



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Participación del eje MEOX2-ZEB1 en la transición
epitelio-mesénquima y resistencia a la terapia oncológica
en cáncer pulmonar**

TESIS

Que para optar por el grado de
Licenciado en Biología

PRESENTA:

Pineda-Villegas Priscila

DIRECTOR:

Dr. Leonel Armas López. FES IZTACALA

SINODALES :

Dr. Federico Ávila Moreno.
Dr. Luís Enrique Arias Romero.
Dr. Santiago Martínez Calvillo.
FES IZTACALA
Dra. Patricia Piña Sánchez.
CMNSXX1

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México; 2020



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.

Agradecimientos

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por la infraestructura, la enseñanza, por ser mi hogar y un refugio. Por las mejores enseñanzas en todo sentido, por las oportunidades.

Al Dr. Leonel Armas López, agradezco su paciencia, tolerancia, respeto, exigencia, templanza y confianza.

Al Dr. Federico Ávila Moreno, por su paciencia, por su tolerancia y por enseñarme sobre de dedicación, carácter y liderazgo.

A mis Sinodales Dr. Federico Ávila Moreno, Dr. Luís E. Arias Romero, Dr. Santiago Martínez Calvillo, Dra. Patricia Piña Sánchez; por el tiempo que le dedicaron a la lectura de la presente, sus revisiones y correcciones.

Dedicatorias

A Josafat Pineda Ramírez; padre contigo todo sin ti nada.

A Liliana Villegas Alcántar por tu apoyo siempre.

A mis hermanos Harley y Alan por la confidencialidad, por que sé que siempre puedo contar con ustedes.

A mis nanas Marina y Xóchitl; las niñas Fanny y Alison, como siempre: somos 9, estamos 9 con todo y para todo.

A mis compañeros Alfonso Ávila, Bruno Cortés, Guadalupe Flores, Patricia Monroy, Alejandra Nájera, Rafael Sánchez, Carlos Sánchez, Samantha Vergara... por acabarse mi paciencia.

A LVVG por la inspiración, por el cariño y el pato.

Contenido

| | |
|---|-----------|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | 6 |
| ÍNDICE DE TABLAS E ÍNDICE DE CUADROS..... | 8 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 9 |
| RESUMEN..... | 10 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 12 |
| 1.1 CÁNCER: CONTEXTO HISTÓRICO | 12 |
| 1.2 DEFINICIÓN DE CÁNCER..... | 14 |
| 1.3 BIOLOGÍA DEL CÁNCER | 15 |
| 1.-AUTO SUFICIENCIA/MANTENIMIENTO DE SEÑALES PROLIFERATIVAS..... | 17 |
| 2.-EVASIÓN/INSENSIBILIDAD A SUPRESORES DEL CRECIMIENTO | 18 |
| 3.- ACTIVACIÓN DE INVASIÓN Y METÁSTASIS | 19 |
| 4.-INMORTALIDAD REPLICATIVA | 20 |
| 5.-INDUCCIÓN DE ANGIOGÉNESIS..... | 21 |
| 6.-EVASIÓN DE MUERTE CELULAR..... | 21 |
| 7.-EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE..... | 22 |
| 8.-DESREGULACIÓN DE METABOLISMO ENERGÉTICO..... | 23 |
| 9) INFLAMACIÓN TUMORAL | 23 |
| 10) INESTABILIDAD GENÓMICA Y MUTACIONES | 24 |
| 1.4 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER PULMONAR | 25 |
| 1.5.-FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER PULMONAR. | 26 |
| 1.6.-ÉTAPIFICACIÓN DEL CÁNCER..... | 29 |
| 1.7.-SOBREVIDA DE LOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS | 33 |
| 1.8.- TRATAMIENTO..... | 34 |
| 1.9 RESISTENCIA A LA TERAPIA ONCOLÓGICA | 37 |
| 1.10.-TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA..... | 40 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 41 |
| 3.- JUSTIFICACIÓN..... | 43 |
| 4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 44 |

| | |
|---|-----------|
| 5.- HIPOTESIS..... | 44 |
| 6.- OBJETIVOS..... | 45 |
| 6.1.- OBJETIVO GENERAL..... | 45 |
| 6.2.- OBJETIVOS PARTICULARES | 45 |
| 7.- DIAGRAMA EXPERIMENTAL | 46 |
| | 46 |
| 8.- MATERIALES Y MÉTODOS..... | 47 |
| 8.1 ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> | 47 |
| 8.2 CULTIVO CELULAR..... | 47 |
| 8.3 VIABILIDAD CELULAR | 48 |
| 8.4 SILENCIAMIENTO GENÉTICO..... | 49 |
| 8.5 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS | 49 |
| 8.6 SÍNTESIS DE CDNA | 50 |
| 8.7 RT-PCR Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE MRNA..... | 51 |
| 8.8 WESTERN BLOT | 51 |
| 8.9 ENSAYOS DE MIGRACIÓN | 52 |
| 8.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 53 |
| 9.- RESULTADOS | 54 |
| 10.-DISCUSIÓN | 76 |
| 11.- CONCLUSIONES..... | 86 |
| 13.-ANEXO | 88 |
| 13.- BIBLIOGRAFÍA | 90 |

Índice de figuras

| | |
|---|-----------|
| Figura 1.- Ocupación del factor de transcripción MEOX2 y RNA pol II, sobre la región promotora de ZEB1 en pacientes Mexicanos. | 40 |
| Figura 2.- Análisis in silico que indican los sitios de interacción física de alta probabilidad de la proteína MEOX2, tiene sobre el promotor de ZEB1..... | 41 |
| Figura 3.- Sitios motif del factor de transcripción MEOX2 sobre el promotor de ZEB1..... | 42 |
| Figura 4.- Estado epigenético de la región promotora de ZEB1 en células A549. | 43 |
| Figura 5.- Determinación de niveles basales de mRNA de MEOX2 y ZEB1 en 4 líneas celulares (A549, NH2347, H1975 y HCC827). | 44 |
| Figura 6.- Determinación de niveles basales de mRNA de E-cadherina y VIMENTINA en A549, NH2347, H1975 y HCC827..... | 45 |
| Figura 7.- Detección de los niveles de proteína de ZEB1 y MEOX2 en 4 líneas de adenocarcinoma pulmonar. | 45 |
| Figura 8.- Efecto del silenciamiento en células A549 sobre MEOX2 y ZEB1. | 46 |
| Figura 9.- Efecto del silenciamiento de MEOX2 y ZEB1 sobre VIMENTINA y E-cadherina en A549..... | 47 |
| Figura 10.- Efecto del silenciamiento en células NH2347 sobre MEOX2 y ZEB1.. | 47 |
| Figura 11.- Efecto del silenciamiento de MEOX2 y ZEB1 sobre VIMENTINA y E-cadherina en NH2347. | 48 |
| Figura 12.- Efecto del silenciamiento en células H1975 sobre MEOX2 y ZEB1 | 49 |
| Figura 13 Efecto del silenciamiento de MEOX2 y ZEB1 sobre VIMENTINA y E-cadherina en H1975..... | 49 |
| Figura 14.-Efecto del silenciamiento en células HCC827 sobre MEOX2 y ZEB1. | 50 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 15.- Efecto del silenciamiento de MEOX2 y ZEB1 sobre VIMENTINA y E-cadherina en HCC827. | 51 |
| Figura 16.- Ensayos de migración celular en A549 con silenciamiento | 52 |
| Figura 17.- Ensayos de migración celular en NH2347 con silenciamiento.. ... | 53 |
| Figura 18. – Ensayos de migración celular en H1975 con silenciamiento | 54 |
| Figura 20.- Ensayos de migración celular en HCC827 con silenciamiento | 55 |
| Figura 21.- Determinación de IC:50 en A549 a cisplatino en condiciones de silenciamiento | 56 |
| Figura 22.- Determinación de IC:50 en H1975 a cisplatino en condiciones de silenciamiento | 57 |
| Figura 23.- Determinación de IC:50 en HCC827 a cisplatino en condiciones de silenciamiento. | 57 |

ÍNDICE DE TABLAS E ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|-----------|
| <i>Tabla 1 Estadios y sobrevida con base en TNM. Modificado de: Goldstraw P. et al. 2016.....</i> | <i>34</i> |
| <i>Tabla 2 Tratamiento inicial de acuerdo con estadio clínico. Modificado de Ettinger DS. et al, 2018.....</i> | <i>37</i> |
| <i>Tabla 3 Proporción de los componentes del medio de cultivo empleado para el mantenimiento de cultivo de líneas celulares de cáncer pulmonar empleadas</i> | <i>48</i> |
| <i>Tabla 4.- Reactivos empleados para la síntesis de cDNA por reacción. El volumen total de agua se determina de acuerdo con la cantidad total de RNA para 4µg</i> | <i>50</i> |
| <i>Tabla 5.- Reactivos empleados para el desarrollo de la segunda fase de la síntesis de cDNA por reacción para un volumen total de reacción de 20 µL.....</i> | <i>50</i> |
| <i>Tabla 6.- Condiciones de reacción de tiempo final para la síntesis de cDNA.....</i> | <i>51</i> |
| <i>Tabla 7.- Condiciones de qPCR en tiempo real empleadas para el equipo Light Cycler 480 de qPCR para el análisis de expresión del mRNA por el método de Sybr Green.....</i> | <i>51</i> |

LISTA DE ABREVIATURAS

aC. Antes de Cristo

dC Después de Cristo

WHO Organización mundial de la Salud (del inglés World Health Organization)

NIH Institutos Nacionales de Salud, USA (del inglés National Institutes of Health)

NCI Instituto Nacional de Salud, USA (del inglés National Cancer Institute)

ACS Sociedad Americana del Cáncer (del inglés American Cancer Society)

PMC PubMed Central

NCBI Centro Nacional para la Información Biotecnológica (del inglés National Center for Biotechnology Information)

ATP Adenosín Trifosfato (del inglés Adenosine Triphosphate)

TKRs Receptores de Tirosina Cinasa (del inglés Tyrosine Kinase Receptors)

VEGFR Receptor de Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (del inglés Vascular Endothelial Growth Factor Receptor)

EGFR Receptor de Factor de Crecimiento Epidermal (del inglés Epidermal Growth Factor Receptor)

TP53 Proteína Tumoral 53 (del inglés Tumoral Protein 53)

RB Asociado a Retinoblastoma (del inglés Retinoblastoma Associated)

CDKs Cinasas dependientes de Ciclinas (del inglés Cyclin Dependent Kinase)

MAPK Proteína Cinasa Activada por Mitógenos (del inglés Mitogen Activated Protein Kinase)

HDAC Desacetilasa de Histonas (del inglés Histone Desacetilase)

DNA Ácido desoxirribonucleico (del inglés Deoxyribonucleic Acid)

TNRF1 Receptor de Factor de Necrosis Tumoral (del inglés Tumor Necrosis Factor Receptor 1)

PI(3)K Cinasa Fosfatidilinositol 3 (del inglés Phosphatidylinositol 3 kinase)

NF-K β Factor Nuclear Kappa Beta (del inglés Nuclear Factor Kappa Beta)

TERT Telomerasa Transcriptasa Reversa (del inglés Telomerase Reverse Transcriptase Catalytic Subunit)

RAS Sarcoma de Rata (del inglés Rat Sarcoma)

FGF-1 Factor de Crecimiento Fibroblástico (del inglés Fibroblast Grow Factor)

HGF Factor de Crecimiento de Hepatocito (del inglés Hepatocyte Grow Factor)

MEOX2 Homeobox Mesenquimal-2 (del inglés Mesenchime Homeobox-2)

SNAIL Proteína de Dedos de Zinc-1 (del inglés Zinc Finger Protein-1)

SLUG Proteína Dedos de Zinc-2 (del inglés Zinc Finger Protein-2)

ZEB Dedos de Zinc de unión a cajas E (del inglés Zinc Finger E-Box Binding)

INF- γ Interferón Gamma (del inglés Gamma Interferon)

IL-4 Interleucina 4 (del inglés Interleukin 4)

ASR Tasa Estandarizada por Edad (del inglés age-standardised rate)

SCLC Cancer Pulmonar de Células Pequeñas (del inglés Small Cell Lung Carcinoma)

NSCLC Cáncer de Pulmón de Células No-Pequeñas (del inglés Non-Small Cell Lung Carcinoma)

KRAS Sarcoma de Rata Kristen (del inglés Kirsten Rat Sarcoma)

EMT Transición Epitelio-Mesénquima (del inglés Epitelial-Mesenchymal Transition)

ncRNAs ARNs No Codificantes (del inglés Non Coding RNAs)

RNA Ácido Ribonucleico (del inglés Ribonucleic Acid)

E2F1 Factor de Transcripción 1 (del inglés Transcription factor 1)

Resumen

El cáncer pulmonar es la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial, algunas de las barreras a superar en clínica son la resistencia a la quimioterapia y el fenotipo de transición epitelio-mesénquima (EMT) barreras que han sido abordadas con técnicas de biología molecular en un esfuerzo por comprender los procesos involucrados en estos fenómenos. Los antecedentes apuntan a la correlación de la resistencia a la quimioterapia y la EMT por medio de la expresión de factores de transcripción como ZEB1 y MEOX2. MEOX2 ha sido estudiado como un factor de transcripción involucrado en la regulación transcripcional de otros factores que, como ZEB1 son de tipo dedos de Zinc; en ese sentido en el presente trabajo se identificó la probable regulación a nivel transcripcional de MEOX2 sobre ZEB1, su impacto en la EMT y la resistencia a la terapia oncológica en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas. Mediante análisis in silico se identificaron 6 picos de fluorescencia que indican el coposicionamiento de MEOX2 y RNA pol II en la región promotora de ZEB1 en una extensión de 4,000pb. El análisis de expresión a nivel de mRNA y proteínas basales evidenció que la línea celular que tiene mayor expresión de MEOX2 fue HCC827 y NH2347. Mientras que HCC827 fue la de menor expresión de ZEB1 y la de mayor fue NH2347. Los ensayos de silenciamiento evidencian una probable correlación inversa en la expresión de MEOX2 y ZEB1 en A549 y NH2347. Los ensayos de migración indican que con el silenciamiento de ZEB1 disminuye la capacidad migratoria en casi el 50% en los 4 modelos. Los ensayos de MTT indican que con el silenciamiento de MEOX2 y ZEB1 las 4 líneas presentan menor tolerancia a cisplatino A549 IC de ~10.20, NH2347 de ~10.20, HCC827 de ~9.67. Esta evidencia indica la participación del eje transcripcional MEOX2-ZEB1 en la malignidad tumoral en NSCLC.

Abstract

Lung cancer is the first cancer related cause of death world wide. some of the barriers to overcome in clinic are the chemo-resistance to oncology therapy and epithelial to mesenchymal transition (EMT) phenotype barriers that have been aborded from molecular biology in an edeavor of understand the processes involved in these phenomenomena. The published antecedents point to a relationships between chemoresistance and EMT through the expresión of transcription factors as MEOX2 and ZEB1 in both phenomena. MEOX2 have been studied as a transcription factor involved in the transcriptional regulation of other factors that, as ZEB1 are zinc factor like; in that sense , in this study was identificated the probable regulation into a transcription level of MEOX2 over ZEB1 and its impact into EMT and chemoresistance into non small cell lung cancer cell lines. First of all by an in silico análisis, 6 fluorescence peaks were identified indicating the co-positioning of MEOX2 and RNA pol II in the promoter region of ZEB1 in a 4,000 bp lenght. The expression analysis at mRNA level and basal protein show that HCC827 and NH2347 cell lines has the highest MEOX2 expression. While HCC827 was the one with the lowest expression of ZEB1 and NH2347 the highest. The silencing assays show a probable inverse relationship in the expression of MEOX2 and ZEB1 in A549 and NH2347. Migration assays indicate that in absence of ZEB1 cell lines reduce the migratory capacity in almost 50% in the 4 models. The MTT assay indicate that, the silencing of MEOX2 and ZEB1 cell lines reduce its tolerance to cisplatin A549 IC ~ 10.20, NH2347 of ~ 10.20, HCC827 of ~ 9.67 vs SCR ~40. This evidence indicates the participation of the MEOX2-ZEB1 transcriptional axis in tumor malignancy in NSCLC.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer: contexto histórico

A diferencia de lo que se suele mencionar, el cáncer no es un padecimiento nuevo producto de los malos hábitos propios de una era llena de riesgos asociados a los avances en ciencia y tecnología. De hecho, los primeros registros se encontraron en Egipto, en “El papiro quirúrgico” de Edwin Smith, llamado así por el egiptólogo que lo encontró en 1862 y se calcula que fue escrito alrededor del año 1600 aC. [1]. El texto contiene 48 “casos” de heridas y traumas: descripción, tratamiento y pronóstico. En la traducción del caso 45 en particular, titulado “Tumores de pecho” el autor menciona que no existe cura para dichos tumores, pero que es tratable con cualquiera de las cirugías descritas a lo largo del papiro ya que son pequeñas protuberancias fácilmente localizables.

Posteriormente, Hipócrates alrededor del año 400 aC; describió algunos tipos de cáncer y se refería a ellos con la palabra griega *carcinós* (cangrejo) por la forma de los vasos sanguíneos hinchados alrededor de los tumores malignos, asemejándose a los apéndices del crustáceo decápodo. Más tarde, Galeno alrededor del año 200 dC, utilizó la palabra *oncos* para denominar los tumores benignos, su significado es hinchazón o masa, de cuyo nombre deriva la disciplina moderna Oncología [2]. Tanto Hipócrates como Galeno aseguraban que era mejor no hacer cirugía en los tumores detectados con la premisa de que el cuerpo era una máquina perfecta que funcionaba con distintos líquidos (humores) y que el padecimiento de alguna enfermedad era resultado de un exceso de alguno de ellos, el cáncer particularmente era producto de un exceso en “bilis negra” asociada también a depresión y sentimientos negativos. Galeno sugirió que un cirujano podría cortar el cáncer pero esa bilis estaría en todas partes y fluiría como la savia que se filtra a través de las ramas de un árbol, por lo que, lo más sensato era realizar una serie de desangramientos y purga para exprimir los humores fuera del cuerpo, como si de una esponja se tratase [3]. Moses Maimonides en 1187 escribió en su libro de aforismos que, si alguien deseaba tratar el cáncer mediante cirugía debía comenzar

por la eliminación de bilis negra -retomando las enseñanzas de Galeno-, seguido de la eliminación completa del miembro enfermo “quitando más allá de las raíces”, evitando así la reaparición de un brote tumoral [4]. Más tarde en 1713, Bernardo Ramazzini médico italiano, realizó uno de los trabajos más extensos de epidemiología llamado *De Morbis Artificum Diatriba* (Enfermedades de los trabajadores) que contiene una descripción de las enfermedades relacionadas a trabajos particulares [5] en el que se reportan más casos de cáncer de mama en monjas que en mujeres no devotas, por ejemplo; la alta incidencia del cáncer pulmonar con a la limpieza de chimeneas por los deshollinadores, etcétera.

Siendo ésta, la primer asociación de la aparición de cáncer con ciertos oficios o profesiones, Bernardo Ramazzini fue considerado el padre de la medicina del trabajo [6]. Luego, en el año de 1793 Matthew Baillie patólogo escocés, publicó un libro sobre “la anatomía aberrante del cuerpo enfermo”, donde describe, entre otras cosas, el cáncer de pulmón como “una masa tan grande como un fruto del naranjo” y descartó, por primera vez, la existencia de la “bilis negra” tanto en tejido sano adyacente como en tumores [7]. Fue hasta el año 1829 que Récamier un ginecólogo francés, acuñó el término *metástasis* para describir la propagación del cáncer a todo el cuerpo [8] aunque para entonces no se conocía origen ni mecanismos él creía que la única forma viable de propagación era a través de los vasos sanguíneos. Posteriormente y con la publicación de la teoría celular postulada por Schwann y Schleiden en 1838 [9], Johannes Müller anatomista y fisiólogo alemán publicó un análisis sistemático de neoplasias malignas y benignas donde hace la descripción del carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y algunos otros, con más de 100 dibujos ilustrando la microscopía del cáncer y con ello, dando pie para el inicio de la clasificación histológica del cáncer [10]. Dos años más tarde en 1840 publicó otro trabajo donde menciona que el cáncer es producto de la formación y crecimiento de células nuevas (neoplasia) en los órganos enfermos, células con potencial de propagarse a otras partes del cuerpo por medio de los vasos sanguíneos como lo había dicho Récamier años atrás [11]. En la época moderna, en los 80’s, Michael J. Bishop y Harold E. Varmus descubrieron el primer oncogén

humano N-myc; postularon que los oncogenes eran parte de la información genética normal, lo que generó el conocimiento necesario para el entendimiento básico del padecimiento a través de los cambios en la expresión génica [12]. Durante la primera mitad del siglo XX el estudio de la causalidad del cáncer llevó a Wynder y Graham en 1950 a realizar un estudio que involucraba una cohorte de 600 casos de cáncer y 600 controles donde se evidencia la probable relación entre el humo de tabaco con la incidencia de cualquier tipo de cáncer [13]. En 1956 se publicaron datos que relacionan la mortalidad por cáncer pulmonar específicamente con relación al hábito de fumar en mayor o menor medida e incluso con la residencia de los pacientes en zonas más o menos urbanizadas [14]. En la época molecular, con la publicación de “La estructura molecular de los ácidos nucleicos” [15] comenzó un auge de publicaciones, que permitieron complementar el entendimiento de la biología del cáncer. Éste paso, permitió la clasificación molecular del cáncer lo que a su vez mejora la detección de la neoplasia y por ende, su tratamiento [16].

1.2 Definición de cáncer

Con base en la historia del estudio del cáncer, se han planteado muchas definiciones del padecimiento. La Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés), por ejemplo, indica que cáncer es un término genérico para un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento celular anormal, células que pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o diseminarse a otros órganos [17]. El National Institutes of Health (NIH), por medio una de sus agencias: National Cancer Institute (NCI) define al cáncer de manera muy similar: agregando que “cáncer” es el nombre que se da a un conjunto de enfermedades relacionadas entre sí [18] pensando en que un cambio (del tipo que sea) puede desencadenar muchos más, como una cascada. Por otro lado, la Sociedad Americana del Cáncer (ACS por sus siglas en inglés) explica que el cáncer se puede originar en cualquier parte del cuerpo y algunos aspectos básicos como la proliferación celular [19]. PMC (PubMed Central), el motor de búsqueda desarrollado por NCBI (National Center for Biotechnology Information) define al cáncer sólo como una palabra, un término genérico para definir las enfermedades donde las células “anormales” se dividen sin

control e incluso se pueden diseminar a otras partes del cuerpo a través de la sangre y el sistema linfático [20]. Sin embargo, considero que las definiciones brindadas por las grandes instituciones internacionales de salud no son suficientes para definir el padecimiento, esto podría deberse a la heterogeneidad presente en la neoplasia, es decir, cada tipo de cáncer es distinto, cada célula puede presentar alteraciones particulares e independientes a la célula contigua, ésta heterogeneidad aumenta el nivel de dificultad no sólo en la definición de lo que es el cáncer, sino en el estudio, diagnóstico y tratamiento del mismo.

Quizá para comprenderlo y poder dar una definición adecuada y completa, no sólo para la comunidad científica sino para la población en general (que es para quienes se hace ciencia en primera instancia), sería necesario exponer de forma clara las características del padecimiento para posteriormente eliminar la estigmatización de la palabra; en éste sentido, me atrevería a proponer una definición que englobe algunas de las definiciones expuestas con anterioridad: “Cáncer es la palabra con la que se nombra un conjunto de enfermedades derivadas del desequilibrio en la expresión y/o función de moléculas involucradas en procesos celulares como la multiplicación o la regulación del metabolismo, entre otras. De este modo se promueve la aceleración en los procesos de crecimiento, pérdida de identidad celular, adquisición de movilidad, evasión de la muerte celular programada y de la respuesta inmune entre otras características que tienen en común todos los tipos de cáncer”.

1.3 Biología del cáncer

La carcinogénesis es el proceso por el cual se desarrolla el cáncer. Existen más de 100 tipos de cáncer descritos actualmente y cada uno se nombra, en primera instancia de acuerdo a su localización primaria [20]. Es decir, el nombre del órgano de origen: cáncer de próstata, cáncer de mama y tantos como órganos en el cuerpo humano. Estos se clasifican con base en la histología presente en la masa tumoral, desde esta perspectiva se han agrupado en seis grandes grupos [21] y de hecho ha sido propuesta como el estándar de diagnóstico [22]:

1.- Carcinoma; una neoplasia de origen epitelial donde también podemos encontrar subtipos: adenocarcinoma que se origina en órganos o glándulas y carcinoma de células escamosas que se origina en el epitelio escamoso[22].

2.- Sarcoma; un tipo de cáncer cuyos orígenes son el tejido conectivo y de soporte como huesos (osteosarcoma), cartílago (condrosarcoma), músculo-esquelético (rabdiomiosarcoma y tejido adiposo (liposarcoma); por mencionar algunos[23].

3.-Mieloma; cáncer que se origina en las células plasmáticas de la médula ósea

4.- Leucemia; neoplasia de la médula ósea, asociada comúnmente a la sobreproducción de células sanguíneas blancas inmaduras. Un ejemplo es Leucemia granulocítica un tipo de cáncer de glóbulos blancos granulocíticos.

5.-Linfoma; se desarrollan en las glándulas o ganglios del sistema linfático: una red de vasos, ganglios y órganos que purifican fluidos corporales y producen glóbulos blancos o linfocitos que combaten infecciones. Cuando los linfomas ocurren en órganos como el estómago, senos o cerebro son llamados Linfomas extranodales. De manera general, los linfomas se subclasifican en: Linfoma de Hodgkin que tiene presencia de células Reed-Stenberg y linfoma no-Hodkin donde no están presentes.

6.-Tipos Mixtos; cuando los componentes pueden estar dentro de varias categorías: carcinoma adenoescamoso, carcinosarcoma, teratocarcinoma, etcétera.

También por el grado histológico que se refiere al grado de diferenciación de las células de las que se origina. Las que están bien diferenciadas son de Grado 1, cuya característica principal es que no han perdido del todo su morfología, se parecen a las células del tejido, se multiplican lento y se dice que el cáncer es menos agresivo. Grado 2 moderadamente diferenciado, Grado 3 tumor mal diferenciado y Grado 4 en el que se encuentran los tumores cuyas células tienden a multiplicarse con tal rapidez que resulta complicado determinar su estirpe, tienden a extenderse o diseminarse con rapidez [24].

Para ser más específicos, incluso se nombran de acuerdo con la expresión de ciertos marcadores moleculares partiendo de la premisa de que el cáncer es generalmente causado por alteraciones moleculares que llevan a mutaciones específicas [25].

Debido a la dificultad de la caracterización y definición del cáncer, Hannahan y Weinberg describieron seis capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo de todos los tipos de cáncer, son marcas recurrentes independientemente de la localización, del órgano, del tipo histológico y de los marcadores moleculares; dichas capacidades regulan la transformación celular y posteriormente el crecimiento tumoral y diseminación metastásica. Estas marcas son: 1) mantenimiento de señales proliferativas, 2) evasión de los supresores de crecimiento, 3) activación de invasión y metástasis, 4) inmortalidad replicativa, 5) inducción de angiogénesis, 6) resistencia a la muerte celular [26]. Posteriormente, se actualizó la publicación agregando cuatro más: 7) evasión de la respuesta inmune, 8) desregulación del metabolismo energético, 9) inestabilidad genética e 10) inflamación promotora tumoral [27]. Cada una de estas marcas es regulada por procesos moleculares en su mayoría internos que han y siguen siendo investigados para comprender el desarrollo y progresión del cáncer, lo que resultará a mediano y largo plazo en la generación de terapias más eficientes y menos agresivas para los pacientes. En este sentido, mencionaré algunas de las características de las capacidades biológicas adquiridas o *hallmarks* durante el desarrollo de todos los tipos de cáncer.

