



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Nivel de metilación e hidroximetilación en las regiones promotoras  
de RAR  $\alpha$  y RAR  $\beta$  en muestras de sangre de pacientes con  
adenocarcinoma pulmonar.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

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

**MOISÉS BARUC PERALTA LÓPEZ**



**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. SAÉ MUÑIZ HERNÁNDEZ**

**Ciudad Universitaria, CD. MX. (2021)**



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 Académicos**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme ser parte de su casa desde ya hace varios años.**

**A la Facultad de Ciencias, por permitirme conocer a mis más grandes amores.**

**Al Instituto Nacional de Cancerología, por darme todas las facilidades para poder iniciar, llevar acabo y finalizar mi tesis en sus instalaciones.**

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Oncología Experimental, Subdirección de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN).**

**Mi tutora.**

**Dra. Saé Muñiz Hernández, quien fue mi sensei, quien intento tener un alto grado de paciencia cuando habla conmigo, quien intento de muchas formas educarme pero con poco éxito, quien no solo intento enseñarme una técnica experimental o a poder criticar las entre líneas de un artículo científico. Ella también me enseñó que “el diablo está en los detalles”, que “Calidad no es el trabajo que hago cuando hay personas observándome si no, el que realizo bien aún cuando no hay nadie”. Con mucho amor y cariño para mi señora, jefa y ama de mis grilletes.**

**Al Dr. Oscar G. Arrieta Rodríguez, por permitirme ser parte de uno de los mejores equipos de trabajo al que pude pertenecer.**

## Agradecimientos personales

*Quod scripsi scripsy*

Creo que ya hace bastante tiempo me he puesto a pensar lo que quiero plasmar en este apartado pero ahora que lo estoy haciendo ya no recuerdo lo que era. Lo que puedo recordar es que siempre pienso en las mismas personas y eso es porque en diferentes aspectos han sido mis maestros.

Por eso agradezco a los doctores Saúl Gómez Manzo, Alejandro Cristin Ponciano, Álvaro Chaos Cador, Enrique Salvador Buzo, Alejandro Marche Cova, Daniel Humberto Rosas y a la Dra. María Candela Iglesias Chiesa quienes seguramente no me recuerden o les impresione que apenas estoy escribiendo estos agradecimientos, sea lo que sea, gracias; gracias por mostrarme el amor que le tienen a sus respectivas áreas de investigación y que lo vi reflejado en el ímpetu con el cual impartían sus clases.

Gracias hermanos (Carlos, Migue, Paty), sé que no hablo mucho con ustedes pero no significa otra cosa más que hemos salido de diferentes “ocnos” a volar. Ustedes deben saber que son parte importante y que siempre contarán conmigo así como siempre me han dado la mano cuando la he necesitado.

Gracias mis herbanos (Anninsky, Geoshi salvaje) por ser mis psicólogos y escuchar las tonterías que de repente se me da hacer, espero sigan ahí por un buen rato para que me sigan escuchando pues dudo que deje de hacer tonterías.

Gracias Press por ser parte del engranaje y ayudarme a forjar uno de las piezas más importantes de nuestras vidas. Gracias mi tlacuache sanguijuelesco por dejarme reír a tú lado, hacer como que te educó aunque tú seas quien en realidad lo hace, gracias por compartir tus risas, molestias, pensamientos y parte de tú tiempo conmigo.

Gracias mi sensei por todos estos años, por la oportunidad que me dio y por haber creído en mí para este proyecto.

Y gracias má por enseñarme a no rendirme.

*scientia et vivet*

ÍNDICE	Pág.
<b>RESUMEN</b>	1
CAPÍTULO I	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
I. 1. Generalidades del Cáncer	3
I. 2. Cáncer de pulmón	3
I. 2. 1. Subtipos histológicos del CPCNP	4
I. 2. 2. Características moleculares del adenocarcinoma	5
I. 2. 3. Genes oncogénicos y supresores de tumor	6
I. 3. Epigenética	9
I. 3. 1. Metilación del DNA	9
I. 3. 2. Desmetilación del DNA	10
I. 3. 3. Hidroximetilación del DNA	11
I. 4. Retinoides, vía metabólica del retinol y sus aspectos oncogénicos	13
CAPÍTULO II	
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	18
CAPÍTULO III	
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>	19
CAPÍTULO IV.	
<b>HIPÓTESIS</b>	20
CAPÍTULO V	
<b>OBJETIVOS</b>	21

V. 1. Objetivo general	21
V. 2. Objetivos particulares	21

## CAPÍTULO VI

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	22
VI. 1. Obtención de muestras	22
VI. 2. Cuantificación y análisis de calidad de material genético	22
VI. 3. Obtención de secuencias génicas y primers	23
VI. 4. Obtención de porcentaje de citosinas y citosinas modificadas de los segmentos de los promotores de los genes RAR $\alpha$ y RAR $\beta$	24
VI. 4. 1. Digestión de DNA con las enzimas corte HpaII y MspI	24
VI. 4. 2. Amplificación de productos mediante qPCR	25
VI. 5. Análisis de modificación epigenética en los promotores de RAR $\alpha$ y RAR $\beta$ de muestras de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar	25
V. 6. Análisis Estadístico	26

## CAPÍTULO VII

<b>RESULTADOS</b>	27
VII. 1. Población de estudio	27
VII. 2. Análisis de calidad del DNA purificado	27
VII. 3. Análisis de las modificaciones epigenéticas en los genes RAR $\alpha$ Y RAR $\beta$ en muestras de pacientes con CPCNP	29
VII. 3. 1. Cuantificación del porcentaje de modificación en la región promotora de RAR $\alpha$ y RAR $\beta$ en muestras de pacientes con CPCNP	32
VII. 3. 2. Cuantificación del porcentaje de modificación en la región promotora de RAR $\alpha$ y RAR $\beta$ de muestras de sujetos sanos.	34
VII. 3. 3. Asociación entre los porcentajes de metilación y las características clínicas de los pacientes.	36
VII. 4. Sobrevida Libre de Progresión y Sobrevida Global	37

CAPÍTULO VIII	
<b>DISCUSIÓN</b>	41
CAPÍTULO IX	
<b>CONCLUSIÓN</b>	43
CAPÍTULO X	
<b>PERSPECTIVAS</b>	44
CAPÍTULO XI	
<b>ANEXOS</b>	45
ANEXO I. Figura Suplementaria	45
ANEXO II. Lista de Tablas	46
ANEXO III. Lista de Figuras	47
CAPÍTULO XII	
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	48

## Resumen

El cáncer de pulmón es un importante problema del sector salud a nivel mundial, debido a que representa una de las principales causas de muerte por cáncer. En México durante el 2018 se registraron 7'811 nuevos casos, y 6'733 fallecimientos por esta neoplasia; diversos estudios sugieren que la elevada tasa de mortalidad está en relación directa con el diagnóstico tardío.

En el desarrollo del cáncer de pulmón (CP) y otras neoplasias sólidas, los cambios en la expresión de genes involucrados con su desarrollo, pueden ser de origen genético o epigenético. Tales cambios pueden deberse al contacto constante con factores carcinogénicos, predisposición y/o susceptibilidad génica. Factores epigenéticos como la metilación e hidroximetilación de las citosinas en el promotor o en el cuerpo de los genes provoca diferentes efectos sobre los propios genes; por ejemplo, un aumento de la metilación de un promotor con una alta densidad de islas CpG resulta en el silenciamiento o represión de los genes; en contraste, la hidroximetilación del mismo promotor puede inducir la formación de empalmes alternativos. El análisis del perfil molecular de los pacientes con cáncer de pulmón, podría favorecer la identificación y caracterización de marcadores con utilidad en el diagnóstico temprano de la enfermedad. Estudios previos sugieren que algunos genes supresores de tumor (GST) en células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) presentan modificaciones epigenéticas, similares a las que muestran los tejidos tumorales de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP); lo que permite suponer que el uso de sangre puede ser un blanco de análisis para el diagnóstico.

La isoforma  $\alpha$  del receptor de ácido retinoico ( $RAR\alpha$ ) es un gen que se ha asociado con migración y proliferación en líneas celulares de cáncer de pulmón; sin embargo, no existe un consenso sobre su participación o nivel de expresión en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de pulmón. Por otra parte, el receptor de ácido retinoico  $RAR\beta$  participa en la vía metabólica del retinol, es una proteína involucrada en la inhibición de la proliferación celular. Diversos estudios han mostrado que  $RAR\beta$  tiene una expresión disminuida en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de pulmón. Específicamente en cáncer de pulmón, los receptores  $RAR\alpha$ ,  $RAR\beta$ ,  $RXR\alpha$  y  $RXR\beta$ , muestran modificaciones en su expresión



intratumoral. Importantemente, se ha mostrado que existe una asociación entre la disminución de la expresión de RAR $\beta$  con cambios epigenéticos.

En este trabajo de investigación, se determinó el porcentaje de metilación e hidroximetilación presente en un segmento de DNA en la región promotora de RAR $\alpha$  y RAR $\beta$  en muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas. Las muestras se obtuvieron de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, el análisis se realizó con el kit EpiJet 5-hmC and 5-mC (Thermo Fisher Scientific) mediante PCR tiempo real.

Los resultados mostraron que para ambos genes RAR $\alpha$  y RAR $\beta$ , en las analizadas, el porcentaje de citosinas modificadas fue mayor en muestras de pacientes con CP comparados con el porcentaje encontrado en muestras de individuos sanos. La presencia de citosinas no modificadas para ambos genes se asoció con tabaquismo pasivo. Pacientes que presentaron un porcentaje mayor de citosinas no modificadas en RAR $\alpha$ , mostraron una mejor media de sobrevida libre de progresión y sobrevida global comparada con pacientes que mostraron citosinas modificadas. El porcentaje de citosinas modificadas en RAR $\beta$  fue mucho menor al reportado en la literatura.

Finalmente, los porcentajes de citosinas modificadas obtenidas, en muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón, para RAR $\alpha$  y RAR $\beta$  confirmarían la participación de los eventos de metilación en dichos receptores en el desarrollo del cáncer de pulmón.

## **CAPÍTULO I.**

### **Introducción**

#### ***I. 1. Generalidades del cáncer***

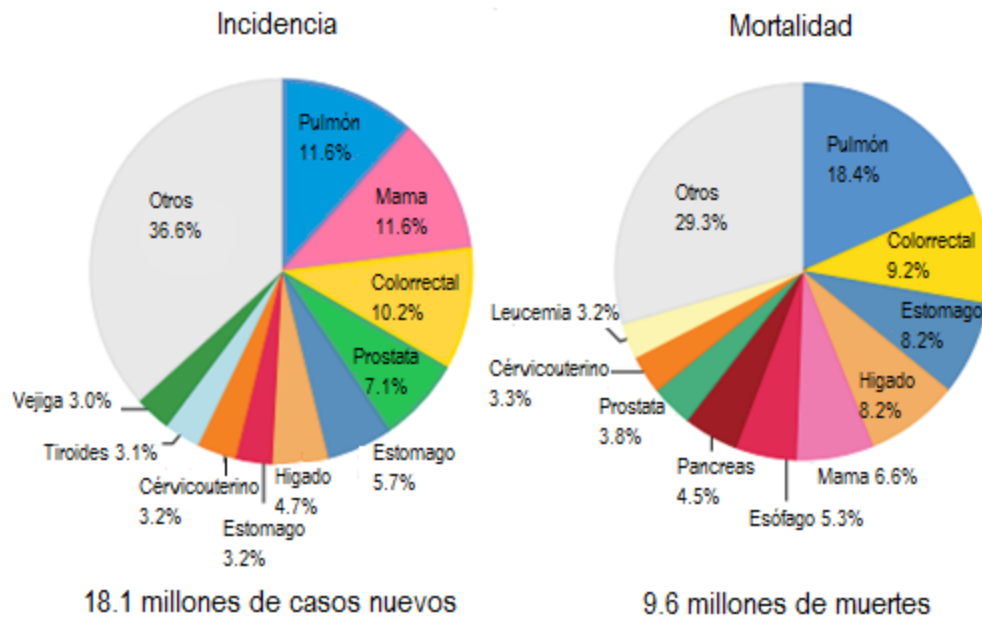
Las enfermedades no transmisibles son responsables de la mayor parte de las muertes a nivel mundial; y el cáncer se ha proyectado como la primer causa de muerte. La incidencia y mortalidad por cáncer aumentan de manera acelerada en todo el mundo; reflejando las interacciones entre el envejecimiento de la población, la distribución de los principales factores de riesgo, así como los cambios en la prevalencia de las neoplasias (Bray et al., 2018). De acuerdo a los datos estimados por la IARC (por sus siglas en inglés; International Agency for Research on Cancer), en 2018 se presentaron 18.1 millones de nuevos casos y 9.6 millones de muertes de individuos con cáncer; de los cuales el 21.1% y el 14.4% corresponden a la incidencia y mortalidad registrada en el continente Americano (Bray et al., 2018). De las 5 neoplasias con mayor número de nuevos casos y muertes estimadas para ambos sexos, en 2018, el cáncer de pulmón presenta la mayor incidencia con 2.1 millones de nuevos casos (11.6 %) y es la causa líder de muerte por neoplasias con 1.8 millones de defunciones por año, representando el 18.4 % del total de las muertes por cáncer a nivel mundial. En la figura 1, se presenta la incidencia y mortalidad de los 10 tipos de cáncer más comunes en 2018 (Bray et al., 2018).

Las estadísticas epidemiológicas de 2018 en México, reportaron 190, 167 nuevos casos de cáncer, con 84,000 defunciones, de las cuales casi el 10% de las muertes reportadas por cáncer correspondieron a cáncer de pulmón, con 6, 733 defunciones, 8.4% de prevalencia a nivel nacional (GLOBOCAN 2018).

#### ***I. 2. Cáncer de pulmón***

El cáncer de pulmón (CP) es una enfermedad heterogénea con múltiples subtipos histológicos, la primera clasificación lo divide en dos grupos: carcinoma de pulmón de células pequeñas o microcítico (CPCP) y carcinoma de pulmón de células no pequeñas o no

microcítico (CPCNP). El subtipo más común es el CPCNP el cual representa hasta el 85% de los casos de CP (Fujimoto and Wistuba, 2014; Testa et al., 2018).



**Figura 1. Porcentaje de incidencia y mortalidad de cáncer en 2018 a nivel mundial para ambos sexos.** De izquierda a derecha se muestran los porcentajes de los 10 tipos de cáncer con mayor número de nuevos casos y el porcentaje de mortalidad con los diferentes tipos de neoplasias. Editado de GLOBOCAN 2018.

### ***I. 2. 1. Subtipos histológicos del CPCNP***

El CPCNP se subdivide en tres subtipos: 1) adenocarcinoma, 2) carcinoma poco diferenciado o de células grandes y 3) carcinoma de células escamosas o epidermoide; cada uno posee una histología y una biología molecular característica (Serra et al., 2017; Travis, 2004; Testa et al., 2018). De estos subtipos histológicos el adenocarcinoma pulmonar es el más frecuente. Además de tabaco, algunos de los carcinógenos asociados a esta neoplasia son los asbestos, el radón, el arsénico y la contaminación en el aire; así como, la exposición al humo de leña, al sílice, éter o níquel (Sichletidis et al., 2009; Loomis et al., 2013; Arrieta et al., 2013; Báez, 2016).

