



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Identificación de los blancos génicos, asociados al factor
transcripcional mesenchyme homeobox 2 (MEOX2) en
cáncer pulmonar”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

PRESENTA:

ARMAS LÓPEZ LEONEL

DIRECTORES DE TESIS:

DR. FEDERICO ÁVILA MORENO
DRA. LUZ MARÍA BARAJAS FARIAS



MÉXICO D.F. ABRIL, 2011

CÓMITÉ TUTORIAL:

Dra. Paula Figueroa Arredondo.(PIBIOM)

Dra. Laurence A. Marchat M. (PIBIOM)

Dr. Absalom Zamorano Carrillo. (PIBIOM)



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 4 del mes de Abril del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMyH para examinar la tesis titulada:

Identificación de los blancos génicos, asociados al factor transcripcional mesenchyme homeobox 2 (Meox2) en cáncer pulmonar

Presentada por el alumno:

Armas
Apellido paterno

López
Apellido materno

Leonel
Nombre(s)

Con registro:

A	0	9	0	0	0	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

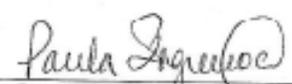
Directores de tesis


Dr. Federico Avila Moreno


Dra. Luz María Barajas Farias


Dr. Laurence A. Marchal M


Dr. Absalom Zamorano Carrillo


Dra. Paula Figueroa Arredondo

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES




SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA
Y HOMEOPATÍA
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 4 del mes Abril del año 2011, el (la) que suscribe Leonel Armas López alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular con número de registro A090006, adscrito a la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Federico Ávila Moreno y cede los derechos del trabajo intitulado Identificación de los blancos génicos, asociados al factor transcripcional mesenchyme homeobox 2 (MEOX2) en cáncer pulmonar, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: leon_zeta11@hotmail.com, avilamore@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Q.F.B. Leonel Armas López

El trabajo experimental de esta tesis fue realizado en:

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), Ismael Cosío Villegas, Unidad de Investigación, Departamento de Investigación en Bioquímica.

Universidad Nacional Autónoma de México, FES-Iztacala. División de Investigación y Posgrado. Unidad de Biomedicina (UBIMED), Laboratorio 12.

ENMyH, Sección de Posgrado e investigación Programa de Posgrado en Biomedicina Molecular. Laboratorio 2

Bajo la dirección principal del doctor Federico Ávila Moreno profesor titular por la UNAM-FES-Iztacala, UBIMED en colaboración con el INER, y la doctora Luz María Barajas Farias profesora de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación del Programa Institucional de Biomedicina Molecular de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía (ENMyH) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

El financiamiento del presente proyecto fue obtenido a través del presupuesto otorgado por la Dirección de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias INER. UNAM, FES-Iztacala, DIP-UBIMED. Así como, la Secretaria de Investigación y Posgrado (SIP-IPN) y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (Proyecto CONACYT Investigación básica: 53643, como responsable principal Dr. Federico Ávila Moreno).

Se contó con beca de Maestría otorgada por el consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (becario CONACYT: 226096), así como en la modalidad de participante-becario de proyecto de investigación básica Conacyt-53643, con número de registro: 13194. Adicionalmente se agradece el apoyo de terminación brindado al estudiante Armas López, en el marco de la convocatoria UNAM, DGAPA-IACOD-2011, FES-Iztacala-UBIMED, con número de solicitud: I1201611.

Por otro lado, como becario del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional (No. De proyectos SIP-20090802 y SIP-20101060).

Adicionalmente el presente trabajo agradece el apoyo otorgado por el laboratorio de Genómica de la unidad de investigación del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), a cargo del Dr. Carlos Pérez Plasencia, por el asesoramiento en el desarrollo de ensayos de hibridación en micro-arreglos de DNA.

Así mismo, al laboratorio de Oncología Molecular a cargo de la Dra. Patricia Piña Sánchez, por el entrenamiento y asesoría en el desarrollo de micro-arreglos de tejidos y ensayos de inmunohistoquímica.

Dedicatorias:

A mi tutor el Dr. Federico Ávila Moreno que ha sido mi padre académico ayudándome con sus consejos, opiniones, regaños, por esa paciencia que a veces agoto, pero que a final de cuentas es un excelente tutor y amigo.

A la Dra. Luz María Barajas Farias, por sus opiniones aportadas a la tesis.

A la Dra. Paula Figueroa Arredondo parte de mi comité tutorial por sus consejos aportados para la realización de esta tesis.

A la Dra. Laurence A. Marchat M. por sus consejos y opinión no solo en cuanto a la tesis, si no también por sus consejos personales que en algún momento me ayudaron en el curso de mi maestría.

Dr. Absalom Zamorano Carrillo, miembro de mi comité tutorial por apoyarme durante todo el proyecto de investigación y la realización de esta tesis.

Agradecimientos:

A mis padres que me dieron la vida, y a pesar de la distancia que nos separa nunca estuve solo, siempre me apoyaron con sus consejos,

A mi tía Car, mi segunda madre por brindarme todo el apoyo que necesitaba en el momento indicado, por compartir tantas experiencias familiares y sobre todo por compartir su vida conmigo.

A mi ángel negro, como lo dije una vez “La sangre es más pesada que el agua” y nunca dejaras de ser mi hermano.

A Pily y Laura, mis compañeras, por esos días de felicidad y por los consejos personales que me sirvieron de mucho.

A la Dra. Mónica de Nova una excelente persona, sincera y comprensible, por sus consejos y todo el tiempo que me dedicaba para escucharme y orientarme tanto en el ámbito académico como en lo personal.

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS	12
INDICE DE FIGURAS	13
INDICE DE TABLAS	14
INDICE DE GRAFICAS	15
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	16
RESUMEN	18
ABSTRACT	21
1 INTRODUCCIÓN	23
1.1 CÁNCER PULMONAR	23
1.2 GENÓMICA EN CÁNCER PULMONAR	25
1.3 EPIGENETICA EN CÁNCER	27
2 ANTECEDENTES	31
2.1 EPIGENÓMICA Y MARCADORES EPIGENÉTICOS EN CÁNCER PULMONAR	31
2.2 GENES HOMEBOX (HOX) EN CÁNCER PULMONAR	34
2.3 BLANCOS GÉNICOS REGULADOS POR EL FACTOR TRANSCRIPCIONAL MESENCHYME HOMEBOX 2 (<i>MEOX2</i>) EN CÁNCER PULMONAR	36
3 JUSTIFICACIÓN	37
4 OBJETIVOS	38
4.1 OBJETIVO GENERAL	38
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	38
5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	39
6 MATERIALES Y MÉTODOS	40
6.1 CULTIVOS CELULARES	40
6.2 SELECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE TEJIDO PULMONAR DE PACIENTES	41
6.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	41
6.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	41

6.3	FRAGMENTACIÓN E INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (ChIP)	42
6.3.1	ENTRECRUZAMIENTO Y FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA DE MUESTRAS DE TEJIDO SÓLIDO PARA ChIP	43
6.3.2	FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA POR SONICACIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS	44
6.3.3	PURIFICACIÓN DEL DNA SONICADO POR FENOL:CLOROFORMO	44
6.3.4	INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA ChIP	45
6.3.5	ELUCIÓN DEL COMPLEJO Y REVERSIÓN DEL ENTRECRUZAMIENTO	46
6.3.6	PURIFICACIÓN DEL DNA-IP	46
6.4	CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN <i>GADPH</i>	47
6.5	AMPLIFICACIÓN GENÓMICA LINEAL (WHOLE GENOME AMPLIFICATION "WGA")	48
6.5.1	PROCEDIMIENTO DE AMPLIFICACIÓN DEL MÉTODO, WGA1	49
6.5.2	PREPARACIÓN DE LA BIBLIOTECA	49
6.5.3	AMPLIFICACIÓN	50
6.6	PROCEDIMIENTO DE RE-AMPLIFICACIÓN, WGA3	51
6.7	ChIP ON chip MICROARREGLOS DE DNA DE ALTA RESOLUCIÓN (3X720K REFSEQ) NIMBLEGEN-ROCHE	52
6.7.1	MARCAJE FLUORESCENTE DEL DNA-IP CON NIMBLEGEN DUAL COLOR	54
6.7.2	PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DEL DNA-IP	55
6.7.3	HIBRIDACIÓN DEL MICROARREGLO	56
6.7.4	LAVADO DEL MICROARREGLO	57
6.7.5	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	58
6.8	SELECCIÓN DE GENES BLANCO DE <i>MEOX2</i>	59
6.9	ENSAYOS DE VALIDACIÓN POR PCR TIEMPO REAL	59

6.9.1	DISEÑO DE PRIMERS	59
6.9.2	CONDICIONES DE PCR EN TIEMPO REAL DE LOS GENES <i>EVX1, MEOX2, TWIST1 Y C-FOS</i>	60
6.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	61
7	RESULTADOS	62
7.1	SELECCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	62
7.2	ANÁLISIS POR INMUNOHISTOQUÍMICA DE <i>MEOX2</i> EN LÍNEAS CELULARES Y CARCINOMAS SÓLIDOS PULMONARES TIPO AD	65
7.3	DESARROLLO DE MÉTODOS DE FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA A PARTIR DE MUESTRAS DE LÍNEAS CELULARES Y CARCINOMAS SÓLIDOS PULMONARES	67
7.4	INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA A PARTIR DE CARCINOMAS SÓLIDOS PULMONARES TIPO AD	70
7.5	PRUEBA DE CALIDAD DE LOS SEGMENTOS DE DNA-IP MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DEL PROMOTOR (CONTROL ENDOGENO) DEL GEN <i>GADPH</i>	72
7.6	AMPLIFICACION DE LOS SEGMENTOS DNA-IP POR WGA 1	74
7.7	RE-AMPLIFICACION DEL DNA-IP POR EL MÉTODO WGA 3	77
7.8	HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA EN MICROARREGLOS DE SECUENCIAS PROMOTORAS (3X720K, NIMBLEGEN, ENSAMBLE HG18)	80
7.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL MICROARREGLO 3X720K	81
7.10	ANÁLISIS DE POSIBLES BLANCOS GENÉTICOS ASOCIADOS AL FACTOR TRANSCRIPCIONAL <i>MEOX2</i>	85
7.11	ENSAYOS DE VALIDACIÓN CUANTITATIVA SOBRE SECUENCIAS PROMOTORAS DE LOS GENES <i>MEOX2, EVX1, TWIST1 Y C-FOS,</i> COMO SECUENCIAS BLANCO DE <i>MEOX2</i>	95
7.12	BLANCOS GÉNICOS DE <i>MEOX2</i> IDENTIFICADOS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE ChIP ON chip EN MICROARREGLOS DE PROMOTORES DE NIMBLEGEN 3X720	103
8	DISCUSIÓN	105

9 CONCLUSIONES	113
10 PERSPECTIVAS	114
11 BIBLIOGRAFÍA	115
12 ANEXOS	122
12.1 DISEÑO DE PRIMERS DEL GEN <i>EVX1</i>	122
12.2 DISEÑO DE PRIMERS DEL GEN <i>MEOX2</i>	123
12.3 DISEÑO DE PRIMERS DEL GEN <i>TWIST1</i>	124
12.4 BLANCOS GÉNICOS DE <i>MEOX2</i> IDENTIFICADOS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE CHIP ON chip EN MICROARREGLOS DE PROMOTORES DE NIMBLEGEN 3X720	126

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Medio de cultivo	40
Cuadro 2. Buffer de lisis	43
Cuadro 3. Condiciones de fragmentación de la cromatina	44
Cuadro 4. Condiciones de PCR en tiempo final para <i>GADPH</i>	47
Cuadro 5. Condiciones de amplificación (WGA1)	50
Cuadro 6. Condiciones de amplificación (WGA3)	51
Cuadro 7. Condiciones de marcaje (NimbleGen Dual Color)	54
Cuadro 8. Condiciones de Master mix para el marcaje	54
Cuadro 9. Preparación de las muestras previas a hibridar	56
Cuadro 10. Preparación, buffers de lavado de NimbleGen	57
Cuadro 11. Diseño de primers	60
Cuadro 12. Condiciones de PCR en tiempo real para <i>Evx1</i>, <i>Meox2</i>, <i>Twist1</i> y <i>C-fos</i>	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flujo de trabajo para el análisis de ChIP-chip NimbleGen	53
Figura 2. Formato de 3X720K arreglos NimbleGen	56
Figura 3. Morfología macroscópica de líneas celulares de cáncer de pulmón tipo adenocarcinoma	62
Figura 4. Inmunohistoquímicas anti-<i>Meox2</i> en las distintas líneas celulares	65
Figura 5. Análisis por inmunohistoquímica empleando anticuerpos anti-<i>Meox2</i> en las distintas fases de la progresión neoplásica pulmonar	66
Figura 6. Fragmentación de la cromatina de muestras biológicas de cáncer pulmonar tipo AD	67
Figura 7. Fragmentación de la cromatina de muestras de tumores sólidos de carcinomas pulmonares de pacientes tipo AD	69
Figura 8. Amplificación por PCR de la región promotora del gen <i>GADPH</i> (Prueba de calidad del DNA-IP)	73
Figura 9. Amplificación lineal del DNA genómico correspondiente al DNA-IP por el método WGA1	75
Figura 10. Amplificación lineal del DNA genómico correspondiente al DNA-IP/WGA1 por el método WGA3	78
Figura 11. Resultado de hibridación genómica en microarreglos 3X720K, NimbleGen-Roche	80
Figura 12. Alineamiento del microarreglo 3X720K de NimbleGen, Roche	81

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de cultivo celular	63
Tabla 2. Relación de pacientes con cáncer pulmonar de tipo Adenocarcinoma	64
Tabla 3. Valores de cuantificación de DNA inmunoprecipitado	71
Tabla 4. Valores de cuantificación del DNA-IP amplificado por WGA1	76
Tabla 5. Valores de cuantificación del DNA-IP/WGA1 amplificado por el método WGA3	79
Tabla 6. Características de regiones blanco de <i>Meox2</i> para ensayos de validación cuantitativa	86
Tabla 7. Selección de genes blanco de <i>Meox2</i> con actividad de regulación epigenética y transcripcional en carcinomas pulmonares	104

INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Segmentos o picos de fluorescencia que representan secuencias del DNA de promotores asociados a <i>Meox2</i>	82
Grafica 2. Segmentos o picos de fluorescencia que representan secuencias del DNA de promotores asociados a <i>RNA POL II</i>	82
Grafica 3. Segmentos o picos de fluorescencia que representan secuencias del DNA de promotores bajo el análisis de obtención de índice (Ratio) de fluorescencia entre ambos canales (<i>Meox2 / RNA Pol II</i>)	83
Grafica 4. Resultado de análisis por CGH de ambos canales de fluorescencia por separado para DNA-IP de <i>Meox2</i> (señal superior) y DNA IP de <i>RNA Pol II</i> (señal inferior), genoma completo.	84
Grafica 5. Ubicación del gen <i>Meox2</i> en el cromosoma 7, región 7p 21.1	87
Grafica 6. Ubicación del gen <i>Evx1</i> en el cromosoma 7, región 7p 15.2	89
Grafica 7. Ubicación del gen <i>Twist1</i> en el cromosoma 7, región 7p 21.1	91
Grafica 8. Ubicación del gen <i>C-fos</i> en el cromosoma 14, región 14q 24.3	93
Grafica 9. Análisis cuantitativo mediante amplificación por PCR para la secuencia promotora del gen <i>Evx1</i> en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD	95
Grafica 10. Análisis cuantitativo mediante amplificación por PCR para la secuencia promotora del gen <i>Meox2</i> en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD	96
Grafica 11. Análisis cuantitativo mediante amplificación por PCR para la secuencia promotora del gen <i>Twist1</i> en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD	97
Grafica 12. Análisis cuantitativo mediante amplificación por PCR para la secuencia promotora del gen <i>C-fos</i> en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD	98
Grafica 13. Análisis cuantitativo del promotor del gen <i>Evx1</i> por factor de riesgo	99
Grafica 14. Análisis cuantitativo del promotor del gen <i>Meox2</i> por factor de riesgo	100
Grafica 15. Análisis cuantitativo del promotor del gen <i>Twist1</i> por factor de riesgo	101
Grafica 16. Análisis cuantitativo del promotor del gen <i>C-fos</i> por factor de riesgo	102

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AD	Adenocarcinoma
ATCC	American Type Culture Collection
CGH	Hibridación Genómica Comparativa
ChIP	Inmunoprecipitación de Cromatina
CNV	Variación de número de copias
CpG	Citosina – Guanina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA IP	Ácido desoxirribonucleico Inmunoprecipitado
DNMT's	DNA metil transferasas
dNTP's	Desoxiribunucleótidos trifosfato
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Evx1	Even skipped homeotic
Ezh2	Histone-lysine N-methyltransferase
FDA	Food and Drug Administration
FDR	Tasa de Falsos Descubiertos (Positivos)
GADPH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
Gax	Growth arrest-specific homeobox
GFF	General Feature Format
GSTMI	Glutation S-Transferasa
HAT	Histona acetil-transferasas
HCl	Ácido clorhídrico
HDAC	Desacetilasas de histonas
Hhex	Hematopoietically expressed homeobox
HMT's	Histona metil-transferasas
Hox	Homeobox
H3K4me3	Histona 3 Lisina 4 trimetilada
IgG	Inmunoglobulina Tipo G
IT	Índice Tabaquico
INK4a	Inhibidor de Ciclina dependiente de Cinasa 4

MeCP2	Methyl CpG binding protein 2
MBD	Proteínas con Domiions de Unión a grupos Metilo
Meox	Mesenchyme homeobox
MgSO₄	Sulfato de Magnesio
MIRA	Ensayos de recuperación de islas CpG metiladas
MS-HRM	Curvas de alta resolución sensibles a metilación
NaCl	Cloruro de Sodio
ncRNAs	Ácido ribonucleico no codificantes
NSCLC	Carcinomas Pulmonares de Células No-Pequeñas
PBS	Buffer salino-fosfato
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Prox	Prospero-related homeobox
Prx	Paired-related homeobox
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SCLC	Carcinomas Pulmonares de células-pequeñas
SCC	Caricnomas de células escamosas o epidermoides
SDS	Dodecil sulfato sódico
SNP´s	Polimorfismos genéticos de una sola base
siRNAs	Ácido ribonucleico interferentes
Tm	Temperatura media
TN-C	Tenancina-C
VSMCs	Células Vasculares de Músculo Liso
WGA	Amplificación Total del Genoma

RESUMEN

Introducción:

Recientemente se ha descrito variación en el número de copias y sobre-expresión del factor transcripcional *Meox2* en la progresión neoplásica pulmonar. Sin embargo, actualmente se desconoce la participación de *Meox2* en los procesos de transformación y progresión neoplásica pulmonar. La identificación de los posibles blancos génicos transcripcionales de *Meox2* en pacientes con cáncer pulmonar, permitirá describir y proponer posibles vías de activación transcripcional orquestadas por *Meox2*, debido a su alta expresión desde etapas tempranas de la progresión neoplásica pulmonar, posiblemente consolidándose como marcador temprano y/o blanco transcripcional central o terapéutico del cáncer pulmonar.

Objetivo:

Identificar los posibles blancos génicos, asociados al factor transcripcional *Meox2* en cáncer pulmonar.

Materiales y métodos:

Fueron utilizadas 4 líneas celulares de cáncer pulmonar y 10 muestras de carcinomas pulmonares sólidos, derivadas de pacientes con diagnóstico definitivo de cáncer pulmonar tipo Adenocarcinoma. En ambos casos, tanto líneas celulares como tumores sólidos en fresco fueron derivados de pacientes mestizos mexicanos, bajo atención médica en el INER. A partir de dichas muestras de tejido, se llevó a cabo la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina “ChIP-on-chip”. A partir de lo cual aquellos segmentos genéticos inmunoprecipitados (IP) fueron verificados en su calidad del DNA mediante amplificación por PCR de la región promotora del gen *GADPH*, considerado como gen control. Posteriormente los DNA-IP de pacientes fueron amplificados y re-amplificados mediante métodos WGA1 y WGA3, respectivamente. De este modo, muestras DNA-IP fueron marcadas diferencialmente por fluorescencia e hibridadas en microarreglos de promotores en formato 3X720 NimbleGen-Roche. Posterior a ello, regiones génicas de interés fueron validadas cuantitativamente por PCR en tiempo real. Así como análisis de validación cuantitativa de blancos de *Meox2* y su posible asociación a factores de riesgo fueron realizados.

Resultados:

Se identificó la presencia del factor transcripcional *Meox2* en núcleo tanto en líneas celulares como en carcinomas pulmonares sólidos tipo AD. *Meox2* se deslocaliza de núcleo en líneas celulares tipo AD, en forma contacto-dependiente en cultivos *in vitro*. Mientras que, en las neoplasias sólidas pulmonares tipo AD su localización es mayoritaria a nivel nuclear. El análisis cuantitativo de ciertos blancos génicos del factor transcripcional *Meox2*, indica el aumento en la interacción con su propio promotor de *Meox2*, así como *Evx1* y *Twist1*, en contraste del nivel de interacción de *Meox2* con el promotor *C-fos*, incluido en el estudio como una secuencia promotora control o endógena.

El análisis cuantitativo para las secuencias promotoras blanco de *Meox2* como el propio promotor de *Meox2* y *EVX1* indican mayor amplificación del DNA-IP cuando se inmunoprecipita *Meox2*, comparado al inmunoprecipitar *RNA Pol II*, e incluso estadísticamente significativo al comparar pacientes bajo exposición a humo de leña de aquellos pacientes libres de factores de riesgo. Mientras que la amplificación cuantitativa para el promotor del gen *Twist1* aumenta en ambos grupos de pacientes tanto exposición a humo de leña, como pacientes libres de factores de riesgo.

Lo cual sugiere que *Meox2* interacciona y regula en distinto grado a diferentes factores de transcripción, incluyendo genes Homeobox relacionados como el mismo *Meox2* y *Evx1*; así como, otro tipo de factores de transcripción como *Twist1*, en contraste de *C-fos* como gen endógeno control, el cual no se observa aumentado. Adicionalmente fueron identificados cerca de 145 nuevos blancos génicos asociados a *Meox2*, con una alta predicción estadística (FDR=0) de interacción física proteína-promotor, de un total de 5,577 (FDR \leq 0.2) blancos génicos identificados.

Conclusión:

La exposición a factores de riesgo ambientales como el humo de leña incrementa la interacción transcripcional por blancos génicos regulados por *Meox2* sobreexpresado en carcinomas pulmonares tipo adenocarcinoma. Sugiriendo además

que *Meox2* auto-regula su propia expresión genética, así como la regulación de distintas vías de regulación transcripcional, entre ellas, genes Homeobox relacionados, factores con dominios dedos de zinc, DNA metil-transferasas y receptores nucleares, así como clusters de micro-RNAs implicados en cáncer pulmonar principalmente incrementados, cuando existe exposición a factores de riesgo ambientales, entre ellos humo de leña y muy posiblemente humo de tabaco.

ABSTRACT

Recently described copy number variation and overexpression of the transcription factor *Meox2* in lung cancer progression. However, currently is unknown *Meox2* participation in the processes of transformation and human lung tumor progression. The identification of potential target genes for *Meox2* as transcriptional factor in lung cancer patients, would describe and propose possible signaling pathways *Meox2* orchestrated by transcriptional activation due to its high *Meox2* expression since early stages of lung tumor progression, as one possible early gene marker or central transcriptional or as gene target therapy for lung cancer.

