



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**ZARAGOZA**

**CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA**

**Relación de la expresión de cuatro genes asociados a la  
respuesta al tratamiento con gemcitabina en pacientes con  
Mesotelioma Pleural Maligno.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**JORGE ANTONIO MENDOZA DESIÓN**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. SAÉ MUÑIZ HERNANDEZ**

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA**

**ASESOR INTERNO**

**DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ**

**FES ZARAGOZA, UNAM**

**CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2018**





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.

*A mi madre y mis hermanas, por apoyarme en cada momento a lo largo del camino, el cual sin su apoyo sería mucho más difícil.*

## **Agradecimientos Académicos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme las puertas para continuar mis estudios de nivel superior.

A la Facultad de Estudios superiores - Zaragoza, por permitirme desarrollarme como una persona de calidad dentro de sus instalaciones.

Al Instituto Nacional de Cancerología, por permitir el desarrollo de este proyecto, así como apoyarme en mi desarrollo tanto personal como profesional.

## **Agradecimientos Académicos**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Oncología Experimental del Instituto Nacional de Cancerología con apoyo del proyecto del Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro SALUD-2015-1-262341. Bajo la dirección de la Dra. Saé Muñiz Hernández.

## **Agradecimientos Académicos**

A la Dra. Saé Muñiz Hernández, por su guía, apoyo y dedicación durante todo el desarrollo del proyecto, lo cual llevó a la conclusión exitosa del mismo.

A la Dra. Ma. Isabel Soto Cruz, del Laboratorio 9 – Unidad de Investigación Multidisciplinaria – FES Zaragoza; como asesor interno del proyecto.

Al Dr. Oscar Arrieta, jefe del Laboratorio de Oncología Experimental, por todo el apoyo brindado.

A la Dra. Carolina González Torres, del Laboratorio de Secuenciación, Centro de Instrumentos, División de Desarrollo de la Investigación – Centro Médico Nacional Siglo XXI – IMSS; por su apoyo y asesoría durante el desarrollo experimental.

A la Dra. Vanesa Izquierdo Sánchez, de la Unidad del Ciclotrón & Radiofarmacia - Instituto Nacional de Cancerología, cuyos conocimientos me han servido de guía y por el apoyo técnico en la realización del presente proyecto.

A mis compañeros y personal de laboratorio por apoyarme en todo momento.

## **Agradecimientos Personales**

*Le agradezco a mi madre, Mariela Desión Ramírez, por formarme y no permitir que me rindiera en los momentos mas difíciles, por confiar en mí y apoyarme para seguir adelante.*

*A mis hermanas Pamela Stephanie y Gemma Isabelle quienes siempre confiaron en mí, dándome la motivación para seguir adelante.*

*A los amigos formados en la carrera, que a pesar de las distancias siempre han procurado apoyarme.*

*A los Sr. Martín López y la Sra. Cristina Rosales, quienes a través del trabajo compartido, me han brindado su apoyo en momentos difíciles durante mis estudios.*

*A mis compañeros de laboratorio de Oncología Experimental, con quienes he pasado muy gratos momentos.*

*Agradezco a mis amigos del CCH, con los cuales, a pesar de haber tomado caminos separados, se que puedo confiar y siempre los tengo presentes.*

*Agradezco a la doctora Saé Muñiz por todas sus enseñanzas, por que me han ayudado a desarrollarme de mejor manera, por su apoyo y comprensión durante estos últimos años.*

## Índice General

	Pág.
<b>Capítulo I</b>	
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo II</b>	
<b>Marco teórico</b>	
<b>1. Generalidades del Mesotelioma Pleural Maligno</b>	<b>2</b>
<b>2. Etiología del Mesotelioma Pleural Maligno</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Asbestos</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Radiación Ionizante</b>	<b>5</b>
<b>2.3. SV-40</b>	<b>6</b>
<b>3. Presentación clínica del MPM</b>	<b>7</b>
<b>3.1. Etapificación</b>	<b>7</b>
<b>4. Tratamiento</b>	<b>9</b>
<b>4.1. Cisplatino</b>	<b>9</b>
<b>4.2. Pemetrexed</b>	<b>11</b>
<b>4.3. Gemcitabina</b>	<b>13</b>
<b>5. Biomarcadores</b>	<b>15</b>
<b>5.1. Ribonucleótido Reductasa (RR)</b>	<b>16</b>
<b>5.1.1. Asociación de RRM1 con la respuesta a</b>	<b>17</b>
<b>quimioterapia</b>	
<b>5.1.2. Relación de la expresión de RRM2 y la</b>	<b>19</b>
<b>respuesta al tratamiento</b>	
<b>5.2. hENT -1, transportador de nucleósidos equilibrados</b>	<b>21</b>
<b>5.3. Vía de reparación de ADN por escisión de nucleótidos</b>	<b>22</b>
<b>5.4. Relación de ERCC1 con la respuesta a la</b>	<b>23</b>
<b>quimioterapia</b>	

<b>Capítulo III</b>	
<b>Planteamiento del problema</b>	<b>25</b>
<b>Capítulo IV</b>	
<b>Objetivos</b>	
1. <b>Objetivo general</b>	<b>26</b>
2. <b>Objetivos particulares</b>	<b>26</b>
<b>Capítulo V</b>	
<b>Materiales y métodos</b>	
1. <b>Selección de muestras</b>	<b>27</b>
2. <b>Obtención y purificación de material genético de las biopsias de MPM</b>	<b>27</b>
3. <b>Cultivo celular</b>	<b>28</b>
3.1. <b>Extracción de ARN de líneas celulares</b>	<b>28</b>
4. <b>Cuantificación de ARN</b>	<b>28</b>
5. <b>Análisis de la expresión genética de los biomarcadores</b>	<b>29</b>
5.1. <b>Diseño de primers</b>	<b>29</b>
5.2. <b>Obtención de cDNAs</b>	<b>30</b>
5.2.1. <b>Reacción en cadena de la polimerasa en punto final</b>	<b>30</b>
5.2.2. <b>Análisis de amplificación de productos de PCR</b>	<b>31</b>
6. <b>Secuenciación tipo Sanger</b>	<b>31</b>
<b>Capítulo VI</b>	
<b>Resultados</b>	
1. <b>Características generales de la población de estudio</b>	<b>32</b>
2. <b>Cuantificación y análisis de pureza</b>	<b>32</b>
2.1. <b>Análisis de pureza del ARN proveniente de líneas celulares</b>	<b>32</b>

2.2. Análisis de pureza del ARN proveniente de tejido tumoral de pacientes con Mesotelioma Pleural Maligno	35
3. Análisis de expresión en líneas celulares	38
4. Análisis de expresión en tejido tumoral de pacientes con MPM	41
5. Validación de la expresión de genes en las muestras de MPM por el método de secuenciación tipo Sanger	46
6. Asociación entre la expresión de genes y la respuesta a tratamiento	47
Capítulo VII	
Discusión	49
Capítulo VIII	
Conclusión	52
Capítulo IX	
Perspectivas	53
Capítulo X	
Referencias Bibliográficas	54
Capítulo XI	
Anexos	
1. Lista de abreviaturas	61
2. Lista de figuras	62
3. Lista de tablas	63
4. Protocolo de extracción DNA RNA	64

## CAPITULO I

### INTRODUCCIÓN

El mesotelioma pleural maligno (MPM), se origina en las células mesoteliales de la pleura pulmonar, es una neoplasia muy agresiva de difícil diagnóstico y tratamiento, con un pronóstico extremadamente pobre. La mayoría de los pacientes son diagnosticados en estados avanzados de la enfermedad, lo que reduce significativamente el tiempo de supervivencia global. Uno de los principales problemas con el diagnóstico del MPM es que sus signos y síntomas, son similares a otras enfermedades respiratorias. La quimioterapia combinada de cisplatin o carbo-platino, con un antimetabolito o un antifolato, suelen ser la de mejor respuesta. La gemcitabina es un antimetabolito análogo de nucleósidos, cuya principal función es inhibir la síntesis de ADN. En estudios fase II se ha comparado el uso de gemcitabina o vinorelbina, combinado con cisplatino, en pacientes con MPM y concluyen que ambos ofrecen tasas de respuesta similares. La FDA aprobó en 2003 el uso de pemetrexed/cisplatino en el tratamiento de MPM. Actualmente no se ha establecido un tratamiento estándar en pacientes con MPM en estadios avanzados. Con los avances en la biología molecular del MPM se ha permitido la identificación de moléculas, que puedan ser utilizadas como biomarcadores, principalmente de pronóstico y de respuesta a la terapia. En este trabajo se analizó la expresión de RRM1, RRM2, ERCC1 y hENT1 a nivel génico, en muestras tumorales de pacientes con diagnóstico de MPM en estado avanzado.

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### II. 1. Generalidades del Mesotelioma Pleural Maligno

El mesotelioma es una neoplasia muy agresiva generada a partir de las células mesoteliales, tanto en la cavidad pleural del pulmón como en peritoneo, epidídimo, pericardio y túnica vaginalis; el sitio más común para el origen de esta enfermedad es la cavidad pleural pulmonar<sup>1,2</sup>. El mesotelioma pleural maligno (MPM) es la neoplasia originada en las células que recubren la pleura pulmonar, ésta se caracteriza por su pronóstico extremadamente pobre; debido a su diagnóstico tardío y a la resistencia al tratamiento<sup>3</sup>. El MPM es una de las neoplasias clínicamente más agresivas, donde la mayoría de los pacientes mueren dentro de los 2 años posteriores al diagnóstico<sup>2</sup>, la mayoría de los pacientes son diagnosticados en estadios avanzados, lo cual conduce a un tiempo de supervivencia menor a 12 meses<sup>3</sup>. En años recientes se han implementado estrategias de tratamiento combinando cirugía y quimioterapia. Con la optimización de los regímenes quimioterapéuticos se ha conducido a mejorar la calidad de vida y la sobrevida global de pacientes con MPM<sup>2</sup>. La edad de presentación de la enfermedad, se ha relacionado a la existencia de un tiempo de latencia de entre 20 y 50 años, posterior a la exposición a las fibras de asbesto; las cuales se presumen son la principal causa de esta neoplasia<sup>1,4</sup>. Tanto el Mesotelioma maligno como el MPM poseen tiempos de latencia largos, se ha sugerido que debido a esta característica su incidencia aumentará entre el 5 - 10% cada año, principalmente en ciudades industrializadas en las siguientes 2 - 3

décadas; a pesar de los esfuerzos para reducir el uso y consumo de asbesto<sup>5</sup>. La incidencia de mesotelioma y otras enfermedades relacionadas a asbesto, han comenzado a disminuir en países como Suecia, Australia, Estados Unidos y, se estima disminuya en la mayor parte de Europa en la siguiente década<sup>6</sup>. Lo anterior, debido a una disminución del consumo de asbesto y la implementación de políticas reguladoras o prohibitivas, que han ocurrido en los últimos 40 años. En contraste, la tasa de incidencia de mesotelioma maligno en Japón ha ido en aumento, se espera que alcance un máximo entre 2030-2039, debido al uso de grandes cantidades de asbesto después de la segunda guerra mundial y hasta el 2003, fecha en que fue prohibido<sup>6</sup>. En México, el MPM ocupa el lugar número 34 entre las neoplasias malignas, presentando una mayor predominancia en varones, con edades aproximadas de 50 - 70 años<sup>1,4</sup>. Además, se ha sugerido existe un sub-registro de aproximadamente el 71% de los casos, por lo que se estima que en promedio se presentan 500 casos por año, de los cuales sólo 170 son reportados como MPM<sup>7</sup>.

El MPM es clasificado principalmente en tres subtipos histológicos: epitelial, sarcomatoide y mixto o bifásico. El subtipo epitelial se asocia con buen pronóstico, mientras que el sarcomatoide se asocia a mal pronóstico<sup>8</sup>. De acuerdo con la OMS desde 2015 se incluyó un subgrupo de variables histológicas para el MPM epitelial: papilar, micropapilar, trabecular, sólido y pleomórfico; sin embargo, a la fecha se desconoce su relación con el pronóstico de la enfermedad<sup>9</sup>. Estudios recientes han reportado un comportamiento más agresivo en pacientes con diagnóstico histológico epitelial-pleomorfo; por lo que los autores han propuesto que sea integrado en la clasificación del tipo sarcomatoide<sup>9</sup>.

## **II. 2. Etiología del Mesotelioma Pleural Maligno**

Alrededor del 50 al 70% de los casos de MPM se asocian con exposición a asbestos, ya sea ocupacional o ambiental. Un estudio realizado en Italia, mostró que en el desarrollo de MPM, existe una relación entre el tiempo de exposición y la cantidad acumulada de asbesto en el organismo<sup>10</sup>. Sin embargo, se han sugerido otras causas que podrían facilitar el desarrollo de la enfermedad, como la radiación ionizante y el virus SV-40<sup>1,5,10</sup>.

### **II.2.1 Asbestos**

Existen seis tipos de asbestos que se dividen en dos grupos: las serpentinas y los anfíboles<sup>11</sup>. En el grupo de las serpentinas se encuentra únicamente el crisotilo; mientras que en el grupo de los anfíboles se encuentran: la actinolita, la amosita, la crocidolita, la tremolita y la antofilita<sup>11</sup>. El crisotilo representa aproximadamente el 95% del asbesto utilizado a nivel mundial. La oncogenicidad de las fibras de asbesto es relativa y controversial, diversos estudios muestran una razón de riesgo diferente para las mismas fibras, por ello la OMS determinó que todas las fibras de asbesto pueden causar cáncer en los humanos, principalmente de pulmón y mesotelioma<sup>11</sup>. La exposición a asbesto, tanto en forma de serpentina como de anfíboles, es común para los obreros en industrias, por lo que se considera exposición ocupacional<sup>5</sup>. El contacto con las fibras de asbesto también se da por vivir en el mismo lugar que los trabajadores expuestos o por habitar en un área donde hay emisiones de asbesto<sup>5</sup>. La acumulación de este mineral causa daño directo al ADN, posiblemente con interferencia mecánica durante la mitosis;

e indirectamente, por inducción de liberación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS e iNOS)<sup>5</sup>.

## **II. 2. 2. Radiación Ionizante**

La radiación ionizante (terapéutica o no terapéutica) en la parte superior del cuerpo puede ser un factor de riesgo para el posterior desarrollo de MPM<sup>8</sup>. En el año 2011 se publicó un meta análisis, utilizando casos de trabajadores en instalaciones que producen energía nuclear o que se especializan en actividades tales como investigación, gestión de desechos o producción de combustible nuclear, isótopos y armas, a quienes se les diagnosticó MPM entre 1980 a 2009, donde la información no fue suficiente para establecer dicha asociación; debido a que en el sitio se encontró presencia de otros carcinógenos como el asbesto<sup>12</sup>. Un estudio retrospectivo en pacientes con Linfoma No-Hodgkin, demostró que hay un mayor riesgo de presentar mesotelioma después del tratamiento con radiación<sup>13</sup>. Se ha encontrado evidencia que sugiere que tanto las radiaciones  $\alpha$  y  $\beta$  ocasionadas por tratamiento, así como la  $\gamma$  en radioterapia y ocupacional, están asociadas al aumento de riesgo de desarrollo del mesotelioma<sup>14</sup>. En grupos de pacientes que reciben radioterapia, el número de personas que desarrollan mesotelioma suele ser pequeño, lo cual reduce el poder estadístico. Además, pacientes jóvenes con un tumor primario, tienen más posibilidades de desarrollar un segundo primario, por lo que la magnitud de asociación entre tratamientos con radiación y mesotelioma podría ser mayor a lo informado<sup>14</sup>.