1.-Auto suficiencia/mantenimiento de señales proliferativas

En condiciones “normales” la replicación y división requieren de factores de crecimiento producidas por un tipo de células especializadas. Ningún tipo de células normales puede proliferar en ausencia de estos estímulos [27]. Dichas señales son transmitidas por factores transmembranales como las proteínas con actividad de cinasas [28].

Primero, las enzimas que usan la energía del ATP para agregar fosfatos a otras proteínas son conocidas como proteínas cinasas [29]. El genoma humano codifica 556 diferentes proteínas de este tipo [30]. Los receptores tirosina cinasas (RKTs), por ejemplo, son proteínas simples con un dominio extra celular de unión a ligando y uno intracelular con un dominio con actividad de cinasa, todos ellos son clasificados con base en su estructura y propiedades de afinidad de ligando [31]. Por lo menos existen nueve subfamilias de receptores de tipo tirosina cinasas entre los que están la familia de los receptores de insulina, los del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) y los receptores de factores de crecimiento epidermal (EGFR) por mencionar algunos [32]. La sobreexpresión de estos receptores tiene como resultado hiperrespuesta de las células a niveles ambientales fisiológicos de factores de crecimiento en varios tipos de cáncer que a su vez estimulan la expresión de los receptores transmembranales creando una retroalimentación en *loop* o biofeedback [33–36], de esta manera, las células neoplásicas aseguran la supervivencia incluso en ausencia de señales de crecimiento tejido específicas.

2.-Evasión/Insensibilidad a supresores del crecimiento

A demás de la capacidad de autosuficiencia en crecimiento celular, las células de cáncer adquieren insensibilidad a las señales supresoras del crecimiento. En condiciones de normalidad, las células pueden ser forzadas a mantenerse en la fase G0 dónde pueden reiniciar su ciclo cuando las condiciones micro-ambientales lo permitan, también pueden ser inducidas a su estado posmitótico, asociado a la diferenciación celular [26]. Estos procesos dependen en gran medida de supresores del crecimiento que entre otras cosas, regulan la proliferación por ejemplo TP53 y RB (Retinoblastoma asociated) que operan como control del ciclo celular [27].

Rb, actúa como un factor clave en la progresión del ciclo celular y promueve la diferenciación celular. Es responsable del punto de restricción G1 bloqueando la entrada de la fase S y por ende el crecimiento celular [37]. Se ha relacionado que la ausencia de Rb en un modelo de adenocarcinoma pulmonar anula la necesidad de amplificación de MAPK empleando CDK2 para las fosforilaciones blanco [38], por lo

que incluso Rb está implicado en la actividad de la vía EGFR/MAPK [39]. Rb fosforilado (pRb) recluta algunos remodeladores de la cromatina como HDAC1[37], y el grupo de proteínas Polycomb [40].

TP53 también es un supresor de tumor que induce arresto del ciclo celular [41], apoptosis [42] y mecanismos de reparación del DNA por su capacidad de activar la expresión de otros genes. A la fecha se han identificado 3661[43] genes blanco de directos de TP53, algunos regulados negativamente como CDK4, TOP2A [44][45]. En algunos casos, las mutaciones sin sentido provocan en su mayoría, la pérdida de la expresión de la proteína TP53, sin embargo, con mayor frecuencia las alteraciones asociadas al tumor son en mayor medida la sustitución de un sólo aminoácido a lo largo de la proteína P53 y en mayor medida dentro de su región de unión al DNA. Mutaciones que, generalmente conducen a una pérdida o disminución de la actividad *wild type* de p53 confiriendo capacidad de inhibidor sobre cualquier proteína no mutada de P53[46]. Una de las razones por las cuales las células inhiben la expresión de TP53 durante la progresión del cáncer puede ser debido a su actividad de inducción de apoptosis posterior a la identificación de un daño difícilmente reparable en el DNA por TP53 [41].

3.- Activación de invasión y metástasis

La metástasis es un proceso complejo que requiere de algunas características: Movilidad e invasión celular, habilidad de modular el microambiente, plasticidad y habilidad para colonizar tejidos secundarios [47]. Los procesos de invasión y metástasis se han estudiado desde hace más de 100 años y recientemente se han identificado algunos mecanismos que describen la activación de estos procesos [48] como la vía de las integrinas, TGF- β , Sonic Hedgehog, EGFR, por mencionar algunos [49]. Migración e invasión no son lo mismo. La migración celular es una característica presente en los procesos de cicatrización de heridas, embriogénesis, la formación de tejidos en condiciones normales y en cáncer, la migración celular puede derivar en invasión y metástasis [50]. Éstos últimos son el resultado de la migración de células individuales que se desprendieron del tumor primario,

ingresaron a los vasos linfáticos o en el torrente sanguíneo y se establecieron en órganos distales [51]. Los procesos de migración celular, invasión y metástasis han sido explicados por la transición epitelio-mesénquima (EMT) producto de la inducción de factores de transcripción como SNAIL, SLUG, TWIST1, Zeb1/2 que alteran la expresión de genes involucrados en la adhesión célula a célula, célula-matriz extracelular que deriva en modificaciones en la dinámica del citoesqueleto y a su vez, un cambio de morfología epitelial a una mesenquimal [52]. El tema de la transición epitelio mesénquima será abordado a profundidad más adelante.

4.-Inmortalidad replicativa

Las células no tumorales están provistas de un cronómetro biológico que cuenta las veces que una célula se ha dividido. Cada célula tiene un número finito de ciclos de división y crecimiento. Una vez alcanzado dicho límite, las células entran en una senescencia, condición en la que las células permanecen metabólicamente activas pero no se dividen [53]. Los telómeros forman el final de todos los cromosomas y se acortan con cada división celular, son ellos el cronómetro biológico [54] y están formados por 5-12kb de secuencias repetidas (TTAGGG). Los telómeros son la protección de los cromosomas, previenen la pérdida de información genética, degradación y senescencia [55]. La telomerasa es la enzima que agrega DNA telomérico a los cromosomas [55] ésta enzima está casi universalmente sobre-expresada en cáncer y es regulada prácticamente a todos los niveles: epigenético, genético, transcripcional, post-transcripcional, postraduccional, etcétera [56]. La inmortalización de las células tumorales por el mantenimiento de los telómeros representa un paso esencial de la progresión del cáncer. Las células somáticas no tienen actividad de la telomerasa y dejan de dividirse cuando los telómeros ya están muy cortos [57]. Las proteínas de mantenimiento telomérico están implicadas también en la metástasis del cáncer, por ejemplo TERT (Telomerase reverse transcriptase catalytic subunit) unida con B-catenina regulan genes blanco de WNT, además TERT regula directamente NF-KB y sus genes blanco [58].

5.-Inducción de angiogénesis

Angiogénesis es un proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes en respuesta a la hipoxia o las demandas de sustrato del tejido. Existen varios estimuladores de angiogénesis, el más conocido es VEGF cuya expresión es resultado de la hipoxia, FGF-1 (*Fibroblast Grow Factor*) y HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) entre otras [59] moléculas de superficie celular de las familias Notch/Delta, Roundabout y Hedgehog [60]. También existen moléculas anti-angiogénicas como TSP-1 (trombospondina-1), GAX (conocido también como MEOX2; mesenchimal homeobox-2) [61]. La adquisición de la habilidad de inducción de angiogénesis conocido como “*switch* angiogénico”, puede ser activado por hipoxia, hipoglicemia e inflamación [62] y es un paso crítico en la transformación maligna [63]. Durante el proceso de angiogénesis las células crecen y degradan la membrana basal, migran a través del estroma y finalmente se diferencian en las estructuras tubulares de nuevos vasos [64]. El *switch* consiste en los siguientes pasos: desprendimiento perivascular y dilatación de los vasos; brote angiogénico, creación y desarrollo de nuevos vasos; y reclutamiento de células perivasculares. EGF induce crecimiento, diseminación, invasión y metástasis. La activación de EGFR tiene como resultado la sobre regulación de VEGF [65][66].

6.-Evasión de Muerte celular

La muerte celular programada o apoptosis; es un proceso inducido también por controles del ciclo celular llamados sensores como TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor 1*) y efectores como las caspasas y citocromos [67]. Algunas moléculas que regulan ese proceso tienen otras actividades lo que hace difícil identificar cuáles mutaciones en tumores confieren también ventajas de supervivencia [68]. Por ejemplo, se sabe que la exposición excesiva a luz UV induce apoptosis y en algunos casos dicha exposición resulta en la pérdida de función de TP53 lo que a su vez permite la supervivencia de las células dañadas por la radiación promoviendo el desarrollo de cáncer de piel [69]. PI(3)K (*Phosphatidylinositol 3 kinase*) que originalmente se había descrito sólo como un transductor de señales de

supervivencia celular resultó que al ser activado por RAS suprime la expresión de c-Myc y por ende la célula es capaz de evadir apoptosis [70]. RAS se había identificado como efector o promotor de la apoptosis por medio de la vía de Raf más no por la vía de PI(3)K. Lo que evidencia la asociación de algunas moléculas como RAS en vías intracelulares contradictorias [71].

NF- κ B es un factor de transcripción que tiene dos funciones, por un lado, es la expresión del proto-oncogen c-myc y la proliferación; y por otro lado señales antiapoptóticas. NF- κ B es blanco de la vía RAS/PI(3)K/AKT [72], vía que resulta en evasión de apoptosis, inducción de proliferación, mantenimiento de señales de crecimiento, motilidad celular, etcétera.

7.-Evasión de la respuesta inmune

Algunos tipos de cáncer inician desde sitios de infección, irritación crónica e inflamación [73]. En algunos tipos de cáncer las condiciones inflamatorias están presentes incluso antes de que ocurran los cambios en proliferación [74]. Uno de los ejemplos más citados es el caso de la identificación de *Helicobacter pylori* en carcinoma gástrico debido a su papel en la inflamación del tejido gástrico previo a la formación de tumores [75]. Factores contaminantes como el asbesto o la silica han sido relacionados con la inflamación pulmonar, fibrosis y cáncer [76]. Como resultado de la inflamación, el microambiente tumoral contiene macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células asesinas naturales (“*natural killer*”), células adaptativas como las células T y los linfocitos B [77]. Algunas citosinas secretadas por el tumor y las células inmunes/inflamatorias pueden tanto promover el crecimiento tumoral, como tener efectos antitumorales esto es resultado del delicado balance entre la inmunidad antitumoral y la inflamación que origina el tumor [78]. Por ejemplo se han dilucidado algunas funciones de supresores del sistema inmune como la IL10 (interleucina 10) que puede actuar como un mediador entre la inmunidad innata y adaptativa [79].

Hay una teoría llamada “inmunovigilancia” que sostiene que el sistema inmune está constantemente monitoreando el cuerpo previniendo la formación de tumores [80].

Sin embargo, sigue poco claro el rol que tiene el sistema inmune en erradicar o resistir la formación y progresión de las neoplasias [27].

8.-Desregulación de metabolismo energético

Esta marca involucra la mayor reprogramación del metabolismo energético para mantener continuo el crecimiento celular y la proliferación [27]. Las células tumorales pueden reprogramar su metabolismo de glucosa y la producción de energía limitando su metabolismo a la glicólisis, a este estado se le ha denominado “glicólisis aerobia” que en muchos tipos de cáncer es resultado de la activación de oncogenes, pérdida de supresores de tumor, microambiente hipóxico, mutaciones en el DNA mitocondrial incluso el tejido de origen [81]. HIF1 (hipoxia-inducible factor 1) ha sido identificado en la regulación de oncogenes y genes supresores de tumor como PI(3)K/AKT, mTOR, p53, β -catenina, RAS, entre algunos otros. También su expresión se ha relacionado con genes involucrados en los procesos y mantenimiento de la inflamación mencionada anteriormente como NF- κ B, IFN- γ , IL-4[82] . Se ha sugerido que esto representa una ventaja para el tumor ya que decreta la actividad de la mitocondria, no incrementando la capacidad celular de la glicolisis, pero los mecanismos aún no son claros [83].

9) Inflamación tumoral

La respuesta inflamatoria es un proceso esencial para la defensa de un sistema contra agentes patógenos, es importante para la reparación de tejidos, la regeneración e incluso la homeostasis del tejido [84]. En el siglo 19, Virchow reportó la presencia de leucocitos en las muestras observadas de tumores [85], una de las primeras evidencias indirectas de una relación entre la inflamación y enfermedades. Posteriormente, la identificación de inflamación crónica relacionada con enfermedades cardiovasculares, renales, metabólicas [86], alzhéimer y algunos tipos de cáncer [87]. Alrededor del 15%-20% de todos los tipos de cáncer son precedidos por infecciones, inflamaciones crónicas o autoinmunidad en el mismo tejido [77]. El cáncer no es la excepción y por ello se define como un proceso de pasos múltiples, uno de los ejemplos más estudiados sobre la inflamación crónica y

el cáncer es la bacteria *H. pylori* [73]. La infección por esta bacteria induce respuesta inflamatoria resultando en gastritis crónica, luego atrófica, seguido por metaplasia intestinal y en algunos casos, avanza hasta el estado de displasia. Es importante dejar en claro que con la eliminación de *H. pylori* no resulta, por si misma, en la erradicación de las lesiones que causa su presencia en el sistema [88].

De manera general, podemos abordarlo desde la disminución de la expresión de P53 que es bien sabido que tiene un papel importante en la homeostasis celular; uno de sus blancos es NF- κ B que es un intermediario importante en la promoción de cambios a nivel celular que pueden encabezar el crecimiento de las células de cáncer e incluso la activación de cambios microambientales que facilitan la metástasis. En el proceso proinflamatorio están involucradas redes de citosinas como TNF, IL1. En el microambiente tumoral se coordinan respuestas proinflamatorias que pueden actuar de forma autócrina y/o parácrina en las células neoplásicas. Las células inmunes en un tumor pueden tener roles como respuesta antitumoral o promoción activa de la tumorigénesis [89].

10) inestabilidad genómica y mutaciones

La inestabilidad genómica está definida como una serie de variaciones al azar que modifican el número “normal” de cromosomas en las células; variaciones que pueden modificar estructuralmente los cromosomas como translocaciones o deleciones o alteraciones numéricas que modifican el cariotipo. Una vez que el cariotipo ha sido modificado, generalmente se presenta aneuploidía que, a grandes rasgos, es la diferencia en cantidad de cromosomas en algunas células que al final difieren de la cantidad “normal” de una especie [90].

La inestabilidad genómica fue definida como una característica habilitadora debido a que la adquisición de cualquiera de las otras primeras 6 marcas depende en gran porcentaje de alteraciones sucesivas en el genoma de las células neoplásicas[27]. Esta marca puede generarse por mutaciones individuales de un gen concreto, por ejemplo, los “*gate keepers*”. Estos guardianes del genoma se han llamado así debido a que son los responsables del control o la inhibición del crecimiento celular

[91]. De manera general son considerados del tipo supresores de tumor como P53[92], PTEN [93], SWI/SNF [94], Oct4 [95], etcétera. Cuando las dos copias de un supresor de tumor están dañadas en una célula, la proteína no puede ser sintetizada y por ende se pierde el control del crecimiento celular, replicación y reparación del DNA [96] dependiendo de la región afectada. La inestabilidad genómica también puede expresarse por pérdida o ganancia de cromosomas. Es por ello que el cáncer también se define como una enfermedad genómica, porque el nivel de la inestabilidad genética involucra regiones grandes que pueden incluir muchos genes y estos pueden estar borrados o multiplicados [97]. Las causas de la inestabilidad cromosómica se han relacionado también con errores de replicación y la ineficiencia de la reparación del DNA incluso la evasión de los *check points* del ciclo celular como G1-S y G2-M [98].

Los procesos multipasos para la formación de los tumores pueden entonces, ser explicados como una consecuencia de la sucesión de expansiones clonales aceleradas, cada una de las cuales es desencadenada por la adquisición de genotipos habilitadores que incluso interfieren en la transcripción de la maquinaria de reparación del DNA, estos defectos son ventajosos para la progresión del cáncer porque se ve acelerado el índice al cual las células pueden acumular genotipos favorables.

1.4 Epidemiología del cáncer pulmonar

El cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo, precedido únicamente por las enfermedades relacionadas con el sobrepeso como la hipertensión y la diabetes. Se estima que 1 de cada 6 muertes está relacionada a cáncer [17] Las estadísticas de incidencia de esta enfermedad a nivel mundial tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo han cambiado poco desde 1975. Es importante notar las diferencias demográficas y socioculturales de la incidencia del cáncer. GLOBOCAN, una plataforma en línea que recopila las estadísticas mundiales de cáncer, emplea el ASR (*Age-standardised Rate*) como una medida aproximada de una población si ésta tuviera una estructura de edad

estándar, esta estandarización es necesaria ya que la edad incrementa el riesgo de mortalidad por cáncer [99].

Los tipos de cáncer con mayor incidencia desde 1975 son pulmón, mama, estómago y próstata [100]. El cáncer de pulmón es y ha sido la causa de muerte por neoplasias más común con un aproximado de 1.9 millones de víctimas anuales en todo el mundo [101].

Debido a las estadísticas y para un mejor estudio del padecimiento, el cáncer pulmonar se ha dividido de acuerdo con sus características histológicas en: cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Siendo NSCLC el de mayor incidencia con un aproximado de 85% de los casos en fumadores y en pacientes no relacionados con el tabaco [113]. Éste a su vez se ha subdividido en adenocarcinoma (60% de incidencias) carcinoma de células escamosas (30%), y carcinoma de células grandes (10%) [104]. En los últimos años se han identificado diferentes alteraciones moleculares en NSCLC que incluyen oncogenes y genes supresores de tumor que representan biomarcadores predictivos o blancos terapéuticos entre los que destacan la sobreexpresión del gen EGFR (Epidermal Grow Factor Receptor) en 40-80% en NSCLC y otros cánceres de tipo epitelial y alteraciones en el gen KRAS (Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog) presentes en 15-25% de los pacientes con adenocarcinoma [114].

1.5.-Factores de Riesgo del cáncer pulmonar.

Los Factores de riesgo se han denominado todas aquellas cosas que incrementan la probabilidad del desarrollo de alguna enfermedad, en este caso de padecer cáncer pulmonar. Los factores de riesgo se han determinado a lo largo de la historia con investigaciones epidemiológicas de casos y controles. Se proponen con base en la incidencia de la enfermedad y la historia clínica de los pacientes.

1. **Exposición al humo de tabaco.** En este rubro se pueden englobar 2 categorías fumadores y fumadores pasivos. Bien sabido es que el hábito de fumar es uno de los factores de riesgo más asociados al cáncer

pulmonar con un riesgo que depende del número de cigarrillos por día, cajetillas por año e incluso la edad de inicio de tabaquismo pero que representa el 21% de los casos de cáncer a nivel mundial [102]. Esto podría deberse a metilación en genes específicos como MTHRF1 y Ecadherina [103].

La asociación entre los fumadores pasivos y la incidencia de cáncer pulmonar puede explicar el 1.6% de los casos y han sido identificados en pacientes que nunca han fumado pero que viven o han vivido con un fumador. El riesgo relativo va de 1.14 a 5.20. Es de llamar la atención que estudios recientes indican que la exposición a humo de tabaco durante la niñez incrementa el riesgo de padecer cáncer pulmonar en la edad adulta en 3.6 [104].

2. **Genéticos.** La historia familiar de cáncer pulmonar se ha encontrado como un factor de riesgo en linajes con mutaciones en el locus 6q23-25 incluso con un síndrome llamado Li-Fraumeni cuya característica es la mutación de p53. Por otro lado los polimorfismos genéticos más susceptibles a mutaciones relacionadas con cáncer pulmonar son en los loci 15q25, 5p15, 9p21, pero el hecho de que la mínima cantidad de fumadores desarrollen cáncer indica que la susceptibilidad genética puede contribuir a la carcinogénesis[105]. Esto no significa que todo el cáncer sea hereditario, lo que significa es que algunas características heredables como la eficiencia en los mecanismos de reparación del DNA modifican los efectos del ambiente en el organismo.
3. **Dieta.** Desde 1950 se han asociado algunos patrones de dieta con la incidencia de cáncer en diferentes países y se concluye que el tipo de dieta influye parcialmente en las incidencias. Con base en las observaciones realizadas se ha determinado que posiblemente las frutas y vegetales sean factores protectivos, pero no se identificaron factores de riesgo relacionados con la dieta aunque la ausencia de vitamina A tiene una ligera asociación con la incidencia de cáncer pulmonar [106].

4. **Contaminación ambiental.** El cáncer de pulmón es uno de los efectos adversos de la exposición prolongada a agentes tóxicos. La contaminación ambiental es rica en hidrocarburos policíclicos aromáticos. La proporción de casos asociados a la contaminación del aire en Europa, por ejemplo es un estimado de 11%[107] . Es en los países con mayor PIB que las incidencias de cáncer pulmonar indica que el desarrollo industrial tiene una estrecha relación con la cantidad de diagnósticos y es directamente proporcional a la contaminación del aire[108].
5. **Ocupacional.** La construcción, manufactura de plásticos, limpieza industrial, producción y procesamiento de carne, instalación de construcciones, son algunas de las ocupaciones que se han relacionado con una mayor incidencia de cáncer pulmonar con significancia estadística contra empleos como consultor legal, amas de casa, oficinista, maestros, científicos y comerciantes. El riesgo incrementa con el tiempo en horas de trabajo y va en función del tipo de materiales volátiles a los que se está expuesto [109]. Aunque actualmente las instituciones de derechos humanos y la industria han tomado cartas en el asunto para incrementar la seguridad de los trabajadores y la búsqueda de materiales alternativos con menos toxicidad.
6. **Enfermedades pulmonares previas.** Enfermedades crónicas inflamatorias como el asma o la tuberculosis son asociados con un incremento en el riesgo de padecer cáncer y esto va en función de los efectos mutágenos de los radicales libres producidos por las células inflamatorias y la estimulación de la proliferación en la regeneración del tejido [110].
7. **Combustión de Biomasa.** En países con un PIB más bajo, denominados por los otros como “países en vías de desarrollo “el empleo de combustión de leña para cocina, incluso para calentar el hogar es una práctica común. Estadísticas globales sugieren que el 50% de todos los hogares en el mundo emplean la combustión de biomasa para estos fines. Esta

combustión tiene como productos partículas como los, benzo (a) pirenos, etcétera. Este producto del humo de leña para cocinar equivale al consumo de 20 cigarrillos por día [111].

Es importante dejar en claro que, aunque existan factores de riesgo existe también la prevención. Algunos como eliminación del hábito de fumar, uso de protección adecuada para los trabajadores y una alimentación balanceada pueden disminuir el riesgo de padecer cáncer pulmonar.

Debido a la gama tan amplia de factores de riesgo, la sintomatología tan genérica y la localización del órgano, el diagnóstico oportuno de cáncer pulmonar ha sido complicado [112,113]. Los esfuerzos en oncología clínica e investigación se están centrando en el diagnóstico oportuno y tratamiento multi, inter y transdisciplinario para mejorar la calidad de vida de los pacientes.

1.6.-Etapificación del cáncer

Etapificación o estadificación del cáncer es la determinación de la etapa de la enfermedad de un paciente al momento del diagnóstico oncológico. Existen actualizaciones constantes de la AJCC (American Joint Committee on Cancer) y la IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) que proponen de acuerdo con evidencias científicas y epidemiológicas herramientas que permiten el estudio, clasificación, tratamiento y pronóstico de los pacientes [114]. En primera instancia se determina la etapa clínica, posteriormente una agrupación por etapas determinada por la TNM (Tumor Nódulos Metástasis). La T determina el tamaño y extensión del tumor principal, la N indica la propagación del cáncer a los ganglios linfáticos adyacentes y la M es la propagación del cáncer a órganos distantes. Los números y letras que acompañan la TNM proporcionan detalles sobre cada factor. Números más altos significan un estadio más avanzado de cáncer[115] .

1.- **Cáncer oculto.** Categoría empleada cuando no se puede evaluar el tumor principal, sin embargo, se tiene evidencia de células cancerosas en las flemas u otros líquidos. El cáncer no es detectado por otras pruebas de tal suerte que (TX) la

localización no se puede determinar, (N0) no se sospecha propagación a ganglios (M0), ni a partes distantes del cuerpo.

2.- **Etapa 0.** Tumor superficial de vías de revestimiento a las vías respiratorias. No ha invadido tejidos pulmonares más profundos (Tis), No hay propagación a ganglios (N0), sin metástasis (M0).

3.-**Etapa IA1.** Adenocarcinoma mínimamente invasivo de <3cm de ancho (T1mi), no hay propagación a ganglios linfáticos adyacentes (N0), sin metástasis (M0).

El tumor mide <1cm, no afecta bronquios (T1a), no se ha propagado a ganglios (N0), sin metástasis (M0)

4.- **Etapa IA2.** El tumor mide >1cm, el cáncer no ha rodeado membranas pulmonares, sin afección a bronquios (T1b). No se ha propagado a ganglios (N0) ni hay metástasis (M0).

5.- **Etapa IA3.** El tumor mide >2cm y menos que 3- No ha alcanzado membranas pulmonares (T1c). No se ha propagado a ganglios linfáticos adyacentes (N0) ni hay metástasis (M0).

6.- **Etapa IB.** Tumor >4cm, localizado en bronquios principales, con invasión a pleura, obstruye vías respiratorias (T2a). Sin propagación a ganglios (N0) ni metástasis (M0).

7.- **Etapa IIA.** Tumor que mide más de 4cm, en un bronquio principal, ha invadido la pleura visceral u obstruye parcialmente las vías respiratorias (T2b, N0, M0).

8.-**Etapa IIB.** Tumor de no más de 3cm, no ha invadido membranas pulmonares, no afecta ramas de bronquios (T1a, T1b, T1c), propagado a ganglios en el mismo lado del cáncer (N1). Sin metástasis (M0).

Tumor de más de 3cm en un bronquio principal, con invasión a pleura visceral y obstruye vías respiratorias (T2a, T2b). Invasión a ganglios linfáticos (N1) sin metástasis (M0).

Tumor que mide más de 5cm, invasión a pared torácica, pleura parietal, nervio frénico y pericardio parietal. Presencia de 2 o más nódulos tumorales separados en el mismo lóbulo del pulmón (T3). Sin propagación a los ganglios adyacentes (N0), sin metástasis (M0).

9.-Etapa IIIA. Tumor de 3cm sin invasión a membranas pulmonares sin afección en ramas de los bronquios (T1a, T1b, T1c). El cáncer se propagado a los ganglios linfáticos o en el mediastino del mismo lado del tumor primario (N2). Sin metástasis (M0).

Tumor de más de 3cm que ha crecido en un bronquio principal, que invadió pleura visceral y obstruye parcialmente las vías respiratorias (T2a, T2b). Propagado a los ganglios linfáticos que se encuentran alrededor de la carina o mediastino del mismo lado del tumor primario (N2). Sin metástasis (M0).

Tumor de más de 5cm, con invasión a pleura parietal, pericardio parietal o hay dos o más nódulos tumorales separados en el mismo lóbulo del pulmón (T3). Cáncer en ganglios linfáticos hiliares del mismo lado del tumor (N1). Sin metástasis (M0).

Tumor de 7cm invasión del mediastino, corazón vasos sanguíneos, tráquea, esófago, diafragma o columna vertebral (T4). El cáncer puede o no haberse propagado a los ganglios linfáticos dentro del pulmón y/o alrededor del área de los ganglios linfáticos hiliares. Todos los ganglios afectados se encuentran en el mismo lado del cáncer (N0 o N1). Cáncer que no se ha propagado a partes distantes del cuerpo (M0).