Objective:

Identify potential gene targets, for transcriptional factor *Meox2* in lung cancer patients.

Materials and methods:

Were used 4 lung cancer cell lines and 10 samples of solid lung carcinomas, derived from patients with definite diagnosis of adenocarcinoma type lung cancer. In both cases, solid tumors and cell lines were derived from Mexican mestizian patients under medical care at the INER. From these tissue samples was carried out by the technique of chromatin immunoprecipitation “ChIP-on-chip”. From those gene segments which immunoprecipitates (IP), were tested in DNA quality by PCR assays confirmation based in use of *GADPH* gene promoter region, considered as gene control.

Subsequently, the DNA-IP patients were amplified and re-amplified using both methods WGA3 and WGA1, respectively. Thus DNA-IP samples were labeled by differentially fluorescence and hybridized on microarray format promoters 3X720 NimbleGen-Roche.

Following this, probably gene target regions for *Meox2* were validated by quantitative real-time PCR. Validation and quantitative analysis for *Meox2* gene targets and their possible association with risk factors were performed.

Results:

We identified the presence of the transcription factor *Meox2* in nucleus in both lung cancer cell lines and lung carcinomas solid hitological type AD. *Meox2* is moving-

out from nucleus in AD type cell lines in contact-dependent manner *in vitro* cultures.

While in solid lung AD *Meox2* location is preferentially in the nucleus. The quantitative analysis of selected gene targets for the transcription factor *Meox2* indicates the increased interaction with its own promoter *Meox2*, *Evx1* and *Twist1* in contrast the level of interaction between *Meox2* protein and *C-fos* promoter, included in present study as gene promoter sequence control.

The quantitative analysis for *Meox2* and *Evx1* promoter sequences, indicates greater amplification for DNA-IP obtained for transcriptional factor *Meox2*, compared to immunoprecipitate *RNA Pol II*, and even statistically significant when comparing patients under exposure to wood smoke patients and free risk factors. While the quantitative amplification for gene promoter *Twist1* increases in both group patients wood smoke exposure and free risk factor patients.

All these suggests that *Meox2* interacts and regulates in different degrees for other transcription factors, including homeobox genes related as the same *Meox2* and *Evx1*, as well as, other transcription factors such as *Twist1*, in contrast to *C-fos* as endogenous control gene, which is not observed increased. Additionally were identified around 145 new gene targets associated with *Meox2*, with high statistical prediction (FDR= 0) of physical interaction protein-promoter, a total of 5,577 (FDR <0.2) identified gene targets.

Conclusion:

Exposure to environmental risk factors such as wood smoke increases the interaction transcriptional targets regulated by *Meox2* gene over-expressed in lung adenocarcinomas. *Meox2* further suggesting that self-regulates its own gene expression and regulation of different transcriptional regulatory pathways, including Homeobox genes related, zinc finger transcription factors, DNA methyl-transferases and nuclear receptors, as well as micro-RNAs clusters primarily increased and involved in lung cancer when there is exposure to environmental risk factors, including wood smoke, and quite possibly tabaquism exposure.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER PULMONAR

El cáncer de pulmón como la mayoría de las neoplasias malignas es una enfermedad multifactorial, resultado de la suma de exposición a factores de riesgo tanto, químicos, físicos, ambientales e incluso genéticos, reflejado en la desregulación de procesos celulares como la proliferación celular, evasión de la apoptosis, des-diferenciación celular, procesos de invasión y/o metástasis (Douglas H., *et al.* 2000).

El cáncer pulmonar se conforma por un grupo de neoplasias de tipo epitelial llamados carcinomas, los cuales en su mayoría muestran un comportamiento maligno. Los cuales se clasifican en función de su tamaño y origen celular histopatológico. Los carcinomas pulmonares de células no-pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés) representan cerca del 80% de los casos, mientras que los carcinomas de células pequeñas (SCLC), representan entre 15-17% del total de casos por cáncer pulmonar (Travis WD., *et al.* 1995; Raz DJ., *et al.* 2006; Rosti G., *et al.* 2006; Collins LG., *et al.* 2007).

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por neoplasias malignas en todo el mundo con más de 1 millón de muertes por año. No obstante dicha enfermedad puede ser controlada, si esta se detecta en etapas tempranas (Sun S., *et al.* 2007; Jemal A., *et al.* 2008), tanto asociado a pacientes bajo exposición al tabaquismo, ex-fumadores como pacientes no fumadores (Hackshaw AK., *et al.* 1997; Subramanian J., *et al.* 2007).

Aunque el tabaquismo sea la causa principal del desarrollo de carcinomas pulmonares, aproximadamente el 25% de todos los casos de cáncer de pulmón en el mundo no son atribuibles a la exposición al humo de tabaco, lo que representa la 7a causa de muerte por neoplasias malignas con mas 300,000 muertes cada año. Existen notables diferencias en el cáncer de pulmón no asociado a tabaquismo comparado con aquellos que están expuestos al humo de tabaco, esto se ve reflejado en las características epidemiológicas, clínicas y moleculares de cada carcinoma, el tipo histopatológico asociado al tabaquismo es el cáncer de

células escamosas (SCC) mientras que el de tipo adenocarcinoma (AD) esta asociado al cáncer de pulmón no asociado al tabaquismo (Sun S., *et al.* 2007).

La evidencia epidemiológica en los años 50's apunta que el cáncer de pulmón de células escamosas tenia una alta incidencia cerca del 80% sobre todo en el genero masculino, sin embargo en el siglo XXI la incidencia del cáncer pulmonar es diferente pues el genero femenino como masculino se ven afectados y predomina el tipo histopatológico adenocarcinoma, así como pacientes con cáncer pulmonar no asociado a tabaquismo (Toh CK., 2009).

En relación a pacientes no-fumadores, la aparición del cáncer de pulmón es el probable resultado de la combinación entre otros factores, aquellos de tipo genético, hormonales, virales y ambientales como exposición a gas Radón, microfibras de asbesto, contaminantes metálicos, volátiles, etc., (Catelinois O., *et al.* 2006; Coyle YM., *et al.* 2006; Gorlova OY., *et al.* 2007; Sun S., *et al.* 2007; O'Reilly KM., *et al.* 2007).

El diagnóstico tardío del cáncer de pulmón y la ausencia de un tratamiento terapéutico eficaz es considerada como la principal causa del aumento sostenido en la tasa de mortalidad (Collins LG., *et al.* 2007). En ese sentido, el cáncer de pulmón en estadios tempranos puede ser tratado mediante intervención quirúrgica curativa en alrededor del 20-40% de los casos, mientras que en estadios avanzados la única opción principalmente paliativa es radioterapia y quimioterapia (Seo JB., *et al.* 2001; Tammemagi CM., *et al.* 2004; Azim HA., *et al.* 2007).

Existen alteraciones de carácter genético en cáncer pulmonar, entre las que destacan mutaciones, polimorfismos genéticos de una sola base (SNP's), perdida de la heterocigosidad, aberraciones cromosómicas: ganancias, amplificaciones, y deleciones así como la variación en el número de copias (CNV) que probablemente conlleven a la transformación neoplásica pulmonar (Rodenhiser D., *et al.* 2006).

Estos cambios estructurales conllevan al silenciamiento de genes supresores de tumor y/o activación de oncogenes, que se ven reflejados en el cáncer pulmonar por eso esta patología multifactorial es causada por la exposición ambiental, los factores genéticos e incluso aquellos de tipo heredo-familiar, que muestran su

efecto en la susceptibilidad del cáncer pulmonar, como ha sido descrito para el locus citogenética 6q23-25 en cáncer broncogénico (Matakidou A., *et al.* 2005).

Un ejemplo de esto son los polimorfismos en el citocromo P450 1:1 (CYP1A1) tales como (1462V) los cuales se han observado en pacientes no-fumadoras, el cual es homocigoto para en pacientes con supresión de Glutation S-Transferasa (GSTMI) debido al genotipo GSTM-I NULO, este genotipo aumenta el riesgo de 2-4 veces desarrollar cáncer pulmonar (Hung R.J., *et al.* 2003)

Otro genes de gran importancia estudiados en cáncer pulmonar son: *XRCC1*, *XRCC3*, *ERCCZ*, *ERCC1*, *ERCC2*, *OGGI* y *XPA* que se ven directamente involucrados en la reparación al daño del DNA, los cuales han sido asociados al cáncer broncogénico (Zhou W., *et al.* 2003)

Lo anterior, se explica la falta de marcadores de diagnóstico temprano, por lo que muchos esfuerzos en la actualidad se enfocan a la identificación de marcadores tanto genéticos como epigenéticos que permitan una mayor solidez al abordaje terapéutico a los pacientes con cáncer pulmonar, entre ellas destacando la genómica.

1.2 GENÓMICA EN CÁNCER PULMONAR

El cáncer pulmonar permanece como la primera causa de muerte por neoplasias malignas a nivel mundial. A la fecha se desconocen el conjunto de factores que inducen los primeros cambios en la transformación neoplásica pulmonar (Sun S., *et al.* 2007; Jemal A., *et al.* 2008).

Sin embargo, diversos estudios previos han planteado que el cáncer de pulmón es la suma de anormalidades genéticas y cambios epigenéticos, entre otros en oncogenes, genes supresores de tumor y genes reparadores del daño al DNA (Salgia R., *et al.* 1998). Dichas anormalidades se ven reflejadas en la inactivación de genes supresores de tumor e hiperactividad de oncogenes, así como deficiencias en los mecanismos de reparación del DNA durante la replicación, lo cual promueve el crecimiento y proliferación celular. Estas alteraciones han dado lugar a la búsqueda continua de marcadores genéticos. Tales aproximaciones

constituyen en la actualidad los principales objetivos para la detección temprana, la prevención y tratamiento oportuno del cáncer de pulmón (Fong KM., *et al* 2003).

A este respecto, se ha logrado demostrar la activación de oncogenes en el tejido neoplásico pulmonar. Algunos de ellos, comprenden la amplificación y aumento en el número de copias de los oncogenes *myc* en tumores SCLC, mutaciones puntuales en regiones que codifican para el oncogén *Ras* en NSCLC en particular del tipo adenocarcinoma (Aviel-Ronen S., *et al.* 2006).

Adicional a lo anterior, mediante hibridación genómica comparativa (CGH) se han identificado y propuesto alteraciones genéticas tempranas de la progresión neoplásica pulmonar en tumores tipo adenocarcinoma, tales como aumento en el número de copias (CNV) de genes localizados en el locus 7q21.3-q22, entre ellos *SERPINE1* involucrado en la migración celular y posiblemente la metástasis, *GNB2* que codifican para la sub-unidad β de proteína G, el cual promueve la progresión y metástasis en distintos tipos de tumor incluyendo los del grupo NSCLC; otro gen que destaca es *STI3* involucrado en la progresión neoplásica. Todos ellos, se ha propuesto que a mayor aumento de CNV los pacientes con cáncer pulmonar cursan con mal pronóstico y pobre supervivencia (Aviel-Ronen S., *et al.* 2008). Sin embargo estos resultados, no han sido validados como posibles marcadores de diagnóstico temprano; así como potenciales blancos terapéuticos en cáncer pulmonar.

Por otro lado, recientemente se han identificado micro-aberraciones estructurales del DNA o CNV, así como epigenéticos y de sobre-expresión de genes posiblemente involucrados en etapas tempranas de la progresión neoplásica pulmonar. Entre ellas, destacan genes ubicados en las regiones sub-teloméricas 7p21.3, 7p21.1, 7p15.3. las cuales muestran cierto grado de correlación entre aumento de CNV, con aumento en la expresión génica (RNA y proteína). (Limón RD., *et al.* 2011).

Adicional a ello, mediante técnicas de análisis masivo del genoma como la secuenciación masiva del DNA y microarreglos de DNA, se ha podido identificar mediante el estudio de 200 muestras de distintas neoplasias, entre ellas el cáncer de pulmón de células no pequeñas, aberraciones estructurales en el cromosoma 3

como son inserciones y alto nivel de metilación en diversos genes entre ellos: *MINT24*, *BHLHB2*, *RPL15*, *RARbeta1*, *ITGA9*, *RBSP3*, *BVS*, *ZIC4*, sugiriendo su participación en el comportamiento biológico del tumor. La metilación de estos locis genéticos fue confirmada mediante PCR específica de metilación y secuenciación por bisulfito de sodio (Pavlova TV., *et al.* 2009), sugiriendo su probable papel como nuevos marcadores regulados epigenéticamente asociados al diagnóstico y/o tratamiento de carcinomas pulmonares.

1.3 EPIGENÉTICA EN CÁNCER

Como se menciona respecto al estudio del cáncer, otro aspecto importante es el estudio de los mecanismos de regulación epigenética. La epigenética entendida por definición como los cambios heredables en la función génica no-controlados por la secuencia primaria del DNA, es decir, en ausencia de cambios en el marco de lectura de una secuencia lineal del DNA, ya que la regulación epigenética trabaja como un proceso intermediario de regulación y adaptación génica frente a estímulos intra y extra-celulares, es decir bajo mecanismos dinámicos de regulación (Esteller M., *et al.* 2005),

Al respecto, se han descrito varios mecanismos de regulación epigenética, entre los cuales se destacan por Hahm M, y colaboradores 5 mecanismos ordenados de regulación posiblemente involucrados en la progresión del cáncer y que a continuación se describen brevemente:

- 1) La remodelación de la cromatina a partir de su organización básica como los nucleosomas es capaz de estimular la transcripción mediante la modificación tri-dimensional de los mismos presentes en las regiones centrales y contiguas al promotor, lo que permite el acceso de factores de la transcripción al DNA. Las funciones adicionales de la remodelación de nucleosomas incluyen cambios en distintas histonas así como la capacidad de deslizamiento de los nucleosomas.
- 2) Las células de mamíferos expresan tres variantes de la histona H3 tales como: H3.1, H3.2 y H3.3. A este respecto, el enriquecimiento específico de la variante H3.3 es capaz de reclutar amplias regiones reguladoras y genes transcripcionalmente activos; mientras que H3.1 reprime o inactiva elementos

genéticos que sugieren una función reguladora negativa por parte de estas variantes. La variación de histonas también es importante para muchos procesos relacionados con la cromatina. Tales como reparación del daño al DNA, por ejemplo, la presencia de una variante de la histona H2A, H2A.X, sufre modificaciones químicas por fosforilación bajo el escenario de detección de daño al DNA uniéndose a la maquinaria de reparación.

3) Las evidencias recientes sugieren funciones importantes de los RNAs largos no codificantes (ncRNAs) en la regulación transcripcional. La interacción entre enzimas modificadoras de la cromatina con ncRNAs, se ha especulado es capaz de impedir la unión específica a un loci genómico (LCR, Locus Control Region). Un ejemplo bien estudiado es la histona metiltransferasa Ezh2, que se ha demostrado interviene en la interacción con diferentes ncRNAs induciendo la inactivación del cromosoma X y la represión de diversos genes. Los ncRNAs pequeños, por ejemplo los siRNAs y RNA antisentido, también son capaces de llevar a cabo la formación de estructuras que reprimen la cromatina.

4) Las histonas pueden ser modificadas después de la traducción. Las principales modificaciones incluyen la fosforilación, acetilación y metilación. Las combinaciones de diferentes modificaciones en las histonas (código de histonas) representan una huella en la cromatina que son reconocidas por proteínas específicas que median los efectos río abajo. En el contexto de la regulación de la transcripción, la metilación de histonas en las lisinas ha sido particularmente bien caracterizado. Esta modificación genera una gran complejidad de las señales, ya que cada posición de lisina pueden ser mono-(me), di-(me₂), o trimetilada (me₃) y distintas proteínas de unión para cada estado de metilación puede mediar diferentes funciones. Por ejemplo, los dominios de la eucromatina que están transcripcionalmente activos, se caracterizan por la histona H3 lisina 4 trimetilada (H3k4me₃) en la región promotora, mientras que H3k36me₃ se presenta en la región del marco abierto de lectura es decir al interior de la secuencia del gen. Los 2 tipos de heterocromatina lleva acabo distintos patrones de modificación. La heterocromatina facultativa se caracteriza por tener altos niveles de H3k27me₃.

Mientras que, por el contrario la heterocromatina constitutiva contiene una combinación entre H3k9me3 y H4k20me3

5) Las citosinas, en el contexto de dinucleótidos CpG, se pueden metilar en la posición 5 por DNA metil-transferasas. La metilación del DNA es una modificación de represión que se enriquece en las regiones promotoras de los genes y secuencias del DNA no codificantes. Las proteínas con dominios de unión al DNA metilado ("MBD", methyl binding domain) y MeCP2 (methyl CpG binding protein 2) puede unir tramos de DNA metilado y, a su vez recluta complejos co-represores para facilitar el silenciamiento de la transcripción.

El perfil de metilación en distintas neoplasias, se ha reportado con diversas aberraciones tanto en regiones promotoras e islas CpG del DNA genómico, lo cual esto ejerce una serie de eventos negativos, como son aumento en la expresión de oncogenes y disminución en la expresión de genes supresores de tumor (Esteller M., *et al.* 1999).

Estas variaciones dependen del tipo histológico de las células neoplásicas así como del proceso neoplásico, la diferencia en el perfil de metilación dará lugar a eventos de hiper-metilación o hipo-metilación, lo cual contribuirá a la formación de tumores; es por eso, que el estudio del perfil de metilación cobra gran importancia como un proceso celular involucrado en el comportamiento de las células transformadas que integran a las neoplasias; así como, en contribución del diagnóstico, pronóstico y como posibles blancos de terapia epigenética (Schumacher A., *et al.* 2006).

La detección y cuantificación precisa de la metilación heterogénea del DNA es muy difícil, sin embargo existen técnicas como curvas de alta resolución sensibles a metilación (MS-HRM) que es un método habitualmente utilizado para el análisis de la metilación del DNA, aunque esta técnica solo permite identificar zonas metiladas pero no cuantificar, sin embargo la pirosecuenciación con bisulfito se ha utilizado para estimar el nivel de metilación heterogénea mediante el nivel de metilación presente en los di nucleótidos CpG individuales. Combinando estos dos métodos se pueden detectar no solo cualitativamente sino cuantitativamente las

regiones que sufren metilación heterogénea, que estén involucradas en el desarrollo neoplásico (Candiloro IL., *et al.* 2011).

En este mismo sentido la terapéutica clínica se ha enfocado al estudio y desarrollo de inhibidores de moléculas pequeñas, como inhibidores de las enzimas DNMT's o HMT's. Estas moléculas pueden revertir el re-arreglo epigenético y aplicarse en el tratamiento de enfermedades neoplásicas, por ejemplo carcinomas pulmonares, actualmente existen fármacos epigenéticos aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer y alrededor de 10 HDAC's están en desarrollo clínico (Wagner JM., *et al.* 2010)

Sin embargo, la problemática actual es el diagnóstico tardío en los carcinomas pulmonares, por esta razón se han sumado esfuerzos en la búsqueda de marcadores regulados no solo desde el punto de vista genético sino epigenético asociados al diagnóstico temprano y pronóstico de carcinomas pulmonares

2 ANTECEDENTES

2.1 MARCADORES EPIGENÉTICOS EN CÁNCER PULMONAR

Existen varias evidencias sobre la regulación epigenética en cáncer pulmonar, en particular el aspecto de metilación de regiones promotoras se ha observado que existe altos niveles de metilación en los genes p16, *DAPK* (una proteína cinasa asociada a muerte), *RAR-β* (receptor beta del ácido retinoico), que están asociados a los datos clínicos de aquellos pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas y su exposición a factores de riesgo como el consumo de tabaco (Zhang C., *et. al.* 2011).

La metilación de *novio* en islas CpG es un fenómeno común en cáncer. Utilizando microarreglos de alta densidad y ensayos de recuperación de islas CpG metiladas (methylated-CpG island recovery assay, MIRA), se ha podido encontrar que los cuatro clusters de genes *Hox* en los cromosomas 2, 7, 12 y 17, son blanco preferencial de la metilación del DNA en líneas celulares de cáncer y en el cáncer pulmonar en etapas tempranas. Las islas CpG están asociadas a muchos otros genes Homeobox, como son *SIX*, *LHX*, *PAX*, *DLX*, y *Engrailed*, que también están altamente metilados. Más de la mitad (104 de 192) de las islas CpG metiladas, están asociadas a los genes Homeobox en la línea celular A-549 de cáncer pulmonar. El clúster de los genes *HoxA* fue analizado con mayor detalle, y se observó metilación en la histona H3 lisina 4 (*H3k4me*). El análisis de metilación de los genes *HoxA* en carcinomas pulmonares primarios de células escamosas, condujo a la identificación de islas CpG frecuentemente metiladas en tumores de estadio I en los genes *HoxA7* y *HoxA9*. Los genes Homeobox son potencialmente útiles como biomarcadores epigenéticos, para el diagnóstico de carcinomas en estadio temprano (Rauch TA., *et al* 2007).

También se ha observado que los tumores tienen la capacidad de reducir los niveles de metilación del DNA geonómico y aumentar la metilación en islas CpG, sin embargo el proceso que lleva a la hipo-metilación o hiper-metilación aun es desconocido, el cáncer pulmonar de células escamosas se ha estudiado desde este punto de vista, comparando la metilación del tejido neoplásico pulmonar con el tejido normal adyacente. Los tejidos normales de distintos individuos muestran

patrones de metilación del DNA muy similares, mientras que los carcinomas contienen varios cientos de islas CpG hiper-metilados, se han identificado y confirmado 11 islas CpG que se encuentran metiladas en un 80-100% de los tumores de SCC, estos probablemente se consoliden como biomarcadores eficaces para el diagnóstico temprano del cáncer pulmonar (Rauch TA., et al. 2008).

Otro aspecto que se ha evaluado son las modificaciones postraduccionales de distintos ligandos de quimosinas (CXCL1, 2, 8) y sus receptores (CXCR1 / 2) en donde se observa una desregulación en cáncer pulmonar de células no pequeñas en comparación con tejido normal con excepción de CXCL3. CXCL8 y CXCR1 2 que resultan ser epigenéticamente regulada por modificaciones de las histonas después de la traducción (Baird AM., et al. 2011).

Aunque se ha evidenciado que el cáncer pulmonar se desarrolla como resultado de múltiples factores ambientales y genéticos, también se ha demostrado la participación de moduladores epigenéticos, tales como algunos miembros del grupo multiproteico represor llamado Polycomb, el cual regula la expresión de distintas proteínas como son *Bmi1*. El análisis inmunohistoquímico de carcinomas pulmonares ha demostrado mayor presencia de esta proteína en el grupo de tumores SCLC, comparado con NSCLC. Adicionalmente, experimentos *in vitro* indican que el silenciamiento de *Bmi1* suprime de forma significativa la proliferación, formación de colonias, así como tumores *in vivo*. Por otra parte, se ha descrito al gen supresor de tumores *WWOX* como blanco de *Bmi1*. De este modo se propone que *WWOX* posee un papel como gen supresor de tumores mayoritario en el grupo de SCLC, por lo tanto, se propone que la vía de *Bmi1/WWOX* es un nuevo candidato para la terapia del cáncer pulmonar del grupo SCLC (Kimura M., et al. 2011).