### II. 2. 3. SV-40 (Simian Virus 40)

El virus SV-40 es un poliomavirus con ADN circular bicatenario<sup>15</sup>. Mediante la detección de secuencias de ADN del virus SV-40 en muestras de pacientes con MPM, es que se ha considerado como un co-factor para el desarrollo tanto de MM como de MPM<sup>5,16</sup>. Se cree que millones de personas entre los años 1954 - 1978, estuvieron expuestas a este virus a través de vacunas contra la poliomielitis de salk y de sabin contaminadas<sup>15,16</sup>. Debido a que el SV-40 se ha encontrado en pacientes con MPM expuestos a asbesto, se cree que el virus podría actuar como un co-activador de este carcinógeno<sup>16</sup>. En un estudio realizado en líneas celulares de mesotelioma pleural maligno, observaron que altos niveles de p53 inhiben la replicación del virus SV-40. Adicionalmente, células infectadas con SV-40 y expuestas a crocidolita, fueron más susceptibles de sufrir una transformación celular<sup>17</sup>.

En las biopsias de MM, se ha demostrado que SV-40 se une y activa oncogenes, como c-met, IGF-I ; además de inactivar p53 y a pRb<sup>5</sup>. SV40tag inhibe a PP2A, lo que puede conducir a la activación de las vías Wnt y ERK, mismas que pueden llevar a la generación de mutaciones y crecimiento descontrolado de las células<sup>15</sup>. La infección con SV40 en MPM también puede aumentar la transcripción y activación de Notch-1, lo cual puede tener un papel importante en la transformación y proliferación de las células mesoteliales<sup>15,16</sup>. Además se ha observado el silenciamiento de RASSF1; la pérdida de expresión de éste gen se ha asociado con la patogénesis de varias neoplasias<sup>16</sup>.

### **II. 3. Presentación clínica del MPM**

Los síntomas asociados al MPM son disnea, dolor de pecho, fatiga, anorexia, sudores y malestar general<sup>1,18</sup>; a medida que la enfermedad se extiende alrededor de la superficie de la pleura pulmonar, la disnea se produce por el movimiento respiratorio restringido y la compresión del pulmón por el tumor<sup>18</sup>. En contraste con tumores sólidos en el tejido pulmonar, cuadros de tos, hemoptisis, y linfadenopatía son menos comunes en el MPM. A su vez la invasión tumoral local puede causar obstrucción de la vena cava superior, parálisis del nervio laríngeo o disfagia<sup>18</sup>.

Algunos pacientes son asintomáticos, por lo que el diagnóstico se presenta cuando se detectan anomalías en estudios de imagen, realizados por razones diferentes a la sospecha de la presencia de tumor<sup>18</sup>. En pacientes con historial de exposición a asbestos; los síntomas pulmonares sumados a la presencia de derrame pleural unilateral de gran volumen, aumenta la sospecha de MPM<sup>8</sup>.

#### **II. 3. 1. Etapificación**

El sistema American Joint Committee on Cancer (AJCC ed. 2010), se utilizan para la etapificación del MPM, empleando la clasificación de acuerdo al TNM (Tumor, node, Metastasis.). En la tabla 1, se presenta la definición de tumor y metastasis de acuerdo al sistema AJCC; mientras que las etapas clínicas son definidas en la tabla 2. Basado en dicha clasificación, se establece que los estadios I y II son potencialmente resecables; sin diseminación a ganglios linfáticos ni metástasis. Mientras que en el estadio III se presenta, diseminación ganglionar; y finalmente el estadio IV presenta metástasis a distancia y localmente avanzado e irresecable, incluyendo afectación ganglionar<sup>1,19</sup>.

**Tabla 1. Definición del tumor y de las metástasis en MPM, AJCC 2010.**

Tx	Tumor primario no evaluable
T0	No hay evidencia de tumor primario
T1	Tumor primario limitado al a pleura parietal ipsilateral con o sin invasión de la pleura mediastínica y/o diafragmática
T1a	Sin invasión de pleura visceral
T1b	El tumor involucra pleura visceral
T2	El tumor invade cada una de las superficies pleurales ipsilaterales, con al menos uno de los siguientes: a) Afectación del musculo diafragmático; b) Extensión hacia el parénquima pulmonar subyacente.
T3	Tumor localmente avanzado, resecable; el tumor invade cada una de las superficies pleurales ipsilaterales con alguna de las siguientes: a) afectación de la fascia endotorácica; b) extensión de la grasa mediastínica; c) afectación no transmural del pericardio; d) foco solitario; e) completamente resecable que se extiende a los tejidos blandos de la pared torácica.
T4	Tumor localmente avanzado, técnicamente irresecable, afecta superficies ipsilaterales con al menos una de las siguientes: a) extensión difusa o masas multifocales de tumor en la pared torácica, con o sin destrucción costal asociada; b) extensión directa del tumor hasta el peritoneo; c) extensión directa del tumor en la pleura contralateral; d) extensión directa del tumor en órganos mediastinos o extensión directa hasta la columna; e) tumor que se extiende hasta la superficie interna del pericardio con o sin derrame pericárdico; f) tumor que involucra el miocardio.
Mx	Metástasis a distancia no valorables
M0	Sin evidencia de metástasis a distancia
M1	Presencia de metástasis a distancia
<b>T, Tumor primario; M, metástasis. <i>Modificada de Arrieta O, Domínguez LM (2013)</i><sup>1</sup></b>	

Tabla 2. Etapas clínicas basadas en el sistema TNM, de acuerdo con la AJCC 2010.										
Etapas	I	IA	IB	II	III			IV		
	T	1	1A	1B	2	1-2	1-2	3	4	i
N	0	0	0	0	1	2	0-2	i	3	i
M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

i, cualquier criterio. Modificada de Arrieta O, Domínguez LM (2013)<sup>1</sup>

## II. 4. Tratamiento

Hasta un 80% de los pacientes con MPM son diagnosticados en etapas avanzadas, cuando la eficacia de las modalidades terapéuticas es muy limitada<sup>3</sup>.

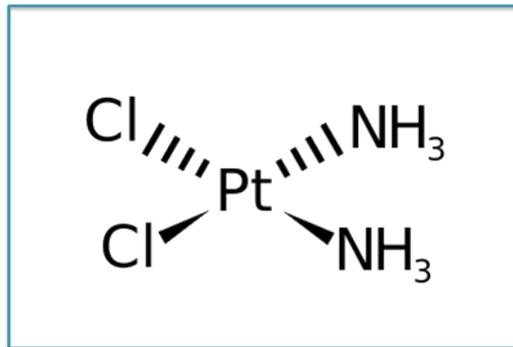
Las opciones de tratamiento incluyen quimioterapia, terapia dirigida y radioterapia, administradas por separado o como parte de un tratamiento multimodal<sup>18</sup>; desafortunadamente, no existe un tratamiento curativo. En su mayoría, los pacientes son tratados con quimioterapia debido a que presentan enfermedad localmente avanzada o metastásica con pobre pronóstico<sup>20</sup>.

En pacientes en etapa III y IV se ha estudiado la quimioterapia paliativa como monodroga o combinada; de los diferentes grupos de fármacos, los anti metabolitos, metotrexato y gemcitabina parecen ser los más activos, mientras que del grupo de antifolatos, el pemetrexed produce respuestas del 15%<sup>1</sup>.

### II. 4. 1. Cisplatino

El cisplatino posee una gran actividad contra un amplio espectro de neoplasias sólidas, incluidos cáncer ovárico, testicular, de vejiga, colorrectal, de cabeza y cuello, y de pulmón. Este fármaco conduce a una respuesta terapéutica inicial asociada con remisión completa de la enfermedad, respuesta parcial o

enfermedad estable. El tratamiento con cisplatino requiere medicación adicional y puede producir efectos secundarios severos, como lo son nefrotoxicidad neuropatía y ototoxicidad, además de, náuseas y vómito<sup>21</sup>. En la figura 1, se presenta la estructura del cisplatino.



**Figura 1. Estructura del Cisplatino**

Por mucho tiempo se planteó que el cisplatino entra a la célula mediante difusión pasiva, debido a que su captación es no saturable y dependiente de la concentración. Sin embargo, se ha encontrado que tanto el transportador de cobre (CTR1) como las ATPasas tipo P de extracción de cobre (ATP7A y ATP7B) también tiene un papel importante en la captación de cisplatino<sup>22</sup>. En células que muestran resistencia a cisplatino se ha observado que CTR está subregulado; así como en estudios realizados con fibroblastos murinos embrionarios deficientes de CTR1, se ha encontrado una menor acumulación de cisplatino<sup>22</sup>. Niveles altos de CTR1 asociados a niveles bajos de ATP7A se consideraron como, factores de pronóstico favorables subsecuentes a la quimioterapia en pacientes con CPCNP resecaos<sup>23</sup>. En dicho estudio se encontró, que pacientes con niveles de expresión elevados tuvieron tiempos de sobrevida global mayores comparado con pacientes con niveles de expresión bajos (<66 meses vs 15 meses, p<0.001)<sup>23</sup>.

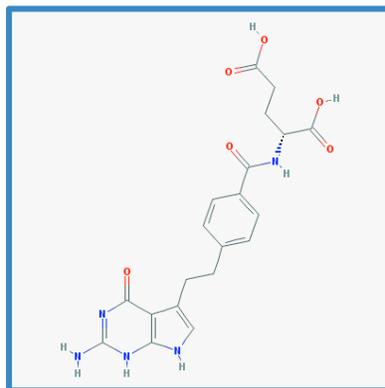
Dentro de la célula, el cisplatino es hidrolizado formando complejos mono- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$  y di-acuosos  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ . Las especies activadas de cisplatino reaccionan con centros nucleofílicos sobre las bases de purina del ADN, particularmente, en la posición N7 de los residuos de guanosina y adenosina, los dos centros reactivos en la estructura del platino permite el entrecruzamiento de dos guaninas adyacentes; su unión genera un entrecruzamiento en las hebras de ADN, induciendo una distorsión en la doble hélice. Existen distintas familias de proteínas involucradas en el reconocimiento de aductos de ADN-Pt; entre ellas las proteínas de la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER)<sup>22</sup>. La vía NER es empleada por las células cancerosas para la eliminación de los aductos de ADN-Pt y la reparación del ADN; además, se ha asociado una actividad aumentada de NER con la resistencia al cisplatino<sup>22</sup>.

Un meta-análisis mostró que la mayoría de los agentes quimioterapéuticos empleados como monodroga presentan una baja actividad, a excepción de cisplatino<sup>8</sup>. Se ha observado que se obtienen tasas de respuesta superiores cuando se emplean terapias combinadas en comparación con terapias basadas en agentes solos y que esas tasas de respuesta son superiores al utilizar cisplatino en las terapias combinadas<sup>8</sup>.

#### **II. 4. 2. Pemetrexed**

El Pemetrexed es un anti-folato que inhibe varias enzimas involucradas en la síntesis de purinas y pirimidinas, como la timidilato sintasa (TS), la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la glicinamida ribonucleótido formiltransferasa<sup>24</sup>. La figura 2, presenta la estructura del pemetrexed. En dos estudios independientes, realizados

con pacientes con CPCNP en estadios avanzados, se observó que una baja expresión de TS correlaciona con una mayor SLP<sup>25,26</sup>. En MPM se ha relacionado la alta expresión de TS con resistencia intrínseca y adquirida, al tratamiento con pemetrexed/platino<sup>24</sup>.



**Figura 2. Estructura del Pemetrexed**

En 2003, un estudio comparó la administración de cisplatino como monodroga y en combinación con pemetrexed en pacientes con MPM, la media de supervivencia global en el grupo de pacientes tratados con pemetrexed/cisplatino fue mayor que en el grupo de cisplatino (12.1 vs 9.3 meses,  $p= 002$ )<sup>27</sup>. Ese mismo año, 2003, el pemetrexed fue aprobado por la FDA para ser utilizado en combinación con cisplatino, en el tratamiento del MPM<sup>18</sup>.

En 2014, en un reporte de caso de un paciente de 69 años, con exposición a asbesto, histología epitelial; a quien, por rechazo de cirugía y radioterapia, además de toxicidad renal inducida por cisplatino, se dejó en terapia de mantenimiento con pemetrexed como monodroga. Este paciente alcanzó una respuesta completa al día 25 del sexto ciclo, sugiriendo una actividad antitumoral del pemetrexed como agente único, con niveles de toxicidad tolerables. Este régimen generó un tiempo libre de progresión de 22 meses, después de la quimioterapia de inducción<sup>24</sup>.

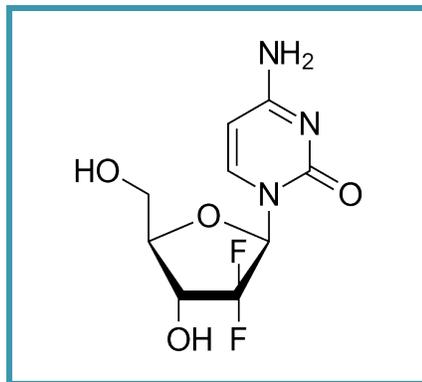
Adicionalmente, los autores sugieren que los resultados favorables pudieran estar relacionados con una baja expresión de TS en el tejido tumoral<sup>24</sup>.

### **II. 4. 3. Gemcitabina**

La Gemcitabina (2',2'-difluoro- 2'-deoxicitidina dFdC) es un análogo de la citosina arabinosa, que difiere estructuralmente debido a la presencia de flúor en el anillo de furanosa. En la figura 3, se presenta la estructura de la gemcitabina. Originalmente este agente fue pensado para ser utilizado como antiviral, pero se le encontró una impresionante actividad antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>21</sup>. Actualmente se utiliza como agente único en el tratamiento de pacientes con cáncer de páncreas metastásico, y en quimioterapia combinada en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), de vejiga y de mama. También se ha utilizado en neoplasias como mesotelioma, tumores de ovario y de cabeza y cuello<sup>21</sup>.

El transporte de la gemcitabina hacia el interior celular, se realiza mediante múltiples transportadores de nucleósidos activos (NTs) ubicados en la membrana celular<sup>21</sup>. Los transportadores de nucleosidos humanos se clasifican en los dependientes de sodio CNT (concentrativos) y los independientes de sodio ENT (equilibrados). En particular la gemcitabina utiliza dos transportadores del sistema equilibrado (hENT1 y hENT2) y tres del sistema concentrativo (hCNT1, hCNT2, hCNT3). En su mayoría la captación de la gemcitabina por las células blanco, es mediado por hENT1; en condiciones de ausencia de dicho transportador se genera una elevada resistencia a este análogo de nucleósidos<sup>21</sup>. La gemcitabina es fosforilada intracelularmente por la desoxicitidina cinasa (dCK) para producir

gemcitabina monofosfato (dFdCMP), la cual será convertida en sus metabolitos activos gemcitabina di- y tri-fosfato (dFdCDP y dFdCTP)<sup>21</sup>.



