la morfogénesis y la diferenciación celular, la sobre expresión de este gen HOX inhibe la proliferación y la invasión en células NSCLC, se ha propuesto que la baja expresión de HOXA5 conlleva a un pobre pronóstico y una baja supervivencia en pacientes con NSCLC [103], contrario a lo observado en nuestro grupo pues la baja expresión de MEOX2 en pacientes con NSCLC es un marcador de mejor pronóstico y alta supervivencia [113], esto también debido a los datos obtenidos ya que al disminuir los niveles de expresión de MEOX2 también disminuyen la capacidad de formar colonias y la movilidad celular, si bien los dos genes tienen un dominio tipo Homeobox estos se expresan de manera diferencial y pueden ser utilizados como biomarcadores. Sin embargo lo que cabe destacar es la participación de los genes HOX como moduladores transcripcionales, en respuesta a un evento de estrés celular, o frente a un reto farmacológico, a la fecha el auge de la determinación de marcadores tempranos para la detección y/o pronóstico ha sido enfocado en factores de transcripción y los genes HOX no han sido la excepción.

Aunque las investigaciones están enfocadas al desarrollo de fármacos de nueva generación de terapia dirigida como Osimertinib [135], el tratamiento con cisplatino como fármaco de primera línea se seguirá utilizando en la clínica en combinaciones con otros fármacos y/o inhibición de genes RNA no codificante para aumentar el efecto citotóxico y disminuir la quimioresistencia así como los efectos adversos en el tratamiento de cáncer pulmonar [136,137]

Fortalezas y debilidades

Aunque el análisis de microarreglos es una herramienta poderosa, las limitaciones del proyecto están dadas por la validación de solo 1 gen de la vía de señalización Hedgehog, sin embargo se ha ampliado el estudio de 12 genes restantes con un $FDR < 0.1$, en los proyectos con los estudiantes en el laboratorio, pudiendo realizar una red de interacción entre estos genes y MEOX2, para así determinar su implicación en el cáncer pulmonar, por otra parte es de suma importancia evaluar la implicación de MEOX2 y GLI1 en modelos *in vivo*, estos ensayos actualmente se están desarrollando en el laboratorio y en colaboración con el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

La fortaleza de este proyecto de investigación radica en el análisis masivo del epigenoma en muestras de pacientes con cáncer pulmonar, el análisis sistemático y estadísticamente significativo de genes asociados a esta neoplasia, la validación de los genes blancos en muestras de pacientes con cáncer pulmonar y líneas celulares, y la regulación de los blancos génicos mediante el uso de RNA interferente y su impacto en procesos oncogénicos como la migración y la formación de colonias, además tiene y su importancia en el ámbito clínico al identificar una coexpresión y la supervivencia global en una cohorte de 90 pacientes con seguimiento clínico, todo este conjunto de análisis conlleva a proponer un eje transcripcional entre MEOX2 y GLI-1 y su participación en el cáncer pulmonar.

11. CONCLUSIONES

1. Se determinaron por primera vez los blancos génicos del factor transcripcional MEOX2, en una cohorte de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar y las líneas celulares A549 y A427, determinando una firma de 78 genes con secuencias promotoras compartidas entre diferentes pacientes con una significancia estadística $FDR \leq 0.2$.
2. Se determinó que la A549 posee los niveles de mRNA más altos de los blancos genes de MEOX2 (SHH, SMO, GLI-1, ABCG2), mientras que la A427 posee los niveles más bajos, en las líneas INER37 e INER51 no hubo diferencia significativa.
3. Se identificó la interacción de MEOX2, RNA POL II e histonas (H3K27Ac y H3K9me3) enriquecidas en la región promotora del gen GLI-1, en A549 y A427 las cuales presentaron los niveles de expresión más altos y bajos respectivamente.
4. En presencia de cisplatino se reprograma el código de histonas de H3K4me3, H3K9me3 y H3K27ac en la A549 y H3K9me3 en A427.
5. MEOX2 regula de manera positiva la expresión del blanco génico GLI-1 independiente de la exposición de cisplatino en las líneas con estatus de EGFR no mutado (A549 y A427), no se detectaron niveles de expresión en líneas con estatus de EGFR mutado (H1975).
6. El silenciamiento de MEOX2 disminuye la migración y la formación de colonias de células tumorales en las líneas A549 y NH2347, mientras que células que no expresan MEOX2 (H1975) no sufren cambios en su capacidad de migración y formación de colonias.
7. La coexpresión de MEOX2 y del blanco génico GLI-1 correlaciona de manera positiva en pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas.
8. El análisis de supervivencia mediante curvas de Kaplan-Meier identificó que la expresión de GLI-1, es dependiente de MEOX2 y pobre supervivencia global, en pacientes con cáncer pulmonar con estatus genético de EGFR no-mutado y EGFR mutado.

12. PERSPECTIVAS

Con base en el marco teórico y resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación, el presente trabajo confirma la participación de MEOX2 regulando la expresión génica de GLI1, miembro de la vía de señalización Hedgehog en neoplasias pulmonares de tipo adenocarcinoma. Lo anterior dependiente de mecanismos de re-programación epigenética frente a fármacos intercalantes del DNA como son los derivados del platino.

Asimismo, se demuestra que el eje transcripcional MEOX2-GLI-1 se encuentra activo en carcinomas pulmonares derivados de pacientes cuyo eje funcional se encuentra activo durante el desarrollo embrionario, también durante los mecanismos de la transición epitelial-mesenquimal e invasión-metástasis del cáncer.

Con base en los datos obtenidos durante este proyecto, el cual se enfocó en dilucidar la participación de MEOX2 en el fenómeno de quimiorresistencia en cáncer pulmonar, proponemos que el presente trabajo genera 2 perspectivas:

1. Determinar en tumores sólidos pulmonares y líneas celulares derivadas de pacientes, los complejos proteicos asociados (acoplados) a MEOX2, lo cual permita explicar cómo interviene MEOX2 de manera fina transcripcional y epigenéticamente sobre la capacidad de resistir a esquemas de tratamiento basado en fármacos oncológicos (cisplatino) capaces de afectar el pronóstico y supervivencia de los pacientes con cáncer pulmonar a nivel clínico.
2. Determinar en modelos murinos la participación transcripcional del eje MEOX2-GLI-1, al inhibir este eje se pretende evaluar la capacidad de revertir la formación de nuevos tumores, así como evaluar la metástasis *in vivo*, todo esto con el fin de dilucidar el impacto del eje transcripcional MEOX2-GLI-1 en las neoplasias pulmonares, así como implementar nuevas estrategias terapéuticas que permitan dar una mejor calidad de vida al paciente.

13. BIBLIOGRAFIA

- [1] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, *Cell*. 100 (2000) 57–70.
- [2] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*. 144 (2011) 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [3] P.P. Di Fiore, J.H. Pierce, M.H. Kraus, O. Segatto, C.R. King, S.A. Aaronson, erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells, *Science*. 237 (1987) 178–182.
- [4] L. Fei, Y. Ma, M. Zhang, X. Liu, Y. Luo, C. Wang, H. Zhang, W. Zhang, Y. Han, RACK1 promotes lung cancer cell growth via an MCM7/RACK1/ Akt signaling complex, *Oncotarget*. 8 (2017) 40501–40513. doi:10.18632/oncotarget.17120.
- [5] R.A. Weinberg, The retinoblastoma protein and cell cycle control, *Cell*. 81 (1995) 323–330.
- [6] Z. Liu, J. Zhang, X. Yuan, B. Liu, Y. Liu, A. Li, Y. Zhang, X. Sun, S. Tuo, Detecting pan-cancer conserved microRNA modules from microRNA expression profiles across multiple cancers, *Mol. Biosyst*. 11 (2015) 2227–2237. doi:10.1039/c5mb00257e.
- [7] A.H. Wyllie, J.F. Kerr, A.R. Currie, Cell death: the significance of apoptosis, *Int. Rev. Cytol*. 68 (1980) 251–306.
- [8] J.M. Adams, S. Cory, The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy, *Oncogene*. 26 (2007) 1324–1337. doi:10.1038/sj.onc.1210220.
- [9] L. Hayflick, Mortality and immortality at the cellular level. A review, *Biochem. Biokhimiia*. 62 (1997) 1180–1190.
- [10] R.A. Dagg, H.A. Pickett, A.A. Neumann, C.E. Napier, J.D. Henson, E.T. Teber, J.W. Arthur, C.P. Reynolds, J. Murray, M. Haber, A.P. Sobinoff, L.M.S. Lau, R.R. Reddel, Extensive Proliferation of Human Cancer Cells with Ever-Shorter Telomeres, *Cell Rep*. 19 (2017) 2544–2556. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.087.
- [11] H.A. Bull, P.M. Brickell, P.M. Dowd, Src-related protein tyrosine kinases are physically associated with the surface antigen CD36 in human dermal microvascular endothelial cells, *FEBS Lett*. 351 (1994) 41–44.
- [12] R. Sullivan, G. Maresh, X. Zhang, C. Salomon, J. Hooper, D. Margolin, L. Li, The Emerging Roles of Extracellular Vesicles As Communication Vehicles within the Tumor Microenvironment and Beyond, *Front. Endocrinol*. 8 (2017) 194. doi:10.3389/fendo.2017.00194.
- [13] M.B. Sporn, The war on cancer, *Lancet Lond. Engl*. 347 (1996) 1377–1381.
- [14] Y. Li, H. Zhang, Y. Li, C. Zhao, Y. Fan, J. Liu, X. Li, H. Liu, J. Chen, MiR-182 inhibits the epithelial to mesenchymal transition and metastasis of lung cancer cells by targeting the Met gene, *Mol. Carcinog*. (2017). doi:10.1002/mc.22741.
- [15] M. Berdasco, M. Esteller, Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry, *Dev. Cell*. 19 (2010) 698–711. doi:10.1016/j.devcel.2010.10.005.
- [16] F. Pagès, J. Galon, M.-C. Dieu-Nosjean, E. Tartour, C. Sautès-Fridman, W.-H. Fridman, Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored, *Oncogene*. 29 (2010) 1093–1102. doi:10.1038/onc.2009.416.
- [17] O. Warburg, On respiratory impairment in cancer cells, *Science*. 124 (1956) 269–270.
- [18] C.M. Vajdic, M.T. van Leeuwen, Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation, *Int. J. Cancer*. 125 (2009) 1747–1754. doi:10.1002/ijc.24439.
- [19] B. Qiu, M.C. Simon, Oncogenes strike a balance between cellular growth and homeostasis, *Semin. Cell Dev. Biol*. (n.d.). doi:10.1016/j.semcdb.2015.08.005.
- [20] L. Simó-Riudalbas, M. Esteller, Cancer genomics identifies disrupted epigenetic

- genes, *Hum. Genet.* 133 (2014) 713–725. doi:10.1007/s00439-013-1373-5.
- [21] P.C. Janson, O. Winqvist, Epigenetics - the Key to Understand Immune Responses in Health and Disease: EPIGENETICS IN IMMUNE RESPONSES, *Am. J. Reprod. Immunol.* 66 (2011) 72–74. doi:10.1111/j.1600-0897.2011.01050.x.
- [22] D. Crews, J.A. McLachlan, Epigenetics, Evolution, Endocrine Disruption, Health, and Disease, *Endocrinology.* 147 (2006) s4–s10. doi:10.1210/en.2005-1122.
- [23] H. Yu, Z. Han, Y. Wang, H. Xin, The Clonal Evolution and Therapeutic Approaches of Lung Cancer, *Cell Biochem. Biophys.* 70 (2014) 63–71. doi:10.1007/s12013-014-9910-y.
- [24] C.M. Croce, Oncogenes and Cancer, *N. Engl. J. Med.* 358 (2008) 502–511. doi:10.1056/NEJMra072367.
- [25] O. Aguilera, A.F. Fernandez, A. Munoz, M.F. Fraga, Epigenetics and environment: a complex relationship, *J. Appl. Physiol.* 109 (2010) 243–251. doi:10.1152/jappphysiol.00068.2010.
- [26] V. Brower, Epigenetics: Unravelling the cancer code, *Nature.* 471 (2011) S12–S13.
- [27] M. Esteller, Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes, *Br. J. Cancer.* 94 (2006) 179–183. doi:10.1038/sj.bjc.6602918.
- [28] A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global cancer statistics, *CA. Cancer J. Clin.* 61 (2011) 69–90. doi:10.3322/caac.20107.
- [29] R. Siegel, D. Naishadham, A. Jemal, Cancer statistics, 2013, *CA. Cancer J. Clin.* 63 (2013) 11–30. doi:10.3322/caac.21166.
- [30] Lung Cancer OncoGuia Group, P. Manchon Walsh, R. Aguiló, M. Alejo, M. Mar Arnaiz, J. Astudillo, R. Blanco, E. Canalís, F. Cardenal, V. Curull, E. Felip, R. Fuentes, Á. Gayete, A.M. Giménez, J. Jové, C. Lainez, J. Lloreta, R. Marrades, J.I. Martínez, X. Martínez, M. Ángeles Montero, C. Pallarès, R. Palmero, J. Ramírez, N. Rodríguez, A. Rosell, J. Saumench, N. Viñolas, Á. Olazábal, Lung Cancer OncoGuia, *Clin. Transl. Oncol.* 11 (2009) 805–824. doi:10.1007/s12094-009-0449-0.
- [31] M. Sánchez-Céspedes, Lung cancer biology: a genetic and genomic perspective, *Clin. Transl. Oncol.* 11 (2009) 263–269. doi:10.1007/s12094-009-0353-7.
- [32] R.V. Bowman, I.A. Yang, A.B. Semmler, K.M. Fong, Epigenetics of lung cancer, *Respirology.* 11 (2006) 355–365.
- [33] P. Yang, Epidemiology of Lung Cancer Prognosis: Quantity and Quality of Life, in: M. Verma (Ed.), *Cancer Epidemiol.*, Humana Press, Totowa, NJ, 2009: pp. 469–486. http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-416-2_24 (accessed January 20, 2015).
- [34] J. Delgado, L.M. Martinez, T.T. Sánchez, A. Ramirez, C. Iturria, G. González-Avila, Lung cancer pathogenesis associated with wood smoke exposure, *Chest.* 128 (2005) 124–131. doi:10.1378/chest.128.1.124.
- [35] R. Nishihara, T. Morikawa, A. Kuchiba, P. Lochhead, M. Yamauchi, X. Liao, Y. Imamura, K. Noshō, K. Shima, I. Kawachi, Z.R. Qian, C.S. Fuchs, A.T. Chan, E. Giovannucci, S. Ogino, A Prospective Study of Duration of Smoking Cessation and Colorectal Cancer Risk by Epigenetics-related Tumor Classification, *Am. J. Epidemiol.* 178 (2013) 84–100. doi:10.1093/aje/kws431.
- [36] A. Balmain, J.C. Barrett, H. Moses, M.J. Renan, How many mutations are required for tumorigenesis? implications from human cancer data, *Mol. Carcinog.* 7 (1993) 139–146. doi:10.1002/mc.2940070303.
- [37] A. Risch, C. Plass, Lung cancer epigenetics and genetics, *Int. J. Cancer.* 123 (2008) 1–7.
- [38] S.-M. Ho, A. Johnson, P. Tarapore, V. Janakiram, X. Zhang, Y.-K. Leung, Environmental epigenetics and its implication on disease risk and health outcomes,

ILAR J. 53 (2012) 289–305.

[39] R.M. Brena, J.F. Costello, Genome-epigenome interactions in cancer, *Hum. Mol. Genet.* 16 (2007) R96–R105. doi:10.1093/hmg/ddm073.

[40] M. Esteller, Cancer, epigenetics and the Nobel Prizes, *Mol. Oncol.* 6 (2012) 565–566.

[41] S. Mulero-Navarro, M. Esteller, Epigenetic biomarkers for human cancer: The time is now, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 68 (2008) 1–11. doi:10.1016/j.critrevonc.2008.03.001.

[42] A.J. Alberg, Epidemiology of Lung Cancer * : ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition), *CHEST J.* 132 (2007) 29S. doi:10.1378/chest.07-1347.

[43] J.R. Molina, P. Yang, S.D. Cassivi, S.E. Schild, A.A. Adjei, Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship, in: *Mayo Clin. Proc.*, Elsevier, 2008: pp. 584–594. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025619611607350> (accessed January 20, 2015).

[44] M.S. Nise, P. Falaturi, T.C. Erren, Epigenetics: Origins and implications for cancer epidemiology, *Med. Hypotheses.* 74 (2010) 377–382. doi:10.1016/j.mehy.2009.09.008.

[45] H.S. Choi, B.K. Jeong, H. Jeong, Y.H. Lee, I.B. Ha, J.H. Song, K.M. Kang, Application of the new 8th TNM staging system for non-small cell lung cancer: treated with curative concurrent chemoradiotherapy, *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 12 (2017). doi:10.1186/s13014-017-0848-2.

[46] J.H. Schiller, D. Harrington, C.P. Belani, C. Langer, A. Sandler, J. Krook, J. Zhu, D.H. Johnson, Comparison of Four Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer, *N. Engl. J. Med.* 346 (2002) 92–98. doi:10.1056/NEJMoa011954.

[47] S. Dubey, C.A. Powell, Update in Lung Cancer 2008, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179 (2009) 860–868. doi:10.1164/rccm.200902-0289UP.

[48] R. Pirker, Adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small cell lung cancer, *Transl. Lung Cancer Res.* 3 (2014) 305–310. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2014.09.13.

[49] P. Goldstraw, K. Chansky, J. Crowley, R. Rami-Porta, H. Asamura, W.E.E. Eberhardt, A.G. Nicholson, P. Groome, A. Mitchell, V. Bolejack, International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee, Advisory Boards, and Participating Institutions, International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee Advisory Boards and Participating Institutions, The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer, *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer.* 11 (2016) 39–51. doi:10.1016/j.jtho.2015.09.009.

[50] H. Guohua, L. Hongyang, J. Zhiming, Z. Danhua, W. Haifang, Study of small-cell lung cancer cell-based sensor and its applications in chemotherapy effects rapid evaluation for anticancer drugs, *Biosens. Bioelectron.* 97 (2017) 184–195. doi:10.1016/j.bios.2017.05.050.

[51] H. Niwa, Y. Nakahara, M. Yokoba, H. Mitsufuji, J. Sasaki, N. Masuda, Safety and efficacy of carboplatin plus nab-paclitaxel for treating advanced non-small-cell lung cancer with interstitial lung disease, *Mol. Clin. Oncol.* 7 (2017) 604–608. doi:10.3892/mco.2017.1359.

[52] R. Punia, K. Raina, R. Agarwal, R.P. Singh, Acacetin enhances the therapeutic

- efficacy of doxorubicin in non-small-cell lung carcinoma cells, *PLoS ONE*. 12 (2017). doi:10.1371/journal.pone.0182870.
- [53] Y. Chen, L. Chen, D. Zhong, Comparing the adverse effects of platinum in combination with etoposide or irinotecan in previously untreated small-cell lung cancer patients with extensive disease: A network meta-analysis, *Thorac. Cancer*. (2017). doi:10.1111/1759-7714.12420.
- [54] J. Chen, N. Emara, C. Solomides, H. Parekh, H. Simpkins, Resistance to platinum-based chemotherapy in lung cancer cell lines, *Cancer Chemother. Pharmacol*. 66 (2010) 1103–1111. doi:10.1007/s00280-010-1268-2.
- [55] M. Yamasaki, I. Murakami, K. Nakano, M. Doi, S. Kitaguchi, T. Kondo, J. Sakurai, N. Hattori, K.-I. Arita, Carboplatin plus Weekly Paclitaxel Combined with Bevacizumab as First-line Treatment for Non-small Cell Lung Cancer, *Anticancer Res*. 37 (2017) 923–928. doi:10.21873/anticancer.11400.
- [56] J. You, H. Yu, M. Song, C. Shi, X. Wang, Y. Zheng, R. Yu, A. Shi, G. Zhu, [Phase I Study of Etoposide and Cisplatin Chemotherapy Dose Escalation with Concurrent Twice-daily Radiotherapy for Patients with Limited-stage Small Cell Lung Cancer], *Zhongguo Fei Ai Za Zhi Chin. J. Lung Cancer*. 20 (2017) 55–60. doi:10.3779/j.issn.1009-3419.2017.01.08.
- [57] Y. Gokmen-Polar, K.D. Miller, Redefining the target again: chemotherapeutics as vascular disrupting agents?, *Cancer Cell*. 14 (2008) 195–196. doi:10.1016/j.ccr.2008.08.006.
- [58] B.-C. Liao, C.-C. Lin, J.-H. Lee, J.C.-H. Yang, Optimal management of EGFR-mutant non-small cell lung cancer with disease progression on first-line tyrosine kinase inhibitor therapy, *Lung Cancer Amst. Neth*. 110 (2017) 7–13. doi:10.1016/j.lungcan.2017.05.009.
- [59] M. Santarpia, A. Liguori, N. Karachaliou, M. Gonzalez-Cao, M.G. Daffinà, A. D’Aveni, G. Marabello, G. Altavilla, R. Rosell, Osimertinib in the treatment of non-small-cell lung cancer: design, development and place in therapy, *Lung Cancer Auckl. NZ*. 8 (2017) 109–125. doi:10.2147/LCTT.S119644.
- [60] C. Proto, G. Lo Russo, G. Corrao, M. Ganzinelli, F. Facchinetti, R. Minari, M. Tiseo, M.C. Garassino, Treatment in EGFR-mutated non-small cell lung cancer: how to block the receptor and overcome resistance mechanisms, *Tumori*. 103 (2017) 325–337. doi:10.5301/tj.5000663.
- [61] S.B. Baylin, Resistance, epigenetics and the cancer ecosystem, *Nat. Med*. 17 (2011) 288.
- [62] S. Raguz, E. Yagüe, Resistance to chemotherapy: new treatments and novel insights into an old problem, *Br. J. Cancer*. 99 (2008) 387–391. doi:10.1038/sj.bjc.6604510.
- [63] D.B. Longley, P.G. Johnston, Molecular mechanisms of drug resistance, *J. Pathol*. 205 (2005) 275–292. doi:10.1002/path.1706.
- [64] C. Holohan, S. Van Schaeybroeck, D.B. Longley, P.G. Johnston, Cancer drug resistance: an evolving paradigm, *Nat. Rev. Cancer*. 13 (2013) 714–726. doi:10.1038/nrc3599.
- [65] T. Fojo, S. Bates, Strategies for reversing drug resistance, *Oncogene*. 22 (2003) 7512–7523. doi:10.1038/sj.onc.1206951.
- [66] M.M. Gottesman, T. Fojo, S.E. Bates, Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters, *Nat. Rev. Cancer*. 2 (2002) 48–58. doi:10.1038/nrc706.
- [67] P. Bouwman, J. Jonkers, The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance, *Nat. Rev. Cancer*. 12 (2012) 587–598. doi:10.1038/nrc3342.

- [68] U.E. Martinez-Outschoorn, Z. Lin, Y.-H. Ko, A.F. Goldberg, N. Flomenberg, C. Wang, S. Pavlides, R.G. Pestell, A. Howell, F. Sotgia, M.P. Lisanti, Understanding the metabolic basis of drug resistance: therapeutic induction of the Warburg effect kills cancer cells, *Cell Cycle Georget. Tex.* 10 (2011) 2521–2528. doi:10.4161/cc.10.15.16584.
- [69] S.T. Taylor, J.A. Hickman, C. Dive, Epigenetic determinants of resistance to etoposide regulation of Bcl-X(L) and Bax by tumor microenvironmental factors, *J. Natl. Cancer Inst.* 92 (2000) 18–23.
- [70] S. Kobayashi, T.J. Boggon, T. Dayaram, P.A. Jänne, O. Kocher, M. Meyerson, B.E. Johnson, M.J. Eck, D.G. Tenen, B. Halmos, EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib, *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 786–792. doi:10.1056/NEJMoa044238.
- [71] D.W. Bell, I. Gore, R.A. Okimoto, N. Godin-Heymann, R. Sordella, R. Mulloy, S.V. Sharma, B.W. Brannigan, G. Mohapatra, J. Settleman, D.A. Haber, Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR, *Nat. Genet.* 37 (2005) 1315–1316. doi:10.1038/ng1671.
- [72] J.A. McCubrey, S.L. Abrams, K. Stadelman, W.H. Chappell, M. LaHair, R.A. Ferland, L.S. Steelman, Targeting signal transduction pathways to eliminate chemotherapeutic drug resistance and cancer stem cells, *Adv. Enzyme Regul.* 50 (2010) 285–307. doi:10.1016/j.advenzreg.2009.10.016.
- [73] L. Galluzzi, I. Vitale, J. Michels, C. Brenner, G. Szabadkai, A. Harel-Bellan, M. Castedo, G. Kroemer, Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future, *Cell Death Dis.* 5 (2014) e1257. doi:10.1038/cddis.2013.428.
- [74] L. Galluzzi, L. Senovilla, I. Vitale, J. Michels, I. Martins, O. Kepp, M. Castedo, G. Kroemer, Molecular mechanisms of cisplatin resistance, *Oncogene.* 31 (2012) 1869–1883. doi:10.1038/onc.2011.384.
- [75] Y. Fang, C. Zhang, T. Wu, Q. Wang, J. Liu, P. Dai, Transcriptome Sequencing Reveals Key Pathways and Genes Associated with Cisplatin Resistance in Lung Adenocarcinoma A549 Cells, *PloS One.* 12 (2017) e0170609. doi:10.1371/journal.pone.0170609.
- [76] L.J. Tafe, Molecular mechanisms of therapy resistance in solid tumors: chasing “moving” targets, *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* (2017). doi:10.1007/s00428-017-2101-7.
- [77] W. Pao, V.A. Miller, K.A. Politi, G.J. Riely, R. Somwar, M.F. Zakowski, M.G. Kris, H. Varmus, Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain, *PLoS Med.* 2 (2005) e73. doi:10.1371/journal.pmed.0020073.
- [78] S. Aviel-Ronen, F.H. Blackhall, F.A. Shepherd, M.-S. Tsao, K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review, *Clin. Lung Cancer.* 8 (2006) 30–38. doi:10.3816/CLC.2006.n.030.
- [79] S. Aviel-Ronen, B.P. Coe, S.K. Lau, G. da Cunha Santos, C.-Q. Zhu, D. Strumpf, I. Jurisica, W.L. Lam, M.-S. Tsao, Genomic markers for malignant progression in pulmonary adenocarcinoma with bronchioloalveolar features, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 10155–10160. doi:10.1073/pnas.0709618105.
- [80] T.V. Pavlova, V.I. Kashuba, O.V. Muravenko, S.P. Yenamandra, T.A. Ivanova, V.I. Zabarovskaia, E.R. Rakhmanaliev, L.A. Petrenko, I.V. Pronina, V.I. Loginov, O.I. Iurkevich, L.L. Kiselev, A.V. Zelenin, E.R. Zabarovskii, [Technology of analysis of epigenetic and structural changes of epithelial tumors genome with NotI-microarrays by the example of human chromosome], *Mol. Biol. (Mosk.).* 43 (2009) 339–347.
- [81] V.M. Sales, A.C. Ferguson-Smith, M.-E. Patti, Epigenetic Mechanisms of