Adicionalmente se menciona que existen moléculas responsables del silenciamiento inadecuado así como la sobre-activación de genes, lo cual repercute en el acceso de la maquinaria transcripcional a sus genes blanco, ello a través de modificaciones químicas tanto del DNA, como secuencias de aminoácidos de histonas y proteínas remodeladoras de la cromatina, dichas

modificaciones están mediadas por enzimas tales como DNA metil-transferasas (DNMTs), acetil-transferasas de histonas (*HAT*), desacetilasas de histonas (HDAC), metil-transferasas de histonas (*HMTs*), así como desmetilasas de histonas (Best AM., *et al.* 2011). Alteraciones en los procesos de regulación de tales enzimas conllevan al mal funcionamiento de la célula y eventualmente hacia la progresión neoplásica, lo cual hace importante el estudio de los mecanismos de regulación epigenética en cáncer pulmonar.

Algunos de los mecanismos que se ven afectados en cáncer, afectan la expresión de ciertos genes que participan en el control del desarrollo embrionario, reflejo de un proceso de desdiferenciación celular en cáncer. Algunos de estos genes, son aquellos miembros del grupo de genes *Hox* (Homeobox related genes), los cuales en su mayoría deberían permanecer apagados en etapa adulta, que sin embargo elevan su expresión en cáncer, y el cáncer pulmonar no es la excepción.

Los genes homeobox codifican para una familia de factores de transcripción que juegan un papel decisivo en la embriogénesis y la diferenciación celular. Las proteínas Homeobox se consideran una familia por tener un dominio de unión a proteína (hélice-vuelta-hélice) llamado homeodominio, aparte de este homeodominio los miembros de esta familia comparten un sitio de unión a DNA muy conservado de 60 aminoácidos (García-Fernández J., 2005.). La mayoría de los miembros de esta familia se encuentran dispersos a lo largo de todo el genoma, pero un sub-grupo de los genes Homeobox los genes *Hox* se organizan en clusters. Los genes *Hox* fueron originalmente identificados en *Drosophila* como factores que intervienen en las transformaciones homeóticas, durante la evolución de los mamíferos los antiguos genes *Hox* se sometieron a distintos cambios genéticos, lo que llevó a la aparición de 39 genes *Hox* organizados en 4 clusters (Lewis EB., 1978). Las proteínas *Hox* son reguladores epigenéticos esenciales en el desarrollo celular y posiblemente como blancos terapéuticos en contra de la tumorigénesis

2.2 GENES HOMEBOX (HOX) EN CÁNCER PULMONAR

La participación temprana de genes involucrados en el desarrollo del cáncer pulmonar, ha sido el aumento en la expresión de los genes Homeobox (*Hox*), debido a su principal función como reguladores del desarrollo embrionario, procesos que, se ha demostrado se encuentran desregulados en cáncer. Al respecto se ha puesto en evidencia la participación de la familia de los genes *Hox* en distintas neoplasias, como factores de transcripción lo cuales contienen un dominio de unión a DNA altamente conservado de 60 aminoácidos llamado homeodominio (Douville JM., *et.al.*2007).

Los genes *Hox* han sido estudiados en sus diferentes clusters de genes: *HoxA* ubicados en el cromosoma 7, los genes *HoxB* ubicados en el cromosoma 17, los genes *HoxC* ubicados en el cromosoma 12 y los genes *HoxD* ubicados en el cromosoma 2 (Lewis EB., 1978; Rauch T., *et al.* 2007).

Mientras que otras subfamilias de genes de reciente estudio relacionados con la familia de los genes Homeobox han sido:

Prx (Paired-related Homeobox) necesario para el desarrollo de la arteria pulmonar. Esta función se logra a través de trans-activación de *Prx1* del promotor de Tenascina-C (TN-C), una glicoproteína de la matriz extracelular (Douville JM., *et.al.* 2007). La sobre-regulación de *Prx1* en el cáncer de pulmón se ha propuesto como posible blanco terapéutico, así como a nivel pronóstico (Kim JH., *et al.* 2008).

Prox (Prospero-related Homeobox) el cual se expresa en un subconjunto de células endoteliales que conforman los vasos linfáticos. Lo cual se ha demostrado mediante estudios de mutaciones dirigidas de *Prox* en ratones *Prox1*^{-/-}, a partir de ello en embriones de ratón estos no desarrollan sistema linfático normal, a pesar de que están implicados en la vasculogénesis y angiogénesis (Douville JM., *et.al.* 2007). Adicional a lo anterior, también se ha observado en distintas neoplasias entre ellas, cáncer de colon, mama, melanomas y cáncer pulmonar (Fiedler U., *et al.* 2006)

Hhex (Hematopoietically expressed Homeobox) involucrado en la diferenciación de hemangioblastos en células endoteliales y hematopoyéticas. La expresión de

Hhex además se encuentra implicado en la formación de angioblastos y desarrollo de la red vascular, por lo que se ha propuesto como un marcador temprano de células precursoras endoteliales (Douville JM., *et.al.*, 2007). *Hhex* muestra deslocalización de la proteína en carcinomas de mama, pues en tejido normal se localiza en núcleo y citoplasma, mientras que en el tumor se observa reducción en la fracción nuclear (Puppin C., *et al.*, 2006).

Meox (Mesenchyme Homeobox) regulador clave de la función de las células vasculares. En células vasculares de músculo liso (VSMCs) su expresión se limita a las células senescentes y por esta razón también es conocido como growth arrest-specific Homeobox (*Gax*). Con relación a la expresión de *Meox2* esta, es rápidamente desregulada en respuesta a mitógenos *in vitro* y en lesiones de células endoteliales *in vivo* (Douville JM., *et.al.* 2007). Recientemente se ha observado sobre-expresión en tejido pulmonar fetal y tejido neoplásico pulmonar comparado con tejido pulmonar normal y adyacente a las neoplasias pulmonares (Cortese R., *et al.* 2008).

Recientemente se ha descrito como es regulado funcionalmente *Meox2* a través de mecanismos epigenéticos postranscripcionales, como los miRNAs. Al respecto las evidencias indican que miR-221 induce la sobre expresión de *Meox2*, de manera indirecta desregulando transcripcionalmente al inhibidor de *Meox2*. Dicho inhibidor natural de *Meox2*, es codificado por el gen llamado *SIP1/ZEB2*, conocido como un miembro (*δEF-1*) de la familia que pertenece a los factores nucleares llamados dedos de zinc. Al respecto se sabe que *ZEB2* actúa principalmente como un represor transcripcional, además de identificar y confirmar múltiples sitios de unión *ZEB2* capaces de bloquear la transcripción de *Meox2* (Chen Y., *et al.* 2010).

2.3 BLANCOS GÉNICOS REGULADOS POR EL FACTOR TRANSCRIPCIONAL MESENCHYME HOMEBOX-2 (*MEOX2*) EN CÁNCER PULMONAR

A la fecha son escasos los estudios enfocados al estudio e identificación de los blancos génicos regulados por *Meox2* en cáncer pulmonar.

Las escasas evidencias sobre *Meox2* como regulador transcripcional, indican que *Meox2* regula la activación en forma directa sobre el promotor de *INK4a* como gen supresor de tumores. A este respecto se ha observado la pérdida de la función de este gen en diversos tipos de neoplasias (Ruas M., *et al* 1998; Sherr C.J., 2001). Adicionalmente, se sabe que *INK4a* posee un papel clave en el control del ciclo celular inhibiendo de forma directa a las cinasas dependientes de ciclinas 4 y 6; previniendo la interacción con ciclinas tipo E y D. Siendo de esta forma como *INK4a* impide que la proteína RB sea fosforilada a través del heterodímero de Ciclina E/D con /CDK 4/6. Es decir que en ausencia de fosforilación a través de CDK4/6, sobre RB, esta sigue unida a *E2F1*, lo que impide que el factor *E2F1* sea activado y liberado en la célula como una señal decisiva en la transición de la fase G0/G1 hacia la fase S del ciclo celular y por tanto, promoviendo la replicación celular en cáncer (Irelan J.T., *et al*. 2009).

Existen pocos reportes que señalen el probable papel que *Meox2* pueda estar desempeñando en la progresión histopatológica y clínica de carcinomas pulmonares, dado que además se desconocen con certeza cuales pudieran constituir sus posibles blancos génicos asociados dado su papel transcripcional. Por lo que el presente trabajo pretendió identificar y describir a sus posibles interacciones génicas blanco, además de validar de forma cuantitativa algunos de estos posibles blancos génicos regulados por *Meox2*, ello en el contexto de una posible asociación con factores de exposición ambiental en pacientes con cáncer pulmonar. Basado en lo anterior, es posible evaluar y proponer su posible relevancia oncológica como potencial marcador temprano y/o posible blanco terapéutico en cáncer pulmonar.

3 JUSTIFICACIÓN

Frente al problema actual de salud que representa el cáncer pulmonar debido a su alta incidencia y elevados índices de mortalidad en cáncer de pulmón, recientemente se han diseñado estudios enfocados a la búsqueda de posibles marcadores genéticos que permitan el diagnóstico temprano; sin embargo, tales estudios solo reflejan las alteraciones cromosómicas, genéticas y epigenéticas presentes en etapas avanzadas del cáncer pulmonar, por lo que, no ha sido posible sugerir con mayor certeza algún tipo de marcador genético temprano o nuevos blancos terapéuticos oportunos que por su función, estos permitan el diseño de estrategias en contra de las neoplasias pulmonares.

Recientemente, nuestro grupo ha identificado aumento de CNV del factor transcripcional *Meox2* ubicado en la región subtelomérica 7p21.1, en correlación con aumento de la expresión génica (RNAm y proteína), tanto en lesiones precursoras pulmonares como en tejido neoplásico pulmonar, en contraste de tejido pulmonar histológicamente normal. No obstante son escasos los reportes sobre el papel de *Meox2* en cáncer pulmonar, los antecedentes del grupo sugieren al factor transcripcional *Meox2* como posible marcador temprano en la progresión neoplásica pulmonar y posible blanco terapéutico. Por lo que, la identificación de los posibles blancos genéticos regulados transcripcionalmente por *Meox2*, probablemente permita identificar en su conjunto aquellos probables eventos transcripcionalmente tempranos de la progresión neoplásica pulmonar, lo cual permita incluso proponer o describir nuevos circuitos de regulación nuclear transcripcional o metabólicas ocurridos desde etapas tempranas y/o avanzadas de neoplasias pulmonares. De acuerdo a lo anterior ello probablemente contribuya a mediano plazo a la identificación de nuevos blancos de diagnóstico o tratamiento oportuno, que además permitan un mejor pronóstico de los pacientes con cáncer pulmonar.

4 OBJETIVOS

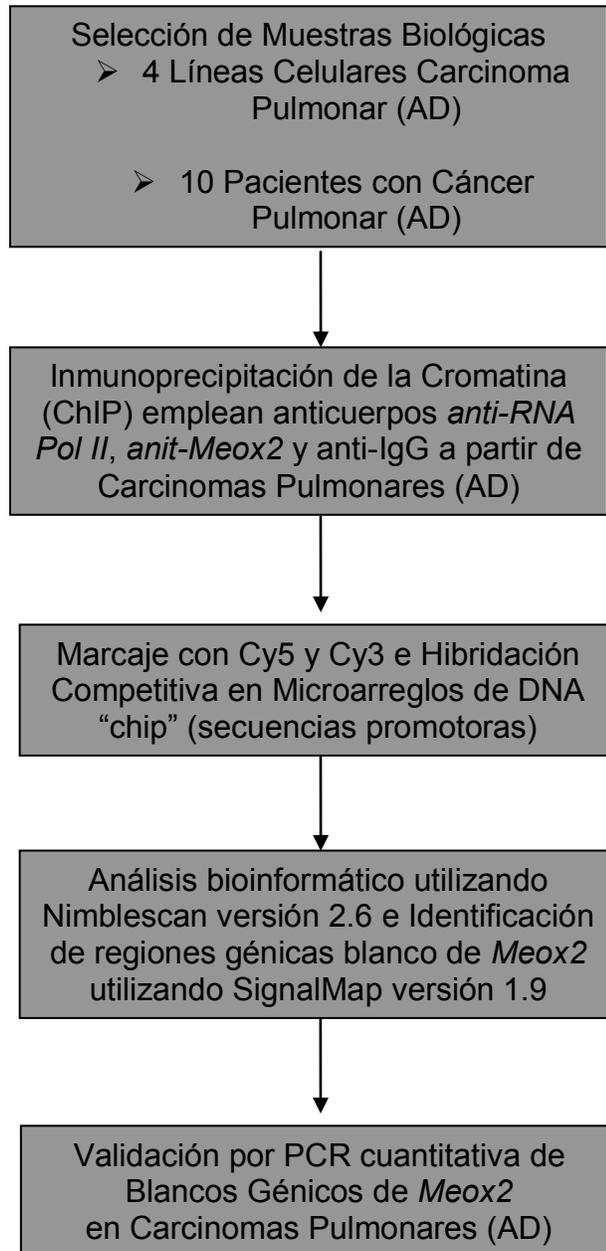
4.1 OBJETIVO GENERAL

- Identificar los posibles blancos génicos, asociados al factor transcripcional *Meox2* en cáncer pulmonar

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la presencia en núcleo de *Meox2* en muestras de pacientes con cáncer pulmonar (líneas celulares y carcinomas pulmonares tipo AD).
2. Desarrollar Fragmentación e Inmuno-Precipitación de la Cromatina (ChIP), anti-*Meox2* y anti-*RNA Pol II*, a partir de líneas celulares y carcinomas sólidos pulmonares tipo AD.
3. Desarrollar Hibridación Genómica Comparativa en micro-arreglos de DNA de secuencias promotoras.
4. Identificar a través de análisis bioinformático regiones génicas blanco de *Meox2* funcionalmente interesantes en muestras de pacientes con carcinomas pulmonares tipo AD.
5. Validar secuencias promotoras de genes de blanco de *Meox2*, asociados con exposición a factores de riesgo ambientales en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD.

5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 CULTIVOS CELULARES

Fueron empleadas 4 líneas celulares de tipo adenocarcinoma para el desarrollo de técnicas de estandarización.

INER-37 e INER-51 aisladas de pacientes mexicanos bajo atención médica en el instituto, (de Lucio B., *et al.* 2005; Ponce de León V., *et al.* 2005; Zapata BP., *et al.* 2007).

A-427 y A-549 de origen caucásico generadas y registradas comercialmente por el ATCC.

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

Cuadro 1. Medio de cultivo. Preparación de 500 ml para uso en cultivos de líneas celulares y muestras de tejido en fresco

Componente	Concentración	Porcentaje %	Volumen en ml.
Medio RPMI-1640		85.4	427
Suero Fetal bovino		10	50
Gentamicina	25 mg.	0.1	0.5
L-Glutamina 100 mM	2 mM	1	5
Piruvato Sodio 7.5%	1 mM	1	5
Hepes Buffer 1M	25 mM	2.5	12.5

Se realizaron cultivos por periodos de 48 horas. Posterior a ello, fueron cosechadas con Tripsina-EDTA 3x de la marca Biowest (México, USDA Approved), se agregó 3 ml., de tripsina e incubó 1 min a 37 °C para desprender la población de células.

Se calculó la viabilidad celular mediante el colorante vital de exclusión azul de tripano.

6.2 SELECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE TEJIDO PULMONAR DE PACIENTES

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

El tejido fue transportado al laboratorio en 25 ml., de medio RPMI 1640 libre de suero.

Mediante el uso de material quirúrgico estéril, el tejido tumoral y tejido histológicamente normal fue procesado en medio de cultivo reconstituido con 10% de suero fetal bovino, posterior a ello el tejido fue diseccionado en espejo (2 fragmentos simétricos) los cuales fueron destinados a diferentes métodos de análisis.

Un fragmento de ellos fue destinado para su fijación en el reactivo HOPE[®] para su posterior procesamiento en parafina, a fin de realizar su análisis histopatológico y confirmación de lesión neoplásica o libre de neoplasia.

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

6.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Diagnostico histopatológico definitivo de cáncer pulmonar.
- Carcinoma pulmonar primario tipo adenocarcinoma.
- Grupo de Pacientes Libres de Factores de riesgo.
- Grupo de Pacientes bajo exposición a humo de leña y/o tabaquismo (índice tabáquico $10 <$).

6.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Cáncer secundario a pulmón.
- Muestra deficiente en cantidad y calidad.

- Pacientes menores a 35 años.
- Negar su ingreso al estudio.

6.3 FRAGMENTACIÓN E INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (ChIP)

La Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP) es un método bioquímico usado principalmente para determinar la localización en el genoma de histonas modificadas, así como de otras proteínas tales como factores activos de la transcripción. Dicha técnica consiste en el uso de un anticuerpo el cual reconozca el epítipo antigénico de la proteína de interés no solamente en disolución sino también bajo la interacción de otras proteínas que conforman la cromatina (Esteller M, *et al.* 2001).

Por lo tanto el método de ChIP consta básicamente de 2 pasos, entrecruzamiento con formaldehído del DNA bajo interacción con las proteínas unidas a éste lo cual permita mantener las interacciones *in vivo* de proteína-proteína, así como las interacciones proteína-DNA seguido de la inmunoprecipitación de los complejos proteína-DNA mediante anticuerpos específicos a partir de extractos de cromatina fragmentada. Las secuencias específicas de DNA inmunoprecipitadas a partir de la cromatina son entonces amplificadas por PCR para determinar su nivel de enriquecimiento o presencia en las muestras correspondientes para cada anticuerpo (Kuo., *et al.* 1999).

Se utilizó el kit comercial EZ-Magna ChIP™ G de la marca Millipore (Temecula, CA, U.S.A) siguiendo las indicaciones del fabricante con modificaciones estandarizadas en el laboratorio que se describen en el siguiente apartado.

6.3.1 ENTRECruzAMIENTO Y FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA DE MUESTRAS DE TEJIDO SÓLIDO PARA ChIP

El tejido en fresco o congelado en trozos pequeños (3 mm^3) fue pulverizado en mortero mediante el uso de nitrógeno líquido, después fue transferido a tubos de 15 ml., posterior a ello e inmediatamente el tejido fue incubado con formaldehído como a continuación se indica.

Una vez a temperatura ambiente se añadió 10 ml de PBS 1X frío de la marca US Biological (Swampscott, MA) a concentración final del 1% (270 μl) de formaldehído u se incubó 15 min. a temperatura ambiente.

Para detener la reacción de entrecruzamiento se añadió glicina de la marca Merck (Darmstadt, Alemania) a concentración final de 0,125 M., (0.938 g) e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Las muestras fueron centrifugadas en una centrifugadora de la marca eppendorf (modelo 5804 Westbury, NY, U.S.A) a 2500 rpm, 4°C durante 15 min.

Se tomó el sobrenadante y se lavó la pastilla celular con 10 ml de PBS 1X frío. Repetir 2 veces.

El tejido se resuspendió en 800 μl de buffer de lisis con inhibidores de proteasas e incubó 45 min en hielo, posterior a ello, se separó una alícuota de 50 μl de cromatina no sonicada, para la cuantificación del DNA asociado a la cromatina.

Cuadro 2. Buffer de lisis. Buffer utilizado para la lisis celular de muestras biológicas de cáncer pulmonar.

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

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

6.3.2 FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA POR SONICACIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se utilizó el sonicador de la marca ultrasonic processor (Modelo GE 601, U.S.A) usado en colaboración con el laboratorio de Biología Molecular de la unidad de investigación del INER.

Después de distintos ensayos de estandarización en líneas celulares las muestras de tumores sólidos de pacientes fueron sónicas bajo los siguientes parámetros:

Cuadro 3. Condiciones de fragmentación de la cromatina

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

Nota: todo el tiempo de sonicación las muestras se mantuvieron en hielo.

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

Fueron almacenadas 7 alícuotas de 100 µl en ultra-congelador de la marca REVCO modelo ULTI7863-A12 (U.S.A) a -80 °C, para su posterior uso.

Se purificó 1 alícuota de 50 µl de cromatina sonicada y 1 alícuota de cromatina sin sonicar por el método de fenol-cloroformo, para el análisis de integridad y cuantificación.

6.3.3 PURIFICACIÓN DEL DNA SONICADO POR FENOL:CLOROFORMO

A partir de alícuotas previas de 50 µl c/u del DNA sonicado y no sonicado, fue adicionado 5 µl de proteinasa K (stock 0.02 mg/µl) de la marca Qiagen (Maryland, U.S.A) e incubó a 65 °C por 1 hora en el termociclador, después se agregó 1 volumen de Fenol:Cloroformo de la marca Invitrogen (U.S.A) y se mezcló para su posterior incubación por 5 min a temperatura ambiente.

Las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm., a 4 °C por 5 min., se tomó la fase acuosa (fase superior) y se transfirió a un tubo nuevo.

Se agregó 2 volúmenes de isopropanol frío de la marca SIGMA (U.S.A) y 1.5 μ l (stock 0.02 mg/ μ l) de glicógeno de la marca fermentas (U.S.A) y se dejó precipitar el DNA toda la noche a -80 °C.

Al término de la precipitación se centrifugó a 13,000 rpm., a 4 °C por 45 min., se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla de DNA con 700 μ l de etanol de la marca SIGMA (Sheboygan Falls, WI, U.S.A) al 70% de 2 a 3 veces.

Se resuspendió en un volumen de 25 μ l de agua libre de nucleasas.

6.3.4 INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA ChIP

Cada IP realizada a partir de 10 μ g., de cromatina y dependiendo de la cuantificación se llevó a un volumen final de 450 μ l (incluyendo cromatina y buffer de dilución) y 2.25 μ l de inhibidor de proteasas. Para cada paciente se incluyó el uso de anticuerpos anti-*Meox2*, anti-*RNA Pol II*, y control negativo anti-IgG de ratón.

Por cada ensayo de inmunoprecipitación se agregó la concentración correspondiente de anticuerpo más 20 μ l de perlas magnéticas acopladas a proteína G totalmente resuspendidas.

Para el control positivo, anti-*RNA Pol II* se añadió 1.0 μ g de anticuerpo por tubo, para el control negativo, anti-IgG de ratón se añadió 1.0 μ g de anticuerpo por tubo, mientras que para anti-*Meox2* se añadió 2.5 μ g de anticuerpo por tubo.

Posteriormente fue incubado a 4 °C toda la noche con agitación-rotación empleando un mezclador *DYNAL*[®] modelo 10111 (New Hyde Park, NY, U.S.A) con velocidad aproximada de 35 rpm. Las pastillas derivadas de perlas magnéticas acopladas a proteína G fueron aisladas del resto del sobrenadante mediante el uso de un magneto (12-tube magnet) de la marca QIAGEN (U.S.A).

El complejo (perlas-anticuerpo-cromatina) fue lavado y resuspendido en 500 μ l., en cada uno de las siguientes soluciones amortiguadoras (buffer) en frío usando el siguiente orden e incubando durante 5 minutos c/u, con agitación seguido del método de separación magnética y desechando el sobrenadante:

Amortiguador o buffer de lavado (Low salt immune complex)

Amortiguador o buffer de lavado (High salt immune complex).

Amortiguador o buffer de lavado (*LiCl immune complex*).

Amortiguador o *Buffer TE*.

6.3.5 ELUCIÓN DEL COMPLEJO Y REVERSIÓN DEL ENTRECRUZAMIENTO

A cada tubo, se agregó 100 µl buffer ChIP elución y 1 µl proteinasa K (stock 0.02 mg/µl) e incubado a 62 °C durante 2 horas con agitación.

Posteriormente se incubó a 95 °C durante 10 minutos en termociclador, al terminar se dejó enfriar las muestras a temperatura ambiente aproximadamente 5 min.