10.- Etapa IIIB. El cáncer no mide más de 3cm de ancho, no invade membranas pulmonares ni afectas ramas de bronquios (T1). Propagado a ganglios linfáticos, hiliares o mediastinales en cualquiera de los lados (N3). Sin metástasis (M0).

Tumor de más de 3cm que ha invadido un bronquio principal, pleura visceral y obstruye parcialmente las vías respiratorias (T2a/T2b). Propagado a ganglios linfáticos, hiliares o mediastinales del lado opuesto al tumor primario (N3). Sin metástasis (M0)

Tumor de más de 5cm, que ha invadido pared torácica, pleura parietal, nervio frénico, pericardio parietal con presencia de dos o más nódulos tumorales en el mismo lóbulo del pulmón (T3). Propagado a ganglios linfáticos o mediastino del mismo lado del pulmón (N2). Sin metástasis (M0)

Tumor de 7cm de ancho, invasión al mediastino, corazón, vasos sanguíneos, traquea, esófago, diafragma, columna vertebral, o hay dos o más nódulos tumorales separados en distintos lóbulos del mismo pulmón (T4). Cáncer propagado a ganglios linfáticos y mediastino, pero del mismo lado del tumor (N2). Sin metástasis (M0).

11.-Etapa IIIC. Tumor de más de 5cm que invade pared torácica, pleura parietal y pericardio parietal. Dos o más nódulos tumorales separados en el mismo lóbulo del pulmón. (T3). Propagado a ganglios hiliares, mediastinales del lado opuesto al tumor primario (N3). Sin metástasis (M0).

Tumor de 7cm invade mediastino, corazón, vasos sanguíneos, tráquea, esófago, diafragma, espina dorsal, o hay dos o más nódulos separados en distintos lóbulos del pulmón. (T4). Propagado a ganglios linfáticos, hiliares o mediastinales del lado opuesto al tumor primario (N3). Sin metástasis (M0).

12.- Etapa IVA. Cáncer de cualquier tamaño pudo haber invadido estructuras cercanas (T), pudo o no haber invadido ganglios (N). Pero presenta cualquiera de estas características (M1a): cáncer en otro pulmón, detección de derrame pleural o pericárdico maligno. O Propagado como un solo tumor fuera del pecho, como a un ganglio linfático distante u órgano como hígado, huesos o el cerebro (M1b).

13.- Etapa IVB. Cáncer de cualquier tamaño pudo haber invadido estructuras cercanas (T), pudo o no haber invadido ganglios (N). Pero presenta cualquiera de

estas características (M1a): cáncer en otro pulmón, detección de derrame pleural o pericárdico maligno. O Propagado como formando más de un tumor fuera del pecho, como a un ganglio linfático distante u órgano como hígado, huesos o el cerebro (M1c). Cáncer de cualquier tamaño pudo haber invadido estructuras cercanas (T), pudo o no haber invadido ganglios (N). Pero presenta cualquiera de estas características (M1a): cáncer en otro pulmón, detección de derrame pleural o pericárdico maligno. O Propagado como un solo tumor fuera del pecho, como a un ganglio linfático distante u órgano como hígado, huesos o el cerebro (M1b).

1.7.-Sobrevida de los pacientes diagnosticados

El término índice/tasa de sobrevida se emplea como un valor estadístico de estudios poblacionales del porcentaje de personas que sobreviven a un determinado tiempo y etapa de cáncer[116]. El pronóstico de sobrevida es otra forma de ver la estadística global, de evaluar incluso la eficiencia en el desarrollo de la ciencia y tecnología oncológica. Se hace hincapié constantemente en la detección temprana de la enfermedad y esto no es banal. El porcentaje de supervivencia a 5 años en estadios tempranos es más alto que en las etapas más avanzadas de la enfermedad [117], sin embargo la mayoría de las neoplasias pulmonares se diagnostican en etapas avanzadas que se traduce en pronóstico desfavorable. Es difícil encontrar datos consistentes en la literatura sobre el porcentaje de sobrevida de los pacientes y no es de extrañarse debido a la heterogeneidad de la población, etapificación inconsistente, variabilidad anatómica e incluso la misma biología tumoral [118] . Un bajo porcentaje de los pacientes son candidatos a cirugía debido a factores como afecciones pulmonares o cardíacas, incluso por la diseminación de la neoplasia [119]. Por ello los esfuerzos van en función de la detección temprana, terapias de mínima invasión que se pueden traducir en incremento en sobrevida y la calidad de vida libre de progresión en los pacientes oncológicos.

Tabla 1 Estadios y sobrevida con base en TNM. Modificado de: Goldstraw P. et al. 2016.

| Estadio | Sobrevida a 5 años |
|---------|--------------------|
| IA1 | 92% |
| 1A2 | 83% |
| 1A3 | 77% |
| IB | 68% |
| IIA | 60% |
| IIB | 53% |
| IIIA | 36% |
| IIIB | 26% |
| IIIC | 13% |
| IVA | 10% |
| IVB | 0% |

1.8.- Tratamiento

Con base en la TNM también se toman decisiones para establecer el esquema de tratamiento según la etapa de progresión de la enfermedad. La resección quirúrgica sigue siendo la única y más consistente forma de tratar pacientes con cáncer pulmonar, aunque no aplica para todos los casos diagnosticados. Únicamente de 15-20% de los pacientes son candidatos a cirugía resecable de tumor [120] (Tabla4.-) y se complementa con quimioterapia ya sea adyuvante (quimioterapia posterior a cirugía) o neoadyuvante (es quimioterapia antes de la cirugía) [121]. Sin embargo, cerca del 70% de los pacientes con cáncer pulmonar son diagnosticados con enfermedad avanzada o metastásica y por ello no son candidatos a cirugía [107]

La quimioterapia de primera línea es, generalmente, una combinación de cisplatino y carboplatino que ha demostrado tener buenos resultados en el tratamiento

adyuvante [122] del cáncer pulmonar y cáncer de ovario [123]. Se propone la terapia de primera línea en el entendido de que con base en las respuestas, se determinarán los siguientes pasos para un caso en particular. Si se observa una progresión de la enfermedad durante el tratamiento de primera línea se les llama a los pacientes: refractarios. Cuando recaen durante los primeros 6 meses son resistentes y parcialmente sensibles cuando cuya recaída es de entre 6 a 12 meses, por último sensibles que recaen después de 12 meses. El tratamiento debe iniciar en cuanto llega el diagnóstico y no se debe esperar hasta que la enfermedad presente sintomatología [124] ya que la sobrevida podría verse comprometida debido a que la sintomatología del cáncer pulmonar únicamente se presenta cuando el tumor está en etapas muy avanzadas.

La quimioterapia de segunda línea Docetaxel, Pemetrexed, Ramucirumab y Gefitinib no se recomienda en combinaciones ya no mejora la sobrevida pero sí incrementa la toxicidad [125]. Este es el tipo de tratamiento que se administra cuando la terapia de primera línea no tiene los resultados esperados. Y se prescribe con base en el tratamiento de primera línea.

Es prácticamente imposible recomendar los tratamientos de tercera línea o de cuarta, ya que dependen de los tratamientos administrados con anterioridad al paciente, sin embargo las opciones son vinorelbina, etopósido y tamoxifen [126].

Con los avances en biología molecular se ha logrado mejorar la supervivencia con el uso de inhibidores de tirosina kinasa e inmunoterapia en pacientes de estado clínico IV con tratamiento paliativo [120].

La terapia dirigida son fármacos de moléculas pequeñas cuyos blancos son moléculas implicadas en la proliferación como EGFR. De terapia dirigida existe terapia de primera, segunda, tercera y cuarta generación. No confundir con la terapia de primera, segunda, tercera y cuarta línea.

Los inhibidores de EGFR como erlotinib y gefitinib son terapia dirigida de primera generación y fueron desarrollados con la finalidad de inhibir una mutación de activación presente en algunos tumores que han demostrado ser efectivos en

pacientes con mutaciones en el gen de EGFR con respuesta del 70% [127]. Fármacos de segunda generación son llamados así porque fueron desarrollados para una mutación adquirida de las células tratadas con los de primera generación un ejemplo es Afatinib. En ese mismo sentido es que se desarrollaron los de tercera generación cuyo blanco son las mutaciones adquiridas por exposición prolongada a los fármacos de segunda generación como el osimertinib y más recientemente olmutinib [128].

El tratamiento con Radiaciones Ionizantes se llama Radioterapia. Se emplea para tumores localizados y consiste en una serie de radiaciones con rayos X durante una cantidad determinada por los médicos de ciclos y de intensidad dependiendo de la localización del tumor y la finalidad de la terapia, es decir si se emplea como paliativo o antiálgico[129].

La inmunoterapia ha emergido como una modalidad nueva de tratamiento del cáncer pulmonar que se enfoca en vacunas para provocar respuestas inmunes específicas y el desarrollo de inhibidores de los mediadores moleculares de la inmunosupresión inducida por cáncer. Sin embargo la eficiencia clínica aún tiene áreas de oportunidad en el tratamiento del cáncer pulmonar [130].

Tabla 2.- Tratamiento inicial de acuerdo con estadio clínico. Modificado de Ettinger DS. et al, 2018.

| ESTADIO CLÍNICO | TRATAMIENTO INICIAL. |
|-----------------|---|
| IA | Resección Quirúrgica y Quimioterapia de primera línea |
| IB | Resección Quirúrgica y Quimioterapia de primera línea |
| IIA | Resección Quirúrgica Radio terapia Y Quimioterapia en casos seleccionados |
| IIB | Resección Quirúrgica Radio terapia Y Quimioterapia en casos seleccionados |
| IIIA | Resección Quirúrgica Radio terapia Y Quimioterapia neoadyuvante en casos seleccionados |
| IIIB | Quimioterapia y Radioterapia Radical |
| IV | Quimioterapia paliativa o terapia dirigida. Radioterapia en casos seleccionados |

1.9 Resistencia a la terapia oncológica

La quimioterapia de primera línea con derivados de platino ha sido el tratamiento principal para el tratamiento del cáncer, sin embargo, con el paso del tiempo la quimioterapia deja de ser suficiente; los pacientes dejan de responder positivamente al tratamiento [131][132]. Existen distintos mecanismos celulares asociados a la expresión de resistencia a fármacos oncológicos, entre los que destacan: amplificación de los genes de la enzima blanco del fármaco [133]; cambios estructurales y funcionales de las enzimas blanco del tratamiento [134]; disminución de los niveles intracelulares del fármaco a través de transportadores específicos como las bombas ABC [135]; epigenética y los mecanismos de reparación del DNA.

Desde la perspectiva molecular el cisplatino y sus derivados han sido empleados como ejemplos tangibles de cómo una interacción pequeña en una estructura química específica puede afectar significativamente la actividad celular [124]. Su modo de acción ha sido descrito desde su habilidad para unirse con bases las púricas en el DNA interfiriendo en los mecanismos de reparación del DNA, causando daño y posteriormente induciendo apoptosis. Los mecanismos asociados a la resistencia a cisplatino son: reparación del DNA, inactivación citosólica del compuesto, incremento en la expulsión celular, detoxificación por glutatión, decremento en la capacidad de unión al DNA por un pH intracelular alto, factores antiapoptóticos[136–138].

Otro de los tratamientos mencionados es la radioterapia, este tipo de radiación induce estrés oxidativo en las células tumorales y los radicales libres son los mediadores que inducen daño en el DNA, afección en la membrana plasmática y organelos celulares e induce la activación de genes de respuesta al estrés y señales intracelulares que promueven la muerte celular. El cáncer ha sido definido también desde una perspectiva de desregulación metabólica energética mediante reprogramación y alteraciones en vías metabólicas que dependen en gran medida de las mitocondrias para contrarrestar el microambiente tumoral en condiciones hipóxicas o malnutrición. Justamente las vías metabólicas dependientes de la mitocondria se han identificado como las vías involucradas en la resistencia a la radioterapia [81][139].

Los fármacos de primera generación de terapia dirigida son inhibidores de una quinazalona de EGFR. Actúan como miméticos de ATP y son inhibidores reversibles del dominio tirosina cinasa, que a una exposición prolongada, los tumores presentan una nueva mutación de tipo T790M que consiste en la sustitución de un residuo de metionina por uno de treonina en la posición 790 del dominio cinasa y por ende resistencia oncológica [140,141]. Esta mutación está presente en el 50% de los tumores con resistencia adquirida al tratamiento con TKIs. Es posible “vencer” dicha resistencia con el desarrollo de nuevos inhibidores de TKIs con mayor afinidad a la

cinasa T790M en comparación con la afinidad del ATP por la cinasa mutada, inhibiendo de forma irreversible la unión del ATP al dominio tirosina cinasa con fármacos de tercera generación como osimertinib [142]. Sin embargo la expresión de factores de transcripción como SLUG confieren resistencia a gefitinib suprimiendo la expresión de genes como BIM e incrementando la actividad de caspasa 9. Otros como NOTCH protegen las células mutantes en EGFR de la apoptosis inducida por gefitinib [143].

Una de las primeras evidencias de la co correlación entre la adquisición de EMT y la resistencia adquirida, fueron cambios morfológicos en las células. Posteriormente se identificó la expresión de algunos factores de transcripción con la respuesta a la terapia como fue mencionado con anterioridad, Slug en la radioterapia y también en células metastásicas o con mayor capacidad de motilidad como los fibroblastos y las células menos diferenciadas Snail, Twist, VEGFR, TGF- β [143,144] Pero abordados de forma independiente. Esta asociación surge cuando se identificó la sobreexpresión de genes como ZEB1 en células con resistencia inducida a fármacos de terapia oncológica [145–147], MEOX2 [148], Gli1[137], Twist [148], TGF- β [149].y la motilidad celular así como la capacidad de invasión.

Debido a la implicación de estos genes involucrados en la EMT se han desarrollado moléculas cuyo blanco son los genes y vías involucrados en este fenómeno: Evodiamina dirigido a la vía de WNT, Moscatilin dirigido a VIMENTINA, SLUG y SNAIL, Bufalina dirigido a la vía de TGF- β entre otros y se ha visto que la sensibilidad a los fármacos de terapia dirigida y derivados del platino se restaura cuando los procesos de EMT son revertidos [150].

La transformación celular por EMT ha sido propuesta como uno de los mecanismos de adquisición de resistencia debido probablemente a que las células con procesos de EMT sobre expresan transportadores ABC. Los promotores de dichas bombas tienen sitios de unión a factores de transcripción como TWIST1, SNAIL, FOXC2 y ZEB1 [143][127] que promueven la expresión de dichas proteínas.

1.10.-Transición Epitelio-Mesénquima

La transición epitelio-mesénquima (EMT por sus siglas en inglés) es un proceso natural activo en tejido adulto sano para la cicatrización de heridas. Se considera un proceso de reversión ya que las células cambian de un fenotipo epitelial caracterizado por un crecimiento celular ordenado e interacciones célula a célula, a uno mesenquimal en el que las células tienen una alta capacidad replicativa y no mantienen conexiones célula-célula [151] incluso se considera que las células pierden la diferenciación propia del tejido en el que se encontraban. Durante la progresión del cáncer sólo algunas células alcanzan e invaden exitosamente órganos anatómicamente distantes [152]. Es por esto último que la EMT puede ser difícil de visualizar en tumores y puede ser subestimada [153]

El fenotipo EMT es caracterizado a nivel molecular por un incremento en la expresión de genes de tipo mesenquimal como VIMENTINA, N-Cadherina y Fibronectina; también por la disminución de proteínas como E-cadherina, ZO1 y las ocludinas [143]. La inducción de EMT en las células tumorales promueve la migración, invasión y diseminación tumoral. Existen numerosos procesos comprometidos en la iniciación de EMT, éstos incluyen, pero no se limitan a la activación de vías como TGF- β , WNT, Notch y Hedgehog por medio de factores de transcripción como TWIST1, SOX, SNAIL y los miembros de la familia ZEB, éstos factores de transcripción son llamados “master EMT genes” [154]. Los cambios en las vías descritas pueden ser controladas epigenéticamente por metilación del DNA, modificaciones de las histonas o cambios en ncRNAs derivando en invasión y metástasis [155]. Existe controversia en el rol de algunas de las proteínas en la progresión de la EMT río abajo de TGF- β -, la controversia versa en que algunas de las proteínas como Smad2/3 no son esenciales para los cambios morfológicos en el epitelio pero sí son componentes requeridos para cambios en el citoesqueleto mediados por actina e incremento en la motilidad [144].

En cáncer pulmonar, ZEB1 ha sido identificado como el maestro en la EMT en NSCLC ya que se han identificado 324 genes correlacionados negativamente con

la expresión de ZEB1 en pacientes [153]. Aunque la inducción de EMT depende también de otros factores de transcripción y mecanismos de modificación de la cromatina. Una de las primeras funciones identificadas de ZEB1 fue que, al ser un factor de transcripción tipo dedos de zinc se une directamente a la caja E (CANNTG) localizada en la región promotora del gen que codifica para la proteína de adhesión epitelial E-cadherina, inhibiendo su expresión [156]. Se ha demostrado también que ZEB1 reprime directamente la expresión de PTEN activando la vía de PI(3)K lo que sugiere que la expresión de ZEB1 podría ser suficiente para la iniciación tumoral [157]. Los mecanismos que asocian la expresión de ZEB1 con la resistencia al tratamiento siguen sin ser claros [145].

2. ANTECEDENTES

En 2013, Roche, J. y colaboradores demostraron mediante inmunoprecipitación de la cromatina, que en células H358 (NSCLC) con sobreexpresión de ZEB1 existe una disminución en H3K27ac y H3K9ac, ambas marcas disminuidas en los sitios de unión de ZEB1 a genes como ESRP1, ST14, RAB25 lo que indica la represión transcripcional de ellos. Se observó también que el decremento de la acetilación de H3K27 correlaciona con mayor expresión de ZEB1 y pobre supervivencia, en pacientes con NSCLC [158].

Ávila-Moreno y colaboradores en 2014, identificaron correlación entre la variación en el número de copias (CNV) del DNA, con aumento en la expresión genética, mediante ensayos de hibridación genómica en micro-arreglos de DNA, identificando a las regiones citogenéticas 7p22.3–p21.1 y 7p15.3–p15.2 con elevada frecuencia de los casos en más del 50% de las muestras de pacientes tanto en lesiones precursoras como tumores pulmonares. Por lo que, dicho aumento en CNVs resultó en sobreexpresión de genes como TWIST1, HDAC9, y MEOX2 identificando la sobreexpresión con aumento en la resistencia a fármacos oncológicos de primera línea como derivados del platino. Al respecto, fue posible detectar reducción en el enriquecimiento de histona H3K27Ac sobre las secuencias promotoras del gen

MEOX2 tanto en tumores NSCLC como en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas: INER37 y A427 [159].

Adicionalmente, Armas y colaboradores en 2017 demostraron que existe regulación transcripcional positiva del factor transcripcional MEOX2, sobre la expresión del gen GLI-1. En este sentido, la región promotora del gen GLI-1 (-2,192 a -109) se encontró ocupada por MEOX2, además de RNA Pol II con dominio activo de fosforilación y marcas de histonas de activación (H3K27Ac y H3K4me3). Por lo que se identificó a MEOX2-GLI1 como un eje transcripcional implicado en la resistencia al tratamiento basado en cisplatino de manera dosis dependiente. Así mismo entre otros genes identificados mediante análisis bioinformático se identificó al gen ZEB1, como otro potencial blanco transcripcional de MEOX2, regulando su expresión negativamente [160].

Por otro lado, Yoshida y colaboradores en 2016 empleando células H1975 con mutación en EGFR (exón 21; L858R and exón 20; T790M), expuestas a dosis crecientes de afatinib entre 3 μ M y 4 μ M para generar una línea resistente a afatinib, determinaron sobreexpresión de ZEB1 con base en la exposición prolongada al fármaco. Con base en todo lo anterior podemos inferir que ZEB1 desempeña un papel importante en la resistencia a fármacos de terapia dirigida TKI-EGFR. Lo cual es consistente con el estudio de una cohorte de 11 muestras de NSCLC tanto previo como posterior al tratamiento con TKIs. Identificando que la sobreexpresión de ZEB1 en las biopsias posterior al tratamiento señalan inducción del proceso de transición epitelio mesénquima. Tales datos han sido corroborados mediante el estudio del modelo *in vitro* en células H1975 mediante ensayos de herida permitiendo comprobar de manera indirecta aumento en la capacidad de movilidad del modelo celular tumoral [146].

Más recientemente, el grupo de Ma y colaboradores en 2019 identificaron en una cohorte de 88 pacientes diagnosticados con NSCLC; por medio de inmunohistoquímica, que en tejidos neoplásicos la expresión de ZEB1 es más alta que en tejido no tumoral. 36 de ellos tenían una expresión alta de ZEB1 y 52 baja

expresión y por medio de un análisis Kaplan-Meier relacionaron la tasa de supervivencia general a 5 años fue de 40.1% en el grupo con baja expresión de ZEB1 y de 21.7% en el grupo con alta expresión de ZEB1. Lo que indica que la expresión de ZEB1 está relacionada con la incidencia y pronóstico de NSCLC [161].

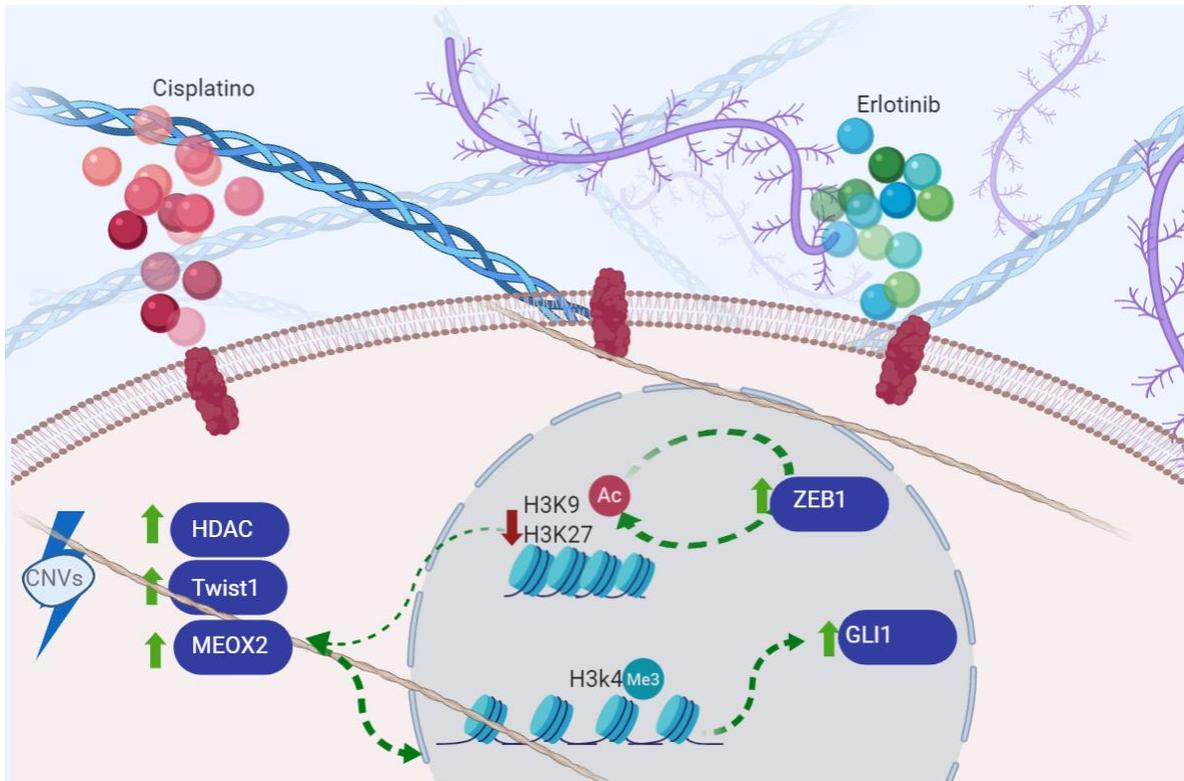


Ilustración 1.- Ejemplificación gráfica de la evidencia científica que antecede directamente el proyecto.

3.- JUSTIFICACIÓN

La resistencia a fármacos de terapia oncológica pulmonar y los procesos de metástasis, representan procesos celulares cuyo entendimiento a nivel molecular ha permitido dilucidar y enfrentar de forma más clara y asertiva los mecanismos de malignidad tumoral. La evidencia acumulada indica que los fenómenos de

metástasis y resistencia a la terapia están relacionados por vías de señalización moleculares; como la expresión de factores de transcripción con capacidad de regulación de efectores principales de procesos como la activación de invasión y metástasis. Dilucidar la correlación de ambos fenómenos podría resultar a la larga en un mejor tratamiento y sobrevida libre de enfermedad.

4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer pulmonar es la primera causa de muerte por neoplasias a nivel mundial debido a la dificultad del diagnóstico, el tratamiento y el latente riesgo de adquisición de resistencia a la terapia oncológica, adquisición de movilidad y capacidad de invadir órganos adyacentes, procesos que disminuyen la sobrevida de los pacientes. Las evidencias experimentales apuntan a que el fenómeno de adquisición de resistencia a fármacos de tratamiento oncológico derivados de platino y los procesos de metástasis podrían estar relacionados por mecanismos de regulación genética, entender cómo se relacionan podría permitir el desarrollo de tratamientos preventivos basados en el silenciamiento de los blancos.

5.- HIPOTESIS

La relación en la expresión de los factores de transcripción MEOX2 y ZEB1 está implicada en el fenómeno de transición epitelio-mesénquima y podría explicar la disminución de la respuesta a cisplatino en modelos celulares de cáncer pulmonar.

6.- OBJETIVOS

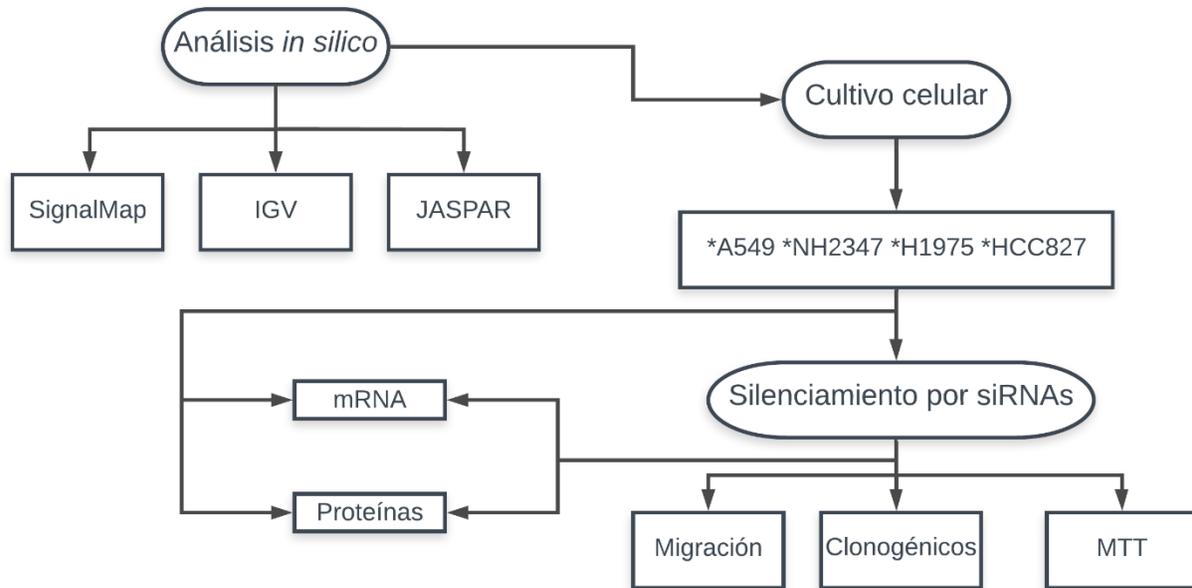
6.1.- Objetivo general

Identificar la relación transcripcional MEOX2-ZEB1 y su impacto en la transición epitelio mesénquima y respuesta a cisplatino en modelos celulares de cáncer pulmonar de células no pequeñas.

