



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**“PARTICIPACIÓN DE LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES MEOX2 Y GLI-1 EN
LA RESISTENCIA A INHIBIDORES DE TIROSINA CINASAS (EGFR-TKIS) EN
CÁNCER PULMONAR”**

Tesis para obtener el grado de Licenciada en Biología

PRESENTA:

Ordóñez Luna María del Carmen

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Federico Ávila Moreno

SINODALES DE TESIS:

Dra. Irlanda Peralta Arrieta

Dr. Leonel Armas López

Dra. Yolanda Irasema Chirino López

Dr. Luis Enrique Arias Romero

Los Reyes Iztacala, Estado de México septiembre 2019



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.

INDICE

Resumen.....	7
1. Introducción.....	8
1.1 Definición y Etiología del cáncer.....	8
1.2 Cáncer de pulmón.....	9
1.2.1 Epidemiología.....	9
1.2.2 Clasificación Histopatológica del Cáncer Pulmonar.....	10
1.2.3 Clasificación molecular del cáncer pulmonar (marcadores genéticos en tumores pulmonares primarios.....	13
1.3 Vías de señalización celular: "EGFR".....	17
1.4 Factores de transcripción en cáncer pulmonar.....	21
1.4.1 El factor transcripcional tipo Homeobox MEOX2 en cáncer pulmonar.....	23
1.5 Participación de la vía de señalización Sonic Hedgehog en cáncer pulmonar.....	24
1.6 Terapia oncológica en cáncer pulmonar.....	28
1.6.1 Mecanismos de Resistencia a la Terapia oncológica Pulmonar.....	29
1.7 Terapia dirigida basada en EGFR-TKIs en cáncer pulmonar.....	31
2. Planteamiento del problema.....	33
3. Hipótesis.....	34
4. Objetivo general.....	35
4.1 Objetivos particulares.....	35
5. Materiales y métodos.....	36
6. Resultados.....	41
6.1. Análisis de las concentraciones Inhibitorias 50 (ic_{50}) frente a cisplatino y EGFR-TKI (erlotinib) en células de cáncer pulmonar.....	41
6.2. Análisis del nivel basal de proteína de los genes ERK y AKT en células de cáncer pulmonar EGFR-silvestre y EGFR-mutadas.....	43
6.2.1 Análisis del nivel de expresión basal de MEOX2 y GLI-1 en líneas celulares del grupo NSCLC.....	44
6.3. Análisis del efecto de cisplatino y TKI erlotinib sobre la activación de miembros de la vía EGFR en células de cáncer pulmonar A549.....	46

6.3.1 Análisis del efecto de cisplatino y TKI erlotinib sobre la activación de miembros de la vía EGFR en células de cáncer pulmonar NCI-H1975.....	49
6.4. Silenciamiento genético y su validación en los genes MEOX2 y GLI-1 mediante ensayos de qRT-PCR y Western Blot.....	51
6.4.1 Efecto del silenciamiento genético de MEOX2 y GLI-1 en la expresión y fosforilación de AKT y ERK en células A549 transfectadas transitoriamente por siRNAs.....	53
6.5. Efecto del silenciamiento genético de MEOX2 y GLI-1 sobre los niveles de proteína total y fosforilada de AKT y ERK en células A549 transfectadas establemente por shRNA A549).....	54
6.5.1 Efecto del silenciamiento de MEOX2 y GLI-1 sobre los niveles de proteína total y fosforilada de AKT y ERK en células A549 transfectadas por shRNAs.....	56
6.6. Participación de los factores de transcripción MEOX2 y GLI-1 en la resistencia al fármaco cisplatino en cáncer pulmonar.....	57
6.7. Las proteínas MEOX2 y GLI-1 afectan la resistencia al TKI erlotinib en células de cáncer pulmonar.....	63
7. Discusión.....	67
8. Conclusiones.....	75
9. Perspectivas.....	75
10. Referencias.....	76
11. Figuras Suplementarias.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de las vías de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)	20
Figura 2. Vía de señalización Hedgehog (Hh), activación canónica y no canónica.....	27
Figura 3. Diseño Experimental	36
Figura 4. Análisis de IC ₅₀ para los fármacos cisplatino y erlotinib en líneas celulares de cáncer pulmonar (NSCLC).....	42
Figura 5. Análisis de los niveles de expresión de AKT, ERK y su respectivo nivel de activación (pERK y pAKT) mediante Western Blot en líneas celulares de cáncer de pulmón (NSCLC).....	44
Figura 6. Análisis del nivel de expresión basal del RNAm y proteína de MEOX2 y GLI-1 mediante qRT-PCR y Western Blot, respectivamente, en líneas celulares NSCLC.....	46
Figura 7. Análisis de los niveles de expresión de AKT y ERK y su nivel de activación por fosforilación (pAKT y pERK) en la línea celular A549 posterior al tratamiento con cisplatino y erlotinib.....	48
Figura 8. Análisis de los niveles de expresión de AKT, ERK y su nivel de activación por fosforilación (pAKT y pERK) en la línea celular NCI-H1975 posterior al tratamiento con cisplatino y erlotinib.	50
Figura 9. Validación del silenciamiento transitorio de MEOX2 y GLI-1 en la línea A549 (modelo siA549).....	52
Figura 10. Efecto del silenciamiento de MEOX2 y GLI-1 en la expresión y fosforilación de AKT en la línea celular A549 (modelo siA549).....	54
Figura 11. Validación del silenciamiento estable de MEOX2 y GLI-1 en la línea A549 (modelo shA549).....	56
Figura 12. Efecto del silenciamiento de MEOX2 y GLI-1 en la expresión y activación de AKT en la línea celular A549 (modelo shA549).....	58
Figura 13. Análisis del efecto de citotoxicidad celular frente al fármaco cisplatino en células de cáncer pulmonar A549 transfectadas de manera estable mediante shRNA contra MEOX2 y GLI-1.....	60
Figura 14. Análisis del efecto de citotoxicidad celular frente al fármaco cisplatino en células de cáncer pulmonar A549 modelo UBIMED pase 7 transfectadas de manera estable mediante shRNA contra MEOX2 y GLI-1.....	62
Figura 15. Análisis del efecto de citotoxicidad celular frente al fármaco cisplatino en células de cáncer pulmonar A549 modelo INER pase 8 transfectadas de manera estable mediante shRNA contra MEOX2 y GLI-1.....	64

- Figura 16.** Análisis del efecto de citotoxicidad celular frente al fármaco erlotinib en células de cáncer pulmonar A549 modelo UBIMED pase 7 transfectadas de manera estable mediante shRNA contra MEOX2 y GLI-1.....66
- Figura 17.** Análisis del efecto de citotoxicidad celular frente al fármaco erlotinib en células de cáncer pulmonar A549 modelo INER pase 8 transfectadas de manera estable mediante shRNA contra MEOX2 y GLI-1.....68

LISTA DE ABREVIATURAS

NCI: Instituto Nacional del Cáncer de USA (National cancer institute)

NF1: Neurofibromatosis tipo 1

RB: Retinoblastoma

ADN: Ácido desoxirribonucleico

RNA: Ácido ribonucleico

SCLC: Carcinoma de células pequeñas (small cell lung carcinoma)

NSCLC: Carcinoma de células no pequeñas (non-small cell lung carcinoma)

TTF-1: factor de transcripción tiroidea

SCC: Carcinoma de células escamosas (squamous cell carcinoma)

LCC: Carcinoma de células grandes (large cell carcinoma)

LCNEC: carcinoma neuroendocrino de células grandes (large cell neuroendocrinal carcinoma)

NET: tumor neuroendocrino de pulmón (neuroendocrinal tumor)

ALK: Anaplastic lymphoma kinase

BRAF: Homólogo B del oncogén viral de sarcoma murino proto-oncogénico (murine sarcoma viral oncogene homolog B)

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor receptor)

KRAS: Oncogen viral Kristen Rat Sarcoma (Kristen Rat Sarcoma viral oncogene)

MEK1: Proteína cinasa activada por mitógeno (Mitogen-activated protein kinase)

MET: Oncogen MET (Mesenquimal epitelial transition)

PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

TKIs: Inhibidores de tirosina cinasas (tyrosine kinase inhibitors)

EML-4: Echinoderm microtubule-associated protein like 4

SHC: Proteína transformante SHC1

GRB-2: Proteína adaptadora GRB2 (Grow factor receptor-bound protein 2)

EML-4: Echinoderm microtubule-associated protein-like 4

RTK: Receptor tirosina cinasa

FT: Factores de transcripción

GEF: factores de intercambio de nucleótidos de guanina

GTP: Guanosin trifosfato

GDP: Guanosin difosfato

Hh: Vía de señalización Hedgehog

RESUMEN

Introducción: El cáncer de pulmón representa en la actualidad uno de los principales tipos de cáncer de mayor malignidad, en parte debido a su compromiso anatómico-regional ocasiona los índices más elevados de incidencia y mortalidad a nivel mundial tanto en hombres, como en mujeres. Entre las diferentes aberraciones genéticas, destacan mutaciones genéticas como aquellas localizadas en el gen que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el cual constituye un blanco terapéutico como resultado de su participación en la activación de transducción de señales de EGFR. A partir del cual, se promueven mecanismos de desdiferenciación y división celular, mediante la activación de sus miembros intermediarios de señalización entre otros como PI3K/AKT y MAPK, que contribuyen al proceso de transformación maligna. Por otro lado, en algunos tipos de cáncer la señalización aberrante de la vía Hh, se ha descrito en comunicación intracelular potencialmente sinérgica con otras vías, destacando la vía de EGFR. En este sentido, en los últimos años el papel del activador transcripcional GLI-1 miembro de la vía Hh.a tenido relevancia. Adicional a ello, diferentes factores de transcripción entre ellos genes tipo homeobox (HOX), como el gen MEOX2 en mancuerna con GLI-1 contribuyen a mecanismos de resistencia a fármacos oncológicos, probablemente contribuyendo a la progresión maligna y/o pobre pronóstico clínico en pacientes con cáncer pulmonar. Sin embargo, los mecanismos celulares involucrados sobre la participación del eje MEOX2-GLI1 sobre la activación de la vía EGFR, aún permanecen por ser esclarecidos.

Metodología: Se realizaron ensayos de transfección estable del silenciamiento genético de MEOX2 y GLI-1 en células EGFR-silvestre A549 (shA549) y transitoriamente con siRNA en células NCI1975 (si1975), que nos permitió describir cambios en las vías de señalización de AKT y ERK posterior a exposición a los fármacos cisplatino y erlotinib. Además de otras técnicas como Western blot, ensayos de MTS y qRT-PCR.

Resultados: Los principales hallazgos de este trabajo posterior a silenciar genéticamente de manera estable y transitoria a los factores MEOX2 y GLI-1 fue generar aumento en la sensibilidad a cisplatino y erlotinib, además de cambios en los niveles de activación de las vías de AKT y ERK.

Conclusión: Los factores de transcripción MEOX2 y GLI-1 contribuyen de manera significativa en la modulación de la activación de la vía de AKT, potencialmente contribuyendo en la resistencia a la terapia oncológica pulmonar.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DEFINICIÓN Y ETIOLOGÍA DEL CÁNCER

De acuerdo a la definición que ofrece el diccionario de términos del Instituto Nacional del Cáncer de USA (NCI, por sus siglas en inglés), el cáncer se define como un conjunto de enfermedades caracterizadas por la división y proliferación celular descontrolada, con capacidad de invasión a tejidos cercanos y metástasis a otras partes del cuerpo (“National Cancer Institute (NCI)” 2015). Así mismo, en cáncer se involucran cambios dinámicos en el genoma caracterizados por un conjunto de anomalías moleculares que incluyen proliferación sostenida, resistencia a la apoptosis, migración, invasión y metástasis, evasión de supresores de crecimiento, angiogénesis, escape del sistema inmune, inmortalidad replicativa, inflamación promotora de tumor, inestabilidad cromosómica, y mutaciones; así, como mecanismos que llevan a la pérdida de regulación de la energética celular (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011).

El cáncer puede originarse por anomalías genéticas tales como aberraciones cromosómicas y mutaciones en genes supresores de tumores (APC, NF1, RB, P53) y oncogenes (RAS, RAF, MYC). Por otro lado, el papel de las alteraciones epigenéticas se han descrito en dicha enfermedad (Baylin and Ohm, 2006). Estas alteraciones epigenéticas son tan importantes para los eventos biológicos como los mecanismos genéticos, ya que no involucran cambios en la secuencia de ADN, pero asumen un importante papel en la modificación de la expresión génica. Estas modificaciones involucran pérdidas y ganancias de metilación de ADN, así como patrones alterados de modificaciones de histonas (Jones and Laird, 1999). Cabe destacar que el cáncer se puede desarrollar en casi cualquier órgano del cuerpo, siendo el cáncer de mama, próstata y pulmón los tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial según lo reportado en la página del GLOBOCAN, 2018 (Bray F, *et al.*, 2018).

1.2 CÁNCER DE PULMÓN

1.2.1 EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de pulmón en la actualidad se encuentra entre los principales tipos de cáncer en términos de incidencia y es la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial tanto en hombres como en mujeres, esto debido a las mutaciones genéticas, la falta de marcadores de diagnóstico y la ubicación espacial del órgano presentes en dicha patología, las cuales contribuyen al inicio y progresión de la enfermedad a una etapa clínica avanzada metastásica en muy poco tiempo (“WHO | Cancer” n.d.) GLOBOCAN, 2018)

Actualmente en México, el cáncer de pulmón es la segunda causa de muerte por cáncer tan solo superada por el cáncer de mama en mujeres y cáncer de colon en hombres. En el año 2000, el cáncer de pulmón fue responsable del 12.7% de las muertes por cáncer; en 2013, representó el 12.8% de las muertes por cáncer y fue la tercera causa de muerte en el país, solo después de las enfermedades cardíacas (24.3%) y la diabetes (14.3%). En este trabajo se muestran los datos que durante la última década se han analizado, y la proporción de casos de cáncer de pulmón es más alta para las mujeres, y el 45,4% de todas las muertes por este tipo de cáncer se produjo en la población de entre 15 y 64 años con una tasa de mortalidad más alta en el norte de México (Mohar-Betancourt A, *et al.*, 2017).

1.2.2 CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL CÁNCER PULMOMAR

El cáncer de pulmón se divide en carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC) y carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (Ferlay J, *et al.*, 2010).

El primero de ellos (SCLC) representa aproximadamente el 20% de los casos diagnosticados de cáncer de pulmón y se caracteriza por la presencia de pequeñas células con una alta relación núcleo-citoplasma que proliferan rápidamente, contienen gránulos neurosecretorios que producen hormonas peptídicas y/o aminas biógenas.

Alrededor del 90% de los casos de SCLC es positivo para los marcadores neuroendocrinos (cromogranina 95%, sinaptofisina 90%, Leu7 CD57), suele desarrollarse peribronquialmente e infiltrarse en la submucosa bronquial, esta clasificación se basa en el aspecto microscópico de las células tumorales (Zhou C, *et al.*, 2011). Por otra parte, el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) representa el 80% de los casos diagnosticados de cáncer pulmonar y se subdivide en: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes y un grupo no especificado (Cho S, *et al.*, 2012).

- **ADENOCARCINOMA**

Es el tipo más común de cáncer de pulmón, representa más de 40% de los casos de cáncer de pulmón registrados, 60% del NSCLC y más del 70% de los casos resecados quirúrgicamente. Por definición, el adenocarcinoma de pulmón es una neoplasia epitelial maligna con diferenciación glandular o producción de mucina. Cuando se reconocen tales características morfológicas, el tumor se designa como adenocarcinoma. Las células de adenocarcinoma de pulmón generalmente expresan marcadores neumocíticos. El factor de transcripción tiroideo (TTF-1) y Napsin A se expresan en más del 85% de los casos de adenocarcinoma de pulmón y, por lo tanto, sirven como marcadores de adenocarcinoma o diferenciación de adenocarcinoma en tumores poco diferenciados y en biopsia limitada (Rekhtman N, *et al.*, 2011; Tacha D, *et al.*, 2012).

- **CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

El subtipo histológico (SCC por sus siglas en inglés), constituye aproximadamente el 20% de los casos de NSCLC (Lewis D, *et al.*, 2014). Su incidencia ha disminuido en las últimas décadas, probablemente debido a cambios en el hábito de fumar. SCC generalmente ocurre en la porción central del pulmón, a lo largo de las vías respiratorias principales, y puede

formar cavidades cuando alcanza un tamaño grande. En el examen microscópico, SCC muestra queratinización y puentes intercelulares y muestra un sólido patrón de crecimiento anidado. Las células tumorales usualmente tienen núcleos hipercromáticos, nucléolos poco visibles, y citoplasma de moderado a abundante con puentes intercelulares delineados. Puede haber queratinización de células tumorales individuales o grupos de células escamosas queratinizantes que forman perlas de queratina ubicadas centralmente dentro de tumores sólidos. Los SCC se dividen en subtipos de queratinización, no queratinización y basaloides. Contrario a los subtipos de adenocarcinoma, dicha subclasificación no muestra una utilidad pronóstica (Brambilla C, *et al.*, 2014).

- **CARCINOMAS DE CÉLULAS GRANDES**

Este subtipo histológico (LCC por sus siglas en inglés), representa aproximadamente un 3% de casos de NSCC que carecen de diferenciación específica de linaje, pruebas morfológicas e inmunohistoquímicas como en el adenocarcinoma, SCC o carcinoma neuroendocrino (inmunofenotipo nulo). LCC suele estar ubicado periféricamente, presenta un aspecto voluminoso y necrótico. Las células tumorales son grandes y de forma poligonal con núcleos pleomórficos y vesiculares, forman una hoja sólida sin patrón definido. El carcinoma neuroendocrino de células grandes (LCNEC) se clasifica en la categoría de tumor neuroendocrino de pulmón (NET) (Lewis D, *et al.*, 2014; Travis W, *et al.*, 2013).

A continuación, se describen datos actualizados de la clasificación del cáncer pulmonar en el año 2011 por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón, la Sociedad Torácica Americana y la Sociedad Respiratoria Europea, en la cual proponen una nueva categorización del Adenocarcinoma basada en la evidencia histológica de invasión.

ADENOCARCINOMA

Las lesiones preinvasivas se clasifican en un continuo desde hiperplasia adenomatosa atípica (AAH) hasta adenocarcinoma *in situ* (AIS), y el adenocarcinoma mínimamente invasivo (MIA) incluyendo lesiones pequeñas (<3 cm) con <5 mm de invasión. Los adenocarcinomas invasivos muestran una variedad de patrones por ejemplo el adenocarcinoma predominantemente lepidico (LPA), acinar, papilar, micropapilar y sólido, los cuales se caracterizan por la alteración de un tumor que invade más de 5mm de la membrana basal alveolar. Esta agrupación se correlaciona con los resultados clínicos, con lesiones preinvasivas que tienen un curso clínico con cerca del 100% de probabilidad de ser curado, en contraste con los carcinomas invasivos que tienen un peor pronóstico. (Yoshizawa A, *et al.*, 2011).

CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS

El cáncer de pulmón de células escamosas (SCC) es el segundo subtipo histológico más común, este comprende aproximadamente el 20% de las neoplasias pulmonares primarias en los EE. UU. SCC generalmente ocurre en la porción central del pulmón, a lo largo de las vías respiratorias principales, y puede formar cavidades cuando alcanza un tamaño grande. En el examen microscópico, SCC muestra queratinización y puentes intercelulares y muestra un sólido patrón de crecimiento anidado. Las células tumorales usualmente tienen núcleos hipercromáticos, nucléolos poco visibles, y citoplasma de moderado a abundante con puentes intercelulares delineados. Puede haber queratinización de células tumorales individuales o grupos de células escamosas queratinizantes que forman perlas de queratina ubicadas centralmente dentro de tumores sólidos. Los SCC se dividen en subtipos de queratinización, no queratinización y basaloides (Travis W, 2011; Brambilla C, *et al.*, 2014).

TUMORES NEUROENDÓCRINOS

En la nueva clasificación de la OMS realizada en el año 2015, se estableció una nueva categoría “tumores neuroendócrinos”. Los tumores neuroendócrinos invasivos comprenden tres subtipos: carcinoma de células pequeñas (SCLC), carcinoma neuroendocrino de células grandes (LCNEC) y tumor carcinoide (típico/atípico). La distinción entre un tumor neuroendocrino de alto grado (HGNET), el cual comprende SCLC y LCNET, y un tumor carcinoide es de importancia para la práctica patológica y clínica. HGNET es uno de los subtipos más agresivos y se caracteriza por una historia de tabaquismo intenso, mientras que los tumores carcinoides tienen un buen pronóstico y ocurren generalmente en pacientes sin antecedentes de tabaquismo (Inamura K, 2017).

1.2.3 CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER PULMONAR (Marcadores Genéticos en Tumores Pulmonares Primarios)

El cáncer de pulmón también puede clasificarse de acuerdo a las modificaciones moleculares descritas en dicha patología, tales como la aparición de mutaciones y/o secuencias polimórficas en diversos genes tanto supresores de tumores como oncogenes, entre los que destacan: AKT1, ALK, BRAF, EGFR, HER2, KRAS, MEK1, MET, NRAS, PIK3CA, RET y ROS1 presentándose alteraciones en vías de señalización importantes para el crecimiento y/o proliferación celular en condiciones fisiológicas normales (Ciardiello and Tortora, 2008).

Con base en lo anterior se han descrito una serie de alteraciones genéticas en el grupo de tumores pulmonares NSCLC, siendo el oncogén viral *Kristen rat sarcoma* (KRAS), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la cinasa de linfoma anaplásico (ALK) los oncogenes más comúnmente alterados, los cuales conducen a la activación constitutiva de proteínas que inducen y sostienen la tumorigénesis (Lee T, *et al.*, 2016). Al respecto, se ha descrito que diferentes mutaciones se pueden encontrar en todos

los tipos histológicos de NSCLC, tanto en pacientes fumadores como en no-fumadores, siendo las personas fumadoras con adenocarcinoma las que presentan mayor incidencia mutacional en KRAS, EGFR, HER2, ALK, RET y ROS1 (Lee T, *et al.*, 2016). A este respecto, el uso de terapias dirigidas en individuos con NSCLC en presencia de mutación en EGFR o ALK ha demostrado beneficio clínico en contraste con aquellos pacientes que no poseen blancos moleculares mutacionales susceptibles para una terapia personalizada (Kwak E, *et al.*, 2010). No obstante, algunas evidencias, por el contrario, sugieren que aquellos tumores pulmonares impulsados por la mutación KRAS (principalmente adenocarcinomas), no responden adecuadamente a fármacos EGFR-TKIs. Así mismo, se ha descrito que la activación de KRAS como una de las vías de señalización involucradas en la resistencia a fármacos EGFR-TKIs también provocan resistencia al uso de anticuerpos monoclonales antagonistas de la función de EGFR. A este respecto, a pesar de la inhibición de EGFR por TKIs, la activación sostenida de KRAS permite la activación constitutiva de la vía de las MAPK, la cual en condiciones normales es activada por la unión de los ligandos a EGFR (Chong and Jänne, 2013). A continuación, se describen algunos de los onco-drivers más relevantes en la oncología molecular del cáncer pulmonar.

- **EGFR**

El factor de crecimiento epidérmico (EGFR) también conocido como ERBB1 y HER1 es una proteína receptora transmembranal con actividad de tirosina cinasa, miembro de la familia HER de receptores epidermales humanos y es un componente crucial de las vías de señalización celulares, se expresa en tejido epitelial normal, mesenquimal y neurogénico (Huang L.and Fu 2015). EGFR se localiza en el brazo corto del cromosoma 7, en la región q22. En condiciones normales, la unión con ligandos (EGF y TGF- α) lleva a la homodimerización o heterodimerización con otros miembros de la familia HER, esto

provoca la autofosforilación del dominio tirosina cinasa y se da un cambio conformacional que permite la unión de proteínas adaptadoras y de andamiaje (SHC y GRB-2) para que se lleve a cabo el reclutamiento de otras proteínas señalizadoras, como resultado, sigue la regulación positiva transcripcional, que conduce a la síntesis de proteínas y la transformación de las funciones celulares o la arquitectura celular (Lynch T, *et al.*, 2004).

Además de EGFR, existen otros oncogenes que, al presentar mutación, conducen al desarrollo y progresión del cáncer, entre los que destacan:

- **KRAS**

Las proteínas RAS, incluida KRAS, son proteínas de unión a nucleótidos de guanina (proteínas G) que pertenecen a la familia de GTPasas pequeñas. Las proteínas G se componen de un dominio catalítico o dominio G, que se une a los nucleótidos de guanina activando o inactivando la señalización, así como una región hipervariable C-terminal (HVR) que incorpora grupos farnesilo o prenilo (modificaciones postranscripcionales). Estas modificaciones divergen en cada isoforma debido a la variabilidad de la secuencia del HVR y ubican las proteínas RAS en la membrana celular, donde realizan su función de señalización del EGFR (Tetlow and Tamanoi, 2013; Vetter and Wittinghofer, 2001).

La señalización descendente está regulada por dos estados alternativos de proteínas RAS: RAS-GTP (forma activa) y RAS-GDP (forma inactiva). El complejo RAS-GTP activa varios efectores de señalización río abajo, como las vías RAF-MEK-ERK, y PI3K-AKT-mTOR entre otras vías que controlan múltiples funciones celulares incluyendo proliferación, apoptosis, movilidad y supervivencia celular. Estas cascadas de señalización se activan mediante el acoplamiento de varios receptores de factores de crecimiento como EGFR que favorecen una activación constitutiva de KRAS (Takashima and Faller, 2013; Mitin, Rossman, and Der 2005). El intercambio de GDP-GTP está regulado por proteínas adicionales: los factores de

intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) disminuyen la afinidad de las proteínas RAS por el GDP y favorecen la unión a GTP que causa la activación de RAS, mientras que las proteínas activadoras de GTPasa (GAP) aceleran la actividad intrínseca de la GTPasa para regular el ciclo RAS (Hennig A, *et al.*, 2015; Bos, Rehmann, and Wittinghofer, 2007).

La mutación más frecuente de KRAS en tumores de NSCLC es G12C en 41% de los casos, estructuralmente, esta mutación impide la unión de KRAS a las GAP y por lo tanto la GTPasa es incapaz de hidrolizar el GTP a GDP.

Se ha propuesto que los tumores pulmonares que presentan mutación en KRAS se comportan de manera similar a los tumores nativos KRAS, EGFR y ALK con respecto al desarrollo de metástasis (Doebele R, *et al.*, 2012). Las mutaciones G12C y G12V generalmente se asocian con una supervivencia libre de progresión (PFS) más corta. Los pacientes con NSCLC que albergan la mutación G12C poseen más probabilidades de presentar diseminación de metástasis óseas, mientras que las metástasis pleuro-pericárdicas son más frecuentes en aquellos con mutaciones G12V. Sin embargo, las mutaciones KRAS G12D activan preferentemente la señalización PI3K y MEK (Ihle N, *et al.*, 2012; Jia Y, *et al.*, 2017).