El diagnóstico de adenocarcinoma se realiza por la observación de formaciones glandulares secretoras de moco en muestras histológicas y es localizado en regiones periféricas a partir de las células bronco alveolares mucoproductoras (Arrieta et al., 2013).

Los casos de adenocarcinoma pulmonar no son homogéneos ya que presentan diferencias clínicas, radiológicas, patológicas y moleculares por lo que la IASLC (por sus siglas en inglés; International Association for the Study of Lung Cancer), ATS (por las siglas en inglés; American Theoretical Society) y la ERS (por las siglas en inglés; European Respiratory Society) han realizado una nueva clasificación del adenocarcinoma en la cual se agregan las variantes adenocarcinoma *in situ*, mínimamente invasivo, invasivo y variantes del invasivo (Travis et al., 2011). La mayoría de los casos de adenocarcinoma pulmonar presentan mucina, aunque se han registrado casos en los que no se presenta. Los diversos tipos de adenocarcinoma invasivo que se pueden presentar es lepidico, acinar, papilar, micropapilar o sólido (Travis et al., 2011). Una clasificación general y las características fenotípicas y moleculares se resumen en la tabla 1.

### ***1. 2. 2. Características moleculares del adenocarcinoma***

La sobre expresión de los proto-oncogenes K-RAS (homólogo viral del sarcoma de rata kirsten), EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) y la translocación de los genes proteína 4 asociada a microtúbulos de equinodermo (EML4) con la quinasa de linfoma anaplásico (ALK), son características moleculares del adenocarcinoma de pulmón. Diversos estudios han mostrado que mutaciones en EGFR son más frecuentes en la población asiática (40%), seguida de la población latinoamericana (33%); en contraste, mutaciones en K-RAS son mayormente frecuentes en la población caucásica (30%) y latinoamericana (16.6%), mientras que en la población asiática se presenta en el 10%. En México, se presentan 31.2 % y 16 % de frecuencia de mutaciones de EGFR y KRAS, respectivamente.

Adicionalmente, se ha reportado que las mutaciones en EGFR y K-RAS son mutuamente excluyentes (Toh et al., 2006; Shigematsu, et al., 2005; Rosell, et al., 2009; Arrieta, et al., 2011); las mutaciones en EGFR se encuentran en el dominio tirosina quinasa (TK) y pueden ser por delección en el exón 19, mutaciones sin sentido en el exón 18, 20 y 21, ó por duplicación del exón 20, otras mutaciones observadas son L850R y T790M. En el caso K-RAS las mutaciones que se han observado son G12A, G12C, G12V y G12D

(Ferrer, et al., 2018). Por otra parte, la translocación de los genes EML4 y ALK (EML4-ALK) es una mutación poco frecuente en CPCNP (Soda et al., 2007; Koivunen et al., 2008; Takeuchi et al., 2008). Esta translocación del gen EML4-ALK se identificó por primera vez en un paciente con historial tabáquico; sin embargo, se presenta preferentemente en pacientes sin historial tabáquico y en casos sin mutaciones de K-RAS o EGFR (Gainor et al., 2013; Shaw et al., 2009). El hecho de que las mutaciones de los genes K-RAS, EGFR y la translocación de EML4-ALK sean excluyentes entre sí, refuerzan la teoría de que solo se requiere una mutación conductora para generar una neoplasia pulmonar (Dearden et al., 2013).

Recientemente, mediante la realización de estudios de secuenciación de genoma de muestras de pacientes con CPCNP, se ha logrado identificar genes que presentan modificaciones; entre los que se encuentran ROS1 en individuos sin historial tabáquico y TP53, BRAF, JAK-2 Y JAK-3 en individuos con historial tabáquico positivo (Govindan et al., 2012). Además, independientemente del historial tabáquico de algunos individuos con cáncer de pulmón, se han encontrado mutaciones en genes como: *STK11*, *KEAP1*, *NF1*, *SMAD*, *U2AF1*, *RBM10*, *NKX2-1*, *CDKN2A*, *P53*, *FGFR1*, y *PIK3CA*; aunque su participación en el desarrollo del cáncer de pulmón o la respuesta al tratamiento continua en investigación (Govindan et al., 2012; Imielinski et al., 2012; Testa et al., 2018).

### ***1. 2. 3. Genes oncogénicos y supresores de tumor***

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por presentar células con una des-regulación en la expresión de genes involucrados en la proliferación, el crecimiento, la diferenciación celular y la muerte; estos genes son llamados proto-oncogenes o genes supresores de tumor (Hanahan and Weinberg, 2000). Los cambios en la expresión de los genes que le da a las células el fenotipo neoplásico pueden ser cambios genéticos o epigenéticos (Flavahan, Gaskell and Bernstein, 2017). Las mutaciones son cambios de la secuencia genética que pueden inhibir o modificar la expresión del gen; mientras que las modificaciones epigenéticas inhiben o modifican la expresión del gen independientemente de la secuencia del DNA (Allis and Jenuwein, 2016).

Las funciones celulares afectadas en las células malignas son la proliferación, la muerte, el crecimiento y la diferenciación; y por lo tanto, los genes que codifican para la traducción de las proteínas involucradas en las vías moleculares de dichas funciones se expresan de forma distinta, que en una célula sin fenotipo neoplásico (Testa et al., 2018). Las vías moleculares que se han observado desreguladas en cáncer se encuentran interconectadas en diferentes puntos, por lo que la expresión inadecuada de una proteína desregula la vía de señalización de diferentes rutas metabólicas, con posibles afectaciones en las funciones celulares y en consecuencia aportando una característica neoplásica a la célula (Hanahan and Weinberg, 2011; Paoli, Giannoni and Chiarugi, 2013).

Los genes que codifican para proteínas que confieren un potencial transformante, es decir, proteínas que aumentan la tasa de proliferación, inhiben la muerte celular, aumentan los factores de crecimiento o inducen la dediferenciación de la célula, son clasificados como genes oncogénicos, cuando su expresión no es exacerbada son llamados proto-oncogénicos. La sobreexpresión de estos genes se puede dar por diferentes mecanismos como las mutaciones, amplificación génica o formación de asas que yuxtapone a elementos tipo enhancer (Alberts et al., 2008).

Al contrario de los genes oncogénicos, los genes supresores de tumor (GST) son genes que inhiben la transformación celular, es decir, que inhiben la proliferación o inducen la muerte celular (Liu et al., 2010). El apagado de los GST es la forma en que las células pierden los “candados” que evitan que dichas células proliferen de forma descontrolada; el apagado de estos genes se puede dar por mutaciones o a través de la hipermetilación de las secuencias génicas en sus promotores (Baylin, 2005; Esteller, 2005; Hernando et al., 2015). Otro mecanismo epigenético, involucrado en el apagado de los genes son las modificaciones post-traduccionales, algunas de estas impiden la transcripción de la secuencia génica manteniendo la cromatina en forma condensada o en un estado de heterocromatina (Santos and Caldas, 2005).

En 1971, Knudson y colaboradores realizaron un estudio epidemiológico en el que se concluyó que los alelos de los GST eran recesivos, es decir, que se requería que ambos alelos estuvieran apagados para impedir la síntesis de la proteína, a esta teoría se le llamo la teoría de los dos hits o la teoría de Knudson. Por el contrario, los genes oncogénicos son

dominantes, por lo que la inactivación de la copia dominante haría que no se transcribiera el gen (Knudson 1971). Existen GST en los cuales la inactivación de una sola copia es suficiente para permitir la transformación celular, debido a que no se sintetiza la cantidad suficiente de proteína, a este fenómeno se le llama haploinsuficiencia (Shen, Huang et al., 2018; Zhao, Yi and Ting, 2018).

**Tabla 1. Características fenotípicas y moleculares de los sub tipos histológicos del CPCNP**

<b>Sub-histología del CPCNP</b>	<b>Características fenotípicas</b>	<b>Perfil molecular</b>
<b>Carcinoma escamoso</b>	Formación de puentes intercelulares o perlas córneas, necrosis del tejido, queratinización celular, citoplasma denso y nodos (ganglios) sólidos. Tiene variantes de células claras, papilar y basaloide.	P63 (P40) (+) CK 5/6 (+)
<b>Carcinoma de células grandes</b>	Marcado pleomorfismo, no es queratinizado, no hay formaciones glandulares, sus células tiene un núcleo prominente. Tiene variantes de células claras, neuroendocrinas, basaloide, tipo linfoepitelioma y rabdoid.	P63 (-) CK 5/6 (-) TTF-1 (-) CK-7 (-)
<b>Adenocarcinoma</b>	Formaciones glandulares, sus células tienen un citoplasma vacuolado, con núcleo grande y segregan mucina. Con variantes de sólido con mucina, células claras papilar y bronquioloalveolar (mucinoso y no mucinoso).	TTF-1 (+) CK-7 (+) P63 (-) CK 5/6 (-)
<b>(+), positivo; (-), negativo; (TTF-1), factor de transcripción tiroidea-1; (P63) proteína 63; (CK), citoqueratina.</b>		

### ***I. 3. Epigenética***

La palabra epigenética es usada por primera vez por Waddington, para describir los mecanismos de compromiso del destino celular y especificación de un linaje durante el desarrollo de un organismo animal; en la actualidad se define como la regulación de la expresión de los genes, independientemente de su secuencia génica y que puede ser heredada de forma meiótica o mitótica. Los procesos epigenéticos son la metilación del DNA, modificaciones post traduccionales de las histonas y la expresión de RNA's largos no codificantes (Allis and Jenuwein, 2016; Waddington, 2012; Bird A., 2007).

#### ***I. 3. 1. Metilación del DNA***

La metilación del DNA es el proceso epigenético más estudiado y el primero que se conoció (Ehrlich, 2009). La metilación es la adición de un grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) en el carbono 4 de las citosinas (N4-metilcitosina) en el DNA de las bacterias; mientras que en los mamíferos la modificación se presenta en el carbono 5 de la citosina (5-metilcitosina) de la cadena de DNA (Rathi, Maurer and Summerer, 2018; Fitzsimmons and Batista, 2018; Kohli and Zhang, 2013).

La metilación se lleva a cabo por la acción de las enzimas DNA metiltransferasas (DNMT) que realizan la metilación de *novo* (DNMT-3A, -B y en menor grado -L) o de mantenimiento (DNMT-1) (Pastor et al., 2013). La metilación de mantenimiento se realiza por la DNMT-1 que es reclutada a la horquilla de replicación por la proteína UHRF1/2, debido que la DNMT-1 metila la secuencia naciente para poder mantener los patrones de metilación que dependen de la estirpe celular. La metilación de *novo* se presenta por la interacción con el ambiente y puede ser heredada (Kohli and Zhang 2013; Pastor et al., 2013).

En los mamíferos la metilación de la citosina se lleva a cabo por la adición de un grupo metilo ( $-\text{CH}_3$ ) que se realiza después de un ataque nucleófilico por parte de una cisteína altamente conservada de las DNMT al carbono 6 de la citosina, esto permite el ataque electrofílico a S-adenosil-L-metionina (SAM) que es el donador universal del grupo  $\text{CH}_3$ . El



enlace de la DNMT y la citosina se elimina después de la pérdida de un electrón de la cisteína (Allis and Jenuwein 2016; de Wit et al., 2015; Ehrlich, 2009).

La metilación se lleva a cabo en regiones del DNA conocidas como islas CpG las cuales son una citosina (C) seguida de una guanina (G) en dirección 5'-3', siendo la "p" el grupo fosfato que une a ambas bases. Las islas CpG no se encuentran distribuidas de forma homogénea a lo largo de la cadena del DNA, por lo que puede encontrarse tanto en los promotores como en la región estructural del gen (de Wit et al., 2015). La cantidad de islas CpG no es igual en todos los genes, en los promotores de genes constitutivos las islas CpG representan del 60% al 70% de la cadena y en los genes tejido específico representa hasta el 40%. La densidad de las islas CpG en los promotores divide a éstos en tres grupos: de alta, baja y media densidad (Pedersen, 2014). Los genes con una densidad alta poseen un 63% de islas CpG en su promotor, la metilación de éstas induce el silenciamiento del gen. En contraste, las islas CpG de baja densidad, formadas hasta un 23% de islas CpG en su secuencia lineal suelen estar metiladas, sin que eso represente el silenciamiento de estos genes, debido a que epigenéticamente la represión o silenciamiento de un gen con baja densidad de islas CpG depende de modificaciones post-traduccionales. Mientras que, los promotores con una densidad media no parecen representar una diferencia en un estado de islas CpG metiladas o no metiladas (Pedersen, 2014).

En diferentes tipos de neoplasias, se ha observado un estado de hipermetilación en la secuencia de promotores y de hipometilación a nivel global de la cromatina (Ehrlich, 2009). La metilación en los promotores de los genes está involucrada con el silenciamiento de los mismos, mientras que la metilación en la región estructural del gen está involucrado con la estructura y función de la cromatina; por lo que cambios en los patrones de metilación modificarían la estructura de la cromatina y con ella la interacción con reguladores distales como silenciadores, aisladores (insulators) o potenciadores (enhancers) (Pedersen, 2014; Ehrlich, 2009).

### **I. 3. 2. Desmetilación del DNA**

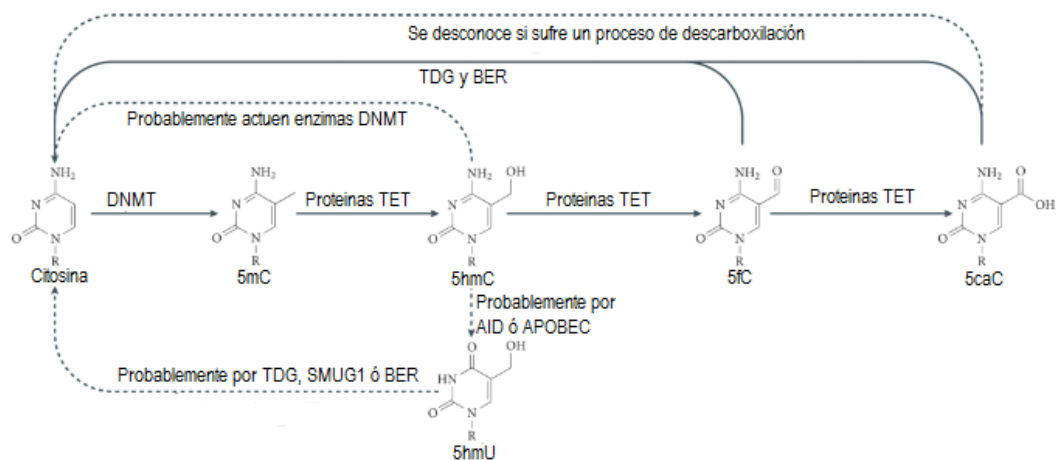
Se conocen dos procesos por medio de los cuales se puede desmetilar a las citosinas, el primero es conocido como un proceso pasivo; debido a que los patrones de metilación no

puede permanecer durante los procesos celulares como la división; las secuencias de DNA que se metilan son islas CpG las cuales se encuentran en secuencias polindrómicas, es decir, que se leen igual en el sentido 5'-3' que de 3'-5'. De tal manera que en la horquilla de replicación se reclutan las proteínas UHRF-1 y -2, las cuales reclutan a DNMT-1; sin embargo, estudios realizados *in vitro* indican que cuando la citosina se encuentra hidroximetilada disminuye hasta 60 veces la actividad de DNMT1. Por tanto, el proceso de desmetilación pasiva es dependiente de la división celular (Rasmussen and Helin, 2016).