6.2.- Objetivos particulares

1. Determinar sitios de interacción de MEOX2 sobre el promotor de ZEB1 mediante análisis *in silico*.
2. Determinar los niveles basales de expresión de mRNA/proteína de MEOX2 y ZEB1 en 4 líneas celulares de cáncer pulmonar (A549, NH2347, H1975 y HCC827).
3. Evaluar el efecto del silenciamiento de MEOX2 y ZEB1 a nivel mRNA/proteína en 4 líneas celulares de cáncer pulmonar.
4. Analizar la capacidad de movilidad y la respuesta a la terapia de 4 líneas celulares de cáncer pulmonar con silenciamiento de MEOX2 y ZEB1.

7.- Diagrama experimental



8.- Materiales y métodos

8.1 Análisis *in silico*

Para el análisis *in silico* se descargaron los datos depositados en *el Dryad Digital Repository* con número de acceso (doi:10.5061/dryad.rm7dd) los cuales pertenecen a ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina acoplados a microarreglos (ChIP on chip) de MEOX2 y RNA POLII de 3 muestras de pacientes con cáncer pulmonar [160]. A partir de estos datos se localizó el sitio de inicio de la transcripción (TSS) del factor de transcripción ZEB1 mediante la búsqueda de la región citogenética en el Genome browser de la versión de marzo de 2006 el ensamble Hg18 (chr10:31438083-32068154) ya que el análisis bioinformático de los datos de los microarreglos originales se realizaron con base en esa versión. Se procedió a la búsqueda de picos de fluorescencia estadísticamente significativos en cada uno de los pacientes con el software Nimblegen versión 2.9. Los picos de fluorescencia indican la interacción de MEOX2 con RNA POL II sobre la región promotora de ZEB1. Dicha región fue analizada en una extensión de 4000 pares de bases de la posición -3200 rio abajo a la posición +800 rio arriba relativas al TSS de ZEB1. La simbología para indicar el valor de corte con un FDR (False Discovery Rate) de los picos de fluorescencia son: rojo ≤ 0.05 ; naranja ≤ 0.1 ; amarillo < 0.2 y gris ≥ 0.2 .

El software IGV tiene la posibilidad de ver datos publicados por las instituciones adscritas al proyecto ENCODE. En este caso del instituto BROAD. Se seleccionaron datos para CTCF, H3k27me3 y H3K27ac, H3k9me3 y H3k27me3, también RNA POL II con dominio catalítico y se subieron los datos de pacientes para una visualización completa. En JASPAR hace predicciones de sitios motif de cualquier factor de transcripción en humano sobre cualquier región del genoma seleccionado. Se hizo la búsqueda de sitios motif de MEOX2 en ZEB1.

8.2 Cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares A549, NH2347, H1975 y HCC827 de adenocarcinoma pulmonar, se mantuvieron en medio RPMI-1640 (BIOWEST cat n° P0860-N10L) suplementado con Suero fetal bovino (BioWest) al 10% y penicilina

estreptomina como antibiótico al 1% en condiciones de cultivo 37°C, 5% de CO₂ y humedad relativa. Para plaquear la cantidad adecuada en cada caja para los ensayos realizados, las células fueron despegadas con una solución de tripsina-EDTA 2x y posteriormente fueron resuspendidas en 10 mL de medio complementado (Tabla 3).

Tabla 3.- Proporción de los componentes del medio de cultivo empleado para el mantenimiento de las líneas celulares utilizadas.

| Reactivo | Proporción |
|-------------------------|------------|
| RPMI-1640 | 89% |
| Suero fetal bovino | 10% |
| Penicilina estreptomina | 1% |

El conteo se realizó en una cámara de Neu-Bauer en presencia de azul tripano por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células} = \left[\left(\frac{\# \text{Células vivas}}{\# \text{ de campos}} \right) (Z)(10,000) \right] * mL$$

Donde:

Z= Factor de dilución: vol de células + azul de tripano

mL= Volumen en mL en los que las células están resuspendidas

8.3 Viabilidad celular

Se sembraron 3,000 células por pozo en placas de 96 con 200 µL de medio complementado, una vez adheridas por 24 horas, se agregó el fármaco en concentraciones de 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µM (cisplatino) durante 44h y posteriormente se encubaron con 20µL de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfo-fenil) 2H-tetrazolio (MTS Promega) durante 4h a 37°C (total de tiempo en cultivo 48 h). Se tomó lectura a una longitud de onda de

490nm. Se realizó el análisis para la obtención del IC50 graficando la viabilidad en porcentaje.

8.4 Silenciamiento genético

Se realizó el ensayo con 300,000 células por pozo sembradas en placas de 6 pozos en medio RPMI-1640 sin antibiótico ni suero fetal bovino durante 24 horas a 37°C, 5% de CO₂. Para el silenciamiento se emplearon RNAs de interferencia (siRNAs) dirigidos contra MEOX2 (sc-106233) y ZEB1 (sc-38643), así como un siRNA control que contiene una secuencia *scrambled* (sc-37007) de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology. Se utilizó Lipofectamine 2000® como reactivo de transfección y siRNAs a una concentración final de 50 nM en un volumen total de 1000 µL en medio Optimem. El silenciamiento se evaluó 48 horas post transfección.

8.5 Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción se utilizó 1 mL de trizol por cada 1,000,000 de células. Se incubaron las muestras por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 200 µL de cloroformo y se agitaron vigorosamente por 15 seg seguidos de incubación a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugaron 15 min a 12,000 x g a 4°C. Pasado ese tiempo se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se precipitó el RNA con 500 µL de isopropanol y se encubaron 60 min a -80°C. Se centrifugaron las muestras por 10 min a 12,000 x g a 4°C. Para los lavados, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µL de etanol con ligera agitación y centrifugando a 7500 x g 15 min a 4°C, procedimiento que se repitió 3 veces. Al finalizar los 3 lavados, se removió el sobrenadante y se resuspendieron las muestras en 20 µL de agua libre de RNAsas con pipeteo repetitivo para suspender completamente. La cuantificación se llevó a cabo en el equipo EPOCH y posteriormente, las muestras fueron almacenadas a -20°C.

8.6 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realiza por medio del kit ReverAid First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific #K1621). Todo el procedimiento se llevó a cabo en hielo y se agregan los componentes en el siguiente orden en tubos de 20 μ L: Seguidos de centrifugación por 15 segundos para homogeneizar.

Tabla 4.-Reactivos utilizados para el primer parte de la síntesis de cDNA por reacción. El volumen total de agua se determina de acuerdo con la cantidad total de RNA resuspendido para 4 μ g.

| <i>Reactivo</i> | <i>Cantidad</i> |
|-------------------------|-----------------|
| Templado RNA | 4 μ g |
| Random Primer Hexámer | 1 μ L |
| Agua libre de Nucleasas | - |
| Volumen Rxn 1 | 12 μ L |

Se incubaron las muestras a 65°C por 5 minutos en el termociclador para esta primera parte. Posteriormente se agregaron los siguientes componentes en orden:

Tabla 5.- Reactivos empleados para el desarrollo de la segunda fase de la síntesis de cDNA por reacción para un volumen total de reacción de 20 μ L.

| <i>Reactivo</i> | <i>Cantidad</i> |
|-----------------------|-----------------|
| Buffer de reacción 5x | 4 μ L |
| Inhibidor de RNAsas | 1 μ L |
| 10mM Mix dNTP | 2 μ L |
| Transcriptasa reversa | 1 μ L |
| Total | 20 μ L |

Se homogeneizaron y centrifugaron un par de segundos. Se colocaron en el termociclador de tiempo final en las siguientes condiciones:

Tabla 6.- Condiciones para las reacciones en tiempo final de la síntesis de cDNA.

| Tiempo | Temperatura |
|------------|-------------|
| 5 minutos | 25° C |
| 60 minutos | 42° C |
| 5 minutos | 70° C |

8.7 RT-PCR y análisis de expresión de mRNA

La detección de expresión de mRNA se realizó utilizando SYBR Green de KAPA bajo las siguientes condiciones de programación en el equipo Light Cycler 480 (Tabla 7).

Tabla 7.- Condiciones de qPCR en tiempo real utilizadas en el equipo Light Cycler 480 para el análisis de expresión de mRNA por Sybr Green.

| Programación | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
|---------------------------|-------------|--------|--------|
| Desnaturalización inicial | 95° C | 5 min | 1 |
| Desnaturalización | 95° C | 10 s | 40 |
| Alineamiento | 60° C | 17 s | 1 |
| Extensión | 72° C | 1 s | 1 |

Los niveles de expresión del mRNA se normalizaron bajo la detección de GAPDH como gen endógeno y los análisis de expresión se llevaron a cabo por $2\Delta\Delta CT$. Se usaron secuencias de oligonucleótidos para MEOX2, VIMENTINA, E-cadherina, ZEB1 y GAPDH diseñados con el programa ProbeFinder versión 2.51 (Roche, Alemania) y sintetizados por SIGMA-ALDRICH y Oligo T4 (EE.UU.).

8.8 Western blot

Las proteínas totales se purificaron con buffer de lisis tipo RIPA (Radioinmunoprecipitation Assay Buffer) con inhibidor de proteasas (mini complete, Roche, Indianapolis, IN, EE. UU.), y se cuantificaron mediante el kit comercial DC Protein (Bio -Rad). Se utilizaron 30 μ g de proteínas totales para electroforesis vertical en geles de acrilamida al 8%, a 120 volts por 120 min; y luego se transfirieron

a membranas de PVDMF (Polyvinylidene difluoride) usando método de transferencia en cámara húmeda a 300 mAMP por 120 min. La eficacia de la transferencia fue confirmada por rojo de Ponceau y Azul de Comassie. Las membranas se bloquearon con TBS 1X-Tween 20 al 0.1% (TBST) con 5% de leche baja en grasa/BSA y se incubaron a 4 °C durante toda la noche con anticuerpos, MEOX2 1:1000, ZEB1 1:250, VIMENTINA 1:500 o GAPDH 1:3000 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EE. UU.), se lavaron 3 veces con TBST por 10 min, a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron durante 2 h con anticuerpo secundario (HRP anti-ratón / anti-conejo HR) 1:10,000 y PBS 1X-Tween 20 al 0.1% con 2% de leche baja en grasa para MEOX2, GAPDH y BSA para VIMENTINA y ZEB1 a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con TBS 1X-Tween 20 al 1% por 10 min. Las membranas se revelaron con 300 µl de Clarity Western ECL Substrate (#1705060) los cambios de relación se calcularon utilizando el programa Image Studio (versión 4.0.21), para el posterior análisis.

8.9 Ensayos de migración

Para el ensayo de migración en transwell se plaquearon 300,000 células por pozo en placas de 6 y se almacenaron en condiciones de cultivo por 12 horas, tras lo cual, se realizó transfección por siRNA descrito con anterioridad, seis horas después (a un total de 18h post plaqueo), se retiró el medio y se lavó cada pozo 2 veces con PBS 1X estéril. Para separar las células de la placa de cultivo se utilizó un método físico (Scraper) y se agregó medio con 1% de SFB para mantener las células en ayuno. En la cámara superior se pusieron 100,000 células resuspendidas en 500 µL de medio con 1% de SFB. En la cámara inferior se colocaron 500 µL de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB y 1% de penicilina estreptomycin para formar un gradiente de quimio-atrayente y se incubaron por 48 horas en condiciones de cultivo. Posteriormente se fijaron con metanol frío al 70% y se retiraron las células de la parte interna de la cámara con un isopo. Se tiñeron con cristal violeta al 0.1% por 5 minutos en agitación constante y se enjugaron con agua corriente hasta eliminar el excedente de colorante. Se dejaron secar las cámaras a temperatura ambiente overnight y una vez que las membranas estuvieron completamente secas,

se cortaron y se montaron en cubreobjetos con medio de montar entellan (Merck Millipore 8107961). Las imágenes fueron tomadas mediante microscopio en campo claro con aumento de 100X.

8.10 Análisis estadístico

Se realizaron las siguientes pruebas estadísticas como T de Student, prueba múltiple de T y análisis de ANOVA de dos vías para determinar diferencias significativas entre grupos experimentales. $p < 0.05$ indica significancia estadística. Así como prueba de Bonferroni La corrección de Bonferroni compensa el aumento en la probabilidad de eventos aberrantes al probar cada hipótesis individual en un nivel significativo de α / m , donde α es el nivel deseado y m es el número de hipótesis para llevar a cabo la corrección mediante la prueba de cada hipótesis de manera individual. Para todo lo anterior fue utilizado el software GaphPad Prism (versión 6.0).

9.- RESULTADOS

El análisis *in silico* de los datos depositados en el sistema DRYAD permitió visualizar picos de fluorescencia con un valor de corte con $FDR \leq 0.2$ detectados por la alineación de por lo menos 4 sondas en la región evitando falsos positivos, indicando interacción física de alta probabilidad estadística para el índice MEOX2/RNA POL II sobre la región promotora de ZEB1.

El primer track está comprendido por 40 sondas de MEOX2 con interacción de RNA POL II lo largo de 4,000 bases relativas al TSS de ZEB1. El segundo track son los picos de predicción de unión de MEOX2/RNA POLII, el tercer y cuarto track se encuentran los picos de MEOX2 y RNA POL II por canales separados y en el último está el TSS de ZEB1.

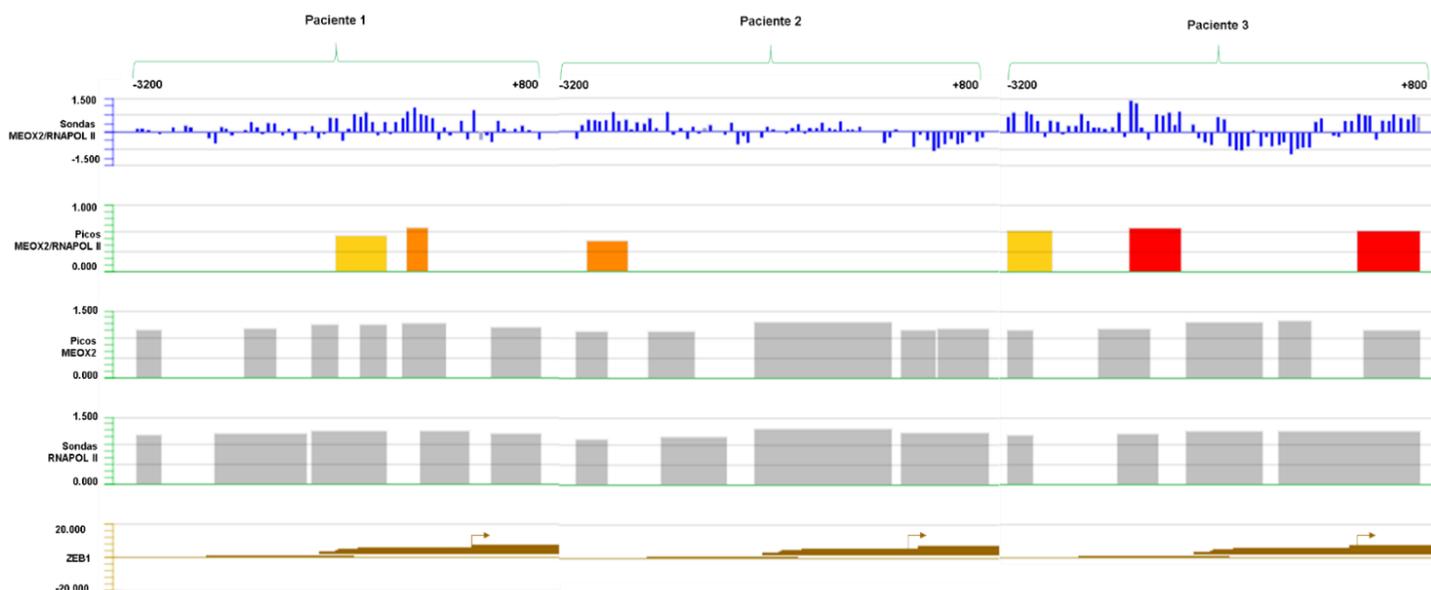


Figura 1.- Ocupación de la región promotora de ZEB1 por el factor de transcripción MEOX2 y RNA POL II en pacientes mexicanos. Estos ensayos de *ChIP-on-chip* (Nimblegen 3x720k) fueron realizados con 40 sondas de 10b cada una de MEOX2 con RNA POL II. Los picos indican la hibridación de las sondas con el DNA donde los colores más cercanos a rojo indican una mayor interacción con significancia estadística.

En la parte superior izquierda de la figura 1, se observan 2 picos correspondientes al paciente 1, uno color naranja ($FDR \leq 0.1$) y uno color amarillo ($FDR \leq 0.2$); en la muestra del paciente 2 se encontró un solo pico de color naranja ($FDR \leq 0.1$) y para la muestra del paciente 3, hay dos picos en color rojo ($FDR \leq 0.05$), y uno en amarillo ($FDR \leq 0.2$).

Para una visualización más simple de los sitios putativos de unión con significancia estadística en los 3 pacientes, se sobrepusieron las gráficas de los picos de fluorescencia de acuerdo con su posicionamiento relativo al TSS de ZEB1, de tal suerte que el pico más cercano a los -3200 pb es el 1, y el que se encuentra en el sitio +1 del TSS es el pico número 6 (Figura 2).

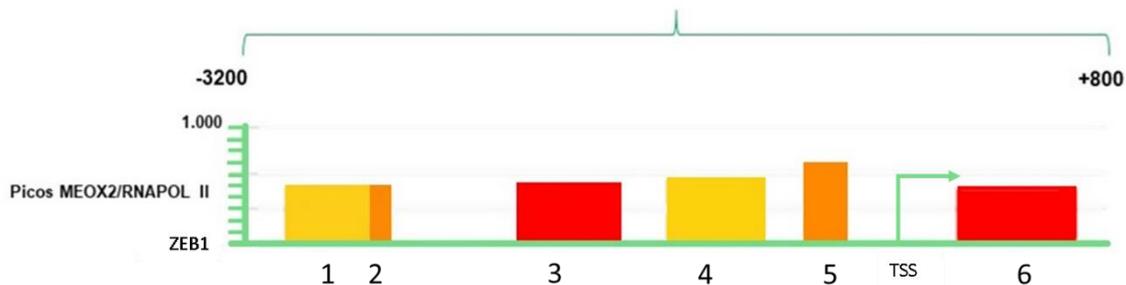


Figura 2.- Sitios de interacción física de alta probabilidad de la proteína MEOX2 sobre el promotor de ZEB1. Solapamiento de picos obtenidos del análisis *in silico* por medio de la herramienta SignalMap numerados respecto a su posición relativa al TSS de ZEB1.

Con la Figura 2 es más sencillo localizar y medir los sitios donde la proteína MEOX2 podría estar unida en la región promotora de ZEB1. El pico número 1 tiene una longitud de 364 bases, el pico 2 de 390 bases, el 3 de 486 bases, el 4 comprende 489 bases, el quinto de 197 bases y el sexto tiene una longitud de 613 bases. En total los picos ocupan 2,539 bases de las 4,000 analizadas. Más del 50% de la región promotora de ZEB1 podría estar ocupada por la proteína MEOX2 en los datos derivados de ensayos en muestras de pacientes mexicanos.

Para corroborar la información obtenida por el software SignalMap de Nimblegen, se procedió a realizar un análisis de predicción *in silico* de sitios de unión de la proteína del factor de transcripción MEOX2 en la misma región de -3,200 a +800pb del promotor de ZEB1 relativo al TSS, mediante el software bioinformático en línea JASPAR. Esta herramienta permite la predicción de sitios motif de cualquier factor de transcripción en diferentes organismos, el análisis realizado se hizo con información disponible para *Homo Sapiens*. Se hizo la colocación de los 17 sitios predictivos y los picos de fluorescencia obtenidos por SignalMap para saber si la información obtenida por una herramienta coincidía con la información arrojada por la otra. Pudimos observar que los picos generados por JASPAR coinciden con los sitios putativos de unión identificados por SignalMap. Encontramos que 14 de los 17 sitios motif encontrados por JASPAR de MEOX2 a lo largo de 4,000 bases de la región promotora de ZEB1 no sólo tienen un valor de cohorte significativo, sino que además concuerdan con el posicionamiento de 5 de los 6 picos de fluorescencia identificados por SignalMap. De los 17 sitios motif de MEOX2 localizados sobre la región promotora de ZEB1, 14 tienen un nivel de significancia del 85% (amarillo) y 3 con 90% (rojo) (Figura 3).

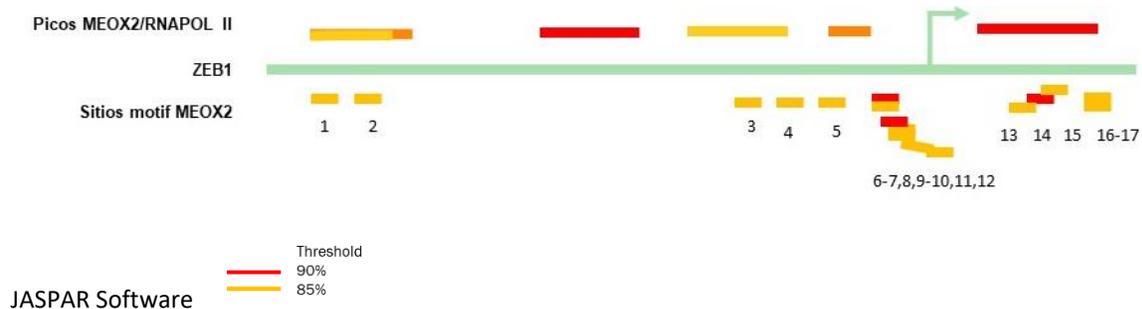


Figura 3.- Sitios motif del factor de transcripción MEOX2 sobre el promotor de ZEB1. En la parte superior de la imagen se encuentran los picos de fluorescencia de MEOX2 y RNA POL II encontrados por SignalMap. En la parte inferior están localizados los 17 sitios Motif de MEOX2 identificados con JASPAR.

Para conocer el estado epigenético del promotor de ZEB1, se delimitó el perfil de la línea A549 en la región promotora de ZEB1 (-3800 a +800). Se analizaron datos derivados de ensayos tipo CHIP-seq en esa línea celular puestos a disposición por el instituto Broad como parte del proyecto ENCODE.

Para el análisis se seleccionaron datos para CTCF (rosa) ya que se ha identificado como un remodelador de la arquitectura cromatínica, las marcas asociadas con activación de la transcripción H3K4me3 y H3K27ac (verde) y de represión H3K9me3 y H3K27me3 (Naranja) así como RNA POL II (negro) y los datos derivados de CHIP-on-chip descargados de Dryad de los 3 pacientes en el formato GFF analizados por el programa SignalMap.

En la figura 4 se observa enriquecimiento en la señal de CTCF, así como en las marcas de represión H3K9me3, H3K27me3 y RNA POL II cuya ubicación coincide con el posicionamiento de 2 picos: pacientes 2 y 3, cercano a los -3200 río abajo del promotor de ZEB1. El enriquecimiento en la señal de RNA POL II concuerda también con enriquecimiento en las 2 marcas de represión, del dominio remodelador de la cromatina CTCF y uno de los picos del paciente 2.

Cercano al TSS de ZEB1, se observa enriquecimiento en las marcas asociadas a la activación de la transcripción cuya posición concuerda con los 2 picos del paciente 1. Finalmente, en el sitio +1, cercano a las 800pb río arriba del promotor de ZEB1 se observa un incremento en la actividad de RNA POL II y disminución en la señal de las marcas de activación. Es importante resaltar la presencia constitutiva de las marcas asociadas con la represión a lo largo de la región analizada. La evidencia de la presencia de actividad de RNA POL II y de las marcas H3K4me3 y H3K27ac podría indicar que existió un promotor activo transcripcionalmente, mediado por marcas de histonas y la presencia de la proteína MEOX2.

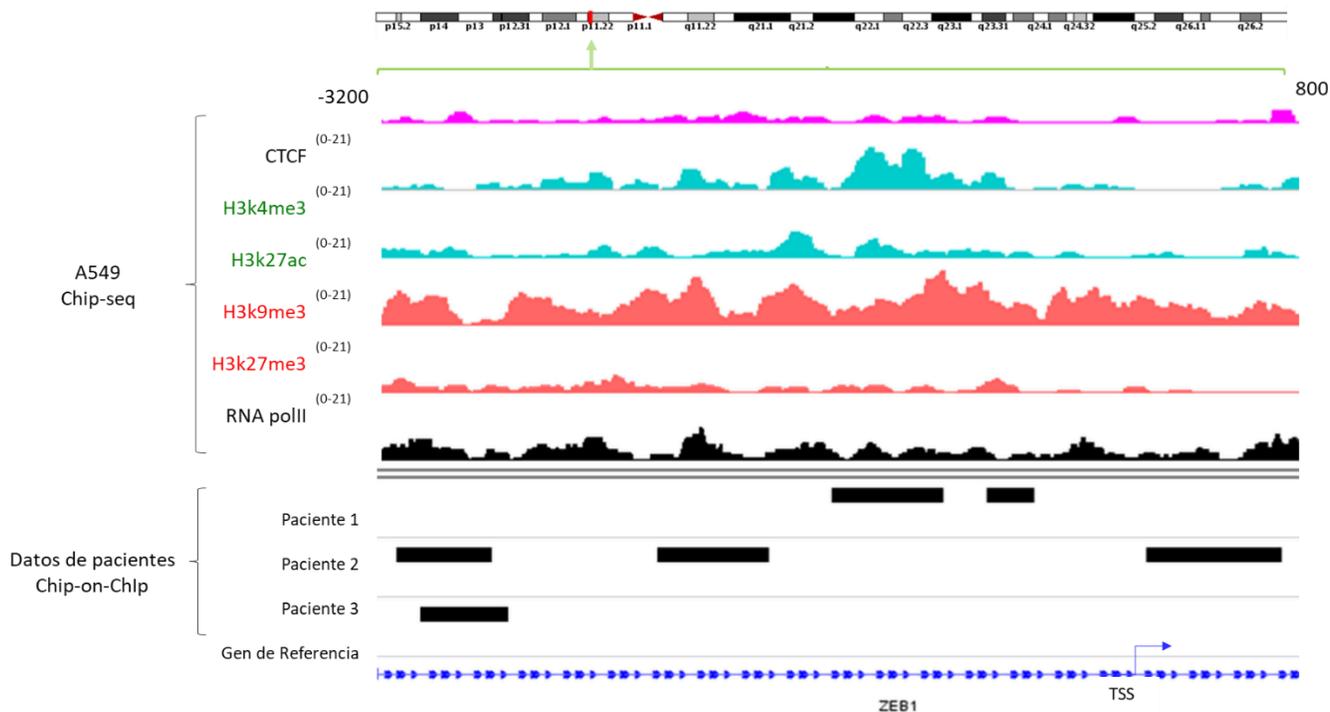


Figura 4.- Estado epigenético de la región promotora de ZEB1 en la línea A549. Marcas de histonas asociadas a la activación (azul) y represión (naranja) de la transcripción, así como CTCF (rosa) y la actividad de RNA POL II (negro) análisis de 4,000pb (-3200 a +800) relativas al TSS de ZEB1 (azul). Así como los picos de fluorescencia derivados de los datos analizados por SignalMap.