- Transmission of Metabolic Disease across Generations, *Cell Metab.* 25 (2017) 559–571. doi:10.1016/j.cmet.2017.02.016.
- [82] H. Cedar, Y. Bergman, Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms, *Nat. Rev. Genet.* 10 (2009) 295–304. doi:10.1038/nrg2540.
- [83] A. Ooki, Z. Maleki, J.-C.J. Tsay, C.M. Goparaju, M. Brait, N. Turaga, H.-S. Nam, W. Rom, H. Pass, D. Sidransky, R. Guerrero-Preston, M.O. Hoque, A panel of novel detection and prognostic methylated DNA markers in primary non-small cell lung cancer and serum DNA, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* (2017). doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1222.
- [84] A.M. Herrera-Solorio, L. Armas-López, O. Arrieta, J. Zúñiga, P. Piña-Sánchez, F. Ávila-Moreno, Histone code and long non-coding RNAs (lncRNAs) aberrations in lung cancer: implications in the therapy response, *Clin. Epigenetics.* 9 (2017) 98. doi:10.1186/s13148-017-0398-3.
- [85] I.K. Sundar, I. Rahman, Gene expression profiling of epigenetic chromatin modification enzymes and histone marks by cigarette smoke: implications for COPD and lung cancer, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 311 (2016) L1245–L1258. doi:10.1152/ajplung.00253.2016.
- [86] M. Weber, I. Hellmann, M.B. Stadler, L. Ramos, S. Pääbo, M. Rebhan, D. Schübeler, Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome, *Nat. Genet.* 39 (2007) 457–466. doi:10.1038/ng1990.
- [87] F. Wu, M. Lu, L. Qu, D.-Q. Li, C.-H. Hu, DNA methylation of hMLH1 correlates with the clinical response to cisplatin after a surgical resection in Non-small cell lung cancer, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8 (2015) 5457–5463.
- [88] C. Kneip, B. Schmidt, A. Seegebarth, S. Weickmann, M. Fleischhacker, V. Liebenberg, J.K. Field, D. Dietrich, SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer in plasma, *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer.* 6 (2011) 1632–1638. doi:10.1097/JTO.0b013e318220ef9a.
- [89] T. Powrózek, P. Krawczyk, M. Nicoś, B. Kuźnar-Kamińska, H. Batura-Gabryel, J. Milanowski, Methylation of the DCLK1 promoter region in circulating free DNA and its prognostic value in lung cancer patients, *Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Span. Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* 18 (2016) 398–404. doi:10.1007/s12094-015-1382-z.
- [90] T. Powrózek, P. Krawczyk, T. Kucharczyk, J. Milanowski, Septin 9 promoter region methylation in free circulating DNA-potential role in noninvasive diagnosis of lung cancer: preliminary report, *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 31 (2014) 917. doi:10.1007/s12032-014-0917-4.
- [91] A.A. Ponomaryova, E.Y. Rykova, N.V. Cherdyntseva, T.E. Skvortsova, A.Y. Dobrodeev, A.A. Zav'yalov, L.O. Bryzgalov, S.A. Tuzikov, V.V. Vlassov, P.P. Laktionov, Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and post-treatment follow-up of lung cancer patients, *Lung Cancer Amst. Neth.* 81 (2013) 397–403. doi:10.1016/j.lungcan.2013.05.016.
- [92] I. Balgkouranidou, M. Chimonidou, G. Milaki, E.G. Tsarouxa, S. Kakolyris, D.R. Welch, V. Georgoulis, E.S. Lianidou, Breast cancer metastasis suppressor-1 promoter methylation in cell-free DNA provides prognostic information in non-small cell lung cancer, *Br. J. Cancer.* 110 (2014) 2054–2062. doi:10.1038/bjc.2014.104.
- [93] J.L. Ramirez, R. Rosell, M. Taron, M. Sanchez-Ronco, V. Alberola, R. de Las Peñas, J.M. Sanchez, T. Moran, C. Camps, B. Massuti, J.J. Sanchez, F. Salazar, S. Catot, Spanish Lung Cancer Group, 14-3-3sigma methylation in pretreatment serum circulating DNA of cisplatin-plus-gemcitabine-treated advanced non-small-cell lung

- cancer patients predicts survival: The Spanish Lung Cancer Group, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23 (2005) 9105–9112. doi:10.1200/JCO.2005.02.2905.
- [94] H. Wang, B. Zhang, D. Chen, W. Xia, J. Zhang, F. Wang, J. Xu, Y. Zhang, M. Zhang, L. Zhang, Y. Lu, Y. Geng, P. Huang, P. Huang, H. Wang, S. Pan, Real-time monitoring efficiency and toxicity of chemotherapy in patients with advanced lung cancer, *Clin. Epigenetics.* 7 (2015) 119. doi:10.1186/s13148-015-0150-9.
- [95] B. Schmidt, J. Beyer, D. Dietrich, I. Bork, V. Liebenberg, M. Fleischhacker, Quantification of cell-free mSHOX2 Plasma DNA for therapy monitoring in advanced stage non-small cell (NSCLC) and small-cell lung cancer (SCLC) patients, *PloS One.* 10 (2015) e0118195. doi:10.1371/journal.pone.0118195.
- [96] F. Salazar, M.A. Molina, M. Sanchez-Ronco, T. Moran, J.L. Ramirez, J.M. Sanchez, R. Stahel, P. Garrido, M. Cobo, D. Isla, J. Bertran-Alamillo, B. Massuti, F. Cardenal, C. Manegold, P. Lianes, J.M. Trigo, J.J. Sanchez, M. Taron, R. Rosell, First-line therapy and methylation status of CHFR in serum influence outcome to chemotherapy versus EGFR tyrosine kinase inhibitors as second-line therapy in stage IV non-small-cell lung cancer patients, *Lung Cancer Amst. Neth.* 72 (2011) 84–91. doi:10.1016/j.lungcan.2010.07.008.
- [97] R.A. Juergens, J. Wrangle, F.P. Vendetti, S.C. Murphy, M. Zhao, B. Coleman, R. Sebree, K. Rodgers, C.M. Hooker, N. Franco, B. Lee, S. Tsai, I.E. Delgado, M.A. Rudek, S.A. Belinsky, J.G. Herman, S.B. Baylin, M.V. Brock, C.M. Rudin, Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer, *Cancer Discov.* 1 (2011) 598–607. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0214.
- [98] C. Zhang, Y. Jin, H. Xu, H. Zhang, W. Zhang, X. Sun, C. Tan, C. Chen, [Relationship between promoter methylation of p16, DAPK and RAR beta genes and the clinical data of non-small cell lung cancer], *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi Chin. J. Med. Genet.* 28 (2011) 23–28. doi:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2011.01.006.
- [99] A.M. Zeidan, A.J. Davidoff, J.B. Long, X. Hu, R. Wang, X. Ma, C.P. Gross, G.A. Abel, S.F. Huntington, N.A. Podoltsev, U. Hajime, T. Prebet, S.D. Gore, Comparative clinical effectiveness of azacitidine versus decitabine in older patients with myelodysplastic syndromes, *Br. J. Haematol.* 175 (2016) 829–840. doi:10.1111/bjh.14305.
- [100] A.-M. Baird, S.G. Gray, K.J. O’Byrne, Epigenetics Underpinning the Regulation of the CXC (ELR +) Chemokines in Non-Small Cell Lung Cancer, *PLOS ONE.* 6 (2011) e14593. doi:10.1371/journal.pone.0014593.
- [101] A.M. Best, J. Chang, A.B. Dull, J.A. Beutler, E.D. Martinez, Identification of four potential epigenetic modulators from the NCI structural diversity library using a cell-based assay, *J. Biomed. Biotechnol.* 2011 (2011) 868095. doi:10.1155/2011/868095.
- [102] J. Kikuchi, T. Takashina, I. Kinoshita, E. Kikuchi, Y. Shimizu, J. Sakakibara-Konishi, S. Oizumi, V.E. Marquez, M. Nishimura, H. Dosaka-Akita, Epigenetic therapy with 3-deazaneplanocin A, an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, inhibits growth of non-small cell lung cancer cells, *Lung Cancer Amst. Neth.* 78 (2012) 138–143. doi:10.1016/j.lungcan.2012.08.003.
- [103] M. Zhang, F. Nie, M. Sun, R. Xia, M. Xie, K. Lu, W. Li, HOXA5 indicates poor prognosis and suppresses cell proliferation by regulating p21 expression in non small cell lung cancer, *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 36 (2015) 3521–3531. doi:10.1007/s13277-014-2988-4.
- [104] J. Garcia-Fernández, The genesis and evolution of homeobox gene clusters, *Nat.*

- Rev. Genet. 6 (2005) 881–892. doi:10.1038/nrg1723.
- [105] E.B. Lewis, A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*, *Nature*. 276 (1978) 565–570.
- [106] T. Rauch, Z. Wang, X. Zhang, X. Zhong, X. Wu, S.K. Lau, K.H. Kernstine, A.D. Riggs, G.P. Pfeifer, Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 5527–5532. doi:10.1073/pnas.0701059104.
- [107] J.M. Douville, D.Y.C. Cheung, K.L. Herbert, T. Moffatt, J.T. Wigle, Mechanisms of MEOX1 and MEOX2 Regulation of the Cyclin Dependent Kinase Inhibitors p21CIP1/WAF1 and p16INK4a in Vascular Endothelial Cells, *PLoS ONE*. 6 (2011) e29099. doi:10.1371/journal.pone.0029099.
- [108] J.-H. Kim, P.N. Bogner, S.-H. Baek, N. Ramnath, P. Liang, H.-R. Kim, C. Andrews, Y.-M. Park, Up-regulation of peroxiredoxin 1 in lung cancer and its implication as a prognostic and therapeutic target, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14 (2008) 2326–2333. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4457.
- [109] U. Fiedler, S. Christian, S. Koidl, D. Kerjaschki, M.S. Emmett, D.O. Bates, G. Christofori, H.G. Augustin, The sialomucin CD34 is a marker of lymphatic endothelial cells in human tumors, *Am. J. Pathol.* 168 (2006) 1045–1053. doi:10.2353/ajpath.2006.050554.
- [110] C. Puppini, F. Puglisi, L. Pellizzari, G. Manfioletti, M. Pestrin, M. Pandolfi, A. Piga, C. Di Loreto, G. Damante, HEX expression and localization in normal mammary gland and breast carcinoma, *BMC Cancer*. 6 (2006) 192. doi:10.1186/1471-2407-6-192.
- [111] R. Cortese, O. Hartmann, K. Berlin, F. Eckhardt, Correlative gene expression and DNA methylation profiling in lung development nominate new biomarkers in lung cancer, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (2008) 1494–1508. doi:10.1016/j.biocel.2007.11.018.
- [112] Y. Chen, M. Banda, C.L. Speyer, J.S. Smith, A.B. Rabson, D.H. Gorski, Regulation of the Expression and Activity of the Antiangiogenic Homeobox Gene GAX/MEOX2 by ZEB2 and MicroRNA-221, *Mol. Cell. Biol.* 30 (2010) 3902–3913. doi:10.1128/MCB.01237-09.
- [113] F. Ávila-Moreno, L. Armas-López, A.M. Álvarez-Moran, Z. López-Bujanda, B. Ortiz-Quintero, A. Hidalgo-Miranda, F. Urrea-Ramírez, R.M. Rivera-Rosales, E. Vázquez-Manríquez, E. Peña-Mirabal, J. Morales-Gómez, J.C. Vázquez-Minero, J.L. Téllez-Becerra, R. Ramírez-Mendoza, A. Ávalos-Bracho, E.G. de Alba, K. Vázquez-Santillán, V. Maldonado-Lagunas, P. Santillán-Doherty, P. Piña-Sánchez, J. Zúñiga-Ramos, Correction: Overexpression of MEOX2 and TWIST1 is Associated with H3K27me3 Levels and Determines Lung Cancer Chemoresistance and Prognosis, *PloS One*. 11 (2016) e0146569. doi:10.1371/journal.pone.0146569.
- [114] M. Ruas, G. Peters, The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives, *Biochim. Biophys. Acta*. 1378 (1998) F115-177.
- [115] C.J. Sherr, The INK4a/ARF network in tumour suppression, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 731–737. doi:10.1038/35096061.
- [116] J.T. Irelan, A. Gutierrez del Arroyo, A. Gutierrez, G. Peters, K.C. Quon, L. Miraglia, S.K. Chanda, A Functional Screen for Regulators of CKDN2A Reveals MEOX2 as a Transcriptional Activator of INK4a, *PLoS ONE*. 4 (2009) e5067. doi:10.1371/journal.pone.0005067.
- [117] B. Lucio, V. Manuel, R. Barrera-Rodriguez, Characterization of human NSCLC cell line with innate etoposide-resistance mediated by cytoplasmic localization of topoisomerase II alpha, *Cancer Sci.* 96 (2005) 774–783. doi:10.1111/j.1349-7006.2005.00111.x.

- [118] V. Ponce de León, R. Barrera-Rodríguez, Changes in P-glycoprotein activity are mediated by the growth of a tumour cell line as multicellular spheroids, *Cancer Cell Int.* 5 (2005) 20. doi:10.1186/1475-2867-5-20.
- [119] C. Guzmán, M. Bagga, A. Kaur, J. Westermarck, D. Abankwa, ColonyArea: An ImageJ Plugin to Automatically Quantify Colony Formation in Clonogenic Assays, *PLOS ONE*. 9 (2014) e92444. doi:10.1371/journal.pone.0092444.
- [120] K.J. O’Byrne, M.P. Barr, S.G. Gray, The role of epigenetics in resistance to Cisplatin chemotherapy in lung cancer, *Cancers*. 3 (2011) 1426–1453. doi:10.3390/cancers3011426.
- [121] S.O. Dolly, D.C. Collins, R. Sundar, S. Popat, T.A. Yap, Advances in the Development of Molecularly Targeted Agents in Non-Small-Cell Lung Cancer, *Drugs*. (2017). doi:10.1007/s40265-017-0732-2.
- [122] T.A. Rauch, X. Zhong, X. Wu, M. Wang, K.H. Kernstine, Z. Wang, A.D. Riggs, G.P. Pfeifer, High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 252–257. doi:10.1073/pnas.0710735105.
- [123] R.R. Singh, K. Kunkalla, C. Qu, E. Schlette, S.S. Neelapu, F. Samaniego, F. Vega, ABCG2 is a direct transcriptional target of hedgehog signaling and involved in stroma-induced drug tolerance in diffuse large B-cell lymphoma, *Oncogene*. 30 (2011) 4874–4886.
- [124] V.E. Villegas, M.F.-U. Rahman, M.G. Fernandez-Barrena, Y. Diao, E. Liapi, E. Sonkoly, M. Stähle, A. Pivarcsi, L. Annaratone, A. Sapino, S.R. Clavijo, T.R. Bürglin, T. Shimokawa, S. Ramachandran, P. Kapranov, M.E. Fernandez-Zapico, P.G. Zaphiropoulos, Identification of novel non-coding RNA-based negative feedback regulating the expression of the oncogenic transcription factor GLI1, *Mol. Oncol.* 8 (2014) 912–926. doi:10.1016/j.molonc.2014.03.009.
- [125] K.R. Cecchini, A. Raja Banerjee, T.H. Kim, Towards a genome-wide reconstruction of cis-regulatory networks in the human genome, *Semin. Cell Dev. Biol.* 20 (2009) 842–848. doi:10.1016/j.semcd.2009.06.005.
- [126] Z. Yuan, J.A. Goetz, S. Singh, S.K. Ogden, W.J. Petty, C.C. Black, V.A. Memoli, E. Dmitrovsky, D.J. Robbins, Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma, *Oncogene*. 26 (2006) 1046–1055. doi:10.1038/sj.onc.1209860.
- [127] E. Giroux Leprieur, T. Vieira, M. Antoine, N. Rozensztajn, N. Rabbe, A.-M. Ruppert, A. Lavole, J. Cadranel, M. Wislez, Sonic Hedgehog Pathway Activation Is Associated With Resistance to Platinum-Based Chemotherapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Carcinoma, *Clin. Lung Cancer*. 17 (2016) 301–308. doi:10.1016/j.clcc.2015.12.007.
- [128] S.H. Bernhart, H. Kretzmer, L.M. Holdt, F. Jühling, O. Ammerpohl, A.K. Bergmann, B.H. Northoff, G. Doose, R. Siebert, P.F. Stadler, S. Hoffmann, Changes of bivalent chromatin coincide with increased expression of developmental genes in cancer, *Sci. Rep.* 6 (2016) 37393. doi:10.1038/srep37393.
- [129] P.-C. Wu, J.-W. Lu, J.-Y. Yang, I.-H. Lin, D.-L. Ou, Y.-H. Lin, K.-H. Chou, W.-F. Huang, W.-P. Wang, Y.-L. Huang, C. Hsu, L.-I. Lin, Y.-M. Lin, C.-K.J. Shen, T.-Y. Tzeng, H3K9 histone methyltransferase, KMT1E/SETDB1, cooperates with the SMAD2/3 pathway to suppress lung cancer metastasis, *Cancer Res.* 74 (2014) 7333–7343. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3572.
- [130] M.P. Barr, S.G. Gray, A.C. Hoffmann, R.A. Hilger, J. Thomale, J.D. O’Flaherty, D.A. Fennell, D. Richard, J.J. O’Leary, K.J. O’Byrne, Generation and Characterisation of Cisplatin-Resistant Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines Displaying a Stem-Like

- Signature, PLoS ONE. 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0054193.
- [131] H. Wang, G. Zhang, H. Zhang, F. Zhang, B. Zhou, F. Ning, H.-S. Wang, S.-H. Cai, J. Du, Acquisition of epithelial–mesenchymal transition phenotype and cancer stem cell-like properties in cisplatin-resistant lung cancer cells through AKT/ β -catenin/Snail signaling pathway, *Eur. J. Pharmacol.* 723 (2014) 156–166. doi:10.1016/j.ejphar.2013.12.004.
- [132] M. Li, C. Balch, J.S. Montgomery, M. Jeong, J.H. Chung, P. Yan, T.H.M. Huang, S. Kim, K.P. Nephew, Integrated analysis of DNA methylation and gene expression reveals specific signaling pathways associated with platinum resistance in ovarian cancer, *BMC Med. Genomics*. 2 (2009) 34. doi:10.1186/1755-8794-2-34.
- [133] Y. Yang, Y. Fan, Y. Qi, D. Liu, K. Wu, F. Wen, S. Zhao, Side population cells separated from A549 lung cancer cell line possess cancer stem cell-like properties and inhibition of autophagy potentiates the cytotoxic effect of cisplatin, *Oncol. Rep.* 34 (2015) 929–935. doi:10.3892/or.2015.4057.
- [134] Y. Katoh, M. Katoh, Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation, *Curr. Mol. Med.* 9 (2009) 873–886.
- [135] I. Sullivan, D. Planchard, Next-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors for Treating EGFR-Mutant Lung Cancer beyond First Line, *Front. Med.* 3 (2016) 76. doi:10.3389/fmed.2016.00076.
- [136] X.-L. Tang, L. Yan, L. Zhu, D.-M. Jiao, J. Chen, Q.-Y. Chen, Salvianolic acid A reverses cisplatin resistance in lung cancer A549 cells by targeting c-met and attenuating Akt/mTOR pathway, *J. Pharmacol. Sci.* (2017). doi:10.1016/j.jphs.2017.06.006.
- [137] L. Gu, J.Z. Deng, S. Roy, P.T. Hammond, A Combination RNAi-Chemotherapy Layer-by-Layer Nanoparticle for Systemic Targeting of KRAS/P53 with Cisplatin to Treat Non-small Cell Lung Cancer, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* (2017). doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2186.

14. ANEXOS

Anexo 1 Diseño de primers expresión. Secuencia, tm y tamaño del amplicón de cada gen diseñado a ser validado

Gen	Secuencia (5'-3')	Tm Teórica	Tamaño	Tm Exp
<i>MEOX2</i>	CTGGATCTCACTGAAAGACAGGT TCCCTTTTTACATTACCAG	59	126	60
<i>GLI-1</i>	CCAGGAATTTGACTCCCAAG GGCTTTGAAGGGCCTCAG	60	124	60
<i>SHH</i>	GCTTCGACTGGGTGTACTACG GCCACCGAGTTCTCTGCT	59	70	60
<i>SMO</i>	TCACCCCTGTGGCAACTC CTGCAGCTCTGGGGAGAT	59	83	60
<i>PTCH 1</i>	TCTGGAGCAGATTTCCAAGG ACCCAGTTTAAATAAGAGTCTCTGAAA	59	91	60
<i>ABCG2</i>	TGGCTTAGACTCAAGCACAGC TCGTCCCTGCTTAGACATCC	60	67	60
<i>GAPDH</i>	AGCCACATCGCTCAGACAC GCCCAATACGACCAAATCC	60	66	60

Anexo 2 Diseño de primers promotor. Secuencia, y tamaño del amplicón de cada gen diseñado a ser validado

Gen	Secuencia (5'-3')	Tm Teórica	Tamaño	Tm Exp.
<i>MEOX2</i>	CGTAATTTTAGATTTGGCGTTT AATACGCCTATCCTTTCAAAAA	60	196	56
<i>GLI-1</i>	TCGTTGTTTTTGTATGTT AAAATTCAACCGAAAACGATA	59	218	56
<i>SHH</i>	TTCGGTTTTTCGTAATTTTT CTCCGAACGATTTAAAAACT	59	155	56
<i>SMO</i>	GCGAGTTAGAGTAATAAAGGAGT ATACGAATACAACCTCCGACTC	57	127	56
<i>PTCH 1 INI</i>	GACGTGTTTGGTTTTAGAATTT AAAAACAACCTATACGCGAATC	59	137	56
<i>PTCH 1 FIN</i>	CGGAAAAAGATATTTTTTCGT AACACAATAAACCCGACAACT	59	138	56
<i>ABCG2</i>	AAAAAATTTAGTCGTTTCGTTTGA TTATTTAAACGCTACCTCCGAA	61	194	56

Anexo 3 Diseño de primers promotor GLI-1. Secuencia, y tamaño del amplicón de cada gen diseñado a ser validado

GEN (REGIÓN)	SECUENCIA (5´- 3´)	POSICIÓN	TAMAÑO	TM EXP.
GLI-1 1	AGGCCGTGTGACATGTGATT GACAGAGCGAGACTCCGTCT	-2192 -2009	183	55
GLI-1 2	TCGGACTCCTGACTTGAGGT TCTTCTCCCCACCCAGTTCT	-1830 -1673	157	55
GLI-1 3	CCAGCCTGGGCAAATAGTGA TCAGAGACCCAGCTCAGTCA	-1541 -1375	166	55
GLI-1 4	CCCTCCAGAACTTCGAGACG GGCTCTGGAAGAAGGTGAGG	-822 -665	157	55
GLI-1 5	TTCCATCCAAAGGGTGAGGC CCCCGACAACCAGATTGAGG	-612 -457	155	55
GLI-1 6	AAAAAATTTAGTCGTTTCGTTTGA TTATTTAAAACGCTACCTCCGAA	-301 -109	193	55

Anexo 4 Diseño de primers de expresión para el gen GLI-1

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
NM_001160045.1 Homo sapiens GLI family zinc finger 1 (GLI1), transcript variant 2, mRNA

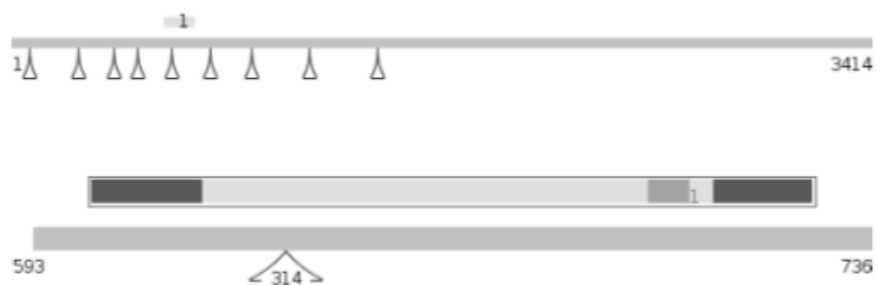
Assay rank 17

Use probe #1 (cat. no. 04684974001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	20	603 - 622	59	50	ccaggaatttgactccaag
Right	18	709 - 726	60	61	ggctttgaagggcctcag
Amplicon (124 nt)					
ccaggaatttgactccaagagcagctggtgcaccacatcaacagcagcagcaccacggggagcgaaggattcgtgtgccactggg gggctgctocagggagctgaggcccttcaaagcc					

The search was for intron spanning assays.
 This assay has: All criteria met.

Length of intron(s) spanned by this assay: 314 nt



Anexo 5 Diseño de primers de expresión para el gen MEOX2

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
NM_005924.4 Homo sapiens mesenchyme homeobox 2 (MEOX2), mRNA

Assay rank 2

Use probe #17 (cat. no. 04686900001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	23	951 - 973	59	48	ctggatctcactgaaagacaggt
Right	21	1056 - 1076	59	43	tccctttttcacattcaccag

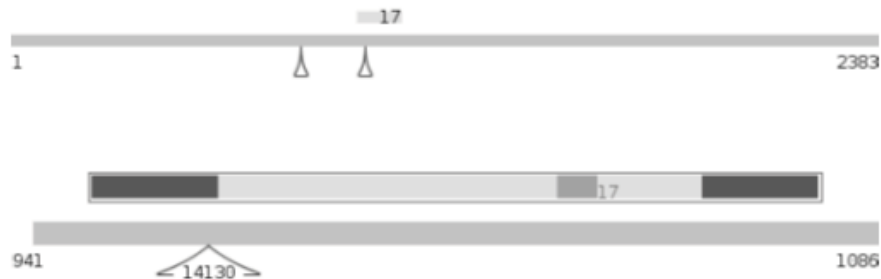
Amplicon (126 nt)

```
ctggatctcactgaaagacaggtgaaagtctggttccaaaacaggcggatgaagtggaagagggtaaaggggtggacagcaaggagctgc
ggctcgggaaaaggaactggtgaatgtgaaaaggga
```

The search was for intron spanning assays.

This assay has: All criteria met.

Length of intron(s) spanned by this assay: 14130 nt



Anexo 6 Diseño de primers de expresión para el gen SHH

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
NM_000193.2 Homo sapiens sonic hedgehog homolog (Drosophila) (SHH), mRNA

Assay rank 1

Use probe #86 (cat. no. 04689119001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	21	657 - 677	59	57	gcttcgactgggtgtactacg
Right	18	709 - 726	59	61	gccaccgagttctctgct

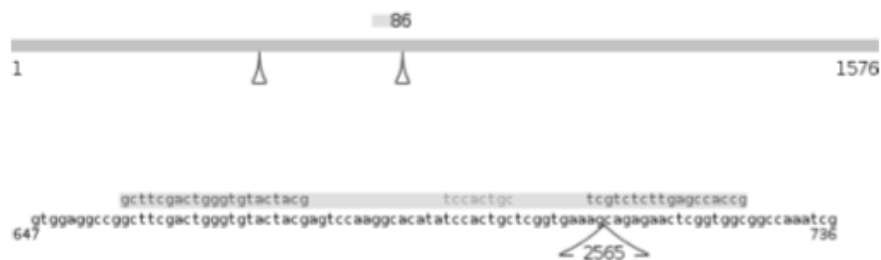
Amplicon (70 nt)

```
gcttcgactgggtgtactacgagtgccaaggcacatatocactgctcggtgaaagcagagaactcgggtggc
```

The search was for intron spanning assays.

This assay has: All criteria met.