Por último se separaron las perlas magnéticas mediante el uso del magneto, y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo.

6.3.6 PURIFICACIÓN DEL DNA-IP

A la solución previa de 100 µl de DNA Inmunoprecipitado (IP) fue añadido 500 µl del amortiguador o buffer de unión mezclando con agitación, esta mezcla se transfirió a la columna con tubo colector, para centrifugar posteriormente durante 30 segundos a 13,000 rpm., desechando la fase líquida.

Posteriormente se agregó 500 µl del reactivo de lavado a la columna y centrifugó durante 30 segundos a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante y repitió este paso 2 veces más.

La columna se colocó en un tubo nuevo y agregaron 50 µl de buffer de elución en la membrana de la columna e incubó por 5 min.

Por último, la columna fue centrifugada durante 30 segundos a 13,000 rpm., desechando la columna y recuperando el DNA para su cuantificación por NanoDrop (marca Thermo scientific, modelo ND-1000, U.S.A).

6.4 CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN *GADPH*

Después de cuantificar se agregó 10 ng., de DNA IP purificado y se llevó a un volumen de 10 μ l se preparó una mezcla de PCR (master mix) bajo las siguientes condiciones de reacción en un volumen final de 20 μ l.

Cuadro 4. Condiciones de PCR en tiempo final para *GADPH*

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

Se utilizó un termociclador de la marca: Axigen, (modelo: Maxigene Gradient U.S.A).

Con el siguiente programa:

Desnaturalización inicial	94 °C 1 min.	
Desnaturalización	94 °C 20 sec.	} 42 ciclos <i>GADPH</i>
Alineamiento	59 °C 30 sec.	
Extensión	72 °C 30 sec.	
Extensión final	72 °C 5 min.	Amplicón 166 pb.

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

6.5 AMPLIFICACIÓN GENÓMICA LINEAL (WHOLE GENOME AMPLIFICATION “WGA”)

La amplificación del genoma completo “GenomePlex” es un método que permite generar una amplificación lineal de 300 a 1000 veces el DNA genómico original. El rendimiento de amplificación depende de la pureza y la cantidad de DNA. El kit utiliza una tecnología patentada basada en la amplificación de fragmentos al azar de DNA genómico y su conversión en una biblioteca flanqueada por primers universales. Esta biblioteca Omniplex es amplificada por PCR utilizando primers universales en un número limitado de ciclos. WGA se ha utilizado en una variedad de aplicaciones, y es conveniente para el uso de DNA genómico de distintas fuentes, incluyendo sangre periférica, paquetes leucocitarios, lavado bucal, tejido fijado en parafina, cultivo celular, entre otras. GenomePlex WGA requiere un mínimo de 10 ng de DNA inicial, obteniendo un rendimiento de PCR de 5 a 10 µg de DNA total al finalizar la reacción. Después de la purificación, el producto de WGA puede ser analizado de una manera similar a cualquier muestra de DNA genómico (Barker DL., *et al* 2004).

6.5.1 PROCEDIMIENTO DE AMPLIFICACIÓN DEL MÉTODO, WGA1

Para la amplificación se utilizó el kit comercial GenomePlex[®] Whole Genome Amplification (WGA 1) de la marca SIGMA (U.S.A) siguiendo las indicaciones del fabricante con modificaciones estandarizadas en el laboratorio que a continuación se describen:

6.5.2 PREPARACIÓN DE LA BIBLIOTECA

Para preparar la biblioteca se utilizó una solución de 20 ng de DNA IP en 10 µl de agua libre de nucleasas, 2 µl de buffer de preparación de librería 1X, mientras que 1 µl de solución estabilizadora de librería.

La mezcla previa se homogenizó fuertemente y centrifugó brevemente, se incubó a 95 °C durante 2 minutos en termociclador y dejó enfriar la muestra en hielo aproximadamente 5 min.

Posteriormente se agregó 1 µl de enzima de preparación de librería haciendo un volumen total de 15 µl, se homogenizó fuertemente y colocaron las muestras en termociclador incubando de la siguiente manera:

16 ° C durante 20 minutos

24 ° C durante 20 minutos

37 ° C durante 20 minutos

75 ° C durante 5 minutos

4 ° C indeterminado

6.5.3 AMPLIFICACIÓN

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

Cuadro 5. Condiciones de amplificación (WGA1)

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

Con la micro-pipeta fue resuspendida la mezcla y centrifugó brevemente, para su posterior incubación mediante las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial	95 ° C 3 min.	} 14 ciclos
Desnaturalizar	94 ° C 15 seg.	
Alineamiento / extensión	65 ° C 5 min.	

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

En geles de agarosa al 1.5 % se verificó el producto amplificado en un rango de 100-1000 pb.

Las muestras purificadas IP se re-amplificaron por el kit comercial GenomePlex[®] WGA Reamplification (WGA3) de la marca SIGMA (U.S.A) siguiendo las indicaciones del fabricante con modificaciones estandarizadas en el laboratorio que a continuación se describen:

6.6 PROCEDIMIENTO DE RE-AMPLIFICACIÓN WGA3

A partir del DNA amplificado por el método WGA1, este fue re-amplificado mediante el método WGA3 a partir de una solución de 500 ng resuspendido en 10 µl de agua libre de nucleasas.

Se preparó un master mix y se añadió los siguientes reactivos a los 500 ng de DNA WGA1.

Cuadro 6. Condiciones de amplificación (WGA3)

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

Se resuspendió, centrifugó brevemente y colocó en termociclador empleando las siguientes condiciones de incubación:

Desnaturalización inicial	95 ° C 3 min.	} 14 ciclos
Desnaturalizar	94 ° C 15 seg.	
Alineamiento / extensión	65 ° C 5 min.	

Después de completar los ciclos el DNA re-amplificado se purifico por fenol-cloroformo resuspendiendo en 200 µl de agua libre de nucleasas.

En geles de agarosa al 1.5 % se verificaron los productos amplificados en un rango de 100-1000 pb.

6.7 CHIP ON chip MICROARREGLOS DE DNA DE ALTA RESOLUCIÓN (3X720K REFSEQ) NIMBLEGEN-ROCHE

Se utilizaron microarreglos de alta resolución en formato 3x720K los cuales permiten la hibridación de muestras (pacientes). Los microarreglos contienen 3 secciones de 720,000 sondas de DNA, las cuales representan 30,893 transcritos y 22,542 regiones promotoras.

La longitud por sonda es de 50-75 pb, conteniendo 100 pb de espacio entre sonda, capaces de representar 3,200pb río arriba (upstream) y 800pb río abajo (downstream) a partir del sitio de inicio de la transcripción.

Los microarreglos están diseñados para determinar regiones no repetitivas en el genoma humano, incluye regiones promotoras, elementos enhancer, unión de factores de transcripción, así como regiones bajo el control de modificación de histonas, basado en versión publicada del ensamble del genoma humano (UCSC genome browser, HG18).

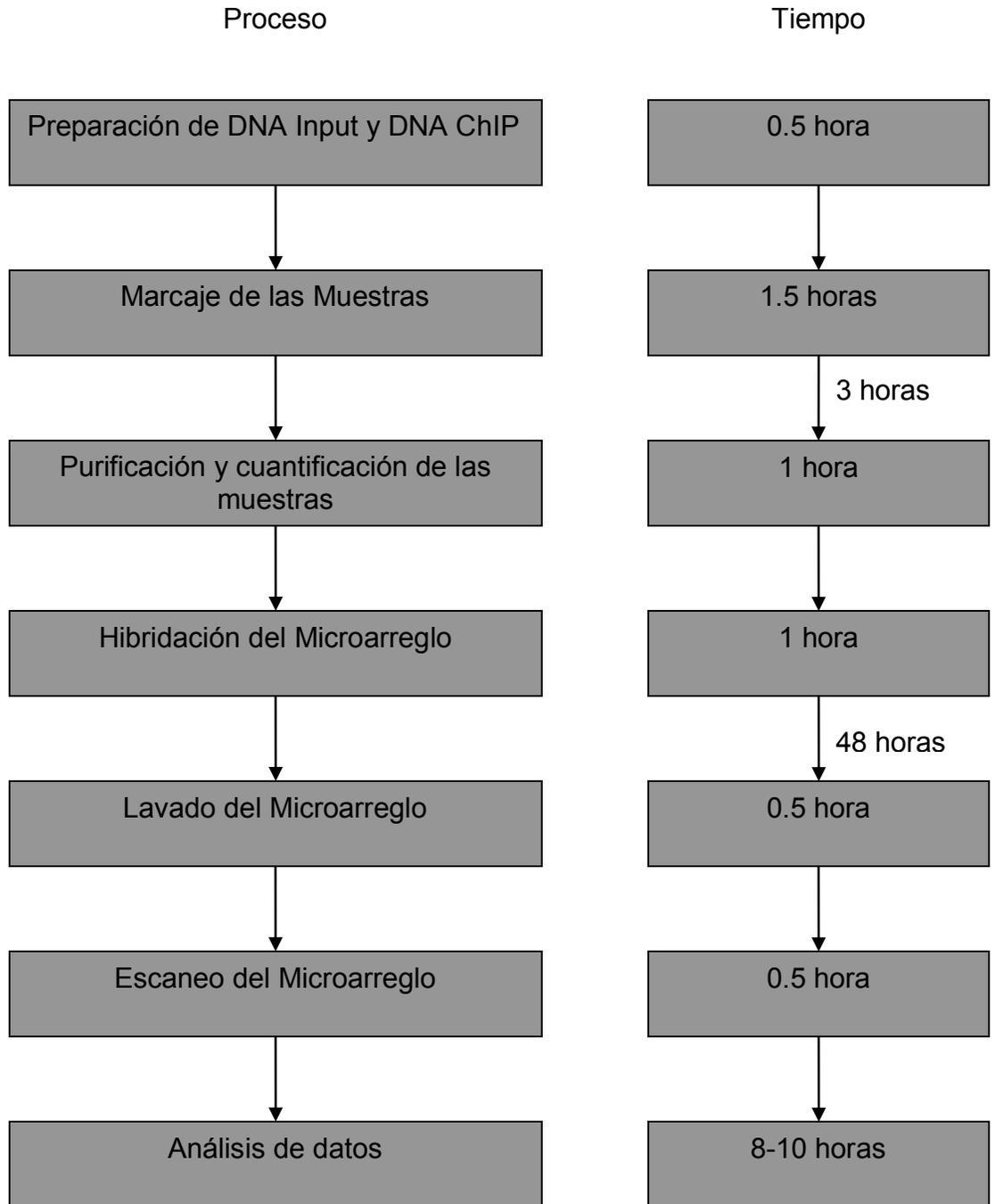


Figura 1. Flujo de trabajo para el análisis de CHIP-chip NimbleGen. Proceso y tiempo estimado para cada paso, basado en el procesamiento por microarreglo o laminilla.

6.7.1 MARCAJE FLUORESCENTE DEL DNA-IP CON NIMBLEGEN DUAL COLOR

El marcaje fluorescente de las muestras de DNA-IP fueron realizadas empleando el Kit comercial NimbleGen Dual-Color DNA Labeling de la marca Roche® (Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones que a continuación se indican:

Se utilizó los DNA inmunoprecipitados obtenidos a partir de *anti-RNA Pol II* y *anti-Meox2* de un paciente registrado con el número AEE101007.

1 µg de ambos DNA-IP se llevó a un volumen de 40 µl, esto se realizó con la menor cantidad de luz posible, mezclando de la siguiente forma:

Cuadro 7. Condiciones de marcaje (NimbleGen Dual Color)

Reactivo	Cy5 Nonameros (Rojo)	Cy3 Nonameros (Verde)
Solución de Nonameros	40 µl	40 µl
DNA	40 µl	40 µl
Agua c. b. p. 44 µl	4 µl	4 µl

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

Cuadro 8. Condiciones de Master mix para el marcaje

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

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

6.7.2 PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DEL DNA-IP

A cada muestra se agregó 11.5 µl de NaCl 5M y 110 µl de isopropanol frío se homogenizó y dejó incubar toda la noche a -20 °C, protegido de la luz.

Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm durante 20 minutos, se decantó el sobrenadante cuidando de no perder la pastilla de DNA (pellet).

La pastilla fue lavada con 500µl de etanol al 80% en frío y resuspendió en un tubo nuevo.

Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante mediante el uso de pipeta y se dejó secar la pastilla por espacio de 20 min. mediante el uso del desecador de la marca SpeedVac (U.S.A) en frío a 4 °C, protegido de la luz.

Una vez desecadas las muestras fueron brevemente centrifugadas y se re-hidrató cada pastilla de DNA en 25 µl. de agua libre de nucleasas.

En un espectro de la marca Bioteck modelo EPOCH (U.S.A) se cuantificó el DNA a una longitud de onda de 260 nm.

Basados en la concentración, se calculó el volumen de cada muestra que equivalía a un total de 34 µg., ambas muestras derivadas del DNA-IP mediante el uso de anticuerpos *anti-RNA Pol II* y *anti-Meox2* fueron combinadas en un tubo de 1,5 ml.

La pastilla se dejó secar nuevamente por 20 min., en el concentrador por vacío (SpeedVac) a 4 °C, protegiendo de la luz.

6.7.3 HIBRIDACIÓN DEL MICROARREGLO

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

Para la hibridación se utilizó el kit comercial de hibridación de la marca NimbleGen Roche® (Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones que a continuación se describen:

Cuadro 9. Preparación de las muestras previas a hibridar

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

La mezcla de hibridación (master mix) se agregó a los 5.6 µl de DNA conteniendo ambos fluoróforos, se agitó ligeramente y centrifugó brevemente para mezclar las 2 soluciones, posteriormente se incubó a 95 °C durante 5 min., protegiendo de la luz.

Al término se incubó a 42 °C en la cámara de hibridación 20 min., antes de cargarse sobre el micro-arreglo.

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

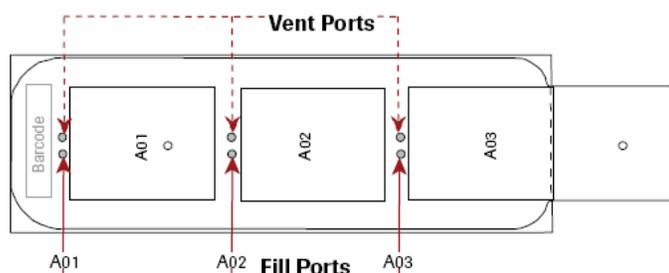


Figura 2. Formato de 3X720K arreglos NimbleGen

Para cada sección del microarreglo se cargarón 18 µl de la muestra previamente preparada mediante el uso de micro-pipeta en posición horizontal.

Para evitar la evaporación se colocó la cubierta adhesiva indicada en el protocolo (cover slip) por cada orificio de carga para posteriormente hibridar incubando durante 48 horas y hasta 72 horas a 42 °C.

6.7.4 LAVADO DEL MICROARREGLO

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

Cuadro 10. Preparación, buffers de lavado de NimbleGen

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

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

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

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

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

Por ultimo se obtuvieron las imágenes del micro-arreglo mediante el lector o scanner de la marca Gene Plx modelo 4000a (U.S.A).

6.7.5 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Para el análisis de hibridación del micro-arreglo se utilizó el programa o software NimbleScan versión 2.6, los microarreglos empleados fueron del formato 3X720K y se procedió en una primera etapa a obtener las imágenes por canal de fluorescencia 635 nm y 532 nm (imágenes) en el programa NimbleScan.

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

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

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

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

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

Una vez generados los distintos reportes se realizó una escala de datos Log₂-Ratio, estos se generaron a partir de los reportes anteriormente indicados (*pair* y *probe*).

El índice generado (ratio) de los canales fue obtenido mediante la formula 532/635.

Esto nos generó un archivo con el nombre de (AEE MEOX 2_ratio.gff), el cual contiene el índice para ambos canales.

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

Los picos fueron detectados por la intensidad y alineamiento de 4 sondas (min probe > valor de corte "cutoff peak"), usando una ventana de deslizamiento de 500pb (sliding window), el valor de corte (cutoff) fue evaluado como un porcentaje hipotético máximo definido como (mean+6[standard deviation]), para obtener los

datos del índice (ratio) se realizaron 20 veces aleatoriamente para evaluar la probabilidad de falsos positivos (FDR), y a cada pico fue asignado un valor FDR, un valor $FDR \leq 0.2$ indica un pico de fluorescencia verdadero (interacción física de alta probabilidad proteína-DNA), mientras que un valor de $FDR \geq 0.2$ indica un posible falso positivo.

Los parámetros usados de valor de corte (cutoff) fueron del 90%, dicho valor de corte alto corresponde a la detección de picos de fluorescencia más astringente lo cual es reflejado en el valor de FDR.

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

6.8 SELECCIÓN DE GENES BLANCO DE *MEOX2*

Mediante análisis de jerarquía y probabilidad de falsos positivos además de análisis *in silico* de expresión genética fueron seleccionados genes probablemente relacionados funcionalmente con la capacidad de regulación transcripcional de *Meox2* en cáncer pulmonar. Ello mediante el análisis de predicción de rutas metabólicas involucradas, mediante el uso de herramientas bioinformáticas en línea, entre ellas: <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/option.php>

6.9 ENSAYOS DE VALIDACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL

6.9.1 DISEÑO DE PRIMERS

Los primers (oligonucleotidos) *Evx1*, *Meox2*, *Twist1* fueron diseñados mediante el uso de los programas bioinformáticos de análisis de predicción de secuencias como OLIGO y VECTOR NT. La secuencia de los primers para *C-fos* fue tomada a partir del kit MAGnify™ Chromatin Immunoprecipitation System de la marca INVITROGEN (U.S.A) con número de catálogo 49-2029. Todos los primers fueron sintetizados por SIGMA-ALDRICH (U.S.A).

Cuadro 11. Diseño de primers. Secuencia, región y tamaño del amplicón de cada gen diseñado a ser validado

Gen	Secuencia (5´-3´)	Tm Teórica	Región	Tm Experimental	Tamaño
<i>Evx1</i>	TCATCGGTGTTAGATCAAGG CAGCGAAGATGAAAGGAAAC	60.1	7p15-14	62	300pb
<i>Meox2</i>	GTCCAGCAGGAGATAGGAAG AGAGTGGGAGAGGTTGAAGC	60.4	7p22.1	55	205pb
<i>Twist1</i>	GGGAGGACGAATTGTTAGAC CGAGGTCCAAAAAGAAAGC	59.9	7p21.2	55	284pb
<i>C-fos</i>	TTAGGACATCTGCGTCAGCAGGTT TCTCGTGAGCATTTCGCAGTTCCT	70.5	14q24.3	55	120

6.9.2 CONDICIONES DE PCR EN TIEMPO REAL DE LOS GENES *EVX1*, *MEOX2*, *TWIST1* Y *C-FOS*

Se utilizó el kit comercial Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix de la marca Fermentas (U.S.A) preparando una mezcla de reacción (master mix) añadiendo todos los componentes (excepto el DNA) para una reacción de 15 µl en hielo.

Cuadro 12. Condiciones de PCR en tiempo real para *Evx1*, *Meox2*, *Twist1* y *C-fos*

Reacción	Concentración Final	Volumen
Máxima SYBR Green qPCR	2X	7.5 µl
Primer´s 10 µM	0.5 µM	0.76 µl
DNA	20 ng	5 µl
H ₂ O	15 µl	1.74 µl
Vol. total	15 µl	15 µl

El DNA de cada muestra (20 ng/reacción) se agregó a cada pozo de la placa previamente diseñada y para la construcción de una curva estándar se utilizó el DNA proveniente de un pool de individuos sanos cuyos valores fueron 80 ng, 40 ng., 20 ng., 10 ng., 5 ng., 2.5 ng., 1.5 ng.

El master mix se mezcló gentilmente y agregó un volumen de 10 µl a la placa, posterior a ello se centrifugó la placa durante 5 min a 1,800 rpm a 4 °C. posterior a lo cual la placa del experimento fue ingresada al equipo de PCR en el tiempo real de la marca Applied Biosystem modelo StepOne plus (Foster City, CA, U.S.A) mediante el uso de las siguientes condiciones de amplificación

Para *Evx1*

Desnaturalización inicial	95 °C 10 min.		
Desnaturalización	95 °C 15 sec.	}	40 ciclos
Alineamiento	62 °C 30 sec.		
Extensión	72 °C 30 sec.		

Para *Meox2*, *Twist1* y *C-fos*

Desnaturalización inicial	95 °C 10 min.		
Desnaturalización	95 °C 15 sec.	}	40 ciclos
Alineamiento	55 °C 30 sec.		
Extensión	72 °C 30 sec.		

6.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Fueron empleadas, prueba exacta Fisher y análisis de covarianza para establecer diferencias estadísticas entre ambos grupos de pacientes, considerando estadísticamente significativas aquellas diferencias con $P \leq 0.05$ aplicando prueba de dos colas. Para ello, se empleó el software SPSS (versión 11.0).

7 RESULTADOS

7.1 SELECCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las muestras biológicas ingresadas al presente estudio fueron 4 líneas celulares del tipo adenocarcinoma (AD), 2 de ellas establecidas a partir de pacientes bajo atención médica en el INER y 2 derivadas del ATCC. En la fig.3 se muestran fotografías representativas de las líneas celulares, en A) y B) se muestra INER-37 e INER-51, respectivamente, establecidas a partir de efusión pleural de pacientes mestizos mexicanos, en C) y D) se muestran la línea celular A-427 y A-549, respectivamente, utilizadas como modelos de estudio del cáncer pulmonar registradas y obtenidas del ATCC, provenientes de pacientes de origen caucásico

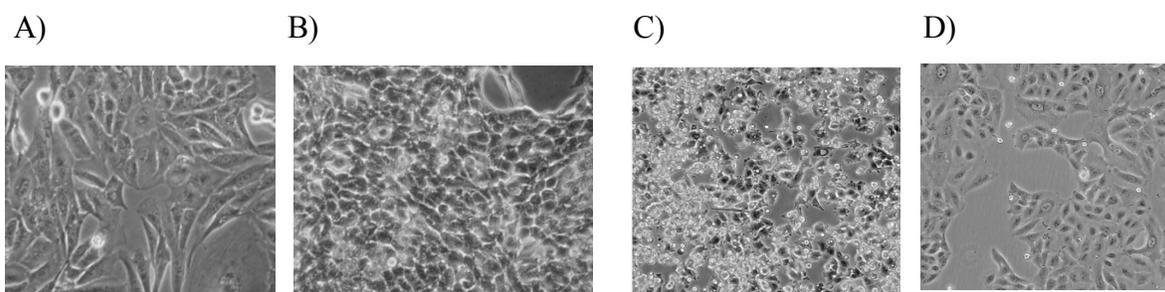


Figura 3. Microfotografía que muestra la morfología de líneas celulares de cáncer de pulmón tipo adenocarcinoma. A) INER-37 mujer de 48 años mexicana. B) INER-51 hombre de 51 años mexicano. C) A-427 hombre de 52 años caucásico. D) A-549 hombre de 58 años caucásico.

Se establecieron cultivos celulares para la estandarización de las técnicas descritas en materiales y métodos para el presente estudio, en la tabla 1 se muestra los resultados del cultivo de las 4 líneas celulares, alcanzando confluencia cercana del 90%, con viabilidad superior al 95%.

Tabla 1. Características de cultivo celular. Valores de confluencia y viabilidad de las distintas líneas celulares.