Se validaron los niveles basales de mRNA de MEOX2, ZEB1, E-Cadherina y VIMENTINA en 4 líneas celulares: A549, NH2347, H1975, HCC827 y fueron ajustadas con un mix de RNA de las 4 líneas.

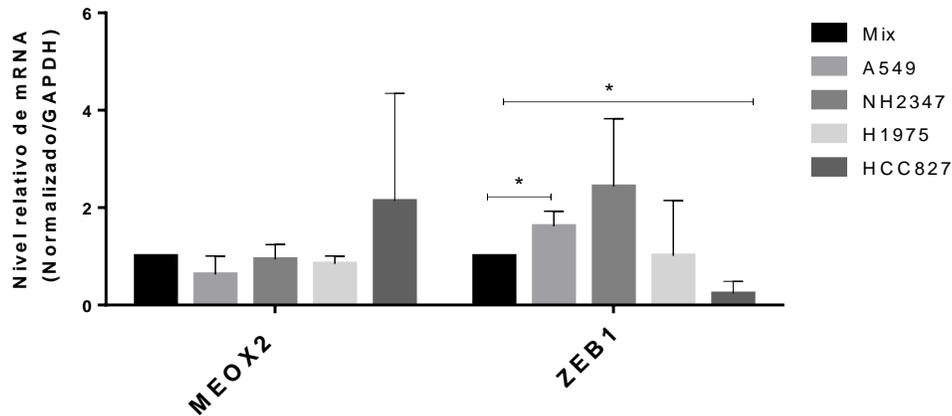


Figura 5.- Determinación de niveles basales de mRNA de MEOX2 y ZEB1 en 4 líneas celulares (A549, NH2347, H1975 y HCC827). Ajustado con un mix de RNA y normalizado con GAPDH. Nivel de significancia estadística prueba de T (*) $p=0.1$.

Se observa que la línea HCC827 presenta niveles más altos de mRNA de MEOX2 respecto al control, esto es inversamente proporcional a la expresión de ZEB1, lo que podría indicar una relación inversa en la expresión de MEOX2 vs ZEB1 a nivel de mRNA. No se reporta cambio significativo en la expresión de MEOX2 en las otras tres líneas con respecto al control (Figura 5). Sin embargo, se observa expresión significativa de ZEB1 en la línea A549. Para hacer la correlación basal de los marcadores de mesenquimalidad, se determinaron los niveles basales de mRNA de E-cadherina y VIMENTINA. Se observa mayor expresión de VIMENTINA en la línea NH2347 y menor en la línea HCC827, sin embargo, respecto a la expresión de E-cadherina la línea HCC827 presenta mayores niveles de expresión lo que concuerda con una menor expresión de VIMENTINA y ZEB1 (Figura 6). En la línea H1975 no se detectaron diferencias en los niveles de expresión ni de MEOX2 ni de ZEB1 (Figura 5).

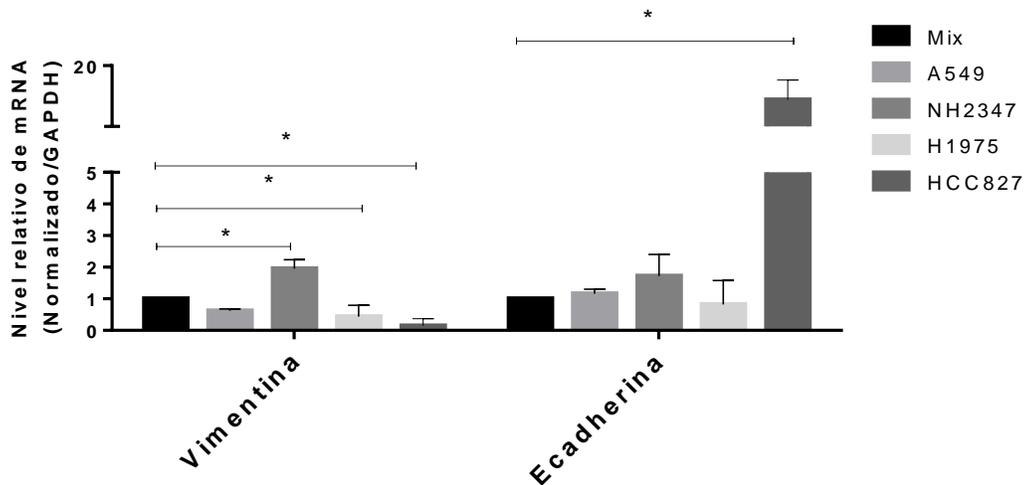


Figura 6.- Determinación de niveles basales de mRNA de E-cadherina y VIMENTINA en A549, NH2637, H1975 y HCC82. Ajustado con un mix de RNA y normalizado con GAPDH nivel de significancia estadística prueba de T (*) $p=0.1$.

Se determinaron también los niveles de expresión a nivel de proteína en las 4 líneas celulares. Se observa que en A549 y NH2347 los niveles de proteína de MEOX2 y ZEB1 son similares (Figura 7). Esto contrasta con la expresión en H1975 y HCC827 donde se observa que la expresión de ambas proteínas es diferencial, es decir; en H1975 donde la expresión MEOX2 tiene una tendencia a mayor expresión, se observan niveles menores de ZEB1. Por otro lado, en HCC827 se observa una menor expresión de MEOX2 respecto a las otras líneas y ZEB1 tiene niveles cercanos a 1 (Figura 7). Lo que indica que podría existir algún tipo de relación en la expresión de ambas proteínas.

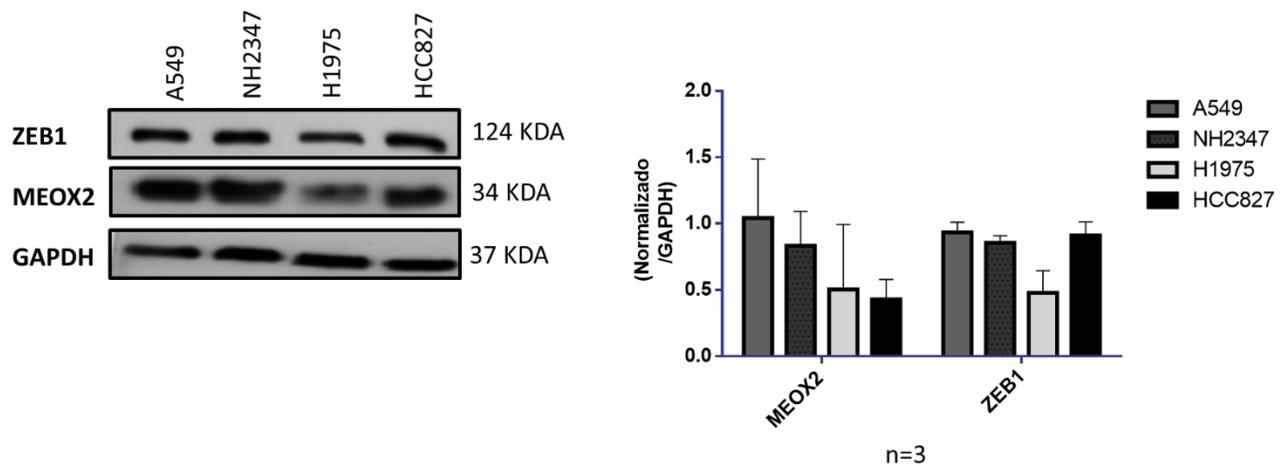


Figura 7.- Expresión a nivel de proteína de ZEB1 y MEOX2 en células de adenocarcinoma pulmonar. Se presenta una imagen representativa de los experimentos realizados en A549, NH2347, H1975, HCC827. Se analizaron 3 réplicas experimentales con el programa Image-J.

Para evaluar la regulación transcripcional de MEOX2 y ZEB1 se realizaron 3 ensayos independientes de silenciamiento por siRNA en las 4 líneas celulares. Para la validación se realizó la determinación de mRNA de los genes blanco. En la línea A549 se valida la efectividad del silenciamiento de MEOX2 (-50%) contra el control. Se observa que en la condición de silenciamiento de MEOX2 disminuye la expresión de ZEB1 y en la condición de silenciamiento de ZEB1 (-90%) disminuye la expresión de mRNA de MEOX2 (Figura 8a). El análisis de western blot indica que no hay una disminución en la expresión de MEOX2 con el silenciamiento de MEOX2, sin embargo, hay disminución en la expresión de MEOX2 en condiciones de silenciamiento de ZEB1. Por otro lado, se detectó mayor señal de ZEB1 en condiciones de silenciamiento tanto de MEOX2 y ZEB1 con diferencia estadística significativa (Figura 8b).

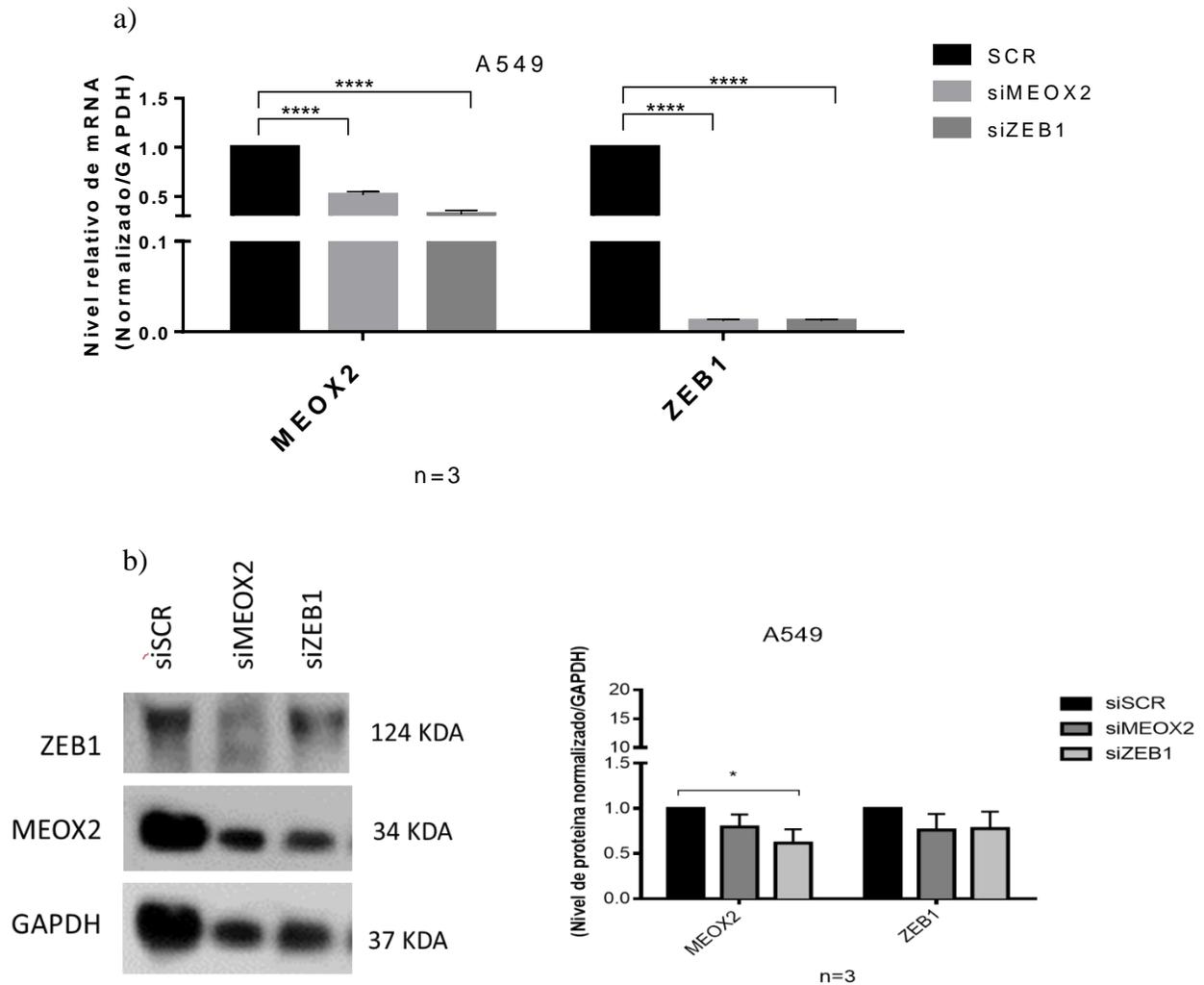


Figura 8.- Efecto del silenciamiento por siRNAs en la línea A549 sobre los blancos, MEOX2 y ZEB1. Se utilizó una secuencia scrambled (SCR) como control de transfección. La detección del nivel relativo de (a) mRNA y (b) proteínas fue normalizado con GAPDH. Nivel de significancia estadística (****) $p=0.0001$ y (**) $p=0.02$. Se muestra una figura representativa del fenómeno.

También se realizó la detección de la expresión de mRNA de VIMENTINA y E-cadherina en las mismas condiciones de silenciamiento. No se observan diferencias significativas en ninguno de los casos, aunque se observa una disminución en la expresión de VIMENTINA en silenciamiento de MEOX2 y ZEB1 vs el control (Figura 9).

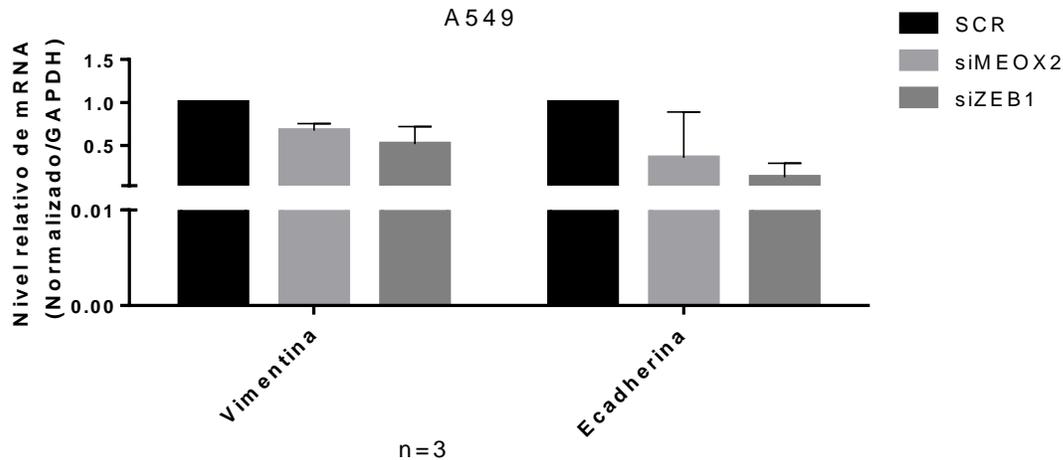


Figura 9.- Efecto del silenciamiento por siRNAs de MEOX2 y ZEB1 en la expresión de marcadores de mesenquimalidad VIMENTINA y E-cadherina en la línea A549. La detección del nivel relativo de mRNA fue normalizada con GAPDH.

En NH2347 se observa un abatimiento de los niveles de mRNA para los genes blanco MEOX2 (>90%) y ZEB1(>90%) y de la misma forma, una disminución de la expresión de MEOX2 en la condición de silenciamiento de ZEB1 y viceversa (Figura 10 a). El análisis de western blot indica una disminución significativa de las proteínas blanco en condiciones de silenciamiento; es decir, se detectó menor cantidad de la proteína de MEOX2 en condiciones de silenciamiento del mismo y en condiciones de silenciamiento de ZEB1. Se observa disminución de la proteína de ZEB1 en condiciones de silenciamiento de MEOX2 y también con el silenciamiento de ZEB1 (Figura 10b).

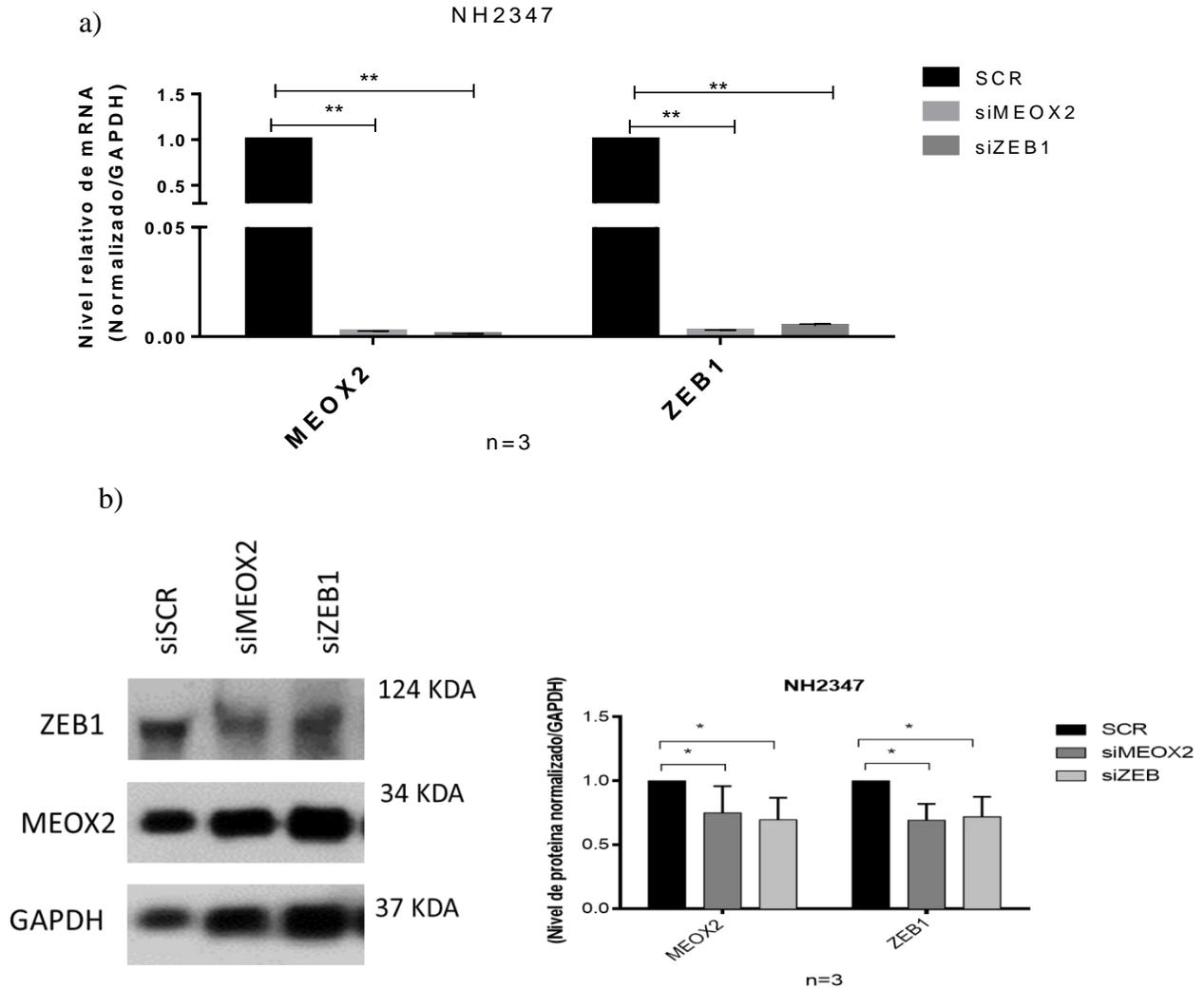


Figura 10.- Efecto del silenciamiento por siRNAs en la línea NH2347 sobre los blancos MEOX2 y ZEB1. Se utilizó una secuencia scrambled (SCR) como control de transfección. La detección del nivel relativo de (a) mRNA y (b) proteínas fue normalizado con GAPDH (** $p= 0.02$ y (***) $p= 0.005$). Se muestra una figura representativa del fenómeno.

Respecto a los marcadores mesenquimal para la línea NH2347 se observó una disminución significativa en la expresión de mRNA tanto de VIMENTINA como de

E-cadherina en ambas condiciones de silenciamiento comparadas con el control (Figura 11).

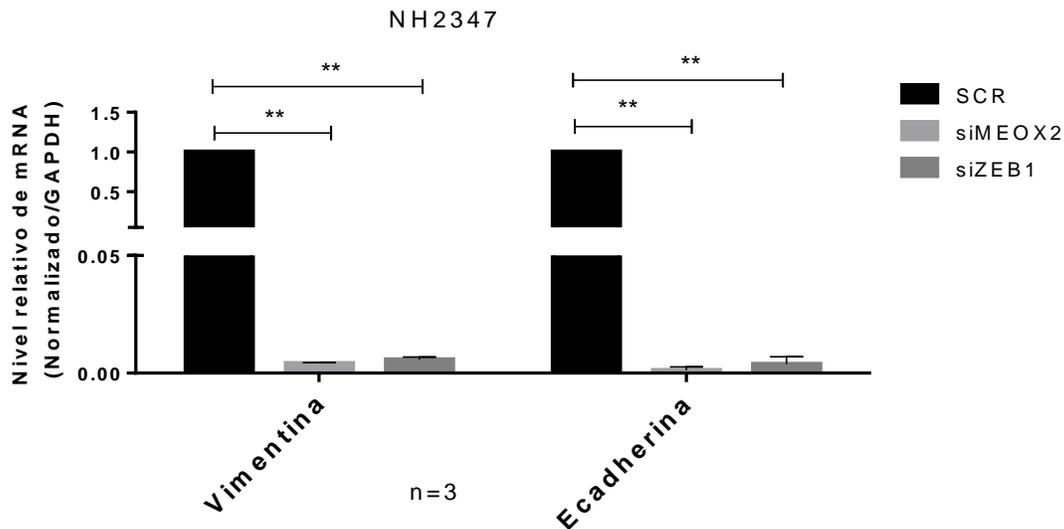


Figura 11.- Efecto del silenciamiento por siRNAs de MEOX2 y ZEB1 en la expresión de marcadores de mesenquimalidad en la línea NH2347. La detección del nivel relativo de mRNA fue normalizado con GAPDH. (**) $p=0.02$.

Para la línea H1975 no se observa efecto del silenciamiento a nivel de mRNA ni de MEOX2 ni de ZEB1. Incluso se determinaron niveles más altos de transcrito tanto de MEOX2 como de ZEB1 en la condición de silenciamiento de MEOX2. Respecto a la condición de silenciamiento de ZEB1 se observa un incremento en el silenciamiento, la detección de MEOX2 no tuvo cambios significativos comparado con el control (Figura 12a). Los niveles de proteína indican que hay disminución estadísticamente significativa de MEOX2 con el silenciamiento del mismo, aunque en condiciones de silenciamiento de ZEB1 se detectó mayor expresión de proteína de MEOX2. En condiciones de silenciamiento de ZEB1 se detectó una menor expresión de MEOX2 y también de ZEB1 (Figura 12b). Esta evidencia valida el silenciamiento a nivel de proteína, pero no en mRNA en H1975.

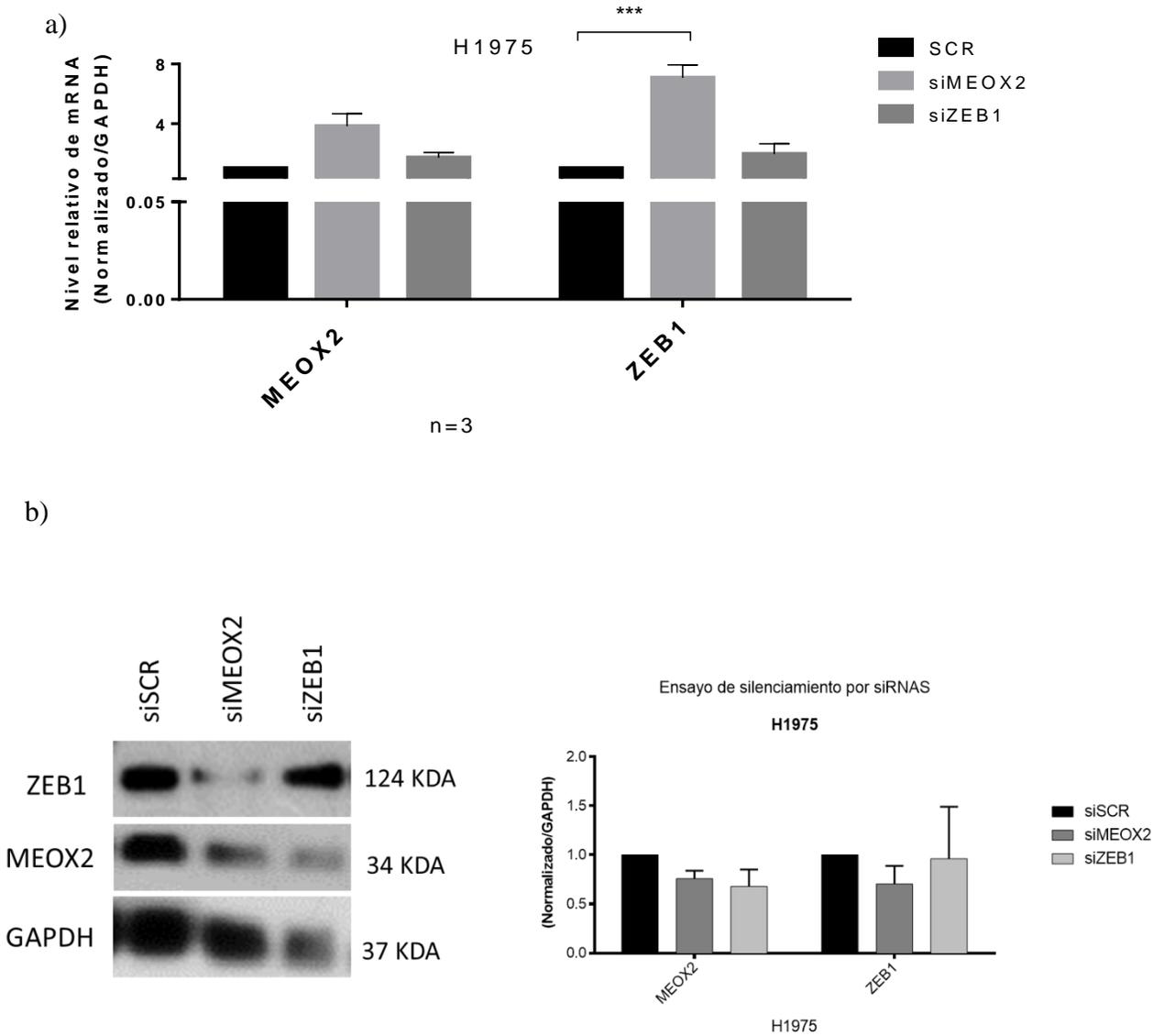


Figura 12 .- Efecto del silenciamiento por siRNAs en la línea H1975 sobre los blancos MEOX2 y ZEB1. Se utilizó una secuencia scrambled (SCR) como control de transfección. La detección del nivel relativo de (a) mRNA y (b) proteínas fue normalizada con GAPDH. (***) $p=0.005$ (**) $p=0.02$

Los marcadores de mesenquimalidad en H1975 no muestran diferencias significativas de detección del transcrito en ninguna de las condiciones de silenciamiento comparadas con el control (Figura 13).