Length of intron(s) spanned by this assay: 2565 nt



Anexo 7 Diseño de primers de expresión para el gen SMO

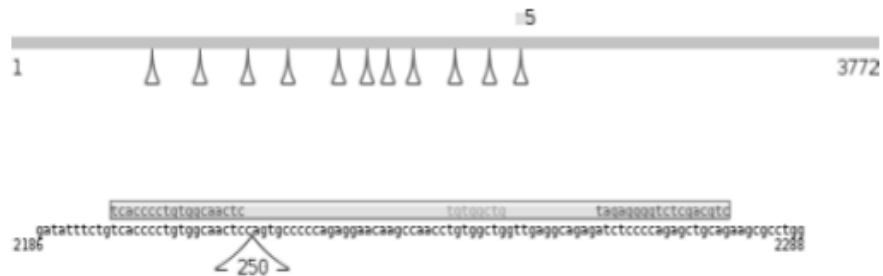
ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
NM_005631.3 Homo sapiens smoothened homolog (Drosophila) (SMO), mRNA

Assay rank 1

Use probe #5 (cat. no. 04685024001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	18	2196 - 2213	60	61	tcaccctgtggcaactc
Right	18	2261 - 2278	59	61	ctgcagctctggggagat
Amplicon (83 nt)					
tcaccctgtggcaactccagtgccccagaggaacaagccaacctgtggctggttgaggcagagatctccccagagctgcag					

This assay has: All criteria met.



Anexo 8 Diseño de primers de expresión para el gen PTCH1

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
NM_000264.3 Homo sapiens patched homolog 1 (Drosophila) (PTCH1), transcript variant 1b, mRNA

Assay rank 1

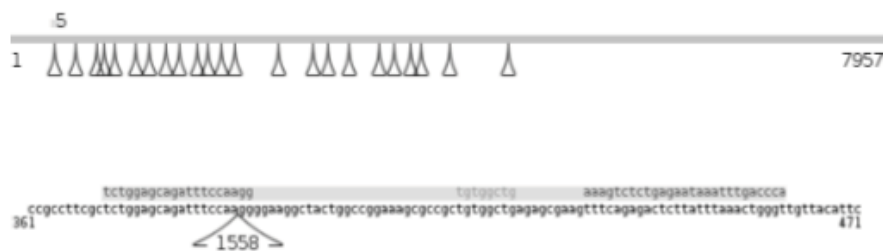
Use probe #5 (cat. no. 04685024001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	20	371 - 390	60	50	tctggagcagattccaagg
Right	27	435 - 461	59	33	accagtttaataagagtctctgaaa
Amplicon (91 nt)					
tctggagcagattccaagggaaggctactggccggaagcgccgctgtggctgagagcgaagtttcagagactcttatttaactgggt					

The search was for intron spanning assays.

This assay has: All criteria met.

Length of intron(s) spanned by this assay: 1558 nt



Anexo 9 Diseño de primers de expresión para el gen ABCG2

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:

NM_004827.2 Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 (ABCG2), mRNA

Assay rank 1

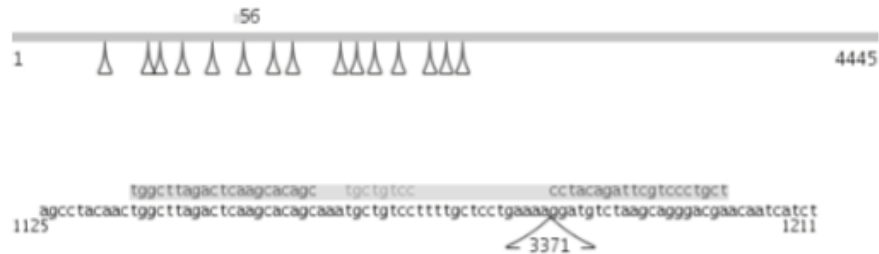
Use probe #56 (cat. no. 04688538001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	21	1135 - 1155	60	52	tggcttagactcaagcacagc
Right	20	1182 - 1201	60	55	tcgtccctgcttagacatcc
Amplicon (67 nt)					
tggcttagactcaagcacagcaaatgctgtcctttgctcctgaaaaggatgtctaagcagggacga					

The search was for intron spanning assays.

This assay has: All criteria met.

Length of intron(s) spanned by this assay: 3371 nt



Anexo 10 Diseño de primers de expresión para el gen GAPDH

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:

NM_002046.3 Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), mRNA

Assay rank 1

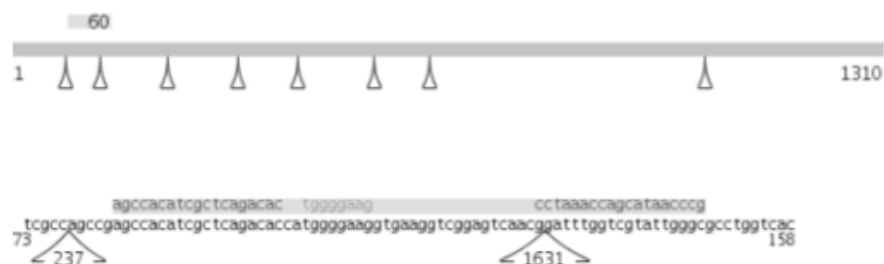
Use probe #60 (cat. no. 04688589001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	19	83 - 101	60	58	agccacatcgctcagacac
Right	19	130 - 148	60	53	gcccaatacagaccaaacc
Amplicon (66 nt)					
agccacatcgctcagacaccatggggaagggaagggtcggagtcacggatttggctgtattgggc					

The search was for intron spanning assays.

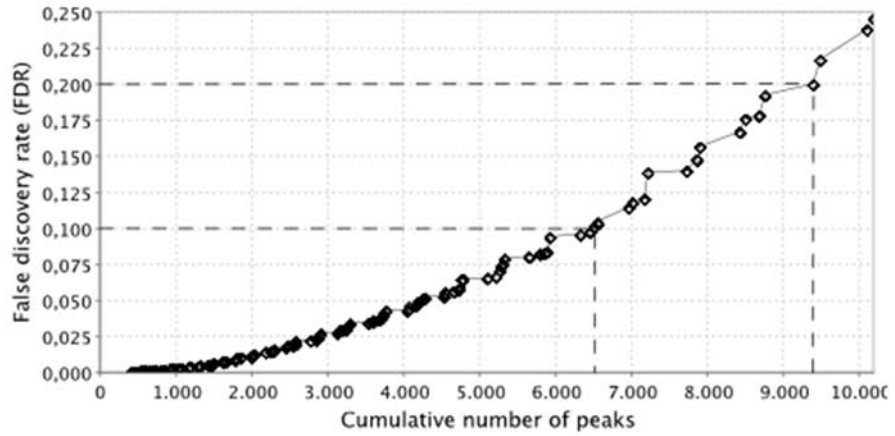
This assay has: All criteria met.

Length of intron(s) spanned by this assay: 1631 nt



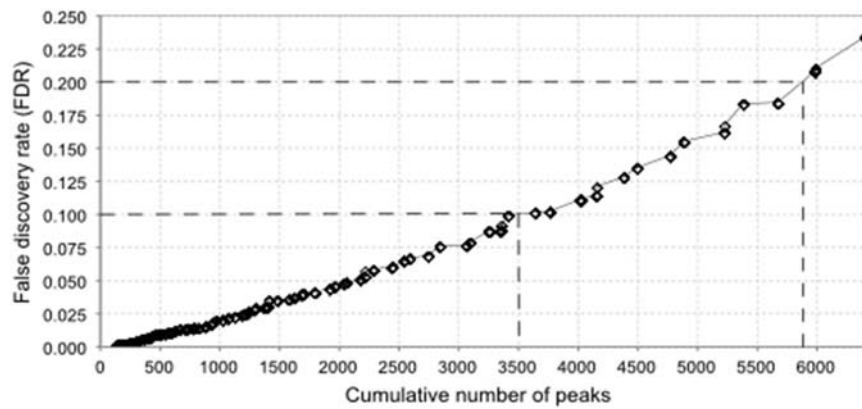
Anexo 11 Estimación de Picos en base a su FDR Paciente 13

**Estimated FDR for
data_GCH_MEOX_2_532/data_GCH_RNA_POL_II_635:
BLOCK1**



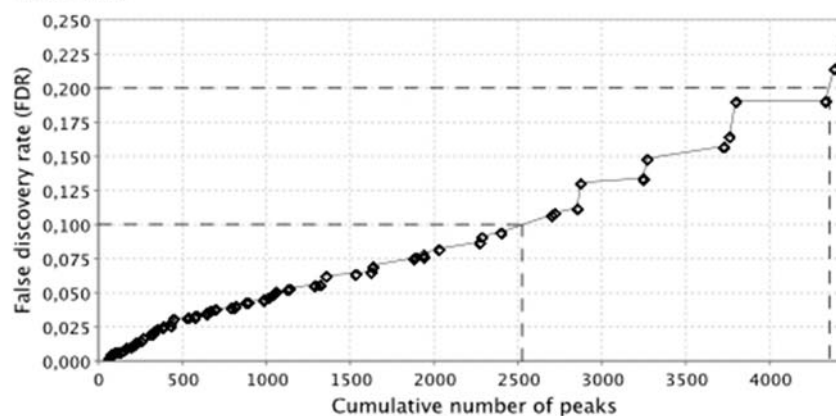
Anexo 12 Estimación de Picos en base a su FDR Paciente 6

**Estimated FDR for
data_AEE_MEOX_2_532/data_AEE_RNA_POL_II_635:
BLOCK1**



Anexo 13 Estimación de Picos en base a su FDR Paciente 3

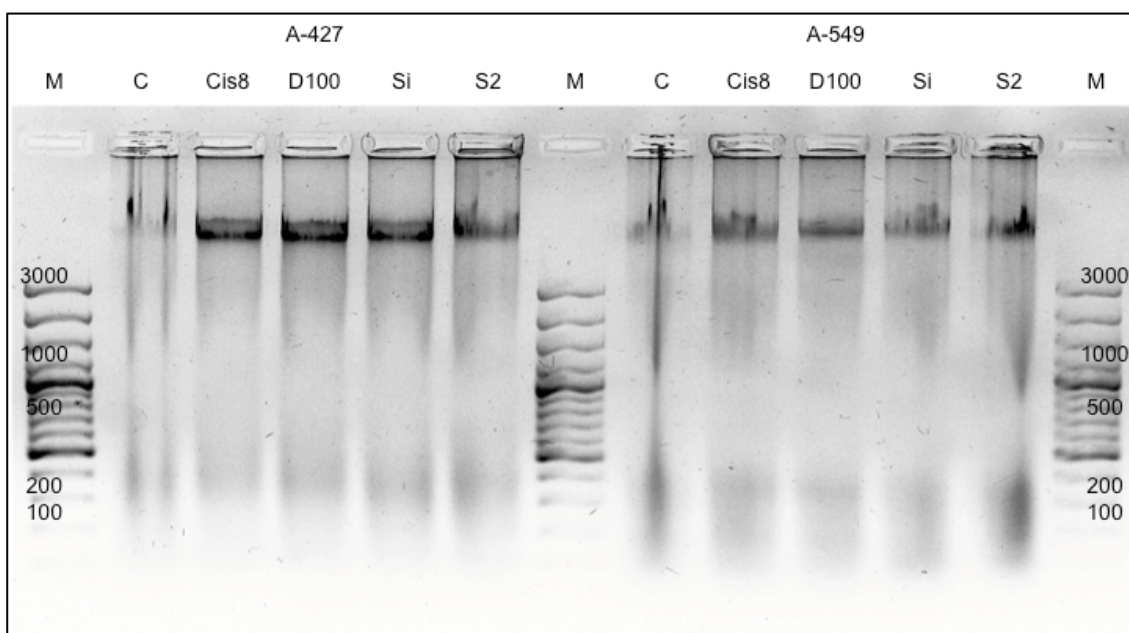
Estimated FDR for
data_GHM_MEOX_2_532/data_GHM_RNA_POL_II_635:
BLOCK1



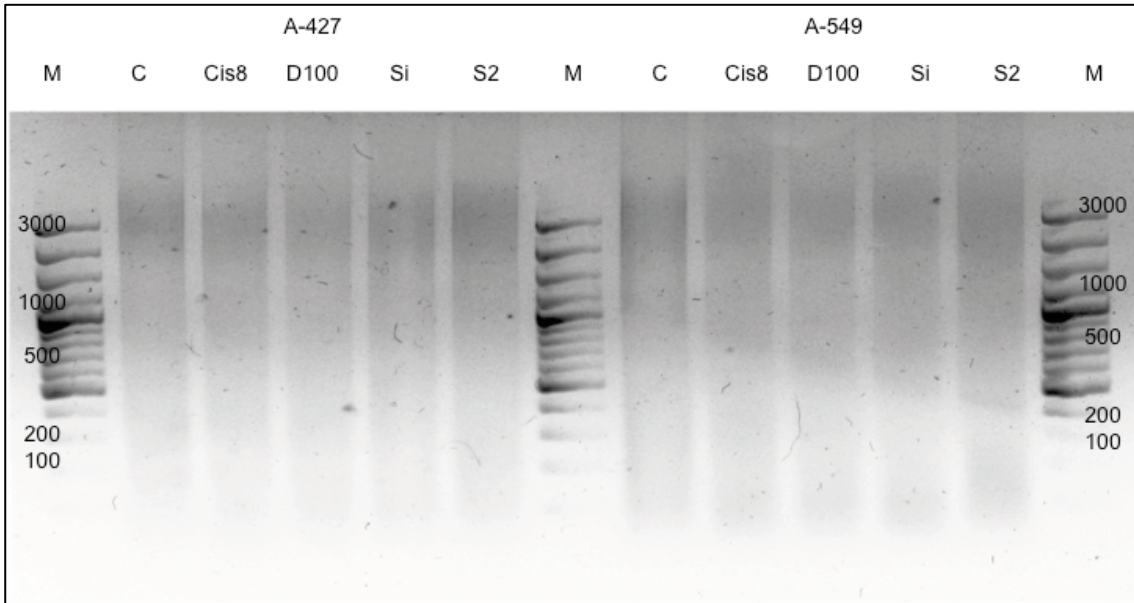
Fragmentación de la cromatina de líneas celulares

La fragmentación de la cromatina de las líneas celulares se llevo acabo bajo las distintas condiciones farmacológicas y parámetros descritos en materiales y métodos, en los anexos 14 y 15 se observa la fragmentación de la cromatina de las 2 líneas celulares A427 y A549, cuya fragmentación del DNA ocurre entre las 100 a 3000 pb. como control de integridad del DNA genómico se empleó el DNA nativo (no-sonicado) el cual posee un alto peso molecular indicando que la fragmentación de la cromatina no se debe a degradación del DNA.

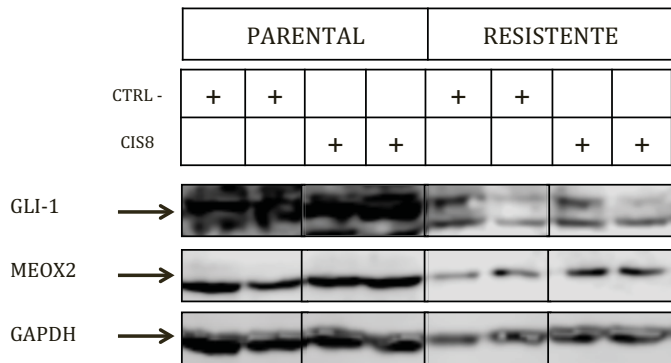
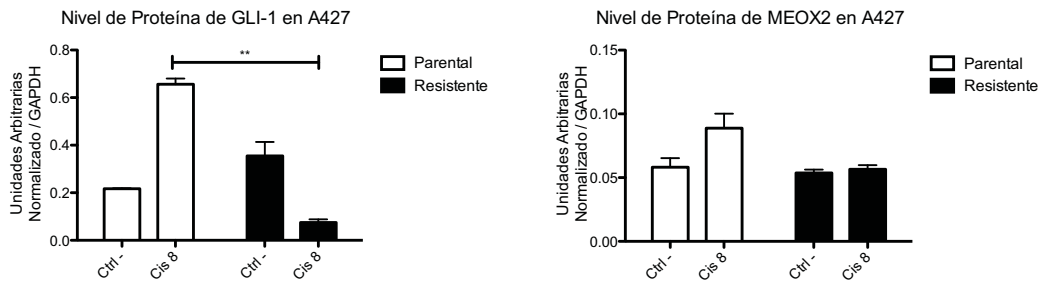
Anexo 14 Patrón de la cromatina antes de su fragmentación Líneas A427 y A549



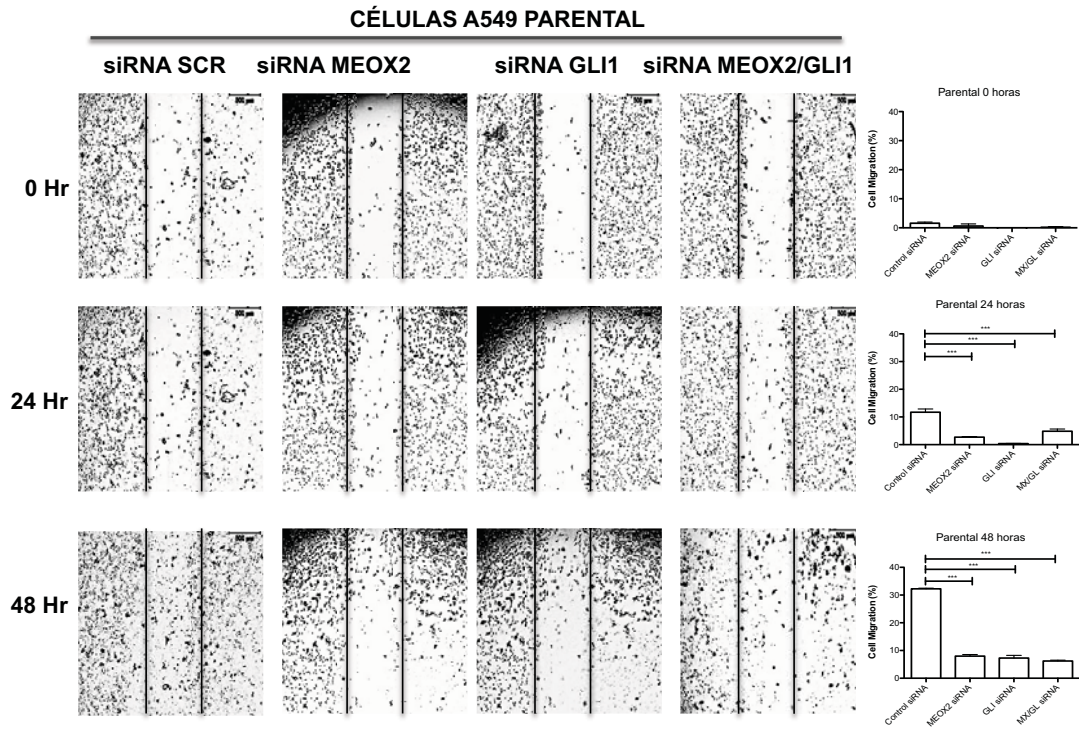
Anexo 15 Patrón de la cromatina después de su fragmentación Líneas A427 y A549



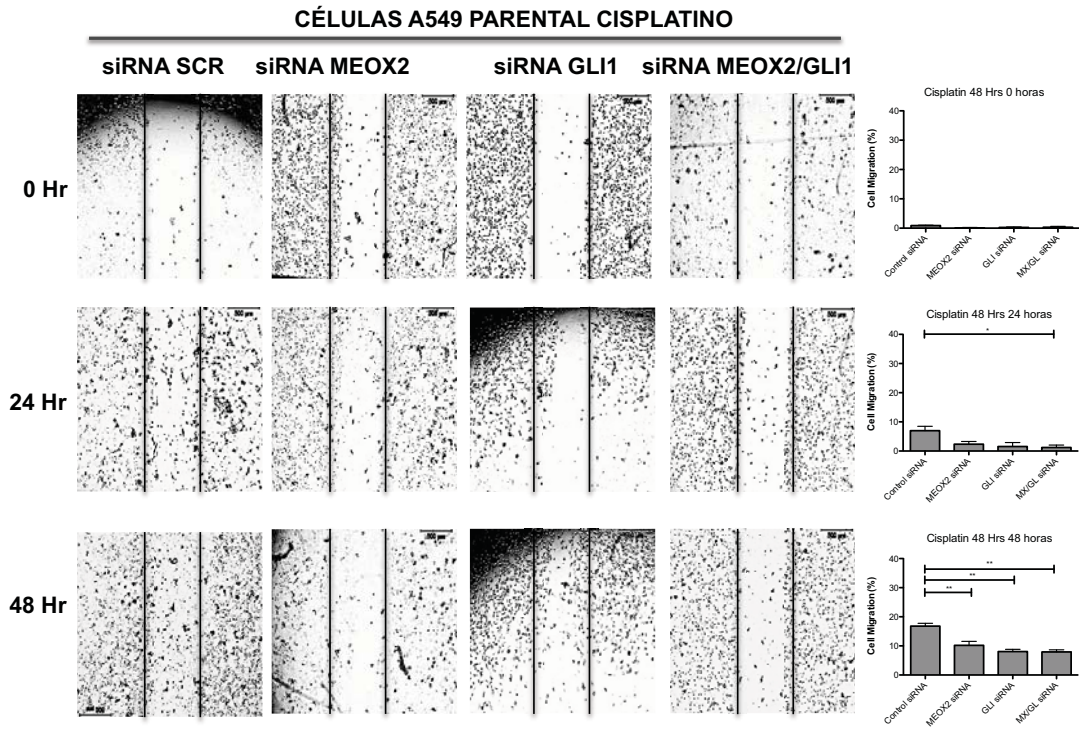
Anexo 16 Análisis de la expresión de proteínas en A427 resistentes a cisplatino



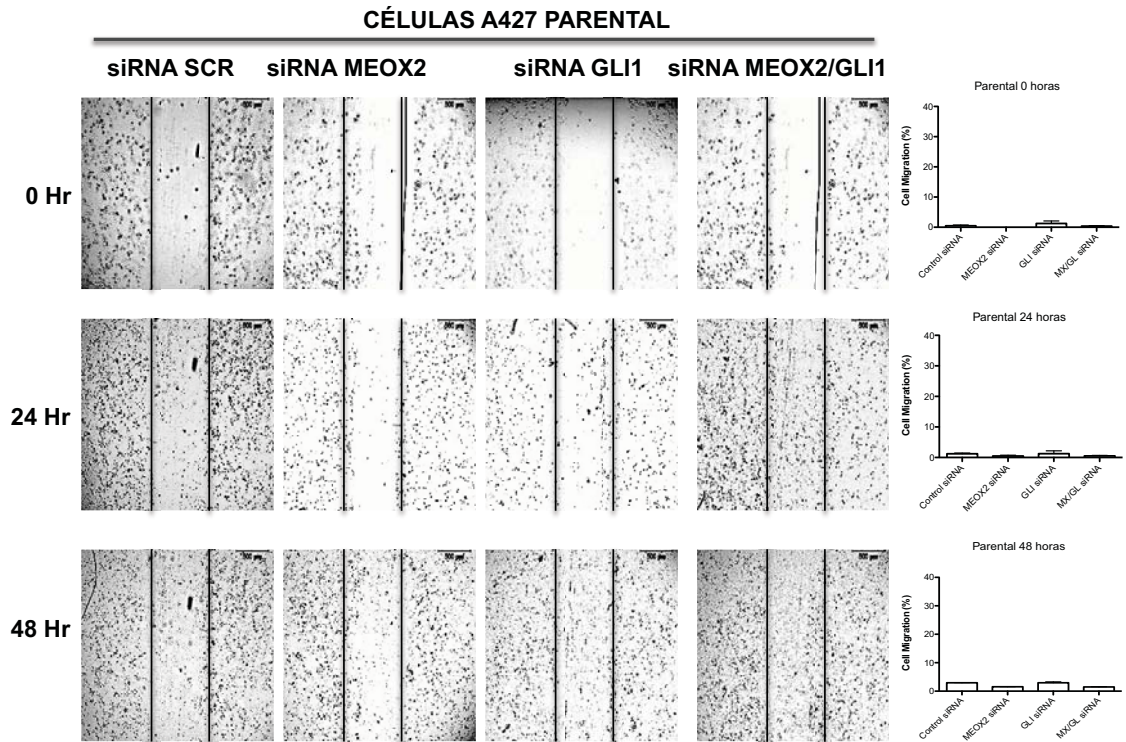
Anexo 17 Análisis de la migración celular por el método de herida en células parentales A549 bajo silenciamiento genético.



Anexo 18 Análisis de la migración celular por el método de herida en células parentales A549 expuestas a cisplatino, bajo silenciamiento genético.



Anexo 19 Análisis de la migración celular por el método de herida en células parentales A427 bajo silenciamiento genético.



Anexo 20 Análisis de la migración celular por el método de herida en células parentales A427 expuestas a cisplatino, bajo silenciamiento genético.