**Figura 3. Estructura de la gemcitabina.**

El principal mecanismo de acción de la gemcitabina es una potente inhibición de la síntesis de ADN. La actividad citotóxica es el resultado de acciones adicionales sobre la síntesis del ADN: dFdCTP compite con la desoxicitidina trifosfato (dCTP), como un inhibidor débil de la ADN polimerasa. El dFdCTP se incorpora en el ADN, después la incorporación de un nucleótido más, conduce a la terminación de la polimerización del ADN y a ruptura de una hebra de la cadena. Este nucleótido “extra” puede ser importante ocultando a la dFdCTP de las enzimas de reparación del ADN, debido a que la incorporación de la gemcitabina en el ADN parece ser resistente a los mecanismos normales de reparación del ADN<sup>21</sup>. Evidencia reciente ha demostrado que la incorporación de la dFdCTP en el ADN es crucial en la apoptosis inducida por gemcitabina<sup>21</sup>.

Los metabolitos de la gemcitabina pueden inhibir diversas enzimas, conduciendo a la auto potenciación de la acción de la gemcitabina. La inhibición de la enzima Ribonucleótido Reductasa (RR), que se encarga de la síntesis *de novo* de nucleótidos, por dFdCDP es uno de los más importantes de esos mecanismos de

autopotenciación. La inhibición de la RR conduce a un agotamiento de dCTP, un potente inhibidor de dCK, llevando a una fosforilación más eficiente de la gemcitabina<sup>21</sup>.

Ensayos realizados en líneas celulares de CPCNP y cáncer pancreático, la gemcitabina induce la apoptosis celular a través de la activación de las caspasas 3 y 8; lo que sugiere que la activación de las caspasas posee un papel importante en la resistencia/sensibilidad a la gemcitabina<sup>21</sup>.

Bajo un esquema de administración en infusión continua, una mayor cantidad del metabolito de la gemcitabina (gemcitabina trifosfato) es producido por la enzima desoxicitidina cinasa, lo cual eleva la concentración sérica e intracelular de este metabolito activo; consecuentemente, una menor cantidad de gemcitabina es utilizada en cada ciclo de tratamiento<sup>20</sup>.

En un estudio fase II, realizado en pacientes con MPM avanzado se utilizó un régimen de cisplatino más gemcitabina en infusión continua, y se obtuvo una tasa de respuesta del 54% y una supervivencia general >20 meses. Adicionalmente, se observó un perfil de toxicidad seguro y manejable; así como, una mejora en la calidad de vida, tanto estadísticamente como clínicamente<sup>20</sup>.

## **II. 5. Biomarcadores**

Diferentes esfuerzos se están realizando con el objetivo de mejorar las tasas de respuesta a los tratamientos oncológicos y en el desarrollo de estrategias que permitan atender de forma individualizada a los pacientes. En años recientes gracias a los avances en el estudio y comprensión de la biología molecular del

MPM, se han podido identificar algunas moléculas que pudieran servir de biomarcadores, sin que a la fecha se haya logrado una completa utilidad clínica.

## **II. 5.1. Ribonucleótido reductasa**

Los desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), proceden de los correspondientes ribonucleótidos por reducción en el átomo de carbono 2' de la D-ribosa para formar el derivado 2'desoxi-D-ribosa; la reducción está catalizada por la enzima ribonucleotido reductasa (RR)<sup>28</sup>. La importancia de la RR en el mantenimiento del genoma nuclear y mitocondrial, reside en la regulación que lleva sobre los niveles de dNTPs<sup>29</sup>. Errores o fallas de esta enzima para mantener las concentraciones adecuadas de dNTPs en las células, puede conducir a rupturas de la cadena de ADN, mutagénesis y muerte celular<sup>29</sup>. En la mayoría de las células eucariotas esta enzima se compone de dos subunidades, una larga ó M1 y una corta ó M2<sup>28</sup>.

La subunidad M1 contiene un sitio catalítico y dos sitios alostericos diferentes; mientras que la subunidad M2 presenta un cofactor di-ferroso y un radical tirosilo esencial para la actividad de la RR; la forma activa de la enzima se produce por la unión de 2 subunidades M1 y dos subunidades M2<sup>29</sup>. La enzima RRM1 es codificada por el gen Rrm1, mientras dos diferentes genes codifican las isoformas de RRM2, el Rrm2 y el p53R2. La holoenzima RRM1-RRM2 provee los dNTPs para la replicación del ADN nuclear en la fase S y la reparación en células en proliferación. Mientras que RRM1-P53R2 contribuye con dNTPs tanto para la reparación del ADN nuclear en células quiescentes; como para la reparación y la replicación del ADN mitocondrial<sup>29</sup>.

Un mecanismo importante en la regulación de la RR ocurre a través del control estado-específico del ciclo celular; en los mamíferos la actividad de la RR es inducida durante la fase S. La expresión del gen RRM1 se regula principalmente por transcripción, los niveles de expresión son insignificantes en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y alcanzan un máximo en la fase S. Sin embargo, la proteína RRM1 permanece constante durante todo el ciclo celular, debido a su vida media larga. RRM2 está regulada tanto por transcripción como por degradación de la proteína. Similar a RRM1, la transcripción del gen Rrm2 alcanza su máximo en la fase S; mientras que los niveles de proteína correlacionan con la cantidad del RNA mensajero. Al término de la fase S, RRM2 es degradada por diversos mecanismos, en contraste, P53R2 se mantiene constante a lo largo del ciclo celular<sup>29</sup>.

En el cáncer una característica principal es la proliferación descontrolada, misma que debe ser respaldada por dNTPs. La expresión elevada de RR en distintos cánceres puede ser debido a una alteración en el ciclo celular, ya que varias neoplasias muestran una fracción de fase S aumentada; también puede ser el resultado directo de amplificaciones génicas y alteraciones genéticas o epigenéticas<sup>29</sup>.

#### **II. 5. 1. 1. Asociación de RRM1 con la respuesta a quimioterapia.**

En diversos estudios clínicos se ha mostrado que niveles de expresión elevados en RRM1, se asocian a pobres respuestas a fármacos de platino, los cuales inducen daño al ADN, contra los cuales altos niveles de RRM1 ofrecen protección; y a la gemcitabina, cuyo blanco es RRM1<sup>29</sup>. Aunque no en todos los estudios se ha reportado que la expresión de RRM1 afecte la supervivencia del paciente

después del tratamiento con gemcitabina, existe un consenso de que niveles bajos de RRM1 mejoran dicha respuesta; además, en células de cáncer resistentes a la gemcitabina, se ha reportado su sobreexpresión<sup>29</sup>.

El análisis de expresión de RRM1 en tejido tumoral de pacientes con MPM, indicó que altos niveles de expresión nuclear pueden asociarse a largos periodos libres de recurrencia y mayor sobrevida global en pacientes bajo tratamiento gemcitabina/cisplatino<sup>30</sup>. Importantemente el nivel de expresión citoplásmico de RRM1, no mostró asociación con el periodo libre de progresión y la sobrevida global (SG)<sup>30</sup>. En otro estudio similar, se analizó la expresión de RRM1 como posible factor predictivo en pacientes con MPM, bajo terapia de vinorelbine/cisplatino o pemetrexed/carboplatino. Los autores encontraron que pacientes en el brazo de vinorelbine/cisplatino mostraron mayor sobrevida global asociada a bajos niveles de expresión de RRM1<sup>31</sup>. En el grupo de pacientes que recibieron pemetrexed/carboplatino no se encontró asociación.

Otros estudios realizados con pacientes con CPCNP en estadios avanzados, se buscó la relación entre la expresión de RRM1 y la respuesta al tratamiento. Los estudios incluyeron terapia combinada de gemcitabina/cisplatino<sup>32,33</sup> ó carboplatino más gemcitabina/ ó vinorelbine/ ó docetaxel; encontraron que la baja de expresión de la proteína favorece la respuesta a gemcitabina de forma contraria, en el último estudio encontraron que una elevada expresión de RRM1 favorece la respuesta a carboplatino/vinorelbine y carboplatino/docetaxel<sup>34</sup>. Bajo el régimen de vinorelbine/cisplatino ó paclitaxel/cisplatino, pacientes con CPCNP en estado avanzado, se determinó la participación de las subunidades M1 y M2 de la RR.

Pacientes con una baja expresión en ambas subunidades mostraron mayor sobrevida libre de progresión (SLP) y mayor sobrevida global (SG)<sup>35</sup>.

El papel de RRM1 como biomarcador de respuesta a la terapia permanece controversial, es necesario realizar un mayor número de estudios con el fin de caracterizar mejor su participación en dicha respuesta. El uso de dos o más moléculas, y la caracterización genética de la población de estudio, ofrecerían probablemente un mayor soporte.

#### **II. 5. 1. 2. Relación entre la expresión de RRM2 y la respuesta al tratamiento**

La subunidad M2 de la Ribonucleótido reductasa, ha sido preferentemente estudiada en neoplasias sólidas. Recientemente, a partir de un análisis *in silico* de genes con alguna alteración en muestras de pacientes diagnosticados con cáncer adrenocortical (ACC) y adenoma adrenocortical, se buscó la interacción entre genes basados en comparaciones de expresión de transcritos en líneas celulares de ambos tipos de neoplasias<sup>36</sup>. En dicho estudio, los autores demostraron una correlación entre RRM2 y Ki67, el cual es un marcador de proliferación celular<sup>36</sup>. La exposición a gemcitabina de la línea celular de ACC (H295R) indujo inhibición de la proliferación y aumento de la apoptosis celular<sup>36</sup>; debido a estos resultados, los autores sugieren que RRM2 puede servir como un marcador de proliferación en ACC. Además, la sobrerregulación de RRM2 después del tratamiento con gemcitabina puede contribuir a la quimioresistencia (generada por la gemcitabina), lo cual limita su eficacia terapéutica en ACC<sup>36</sup>.

Un estudio realizado con pacientes de CPCNP en estadios tempranos, demostró una asociación entre la baja expresión de RRM2 en tejido tumoral y la sobrevida

global en pacientes con resección quirúrgica<sup>37</sup>. Pacientes con sobreexpresión de RRM2 mostraron una SG más cortas vs pacientes con RRM2 subexpresado (61.9 vs 45.9 %, IC 95% p= 0.069)<sup>37</sup>.

Otro estudio realizado en pacientes con CPCNP en estadios avanzados, bajo tratamiento combinado de cisplatino más gemcitabina, vinorelbine o paclitaxel se analizó la expresión de RRM1, RRM2, ERCC1 y BRCA1. En dicho estudio se encontró que una sobreexpresión de ERCC1 Y RRM2 disminuye las tasas de respuesta. Adicionalmente, cuando los niveles de ERCC1, RRM1 y RRM2 son elevados el riesgo de progresión de la enfermedad y muerte aumenta significativamente<sup>38</sup>. Entre los primeros estudios basados en el análisis de blancos moleculares de la gemcitabina, se encuentra uno realizado en pacientes con cáncer de ovario. En este estudio, se analizó la probable relación entre la expresión de siete genes (hENT1, hCNT1, dCK, CDA, 5'NT, RRM1 Y RRM2) y la SG. Con respecto a RRM2 se encontró una relación entre los niveles de expresión y el riesgo relativo de muerte; pacientes que expresaron bajos niveles de RRM2 mostraron mayor SG comparado con los pacientes con altos niveles (36 meses vs 19 meses, p=0.050). Los autores también sugieren que genes relacionados al metabolismo de la gemcitabina pueden estar asociados a una histología más agresiva<sup>39</sup>.

La sobreexpresión de RRM2 se ha relacionado con invasión celular, angiogénesis tumoral y metástasis; sugiriendo que pacientes con una alta expresión de este marcador pudieran progresar más rápidamente<sup>37</sup>. De manera similar a otras moléculas, se sugiere que el nivel de expresión de RRM2 pudiera servir de

marcador de pronóstico; sin embargo, nada se ha investigado del papel de esta molécula en pacientes con MPM.

## **II. 5. 2. hENT-1, transportador de nucleósidos equilibrados**

Prácticamente todas las células cuentan con sistemas de transporte de nucleósidos y de bases, lo que permite a los tejidos incorporarlos desde el plasma sanguíneo y utilizarlos para la síntesis de nucleótidos a través de las vías de recuperación<sup>40</sup>. Este tipo de transportadores, permiten el acceso de análogos de nucleósidos utilizados como fármacos oncológicos y antivirales<sup>40,41</sup>.

Los transportadores de nucleósidos pertenecen a dos familias generales: los concentradores (CNT) y los equilibradores (ENT). Los transportadores equilibradores, actúan en función del gradiente y permiten el flujo de nucleósidos entre las células y el medio extracelular y/o entre compartimentos celulares<sup>40</sup>. En los seres humanos se han identificado cuatro sistemas del transporte equilibrador (hENT1-4) y tres sistemas del tipo concentrador (hCNT1-3), los cuales están codificados por la familia de genes SLC29 y SLC28, respectivamente<sup>40,41,42</sup>.

Los transportadores hENT-1 y hENT-2 se distribuyen de forma ubicua, pero difieren en el nivel de expresión entre los tejidos y los tipos celulares<sup>42</sup>. El transportador hENT-1 se encuentra preferentemente en los eritrocitos, la placenta, el cerebro, el corazón, el hígado, el bazo y el colon; y aunque el hENT-2 se encuentra en numerosos tejidos, se localiza preferentemente en músculo esquelético<sup>40</sup>.

hENT-1 es capaz de transportar con mayor afinidad los nucleósidos y en menor medida a las nucleobases<sup>43</sup>. Los nucleósidos anticancerosos incluyen análogos de purina y pirimidina, la mayoría de ellos poseen mecanismos de acción similares.

Brevemente, dentro de las células son convertidos en análogos de nucleótidos celulares, por enzimas de las vías metabólicas de las purinas y /ó pirimidinas; éstos pueden ser incorporados dentro de los ácidos nucleicos, y en la mayoría de los casos, inhibir las enzimas implicadas en la síntesis de ADN, causando daño al ADN e induciendo apoptosis<sup>42</sup>.

Las diferencias inter-individuales en la expresión y la función del transportador; además y de manera muy importante, en la alteración en la expresión debido al proceso oncogénico, puede modular el perfil del transportador de las células blanco, determinando así la biodisponibilidad y acción del fármaco<sup>42</sup>. Estudios de tumores sólidos, principalmente cáncer de páncreas, se centran en el análisis de la asociación entre los niveles de expresión de hENT1 y su respuesta clínica a la gemcitabina. Una sobreexpresión de hENT1 favorece la respuesta al fármaco; por el contrario, las células que carecen de expresión de hENT1 son altamente resistentes a la gemcitabina<sup>44</sup>. Esa asociación se ha visto también en pacientes con CPCNP<sup>42</sup>; de manera similar, ese resultado se ha observado en líneas celulares de carcinoma ovárico, células resistentes a gemcitabina expresan bajas cantidades del gen de hENT1<sup>39</sup>.

El nivel de expresión de ENT, podría ser un biomarcador predictivo de la eficacia del fármaco en el tratamiento del cáncer; principalmente y debido a los resultados de estudios previos, puede ser considerada como un biomarcador de respuesta a la terapia en pacientes con adenocarcinoma pancreático y/ó cáncer de mama<sup>41</sup>.