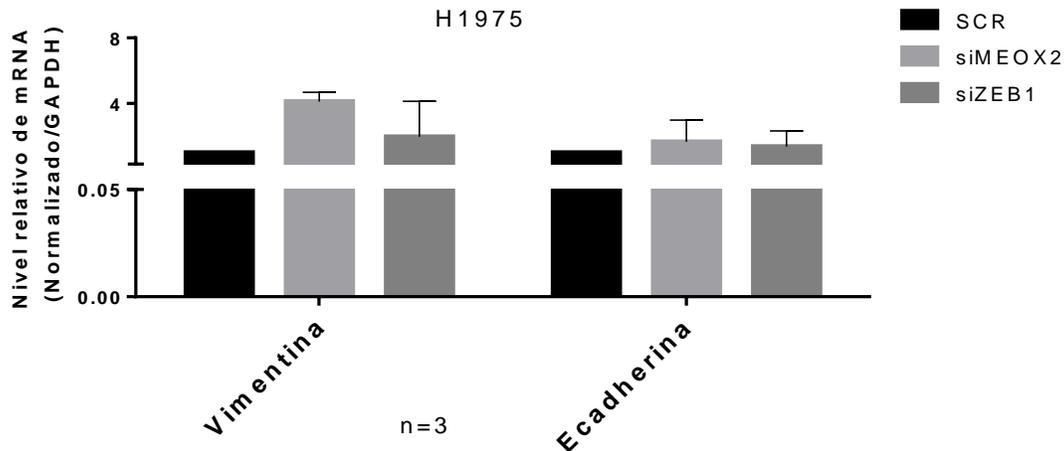


Figura 13.- Efecto del silenciamiento por siRNAs de MEOX2 y ZEB1 en la expresión de marcadores de mesenquimalidad en la línea H1975. La detección del nivel relativo de mRNA fue normalizada con GAPDH.

En el caso de la línea HCC827 se observa un fenómeno similar al detectado en la línea H1975: un incremento significativo en la detección de niveles de MEOX2 en la condición con silenciamiento del mismo y un incremento, también significativo con la detección de transcrito de ZEB1 en la condición de silenciamiento de ZEB1 (Figura 14a). Respecto al análisis de proteínas no se observó disminución en la expresión de MEOX2 en condición de silenciamiento del mismo, pero sí en la condición del silenciamiento de ZEB1. Respecto a la expresión de proteína de ZEB1 se observa una menor expresión del mismo en condición del silenciamiento de MEOX2 y también disminución de la proteína blanco del siRNA (ZEB1) (Figura 14b). Con esta evidencia se valida el silenciamiento de ZEB1 a nivel de proteína en la línea HCC827.

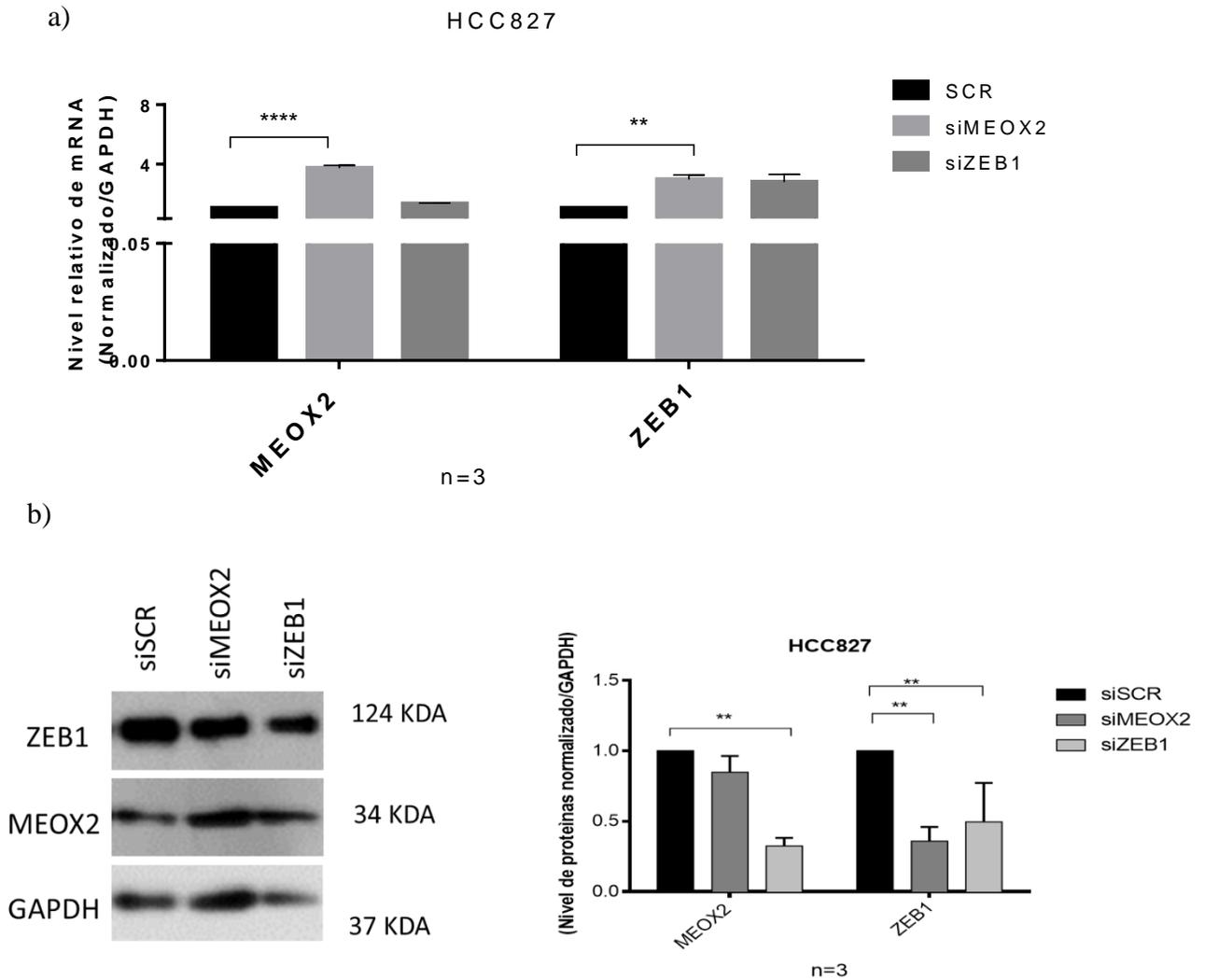


Figura 14.- Efecto del silenciamiento por siRNAs en la línea HCC827 sobre los blancos MEOX2 y ZEB1 usando una secuencia scrambled (SCR) como control de transfección. La detección del nivel relativo de mRNA y proteínas fue normalizado con GAPDH (**) $p=0.0001$ y (**) $=0.02$.**

Los niveles detectables de mRNA de VIMENTINA en condición de silenciamiento de MEOX2 tuvieron un incremento significativo contra el control no así en los niveles de E-cadherina. No se observan cambios significativos en la detección de VIMENTINA ni de E-cadherina en las condiciones de silenciamiento de ZEB1 (Figura 15).

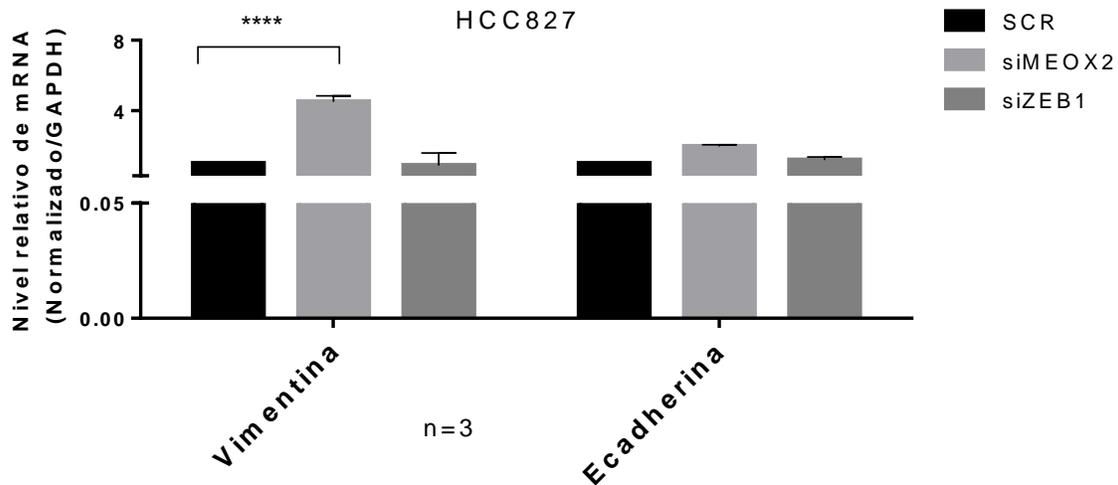


Figura 15.- Efecto del silenciamiento por siRNAs de MEOX2 y ZEB1 en la expresión de marcadores de mesenquimalidad en la línea HCC827. Los resultados fueron normalizados con la detección de GAPDH (**) $p= 0.0001$**

Se realizaron ensayos de migración en transwell con silenciamiento por siRNA de MEOX2 y ZEB1 en las 4 líneas celulares A549, NH2347, H1975 y HCC827. El análisis cuantitativo de las imágenes fue realizado con el programa Image-J.

El programa cuantifica únicamente cierto tamaño de pixeles de acuerdo con la saturación de color en la imagen, en otras palabras, únicamente cuantifica las células que fueron teñidas con cristal violeta debido a la intensidad presente en ellas, lo que le da cierto tamaño a los pixeles. De este modo fue posible cuantificar las células.

Para la línea A549 se observa que hay disminución en la cantidad de células en la membrana transwell lo que indica una disminución en la capacidad migratoria de células con silenciamiento de MEOX2 tal como en las células con el silenciamiento de ZEB1 vs el control (Figura 16)

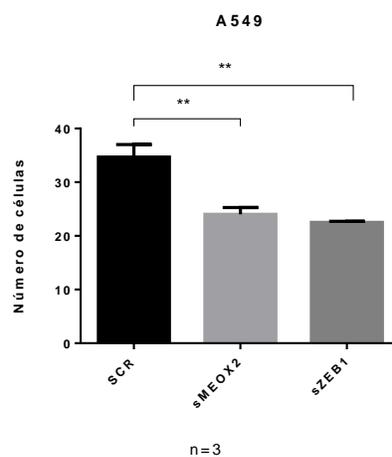
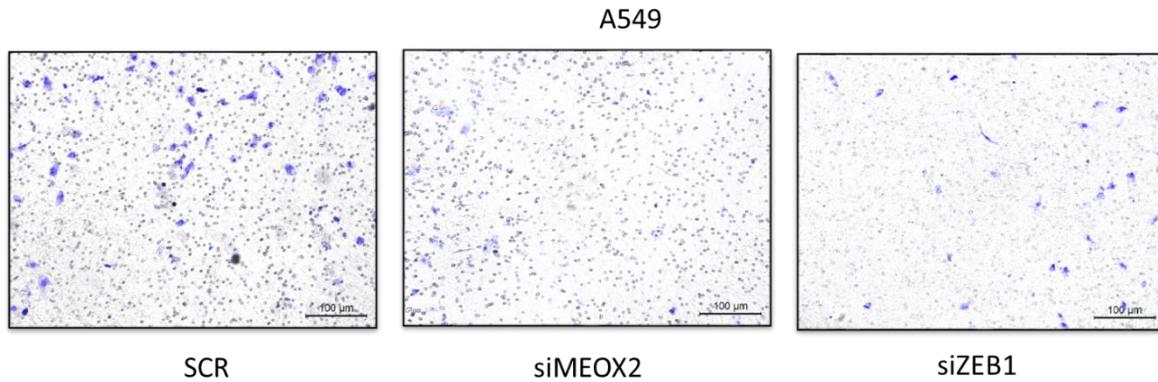


Figura 16.- Ensayo de migración empleando cámaras transwell para la línea A549 en condiciones de silenciamiento de MEOX2, ZEB1 y el control de transfección (SCR) ()** $p= 0.02$. Se muestra una imagen representativa de la membrana transwell. Cada ensayo se hizo por triplicado con 3 réplicas biológicas cada uno. Se graficaron los datos de las réplicas experimentales por condición

A la par, se realizaron ensayos de capacidad de formación de colonias en las mismas condiciones de silenciamiento. Los análisis de formación de colonias se realizaron con un plugin de Image J llamado “colony area”, dicha cuantificación también se hace por pixeles y lo que detecta el plugin es la cantidad de colonias formadas no su tamaño. En la línea A549 se observó una menor capacidad de formación de colonias con el silenciamiento de MEOX2 contra el control. Dicha

capacidad permaneció sin cambios en la condición de silenciamiento de ZEB1 (Figura Anexa 1).

Para los ensayos de migración con la línea NH2347 se observó también disminución en la cantidad de células que atravesaron la membrana en condiciones de silenciamiento de MEOX2 y ZEB1 pero sin diferencias significativas contra el control en ninguno de los casos (Figura 17).

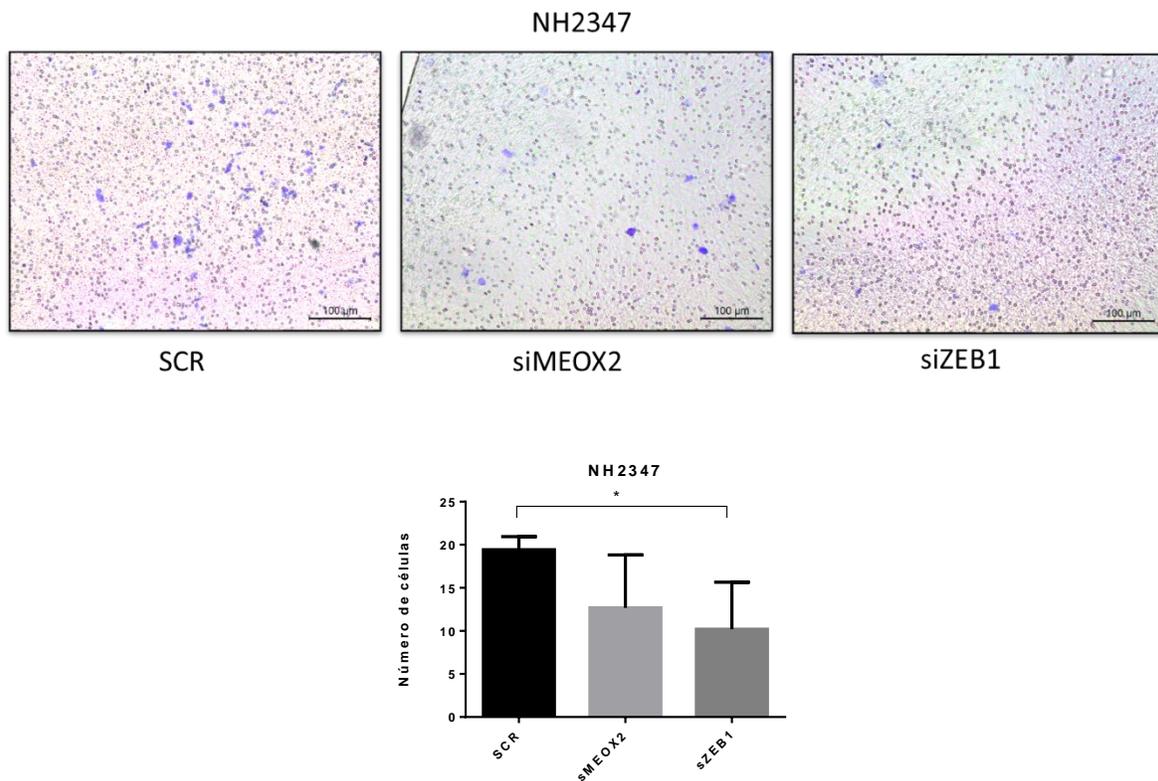


Figura 17.- *Ensayo de migración empleando cámaras transwell para la línea NH2347 en condiciones de silenciamiento de MEOX2, ZEB1 y el control de transfección (SCR). Se muestra una imagen representativa de la membrana transwell. Cada ensayo se hizo por triplicado con 3 réplicas biológicas cada uno. Se graficaron los datos de las réplicas experimentales por condición.*

Respecto a los ensayos de formación de colonias en NH2347 se observó menor cantidad de colonias; tanto como en la condición de silenciamiento de MEOX2 como con el silenciamiento de ZEB1 respecto al control (Figura Anexa 2).

Los resultados obtenidos de los experimentos con la línea H1975 indican una disminución significativa de la capacidad migratoria de las células con el silenciamiento de MEOX2, también en el silenciamiento de ZEB1 (Figura 18).

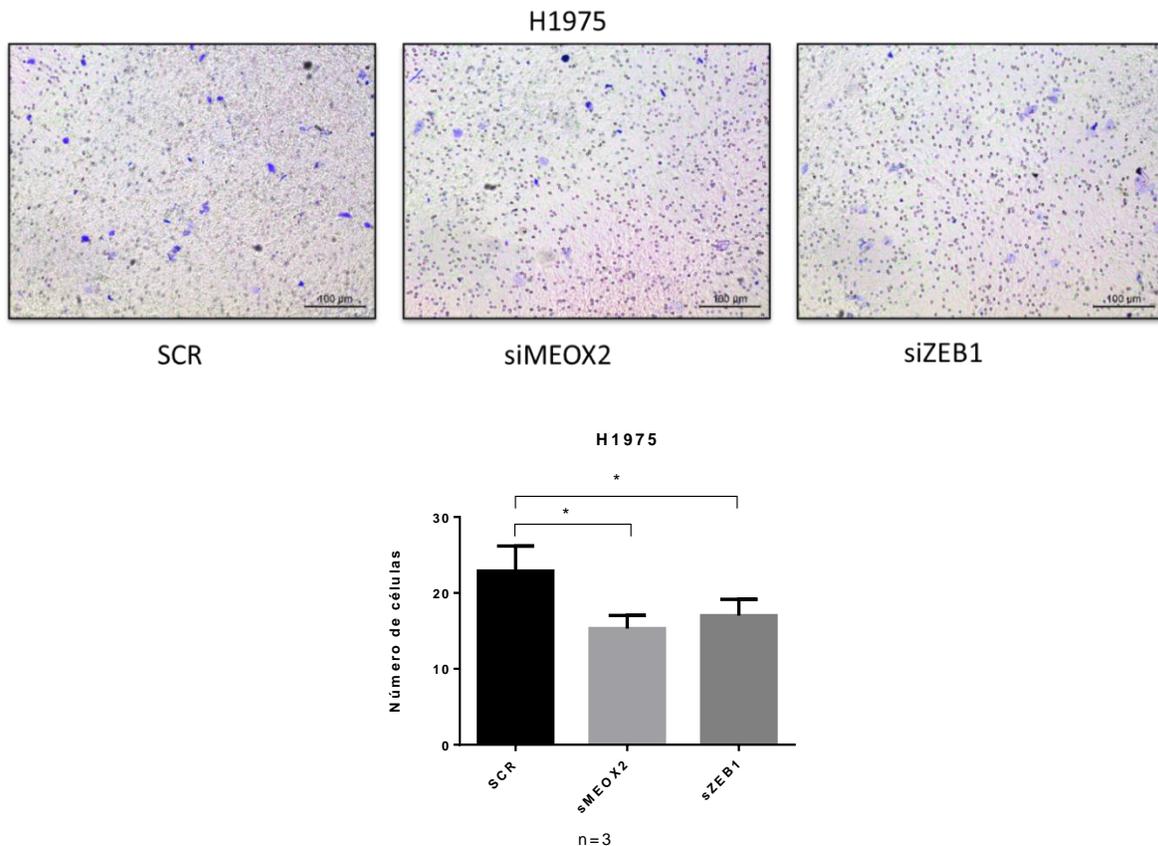


Figura 18.- Ensayo de migración empleando cámaras transwell para la línea H1975 en condiciones de silenciamiento de MEOX2, ZEB1 y el control de transfección (SCR).(*) $p= 0.1$ Se muestra una imagen representativa de la membrana transwell. Cada ensayo se hizo por triplicado con 3 réplicas biológicas cada uno. Se graficaron los datos de las réplicas experimentales por condición.

También se realizaron ensayos de formación de colonias con la línea H1975 en las mismas condiciones de silenciamiento de los blancos MEOX2 y ZEB1. A simple vista no se observó capacidad de formación de colonias sin embargo se realizó el análisis y el plugin es capaz de detectar la coloración por cristal violeta y con ello se puede realizar el análisis, sin embargo no se observan diferencias en la capacidad de formación de colonias en ninguna de las tres condiciones (Figura Anexa 3)

En los ensayos con la línea HCC827 el análisis de los ensayos de migración indica que en condiciones de silenciamiento de MEOX2 existe menor capacidad de migración celular, así como en la condición de silenciamiento de ZEB1; ambas sin diferencias significativas contra el control (Figura 19).

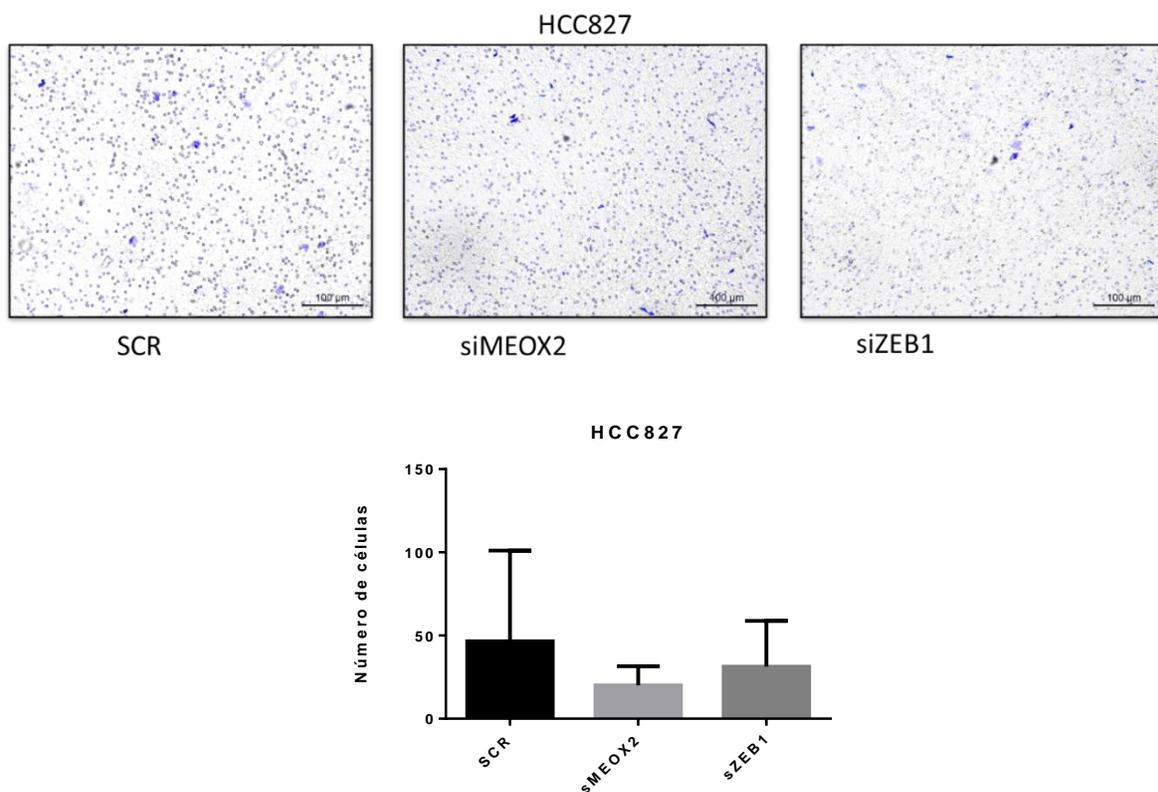


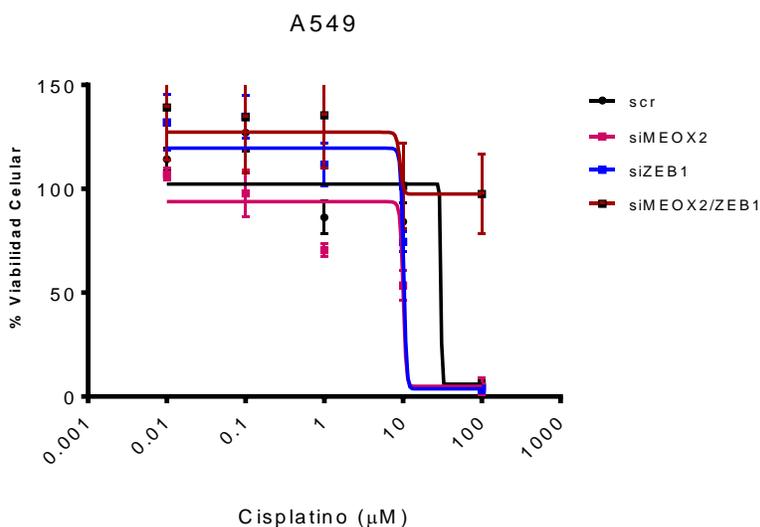
Figura 19.- Ensayo de migración empleando cámaras transwell para la línea HCC827 en condiciones de silenciamiento de MEOX2, ZEB1 y el control de transfección (SCR). Se muestra una imagen representativa de la membrana

transwell. Cada ensayo se hizo por triplicado con 3 réplicas biológicas cada uno. Se graficaron los datos de las réplicas experimentales por condición.

En el caso de los ensayos de formación de colonias se identificó poca capacidad de formación de colonias en la línea HCC827 incluso en el control, no se observan diferencias en la cantidad de colonias entre condiciones (Figura Anexa 4).

Para un acercamiento de la respuesta tumoral a cisplatino, se realizaron ensayos de MTT para viabilidad celular con exposición a cisplatino en 3 líneas celulares: A549, H1975 y HCC827.

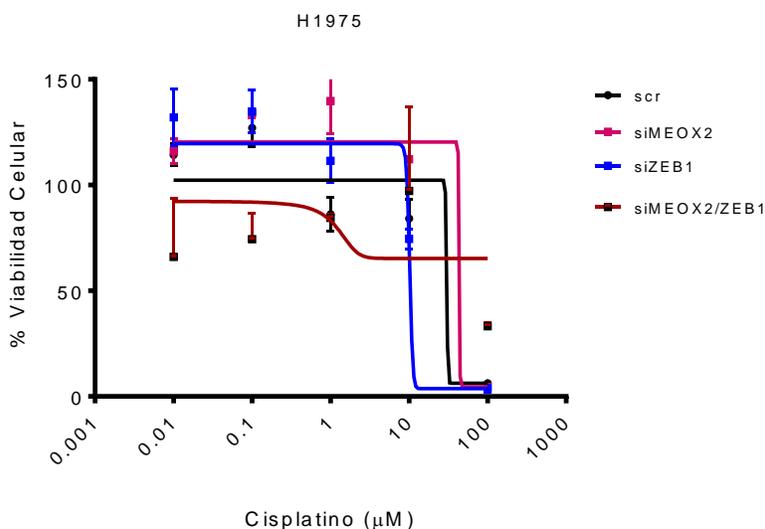
En A549 se observa disminución en la IC50 de cisplatino en las condiciones de silenciamiento de MEOX2 (10.08 μM) y ZEB1 (10.20 μM) respecto al control que presenta una IC50 de alrededor de $\sim 30.31 \mu\text{M}$, también se realizó una transfección doble y en esta condición la IC50 es de 9.18 μM (Figura 20).



| | scr | siMEOX2 | siZEB1 | siMEOX2/ZEB1 |
|---------|--------------|---------|--------|--------------|
| LogIC50 | ~ 30.31 | 10.08 | 10.20 | 9.182 * |

Figura 20 .- Determinación de IC50 de A549 a cisplatino con silenciamiento de MEOX2 y ZEB1. La IC50 fue graficada como porcentaje de viabilidad celular resultado de 3 réplicas experimentales.