- **ALK**

El gen ALK se localiza en el brazo corto del cromosoma 2 (2p23), pertenece a la superfamilia de receptor de insulina, y codifica para la proteína ALK. ALK es un receptor transmembrana con actividad tirosina cinasa, y al igual que otros receptores de tirosina cinasas, tiene un dominio extracelular, un segmento transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina cinasa (Duyster B and Morris, 2001). La expresión de ALK se produce en el sistema nervioso durante la embriogénesis y disminuye en la vida postnatal. La fusión de ALK con la proteína asociada a microtúbulos de equinodermo (EML-

4) es un origen común del cáncer de pulmón. Normalmente, funcionan en el desarrollo neuronal y la formación de microtúbulos, respectivamente, sin embargo, cuando se fusionan, pueden provocar el desarrollo de cáncer de pulmón por la activación irregular de sus elementos río abajo y representan del 4% al 7% de todos los casos de cáncer de pulmón de células no pequeñas (Perner S, *et al.*, 2008). Hay tres tipos de mutaciones en el gen ALK: reordenamiento (ALK-R), amplificación (ALK-A) y mutación puntual. La mayoría de las mutaciones del gen ALK están en forma de una translocación con otro gen asociado que conduce a un oncogén de fusión, el cual se sobre-expresa en cáncer. En 1994, ALK se identificó originalmente en el linfoma anaplásico de células grandes como un compañero de fusión de nucleofosmina (NPM-ALK) como resultado de una translocación cromosómica (Morris S, *et al.*, 1994). Los reordenamientos de ALK crean una tirosina cinasa ALK oncogénica que activa muchas vías de señalización descendentes, lo que resulta en un aumento de la proliferación celular y la supervivencia (Kwak E, *et al.*, 2010). A este respecto, se han descrito socios genéticos adicionales en oncogenes de fusión con el gen *ALK*, incluidos *TPM3*, *TFG*, *CLTCL1* y *ATIC* (Kwak E, *et al.*, 2010).

1.3 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR: “EGFR”

Los sistemas de comunicación y señalización celular son determinantes fundamentales de la coordinación y función de los distintos tipos celulares a través del control de la expresión génica y de la función de las proteínas. Estos sistemas controlan dónde, cuándo, cuánto y por cuánto tiempo se expresan los RNA. En el caso de las proteínas, los mecanismos de señalización celular controlan, además, los cambios de localización, tráfico de proteínas dentro de una célula, cómo se degradan y las interacciones funcionales que establecen. Se estima que más del 20% de los genes en el genoma humano codifican proteínas implicadas en la transducción de señales. Por otra parte, la alteración de estos sistemas da lugar al

desarrollo de múltiples patologías como el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y neuro-degenerativas (Frank S, 2013).

Las vías de comunicación celular son sistemas en cascada, con una serie de etapas secuenciales, en las que existe un proceso de detección de un mensajero por un receptor, seguida de un proceso de transducción o de transformación de esa señal extracelular en una intracelular. La diseminación de esas señales intracelulares (también denominadas segundos mensajeros) y su interacción con proteínas efectoras permite regular los procesos celulares básicos y las funciones fisiológicas integradas. Por tanto, estos sistemas son un poderoso instrumento para modular las funciones del organismo (Downward J, 2001). Los receptores de tirosina cinasas (RTK) son mediadores primarios de muchas de estas señales y, por lo tanto, determinan el destino de la célula: crecimiento, diferenciación, migración o muerte. La familia ErbB de RTK consta de cuatro receptores: ErbB-1 (EGFR), ErbB-2 (HER2 o Neu), ErbB-3 y ErbB-4 (van der Geer P, et al., 1994).

Respecto a las vías de señalización importantes río abajo de EGFR se encuentran las vías RAS/RAF/MAPK (proteína cinasa activada por mitógeno), la vía de PI3K/AKT y la vía Jak/STAT (cinasa Janus transductores de señal y activador de la transcripción). Como resultado de la transducción de estas señales, se promueven la diferenciación celular o la proliferación celular entre otros procesos celulares importantes. La desregulación de las vías de señalización de PI3K/AKT y de las MAPK están implicadas en la transformación maligna (Crosbie P, et al., 2016; McCubrey J, et al., 2007). La activación sostenida por fosforilación resulta en una señalización aberrante que impulsa la proliferación celular, la invasión (Huang C, Jacobson K, and Schaller, 2004) y prolonga la sobrevivencia de las células cancerosas (Balmano and Cook, 2009).

La vía PI3K/AKT se asocia principalmente con el crecimiento celular, la inhibición de la apoptosis, la invasión o la migración (Inamura K, *et al.*, 2010), como se muestra en la imagen 1 tomada de (Nyati M, *et al.*, 2006).

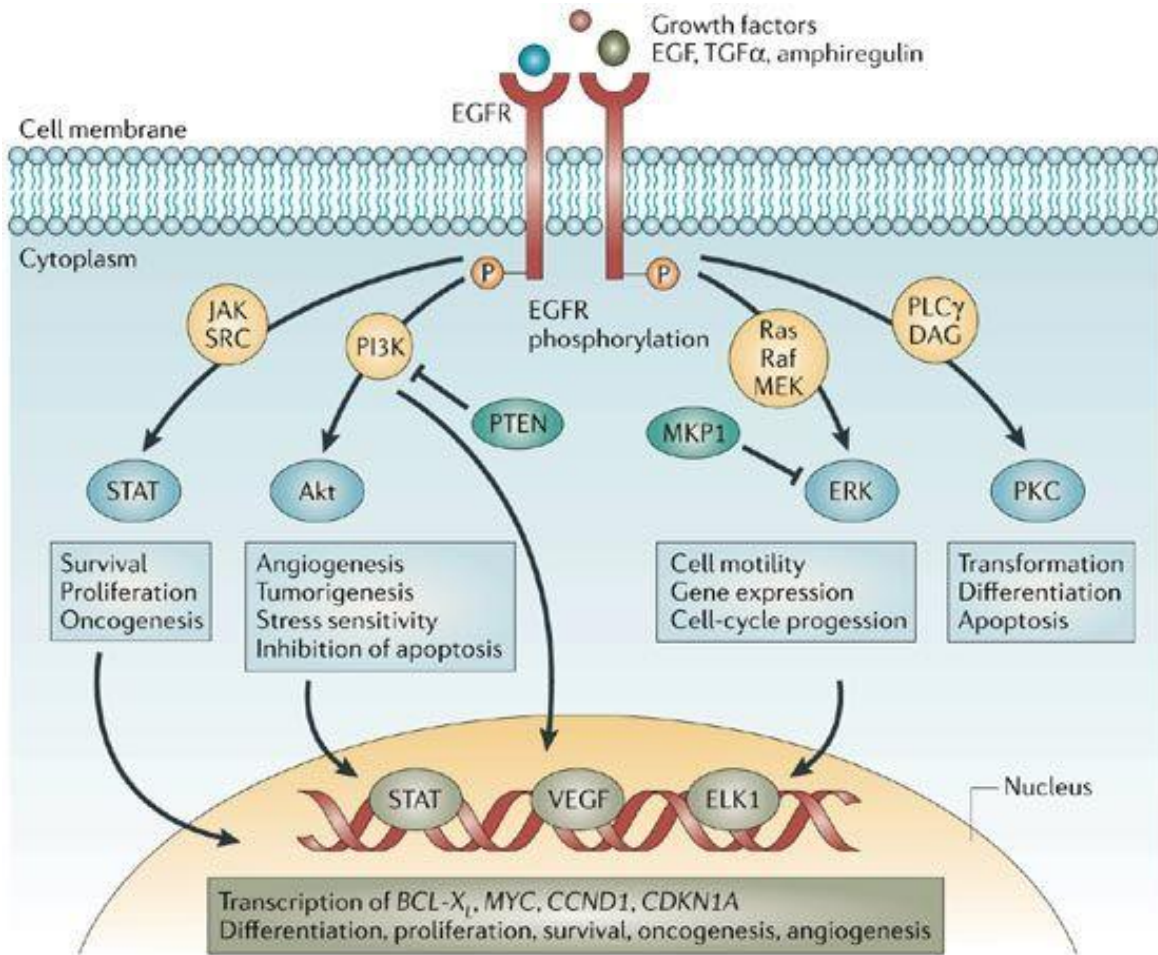
Estudios previos del cáncer de pulmón de células no pequeñas han reportado la presencia de AKT fosforilado en un porcentaje de entre 33 a un 79% de los tumores y lo han identificado como un determinante clave de la agresividad tumoral asociada con pobre supervivencia (Kim and Choi, 2010).

Por otra parte, la vía RAS/RAF/MAPK promueve principalmente la proliferación celular y la supervivencia, siendo las isoformas 1 y 2 de ERK moduladores clave de la proliferación celular. Se requiere la fosforilación de los residuos de treonina (Thr202) y de la tirosina (Tyr204) (fosforilación doble) para la actividad completa de la cinasa; la eliminación de un grupo fosfato (monofosforilación) o ambas inactivan la actividad de la enzima (Lefloch, Pouysségur, and Lenormand, 2009).

Dentro de la misma cascada de señalización, las mutaciones activadoras de KRAS promueven la fosforilación constitutiva de ERK, lo que lleva a la proliferación celular descontrolada. Mutaciones en KRAS se han detectado en aproximadamente 20% de los casos de NSCLC, particularmente adenocarcinomas (Westra H, *et al.*, 1993). ERK fosforilada ha sido detectada hasta un tercio de los NSCLC con una asociación inconsistente con el pronóstico (Vicent S, *et al.*, 2004a). Como se muestra en la Figura 1 tomada de (Nyati M, *et al.*, 2006).

La sobreexpresión de ERK fosforilada también se ha observado en enfisema comparado con tejido pulmonar sano (Mercer B, *et al.*, 2004) y se postula que la activación constitutiva de ERK puede ser un evento crítico en la progresión del enfisema (D'Armiento J, *et al.*, 1992; Imai K, *et al.*, 2001). La evidencia también apunta a la activación de la vía

PI3K/AKT/mTOR en la patogénesis de la EPOC (To Y, *et al.*, 2010; Mercado, Ito, and Barnes 2015).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

Figura 1. Representación de las Vías de Señalización del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR). En la imagen se muestran las diferentes vías río debajo de EGFR, entre ellas se encuentran la vía de PI3K/AKT/mTOR y la vía de las MAPK, las cuales están implicadas en el crecimiento celular, proliferación y la inhibición de la apoptosis. Tomada de: Nyati M, *et al.*, 2006. *Nature Reviews Cancer*, 6, 94.

1.4 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN CÁNCER PULMONAR

Los factores de transcripción (FT) interpretan directamente el genoma y realizan el primer paso para descifrar la secuencia de ADN, funcionando como "reguladores maestros" y "genes selectores" los cuales ejercen control sobre los procesos que especifican los tipos celulares y patrones de desarrollo (Lee T. and Young, 2013). Las mutaciones en los FT y en los sitios de unión al FT subyacen a muchas enfermedades humanas. Sus secuencias de proteínas, regiones reguladoras y funciones fisiológicas se conservan profundamente entre los metazoos (Bejerano G, et al., 2004; Carroll S, 2008).

El mismo FT puede regular diferentes genes en diferentes tipos de células, lo que indica que las redes reguladoras son dinámicas incluso dentro del mismo organismo. Determinar cómo se ensamblan los FT de diferentes maneras para reconocer los sitios de unión y controlar la transcripción es primordial para comprender sus funciones fisiológicas, decodificar las propiedades funcionales específicas de los genomas y mapear cómo se orquestan programas de expresión específicos en organismos complejos. Las principales familias de factores de transcripción en eucariotas como la de dedos de zinc (C2H2-zinc finger ZF), Homeodominio, hélice-loop-helix básica (bHLH), la cremallera básica de leucina (bZIP), y el receptor de hormonas nucleares (NHR), fueron descritas por Johnson y McKnight en 1989). El conocimiento de los sitios de unión, a menudo identificados por métodos como DNase footprinting (huella de DNasa) o el cambio de movilidad, llevó a la identificación de las proteínas de unión particulares mediante la secuenciación de péptidos N-terminales, las bibliotecas de fagos o la selección de un híbrido. Se observaron similitudes en la composición y estructura de aminoácidos entre diferentes proteínas de unión al ADN. Las nuevas proteínas de unión al ADN continúan siendo identificadas por métodos experimentales por ejemplo, ensayos de un híbrido (Reece-Hoyes and Marian Walhout 2012), espectrometría de purificación por afinidad del ADN (Tacheny A, et al.,

2013) y los microarreglos de proteínas (Hu X, *et al.*, 2011), pero hoy en día, la mayoría de los FT conocidos y putativos se han identificado por homología de secuencia con un dominio de unión al DNA (DBD) previamente caracterizado, que también se usa para clasificar el FT (Weirauch and Hughes, 2011). Se cree que la mayoría de los FT actúan reclutando cofactores (Reiter, Wienerroither and Stark 2017). Dichos coactivadores y co-represores son frecuentemente complejos proteicos con múltiples subunidades o proteínas con dominios que regulan la transcripción a través de varios mecanismos. Comúnmente contienen dominios involucrados en la unión de la cromatina, la remodelación de nucleosomas y/o la modificación covalente de las histonas u otras proteínas, incluidos los FT y la RNA polimerasa (Fietze and Farnham, 2011).

Los roles fisiológicos de los FT también se conservan a evolutivamente: un ejemplo muy conocido de ello son los genes HOX, los cuales codifican proteínas que actúan como factores de transcripción y especifican el plano corporal anterior-posterior de los vertebrados (Bürglin T, 2011), otro ejemplo son los FT de la familia RFX que regulan genes involucrados en varios procesos celulares como en el desarrollo de cilios en la superficie celular (Choksi S, *et al.*, 2014). No obstante, los FT evolucionan, modificando sus motivos, y patrones de expresión (Arendt D, *et al.*, 2016; Grove C, *et al.*, 2009; Schmitges F, *et al.*, 2016).

Otras proteínas importantes son las proteínas con Homeodominio, las cuales tienen homólogos en los vertebrados. Los FT se expresan diferente de acuerdo al tejido, los FT con homeodominio, por el contrario, están altamente enriquecidos y además tienen roles bien establecidos en la especificación temprana del destino de las células embrionarias y roles en el mantenimiento y diferenciación de tipos de células especializadas (Bürglin T, 2011; Dunwell and Holland, 2016).

1.4.1 EL FACTOR TRANSCRIPCIONAL TIPO HOMEBOX MEOX2 EN CÁNCER PULMONAR

La proteína Homeobox MEOX2 (también conocido como gen homeobox específico de detención del crecimiento, GAX) es una proteína que en humanos está codificada por el gen MEOX2 (Lepage D, *et al.*, 1994). Este gen codifica a un miembro de una subfamilia de genes que contienen homeobox, divergentes, similares a antenapedia. La proteína codificada juega un papel en la regulación de la miogénesis de las extremidades en vertebrados. Las mutaciones en la proteína MEOX2 presentes en el ratón están asociadas con anomalías craneofaciales y/o esqueléticas, además de la disfunción neurovascular observada en la enfermedad de Alzheimer (Stamatakis D, 2001).

En el NSCLC ciertos genes de la familia homeobox, como MEOX2 han sido asociados previamente con la progresión histopatológica, mal pronóstico clínico y quimiorresistencia oncológica (Ávila-Moreno F, *et al.*, 2014). Adicionalmente, ha sido descrita su regulación epigenética en tejido pulmonar embrionario cuyo perfil se asemeja a tumores de pulmón de adulto. Usando los perfiles de expresión génica diferencial y de metilación del ADN como guía, se han identificado genes, entre los que se encuentra MEOX2, los cuales se encuentran metilados de forma aberrante en el NSCLC. MEOX2 se encontró hipermetilado en las muestras de cáncer de pulmón, mientras que la metilación de otros genes por ejemplo MDK y LPTM5 se correlacionó con el estado de diferenciación del o el tipo de tumor. Se determinó que MEOX2 se encuentra mayormente metilado en tejidos de cáncer de pulmón en comparación con muestras de pulmón de fetos y de adultos sanos, además de su papel en la formación y el patrón de somitas. MEOX2 se expresa en células endoteliales vasculares e inhibe la angiogénesis (Lepage *et al.*, 1994). Por lo tanto, el estado de metilación observada en la región 5' -UTR de MEOX2, en combinación con la expresión génica y la hipometilación de la misma región en pulmones fetales y adultos

sanos indican una expresión alterada de MEOX2 en tumores de pulmón (Mankoo B, *et al.*, 2003), (Cortese R, *et al.*, 2008)

Sin embargo, los mecanismos asociados con los genes relacionados con HOX, como MEOX2, en el contexto de la resistencia a los medicamentos para el cáncer de pulmón, la supervivencia general y el pronóstico clínico aún no se han dilucidado por completo (Armas-López L, *et al.*, 2017).

1.5 PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN SONIC HEDGEHOG EN CÁNCER PULMONAR

Hedgehog (Hh) es una de vía de señalización importante durante el desarrollo para la comunicación intercelular. La vía de Hh es importante para la organogénesis de casi todos los órganos de mamíferos, así como en la regeneración y la homeostasis. La señalización de Hh se altera en diversos tipos de cáncer (Davis F, *et al.*, 2001; Bangs and Anderson, 2017). La señalización de Hh en vertebrados depende de un orgánulo especializado, el cilio primario (PC), a diferencia de otras vías de señalización esenciales para el desarrollo. Este orgánulo es importante para procesar señales celulares y/o cambios ambientales extracelulares necesarios para el desarrollo, como Wingless (Wnt), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), Shh y Notch (Goetz and Anderson, 2010).

Existen tres proteínas Hh en mamíferos, Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) y Desert Hedgehog (Dhh). Shh e Ihh tienen diversas funciones y coinciden en varios tejidos, Shh es importante en la especificación de los tipos celulares del sistema nervioso y en el patrón de las extremidades, mientras que Ihh está involucrado en el desarrollo del esqueleto, principalmente en la osificación endocondral. Dhh está restringido a las gónadas, incluidas las células de la granulosa de los ovarios y en los testículos, en las células de

Sertoli (Bitgood, Shen, and McMahon 1996; Yao, Whoriskey, and Capel 2002; *Wijgerde et al.*, 2005).

La función mejor estudiada de Shh, durante la embriogénesis del ratón, es instruir el patrón de las células progenitoras neurales tales como los progenitores de interneuronas y las neuronas motoras, que se diferencian debido a un gradiente de Shh (Briscoe and Ericson,, 2001; Dessaud, McMahon, and Briscoe, 2008). Varias evidencias demuestran que la embriogénesis y la tumorigénesis tienen características comunes, ambos procesos dependen de mecanismos coordinados de proliferación, diferenciación y migración (Ma Y, *et al.*, 2010). Las vías de señalización vitales para el desarrollo embrionario y la organogénesis se modulan en la tumorigénesis. Se ha demostrado que la activación aberrante de la señalización de la vía de Hh está asociada con la formación de tumores cerebrales, así como con su comunicación cruzada con otras vías como (TGF β s), Wnt, Notch y Shh (Roth W, *et al.*, 2000; Golestaneh and Mishra 2005; Lima F, *et al.*, 2012).

La activación de la vía de Hh es positiva y negativamente regulada por la fosforilación, la cual se produce por moléculas como Sufu, IGUANA, PKA (Ferretti E, *et al.*, 2005); GSK3B (Glycogen synthase kinase 3 beta), y CK1a (Casein Kinase 1 Alpha), entre otras (Ho K, 2002), y puede ocurrir de dos maneras: 1.- Señalización canónica: dependiente del ligando o mediante señalización inducida por el receptor y 2.- Señalización no canónica, cuando hay un mecanismo de activación independiente del ligando (Blotta S, *et al.*, 2012). La señalización canónica de Hh se produce cuando la glicoproteína Shh se une e inactiva a la proteína Patched (Ptch1). A falta del ligando Shh, la actividad de la proteína Smo es inhibida por Ptch1, por lo que la unión de la proteína Shh a Ptch1 regula la actividad de Smo (Choudhry Z, *et al.*, 2014; Rimkus T, *et al.*, 2016). Smo es una proteína similar a GPCR (receptor acoplado a proteína G), y la translocación a la membrana de los cilios es importante para la activación de GLI-1 (Goetz and Anderson, 2010; H Lee and Ko, 2016). En respuesta a la señalización de Shh, se libera la inhibición que tiene Ptch1 sobre Smo en

el cilio primario (PC), después de la degradación de Ptch1, Smo se acumula en el cilio primario (PC) donde se activa y estabiliza al iniciar la cascada de señalización de Hh (Deneff N, *et al.*, 2000). Esta cascada de señalización resulta en la translocación de las proteínas de la familia GLI al núcleo lo cual induce la transcripción de los genes blanco, incluidos Ptch1 y GLI-1, en un circuito de retroalimentación negativa y positiva, respectivamente (Blotta S, *et al.*, 2012). Además, la translocación de GLI-1 al núcleo también modula a la proteína de Wnt y Noggin (Rimkus T, *et al.*, 2016; Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999). El gen GLI-1 se clonó inicialmente como un oncogén amplificado de un glioma maligno y luego se caracterizó como un factor de transcripción de la vía de Hh (Kinzler K, *et al.*, 1987; Ariel Ruiz i Altaba, Mas, and Stecca, 2007). Tres proteínas de la familia GLI (GLI-1, GLI-2 Y GLI-3) son factores de transcripción con dedos de zinc que se expresan en vertebrados, estas tres proteínas son dependientes de Shh, aunque solo GLI-1 actúa como un activador transcripcional, GLI-2 es tanto activador como represor de la vía y GLI-3 actúa como represor de la vía (Ruiz i Altaba A, 1997; Sasaki H, *et al.*, 1999; Teglund and Toftgård, 2010).

La vía de señalización Hh también puede ser controlada por Suppressor of Fused (Sufu) (Gonnissen, Isebaert, and Haustermans, 2015). Sufu es un regulador negativo de la vía de señalización de Hh, que actúa sobre los factores de transcripción de GLI. Cuando el ligando de Hh no está presente, Sufu se une directamente a las proteínas GLI e inhibe su translocación al núcleo, impidiendo la activación de la vía, sin embargo, los mecanismos específicos relacionados con la inactivación de GLI por Sufu no se comprenden completamente (Kogerman P, *et al.*, 1999), sin embargo, actualmente lo que se sabe es que las proteínas GLI retenidas en el citoplasma por Sufu se degradan o procesan y, por lo tanto, inhiben la señalización de Hh. Por lo anterior, la vía de señalización de Hh es crucial no solo durante el desarrollo embrionario y postnatal sino también en el proceso de la transformación maligna, ya que un desequilibrio en la activación de la vía puede conducir a

malformaciones estructurales y fenotípicas en organismos superiores, como complicaciones faciales, holoprosencefalia, microcefalia, cílope y paladar hendido mientras que en la etapa adulta, la activación o modulación constitutiva de la vía Hh está involucrada en la homeostasis de los tejidos y contribuye al proceso de renovación y reparación de los tejidos, así como al mantenimiento de las células madre (Humke E, *et al.*, 2010).

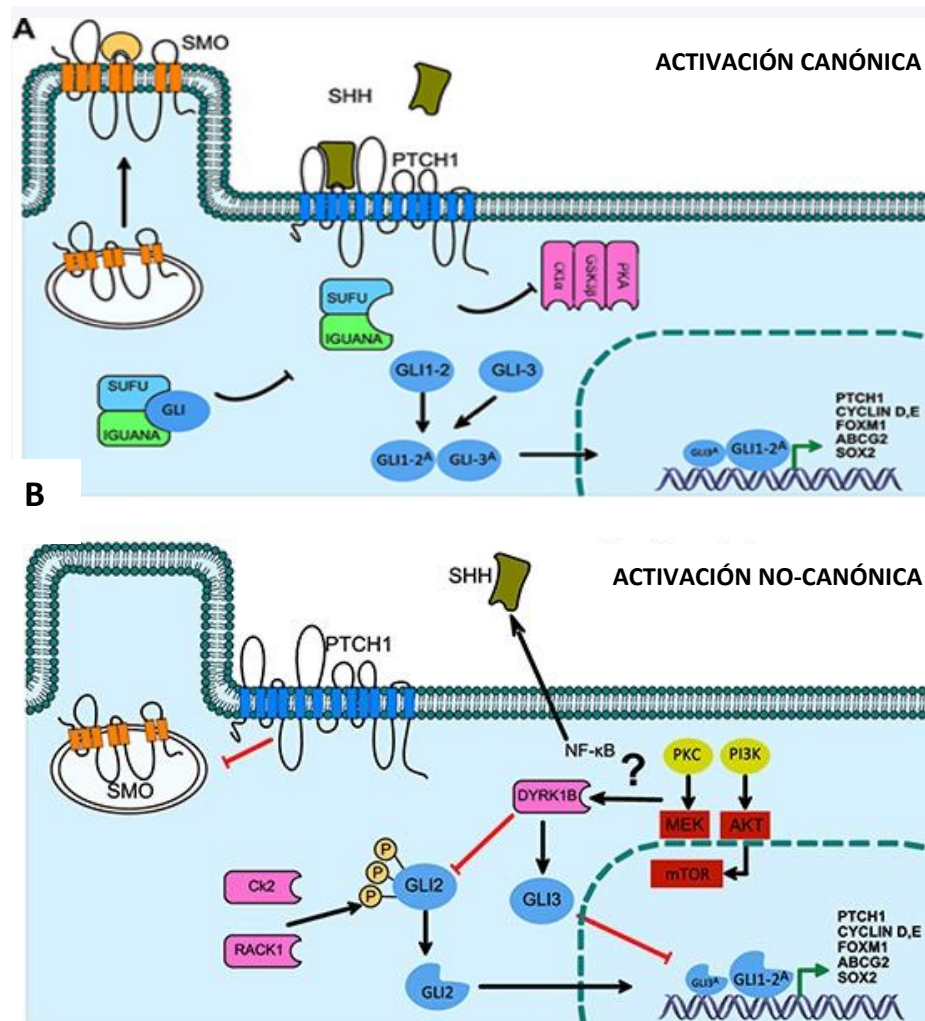


Figura 2. Vía de Señalización de Hedgehog (hH), activación canónica y no canónica. (A) La activación de la vía Hh comienza con la unión del ligando Shh al receptor Ptc1, PTCH1, eliminando la inhibición sobre Smo y promoviendo su desplazamiento a la membrana celular, se promueve la traslocación al núcleo y la actividad transcripcional de GLI-1. **(B)** Se ha descrito la activación no canónica de GLI a través de diversas vías entre las que se encuentran la vía de PI3K/AKT/Mtor y la vía de las MAPK sin que se requiera la unión del ligando Shh. Tomado y adaptado de (Armas-López L, *et al.*, 2017).

1.6 TERAPIA ONCOLÓGICA EN CÁNCER PULMONAR

Inhibidores (Moléculas pequeñas):

El mal pronóstico del cáncer de pulmón se atribuye al diagnóstico de la enfermedad en una etapa avanzada y la falta de cura, así como la corta supervivencia para pacientes con etapas avanzadas de NSCLC. Hasta hace poco, todos los NSCLC se trataban de manera similar, según la estadificación. La cirugía fue el estándar de atención para pacientes con NSCLC en estadio I – IIIA (Goldstraw P, *et al.*, 2016).

Los pacientes con NSCLC representan una población heterogénea, lo que dificulta el manejo de la enfermedad; sin embargo, una mayor comprensión de la patogenia molecular de la enfermedad ha abierto el camino para nuevos tratamientos que utilizan agentes anticancerígenos dirigidos contra moléculas específicas. Actualmente, el blanco terapéutico mejor establecido es EGFR, miembro de la familia de receptores con actividad de tirosina cinasas HER/ErbB (Zer and Leighl, 2014).