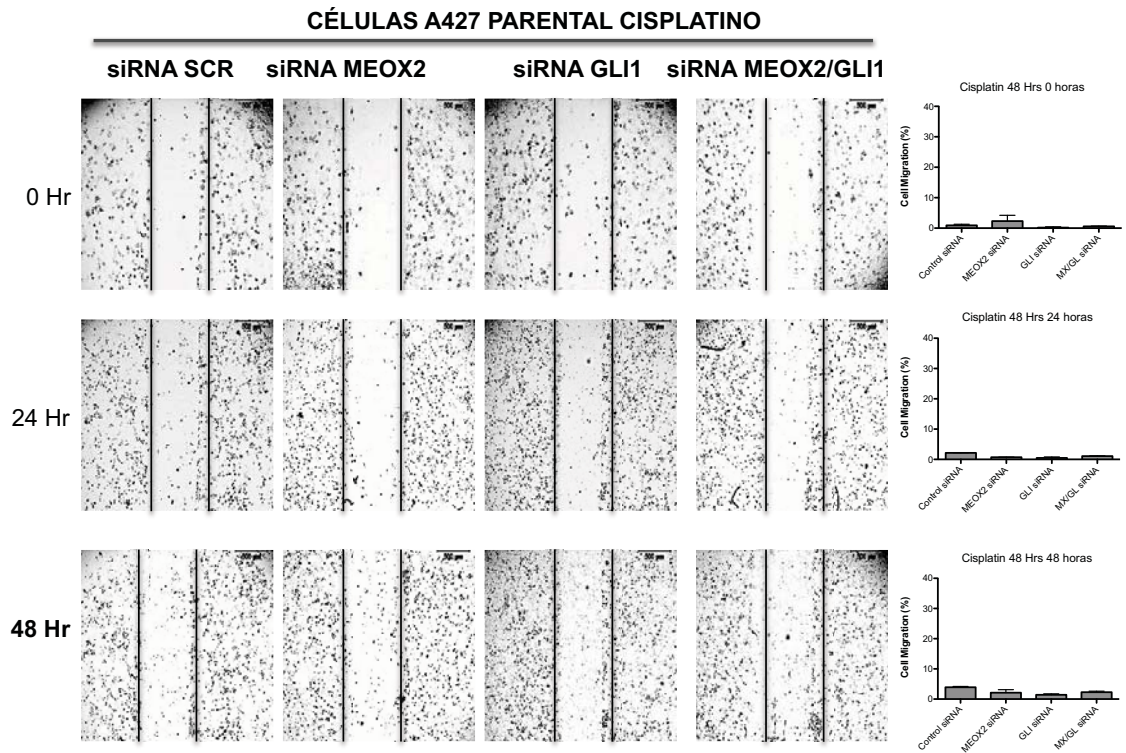


Tabla 3. Secuencias promotoras blanco del factor transcripcional MEOX2, Se realizó usando un FDR 0.2, en pacientes con cáncer pulmonar, en color naranja se muestra GLI-1 gen de la vía de señalización Hedgehog

PICO ID	CHR	PICO INICIO	PICO FINAL	PICO SCORE	PICO FDR	CADENA SENTIDO	# ACCESO	DESCRIPCIÓN
4213	chr1	1774654 19	177465 885	0.479067	0.18459	-	NM_00731 4	ABL2
1061	chr1	1773805 10	177381 312	0.589386	0.04324	-	NM_00515 8	ACSL3
3587	chr1	1773785 54	177379 039	0.795589	0.0535	-	NM_00113 6000	ALDH1A2
1865	chr2	2234336 36	223434 621	0.633109	0.00752	+	NM_00445 7	ANKRD50
3863	chr2	2234324 52	223432 818	0.427995	0.191	+	NM_00445 7	ANKRD53
6668	chr2	2234327 56	223433 449	0.609718	0.08287	+	NM_20337 2	AP1S2
177	chr15	5614461 3	561450 74	0.857094	0.01728	-	NM_17069 6	ARRDC4
1057	chr15	5609460 6	560954 78	0.590198	0.07544	-	NM_17069 7	BTBD3
7382	chr15	5609603 4	560967 40	0.575148	0.09818	-	NM_17069 7	C20orf111
1698	chr4	1258527 91	125853 754	0.646305	0.00435	-	NM_02033 7	C5orf30
1663	chr4	1258505 90	125850 860	0.543137	0.14854	-	NM_02033 7	CASC2
2586	chr4	1258519 53	125852 296	0.878884	0.01453	-	NM_02033 7	CCM2
3927	chr2	7105877 4	710593 42	0.497442	0.16211	+	NM_00111 5116	CEP170
2566	chr2	7105600 3	710565 72	0.485061	0.13397	+	NM_00111 5116	CIZ1
3085	chr2	7105704 3	710573 97	0.834351	0.03487	+	NM_00111 5116	CREM
623	chrX	1578254 0	157831 31	0.759303	0.02314	-	NM_00391 6	DACT1
3192	chrX	1578559 8	157860 71	0.455006	0.1072	-	NM_00391 6	DAZ3
1783	chrX	1578339 0	157840 87	0.985893	0.00328	-	NM_00391 6	DMD
905	chr15	9630484 7	963055 18	0.721764	0.04397	+	NM_18337 6	DTNA
3471	chr15	9630497 1	963054 16	0.442648	0.191	+	NM_18337 6	DYRK1A
1547	chr15	9630339 5	963045 10	1.022486	0.0088	+	NM_18337 6	EHBP1
399	chr20	1181962 6	118201 06	0.795783	0.03641	+	NM_18144 3	EN2
1291	chr20	1184341 4	118446 12	0.570716	0.02392	+	NM_01496 2	ERBB2IP
3841	chr20	1184630 1	118474 15	0.771008	0.04345	+	NM_01496 2	F3
286	chr20	4227227 5	422726 16	0.819189	0.03022	-	NM_01647 0	FBXO33
3617	chr20	4227519 3	422755 70	0.434831	0.15746	-	NM_01647 0	FHL1
1223	chr20	4227330 5	422738 86	1.079411	0.00154	-	NM_01647 0	FLJ32063
2025	chr5	1026222 64	102622 950	0.618241	0.07709	+	NM_03321 1	FOXK1
3020	chr5	1026211 23	102621 603	0.459467	0.15746	+	NM_03321 1	FOXP1

6375	chr5	1026214 28	102622 020	0.622095	0.11495	+	NM_03321 1	FSTL1
2155	chr10	1197962 80	119796 651	0.610494	0.08776	+	NR_02694 1	FYN
2735	chr10	1197941 84	119794 527	0.476998	0.13397	+	NR_02693 9	FZD1
5844	chr10	1197948 91	119795 394	0.650177	0.09625	+	NR_02694 1	GAB2
220	chr7	4500597 3	450067 74	0.837568	0.02188	+	NM_03144 3	GLI-1
2769	chr7	4503072 5	450312 17	0.475841	0.13397	+	NM_00102 9835	GTPBP5
4226	chr7	4500535 0	450056 87	0.745808	0.0535	+	NM_03144 3	HRH1
4219	chr1	2414846 40	241485 328	0.479067	0.18459	-	NM_01481 2	INTS6
1420	chr1	2414869 31	241487 302	0.559916	0.08721	-	NM_00104 2405	ITGA1
6261	chr1	2414863 27	241486 888	0.629841	0.14039	-	NM_00104 2404	KIAA0146
233	chr9	1300086 10	130009 097	0.836373	0.02314	-	NM_00113 1015	KIF2A
1909	chr9	1300055 67	130006 031	0.52188	0.08721	-	NM_01212 7	LIF
7432	chr9	1300072 26	130007 641	0.573205	0.16712	-	NM_00113 1015	MAGIX
4761	chr10	3545588 4	354566 61	0.429607	0.10251	+	NM_18306 0	MAN1A1
655	chr10	3546679 1	354672 86	0.64535	0.045	+	NM_18301 2	MDGA1
375	chr10	3552399 0	355250 85	1.362276	0	+	NM_18272 1	MMP24
2876	chr14	5817416 7	581746 56	0.559657	0.11139	+	NM_01665 1	NBEA
1687	chr14	5817205 8	581726 34	0.541994	0.05263	+	NM_00107 9520	NKX2-5
5727	chr14	5817334 8	581738 22	0.653892	0.11495	+	NM_00107 9520	NKX3-2
4176	chrY	2377535 0	237759 29	0.480305	0.05867	+	NM_02036 4	OGFR
738	chrY	2536956 5	253714 94	0.630152	0	-	NM_02036 4	PDE4B
8405	chrY	2537060 1	253710 99	0.458075	0.16712	-	NM_02036 4	PELO
1172	chrX	3119467 0	311951 39	0.696028	0.04148	-	NM_00401 6	PORCN
592	chrX	3294942 7	329501 08	0.657231	0.00702	-	NM_00400 7	PPP1R3F
7629	chrX	3313941 8	331398 11	0.559561	0.09625	-	NM_00400 6	PRDM13
5002	chr18	3032753 1	303281 00	0.402296	0.11483	+	NM_03297 9	PRKG1
517	chr18	3042550 5	304260 50	0.677605	0.0393	+	NM_00112 8175	PRKRA
7851	chr18	3042633 1	304271 34	0.53307	0.09818	+	NM_00112 8175	PVRL3
1297	chr21	3766195 5	376624 07	0.6795	0.05137	+	NM_10139 5	RGS3
2899	chr21	3771217 0	377128 25	0.468277	0.13397	+	NM_13043 6	RUFY3
2321	chr21	3765907 2	376596 27	0.90875	0.01453	+	NM_10139 5	SATB1
2128	chr2	6278615 8	627868 49	0.610498	0.00968	+	NM_01525 2	SDCCAG8

3126	chr2	6275206 1	627525 34	0.456528	0.15746	+	NM_00114 2615	SEC24B
3493	chr2	6278553 8	627860 21	0.802261	0.04345	+	NM_01525 2	SORBS2
3451	chr7	1549423 84	154944 409	0.52065	0	+	NM_00142 7	SPTBN1
4035	chr7	1549410 33	154941 393	0.419859	0.191	+	NM_00142 7	TANC1
7069	chr7	1549419 68	154942 317	0.590432	0.14039	+	NM_00142 7	TBX20
1724	chr5	6525735 0	652577 93	0.640321	0.06909	+	NM_01869 5	TLX3
3686	chr5	6525745 6	652580 01	0.43075	0.191	+	NM_00100 6600	TTC3
1533	chr5	6525848 7	652589 47	1.026457	0.00758	+	NM_00100 6600	WASF3
825	chr1	9477978 4	947802 63	0.730007	0.04397	-	NM_00199 3	WASL
2275	chr1	9478238 4	947829 77	0.500978	0.13397	-	NM_00199 3	WDFY3
4512	chr1	9478209 6	947829 77	0.72929	0.08081	-	NM_00199 3	WWP1
5348	chr14	3897078 0	389715 37	0.35818	0.07914	-	NM_20330 1	YTHDF1
2595	chr14	3897331 8	389736 69	0.484942	0.13397	-	NM_20330 1	ZEB1
4086	chr14	3897201 6	389724 21	0.751976	0.06601	-	NM_20330 1	ZFHX3
777	chrX	1350577 75	135058 236	0.738211	0.03022	+	NM_00115 9700	ZNF135
905	chrX	1350543 43	135055 220	0.606675	0.0393	+	NM_00144 9	ZNF330
1283	chrX	1351037 99	135104 382	1.065831	0.00168	+	NM_00115 9701	ZNF664

Tabla 4 Cohorte de pacientes y seguimiento clínico de pacientes con Cáncer Pulmonar (n=90).

	% (n/N)
Genero	
Femenino	63.3 (57/90)
Masculino	36.7 (33/90)
Edad (Años)	
Media (± S.D.)	56.2 (14.1)
Mediana	58.5
Mediana Edad (Años)	
< 60	53.3 (48/90)
≥60	46.7 (42/90)
Exposición a humo de tabaco	
No Fumador	48.9 (44/90)
Fumador	51.1 (46/90)
Tabaquismo (paquetes/años)	
Media (± S.D.)	18.2 (22.9)
Mediana	10.3
Mediana de tabaquismo (paquetes/años)	
Fumador leve (< 10.18)	50 (23/46)
Fumador crónico (≥10.18)	50 (23/46)
Exposición a humo de leña	
Presente	72 (65/90)
Ausente	27.8 (25/90)
Exposición Asbestos	
Presente	7.8 (7/90)
Ausente	92.2 (83/90)
Estadio Clínico	
IIIb	23.3 (21/90)
IV	76.7 (69/90)
ECOG PS	
0-1	82.2 (74/90)
2-4.	17.8 (16/90)
Histología	
Adenocarcinoma	84.4 (76/90)
Epidermoide	7.8 (7/90)
Carcinoma células grandes	5.6 (5/90)
indiferenciado y otros carcinomas NSCLC	2.2 (2/90)
Quimioterapia basada en Cisplatino	
No	20 (18/90)
Yes	80 (72/90)
Respuesta terapéutica a quimioterapia basada en Cisplatino	
Respuesta Completa	2.8 (2/72)
Respuesta Parcial	40.3 (29/72)
Enfermedad estable	40.3 (29/72)
Progresión de la enfermedad	16.7 (12/72)
Mutación en EGFR	
Negativo	60 (54/90)
Positivo	36.7 (33/90)
Sin determinar	3.3 (3/90)

Epigenomic study identifies a novel mesenchyme homeobox2-GLI1 transcription axis involved in cancer drug resistance, overall survival and therapy prognosis in lung cancer patients

Armas López Leonel¹, Piña-Sánchez Patricia², Arrieta Oscar³, Guzman de Alba Enrique⁴, Ortiz Quintero Blanca⁴, Santillán Doherty Patricio⁴, Christiani David C.⁵, Zúñiga Joaquín⁴ and Ávila-Moreno Federico^{1,4}

¹National University Autonomous of México (UNAM), Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala, Biomedicine Research Unit (UBIMED), Lung Diseases And Cancer Epigenomics Laboratory, Mexico State, Mexico

²Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Centro Medico Nacional (CMN) Siglo XXI, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas (UIMEO), Molecular Oncology Laboratory, Mexico City, Mexico

³National Cancer Institute (INCAN), Thoracic Oncology Clinic, Mexico City, Mexico

⁴National Institute of Respiratory Diseases (INER), Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico

⁵Harvard Medical School, Harvard School of Public Health, Department of Environmental Health, Boston Massachusetts, USA

Correspondence to: Federico Ávila Moreno, **email:** avilamore@hotmail.com, f.avila@unam.mx

Keywords: lung cancer, homeobox transcription factors, Epigenetics cancer drug resistance, overall survival, treatment prognosis

Received: May 26, 2016

Accepted: April 11, 2017

Published: May 09, 2017

Copyright: Leonel et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Several homeobox-related gene (HOX) transcription factors such as mesenchyme HOX-2 (MEOX2) have previously been associated with cancer drug resistance, malignant progression and/or clinical prognostic responses in lung cancer patients; however, the mechanisms involved in these responses have yet to be elucidated. Here, an epigenomic strategy was implemented to identify novel MEOX2 gene promoter transcription targets and propose a new molecular mechanism underlying lung cancer drug resistance and poor clinical prognosis. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays derived from non-small cell lung carcinomas (NSCLC) hybridized on gene promoter tiling arrays and bioinformatics analyses were performed, and quantitative, functional and clinical validation were also carried out. We statistically identified a common profile consisting of 78 gene promoter targets, including Hedgehog-GLI1 gene promoter sequences ($FDR \leq 0.1$ and $FDR \leq 0.2$). The GLI-1 gene promoter region from -2,192 to -109 was occupied by MEOX2, accompanied by transcriptionally active RNA Pol II and was epigenetically linked to the active histones H3K27Ac and H3K4me3; these associations were quantitatively validated. Moreover, siRNA genetic silencing assays identified a MEOX2-GLI1 axis involved in cellular cytotoxic resistance to cisplatin in a dose-dependent manner, as well as cellular migration and proliferation. Finally, Kaplan-Maier survival analyses identified significant MEOX2-dependent GLI-1 protein expression associated with clinical progression and poorer overall survival using an independent cohort of NSCLC patients undergoing platinum-based oncological therapy with both epidermal growth factor receptor (EGFR)-non-mutated and EGFR-mutated status. In conclusion, this is the first study to investigate epigenome-wide MEOX2-transcription factor occupation identifying a novel overexpressed MEOX2-GLI1 axis and its clinical association with platinum-based cancer drug resistance and EGFR-tyrosine kinase inhibitor (TKI)-based therapy responses in NSCLC patients.

INTRODUCTION

Lung cancer remains the leading cause of death due to malignant disease in both the U.S.A. and worldwide, with 1.6 million cases annually [1, 2, 3, 4]. Non-small-cell lung carcinomas (NSCLCs) have been associated with exposure to carcinogenesis-promoting environmental risk factors, including tobacco smoke [5], as well several genetic and epigenetic aberrations in the lung [6]; however, notably, the number of lung malignancy-related deaths that are not tobacco-associated is continuously increasing [2, 6].

Several molecular mechanisms and cell-signaling pathways that may or may not be induced by exposure to environmental risk factors contribute to lung tumor biology, as reflected in the “Hallmarks of Cancer,” including genetic [8], transcriptional [9], and epigenetic aberrations in the cancer epigenome that are involved in [10–13] progression, survival and/or therapeutic responses in lung cancer patients [14–16].

Several studies have described epigenome-wide aberration profiles in lung cancer patients; some have identified DNA hypermethylation profiles at gene promoter sequences for transcription factors, while others have characterized the homeobox-related genes (HOX) *MSX1*, *OTX1*, *OSR1*, *IRX2*, *PAX6* [17], *SIX*, *LHX*, *PAX*, *DLX* and *ENGRAILED* [18], as well HOXA cluster genes such as *HOXA7* and *HOXA9* [19]. Notably, some HOX gene transcription factors have been proposed to be potential biomarkers for early diagnosis and/or to monitor treatment outcomes in lung cancer patients [20].

In NSCLC, certain mesenchyme-HOX (MEOX) family genes, such as MEOX2, have previously been associated with histopathological progression, poor clinical prognosis and oncological chemoresistance [21]. However, the mechanisms associated with HOX-related genes such as MEOX2 in the context of lung cancer drug resistance, overall survival, and clinical prognosis has yet to be fully elucidated.

In this study, we investigated the lung cancer epigenome to profile target gene promoters that are occupied and likely regulated by the transcription factor HOX-related gene MEOX2 accompanied by transcriptionally active RNA Pol II and epigenetic activation histone markers in human solid lung carcinomas. Bioinformatics analysis allowed us to identify a molecular signature consisting of 78 gene promoters ($FDR \leq 0.2$), particularly the Hedgehog-GLI1 gene promoter (with the stringent statistical values $FDR \leq 0.1$ and $FDR \leq 0.2$), accompanied by the enrichment of active RNA Pol II. In addition, quantitative validation and functional analyses confirmed that expression of the MEOX2-GLI1 transcriptional axis, accompanied by active RNA Pol II and the epigenetic activation histones H3K27Ac and H3K4me3, were involved in resistance to the cancer drug cisplatin and lung cancer cell migration and proliferation. We also demonstrated that

the MEOX2-GLI1 axis is clinically associated with poorer overall survival in lung cancer patients with both Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-non-mutated and EGFR-mutated status. Thus, for the first time, we have described a novel mechanism by which the MEOX2-GLI1 axis is involved in lung cancer malignancy and platinum-based therapy resistance, as well as an association with clinical progression and poor overall survival, in both EGFR-non-mutated and EGFR-mutated lung cancer patients receiving EGFR-tyrosine kinase inhibitor (TKI)-based therapies.

RESULTS

MEOX2 immunoprecipitation on promoter tiling arrays reveals new MEOX2 gene promoter targets in lung cancer patients

The primary goal of this study was to identify gene promoter targets of the HOX-related gene transcription factor MEOX2 in human solid lung carcinomas, to identify and propose new mechanisms, *e.g.*, transcriptional axes, involved in lung oncological treatment resistance, and to characterize the association between clinical progression and overall survival in lung cancer patients. To address these questions, we implemented an epigenomics approach involving immunoprecipitation assays targeting MEOX2 and the RNA Pol II active enzyme using fragmented chromatin derived from 13 solid lung adenocarcinomas obtained from NSCLC patients ranging in age from 62 to 74 years, with clinical outcomes identified as lower (1 to 16 months) or higher (upper to 70 months) overall survival (Table I). The majority of cases demonstrated partial responses to first/second-line oncological treatment regimens based on cisplatin/paclitaxel-avelbline and were selected to isolate immunoprecipitated DNA (IP-DNA) in MEOX2 and RNA Pol II immunoprecipitation assays that was used for subsequent competitive hybridization on NimbleGen promoter tiling sequence arrays, following a pipeline strategy described in Supplementary Figure 1A. Through bioinformatics analysis, we observed the enriched MEOX2 occupation of gene promoter sequences (Log2 above 532 nm fluorescence) *versus* RNA Pol II occupation (Log2 below 635 nm fluorescence) in the lung cancer patients designated P-13, P-6 and P-3 (Figure 1A). Differential MEOX2/RNA Pol II occupancy throughout the epigenome at gene promoter sequences was likely accompanied by the enrichment of active *versus* repressive epigenetic histone markers, as determined when we compared the epigenome of solid lung adenocarcinomas (identified in the present work) with the previously reported lung cancer epigenome from the lung cell line A549 obtained from the ENCODE project database (Figure 1B).

Additionally, bioinformatics analysis of 1,000-bp segments using the fluorescence index Log2-Ratio

Table I: Clinical outcomes of the INER lung cancer patient cohort (n=13)

PATIENT	AGE	GENDER	WOOD SMOKE	TOBACCO	ASBESTOS/ AROMATIC COMPOUND	NSCLC TYPE	TNM	FAMILY HERITAGE CANCER	FOLLOW UP	TREATMENT	CLINICAL RESPONSE	CURRENT STATUS	CANCER-DRUG FIRST LINE TREATMENT (CYCLES)	CANCER-DRUG SECOND LINE TREATMENT (CYCLES)
P-1	60	FEMALE	+	-	-	AD Solid	T2 N3 M1	+	94 months	Adjuvant Chemotherapy/ Radiotherapy	Partial Response, Local Dissemination	ALIVE	CISPLATINUM / VINORELBINE Partial response (6)	ERLONITIB Partial response (6)
P-2	41	FEMALE	+	-	-	AD Solid	T3 N<3 M0	+	74 months	Coadjuvant and Adjuvant Chemotherapy/ Radiotherapy	Partial Response	ALIVE	CDDP / NAVELBINE Partial response (6)	N.A.
P-3	62	FEMALE	+	-	-	AD Solid	T4 N3 M1	+	70 months	Adjuvant Chemotherapy/ Radiotherapy	Partial Response, Progression, Local / Distal Dissemination	ALIVE	CISPLATINUM / NAVELBINE Partial response (6)	CARBOPLATINUM / PACLITAXEL Partial response (6)
P-4	77	FEMALE	+	-	-	AD Solid	T2 N<3M1	-	63 months	Adjuvant Chemotherapy/ Radiotherapy	Response 75% reduction	ALIVE	CARBOPLATINUM / PACLITAXEL Partial response (6)	DOCETAXEL / ASA404 Partial response (6)
P-5	67	FEMALE	-	+	-	AD N.S.	T1 N<3M1	+	48 months	Adjuvant Chemotherapy	No Response, Local / Distal Dissemination	DEAD	CARBOPLATINUM / DOCETAXEL/ BEVACIZUMAB Partial response (6)	PEMETREXED / CARBOPLATINUM No response (1)
P-6	70	FEMALE	+	-	-/+	AD N.S.	T4 N0 M0	-	16 months	Adjuvant Chemotherapy/ Radiotherapy	Partial Response, Local / Distal Dissemination	DEAD	CARBOPLATINUM / GEMCITABINE No response (2)	N.A.
P-7	48	FEMALE	+	-	-	AD N.S.	T4 N<3M1	-	13 months	Adjuvant Chemotherapy	Partial Response	DEAD	CISPLATINUM / DOCETAXEL Partial response (6)	CARBOPLATINUM/ GEMZAR No response (2)
P-8	71	FEMALE	-	+	-	AD N.S.	T4 N3 M1	-	11 months	Adjuvant Chemotherapy	No Response	DEAD	CARBOPLATINUM / DOCETAXEL Partial response (6)	CDDP/ NAVELBINE PEMETREXED No response (1)
P-9	36	FEMALE	-	-	-	AD Solid	T4 N<3M1	-	11 months	Adjuvant Chemotherapy	No Response, Local / Distal Dissemination	DEAD	DOCETAXEL / CISPLATINUM Partial response (2)	PEMETREXED / CARBOPLATINUM No response (1)
P-10	68	FEMALE	-	-	N.S.	AD N.S.	N.S.	+	7 months	Adjuvant Chemotherapy / Radiotherapy	N.S.	DEAD	CARBOPLATINUM / PACLITAXEL Partial response (1)	ERLONITIB No response (1)
P-11	55	FEMALE	-	+	-	AD N.S.	N.S.	-	6 months	N.S.	N.S.	DEAD	N.A.	N.A.
P-12	64	FEMALE	+	-	-	AD N.S.	T4 N0 M0	-	2 months	Patient Refuse Treatment	Treatment Abandonment	DEAD	N.A.	N.A.
P-13	74	FEMALE	+	-	-	AD Solid	T3 N<3M1	-	1 month	Patient Refuse Treatment	N.A.	DEAD	N.A.	N.A.

Adenocarcinomas (AD). Not Specified (N.S.). Not Applicable (N.A.).

(MEOX2_532/RNA Pol II_635) identified a total of 6,340, 3,707 and 2,512 fluorescence peaks in the lung cancer patients P-13, P-6 and P-3, respectively, with statistical significance at $FDR \leq 0.1$ (Supplementary Figure 1B), representing a total of 5,419, 3,486 and 2,048 gene promoters in each patient, respectively (Figure 2A). Furthermore, 8,440, 5,577 and 4,317 fluorescence peaks were statistically significant at $FDR \leq 0.2$ (Supplementary Figure 1B), corresponding to a total of 6,787, 5,536 and 3,347 gene promoters in patients P-13, P-6 and P-3, respectively (Figure 2A).

Importantly, these findings suggest a statistically significant molecular signature consisting of 13 ($FDR \leq 0.1$) and/or 78 ($FDR \leq 0.2$) MEOX2 gene target

promoters (Figure 2A; listed in Supplementary Table I) common to patients P-13, P-6 and P-3 despite their differing clinical survival data (Table I), likely controlling and/or modulating gene expression for cell signaling pathways.

MEOX2 gene promoter targets are associated with cellular and embryonic differentiation signaling pathways in lung cancer patients

Using the MEOX2 gene promoter target data (Log2-Ratio MEOX2/RNA Pol II, $FDR \leq 0.2$), we predicted biological, molecular and cellular signaling pathways involved in embryonic development, protein-

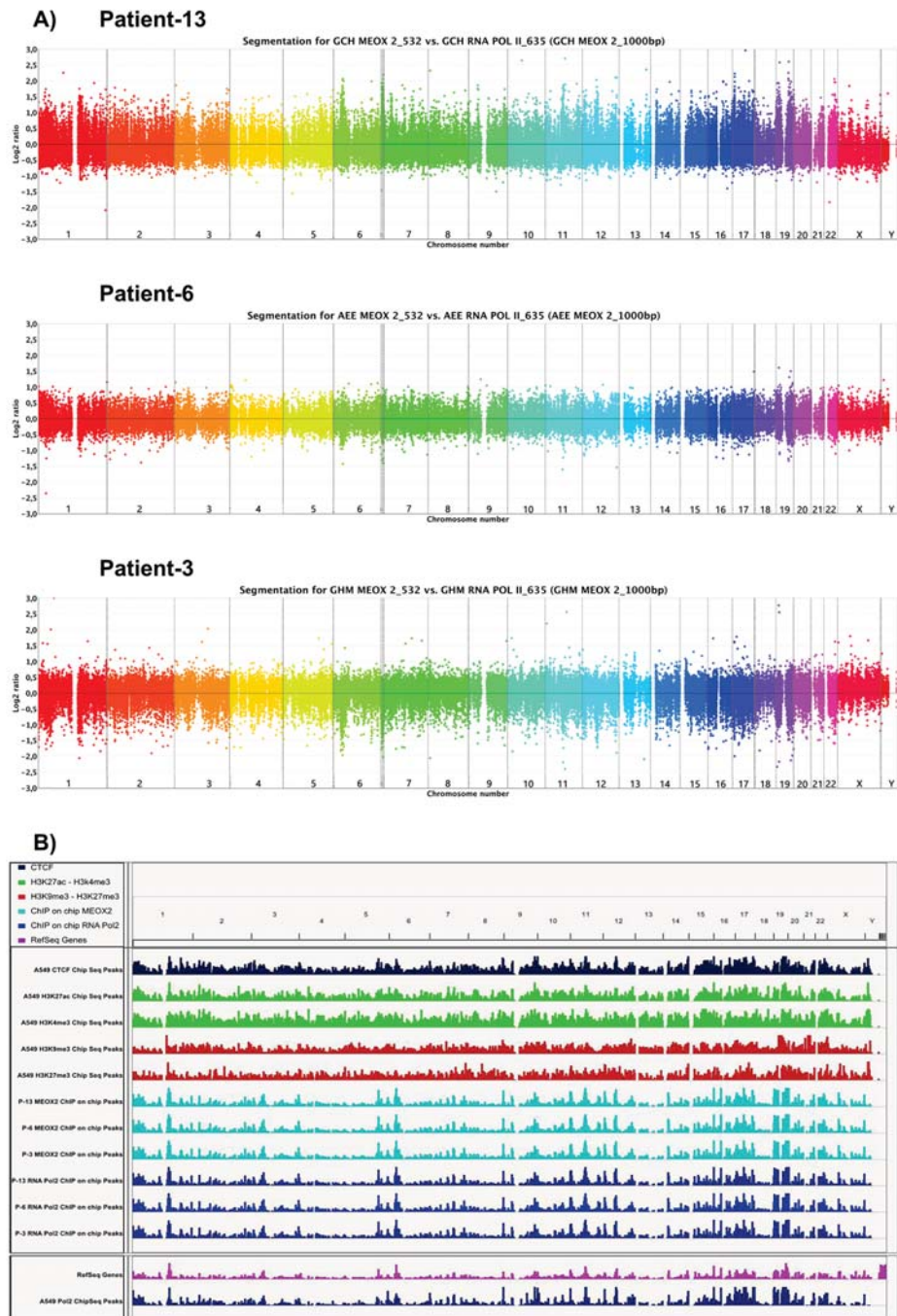


Figure 1: Bioinformatics analysis shows MEOX2 and RNA Pol II occupancy throughout the lung cancer epigenome to identify a new MEOX2 gene promoter target profile. (A) Ideograms obtained via the CGH method indicate peaks of fluorescence intensity for channels 532/635, representing the enrichment of MEOX2_532 (above) and RNA Pol II_635 (bottom) throughout the lung cancer epigenome derived from lung adenocarcinoma patients. **(B)** Lung cancer epigenome, showing occupation of the CTCF insulator (dark-blue marks), activation histones H3K4me3 and H3K27Ac (green marks), and repression histones H3K9me3 and H3K27me3 (red marks) derived from A549 lung adenocarcinoma cells obtained from the ENCODE project database (deposited by the Broad Laboratory). Epigenome occupation by the transcription factor MEOX2 (turquoise marks) and RNA Pol II (dark-blue marks) in lung adenocarcinoma patients (generated by the present study). Additionally, the mRNA transcriptome profile (pink marks below) and RNA Pol II (dark-blue marks) epigenome occupation derived from A549 lung adenocarcinoma cells, taken from the ENCODE project database (deposited by the HudsonAlpha laboratory) are shown. All ENCODE tracks correspond to ChIPSeq assays, while present work tracks correspond to ChIP-on-chip assays utilizing gene promoter tiling arrays. All data were analyzed and visualized using IGV Viewer Program (version 2.3.60). Color codes have been included as a figure legend; increasing color intensity indicates the enrichment of epigenetic and transcriptional markers.

protein binding, ion binding, nucleic acid and nucleotide synthesis processes. Additionally, we investigated several cell-signaling pathways, such as TGF- β , WNT, NOTCH, MAPK, Jak-STAT, and mTOR, and Sonic Hedgehog (SHH) (Figure 2B), for which association with the Hedgehog-GLI1 gene promoter was statistically significant using both stringent $FDR \leq 0.1$ and $FDR \leq 0.2$

values (Figure 2A and Supplementary Table I). Interactome prediction analysis revealed a high probability of protein interactions among MEOX2 and protein nuclear factors such as the transcription factors PAX1, PAX3, RELA, and ZEB2, as well PCNA and CDKN1A-2A, which are involved in DNA replication and cell cycle control, respectively (Figure 2C).