En la línea H1975 se detectó incremento en la IC50 con el silenciamiento de MEOX2 (~43.43 μM) comparado con el control (~30.23 μM) y un decremento en la IC50 en la condición de silenciamiento de ZEB1 (10.20 μM), también se observó decremento en la condición del silenciamiento doble (1.216 μM) (Figura 21).



| | scr | siMEOX2 | siZEB1 | siMEOX2/ZEB1 |
|---------|---------|---------|--------|--------------|
| LogIC50 | ~ 30.23 | ~ 43.43 | 10.20 | 1.216 |

Figura 21.- Determinación de IC50 de H1975 a cisplatino con silenciamiento de MEOX2 y ZEB1. La IC50 fue graficada como porcentaje de viabilidad celular resultado de 3 réplicas experimentales.

La línea HCC827 en la condición SCR presenta una IC50 de 49.97 μM que es la más alta de las 3 líneas analizadas. Se observó disminución de la IC50 en la condición de silenciamiento de MEOX2 (9.95 μM), en el silenciamiento de ZEB1 (9.87 μM) y para el silenciamiento doble (1.10 μM) (Figura 22).

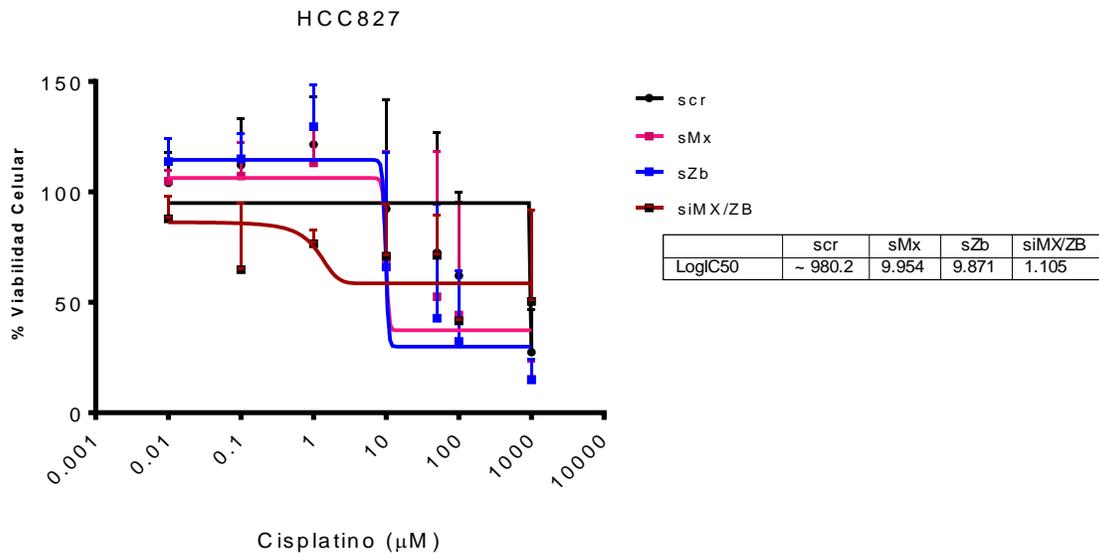


Figura 22.-Determinación de IC50 de HCC827 a cisplatino con silenciamiento de MEOX2 y ZEB1. La IC50 fue graficada como porcentaje de viabilidad celular resultado de 3 réplicas experimentales.

10.-DISCUSIÓN

Para un primer acercamiento se realizaron análisis bioinformáticos, partiendo de la premisa de que la vida misma es información. Los genes que determinan la fisiología de un organismo por ejemplo, en su forma más básica, pueden verse como información digital o numérica y, por ende, ser analizados, cuantificados y agrupados con base en similitudes estadísticas [162] y con ello analizar la dinámica funcional de un sistema complejo de forma “sencilla”.

Las uniones proteína-DNA, por ejemplo, son la piedra angular de procesos como el inicio de la replicación, transcripción y regulación génica, entre otros. Con base en la importancia de dichas uniones, se analizaron las interacciones mediante herramientas bioinformáticas con datos de pacientes publicados previamente por Ávila y colaboradores en 2015. Se realizó el análisis de datos derivados de ensayos de ChIP on chip con la herramienta “Signal Map”. El objetivo fue localizar los sitios dónde la proteína de MEOX2 pudiera estar unida en la región promotora de ZEB1.

El resultado de dicho análisis indica que podría ser posible la regulación transcripcional de la proteína del factor de transcripción MEOX2 sobre la región promotora de ZEB1 por la presencia de picos de fluorescencia de RNA POL II y MEOX2 sobre ZEB1; tal como lo reportan Armas-López y colaboradores en 2017 quienes identificaron por medio de la misma herramienta la presencia de picos de interacción de alta probabilidad de MEOX2 y RNA POL II sobre la región promotora del gen GLI1[160], factor de transcripción que codifica un miembro de la familia Kruppel de proteínas tipo dedos de Zinc [163] y está implicado en la vía de señalización SHH.

Los factores de transcripción (TFs) son estudiados como mecanismo de regulación ya que son proteínas que pueden activar o reprimir la transcripción de otros genes por su capacidad de unión a elementos en *cis* (elementos de regulación presentes en la misma molécula de DNA que el gen blanco con una longitud de alrededor de 10nt) llamados sitios de unión a factores de transcripción [164]. Estos factores son agrupados en familias con base en el sitio de unión a DNA que presenta su estructura. La proteína analizada MEOX2 conocido también como GAX, pertenece a la familia de genes HOX caracterizados por la presencia de un dominio tipo homeobox [165][160,166]. Por su parte ZEB1 es un factor de transcripción tipo dedos de Zinc [167][168,169].

Para corroborar la probabilidad de que existan sitios de unión del TF MEOX2 sobre el TF ZEB1 empleamos la herramienta en línea JASPAR. Ésta base de datos contiene una colección de sitios de unión de factores de transcripción publicados. Una de las bondades de esta herramienta es que arroja las posibles regiones de interacción con valores de cohorte definidos previamente de forma experimental [170].

La identificación de sitios putativos de unión por medio de JASPAR se ha empleado por otros grupos de trabajo para conocer el papel funcional y mecanismos moleculares de algunos factores de transcripción en cáncer, por ejemplo Han y colaboradores en 2015 identificaron sitios putativos de unión de SOX30 sobre el

promotor de p53 con ello y con la validación experimental correspondiente, concluyeron que SOX30 activa transcripcionalmente a p53 mediando su función como supresor de tumores en cáncer pulmonar[171].

En otro estudio realizado en 2016 también se empleó JASPAR para la identificación de sitios de unión de CTCF sobre miR-181c, con el fin de explorar su regulación epigenética. CTCF también es una proteína de tipo dedos de Zinc implicada en la reorganización de la cromatina que favorece las interacciones inter e intra cromosómicas, ellos utilizan JASPAR como una primer aproximación y posteriormente, mediante ensayos experimentales, corroboraron la regulación de CTCF sobre miR-181c [172]. Sin embargo, ésta es la primera vez que se realiza un análisis *in silico* para conocer la relación de la proteína MEOX2 sobre la región promotora de ZEB1 identificando 17 sitios de unión con valores de cohorte mayores al 80% de los cuales 14 concuerdan con el posicionamiento de picos de unión de alta significancia estadística, que demuestran, de manera preliminar que ZEB1 podría ser un gen blanco de MEOX2.

La expresión de los TFs ha sido estudiado como un fenómeno inducible mediado por mecanismos de regulación epigenética. Actualmente se han descrito más de 20 mecanismos de regulación epigenética como Metilación del DNA, complejos de remodelación de la cromatina dependientes de ATP, silenciamiento por ncRNAs, complejos protéicos como Polycomb y Trithorax; y modificaciones de las histonas[173].

Muchos de los cambios en expresión génica en el desarrollo de enfermedades son temporal y espacialmente controlados por las modificaciones de histonas en la cromatina [174]. Por ello, se buscó conocer las marcas de histonas asociadas al promotor de ZEB1 en la línea celular A549 empleando los datos del proyecto ENCODE. La técnica empleada para el análisis de las interacciones proteína DNA es Chip-seq. Ésta técnica combina la inmunoprecipitación de cromatina con la secuenciación masiva en paralelo para la identificación de millones de fragmentos de DNA asociadas a proteínas [175].

Algunas modificaciones de histonas tienen un papel importante en la regulación epigenética en respuesta al ambiente como H3K4me3, H3k27me3[176]. Por lo que, fueron seleccionadas modificaciones de la histona H3 asociadas a la activación de la transcripción: H3K4me3 y H3K27ac [177,178] y asociadas a la represión transcripcional: H3k9me3 y H3K27me3 [158,179], también se seleccionaron datos para el dominio remodelador de la cromatina CTCF. Los resultados obtenidos del análisis en el visualizador (IGV) sugieren que el promotor de ZEB1 está activo transcripcionalmente y esta activación es mediada por marcas de histonas.

Es importante destacar que los picos de enriquecimiento de la señal de RNA POLII en la línea A549 concuerdan con los picos de fluorescencia de interacción de las sondas de MEOX2 sobre la misma región promotora de ZEB1 (4000pb) fortaleciendo la hipótesis de que el factor de transcripción MEOX2 regula la expresión de ZEB1 y ésta es mediada por marcas de histonas.

En un estudio realizado en 2019, se evaluaron algunas marcas de histonas entre ellas H3K4me3, H3k27ac incluida la proteína de unión a la cromatina Brd4 en la línea HEK293T. Ellos identificaron sitios de enriquecimiento de las marcas epigenéticas seleccionadas y observaron enriquecimiento de H3k27ac en los TSS de genes extraídos del genoma gh19. Fue un análisis de meta-genes para validar la confiabilidad del análisis de marcas epigenéticas empleando IGV [180]. Esta herramienta también fue empleada para analizar el perfil epigenético con marcas como H3k27ac, H3K4me3, H3k27me3. Corroboraron de manera general que H3K4me3 es una marca de iniciación de la transcripción y está enriquecida en los promotores de sus genes blanco [181]. En el presente estudio, se identificó el enriquecimiento en H3K4me3 en una región cercana al TSS de ZEB1 con una extensión de 800b. Xiao y colaboradores, también identificaron que la presencia de H3K27ac se correlaciona con la presencia de enhancers activos/pasivos con base en el enriquecimiento de H3K27ac [181]. Ésta marca puede distinguir entre ambos elementos enhancer ya que las regiones modificadas por H3k27ac se correlacionan con expresión del gen proximal y cuando los enhancer carecen de enriquecimiento con H3K27ac muestran niveles más bajos comparados con el gen proximal [182].

En el análisis con IGV se identificó la presencia de enriquecimiento en H3K27ac tanto en la parte más alejada del TSS (-3200b) de ZEB1 como a +800b relativas al TSS lo que podría indicar la presencia de enhancers por H3K27ac.

Cuando un nucleosoma está marcado tanto como por H3K27me3 como por H3K4me3 se ha determinado como dominio bivalente y se ha sugerido que el estrés promueve la presencia de estos dominios en el genoma [176]. En el análisis realizado en este estudio, de manera general muestra enriquecimiento de ambas marcas a una longitud de alrededor de 1000b, sitio que se localiza cercano al TSS de ZEB1 indicando que podría existir un dominio bivalente sobre dicho promotor.

La T790M presente en H1975 se ha reportado en el 50% de los tumores con resistencia adquirida al tratamiento con TKIs [183], y no sólo eso, sino también se ha corelacionado con la expresión de marcadores de EMT [150] como VIMENTINA en H1975. Tsatsral Ideorzorig y colaboradores en 2016 por ejemplo, reportaron que PRMT-1 -presente de manera constitutiva específicamente en la línea H1975- está involucrado en el fenotipo mesenquimal de esa línea debido a que metila algunos de los represores de E-cadherina como Twist, Snail, Slug y ZEB1 [184]. Lo que concuerda con los resultados de este estudio donde se observan niveles de expresión de ZEB1 que relacionan con los niveles de expresión de VIMENTINA en H1975.

Es importante notar que, aunque en las otras líneas no hay diferencia en la expresión de MEOX2, se observa mayor expresión de ZEB1 y VIMENTINA en contraste con una disminución de la expresión de E-cadherina en NH2347.

Cabe destacar que esta es la primera vez que se reportan niveles basales de mRNA de ZEB1 en las líneas HCC827, H1975 y NH2347. En las líneas HCC827 y H1975 se ha reportado que la resistencia a gefitinib, por ejemplo está asociada con la EMT ya que a una exposición prolongada las células adquieren expresión de genes como ZEB1 y al mismo tiempo de VIMENTINA [185]. Con base en nuestros resultados donde observamos menor expresión de ZEB1 menor de VIMENTINA y mayor de E-

cadherina podemos inferir la sensibilidad de HCC827 a inhibidores de tirosina cinasa.

Menor expresión mRNA de ZEB1 en células con aumento en la expresión de MEOX2, también correlaciona con un aumento en la detección de mensajero de E-cadherina y una disminución en VIMENTINA esto es congruente con la literatura que indica que ZEB1 inhibe la expresión de E-cadherina uniéndose a la caja E localizada en su promotor y libera la expresión de VIMENTINA [186,187]. Esta regulación podría ser regulada epigenéticamente como lo mencionan Agdassi y colaboradores en 2011 que identificaron la acetilación de las hisonas H3 y H4 en el promotor activo de E-cadherina la acetilación de las histonas H3 y H4, mientras que se localizó HDAC1, HDAC2 y ZEB1 unidas al promotor inactivo de E-cadherina [188].

Se ha reportado que MEOX2 regula la expresión de moléculas como NF-KB[189], p21 y p16 [190]. También se ha reportado como un mediador de vías de señalización como Sonic Hedgehog por su interacción con miembros de la vía como Gli2. En un artículo de 2004 se reportó por primera vez la probable regulación en loop de Gli1 y MEOX2 en el desarrollo de tejido esquelético-muscular, ellos observaron una correlación positiva en la expresión de ambos y lo validaron con ensayos de transfección por vectores en la línea P19 [191]. La evidencia que obtuvimos tras el silenciamiento, la disminución de MEOX2 y al mismo tiempo de ZEB1 nos permite hacer la inferencia de una posible regulación en feedback de ambos factores de transcripción tanto en A549 como en NH2347, regulación que podría estar implicada en la expresión de marcadores como VIMENTINA y E-cadherina. La hipótesis de una regulación en feedback puede ser explicada desde el dogma central de la biología: a nivel de mRNA, en A549 se reportó la disminución de los genes blanco del siRNA pero a nivel de proteína no se identificó la disminución de la expresión de proteína sino, por el contrario, podría arriesgarme a decir que se observa un restablecimiento en la cantidad de proteína de MEOX2 específicamente y niveles significativamente más altos de ZEB1 en las condiciones de silenciamiento de ambos blancos. En el caso de NH2347 sí se observa el efecto

del silenciamiento de los blancos del siRNA y se cuantificaron niveles más bajos de la proteína MEOX2 con el silenciamiento de ZEB1 y viceversa, lo que podría respaldar las evidencias identificadas por mRNA y la hipótesis de una regulación en feedback.

En las líneas con mutaciones en EGFR observamos el fenómeno pero en sentido contrario. Me refiero a que, en la condición de silenciamiento de MEOX2 tanto en H1975 como en HCC827 se observa un incremento en la detección del transcrito del blanco versus el control scrambled y no sólo eso, sino que también se detectó un incremento en la detección del transcrito de ZEB1 en la condición de silenciamiento de MEOX. Entonces, a mayor detección de MEOX2 mayor detección de ZEB1 y esto también se observa en el incremento del transcrito de VIMENTINA. En 2008, Gredell y colaboradores reportaron que la proporción de siRNAs que son exitosos reprimiendo los blancos son pocos debido a la estabilidad relativa de los duplex de siRNA con la cadena débilmente hibridada 5'-final, de la misma manera identificaron que algunos siRNAs se unen a las secuencias blanco resultando en efectos no positivos debido a que la estructura del blanco tiene un efecto directo en la eficiencia del siRNA[192]. Nosotros pudimos observar justamente un fenómeno inverso al silenciamiento por siRNAs en H1975 y HCC827 que podría ser justificado con lo reportado por Gredell y colaboradores. Independientemente del silenciamiento no exitoso observamos un efecto que concuerda con lo reportado para las líneas wild type en EGFR tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteínas. Se refuerza la evidencia de una probable regulación positiva MEOX2-ZEB1 en cáncer pulmonar de células no pequeñas con impacto en marcadores como VIMENTINA y E-cadherina únicamente a nivel de mRNA. Los análisis de proteínas de los marcadores de mesenquimalidad no fueron detectados con éxito en ninguna de las 3 réplicas por la cantidad de muestra obtenida y la calidad de la misma que no fue posible desnudar completamente la membrana sin deteriorar el epítipo protéico.

Para la parte del análisis funcional del silenciamiento de ZEB1 y MEOX2 sobre la capacidad de migración de las células se realizaron ensayos en cámaras transwell.

Éste es un ensayo desarrollado en 1961 por el Dr Stephen Boyden. Los resultados se obtuvieron por medio de un plugin [193] del programa ImageJ que funciona mediante algoritmos y permite cuantificar únicamente un tamaño específico (píxeles) con una tonalidad de color específica (al convertir las imágenes a binario) por lo cual resulta sumamente confiable, cabe destacar que se cuantifican únicamente las células que lograron atravesar la membrana.

En las 4 líneas celulares se observa una disminución en la capacidad migratoria de las células con el silenciamiento de los blancos MEOX2 y ZEB1 respecto al control. Sin embargo, hay diferencias entre ellas. A549 y NH2347 por ejemplo en las condiciones control se encontró mayor número de células que en H1975 y HCC827, esto podría deberse a que A549 y NH2347 tienen una morfología de crecimiento tipo monocapa y buscan, por así decirlo el estímulo célula a célula para seguir formando la monocapa, a diferencia de lo que se observa en condiciones basales en H1975 y HCC827, los ensayos de migración con H1975 no muestran diferencias de los tratamientos vs los controles. Pero sí se observa la capacidad migratoria de las mismas [194] lo mismo fue reportado para las células HCC827 [195,196].

Independientemente de la capacidad migratoria dependiente del tipo celular, Gohn y colaboradores en 2017 reportaron que cuando se sobreexpone MEOX2 se incrementa también la capacidad migratoria de células endoteliales [197], igual que en células endoteliales vasculares [61] incluso en células derivadas del palatino mesenquimal de ratón [198]. En cáncer también se ha relacionado la sobreexpresión de MEOX2 en la actividad migratoria de las células, en hepatocarcinoma [199], cáncer de mama [200]. Por el contrario, al silenciar MEOX2 se ha visto que se inhibe la proliferación y migración; y se promueve la apoptosis en cáncer de próstata [201] también en cáncer pulmonar se observa disminución en la capacidad migratoria tras el silenciamiento de MEOX2[160]. Respecto a ZEB1 se ha reportado su impacto en la capacidad migratoria por su función como dedos de zinc [145,146,158,186,202]. Tal como lo reportamos en el presente estudio, con el silenciamiento de MEOX2 y ZEB1 disminuye la capacidad migratoria de líneas celulares de NSCLC.

En HCC827 y en H1975 no observamos capacidad de formación de colonias a diferencia de A549 y NH2347. Eso concuerda con lo reportado en este estudio, a nivel de mRNA observamos incremento en la expresión de ZEB1 en las líneas HCC827 y H1975, de hecho Zhang y colaboradores en 2016 determinaron que debido a la mutación en EGFR presente en HCC827 y la presente en H1975 la sobreexpresión de ZEB1 inhibe el crecimiento tumoral contrario de lo que sucede en líneas con mutación en KRAS que promueve el crecimiento tumoral. Aunque esta misma sobre expresión promueve la EMT en ambos casos [203].

Cisplatino es una de las quimioterapias más utilizadas para el tratamiento del cáncer pulmonar por lo que se realizaron ensayos farmacológicos con dosis logarítmicas. Se analizaron los silenciamientos antes mencionados de los genes blanco para 3 de las 4 líneas celulares y estas fueron: A549, H1975 y HCC827.

La decisión de tomar únicamente una de las líneas EGFR wild type, específicamente A549 es la mutación en KRAS que presenta que se ha reportado que está relacionada con la resistencia a fármacos de primera línea derivados del platino, la línea H1975 que como mencioné, tiene una mutación doble en EGFR y HCC827.

En general, la expresión de ZEB1 se ha relacionado con la resistencia a cisplatino. Por ejemplo, en cáncer de ovario se determinó que ZEB1 regula la expresión de SLC3A2 y promueven la quimioresistencia [147]. Yan y colaboradores en 2014 investigaron el papel de E2F1 en la quimioresistencia en cáncer gástrico. Determinaron que al inducir la expresión de E2F1 en células resistentes a cisplatino la expresión de MEOX2 disminuye mientras que la de ZEB1 aumenta. En los controles negativos observaron una menor expresión de ZEB1 y mayor en MEOX2 [204]. Por otro lado, Wang y colaboradores publicaron que el Knock down de ZEB1 las células de cáncer colorectal mostraban mayor susceptibilidad al daño al DNA inducido por cisplatino [205]. Estas evidencias soportan los hallazgos presentados en este trabajo. El silenciamiento de ZEB1 y MEOX2 sensibiliza líneas celulares de NSCLC al tratamiento con cisplatino.

Por otro lado, se ha reportado que EGFR nuclear está involucrado en los procesos de reparación del DNA. La proteína de unión de la cromatina PCNA es fosforilada por EGFR en Tyr 211, fosforilación que es fundamental para el mantenimiento de la función de PCNA en la cromatina y en los múltiples mecanismos de reparación del DNA [206,207] lo que podría explicar el por qué en la condición de silenciamiento control la IC50 es de alrededor de 30 μM en H1975 y en HCC827 que es la más alta para los controles sea de 49.97 μM . Sin embargo, la respuesta celular mejora en condiciones de silenciamiento de ZEB1 y MEOX2.

11.- CONCLUSIONES

1. Se identificó que MEOX2 está posicionado a lo largo de 4,000pb sobre la región promotora con características de bivalencia epigenética en ZEB1 de datos derivados de pacientes mexicanos.
2. Se determinó que A549 y NH2347 tienen mayores niveles de proteína y mRNA tanto de MEOX2 como ZEB1, sin embargo, la única que concuerda con la literatura es HCC827.
3. Se validó el silenciamiento de MEOX2 y ZEB1 en A549 y NH2347 a nivel de mensajero, mientras que no se observa este efecto en las líneas H1975 y HCC827.
4. La sensibilidad al fármaco de las líneas A549, H1975 y HCC827 disminuye la IC50 en condiciones de silenciamiento, mientras que el efecto del silenciamiento en la migración y formación de colonias solo se observa significativo en A549.

12.- PERSPECTIVAS

1. Determinar la expresión de mRNA y proteínas de MEOX2 y ZEB1 en muestras de pacientes de cáncer pulmonar de células no pequeñas.
2. Realizar ensayos de sobreexpresión de MEOX2 y ZEB1 para confirmar el efecto de MEOX2 sobre ZEB1 en HCC827.
3. Así como ensayos de reportero para determinar el papel transcripcional de MEOX2 en el promotor de ZEB1 y viceversa.
4. También se propone el empleo de modelo de metástasis *in vivo* e *in vitro* para conocer el papel de la EMT y la respuesta al tratamiento con y sin la expresión de MEOX2 y ZEB1.

13.-Anexo

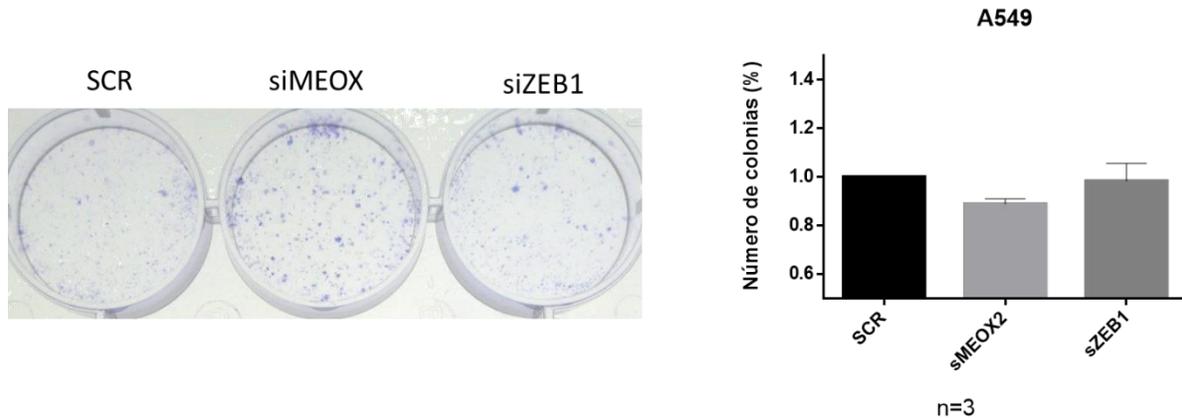


Figura Anexa 1 .- Ensayos de capacidad de formación de colonias en A549 con silenciamiento de MEOX2, ZEB1 y SCR. Se realizaron 3 réplicas experimentales pero se muestra únicamente una imagen representativa del fenómeno, así como el análisis cuantitativo de dicha imagen por ImageJ con el pluggin “Colony Area”

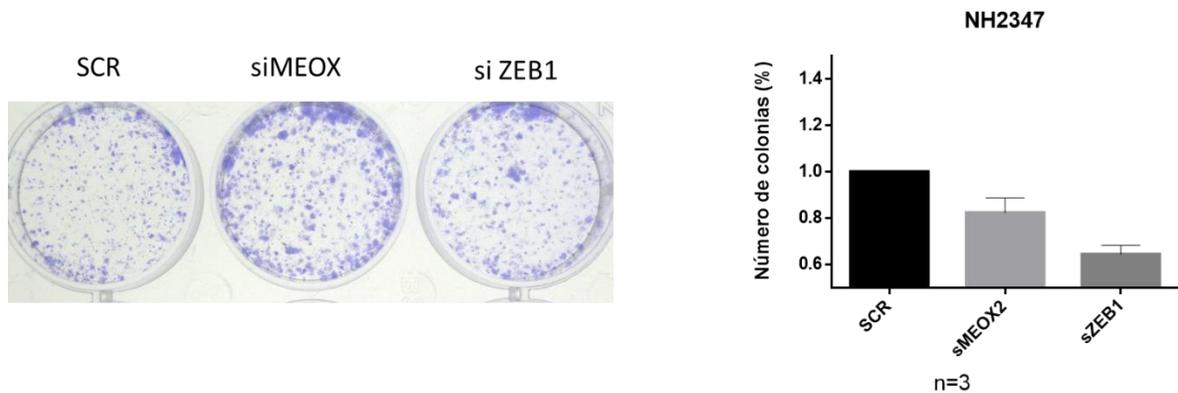


Figura Anexa 2. -Ensayos de capacidad de formación de colonias en NH2347 con silenciamiento de MEOX2, ZEB1 y SCR. Se realizaron 3 réplicas experimentales pero se muestra únicamente una imagen representativa del fenómeno, así como el análisis cuantitativo por Image J de dicha imagen con el pluggin “Colony Area”

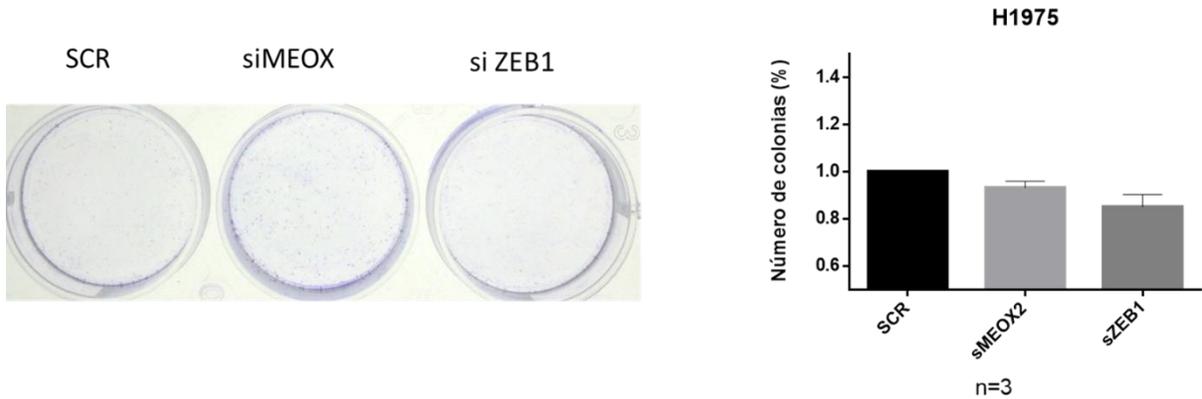


Figura Anexa 3. -Ensayos de capacidad de formación de colonias en H1975 con silenciamiento de MEOX2, ZEB1 y SCR. Se realizaron 3 réplicas experimentales, pero se muestra únicamente una imagen representativa del fenómeno, así como el análisis cuantitativo de dicha imagen por ImageJ con el pluggin “Colony Area”

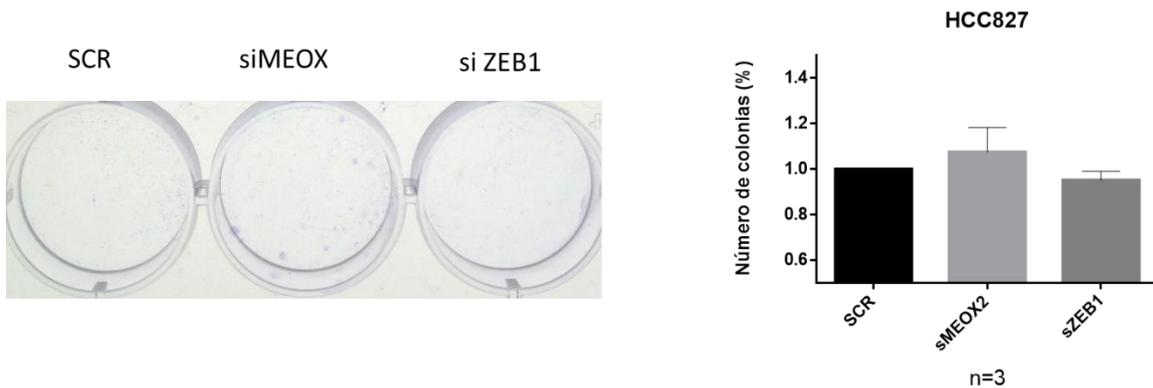


Figura Anexa 4.-Ensayos de capacidad de formación de colonias en H1975 con silenciamiento de MEOX2, ZEB1 y SCR. Se realizaron 3 réplicas experimentales pero se muestra únicamente una imagen representativa del fenómeno, así como el análisis cuantitativo de dicha imagen por Image J con el pluggin “Colony Area”.