Avances recientes en terapias moleculares dirigidas han cambiado el paradigma para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), que presentan mutaciones somáticas activadoras en EGFR (Lynch T, *et al.*, 2004b; Paez J, *et al.*, 2004a; Pao W, *et al.*, 2004b).

Varios EGFR-TKIs, como erlotinib, gefitinib y afatinib, han demostrado un notable beneficio clínico y, en consecuencia, han sido aprobados como terapia de primera línea en el NSCLC con mutación en EGFR en estadio avanzado (Maemondo I, *et al.*, 2010; Mitsudomi T, *et al.*, 2010; Mok T, *et al.*, 2009; Y.-L. Wu *et al.*, 2014a).

Sin embargo, el desarrollo de la resistencia es inevitable y presenta un gran desafío para el éxito del tratamiento con EGFR-TKIs (Pao and Chmielecki, 2010; Chong and Jänne, 2013; Camidge, Pao, and Sequist, 2014). En los últimos años se han descrito mecanismos

moleculares que conducen a la adquisición de resistencia a EGFR-TKIs, entre los que se encuentra la mutación T790M acompañada por la amplificación de EGFR, detectada en aproximadamente el 50% de los NSCLC que presentan mutación en EGFR y resistencia adquirida a gefitinib o erlotinib (Kobayashi S, *et al.*, 2005; Pao W, *et al.*, 2005).

Anticuerpos Monoclonales:

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) representan otra forma alternativa de inhibir la activación y señalización de EGFR. Además de la inhibición competitiva de los ligandos que se unen al dominio extracelular, también pueden formar complejos de anticuerpo-receptor que se endocitan y degradan. Los mAbs anti-EGFR disponibles incluyen cetuximab, necitumumab, panitumumab y matuzumab. Dos estudios de fase III, FLEX (Pirker R, *et al.*, 2009) y BMS099 (Lynch T, *et al.*, 2010) han examinado la combinación de cetuximab con quimioterapia doble de platino en NSCLC avanzado mientras que el ensayo FLEX demostró una mejora marginal en la supervivencia global media.

1.6.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA TERAPIA ONCOLÓGICA PULMONAR

El perfil molecular en tumores del grupo NSCLC ha llevado al desarrollo de una clasificación (catálogo diverso), actualmente en proceso de expansión, tanto de las aberraciones genéticas que conducen y sostienen la tumorigénesis, como de mutaciones genéticas activadoras de procesos de señalización celular como ocurre para el EGFR el cual representa el ejemplo prototípico de conductor oncogénico que puede ser modificado o dirigido con fines terapéuticos (Pao W, *et al.*, 2004b; Lynch T, *et al.*, 2004^a).

Numerosos ensayos aleatorios y de meta-análisis han confirmado la superioridad y beneficio del uso de EGFR-TKIs, sobre los efectos tóxicos de la quimioterapia en el tratamiento de pacientes con NSCLC que presentan mutaciones en el EGFR, con ventajas consistentes y significativas en términos de tasa de respuesta objetiva (ORR) y supervivencia libre de progresión (SLP). Aunque una proporción considerable de pacientes tratados con EGFR-TKIs inicialmente logran un control notable de la enfermedad, la progresión ocurre inevitablemente. Dado que las neoplasias evolucionan continuamente y se vuelven resistentes al bloqueo de EGFR, el tratamiento de los pacientes con NSCLC que adquieren resistencia a las terapias dirigidas contra el EGFR representa un desafío (Neel and Bivona, 2017).

Se han descrito varios mecanismos de resistencia adquirida a EGFR-TKIs los cuales se pueden dividir en: mutaciones secundarias en el EGFR tales como la L858R, T790M en el exón 20 de *EGFR*, la amplificación de *MET*, la sobreexpresión del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), la activación del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R), la activación de vías de señalización alternativas PI3K y MAPK y la transformación fenotípica o histopatológica mediante la transición epitelio-mesenquima (EMT) (Sequist L, *et al.*, 2011; Ohashi K, *et al.*, 2013; Yano S, *et al.*, 2017; Mok T, *et al.*, 2009) (Maemondo M, *et al.*, 2010; Rosell R, *et al.*, 2012; Y.-L. Wu *et al.*, 2014^a). Sin embargo, la mutación T790M del EGFR es el mecanismo más común que provoca dicha resistencia, habiéndose detectado hasta en un 50% de los pacientes tratados con los EGFR-TKIs de primera generación erlotinib o gefitinib (Wu S, *et al.*, 2016; Tan, Gilligan, and Pacey 2015; Stewart E, *et al.*, 2015; Huang L and Fu 2015; Morgillo F, *et al.*, 2016).

1.7 TERAPIA DIRIGIDA BASADA EN EGFR-TKIS EN CÁNCER PULMONAR

Las guías actuales (Lim S, *et al.*, 2018; Maconachie R, *et al.*, 2019) recomiendan la prueba mutacional de EGFR en todos los pacientes para identificar aquellos pacientes candidatos a inhibición del receptor EGFR, así como el tratamiento de primera línea con monoterapia basada en EGFR-TKIs (Ettinger D, *et al.*, 2017). Los TKIs son moléculas pequeñas que interfieren con la unión del ATP al dominio tirosina cinasa. Se han desarrollado varias generaciones de EGFR-TKIs, los TKIs de primera generación como erlotinib y gefitinib se unen reversiblemente al sitio de unión de ATP del dominio tirosina cinasa de EGFR. Estudios por meta-análisis han demostrado que la primera generación de EGFR-TKIs como gefitinib y erlotinib mejoró la supervivencia libre de progresión en comparación con la aplicación de quimioterapia con base en derivados de platino (Lee C, *et al.*, 2013).

Por lo tanto, la monoterapia con EGFR-TKIs se ha convertido en el estándar de atención para pacientes con NSCLC avanzado que son positivos para tales mutaciones. Sin embargo, aunque la mayoría de los pacientes que albergan mutaciones sensibilizadoras a EGFR-TKI muestran inicialmente una buena respuesta al tratamiento, después de aproximadamente 9 a 14 meses de dicha terapia adquieren resistencia a estos fármacos. Los EGFR-TKIs de segunda generación afatinib y dacomitinib son inhibidores covalentes irreversibles de EGFR y otros miembros de la familia ErbB (HER2, ErbB3 y ErbB4) (Li D, *et al.*, 2008; Solca F, *et al.*, 2012; Engelman J, *et al.*, 2007). Afatinib se asocia con una mejoría en la PFS en comparación con la quimioterapia a base de derivados del platino (cisplatino) como tratamiento de primera elección para el tratamiento del NSCLC con mutación en EGFR (Sequist L, *et al.*, 2013; Y.-L. Wu *et al.*, 2014b) y puede mejorar la PFS en comparación con gefitinib en pacientes sin tratamiento previo (Paz-Ares L, *et al.*, 2017). Un análisis conjunto de los ensayos de fase III LUX-LUNG 3 y 6 reveló que el afatinib, en comparación con la quimioterapia basada en cisplatino, mostró un beneficio general en

cuanto a supervivencia en un subconjunto de pacientes con deleciones del exón 19 (Yang J, *et al.*, 2015).

Recientemente, el afatinib se comparó con el gefitinib como tratamiento de primera línea, y el afatinib mejoró significativamente la PFS (Park K, *et al.*, 2016). Más recientemente, un estudio aleatorizado de fase III (ARCHER 1050) informó que el TKI dacomitinib fue superior al gefitinib con una mejoría en la PFS en el tratamiento de primera línea del NSCLC con mutación en EGFR (Y.-L. Wu *et al.*, 2017).

A pesar de elevados índices de respuesta inicial en pacientes tratados con EGFR-TKIs inevitablemente estos adquieren resistencia al tratamiento.

Dada la eficacia limitada de los EGFR-TKI de segunda generación para superar la mutación T790M que genera resistencia a los TKI, se han desarrollado EGFR-TKIs de tercera generación. Estos incluyen osimertinib, EGF816, olmutinib, PF-06747775, YH5448, avitinib y rociletinib. La característica de estos agentes de tercera generación es que tienen una actividad significativamente mayor en las células con mutación en EGFR que en las células EGFR WT, lo que las hace mutante-selectivas (Wang, Cang, and Liu, 2016). Estos inhibidores de tercera generación tienen estructuras centrales de pirimidina para ir contra la mutación T790M. Al unirse covalentemente a la cisteína (C797) del bolsillo de unión a ATP, con alta selectividad a la mutación T790M, los inhibidores de tercera generación ofrecen mejores índices de respuesta a pacientes con resistencia a inhibidores de primera y segunda generación. Los resultados de la eficacia del tratamiento con inhibidores de tercera generación han demostrado mejores resultados clínicos en comparación con inhibidores de primera y segunda generación y se tiene una tendencia hacia la mejora de la supervivencia general (Soria J, *et al.*, 2018).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio del genoma, epigenoma y su correlación con el transcriptoma en cáncer, para la identificación de las aberraciones moleculares en enfermedades oncológicas, entre otras como alteraciones en la expresión de factores de transcripción, cambios aberrantes en el código de histonas y metilación de secuencias del DNA se han visto involucrados en la progresión histopatológica maligna y mecanismos de resistencia a la terapia basada en fármacos oncológicos, como ocurre en las enfermedades malignas pulmonares. Al respecto, trabajos recientes han destacado el posible papel que llevan a cabo los factores de transcripción tipo Homeobox como MEOX2, al desregular la expresión de genes que codifican para miembros de vías de señalización, entre ellos el gen efector GLI-1 miembro de la vía Sonic Hedgehog tanto en modelos de cáncer pulmonar *in vitro*, como en tumores *in vivo* derivados de modelos animales, o bien derivados de pacientes con cáncer pulmonar, sugiriendo en parte una posible explicación al aumento en la capacidad de resistencia a la terapia fármaco-oncológica tanto basado en cisplatino, como en la terapia dirigida basada en EGFR-TKIs en pacientes con mal pronóstico, tanto en ausencia, como en presencia de un estatus mutacional para el gen EGFR. Sin embargo, los mecanismos asociados y/o involucrados se desconocen actualmente. No obstante, evidencias preliminares recientes han sugerido que alteraciones en la activación por fosforilación de algunos de los miembros de las vías de señalización de EGFR, como PI3K-AKT-mTOR y MAPK podrían estar mediadas por los niveles de sobreexpresión del eje transcripcional MEOX2-GLI1, desempeñando un probable papel molecular de resistencia a fármacos oncológicos como cisplatino y terapia dirigida “EGFR-TKIs” en cáncer pulmonar. Por lo que, el presente proyecto se propuso determinar si la activación por fosforilación de miembros de la vía de EGFR, son modulados en ausencia y/o presencia de la expresión de MEOX2 y/o GLI-1 empleando para ello, modelos celulares *in vitro* de cáncer pulmonar de humano, y con ello

contribuir en determinar sobre la participación de MEOX2 y/o GLI-1 como potenciales blancos terapéuticos intermediarios de los mecanismos de resistencia adquirida a EGFR-TKIs en cáncer pulmonar.

3. HIPÓTESIS

Actualmente, el eje transcripcional MEOX2-GLI1 asociado con la resistencia a la terapia fármaco-oncológico, se desconoce su mecanismo de acción molecular en cáncer pulmonar, su estudio en la activación de las vías de señalización EGFR-TKI, permitirá identificar las alteraciones moleculares involucradas en la resistencia al tratamiento oncológico de terapia dirigida en cáncer pulmonar.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de los factores de transcripción MEOX2-GLI1 en alteraciones de miembros de la vía de EGFR (AKT y ERK), y su impacto en la capacidad de resistencia al tratamiento oncológico en células de cáncer pulmonar.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la sensibilidad a cisplatino vs TKI-erlotinib en modelos celulares de cáncer de pulmón EGFR silvestre (células A549, NCI-NH2347), y EGFR-mutadas (células NCI-H1975, HCC827).
2. Determinar los niveles de expresión basal y de activación de AKT y ERK, además de MEOX2 y GLI-1 en células de cáncer pulmonar EGFR silvestre (A549, NCI-NH2347) vs EGFR-mutado (HCC827, NCI-H1975).
3. Determinar los efectos en la expresión basal y de activación (fosforilación) de AKT y ERK en células de cáncer pulmonar posterior al tratamiento basado en cisplatino vs TKI-erlotinib.
4. Determinar el efecto de silenciamiento genético de MEOX2 y GLI-1 mediante el uso de siRNAs vs shRNAs en la expresión/activación de AKT y ERK en células de cáncer de pulmón.
5. Determinar los cambios en la sensibilidad al tratamiento basado en cisplatino y TKI-erlotinib en células de cáncer de pulmón por efecto de silenciamiento genético de MEOX2 y GLI-1.

Líneas celulares de NSCLC

- A549 (EGFR wildtype, KRAS G12S) y NH2347 (EGFR wildtype)
 - H1975 (L858R y T790M)
 - HCC827 (del E746-A750)

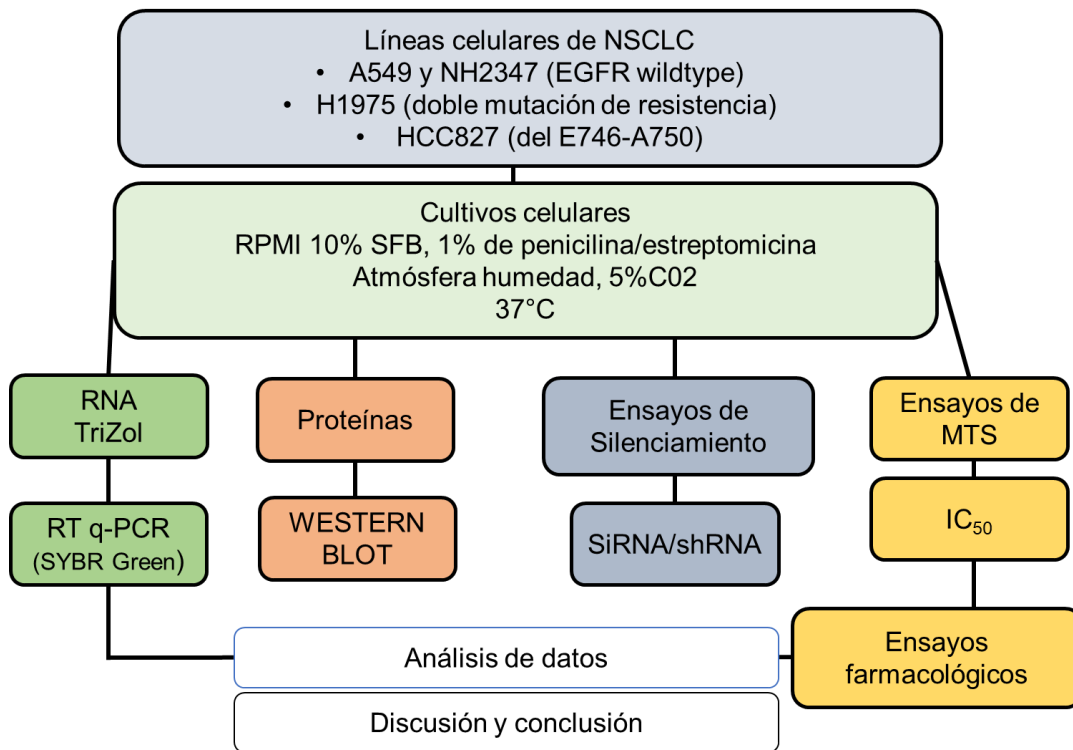


Figura 3. CORREGIR Diseño Experimental. En este trabajo se utilizaron líneas celulares de NSCLC A549 (EGFR-silvestre, mutación G12C de KRAS), NH2347 (EGFR-silvestre), NCI-H1975 (L858R y T790M) y HCC827 (del E746-A750) para realizar ensayos de qRT-PCR, Western Blot, ensayos de silenciamiento mediante siRNA y shRNA y ensayos de viabilidad celular mediante la técnica de MTS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Las líneas celulares A549, NCI-H2347 (EGFR silvestre, mutación G12C en KRAS), HCC827 (del E746-A750 en el exón 19) y NCI-H1975 (mutación L858R y T790M, mutaciones ausentes en KRas y ALK) de cáncer de pulmón (adenocarcinoma) humano se obtuvieron del ATCC (American Type Culture Collection). Los cultivos celulares se mantuvieron medio RPMI 1640 (Biowest), suplementado con suero fetal bovino (Biowest) al 10% y penicilina estreptomicina al 1% (Biowest), en una incubadora a 37°C y 5% de CO₂.

Extracción de RNA y qRT-PCR

La extracción del RNA total se realizó mediante el método de TRIzol (Invitrogen). La síntesis de cDNA se realizó mediante el kit SuperScript II (RNasa H) (Invitrogen) a partir de 1 µg de RNA total. Para la reacción de qRT-PCR se utilizaron 20ng de cDNA. La detección de la expresión de los RNAm se realizó mediante SYBR GREEN (RealQ Plus Master Mix Green) en un volumen total de reacción de 15 µL. La qRT-PCR se realizó en el equipo LightCycler 480 Real-Time PCR (Roche, Alemania). Los niveles de expresión del RNAm se normalizaron con la expresión del gen endógeno GAPDH. El análisis de expresión se realizó utilizando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabla 1. Secuencia de Oligonucleótidos		
Gen	Secuencia	Tm °C
GAPDH	F5'-TCTGCTCCTCCTGTTTCGAC-3'	60

	R5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	
MEOX2	F5'-GTCAGAAGTCAACAGCAAACCCAG-3' R5'-CACATTCACCAGTTCCTTTTCCCGAGCC-3'	60
GLI-1	F5'-CCAGGAATTTGACTCCCAAG-3' R5'-GGCTTTGAAGGGCCTCAG-3'	60

Tabla 1. La tabla muestra cada una de las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para determinar la expresión de los genes blanco mediante qRT-PCR y la temperatura de alineamiento.

Ensayos de Transfección Transitoria (RNA de interferencia “siRNAs”)

Para los ensayos de la disminución de la expresión transitoria del RNAm blanco se utilizó un siRNA dirigido para MEOX2 y GLI-1 además de un siRNA control (Santa Cruz Biotechnology. MOX-2 siRNA: sc-106233. GLI-1-siRNA: sc-37911 control siRNA: sc-37007). Se sembraron 290 000 células A549 y 300 000 células para la línea NCI-H1975 en cajas multi-pozos de 6 y se incubaron toda la noche, al día siguiente, se transfectaron con 20 pmol de cada siRNA mediante el método de lipofectamina 2000 (Invitrogen). Después de 48h las células se cosecharon para realizar la extracción de RNA y proteínas para futuros ensayos.

Ensayos de Western Blot

Las proteínas se extrajeron con buffer RIPA (Tris pH 7,4 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, SDS 0,1%, EDTA 2 μ M) adicionado con inhibidor de proteasas a partir de 1×10^6 células y se cuantificaron mediante el método de Lowry, la cuantificación de proteínas se determinó a una longitud de onda de 750 nm en el equipo EPOCH.

Para el Western blot se utilizaron 30 μ g de proteína total y se separaron en geles de poliacrilamida-SDS al 12%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-rad), el bloqueo se realizó con solución de bloqueo (Blotting-Grade Blocker, Bio-rad), o bien BSA al 5% para la incubación de anticuerpos dirigidos contra las proteínas fosforiladas durante 2h. La incubación de los anticuerpos primarios se realizó toda la noche a 4°C empleando las siguientes diluciones correspondientes: GLI-1: 1:500 (abcam), MEOX2: 1:750, AKT:1:750, ERK: 1:750, p-AKT: 1:750 y p-ERK:1:750. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó por 2h: anti-Rabbit 1:10,000 y anti-mouse: 1:10,000 (genetex) según las instrucciones que el proveedor señala. Las marcas se revelaron con el kit de detección quimioluminiscente ECL (BioRad).

Ensayos de viabilidad celular (MTS)

Los cultivos celulares se sembraron en placas de 96 pozos en una densidad de 3000 células para A549 y NCI-H2347 y 4000 células para NCI-H1975 y HCC827. Los cultivos celulares se incubaron toda la noche para la adherencia celular. Se preparó un stock a 10 mM del EGFR-TKI erlotinib (Sigma Aldrich) con DMSO y se prepararon las siguientes diluciones: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000, 20, 40, 80,

200 μM , manteniendo un porcentaje de DMSO no mayor al 1%. Para el caso de cisplatino (Sigma Aldrich) se preparó un stock a 5 mM a partir de 5 mg de la sal y se disolvió en NaCl al 0.9%, se prepararon las siguientes diluciones: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000, 30, 50, 80 μM . La incubación con el fármaco se realizó por 72 h para el erlotinib y 48 h para cisplatino, pasado el tiempo, se agregó 20 μL del reactivo de MTS CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) y se incubó por 2 h para el caso de las líneas celulares A549 y NCI-H2347, para las líneas celulares NCI-H1975 y HCC827 4h, la reacción se detuvo con SDS 10% y se leyó a una longitud de onda de 490nm y un longitud de onda de 690 nm para restar el fondo, la viabilidad fue calculada como el porcentaje del control (células con medio RPMI con 0.2% de DMSO para el caso del EGFR-TKI o células no tratadas para cisplatino) después de restar la absorbancia de fondo. La determinación de IC_{50} , IC_{25} , e IC_{10} se calculó mediante el programa GraphPad Prism 6. Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes por cuadruplicado.

Análisis estadístico

Se llevaron a cabo pruebas de T y ANOVA de dos vías, para analizar de manera comparativa diferencias entre las diferentes líneas celulares de cáncer pulmonar empleadas; los valores de $P \leq 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando los programas de software GraphPad Prism versión 6 y el programa Sigma plot 10.0.

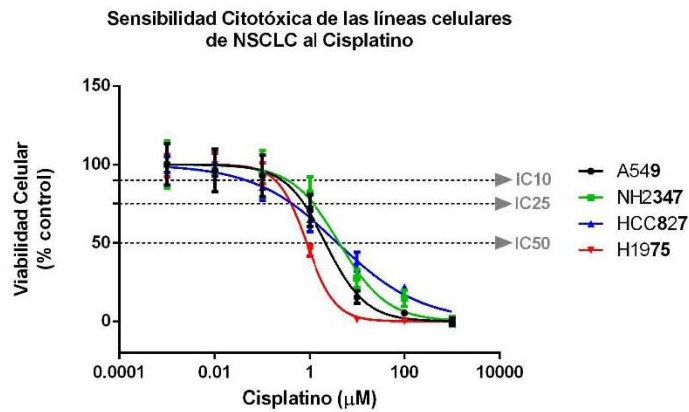
5. RESULTADOS

6.1 ANÁLISIS DE LAS CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 (IC₅₀) FRENTE A CISPLATINO Y EGFR-TKI (ERLOTINIB) EN CÉLULAS DE CÁNCER PULMONAR

Para establecer la concentración citotóxica o inhibitoria 50 (IC₅₀) de las líneas celulares de NSCLC a los fármacos *in vitro*, las células se trataron con cisplatino durante 48h y erlotinib durante 72h y se realizaron ensayos de citotoxicidad celular mediante la técnica MTS. En la figura 4(A) se muestra que, al tratar las células con cisplatino, se observó citotoxicidad en la línea celular NCI-H1975 a una concentración de 0.8597µM, mientras que en las demás líneas analizadas (A549, NH2347 y HCC827) se observó citotoxicidad a concentraciones de 2.440 µM, 5.302 µM y, 5.109 µM respectivamente.

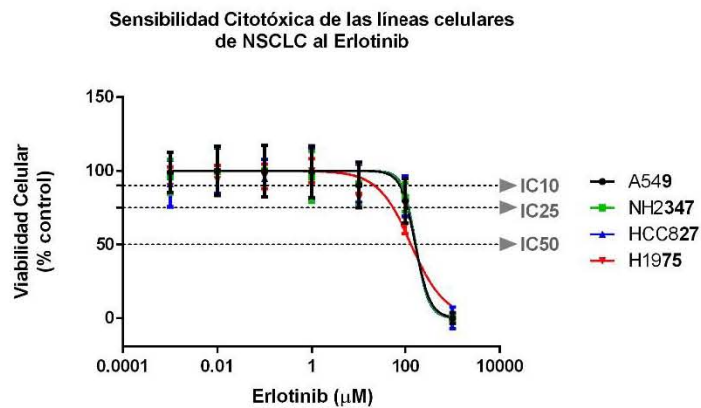
En la figura 4(B) se muestra que la citotoxicidad de la línea celular A549 para el TKI erlotinib se presenta a una concentración de 223.2 µM, mientras que para la línea NCI-H1975 se presenta a una concentración de 104.8 µM presentando una IC₅₀ menor en comparación con las células NCI-NH2347 (262.4 µM) y (HCC827 246.6 µM), esto difiere con reportes previos donde células NCI-NH2347 (EGFR silvestre) y HCC827 (del E746-A750 en el exón 19) presentan mayor sensibilidad al tratamiento con erlotinib, ya que las mutaciones presentes en dichas líneas celulares confieren sensibilidad a los fármacos EGFR-TKIs en comparación con la línea NCI-H1975 como lo reportan Wang *et al* (2015) y Abourbeh *et al* (2015).

A)



Cisplatino					Réplicas Biológicas
Línea Celular	LogIC50 fármaco (media±D.E.)	IC50 (µM) fármaco (media±D.E.)	IC25 (µM) fármaco (media±D.E.)	IC10 (µM) fármaco (media±D.E.)	
A549	0.3397±0.0527	2.186±0.8991	0.7456±0.1645	0.2543±0.0251	3
NH2347	0.6306±0.0654	4.272±1.3250	1.194 ±0.1044	0.3338±0.0278	3
HCC827	0.5920±0.0424	3.908±1.7386	0.4171±0.2121	0.0445±0.0245	3
H1975	-0.065±0.0171	0.8598±0.1539	0.3980±0.0948	0.1842±0.0579	3

B)



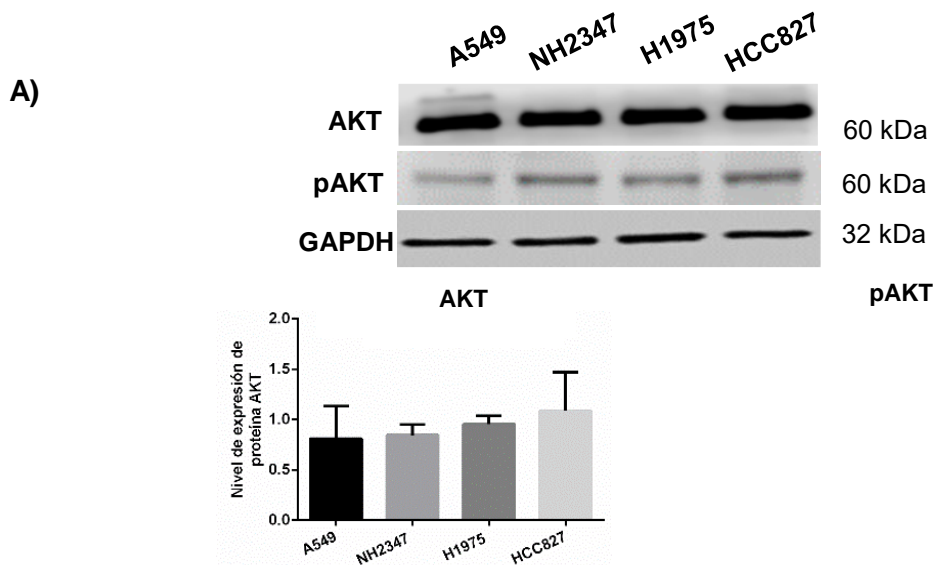
Erlotinib					Réplicas Biológicas
Línea Celular	LogIC50 fármaco (media±D.E.)	IC50 (µM) fármaco (media±D.E.)	IC25 (µM) fármaco (media±D.E.)	IC10 (µM) fármaco (media±D.E.)	
A549	2.212±0.2538	163±0.8660	109.6±6.2217	73.68±7.9560	3
NH2347	2.218±0.3280	165.4±6.8090	114.9±10.5453	79.77±11.4553	3
HCC827	2.220±0.4076	165.9±3.3857	116.8±11.4424	82.8±14.5408	3
H1975	2.118±0.0536	131.3±36.2623	52.83±39.6219	21.26±29.1304	3

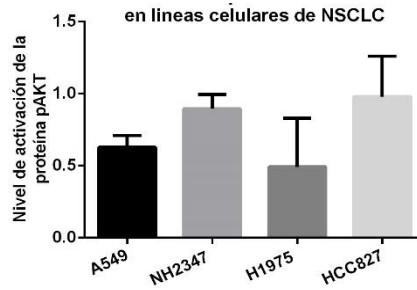
Figura 4. Análisis de IC₅₀ para los fármacos cisplatino y erlotinib en líneas celulares de cáncer pulmonar (NSCLC). Ensayo representativo de citotoxicidad MTS a 48h o 72h. **(A)** tratamiento con cisplatino, **(B)** tratamiento con erlotinib. El eje x indica el porcentaje de viabilidad celular y el eje Y la

representación logarítmica de la concentración del fármaco en escala micromolar. Los datos se presentan como media \pm D.E., de 3 réplicas biológicas independientes.