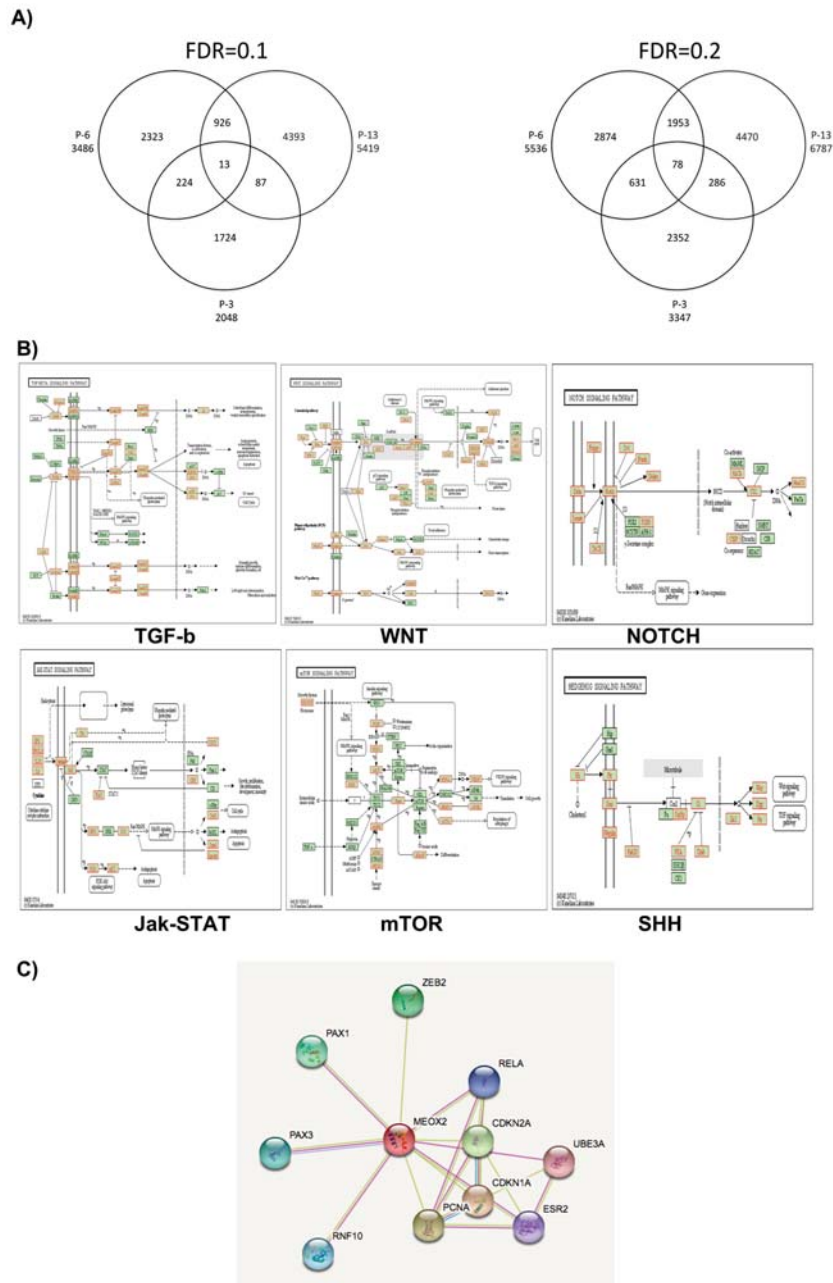
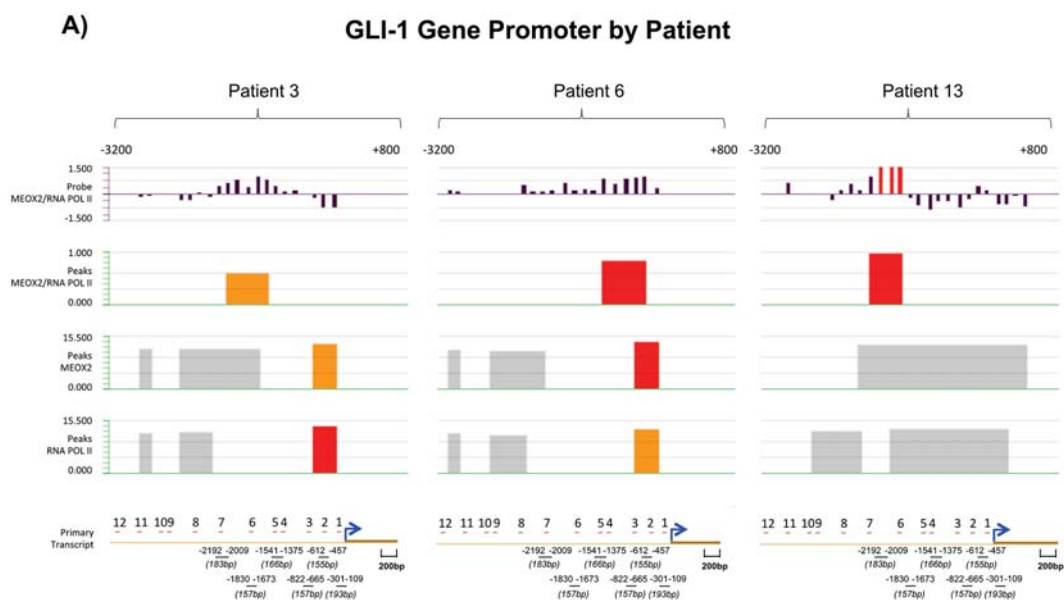


Figure 2: Cell signaling pathways predicted via bioinformatics analysis by the KYOTO genome expression database. (A) MEOX2 gene promoter targets derived from lung cancer patients are clustered via Venn diagram analysis (patients P-13, P-6, and P-3). **(B)** Prediction analyses to identify cell signaling pathways, based on ChIP-on-chip bioinformatics data derived from MEOX2 gene target promoters in lung adenocarcinoma patients (representative image taken from P-6, AEE5536gensymbol.txt) with $FDR \leq 0.2$. AEE5536gensymbol.txt; organism: hsapiens; ID type: gene_symbol; ref set: genome, i.e., the entire Entrez Gene list; statistic: hypergeometric; significance level: 0.05; MTC: Bonferroni; minimum genes: 2. **(C)** Interactome protein-protein analysis predictions were performed based on selection of the MEOX2 protein using the STRING bioinformatics program (Version 10.0; <http://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=5WpBaIiJVSoV>).



B) GLI-1 Gene At Genomic And Epigenomic Position

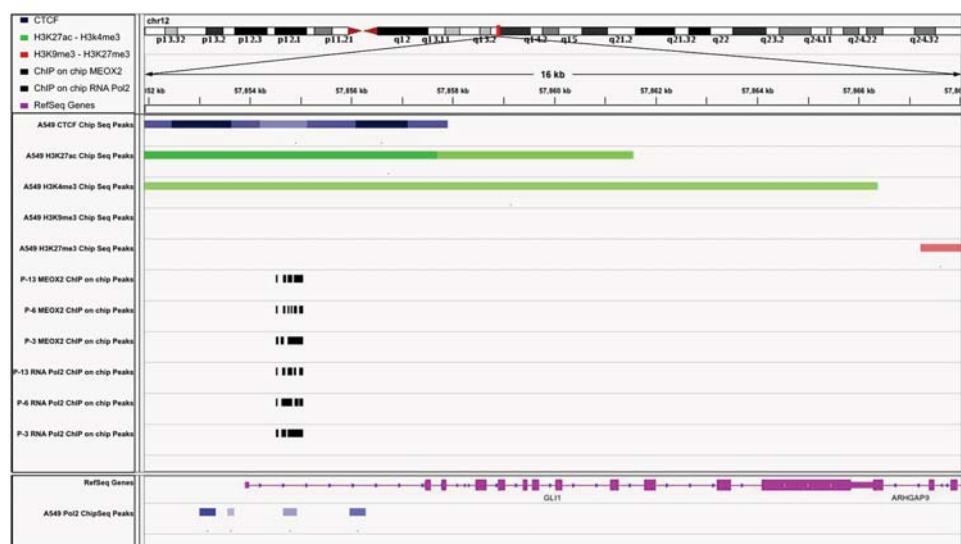


Figure 3: Statistically significant occupancy of Hedgehog-GLI1 gene promoter sequences by MEOX2 and RNA Pol II is accompanied by an activation histone profile in lung adenocarcinoma patients and lung cancer cells. (A) Bioinformatics analyses identified 7 of 12 putative MEOX2-binding domains throughout GLI-1 gene promoter sequences (lower black bars) that were significantly associated with both MEOX2 and active RNA Pol II in lung adenocarcinoma patients (P-3, P-6, and P-13) and detected based on fluorescence peaks, which were determined via the alignment of at least 4 probes with a 90% or 95% call rate; statistically significant FDR values were obtained. **(B)** Bioinformatics analysis revealed CTCF insulators (dark-blue marks) as well as the histone activation markers H3K4me3 and H3K27Ac (green marks) and the absence of the repressive histones H3K9me3 and H3K27me3 (red marks) in A549 lung adenocarcinoma cells (ENCODE project database); this epigenetic activation pattern was accompanied by occupation of the transcription factor MEOX2 and active enzyme RNA Pol II (black marks) in solid lung adenocarcinomas (present study). Transcriptome expression profile (pink marks) accompanied by RNA Pol II (blue marks below) in A549 lung adenocarcinoma cells. All data were analyzed and visualized using the IGV Viewer Program (version 2.3.60). Color coding is provided in the figure legend; increased color intensity indicates the enrichment of epigenetic and transcriptional markers.

MEOX2 and RNA Pol II are positioned throughout GLI-1 gene promoter sequences

Bioinformatics analyses of GLI-1 gene promoter sequences between -3,200 bp and +800 bp were performed by evaluating the fluorescence absolute intensities obtained from individually imprinted probes and determining the fluorescence ratio of the *MEOX2_532* "upper" and *RNA Pol II_635* "below" channels (first track, Figure 3A).

Second-track (Figure 3A) fluorescence peaks were based on the fluorescence probe ratios (MEOX2/RNA Pol II Ratio) for the patients P-13 and P-6, which demonstrated fluorescence intensity peaks at $FDR \leq 0.05$ (red segments), while patient P-3 exhibited peaks (orange segments) at $FDR \leq 0.1$, primarily located from -3,200 to +1 bp in the GLI-1 gene promoter (Figure 3A).

Similarly, as shown in Figure 3A (third track), we identified MEOX2 fluorescence peaks in the GLI-1 gene promoter demonstrating a range of significance levels at $FDR \leq 0.05$, $FDR \leq 0.1$ and $FDR \leq 0.2$ (red, orange and gray color segments, respectively). Interestingly, in the fourth track, the significant presence of RNA Pol II on GLI-1 gene promoter sequences suggested that the GLI-1 gene is transcriptionally active, given the presence of the MEOX2 transcription factor, as well as epigenetically altered, demonstrated by a histone activation profile involving H3K4me3 and H3K27Ac and active enzyme RNA Pol II, which were previously identified in lung adenocarcinoma cells A549 obtained from the ENCODE project database analyzed here (Figure 3B).

The GLI-1 gene promoter is occupied by MEOX2 and active RNA Pol II and is epigenetically associated with the activation histones H3K27Ac and H3K4me3

The bioinformatics results suggested the physical occupation and positive regulation of GLI-1 gene promoter sequences by the transcriptional factor MEOX2. To confirm this hypothesis, we quantitatively validated the MEOX2 occupancy of GLI-1 gene promoter sequences in 13 lung samples from patients with adenocarcinoma (Table I) and in the lung adenocarcinoma cell lines A427 and A549.

We designed an oligonucleotide set (Supplementary Table II) that covered 7 of 12 "TAATTA" MEOX putative transcription binding sites (spanning a sequence promoter region from -2,192 to -109 bp) identified via *in silico* prediction analysis using the TF-Search online program *Computational Biology Research Consortium* (see lower section of Figure 3A), and additionally we predicted 29 MEOX2 putative domains between -3,200 and -200 bp on the GLI-1 gene promoter using the bioinformatics program Jaspar (data not shown).

Quantitative qPCR analysis confirmed MEOX2 (Figure 4A) and RNA Pol II (Figure 4B) occupancy on GLI-1 gene promoter sequences in the region

spanning -2,192 to -109 bp, and we detected higher levels of MEOX2 and RNA Pol II, particularly at MEOX2-putative 6 and 3 transcription binding sites (Figure 4A–4B).

MEOX2 and RNA Pol II occupancy on the GLI-1 gene promoter was differentially enriched, likely correlating with different clinical parameters such as overall survival time and/or cancer drug response (Table I). We identified significant ($p \leq 0.05$) quantitative enrichment in domain 3 compared to domain 6 of the GLI-1 gene promoter, including in the lung adenocarcinoma cell lines A427 and A549 (Figure 4C–4D). These findings indicate that MEOX2 occupancy is compatible with positive transcriptional modulation accompanied by enrichment of the epigenetic activation histones H3K27Ac and H3K4me3 (Figure 4E–4F), specifically the significant enrichment of H3K27Ac (Figure 4G) and H3K4me3 (Figure 4H) in domain 3 compared with 6 domain ($p \leq 0.05$), including in the A427 and A549 cell lines.

In contrast, decreased enrichment of the repressive histones H3K27me3 and H3K9me3 in both lung adenocarcinoma patients and the lung adenocarcinoma cell lines A427 and A549 was also detected on GLI-1 gene promoter (data not shown); instead an increased active histone profiling may also be confirmed for GLI-1 gene and promoter sequences in A549 lung cancer cells based on the bioinformatics analyses obtained from the ENCODE project database (Figure 3B). These results strongly suggest that positive transcriptional and epigenetic regulation of the MEOX2-GLI1 axis is involved in malignant lung tumor biology and cancer drug resistance *versus* responses, as previously suggested for MEOX2 in human lung cancer [21]; however, the mechanisms involved remain uncharacterized, and it is possible that a previously undescribed MEOX2 protein interaction on the GLI-1 gene promoter is responsible for lung cancer drug resistance and/or lung oncological therapy responses.

Inducible mRNA and protein GLI-1 expression occur in a MEOX2- and cisplatin dose-dependent manner in lung cancer

We observed a MEOX2-dependent reduction in GLI-1 mRNA expression both in the absence and the presence of cisplatin and confirmed this observation using a specific anti-MEOX2 siRNA cocktail (Figure 5A). Specifically, reduced MEOX2 protein expression following the application of anti-MEOX2 siRNAs correlated with reduced GLI-1 protein co-expression levels (Supplementary Figure 2A).

Furthermore, an inducible, cisplatin dose-dependent MEOX2 protein expression pattern was identified in lung adenocarcinoma cells (Supplementary Figure 2B), corresponding to cisplatin-induced GLI-1 protein expression in the lung adenocarcinoma cell lines A427 and A549 that was markedly reduced by anti-MEOX2 siRNAs (Figure 5B).

To demonstrate the probable contribution of the MEOX2-GLI1 axis to chemoresistance, we performed cellular cytotoxic assays to evaluate cisplatin dose responses using the lung adenocarcinoma cells lines A427 and A549. First, inhibitory concentrations (IC:50) were calculated by constructing cisplatin dose-dependent curves; the IC:50 was approximately 30 μM for both cell lines (Figure 6A). Next, genetic silencing

was performed using siRNA-MEOX2, and we observed a reduction in the IC:50s for both A427 (10.44 μM) and A549 (16.75 μM) cells. Similar effects were seen with siRNA-GLI1 or a mixture of siRNA-MEOX2 plus siRNA-GLI1 (Figure 6B), but no significant reduction in cellular viability occurred with either anti-MEOX2 or anti-GLI-1 siRNAs in an EGFR-mutated lung cancer cell line H1975 with non-detectable MEOX2 mRNA expression

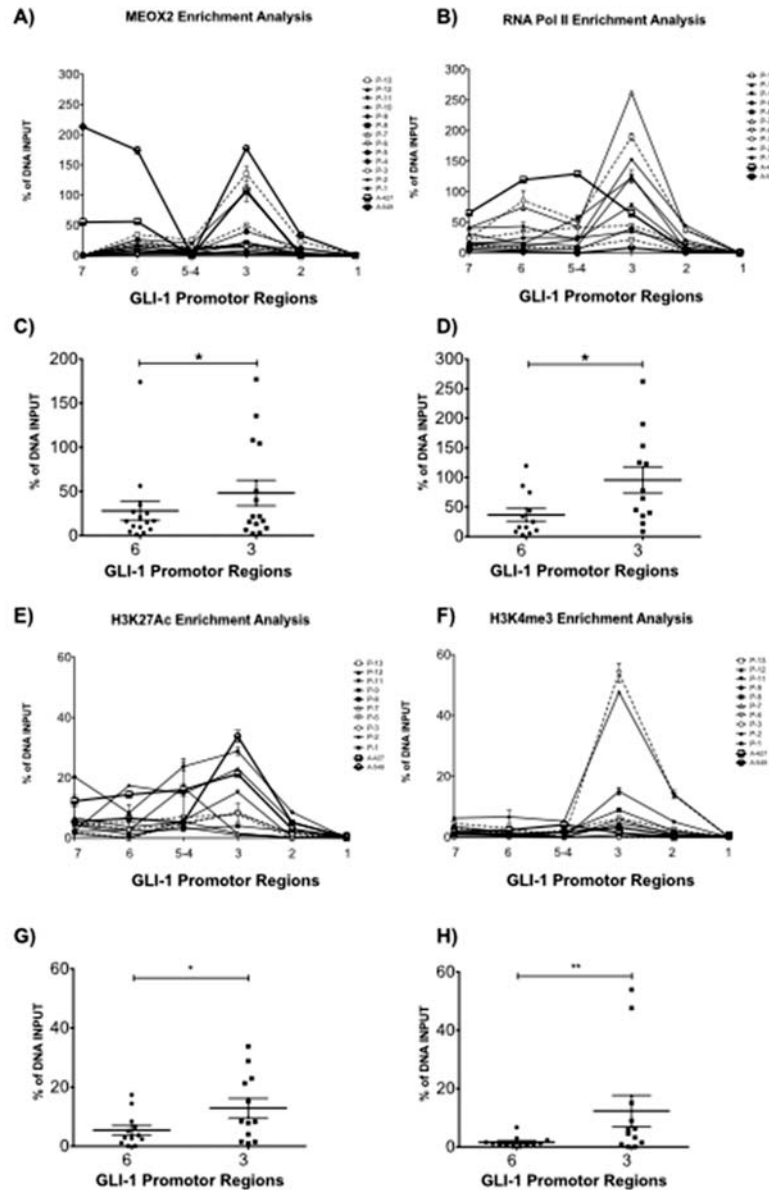


Figure 4: Quantitative validation analysis confirmed MEOX2 protein enrichment on GLI-1 gene promoter sequences accompanied by active RNA Pol II and the activation histones H3K4me3 and H3K27Ac. (A) Quantitative enrichment analyses for MEOX2 and (B) RNA Pol II were performed on 7 of 12 putative MEOX2-binding domains in GLI-1 gene promoter sequences in samples from 13 lung adenocarcinoma patients as well as the A427 and A549 lung adenocarcinoma cell lines. Statistical analysis was performed to determine the average enrichment values for (C) MEOX2 and (D) RNA Pol II for each patient group, focusing on regions 6 and 3 located in GLI-1 gene promoter sequences. Histone code profile analysis was performed for (E) H3K27Ac and (F) H3K4me3 in 7 of 12 putative MEOX2-binding domains in GLI-1 gene promoter sequences, and the average enrichment was calculated, focusing on domains 6 and 3 for (G) H3K27Ac and (H) H3K4me3; * $p < 0.05$ indicates statistically significant differences (using a paired t test) between regions 6 and 3 in GLI-1 gene promoter sequences.

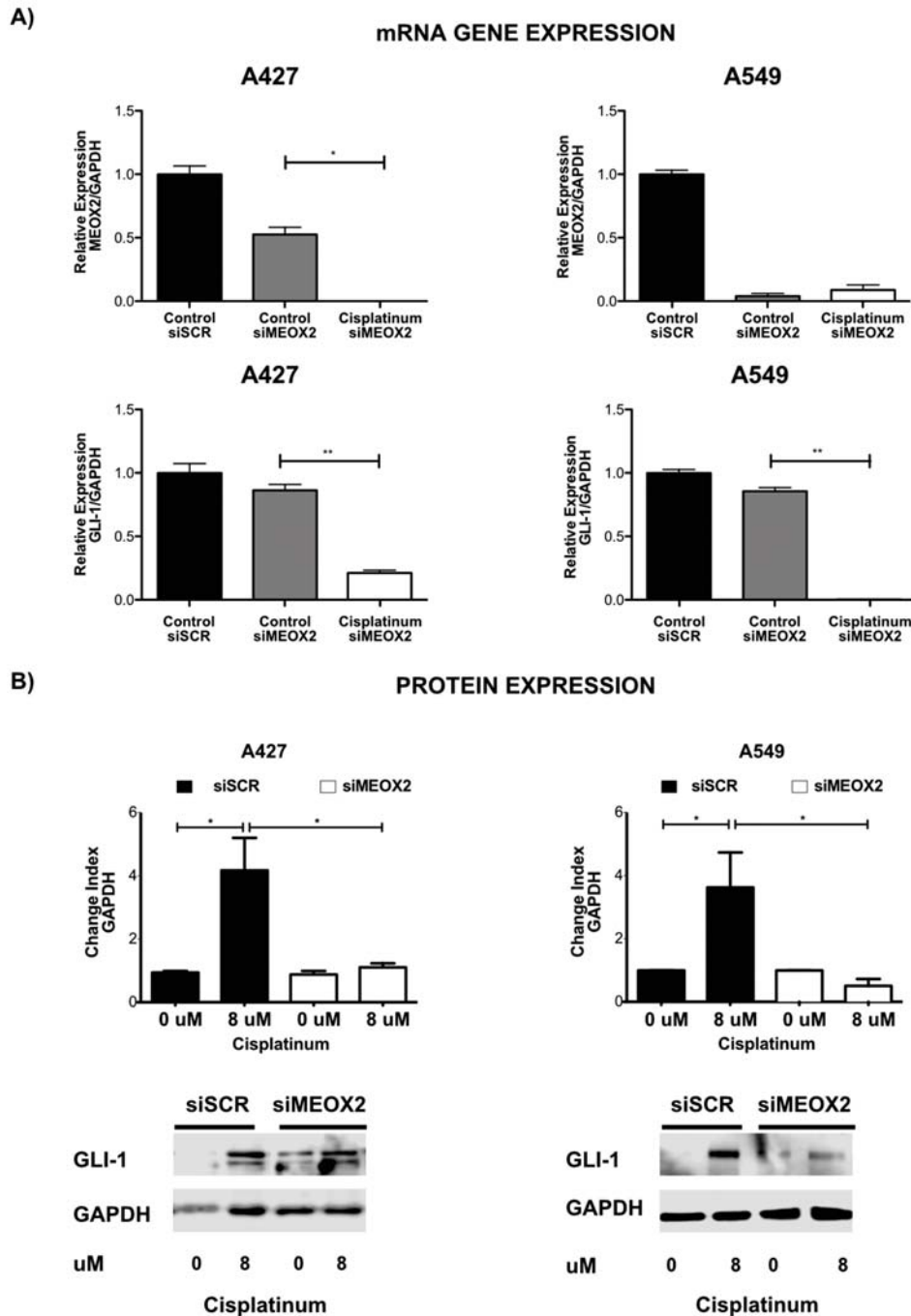


Figure 5: Inducible expression of GLI-1 mRNA and protein occurs in a MEOX2-dependent manner and is involved in cancer drug resistance. (A) mRNA expression analysis was performed for the A427 and A549 lung adenocarcinoma cell lines in the presence or absence of cisplatin-based treatment, and the effects of negative control siRNAs and specific anti-MEOX2 siRNAs were assessed. The results are shown for two representative biological experiments performed in triplicate, with $*p \leq 0.05$, and $**p \leq 0.01$. (B) A427 and A549 lung adenocarcinoma cells exhibited a cisplatin-inducible GLI-1 protein expression pattern at IC:12.5 (8 μ M), while reduced inducible GLI-1 expression was observed following transfection with anti-MEOX2 siRNA in the presence of 8 μ M cisplatin. Western blot statistical analyses, assessed via quantitative densitometry, were performed to determine $*p \leq 0.05$ and $**p \leq 0.005$ using Student's *t*-test as well as one-way ANOVA with Dunnett's and Tukey's multiple comparison tests. Western blot bands were quantified as the pixel total intensity rate and expressed as a Change Index normalized to GAPDH. Images are representative of 3 biological replicates. Quantification analyses were performed using cisplatin (0 μ M) treatment as a negative control reference. Images were obtained using a C-DIGIT device (LICOR). Pixel quantification and data analyses were carried out using Image Studio software; the total pixel intensity for each specific protein product was normalized to GAPDH.