Línea	INER-37	INER-51	A-427	A-549
Confluencia	90 %	90 %	96 %	95 %
Viabilidad	99 %	96 %	97 %	100 %

También se utilizaron 10 muestras de carcinomas pulmonares sólidos de pacientes tipo AD, tomando en cuenta los criterios de inclusión y exclusión previamente descritos en materiales y métodos. Se seleccionaron 5 muestras bajo exposición a humo de leña y 5 muestras de pacientes libres de exposición a factores de riesgo. En ambos casos, las muestras correspondieron a pacientes del género femenino, debido a su alta incidencia en este género, como fue descrito en antecedentes, dichos pacientes diagnosticadas con AD pulmonar primario e índice tabaquico inferior a 4, el rango de edad se mantuvo dentro de 38-74 años. Todos estos datos fueron obtenidos a partir del estudio de los expedientes clínicos de cada paciente. En la tabla 2, se muestran las características clínicas, así como el número de registro asignado por cada paciente.

Tabla 2. Relación de pacientes con cáncer pulmonar de tipo Adenocarcinoma

No. Registro	Sexo	Edad	Tipo Histológico	IT	Exposición a factores de riesgo
GCH170209	Fem.	74	AD BD bronquioalveolar	0	Humo de leña (crónico)
AEE101007	Fem.	71	AD PD	(-)	Humo de leña, petróleo
GOMJ300609	Fem.	64	AD mixto necrosis y cavitación	0	Humo de leña
GHM291008	Fem.	63	AD Mucoproducor	(-)	Humo de leña
PMA230408	Fem.	59	AD BD	0	Humo de leña (crónico)
DSE201008	Fem.	70	AD BD	4	(-)
MGG140809	Fem.	55	AD BD	0	(-)
GMR080708	Fem.	47	AD MD Mucoproducor	(-)	(-)
SPN020309	Fem.	41	AD Mucoproducor	0	(-)
RSCL300109	Fem.	38	AD BD	(-)	(-)

7.2 ANÁLISIS POR INMUNOHISTOQUÍMICA DE *MEOX2* EN LÍNEAS CELULARES Y CARCINOMAS SÓLIDOS PULMONARES TIPO AD

Los resultados por inmunohistoquímica revelan des-localización nuclear de *Meox2* en las distintas líneas celulares de cáncer pulmonar. La fig. 4 muestra distintas condiciones de cultivo previas a la inmunohistoquímica, en A), B), C) y D) se muestran las líneas celulares INER-37, INER-51, A-427 y A-549, respectivamente, a confluencia menor del 40 %, a dicha confluencia se observa de forma preponderante la ubicación nuclear de *Meox2*, lo cual sugiere su participación transcripcional mediante su interacción con el DNA. Sin embargo, este fenómeno no se observa a mayor confluencia, como se observa en los paneles E), F), G) y H) en confluencia cercana del 80%. Bajo estas condiciones se observa el aumento de la presencia de *Meox2* en citoplasma; así como en la membrana celular, sugiriendo que la ubicación de la proteína *Meox2* posiblemente este regulada por contacto célula-célula en condiciones *in vitro*, y por tanto modulando la interacción con sus blancos transcripcionales de *Meox2*, implicando deficiencias en el proceso de inmunoprecipitación de blancos génicos, debido a ello los ensayos de IP con líneas celulares fueron realizados a confluencia del 40%.

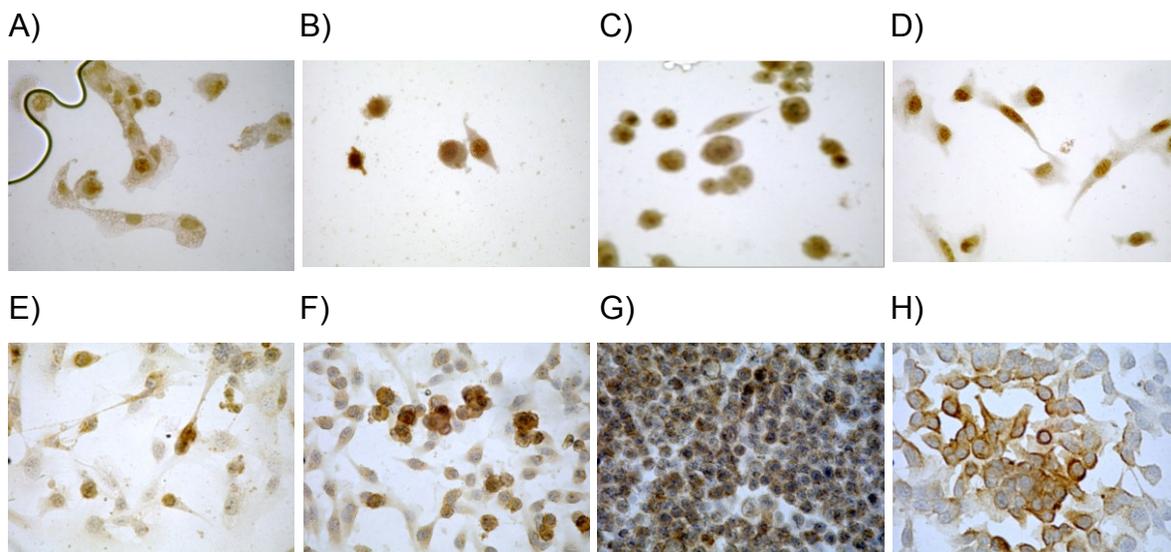


Figura 4. Inmunohistoquímicas anti-*Meox2* en las distintas líneas celulares. A, B, C y D confluencia al 40 %. E, F, G y H confluencia al 80%. A) y E) INER-37. B) y F) INER-51. C) y G) A-427. mientras que D) y H) A-549.

Por el contrario, en muestras de tumores sólidos de carcinomas pulmonares la ubicación de la proteína permanece con alta presencia en núcleo, incluso durante el proceso de progresión neoplásica desde lesiones pulmonares precursoras hasta lesiones invasoras (fig. 5). Lo cual, sugiere su participación en núcleo como factor transcripcional. Dado lo anterior, las condiciones fueron óptimas para el desarrollo de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina, donde es necesaria la premisa de interacción proteína-DNA para lograr inmunoprecipitar segmentos génicos (secuencias promotoras o blancos génicos).

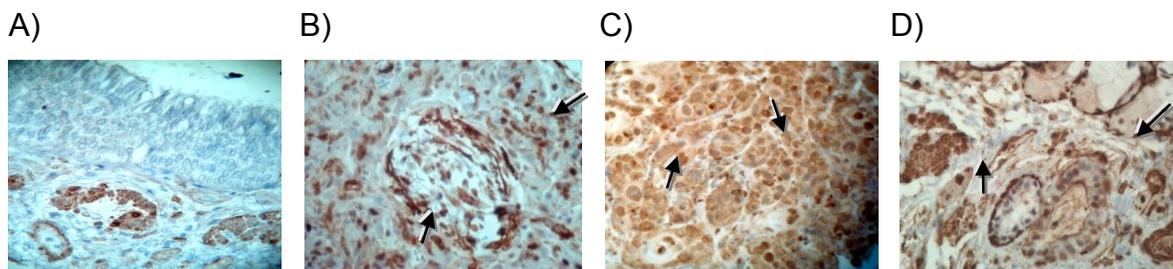


Figura 5. Análisis por inmunohistoquímica empleando anticuerpos anti-*Meox2* en las distintas fases de la progresión neoplásica pulmonar. A) Tejido pulmonar histológicamente Normal, B) Metaplasia Pulmonar, C) AD-BD, D) AD-PD.

7.3 DESARROLLO DE MÉTODOS DE FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA A PARTIR DE MUESTRAS DE LÍNEAS CELULARES Y CARCINOMAS SÓLIDOS PULMONARES

Basado en los resultados antes mencionados, el uso de líneas celulares fue restringido al desarrollo de los métodos de estandarización de la fragmentación de la cromatina, cuyo paso es inicial para la técnica de ChIP. Para lo cual, en primera instancia se procedió a fragmentar la cromatina de las 4 líneas celulares bajo los parámetros descritos en materiales y métodos, en la fig.6 A se observa la fragmentación de la cromatina de las 4 líneas celulares, cuya fragmentación del DNA ocurre entre las 100 a 3000 pb, la cual se observa enriquecida en el rango de 200 a 1000 pb, como control de integridad del DNA genómico se empleó el DNA nativo (no-sonicado) el cual posee un alto peso molecular indicando que la fragmentación de la cromatina no se debe a degradación del DNA.

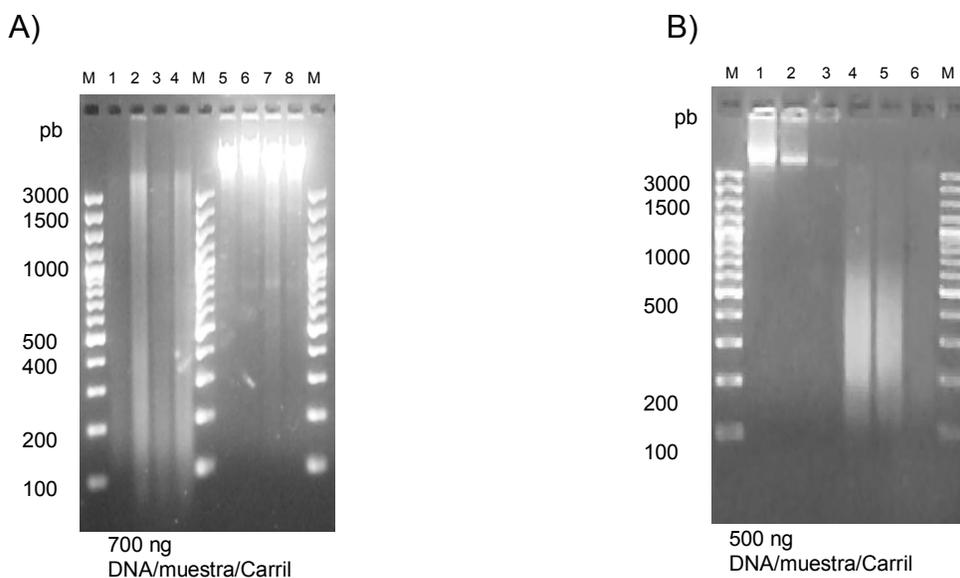


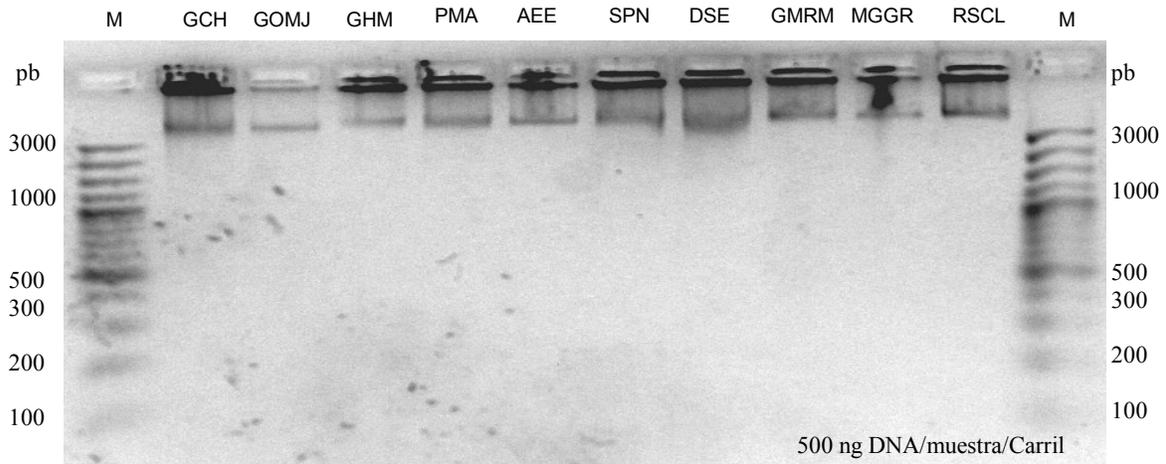
Figura 6. Fragmentación de la cromatina de muestras biológicas de cáncer pulmonar tipo AD. A) Fragmentación de la cromatina de 4 líneas celulares carril 1 INER 37, carril 2 INER 51, carril 3 A-427, carril 4 A-549, carriles 5, 6, 7, y 8 respectivamente en el mismo orden DNA no-sonicado (nativo). B) Cromatina no-sonicada (nativo) de muestra de tumor sólido carril 1 paciente 1, carril 2 paciente 2, carril 3 paciente 3, carriles 4, 5, y 6 respectivamente, muestras sónicas de pacientes en el mismo orden. Gel de agarosa 1.5 %.

Adicionalmente el mismo proceso fue realizado para 3 muestras de tumor sólido de pacientes, en la fig.6 B se muestran en carriles 1-3 DNA-no sonicado (nativo) de alto peso molecular mientras que en carriles 4-6 se muestra la fragmentación del DNA la cual ocurre desde 100 a 1,500 pb, lo cual indica condiciones reproducibles de fragmentación exitosa de la cromatina para los siguientes pasos de la técnica de ChIP.

Posteriormente se procedió a la fragmentación de la cromatina de muestras de tumores sólidos pulmonares. Seleccionadas para ello empleando los mismos parámetros previamente descritos. En fig.7A se muestra electrofóresis en gel de agarosa del DNA control (nativo libre de sonicación) donde se observa una banda de alto peso molecular, los primeros 5 pacientes corresponden al grupo de pacientes con exposición a humo de leña, los siguientes 5 corresponden al grupo de pacientes libres de exposición a factores de riesgo. Dichos resultados indican ausencia de degradación del DNA genómico debido al método de extracción o exposición a factor de riesgo ambiental.

En fig.7B se muestra el DNA sonicado de ambos grupos de pacientes en el orden arriba indicado, donde se puede observar la presencia de fragmentación característico de la fragmentación de la cromatina, el cual va desde las 100-3000pb presentando un enriquecimiento en el rango e 200-1000 pb, nuevamente la fragmentación es optima para ensayos de ChIP y no se observa diferencia entre grupos de pacientes.

A)



B)

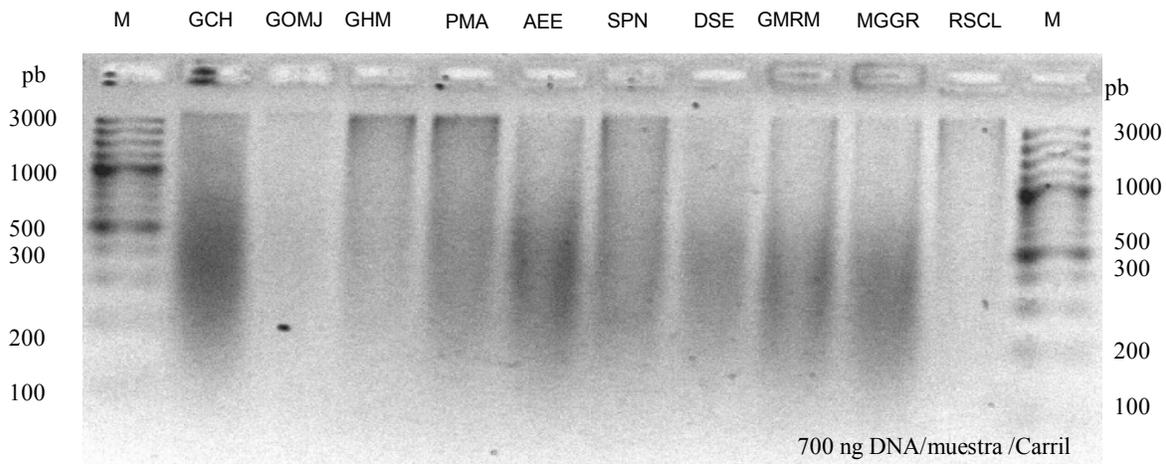


Figura 7. Fragmentación de la cromatina de muestras de tumores sólidos de carcinomas pulmonares de pacientes tipo AD. A) Cromatina no-sonicada para 10 muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD. B) Cromatina sonicada para mismos 10 pacientes con cáncer pulmonar tipo AD. Gel de agarosa 1.5%.

7.4 INMUNOPRECIPITACION DE LA CROMATINA A PARTIR DE CARCINOMAS SÓLIDOS PULMONARES TIPO AD

La inmunoprecipitación de la cromatina se realizó para las muestras de tumores sólidos pulmonares de 10 pacientes en presencia y ausencia de factores de riesgo, utilizando como control positivo de inmunoprecipitación y de actividad transcripcional un anticuerpo *anti-RNA Pol II*, así como el principal anticuerpo problema *anti-Meox2*, además del control negativo de inmunoprecipitación empleando un anticuerpo anti-IgG.

Para iniciar el método de inmunoprecipitación fue necesario contar con cromatina correspondiendo a 10 µg. de DNA fragmentado previamente cuantificado por el método de NanoDrop, al finalizar el método de IP, la concentraciones y rendimiento del DNA-IP, fueron ordenados como se muestra en la tabla 3, en combinación de sus características clínicas.

En términos generales podemos observar que los valores de rendimiento y cuantificación del DNA-IP son similares entre ambos grupos de pacientes con exposición a humo de leña y libres de factores de riesgo. Los valores del DNA-IP a partir del uso de *anti-RNA Pol II* se observan en el rango de 1 ng/µl hasta 5 ng/µl, salvo para un paciente el cual mostró una concentración de 9.64 ng/µl; Mientras que de igual manera los valores del DNA-IP a partir de *anti-Meox2* se observan en el rango de 1 ng/µl hasta 5 ng/µl. Lo anterior, en contraste con los valores obtenidos a partir del uso de anti-IgG, los cuales en todos los casos resultaron menores a una concentración de 0.7 ng/µl, lo cual significó un valor negativo de DNA-IP, explicados solamente debido a la presencia de fragmentos de DNA-IP fragmentado e inespecífico residual, como esta indicado en la literatura, dentro del rango normal del DNA-IP negativo.

Tabla 3. Valores de cuantificación de DNA inmunoprecipitado. Muestras de cáncer de pulmón, control positivo *anti-RNA Pol II*, control negativo *anti-IgG* y muestras problema *anti-Meox2*.

No. Registro	Sexo	Edad	Tipo Histológico	IT	Exposición otros agentes	Inmunoprecipitación		
						<i>Anti-RNA Pol II</i>	<i>Anti-Meox2</i>	<i>Anti-IgG Negativo</i>
GCH170209	Fem.	74	AD BD bronquioalveolar	0	Humo de leña (crónico)	2.75 ng/μl	3.15 ng/μl	0.13 ng/μl
AEE101007	Fem.	71	AD PD	(-)	Humo de leña, petróleo	1.05 ng/μl	1.71 ng/μl	0.47 ng/μl
GOMJ300609	Fem.	64	AD mixto necrosis	0	Humo de leña	2.15 ng/μl	3.41 ng/μl	0.69 ng/μl
GHM291008	Fem.	63	AD Mucoproduccion	(-)	Humo de leña	1.69 ng/μl	2.52 ng/μl	0.53 ng/μl
PMA230408	Fem.	59	AD BD	0	Humo de leña (crónico)	4.53 ng/μl	3.70 ng/μl	0.69 ng/μl
DSE201008	Fem.	70	AD BD	4	(-)	2.64 ng/μl	3.69 ng/μl	0.69 ng/μl
MGGR140809	Fem.	55	AD BD	0	(-)	2.19 ng/μl	1.09 ng/μl	0.08 ng/μl
GMRM080708	Fem.	47	AD MD Mucoproduccion	(-)	(-)	1.85 ng/μl	4.43 ng/μl	0.47 ng/μl
SPN020309	Fem.	41	AD Mucoproduccion	0	(-)	9.64 ng/μl	3.78 ng/μl	0.13 ng/μl
RSCL300109	Fem.	38	AD BD	(-)	(-)	3.52 ng/μl	1.48 ng/μl	0.69 ng/μl

7.5 PRUEBA DE CALIDAD DE LOS SEGMENTOS DE DNA-IP MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DEL PROMOTOR (CONTROL ENDOGENO) DEL GEN *GADPH*

Para continuar con el método de ChIP on chip, aquellos segmentos del DNA-IP mencionados en la tabla 3, las muestras de cada paciente fueron sometidas a pruebas de calidad por PCR convencional de tiempo final para confirmar la presencia de fragmentos genéticos bien preservados del DNA en contraste de aquellos derivados del uso de anti-IgG negativo, indicando trazas de DNA acarreado de forma inespecífica.

Estos ensayos sirvieron como pruebas de control de calidad del DNA-IP para cada muestra de paciente, en la fig.8 se observa el resultado representativo (4 pacientes) de esta prueba de calidad donde se observa la amplificación de la región promotora del gen endógeno o constitutivo *GADPH*. En todos los casos se amplificó en el mismo orden, carril 1 DNA Input (sonicado, no-inmunoprecipitado), carril 2 DNA-IP *RNA Pol II*, carril 3 IP *Meox 2*, carril 4 IgG control negativo. En términos generales se puede observar la amplificación del fragmento de 166 pb correspondiente al fragmento esperado, solo para DNA Input y DNA-IP, lo cual nos indicó el éxito en la IP de segmentos promotores del DNA genómico, mientras que el resultado fue negativo para todas las muestras procesadas con el uso del anticuerpo anti-IgG, lo cual señala el alto nivel de especificidad desarrollado durante el presente trabajo experimental.

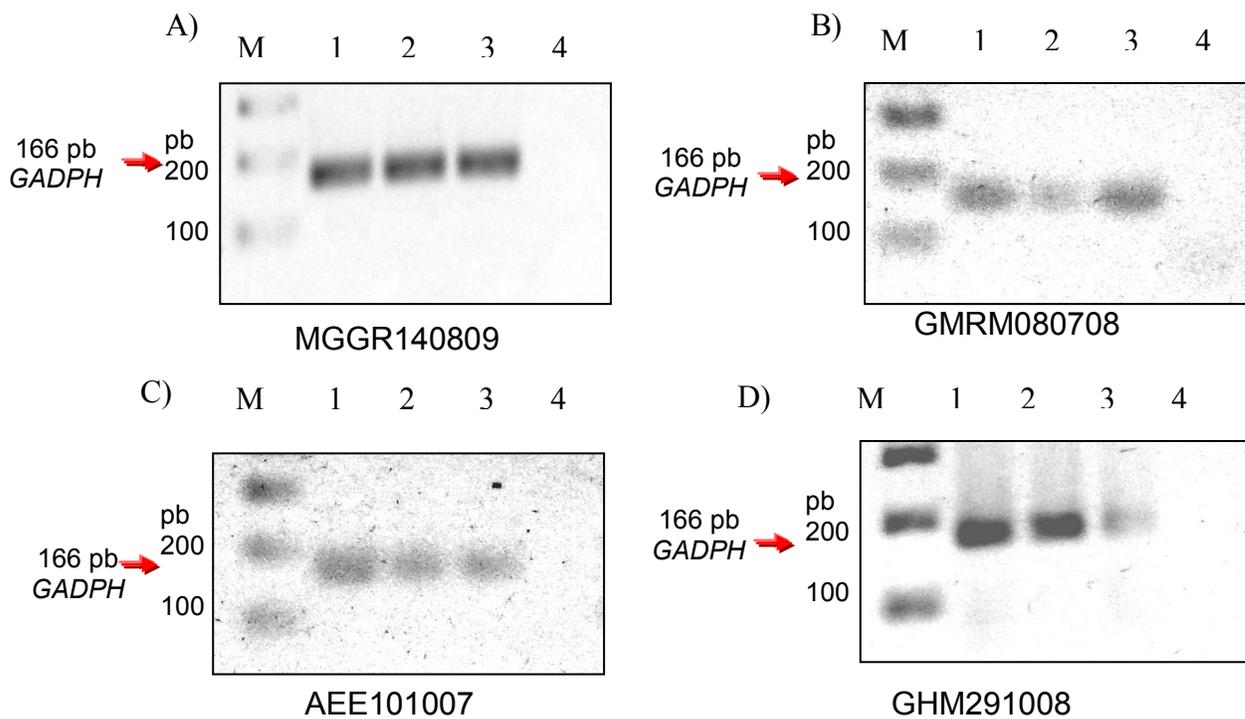


Figura 8. Amplificación por PCR de la región promotora del gen *GADPH* (Prueba de calidad del DNA-IP). Muestras representativas del DNA-IP de pacientes con cáncer pulmonar. Carril 1 DNA Input, carril 2 IP de *RNA Pol II*, carril 3 IP de *Meox 2*, carril 4 IgG negativo. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%.