6.2 ANÁLISIS DEL NIVEL BASAL DE PROTEÍNA DE LOS GENES ERK Y AKT EN CÉLULAS DE CÁNCER PULMONAR EGFR-SILVESTRE Y EGFR-MUTADAS.

Con el objetivo de determinar los niveles endógenos de proteína de los genes AKT, ERK, y su correspondiente nivel de activación por fosforilación (pAKT y pERK) en células de cáncer pulmonar EGFR-silvestre y EGFR-mutadas, se llevó a cabo la extracción de proteínas para realizar ensayos de Western Blot. En la figura 5(A) se muestran los niveles de expresión y activación de AKT en las 4 líneas celulares del grupo NSCLC, donde se puede observar que los niveles de AKT total no presentan variación estadísticamente significativa entre las líneas celulares, así mismo para el caso de la forma activa (pAKT), el nivel de fosforilación en las 4 líneas celulares presenta un mayor nivel en las líneas celulares NCI-NH2347 y NCI-HCC827 en comparación con las demás líneas celulares, aunque de manera no significativa. Por su parte en la figura 5(B) se observa que los niveles de expresión de ERK total no presentan variación estadísticamente significativa entre las 4 líneas celulares al igual que el nivel de fosforilación de ERK. Se utilizó GAPDH como control de carga y para normalizar los datos, los datos se presentan como media \pm D.E., de 3 réplicas biológicas independientes.





B)

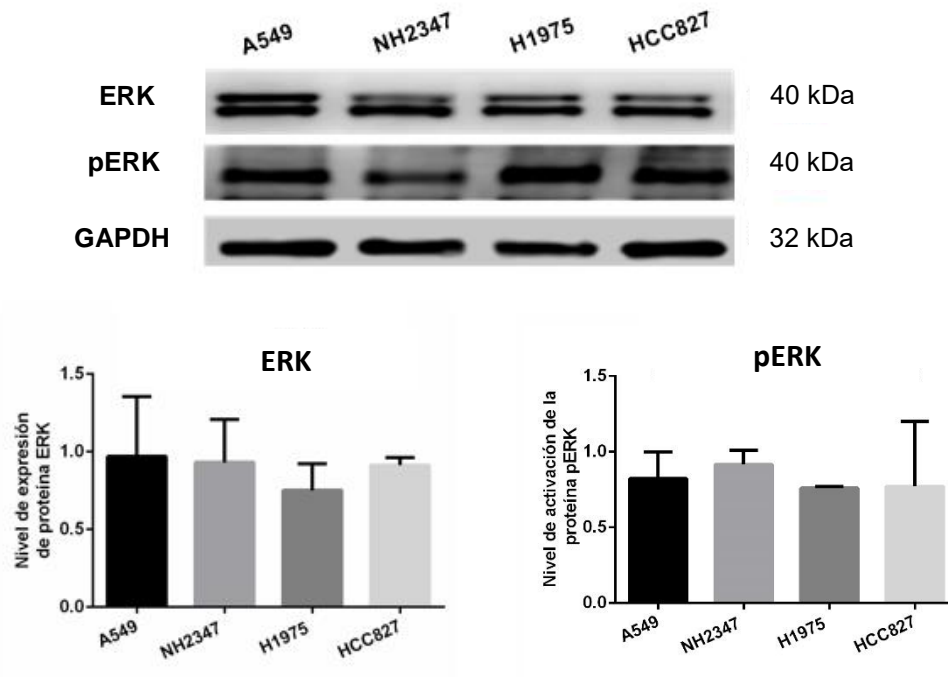


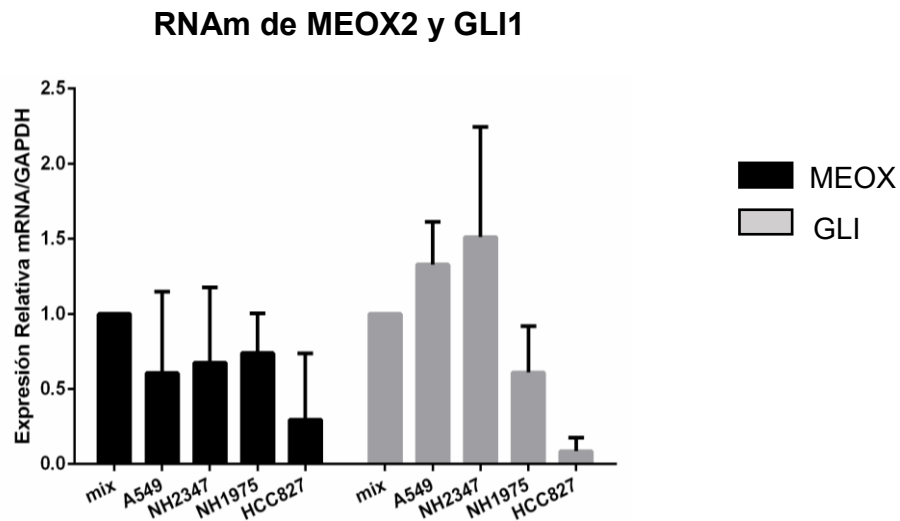
Figura 5. Análisis de los niveles de expresión de AKT, y ERK, con su respectivo nivel de activación por fosforilación (pERK y pAKT) mediante ensayos de Western Blot en líneas celulares de cáncer de pulmón (NSCLC). En (A) se muestran los niveles de expresión y activación de AKT; mientras que en (B) se muestran los niveles de expresión y activación de ERK. Niveles de GAPDH fueron analizados como control de carga. Los datos se presentan como media \pm D.E., de 3 réplicas biológicas independientes.

6.2.1 ANÁLISIS DEL NIVEL DE EXPRESIÓN BASAL DE MEOX2 Y GLI-1 EN LÍNEAS CELULARES DEL GRUPO NSCLC.

A continuación, para determinar un posible papel de MEOX2 y GLI-1 en la resistencia al tratamiento oncológico pulmonar se determinaron los niveles de expresión de MEOX2 y

GLI-1 en las líneas celulares de NSCLC: A549, NCI-H1975, HCC827 y NCI-NH2347 mediante qRT-PCR y Western Blot. En la figura 6(A) se muestran los resultados obtenidos para los niveles de RNA mensajero de MEOX2 y GLI-1, se observa que MEOX2 y GLI-1 son detectables en todas las líneas celulares de NSCLC, sin embargo, los niveles de RNA m de MEOX2 son muy bajos en las líneas celulares. En cuanto a la expresión de GLI-1 hay un nivel de expresión mayor en la línea celular A549 a nivel de RNAm, lo cual convierte a esta línea celular en un modelo adecuado para este trabajo. En la figura 6(B) con respecto a los niveles de expresión a nivel de proteína la expresión de MEOX2 en la línea celular A549 es mayor, aunque de una manera no significativa, en comparación con las demás líneas celulares, por otra parte, el nivel de expresión de GLI-1 en la línea celular A549 y HCC827 es menor en comparación con las demás líneas celulares de NSCLC. Los resultados se muestran como la media \pm D.E., de 3 réplicas biológicas independientes.

A)



B)

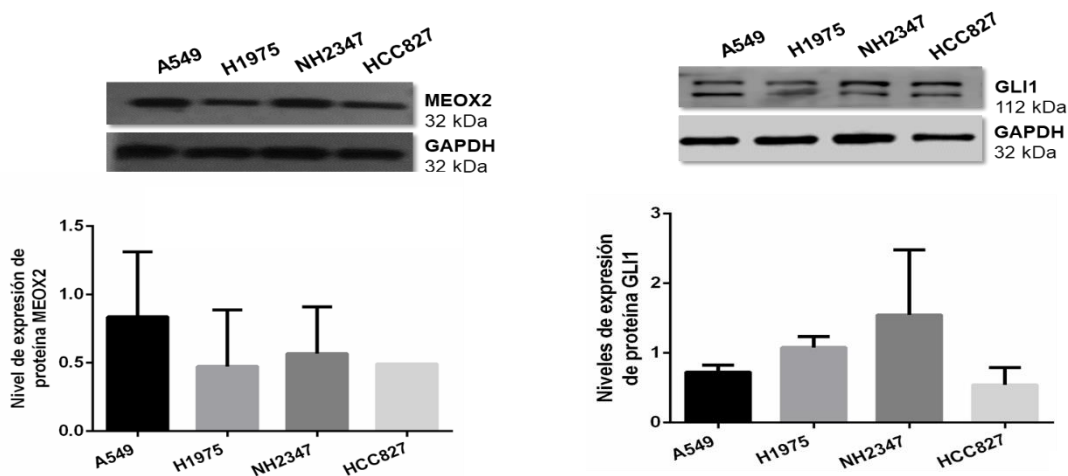


Figura 6. Análisis del nivel de expresión basal del RNAm y proteína de MEOX2 y GLI-1 mediante qRT-PCR y Western Blot, respectivamente, en líneas celulares NSCLC. En (A) se muestra el nivel de RNAm de MEOX2 y GLI-1 en las líneas celulares de NSCLC mediante qRT-PCR. En (B) se muestra el nivel de expresión de las proteínas MEOX2 y GLI-1 mediante Western Blot. Se utilizó GAPDH como control de carga tanto para la qRT-PCR como para el Western Blot. Los datos representan la media \pm D.E., de 3 réplicas biológicas independientes.

6.3 ANÁLISIS DEL EFECTO DE CISPLATINO Y TKI-ERLOTINIB SOBRE LA ACTIVACIÓN DE MIEMBROS DE LA VÍA EGFR EN CÉLULAS DE CÁNCER PULMONAR A549.

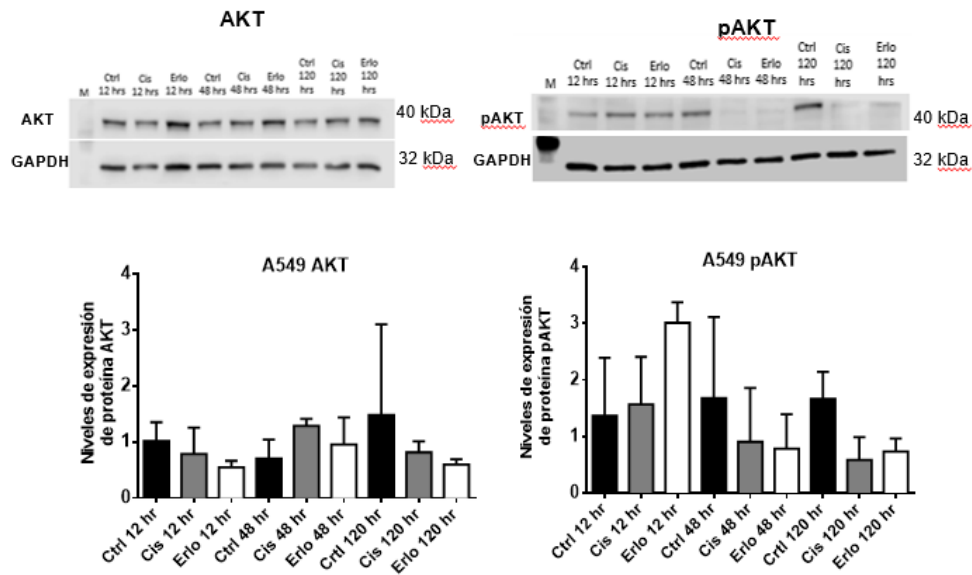
Para determinar los cambios en la fosforilación de elementos río abajo de EGFR (AKT y ERK) frente a tratamiento por EGFR-TKIs y cisplatino en líneas celulares de cáncer pulmonar A549 y NCI-H1975, 1×10^6 células se sembraron en cajas petri, se permitió su adherencia por 24 horas y las células fueron tratadas con erlotinib o cisplatino durante 12, 48 o 120 h. Posteriormente, al transcurrir el tiempo de exposición a los fármacos, se recuperaron las células para la extracción de proteínas y se realizaron ensayos de Western

blot para determinar los niveles de AKT y ERK totales, así como los niveles de activación (pAKT y pERK).

En la figura 7(A) se muestran los niveles de expresión de AKT total y pAKT en la línea celular A549, se observa que los niveles de expresión de AKT disminuyen aunque no de una manera significativa tanto en el tratamiento con erlotinib como con cisplatino al exponerse al fármaco durante 12 h, mientras que al exponerse los fármacos durante 48 horas los niveles de AKT aumentan tanto con erlotinib como con cisplatino, disminuyendo de la misma manera los niveles de AKT y pAKT a las 120 h de exposición al fármaco.

En la figura 7(B) se muestran los resultados de los niveles de expresión de ERK total y pERK en la línea celular A549 después del tratamiento con cisplatino y erlotinib, se observa que los niveles de ERK total aumentan tras la exposición durante 12, 48 y 120 h con erlotinib o con cisplatino, mientras que los niveles de activación de ERK disminuyen al tratarse las células con erlotinib durante 12, 48 o 120h. Los datos se presentan como la media \pm D.E., de 4 réplicas biológicas independientes.

A)



B)

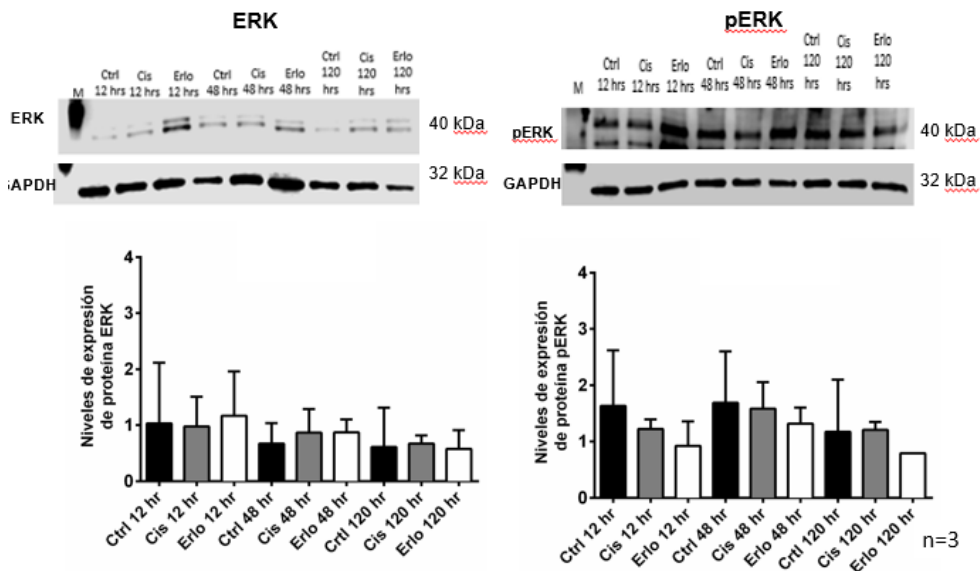
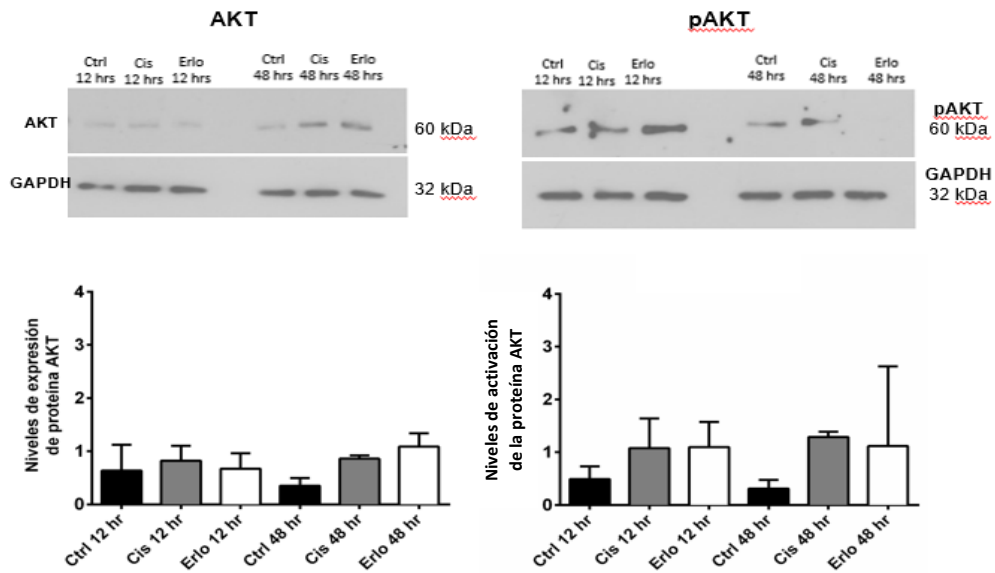


Figura 7. Análisis de los niveles de expresión de AKT y ERK, y su nivel de activación por fosforilación (pAKT y pERK) en la línea celular A549 posterior al tratamiento con cisplatino y erlotinib. (A) Análisis de la expresión de AKT y pAKT en células A549 posterior al tratamiento con erlotinib y cisplatino a 12, 48 y 120 h. (B) Análisis de expresión y activación de ERK en células A549 posterior al tratamiento con erlotinib y cisplatino a 12, 48 y 120 h. Se utilizó GAPDH como control de carga tanto para la qRT-PCR como para el Western Blot. Los datos representan la media \pm D.E., de 4 réplicas biológicas independientes.

6.3.1 ANÁLISIS DEL EFECTO DE CISPLATINO Y TKI-ERLOTINIB SOBRE LA ACTIVACIÓN DE MIEMBROS DE LA VÍA EGFR EN CÉLULAS DE CÁNCER PULMONAR NCI-H1975

Para determinar los cambios en la fosforilación de elementos río abajo de EGFR (AKT y ERK) frente a tratamiento por EGFR-TKIs y cisplatino en la línea celular de cáncer pulmonar NCI-H1975, se realizó lo anteriormente descrito para la línea, al transcurrir el tiempo de exposición a los fármacos, se realizó la extracción de proteínas y se realizaron ensayos de Western blot para determinar los niveles de AKT y ERK totales, así como los niveles de activación (pAKT y pERK). En la figura 8(A) se muestran los resultados de los niveles de expresión y activación de AKT en la línea celular NCI-H1975 después del tratamiento con cisplatino y TKI-erlotinib se observa que los niveles de expresión y activación de AKT aumentan en los diferentes tiempos de exposición al fármaco ya sea con erlotinib o cisplatino. En la figura 8(B) se observa una tendencia a que los niveles de ERK total disminuyan, aunque de una manera no significativa tanto con erlotinib como con cisplatino tras la exposición durante 12, 48 y 120 h, mientras que los niveles de activación de ERK aumentan tanto con erlotinib como con cisplatino. Los datos se presentan como la media \pm D.E., de 2 réplicas biológicas independientes.

A)



B)

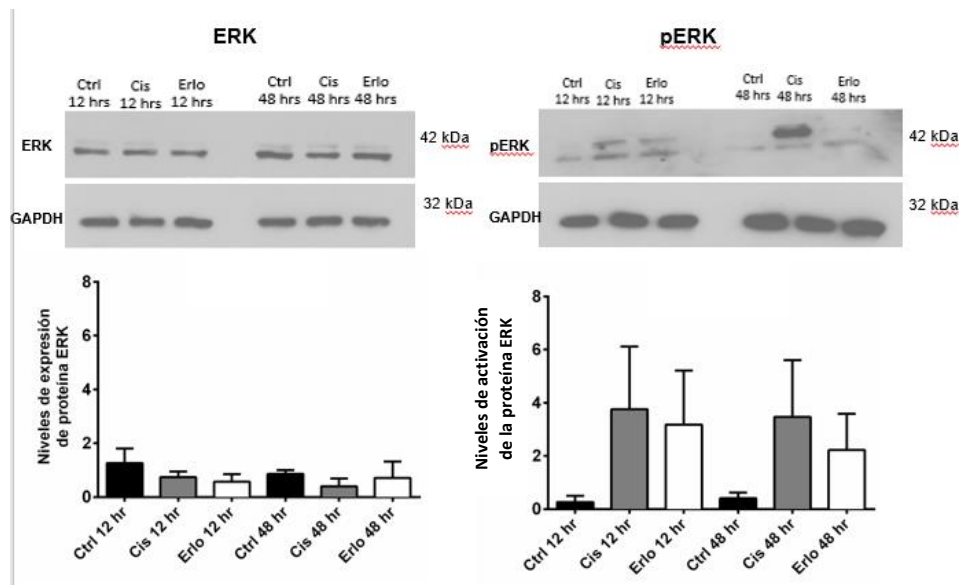
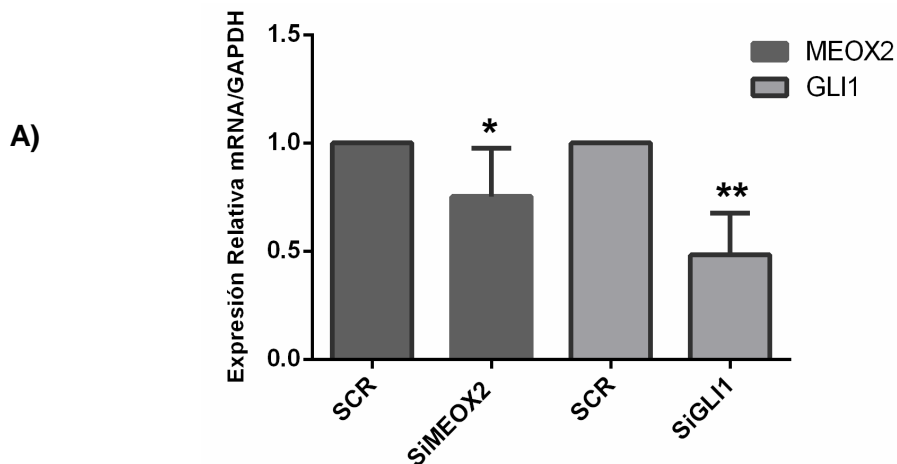


Figura 8. Análisis de los niveles de proteína de los genes AKT y ERK, y su nivel de activación por fosforilación pAKT y pERK en la línea celular NCI-H1975 posterior al tratamiento con cisplatino y TKI-erlotinib a 12, 48 y 120 h. (A) niveles de expresión de AKT y pAKT. (B) Niveles de expresión de ERK y pERK. La proteína GAPDH fue usada como control de carga. Los datos se presentan como la media \pm D.E., de 2 réplicas biológicas independientes.

6.4 SILENCIAMIENTO GENÉTICO Y SU VALIDACIÓN EN LOS GENES MEOX2 Y GLI-1 MEDIANTE ENSAYOS DE qRT-PCR Y WESTERN BLOT

Al establecer que los niveles de expresión de MEOX2 y GLI-1 son detectables en la línea celular A549, la pregunta es si la actividad de los genes contribuye a la resistencia al tratamiento oncológico y si existe algún tipo de sinergia con la vía de EGFR. Para probar esto, las células A549 se transfectaron transitoriamente con siRNA dirigidos contra MEOX2 (siMEOX2), GLI-1 (siGLI-1) o con un control scramble (siSCR). En la figura 9(A) se muestra la validación del silenciamiento a nivel de RNAm mediante ensayos de qRT-PCR, se observa que los niveles tanto de MEOX2 como de GLI-1 en la línea celular A549 disminuyen de manera significativa en comparación con el (siSCR). Los datos se presentan como media \pm D.E., de 4 réplicas biológicas independientes vs (siSCR). * $P < 0.05$, ** $P < 0.0001$. En la figura 9(B) se muestra la validación del silenciamiento de MEOX2 y GLI-1 a nivel de proteína mediante Western blot, se observa que los niveles de MEOX2 ($P = 0.0276$) y GLI-1 ($P = 0.0010$) disminuyeron de manera significativa en la línea celular A549 en comparación con el control (siSCR). Los datos se presentan como la media \pm D.E., de 2 réplicas biológicas independientes * $P < 0.05$ vs siSCR.