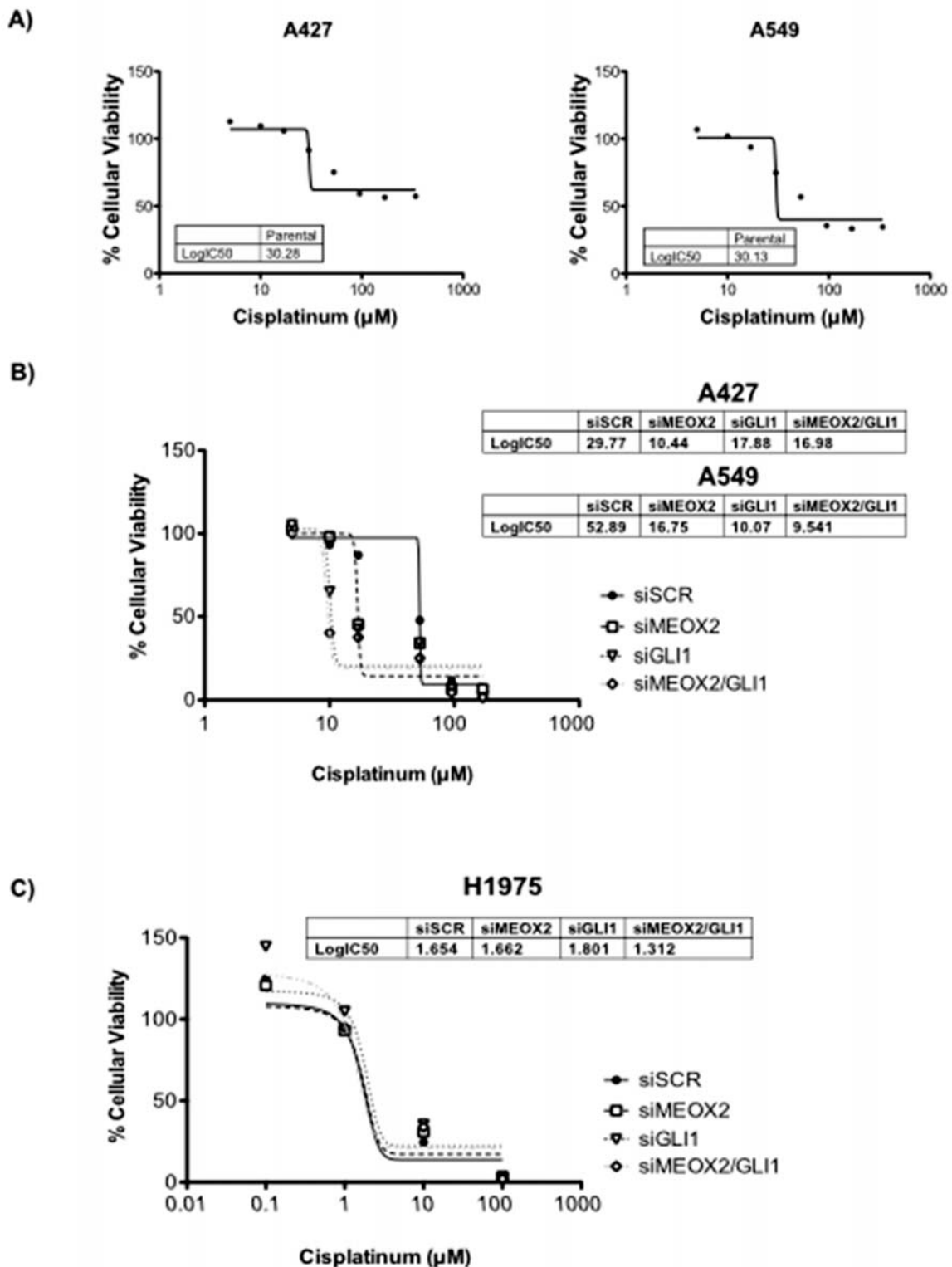


Figure 6: Cytotoxic cellular resistance exhibited MEOX2-GLI1 axis-dependent resistance via a cisplatin dose-dependent mechanism. (A) Cellular viability assays generated cisplatin dose-response curves indicating the 50% inhibitory concentrations (IC:50) for A427 and A549 lung adenocarcinoma cells. (B) Cisplatin IC:50s for both A427 and A549 lung cancer cells were significantly decreased ($p \leq 0.05$) by MEOX2 and/or GLI-1 gene silencing as determined by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. (C) Cisplatin IC:50s for H1975 lung adenocarcinoma cells were not significantly decreased ($p \leq 0.05$) by MEOX2 and/or GLI-1 gene silencing.

(Supplementary Figure 2C, Figure 6C). We concluded that MEOX2 transcription factor occupancy on the GLI-1 gene promoter acts as a positive modulator of MEOX2-GLI1 axis expression via a cisplatin-dependent resistance mechanism associated with lung tumor cellular viability, cellular proliferation and migration.

The inducible MEOX2-GLI-1 axis is involved in cellular migration and cellular proliferation in lung cancer cells

Cellular migration and proliferation were systematically analyzed in functional assays, and significant ($p \leq 0.001$)

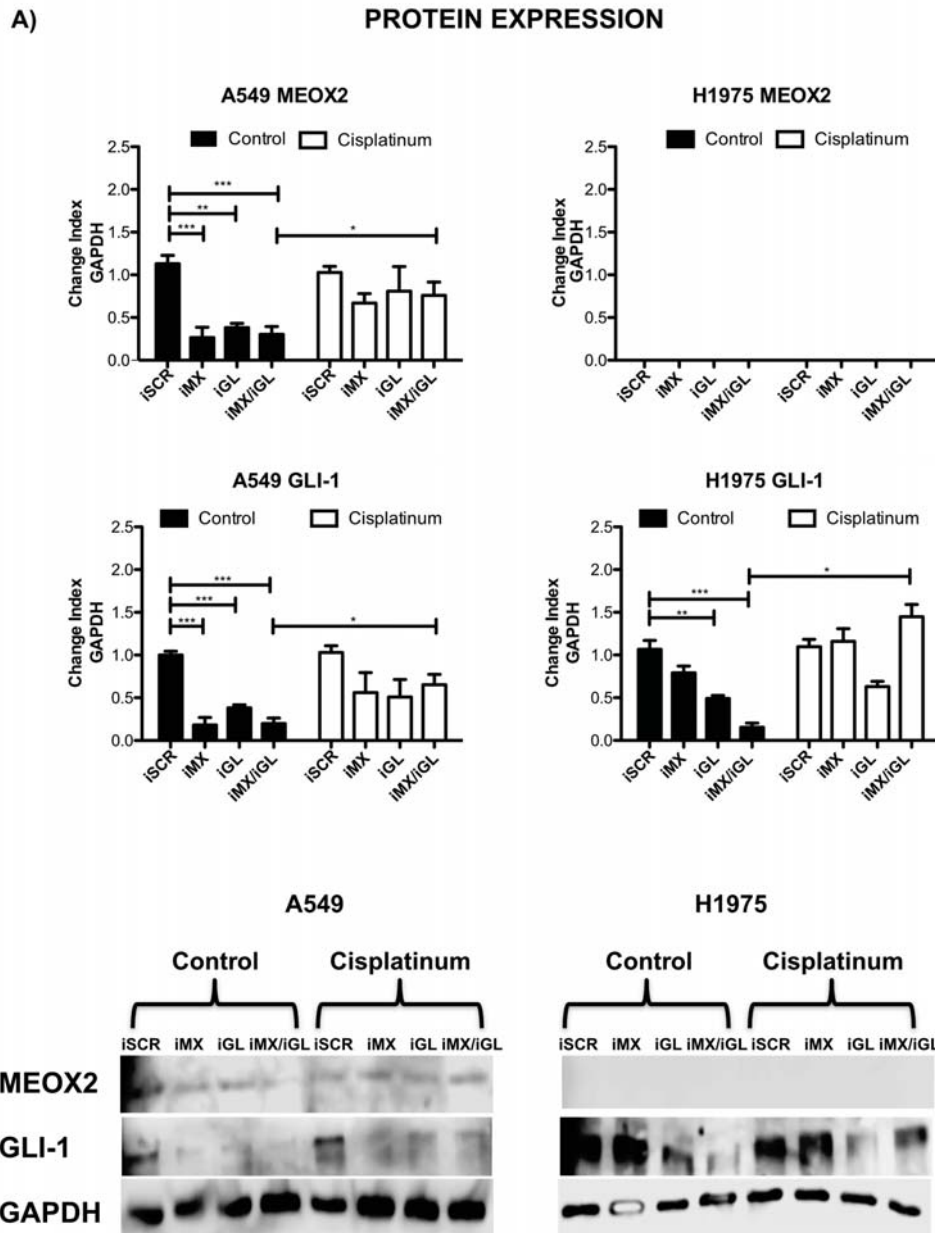


Figure 7: Inducible MEOX2-GLI1 axis expression was involved in cellular migration and cellular proliferation in lung cancer cells. (A) A549 and H1975 lung cancer cells demonstrated an inducible GLI-1 protein expression pattern following treatment with 8 μ M cisplatin and reduced GLI-1 inducible expression following the application of specific anti-MEOX2 siRNA and/or anti-MEOX2 siRNA plus anti-GLI1 siRNA in the presence of 8 μ M cisplatin. Western blot statistical analyses, assessed via quantitative densitometry, were performed to determine $*p \leq 0.05$ by one-way ANOVA and Dunnett's test for multiple comparisons to identify significant differences with respect to controls. Student's *t*-test was performed to identify significant differences between control and cisplatin treatment. Quantification analyses were normalized to scrambled siRNA as a negative control for gene silencing. Images were obtained using a C-DIGIT device (LICOR), and pixel quantification and data analyses were carried out using Image Studio software. Total pixel intensity for each specific protein product was normalized to GAPDH. (*continued*)

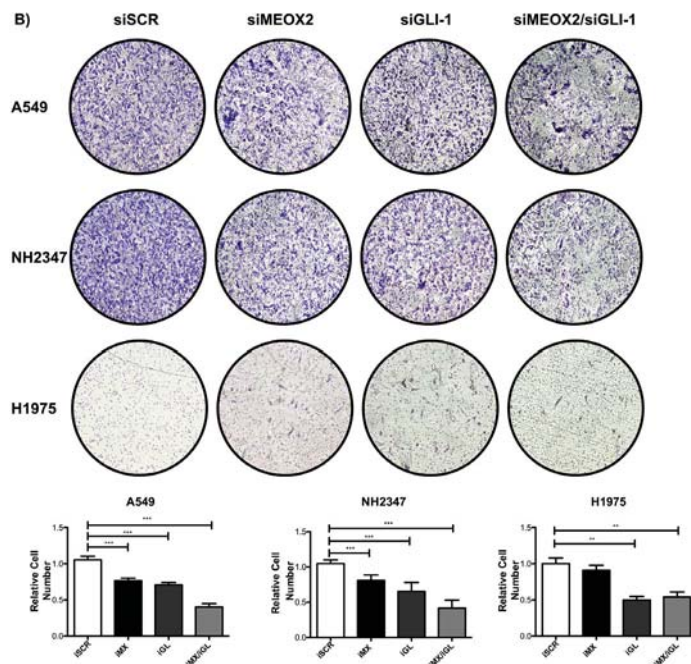


Figure 7: (continued) Inducible MEOX2-GLI1 axis expression was involved in cellular migration and cellular proliferation in lung cancer cells. (B) Cell culture images and graphs showing the quantitative analysis of cellular migration as a percentage (transwell migration assays) indicated significant MEOX2 and GLI-1 protein-dependent functions following the individual and combined application of anti-MEOX2 and anti-GLI1 siRNAs in A549, NH2347 and H1975 lung adenocarcinoma cells; ** $p \leq 0.005$ and *** $p \leq 0.0001$ based on one-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test

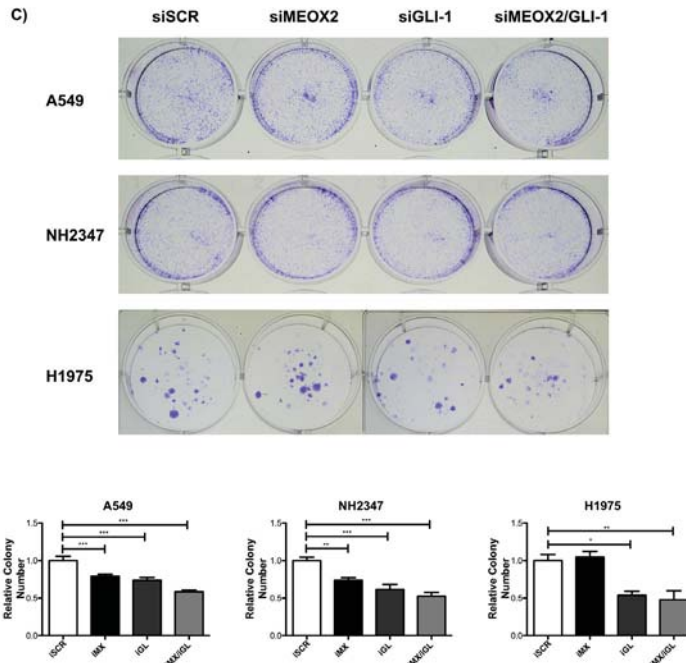


Figure 7: (continued) Inducible MEOX2-GLI1 axis expression was involved in cellular migration and cellular proliferation in lung cancer cells. (C) Cell culture images and graphs showing the quantitative analysis of cellular proliferation (clonogenic assays) indicated significant MEOX2 and GLI-1 protein-dependent functions following the individual and combined application of anti-MEOX2 and anti-GLI1 siRNAs in A549, NH2347 and H1975 lung adenocarcinoma cells; ** $p \leq 0.005$ and *** $p \leq 0.0001$ based on one-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test. Transwell migration index and colony growth (clonogenic assays) rates were normalized and quantified using the ImageJ Colony Number plugin tool (see Materials and Methods).

MEOX2-dependent GLI-1 protein expression was present in A549 cells, which contrasted with non-detectable MEOX2 levels in the H1975 lung adenocarcinoma cell line (Figure 7A and Supplementary Figure 2C). Moreover, reductions in lung tumor cellular migration were observed in the A427 (Supplementary Figure 3A) and A549 (Supplementary Figure 3B) cell lines in an *in vitro* scratch-migration horizontal assay, and MEOX2 and/or GLI-1 gene silencing resulted in a significant reduction ($p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$) of the migration index in A549 cells (Supplementary Figure 3B), compared with a lower migration index in A427 cells (Supplementary Figure 3A). We also validated the role of the MEOX2-GLI1 axis by performing transwell-migration vertical assays with both the A549 and NH2347 lung adenocarcinoma cell lines and observed significant differences ($p \leq 0.001$) compared with H1975 lung cancer cells (Figure 7B), which express non-detectable MEOX2 levels (Figure 7A and Supplementary Figure 2C).

Finally, the MEOX2-GLI1 axis was validated by investigating the proliferation capacity of the A549 and NH2347 lung cancer cell lines in clonogenic assays, and we identified statistically significant differences ($p \leq 0.01$, and $p \leq 0.001$) compared with H1975 lung cancer cells (Figure 7C). All of these data are likely associated with clinical stage progression, malignant capacity (invasion/metastasis), and/or cancer drug resistance as well as overall survival in lung cancer patients.

***In Situ* positive co-expression of MEOX2 and GLI-1 supports a MEOX2-GLI1 axis in two cohorts of lung cancer patients**

Clinical validation analyses were performed in two independent lung cancer patient cohorts to identify positive nuclear co-expression of the MEOX2 and GLI-1 proteins *in situ* in solid lung carcinomas derived from 20 lung cancer patients in the “INER cohort” or 90 lung cancer patients in the “INCAN cohort” in the context of clinical outcomes (Table II), supporting our hypothesis regarding the existence of a novel co-regulatory axis involving association of the MEOX2 protein with GLI-1 gene promoter sequences in human NSCLC.

In this context, double immunostaining analyses of cellular nuclear area expressed as an average percentage (MEOX2-DAB “brown” *versus* GLI1-AP “red”) were carried out for the INER patient cohort, and proportional positive co-expression levels for the MEOX2 and GLI-1 proteins (i.e., high MEOX2 expression levels correlate with high GLI-1 expression levels) were observed with $p \leq 0.005$ and $p \leq 0.0001$ significance levels, respectively (Figure 8A). Subsequently, this positive co-expression among both low and high protein expression lung cancer patient groups was quantitatively detected in the INCAN patient cohort by undertaking an Intensity Index analysis based on Algorithm Positive Pixel Bin Counts for MEOX2 and GLI-1 (Figure 8B). In addition, robust quantitative analyses

were performed based on the Algorithm Intensity Index plus the average nuclear area percentage, confirming a positive correlation in terms of MEOX2-GLI1 axis co-expression levels for each lung cancer patient at both the $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.0001$ significance levels (Figure 8C). Furthermore, based on clinical outcomes for the INCAN lung cancer patient cohort, which predominantly received platinum-based therapy (Table II), a multivariate analysis emphasized MEOX2 overexpression as a significant hazard risk, with a significance level of $p = 0.046$ (Table III); these results support the existence of a role for the MEOX2-GLI1 axis in clinical malignancy and/or cancer drug-based therapy resistance *versus* response, reflected in overall survival.

Overexpression of the MEOX2-GLI1 axis is associated with poorer overall survival and cancer drug therapy responses

Based on the analysis described above, a Kaplan-Maier survival curve analysis was constructed for the INCAN cohort, and better overall survival (statistically significant at $p \leq 0.005$) was observed for all lung carcinoma patients with lower MEOX2 and GLI-1 protein co-expression levels (statistically significant at $p = 0.009$ and $p = 0.002$, respectively) (Figure 9A). Additional Kaplan-Maier survival curve analyses of lung adenocarcinoma patients representing 84% (76/90) of the total INCAN lung cancer patient cohort indicated poorer overall survival (statistically significant at $p \leq 0.005$) in lung adenocarcinoma patients with higher MEOX2 and GLI-1 protein co-expression levels ($p = 0.079$ and $p = 0.002$, respectively) (Figure 9B).

Furthermore, survival curve analysis of all INCAN lung carcinoma patients with EGFR-non-mutated status identified a better overall survival index (statistically significant at $p \leq 0.005$) with lower MEOX2 and GLI-1 protein expression levels ($p = 0.122$ and $p = 0.002$, respectively) (Figure 9C). However, survival analysis of only lung adenocarcinoma patients with EGFR-non-mutated status identified poorer overall survival (statistically significant at $p \leq 0.005$) with higher MEOX2 and GLI-1 protein co-expression levels ($p = 0.045$ and $p = 0.006$, respectively) (Figure 9D).

Finally, overall survival analysis of all INCAN lung cancer patients with EGFR-mutated status identified better overall survival prognosis with lower MEOX2 and GLI1 protein co-expression levels ($p = 0.024$ and $p = 0.011$, respectively) (Supplementary Figure 4A-4B), which is likely associated with combined-cisplatinum plus TKI-based treatments for a specific group (33/90) of EGFR-mutated lung cancer patients (Table II). In summary, our results provide evidence for a novel transcriptional-epigenetic MEOX2-GLI1 axis that is involved in cellular viability, cancer drug resistance, cellular proliferation and migration capacity, and overall clinical survival and therapy prognosis in lung cancer.

Table 2: Clinical outcomes of the INCAN lung cancer patient cohort (n=90)

	% (n/N)
Gender	
Female	63.3 (57/90)
Male	36.7 (33/90)
Age (years)	
Mean (\pm S.D.)	56.2 (14.1)
Median	58.5
Median Age (years)	
< 60	53.3 (48/90)
\geq 60	46.7 (42/90)
Smoking Exposure	
Non-smoker	48.9 (44/90)
Smoker	51.1 (46/90)
Tobacco (pack/years)	
Mean (\pm S.D.)	18.2 (22.9)
Median	10.3
Median of Tobacco (pack/years)	
Light smokers (< 10.18)	50 (23/46)
Heavy smokers (\geq 10.18)	50 (23/46)
Wood-Smoke Exposure	
Present	72 (65/90)
Absent	27.8 (25/90)
Asbestos Exposure	
Present	7.8 (7/90)
Absent	92.2 (83/90)
Disease Stage	
IIIb	23.3 (21/90)
IV	76.7 (69/90)
TNM	
TX	0(0/90)
T 0 to 1	0(0/90)
T2	12.2 (11/90)
T3	15.6 (14/90)
T4	72.2 (65/90)
NX	72.2 (65/90)
N0	0 (0/90)
N<3	0 (0/90)

(Continued)

	% (n/N)
N3	15.6 (14/90)
N4	12.2 (11/90)
MX	0 (0/90)
M0	23.3 (21/90)
M1	76.7 (69/90)
ECOG PS	
0-1	82.2 (74/90)
2-4.	17.8 (16/90)
Histology	
Adenocarcinoma	84.4 (76/90)
Epidermoid	7.8 (7/90)
Large Cell Carcinoma	5.6 (5/90)
Undifferentiated and others NSCLC	2.2 (2/90)
Main Histological Pattern Among Adenocarcinoma Patients	
Lepidic	14.5 (11/76)
Acinar	10.5 (8 /76)
Papilar	7.9 (6 /76)
Micropapilar	1.3 (1 /76)
Solid	27.6 (21 /76)
Other/Not specified	38.2 (29 /76)
Received Platinum-Based Chemotherapy	
No	20 (18/90)
Yes	80 (72/90)
Therapeutic Response to Platinum-Based Chemotherapy	
Complete response	2.8 (2/72)
Partial response	40.3 (29/72)
Stable disease	40.3 (29/72)
Disease Progression	16.7 (12/72)
EGFR-Mutated	
Negative	60 (54/90)
Positive	36.7 (33/90)
Undetermined	3.3 (3/90)

DISCUSSION

Genomic and epigenomic studies have described several genetic and epigenetic aberrations, some of which are identified as Homeobox-related gene transcription factors such as the HOXA and HOXB cluster genes, in human lung carcinomas [17, 18] that are involved in lung

cancer biology [19] and are associated with early lung cancer diagnosis [20] and/or malignant stage upon clinical diagnosis [17]. Recently, MEOX2 has been implicated in fetal lung development and histopathological lung cancer progression [22], and MEOX2 and TWIST1 were previously associated with chemoresistance and lung cancer prognosis [21]. Recent published reports suggest

MEOX2 overexpression accompanied by epigenetic events constitutes a probable new cancer drug resistance mechanism that must be considered in the context of lung cancer clinical management [23]. However, the identities of MEOX2 gene promoter targets, as well as related epigenetic profiles and molecular mechanisms involved in cancer drug resistance and clinical lung cancer prognosis, have remained unclear.

Here, we describe for the first time a MEOX2 gene promoter target profile in the context of transcriptionally active RNA Pol II enzyme in lung cancer. Our epigenome-wide data were directly obtained from human solid lung carcinomas and identified a range of 3,347 to 6,787 gene promoters ($FDR \leq 0.2$) representing several cell signaling

pathways, including TGF β , WNT, Notch, Jak-STAT, MAPK, and mTOR; the involvement of some of these pathways in cancer progression, tumor cellular invasion and cancer metastasis has previously been described [24].

A statistically significant molecular signature consisting of 78 gene promoters ($FDR \leq 0.2$) or 13 gene promoters ($FDR \leq 0.1$) was shared by different lung carcinoma patients; these promoters included Sonic Hedgehog-GLI-1 gene promoter sequences, which have not been previously been reported to be under MEOX2 transcriptional influence. Importantly, the GLI-1 gene was recently proposed to be involved in ABC transporter-independent oncological resistance, in which the TWIST1 and Snail gene transcription factors are linked to the

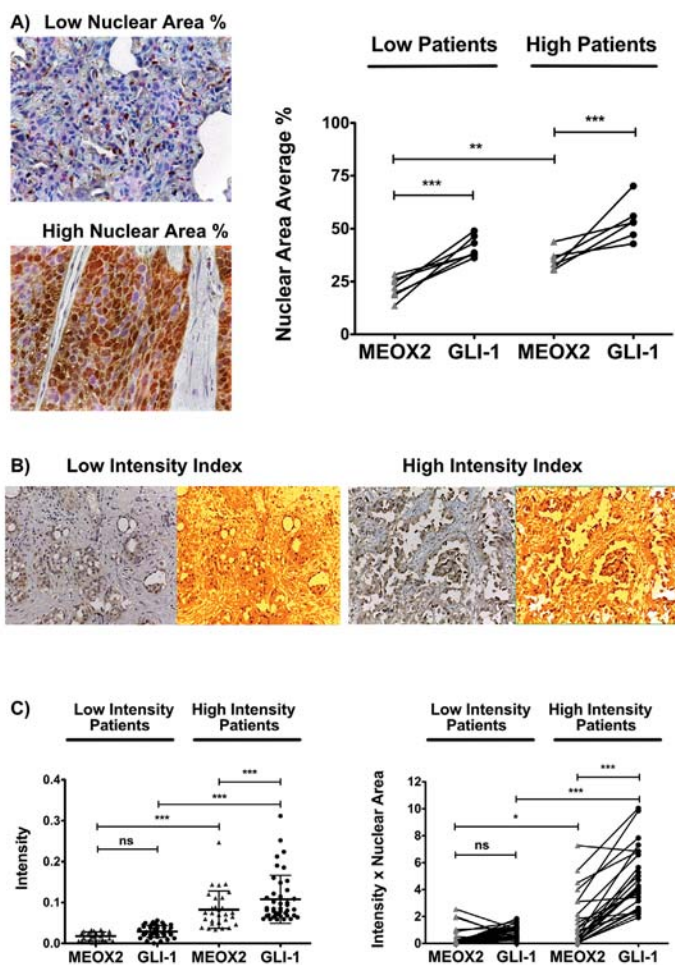


Figure 8: Positive MEOX2 and GLI-1 co-expression was confirmed in two lung cancer patient cohorts. (A) Investigation of the lung cancer INER patient cohort by analyzing the expression intensity of MEOX2-DAB (brown) and GLI-1-AP (red) identified groups of lung cancer patients with lower and higher positive nuclear area averages (%) at $**p \leq 0.005$ and $***p \leq 0.0001$. (B) Investigation of the lung cancer INCAN patient cohort by analyzing the intensity indices of MEOX2-DAB and GLI-1-DAB (not shown) via color transformation analysis based on the Algorithm Positive Pixel Count (see Materials and Methods) identified groups of lung cancer patients exhibiting lower and higher protein expression intensity levels with a cutoff established at $*p \leq 0.05$; significant differences were determined by performing one-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test. (C) Intensity Index and Intensity Index plus Nuclear Area Average analyses for the independent positive expression markers MEOX2-DAB and GLI-1-DAB were performed, and groups of lung cancer patients exhibiting lower and higher protein expression levels were identified, with significant differences at $*p \leq 0.05$ and $***p \leq 0.0001$ as determined by one-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test.

Table 3: Multivariate analysis based on clinical outcomes of the INCAN lung cancer patient cohort (n=90)

	Relative Risk	95% C.I.	P
Age	1.013	0.99 – 1.04	0.709
Gender	1.145	0.53 – 2.5	0.73
Smoking	1.063	0.53 – 2.5	0.873
ECOG	1.227	0.82 – 1.8	0.323
Clinical Stage	1.138	0.74 – 1.7	0.354
MEOX2 Expression	2.04	1.02 – 4.1	0.046*
GLI-1 Expression	1.73	0.889 – 3.4	0.106

Cox regression model and relative risk (RR) ratio calculated with a corresponding 95% C.I.