7.6 AMPLIFICACION DE LOS SEGMENTOS DNA-IP POR WGA 1

Posterior al método de validación de calidad por PCR de la región promotora endógena de *GADPH*, los segmentos génicos IPs de ambos grupos de pacientes fueron amplificados por el método WGA1, ya que es necesario amplificar el DNA-IP de forma lineal hasta alcanzar una concentración suficiente del DNA-IP para su posterior hibridación en micro-arreglos de DNA. Para los 10 pacientes seleccionados se llevó a cabo la amplificación del DNA-IP, en la fig.9 se muestran resultados representativos de este ensayo, donde se puede observar en el carril 1 amplificación del DNA Input (sonicado, no-IP) en un rango de 120 a 900 pb, carril 2 DNA IP a partir de *RNA Pol II* la amplificación menos intensa en un rango de 150 a 800 pb, mientras que en el carril 3 se muestra el IP de *Meox 2* amplificado en menor intensidad que los 2 anteriores en un rango de 160 a 700 pb. Lo cual sugiere, mayor especificidad de segmentos discretos inmuno-precipitados a partir de *anti-Meox2*. En tabla 4 se muestran los valores de amplificación resultados del método WGA1, en promedio para la IP de *RNA Pol II* se obtuvo un rendimiento de 10 veces la concentración inicial del DNA-IP por paciente, mientras que para *Meox2* se obtuvo un rendimiento de 13 veces el valor inicial.

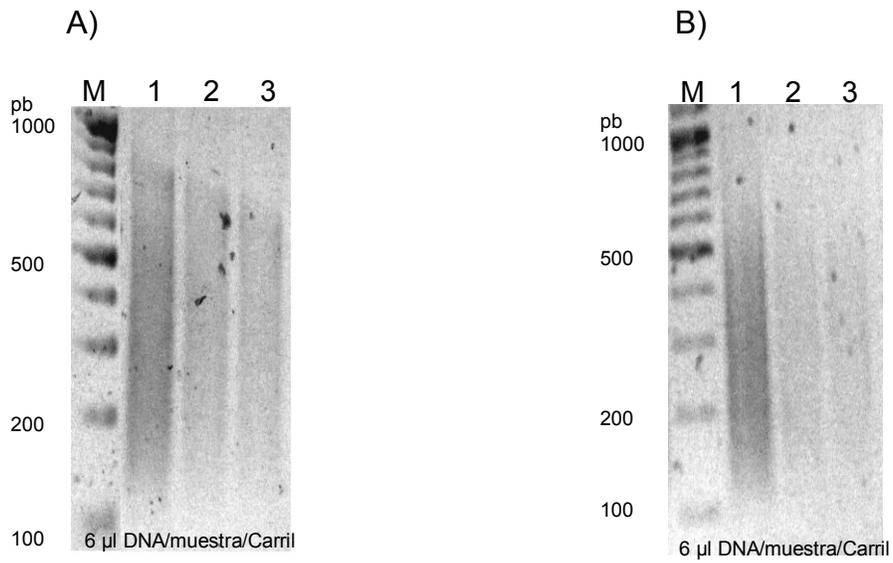


Figura 9. Amplificación lineal del DNA genómico correspondiente al DNA-IP por el método WGA1. Resultado representativo de 2 pacientes con cáncer pulmonar tipo AD. Amplificación lineal a partir de 20 ng de DNA-IP. Carril 1 DNA Input (Sonicado, no-IP) , carril 2 IP de *RNA Pol II*, carril 3 IP de *Meox 2*. A) Paciente AEE101007, B) Paciente GMRM080708. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%.

Tabla 4. Valores de cuantificación del DNA-IP amplificado por WGA1. Muestras de cáncer de pulmón, amplificación a partir de 20 ng de DNA IP para *RNA Pol II* y *Meox2*.

No. Registro	Sexo	Edad	Tipo Histológico	IT	Exposición otros agentes	Inmunoprecipitación			Whole Genome Amplification (WGA1)	
						<i>Anti-RNA Pol II</i>	<i>Anti-Meox2</i>	Anti-IgG Negativo	<i>RNA Pol II</i>	<i>Meox2</i>
GCH170209	Fem.	74	AD BD bronquioalveolar	0	Humo de leña (crónico)	2.75 ng/μl	3.15 ng/μl	0.13 ng/μl	35.47 ng/μl	77.73 ng/μl
AEE101007	Fem.	71	AD PD	(-)	Humo de leña, petróleo	1.05 ng/μl	1.71 ng/μl	0.47 ng/μl	102.92 ng/μl	77.39 ng/μl
GOMJ300609	Fem.	64	AD mixto necrosis	0	Humo de leña	2.15 ng/μl	3.41 ng/μl	0.69 ng/μl	37.15 ng/μl	57.49 ng/μl
GHM291008	Fem.	63	AD Muco productor	(-)	Humo de leña	1.69 ng/μl	2.52 ng/μl	0.53 ng/μl	65.0 ng/μl	65.9 ng/μl
PMA230408	Fem.	59	AD BD	0	Humo de leña (crónico)	4.53 ng/μl	3.70 ng/μl	0.69 ng/μl	26.95 ng/μl	21.44 ng/μl
DSE201008	Fem.	70	AD BD	4	(-)	2.64 ng/μl	3.69 ng/μl	0.69 ng/μl	21.56 ng/μl	20.25 ng/μl
MGG140809	Fem.	55	AD BD	0	(-)	2.19 ng/μl	1.09 ng/μl	0.08 ng/μl	46.48 ng/μl	85.8 ng/μl
GMR080708	Fem.	47	AD MD Mucoprodutor	(-)	(-)	1.85 ng/μl	4.43 ng/μl	0.47 ng/μl	56.51 ng/μl	58.22 ng/μl
SPN020309	Fem.	41	AD Muco productor	0	(-)	9.64 ng/μl	3.78 ng/μl	0.13 ng/μl	22.36 ng/μl	35.50 ng/μl
RSCL300109	Fem.	38	AD BD	(-)	(-)	3.52 ng/μl	1.48 ng/μl	0.69 ng/μl	81.10 ng/μl	171.18 ng/μl

7.7 RE-AMPLIFICACION DEL DNA-IP POR EL MÉTODO WGA 3

Después de la amplificación por WGA1 se procedió a re-amplificar por el método de re-amplificación (WGA3) de las muestras de pacientes, lo anterior para obtener una cantidad elevada y necesaria del DNA-IP para el desarrollo de hibridación en microarreglos de DNA, así como el desarrollo de ensayos de validación cuantitativa por PCR en tiempo real.

En la fig.10 se muestran resultados representativos de este ensayo, en donde se puede observar el resultado de amplificación por WGA3, en carril 1 WGA1 del DNA Input, carril 2 WGA1 de *RNA Pol II*, carril 3 WGA1 de *Meox 2*.

En contraste con el ensayo por WGA1 donde se muestran diferencias en el rendimiento por concentración de los amplificados, en este ensayo, ya no se observa dicha diferencia entre muestras del DNA IP.

En tabla 5 se muestran los valores de amplificación por WGA3, en promedio para los DNA-IP a partir de anti-*RNA Pol II* y anti-*Meox2* se obtuvo un rendimiento de 26 veces mayor al rendimiento obtenido por el método de WGA1, obteniendo en promedio un rango de 21-25 µg por DNA-IP por muestra de paciente, lo cual en concentración y rendimiento es suficiente para proceder al desarrollo de ensayos tanto de hibridación genómica en microarreglos (ChIP on chip) como ensayos de validación cuantitativa por PCR en tiempo real.

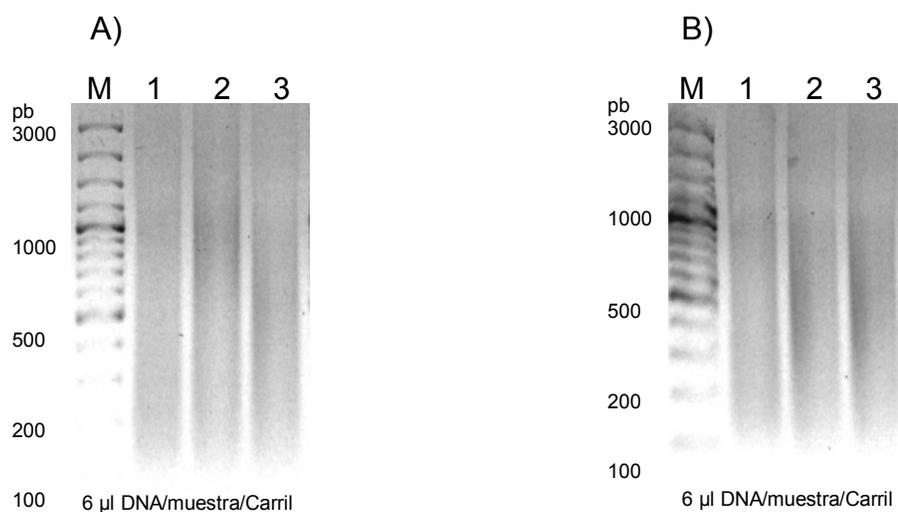


Figura 10. Amplificación lineal del DNA genómico correspondiente al DNA-IP/WGA1 por el método WGA3. Resultado representativo de 2 pacientes con cáncer de pulmón tipo AD. Resultado de amplificación lineal a partir de 500 ng de DNA-IP/WGA1, carril 1 DNA Input (Sonicado, no-IP), carril 2 WGA1 de *RNA Pol II*, carril 3 WGA1 de *Meox 2*. A) Paciente AEE101007, B) Paciente GMRM080708. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%.

Tabla 5. Valores de cuantificación del DNA-IP/WGA1 amplificado por el método WGA3. Muestras de cáncer de pulmón, amplificación por PCR a partir de 500 ng de DNA-IP/WGA1 de RNA Pol II y Meox2

No. Registro	IT	Exposición otros agentes	Inmunoprecipitación			Whole Genome Amplification (WGA1)		Whole Genome Re-Amplification (WGA3)	
			Anti-RNA Pol II	Anti-Meox2	Anti-IgG Negativo	RNA Pol II	Meox2	RNA Pol II	Meox2
GCH170209	0	Humo de leña (crónico)	2.75 ng/μl	3.15 ng/μl	0.13 ng/μl	35.47 ng/μl	77.73 ng/μl	78.29 ng/μl	96.08 ng/μl
AEE101007	(-)	Humo de leña, petróleo	1.05 ng/μl	1.71 ng/μl	0.47 ng/μl	102.92ng/μl	77.39 ng/μl	119.02 ng/μl	127.79 ng/μl
GOMJ300609	0	Humo de leña	2.15 ng/μl	3.41 ng/μl	0.69 ng/μl	37.15 ng/μl	57.49 ng/μl	140.74 ng/μl	124.49 ng/μl
GHM291008	(-)	Humo de leña	1.69 ng/μl	2.52 ng/μl	0.53 ng/μl	65.0 ng/μl	65.9 ng/μl	135.14 ng/μl	155.19 ng/μl
PMA230408	0	Humo de leña (crónico)	4.53 ng/μl	3.70 ng/μl	0.69 ng/μl	26.95 ng/μl	21.44 ng/μl	102.63 ng/μl	107.28 ng/μl
DSE201008	4	(-)	2.64 ng/μl	3.69 ng/μl	0.69 ng/μl	21.56 ng/μl	20.25 ng/μl	97.63 ng/μl	103.05 ng/μl
MGG140809	0	(-)	2.19 ng/μl	1.09 ng/μl	0.08 ng/μl	46.48 ng/μl	85.8 ng/μl	105.61 ng/μl	304.35 ng/μl
GMR080708	(-)	(-)	1.85 ng/μl	4.43 ng/μl	0.47 ng/μl	56.51 ng/μl	58.22 ng/μl	152.65 ng/μl	136.23 ng/μl
SPN020309	0	(-)	9.64 ng/μl	3.78 ng/μl	0.13 ng/μl	22.36 ng/μl	35.50 ng/μl	71.38 ng/μl	77.53 ng/μl
RSCL300109	(-)	(-)	3.52 ng/μl	1.48 ng/μl	0.69 ng/μl	81.10 ng/μl	171.18 ng/μl	88.61 ng/μl	87.49 ng/μl

7.8 HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA EN MICROARREGLOS DE SECUENCIAS PROMOTORAS (3X720K, NIMBLEGEN, ENSAMBLE HG18)

En la fig.11 se muestra el resultado de la hibridación del microrreglo que pertenece al paciente con registro AEE101007 donde, se observa el adecuado balance de colores entre canales de fluorescencia producto final de la hibridación, ajustando tanto el brillo como contraste, de forma previa al alineamiento del micro-arreglo con la plantilla del patrón de sondas impresas por microarreglo.

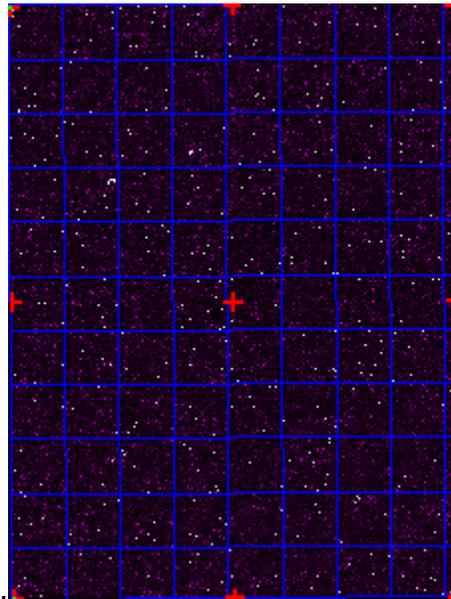


Figura 11. Resultado de hibridación genómica en microarreglos 3X720K, NimbleGen-Roche. Balance de 2 canales, muestra de paciente con cáncer pulmonar tipo AD.

Posteriormente en fig.12 se muestra el alineamiento del arreglo con las sondas impresas como criterios control necesarios previo a su análisis bioinformático, el arreglo se alineó por sus 4 esquinas, haciendo coincidir los 18 cuadros en color rojo, mientras que la señal en color verde al centro indica un alineamiento aceptable cuando el índice de fluorescencia es menor de 0.1600, a este respecto el valor de alineamiento obtenido fue 0.1290.

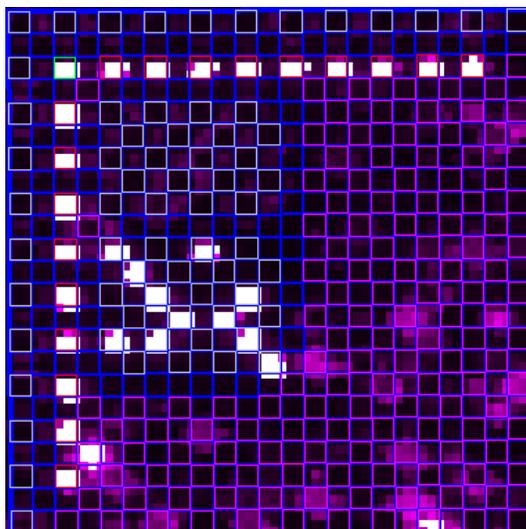
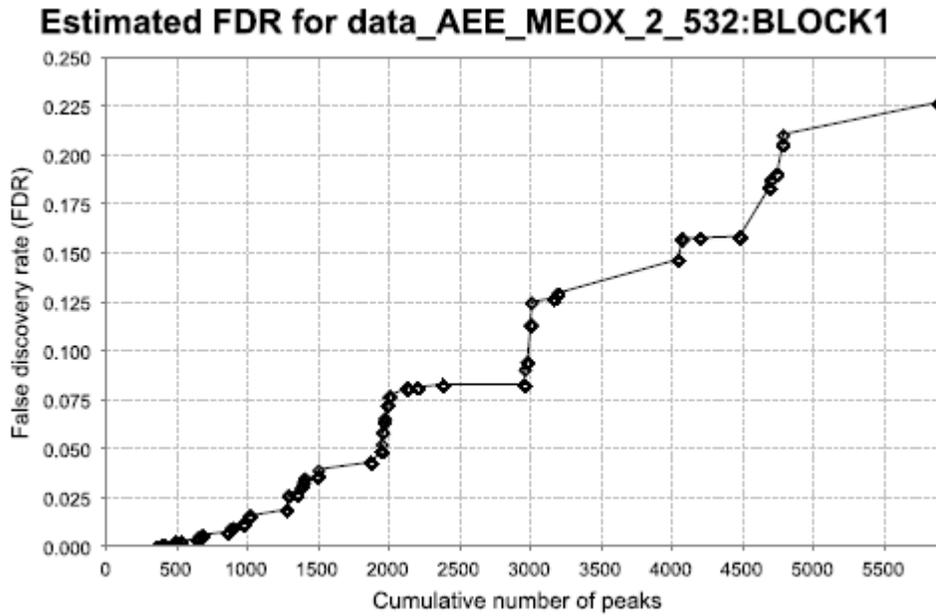


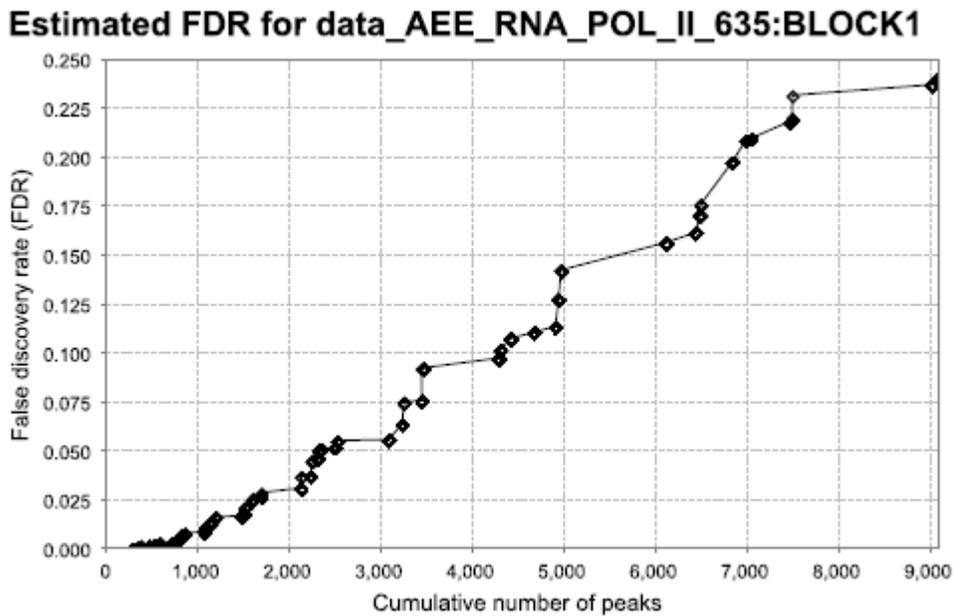
Figura 12. Alineamiento del microarreglo 3X720K de NimbleGen, Roche. Imagen generada mediante el programa de análisis NimbleScan, valor de alineamiento: 0.1290.

7.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL MICROARREGLO 3X720K

La estimación de los picos o segmentos reales de hibridación fueron descritos en materiales y métodos, en grafica 1 se muestran los segmentos obtenidos, así como su valor de FDR, para el canal de *Meox2* donde se obtuvo 4,627 picos con un valor de $FDR \leq 0.2$, con el uso de estos valores se asegura con alta certeza la interacción directa DNA-Proteína en núcleo, descartando un falso positivo. En la grafica 2 se muestran los picos (segmentos) obtenidos para el canal de *RNA Pol II* donde se obtuvieron 6,724 picos con un valor de $FDR \leq 0.2$. Por ultimo, se realizó una correlación entre ambos canales de fluorescencia para la obtención de un índice, utilizando como numerador el canal de *Meox2* y como denominador *RNA Pol II* donde se obtuvieron 5,577 picos con valor de $FDR \leq 0.2$, ver grafica 3.

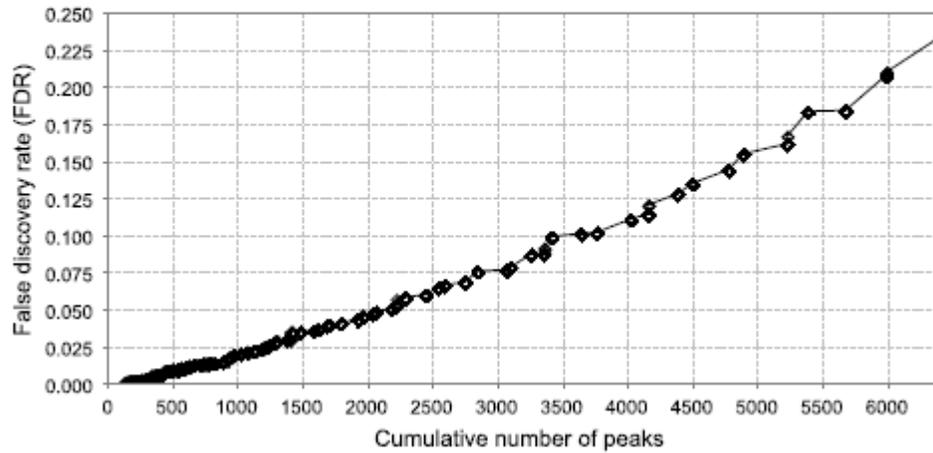


Grafica 1. Segmentos o picos de fluorescencia que representan secuencias del DNA de promotores asociados a *Meox2*. Grafica obtenida exclusivamente para el canal de *Meox2_532* donde se muestra el número de picos y su valor de FDR.



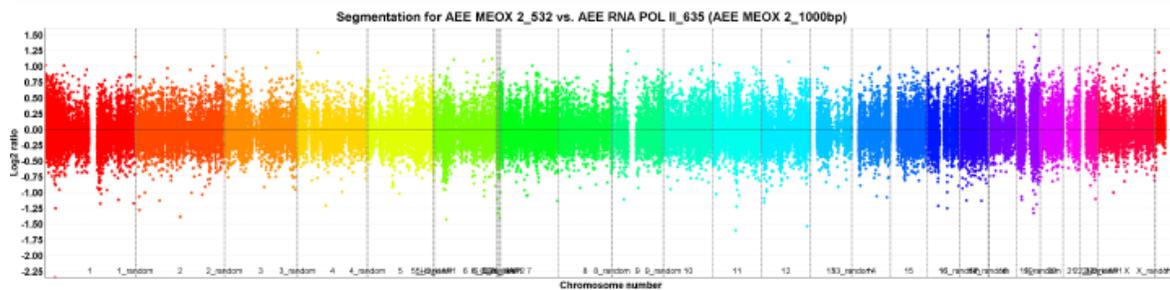
Grafica 2. Segmentos o picos de fluorescencia que representan secuencias del DNA de promotores asociados a *RNA POL II*. Grafica obtenida exclusivamente para el canal de *RNA Pol II_635* donde se muestra el número de picos y su valor de FDR.