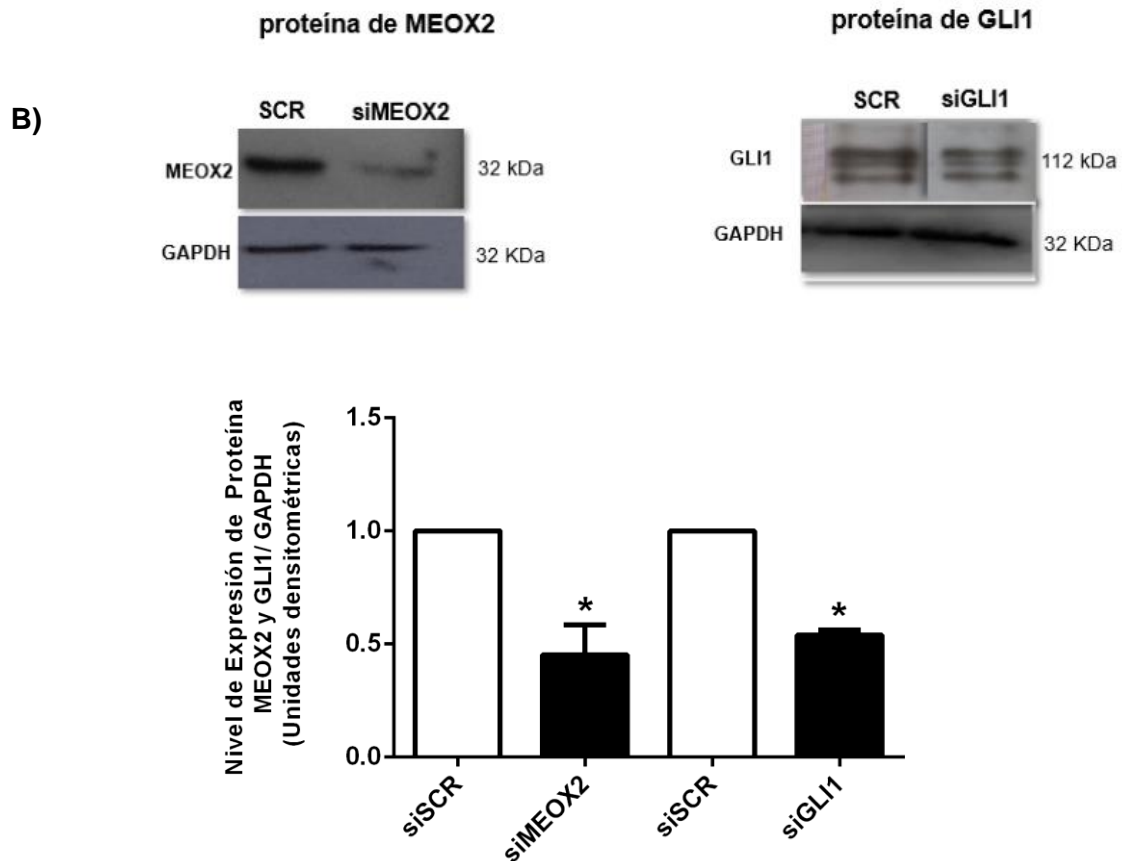


Figura 9. Validación del silenciamiento genético transitorio de MEOX2 y GLI-1 en células A549 (modelo siA549). **A)** El silenciamiento mediado por siRNA de MEOX2 y GLI-1 se evaluó mediante qRT-PCR usando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para determinar la expresión génica relativa respecto al siSCR usando GAPDH para normalizar los datos. **B)** El silenciamiento mediado por siRNA de MEOX2 y GLI-1 se validó mediante Western Blot usando GAPDH para normalizar. Las barras representan la media \pm D.E., de 2 réplicas biológicas independientes. * $P < 0.05$ vs siSCR.

6.4.1 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO GENÉTICO DE MEOX2 Y GLI-1 EN LA EXPRESIÓN Y FOSFORILACIÓN DE AKT Y ERK EN CÉLULAS A549, TRANSFECTADAS TRANSITORIAMENTE POR siRNAs

Para determinar si el efecto de los silenciamientos de MEOX2 y GLI-1 mediante siRNAs afecta en los niveles de activación de la vía de señalización de EGFR se realizaron ensayos

de Western Blot para medir los niveles de fosforilación de AKT y ERK posterior al silenciamiento de MEOX2 y GLI-1.

En la figura 10(A) se muestran los niveles de expresión y activación de AKT posterior al silenciamiento mediante siRNAs de MEOX2 o GLI-1, se observa que los niveles de expresión de AKT total permanecen sin cambios tanto con el silenciamiento de MEOX2 ($P=0.0408$) como con el silenciamiento de GLI-1 ($P=0.20607$), mientras que los niveles de activación de AKT disminuyen tras el silenciamiento ya sea de MEOX2 ($P=0.0082$) o GLI-1 ($P=0.0160$). En la figura 10(B) se muestran los niveles de expresión y activación de ERK posterior al silenciamiento mediante siRNAs de MEOX2 o GLI-1, se observa que los niveles los niveles de expresión de ERK total al igual que los niveles de AKT total permanecen sin cambios tanto en silenciamiento de MEOX2 ($P=0.5361$) como en silenciamiento de GLI-1 ($P=0.0659$); mientras que los niveles de expresión de pERK, muestran variaciones con tendencia a la disminución de los niveles de activación de ERK durante el silenciamiento de MEOX2 ($P=0.7953$) y GLI-1 ($P=0.89485$). Los datos se presentan como la media \pm D.E., de 2 réplicas biológicas independientes. $*P<0.05$ vs siSCR. Se utilizó GAPDH como control de carga, así como empleado para normalizar los niveles de proteína total.

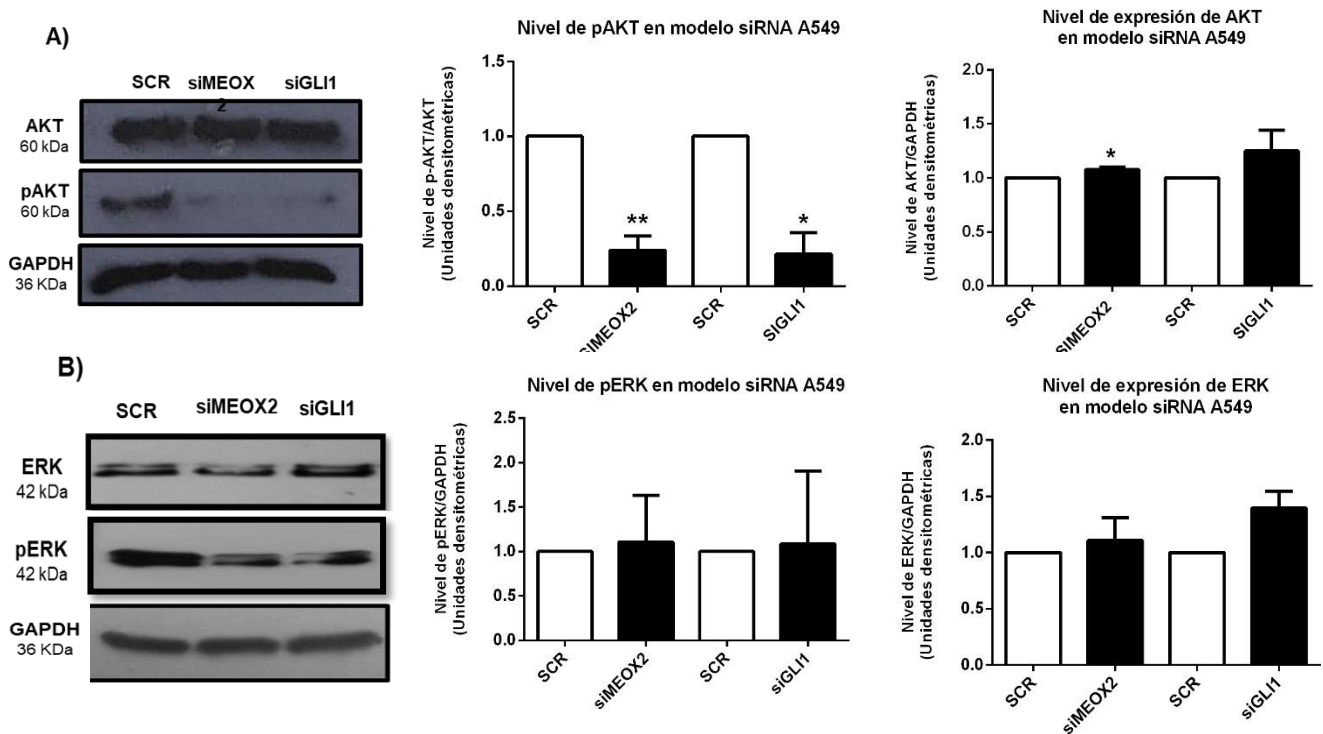


Figura 10. MEOX2 y GLI-1 modulan los niveles de activación/fosforilación de AKT. A) Los niveles de activación de AKT se determinaron mediante Western Blot usando AKT total para normalizar. B) Los niveles de fosforilación de ERK se determinaron mediante Western Blot usando ERK total para normalizar. Para normalizar los niveles de proteínas totales (AKT y ERK) se utilizó a GAPDH. Las barras representan la media \pm D.E., de 2 réplicas biológicas independientes (* P = <0.05 vs siSCR).

6.5 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO GENÉTICO DE MEOX2 y GLI-1 SOBRE LOS NIVELES DE PROTEÍNA TOTAL Y FOSFORILADA DE AKT Y ERK EN CÉLULAS A549 (TRANSFECTADAS ESTABLEMENTE POR shRNA)

A continuación, para corroborar los resultados previos se llevaron a cabo ensayos de transfección estable mediante shRNAs para silenciar a MEOX2 y GLI-1 en la línea celular de cáncer pulmonar A549. En la figura 11 se muestra la validación del silenciamiento de MEOX2 y GLI-1 mediante la técnica de Western Blot. Se observa que los niveles de expresión de MEOX2 y GLI-1 disminuyen con respecto al control (shSCR) cuando hay un

silenciamiento tanto de MEOX2 ($P=0.0670$) como de GLI-1 ($P=0.3769$), aunque de una manera no significativa. Los datos se presentan como la media \pm D.E., de 3 réplicas biológicas independientes.

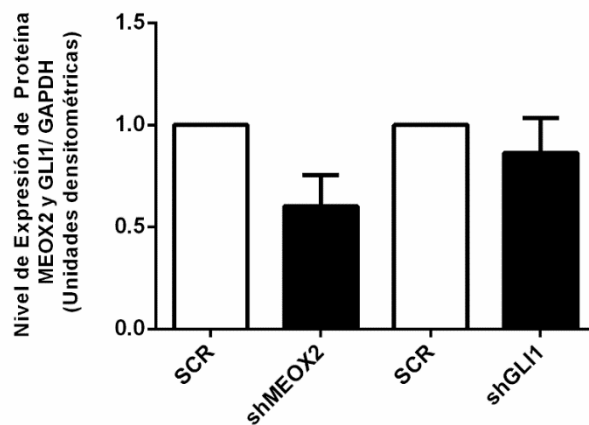


Figura 11. Análisis de validación del silenciamiento estable de MEOX2 y GLI-1 en células de cáncer pulmonar A549 (modelo shA549). El silenciamiento mediado por shRNA de MEOX2 y GLI-1 se validó mediante Western Blot, análisis de normalización se llevó a cabo empleando GAPDH como control de carga. Las barras representan la media \pm D.E., de 3 réplicas biológicas independientes * $P= <0.05$ vs shSCR.

6.5.1 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO GENÉTICO DE MEOX2 Y GLI-1 SOBRE LOS NIVELES DE PROTEÍNA TOTAL Y FOSFORILADA DE AKT Y ERK EN CÉLULAS A549 TRANSFECTADAS POR shRNAs.

Para determinar si el efecto del silenciamiento de MEOX2 y GLI-1 mediante shRNAs afecta los niveles de activación de AKT y ERK se realizaron ensayos de Western Blot. En la figura 12(A) se muestran los niveles de expresión y activación de AKT posterior al silenciamiento mediante shRNAs de MEOX2 o GLI-1, se observa que los niveles de expresión de AKT total permanecen sin cambios tanto con el silenciamiento de MEOX2 como con el silenciamiento de GLI-1, mientras que los niveles de pAKT disminuyeron significativamente tras el silenciamiento ya sea de MEOX2 ($P=0.0009$) o GLI-1 ($P=0.0004$). Por otro lado, en la figura 12(B) muestran los niveles de *expresión* y activación de ERK posterior al silenciamiento de MEOX2 y GLI-1, se observa que los niveles de expresión de ERK total permanecen sin cambios en cuanto a sus niveles de expresión, mientras que los niveles de pERK presentan tendencia a disminuir posterior al silenciamiento de MEOX2 ($P=0.5965$) y GLI-1 ($P=0.8139$). Los datos se presentan como la media \pm D.E., de 3 réplicas biológicas independientes.

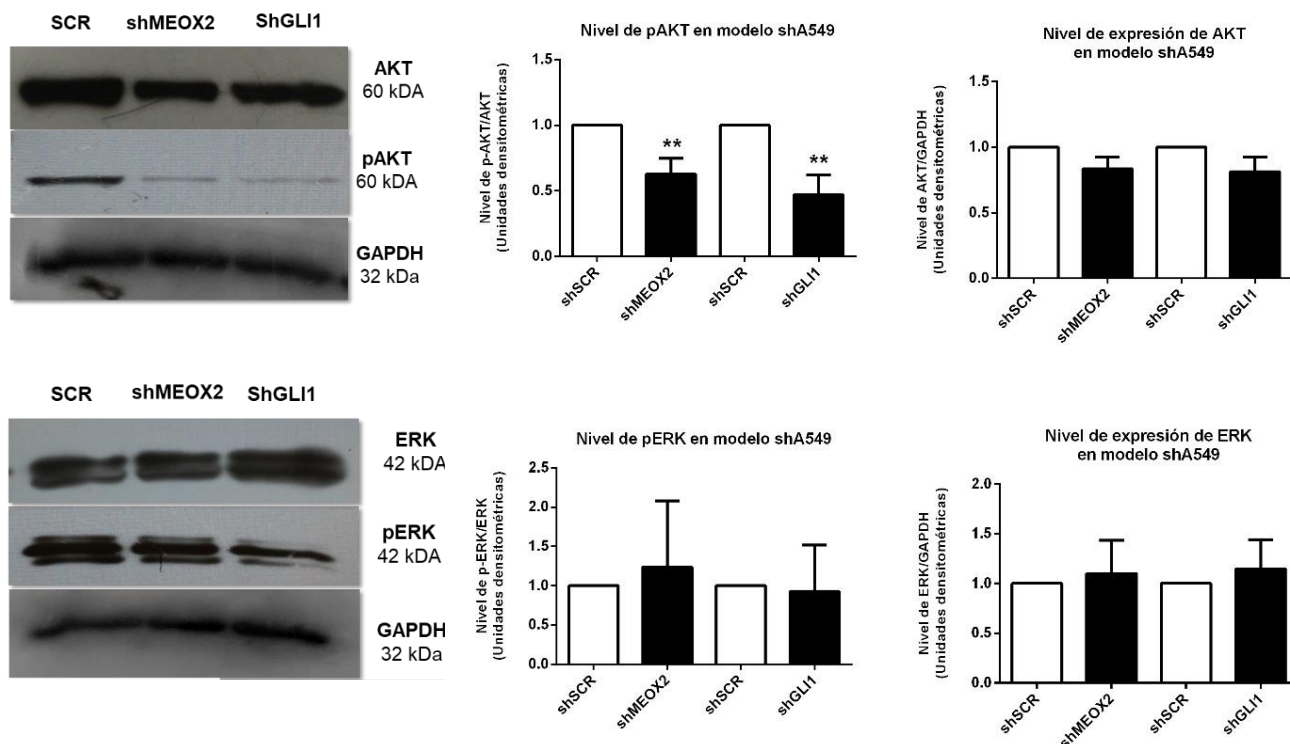
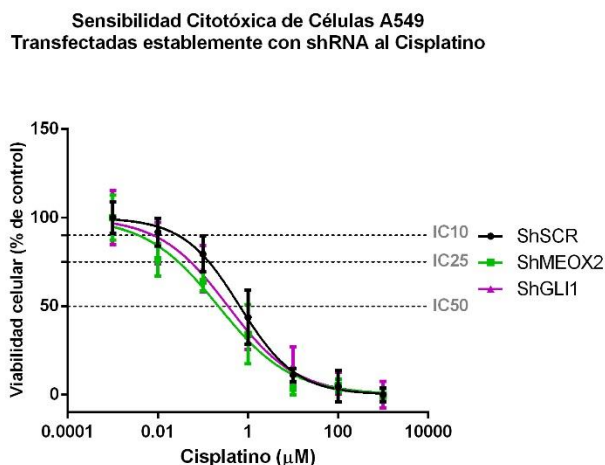


Figura 12. Efecto del silenciamiento de MEOX2 y GLI-1 en la expresión y activación de AKT y ERK en la línea celular A549 (modelo shA549). A) Los niveles de fosforilación de AKT se determinaron mediante Western Blot usando AKT total para normalizar. B) Niveles de fosforilación de ERK se determinaron mediante Western Blot usando ERK total para normalizar. Para normalizar las proteínas totales (AKT y ERK) se utilizó GAPDH. Las barras representan la media \pm D.E., de 3 experimentos independientes. * $P= <0.05$ vs shSCR.

6.6 PARTICIPACIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN MEOX2 Y GLI-1 EN LA RESISTENCIA AL FÁRMACO CISPLATINO EN CÁNCER PULMONAR

Para determinar la participación de los genes MEOX2 y GLI-1 en la resistencia a la terapia fármaco-oncológica pulmonar, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad celular mediante la técnica de MTS. En este sentido, posterior al silenciamiento genético de MEOX2, GLI-1 y en su caso doble silenciamiento mediante shRNAs en células de cáncer pulmonar A549, se evaluó la capacidad de sensibilidad versus resistencia al tratamiento basado en el uso

de cisplatino y erlotinib, las células se trataron con fármacos por 48h y 72h., respectivamente, transcurrido el tiempo de exposición a los fármacos, se añadió el reactivo MTS y leyó la absorbancia a 490 nm. En la figura 10 se muestra que en el silenciamiento de MEOX2 las células muestran una IC₅₀ a una concentración del cisplatino de (0.2188 μ M) mientras que en el silenciamiento de GLI-1, las células muestran una IC₅₀ a una concentración del cisplatino de (0.3577 μ M), por lo que aumenta la sensibilidad de la línea celular A549 al cisplatino en comparación con el grupo control shSCR (0.6541 μ M). Los resultados obtenidos se analizaron y graficaron utilizando el software Graphpad Prism 6.0. y se muestran como la media \pm D.E., de 3 réplicas biológicas empleando el grupo shSCR para su normalización.

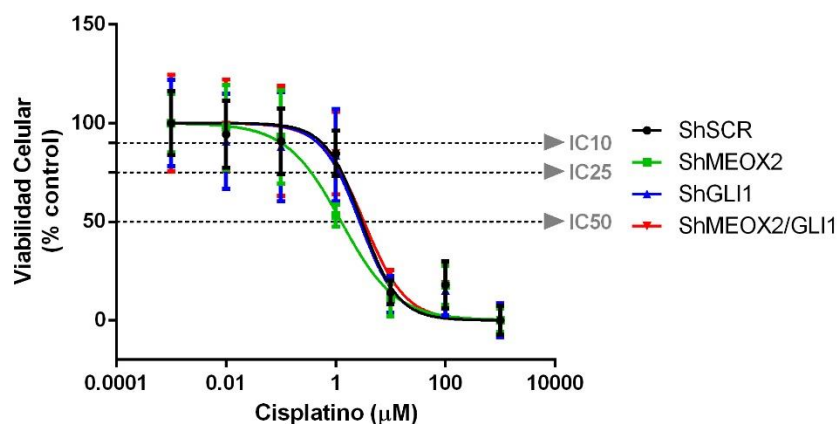


Línea Celular	Cisplatino				RÉPLICAS BIOLÓGICAS
	LogIC50 fármaco (media \pm D.E.)	IC50 (μ M) fármaco (media \pm D.E.)	IC25 (μ M) fármaco (media \pm D.E.)	IC10 (μ M) fármaco (media \pm D.E.)	
shA549					
ShSCR	-0.1844 \pm 0.0262	0.6541 \pm 0.4623	0.1349 \pm 0.0719	0.0278 \pm 0.0194	3
ShMEOX2	-0.6599 \pm 0.0646	0.2188 \pm 0.5993	0.0284 \pm 0.2728	0.0037 \pm 0.1291	3
ShGLI1	-0.4464 \pm 0.0701	0.3577 \pm 0.2535	0.0529 \pm 0.0684	0.00784 \pm 0.0191	3

Figura 13. Análisis del efecto de citotoxicidad celular frente al fármaco cisplatino en células de cáncer pulmonar A549 transfectadas de manera estable mediante shRNA contra MEOX2 y GLI-1. Ensayos de viabilidad celular (MTS) a 48 h de incubación con cisplatino. El eje Y indica el porcentaje de viabilidad celular, mientras que el eje X la concentración del fármaco en micromolar. Los datos se presentan como media \pm D.E., de 3 réplicas biológicas independientes. Los resultados obtenidos se trataron y graficaron utilizando el software Graphpad Prism 6.0. Para normalizar se utilizó el shSCR.

A continuación, en figura 14 se muestra la sensibilidad de células A549 al fármaco cisplatino posterior al silenciamiento por shRNA de MEOX2 y GLI-1 (Llamado modelo UBIMED, pasaje celular 7). Se observa que la sensibilidad de las células aumenta el silenciamiento de MEOX2, presentado citotoxicidad a una concentración de 1.260 μM del fármaco cisplatino, mientras que las células con el silenciamiento de GLI-1 presentan citotoxicidad a una concentración de 2.726 μM , ambos resultados en comparación con el control (shSCR) que presenta citotoxicidad a una concentración del fármaco de 3.009 μM . En estos nuevos ensayos, se realizó un silenciamiento doble (shM/G) para determinar si el efecto de silenciar ambos genes potencializa la sensibilización de las células al tratamiento farmacológico, y se encontró que el efecto es muy similar a la concentración que se obtuvo para el shSCR con una concentración de 3.280 μM . Los datos se presentan como media \pm D.E., de 3 réplicas biológicas independientes y los resultados obtenidos se trataron y graficaron utilizando el software Graphpad Prism 6.0. utilizando el shSCR para normalizar los datos, sin embargo, al no observar aumento en la sensibilidad al cisplatino con el silenciamiento doble (shM/G) se propuso aumentar el número de réplicas biológicas.

**Sensibilidad Citotóxica de Células A549
Transfectadas establemente con shRNA al Cisplatino**



Línea Celular	Cisplatino				Réplicas Biológicas
	LogIC50 fármaco (media±D.E.)	IC50 (µM) fármaco (media±D.E.)	IC25 (µM) fármaco (media±D.E.)	IC10 (µM) fármaco (media±D.E.)	
shSCR	0.4784±0.0527	3.009±0.7092	1.302±0.3576	0.5631±0.1297	3
shMEOX2	0.1005±0.0755	1.260±1.0945	0.3565±0.2370	0.1009±0.0527	3
shGLI1	0.4355±0.0782	2.726±1.1251	1.133±0.3252	0.4706±0.0927	3
shM/G	0.5159±0.0694	3.280±0.9142	1.257±0.1171	0.4816±0.0388	3

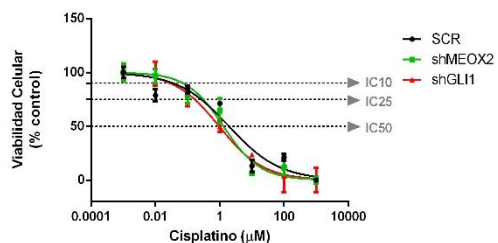
Figura 14. Análisis del efecto de citotoxicidad celular frente al fármaco cisplatino en células de cáncer pulmonar A549 (modelo UBIMED) pasaje 7 de células transfectadas de manera estable mediante shRNA en contra de MEOX2 y GLI-1. Ensayos de viabilidad celular (MTS) a 48 h de incubación con cisplatino. El eje Y indica el porcentaje de viabilidad celular, mientras que el eje X la concentración del fármaco en escala micromolar. Los datos se presentan como media ± D.E., de 3 réplicas biológicas independientes. Los resultados obtenidos se trataron y graficaron utilizando el software Graphpad Prism 6.0. Para normalizar se utilizó el shSCR.

EL EFECTO SILENCIAMIENTO GENÉTICO DE MEOX2 Y GLI-1, ES REPRODUCIBLE EN NUEVOS ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN Y TRATAMIENTO POR CISPLATINO EN CÉLULAS A549

Con el propósito de validar los resultados obtenidos en las células NSCLC A549 (Modelo UBIMED), se realizaron nuevos experimentos de silenciamiento genético (Modelo celular nombrado INER, pasaje celular 7), es así que en la figura 15 se muestran los resultados del efecto del cisplatino en las células A549, en nuevo modelo celular posterior al silenciamiento

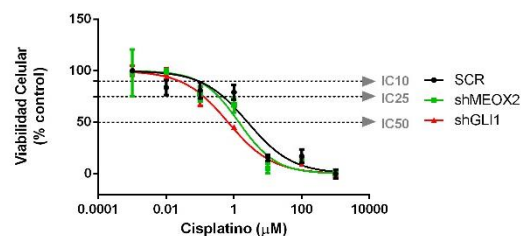
de MEOX2 y GLI-1. En figura 15(A) se observa que el silenciamiento de MEOX2 aumenta la sensibilidad de las células al cisplatino a una concentración del fármaco de 1.295 μM y de la misma manera el silenciamiento de GLI-1 aumenta la sensibilidad al fármaco a una concentración de 0.952 μM ambos en comparación con el control (shSCR) que presenta citotoxicidad a una concentración de 1.924 μM , los resultados se muestran como la media \pm E.E., de 1 réplica biológica realizada por cuadruplicado. En la figura 15(B) se observa que el silenciamiento de MEOX2 aumenta la sensibilidad al cisplatino a una concentración del fármaco de 1.401 μM y de la misma manera el silenciamiento de GLI-1 aumenta la sensibilidad al fármaco a una concentración de 0.670 μM ambos en comparación con el control (shSCR) que presenta citotoxicidad a una concentración de 2.547 μM , los resultados se muestran como la media \pm E.E., de 1 réplica biológica realizada por cuadruplicado. En la figura 12 (C) se muestra la integración de las 2 réplicas biológicas.

A)

Sensibilidad Citotóxica de Células A549
Transfectadas establemente con shRNA al Cisplatino

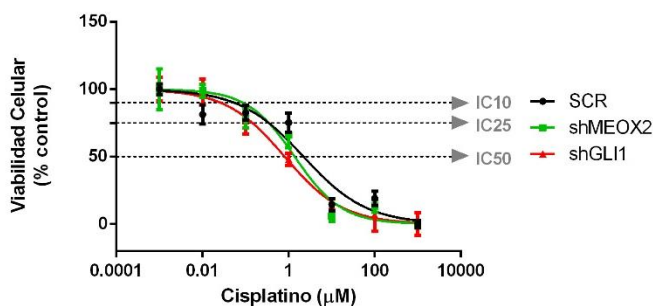
Línea Celular	Cisplatino				RÉPLICAS EXPERIMENTALES
	LogIC50 fármaco (media±D.E.)	IC50 (µM) fármaco (media±D.E.)	IC25 (µM) fármaco (media±D.E.)	IC10 (µM) fármaco (media±D.E.)	
ShA549 INER					
shSCR	0.2843±0.1285	1.924±0.2764	0.2604±0.0538	0.0352±0.0221	4
shMEOX2	0.1122±0.0903	1.295±0.3570	0.3052±0.1166	0.0719±0.0332	4
shGLI1	-0.021±0.1217	0.9520±0.048	0.1655±0.0038	0.0287±2.82	4

B)

Sensibilidad Citotóxica de Células A549
Transfectadas establemente con shRNA al Cisplatino

Línea Celular	Cisplatino				RÉPLICAS EXPERIMENTALES
	LogIC50 fármaco (media±D.E.)	IC50 (µM) fármaco (media±D.E.)	IC25 (µM) fármaco (media±D.E.)	IC10 (µM) fármaco (media±D.E.)	
ShA549 INER					
shSCR	0.4060±0.1191	2.547±0.4638	0.4761±0.4560	0.0890±0.1900	4
shMEOX2	0.1463±0.1083	1.401±0.6209	0.3500±0.2705	0.0874±0.0933	4
shGLI1	-0.1734±0.059	0.6707±0.1702	0.1278±0.0723	0.0243±0.0225	4

C)

Sensibilidad Citotóxica de Células A549
Transfectadas establemente con shRNA al Cisplatino

Línea Celular	Cisplatino				RÉPLICAS BIOLÓGICAS
	LogIC50 fármaco (media±D.E.)	IC50 (µM) fármaco (media±D.E.)	IC25 (µM) fármaco (media±D.E.)	IC10 (µM) fármaco (media±D.E.)	
ShA549 INER					
shSCR	0.3443±0.0875	2.210±0.4405	0.3445±0.1525	0.0537±0.0380	2
shMEOX2	0.1401±0.0692	1.381±0.0749	0.3456±0.0316	0.0865±0.0109	2
shGLI1	-0.092±0.071	0.8077±0.1989	0.1445±0.0266	0.0258±0.0031	2

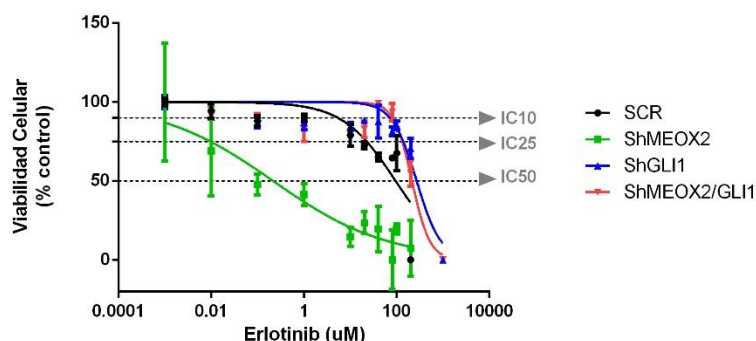
Figura 15. Análisis del efecto de citotoxicidad celular frente al fármaco cisplatino en células de cáncer pulmonar A549 transfectadas de manera estable mediante shRNAs contra MEOX2 y GLI-1 (Modelo de transfección INER, pasaje celular 7). A) y B) Ensayo de viabilidad celular (MTS) realizado por cuadruplicado a 48 h de incubación con cisplatino. C) Integración de las 2 réplicas biológicas. El eje Y indica el porcentaje de viabilidad celular, mientras que el eje X la concentración del fármaco en micromolar. Los datos se presentan como media ± D.E., de 1 réplica biológica realizada 2 veces por cuadruplicado. Los resultados obtenidos se trataron y graficaron utilizando el software Graphpad Prism 6.0. Para normalizar se utilizó el shSCR.