La segunda forma en que es posible desmetilar el DNA, se conoce como desmetilación activa y es dependiente de la actividad de las proteínas, en mamíferos las proteínas diez-once traslocasa (TET) oxidan de forma sucesiva a 5-metilcitosina (5 mC) obteniendo 5 hidroximetilcitosina (5 hmC), 5 formilcitosina (5 fC) y 5 caborxilcitosina (5caC). Las citosinas modificadas son eliminadas por la enzima timina ADN glicosilasa (TDG) y reemplazada por una citosina no modificada por un proceso de reparación por escisión de bases (BER) (Rasmussen and Helin, 2016). En el caso de 5hmC probablemente también puede ser eliminada por la desaminación de las enzimas citidina desaminasa inducida por activación (AID) o por la enzima de edición de ARNm de apolipoproteína B (APOBEC) las cuales forman timina (T) y 5 hidroximetil uracilo (5hmU) respectivamente y éste es eliminado por AID que posteriormente es sustituido por BER, en una citosina no modificada, ADN glicosilasa de uracilo monofuncional de cadena única selectiva (SMUG1), o por TDG, el esquema de estos procesos se muestra en la figura 2 (Kohli and Zhang, 2013). La 5caC probablemente se pueda descarboxilar para poder dar origen a una C sin modificación (Liutkeviciute, et al. 2014).

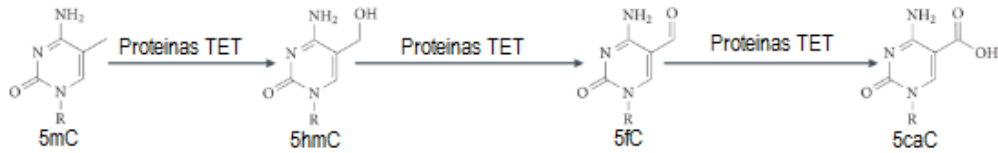
### ***1. 3. 3. Hidroximetilación del DNA***

Se ha planteado que los tres diferentes niveles de oxidación de la 5 mC (5 hmC, fC y 5caC), son marcas epigenéticas; sin embargo, hoy en día no se tiene clara la función de la 5fC y la 5caC (Liutkeviciute, et al., 2014). Por otra parte, se sabe que la función principal de 5hmC es la desmetilación del DNA particularmente en los promotores. (Kohli and Zhang 2013).



**Figura 2. Vías de des-metilación del ADN.** La citosina (C) se metila por la acción de una enzima ADN metiltransferasa (DNMT) que toma un grupo metilo del donador universal S-adenosil-L-metionina (SAM), posterior a ello las proteínas de translocación diez once (TET) oxidan de forma sucesiva 5-metilcitosina (5 mC) a 5-hidroximetilcitosina (5 hmC), 5-formilcitosina (5 fC) y 5-carboxilcitosina (5 caC). Las formas oxidadas de 5 mC funcionan como intermediarios de la des-metilación de la C. Las líneas continuas, vías conocidas; las líneas punteadas, las vías que no han sido comprobadas (Figura editada de Pastor et al., 2013).

La hidroximetilación es el primer nivel de oxidación que se obtiene de la acción de las proteínas TET. La hidroximetilación de un nucleótido se observó por primera vez en la base J;  $\beta$ , D-glucocil hidroximetiluracilo, la cual se encuentra en diferentes especies de *Leishmania sp* y de *Trypanosoma sp* (Pastor et al., 2013). En *Trypanosoma brucei*, el parásito causante de la enfermedad del sueño; se observó que las proteínas JBP1 y JBP2 de la familia de las dioxigenasas dependientes de  $Fe^{2+}$  y 2-oxoglutarato oxidaban el grupo metilo de la timina (T) y, posteriormente la T era glucosilada por una proteína desconocida; en este estado de oxidación es como las enzimas dioxigenasas de reparación a DNA (AlkB), eliminan el grupo metilo (Pastor et al., 2013). Estudios posteriores analizaron muestras de mamíferos en busca de proteínas similares a las de la familia JBP y se encontró una gran similitud con las proteínas TET, las cuales pertenecen a la familia de las enzimas JBP. Las proteínas TET pueden oxidar la 5 mC en forma sucesiva hacia 5 hmC, 5 fC y 5 caC, como se muestra en la figura 3 (Kohli and Zhang, 2013; Pastor et al., 2013).



**Figura 3. Oxidación sucesiva de 5 mC.** Formación de 5hmC, 5 fC y 5 caC (de izquierda a derecha) por acción de las proteínas TET.

Estudios realizados en mamíferos han mostrado que tanto en el desarrollo embrionario como en el crecimiento, los patrones del metiloma e hidroximetiloma son específicos, así como las proteínas que mantienen estos patrones. En un cigoto se aumenta las concentraciones de TET-1 y -3, las cuales borran completamente el metiloma paterno y de forma gradual el materno; en las siguientes etapas aumentan los niveles de 5 hmC, mientras que en las células somáticas TET 2 se observa en mayor concentración y tanto C metiladas como hidroximetiladas tienen diferentes patrones dependiendo de la estirpe celular y la etapa de crecimiento del organismo. (Kohli and Zhang, 2013; Pastor et al., 2013; Wossidlo, et al., 2011).

#### I. 4. *Retinoides, vía metabólica del retinol y sus aspectos oncogénicos*

Como se ha mencionado anteriormente, la metilación del DNA es un mecanismo epigenético clave y frecuente que regula algunos procesos asociados a la transformación oncológica en células eucarióticas (Jasek et al., 2019). La desregulación de los patrones de metilación de DNA es un evento celular que se puede presentar tanto en la fase de iniciación como en la progresión de la oncogénesis (Jasek et al., 2019). La hipermetilación de la región promotora de genes supresores de tumor puede conducir al silenciamiento de genes que participan en importantes vías de señalización celular. El impacto global de la metilación del DNA en el funcionamiento de los organismos es un evento multifactorial, que involucra factores endógenos y exógenos (Jasket et al., 2019). La metilación del DNA en ciertos genes podría utilizarse como un biomarcador de respuesta al tratamiento o de diagnóstico. En ese sentido, diferentes estudios han sugerido que la disminución de la expresión de genes intermediarios en la vía de señalización del retinol como RAR $\beta$  en el

tejido tumoral, está asociada con modificaciones epigenéticas. Se conoce que RAR $\beta$  está metilado en lesiones de cáncer de pulmón comparado con tejido adyacente a las lesiones, donde no se encuentra metilado (Fujiwara et al., 2005). Aunque no se mostraron diferencias con respecto al género, pacientes con historial tabáquico mostraron mayor índice de metilación vs el grupo de pacientes no fumadores (Zhao et al, 2012).

La vitamina A o retinol es un compuesto esencial liposoluble de cadena saturada, del cual derivan diferentes formas de retinoides; por ejemplo, los ésteres de retinol, forma en que se almacenan en los animales, el retinal e isoformas de ácido retinoico, metabolitos involucrados en diferentes funciones fisiológicas de los mamíferos como son el desarrollo embrionario, crecimiento, visión, la activación del sistema inmune, la reproducción y la reparación del tejido epitelial (O'Byrne and Blaner, 2013)

La vía de los compuestos de la vitamina A, tiene un papel importante en procesos celulares tales como la apoptosis, la diferenciación y la proliferación celular (Doldo et al., 2015; Druilhe et al., 2008). Cuando se presentan bajos niveles de vitamina A en un animal, se puede inducir ceguera nocturna, pérdida de la visión, atrofia de testículos, inmunodeficiencia y formación de huesos cortos y anchos (Fields, Soprano and Soprano, 2007). A niveles altos de retinol se observan efectos teratogénicos (Beeman and Kronmiller, 1994; Collins and Mao, 1999). Los niveles de retinol en plasma tienen una concentración entre 1.71  $\mu$ M y 2.14  $\mu$ M (Druilhe, 2008; Ford, Mannino and Redd, 2004).

Los metabolitos bioactivos de la vitamina A son el 11-cis ácido retinoico y all-trans ácido retinoico (ATRA). El metabolito 11-cis ácido retinoico media la fotorecepción actuando como el cromóforo visual. La mayoría de las funciones no visuales de la vitamina A están mediadas por ATRA (Doldo et al., 2015). Los mamíferos no pueden sintetizar retinol por lo que éste se obtiene de la dieta; los ésteres de retinol se obtienen a través del consumo de comida de origen animal, y la provitamina A se obtiene de fuentes de origen vegetal. Los ésteres de retinol se convierten en retinol en la luz del intestino delgado o de la mucosa intestinal, después se re-esterifican para formar nuevamente éster de retinol en los enterocitos dentro del hígado; los carotenos y la provitamina A son absorbidos por las células mucoproducidas del intestino delgado, convirtiéndolos en retinaldehído y después en retinol, en ambos casos la molécula final obtenida son los ésteres de retinol; la cual es

almacenada en los hepatocitos o en retinol (ROL) para su posterior liberación al sistema sanguíneo (Gottesman, Quadro and Blaner, 2001; Folli et al., 2001).

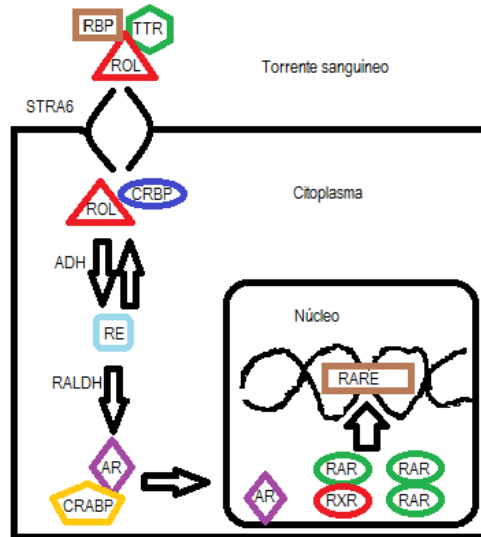
Para facilitar su difusión en el organismo el ROL es transportado en el torrente sanguíneo por la proteína de unión a retinol (RBP) la cual es una proteína de 21 kDa, debido a su tamaño el holo RBP se une a un homotetrámero de transtetirina (TTR), la función de TTR es evitar que se pierda RBP/ROL en la filtración glomerular (Raghu and Sivakumar, 2004). El homotetrámero de TTR se describe mejor como un dímero de dímeros de TTR el cual se une en los residuos de aminoácidos 33 a 36 de RBP. El tamaño final del complejo TTR-RBP es de 71 kDa (Newcomer and Ong, 2000).

El complejo RBP-TTR transporta al ROL a sus células diana a través del sistema sanguíneo, no se han observado cambios conformacionales en RBP al liberar ROL por lo que se cree que éste es liberado por acción de un potencial electronegativo de la membrana plasmática, lo que crea un cambio de pH en el medio circundante de RBP y éste libera al ROL (Raghu and Sivakumar, 2004). Después de ser transportado por el torrente sanguíneo, el ROL es introducido al citosol de sus células diana, por medio de una proteína ubicada en la membrana plasmática de las células, llamada proteína estimulada por ácido retinoico 6 (STRA6). A la fecha, se desconoce la función exacta de STRA6, es decir, si sufre un cambio conformacional o si funciona como un transportador activo o pasivo. Un estudio realizado por el grupo de Kawaguchi, mostró que es un transportador que no cumple con ninguno de los mecanismos de transporte conocidos a la fecha (Kawaguchi, Zhong and Sun, 2013). Posterior a su entrada a la célula, el ácido retinoico (AR) es transportado en el citosol por la proteína de unión a ácido retinoico citoplásmico (CRABP), mientras que el ROL es transportado por la proteína de unión a retinol citoplásmico (CRBP) y la proteínas de unión a ácidos grasos (FABP); éstas proteínas transportan el retinol al núcleo en donde los receptores nucleares, receptores de ácido retinoico (RARs) y los receptores X de retinoides (RXRs) transportan los derivados bioactivos de la vitamina A, a través del núcleo hasta el elemento de respuesta (RARE) del gen diana (Raghu and Sivakumar, 2004; Zhong, et al., 2013). Los receptores tipo RAR pueden ser activados por ATRA y 9-cis RA; mientras que los receptores tipo RXR sólo son activados por 9-cis RA (Raghu and Sivakumar, 2004). En la figura 4 se muestra la vía intracelular del retinol en células diana.

Las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  de los receptores RAR y RXR, forman homodímeros y heterodímeros, se ha observado que en neoplasias como cáncer de pulmón, mama y cabeza y cuello, éstas isoformas participan inhibiendo la proliferación celular. Estudios realizados tanto con líneas celulares como con pacientes de adenocarcinoma pulmonar, mostraron que la expresión de RAR $\beta$  disminuye significativamente mientras que RAR $\alpha$  no tiene diferencia significativa con respecto a la expresión en células no neoplásicas (Picard, et al, 1999; Xu, et al, 1997; Brabender, et al. 2005; Zhang, et al., 1996). En contraste, estudios a nivel de RNAmensajero indicaron que el nivel de expresión de los receptores nucleares RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$  y RXR $\gamma$  se encuentra disminuida entre 60 y 80% en tejido tumoral de pacientes con CPCNP (Kuznetsova, et al., 2016). Nuestro grupo de investigación, ha mostrado que en pacientes mexicanos con cáncer de pulmón, la pérdida de la expresión de RAR $\beta$  y RAR $\alpha$  se encuentra asociada a mal pronóstico y a una pobre sobrevida (Muñiz-Hernández et al., 2016). Por otro lado, la adición de ácido trans-retinoico (ATRA) al esquema de quimioterapia favorece la respuesta, en aquellos pacientes que expresan RAR $\beta$  (Arrieta et al., 2010). Sin embargo un estudio independiente sugiere que el ATRA puede activar la vía de señalización de ERK mediante un mecanismo de transcripción independiente que involucra a RAR $\alpha$  y PI3K, lo cual puede inducir el crecimiento, la proliferación y migración en células de CP (Quintero, et al., 2015).

Estudios realizados con muestras de plasma y tejido tumoral de CPCNP, han mostrado la presencia de genes metilados en ambos tipos de muestras (Hsu et al., 2007; Fujiwara et al., 2005). Los ensayos diagnósticos que proponen el uso de muestras de sangre son un elemento de investigación atractivo, debido principalmente a la facilidad para su recolección y por considerarse un método no invasivo. Además, se perfila como la muestra ideal para la búsqueda de marcadores, ensayos de riesgos y monitoreo de las neoplasias. Específicamente para RAR $\beta$ , un par de estudios han mostrado que existe una relación entre el nivel de metilación en muestras pareadas, de tejido tumoral y plasma sanguíneo, el ensayo posee un nivel predictivo del 75%, en pacientes con cáncer de pulmón utilizando un panel de 5 genes (p16, MGMT, DAPK, RASSF1A y RAR $\beta$ ) (Fujiwara et al., 2005). En otro estudio independiente, se mostró que existe una concordancia entre la metilación encontrada en el tejido tumoral de pacientes con CPCNP y la muestra de sangre de un 76% para RAR $\beta$ , y otros genes como BLU (86%), CDH13 (87%), FHIT (80%) y p16 (75%)

(Hsu et al., 2007). Esta correlación entre los estados de metilación de los genes, analizado en tejido tumoral y sangre, permite proponer la detección de marcadores biológicos de cáncer de pulmón en muestras de sangre.