### **II. 5. 3. Vía de reparación de ADN por escisión de nucleótidos**

La capacidad de una célula para detectar y reparar daños del ADN es esencial para el mantenimiento de la integridad del genoma<sup>45</sup>. Existen diversos sistemas enzimáticos encargados de la reparación del ADN. Una de las vías de reparación del ADN, es mediante escisión de nucleótidos ó NER (por sus siglas en inglés), la cual se encarga de la reparación cuando hay alguna distorsión en la doble hélice<sup>45</sup>. En esta vía, el proceso inicia con el reconocimiento de la lesión por unión de proteínas componentes del complejo de reparación (XPA, XPC-HHR23B, RPA). En la fase de escisión un complejo proteico que incluye endonucleasas (escinucleasa) hidroliza los enlaces fosfodiéster a ambos lados de la lesión en la hebra de ADN a una distancia de -22 y +6 nucleótidos (5',3'), para generar un fragmento de 27 a 29 fragmentos. La endonucleasa XPG corta el extremo 3' de la región escindida y la endonucleasa XPF+ERCC1 corta el extremo 5' de la región escindida<sup>28,45</sup>. Después una helicasa (XPB, XPD) favorece la separación del oligonucleótido liberado, dando lugar a la fase de "síntesis reparadora" donde una ADN polimerasa llena el espacio dejado por la escinucleasa, mediante la elongación del extremo 3'-OH, formado en el corte anterior; el uso de la otra hebra de ADN asegura que se introduce la secuencia correcta. En las células eucariotas las polimerasas delta y épsilon son las encargadas de realizar esta síntesis, junto con factores accesorios (PCNA y RFC)<sup>28,48</sup>. Finalmente, una vez que la ADN polimerasa ha sellado el hueco y solo queda una mella, la ADN ligasa-I une el extremo 3'-OH recién sintetizado con el extremo 5'P formado en el corte de la hebra original, cerrando la mella<sup>28,45</sup>.

### II. 5.3.1. Relación de ERCC1 con la respuesta a la quimioterapia

La enzima ERCC1 (Excision repair cross complementation group 1) tiene un papel importante en las vías de reparación del ADN, especialmente en la reparación por escisión de nucleótidos (NER) de dímeros de timina inducidos por luz UV o aductos de platino<sup>30</sup>.

Un estudio realizado con pacientes diagnosticados con CPCNP tanto en estadios tempranos (I –III) como en estadios avanzados (IV), se encontró que niveles bajos o negativos de ERCC1 se asociaron a mejor pronóstico<sup>37</sup>, y tiempos de progresión más largos (7.2 meses vs 2.6 meses  $p= 0.002$ )<sup>38</sup>, comparados con niveles de expresión elevados. Además, se asoció a una SG más larga (14.9 meses vs 7.3 meses,  $p=0.008$ )<sup>38</sup>. Las respuestas fueron asociadas al tratamiento basado en cisplatino, en combinación con paclitaxel, vinorelbine o gemcitabina. Dos estudios independientes, realizados con pacientes diagnosticados con MPM reportaron, que aquellos que mostraron una baja expresión de ERCC1 en el tejido tumoral exhibieron mayor tiempo de supervivencia libre de recurrencia; por lo que los autores sugirieron que ERCC1 podría ser un factor de pobre pronóstico<sup>30,46</sup>; resultados similares fueron encontrados en pacientes con CPCNP<sup>38</sup>. Recientemente, en un estudio que analizó el papel de diferentes moléculas relacionadas a la vía de reparación del ADN a nivel genético, y encontró que la baja expresión de ERCC1 está asociada a una mayor SG<sup>47</sup>. De manera contradictoria a los estudios anteriores, en un estudio realizado con pacientes con MPM en 2013, encontró que altos niveles de expresión de ERCC1 mostraron mayor tiempo de SG (27.6 meses vs 10.3 meses,  $p=0.06$ )<sup>48</sup>. Debido a que los resultados de los estudios

mencionados en las líneas anteriores y otros más, continúan siendo contradictorios, no se ha podido otorgar un papel pronostico a ERCC1.

## **CAPITULO III**

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El MPM es una neoplasia muy agresiva, la cual, a pesar de los avances en los esquemas terapéuticos, continúa teniendo una pobre sobrevida. La población que con mayor frecuencia desarrolla este tipo de neoplasia pertenece a la clase media baja, tomando en cuenta que cualquier régimen terapéutico excede los ingresos de dichos pacientes, la búsqueda de marcadores biológicos de respuesta a la terapia que permitan generar subgrupos que realmente se beneficien con esquemas terapéuticos específicos, se vuelve imprescindible. Diversos estudios realizados en neoplasias sólidas (diferentes a MPM) han mostrado que moléculas como hENT1, ERCC1, RRM1 y RRM2, las cuales participan en el transporte y absorción de fármacos como el cisplatino y la gemcitabina, podrían funcionar como marcadores de respuesta al tratamiento. Por lo que determinar su expresión y establecer su relación con la respuesta a la terapia en pacientes con MPM, podría servir como una herramienta la selección de pacientes que realmente muestren un beneficio tanto en calidad de vida así como en la respuesta al tratamiento y la sobrevida global.

## **CAPITULO IV**

### **OBJETIVOS**

#### **IV. 1. Objetivo general**

Analizar la expresión de hENT1, ERCC1, RRM1 y RRM2 a nivel genético, en tejido tumoral de pacientes con MPM en estadios avanzados.

#### **IV. 2. Objetivos particulares**

1. Seleccionar las muestras embebidas en parafina (biopsias) de pacientes con diagnostico confirmado de MPM.
2. Obtener y analizar la calidad del material genético de las biopsias.
3. Analizar la expresión de los genes de hENT1, RRM1, RRM2 y ERCC1 en las muestras obtenidas de parafina.

## **CAPITULO V**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **V. 1. Selección de muestras**

Los bloques de tejido tumoral embebido en parafina fueron obtenidos del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cancerología. Las biopsias correspondieron a los bloques utilizados para el diagnóstico de los pacientes, en el periodo comprendido de enero 2011 a diciembre 2017; por lo que no se solicitó carta de consentimiento informado de los mismos.

Se obtuvieron 77 bloques de pacientes con diagnóstico confirmado de MPM, después de una primera revisión por el patólogo, sólo 69 contaron con material suficiente para realizar la extracción de DNA/RNA.

#### **V. 2. Obtención y purificación de material genético de las biopsias de MPM**

Después de seleccionar las muestras, éstas se cortaron con un micrótopo, y se obtuvieron 3 cortes de 4 µm de cada una. Los cortes se colocaron en microtubos de 1.5 mL, en donde fueron sometidos a desparafinado. Brevemente, a los cortes se les adicionó de forma subsecuente xilol y etanol al 100%, se centrifugaron y el botón obtenido se utilizó para la extracción de ADN/ARN.

Para la extracción de material genético se utilizó el kit All prep DNA/RNA FFPE (cat. 80234 Qiagen), la extracción se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, en el anexo 4 se adjunta el inserto con las indicaciones del kit.

Tanto el DNA como el ARN fueron eluidos en columnas con buffer ATE ó en agua libre de RNAsas, respectivamente. El material purificado se almacenó de forma separada a -70°C, hasta su uso.

### **V. 3. Cultivo celular**

Las líneas celulares A549 (adenocarcinoma de pulmón, ATCC) y MSTO-211 (MPM, ATCC) fueron obtenidas de la American Type Culture Colection (ATCC), mantenidas en medio F12-K y RPMI-1640, respectivamente, suplementados con suero fetal bovino al 10% y penicilina-streptomicina al 1%. Los cultivos celulares se mantuvieron en una atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C.

#### **V. 3. 1. Extracción de ARN de líneas celulares**

Para la extracción de ARN se utilizó el RNA/DNA/Protein Purification Plus Kit (cat. 47700 Norgen Biotek Corp.), y la extracción se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los cultivos celulares a 80-90% de confluencia, se lavaron 3 veces con PBS 1X, previo a iniciar el protocolo de extracción del kit. El ARN obtenido, se guardó a -70°C hasta su uso.

### **V. 4. Cuantificación de ARN**

El ARN proveniente tanto de las muestras de los pacientes, así como de los cultivos celulares, se cuantificó mediante espectrofotometría, con un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). El programa del NanoDrop, además calcula las relaciones de integridad y pureza de los ácidos nucleicos, la relación 260/280

(proteínas) y la relación 260/230 (residuos de eluyentes), las cuales fueron utilizadas para la selección de las muestras.

## V. 5. Análisis de la expresión genética de los biomarcadores

### V. 5. 1. Diseño de Primers

La síntesis de primers se realizó de forma comercial en IDT ó Invitrogen (ver tabla 3). En el diseño de los primers, se utilizaron regiones conservadas para cada gen, de acuerdo a las secuencias publicadas en la base de datos de la US National Library of Medicine and National Institutes of Health ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Tabla 3. Secuencias genéticas utilizadas en los primers		
Gen	Secuencia	Producto (pb)
Fw-ERCC1	5'GGC AAA ATC CAA CAG CAT CA3'	150
Rv-ERCC1	5' TAG CGG AGG CTG AGG AAC AG 3'	150
Fw-hENT1	5' TCT CCA ACT CTC AGC CCA CCA A 3'	151
Rv- hENT1	5' CCT GCG ATG CTG GAC TTG ACC T 3'	151
Fw-RRM1	5'TCT GCT GGA ATT GGT GTT 3	149
Rv-RRM1	5'ACC TTG TTC CCA CCT TGA T 3	149
Fw-RRM2	5'TTA CAT AAA AGA TCC CAA AGA AAG G 3	112
Rv-RRM2	5'AGC CTC TTT GTC CCC AAT C 3	112
Fw, forward; Rv, reverse; pb, pares de bases		

## V. 5. 2. Obtención de cDNAs

Para realizar la retrotranscripción se empleó el kit GeneAmp<sup>®</sup> RNA PCR (MuLV Reverse Transcriptase, cat. N8080018, Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó 1µg de ARN y 10mM dNTP Mix (cat. 18427-088 Invitrogen<sup>™</sup>) a una concentración final de 1mM. La reacción se llevó a cabo en un termociclador MaxyGen<sup>™</sup> Gradient (AXYGEN<sup>®</sup>), con un programa de un solo ciclo: retrotranscripción 42°C por 15 min, desnaturalización 99°C por 5 min, enfriamiento 5°C por 5 min. El cADN obtenido de esta manera, se empleó en el PCR de punto final.

### 5. 2. 1. Reacción en cadena de la polimerasa en punto final

En la PCR se utilizó el kit GeneAmp<sup>®</sup> RNA PCR (DNA polymerase AmpliTaq, cat. N8080160, Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante, las temperaturas de desnaturalización y alineación, así como las condiciones de corrida para cada gen se presentan en la tabla 4. La reacción se realizó en un termociclador MaxyGen Gradient (AXYGEN).

<b>Tabla 4. Condiciones generales para PCR de los genes</b>				
<b>Gen</b>	<b>Pre calentamiento</b>	<b>Desnaturalización</b>	<b>Alineamiento</b>	<b>Extensión</b>
<b>ERCC1</b>	94°C 5min	94°C 40seg	60°C 1min	72°C 30seg
<b>RRM1</b>	94°C 5min	94°C 40 seg	55°C 1min	
<b>RRM2</b>				
<b>hENT1</b>	94°C 5min	94°C 40seg	58°C 30seg	

### **5. 2. 2. Análisis de amplificación de productos de PCR**

Los productos de cada una de las reacciones de amplificación, se verificaron mediante el corrimiento en electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X. Se utilizaron 1 ó 2  $\mu\text{L}$  de producto de amplificación y 1 $\mu\text{L}$  de SYBR<sup>TM</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain (S11494 Invitrogen) como intercalante, para revelar las bandas en un transiluminador modelo Bio Doc-it (marca UVP).

### **V. 6. Secuenciación tipo Sanger**

Para verificar la identidad de los productos obtenidos después de la amplificación por PCR punto final, en promedio el 10% de las muestras de MPM por cada uno de los genes, se sometieron a secuenciación tipo Sanger. El análisis de los datos se realizó con el programa Finch TV versión 1.5.0 (2004 – 2012, Geospiza Inc.). La similitud entre las secuencias se analizó en la base de datos BLAST.

## **CAPITULO VI**

### **RESULTADOS**

#### **VI. 1. Características generales de la población de estudio**

Las muestras de tejido utilizadas en el presente estudio, se obtuvieron en el Departamento de Patología del propio instituto. Después de la obtención y purificación del DNA, de las 69 muestras procesadas sólo 47 cumplieron con los requisitos del análisis de calidad. Por lo que el análisis de expresión de genes y de la población en general, estará basado en un total de 47 muestras. La mayoría de la población de estudio fueron hombres 68.1 %, sin exposición a tabaco 57.4% ó asbesto 66% (tabla 5). La histología más frecuente fue epitelial con 87.2%, el 76.6% de los pacientes presentaron un estadio IV de la enfermedad al diagnóstico y más de la mitad recibieron gemcitabina en primera línea (53.2%) (tabla 5).

#### **VI. 2. Cuantificación y análisis de pureza del ARN**

##### **VI. 2. 1. Análisis de pureza del ARN proveniente de líneas celulares**

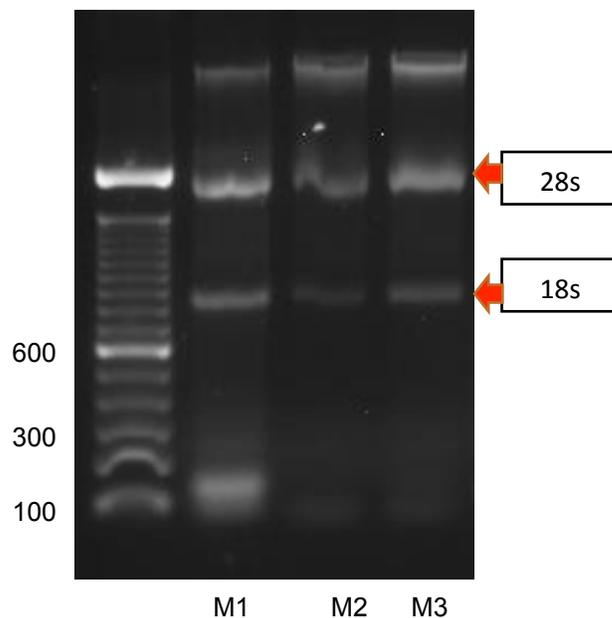
Se utilizaron dos líneas celulares una derivada de adenocarcinoma de pulmón (A549) y la segunda derivada de mesotelioma pleural maligno (MSTO-211) para estandarizar el análisis de expresión de los genes seleccionados (hENT1, ERCC1, RRM1, RRM2).

**Tabla 5. Características generales de los pacientes con MPM**

	N=47 % (n/N)
<b>Género</b>	
Femenino	31.9 (15)
Masculino	68.1 (32)
<b>Edad</b>	
Media ( $\pm$ DS)	61 ( $\pm$ 10.7)
< 60 años	40.4 (19)
$\geq$ 60 años	59.6 (28)
<b>Historial Tabáquico</b>	
Si	42.6 (20)
No	57.4 (27)
<b>Exposición a asbestos</b>	
Si	34.0 (16)
No	66.0 (31)
<b>Exposición a humo de leña</b>	
Si	29.8 (14)
No	70.2 (33)
<b>ECOG</b>	
0-1	44.7 (21)
2-3	55.3 (26)
<b>Estadio de la Enfermedad</b>	
II – III	23.4 (11)
IV	76.6 (36)
<b>Histología</b>	
Epitelial	87.2 (41)
Sarcomatoide	8.5 (4)
Mixto	4.3 (2)
<b>Tratamiento gemcitabina 1ra. línea</b>	
Si	53.2 (25)
No	46.8 (22)
<b>ECOG, European Cooperative Eastern Group Classification; DS, desviación estándar</b>	

La extracción del material genético se realizó con el kit RNA/DNA/Protein Purification Plus, después el ARN purificado se cuantificó por espectrofotometría, en un nanodrop 2000. En la tabla 6, se presentan las concentraciones obtenidas, así como los valores de pureza (260/280) e integridad (260/230). La concentración de la muestra se calcula a partir del valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 260 nm. Una relación 260/280 de  $\approx 2.0$  se acepta para denominar un ARN puro; mientras que para la relación 260/230 el valor esperado está en el rango de 2.0 – 2.2 para ARN. Las muestras de ARN obtenidas de las líneas celulares, se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%. En la figura 4 se muestra la integridad del material obtenido, es posible distinguir las subunidades ribosomales, 18s y 28s, así como el ARN de transferencia.