6.7 LAS PROTEÍNAS MEOX2 Y GLI-1 AFECTAN LA RESISTENCIA A TKI-ERLOTINIB EN CÉLULAS DE CÁNCER PULMONAR

Para determinar la participación de los genes MEOX2 y GLI-1 en la capacidad de resistencia a la terapia oncológica pulmonar, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad-citotoxicidad celular mediante la técnica de (MTS). En este sentido, posterior al silenciamiento genético de MEOX2, GLI-1 y en su caso el silenciamiento doble con shRNAs en células de cáncer pulmonar A549, se evaluó la capacidad de sensibilidad versus resistencia al tratamiento basado en EGFR-TKI erlotinib por 72h, transcurrido el tiempo de exposición, se adicionó el reactivo MTS y se leyó la absorbancia a 490 nm.

Basado en lo anterior, en figura 16 se observa que el silenciamiento de MEOX2 aumenta la sensibilidad a erlotinib a una concentración de 0.2151 μM en contraste del grupo control shSCR el cual presenta citotoxicidad a concentración de 94.84 μM , mientras que, tanto el silenciamiento de GLI-1 (270.1 μM) como el silenciamiento doble (shM/G) (214.9 μM) aumentan la sensibilidad a erlotinib en comparación con el control shSCR. Los resultados obtenidos se analizaron mediante el software Graphpad Prism 6.0, los cuales se muestran como la media \pm E.E., de 3 réplicas biológicas. Si bien los resultados obtenidos son representativos, muestran una tendencia al aumento en la sensibilidad de las células al tratamiento con erlotinib

**Sensibilidad Citotóxica de Células A549
Transfectadas establemente con shRNA al Erlotinib**



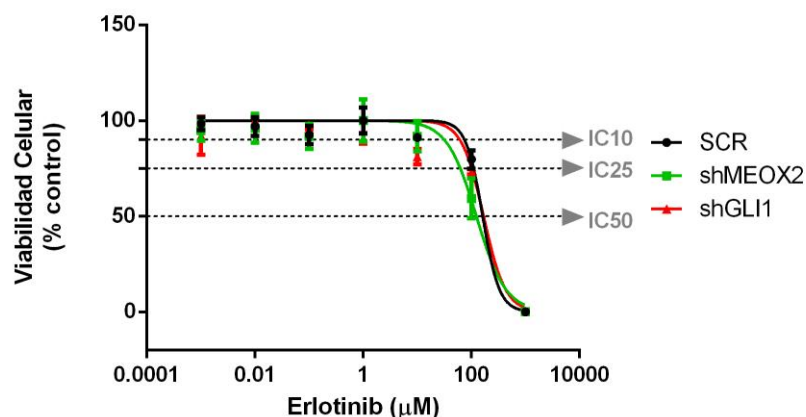
Línea Celular	Erlotinib				RÉPLICAS EXPERIMENTALES
	LogIC50 fármaco (media±D.E.)	IC50 (µM) fármaco (media±D.E.)	IC25 (µM) fármaco (media±D.E.)	IC10 (µM) fármaco (media±D.E.)	
shSCR	1.977±0.1018	94.84±37.1911	22.48±7.7169	5.330±1.4251	3
shMEOX2	0.6673±0.2653	0.2151±8.1380	0.009455±0.6825	0.0004155±0.0572	3
shGLI1	2.431±0.06263	270.1±35.2466	138.9 ±21.5028	71.40±13.4107	3
shM/G	2.332±0.05206	214.9±23.7159	132.1±17.3544	81.16±19.6221	3

Figura 16. Análisis del efecto de citotoxicidad celular frente al fármaco erlotinib en células de cáncer pulmonar A549 transfectadas de manera estable mediante shRNA contra MEOX2 y GLI-1. Ensayos de viabilidad celular (MTS) a 72h de incubación con erlotinib. El eje Y indica el porcentaje de viabilidad celular, mientras que el eje X la concentración del fármaco en concentración micromolar. Los datos se presentan como media ± E.E., de 1 réplica biológica independiente realizada por triplicado. Los resultados obtenidos se trataron y graficaron utilizando el software Graphpad Prism 6.0. Para normalizar se utilizó el shSCR.

Posteriormente, se realizaron nuevos experimentos para corroborar el efecto del fármaco erlotinib en las células A549. En la figura 17 se muestra el efecto del erlotinib en las células A549 tras los silenciamientos de MEOX2 y GLI-1. Se observa que el silenciamiento de MEOX2 aumenta la sensibilidad de las células al TKI-erlotinib a una concentración IC:50 del fármaco de 123.6 μM en comparación con el control (shSCR) que presenta citotoxicidad a una concentración IC:50 de 162.0 μM , por otra parte el silenciamiento de GLI-1 no logra aumentar la sensibilidad al fármaco erlotinib, presentando citotoxicidad a una concentración IC:50 de 168.0 μM en comparación con el control (shSCR), los resultados se muestran como la media \pm E.E., de 1 réplica biológica realizada por cuadruplicado.

Cabe mencionar que experimentos preliminares al finalizar el presente trabajo de tesis indican que el silenciamiento de MEOX2 contribuye en aumentar la sensibilidad a TKI-erlotinib en células A549, en comparación del grupo control shSCR, mientras que el silenciamiento de GLI-1 promueve un aumento marginal en la sensibilidad a TKI-erlotinib, cuyos resultados serán validados en ensayos posteriores a cargo del grupo de investigación y procesando su análisis estadístico definitivo mediante el software Graphpad Prism 6.0. Por último, cabe mencionar que ensayos adicionales de resistencia citotóxica serán realizados por el grupo de investigación sobre células EGFR-mutadas (NCI-H1975) transfectadas establemente por shRNA-MEOX2 versus shRNA-GLI1, lo cual permitirá llegar a conclusiones definitivas sobre este fenómeno de resistencia farmacológica, como se llevó a cabo de manera preliminar mediante el análisis de validación del silenciamiento genético de MEOX2 y GLI1 en células EGFR-mutadas (NCI-H1975), mediante ensayos de expresión genética por qPCR, mostrados en figura suplementaria 1.

Sensibilidad Citotóxica de las Células A549
Transfectadas establemente con shRNA al Erlotinib



Línea Celular ShA549 p.8 INER	Erlotinib				RÉPLICAS EXPERIMENTALES
	LogIC50 fármaco (media±E.E.)	IC50 (µM) fármaco (media±E.E.)	IC25 (µM) fármaco (media±E.E.)	IC10 (µM) fármaco (media±E.E.)	
shSCR	2.210±0.1707	162.0±5.3636	109.7±6.5911	74.27±6.5855	4
shMEOX2	2.092±0.0538	123.6±38.0570	62.24±25.9394	31.35±16.0468	4
shGLI1	2.225±0.1159	168.0±7.8464	101.0±10.7937	60.77±10.1185	4

Figura 17. Análisis de la citotoxicidad celular provocada por efecto del fármaco TKI-erlotinib en células de cáncer pulmonar A549 (Modelo celular INER) en pase celular 8 transfectadas de manera estable con shRNA en contra de MEOX2 y GLI-1. Ensayos de viabilidad celular (MTS) a 72 h de incubación con TKI-erlotinib. El eje Y indica el porcentaje de viabilidad celular, mientras que el eje X indica la concentración del fármaco en concentración Micromolar. Los datos se presentan un ensayo representativo por cuadruplicado de 2, como el valor de la media ± E.E. Los resultados obtenidos se analizaron y graficaron mediante el software Graphpad Prism 6.0. Para normalizar cuantitativamente los cambios se utilizó el grupo control shSCR.

6. DISCUSIÓN

El cáncer pulmonar es considerado la principal causa de muerte a nivel mundial tanto en hombres como en mujeres. Específicamente, el NSCLC representa el 85% de los casos y se encuentra asociado al hábito de fumar y a mutaciones en genes supresores de tumores y oncogenes. Una de las mutaciones mayormente asociadas a NSCLC es la que se presenta en el EGFR.

La mutación puntual de EGFR más comúnmente encontrada es la mutación L858R, la cual se encuentra en el dominio tirosina cinasa y constituye aproximadamente el 45% de las mutaciones en el EGFR (Paez et al. 2004b; Shigematsu et al. 2005). Denominada mutación de activación “clásica”, la mutación L858R confiere 50 veces más actividad de cinasa que el EGFR silvestre (Carey k, *et al.*, 2006); (Yun C,*et al.*, 2007).

El tratamiento estándar aplicado en NSCLC es la cirugía y, para los estadios II y III, se combina con quimioterapia adyuvante basada en cisplatino (Arriagada R, *et al.*, 2010), el cual posee tres mecanismos de acción. El primero de ellos ocurre a partir de la unión de grupos alquilo a bases de ADN, promoviendo su fragmentación a partir de enzimas de reparación al intentar reemplazar las bases alquiladas, lo cual evita la síntesis de ADN y por lo tanto la transcripción del RNA, el segundo es a partir del daño al ADN a través de la formación de enlaces cruzados de ADN, lo cual impide la replicación o transcripción y el tercero que se lleva a cabo a partir de la inducción de un emparejamiento incorrecto de los nucleótidos, lo cual conduce a la aparición de mutaciones (Wang D and Lippard 2005).

Por otra parte, para los pacientes con deleciones del exón 19 o una mutación del exón 21 (L858R) de EGFR, el tratamiento estándar de primera línea es el uso de EGFR-TKIs de primera (gefitinib, erlotinib) o segunda generación (afatinib). Los fármacos EGFR-TKIs mejoran la tasa de respuesta, el tiempo de progresión y la supervivencia general. Desafortunadamente, los pacientes de NSCLC con mutación en EGFR desarrollan

progresión de la enfermedad después de aproximadamente 10 a 14 meses posteriores al inicio del tratamiento con EGFR-TKIs. Se han descrito diferentes mecanismos de resistencia adquirida a los EGFR-TKIs de primera y segunda generación, sin embargo, el tratamiento óptimo para los diversos mecanismos de resistencia adquirida aún no está claramente definido. Uno de los mecanismos mayormente descritos es el que se adquiere debido a la mutación T790M, dicha mutación aumenta la afinidad por el ATP, lo que reduce la capacidad de los EGFR-TKIs reversibles para unirse al dominio de tirosina cinasa EGFR (S.-G. Wu and Shih 2018; Maemondo M, *et al.*, 2010; Mitsudomi T, *et al.*, 2010; Mok T, *et al.*, 2009; Wu Y, *et al.*, 2014^a).

Más del 60% de los pacientes desarrollan resistencia a los inhibidores de primera o segunda generación con la T790M, esta mutación evita la unión del fármaco al aumentar la afinidad del ATP a su sitio de unión de ATP en el bolsillo de unión de ATP (Sequist L, *et al.*, 2011).

Con la finalidad de determinar la sensibilidad *in vitro* a cisplatino y erlotinib y con ello realizar ensayos posteriores, en este trabajo se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante la técnica MTS. Los resultados muestran que la línea celular NCI-H1975 presentó una mayor sensibilidad a ambos fármacos, en comparación con las demás líneas celulares de NSCLC que presentan mutaciones activadoras o no presentan mutación en EGFR. Se ha descrito que la línea celular NCI-H1975 es resistente a los fármacos TKIs en comparación con otras líneas celulares que son EGFR Wild-type (Wang Z, *et al.*, 2016). Sin embargo, a este respecto Noro en el 2006 describió que la línea celular NCI-H1975 con sobreexpresión de HER2 presenta una mayor sensibilidad al tratamiento con gefitinib en comparación con la línea parental, lo que sugiere que la sobreexpresión de HER2 puede superar/revertir la resistencia mediada por la mutación T790M. Además, se observó que la expresión de HER2 también puede emplearse como un marcador pronóstico para pacientes con cáncer de pulmón, particularmente aquellos que albergan la mutación T790M en el dominio de

quinasa de EGFR (Jing Xu, 2016). Además, las mutaciones de HER2 dentro del dominio tirosina cinasa también se consideran asociadas con la capacidad de respuesta de EGFR-TKIs en NSCLC y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Shigematsu H, 2005; Cohen EE, 2005), sin embargo, se requieren estudios prospectivos para confirmar el papel de HER2 en el NSCLC y otro tipo de tumores como un marcador pronóstico para la capacidad de respuesta tumoral, además de las mutaciones de EGFR y KRAS.

Por otra parte, Han SW (2005) demostró que las mutaciones activadoras en los genes KRAS y BRAF se correlacionan con la resistencia primaria a los TKI en el NSCLC, lo que sugiere que las mutaciones comunes, que se sabe que están asociadas con la resistencia, no resultan directamente en el desarrollo de resistencia adquirida a los TKI, ya que en general, el desarrollo de resistencia adquirida a los TKI, basado en la mutación T790M, se ha atribuido a la reactivación de EGFR, debido a la deficiencia de unión al fármaco (Xue C, 2012; Shepherd FA, 2005). Por lo tanto, se deben considerar otros mecanismos de resistencia a TKIs.

Esto abre la posibilidad de que la línea empleada en este estudio no presente la mutación T790M o que haya adquirido una alteración adicional que anule el efecto de la mutación T790M. Para corroborar esto se requeriría hacer un genotipificado de la línea celular.

Después de los análisis de sensibilidad al fármaco, se evaluó el estado de activación de las cascadas de señalización de AKT (S473) y ERK, las cuales se han visto implicadas en la transformación maligna del NSCLC (Dhillon A, *et al.*, 2007) (Hers, Vincent, and Tavaré 2011) (McCubrey J, *et al.*, 2007). La activación sostenida por fosforilación de dichas proteínas resulta en una señalización aberrante que promueve la proliferación celular, invasión tumoral (C. Huang, Jacobson, and Schaller 2004) y prolonga la supervivencia de las células cancerosas (Balmanno and Cook, 2009). Además (Tsurutani W, *et al.*, 2006)

determinan la presencia de AKT fosforilado (S473) en 33% a 79% de los tumores analizados en diferentes estudios y esta asociado con un pronóstico desfavorable, diversos autores lo han identificado como un factor determinante clave de la agresividad del tumor asociado con una mala supervivencia. Mukohara T, *et al.*, 2003 lo identificaron como un factor determinante clave de la agresividad del tumor asociado con una mala supervivencia (Balsara et al. 2004; Scrima et al. 2012; Tang et al. 2006; Yoshizawa et al. 2010).

Por otro lado, la activación la vía PI3K/AKT/mTOR desempeña un papel crucial en la resistencia adquirida a la terapia dirigida a EGFR (Gadgeel and Wozniak 2013). Además, la amplificación del receptor *MET*, es otro mecanismo de resistencia a EGFR-TKIs que puede resultar en la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR. Los estudios preclínicos han demostrado que los inhibidores de dicha vía podrían superar la resistencia al EGFR-TKI (Donev I, *et al.*, 2011).

Así mismo, (Lefloch, Pouysségur, and Lenormand 2009) determinaron que ERK es un modulador clave de la proliferación celular y encuentran que la fosforilación de los residuos de treonina (Thr202) y tirosina (Tyr204) (doble fosforilación) se requiere para la actividad completa de la cinasa. Además varios trabajos, entre los que destaca el trabajo de Mokohara (Mukohara T, *et al.*, 2003) detectaron a ERK fosforilado en hasta un tercio de los NSCLC, sin embargo, presenta una asociación inconsistente con el pronóstico (Shi Y, *et al.*, 2011) (Vicent S, *et al.*, 2004b).

En este trabajo se determinaron los cambios en la fosforilación de miembros de la vía de señalización de EGFR (AKT y ERK) frente a tratamiento con cisplatino y EGFR-TKIs en las líneas celulares de cáncer pulmonar A549 y NCI-H1975. Los resultados muestran que la expresión y activación de las proteínas AKT y ERK en las líneas A549 y NCI-H1975, permaneció sin cambios significativos en sus niveles basales posterior al tratamiento con cisplatino y erlotinib después de 12h, 48h y 120h, sin embargo, se observa una tendencia

a la disminución de los niveles de fosforilación de AKT y ERK tras el tratamiento, lo que es consistente con reportes previos en donde se ha reportado que la activación en sentido descendente de la vía PI3K/AKT/mTOR tiene un papel crucial en la resistencia adquirida a la terapia dirigida a EGFR (Gadgeel and Wozniak 2013; Holland W, *et al.*, 2015) y tras el tratamiento con EGFR-TKIs y con cisplatino se logra disminuir la activación de las cascadas de AKT y ERK.

Recientemente en nuestro equipo de trabajo, mediante ensayos de silenciamiento genético por siRNA se logró identificar el eje MEOX2-GLI-1 en líneas celulares de NSCLC, dicho eje parece estar involucrado en la resistencia a cisplatino de una manera dependiente de la concentración (Armas L, *et al.*, 2017).

La vía de Hh desempeña un papel importante en la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis y la migración, y se ha demostrado que interactúa con otras vías de señalización como la vía de las MAPK/ERK (Seto M, *et al.*, 2009), PI3K/AKT/mTOR (Zhou J, *et al.*, 2016) y EGFR (Kasper M, *et al.*, 2006), entre otras. La desregulación de la vía de Hh contribuye a la tumorigénesis y acelera la tasa de crecimiento del tumor (Katoh and Katoh 2009). La activación anómala de la ruta de Hh se ha demostrado en muchos tipos de cáncer, incluyendo el carcinoma de células basales (BCC) (Oro A, *et al.*, 1997), gliomas malignos (Clement V, *et al.*, 2007), meduloblastoma (Goodrich L, *et al.*, 1997), leucemias (Dierks C, *et al.*, 2008), y carcinomas de mama, pulmón, páncreas y próstata (Rimkus T, *et al.*, 2016). En el NSCLC, la vía de Hh desregulada con la reactivación de los factores de transcripción GLI facilita el inicio, la progresión y la metástasis, así como también confiere resistencia a los fármacos a través de la desregulación de la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la actividad de ABCG2. En consecuencia, la inhibición de la señalización de Hh induce una disminución significativa en la proliferación de células NSCLC (Bermudez O, *et al.*, 2013) (Yuan Z, *et al.*, 2007). Los efectos autocrinos de la vía SHH se han relacionado

previamente con la proliferación celular en líneas celulares de NSCLC (A549, H322M y HOP-62) y carcinomas pulmonares sólidos derivados de pacientes; Específicamente, el silenciamiento genético GLI-1 combinado con un antagonista de SHH reduce la proliferación celular del tumor pulmonar (Yuan Z, 2007). Clement en 2007 demuestra que los factores de transcripción GLI-1 se relacionan funcionalmente con la capacidad de autorrenovación de las células madre del cáncer y la tumorigenicidad en los tumores de glioma sólido. Además, la inhibición de la señalización de SHH-GLI1 está implicada en la sensibilización a la terapia basada en EGFR-TKI (gefitinib / erlotinib)

Basado en lo anterior, para determinar un posible papel de MEOX2 y GLI-1 en la resistencia al tratamiento oncológico pulmonar, en primer lugar, se determinaron los niveles de expresión basales de MEOX2 y GLI-1 en las 4 líneas celulares de NSCLC A549, NCI-H1975, HCC827 y NCI-NH2347 mediante qRT-PCR y Western Blot, esto para determinar si dichos genes se detectan en todas las líneas celulares y ver si existen diferencias en la expresión entre las mismas. Los resultados indican que tanto MEOX2 como GLI-1 son detectables en todas las líneas celulares, siendo las líneas A549 y NCI-H1975 las que muestran los mayores niveles de expresión de MEOX2 y GLI-1 respectivamente.

Posteriormente, para determinar si los genes MEOX2 y GLI-1 participan en la activación de las cascadas de señalización de AKT y ERK, en primer lugar, se realizaron ensayos de silenciamiento de MEOX2 y GLI-1 mediante siRNAs y shRNAs en la línea celular A549. Posteriormente se determinó la expresión de AKT, ERK, pAKT y pERK después del silenciamiento de los genes. Los resultados demuestran en este estudio que ni MEOX2 ni GLI-1 tienen influencia sobre la expresión de AKT y ERK y tampoco influyen en el estado de fosforilación de ERK al menos no de manera significativa, aunque se observa una tendencia a la disminución de la expresión de pERK, pero MEOX2 y GLI-1 sí tienen influencia sobre pAKT en la línea A549, estos son los primeros resultados obtenidos hasta

el momento sobre la posible participación de MEOX2 y GLI-1 en la activación de las cascadas de señalización de AKT y ERK.

Sin embargo, el trabajo previo de Armas López en 2017, reportó mediante ensayos de silenciamiento por siRNAs, que el silenciamiento de los genes de MEOX2/GLI-1 está relacionados con la resistencia citotóxica a cisplatino de una manera dependiente de la dosis, así como en la capacidad de la migración y proliferación celular (Armas L, *et al.*, 2017).

No existe más información con respecto al eje MEOX2/GLI-1 en ningún tipo de cáncer, por lo que el presente trabajo pretendió determinar, si el silenciamiento de los genes MEOX2 y GLI-1 se encuentra relacionado con la resistencia a la terapia oncológica pulmonar con cisplatino y además del efecto sobre la terapia blanco EGFR-TKI (erlotinib). Por lo que, en el presente trabajo, posterior al silenciamiento de MEOX2 y GLI-1 en células A549, tratadas por 48 h con Cisplatino y 72 h con TKI-erlotinib, respectivamente, los resultados indican que ambos MEOX2 y GLI-1 contribuyen de manera paralela a la resistencia a cisplatino y a TKI-erlotinib, cuyos resultados deberán ser validados en ulteriores ensayos experimentales tanto *in vitro*, como ensayos *in vivo*.

7. CONCLUSIONES

1. Células de cáncer pulmonar A549, seguido de células NCI-NH2347 y HCC827 presentaron mayor resistencia a cisplatino y TKI-erlotinib en contraste de células NCI-H1975 (EGFR mutadas "T790M), sin embargo, no existen diferencias significativas entre dichas líneas celulares sobre la sensibilidad en ambos fármacos.
2. Se determinaron los niveles detectables de expresión basal de las proteínas AKT, pAKT, ERK y pERK en las 4 líneas celulares de cáncer pulmonar, no detectando diferencias significativas entre ellas. Lo mismo, se observa respecto a los niveles de expresión de MEOX2 y GLI-1.
3. Fueron detectados alteraciones en los niveles de proteína total y fosforilada de ambas AKT y ERK en células A549 "EGFR wild type" y NCI-H1975 "EGFR-mutado", posterior al tratamiento por cisplatino y TKI-erlotinib.
4. MEOX2 y GLI-1 participan en aumentar significativamente los niveles de fosforilación de AKT, mientras que los cambios de activación de ERK, resultaron no-significativos en células de cáncer pulmonar A549.
5. La expresión de las proteínas MEOX2 y GLI-1 promueven la resistencia tanto a fármacos oncológicos (cisplatino), como de terapia dirigida TKI-erlotinib en células de cáncer pulmonar A549.

8. PERSPECTIVAS

La participación del eje transcripcional MEOX2-GLI1 en la resistencia a la terapia oncológica dirigida como EGFR en células de Cáncer Pulmonar deberá ser validada en su contexto fisiológico empleando modelos *in vivo*, analizando ambos modelos celulares de cáncer pulmonar de humano tanto EGFR-wild type (A549), como EGFR-mutadas (NCI-H1975).

9. REFERENCIAS

- Abourbeh, G., Itamar, B., Salnikov, O., Beltsov, S., & Mishani, E. (2015). Identifying erlotinib-sensitive non-small cell lung carcinoma tumors in mice using [(11)C]erlotinib PET. *EJNMMI research*, 5, 4. doi:10.1186/s13550-014-0080-0
- Armas-López, Leonel, Patricia Piña-Sánchez, Oscar Arrieta, Enrique Guzman de Alba, Blanca Ortiz-Quintero, Patricio Santillán-Doherty, David C. Christiani, Joaquín Zúñiga, and Federico Ávila-Moreno. 2017. "Epigenomic Study Identifies a Novel Mesenchyme Homeobox2-GLI1 Transcription Axis Involved in Cancer Drug Resistance, Overall Survival and Therapy Prognosis in Lung Cancer Patients." *Oncotarget*, May. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17715>.
- Armas-López, Leonel, Joaquín Zúñiga, Oscar Arrieta, and Federico Ávila-Moreno. 2017. "The Hedgehog-GLI Pathway in Embryonic Development and Cancer: Implications for Pulmonary Oncology Therapy." *Oncotarget* 8 (36): 60684–703. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19527>.
- Arendt Detlev., Musser Jacob M., V. H. Baker Clare., Bergman Aviv., Cepko Connie, H Douglas, Erwin., Pavlicev Mihaela., Schlosser Gerhard., Widder Stefanie., D Manfred., Laubichler, et al. 2016. "The origin and evolution of cell types". *Nat Rev Genet*. 2016 Nov 7 Published online 2016 Nov 7. doi: 10.1038/nrg.2016.127
- Arriagada, Rodrigo, Ariane Dunant, Jean-Pierre Pignon, Bengt Bergman, Mariusz Chabowski, Dominique Grunenwald, Mirosław Kozłowski, et al. 2010. "Long-Term Results of the International Adjuvant Lung Cancer Trial Evaluating Adjuvant Cisplatin-Based Chemotherapy in Resected Lung Cancer." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (1): 35–42. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.2272>.
- Ávila-Moreno, Federico, Leonel Armas-López, Aldo M. Álvarez-Moran, Zoila López-Bujanda, Blanca Ortiz-Quintero, Alfredo Hidalgo-Miranda, Francisco Urrea-Ramírez, et al. 2014. "Overexpression of MEOX2 and TWIST1 Is Associated with H3K27me3 Levels and Determines Lung Cancer Chemoresistance and Prognosis." *PLoS ONE* 9 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114104>.
- Balmano, K., and S. J. Cook. 2009. "Tumour Cell Survival Signalling by the ERK1/2 Pathway." *Cell Death and Differentiation* 16 (3): 368–77. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.148>.
- Balsara, Binaifer R., Jianming Pei, Yasuhiro Mitsuuchi, Robert Page, Andres Klein-Szanto, Hao Wang, Michael Unger, and Joseph R. Testa. 2004. "Frequent Activation of AKT in Non-Small Cell Lung Carcinomas and Preneoplastic Bronchial Lesions." *Carcinogenesis* 25 (11): 2053–59. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh226>.
- Bangs, Fiona, and Kathryn V. Anderson. 2017. "Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9 (5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028175>.
- Baylin, Stephen B., and Joyce E. Ohm. 2006. "Epigenetic Gene Silencing in Cancer – a Mechanism for Early Oncogenic Pathway Addiction?" *Nature Reviews Cancer* 6 (2): 107–16. <https://doi.org/10.1038/nrc1799>.
- Bejerano, G., Michael, P., Igor, M., Stuart Stephen, W., James Kent, John S. 2004. "Ultraconserved Elements in the in the Human Genome". *Science*: 1321-1325.