Sonic Hedgehog pathway and induce tumor-initiating cancer stem-like cells, in both non-solid tumor-derived leukemia cells and solid-epithelial tumor-derived cervical cancer cells [25]. Additionally, we suggest the MEOX2 transcription factor promotes platinum-based treatment resistance at the Hedgehog-GLI1 gene promoter level, in accordance with a previous report describing the involvement of Hedgehog-GLI1 in the ABCG2 transporter-dependent oncological resistance exhibited by a lung cancer stem-like side cell population [26] and is involved maintaining the self-renewal of cancer stem-like cells as recently reported for arsenic trioxide-treated lung carcinoma cells [27]. Here, we suggest not only the positive modulation of Hedgehog-GLI1 gene expression but also positive induction of the mTOR pathway (Figure 2), in line with very recent reports describing an association between the mTOR and 4E-BP1 pathways, which are under TWIST1 transcriptional control, and poorer overall survival in NSCLC patients [28], as well as the involvement of TWIST1-Snail, linked to the Hedgehog pathway, in a chemoresistant cancer stem cell-like phenotype [25].

The autocrine effects of the SHH pathway have previously been linked to cellular proliferation in NSCLC cell lines (A549, H322M, and HOP-62) and solid lung carcinomas derived from patients; specifically, GLI-1 genetic silencing combined with an SHH antagonist reduces lung tumor cellular proliferation [29]. Additionally, GLI-1 gene transcription factors have been functionally related to cancer stem cell self-renewal capacity and tumorigenicity in solid glioma tumors [30]. Furthermore, SHH-GLI1 signaling inhibition is involved in sensitization to EGFR-TKI (gefitinib/erlotinib)-based therapy, thereby reducing cellular viability, as well as the self-renewal function of cancer stem-like cells derived from the EGFR-mutated lung cancer cell lines H1650 and H1975 [31]. Here, we identified significant participation of the MEOX2-GLI1 axis in both cellular cytotoxic resistance capacity and cellular migration proliferation, which is likely explained in part by previous studies showing the involvement of the SHH-

GLI1 signaling pathway in cellular proliferation, cellular transmigration and epithelial-mesenchymal transition in the NSCLC cell lines A549 and H520 [32]. In this regard, recent reports have demonstrated a correlation between MEOX2 overexpression and greater cellular migration capacity, increased senescence and cell cycle progression, promoting the development of vessel cells [33].

Several previous reports implicated the GLI-1 gene in docetaxel, methotrexate and etoposide chemoresistance through transcriptional modulation of the ABC transporter family genes in esophageal adenocarcinoma, prostate carcinoma and metastatic squamous cell carcinoma cell lines [34]. Other studies described the contribution of the canonical cell signaling SHH-GLI1 axis to acquired chemoresistance to doxorubicin, vincristine, and etoposide in both non-solid tumor-derived K-562 erythroid leukemia cells and solid tumor-derived epidermoid carcinoma KB cells [35]. These effects have also been observed in NSCLC cell lines under gefitinib/erlotinib exposure [31] and in mouse- and human-derived SCLC cells treated with the cancer drugs etoposide, carboplatin, cisplatin and/or the SHH-antagonist NVP-LDE225 [36]. Additionally, a significant reduction in cisplatin chemoresistance in experimental *in vitro* models is achieved via inhibition of the SHH-SMO-GLI1 axis signaling with an SMO antagonist (GDC-0449) in both human NSCLC and SCLC cell lines [37].

However, few studies have described chemoresistance at the transcriptional level in terms of gene promoter sequences. The ABCG2 transporter gene promoter is modulated by the GLI-1 gene transcription factor through gene sequences in other domains located from -416 to -408, accompanied by increased levels of the histone marker H3K18Ac, following cellular stimulation of the SHH-GLI1 axis [38]. Such epigenetic markers promote GLI-1 occupation of ABCG2 gene promoter sequences and induce the expression of ABCG2, which is involved in chemoresistance in the presence of doxorubicin and methotrexate in non-solid tumors and B-cell non-Hodgkin lymphoma cells [38]. These and other reports indicate the functionality of the SHH-GLI1-

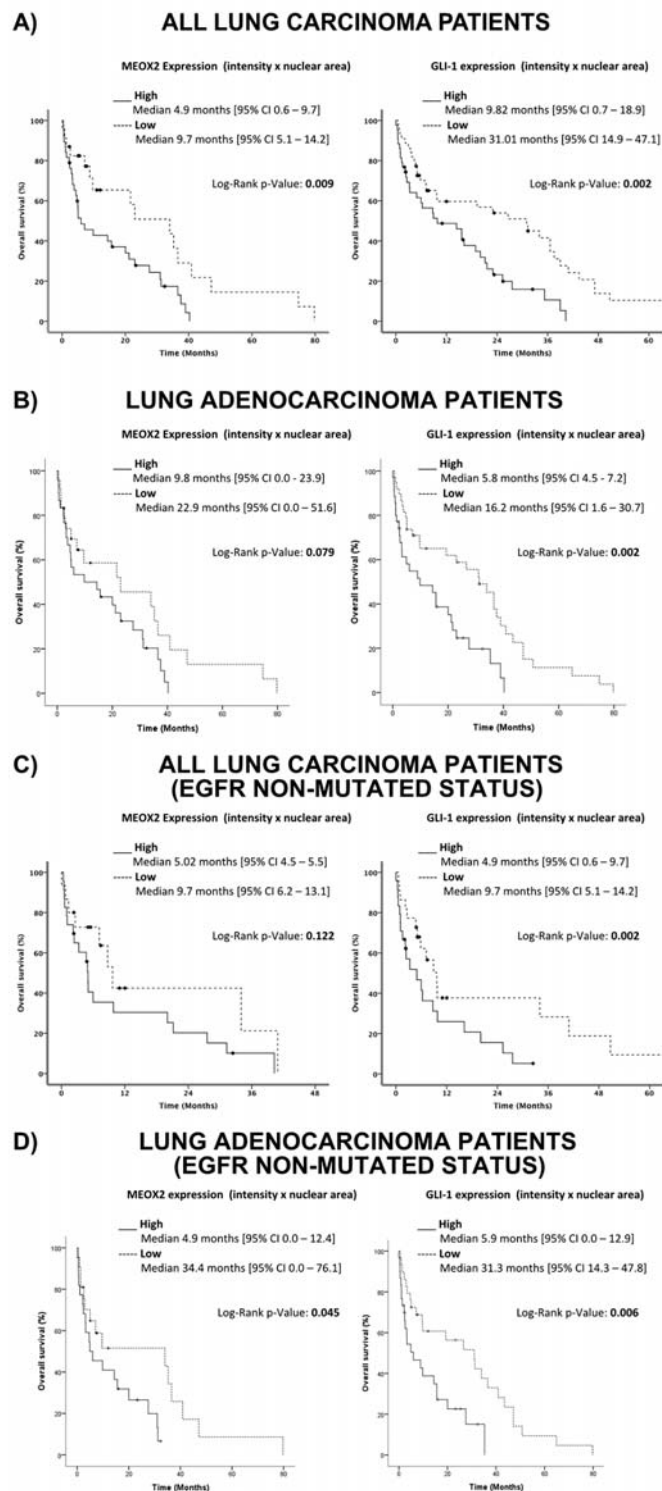


Figure 9: Quantitative (Intensity Index plus Nuclear Area Average) analyses revealed the involvement of the MEOX2-GLI1 axis in overall survival and clinical responses to treatment in lung cancer patients. (A) Overall survival in all lung cancer patients with low and high MEOX2-GLI1 axis expression levels; global survival expressed as months accumulated (log rank “Mantel-Cox”, $p=0.009$ and $p=0.002$). (B) Overall survival in lung adenocarcinoma patients with low and high MEOX2-GLI1 axis expression; global survival expressed as months accumulated (log rank “Mantel-Cox”, $p=0.079$ and $p=0.002$). (C) Overall survival in all lung carcinoma patients with low and high MEOX2-GLI1 axis expression levels; global survival expressed as months accumulated under cancer drug treatment responses for EGFR non-mutated status (log rank “Mantel-Cox”, $p=0.122$ and $p=0.002$). (D) Overall survival in lung adenocarcinoma patients with low and high MEOX2-GLI1 axis expression Levels; global survival expressed as months accumulated under cancer drug treatment responses for EGFR non-mutated status (log rank “Mantel-Cox”, $p=0.045$ and 0.006).

ABCG2 axis is highly correlated with chemoresistance, as shown for the lung cancer stem cell-like population derived from H460 parental lung cancer cells [39].

Our results obtained from solid lung carcinomas and the A427 and A549 NSCLC cell lines constitute the first evidence demonstrating significant epigenome occupancy of the homeobox-related gene MEOX2. Additionally, GLI-1 gene promoter sequences are transcriptionally occupied by active RNA Pol II and epigenetically accompanied by the active histones H3K27Ac and H3K4me3 with statistically significant enrichment at two hotspot regions ranging from -1,830 to -1673 and -822 to -665, supporting the existence of an active MEOX2-GLI1 axis, which was also indicated by the lung cancer epigenome analysis derived from A549 lung adenocarcinoma cells (Figure 1B and Figure 3B) previously published and deposited by Sabo PJ and colleagues in the ENCODE Project database [40].

Here, our findings are in accordance with intrinsic chemoresistance and/or also likely associated with acquired chemoresistance, which have been linked to and/or involved in epigenetic mechanisms based on aberrations in the histone repressive profiles H3K27me3 on MEOX2 gene promoter [21], but also histone activation profiles detected for H3K27Ac and H3K4me3 on GLI-1 gene promoter sequences (Figure 3B and Figure 4E-4H). But in other cases is modulated by long non-coding RNAs (lncRNAs), as was recently been reported for lncRNA HOTAIR, which promotes cisplatin drug resistance by controlling p21 protein expression to increasing cell cycle control in A549 lung cancer cells [41]. Additionally, HOTAIR overexpression has been detected in solid tumor NSCLC patients with poorer prognosis as well as functionally associated with higher lung tumor cellular migration and cellular invasion *in vitro* lung in A549 and SPC-A1 cancer cells, with lung tumor metastasis *in vivo* in SPC-A1 lung cancer cells [42], and with poorer prognosis in lung cancer patients [37, 38]. Other possible explanations include a role for HOTAIR-coordinated assembly “binding” to the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) in a SUZ12/EZH2 and/or LSD1/CoREST/REST complex-dependent manner, which are reportedly involved in increased repressive histone H3K27 methylation and H3K4 demethylation, respectively [43]. Additionally, lncRNA HOTAIR is epigenetically involved in repression of the p15, p21 and p27 genes at the promoter sequence level in lung cancer [44]. Down-regulated expression of lncRNA MEG3 is involved in cisplatin resistance through p53 and Bcl-x1 controlled gene expression in lung carcinoma cells [45], although additional epigenetic evidences must be obtained in lung cancer patients. Additionally, lncRNA BC087858 overexpression is clearly associated with acquired resistance to EGFR-TKI based “gefitinib” therapy [46], while lncRNA GAS5 down-regulation is involved in EGFR-TKI resistance in lung cancer patients and NSCLC cell lines [47]; in both cases,

the underlying epigenetic mechanisms have yet to be fully clarified.

Our functional epigenomics strategy also suggests novel MEOX2-GLI1 transcriptional axis signaling is involved in resistance to the cancer drug cisplatin in a dose-dependent manner, as previously proposed for lung cancer [21]. MEOX2 overexpression resulted in cisplatin dose-dependent inducible GLI-1 gene expression at the gene promoter level associated with chemoresistance in lung cancer cells, which likely correlates with previous reports in which inhibition of the SHH-GLI1 axis is involved in cancer drug resistance by a lung cancer stem-like cell side population [37] through a direct transcriptional target action in the ABCG2 gene promoter sequence [38]. Additionally, this mechanism is involved in lung adenocarcinoma cell survival and cancer drug resistance conducted via the SHH-GLI1 axis but negatively regulated by Hedgehog-Interacting Protein (HHIP) in EGFR-non-mutated A549 or EGFR-mutated H1975 and HCC827 NSCLC cell lines under TKI-based treatment [48]; however, here this mechanism is positively regulated by MEOX2 at the transcriptional level.

In conclusion, here we have reported for the first time the functional and clinical correlations of the overexpressed MEOX2-GLI1 transcriptional axis, both as a novel molecular candidate axis involved in lung cancer drug resistance and as a predictor of therapy prognosis. Certain reports investigating NSCLC patients have described an overexpressed SHH-GLI2 axis associated with poorer progression-free survival [49] as well as an overexpressed GLI-2 axis involved in cellular proliferation and apoptosis resistance in lung squamous cell carcinomas [50]. However, as determined in SMO inhibition assays, these axes promote the down-regulation of GLI-1 gene expression and facilitate significant EGFR-TKI-based treatment susceptibility, thereby reducing tumor cell proliferation in both EGFR-wild type as well as EGFR-mutated NSCLC cell lines [51], suggesting an interdependent oncogenic addiction between the EGFR and SHH-GLI1 axis pathways that is involved in lung cancer cell survival and cancer drug resistance [52]. We obtained similar results for both EGFR-wild type and EGFR-mutated lung cancer patients (Figure 9C-9D and Supplementary Figure 4A). However a non-canonical GLI-1 activation likely occurs in a Rack1-dependent manner in NSCLC patients as a proposed necessary step for lung cancer tumorigenicity [53]. Additionally, this process is likely involved in EGRF-TKI-based therapy resistance in both EGFR-non mutated (A549) and EGFR-mutated (H1975) lung cancer cells [54].

Despite developing a significant correlation index based on the overexpressed MEOX2-GLI1 axis, our results depict a novel transcriptional and likely epigenetic mechanism involved in lung tumor biology and cancer drug resistance mechanisms to platinum-based and/or target EGFR-TKI-based therapy responses, affecting

lung tumor cell viability, cellular migration/proliferation, clinical prognosis and overall survival in lung cancer patients.

MATERIALS AND METHODS

Sample selection and cell lines

A total of 123 tumor samples from 2 cohorts of NSCLC patients were included in the present study. The training cohort consisted of 13 fresh-frozen (FF) lung tumors collected from the Thoracic Surgical Service and 20 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) lung tumors from the Pathology Service at the National Institute of Respiratory Diseases (INER) in Mexico City. An independent validation cohort consisted of 90 randomly selected patients with advanced NSCLC enrolled in the Thoracic Oncology Unit at the National Cancer Institute (INCAN) in Mexico City from July 2010 to December 2011. We included samples from patients with clinical stages corresponding to the TNM Staging System (6th edition) who had an Eastern Cooperative Oncology Group Scale of Performance Status (ECOG PS) score of 0–2 and were candidates for platinum-based chemotherapy and/or TKI-based target therapy.

In addition, the NSCLC cell lines A427, A549, NH2347 and H1975 from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas VA, USA) were used to perform experimental assays to investigate cisplatin drug resistance and epigenetic analyses. The Institutional Review Board reviewed and approved protocols for INER (B17-07, B09-08) and INCAN (015/016/ICI, 964/15). All patients had a histologically confirmed lung cancer diagnosis, underwent surgical procedures, and provided informed consent before tumor resection for this study and future genetic/epigenetic biomarker studies.

Clinical data collection, treatment regimen and patient follow-up

Clinical outcome data for all patients, including their clinical history, histopathological diagnosis, performance status and smoking history, were obtained from medical records. Smoking history was defined as ever smokers (combining current or former smokers). Current smokers were defined as those patients smoking who have smoked at least 100 cigarettes in life and were still smoking at the very moment of the interview. Former smokers were defined as those patients who were not smoking at the moment of the interview but have smoked at least 100 cigarettes in their life. All patients were treated according to international guidelines for lung cancer treatment [55]. All received platinum-based chemotherapy as a first-line treatment in combination with paclitaxel or vinorelbine. After progression with cytotoxic chemotherapy, the patients received second-

or third-line treatment with an epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeting tyrosine kinase inhibitor (TKI), either gefitinib or erlotinib, based on their mutation status. EGFR non-mutated and mutated patients (exons 18–21) were detected using a Therascreen RGQ EGFR Real-time PCR Kit (QIAGEN, Scorpions ARMS method, Dusseldorf, Germany), which was previously used to genotype NSCLC patients [56].

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

FF lung tumor (LT; 3 mm³) samples consisting of almost 70% tumor tissue were pulverized under liquid nitrogen, fixed with 1% formaldehyde for 10 min, and immediately neutralized with 0.125 M glycine for 5 min. The resulting cells were washed with 1X PBS and treated with lysis buffer (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS) containing 10 ml with protease inhibitors (complete Mini, Roche, Indianapolis, IN, USA).

The chromatin from the FF-LT samples was sonicated for 10 pulses of 20 seconds w/u 60 watts. Then, 10 µg of chromatin was immunoprecipitated (ChIP) using a commercial EZ-Magna ChIP™ G kit (Millipore, Temecula, CA, USA) and 2.5 µg of anti-MEOX2 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) as well as 1 µg of activated anti-H3K27Ac, anti-H3K4me3, anti-H3K27me3, anti-H3K9me3 or anti-RNA Pol II antibodies (Abcam, Cambridge Science Park, Cambridge, U.K.). A 1-µg aliquot of anti-mouse IgG was used as a negative control for ChIP (Millipore, Temecula, CA, USA).

IP-DNA amplification, labeling and hybridization using promoter sequence tiling arrays

Sequence promoter tiling arrays (RefSeq, NimbleGen Assembly HG18, version 3x720K. Roche NimbleGen, Germany) representing 30,893 transcripts, 22,542 promoter sequences, and enhancer regions were employed to identify binding sites for the MEOX2 transcription factor. Microarrays containing 50–75-bp probes with 100 bp between each probe, representing -3,200 bp upstream and +800 bp downstream of the transcription start site (TSS), were used.

Immunoprecipitated DNA (IP-DNA; 20 ng) was linearly amplified using a Whole Genome Amplification (WGA2) GenomePlex Kit (IP-DNA-WGA2; 500 ng) and Reamplification Kit (WGA3) (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.). In both cases, WGA2 and WGA3 were amplified under the following conditions: Initial denaturation step at 95°C for 3 min, 14 cycles of denaturation/annealing/extension at 94°C for 15 seconds, and a final step at 65°C for 5 min. Re-amplified IP-DNA was purified using the phenol-chloroform method.

Next, a commercial NimbleGen Dual-Color DNA Labeling Kit (Roche, Germany) was used to label 1 µg of IP-DNA obtained with anti-RNA Pol II and anti-MEOX2 via incubation with a solution of nonamers (Cy3 and Cy5, respectively), 10 mM dNTP mix and 50 U/µl exo-Klenow fragment (3'→5' exo-) for 3 hours at 37°C in the dark. Finally, 10 µl of buffer (0.5 M EDTA) was added to stop the fluorescence labeling reaction.

Total labeled IP-DNA was purified and washed with both absolute isopropanol and 70% ethanol and quantified at 260 nm using a spectrophotometer (Biotech, model EPOCH, USA). Then, 34 µg of previously labeled IP-DNA obtained using both the MEOX2 and RNA Pol II antibodies was mixed and hybridized for 48 hours at 42°C. Finally, the microarrays were washed using the NimbleGen Wash Buffer kit (Roche Germany) and subjected to dry centrifugation (Roche NimbleGen, Germany) for 2 min at 1,500 rpm, and images were captured.

ChIP-on-chip bioinformatic analysis

Microarray images were obtained at 532 nm and 635 nm using a scanner (GenePix model 4000a, USA). In addition, bioinformatics analysis was performed using NimbleScan software version 2.6 (NimbleGen, Germany).

Both images (one from each channel) were subjected to microarray alignment with values close to 0.1290, adjusting for brightness and contrast, and stored using the .tiff format. Next, ChIP-on-chip analysis generated the following bioinformatics reports containing information from both fluorescence channels: Pairs reports (.pair), Probe reports (.probe) and GFF reports (General Feature Format: .gff).

Additionally, a complete genome bioinformatics sub-analysis was performed using the CGH method to show the presence or absence of the fluorescence signals obtained from IP-DNA segments attached to MEOX2 and/or RNA Pol II, indicating possible transcriptionally active MEOX2 gene promoter sequence targets. Later, NimbleGen SignalMap (software version 1.9) was used to map the positions of the signal segments resulting from the hybridization data; for this analysis, a Log₂-Ratio scale was established, and the index (ratio) was obtained using the formula $532/635$ (*MEOX2_532/RNA Pol II_635*). Peaks were detected based on fluorescence intensity and determined by the alignment of 4 probes near one another (min probe > cutoff “cutoff peak”), contained in a sliding window of 500 bp.

While the cutoff value was evaluated based on a hypothetical 95 maximum percentage defined as the mean+6 [standard deviation], data from the index (ratio) were randomly assessed 20 times to establish the probability of a positive false discovery rate (FDR); the values $FDR \leq 0.05$, $FDR \leq 0.1$ and $FDR \leq 0.2$ indicate fluorescence peaks. (all epigenome data associated have

been deposited in the online Dryad Digital Repository System, with the provisional doi:10.5061/dryad.rm7dd).

Signaling prediction pathways (from MEOX2 gene promoter targets)

Hierarchical data analyses based on FDR probability and the *in silico* prediction of gene expression levels identified and selected genes that were most likely to be under the transcriptional control of MEOX2 in lung cancer patients. These analyses to predict metabolic pathways or signaling pathways were undertaken using the online KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database, and *in silico* prediction analysis was performed using the online webpage <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/option.php> with the following statistical parameters: a hyper-geometric method and Bonferroni correction tests with a significance level of 0.05, and a minimum number of 2 genes per category.

qPCR assays to quantitatively validate ChIP analyses

The IP-DNAs were analyzed by performing qPCR absolute quantification using a LightCycler 480 System (Roche, Mannheim, Germany), SYBR Green Master Mix (KAPA Science, Foster City, CA, USA) and oligonucleotide sets for the proposed gene promoter target sites (Supplementary Table II).

A total of 20 ng of IP-DNA was used per reaction, followed by the amplification of standard curves through serial dilutions of native DNA (diploid control genomic DNA) derived from the peripheral blood mononuclear cells of healthy donors (100 ng, 10 ng, 1.0 ng, 0.1 ng and 0.01 ng).

The following amplification conditions were used: initial denaturation at 95°C for 10 min and 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds, annealing at 55°C for 30 seconds and extension at 72°C for 30 seconds. Oligonucleotides (Supplementary Table II) were designed using the OLIGO and NT VECTOR programs and synthesized by SIGMA-ALDRICH (USA).

Genetic silencing (siRNA transfection assays)

We used the anti-MEOX2 (sc-106233), and GLI-1 (sc-37911) siRNAs, each consisting of a pool (cocktail) of 3 target-specific siRNAs (19-25 nt) designed to knock down corresponding human gene expression. Two non-human related siRNAs obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) were used as negative controls (sc-37007 and sc-44230). Briefly, 3×10^5 cells in RPMI-1640 (Biowest, USA) and 3% antibiotic-free FBS (Biowest, USA) were incubated in 6-well plates for 12 hours and then transfected for a total of 48 hours with Lipofectamine 2000® (Invitrogen, Foster City, CA, USA) and siRNAs at

50 nM in the presence or absence of a cisplatin drug in a total volume of 2,500 μ l.

RT-qPCR assays for mRNA expression analyses

The TRIzol (Invitrogen, California, USA) method was used for total mRNA extraction and purification, and cDNA was synthesized from 2 μ g of total RNA using the ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Madison Wisconsin, USA). mRNA expression detection was performed using a Probe Master kit (Roche, Germany) and hydrolysis probes (Universal Probe Library "UPL", Roche, Germany) on a LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Germany) following the manufacturer's instructions. mRNA expression levels were normalized to expression of the endogenous gene GAPDH, and expression analyses were performed using the $\Delta\Delta T$ method.

Oligonucleotide sequences and UPL probes (Supplementary Table III) were applied under the following amplification conditions: initial denaturation at 95°C for 5 min and 40 cycles of denaturation at 95°C for 10 seconds, annealing at 60°C for 17 seconds and extension at 72°C for 1 seconds. Oligonucleotides were designed using the ProbeFinder program version 2.51 (Roche, Germany) and synthesized by SIGMA-ALDRICH (USA).

Western blot assays

Total proteins were extracted from cultured cells and purified using the TRIZOL method (Invitrogen), suspended in 5% SDS with protease inhibitors (cOmplete Mini, Roche, Indianapolis, IN, USA) and quantified using a commercial protein assay kit (Bio-Rad DC). Next, 30 μ g of total protein was resolved by vertical electrophoresis in 12% acrylamide gels and then transferred to nitrocellulose membranes using Trans-Blot-Turbo equipment/Transfer System Pierce G2 (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA). The membranes were blocked at room temperature for 2 hours with 5% low-fat milk in 1X PBS/0.1% Tween-20 and incubated overnight with antibodies against GLII (Rockland, 100-401-223, Pottstown, PA USA; and Abcam AB134906, Cambridge Science Park, Cambridge, U.K.) (1:3,000), MEOX2 Sc-81971 (1:1,500), and GAPDH Sc-25778 (1:3,000) from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). The membranes were washed with 1X PBS supplemented with 0.1% Tween-20 at room temperature and then incubated for 2 hours with a secondary antibody (anti-mouse HRP/anti-rabbit HRP; 1:10,000) at room temperature, followed by washing with 1X PBS supplemented with 0.1% Tween-20 at room temperature. The membranes were incubated with Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, Fermentas Life Science, Foster City, CA, USA), and a C-Digit Scanner was used for image acquisition (LICOR, Lincoln, NE, USA). The change ratio was calculated using Image Studio Software (version 4.0.21).

Cellular viability (Cytotoxicity) assays

Cellular viability analyses were performed in 96-well plates using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) (Promega, Madison, WI, USA) in the presence or absence of cisplatin. Briefly, 96-well plates were seeded with 2,000 to 3,000 cells in 100 μ l of RPMI-1640 culture medium for 48 hours and subsequently incubated with 20 μ l of MTS (5 mg/ml) for 3 hours to be read later at 490 nm; cell viability was calculated using the following formula: cell viability = (O.D. of the sample/Control O.D.) \times 100. Similarly, drug resistance curves were constructed to evaluate dose responses using serial dilutions of cisplatin.

Cellular scratch (Migration) assays

Wounding (approximately 800 microns was carried out on cells 8 hours after monolayer cultures were established using 2×10^5 cells per well (24-well plates)). The cells were deprived of Fetal Bovine serum (FBS) for the remainder of the 48-hours experiment; then, cultures were washed 3 times with 1X PBS. Photographs (40x) were taken at 0, 24, 36 and 48 hours post-wounding. The wound area was quantified using ImageJ, employing the "Duplicate" "Process", "Binary" and "Make binary" applications to transform pixels into binary code. Finally, adjustments to "Scale Set" and "Analyze Particles" facilitated quantitative representation of the cell migration index expressed as a percentage (%) with respect to the wound (scratch) at time 0 hours.

Cellular transwell (Migration) assays

Six-well plates were seeded in triplicate at a density of 3×10^5 cells per well. Following overnight adherence, cells were transfected with corresponding siRNAs for 6 hours. Subsequently, 25×10^3 transfected cells were transferred into upper transwell chambers in 24-well plates, while the bottom chambers contained RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS. The total culture time was 48 hours at 37°C and 5% CO₂. Then, cells that adhered below the transwell inserts were carefully fixed using 70% methanol, stained with 0.1% crystal violet, washed with running water, and mounted on slides using entellan. Final images were taken with light field microscope at a total magnification of 100X.