<b>Tabla 6. Concentración de ARN de cultivos celulares</b>			
<b>Línea celular</b>	<b>Concentración (ng/ <math>\mu</math>L)</b>	<b><math>^{260}/_{280}</math></b>	<b><math>^{260}/_{230}</math></b>
<b>MSTO-211</b>			
<b>Muestra 1</b>	780.5	2.08	2.2
<b>Muestra 2</b>	255.1	2.03	1.81
<b>A549</b>			
<b>Muestra 1</b>	1155.23	2.09	1.61
<b>Muestra 2</b>	1144.30	2.08	1.61



**Figura 4. Integridad del ARN obtenido de células.**

Imagen representativa de la integridad del ARN obtenido de tres muestras diferentes de la línea celular MSTO-211. En los recuadros se señalan las unidades ribosomales.

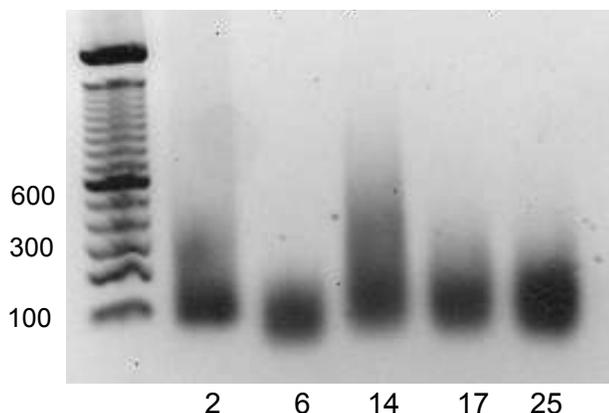
## **VI. 2. 2. Análisis de pureza del ARN proveniente de tejido tumoral de pacientes con Mesotelioma Pleural Maligno**

EL ARN obtenido de biopsias de pacientes con diagnóstico de MPM, se cuantificó de manera similar que el de líneas celulares. Los datos de la cuantificación se presentan en la tabla 7. Las muestras señaladas mediante las casillas rellenas, corresponden a las muestras empleadas en el análisis de los genes; mientras que las muestras señaladas con el número correspondiente seguido de un punto uno, denotan aquellas muestras con un segundo vial, al que se realizó la extracción y cuantificación de ARN de manera individual (tabla 7).

<b>Tabla 7. Concentración y pureza de ARN obtenido de biopsias de pacientes</b>											
<b>No. muestra</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>5.1</b>	<b>6</b>	<b>6.1</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
Concentración (ng/ $\mu$ L)	17 1. 9	1575. 7	876.9 5	201.8 5	23.3	39.5	175. 2	171.9	42.8 0	30.6 0	40.1 0
260/280	1. 99	2.01	2	1.95	1.78	1.71	1.68	1.78	1.72	1.83	1.73
260/230	0. 86	1.98	2.11	0.63	0.58	-0.86	0.21	1.12	0.45	0.68	0.36
<b>No. muestra</b>	<b>10</b>	<b>10.1</b>	<b>11</b>	<b>11.1</b>	<b>12</b>	<b>12.1</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>16.1</b>
Concentración (ng/ $\mu$ L)	20 .8 5	16.05	9.25	16.80	130.5 0	169.4 5	475	1000. 7	482. 9	182. 8	366. 9
260/280	1. 68	1.86	9.11	1.8	1.94	1.91	2.01	1.97	1.91	1.99	1.96
260/230	0. 1	0.22	0.02	0.46	0.53	0.38	1.21	1.47	1.16	0.98	1.56
<b>No. muestra</b>	<b>17</b>	<b>17.1</b>	<b>18</b>	<b>18.1</b>	<b>19</b>	<b>19.1</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>23.1</b>
Concentración (ng/ $\mu$ L)	28 0. 3	805.8	64	10.8	8.8	8.95	390. 2	472.7	938. 9	102. 6	87.9
260/280	1. 94	1.94	1.75	1.86	1.78	2.05	1.96	1.96	1.94	1.97	1.89
260/230	0. 79	1.75	0.39	0.05	0.06	0.004	1.14	1.14	1.4	0.14	0.62
<b>No. muestra</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>26.1</b>	<b>27</b>	<b>27.1</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>29.1</b>	<b>30</b>	<b>31</b>
Concentración (ng/ $\mu$ L)	86 6. 3	373.4	121.4 5	88.5	67.2	38.73	335. 1	27.65	41.1	351	659. 9
260/280	1. 96	1.98	1.88	1.91	2.1	1.99	1.96	2.02	1.92	1.94	19.9 7
260/230	1. 91	1.45	0.36	0.21	0.09	0.27	0.43	0.08	0.57	1.38	1.4
<b>No. muestra</b>	<b>32</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>37.1</b>	<b>38</b>	<b>38.1</b>	<b>39</b>	<b>39.1</b>
Concentración (ng/ $\mu$ L)	44 3. 2	12.6	108.5	153	108.8	35.25	17.6	213.6	61.5	10.8	6.55
260/280	1. 91	2	1.89	1.79	1.85	1.98	2.09	2.01	1.97	1.54	1.91
260/230	1. 26	0.03	0.14	1.37	0.6	0.13	0.31	0.31	0.17	0.35	0.13
<b>No. muestra</b>	<b>40</b>	<b>41</b>	<b>41.1</b>	<b>42</b>	<b>42.1</b>	<b>43</b>	<b>43.1</b>	<b>44</b>	<b>44.1</b>	<b>45</b>	<b>45.1</b>
Concentración (ng/ $\mu$ L)	82 0. 4	540.6	310.6	113.1	104.7	114.6	31.5	10	9.5	368. 7	291
260/280	2. 01	2.01	1.97	1.97	1.9	1.92	2.08	1.75	3.06	2.02	1.99
260/230	1. 89	0.26	1.34	1.15	1.06	0.91	0.29	0.11	0.02	1.45	1.64
<b>No. muestra</b>	<b>46</b>	<b>46.1</b>	<b>47</b>	<b>47.1</b>	<b>48</b>	<b>48.1</b>	<b>49</b>	<b>49.1</b>	<b>50</b>	<b>50.1</b>	<b>51</b>
Concentración (ng/ $\mu$ L)	21 9.	232.6	114.2	134. 9	128.2	102.1	11.4	13.4	15.7 5	13	12.1 5

	1										
260/280	1.96	1.95	1.89	1.86	1.95	1.96	1.7	1.94	1.68	1.9	1.64
260/230	1.13	1.45	1.21	1.45	1.17	0.29	0.07	0.17	0.5	0.85	0.31
<b>No. muestra</b>	<b>51</b>	<b>52</b>	<b>52.1</b>	<b>53</b>	<b>53.1</b>	<b>54</b>	<b>54.1</b>	<b>55</b>	<b>55.1</b>	<b>56</b>	<b>56.1</b>
Concentración (ng/ $\mu$ L)	9.6	132.1	128.9	23.2	16.5	172.5	197.6	111	108.8	175.8	173.6
260/280	1.62	2.02	1.98	1.58	1.46	1.92	1.87	1.93	1.95	1.99	1.98
260/230	0.13	0.22	0.44	0.5	0.94	1.25	1.43	1.2	0.43	0.76	0.69
<b>No. muestra</b>	<b>57</b>	<b>57.1</b>	<b>58</b>	<b>58.1</b>	<b>59</b>	<b>59.1</b>	<b>60</b>	<b>60.1</b>	<b>61</b>	<b>62</b>	<b>63</b>
Concentración (ng/ $\mu$ L)	92.4	54.7	18.2	46.6	167.6	114.1	137.2	135.4	339.5	190.1	201.5
260/280	1.95	1.93	2.62	1.93	1.88	1.92	2.1	1.92	2.02	1.93	1.93
260/230	0.55	1.11	0.97	0.94	0.47	0.14	1.43	0.74	0.62	1.24	0.51
<b>No. muestra</b>	<b>64</b>	<b>64.1</b>	<b>65</b>	<b>66</b>	<b>67</b>	<b>67.1</b>	<b>68</b>	<b>69</b>			
Concentración (ng/ $\mu$ L)	62.5	140.2	5.05	556.55	57.65	504.1	311.7	470.1			
260/280	2	1.92	2.01	2.01	2.02	2.02	2.02	2.01			
260/230	0.14	0.27	0.03	1.86	0.21	0.71	0.96	1.11			

La figura 5, es una imagen representativa de un gel de agarosa, donde se muestra la integridad del ARN obtenido a partir de las muestras indicadas en la tabla 7. Debido a que el tejido es procesado para su inclusión en parafina, el material genético que se obtiene, pierde sus características, en el gel se busca que genere al menos una banda bien definida.



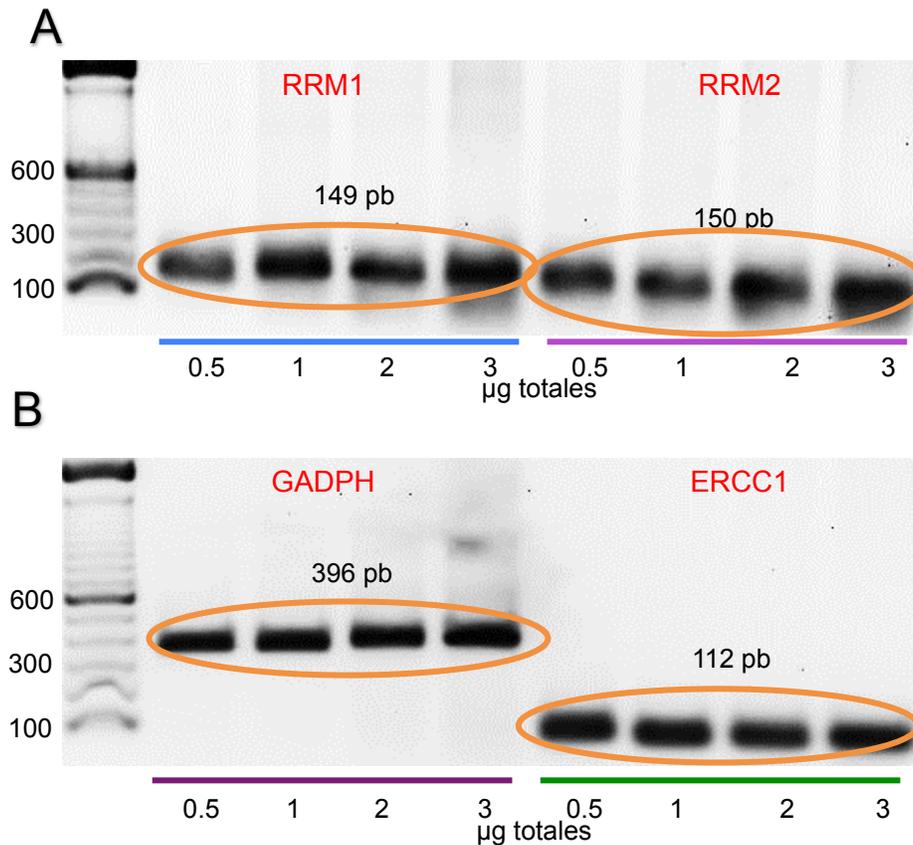
**Figura 5. Integridad de ARN proveniente de tejido tumoral.**

Los carriles están indicados con el número de muestra correspondiente.

### VI. 3. Análisis de expresión en líneas celulares

El análisis de expresión de los genes en las líneas celulares, se realizó de acuerdo al protocolo para PCR descrito en la sección de materiales y métodos. El análisis de la expresión de ERCC1, RRM-1 y -2, se estandarizó con la línea celular A549; mientras que la estandarización de la expresión de hENT1 se analizó en la línea MSTO-211. En la figura 6, se presenta una imagen representativa con los productos obtenidos del PCR, la PCR se realizó a concentraciones crecientes de ARN total; para el corrimiento electroforético se corrió la misma concentración por carril. En el panel superior se muestran los resultados de amplificación para RRM1 Y RRM2 (Fig. 6A); mientras que en el panel inferior se muestra el producto obtenido para ERCC1; además del producto de amplificación de GADPH, el cual utilizamos como gen constitutivo en nuestras reacciones [secuencia de GADPH, FW- 5'CCC CTT CAT TGA CCT CAA CT 3'; RV- 5' TTG TCA TGG ATG ACC TTG GC 3' ] (Fig. 6B).

En la figura 6 A-B, se señala con elipses en color amarillo las bandas correspondientes a la amplificación de cada gen. Las bandas corresponden a los tamaños esperados, para cada uno de los genes 150 pb para ERCC1, 396 pb para GADPH, 149 pb y 112pb para RRM1 y para RRM2, respectivamente. Como puede observarse en la figura, las bandas obtenidas corresponden a los pesos supuestos, de acuerdo al diseño de primers, para cada gen analizado.



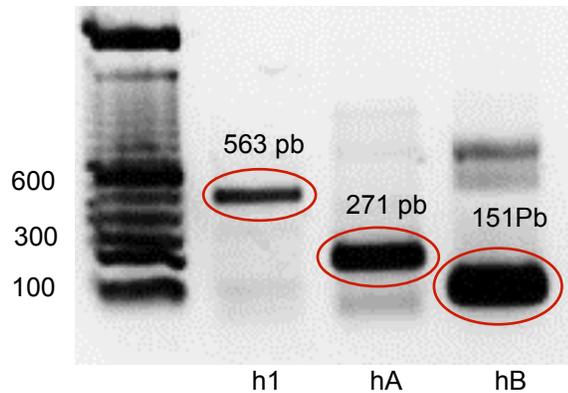
**Figura 6. Expresión de los cuatro genes en ARN de la línea celular A549.**

En el panel superior A) se muestra la expresión de RRM1 y RRM2; mientras que en el inferior B) se muestra la expresión de ERCC1 y GADPH (señalados con la elipse), obtenido a partir de muestras de ARN proveniente de la línea celular A549. Al calce de los carriles se muestra la cantidad total de ARN que se colocó para hacer la PCR.

Particularmente, la secuencia del gen de hENT-1 mostró una mayor región conservada, por lo que se diseñaron tres juegos de primers. Todos los pares de primers se utilizaron durante la estandarización de la expresión del gen con la línea celular MSTO-211. En la tabla 8, se presenta la secuencia y el tamaño esperado de los productos, para cada uno de los tres pares de primers.