**Figura 4. Vía de retinol en células diana.** El retinol (ROL) viaja por torrente, sanguíneo transportado por la proteína de unión a retinol (RBP) y por transterritina (TTR), es introducido al citosol por la proteína estimulada por ácido retinoico 6 (STRA6). El ROL es transportado en citoplasma por la proteína de unión a retinol citoplásmico (CRBP), y es oxidado por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) obteniendo como producto retinal (RE) este último se oxida para dar origen al ácido retinoico (AR) por acción de la enzima retinaldehído deshidrogenasa (RALDH). El AR es transportado por la proteína celular de unión a ácido retinoico (CRABP) al núcleo. En el núcleo el AR activa los factores de transcripción activados por ligando los cuales son las proteínas receptor del ácido retinoico (RAR) y receptor X de retinoides (RXR) estos forman homodímeros o heterodímeros entre sí, tanto los homodímeros como los heterodímeros reconocen secuencias consenso conocidas como elementos de respuesta a ácido retinoico, de esta forma activa la transcripción de genes diana.

En el presente estudio se plantea analizar el nivel de citosinas modificadas a 5 mC ó 5 hmC en una sección de la región promotora de RAR $\alpha$  y RAR $\beta$  en muestras de sangre de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, se ha observado que hay una metilación aberrante en diferentes genes tanto en CP como en otros tipos de neoplasias y tanto RAR $\alpha$  y RAR $\beta$  son genes involucrados en vías de señalización que confieren un potencial transformante o que inhiben la transformación celular.



## CAPÍTULO II.

### Justificación

El cáncer de pulmón es una de las principales neoplasias, con la mayor tasa de mortalidad tanto a nivel mundial como en nuestro país. Se conocen algunos factores y cambios moleculares que pueden inducir esta patología; una de las razones por las cuales se induce la formación de esta enfermedad son los cambios en los patrones de metilación de genes supresores de tumores y oncogenes, incluyendo  $RAR\alpha$  y  $RAR\beta$ . Se han encontrado modificaciones en la expresión de los genes  $RAR\alpha$  y  $RAR\beta$  en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas. Algunas de las modificaciones en la expresión de  $RAR\beta$  se han asociado a cambios en los patrones de metilación del DNA y se han encontrado concordancias en los niveles de metilación del gen tanto en muestras provenientes de tejido tumoral como en muestras sanguíneas. Para  $RAR\alpha$  se desconocen los niveles de metilación en DNA libre en el sistema sanguíneo de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. La mayoría de los estudios se han realizado en poblaciones europeas o asiáticas por lo que es de gran importancia investigar si existe un cambio en los patrones de citosinas modificadas en la población mexicana. En el presente estudio se buscó determinar el porcentaje de modificación en las citosinas de una región determinada en la secuencia del promotor de los genes  $RAR\alpha$  y  $RAR\beta$  en muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadios avanzados.

### **CAPÍTULO III.**

#### **Pregunta de investigación**

¿Cuál es el porcentaje de modificación 5mC y 5hmC presente en un segmento del promotor de los receptores nucleares RAR $\alpha$  y RAR $\beta$  en muestras de sangre periférica de pacientes con Cáncer de Pulmón de Células no Pequeñas?

## CAPÍTULO IV

### Hipótesis

Debido a las funciones de las proteínas RAR, éstas tienen un papel importante en el desarrollo del cáncer de pulmón; cambios en los patrones epigenéticos inducen la carcinogénesis, por lo tanto es posible observar cambios en el nivel de expresión de 5 mC y 5 hmC en las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de RAR en muestras de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma de pulmón en estadios avanzados.

## **CAPÍTULO V.**

### **Objetivos**

#### **V. 1. Objetivo general**

Caracterizar el estado de metilación e hidroximetilación de los receptores RAR $\alpha$  y RAR $\beta$  en un segmento de sus promotores, en muestras de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

#### **V. 2. Objetivos particulares**

1. Seleccionar las muestras de DNA purificado a partir de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar.
2. Generar una base de datos con la información clínico-patológica del paciente.
3. Cuantificar y analizar la calidad del material genético.
4. Analizar la presencia de modificaciones epigenéticas en las citosinas de la región de los promotores de cada uno de los genes.

## **CAPÍTULO VI.**

### **Materiales y Métodos**

#### ***VI. 1. Obtención de muestras***

Se seleccionaron 20 muestras de DNA obtenido de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Las muestras fueron obtenidas de pacientes quienes asistieron a la Clínica de Oncología Torácica - Instituto Nacional de Cancerología, en el período enero-diciembre 2016. La sangre periférica se obtuvo bajo consentimiento informado, de pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón de células no pequeñas para un protocolo de investigación independiente al presente proyecto, con número de aprobación de los comités de Investigación y Bioética del Instituto (015/026/IBI) (CEI/954/15). El DNA se obtuvo y purificó con el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corp., USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante; una vez purificado se mantuvo en congelación a -70 °C hasta su uso. Adicionalmente, se utilizaron siete muestras de DNA obtenido a partir de individuos sanos.

La selección de las muestras se basó en la histología de adenocarcinoma confirmada histopatológicamente y con seguimiento en el historial clínico. Adicionalmente, el DNA obtenido debía cubrir los rangos señalados en el kit Epi JET 5-hmC and 5-mC, de calidad y concentración. La información clínica general y sociodemográfica, se obtuvo del expediente electrónico (del INCan) de cada paciente. Las variables consideradas incluyeron: el subtipo histológico, el sexo, la edad, las fechas de diagnóstico, último seguimiento o muerte, estadio de la enfermedad, antecedente de tabaquismo, exposición a asbestos y exposición a humo de leña; entre otros.

#### ***VI. 2. Cuantificación y análisis de calidad de material genético***

Las muestras de DNA se descongelaron en hielo, para permitir su descongelamiento lentamente y se cuantificaron usando espectrofotometría con un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). Con el programa del NanoDrop se obtuvieron las relaciones de integridad y pureza de los ácidos nucleicos, la relación 260/280 y la relación 260/230, las cuales fueron utilizadas para la selección de las muestras.

### VI. 3. Obtención de secuencias génicas y primers

La secuencia genética de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  del gen RAR se buscó en la base de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI-GENE), lugar de donde se extrajeron las secuencias que corresponden a los promotores según la información de la misma base. El diseño de los primers se realizó con el programa methprimer y se seleccionó un par de primers para cada isoforma, la secuencia de ambos se encuentra descrita en la tabla 2. Los primers se mandaron sintetizar de forma comercial con Integrated DNA Technologies (IDT, Iowa, USA).

Tabla 2. Secuencias genéticas de los primers para RAR $\alpha$ y $\beta$		
Gen	Secuencia	Producto (pb)
Fw-RAR $\alpha$	5' AGTCCTGGGCTGGTTCTCAC 3'	173
Rv-RAR $\alpha$	5' GTCCAGATTCATCCGCAAAC 3'	173
Fw-RAR $\beta$	5' CCCTGCTCATTTTAAAAGCACT 3'	154
Rv- RAR $\beta$	5' CCAACTCCCAGGATTCTCAC 3'	154
Fw, forward; Rv, reverse; pb, pares de bases		

Estudios realizados con muestras de plasma y tejido tumoral de CPCNP, han mostrado la presencia de genes metilados en ambos tipos de muestras (Hsu et al., 2007; Fujiwara et al., 2005). Los ensayos diagnósticos que proponen el uso de muestras de sangre son un elemento de investigación atractivo, debido principalmente a la facilidad para su recolección y por considerarse un método no invasivo. Además, se perfila como la muestra ideal para la búsqueda de marcadores, ensayos de riesgos y monitoreo de las neoplasias. Específicamente para RAR $\beta$ , un par de estudios han mostrado que existe una relación entre el nivel de metilación en muestras pareadas, de tejido tumoral y plasma sanguíneo, el ensayo posee un nivel predictivo del 75%, en pacientes con cáncer de pulmón utilizando un panel de 5 genes (p16, MGMT, DAPK, RASSF1A y RAR $\beta$ ) (Fujiwara et al., 2005). En otro estudio independiente, se mostró que existe una concordancia entre la metilación

encontrada en el tejido tumoral de pacientes con CPCNP y la muestra de sangre de un 76% para RAR $\beta$ , y otros genes como BLU (86%), CDH13 (87%), FHIT (80%) y p16 (75%) (Hsu et al., 2007). Esta correlación entre los estados de metilación de los genes, analizado en tejido tumoral y sangre, permite proponer la detección de marcadores biológicos de cáncer de pulmón en muestras de sangre.

#### **VI. 4. Obtención de porcentaje de citosinas y citosinas modificadas de los segmentos de los promotores de los genes RAR $\alpha$ y RAR $\beta$**

##### **VI. 4. 1. Digestión de DNA con las enzimas corte HpaII y MspI**

El DNA purificado y cuantificado, se sometió a digestión con las enzimas de corte MspI y HpaII incluidas en el kit de análisis Epi JET 5-hmC and 5-mC (Thermo Fisher Scientific, cat. K1501), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, la digestión del DNA con las enzimas se dividió en dos etapas: 1) la glucosilación del DNA, se realizó con el buffer 10x Epi y 10x UDP-glucosa, mezclándolo con cada muestra de DNA genómico, y agua libre de nucleasas agregando las cantidades que se muestran en la tabla 3; las muestras se homogenizaron por pipeteo, se centrifugaron suavemente y se incubaron a 37°C durante 15 min, en baño seco modelo DBSC-001, marca MRC. En la etapa 2) propiamente la digestión, se agregaron las enzimas de corte MspI, HpaII y agua libre de nucleasas se incubó por 1h a 37°C; finalmente para detener la digestión la mezcla se incubó a 80°C por 20 min en un thermomixer marca Eppendorf, modelo: 22331.

<b>Tabla 3. Mezcla para glucosilación.</b>		
	<b>1 X</b>	<b>5 X</b>
<b>DNA genómico</b>	400 ng	2000 ng
<b>10x UDP glucosa</b>	5 $\mu$ L	25 $\mu$ L
<b>10x Epi buffer</b>	5 $\mu$ L	25 $\mu$ L
<b>Agua libre de nucleasas</b>	cbp 49 $\mu$ L	cbp 245 $\mu$ L
cbp; cuanto baste para		

#### **VI. 4. 2. Amplificación de productos mediante qPCR**

El ADN modificado por medio de glucolización y corte enzimático, se utilizó para realizar la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando Maxima SYBR Green/ROXqPCR Mix (cat. K022, Thermo Scientific). Las condiciones de amplificación y alineamiento de las reacciones están descritos en la tabla 4. La reacción se realizó en un termociclador en tiempo real, modelo Light Cycler 480 II (Roche, USA). Las condiciones generales son iguales para las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  del gen RAR.

<b>Tabla 4. Condiciones generales para qPCR de RAR<math>\alpha</math> y RAR<math>\beta</math></b>				
	<b>Pre calentamiento</b>	<b>Desnaturalización</b>	<b>Alineamiento</b>	<b>Extensión</b>
<i>Temperatura</i>	95° C	95° C	58° C	72° C
<i>Tiempo</i>	10 min	15 seg	30 seg	30 seg
<i>Ciclos</i>	1	40		

#### **VI. 5. Análisis de modificación epigenética en los promotores de RAR $\alpha$ y RAR $\beta$ de muestras de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma pulmonar**

Los resultados obtenidos de la qPCR se analizaron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se utilizaron curvas comparativas (visualmente) y mediante cálculos matemáticos. Los porcentajes de modificación epigenéticas de las muestras de tejido tumoral, se obtuvieron utilizando las ecuaciones enlistadas en la tabla 5. De acuerdo a dichas ecuaciones, es posible determinar el porcentaje de citosinas metiladas (%mC), el porcentaje de citosinas hidroximetiladas (%hmC) y el porcentaje de citosinas que no presenta modificación (%C).



**Tabla 5. Ecuaciones para la determinación de modificación en las citosinas**

**Citosinas hidroximetiladas**

$$\% 5 \text{ hmC} = 100 / (1+E)^{Cq3-Cq1}$$

**Citosinas metiladas**

$$\% 5mC = 100/(1+E)^{Cq2-Cq1} - 100/(1+E)^{Cq3-Cq1}$$

**Citosinas sin modificación**

$$\% C = 100 - 100/(1+E)^{Cq2-Cq1}$$

**Dónde:**

Cq1: Ciclo umbral (Cp) del control sin enzimas

Cq2: Cp HpaII

Cq3: Cp T4 BGT + MspI

E: Valor de eficiencia de la PCR

## **VI. 6. Análisis Estadístico**

Para propósitos descriptivos las variables continuas se resumieron como medias aritméticas y desviaciones estándar; mientras que las variables categóricas se presentaron como frecuencias y proporciones. La prueba de T-student se utilizó para analizar las diferencias entre las variables continuas. Mientras que la prueba de kruskal Wallis fue empleada en el análisis de asociación entre las modificaciones epigenéticas y las características de la población de estudio. La sobrevida fue calculada mediante la prueba de Kaplan-Meier. El análisis estadístico fue realizado usando el software SPSS v15 (SPSS Inc, Chicago, IL).

## CAPITULO VII.

### Resultados

#### *VII. 1. Población de estudio*

Muestras de DNA previamente purificado a partir de sangre periférica de pacientes con CPCNP se seleccionaron con base a la revisión de los expedientes electrónico, se seleccionaron 20 muestras totales, correspondientes a pacientes con adenocarcinoma, diagnóstico confirmado histopatológicamente. Entre los criterios de selección de las muestras, se incluyó el que cada una tuviera una cantidad de DNA total de 500 ng.

La media de la edad al diagnóstico fue de 59 años ( $\pm 14.5$  años), la mayoría de la población fue masculino (60%) con historial tabáquico (60%) y sin exposición a humo de leña o asbesto (60 % y 80%, respectivamente). Las características clínico patológicas de la población del estudio se presentan en la tabla 6.

La mayoría de los pacientes recibieron una terapia basada en paclitaxel- carbo ó cisplatino como terapia de primera línea (16/20, 80%).