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



Grafica 3. Segmentos o picos de fluorescencia que representan secuencias del DNA de promotores bajo el análisis de obtención de índice (Ratio) de fluorescencia entre ambos canales (*Meox2* / *RNA Pol II*). Grafica obtenida a partir del índice de ambos canales (532/635) donde se muestra el número de picos y su valor de FDR.

Se obtuvo por análisis de ChIP on chip imágenes del genoma completo mostrando la presencia o ausencia de señal de fluorescencia para segmentos IP provenientes de *Meox2* y *RNA Pol II*, lo cual indica los posibles blancos génicos de promotores de genes asociados a *Meox2* transcripcionalmente activos debido a su coincidencia con *RNA Pol II*, mediante el análisis del índice de fluorescencia. Lo cual, puede observarse en grafica 4 donde la región media indica correlación entre ambos canales, mientras que hacia los extremos superior (*Meox2*) e inferior (*RNA Pol II*) de la grafica se indican aquellos genes con mayor índice de representatividad por florescencia.



Grafica 4. Resultado de análisis por CGH de ambos canales de fluorescencia por separado para DNA-IP de *Meox2* (señal superior) y DNA-IP de *RNA Pol II* (señal inferior), genoma completo. Representación del genoma completo en arcoíris generado a partir del análisis de picos de fluorescencia de ambos canales por separado (canales 532/635).

7.10 ANÁLISIS DE POSIBLES BLANCOS GENÉTICOS ASOCIADOS AL FACTOR TRANSCRIPCIONAL *MEOX2*

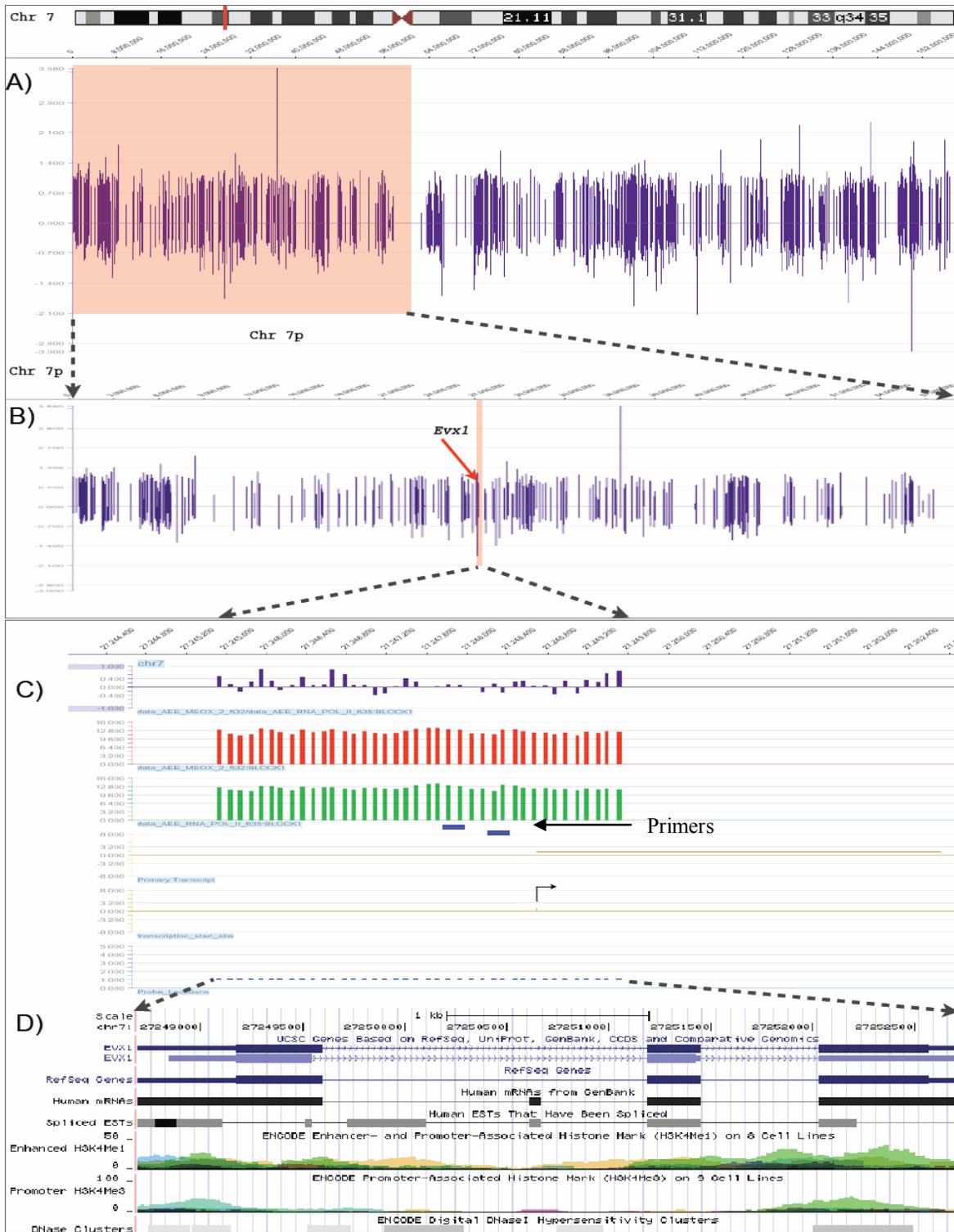
Posterior al análisis bioinformático en la obtención de segmentos genéticos asociados a *Meox2* y *RNA Pol II* basados en picos de fluorescencia por el método estadístico ya descrito en materiales y métodos, se procedió al análisis de posicionamiento genómico, haciendo visibles dichos segmentos mediante el uso del programa SignalMap versión 1.9, a partir del cual pueden apreciarse ambos picos de fluorescencia.

A continuación se muestra en análisis del índice de fluorescencia sobre un conjunto segmentos genéticos asociados a *Meox2*, ubicados en el brazo corto del cromosoma 7. Lo anterior fue decidido, dado que resulta interesante conocer si *Meox2* como factor transcripcional es capaz de regular su propia expresión a nivel de promotor como gen relacionado a genes Homeobox, así como a otro miembro de la misma familia como es el promotor del gen *Evx1*. Adicionalmente, fue propuesto analizar si otros factores de transcripción no relacionados con genes Homeobox fueran blanco de regulación transcripcional por *Meox2*, tal es el caso del promotor del gen *Twist1* ubicado también en el brazo corto del cromosoma 7. En contraste con el objeto de validar otro tipo de promotor no relacionado con genes Homeobox, se decidió analizar un promotor endógeno como es el caso de *C-fos*. Por tanto en las graficas 5A, 6A y 7A se indica el ideograma del brazo corto del cromosoma 7, el cual representa la señal fluorescencia debido a la IP de *Meox2* y *RNA Pol II* y el brazo largo del cromosoma 14 para *C-fos*.

Adicionalmente en gráficas 5B, 6B y 7B se muestra un acercamiento al brazo corto del cromosoma 7 haciendo énfasis en la ubicación 7p21.1 para la región promotora de *Meox2* y *Twist1*, así como la región 7p15.2 para el promotor del gen *Evx1*. Mientras que, en gráficas 5C, 6C y 7C se indica el acercamiento a la región promotora de los genes en estudio de validación indicando el sitio de impresión (sondas) del microarreglo donde que incluyen el promotor, el sitio de inicio de la transcripción e inicio del transcrito primario. A continuación Tabla 6., se indican las características de regiones génicas blanco de *Meox2* para su validación mediante ensayos cuantitativos por PCR en tiempo real.

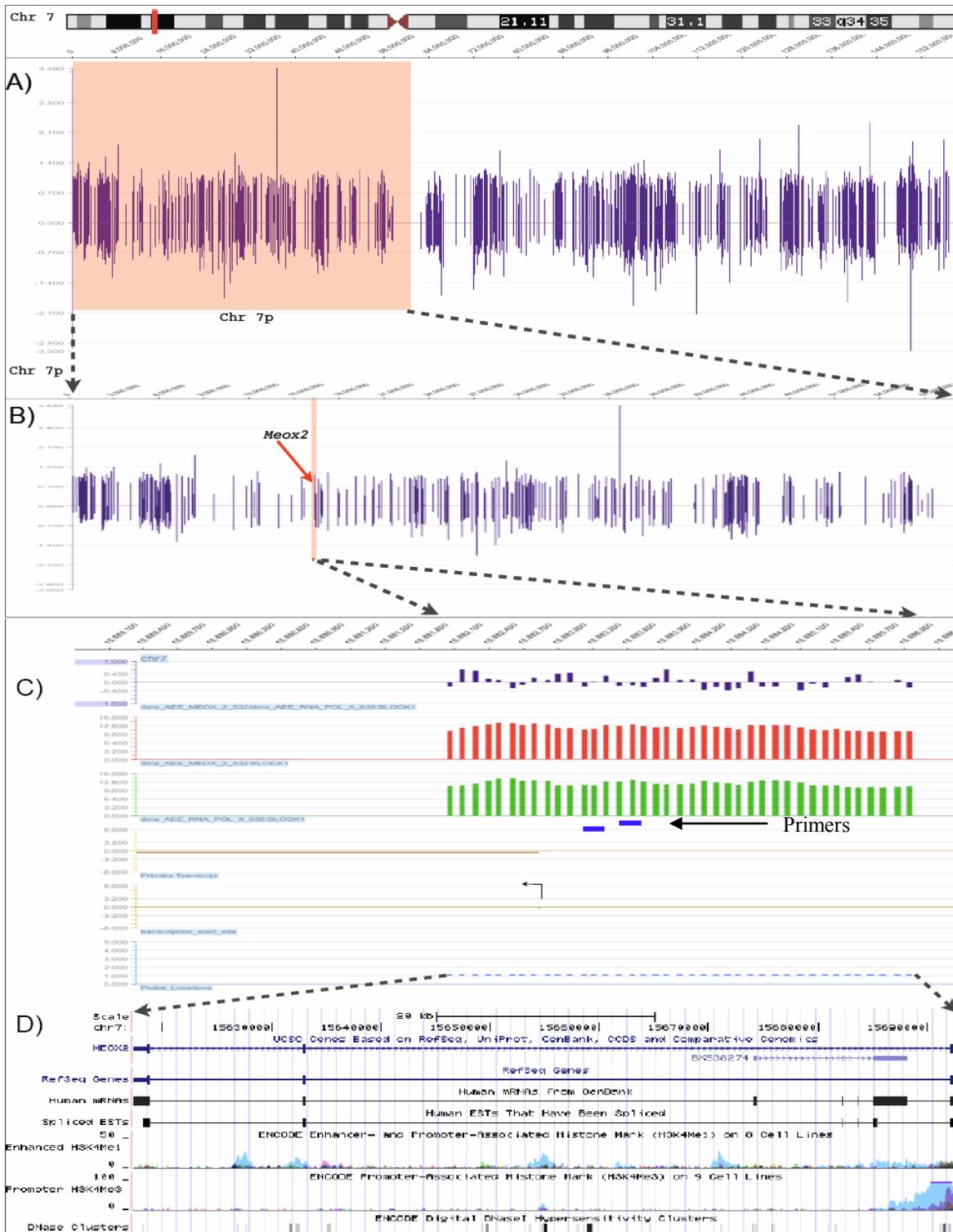
Tabla 6. Características de regiones blanco de *Meox2* para ensayos de validación cuantitativa

Gen	Región citogenética	Inicio del transcrito	Fin del transcrito	Dirección del transcrito
<i>Evx1</i>	7p 15.2	27,248,688	27,252,717	+
<i>Meox2</i>	7p 21.1	15,617,361	15,692,833	-
<i>Twist1</i>	7p 21.1	19,121,615	19,123,820	-
<i>C-fos</i>	14q 24.3	74,815,283	74,818,665	+



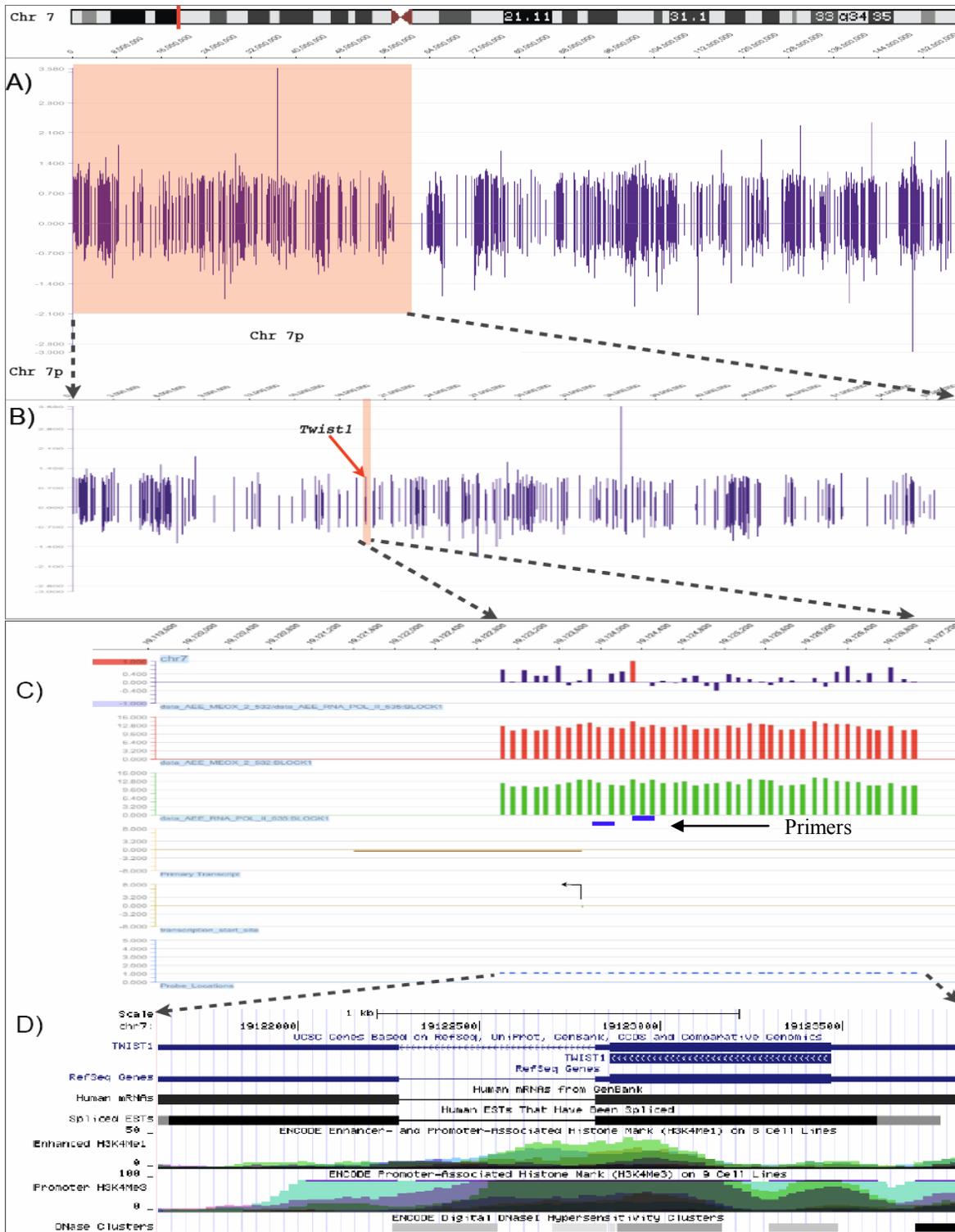
Grafica 5. Ubicación del gen *Evx1* en el cromosoma 7, región 7p 15.2 Ubicación del gen *Evx1* en el cromosoma 7, región 7p 15.2 A) Cromosoma 7. B) Acercamiento al brazo corto del cromosoma 7. C) Región promotora y transcrito del gen *Evx1*, incluyendo la posición de los oligonucleotidos (primers) diseñados para su posterior análisis de

validación cuantitativa por PCR. D) En color morado se muestra el índice (ratio) de ambos canales (*Meox2* / *RNA Pol II*), en color rojo la fluorescencia debida al canal de fluorescencia de *Meox2*, en color verde la fluorescencia del canal para *RNA Pol II*, las sondas abarcan la posición -3,200 pb upstream y +800 pb downstream, (transcrito primario) a partir del sitio de inicio de la transcripción. Posición genómica de la región 7p15.2, Chr7p: 7p 15.2 27,248,688-27,252,717 que incluye la secuencia promotora e inicio del transcrito primario del gen *Evx1*. (Publicado y obtenido del servidor UCSC Genome Browser).



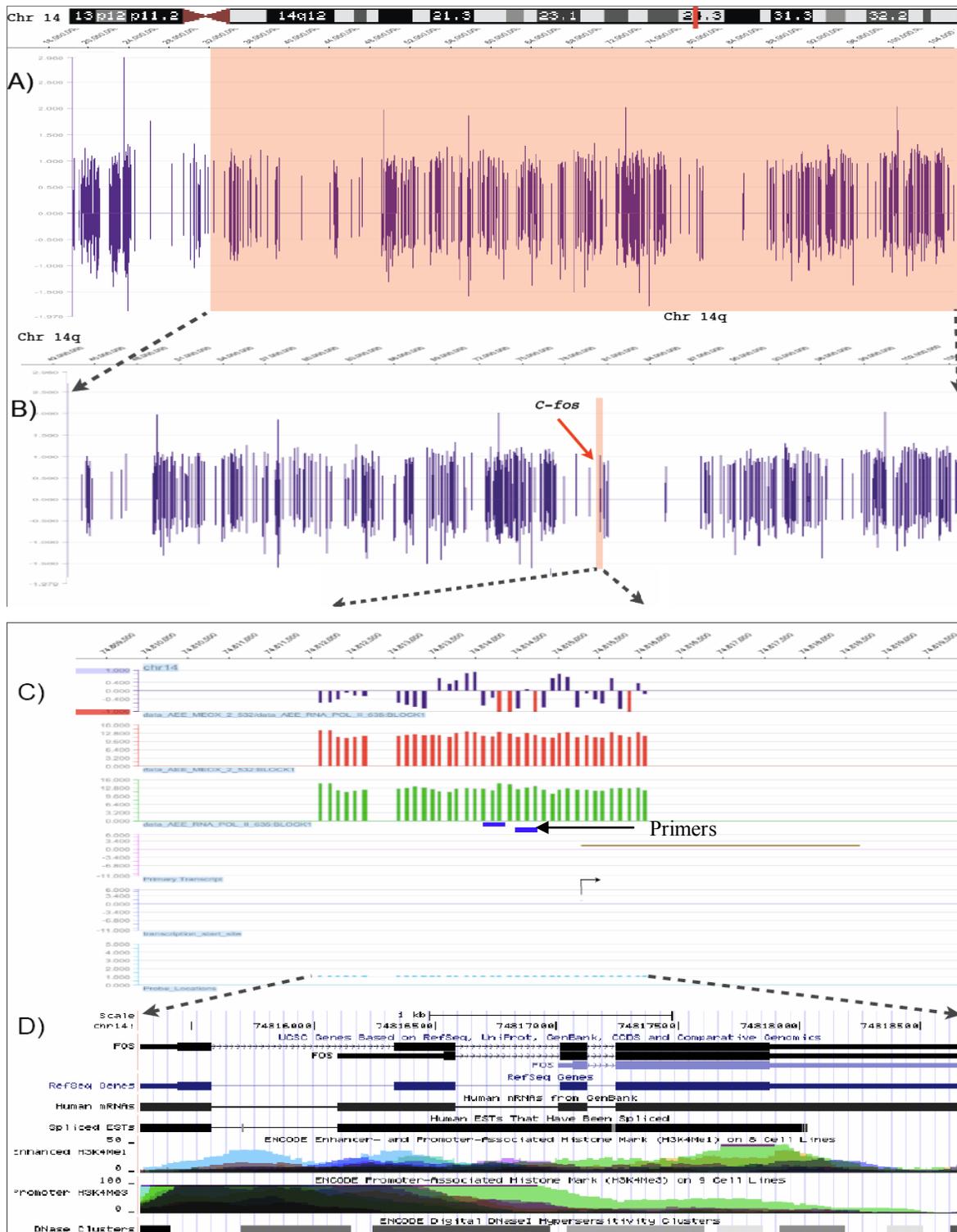
Grafica 6. Ubicación del gen *Meox2* en el cromosoma 7, región 7p21.1 A) Cromosoma 7. B) Acercamiento al brazo corto del cromosoma 7. C) Región promotora y transcrito del gen *Meox2* incluyendo la posición de los oligonucleotidos (primers) diseñados para su posterior análisis de validación cuantitativa por PCR. En color morado se muestra el

índice (ratio) de ambos canales (*Meox2* / *RNA Pol II*), en color rojo la fluorescencia debida al canal de fluorescencia de *Meox2*, en color verde la fluorescencia del canal para *RNA Pol II*, las sondas abarcan la posición -3,200 pb upstream y +800 pb downstream, (transcrito primario) a partir del sitio de inicio de la transcripción. Posición genómica de la región 7p21.1, Chr7p: 15,617,361-15,692,833 que incluye la secuencia promotora e inicio del transcrito primario del gen *Meox2* (Publicado y obtenido del servidor UCSC Genome Browser).



Grafica 7. Ubicación del gen *Twist1* en el cromosoma 7, región 7p 21.1. A) Cromosoma 7. **B)** Acercamiento al brazo corto del cromosoma 7. **C)** Región promotora y transcrito del gen *Twist1*, incluyendo la posición de los oligonucleotidos (primers) diseñados para su posterior análisis de validación cuantitativa por PCR. **D)** En color

morado se muestra el índice (ratio) de ambos canales (*Meox2* / *RNA Pol II*), en color rojo la fluorescencia debida al canal de fluorescencia de *Meox2*, en color verde la fluorescencia del canal para *RNA Pol II*, las sondas abarcan la posición -3,200 pb upstream y +800 pb downstream, (transcrito primario) a partir del sitio de inicio de la transcripción. Posición genómica de la región 7p21.1, Chr:7p 19,121,615-19,123,820 que incluye la secuencia promotora e inicio del transcrito primario del gen *Twist1*. (Publicado y obtenido del servidor UCSC Genome Browser).