Clonogenic assays

Six-well plates were seeded at a density of 3×10^5 cells per well. After overnight adherence, cells were transfected with corresponding siRNAs. The cells were then transferred in triplicate into 6-well plates at a density of 1×10^4 per well and into 12-well plates at a density of 5×10^3 per well. Cells were cultured for 6 to 21 days at 37 °C and 5% CO₂,

followed by fixation with methanol and acetic acid (3:1 v/v), washing in running water, and staining with 0.5% crystal violet. Colony growth was quantified using the ImageJ Colony Number plugin tool [57].

Immunohistochemical assays using histopathological samples

Immunohistochemical analyses were performed on FFPE-LT tissue samples, which were used to construct tissue microarrays (TMAs). Lung cancer specimens were blindly selected by a pathologist who identified triplicate lung tumor regions characterized by high cellularity for each lung tumor. The arrays were constructed using the Chemicon Advanced Tissue Arrayer (ATA100) with a 0.5-mm needle. We used 1-2 µg of specific anti-MEOX2 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) and anti-GLI-1 antibodies (Rockland, Pottstown, PA USA). UltraView Universal DAB and UltraView Universal Alkaline Phosphatase Red detection kits were used in conjunction with a Ventana System BenchMark GX (Ventana Medical System Inc., Tucson, AZ, USA). The slides were dehydrated, cleared in xylol and mounted in synthetic resin. A Leica DM750 transmitted light microscope (Wetzlar, Germany) was used to obtain photomicrographs at 200X and 400X magnification.

The image analysis software program ImageJ and the ImmunoRatio Plugin (Version 1.42q), developed by Jorma Isola and Vilppu Tuominen at the Institute of Biomedical Technology, University of Tampere (<http://153.1.200.58:8080/immunoratio/>), were used to quantitatively analyze the percentage corresponding to positive nuclear area (average) on histopathological slides (3 fields for each slide sample) at 200X and 400X. In addition, Aperio ePathology ImageScope Software version 11.0.2.725 (Leica Biosystems, USA) and the Intensity Index based on the Algorithm Positive Pixel Count 2004-08-11 (Version 8.100) were used to categorize positive pixel counts into three Intensity Bins, expressed as the Number of Strong Positive Reactions Index (described as $N_{sr} = N_{sp} + N_{wp} + N_{p} + N_{sp}$). All data were statistically analyzed to obtain significant differences among the NSCLC patient groups.

Statistical analyses

T-tests, one-way ANOVA, Tukey's, Dunn's and Mann-Whitney's multiple comparison tests were performed to analyze the differences between patient groups; *p* values ≤ 0.05 were considered statistically significant. Overall survival analyses were calculated using the Kaplan-Meier method, including comparisons among subgroups with the Breslow-Wilcoxon and Log Rank "Mantel-Cox" tests; *p* values ≤ 0.01, 0.005 and 0.0025 were considered statistically significant. Adjustments for potential confounders were calculated using a multivariate

Cox regression model, and the relative risk (RR) ratio was calculated with a corresponding 95% C.I. as a measure of association. All statistical analyses were carried out using the software programs GraphPad (Mac-OS X, Version 5.0) and IBM-SPSS Statistics (Windows, version 20).

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank postdoctoral fellow Herrera Solorio Abril Marcela as well as Peralta Alvarez CA, Muñiz Hernández Sae, Velázquez C, Salgado Bernabe E, and Pineda Villegas P for their technical assistance. We also thank Aguilar Lemarroy A and Jave Suárez L for access to the genome hybridization and scanning platform at CIBO-IMSS, Ramírez Tirado L Alejandra for her professional assistance with the lung cancer patient databases and Zatarain Barron Zyanya Lucia for her manuscript edition helpful. This work was funded by the National Institute of Respiratory Diseases (INER) and the INER-Research Unit through the collaboration agreement register: UNAM 43355-3065-17-XI-15; Patricia Piña Sánchez thanks as the recipient of the IMSS-FOUNDATION Research Support Grant. This work fulfills one of the requirements for Leonel Armas López to obtain a Ph.D. degree in Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM): he was the recipient of a doctoral fellowship from CONACyT (Fellowship 226096, CVU 294950).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors disclose no potential conflicts of interest.

GRANT SUPPORT

This work was funded by projects PAPIIT-DGAPA: IB202512, RR282512 and IN226317 from the National University Autonomous of Mexico (UNAM), as well as FOSISS 2016-1: Project 00272655 from the National Council for Science and Technology (CONACyT). "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript."

REFERENCES

1. A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global cancer statistics, CA. Cancer J. Clin. 61 (2011) 69–90. doi:10.3322/caac.20107.
2. R. Siegel, D. Naishadham, A. Jemal, Cancer statistics, 2013, CA. Cancer J. Clin. 63 (2013) 11–30. doi:10.3322/caac.21166.
3. R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer Statistics, 2017, CA. Cancer J. Clin. 67 (2017) 7–30. doi:10.3322/caac.21387.

4. L.A. Torre, R.L. Siegel, A. Jemal, Lung Cancer Statistics, in: A. Ahmad, S. Gadgeel (Eds.), *Lung Cancer Pers. Med.*, Springer International Publishing, 2016: pp. 1–19. doi:10.1007/978-3-319-24223-1_1.
5. S. Sun, J.H. Schiller, A.F. Gazdar, Lung cancer in never smokers--a different disease, *Nat. Rev. Cancer.* 7 (2007) 778–790. doi:10.1038/nrc2190.
6. A. Besaratinia, G.P. Pfeifer, Second-hand smoke and human lung cancer, *Lancet Oncol.* 9 (2008) 657–666. doi:10.1016/S1470-2045(08)70172-4.
7. S. Sun, J.H. Schiller, M. Spinola, J.D. Minna, New molecularly targeted therapies for lung cancer, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 2740–2750. doi:10.1172/JCI31809.
8. K.R. Mitchell, D. Warshawsky, Frequent Ha-ras mutations in murine skin and liver tumors induced by 7H-dibenzo[c,g] carbazole, *Mol. Carcinog.* 25 (1999) 107–112.
9. J. Delgado, L.M. Martinez, T.T. Sánchez, A. Ramirez, C. Iturria, G. González-Avila, Lung cancer pathogenesis associated with wood smoke exposure, *Chest.* 128 (2005) 124–131. doi:10.1378/chest.128.1.124.
10. T. Bartke, J. Borgel, P.A. DiMaggio, Proteomics in epigenetics: new perspectives for cancer research, *Brief. Funct. Genomics.* 12 (2013) 205–218. doi:10.1093/bfpg/elt002.
11. S.B. Baylin, Resistance, epigenetics and the cancer ecosystem, *Nat. Med.* 17 (2011) 288.
12. R.M. Brena, J.F. Costello, Genome-epigenome interactions in cancer, *Hum. Mol. Genet.* 16 (2007) R96–R105. doi:10.1093/hmg/ddm073.
13. S. Roessler, E.L. Long, A. Budhu, Y. Chen, X. Zhao, J. Ji, R. Walker, H.-L. Jia, Q.-H. Ye, L.-X. Qin, Z.-Y. Tang, P. He, K.W. Hunter, S.S. Thorgeirsson, P.S. Meltzer, X.W. Wang, Integrative Genomic Identification of Genes on 8p Associated with Hepatocellular Carcinoma Progression and Patient Survival, *Gastroenterology.* 142 (2012) 957–966. e12. doi:10.1053/j.gastro.2011.12.039.
14. V. Levina, A.M. Marrangoni, R. DeMarco, E. Gorelik, A.E. Lokshin, Drug-Selected Human Lung Cancer Stem Cells: Cytokine Network, Tumorigenic and Metastatic Properties, *PLoS ONE.* 3 (2008) e3077. doi:10.1371/journal.pone.0003077.
15. J. Chen, N. Emara, C. Solomides, H. Parekh, H. Simpkins, Resistance to platinum-based chemotherapy in lung cancer cell lines, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66 (2010) 1103–1111. doi:10.1007/s00280-010-1268-2.
16. J.R. Kratz, A. Yagui-Beltrán, D.M. Jablons, Cancer Stem Cells in Lung Tumorigenesis, *Ann. Thorac. Surg.* 89 (2010) S2090–S2095. doi:10.1016/j.athoracsur.2010.03.038.
17. T.A. Rauch, X. Zhong, X. Wu, M. Wang, K.H. Kernstine, Z. Wang, A.D. Riggs, G.P. Pfeifer, High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 252–257. doi:10.1073/pnas.0710735105.
18. G.P. Pfeifer, T.A. Rauch, DNA methylation patterns in lung carcinomas, *Semin. Cancer Biol.* 19 (2009) 181–187. doi:10.1016/j.semcancer.2009.02.008.
19. T. Rauch, Z. Wang, X. Zhang, X. Zhong, X. Wu, S.K. Lau, K.H. Kernstine, A.D. Riggs, G.P. Pfeifer, Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 5527–5532. doi:10.1073/pnas.0701059104.
20. I. Nawaz, X. Qiu, H. Wu, Y. Li, Y. Fan, L.-F. Hu, Q. Zhou, I. Ernberg, Development of a multiplex methylation specific PCR suitable for (early) detection of non-small cell lung cancer, *Epigenetics.* 9 (2014) 1138–1148. doi:10.4161/epi.29499.
21. F. Ávila-Moreno, L. Armas-López, A.M. Álvarez-Moran, Z. López-Bujanda, B. Ortiz-Quintero, A. Hidalgo-Miranda, F. Urrea-Ramírez, R.M. Rivera-Rosales, E. Vázquez-Manríquez, E. Peña-Mirabal, J. Morales-Gómez, J.C. Vázquez-Minero, J.L. Téllez-Becerra, R. Ramírez-Mendoza, A. Ávalos-Bracho, E.G. de Alba, K. Vázquez-Santillán, V. Maldonado-Lagunas, P. Santillán-Doherty, P. Piña-Sánchez, J. Zúñiga-Ramos, Overexpression of MEOX2 and TWIST1 is associated with H3K27me3 levels and determines lung cancer chemoresistance and prognosis, *PloS One.* 9 (2014) e114104. doi:10.1371/journal.pone.0114104.
22. R. Cortese, O. Hartmann, K. Berlin, F. Eckhardt, Correlative gene expression and DNA methylation profiling in lung development nominate new biomarkers in lung cancer, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (2008) 1494–1508. doi:10.1016/j.biocel.2007.11.018.
23. A. Ahmad, Epigenetics in Personalized Management of Lung Cancer, in: A. Ahmad, S.M. Gadgeel (Eds.), *Lung Cancer Pers. Med. Nov. Ther. Clin. Manag.*, Springer International Publishing, 2016: pp. 111–122. doi:10.1007/978-3-319-24932-2_6.
24. L.S. Steelman, W.H. Chappell, S.L. Abrams, C.R. Kempf, J. Long, P. Laidler, S. Mijatovic, D. Maksimovic-Ivanic, F. Stivala, M.C. Mazzarino, M. Donia, P. Fagone, G. Malaponte, F. Nicoletti, M. Libra, M. Milella, A. Tafuri, A. Bonati, J. Bäsecke, L. Cocco, C. Evangelisti, A.M. Martelli, G. Montalto, M. Cervello, J.A. McCubrey, Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging, *Aging.* 3 (2011) 192–222. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3091517/> (accessed September 7, 2015).
25. Y. Kong, Y. Peng, Y. Liu, H. Xin, X. Zhan, W. Tan, Twist1 and snail link Hedgehog signaling to tumor-initiating cell-like properties and acquired chemoresistance independently of ABC transporters, *STEM CELLS.* (2015) n/a-n/a. doi:10.1002/stem.1955.
26. S. Zhang, Y. Wang, J.-H. Mao, D. Hsieh, I.-J. Kim, L.-M. Hu, Z. Xu, H. Long, D.M. Jablons, L. You, Inhibition of CK2 α down-regulates Hedgehog/Gli signaling leading to

- a reduction of a stem-like side population in human lung cancer cells, *PLoS One*. 7 (2012) e38996. doi:10.1371/journal.pone.0038996.
27. K.-J. Chang, M.-H. Yang, J.-C. Zheng, B. Li, W. Nie, Arsenic trioxide inhibits cancer stem-like cells via down-regulation of Gli1 in lung cancer, *Am. J. Transl. Res.* 8 (2016) 1133–1143. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846956/> (accessed January 25, 2017).
 28. T. Lv, Q. Wang, M. Cromie, H. Liu, S. Tang, Y. Song, W. Gao, Twist1-mediated 4E-BP1 regulation through mTOR in non-small cell lung cancer, *Oncotarget*. 6 (2015) 33006–33018. doi:10.18632/oncotarget.5026.
 29. Z. Yuan, J.A. Goetz, S. Singh, S.K. Ogden, W.J. Petty, C.C. Black, V.A. Memoli, E. Dmitrovsky, D.J. Robbins, Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma, *Oncogene*. 26 (2007) 1046–1055. doi:10.1038/sj.onc.1209860.
 30. V. Clement, P. Sanchez, N. de Tribolet, I. Radovanovic, A. Ruiz i Altaba, HEDGEHOG-GLI1 Signaling Regulates Human Glioma Growth, Cancer Stem Cell Self-Renewal, and Tumorigenicity, *Curr. Biol.* 17 (2007) 165–172. doi:10.1016/j.cub.2006.11.033.
 31. N. Bora-Singhal, D. Perumal, J. Nguyen, S. Chellappan, Gli1-Mediated Regulation of Sox2 Facilitates Self-Renewal of Stem-Like Cells and Confers Resistance to EGFR Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer, *Neoplasia*. 17 (2015) 538–551. doi:10.1016/j.neo.2015.07.001.
 32. O. Bermudez, E. Hennen, I. Koch, M. Lindner, O. Eickelberg, Gli1 Mediates Lung Cancer Cell Proliferation and Sonic Hedgehog-Dependent Mesenchymal Cell Activation, *PLoS ONE*. 8 (2013) e63226. doi:10.1371/journal.pone.0063226.
 33. C.R. Gohn, E.K. Blue, B.M. Sheehan, K.M. Varberg, L.S. Haneline, Mesenchyme Homeobox 2 Enhances Migration of Endothelial Colony Forming Cells Exposed to Intrauterine Diabetes Mellitus, *J. Cell. Physiol.* (2016). doi:10.1002/jcp.25734.
 34. J. Sims-Mourtada, J.G. Izzo, J. Ajani, K.S.C. Chao, Sonic Hedgehog promotes multiple drug resistance by regulation of drug transport, *Oncogene*. 26 (2007) 5674–5679. doi:10.1038/sj.onc.1210356.
 35. X. Zhan, J. Wang, Y. Liu, Y. Peng, W. Tan, GPCR-like signaling mediated by smoothened contributes to acquired chemoresistance through activating Gli, *Mol. Cancer*. 13 (2014) 4. doi:10.1186/1476-4598-13-4.
 36. K.-S. Park, L.G. Martelotto, M. Peifer, M.L. Sos, A.N. Karnezis, M.R. Mahjoub, K. Bernard, J.F. Conklin, A. Szczepny, J. Yuan, R. Guo, B. Ospina, J. Falzon, S. Bennett, T.J. Brown, A. Markovic, W.L. Devereux, C.A. Ocasio, J.K. Chen, T. Stearns, R.K. Thomas, M. Dorsch, S. Buonamici, D.N. Watkins, C.D. Peacock, J. Sage, A crucial requirement for Hedgehog signaling in small cell lung cancer, *Nat. Med.* 17 (2011) 1504–1508. doi:10.1038/nm.2473.
 37. F. Tian, J. Mysliwicz, J. Ellwart, F. Gamarra, R.M. Huber, A. Bergner, Effects of the Hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 on lung cancer cell lines are mediated by side populations, *Clin. Exp. Med.* 12 (2012) 25–30. doi:10.1007/s10238-011-0135-8.
 38. R.R. Singh, K. Kunkalla, C. Qu, E. Schlette, S.S. Neelapu, F. Samaniego, F. Vega, ABCG2 is a direct transcriptional target of hedgehog signaling and involved in stroma-induced drug tolerance in diffuse large B-cell lymphoma, *Oncogene*. 30 (2011) 4874–4886. <http://www.nature.com/onc/journal/v30/n49/abs/onc2011195a.html> (accessed January 20, 2015).
 39. Y. Shi, X. Fu, Y. Hua, Y. Han, Y. Lu, J. Wang, The Side Population in Human Lung Cancer Cell Line NCI-H460 Is Enriched in Stem-Like Cancer Cells, *PLoS ONE*. 7 (2012) e33358. doi:10.1371/journal.pone.0033358.
 40. P.J. Sabo, M. Hawrylycz, J.C. Wallace, R. Humbert, M. Yu, A. Shafer, J. Kawamoto, R. Hall, J. Mack, M.O. Dorschner, M. McArthur, J.A. Stamatoyannopoulos, Discovery of functional noncoding elements by digital analysis of chromatin structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 16837–16842. doi:10.1073/pnas.0407387101.
 41. Z. Liu, M. Sun, K. Lu, J. Liu, M. Zhang, W. Wu, W. De, Z. Wang, R. Wang, The Long Noncoding RNA HOTAIR Contributes to Cisplatin Resistance of Human Lung Adenocarcinoma Cells via downregulation of p21WAF1/CIP1 Expression, *PLoS ONE*. 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0077293.
 42. X. Liu, Z. Liu, M. Sun, J. Liu, Z. Wang, W. De, The long non-coding RNA HOTAIR indicates a poor prognosis and promotes metastasis in non-small cell lung cancer, *BMC Cancer*. 13 (2013) 464. doi:10.1186/1471-2407-13-464.
 43. M.-C. Tsai, O. Manor, Y. Wan, N. Mosammamparast, J.K. Wang, F. Lan, Y. Shi, E. Segal, H.Y. Chang, Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes, *Science*. 329 (2010) 689–693. doi:10.1126/science.1192002.
 44. W. Cao, R. de O. Ribeiro, D. Liu, P. Saintigny, R. Xia, Y. Xue, R. Lin, L. Mao, H. Ren, EZH2 Promotes Malignant Behaviors via Cell Cycle Dysregulation and Its mRNA Level Associates with Prognosis of Patient with Non-Small Cell Lung Cancer, *PLoS ONE*. 7 (2012) e52984. doi:10.1371/journal.pone.0052984.
 45. J. Liu, L. Wan, K. Lu, M. Sun, X. Pan, P. Zhang, B. Lu, G. Liu, Z. Wang, The Long Noncoding RNA MEG3 Contributes to Cisplatin Resistance of Human Lung Adenocarcinoma, *PLoS One*. 10 (2015) e0114586. doi:10.1371/journal.pone.0114586.
 46. H. Pan, T. Jiang, N. Cheng, Q. Wang, S. Ren, X. Li, C. Zhao, L. Zhang, W. Cai, C. Zhou, Long non-coding RNA BC087858 induces non-T790M mutation acquired resistance to EGFR-TKIs by activating PI3K/AKT and MEK/ERK pathways and EMT in non-small-cell lung

- cancer, *Oncotarget*. 7 (2016) 49948–49960. doi:10.18632/oncotarget.10521.
47. S. Dong, X. Qu, W. Li, X. Zhong, P. Li, S. Yang, X. Chen, M. Shao, L. Zhang, The long non-coding RNA, GAS5, enhances gefitinib-induced cell death in innate EGFR tyrosine kinase inhibitor-resistant lung adenocarcinoma cells with wide-type EGFR via downregulation of the IGF-1R expression, *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol*. 8 (2015). doi:10.1186/s13045-015-0140-6.
 48. E.-H. Lin, Y.-R. Kao, C.-A. Lin, T.-Y. Kuo, S.-P. Yang, C.-F. Hsu, T.-Y. Chou, C.-C. Ho, C.-W. Wu, Hedgehog pathway maintains cell survival under stress conditions, and drives drug resistance in lung adenocarcinoma, *Oncotarget*. 7 (2016) 24179–24193. doi:10.18632/oncotarget.8253.
 49. E. Giroux Leprieur, T. Vieira, M. Antoine, N. Rozensztajn, N. Rabbe, A.-M. Ruppert, A. Lavole, J. Cadranet, M. Wislez, Sonic Hedgehog Pathway Activation Is Associated With Resistance to Platinum-Based Chemotherapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Carcinoma, *Clin. Lung Cancer*. (2015). doi:10.1016/j.clc.2015.12.007.
 50. L. Huang, V. Walter, D.N. Hayes, M. Onaitis, Hedgehog-GLI signaling inhibition suppresses tumor growth in squamous lung cancer, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res*. 20 (2014) 1566–1575. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2195.
 51. C.M. Della Corte, C. Bellecine, G. Vicidomini, D. Vitagliano, U. Malapelle, M. Accardo, A. Fabozzi, A. Fiorelli, M. Fasano, F. Papaccio, E. Martinelli, T. Troiani, G. Troncone, M. Santini, R. Bianco, F. Ciardiello, F. Morgillo, SMO Gene Amplification and Activation of the Hedgehog Pathway as Novel Mechanisms of Resistance to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Drugs in Human Lung Cancer, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res*. 21 (2015) 4686–4697. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-3319.
 52. E.-H. Lin, Y.-R. Kao, C.-A. Lin, T.-Y. Kuo, S.-P. Yang, C.-F. Hsu, T.-Y. Chou, C.-C. Ho, C.-W. Wu, Hedgehog pathway maintains cell survival under stress conditions, and drives drug resistance in lung adenocarcinoma, *Oncotarget*. (2016). doi:10.18632/oncotarget.8253.
 53. S. Shi, Y.-Z. Deng, J.-S. Zhao, X.-D. Ji, J. Shi, Y.-X. Feng, G. Li, J.-J. Li, D. Zhu, H.P. Koeffler, Y. Zhao, D. Xie, RACK1 Promotes Non-small-cell Lung Cancer Tumorigenicity through Activating Sonic Hedgehog Signaling Pathway, *J. Biol. Chem*. 287 (2012) 7845–7858. doi:10.1074/jbc.M111.315416.
 54. X.-Y. Bai, X.-C. Zhang, S.-Q. Yang, S.-J. An, Z.-H. Chen, J. Su, Z. Xie, L.-Y. Gou, Y.-L. Wu, Blockade of Hedgehog Signaling Synergistically Increases Sensitivity to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Lines, *PLoS One*. 11 (2016) e0149370. doi:10.1371/journal.pone.0149370.
 55. O. Arrieta, E. Guzmán-de Alba, L.F. Alba-López, A. Acosta-Espinoza, J. Alatorre-Alexander, J.F. Alexander-Meza, S.R. Allende-Pérez, S. Alvarado-Aguilar, M.E. Araujo-Navarrete, L.M. Argote-Greene, C.A. Aquino-Mendoza, A.M. Astorga-Ramos, H. Austudillo-de la Vega, A. Avilés-Salas, L.J. Barajas-Figueroa, N. Barroso-Quiroga, M. Blake-Cerda, P.A. Cabrera-Galeana, G. Calderillo-Ruiz, A.D. Campos-Parra, A.M. Cano-Valdez, D. Capdeville-García, G. Castillo-Ortega, C. Casillas-Suárez, P. Castillo-González, J.F. Corona-Cruz, M.E. Correa-Acevedo, S.S. Cortez-Ramírez, J.A. de la Cruz-Vargas, J.G. de la Garza-Salazar, M.D. de la Mata-Moya, M.E. Domínguez-Flores, H.R. Domínguez-Malagón, L.M. Domínguez-Parra, A. Domínguez-Peregrina, J. Durán-Alcocer, M.I. Enríquez-Aceves, A. Elizondo-Ríos, M.D. Escobedo-Sánchez, P.E.-M. de Villafranca, A. Flores-Cantisani, J.P. Flores-Gutiérrez, F. Franco-Marina, E.E. Franco-González, R.A. Franco-Topete, H. Fuentes-de la Peña, S. Galicia-Amor, D. Gallardo-Rincón, A. Gamboa-Domínguez, J. García-Andreu, C.M. García-Cuéllar, M.C. García-Sancho-Figueroa, R. García-Torrentera, R. Gerson-Cwilich, A. Gómez-González, L. Green-Schneeweiss, M. del R. Guillén-Núñez, H. Gutiérrez-Velázquez, C. Ibarra-Pérez, E. Jiménez-Fuentes, P. Juárez-Sánchez, A. Juárez-Ramiro, J. Kelly-García, R. Kuri-Exsome, J.M. Lázaro-León, E. León-Rodríguez, S. Llanos-Osuna, S. Llanos-Osuna, U. Loyola-García, J.S. López-González, F.J. López y de Antuñano, M.A. Loustaunau-Andrade, E.O. Macedo-Pérez, L. Machado-Villarreal, M. Magallanes-Maciél, L. Martínez-Barrera, J. Martínez-Cedillo, G. Martínez-Martínez, A. Medina-Esparza, A. Meneses-García, A. Mohar-Betancourt, J. Morales Blanhir, J. Morales-Gómez, D. Motola-Kuba, M.P. Nájera-Cruz, C. del C. Núñez-Valencia, M.A. Ocampo-Ocampo, M.D. Ochoa-Vázquez, C.A. Olivares-Torres, A. Palomar-Lever, M. Patiño-Zarco, R. Pérez-Padilla, Y.R. Peña-Alonso, A.R. Pérez-Romo, M. Aquilino Pérez, P.M. Pinaya-Ruiz, M.A. Pointevin-Chacón, J.J. Poot-Braga, R. Posadas-Valay, M. Ramirez-Márquez, I. Reyes-Martínez, J. Robledo-Pascual, J. Rodríguez-Cid, C.E. Rojas-Marín, E. Romero-Bielma, J.E. Rubio-Gutiérrez, J.A. Sáenz-Frías, M.A. Salazar-Lezama, K. Sánchez-Lara, R. Sansores Martínez, P. Santillán-Doherty, J. Alejandro-Silva, J.L. Téllez-Becerra, V. Toledo-Buenrostro, L. Torre-Bouscoulet, L. Torecillas-Torres, M. Torres, V. Tovar-Guzmán, J.G. Turcott-Chaparro, J.J. Vázquez-Cortés, M.E. Vázquez-Manríquez, N. Vilches-Cisneros, J.F. Villegas-Elizondo, M.M. Zamboni, J. Zamora-Moreno, J.W. Zinser-Sierra, [National consensus of diagnosis and treatment of non-small cell lung cancer], *Rev. Investig. Clínica Organo Hosp. Enfermedades Nutr*. 65 (2013) S5-84.
 56. O. Arrieta, A.F. Cardona, G. Federico Bramuglia, A. Gallo, A.D. Campos-Parra, S. Serrano, M. Castro, A. Avilés, E. Amorin, R. Kirchuk, M. Cuello, J. Borbolla, O. Riemersma, H. Becerra, R. Rosell, CLICaP, Genotyping non-small cell lung cancer (NSCLC) in Latin America, *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer*. 6 (2011) 1955–1959. doi:10.1097/JTO.0b013e31822f655f.
 57. C. Guzmán, M. Bagga, A. Kaur, J. Westermarck, D. Abankwa, ColonyArea: An ImageJ Plugin to Automatically Quantify Colony Formation in Clonogenic Assays, *PLoS ONE*. 9 (2014) e92444. doi:10.1371/journal.pone.0092444.