#### *VII. 2. Análisis de calidad del DNA purificado*

Adicionalmente a la cantidad total de DNA (reportado previamente en la purificación), se determinó la concentración y calidad de las muestras de ADN de sangre periférica. La concentración se determinó mediante espectrofotometría, en un nanodrop 2000, el cual además proporciona los valores de pureza (260/280) e integridad (260/230). Los valores de la relación 260/280 deben ser  $\approx 1.8$ , el cual se acepta para denominar al ADN con una pureza óptima (rango 1.7 - 1.9); una relación menor indica contaminación por proteínas o fenoles y una relación mayor indica que la muestra tiene contaminantes orgánicos. Mientras que para la relación 260/230 el valor esperado está en el rango de 1.5 - 2.2 para DNA. Los valores obtenidos por espectrofotometría, indicaron que las 20 muestras seleccionadas cumplieron con los criterios de concentración y pureza, por lo que el total de las muestras fueron empleadas en la determinación de modificaciones epigenéticas. Los valores de cuantificación y las relaciones de pureza se presentan en la tabla 7.

<b>Tabla 6. Características generales de los pacientes</b>		N =20
		% (n/N)
<b>Edad</b>		
	Media ( $\pm$ DE)	59 ( $\pm$ 14.5)
	< 60 años	
	> 60 años	
<b>Género</b>		
	Femenino	40 (8/20)
	Masculino	60 (12/20)
<b>Historial Tabáquico</b>		
	Fumador	60 (12/20)
	No-fumador	40 (8/20)
<b>Exposición Pasiva a Tabaco</b>		
	Si	10 (2/20)
	No	90 (18/20)
<b>Exposición a asbesto</b>		
	Si	20 (4/20)
	No	80 (16/20)
<b>Exposición a Humo de leña</b>		
	Si	40 (8/20)
	No	60 (12/20)
<b>ECOG</b>		
	0-1	65 (13/20)
	2-3	35 (7/20)
<b>Estadio de la enfermedad</b>		
	III	15 (3/20)
	IV	85 (17/20)
<b>Histología</b>		
	Adenocarcinoma	95 (19/20)
	Otros	5 (1/20)
<b>EGFR</b>		
	Nativo	65 (13/20)
	Mutado	35 (7/20)
<b>DE: desviación estándar; ECOG: European Cooperative Eastern Group Classification (escala de funcionalidad en pacientes oncológicos); EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico</b>		

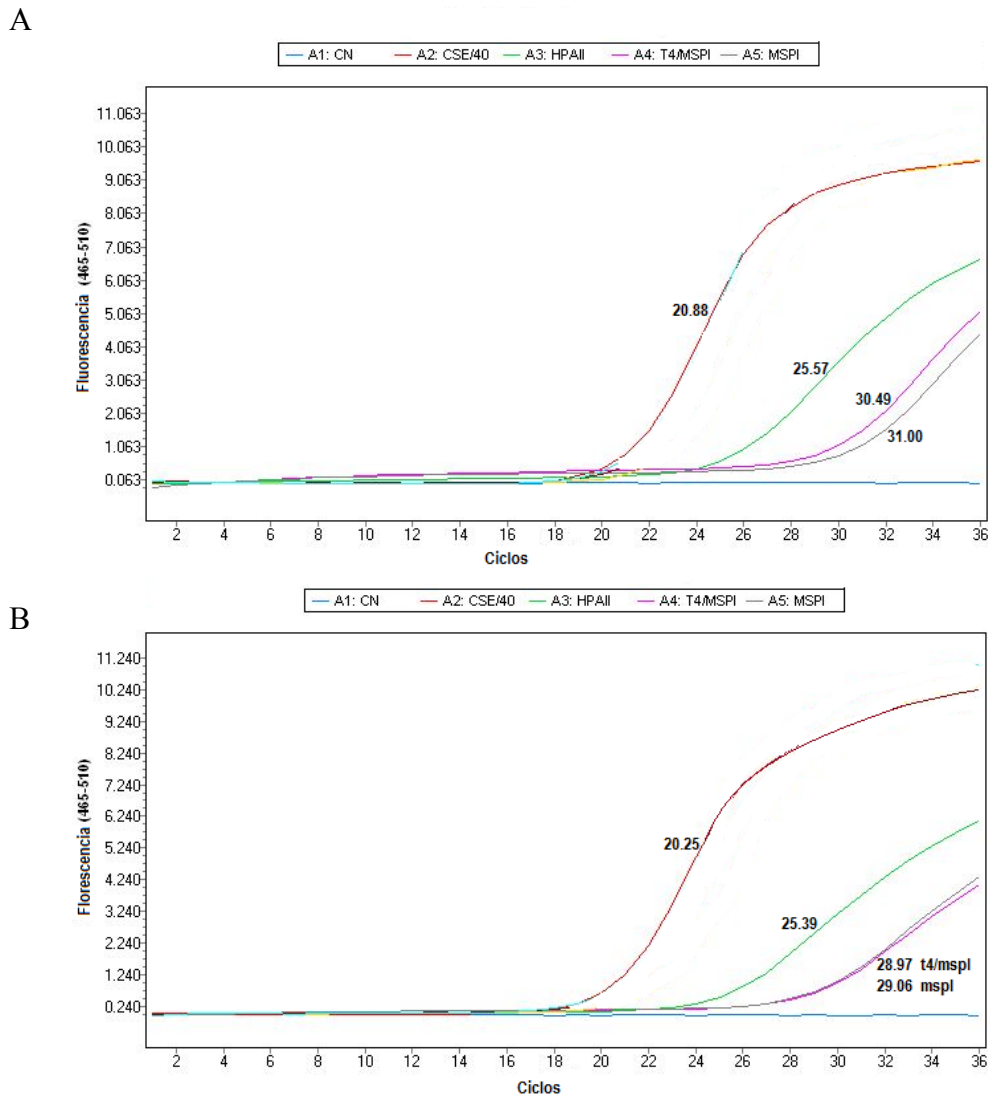
**Tabla 7. Cuantificación de DNA de sangre periférica de pacientes con CPCNP.**

Muestra	260/280	260/230	Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Muestra	260/280	260/230	Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
1	1.9	2.34	839.2	11	1.9	1.26	430.1
2	1.88	2.26	470.75	12	1.88	2.27	131.85
3	1.91	2.35	102.9	13	1.86	2.29	136.55
4	1.86	2.45	129.1	14	1.9	2.5	232.85
5	1.8	2.18	65.8	15	1.89	2.53	232.6
6	1.87	2.24	422	16	1.9	2.46	123.85
7	1.48	0.63	439	17	1.9	2.35	273.05
8	1.87	2.4	175.35	18	1.88	2.27	749.7
9	1.89	2.34	399.1	19	1.94	2.13	367
10	1.75	2.21	2616.6	20	1.92	2.34	1582.65

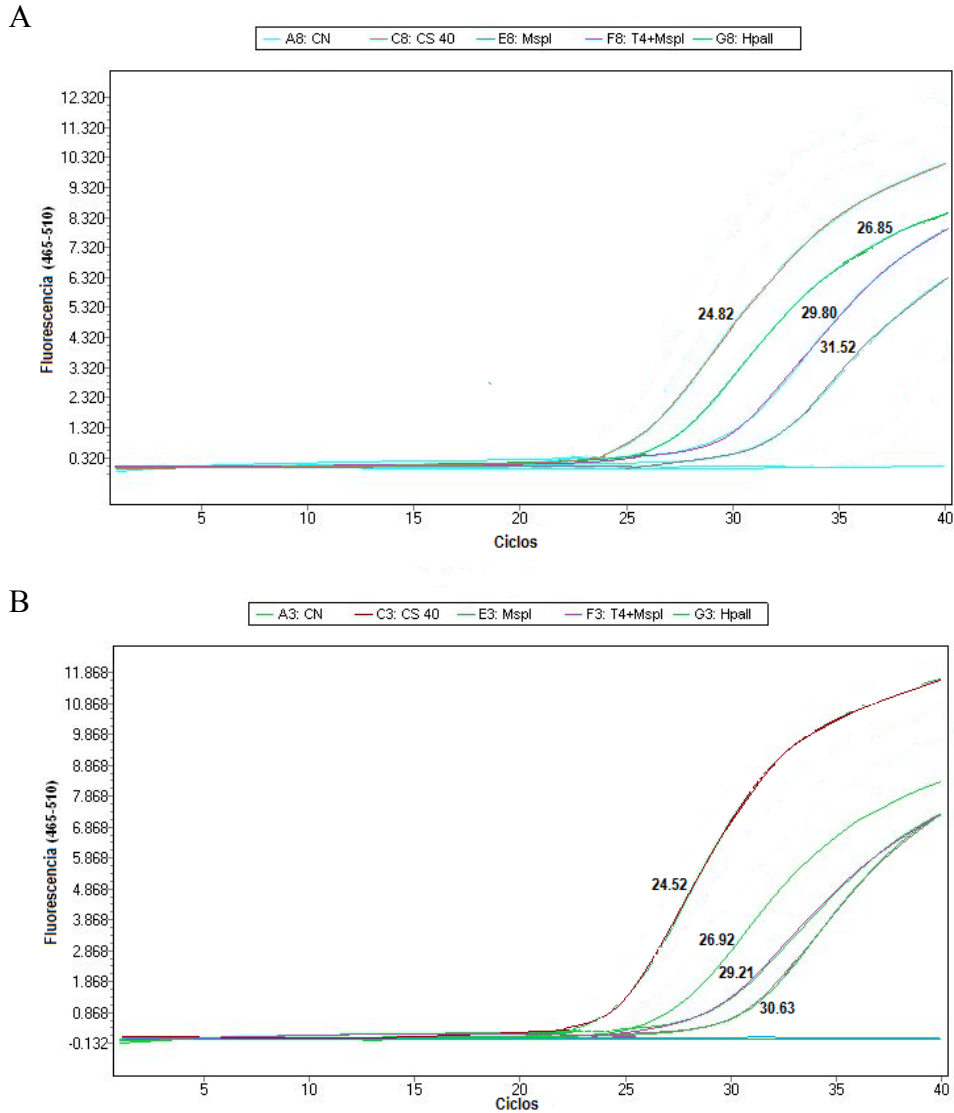
### *VII. 3. Análisis de las modificaciones epigenéticas en los genes RAR $\alpha$ Y RAR $\beta$ en muestras de pacientes con CPCNP*

En las muestras de pacientes con diagnóstico de CPCNP se utilizó el kit EpiJET DNA Methylation Analysis (MspI/HpaII) para identificar las citosinas modificadas en los segmentos de los promotores de RAR $\alpha$  y RAR $\beta$ , siguiendo las indicaciones del fabricante (ver sección de Materiales y Métodos). El análisis de modificación se realizó mediante PCR-tiempo real en un equipo Light Cycler 480, el software permite realizar un análisis visual de los estados de modificación por cambios epigenéticos, esto debido al uso de las enzimas de corte MspI (reconoce las citosinas modificadas como 5 hmC o 5 mC) y HpaII (reconoce citosinas no modificadas), para poder diferenciar entre las C modificadas el kit aprovecha la capacidad  $\beta$ -glucosiltransferasa del fago T4 (T4 BGT) para modificar los residuos de 5 hmC al agregar glucosa evita que MspI reconozca 5 hmC glucosilada. En la figura 5, se presentan las gráficas obtenidas en el software light cycler 480, de dos muestras independientes que no presentan citosinas modificadas en la secuencia del promotor de RAR $\alpha$ , los segmentos de promotor analizados se muestran en las figuras suplementarias, anexo 1; mientras que en la figura 6, se presentan dos gráficas independientes de muestras

que presentan modificación en la 5hmC (5 hidroxi-metil citosina) y la 5mC (5 metil citosina) en la región del promotor del gen RAR $\alpha$ . Las curvas corresponden al par de primers utilizados para el reconocimiento y amplificación.



**Figura 5. Curvas sin citosinas modificadas en un segmento del promotor del gen RAR $\alpha$ .** Curvas representativas de las muestras uno (A) y once (B) sin expresión de metilación en la región de unión al par de primers. Para ambas graficas de izquierda a derecha se muestran las curvas de amplificación, en café muestra sin enzimas de corte (cs), en color verde muestra más HpaII (hpall), en color morado muestras glucosiladas más MspI (msp1), en color gris muestras más MspI (mspl), la línea recta color azul es el control negativo (cn); a un lado de cada curva se presenta su ciclo umbral.



**Figura 6. Curvas con citosinas modificadas en un segmento del promotor del gen *RARα*.** Curvas representativas de las muestras tres (A) y trece (B) con expresión de metilación de islas CpG en la región de unión al par de primers. Para ambas graficas las curvas de amplificación se muestran de izquierda a derecha en café la muestra sin enzimas de corte (cs), las curvas color verde son muestra más Hpall (hpall), las curvas moradas son muestras glucosiladas más Mspl (msp1), las curvas color gris son las muestras más Mspl (mspl), la línea recta color azul es el control negativo (cn); a un lado de cada curva se presenta su ciclo umbral.

**VII. 3.1 Cuantificación del porcentaje de modificación en la región promotora de RAR $\alpha$  y RAR $\beta$  en muestras de pacientes con CPCNP**

El porcentaje de metilación o hidroximetilación presente en las muestras de tejido tumoral de pulmón, se calculó de acuerdo a las fórmulas provistas por el fabricante del kit EpiJEt (ver tabla 5, materiales y métodos). Los resultados del porcentaje de metilación o hidroximetilación de las muestras, que se obtuvieron utilizando el par de primers para RAR $\alpha$ , se muestra en la tabla 8; la mayoría de las muestras presentaron porcentajes elevados de citosinas no modificadas (tabla 8, C). En 8 (40%) de las muestras observamos un porcentaje de alrededor del 10% de modificaciones en la 5 hmC ó 5 mC (marcadas en azul, tabla 8).

**Tabla 8. Porcentajes de citosinas modificadas y no modificadas del amplicon de RAR $\alpha$**

Muestra	5hmC (%)	5mC (%)	C (%)	Muestra	5hmC (%)	5mC (%)	C (%)
1	0.12198	3.66254	96.21548	11	0.31349	3.02964	96.65687
2	0.76224	9.01075	90.22701	12	0.28913	6.45343	93.25744
3	0.87789	13.63262	85.48950	13	3.34870	18.47157	78.17973
4	0.04081	0.89592	99.06327	14	0.15705	10.85886	88.98408
5	0.13717	4.82310	95.03973	15	0.15126	3.29545	96.55329
6	0.20410	4.59150	95.20440	16	0.42025	3.41633	96.16341
7	9.16631	8.77444	82.05925	17	0.17330	5.44476	94.38195
8	0.07419	2.28672	97.63909	18	0.13303	3.61068	96.25629
9	0.38447	7.87392	91.74162	19	0.70538	9.73071	89.56391
10	1.09832	8.43001	90.47167	20	0.03849	1.84437	98.11714

**5 hmC, 5 hidroximetil citosina; 5 mC, 5 metil citosina; C, citosina no modificada**

Los porcentajes de modificación epigenética en el gen de RAR $\beta$ , obtenidos con el par de primers diseñado para una región dentro de la secuencia del promotor, se presenta en la tabla 9. De acuerdo con los resultados el 95% de las muestras presentaron porcentajes cercano al 100% de citosinas no modificadas (C, tabla 9). En la figura 7 se muestran

curvas representativas de muestras que no expresan modificación en la región promotora de RAR $\beta$ .