- Bermudez, Olga, Elisabeth Hennen, Ina Koch, Michael Lindner, and Oliver Eickelberg. 2013. "Gli1 Mediates Lung Cancer Cell Proliferation and Sonic Hedgehog-Dependent Mesenchymal Cell Activation." *PLoS One* 8 (5): e63226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063226>.
- Bitgood, M. J., L. Shen, and A. P. McMahon. 1996. "Sertoli Cell Signaling by Desert Hedgehog Regulates the Male Germline." *Current Biology: CB* 6 (3): 298–304.
- Blotta, Simona, Jana Jakubikova, Teresa Calimeri, Aldo M. Roccaro, Nicola Amodio, Abdel Kareem Azab, Umberto Foresta, et al. 2012. "Canonical and Noncanonical Hedgehog Pathway in the Pathogenesis of Multiple Myeloma." *Blood* 120 (25): 5002–13. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-368142>.
- Bos, Johannes L., Holger Rehmann, and Alfred Wittinghofer. 2007. "GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins." *Cell* 129 (5): 865–77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.018>.
- Brambilla, Christian, Julien Laffaire, Sylvie Lantuejoul, Denis Moro-Sibilot, H el ene Mignotte, Fran ois Arbib, Anne-Claire Toffart, et al. 2014. "Lung Squamous Cell Carcinomas with Basaloid Histology Represent a Specific Molecular Entity." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20 (22): 5777–86. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0459>.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. and Jemal, A.. 2013. "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries". *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68 (6): 394-424. 10.3322/caac.21492. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21492>.
- Briscoe, J., and J. Ericson. 2001. "Specification of Neuronal Fates in the Ventral Neural Tube." *Current Opinion in Neurobiology* 11 (1): 43–49.
- B urglin Thomas R.2011."Homeodomain subtypes and functional diversity".*Subcell Biochem.* 2011; 52: 95–122. doi: 10.1007/978-90-481-9069-0_5.
- Camidge, D. Ross, William Pao, and Lecia V. Sequist. 2014. "Acquired Resistance to TKIs in Solid Tumours: Learning from Lung Cancer." *Nature Reviews. Clinical Oncology* 11 (8): 473–81. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.104>.
- Carey, Kendall D., Andrew J. Garton, Maria S. Romero, Jennifer Kahler, Stuart Thomson, Sarajane Ross, Frances Park, John D. Haley, Neil Gibson, and Mark X. Sliwkowski. 2006. "Kinetic Analysis of Epidermal Growth Factor Receptor Somatic Mutant Proteins Shows Increased Sensitivity to the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Erlotinib." *Cancer Research* 66 (16): 8163–71. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0453>.
- Carroll, Sean B. 2008 "Evo-Devo and an Expanding Evolutionary Synthesis: A Genetic Theory of Morphological Evolution". *Cell*. 134 (1). 25-36. 10.1016/j.cell.2008.06.030
- Cho, Sukki, Tae In Park, Eung-Bae Lee, and Shin-Ah Son. 2012. "Poor Prognostic Factors in Surgically Resected Stage I Non-Small Cell Lung Cancer: Histopathologic and Immunohistochemical Analysis" 45 (2): 101–9. <https://doi.org/10.5090/kjtcs.2012.45.2.101>.
- Choksi, Semil P., Lauter Gilbert., Swoboda, Peter., Roy, Sudipto.2014."Switching on cilia: transcriptional networks regulating ciliogenesis". *Development*. 2014 Apr; 141(7): 1427–1441. doi: 10.1242/dev.074666
- Chong, Curtis R., and Pasi A. J anne. 2013. "The Quest to Overcome Resistance to EGFR-Targeted Therapies in Cancer." *Nature Medicine* 19 (11): 1389–1400. <https://doi.org/10.1038/nm.3388>.
- Choudhry, Zia, Azadeh A. Rikani, dan Maqsood Choudhry, Sadaf Tariq, Fozia Zakaria, Muhammad Waheed Asghar, Muhammad Khan Sarfraz, Kamran Haider, Afia Ansar Shafiq, and Nusrat

- Jahan Mobassarrah. 2014. "Sonic Hedgehog Signalling Pathway: A Complex Network." *Annals of Neurosciences* 21 (1): 28–31. <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.210109>.
- Ciardello, F. and Tortora, G. (2008) EGFR Antagonists in Cancer Treatment. *New England Journal of Medicine*, 358, 1160-1174. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra0707704>
- Clement, Virginie, Pilar Sanchez, Nicolas de Tribolet, Ivan Radovanovic, and Ariel Ruiz i Altaba. 2007. "HEDGEHOG-GLI1 Signaling Regulates Human Glioma Growth, Cancer Stem Cell Self-Renewal, and Tumorigenicity." *Current Biology: CB* 17 (2): 165–72. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.11.033>.
- Cortese, Rene, Oliver Hartmann, Kurt Berlin, and Florian Eckhardt. 2008. "Correlative Gene Expression and DNA Methylation Profiling in Lung Development Nominate New Biomarkers in Lung Cancer." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 (8): 1494–1508. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.11.018>.
- Cox, Adrienne D., Channing J. Der, and Mark R. Philips. 2015. "Targeting RAS Membrane Association: Back to the Future for Anti-RAS Drug Discovery?" *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 21 (8): 1819–27. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3214>.
- Crosbie, Philip A. J., Emma J. Crosbie, Mark Aspinall-O’Dea, Michael Walker, Rebecca Harrison, Maria Pernemalm, Rajesh Shah, et al. 2016. "ERK and AKT Phosphorylation Status in Lung Cancer and Emphysema Using Nanocapillary Isoelectric Focusing." *BMJ Open Respiratory Research* 3 (1): e000114. <https://doi.org/10.1136/bmjresp-2015-000114>.
- Dahmane, N., and A. Ruiz i Altaba. 1999. "Sonic Hedgehog Regulates the Growth and Patterning of the Cerebellum." *Development (Cambridge, England)* 126 (14): 3089–3100.
- D’Armiento, Jeanine, Seema S. Dalal, Yasunori Okada, Richard A. Berg, and Kiran Chada. 1992. "Collagenase Expression in the Lungs of Transgenic Mice Causes Pulmonary Emphysema." *Cell* 71 (6): 955–61. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90391-O](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90391-O).
- Davis, F. G., V. Kupelian, S. Freels, B. McCarthy, and T. Surawicz. 2001. "Prevalence Estimates for Primary Brain Tumors in the United States by Behavior and Major Histology Groups." *Neuro-Oncology* 3 (3): 152–58.
- Denef, N., D. Neubüser, L. Perez, and S. M. Cohen. 2000. "Hedgehog Induces Opposite Changes in Turnover and Subcellular Localization of Patched and Smoothed." *Cell* 102 (4): 521–31.
- Dessaud, Eric, Andrew P. McMahon, and James Briscoe. 2008. "Pattern Formation in the Vertebrate Neural Tube: A Sonic Hedgehog Morphogen-Regulated Transcriptional Network." *Development (Cambridge, England)* 135 (15): 2489–2503. <https://doi.org/10.1242/dev.009324>.
- Dhillon, A. S., S. Hagan, O. Rath, and W. Kolch. 2007. "MAP Kinase Signalling Pathways in Cancer." *Oncogene* 26 (22): 3279–90. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210421>.
- Dierks, Christine, Ronak Beigi, Gui-Rong Guo, Katja Zirlik, Mario R. Stegert, Paul Manley, Christopher Trussell, et al. 2008. "Expansion of Bcr-Abl-Positive Leukemic Stem Cells Is Dependent on Hedgehog Pathway Activation." *Cancer Cell* 14 (3): 238–49. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.08.003>.
- Doebele, Robert C., Xian Lu, Christopher Sumey, Delee A. Maxson, Andrew J. Weickhardt, Ana B. Oton, Paul A. Bunn, et al. 2012. "Oncogene Status Predicts Patterns of Metastatic Spread in Treatment-Naive Non-small Cell Lung Cancer." *Cancer* 118 (18): 4502–11. <https://doi.org/10.1002/cncr.27409>.
- Donev, Ivan S., Wei Wang, Tadaaki Yamada, Qi Li, Shinji Takeuchi, Kunio Matsumoto, Takao Yamori, Yasuhiko Nishioka, Saburo Sone, and Seiji Yano. 2011. "Transient PI3K Inhibition Induces Apoptosis and Overcomes HGF-Mediated Resistance to EGFR-TKIs in EGFR Mutant Lung

- Cancer." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17 (8): 2260–69. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1993>.
- Downward, J. 2001."The ins and outs of signaling". *Nature* 411 759-762.
- Dunwell, T. L., & Holland, P. W. (2016). Diversity of human and mouse homeobox gene expression in development and adult tissues. *BMC developmental biology*, 16(1), 40. doi:10.1186/s12861-016-0140-y
- Duyster, J., R. Y. Bai, and S. W. Morris. 2001. "Translocations Involving Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)." *Oncogene* 20 (40): 5623–37. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204594>.
- Engelman, Jeffrey A., Kreshnik Zejnullahu, Christopher-Michael Gale, Eugene Lifshits, Andrea J. Gonzales, Takeshi Shimamura, Feng Zhao, et al. 2007. "PF00299804, an Irreversible Pan-ERBB Inhibitor, Is Effective in Lung Cancer Models with EGFR and ERBB2 Mutations That Are Resistant to Gefitinib." *Cancer Research* 67 (24): 11924–32. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1885>.
- Ettinger, David S., Douglas E. Wood, Dara L. Aisner, Wallace Akerley, Jessica Bauman, Lucian R. Chirieac, Thomas A. D'Amico, et al. 2017. "Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology." *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 15 (4): 504–35. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2017.0050>.
- Ferlay, Jacques, Hai-Rim Shin, Freddie Bray, David Forman, Colin Mathers, and Donald Maxwell Parkin. 2010. "Estimates of Worldwide Burden of Cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." *International Journal of Cancer* 127 (12): 2893–2917. <https://doi.org/10.1002/ijc.25516>.
- Ferretti E, De Smaele E, Di Marcotullio L, Screpanti I, Gulino A. Hedgehog checkpoints in medulloblastoma: the chromosome 17p deletion paradigm. *Trends Mol Med*. 2005; 11:537–45. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.10.005>.
- Frank S. A. (2013). Input-output relations in biological systems: measurement, information and the Hill equation. *Biology direct*, 8, 31. doi:10.1186/1745-6150-8-31
- Frietze, Seth., Farnham, Peggy J. 2011."Transcription Factor Effector Domains".Subcell Biochem. Author manuscript; available in PMC 2014 Sep 2. Published in final edited form as: *Subcell Biochem*. 2011; 52: 261–277. doi: 10.1007/978-90-481-9069-0_12
- Gadgeel, Shirish M., and Antoinette Wozniak. 2013. "Preclinical Rationale for PI3K/Akt/MTOR Pathway Inhibitors as Therapy for Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor-Resistant Non-Small-Cell Lung Cancer." *Clinical Lung Cancer* 14 (4): 322–32. <https://doi.org/10.1016/j.clc.2012.12.001>.
- Goetz, Sarah C., and Kathryn V. Anderson. 2010. "The Primary Cilium: A Signalling Centre during Vertebrate Development." *Nature Reviews. Genetics* 11 (5): 331–44. <https://doi.org/10.1038/nrg2774>.
- Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, I., et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2016; 11:39-51.
- Golestaneh, Nady, and Bibhuti Mishra. 2005. "TGF-Beta, Neuronal Stem Cells and Glioblastoma." *Oncogene* 24 (37): 5722–30. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208925>.
- Gonnissen, Annelies, Sofie Isebaert, and Karin Haustermans. 2015. "Targeting the Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: Beyond Smoothed." *Oncotarget* 6 (16): 13899–913. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4224>.

- Goodrich, L. V., L. Milenković, K. M. Higgins, and M. P. Scott. 1997. "Altered Neural Cell Fates and Medulloblastoma in Mouse Patched Mutants." *Science (New York, N.Y.)* 277 (5329): 1109–13.
- Grove Christian A., Federico de Masi, M. Inmaculada Barrasa, Daniel E. Newburger, Mark J. Alkema, Martha L. Bulyk, Albertha J.M. Walhout. "[A Multi-Parameter Network Reveals Extensive Divergence Between *C. elegans* bHLH Transcription Factors](#)". *Cell*. 2009 Jul 23; 138(2): 314–327. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.058.
- Han SW, Hwang PG, Chung DH, Kim DW, Im SA, Kim YT, Kim TY, Heo DS, Bang YJ and Kim NK: Epidermal growth factor receptor (EGFR) downstream molecules as response predictive markers for gefitinib (Iressa, ZD1839) in chemotherapy-resistant non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 113: 109-115, 2005.).
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell* 100 (1): 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation." *Cell* 144 (5): 646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hennig, Anne, Robby Markwart, Manuel A. Esparza-Franco, Graham Ladds, and Ignacio Rubio. 2015. "Ras Activation Revisited: Role of GEF and GAP Systems." *Biological Chemistry* 396 (8): 831–48. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0257>.
- Hers, Ingeborg, Emma E. Vincent, and Jeremy M. Tavaré. 2011. "Akt Signalling in Health and Disease." *Cellular Signalling* 23 (10): 1515–27. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.004>.
- Xinli Hu, Hyun Kim, Eli Stahl, Robert Plenge, Mark Daly, Soumya Raychaudhuri." Integrating autoimmune risk loci with gene-expression data identifies specific pathogenic immune cell subsets. *Am J Hum Genet*. 2011 Oct 7; 89(4): 496–506. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.09.002
- Ho KS, Scott MP. Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms. *Curr Opin Neurobiol*. 2002; 12:57–63. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(02\)00290-8](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00290-8).
- Holland, W. S., Chinn, D. C., Lara, P. N., Jr, Gandara, D. R., & Mack, P. C. (2015). Effects of AKT inhibition on HGF-mediated erlotinib resistance in non-small cell lung cancer cell lines. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 141(4), 615–626. doi:10.1007/s00432-014-1855-4
- Huang, Cai, Ken Jacobson, and Michael D. Schaller. 2004. "MAP Kinases and Cell Migration." *Journal of Cell Science* 117 (20): 4619–28. <https://doi.org/10.1242/jcs.01481>.
- Huang, Lihua, and Liwu Fu. 2015. "Mechanisms of Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors." *Acta Pharmaceutica Sinica. B* 5 (5): 390–401. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.001>.
- Humke EW, Dorn KV, Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. The output of hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between suppressor of fused and the Gli proteins. *Genes Dev*. 2010;24:670–82.
- Ihle, Nathan T., Lauren A. Byers, Edward S. Kim, Pierre Saintigny, J. Jack Lee, George R. Blumenschein, Anne Tsao, et al. 2012. "Effect of KRAS Oncogene Substitutions on Protein Behavior: Implications for Signaling and Clinical Outcome." *Journal of the National Cancer Institute* 104 (3): 228–39. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr523>.
- Imai, Kazushi, Seema S. Dalal, Edward S. Chen, Robert Downey, Larry L. Schulman, Mark Ginsburg, and Jeanine D'armiento. 2001. "Human Collagenase (Matrix Metalloproteinase-1) Expression in the Lungs of Patients with Emphysema." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163 (3): 786–91. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.3.2001073>.

- Inamura, Kentaro, Hironori Ninomiya, Yuichi Ishikawa, and Osamu Matsubara. 2010. "Is the Epidermal Growth Factor Receptor Status in Lung Cancers Reflected in Clinicopathologic Features?" *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 134 (1): 66–72. <https://doi.org/10.1043/2008-0586-RAR1.1>.
- Inamura K. 2017. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Frontiers in oncology*, 7, 193. doi:10.3389/fonc.2017.00193
- Jia, Yijun, Tao Jiang, Xuefei Li, Chao Zhao, Limin Zhang, Sha Zhao, Xiaozhen Liu, et al. 2017. "Characterization of Distinct Types of KRAS Mutation and Its Impact on First-Line Platinum-Based Chemotherapy in Chinese Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer." *Oncology Letters* 14 (6): 6525–32. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7016>.
- Jing Xu, Li Shen, Bi-Cheng Zhang, Wen-Hong Xu, Shu-Qin Ruan, Chi Pan And Qi-Chun Wei. HER2 overexpression reverses the relative resistance of EGFR-mutant H1975 cell line to gefitinib. *Oncol Lett*. 2016 Dec; 12(6): 5363–5369. doi: [10.3892/ol.2016.5373](https://doi.org/10.3892/ol.2016.5373)
- Johnson PF, McKnight SL (1989) Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu Rev Biochem* 58: 799–839
- Jones, Peter A., and Peter W. Laird. 1999. "Cancer-Epigenetics Comes of Age." *Nature Genetics* 21 (2): 163–67. <https://doi.org/10.1038/5947>.
- Kasper, Maria, Harald Schnidar, Graham W. Neill, Michaela Hanneder, Stefan Klingler, Leander Blaas, Carmen Schmid, et al. 2006. "Selective Modulation of Hedgehog/GLI Target Gene Expression by Epidermal Growth Factor Signaling in Human Keratinocytes." *Molecular and Cellular Biology* 26 (16): 6283–98. <https://doi.org/10.1128/MCB.02317-05>.
- Katoh, Y., and M. Katoh. 2009. "Hedgehog Target Genes: Mechanisms of Carcinogenesis Induced by Aberrant Hedgehog Signaling Activation." *Current Molecular Medicine* 9 (7): 873–86.
- Kermit L. Carraway III, Lewis, C Cantley. 1994. "A new acquaintance for ErbB3 and ErbB4: A role for receptor heterodimerization in growth signalling". *Cell* 78 (1). 5-8.
- Kim, Eun Kyung, and Eui-Ju Choi. 2010. "Pathological Roles of MAPK Signaling Pathways in Human Diseases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1802 (4): 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009>.
- Kinzler, K. W., S. H. Bigner, D. D. Bigner, J. M. Trent, M. L. Law, S. J. O'Brien, A. J. Wong, and B. Vogelstein. 1987. "Identification of an Amplified, Highly Expressed Gene in a Human Glioma." *Science (New York, N.Y.)* 236 (4797): 70–73.
- Kobayashi, Susumu, Titus J. Boggon, Tajhal Dayaram, Pasi A. Jänne, Olivier Kocher, Matthew Meyerson, Bruce E. Johnson, Michael J. Eck, Daniel G. Tenen, and Balázs Halmos. 2005. "EGFR Mutation and Resistance of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib." *The New England Journal of Medicine* 352 (8): 786–92. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa044238>.
- Kogerman, P., T. Grimm, L. Kogerman, D. Krause, A. B. Undén, B. Sandstedt, R. Toftgård, and P. G. Zaphiropoulos. 1999. "Mammalian Suppressor-of-Fused Modulates Nuclear-Cytoplasmic Shuttling of Gli-1." *Nature Cell Biology* 1 (5): 312–19. <https://doi.org/10.1038/13031>.
- Kwak, Eunice L., Yung-Jue Bang, D. Ross Camidge, Alice T. Shaw, Benjamin Solomon, Robert G. Maki, Sai-Hong I. Ou, et al. 2010. "Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer." *The New England Journal of Medicine* 363 (18): 1693–1703. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1006448>.

- Lee, Chee Khoo, Chris Brown, Richard J. Gralla, Vera Hirsh, Sumitra Thongprasert, Chun-Ming Tsai, Eng Huat Tan, et al. 2013. "Impact of EGFR Inhibitor in Non-Small Cell Lung Cancer on Progression-Free and Overall Survival: A Meta-Analysis." *Journal of the National Cancer Institute* 105 (9): 595–605. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt072>.
- Lee, Hankyu, and Hyuk Wan Ko. 2016. "Ciliary Smoothened-Mediated Noncanonical Hedgehog Signaling Promotes Tubulin Acetylation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 480 (4): 574–79. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.093>.
- Lee, Taebum, Boram Lee, Yoon-La Choi, Joungho Han, Myung-Ju Ahn, and Sang-Won Um. 2016. "Non-Small Cell Lung Cancer with Concomitant EGFR, KRAS, and ALK Mutation: Clinicopathologic Features of 12 Cases." *Journal of Pathology and Translational Medicine* 50 (3): 197–203. <https://doi.org/10.4132/jptm.2016.03.09>.
- Lefloch, Renaud, Jacques Pouysségur, and Philippe Lenormand. 2009. "Total ERK1/2 Activity Regulates Cell Proliferation." *Cell Cycle* 8 (5): 705–11. <https://doi.org/10.4161/cc.8.5.7734>.
- Lepage, David F., Deborah A. Altomare, Joseph R. Testa, and Kenneth Walsh. 1994. "Molecular Cloning and Localization of the Human GAX Gene to 7p21." *Genomics* 24 (3): 535–40. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1663>.
- Lewis, Denise Riedel, David P. Check, Neil E. Caporaso, William D. Travis, and Susan S. Devesa. 2014. "U.S. Lung Cancer Trends by Histologic Type." *Cancer* 120 (18): 2883–92. <https://doi.org/10.1002/cncr.28749>.
- Li, D, L Ambrogio, T Shimamura, S Kubo, M Takahashi, LR Chirieac, RF Padera, et al. 2008. "BIBW2992, an Irreversible EGFR/HER2 Inhibitor Highly Effective in Preclinical Lung Cancer Models." *Oncogene* 27 (34): 4702–11. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.109>.
- Lim, Sun Min, Nicholas L. Syn, Byoung Chul Cho, and Ross A. Soo. 2018. "Acquired Resistance to EGFR Targeted Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer: Mechanisms and Therapeutic Strategies." *Cancer Treatment Reviews* 65 (April): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.02.006>.
- Lima, Flavia R. S., Suzana Assad Kahn, Rossana C. Soletti, Deborah Biasoli, Tercia Alves, Anna Carolina C. da Fonseca, Celina Garcia, et al. 2012. "Glioblastoma: Therapeutic Challenges, What Lies Ahead." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1826 (2): 338–49. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.05.004>.
- Lynch, Thomas J., Daphne W. Bell, Raffaella Sordella, Sarada Gurubhagavatula, Ross A. Okimoto, Brian W. Brannigan, Patricia L. Harris, et al. 2004a. "Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib." *The New England Journal of Medicine* 350 (21): 2129–39. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040938>.
- Lynch TJ, Patel T, Dreisbach L, et al. Cetuximab and first-line taxane/carboplatin chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: results of the randomized multicenter phase III trial BMS099. *J Clin Oncol* 2010;28:911-7.
- . 2004b. "Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib." *New England Journal of Medicine* 350 (21): 2129–39. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040938>.
- Ma, Yanlei, Peng Zhang, Feng Wang, Jianjun Yang, Zhe Yang, and Huanlong Qin. 2010. "The Relationship between Early Embryo Development and Tumourigenesis." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14 (12): 2697–2701. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01191.x>.