13.- BIBLIOGRAFÍA

1 Edwin Smith (1862). Edwin Smith's Surgical papyrus. [Recuperado de: <https://ceb.nlm.nih.gov/proj/flash/smith/smith.html> [Acceso 29-Sep-2019]

2 Weiss, L. (2000) Early Concepts of Cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 19, 205–217

3 Siddhartha Mukherjee (2010) THE EMPEROR OF ALL MALADIES: A BIOGRAPHY OF CANCER, (1st edn) , 1 vols.Scribner.

4 Rosner, F. (1998) The Medical Legacy of Moses Maimonides, KTAV Publishing House, Inc.

5 Ramazzini, B. (2001) De Morbis Artificum Diatriba [Diseases of Workers]. *Am. J. Public Health* 91, 1380–1382

6 Franco, G. and Franco, F. (2001) Bernardino Ramazzini: The Father of Occupational Medicine. *Am. J. Public Health* 91, 1382

7 Baillie, M. (1793) The morbid anatomy of some of the most important parts of the human body, London : Printed for J. Johnson and G. Nicol

8 Androutsos, G. et al. (2011) Joseph-Claude-Anthelme Récamier (1774-1852): Forerunner in surgical oncology, 16

9 Biología. Curtis H., Barnes S., Schnek A. y Massarini A. (2008) 7ª Edición. Editorial Médica Panamericana. 1883-1839

10 Haggard, H.W. and Smith, G.M. (1938) Johannes Müller and The Modern Conception of Cancer. *Yale J. Biol. Med.* 10, 419.b1-436

- 11 Hajdu, S.I. (2004) The First Tumor Pathologist. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 34, 355–356
- 12 Stanton, L. W., Schwab, M., & Bishop, J. M. (1986). Nucleotide sequence of the human N-myc gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(6), 1772–1776. doi:10.1073/pnas.83.6.1772
- 13 Wynder, E.L. and Graham, E.A. (2005) Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma. *Bull. World Health Organ.* 83, 146–153
- 14 Doll, R. and Hill, A.B. (1956) Lung Cancer and Other Causes of Death in Relation to Smoking. *Br. Med. J.* 2, 1071–1081
- 15 Watson, J.D. and Crick, F.H. (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737–738
- 16 Varmus, H. (2006) The New Era in Cancer Research. *Science* 312, 1162–1165
- 17 WHO | Cancer. WHO. [Online]. Available: <http://www.who.int/topics/cancer/en/>. [Accessed: 27-Jul-2019]
- 18 National Cancer Institute (NCI). , National Institutes of Health (NIH) (2019). [Online]. Available: <https://www.nih.gov/about-nih/what-we-do/nih-almanac/national-cancer-institute-nci>. [Accessed: 27-Jul-2019].
- 19 Learn About Cancer | Cancer Resources | American Cancer Society. . [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer.html>. [Accessed: 27-Jul-2019]
- 20 PubMed definition of: Cancer - National Library of Medicine, PubMed Health. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0015630/>. [Accessed: 27-Dec-2018]

- 21 He, L. et al. (2012) Histology image analysis for carcinoma detection and grading. *Comput. Methods Programs Biomed.* 107, 538–556
- 22 Nair, M. et al. (2018) Cancer molecular markers: A guide to cancer detection and management. *Semin. Cancer Biol.* 52, 39–55
- 23 Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70
- 24 Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674
- 25 Moran, K.D. et al. (2019) Cell-cycle control of cell polarity in yeast. *J. Cell Biol.* 218, 171–189
- 26 Lemmon, M.A. and Schlessinger, J. (2010) Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117–1134
- 27 Lipsick, J. (2019) A History of Cancer Research: Tyrosine Kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 11, a035592
- 28 Li, E. and Hristova, K. (2006) Role of Receptor Tyrosine Kinase Transmembrane Domains in cell signaling and human pathologies. *Biochemistry* 45, 6241–6251
- 29 Fantl, W.J. et al. (1993) Signalling by Receptor Tyrosine Kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 453–481

- 30 Mao, W. et al. (2019) The role of vascular endothelial growth factor, interleukin 8, and insulinlike growth factor in sustaining autophagic DIRAS3-induced dormant ovarian cancer xenografts. *Cancer* 125, 1267–1280
- 31 Batlle, E. and Massagué, J. (2019) Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* 50, 924–940
- 32 Bradbury, K.E. et al. (2019) Circulating insulin-like growth factor I in relation to melanoma risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Int. J. Cancer* 144, 957–966
- 33 Murakami, A. et al. (2019) Cullin-3/KCTD10 E3 complex is essential for Rac1 activation through RhoB degradation in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer cells. *Cancer Sci.* 110, 650–661
- 34 Ma, D. et al. (2003) Distinct Mechanisms for Regulating the Tumor Suppressor and Antiapoptotic Functions of Rb. *J. Biol. Chem.* 278, 19358–19366
- 35 Rubin, S.M. and Sage, J. (2019) Manipulating the tumour-suppressor protein Rb in lung cancer reveals possible drug targets. *Nature* 569, 343–344
- 36 Walter, D.M. et al. (2019) RB constrains lineage fidelity and multiple stages of tumour progression and metastasis. *Nature* 569, 423–427
- 37 Sheng, Z. and Du, W. (2019) NatB modulates Rb mutant cell death and tumor growth by regulating EGFR/MAPK signaling through the N-end rule pathways. *bioRxiv* DOI: 10.1101/590349
- 38 Dahiya, A. et al. (2001) Linking the Rb and polycomb pathways. *Mol. Cell* 8, 557–569

- 39 Chen, J. (2016) The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6
- 40 Aubrey, B.J. et al. (2018) How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* 25, 104–113
- 41 Fischer, M. et al. (2016) Integration of TP53, DREAM, MMB-FOXM1 and RB-E2F target gene analyses identifies cell cycle gene regulatory networks. *Nucleic Acids Res.* 44, 6070–6086
- 42 Kitamura, H. et al. (2009) Small cell lung cancer: significance of RB alterations and TTF-1 expression in its carcinogenesis, phenotype, and biology. *Endocr. Pathol.* 20, 101–107
- 43 Fan, T.-J. et al. (2005) Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 37, 719–727
- 44 Lowe, S.W. and Lin, A.W. (2000) Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21, 485–495
- 45 Ziegler, A. et al. (1994) Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372, 773–776
- 46 Kauffmann-Zeh, A. et al. (1997) Suppression of c-Myc-induced apoptosis by RAS signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* 385, 544–548
- 47 Igney, F.H. and Krammer, P.H. (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 2, 277–288

- 48 Romashkova, J.A. and Makarov, S.S. (1999) NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401, 86–90
- 49 Lee, D.-H. et al. (2009) Magnolol induces apoptosis via inhibiting the EGFR/PI3K/Akt signaling pathway in human prostate cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 106, 1113–1122
- 50 Liu, M. et al. (2019) Nimotuzuma restrains proliferation and induces apoptosis in human osteosarcoma cells by regulation of EGFR/PI3K/AKT signal pathway. *J. Cell. Physiol.* 234, 20879–20887
- 51 Buddhini Samarasinghe (09-10-2013) The Hallmarks of Cancer: 4 – Limitless Replicative Potential. , Scientific American Blog Network. Available: <https://blogs.scientificamerican.com/guest-blog/the-hallmarks-of-cancer-4-limitless-replicative-potential/>. [Accessed: 13-Aug-2019]
- 52 Jiang, H. et al. (2007) Telomere shortening and ageing. *Z. Für Gerontol. Geriatr.* 40, 314–324
- 53 Gancarcíková M, Zemanová Z, Brezinová J, Berková A, Vcelíková S, Smigová J, Michalová (2010). The role of telomeres and telomerase complex in haematological neoplasia: the length of telomeres as a marker of carcinogenesis and prognosis of disease. *Prague Med Rep*;111(2):91-105.
- 54 Yaswen, P. et al. (2015) Therapeutic targeting of replicative immortality. *Semin. Cancer Biol.* 35, S104
- 55 Hiyama, K. et al. (1995) Telomerase Activity in Small-Cell and Non–Small-Cell Lung Cancers. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 87, 895–902

- 56 Nathaniel J. Robinson, Derek J. Taylor, William P. Schiemann. (2019) Stem cells, immortality, and the evolution of metastatic properties in breast cancer: telomere maintenance mechanisms and metastatic evolution. *J Cancer Metastasis Treat* 2019;5:39.10.20517/2394-4722.2019.15
- 57 Zygmunt, M. et al. (2003) Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 110, S10–S18
- 58 Miles, K.A. (1999) Tumour angiogenesis and its relation to contrast enhancement on computed tomography: a review. *Eur. J. Radiol.* 30, 198–205
- 59 Isner, J.M. and Asahara, T. (1999) Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J. Clin. Invest.* 103, 1231–1236
- 60 Sullivan, D.C. and Bicknell, R. (2003) New molecular pathways in angiogenesis. *Br. J. Cancer* 89, 228–231
- 61 Chen, Y. et al. (2010) Regulation of the Expression and Activity of the Antiangiogenic Homeobox Gene GAX/MEOX2 by ZEB2 and MicroRNA-221. *Mol. Cell. Biol.* 30, 3902–3913
- 62 Loizzi, V. et al. (2017) Biological Pathways Involved in Tumor Angiogenesis and Bevacizumab Based Anti-Angiogenic Therapy with Special References to Ovarian Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 18,
- 63 Hanahan, D. and Folkman, J. (1996) Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 86, 353–364

- 64 Carè, A. et al. (2001) HOXB7: A Key Factor for Tumor-associated Angiogenic Switch. *Cancer Res.* 61, 6532–6539
- 65 Larsen, A.K. et al. (2011) Targeting EGFR and VEGF(R) pathway cross-talk in tumor survival and angiogenesis. *Pharmacol. Ther.* 131, 80–90
- 66 Werb, Z. (1997) ECM and Cell Surface Proteolysis: Regulating Cellular Ecology. *Cell* 91, 439–442
- 67 Coussens, L.M. and Werb, Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867
- 68 Mantovani, A. et al. (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436–444
- 69 Parsonnet, J. et al. (1991) Helicobacter pylori Infection and the Risk of Gastric Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 325, 1127–1131
- 70 Dostert, C. et al. (2008) Innate Immune Activation Through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. *Science* 320, 674–677
- 71 (2010) Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 140, 883–899
- 72 Lin, W.-W. and Karin, M. (2007) A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.* 117, 1175–1183
- 73 Mocellin, S. et al. (2005) Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J. Leukoc. Biol.* 78, 1043–1051
- 74 Jeffrey K.Actor (2012) Immunomodulation | ScienceDirect Topics. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07447-6.00008-9> [Accessed: 18-Aug-2019]

- 75 Welch, D.R. and Hurst, D.R. (2019) Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Res.* 79, 3011–3027
- 76 Talmadge, J.E. and Fidler, I.J. (2010) AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Res.* 70, 5649–5669
- 77 Robert, J. (2013) Biologie de la métastase. *Bull. Cancer (Paris)* 100, 333–342
- 78 Franz, C.M. et al. (2002) Cell Migration in Development and Disease. *Dev. Cell* 2, 153–158
- 79 Friedl, P. and Wolf, K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 3, 362–374
- 80 Gonzalez, D.M. and Medici, D. (2014) Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Signal.* 7, re8
- 81 Zheng, J. (2012) Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncol. Lett.* 4, 1151–1157
- 82 Majmundar AJ., Wong WJ., Simon MC. (2010) Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. *Mol. Cell* 40, 294–309
- 83 Denko, N.C. (2008) Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat. Rev. Cancer* 8, 705–713
- 84 IARC Glossary of terms. (2010). [Online]. Available: <http://www-dep.iarc.fr/WHOdb/glossary.htm>. [Accessed: 28-Jul-2019]
- 85 Cancer today. IARC. (GLOBOCAN 2018) [Online]. Available: <http://gco.iarc.fr/today/home>. [Accessed: 10-Jan-2018]

86 Cancer Research UK 14-May-2015 , Worldwide cancer incidence statistics. [Online]. Available: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/incidence>. [Accessed: 29-September-2019]

87 Ferlay, J. et al. (2019) Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* 144, 1941–1953

88 Pelosof, L. et al. (2017) Proportion of Never-Smoker Non–Small Cell Lung Cancer Patients at Three Diverse Institutions. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 109,

89 Siegel, R.L. et al. (2017) Cancer statistics, 2017. *CA. Cancer J. Clin.* 67, 7–30

90 Sun, S. et al. (2007) Lung cancer in never smokers — a different disease. *Nat. Rev. Cancer* 7, 778–790

91 Molina, J.R. et al. (2008) Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clin. Proc. Mayo Clin.* 83, 584–594

92 Rodriguez-Canales, J. et al. (2016) Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. In *Lung Cancer* pp. 25–46, Springer, Cham

93 Kalluri, R. and Neilson, E.G. (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* 112, 1776–1784

94 Ehnman, M. et al. (2019) The Tumor Microenvironment of Pediatric Sarcoma: Mesenchymal Mechanisms Regulating Cell Migration and Metastasis. *Curr. Oncol. Rep.* 21, 90

- 95 Gemmill, R.M. et al. (2011) ZEB1-Responsive Genes in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Lett.* 300, 66–78
- 96 Du, B. and Shim, J.S. (2016) Targeting Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Molecules* 21
- 97 Kalluri, R. and Weinberg, R.A. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420–1428
- 98 O’Leary, K. and Schmid*, A.S. and P. 31-Dec-(2017) , Epigenetic Regulation of EMT in Non-Small Cell Lung Cancer. , *Current Cancer Drug Targets*. [Online]. Available: <http://www.eurekaselect.com/149765/article>. [Accessed: 18-Aug-2019]
- 99 Smith, B.N. and Bhowmick, N.A. (2016) Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance. *J. Clin. Med.* 5
- 100 Aigner, K. et al. (2007) The transcription factor ZEB1 (δ EF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* 26, 6979–6988
- 101 Liu, Y. et al. (2014) Different thresholds of ZEB1 are required for Ras-mediated tumour initiation and metastasis. *Nat. Commun.* 5, 5660
- 102 Meidhof, S. et al. (2015) ZEB1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat. *EMBO Mol. Med.* 7, 831–847
- 103 Liu, F.-S. (2009) Mechanisms of Chemotherapeutic Drug Resistance in Cancer Therapy—A Quick Review. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 48, 239–244

- 104 Karlsson, M.C. et al. (2017) Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis through the lymphatic system. *Mol. Oncol.* 11, 781–791
- 105 Beverley, S.M. et al. (1984) Unstable DNA amplifications in methotrexate resistant *Leishmania* consist of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization. *Cell* 38, 431–439
- 106 Chen, G.X. et al. (1987) Kinetic and molecular properties of the dihydrofolate reductase from pyrimethamine-sensitive and pyrimethamine-resistant clones of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Pharmacol.* 31, 430–437
- 107 Ellenberger, T.E. and Beverley, S.M. (1989) Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* 264, 15094–15103
- 108 Otsuki, Y. et al. (2018) Prospects for new lung cancer treatments that target EMT signaling. *Dev. Dyn.* 247, 462–472
- 109 Gallant, J.-N. et al. (2015) EGFR Kinase Domain Duplication (EGFR-KDD) Is a Novel Oncogenic Driver in Lung Cancer That Is Clinically Responsive to Afatinib. *Cancer Discov.* 5, 1155–1163
- 110 Yang, B. et al. (2017) Circulating Tumor Cells Predict Prognosis Following Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment in EGFR-mutant Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *Oncol. Res.* DOI: 10.3727/096504017X14928634401178
- 111 Taus, Á. et al. (2011) Mutaciones de sensibilidad y resistencia del gen epidermal growth factor receptor (EGFR) en el cáncer de pulmón de célula no pequeña: una realidad clínica. *Arch. Bronconeumol.* 47, 103–105

- 112 Weng, C.-H. et al. (2019) Epithelial-mesenchymal transition (EMT) beyond EGFR mutations per se is a common mechanism for acquired resistance to EGFR TKI. *Oncogene* 38, 455–468
- 113 Bartholomew, C. et al. (2017) EGFR targeted therapy in lung cancer; an evolving story. *Respir. Med. Case Rep.* 20, 137–140
- 114 Roche, J. et al. (2013) Global Decrease of Histone H3K27 Acetylation in ZEB1-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells. *Cancers* 5, 334–356
- 115 Yan, L.-H. et al. (2014) Overexpression of E2F1 in human gastric carcinoma is involved in anti-cancer drug resistance. *BMC Cancer* 14, 904
- 116 Ávila-Moreno, F. et al. (2014) Overexpression of MEOX2 and TWIST1 Is Associated with H3K27me3 Levels and Determines Lung Cancer Chemoresistance and Prognosis. *PLOS ONE* 9, e114104
- 117 Armas-López, L. et al. (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* 8, 67056–67081
- 118 Yoshida, T. et al. (2016) ZEB1 Mediates Acquired Resistance to the Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE* 11, e0147344
- 119 Luscombe, N.M. et al. (2001) What is bioinformatics? An introduction and overview. *Yearb. Med. Inform.* 10, 83–100

- 120 Villavicencio, E.H. et al. (2000) The Sonic Hedgehog–Patched–Gli Pathway in Human Development and Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1047–1054
- 121 Chen, K. and Rajewsky, N. (2007) The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat. Rev. Genet.* 8, 93–103
- 122 Svingen, T. and Tonissen, K.F. (2006) Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Heredity* 97, 88–96
- 123 Wu, Z. et al. (2005) Role of the MEOX2 homeobox gene in neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat. Med.* 11, 959–965
- 124 Zhang, P. et al. (2015) ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle Georget. Tex* 14, 481–487
- 125 Liu, Y. et al. (2008) ZEB1 Links Epithelial-Mesenchymal Transition and Cellular Senescence. *Dev. Camb. Engl.* 135, 579–588
- 126 Sousa, B. et al. (2019) The Crosstalk Between Cell Adhesion and Cancer Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 20
- 127 Stormo, G.D. (2015) DNA Motif Databases and Their Uses. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 51, 2.15.1-2.15.6
- 128 Han, F. et al. (2015) SOX30, a novel epigenetic silenced tumor suppressor, promotes tumor cell apoptosis by transcriptional activating p53 in lung cancer. *Oncogene* 34, 4391–4402
- 129 Ayala-Ortega, E. et al. (2016) Epigenetic silencing of miR-181c by DNA methylation in glioblastoma cell lines. *BMC Cancer* 16, 226

- 130 Ringrose, L. and Paro, R. (2004) Epigenetic Regulation of Cellular Memory by the Polycomb and Trithorax Group Proteins. *Annu. Rev. Genet.* 38, 413–443
- 131 Lawrence, M. et al. (2016) Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends Genet.* 32, 42–56
- 132 Mundade, R. et al. (2014) Role of ChIP-seq in the discovery of transcription factor binding sites, differential gene regulation mechanism, epigenetic marks and beyond. *Cell Cycle* 13, 2847–2852
- 133 Zeng, Z. et al. (2019) Cold stress induces enhanced chromatin accessibility and bivalent histone modifications H3K4me3 and H3K27me3 of active genes in potato. *Genome Biol.* 20, 123
- 134 Zhang, K. et al. (2002) Identification of Acetylation and Methylation Sites of Histone H3 from Chicken Erythrocytes by High-Accuracy Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time-of-Flight, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Postsource Decay, and Nanoelectrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* 306, 259–269
- 135 Schübeler, D. et al. (2004) The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* 18, 1263–1271
- 136 Rea, S. et al. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593–599
- 137 Carter, B. et al. (2019) Mapping histone modifications in low cell number and single cells using antibody-guided chromatin tagmentation (ACT-seq). *Nat. Commun.* 10,

- 138 Zhang, X.-L. et al. (2016) Integrative epigenomic analysis reveals unique epigenetic signatures involved in unipotency of mouse female germline stem cells. *Genome Biol.* 17, 162
- 139 Creighton, M.P. et al. (2010) Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21931–21936
- 140 Suda, K. et al. (2010) Reciprocal and Complementary Role of MET Amplification and EGFR T790M Mutation in Acquired Resistance to Kinase Inhibitors in Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* 16, 5489–5498
- 141 Iderzorig, T. et al. (2016) PS01.28: Epithelial Mesenchymal Transition in TKI Resistant NSCLC with T790M Mutation: Topic: Medical Oncology. *J. Thorac. Oncol.* 11, S286
- 142 Hu, Y. et al. 28-Apr-(2017) , Epithelial-to-mesenchymal transition correlates with gefitinib resistance in NSCLC cells and the liver X receptor ligand GW3965 reverses gefitinib resistance through inhibition of vimentin. , *OncoTargets and Therapy*. [Online]. Available: <https://www.dovepress.com/epithelial-to-mesenchymal-transition-correlates-with-gefitinib-resista-peer-reviewed-fulltext-article-OTT>. [Accessed: 25-Aug-2019]
- 143 Schulte, J. et al. (2012) Expression of the E-cadherin repressors Snail, Slug and Zeb1 in urothelial carcinoma of the urinary bladder: relation to stromal fibroblast activation and invasive behaviour of carcinoma cells. *Histochem. Cell Biol.* 138, 847–860
- 144 Zhang, P. et al. (2015) ZEB1: At the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle* 14, 481–487

- 145 Aghdassi, A. et al. (2012) Recruitment of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 by the transcriptional repressor ZEB1 downregulates E-cadherin expression in pancreatic cancer. *Gut* 61, 439–448
- 146 Chen, Y. et al. (2010) MEOX2 regulates nuclear factor- κ B activity in vascular endothelial cells through interactions with p65 and I κ B β . *Cardiovasc. Res.* 87, 723–731
- 147 Douville, J.M. et al. (2011) Mechanisms of MEOX1 and MEOX2 regulation of the cyclin dependent kinase inhibitors p21 and p16 in vascular endothelial cells. *PLoS One* 6, e29099
- 148 Petropoulos, H. et al. (2004) Disruption of Meox or Gli Activity Ablates Skeletal Myogenesis in P19 Cells. *J. Biol. Chem.* 279, 23874–23881
- 149 Gredell, J.A. et al. (2008) Impact of target mRNA structure on siRNA silencing efficiency: a large-scale study. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 744–755
- 150 Guzmán, C. et al. (2014) ColonyArea: An ImageJ Plugin to Automatically Quantify Colony Formation in Clonogenic Assays. *PLOS ONE* 9, e92444
- 151 Liu, J. et al. (2018) Effect of TW37 on the growth of H1975 EGFR-TKI-resistant lung cancer cells and its underlying mechanisms. *Mol. Med. Rep.* 17, 2509–2514
- 152 Hsu, P.-C. et al. (2016) YAP promotes erlotinib resistance in human non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget* 7, 51922–51933

- 153 Wang, H. et al. (2018) Comprehensive circular RNA profiling reveals the regulatory role of the circRNA-000911/miR-449a pathway in breast carcinogenesis. *Int. J. Oncol.* 52, 743–754
- 154 GOHN, C.R. et al. (2017) Mesenchyme Homeobox 2 Enhances Migration of Endothelial Colony Forming Cells Exposed to Intrauterine Diabetes Mellitus. *J. Cell. Physiol.* 232, 1885–1892
- 155 Shi, L. et al. (2019) Mouse embryonic palatal mesenchymal cells maintain stemness through the PTEN-Akt-mTOR autophagic pathway. *Stem Cell Res. Ther.* 10, 217
- 156 Zhou, P. et al. (2012) miR-301a Is a Candidate Oncogene that Targets the Homeobox Gene Gax in Human Hepatocellular Carcinoma. *Dig. Dis. Sci.* 57, 1171–1180
- 157 SKA2 mediates invasion and metastasis in human breast cancer via EMT. . [Online]. Available: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2018.9623>. [Accessed: 25-Aug-2019]
- 158 Zhu, Z.-Y. et al. (2018) Silencing of MEOX1 Gene Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis of LNCaP Cells in Prostate Cancer. *Cancer Biother. Radiopharm.* 34, 91–102
- 159 Gemmill, R.M. et al. (2011) ZEB1-Responsive Genes in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Lett.* 300, 66–78
- 160 Zhang, T. et al. (2016) A genetic cell context-dependent role for ZEB1 in lung cancer. *Nat. Commun.* 7

161 Cui, Y. et al. (2018) ZEB1 Promotes Chemoresistance to Cisplatin in Ovarian Cancer Cells by Suppressing SLC3A2. *Chemotherapy* 63, 262–271

162 Wang, M. et al. (2017) Potential role of ZEB1 as a DNA repair regulator in colorectal cancer cells revealed by cancer-associated promoter profiling. *Oncol. Rep.* 38, 1941–1948

163 Wang, S.-C. et al. (2006) Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. *Nat. Cell Biol.* 8, 1359–1368

164 Boehm, E.M. et al. (2016) The many roles of PCNA in eukaryotic DNA replication. *The Enzymes* 39, 231–254