**Tabla 9. Porcentajes de citosinas modificadas y no modificadas del amplicon de RAR $\beta$**

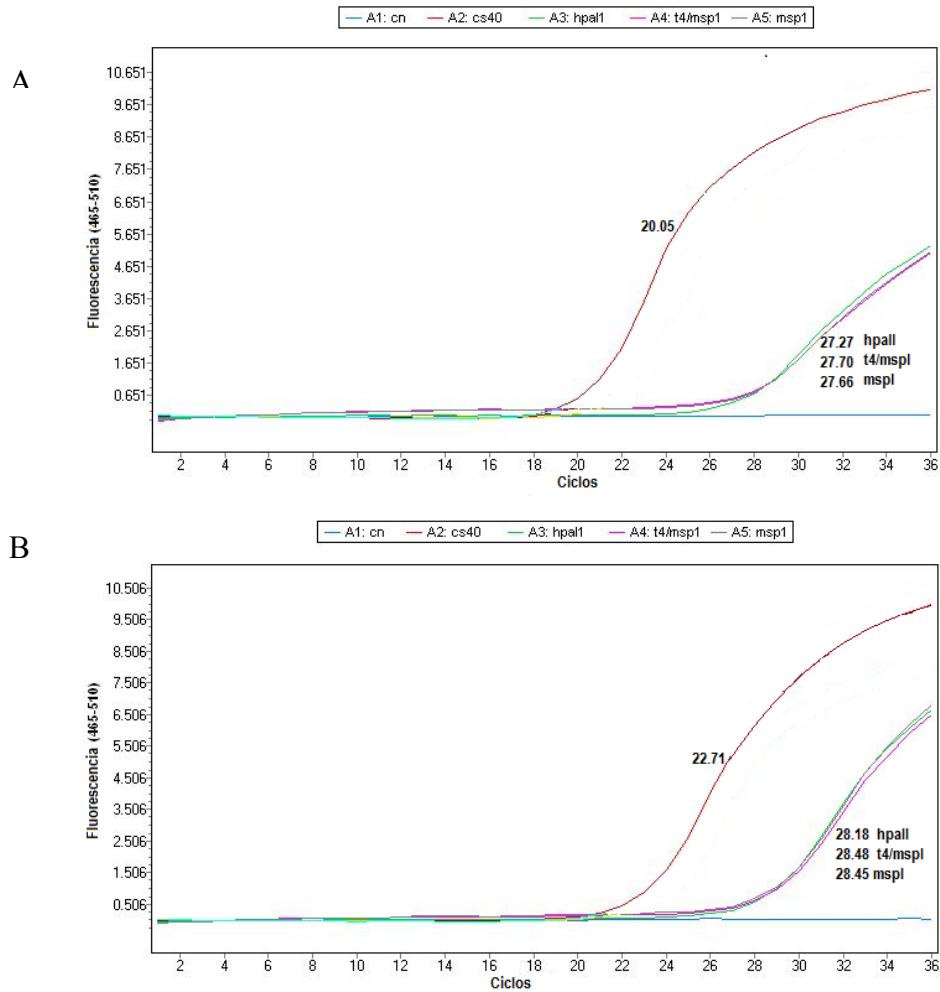
Muestra	Porcentajes (%) de			Muestra	Porcentajes (%) de		
	5hmC	5mC	C		5hmC	5mC	C
1	0.54817	0.18636	99.26548	11	1.09555	0.10803	98.79642
2	0.49531	0.15741	99.34727	12	1.10446	0.16751	98.72803
3	3.03577	0.87161	97.83585	13	8.34012	6.73947	84.92
4	0.28032	0.30475	99.41493	14	0.27434	1.53586	98.18980
5	0.17474	0.14846	99.67680	15	0.19568	0.21096	99.59336
6	0.10623	0.05968	99.83409	16	0.40375	0.01084	99.58541
7	0.39909	0.94439	98.65652	17	ND	ND	ND
8	0.83439	0.58332	98.58229	18	0.17749	0.16365	99.65887
9	0.26220	0.23116	99.50664	19	0.02235	0.16557	99.81208
10	1.46517	0.00000	98.53483	20	0.04370	0.07762	99.87867

**5 hmC, 5 hidroximetil citosina; 5 mC, 5 metil citosina; C, citosina no modificada; ND, no determinado**

Adicionalmente se seleccionaron los amplicones de 10 muestras, tratadas con las enzimas de corte HpaI y MspI y sin tratar, las cuales se corrieron en un gel de agarosa al 2%. En la figura 8, se muestra el corrimiento de las muestras cuatro y quince; y se observa que en todos los carriles independientemente de si se emplearon las enzimas de corte o no, se obtuvo una banda a la altura de 154 pb, el cual coincide con el peso molecular del amplicón de una secuencia sin citosinas modificadas.

Para simplificar los valores obtenidos mediante el análisis de modificación, los porcentajes de 5hmC y de 5mC se sumaron y se presentan como “modificado”; mientras que los valores de “C”, corresponden a las citosinas “no modificadas”; en la tabla 10, se muestran las medias ( $\pm$  DE) para los dos genes.



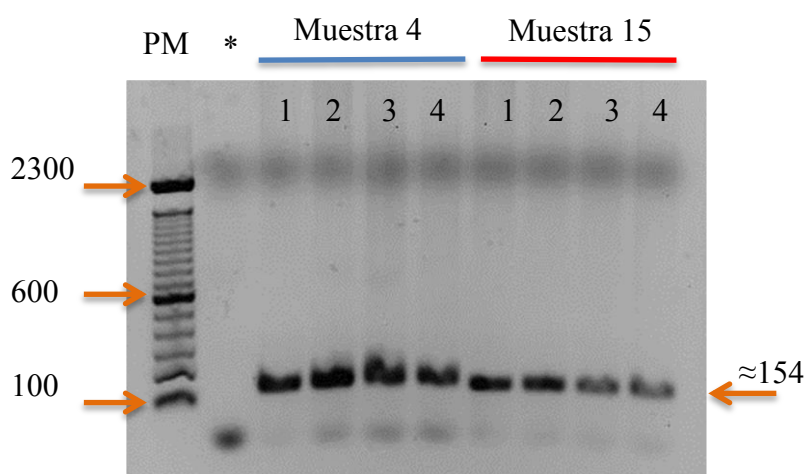


**Figura 7. Curvas sin citosinas modificadas en un segmento del promotor del gen RAR $\beta$ .** Curvas representativas de las muestras uno (A) y dos (B) sin metilación o hidroximetilación de islas CpG en la región de unión al par de primers. Para ambas graficas las curvas de amplificación se muestran de izquierda a derecha en café la muestra sin enzimas de corte (cs), las curvas color verde son muestra más HpaII (hpall), las curvas moradas son muestras glucosiladas más MspI (mspl), las curvas color gris son las muestras más MspI (mspl), la línea recta color azul es el control negativo (cn); a un lado de cada curva se presenta su ciclo umbral.

### VII. 3. 2. Cuantificación del porcentaje de modificación en la región promotora de RARA y RAR $\beta$ de muestras de sujetos sanos.

Con la finalidad de comparar los porcentajes de modificación obtenidos a partir de sujetos con CPCNP vs sujetos sin diagnóstico de cáncer, se utilizaron siete muestras de DNA purificado a partir de sangre periférica de sujetos sanos. Las muestras de DNA fueron purificadas previo al presente trabajo, se cuantificaron y se modificaron de la misma

manera que las muestras de cáncer de pulmón; utilizando el kit EpiJET siguiendo las instrucciones del fabricante. Los porcentajes de C modificadas (5 hmC y 5 mC) y no modificadas, en las regiones de los promotores para los genes RAR $\alpha$  y RAR $\beta$ , se muestran en la tabla 10. Como se puede observar, los porcentajes de modificación para el gen de RAR $\alpha$  fueron menores en sujetos sanos que en pacientes con CPCNP, encontramos que el 100% de las muestras analizadas no mostraron modificación en las C (Tabla 10, RAR $\alpha$ ). Es importante que para el gen RAR $\beta$  los resultados de modificación en muestras de sujetos sanos, fueron similares a los obtenidos en muestras de pacientes; las citosinas se encontraron no modificadas (Tabla 11, RAR $\beta$ ).



**Figura 8. Imagen representativa del corrimiento de amplicones para RAR $\beta$ .** Los carriles representan: 1) DNA normal (no modificado) 2) DNA +HPAII, 3) DNA + T4DGP + MSPI 4) DNA + MSPI; \* indica amplicón sin muestra, sólo primers.

**Tabla 10. Porcentajes de modificación epigenética en RAR $\alpha$  y RAR $\beta$  en pacientes con CPCNP**

	RAR $\alpha$		RAR $\beta$	
	DNA modificado	DNA no modificado	DNA modificado	DNA no modificado
<b>Media (%)</b>	7.43	92.56	1.68	99.12
<b>DE (%)</b>	5.56	5.56	3.36	0.62
<b>Rango</b>	0.94 – 21.82	78.18 – 99.06	0.12 – 15.08	97.84 – 99.88

DE, desviación estándar

**Tabla 11. Porcentajes de citosinas modificadas en muestras de sujetos sanos.**

	RAR $\alpha$			RAR $\beta$			
	5-hmC	5-mC	C	5-hmC	5-mC	C	
<b>1</b>	0.07	0.45	98.96	<b>1</b>	0.45	0.53	99.02
<b>2</b>	0.17	0.22	93.15	<b>2</b>	0.22	0.81	98.98
<b>3</b>	0.44	0.87	91.35	<b>3</b>	0.87	0.65	98.48
<b>4</b>	0.03	0.06	98.44	<b>4</b>	0.06	0.16	99.78
<b>5</b>	0.11	0.50	98.36	<b>5</b>	0.50	0.59	98.92
<b>6</b>	0.01	0.38	99.05	<b>6</b>	0.38	0.63	98.99
<b>7</b>	0.11	0.45	95.61	<b>7</b>	0.45	0.43	99.12

En la tabla 12 se muestran los porcentajes de modificación para ambos genes en las muestras de individuos sanos.

**Tabla 12. Porcentajes de modificación epigenética en RAR $\alpha$  y RAR $\beta$  en individuos sanos.**

	RAR $\alpha$		RAR $\beta$	
	DNA modificado	DNA no modificado	DNA modificado	DNA no modificado
<b>Media (%)</b>	0.552	96.41	0.96	99.04
<b>DE (%)</b>	0.37	3.11	0.38	0.38
<b>Rango</b>	0.09 – 1.31	91.35 – 99.05	0.22 – 1.52	98.48 – 98.78

DE, desviación estándar

### ***VII. 3. 3. Asociación entre los porcentajes de metilación y las características clínicas de los pacientes.***

Se analizó la probable relación entre los porcentajes de modificación epigenética de los genes RAR $\alpha$  y RAR $\beta$ , y las características clínicas de los pacientes con CPCNP. Se encontró una asociación entre la no metilación de los genes RAR $\alpha$  y RAR $\beta$ , con el tabaquismo pasivo (Tabla 13). Las demás características clínicas nos mostraron asociación.

#### ***VII. 4. Sobrevida Libre de Progresión y Sobrevida Global***

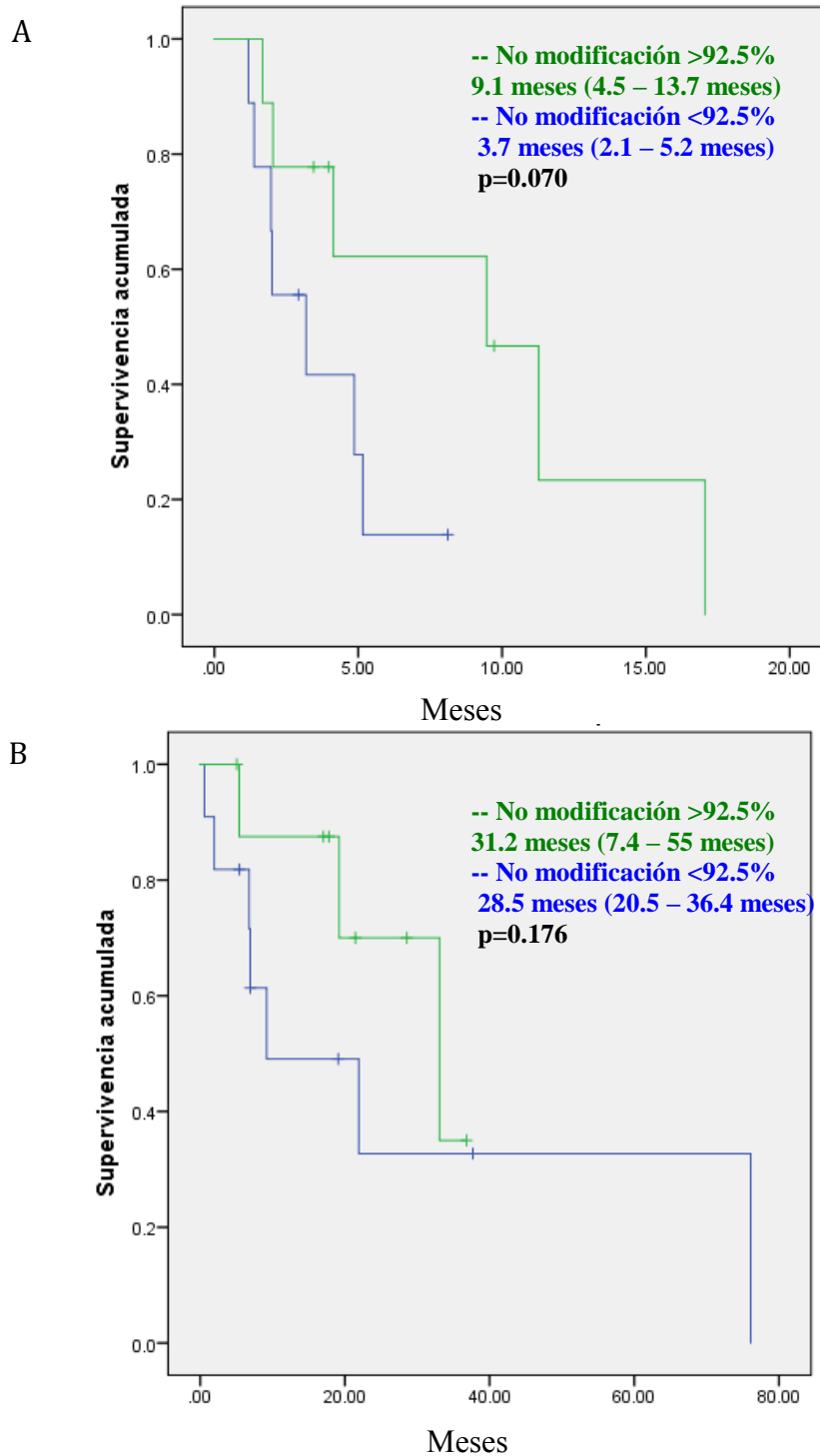
La media de la sobrevida libre de progresión fue de 5.1 meses (2.5 – 7.7 meses) para la población en general. Aunque no se alcanzó la significancia estadística, pacientes quienes no mostraron metilación (no modificación > 92.5%) del gen RAR $\alpha$  tuvieron una mejor sobrevida comparado con aquellos quienes tuvieron no modificación < 92.5% [9.1 meses (4.5 – 13.7 meses) vs 3.7 meses (2.1 – 5.2 meses), p=0.070] (Figura 8A).