- Maconachie, Ross, Toby Mercer, Neal Navani, and Gary McVeigh. 2019. "Lung Cancer: Diagnosis and Management: Summary of Updated NICE Guidance." *BMJ* 364 (March): l1049. <https://doi.org/10.1136/bmj.l1049>.
- Maemondo, Makoto, Akira Inoue, Kunihiko Kobayashi, Shunichi Sugawara, Satoshi Oizumi, Hiroshi Isobe, Akihiko Gemma, Masao Harada, Hirohisa Yoshizawa, Ichiro Kinoshita, Yuka Fujita, Shoji Okinaga, Haruto Hirano, Kozo Yoshimori, Toshiyuki Harada, Takashi Ogura, Masahiro Ando, Hitoshi Miyazawa, Tomoaki Tanaka, Yasuo Saijo, Koichi Hagiwara, Satoshi Morita, Toshihiro Nukiwa, et al. 2010. "Gefitinib or Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR." *The New England Journal of Medicine* 362 (25): 2380–88. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0909530>.
- . 2010. "Gefitinib or Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR." *New England Journal of Medicine* 362 (25): 2380–88. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0909530>.
- Mankoo, Baljinder S., Skuntz, Susan., Harrigan, Ian., Grigorieva, Elena., Candia, Al., V, Christopher., Wright, E., Arnheiter, Heinz., Pachnis, Vassilis. "The concerted action of Meox homeobox genes is required upstream of genetic pathways essential for the formation, patterning and differentiation of somites". *Development*. 2003 Oct; 130(19): 4655–4664. doi: 10.1242/dev.00687
- Marx, Alexander, John K.C. Chan, Jean-Michel Coindre, Frank Detterbeck, Nicolas Girard, Nancy L. Harris, Elaine S. Jaffe, et al. 2015. "The 2015 WHO Classification of Tumors of the Thymus: Continuity and Changes." *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 10 (10): 1383–95. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000654>.
- McCubrey, James A., Linda S. Steelman, William H. Chappell, Steven L. Abrams, Ellis WT. Wong, Fumin Chang, Brian Lehmann, et al. 2007. "ROLES OF THE RAF/MEK/ERK PATHWAY IN CELL GROWTH, MALIGNANT TRANSFORMATION AND DRUG RESISTANCE." *Biochimica et Biophysica Acta* 1773 (8): 1263–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.001>.
- Mercado, Nicolas, Kazuhiro Ito, and Peter J. Barnes. 2015. "Accelerated Ageing of the Lung in COPD: New Concepts." *Thorax* 70 (5): 482–89. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-206084>.
- Mercer, Becky A., Natalia Kolesnikova, Joshua Sonett, and Jeanine D'Armiento. 2004. "Extracellular Regulated Kinase/Mitogen Activated Protein Kinase Is Up-Regulated in Pulmonary Emphysema and Mediates Matrix Metalloproteinase-1 Induction by Cigarette Smoke." *Journal of Biological Chemistry* 279 (17): 17690–96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313842200>.
- Mitin, Natalia, Kent L. Rossman, and Channing J. Der. 2005. "Signaling Interplay in Ras Superfamily Function." *Current Biology: CB* 15 (14): R563–574. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.010>.
- Mitsudomi, Tetsuya, Satoshi Morita, Yasushi Yatabe, Shunichi Negoro, Isamu Okamoto, Junji Tsurutani, Takashi Seto, et al. 2010. "Gefitinib versus Cisplatin plus Docetaxel in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor (WJTOG3405): An Open Label, Randomised Phase 3 Trial." *The Lancet. Oncology* 11 (2): 121–28. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70364-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70364-X).
- Mohar-Betancourt, Alejandro, Nancy Reynoso-Noverón, Daniel Armas-Texta, Cristina Gutiérrez-Delgado, and Juan A. Torres-Domínguez. 2017. "Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies." *Journal of Global Oncology*, March, JGO.2016.007476. <https://doi.org/10.1200/JGO.2016.007476>.
- Mok, Tony S., Yi-Long Wu, Sumitra Thongprasert, Chih-Hsin Yang, Da-Tong Chu, Nagahiro Saijo, Patrapim Sunpaweravong, et al. 2009. "Gefitinib or Carboplatin-Paclitaxel in Pulmonary

- Adenocarcinoma." *The New England Journal of Medicine* 361 (10): 947–57. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810699>.
- Morgillo, Floriana, Carminia Maria Della Corte, Morena Fasano, and Fortunato Ciardiello. 2016. "Mechanisms of Resistance to EGFR-Targeted Drugs: Lung Cancer." *ESMO Open* 1 (3): e000060. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2016-000060>.
- Morris, S. W., M. N. Kirstein, M. B. Valentine, K. G. Dittmer, D. N. Shapiro, D. L. Saltman, and A. T. Look. 1994. "Fusion of a Kinase Gene, ALK, to a Nucleolar Protein Gene, NPM, in Non-Hodgkin's Lymphoma." *Science (New York, N.Y.)* 263 (5151): 1281–84.
- Mukhopadhyay, Sanjay, and Anna-Luise Katzenstein. 2011. "Subclassification of Non-Small Cell Lung Carcinomas Lacking Morphologic Differentiation on Biopsy Specimens." *The American Journal of Surgical Pathology* 35 (1): 15–25. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182036d05>.
- Mukohara, Toru, Shinzoh Kudoh, Setsuko Yamauchi, Tatsuo Kimura, Naruo Yoshimura, Hiroshi Kanazawa, Kazuto Hirata, et al. 2003. "Expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Downstream-Activated Peptides in Surgically Excised Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC)." *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 41 (2): 123–30.
- "National Cancer Institute (NCI)." 2015. National Institutes of Health (NIH). July 7, 2015. <https://www.nih.gov/about-nih/what-we-do/nih-almanac/national-cancer-institute-nci>.
- Neel, Dana S., and Trevor G. Bivona. 2017. "Resistance Is Futile: Overcoming Resistance to Targeted Therapies in Lung Adenocarcinoma." *Npj Precision Oncology* 1 (1): 3. <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0007-0>.
- Noro R, Gemma A, Kosaihiro S, Kokubo Y, Chen M, Seike M, Kataoka K, Matsuda K, Okano T, Minegishi Y, et al: Gefitinib (IRESSA) sensitive lung cancer cell lines show phosphorylation of Akt without ligand stimulation. *BMC Cancer* 6: 277, 2006).
- Nyati, M.K., Morgan, M.A., Feng, F.Y., & Lawrence, T.S. (2006). Erratum: Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 6, 974.
- Ohashi K., Maruvka Y.E., Michor F., Pao W. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-resistant disease. *J. Clin. Oncol.* 2013;31:1070–1080. doi: 10.1200/JCO.2012.43.3912
- Oro, A. E., K. M. Higgins, Z. Hu, J. M. Bonifas, E. H. Epstein, and M. P. Scott. 1997. "Basal Cell Carcinomas in Mice Overexpressing Sonic Hedgehog." *Science (New York, N.Y.)* 276 (5313): 817–21.
- Paez, J. Guillermo, Pasi A. Jänne, Jeffrey C. Lee, Sean Tracy, Heidi Greulich, Stacey Gabriel, Paula Herman, et al. 2004a. "EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy." *Science* 304 (5676): 1497–1500. <https://doi.org/10.1126/science.1099314>.
- . 2004b. "EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy." *Science* 304 (5676): 1497–1500. <https://doi.org/10.1126/science.1099314>.
- Pao, William, and Juliann Chmielecki. 2010. "Rational, Biologically Based Treatment of EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer." *Nature Reviews. Cancer* 10 (11): 760–74. <https://doi.org/10.1038/nrc2947>.
- Pao, William, Vincent A. Miller, Katerina A. Politi, Gregory J. Riely, Romel Somwar, Maureen F. Zakowski, Mark G. Kris, and Harold Varmus. 2005. "Acquired Resistance of Lung

- Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib Is Associated with a Second Mutation in the EGFR Kinase Domain." *PLoS Medicine* 2 (3): e73. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020073>.
- Pao, William, Vincent Miller, Maureen Zakowski, Jennifer Doherty, Katerina Politi, Inderpal Sarkaria, Bhuvanesh Singh, et al. 2004a. "EGF Receptor Gene Mutations Are Common in Lung Cancers from 'Never Smokers' and Are Associated with Sensitivity of Tumors to Gefitinib and Erlotinib." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (36): 13306–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405220101>.
- . 2004b. "EGF Receptor Gene Mutations Are Common in Lung Cancers from 'Never Smokers' and Are Associated with Sensitivity of Tumors to Gefitinib and Erlotinib." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (36): 13306–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405220101>.
- Papadimitrakopoulou, Vassiliki. 2012. "Development of PI3K/AKT/MTOR Pathway Inhibitors and Their Application in Personalized Therapy for Non-Small-Cell Lung Cancer." *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 7 (8): 1315–26. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31825493eb>.
- Park, Keunchil, Eng-Huat Tan, Ken O'Byrne, Li Zhang, Michael Boyer, Tony Mok, Vera Hirsh, et al. 2016. "Afatinib versus Gefitinib as First-Line Treatment of Patients with EGFR Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer (LUX-Lung 7): A Phase 2B, Open-Label, Randomised Controlled Trial." *The Lancet. Oncology* 17 (5): 577–89. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30033-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30033-X).
- Paz-Ares, L., E.-H. Tan, K. O'Byrne, L. Zhang, V. Hirsh, M. Boyer, J. C.-H. Yang, et al. 2017. "Afatinib versus Gefitinib in Patients with EGFR Mutation-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Overall Survival Data from the Phase IIb LUX-Lung 7 Trial." *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 28 (2): 270–77. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw611>.
- Perner, Sven, Patrick L Wagner, Francesca Demichelis, Rohit Mehra, Christopher J LaFargue, Benjamin J Moss, Stefanie Arbogast, et al. 2008. "EML4-ALK Fusion Lung Cancer: A Rare Acquired Event." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 10 (3): 298–302.
- Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, et al. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet* 2009;373:1525-31.
- Reece-Hoyes, J. S., & Marian Walhout, A. J. (2012). Yeast one-hybrid assays: a historical and technical perspective. *Methods (San Diego, Calif.)*, 57(4), 441–447. doi:10.1016/j.ymeth.2012.07.027
- Reiter Franziska, Wienerroither Sebastian, Stark Alexander. 2017."Combinatorial function of transcription factors and cofactors". *Curr Opin Genet Dev.* 2017 Jan 19; 43: 73–81. Published online 2017 Jan 19. doi: 10.1016/j.gde.2016.12.007
- Rekhtman, Natasha, Daphne C. Ang, Camelia S. Sima, William D. Travis, and Andre L. Moreira. 2011. "Immunohistochemical Algorithm for Differentiation of Lung Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma Based on Large Series of Whole-Tissue Sections with Validation in Small Specimens." *Modern Pathology* 24 (10): 1348–59. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.92>.
- Rimkus, Tadas K., Richard L. Carpenter, Shadi Qasem, Michael Chan, and Hui-Wen Lo. 2016. "Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors." *Cancers* 8 (2). <https://doi.org/10.3390/cancers8020022>.
- Román, Marta, Iosune Baraibar, Inés López, Ernest Nadal, Christian Rolfo, Silvestre Vicent, and Ignacio Gil-Bazo. 2018. "KRAS Oncogene in Non-Small Cell Lung Cancer: Clinical Perspectives

- on the Treatment of an Old Target.” *Molecular Cancer* 17 (February).
<https://doi.org/10.1186/s12943-018-0789-x>.
- Rosell, Rafael, Enric Carcereny, Radj Gervais, Alain Vergnenegre, Bartomeu Massuti, Enriqueta Felip, Ramon Palmero, et al. 2012. “Erlotinib versus Standard Chemotherapy as First-Line Treatment for European Patients with Advanced EGFR Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer (EURTAC): A Multicentre, Open-Label, Randomised Phase 3 Trial.” *The Lancet. Oncology* 13 (3): 239–46. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70393-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70393-X).
- Roth, W., C. Wild-Bode, M. Platten, C. Grimm, H. S. Melkonyan, J. Dichgans, and M. Weller. 2000. “Secreted Frizzled-Related Proteins Inhibit Motility and Promote Growth of Human Malignant Glioma Cells.” *Oncogene* 19 (37): 4210–20. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203783>.
- Ruiz i Altaba, A. 1997. “Catching a Gli-Mpse of Hedgehog.” *Cell* 90 (2): 193–96.
- Ruiz i Altaba, Ariel, Christophe Mas, and Barbara Stecca. 2007. “The Gli Code: An Information Nexus Regulating Cell Fate, Stemness and Cancer.” *Trends in Cell Biology* 17 (9): 438–47. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.06.007>.
- Sasaki, H., Y. Nishizaki, C. Hui, M. Nakafuku, and H. Kondoh. 1999. “Regulation of Gli2 and Gli3 Activities by an Amino-Terminal Repression Domain: Implication of Gli2 and Gli3 as Primary Mediators of Shh Signaling.” *Development (Cambridge, England)* 126 (17): 3915–24.
- Schmitges, Frank W., Radovani, Ernest., Najafabadi, Hamed S., Barazandeh, Marjan., Campitelli, Laura F., Yin, Yimeng., Jolma, Arttu., Zhong, Guoqing., Guo, Hongbo., Kanagalingam., Tharsan, Wei F. Dai, Jussi Taipale, Andrew Emili, Jack F. Greenblatt, Timothy R. Hughes.” [Multiparameter functional diversity of human C2H2 zinc finger proteins](#). *Genome Res.* 2016 Dec; 26(12): 1742–1752. doi: 10.1101/gr.209643.116
- Scrima, Marianna, Carmela De Marco, Fernanda Fabiani, Renato Franco, Giuseppe Pirozzi, Gaetano Rocco, Maria Ravo, et al. 2012. “Signaling Networks Associated with AKT Activation in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): New Insights on the Role of Phosphatidylinositol-3 Kinase.” *PLOS ONE* 7 (2): e30427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030427>.
- Sequist, Lecia V., James Chih-Hsin Yang, Nobuyuki Yamamoto, Kenneth O’Byrne, Vera Hirsh, Tony Mok, Sarayut Lucien Geater, et al. 2013. “Phase III Study of Afatinib or Cisplatin plus Pemetrexed in Patients with Metastatic Lung Adenocarcinoma with EGFR Mutations.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (27): 3327–34. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.44.2806>.
- Sequist L.V., Waltman B.A., Dias-Santagata D., Digumarthy S., Turke A.B., Fidias P., Bergethon K., Shaw A.T., Gettinger S., Cospers A.K., et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci. Transl. Med.* 2011;3:75ra26. doi: 10.1126/scitranslmed.3002003.
- Seto, Motoko, Miki Ohta, Yoshinari Asaoka, Tsuneo Ikenoue, Motohisa Tada, Koji Miyabayashi, Dai Mohri, et al. 2009. “Regulation of the Hedgehog Signaling by the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in Gastric Cancer.” *Molecular Carcinogenesis* 48 (8): 703–12. <https://doi.org/10.1002/mc.20516>.
- Shi, Y., L. Chen, J. Li, Y. L. Lv, Q. Sun, L. X. Wang, and S. C. Jiao. 2011. “Prognostic and Predictive Values of PERK1/2 and pAkt-1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Adjuvant Chemotherapy.” *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 32 (2): 381–90. <https://doi.org/10.1007/s13277-010-0131-8>.

- Shigematsu, Hisayuki, Li Lin, Takao Takahashi, Masaharu Nomura, Makoto Suzuki, Ignacio I. Wistuba, Kwun M. Fong, et al. 2005. "Clinical and Biological Features Associated with Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations in Lung Cancers." *Journal of the National Cancer Institute* 97 (5): 339–46. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji055>.
- Solca, Flavio, Goeran Dahl, Andreas Zoephel, Gerd Bader, Michael Sanderson, Christian Klein, Oliver Kraemer, Frank Himmelsbach, Eric Haaksma, and Guenther R. Adolf. 2012. "Target Binding Properties and Cellular Activity of Afatinib (BIBW 2992), an Irreversible ErbB Family Blocker." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 343 (2): 342–50. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.197756>.
- Soria, Jean-Charles, Yuichiro Ohe, Johan Vansteenkiste, Thanyanan Reungwetwattana, Busyamas Chewaskulyong, Ki Hyeong Lee, Arunee Dechaphunkul, et al. 2018. "Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer." *The New England Journal of Medicine* 378 (2): 113–25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1713137>.
- Stamatakis D, Kastrinaki M, Mankoo BS, Pachnis V, Karagogeos D (Jun 2001). "Homeodomain proteins Mox1 and Mox2 associate with Pax1 and Pax3 transcription factors". *FEBS Lett.* **499** (3): 274–8. [doi:10.1016/S0014-5793\(01\)02556-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02556-X)
- Stewart, Erin L., Samuel Zhixing Tan, Geoffrey Liu, and Ming-Sound Tsao. 2015. "Known and Putative Mechanisms of Resistance to EGFR Targeted Therapies in NSCLC Patients with EGFR Mutations—a Review." *Translational Lung Cancer Research* 4 (1): 67–81. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2014.11.06>.
- Tacha, David, Charie Yu, Ryan Bremer, Weiman Qi, and Thomas Haas. 2012. "A 6-Antibody Panel for the Classification of Lung Adenocarcinoma versus Squamous Cell Carcinoma." *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM* 20 (3): 201–7. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31823d7f0e>.
- Tacheny, A., Dieu, M., Arnould, T., Renard, P. "Mass spectrometry-based identification of proteins interacting with nucleic acids." *J Proteomics*. 2013 Dec 6;94:89-109. doi: 10.1016/j.jprot.2013.09.011.
- Takashima, Asami, and Douglas V. Faller. 2013. "Targeting the RAS Oncogene." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 17 (5): 507–31. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.764990>.
- Tan, Chee-Seng, David Gilligan, and Simon Pacey. 2015. "Treatment Approaches for EGFR-Inhibitor-Resistant Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer." *The Lancet Oncology* 16 (9): e447–59. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00246-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00246-6).
- Tang, Jian-Min, Quan-Ying He, Rui-Xia Guo, and Xiu-Jun Chang. 2006. "Phosphorylated Akt Overexpression and Loss of PTEN Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Confers Poor Prognosis." *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 51 (2): 181–91. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.10.003>.
- Teglund, Stephan, and Rune Toftgård. 2010. "Hedgehog beyond Medulloblastoma and Basal Cell Carcinoma." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1805 (2): 181–208. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.01.003>.
- Tetlow, Ashley L., and Fuyuhiko Tamanoi. 2013. "The Ras Superfamily G-Proteins." *The Enzymes* 33 Pt A: 1–14. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416749-0.00001-4>.
- To, Yasuo, Kazuhiro Ito, Yasuo Kizawa, Marco Failla, Misako Ito, Tadashi Kusama, W. Mark Elliott, James C. Hogg, Ian M. Adcock, and Peter J. Barnes. 2010. "Targeting Phosphoinositide-3-Kinase- δ with Theophylline Reverses Corticosteroid Insensitivity in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 182 (7): 897–904. <https://doi.org/10.1164/rccm.200906-0937OC>.

- Travis, William D., Elisabeth Brambilla, Masayuki Noguchi, Andrew G. Nicholson, Kim Geisinger, Yasushi Yatabe, Yuichi Ishikawa, et al. 2013. "Diagnosis of Lung Adenocarcinoma in Resected Specimens: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification." *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 137 (5): 685–705. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0264-RA>.
- Travis WD. 2011."Pathology of lung cancer". *Clinics in Chest Medicine.*; 32(4): 669–692. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.08.005>
- Tsurutani, Junji, Junya Fukuoka, Hiroko Tsurutani, Joanna H. Shih, Stephen M. Hewitt, William D. Travis, Jin Jen, and Phillip A. Dennis. 2006. "Evaluation of Two Phosphorylation Sites Improves the Prognostic Significance of Akt Activation in Non-Small-Cell Lung Cancer Tumors." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (2): 306–14. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.4133>.
- Van der Geer P, Tony Hunter, and Richard A. Lindberg. "Receptor Protein-Tyrosine Kinases and Their Signal Transduction Pathways". *Annual Review of Cell Biology* 1994 10:1, 251-337
- Vetter, I. R., and A. Wittinghofer. 2001. "The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions." *Science (New York, N.Y.)* 294 (5545): 1299–1304. <https://doi.org/10.1126/science.1062023>.
- Vicent, S., J. M. López-Picazo, G. Toledo, M. D. Lozano, W. Torre, C. Garcia-Corchón, C. Quero, et al. 2004a. "ERK1/2 Is Activated in Non-Small-Cell Lung Cancer and Associated with Advanced Tumours." *British Journal of Cancer* 90 (5): 1047–52. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601644>.
- Vicent, S, J M López-Picazo, G Toledo, M D Lozano, W Torre, C Garcia-Corchón, C Quero, et al. 2004b. "ERK1/2 Is Activated in Non-Small-Cell Lung Cancer and Associated with Advanced Tumours." *British Journal of Cancer* 90 (5): 1047–52. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601644>.
- Wang, Shuhang, Shundong Cang, and Delong Liu. 2016. "Third-Generation Inhibitors Targeting EGFR T790M Mutation in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer." *Journal of Hematology & Oncology* 9 (1): 34. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0268-z>.
- Wang, M., Liang, X., Liu, Z., Cui, J., Liu, Y., Jing, L. ... Yao, Y. (2015). In vitro synergistic antitumor efficacy of sequentially combined chemotherapy/icotinib in non-small cell lung cancer cell lines. *Oncology Reports*, 33, 239-249. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3583>
- Wang, Z., Du, T., Dong, X., Li, Z., Wu, G., & Zhang, R. (2016). Autophagy inhibition facilitates erlotinib cytotoxicity in lung cancer cells through modulation of endoplasmic reticulum stress. *International Journal of Oncology*, 48, 2558-2566. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3468>
- Weirauch, Matthew T., Hughes T. R. A catalogue of eukaryotic transcription factor types, their evolutionary origin, and species distribution. *Subcell Biochem.* 2011; 52: 25–73. doi: 10.1007/978-90-481-9069-0_3
- Westra, W. H., R. J. Slebos, G. J. Offerhaus, S. N. Goodman, S. G. Evers, T. W. Kensler, F. B. Askin, S. Rodenhuis, and R. H. Hruban. 1993. "K-Ras Oncogene Activation in Lung Adenocarcinomas from Former Smokers. Evidence That K-Ras Mutations Are an Early and Irreversible Event in the Development of Adenocarcinoma of the Lung." *Cancer* 72 (2):432–38. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19930715\)72:2<432::AID-CNCR2820720219>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19930715)72:2<432::AID-CNCR2820720219>3.0.CO;2-#).

- “WHO Cancer.” n.d. WHO. Accessed July 10, 2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
- Wijgerde, Mark, Marja Ooms, Jos W. Hoogerbrugge, and J. Anton Grootegoed. 2005. “Hedgehog Signaling in Mouse Ovary: Indian Hedgehog and Desert Hedgehog from Granulosa Cells Induce Target Gene Expression in Developing Theca Cells.” *Endocrinology* 146 (8): 3558–66. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0311>.
- Wu SG, Liu YN, Tsai MF, Chang YL, Yu CJ, Yang PC, Yang JC, Wen YF, Shih JY El mecanismo de resistencia adquirida al inhibidor irreversible de la tirosina quinasa EGFR-afatinib en pacientes con adenocarcinoma de pulmón. *Oncotarget*. 2016; 7 : 12404–12413. doi: 10.18632 / oncotarget.7189.
- Wu, Shang-Gin, and Jin-Yuan Shih. 2018. “Management of Acquired Resistance to EGFR TKI–Targeted Therapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer.” *Molecular Cancer* 17 (1): 38. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0777-1>.
- Wu, Yi-Long, Ying Cheng, Xiangdong Zhou, Ki Hyeong Lee, Kazuhiko Nakagawa, Seiji Niho, Fumito Tsuji, et al. 2017. “Dacomitinib versus Gefitinib as First-Line Treatment for Patients with EGFR-Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer (ARCHER 1050): A Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial.” *The Lancet. Oncology* 18 (11): 1454–66. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30608-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30608-3).
- Wu, Yi-Long, Caicun Zhou, Cheng-Ping Hu, Jifeng Feng, Shun Lu, Yunchao Huang, Wei Li, et al. 2014a. “Afatinib versus Cisplatin plus Gemcitabine for First-Line Treatment of Asian Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Harbouring EGFR Mutations (LUX-Lung 6): An Open-Label, Randomised Phase 3 Trial.” *The Lancet. Oncology* 15 (2): 213–22. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70604-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70604-1).
- . 2014b. “Afatinib versus Cisplatin plus Gemcitabine for First-Line Treatment of Asian Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Harbouring EGFR Mutations (LUX-Lung 6): An Open-Label, Randomised Phase 3 Trial.” *The Lancet. Oncology* 15 (2): 213–22. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70604-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70604-1).
- Xue C, Hu Z, Jiang W, Zhao Y, Xu F, Huang Y, Zhao H, Wu J, Zhang Y, Zhao L, et al: National survey of the medical treatment status for non-small cell lung cancer (NSCLC) in China. *Lung Cancer* 77: 371-375, 2012
- Yang, James Chih-Hsin, Yi-Long Wu, Martin Schuler, Martin Sebastian, Sanjay Popat, Nobuyuki Yamamoto, Caicun Zhou, et al. 2015. “Afatinib versus Cisplatin-Based Chemotherapy for EGFR Mutation-Positive Lung Adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): Analysis of Overall Survival Data from Two Randomised, Phase 3 Trials.” *The Lancet. Oncology* 16 (2): 141–51. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71173-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71173-8).
- Yano S., Yamada T., Takeuchi S., Tachibana K., Minami Y., Yatabe Y., Mitsudomi T., Tanaka H., Kimura T., Kudoh S., et al. Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. *J. Thorac. Oncol.* 2011;6:2011–2017. doi: 10.1097/JTO.0b013e31823ab0dd.
- Yao, Humphrey Hung-Chang, Wendy Whoriskey, and Blanche Capel. 2002. “Desert Hedgehog/Patched 1 Signaling Specifies Fetal Leydig Cell Fate in Testis Organogenesis.” *Genes & Development* 16 (11): 1433–40. <https://doi.org/10.1101/gad.981202>.
- Yoshizawa, Akihiko, Junya Fukuoka, Shigeki Shimizu, Konstantin Shilo, Teri J. Franks, Stephen M. Hewitt, Takeshi Fujii, Carlos Cordon-Cardo, Jin Jen, and William D. Travis. 2010. “Overexpression of Phospho-EIF4E Is Associated with Survival through AKT Pathway in Non-

Small Cell Lung Cancer.” *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 16 (1): 240–48. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0986>.

- Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, et al. 2011. “Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: Prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases”. *Modern Pathology*; (1530-0285 [Electronic])
- Yuan, Z., J. A. Goetz, S. Singh, S. K. Ogden, W. J. Petty, C. C. Black, V. A. Memoli, E. Dmitrovsky, and D. J. Robbins. 2007. “Frequent Requirement of Hedgehog Signaling in Non-Small Cell Lung Carcinoma.” *Oncogene* 26 (7): 1046–55. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209860>.
- Yun, Cai-Hong, Titus J. Boggon, Yiqun Li, Michele S. Woo, Heidi Greulich, Matthew Meyerson, and Michael J. Eck. 2007. “Structures of Lung Cancer-Derived EGFR Mutants and Inhibitor Complexes: Mechanism of Activation and Insights into Differential Inhibitor Sensitivity.” *Cancer Cell* 11 (3): 217–27. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.12.017>.
- Zer, Alona, and Natasha Leighl. 2014. “Promising Targets and Current Clinical Trials in Metastatic Non-Squamous NSCLC.” *Frontiers in Oncology* 4 (November). <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00329>.
- Zhou, Caicun, Yi-Long Wu, Gongyan Chen, Jifeng Feng, Xiao-Qing Liu, Changli Wang, Shucui Zhang, et al. 2011. “Erlotinib versus Chemotherapy as First-Line Treatment for Patients with Advanced EGFR Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): A Multicentre, Open-Label, Randomised, Phase 3 Study.” *The Lancet Oncology* 12 (8): 735–42. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70184-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70184-X).
- Zhou, Jiancheng, Guodong Zhu, Jun Huang, Lei Li, Yuefeng Du, Yang Gao, Dapeng Wu, et al. 2016. “Non-Canonical G11/2 Activation by PI3K/AKT Signaling in Renal Cell Carcinoma: A Novel Potential Therapeutic Target.” *Cancer Letters* 370 (2): 313–23. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.11.006>.

10. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

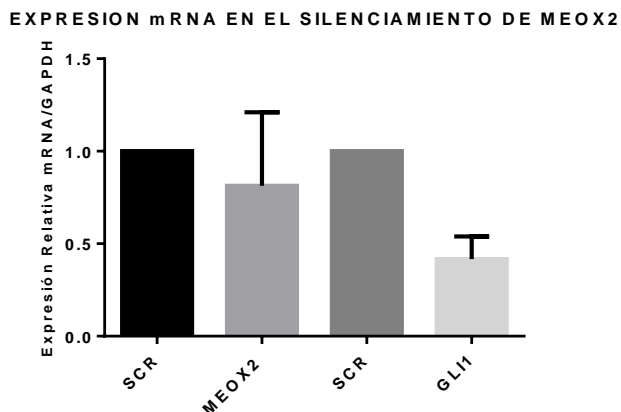


Figura suplementaria 1. **Ensayos de validación del silenciamiento genético de MEOX2 y GLI-1 en células de cáncer pulmonar NCI-H1975 mediante siRNAs.** En la figura se muestran los niveles de expresión de MEOX2 y GLI-1 posterior al silenciamiento mediante siRNAs, se observa que los niveles de MEOX2 y GLI-1 disminuyen, sin embargo, solo se pudieron realizar 2 réplicas biológicas debido a problemas con la viabilidad celular, por lo que en este trabajo únicamente con la línea celular A549 debido a que se pudieron realizar ensayos sin pérdida de células. Los datos se presentan como la media \pm D.E., de 2 réplicas biológicas independientes. Se empleó el control siSCR para normalizar los niveles de expresión relativa. Se realizarán ensayos posteriormente para determinar si MEOX2 y GLI-1 influyen en la resistencia a la terapia en la línea celular NCI-H1975.

AGRADECIMIENTOS

A los proyectos PAPIIT-DGAPA: IN226317 de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y FOSISS 2016-1: 00272655 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt). Finalmente, a la colaboración inter institucional UNAM-INER, con número de registro: UNAM 43355-3065-17-XI-15.