Tabla 8. Secuencias genéticas utilizadas en los primers de hENT1		
Gen	Secuencia	Producto (pb)
Fw-hENT1 (h1)	5' ATG CTG CCC CTG CTG TTA TT 3'	563
Rv- hENT1 (h1)	5' GTG GGC TGA GAG TTG GAG AC 3'	563
Fw-hENT1 (hA)	5' AAA GGA GAG GAG CCA AGA GC 3'	271
Rv-hENT1 (hA)	5'GGC CCA ACC AGT CAA AGA TA 3	271
Fw-hENT1 (hB)	5' TCT CCA ACT CTC AGC CCA CCA A 3'	151
Rv-hENT1 (hB)	5' CCT GCG ATG CTG GAC TTG ACC T 3'	151
Fw, forward; Rv, reverse; pb, pares de bases		

En la Figura 7, se muestran los productos obtenidos de tres pares de primers, se observan tres bandas que corresponden con el tamaño esperado (ver tabla 8), el ARN total en cada una de las reacciones fue de 1 µg. Los resultados revelados con el gen muestran que independientemente del par de primers seleccionados, éstos amplifican; sin embargo, consideramos que el tercer par, el cual amplifica un producto de aproximadamente 151 pb y genera una banda más abundante, apoyaría mayormente el análisis de expresión de hENT-1 en muestras de pacientes, realizado en el presente trabajo.



**Figura 7. Expresión de hENT1 a partir de ARN de células MSTO-211.**

Se diseñaron tres pares de primers para la identificación de hENT-1. Los productos obtenidos se indican como: h1, hA, hB

#### **VI. 4. Análisis de expresión en tejido tumoral de pacientes con MPM**

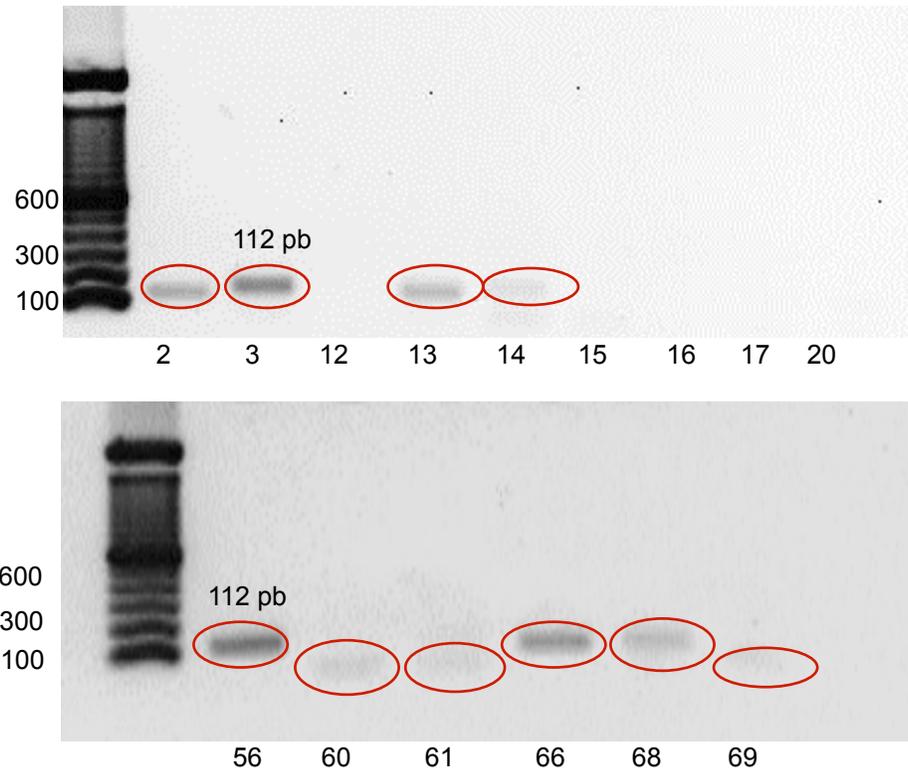
El análisis de expresión de los genes, se realizó de acuerdo a la presencia o ausencia de bandas características, en los tamaños esperados para cada gen y de acuerdo al protocolo descrito en la sección de materiales y métodos. Debido a que no logramos observar una diferencia significativa, en la expresión de los genes blanco (ERCC1, RRM1, RRM2, hENT-1) y el gen constitutivo, etiquetamos las muestras indicando presencia o ausencia, como se muestra en la tabla 9.

Imágenes representativas de los geles mostrando las bandas obtenidas, de los productos amplificados se presentan en las figuras 8 – 11. Los productos que amplificaron para cada par de primers están señaladas con una elipse, los carriles que están marcados con un asterisco denotan aquellas muestras, en donde no amplificaron (Fig. 8 – 11). Al calce de cada carril, se indica el número correspondiente a las muestras de tejido tumoral indicado en la tabla 7. La

expresión de ERCC1 se muestra en la figura 8, y la expresión de RRM1 y RRM2 en las figuras 9 y 10, respectivamente.

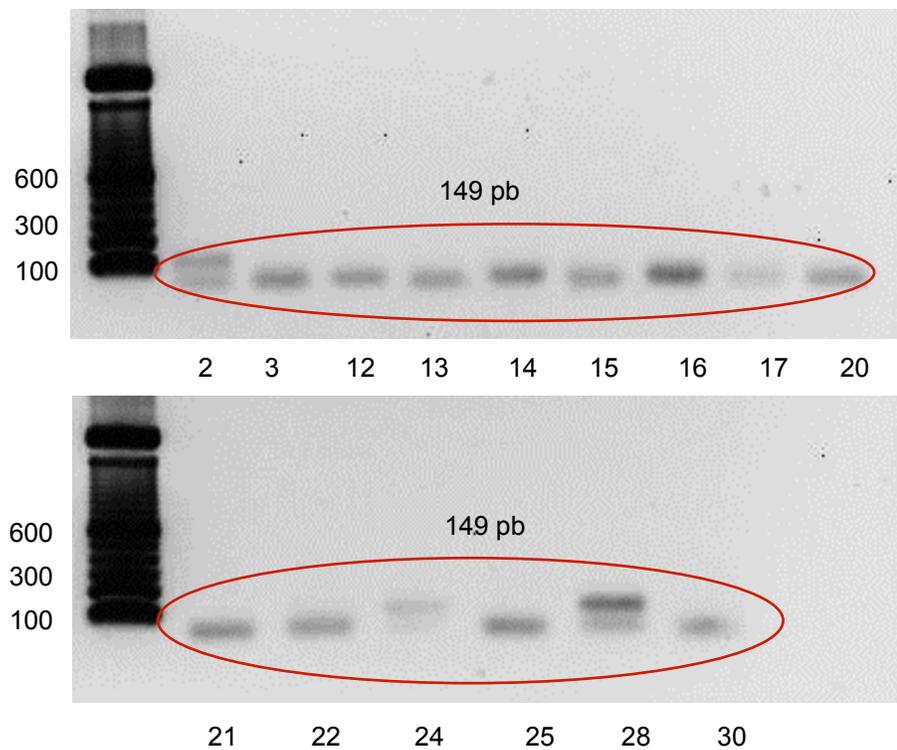
<b>Tabla 9. Resultados de análisis de expresión de los genes en muestras de pacientes con MPM.</b>		
<b>Gen</b>	<b>n/47</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b>ERCC1</b>		
<b>Presente</b>	30	63.8
<b>Ausente</b>	11	23.4
<b>No Valorable</b>	6	12.8
<b>hENT-1</b>		
<b>Presente</b>	47	100
<b>Ausente</b>	0	0
<b>No Valorable</b>	0	0
<b>RRM1</b>		
<b>Presente</b>	39	83.0
<b>Ausente</b>	0	0
<b>No Valorable</b>	8	17.0
<b>RRM2</b>		
<b>Presente</b>	39	83.0
<b>Ausente</b>	0	0
<b>No Valorable</b>	8	17.0

Particularmente, en el análisis de expresión de hENT-1, todas las muestras dieron una expresión positiva. En la figura 11, se pueden observar los resultados de expresión de este gen, los números de las muestras están señaladas al calce de los carriles, y aunque existen bandas con un “aparente” mayor nivel de expresión, comparadas con las bandas adyacentes; debido a las condiciones metodológicas no pudimos cuantificar las diferencias de expresión por muestra.



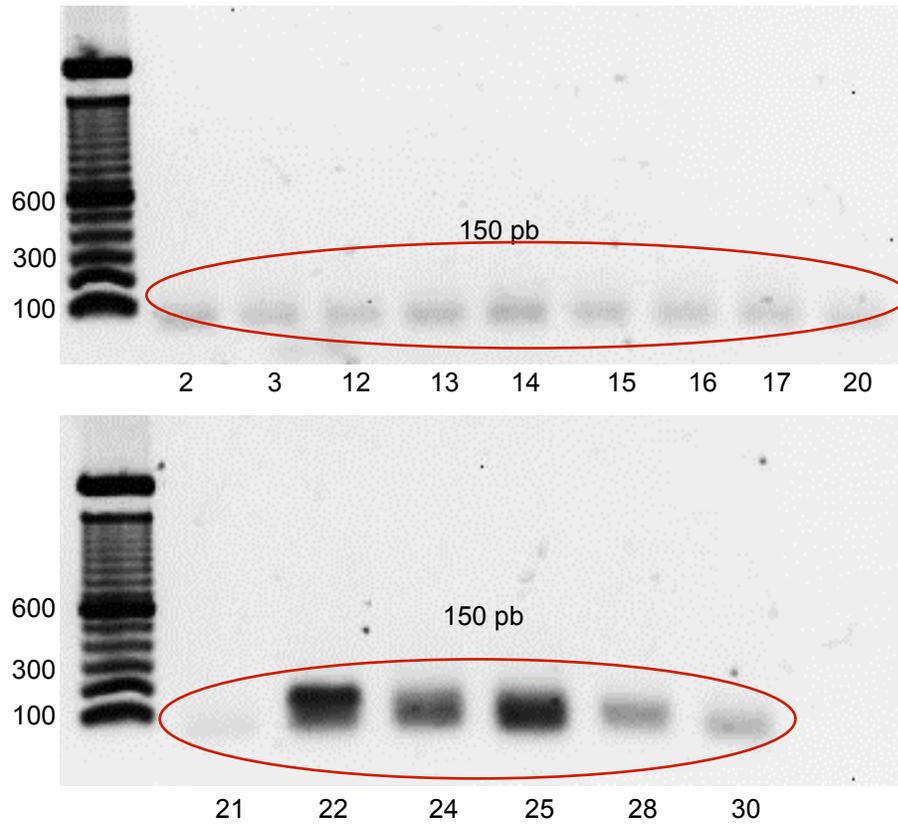
**Figura 8. Expresión de ERCC1 en muestras de tejido tumoral.**

Imágenes representativas de los productos de PCR para ERCC1, en muestras de pacientes.



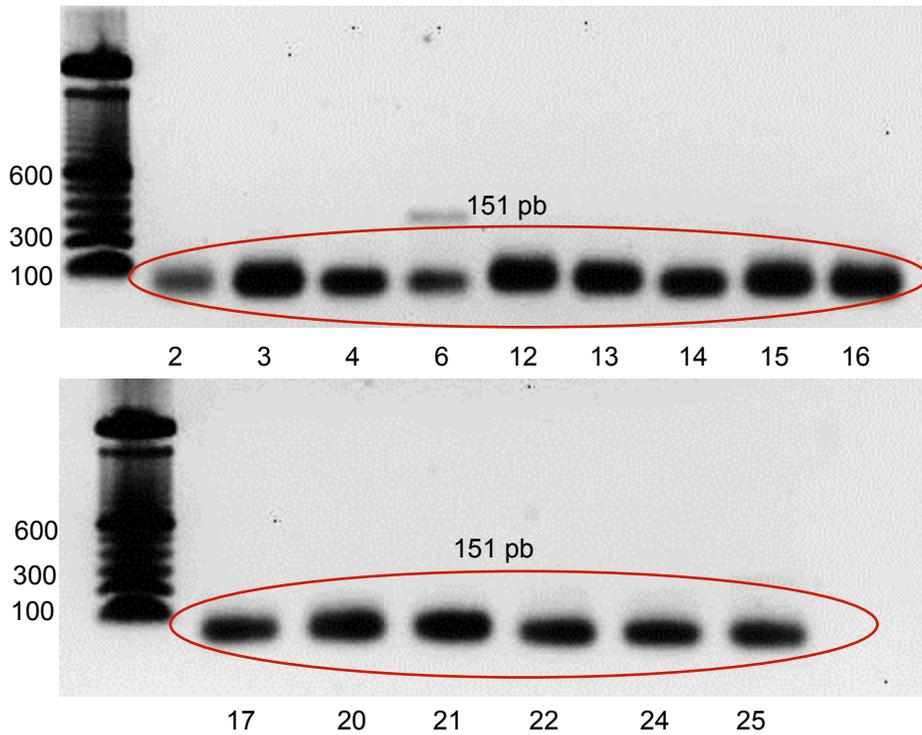
**Figura 9. Expresión de RMM1 en muestras de tejido tumoral.**

Imágenes representativas de los productos de PCR de 15 muestras de pacientes, en todos los carriles se observan bandas oscuras en el tamaño esperado. Los números al calce de los carriles, indican el número de muestra.



**Figura 10. Expresión de RMM2 en muestras de tejido tumoral.**

Imágenes representativas de los productos de PCR de 15 muestras de pacientes, en todos los carriles se observan bandas en el tamaño esperado. Los números al calce de los carriles, indican el número de muestra.



**Figura 11. Expresión de hENT1 en muestras de tejido tumoral.**

Imágenes representativas de los productos de PCR de 15 muestras de pacientes, en todos los carriles se observan bandas en el tamaño esperado. Los números al calce de los carriles, indican el número de muestra.