La media de la sobrevida global fue de 36.9 meses (19.1 – 54.6 meses) para el total de la población. Al analizar si la modificación epigenética en RAR $\alpha$  ó RAR $\beta$  se asocia con la sobrevida global, no encontramos diferencias estadísticamente significativas; sin embargo, para el caso de RAR $\alpha$  observamos una tendencia entre una no modificación > 92.5% y una mayor media de tiempo de sobrevida global [31.2 meses (7.4 – 55 meses) vs 28.5 meses (20.5 – 36.4 meses) p=0.176] (figura 8B).

**Tabla 13. Asociación de las características clínicas con los porcentajes de modificación epigenética en pacientes con CPCNP.**

	RAR primer A			RAR primer B		
	% Metilado mediana (p25-p75)	% No Metilado mediana (p25-p75)	p	% Metilado mediana (p25-p75)	% No Metilado mediana (p25-p75)	p
<b>Edad</b>						
< 60 años	6.1 (3.1 – 9.9)	93.8 (90.0 – 96.8)	0.705	0.49 (0.26 – 1.34)	99.5 (98.6 – 99.7)	0.327
60 + años	4.8 (3.6 – 15.3)	95.1 (84.6 – 96.3)		0.96 (0.39 – 2.07)	99.0 (98.5 – 99.6)	
<b>Género</b>						
Femenino	6.1 (4.1 – 9.8)	93.8 (76.5 – 90.1)	0.643	0.41 (0.18 – 1.27)	99.5 (98.7– 99.8)	0.176
Masculino	4.2 (3.3 – 10.7)	95.7 (89.2 – 96.6)		0.96 (0.45 – 1.45)	99.0 (98.5 – 99.5)	
<b>Historial Tabáquico</b>						
Presente	4.3 (2.6 – 8.5)	95.6 (91.4 – 97.3)	0.105	0.58 (0.32 – 1.44)	99.4 (98.5 – 99.6)	0.322
Ausente	9.3 (4.4 – 13.6)	90.6 (86.3 – 95.5)		1.23 (0.37 – 1.69)	98.7 (98.3 – 99.6)	
<b>Tabaquismo Pasivo</b>						
Presente	18.1 (14.5 – NR)	81.8 (78.1 – NR)	<b>0.032</b>	9.4 (3.9 - NR)	98.1 (97.8 –NR)	<b>0.024</b>
Ausente	4.8 (3.4 – 9.5)	95.1 (90.4 – 96.5)		0.58 (0.33 – 1.30)	99.4 (98.6 – 99.6)	
<b>Exposición a Humo de Leña</b>						
Presente	5.8 (3.4 – 10.6)	94.1 (89.3 – 96.5)	1.000	1.23 (0.32 – 1.43)	98.7 (98.5 – 99.6)	0.804
Ausente	5.2 (3.5 – 10.2)	94.7 (89.7 – 96.4)		0.58 (0.40 – 1.41)	99.4 (98.5 – 99.5)	
<b>Exposición a Asbesto</b>						
Presente	9.6 (7.4 – 10.2)	90.3 (89.7 – 92.5)	0.156	0.96 (0.30 – 1.41)	99.0 (98.5 – 99.7)	0.841
Ausente	4.3 (3.3 – 10.3)	95.6 (89.6 – 96.6)		0.58 (0.34 – 1.41)	99.4 (98.5 – 99.6)	

<b>EC</b>							
	III	10.69 (3.44 – NR)	89.3 (82.0 - NR)	0.491	0.87 (0.40 – NR)	99.1 (98.6 – NR)	0,911
	IV	5.6 (3.7 – 10.1)	94.3 (89.8 – 96.2)		0.69 (0.32 – 1.45)	99.3 (98.5 – 99.6)	
<b>ECOG – PS</b>							
	0-1	4.7 (2.3 – 6.7)	95.2 (93.2 – 97.6)	0.362	0.73 (0.16 – 1.34)	99.2 (98.6 – 99.8)	0.398
	2-3	8.2 (3.5 -10.7)	91.7 (89.2 – 96.4)		0.61 (0.40 – 1.72)	99.3 (98.4 – 99.6)	
<i>EC, estadio de la enfermedad; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group – Performance Status (Estado Funcional)</i>							



**Figura 9. Sobrevida Libre de Progresión y Global.** Pacientes que no presentaron modificaciones de 5 hmC o 5 mC en RAR $\alpha$  >92.5%, mostraron mejor Sobrevida libre de progresión (A) y Sobrevida global (B).

## CAPITULO VIII.

### Discusión

La metilación del DNA es un evento que ocurre durante la transformación celular y el desarrollo de diversas neoplasias sólidas, entre las que se encuentra el cáncer de pulmón. Entre las moléculas biológicas que se han sugerido pueden funcionar como biomarcadores de esta patología se encuentran los receptores nucleares del ácido retinoico, RAR. Diversos estudios han mostrado que una pérdida de la expresión de RAR $\alpha$  y RAR $\beta$  se asocia a pobre pronóstico en pacientes con CPCNP en estadio avanzado de la enfermedad (Muñiz-Hernández et al., 2016). Además, se conoce que RAR $\beta$ , se encuentra metilado en lesiones malignas de CPCNP. Sin embargo, la búsqueda de biomarcadores en sangre, aún es controversial. En el presente trabajo nosotros seleccionamos 20 muestras de sangre tomadas de pacientes con CPCNP en estado avanzado para determinar el porcentaje de metilación y hidroximetilación de un segmento de los receptores RAR $\alpha$  y RAR $\beta$ , utilizando un kit comercial de detección de metilación, que nos permitió determinar además 5 hmC, una forma de oxidación de 5 mC en el DNA. Encontramos que existe mayor porcentaje de metilación en la isoforma  $\alpha$ , comparado con el porcentaje de metilación observado en la isoforma  $\beta$  del receptor RAR. Esto puede estar en relación a que 1) nosotros trabajamos con la secuencia del promotor de ambos genes (ver figura suplementaria) y 2) dentro de esta secuencia se seleccionó un fragmento que cubre 160 pb, los trabajos realizados anteriormente, no han utilizado la secuencia del promotor o se han utilizado kits que proporcionan la cobertura de metilación total del gen (Pedersen et al., 2014, Zhao et al., 2012). Nuestros resultados indican que el tabaquismo pasivo se asoció con la no modificación de las citosinas en ambos genes. Importantemente encontramos que el porcentaje de metilación en ambos genes fue mayor en los pacientes con cáncer de pulmón comparado con el porcentaje observado en individuos sanos, lo cual concuerda con la bibliografía, que indica que la metilación en genes involucrados en vías de proliferación y diferenciación celular, como RAR $\alpha$  y RAR $\beta$ , están relacionados al desarrollo de neoplasias sólidas (cáncer de pulmón) (Quintero et al, 2015).



Finalmente, encontramos una tendencia entre el porcentaje de citosinas no modificadas mayor a 92.5 y mejor tiempo de SLP y SG, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa; indicando que un mayor porcentaje de metilación de RAR $\alpha$  estaría relacionado a una menor sobrevida, en línea con lo descrito anteriormente (Muñiz-Hernández et al., 2016). Consideramos que al respecto un mayor número de muestras, sería determinante para corroborar los datos obtenidos en el presente trabajo.

## **CAPITULO IX.**

### **Conclusión**

El porcentaje de metilación observado en los receptores RAR $\alpha$  y RAR $\beta$  fue superior en las muestras de pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas comparado con el porcentaje de metilación observado en las muestras de sujetos sanos, lo que confirmaría la participación de los eventos de metilación en dichos receptores, en el desarrollo del cáncer de pulmón. Es importante recalcar que los hallazgos fueron realizados en muestras de sangre periférica, por lo que el presente trabajo aporta evidencia de la utilidad de las muestras líquidas en la búsqueda de biomarcadores en cáncer. Sin embargo, es necesario realizar una mayor y más exhaustiva investigación sobre estos eventos y su participación en el desarrollo de Cáncer de Pulmón.

## **CAPÍTULO X.**

### **Perspectivas**

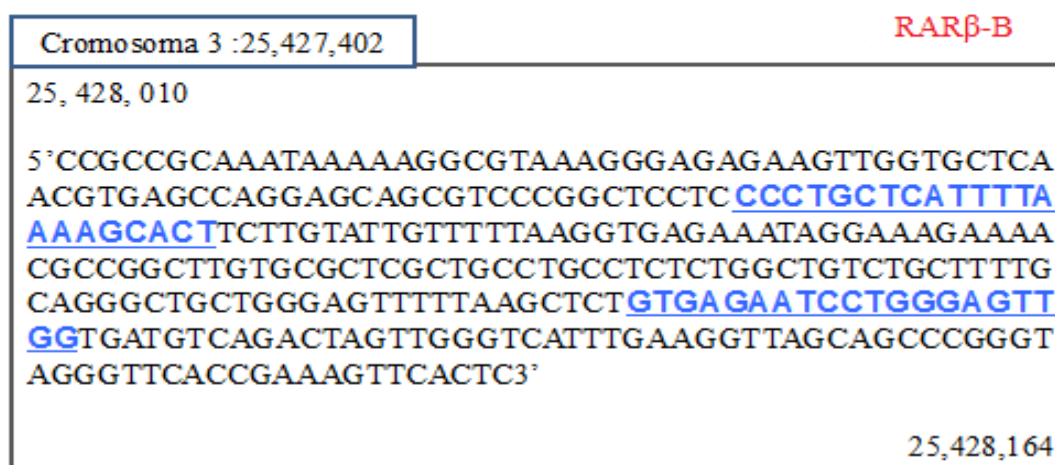
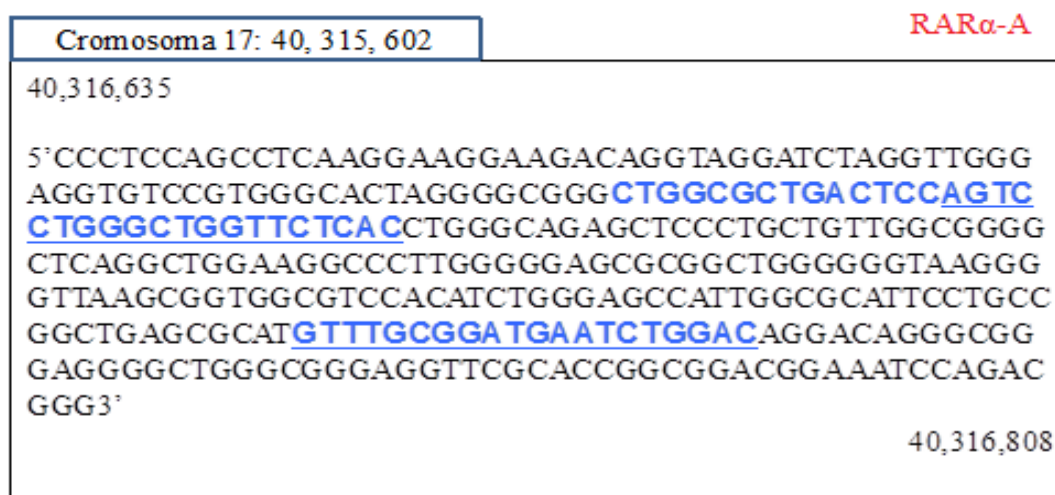
- ✚ Aumentar el número de muestras para corroborar los datos obtenidos.
- ✚ Utilizar al menos 2 pares más de primers, para cubrir mayor secuencia del promotor de cada gen.

## CAPITULO XI.

### Anexos

#### ANEXO 1

#### Figura suplementaria 1



## ANEXO 2

Lista de tablas	Pág.
1. Características fenotípicas y moleculares de los sub tipos histológicos del CPCNP.	8
2. Secuencias genéticas de los primers para RAR $\alpha$ y $\beta$	23
3. Mezcla para glucolización.	24
4. Condiciones generales para qPCR de RAR $\alpha$ y RAR $\beta$ .	25
5. Ecuaciones para la determinación de modificación en las citosinas.	26
6. Características generales de los pacientes.	28
7. Cuantificación de DNA de sangre periférica de pacientes con CPCNP.	29
8. Porcentajes de citosinas modificadas y no modificadas del amplicon de RAR $\alpha$ .	32
9. Porcentajes de citosinas modificadas y no modificadas del amplicon de RAR $\beta$ .	33
10. Porcentajes de modificación epigenética en RAR $\alpha$ y RAR $\beta$ en pacientes con CPCNP.	35
11. Porcentajes de citosinas modificadas en muestras de sujetos sanos.	36
12. Porcentajes de modificación epigenética en RAR $\alpha$ y RAR $\beta$ en individuos sanos.	36
13. Asociación de las características clínicas con los porcentajes de modificación epigenética en pacientes con CPCNP.	38

## ANEXO 3

Lista de figuras	Pág.
1. Porcentaje de incidencia y mortalidad de cáncer en 2018 a nivel mundial para ambos sexos	4
2. Vías de des-metilación del DNA	12
3. Oxidación sucesiva de 5 mC	13
4. Vía de retinol en células diana	17
5. Curvas de no modificación en el gen RAR $\alpha$	30
6. Curvas de modificación en el gen RAR $\alpha$	31
7. Curvas de no modificación en el gen RAR $\beta$	34
8. Imagen representativa del corrimiento de amplicones para RAR $\beta$	35
9. Sobrevida Libre de Progresión y Global	40

## CAPÍTULO XII

### Referencias Bibliográficas

1. Alberts, B., et al. (2008). "Molecular biology of cell. 5 ed. New York: Omega: 1205-1256
2. Allis, C. D., y T. Jenuwein. 2016. 'The molecular hallmarks of epigenetic control', *Nat Rev Genet*, 17: 487-500.
3. Alsafadi, S., et al. (2013). "Retinoic acid receptor alpha amplifications and retinoic acid sensitivity in breast cancers." *Clin Breast Cancer* **13**(5): 401-408.
4. Arrieta O, Guzmán-de Alba-López LF, Acosta-Espinoza A, Alatorre\_Alexander J, Alexander-Meza JF, et al. (2013), "Consenso nacional de diagnóstico y tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas". *Rev Invest Clin.*; 65 (Suppl 1): s5-s84.
5. Arrieta, O., et al. (2011). "Genotyping non-small cell lung cancer (NSCLC) in Latin America." *J Thorac Oncol* **6**(11): 1955-1959.
6. Arrieta O, González-De la Rosa CH, Aréchaga-Ocampo E, Villanueva-Rodríguez G, Cerón-Lizárraga TL, Martínez-Barrera L, Vázquez-Manríquez ME, Ríos-Trejo MA, Alvarez-Avitia MA, Hernández-Pedro N, Rojas-Marín C, De la Garza J. Randomized phase II trial of All-trans-retinoic acid with chemotherapy based on paclitaxel and cisplatin as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 20;28(21):3463-71.
7. Baez-Saldana, R. (2016), "Exposure to Wood Smoke and Risk of Lung Cancer: A Case Control Study".
8. Baylin, S. B. (2005). "DNA methylation and gene silencing in cancer." *Nat Clin Pract Oncol* 2 Suppl 1: S4-11.
9. Beeman, C. S., y Kronmiller, J. E. (1994). "Temporal distribution of endogenous retinoids in the embryonic mouse mandible." *Arch Oral Biol*, 39(9), 733-739.
10. Bettegowda, C., et al. (2014). "Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies." *Sci Transl Med* **6**(224): 224ra224.
11. Bird, A. (2007). "Perceptions of epigenetics." *Nature* **447**(7143): 396-398.