## **VI. 5. Validación de la expresión de genes en las muestras de MPM por el método de secuenciación tipo Sanger**

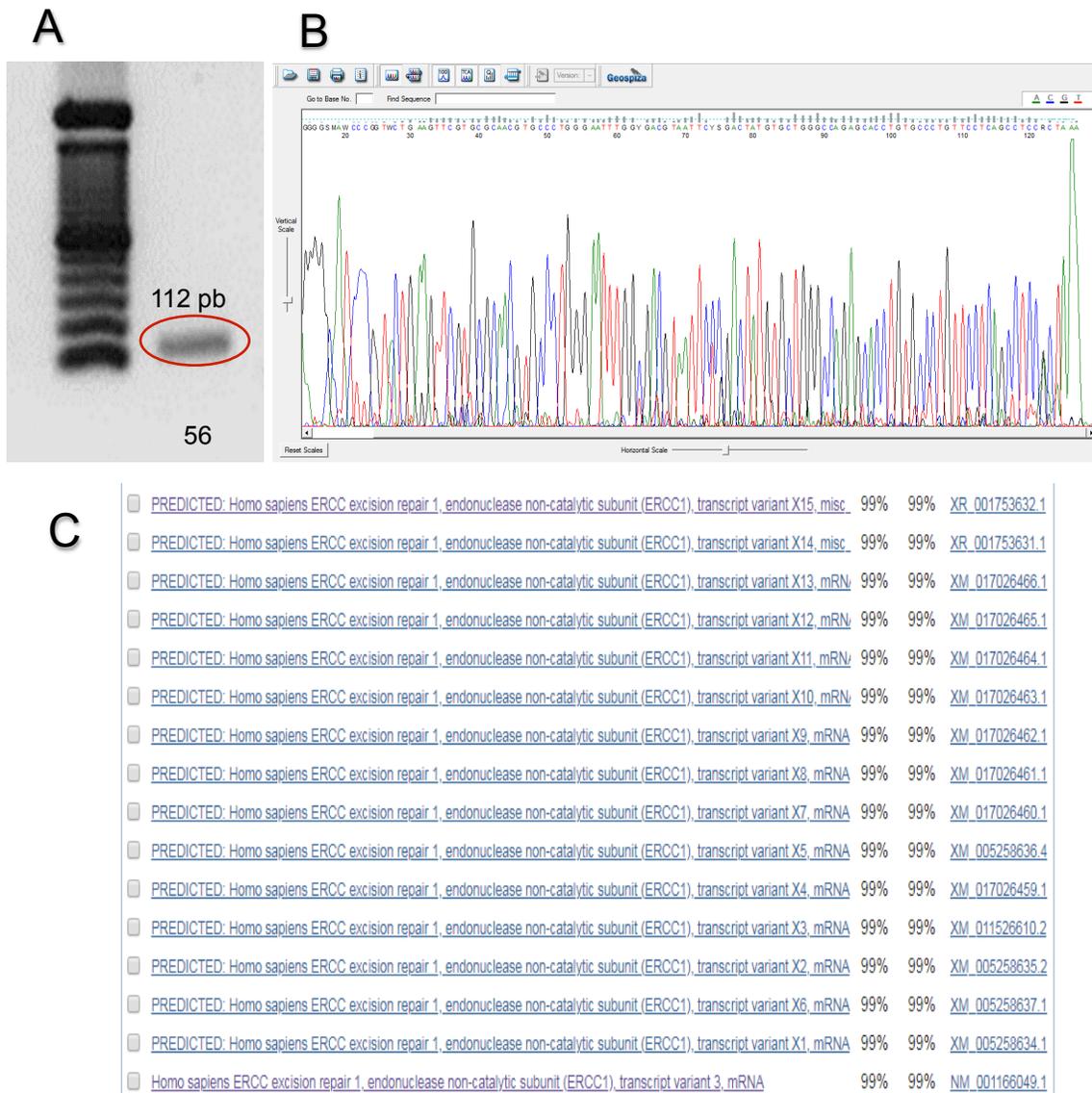
Con el fin de validar los productos obtenidos mediante la técnica de PCR punto final, un total de 5 muestras que dieron bandas del tamaño esperado para cada gen, se secuenciaron. Las muestras secuenciadas, fueron enviadas pareando el producto de PCR obtenido y el producto purificado a partir del gel. Brevemente, después de analizar en el transiluminador la presencia de los productos esperados, la banda correspondiente a una muestra positiva se cortó, se purificó

mediante el kit de extracción minelute gel (Qiagen, cat. 28606) y se cuantificó en nanodrop 2000. Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el software Finch TV Version 1.5.0 (2004 – 2012, Geopiza Inc.), éstas se compararon con la secuencia reportada en la base de datos del NCBI, mediante un BLAST. De acuerdo al análisis en el BLAST, los productos obtenidos concordaron con el gen blanco (ERCC1, RRM1, RRM2, hENT-1), es decir, se encontró una correlación del 100% de muestras positivas. En la Figura 12, se ejemplifica el proceso de validación, mediante un conjunto de eventos representativos de los genes. En la figura 12-A, panel superior izquierdo se presenta una imagen de una banda, la cual corresponde a una de las muestras extrídas del gen y enviadas a secuenciar, en el panel superior derecho (Fig. 12B) se presenta la secuencia obtenida mediante el método tipo Sanger; y en el panel inferior (Fig. 12C) una impresión de pantalla del “blasteo” realizado, la figura corresponde a la muestra 56 (tomada de manera aleatoria) en el análisis de expresión del gen ERCC1.

#### **VI. 6. Asociación entre la expresión de genes y la respuesta a tratamiento.**

El análisis de asociación entre la expresión de genes y la respuesta a tratamiento se realizó, exclusivamente para el gen de ERCC1. El análisis de asociación no fue posible realizarlo para los genes de RRM1, RRM2 y hENT-1, debido a que la expresión fue en el 100% de las muestras. ERCC1 se asoció a una mayor sobrevida libre de progresión en los pacientes que recibieron gemcitabina/cisplatino como primera línea de tratamiento 13.12 meses vs 9.9 meses,  $p=0.039$ , IC 95%.

La media de la SLP fue de 14.1 meses (9.89 – 18.42 meses) y la media de la Sobrevida Global fue de 34.3 meses (29.60 - 39.17 meses).



**Figura 11. Análisis de secuenciación por Sanger de las muestras de pacientes.** Resultados representativos obtenidos por secuenciación de las muestras de MPM. En A) se presenta el producto de PCR de la muestra no. 56, correspondiente a la expresión de ERCC1; en B) el Cromatograma de la secuencia obtenido por secuenciación tipo Sanger y en C) el Blasteo de los nucleótidos obtenidos.

## CAPITULO VII

### DISCUSIÓN

El MPM es una neoplasia muy agresiva y de muy pobre pronóstico<sup>1-3</sup>, debido principalmente a su diagnóstico tardío. Algunos grupos de trabajo han intentado mostrar la utilidad de diferentes moléculas como biomarcadores de pronóstico o de respuesta a la terapia; sin embargo, hoy en día no existe un consenso sobre las moléculas que tendrían aplicación clínica. En este trabajo se analizó la expresión de cuatro genes relacionados con la respuesta al tratamiento basado en gemcitabina/cisplatino, ERCC1, RRM1, RRM2 y hENT1. Mediante el uso de técnicas como inmunohistoquímica y qRT-PCR, se ha analizado la relación entre la expresión de ERCC1 y la SG y la respuesta al tratamiento en pacientes CPCNP<sup>37,38</sup>. En un estudio utilizando RNA extraído de tejido embebido en parafina, los autores no encontraron una relación entre el nivel de expresión del mRNA y los resultados clínicos, ni con la supervivencia global media<sup>37</sup>. El grupo de Zhao et. al. analizó la expresión de ERCC1 por qRT-PCR, a partir de muestras de tejido fresco, y encontraron que los pacientes presentan una menor respuesta al tratamiento cuando el gen está sobreexpresado; aumentando el riesgo de progresión de la enfermedad y muerte<sup>38</sup>.

Por otro lado, estudios realizados en pacientes con MPM, analizando la expresión proteica de estos marcadores, mediante la técnica de inmunohistoquímica<sup>30</sup>, encontraron que la baja expresión de ERCC1 se asocia a una mayor supervivencia libre de recurrencia; sin embargo, no se confirmó de forma estadística<sup>30</sup>. De manera similar, Kao et. al., 2013, determinaron que una alta expresión de ERCC1

está asociada a una mayor sobrevida<sup>48</sup>; dichos resultados estuvieron en oposición a lo reportado por Cihan et. al., 2014, donde la expresión negativa de ERCC1 se asocia a una mayor SLP y SG<sup>46</sup>. En pacientes con MPM los resultados siguen siendo contradictorios, haciendo difícil establecer un papel preciso para ERCC1 como biomarcador pronóstico o de respuesta. Con los datos obtenidos en este estudio, pudimos determinar que ERCC1 está asociado a mejor tiempo de sobrevida libre de progresión (SLP) en pacientes con MPM en estadio avanzado bajo un tratamiento basado en gemcitabina.

Estudios con pacientes con diagnóstico de CPCNP donde se ha analizado la expresión de RRM1 se observó que una baja expresión se asocia a un mejor pronóstico, en pacientes bajo un régimen de gemcitabina/platino<sup>30</sup>. En el año 2014, se publicó en un estudio en pacientes con NSCLC, que una baja expresión de RRM1 analizado por RT-PCR, correlaciona con un aumento en la SLP y sobrevida global (SG) media, así como en la respuesta al tratamiento<sup>35</sup>. Por otra parte, pacientes con MPM bajo tratamiento con vinorelbine-cisplatino presentaron una mayor tasa de sobrevida, cuando la expresión de RRM1 era baja<sup>31</sup>. De forma contradictoria, en otro estudio realizado en 2015, se mostró que una alta expresión de RRM1 se asocia a una mayor sobrevida libre de recurrencia y mayor SG, principalmente en pacientes tratados con gemcitabina/platino<sup>30</sup>. Dicho estudio resulta interesante debido a que los reportes previos muestran que una elevada expresión de RRM1 se asocia con resistencia al tratamiento con gemcitabina<sup>29</sup>. Los estudios de expresión de RRM2 en pacientes con cáncer adrenocortical, cáncer ovárico y CPCNP, han mostrado que el tratamiento con gemcitabina induce un aumento en la expresión de RRM2; y esto se relaciona con la resistencia al

tratamiento<sup>36</sup>. Además, se ha observado que una sobreexpresión se asocia con una menor SG media y un mayor riesgo de muerte<sup>39</sup>. Otros estudios han relacionado la expresión de RRM2 con la capacidad de las células de invadir, angiogénesis tumoral y metástasis, lo que sugiere que una sobreexpresión de RRM2 induce una rápida progresión de la enfermedad<sup>37</sup>. De acuerdo a nuestros resultados, ambas subunidades de la ribonucleótido reductasa, RRM1 y RRM2, estuvieron presentes en todas las muestras de pacientes analizadas, por lo que no se logró observar una asociación con la respuesta a tratamiento. Sin embargo, en estudios realizados por nuestro grupo se ha podido describir que la sobreexpresión de la subunidad M1, analizada por inmunohistoquímica, está asociada un mayor tiempo de SLP (datos no mostrados), en pacientes con MPM en estadios avanzados y bajo un régimen de cisplatino/gemcitabina en infusión continua.

En estudios realizados con pacientes con cáncer ovárico, así como, en los estudios con pacientes de CPCNP y cáncer pancreático, se reportó que hay una mayor respuesta al tratamiento con gemcitabina cuando hENT1 se expresa<sup>39,42</sup>. Esto se asocia principalmente a que la presencia de hENT1 facilita el transporte y absorción de la gemcitabina que es un análogo de nucleósido. En este estudio, similar a lo observado con RRM1 y RRM2, el transportador de nucleosidos. hENT1 se encontró expresado en el total de las muestras analizadas, por lo que no fue posible analizar su relación con la respuesta a tratamiento. Sin embargo, es muy probable que los tiempos de sobrevida y las respuestas observadas en nuestra población de estudio, se relacionen a la presencia de estos genes y su traducción a proteína. Lo que sugiere que los pacientes de MPM poseen un sistema de

transporte eficaz, favoreciendo el metabolismo de la gemcitabina y generando una mejor respuesta.

## **CAPITULO VIII**

### **CONCLUSIÓN**

En el presente trabajo se determinó la expresión de ERCC1, RRM1, RRM2 y hENT1 en muestras de tejido tumoral de pacientes con MPM en estadios avanzados. Se encontró asociación entre la presencia de ERCC1 y la sobrevida libre de progresión (SLP) en pacientes que recibieron gemcitabina/cisplatino como terapia de primera línea, lo que confirmaría el papel pronóstico de este gen en la respuesta al tratamiento.

## **CAPITULO IX**

### **PERSPECTIVAS**

1. Determinar mediante PCR en tiempo real la expresión de los marcadores para establecer diferencias entre las muestras y una probable relación, entre la expresión y la respuesta al tratamiento con gemcitabina/cisplatino.
2. Analizar la expresión proteica de los mismos marcadores, y la respuesta al tratamiento con gemcitabina/cisplatino en pacientes con MPM.
3. Establecer un panel de expresión de genes y proteínas como biomarcadores de respuesta al tratamiento.
4. Llevar a la práctica clínica el análisis de estos 4 biomarcadores, en pacientes con MPM avanzado, como apoyo en el pronóstico de respuesta a la terapia

## CAPITULO X

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arrieta O, Domínguez LM, Jiménez E, Calderillo R, Blanco C, Corona JF, Padilla A. Neoplasias de la pleura y el mediastino. En: Mendoza CA, editor. Oncología y cirugía bases y principios. México: El manual moderno; 2013 p. 327-331
2. Davidson B. Pronostic factors in malignant pleural mesothelioma. *Hum Pathol.* 2015 Jun;46(6):789-804
3. Liu H, Wu L, Ji K, Wang W. Prognostic value of several biomarkers for the patients with malignant pleural mesothelioma. *Tumour Biol.* 2015 Sep;36(10):7375-84.
4. Gopar-Nieto R, Aguilar-Madrid G, Sotelo-Martínez L, et al. Malignant Pleural Mesothelioma: Accuracy of CT Against Immunohistochemical Test Among the Mexican Population. *Arch Med Res.* 2015 Feb;46(2):107-11.
5. Carbone M, Ly BH, Dodson RF, et al. Malignant Mesothelioma: Facts, Myths and Hypotheses. *J Cell Physiol.* 2012 Jan;227(1):44-58.
6. Stayner L, Welch LS, Lemen R. The worldwide pandemic of asbestos-related diseases. *Annu Rev Public Health.* 2013; 34: 205-16.
7. Aguilar-Madrid, G., Robles-Pérez, E., Juárez-Pérez, C. A., Alvarado-Cabrero, I., Rico-Méndez, F. G. and Javier, K.-G. Case-control study of pleural mesothelioma in workers with social security in Mexico. *Am. J. Ind. Med.* 2010; 53: 241-251.

8. Ai J, Stevenson JP. Current Issues in Malignant Pleural Mesothelioma Evaluation and Management. *Oncologist*. 2014 Sep; 19:975–984.
9. Galateau-Salle F, Churg A, Roggli V, Travis WD; World Health Organization Committee for Tumors of the Pleura. The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Pleura: Advances since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*. 2016 Feb;11 (2):142-54.
10. Ferrante D, Mirabelli D, Tunesi S, Terracini B, Magnani C. Pleural mesothelioma and occupational and non-occupational asbestos exposure: a case-control study with quantitative risk assessment. *Occup Environ Med*. 2016 Mar;73(3):147-53.
11. Robinson BM. Malignant pleural mesothelioma: an epidemiological perspective. *Ann Cardiothorac Surg*. 2012 Nov;1(4):491-6.
12. Metz-Flamant C, Guseva Canu I, Laurier D. Malignant pleural mesothelioma risk among nuclear workers: a review. *J Radiol Prot*. 2011 Mar;31(1):9-23.
13. Tward JD et al. The risk of secondary malignancies over 30 years after the treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*. 2006 Jul 1;107(1):108-15.
14. Goodman JE, Nascarella MA, Valberg PA. Ionizing radiation: a risk factor for mesothelioma. *Cancer Causes Control*. 2009 Oct;20 (8):1237-54.
15. Weiner SJ, Neragi-Miandoab S. Pathogenesis of malignant pleural mesothelioma and the role of environmental and genetic factors. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009 Jan; 135(1):15-27.
16. Jaurand MC, Fleury-Feith J. Pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. *Respirology*. 2005 Jan; 10 (1):2-8.

17. Bocchetta M, Di Resta I, Powers A et. al. Human mesothelial cells are unusually susceptible to simian virus 40-mediated transformation and asbestos cocarcinogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 29;97(18):10214-9.
18. Bibby Ac, Tsim S, Kanellakis N et. al. Malignant pleural mesothelioma: an update on investigation, diagnosis and treatment. *Eur Respir*. 2016; 25: 472–486.
19. Cedrés Pérez SM. Análisis de la expresión de PD-L1 en una serie de pacientes con mesotelioma pleural maligno [tesis doctoral en Internet]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 2014 [citada Abr 2017]. 184p. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10803/285157>
20. Arrieta, O., López-Macías, D., Mendoza-García, VO. et al. A phase II trial of prolonged, continuous infusion of low-dose gemcitabine plus cisplatin in patients with advanced malignant pleural mesothelioma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014 May;73 (5):975-82.
21. Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol*. 2006 May; 17 Suppl 5:v7-12.
22. Dilruba S, Kalayda GV. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016 Jun; 77 (6):1103-24.
23. Yang T, Chen M, Chen T, Thakur A. Expression of the copper transporters hCtr1, ATP7A and ATP7B is associated with the response to chemotherapy and survival time in patients with resected non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2015 Oct;10(4):2584-2590.

24. Takeda T, Itano H, Fukita S, Saitoh M, Takeda S. Long progression-free survival by pemetrexed continuation maintenance therapy following cisplatin-based chemotherapy in malignant pleural mesothelioma. *Intern Med.* 2014;53 (20):2347-51.
25. Chen CY, Chang YL, Shih JY et. al. Thymidylate synthase and dihydrofolate reductase expression in non-small cell lung carcinoma: the association with treatment efficacy of pemetrexed. *Lung Cancer.* 2011 Oct;74(1):132-8.
26. Sun JM, Han J, Ahn JS, Park K, Ahn MJ Significance of thymidylate synthase and thyroid transcription factor 1 expression in patients with nonsquamous non-small cell lung cancer treated with pemetrexed-based chemotherapy. *J Thorac Oncol.* 2011 Aug;6(8):1392-9.
27. Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J et. al. Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol.* 2003 Jul 15;21(14):2636-44
28. David L. Nelson, Michael M. Cox. *Lehninger Principios de Bioquímica.* 5<sup>a</sup> ed. España: Ediciones Omega. 2009
29. Aye Y, Li M, Long MJ, Weiss RS. Ribonucleotide reductase and cancer: biological mechanisms and targeted therapies. *Oncogene.* 2015 Apr 16; 34(16):2011-21.
30. Frischknecht L, Meerang M, Soltermann A, et. Al. Importance of excision repair cross-complementation group 1 and ribonucleotide reductase M1 as prognostic biomarkers in malignant pleural mesothelioma treated with

- platinum-based induction chemotherapy followed by surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2015 Jun; 149 (6):1539-46.e1.
31. Zimling ZG, Santoni-Rugiu E, Bech C, Sørensen JB. High RRM1 Expression Is Associated with Adverse Outcome in Patients with Cisplatin/Vinorelbine-treated Malignant Pleural Mesothelioma. *Anticancer Res.* 2015 Dec;35(12):6731-8.
32. Rosell R, Felip E, Taron M et. al. Gene expression as a predictive marker of outcome in stage IIB-IIIA-IIIB non-small cell lung cancer after induction gemcitabine-based chemotherapy followed by resectional surgery. *Clin Cancer Res.* 2004 Jun 15;10(12 Pt 2):4215s-4219s.
33. Rosell R, Scagliotti G, Danenberg KD et. al. Transcripts in pretreatment biopsies from a three-arm randomized trial in metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncogene.* 2003 Jun 5;22(23):3548-53.
34. Dong X, Hao Y, Wei Y et. al. Response to first-line chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer according to RRM1 expression. *PLoS One.* 2014 Mar 19;9(3):e92320.
35. Wang L, Meng L, Wang XW, Ma GY, Chen JH. Expression of RRM1 and RRM2 as a novel prognostic marker in advanced non-small cell lung cancer receiving chemotherapy. *Tumour Biol.* 2014 Mar; 35 (3):1899-906.
36. Grolmusz VK, Karászi K, Micsik T, et. Al. Cell cycle dependent RRM2 may serve as proliferation marker and pharmaceutical target in adrenocortical cancer. *Am J Cancer Res.* 2016 Sep 1; 6 (9):2041-2053.
37. Grossi F, Dal Bello MG, Salvi S, et. Al. Expression of Ribonucleotide Reductase Subunit-2 and Thymidylate Synthase Correlates with Poor

- Prognosis in Patients with Resected Stages I-III Non-Small Cell Lung Cancer. *Dis Markers*. 2015; 2015:302649.
38. Zhao H, Zhang H, Du Y, Gu X. Prognostic significance of BRCA1, ERCC1, RRM1, and RRM2 in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving chemotherapy. *Tumour Biol*. 2014 Dec;35(12):12679-88.
39. Ferrandina G, Mey V, Nannizzi S, Ricciardi S, et. Al. Expression of nucleoside transporters, deoxycytidine kinase, ribonucleotide reductase regulatory subunits, and gemcitabine catabolic enzymes in primary ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010 Mar; 65 (4):679-86.
40. Gil A, Sanchez F. editores. *Tratado de nutrición 2ª ed. Vol. 1 Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*. España. Medica Panamericana;2010. p 552-553.
41. Huang W, Zeng X, Shi Y, Liu M. Functional characterization of human equilibrative nucleoside transporter 1. *Protein Cell*. 2017 Apr;8(4):284-295.
42. Pastor-Anglada M, Pérez-Torras S. Nucleoside transporter proteins as biomarkers of drug responsiveness and drug targets. *Front Pharmacol*. 2015 Feb 10; 6: 13.
43. Yao SY, Ng AM, Cass CE, Baldwin SA, Young JD. Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *J Biol Chem*. 2011 Sep 16;286(37):32552-62.
44. Oguri T1, Achiwa H, Muramatsu H et. al. The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 expression predicts nonresponse to gemcitabine-containing chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett*. 2007 Oct 18;256(1):112-9.

45. Herráez A. Texto ilustrado e interactivo de biología molecular e ingeniería genética. 2ª ed. España. Elsevier. 2012
46. Cihan YB, Ozturk A, Arslan A, et. Al. ERCC1 as a biological marker guiding management in malignant pleural mesothelioma. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(10):4117-23
47. Walter RF, Vollbrecht C, Werner R, et. Al. Screening of Pleural Mesotheliomas for DNA-damage Repair Players by Digital Gene Expression Analysis Can Enhance Clinical Management of Patients Receiving Platin-Based Chemotherapy. J Cancer. 2016 Sep 13;7(13):1915-1925
48. Kao SC, Lee K, Klebe S, et. Al. Excision repair cross complementation group 1 and thymidylate synthase expression in patients with mesothelioma. Clin Lung Cancer. 2013 Mar;14 (2):164-71.

## CAPITULO XI

### ANEXOS

#### Anexo 1. Lista de abreviaturas

MPM	Mesotelioma Pleural Maligno
CPCNP	Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas
dFdCMP	Gemcitabina Monofosfato
dFdCDP	Gemcitabina Difosfato
dFdCTP	Gemcitabina Trifosfato
dCK	desoxicitidina quinasa
dCTP	desoxicitidina Trifosfato
TS	Timidilato sintasa
DHFR	Dihidrofolato Reductasa
CTR	Transportador de Cobre
RR	Ribonucleótido Reductasa
NER	Nucleotide Excision Repair
RRM1	Ribonucleótido Reductasa subunidad M1
RRM2	Ribonucleótido Reductasa subunidad M2
ERCC1	Excision Repair Cross-Complementation group 1 (en Ingles)
hENT	Transportador de Nucleósidos Equilibrado
hCNT	Transportador de Nucleósidos Concentrado
SG	Sobrevida Global
SLP	Sobrevida Libre de Progresión
FDA	Food and Drug Administration (en Ingles)

## Anexo 2. Lista de figuras

No. figura	Descripción	Pág.
<b>Marco teórico</b>		
1	Estructura del Cisplatino	10
2	Estructura del Pemetrexed	12
3	Estructura de la Gemcitabina	14
<b>Resultados</b>		
4	Integridad del ARN obtenido de células	35
5	Integridad de ARN proveniente de tejido tumoral	37
6	Expresión de los cuatro genes en ARN de la línea celular A549	39
7	Expresión de hENT1 a partir de ARN de células MSTO-211	41
8	Expresión de ERCC1 en muestras de tejido tumoral	43
9	Expresión de RRM1 en muestras tejido tumoral	44
10	Expresión de RRM2 en muestras tejido tumoral	45
11	Expresión de hENT1 en muestras tejido tumoral	46
12	Análisis de secuenciación por Sanger de las muestras de pacientes	48

### Anexo 3. Lista de tablas

<b>Tabla No.</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
<b>Marco teórico</b>		
1	Definición del tumor y de las metástasis en MPM, AJCC 2010.	8
2	Etapas clínicas basadas en el sistema TNM, de acuerdo con la AJCC 2010.	9
<b>Metodología</b>		
3	Secuencias genéticas utilizadas en los primers	29
4	Condiciones generales para PCR de los genes	30
<b>Resultados</b>		
5	Características generales de los pacientes con MPM	33
6	Concentración de ARN de cultivos celulares	34
7	Concentración y pureza de ARN obtenido de biopsias de pacientes	36
8	Secuencias genéticas utilizadas en los primers de hENT1	40
9	Resultados de análisis de expresión de los genes en muestras de pacientes con MPM	42

## Anexo 4. Protocolo de extracción DNA/RNA

### AllPrep<sup>®</sup> DNA/RNA FFPE Kit, Part 1

The AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (cat. no. 80234) can be stored for at least 9 months: buffers at room temperature (15–25°C); other components at 2–8°C.

#### Further information

- AllPrep DNA/RNA FFPE Handbook: [www.qiagen.com/handbooks](http://www.qiagen.com/handbooks)
- Safety Data Sheets: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)
- Technical assistance: toll-free 00800-22-44-6000, or [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact)

#### Notes before starting

- Unless otherwise stated, perform all steps quickly at room temperature (15–25°C).
  - Unless otherwise stated, centrifugation is performed at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm).
  - Reconstitute Buffer FRN, Buffer RPE, Buffer AW1, Buffer AW2, and RNase-Free DNase I as described in the handbook. Mix by shaking before use.
  - Set a thermal mixer, heated orbital incubator, or heating block to 56°C.
  - Flow-through from steps 8, 9, and 12 contains Buffer RLT and Buffer FRN and is therefore not compatible with bleach.
  - Symbols: ■ purification of total RNA that **does not include small RNAs**;  
● purification of total RNA that **does include small RNAs**.
1. Prepare sections and remove paraffin as described in the handbook.
  2. Resuspend the pellet obtained after deparaffinization by adding 150  $\mu$ l Buffer PKD and flicking the tube to loosen the pellet. Add 10  $\mu$ l proteinase K and mix by vortexing.
  3. Incubate at 56°C for 15 min. Incubate on ice for 3 min.

4. Centrifuge for 15 min at 20,000 x g (14,000 rpm). Carefully transfer the supernatant, without disturbing the pellet, to a new ■ 1.5 ml or ▲ 2 ml Safe-Lock microcentrifuge tube (see handbook for ordering information) for RNA purification (below).
5. Keep the pellet for DNA purification; see "Genomic DNA purification" in the *Quick-Start Protocol AllPrep DNA/RNA FFPE Kit, Part 2*.

#### RNA purification

6. Incubate the supernatant at 80°C for 15 min.
7. Add 320  $\mu$ l Buffer RLT, and mix by vortexing or pipetting. Add ■ 720  $\mu$ l or ▲ 1120  $\mu$ l ethanol (96–100%), and mix well by vortexing or pipetting.
8. Transfer 700  $\mu$ l sample, including any precipitate, to an RNeasy® MinElute® spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Centrifuge for 15 s. Repeat step until complete lysate is used.
9. Add 350  $\mu$ l Buffer FRN to the spin column. Centrifuge for 15 s.
10. Add 10  $\mu$ l DNase I stock solution to 70  $\mu$ l Buffer RDD. Mix by gently inverting the tube. Add the DNase I incubation mix (80  $\mu$ l) directly to the spin column membrane, and place on the benchtop (20–30°C) for 15 min.
11. Add 500  $\mu$ l Buffer FRN to the spin column. Centrifuge for 15 s. Save the flow-through for use in step 12.
12. Place the spin column in a new 2 ml collection tube (supplied). Apply the flow-through from step 11 to the spin column. Centrifuge for 15 s.
13. Add 500  $\mu$ l Buffer RPE to the spin column. Centrifuge for 15 s. Repeat step.
14. Place the spin column in a new 2 ml collection tube (supplied). Open the lid, and centrifuge at full speed for 5 min to dry spin column membrane.
15. Place the spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 14–30  $\mu$ l RNase-free water directly to the spin column membrane. Close lid, and incubate for 1 min at room temperature (15–25°C). Centrifuge at full speed for 1 min to elute the RNA.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN® kit handbook or user manual.

Trademarks: QIAGEN®, AllPrep®, MinElute®, RNeasy® (QIAGEN Group).  
1071287 06/2012 © 2012 QIAGEN, all rights reserved.



## AllPrep<sup>®</sup> DNA/RNA FFPE Kit, Part 2

The AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (cat. no. 80234) can be stored for at least 9 months: buffers at room temperature (15–25°C); other components at 2–8°C.

### Further information

- AllPrep DNA/RNA FFPE Handbook: [www.qiagen.com/handbooks](http://www.qiagen.com/handbooks)
- Safety Data Sheets: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)
- Technical assistance: toll-free 00800-22-44-6000, or [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact)

### Notes before starting

- Unless otherwise stated, perform all steps quickly at room temperature (15–25°C).
- Unless otherwise stated, centrifugation is performed at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm).
- Reconstitute Buffer FRN, Buffer RPE, Buffer AW1, Buffer AW2, and RNase-Free DNase I as described in the handbook. Mix by shaking before use.
- Set a thermal mixer, heated orbital incubator, or heating block to 56°C.
- Flow-through from steps 22 and 23 contains Buffer AL and Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach.

### Genomic DNA purification

17. Resuspend the pellet from step 5 of “RNA purification” in *Quick-Start Protocol AllPrep DNA/RNA FFPE Kit, Part 1* in 180  $\mu$ l Buffer ATL, add 40  $\mu$ l proteinase K and mix by vortexing.
18. Incubate at 56°C for 1 h.
19. Incubate at 90°C for 2 h without agitation.

20. Briefly centrifuge. If RNA-free genomic DNA is required, cool to room temperature (15–25°C) and add 4  $\mu$ l RNase A (100 mg/ml). Incubate for 2 min.
21. Add 200  $\mu$ l Buffer AL, and mix. Add 200  $\mu$ l ethanol (96–100%) and mix.
22. Transfer the entire sample to a QIAamp® MinElute® spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid and centrifuge for 1 min.
23. Place the spin column in a new 2 ml collection tube (supplied). Add 700  $\mu$ l Buffer AW1 to the spin column. Close the lid and centrifuge for 15 sec.
24. Add 700  $\mu$ l Buffer AW2 to the spin column. Close the lid and centrifuge for 15 s.
25. Add 700  $\mu$ l ethanol (96–100%) to the spin column. Close the lid and centrifuge for 15 s.
26. Place the spin column in a new 2 ml collection tube (supplied). Open the lid of the spin column, and centrifuge at full speed for 5 min to dry the spin column membrane.
27. Place the spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 30–100  $\mu$ l Buffer ATE directly to the spin column membrane. Close the lid and incubate for 1 min at room temperature. Centrifuge at full speed for 1 min to elute the DNA.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN® kit handbook or user manual.

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, AllPrep®, MinElute® (QIAGEN Group).  
1072885 06/2012 © 2012 QIAGEN, all rights reserved.