12. Brabender, J., et al. (2005). "Comprehensive expression analysis of retinoic acid receptors and retinoid X receptors in non-small cell lung cancer: implications for tumor development and prognosis." *Carcinogenesis* **26**(3): 525-530.
13. Bray, F., et al. (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." *CA Cancer J Clin* **68**(6): 394-424. Devasa SS, Shaw GL, Blot WJ. (1991) "Changing patterns of lung cancer incidence by histological type". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **1**, 29-34.
14. Cancer Genome Atlas Research, N. (2014). "Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma." *Nature* **511**(7511): 543-550.
15. Chun-Chang, Keh-Yang, Che-Kun, (2013). "DNA 5-methylcytosine demethylation activities of the mammalian DNA methyltransferases." *J Biol Chem* **288**(13): 9084-9091
16. Chung, J. H., et al. (2011). "DNA methylation profile during multistage progression of pulmonary adenocarcinomas." *Virchows Arch* **459**(2): 201-211.
17. Collins, M. D. and G. E. Mao (1999). "Teratology of retinoids." **Annu Rev Pharmacol Toxicol** **39**: 399-430.
18. Dearden, S., et al. (2013). "Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap)." *Ann Oncol* **24**(9): 2371-2376.
19. Doldo, E., Costanza, G., et al. (2015). "Vitamin A, cancer treatment and prevention: the new role of cellular retinol binding proteins." *Biomed Res Int*, 624627.
20. Druilhe, A., Zahm, J. M., Benayoun, L., El Mehdi, D., Grandsaigne, M., Dombret, M. C. Pretolani, M. (2008). "Epithelium expression and function of retinoid receptors in asthma". *Am J Respir Cell Mol Biol*, 38(3), 276-282.
21. Ehrlich, M. 2009. "DNA hypomethylation in cancer cells." *Epigenomics*, 1: 239-59.
22. Esteller, M. (2005). "Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers." *J Pathol* 205(2): 172-180.



23. Feng, H., et al. (2016). "Promoter methylation of APC and RAR-beta genes as prognostic markers in non-small cell lung cancer (NSCLC)." *Exp Mol Pathol* **100**(1): 109-113.
24. Ferrer, I., et al. (2018). "KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy." *Lung Cancer* **124**: 53-64.
25. Fields, A. L., Soprano, D. R., Soprano, K. J. (2007). Retinoids in biological control and cancer. *J Cell Biochem*, 102(4), 886-898. doi:10.1002/jcb.21530
26. Fitzsimmons, C. M., and P. J. Batista. 2018. 'It's complicated... m(6)A-dependent regulation of gene expression in cancer', *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*.
27. Flavahan, W. A., E. Gaskell, and B. E. Bernstein. 2017. 'Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer', *Science*, 357.
28. Folli, C., Calderone, V., Ottonello, S., Bolchi, A., Zanotti, G., Stoppini, M., y Berni, R. (2001). "Identification, retinoid binding, and x-ray analysis of a human retinol-binding protein." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(7), 3710-3715.
29. Ford, E. S., Mannino, D. M., & Redd, S. C. (2004). "Serum antioxidant concentrations among U.S. adults with self-reported asthma." *J Asthma*, 41(2), 179-187.
30. Fujimoto, J. y Wistuba, II (2014). "Current concepts on the molecular pathology of non-small cell lung carcinoma." *Semin Diagn Pathol* **31**(4): 306-313.
31. Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, et al. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful of early detection of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:1219–1225.
32. Gainor, J. F., et al. (2013). "ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: an analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer." *Clin Cancer Res* **19**(15): 4273-4281.
33. Globocan (2019), Revisado: 11 de febrero de 2019, "México" disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-populations>
34. Globocan (2019). Revisado: 11 de febrero de 2019, "Lung" disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>
35. Gottesman, M. E., Quadro, L., y Blaner, W. S. (2001). "Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems". *Bioessays*, 23(5), 409-419.

36. Govindan, R., et al. (2012). "Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers." *Cell* **150**(6): 1121-1134.
37. Hanahan, D., and R. A. Weinberg. (2000). 'The hallmarks of cancer', *Cell*, 100: 57-70.
38. Hanahan, D., and R. A. Weinberg. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation", *Cell*, 144: 646-74.
39. Hernando-Herraez, I., R. Garcia-Perez, A. J. Sharp and T. Marques-Bonet (2015). "DNA Methylation: Insights into Human Evolution." *PLoS Genet* 11(12): e1005661.
40. Hsu HS, Chen TP, Hung CH, Wen CK, Lin RK, Lee HC, Wang YC. Characterization of a multiple epigenetic marker panel for lung cancer detection and risk assessment in plasma. *Cancer*. 2007 Nov 1;110(9):2019-26.
41. Ignatiadis, M. and S. J. Dawson (2014). "Circulating tumor cells and circulating tumor DNA for precision medicine: dream or reality?" *Ann Oncol* **25**(12): 2304-2313
42. Imielinski, M., et al. (2012). "Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing." *Cell* **150**(6): 1107-1120.
43. Inui, N., et al. (2003). "The loss of retinoic acid receptor alpha, beta and alcohol dehydrogenase3 expression in non-small cell lung cancer." *Respirology* **8**(3): 302-309.
44. Kawaguchi, R., Zhong, M., & Sun, H. (2013). "Real-time analyses of retinol transport by the membrane receptor of plasma retinol binding protein." *J Vis Exp*(71), e50169.
45. Kohli, R. M., y Y. Zhang. (2013). "TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation", *Nature*, 502: 472-9.
46. Koivunen, J. P., et al. (2008). "EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer." *Clin Cancer Res* **14**(13): 4275-4283.
47. Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(4): 820-823.

48. Kuznetsova, E. S., et al. (2016). "[Abnormal expression of genes that regulate retinoid metabolism and signaling in non-small-cell lung cancer]." *Mol Biol (Mosk)* **50**(2): 255-265.
49. Kwak, E. L., et al. (2010). "Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer." *N Engl J Med* **363**(18): 1693-1703.
50. Liggett, T. E., et al. (2011). "Methylation patterns in cell-free plasma DNA reflect removal of the primary tumor and drug treatment of breast cancer patients." *Int J Cancer* **128**(2): 492-499
51. Liu, Z., W. Li, Z. Lei, J. Zhao, X. F. Chen, R. Liu, X. Peng, Z. H. Wu, J. Chen, H. Liu, Q. H. Zhou and H. T. Zhang (2010). "CpG island methylator phenotype involving chromosome 3p confers an increased risk of non-small cell lung cancer" *J Thorac Oncol* **5**(6): 790-797.
52. Liutkeviciute, Z., et al. (2014). "Direct decarboxylation of 5-carboxylcytosine by DNA C5-methyltransferases." *J Am Chem Soc* **136**(16): 5884-5887.
53. Loomis, D., et al. (2013). "The carcinogenicity of outdoor air pollution." *Lancet Oncol* **14**(13): 1262-1263.
54. Lorigan, P., et al. (2005). "Lung cancer after treatment for Hodgkin's lymphoma: a systematic review." *Lancet Oncol* **6**(10): 773-779.
55. McCollum and Marguerite Davis (1973). "Nutrition classics from *The Journal of Biological Chemistry* 15:167-175, 1913. The necessity of certain lipins in the diet during growth." *Nutr Rev* **31**(9): 280-281.
56. Muñoz-Hernández S, Huerta-Yepez S, Hernández-Pedro N, Ramírez-Tirado LA, Aviles-Salas A, Maldonado A, Hernández-Cueto D, Baay-Guzmán G, Arrieta O. Association between nuclear expression of retinoic acid receptor alpha and beta and clinicopathological features and prognosis of advanced non-small cell lung cancer. *Int J Clin Oncol*. 2016 Dec;21(6):1051-1061.
57. Newcomer, M. E. and D. E. Ong (2000). "Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin." *Biochim Biophys Acta* **1482**(1-2): 57-64.
58. O'Byrne, S. M. and W. S. Blaner (2013). "Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology." *J Lipid Res* **54**(7): 1731-1743.

59. OMS. 2019. 'CANCER', revisado: 19-02-2019. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
60. Paoli, P., E. Giannoni and P. Chiarugi (2013). "Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression." *Biochim Biophys Acta* **1833**(12): 3481-3498.
61. Pastor, W. A., L. Aravind, and A. Rao. 2013. 'TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14: 341-56
62. Pedersen, J. S., et al. (2014). "Genome-wide nucleosome map and cytosine methylation levels of an ancient human genome." *Genome Res* **24**(3): 454-466.
63. Picard, E., et al. (1999). "Expression of retinoid receptor genes and proteins in non-small-cell lung cancer." *J Natl Cancer Inst* **91**(12): 1059-1066.
64. **Ponomaryova, A. A., et al.** (2013). "Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and post-treatment follow-up of lung cancer patients." *Lung Cancer* **81**(3): 397-403.
65. **Punnoose, E. A., et al.** (2012). "Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib." *Clin Cancer Res* **18**(8): 2391-2401
66. **Quintero Barceinas, R. S., et al.** (2015). "All-Trans Retinoic Acid Induces Proliferation, Survival, and Migration in A549 Lung Cancer Cells by Activating the ERK Signaling Pathway through a Transcription-Independent Mechanism." *Biomed Res Int* **2015**: 404368.
67. Raghu, P., & Sivakumar, B. (2004). Interactions amongst plasma retinol-binding protein, transthyretin and their ligands: implications in vitamin A homeostasis and transthyretin amyloidosis. *Biochim Biophys Acta*, 1703(1), 1-9.
68. Rasmussen, K. D. and K. Helin (2016). "Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer." *Genes Dev* **30**(7): 733-750
69. Rathi, P., S. Maurer, and D. Summerer. (2018). "Selective recognition of N4-methylcytosine in DNA by engineered transcription-activator-like effectors", *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 373.

70. Reboul, E. (2013). "Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: focus on transport proteins." *Nutrients* **5**(9): 3563-3581.
71. Riely, G. J., et al. (2008). "Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma." *Clin Cancer Res* **14**(18): 5731-5734.)
72. Romero-Garcia, S., J. S. Lopez-Gonzalez, J. L. Baez-Viveros, D. Aguilar-Cazares, and H. Prado-Garcia. 2011. "Tumor cell metabolism: an integral view", *Cancer Biol Ther*, 12: 939-48.
73. Rosell, R., et al. (2009). "Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer." *N Engl J Med* **361**(10): 958-967.
74. Rudin, C. M., et al. (2009). "Lung cancer in never smokers: molecular profiles and therapeutic implications." *Clin Cancer Res* **15**(18): 5646-5661.
75. Santos-Rosa, H. and C. Caldas (2005). "Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer." *Eur J Cancer* 41(16): 2381-2402.
76. Schrock, A. B., et al. (2016). "Comprehensive Genomic Profiling Identifies Frequent Drug-Sensitive EGFR Exon 19 Deletions in NSCLC not Identified by Prior Molecular Testing." *Clin Cancer Res* **22**(13): 3281-3285.
77. Serra V, Fernández G y Medell G, (2017), "Carcinoma de células grandes de pulmòn. Inusual metástasis en intestino delgado con invaginación" *Finlay*, volumen 7, numero 3.
78. Shaw, A. T., et al. (2009). "Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK." *J Clin Oncol* **27**(26): 4247-4253.
79. Shigematsu, H., et al. (2005). "Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers." *J Natl Cancer Inst* **97**(5): 339-346.
80. Sichletidis, L., et al. (2009). "Mortality from occupational exposure to relatively pure chrysotile: a 39-year study." *Respiration* **78**(1): 63-68.
81. Sos, M. L. et al (2009). "PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of AKT and EGFR." *Cancer Res* **69**(8): 3256-3261
82. Takeuchi, K, et al. (2008). "Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts." *Clin Cancer res* **14**(20): 6618-6624.

83. Testa, U., et al. (2018). "Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells." *Cancers (Basel)* **10**(8).
84. Travis W.D., Brambilla E., Müller-Hermelink H.K., et al: Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon, France: IARC Press, 2004
85. Travis, W. D., et al. (2011). "International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma." *J Thorac Oncol* **6**(2): 244-285.
86. Toh, C. K., et al. (2006). "Never-smokers with lung cancer: epidemiologic evidence of a distinct disease entity." *J Clin Oncol* **24**(15): 2245-2251.
87. Tam, I. Y., et al. (2006). "Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features." *Clin Cancer Res* **12**(5): 1647-1653.
88. Toma, S., et al. (1998). "RARalpha antagonist Ro 41-5253 inhibits proliferation and induces apoptosis in breast-cancer cell lines." *Int J Cancer* **78**(1): 86-94.
89. **Van der Wijst, M. G., et al.** (2015). "Local chromatin microenvironment determines DNMT activity: from DNA methyltransferase to DNA demethylase or DNA dehydroxymethylase." *Epigenetics* **10**(8): 671-676.
90. Walter, R. F. H., et al. (2018). "Methylation of L1RE1, RARB, and RASSF1 function as possible biomarkers for the differential diagnosis of lung cancer." *PLoS One* **13**(5): e0195716.
91. Warton, K., et al. (2016). "Methylated circulating tumor DNA in blood: power in cancer prognosis and response." *Endocr Relat Cancer* **23**(3): R157-171.
92. Waddington, C. H. (2012). "The epigenotype. 1942." *Int J Epidemiol* **41**(1): 10-13.
93. Waddington, C. H. (2009). The Pupal Contraction as an Epigenetic Crisis in *Drosophila*. *Proceedings of the Zoological Society of London*, A111(3-4), 181–188.
94. Waddington, C. H. (1942). Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, 150(3811), 563–565.

95. de Wit, E., E. S. Vos, S. J. Holwerda, C. Valdes-Quezada, M. J. Verstegen, H. Teunissen, E. Splinter, P. J. Wijchers, P. H. Krijger and W. de Laat (2015). "CTCF Binding Polarity Determines Chromatin Looping" *Mol Cell* 60(4): 676-684.
96. Wossidlo, M., et al. (2011). "5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming." *Nat Commun* 2: 241.
97. Yi, L., et al. (2019). "Identification of aberrantly methylated differentially expressed genes in breast cancer by integrated bioinformatics analysis." *J Cell Biochem* 120(9): 16229-16243.
98. Zhao-Qing Shen, Yi-Long Huang and Ting-Fen Tsai (2018). "Cisd2 haploinsufficiency: A driving force for hepatocellular carcinoma" *Mol Cell Oncol* 5(3): e1441627.
99. Zhong, M., Kawaguchi, R., Ter-Stepanian, M., Kassai, M., & Sun, H. (2013). "Vitamin A transport and the transmembrane pore in the cell-surface receptor for plasma retinol binding protein." *PLoS One*, 8(11), e73838. doi:10.1371/journal.pone.0073838
100. Zuchegna, C., et al. (2014). "Mechanism of retinoic acid-induced transcription: histone code, DNA oxidation and formation of chromatin loops." *Nucleic Acids Res* 42(17): 11040-11055.