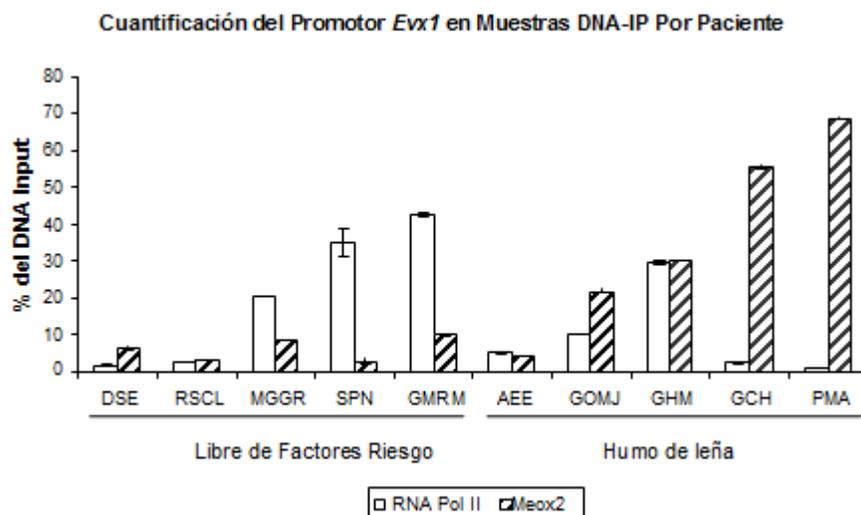


Grafica 8. Ubicación del gen *C-fos* en el cromosoma 14, región 14q24.3 A) Cromosoma 7. B) Acercamiento al brazo corto del cromosoma 7. C) Región promotora y transcrito del gen *C-fos*, incluyendo la posición de los oligonucleotidos (primers) diseñados para su posterior análisis de validación cuantitativa por PCR D) En color

morado se muestra el índice (ratio) de ambos canales (*Meox2* / *RNA Pol II*), en color rojo la fluorescencia debida al canal de fluorescencia de *Meox2*, en color verde la fluorescencia del canal para *RNA Pol II*, las sondas abarcan la posición -3,200 pb upstream y +800 pb downstream, (transcrito primario) a partir del sitio de inicio de la transcripción. Posición genómica de la región 14q24.3, Chr:14q 24.3 74,815,283-74,818,665 que incluye la secuencia promotora e inicio del transcrito primario del gen *C-fos*. (Publicado y obtenido del servidor UCSC Genome Browser).

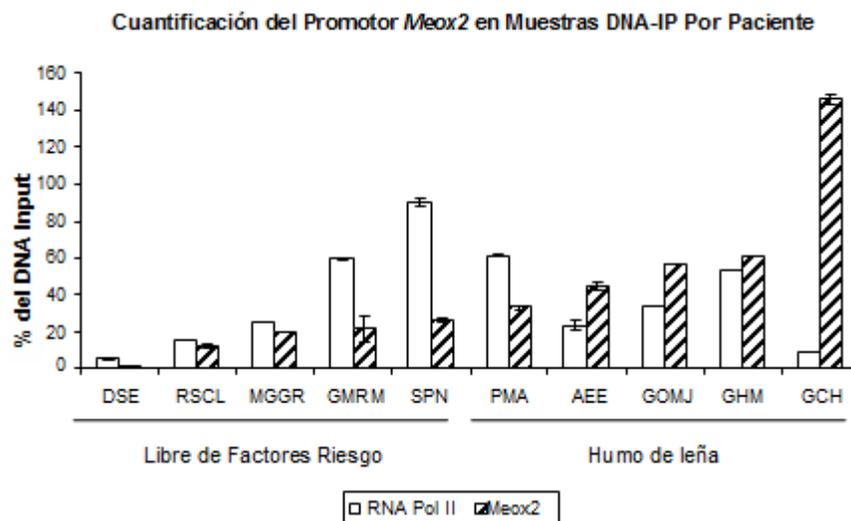
7.11 ENSAYOS DE VALIDACIÓN CUANTITATIVA SOBRE SECUENCIAS PROMOTORAS DE LOS GENES *MEOX2*, *EVX1*, *TWIST1* Y *C-FOS*, COMO SECUENCIAS BLANCO DE *MEOX2*

Posterior a todo lo anterior, fueron realizados ensayos de validación cuantitativa por PCR en tiempo real donde se puede apreciar la amplificación secuencia específica de las regiones promotoras de los genes *Evx1*, *Meox2*, *Twist1* y *C-fos*, regulados transcripcionalmente por ambos *RNA Pol II* y *Meox2* en los 2 grupos de pacientes con cáncer pulmonar de tipo adenocarcinoma. En la grafica 9 se observa mayor amplificación del promotor del gen *Evx1* en aquellos pacientes bajo exposición a humo de leña cuando se inmunoprecipita *Meox2*, en contraste de aquellos pacientes libres de exposición a factores de riesgo. Sin embargo, existe aumento en la amplificación cuantitativa cuando se inmunoprecipita *RNA Pol II* en aquellos pacientes libres de exposición a factores de riesgo.



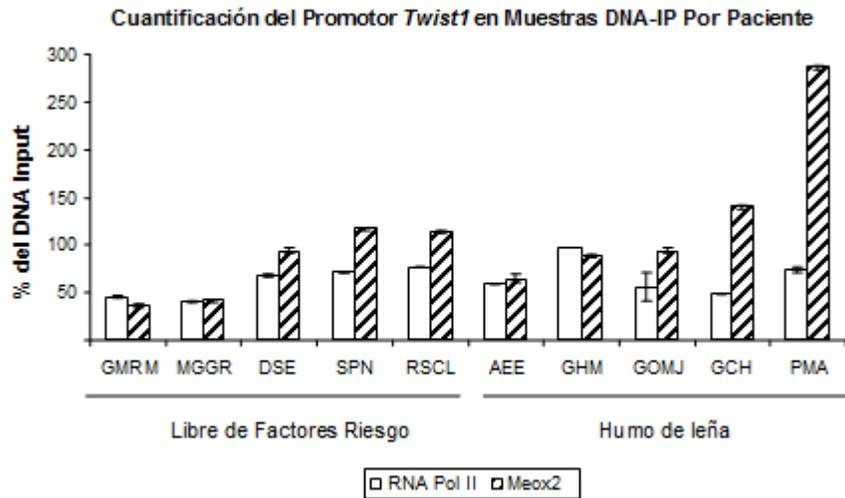
Grafica 9. Análisis cuantitativo mediante amplificación por PCR para la secuencia promotora del gen *Evx1*, en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD. Valores de amplificación para la región promotora del gen *Evx1* representados en porcentaje tomando como referencia de 100% de amplificación del DNA-Input (DNA sonificado, no-IP) de cada paciente, basado en la cuantificación absoluta mediante el uso de curva estándar construida con DNA-Input (DNA sonificado, no-IP) control.

En la grafica 10 se observa una tendencia similar a lo ocurrido con la amplificación del gen *Evx1*, sin embargo los porcentajes de amplificación para la región promotora del gen *Meox2* son superiores, hasta alcanzar valores máximos de 140% en el caso de IPs de *Meox2* y cercanos al 90% para los IP de *RNA Pol II* indicando un porcentaje cercano al doble de amplificación comparado con los valores obtenidos para el gen *Evx1*.



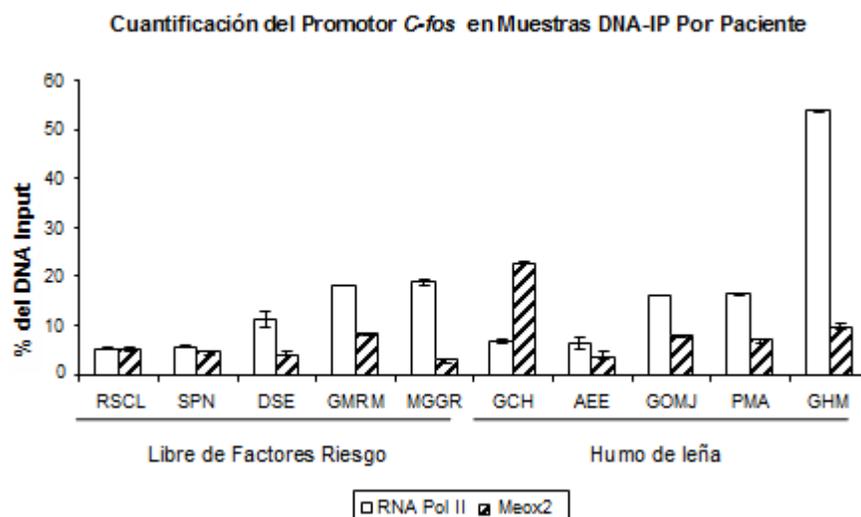
Grafica 10. Análisis cuantitativo mediante amplificación por PCR para la secuencia promotora del gen *Meox2* en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD. Valores de amplificación para la región promotora del gen *Meox2* representados en porcentaje tomando como referencia de 100% de amplificación del DNA-Input (DNA sonificado, no-IP) de cada paciente, basado en la cuantificación absoluta mediante el uso de curva estándar construida con DNA-Input (DNA sonificado, no-IP) control.

Por otro lado, respecto a los ensayos de validación para el gen *Twist1* estos presentan mayor nivel de amplificación en los distintos pacientes, en la grafica 11, se puede observar que existe mayor amplificación para el promotor del gen *Twist1* en 8 pacientes con valores mínimos a 50% y con un máximo 280%, tanto para Ips de *RNA pol II* como *Meox2*, este aumento se observa tanto en pacientes con exposición a humo de leña como en pacientes libres de exposición a factor de riesgo. Sugiriendo que este gen *Twist1* posee mayor actividad transcripcional que los previamente arriba mencionados.



Grafica 11. Análisis cuantitativo mediante amplificación por PCR para la secuencia promotora del gen *Twist1* en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD. Valores de amplificación para la región promotora del gen *Twist1* representados en porcentaje tomando como referencia de 100% de amplificación del DNA-Input (DNA sonicado, no-IP) de cada paciente, basado en la cuantificación absoluta mediante el uso de curva estándar construida con DNA-Input (DNA sonicado, no-IP) control.

Por otro lado, y en contraste en la amplificación del promotor *C-fos* como control endógeno constitutivo, en gráfica 12, se advierte mayor amplificación del promotor asociado con *RNA Pol II*, tanto en pacientes libres de exposición como en pacientes con exposición a humo de leña. No obstante se observa que solo un paciente con exposición a humo de leña mantiene aumento en la amplificación del promotor de de *C-fos* asociado con IP de *Meox2*, no obstante mantiene porcentajes por abajo del 10% para el resto de los pacientes.

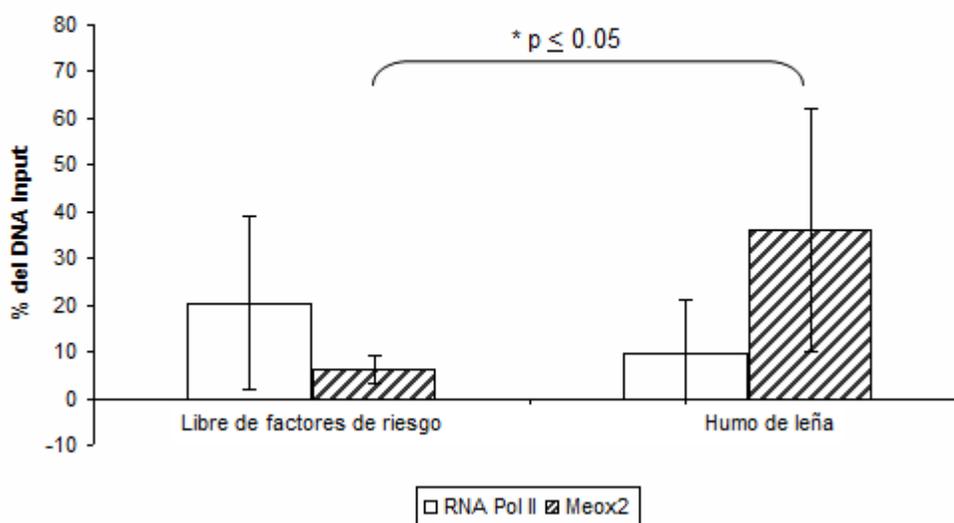


Grafica 12. Análisis cuantitativo mediante amplificación por PCR para la secuencia promotora del gen *C-fos* en muestras de pacientes con cáncer pulmonar tipo AD. Valores de amplificación para la región promotora del gen *C-fos* representados en porcentaje tomando como referencia de 100% de amplificación del DNA-Input (DNA sonicado, no-IP) de cada paciente, basado en la cuantificación absoluta mediante el uso de curva estándar construida con DNA-Input (DNA sonicado, no-IP) control.

Adicional a lo anterior, se promediaron los valores de porcentaje de amplificación de secuencias promotoras por grupos de pacientes en presencia y ausencia de exposición a factores de riesgo.

En la grafica 13 se muestra a los pacientes libres de exposición a factores de riesgo con aumento en la amplificación de *Evx1* cuando se inmunoprecipita *RNA Pol II* alcanzando valores de 20%, comparados con IP's de *Meox2* alcanzando valores solo de 6%. Mientras que en pacientes con exposición a humo de leña el comportamiento es contrario pues se observa disminución en la amplificación de IP's de *RNA Pol II* con valor de 9% en contraste a los IP's de *Meox2* alcanzando valores de 36%.

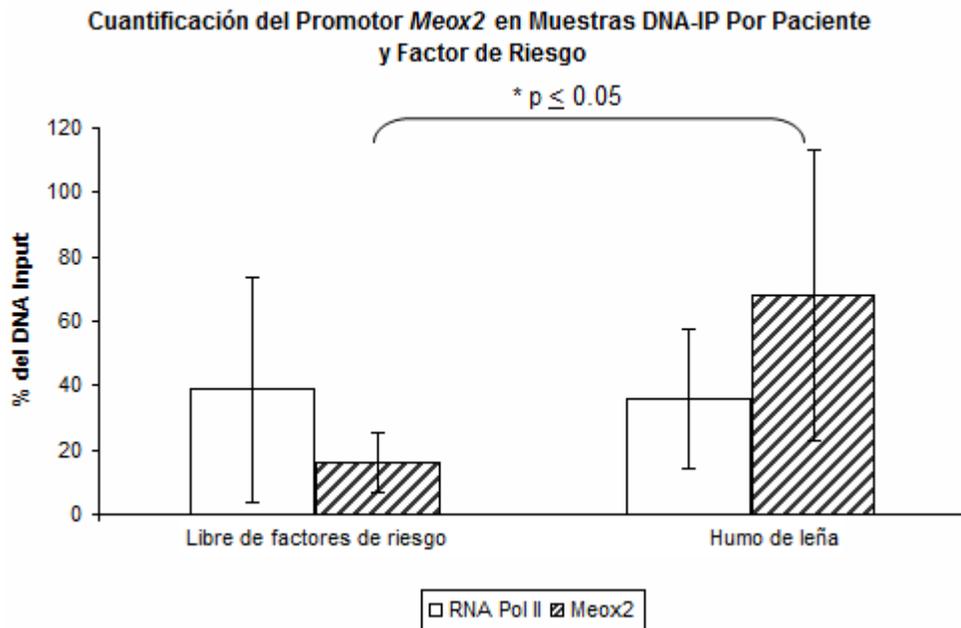
Cuantificación del Promotor *Evx1* en Muestras DNA-IP Por Paciente y Factor de Riesgo



Grafica 13. Análisis cuantitativo del promotor del gen *Evx1* por factor de riesgo. Resultado a partir de PCR en tiempo real para la región promotora del gen *Evx1*, en pacientes con exposición a humo de leña y libres de exposición a factores de riesgo. . * Indica análisis estadístico con $p \leq 0.05$, entre ambos grupos de pacientes.

En la grafica 14 se hace evidente el aumento en la amplificación del promotor *Meox2* asociado con la IP de *Meox2* en pacientes bajo exposición a humo de leña con un valor de 68%, en contraste de valor de 16% en pacientes libres de factores de riesgo.

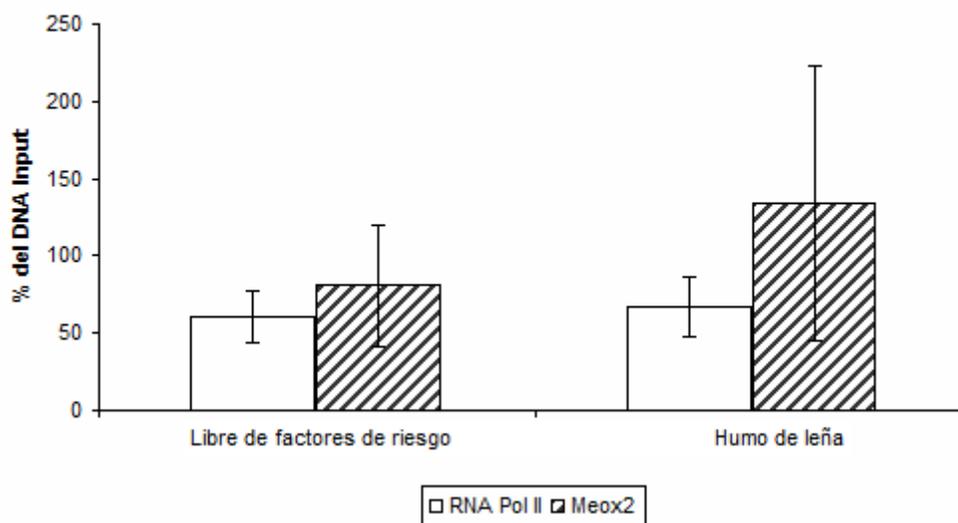
Lo anterior llama la atención dado que el porcentaje de amplificación de IP de *RNA pol II* no disminuye desde un valor de 38% hasta 36%, en pacientes libres de factores de riesgo a pacientes bajo exposición a humo de leña, respectivamente. Una tendencia similar en ambos grupos de pacientes puede ser apreciada para el caso del promotor *Meox2*, sugiriendo una correlación tal vez debida a pertenecer a miembros de la misma familia de los genes Homeobox.



Grafica 14. Análisis cuantitativo del promotor del gen *Meox2* por factor de riesgo. Resultado a partir de PCR en tiempo real para la región promotora del gen *Meox2*, en pacientes con exposición a humo de leña y libres de exposición a factores de riesgo. * Indica análisis estadístico con $p \leq 0.05$, entre ambos grupos de pacientes.

Por otro lado, en contraste con los genes Homeobox relacionados *Evx1* y *Meox2*, en la grafica 15 se observa mayor amplificación del gen *Twist1* asociado con IP de *Meox2* tanto en pacientes libres de exposición a factor de riesgo con un valor promedio de 80%, como en pacientes con exposición a humo de leña alcanzado un valor promedio de 134%. Adicionalmente, también fue observado disminución en la amplificación para los IP de *RNA pol II* tanto en pacientes en ausencia y presencia de factores de riesgo con valores de 60% y 67%, respectivamente.

Quantificación del Promotor *Twist1* en Muestras DNA-IP Por Paciente y Factor de Riesgo

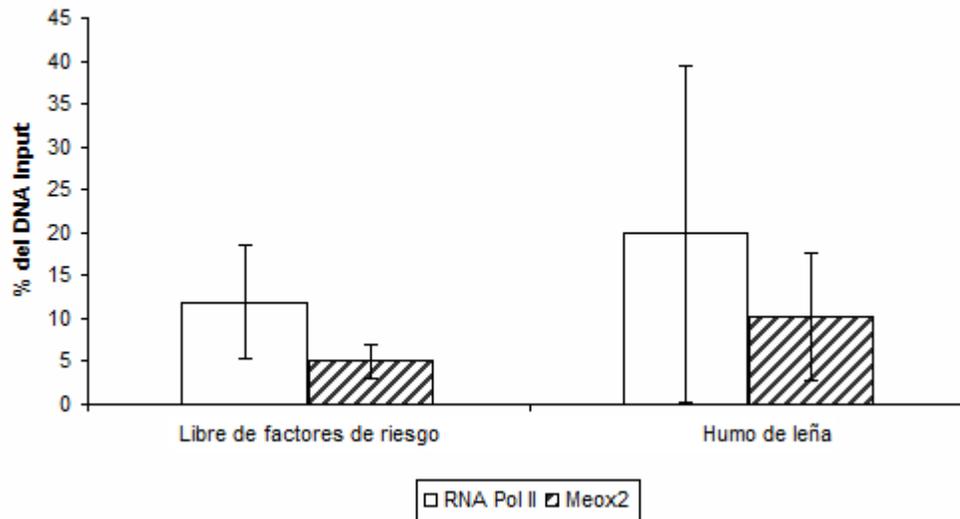


Grafica 15. Análisis cuantitativo del promotor del gen *Twist1* por factor de riesgo.

Resultado a partir de PCR en tiempo real para la región promotora del gen *Twist1*, en pacientes con exposición a humo de leña y libres de exposición a factores de riesgo. * Indica análisis estadístico con $p \leq 0.05$, entre ambos grupos de pacientes.

Por último como se observa en la grafica 16 y comparado con los genes ya mencionados, la amplificación del promotor *C-fos*, este muestra un comportamiento diferente pues existe mayor amplificación en los IP de *RNA pol II* de ambos grupos de pacientes con valores del 12% y 20%; mientras que menor aún en los IPs de *Meox2* en ambos grupos de pacientes con valores prácticamente nulos de 5% y 10%. Indicando que *C-fos* no es un blanco preferencial de *Meox2* en las neoplasias pulmonares.

Cuantificación del Promotor *C-fos* en Muestras DNA-IP Por Paciente y Factor de Riesgo



Grafica 16. Análisis cuantitativo del promotor del gen *C-fos* por factor de riesgo. Resultado a partir de PCR en tiempo real para la región promotora del gen *C-fos*, en pacientes con exposición a humo de leña y libres de exposición a factores de riesgo. * Indica análisis estadístico con $p \leq 0.05$, entre ambos grupos de pacientes.

7.12 BLANCOS GÉNICOS DE *MEOX2* IDENTIFICADOS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE CHIP ON chip EN MICROARREGLOS DE PROMOTORES DE NIMBLEGEN 3X720

Mediante el análisis bioinformático astringente de los ensayos de CHIP on chip fueron obtenidos un total de 145 genes con un índice de fluorescencia alto y con un valor FDR= 0, la lista completa se encuentra en el apartado de anexos 12.4. Sin embargo a continuación se muestran un conjunto de 20 genes los cuales el presente trabajo propone sean evaluados en las perspectivas de este trabajo (tabla 7) los cuales muestran un rango de fluorescencia 1.0 hasta 0.5, que por su función pueden estar involucrados en los procesos de carcinogénesis y/o evolución clínica de las neoplasias pulmonares, destacando entre ellos genes implicados en la maquinaria transcripcional, entre ellos se encuentran:

5 genes miembros de la misma familia Homeobox, como ya observo en los resultados es capaz de regular a genes de la misma familia, 3 proteínas asociadas a cáncer, como lo es RAS y una sinucleína-gamma una proteína específica de cáncer de mama, 2 DNA metil-transferasas, implicadas en la regulación epigenética y metilación de regiones promotoras, 2 miembros de una súper-familia de receptores nucleares que participan en la embriogénesis de mamíferos, 2 sub-unidades de polimerasa, 2 proteínas de unión como CREB y CCCTC, así como la región promotora del cluster de microRNA17-92, que recientemente se postulo como un cluster oncogénico en el cáncer pulmonar (Ver, tabla. 7).

Tabla 7. Selección de genes blanco de *Meox2* con actividad de regulación epigenética y transcripcional en carcinomas pulmonares

Chr	Gen	Descripción	Número. de Acceso	Índice (Ratio)	Posición relativa del gen / cadena
chr21	DNMT3L	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-like	NM_175867	1.00829	Upstream -
chr13	MIRHG1	miR-17-92 cluster host gene (non-protein coding)	NR_027350	1.006268	Upstream +
chr9	NANR6A1	nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1	NM_033334	0.999001	Downstream -
chr20	CTCFL	CCCTC-binding factor (zinc finger protein)-like	NM_080618	0.959621	Upstream -
chr20	TGIF2	TGFB-induced factor homeobox 2	NM_021809	0.936216	Downstream +
chr3	GATA2	GATA binding protein 2	NM_001145661	0.878599	Upstream -
chr11	RASSF7	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N-terminal) member 7	NM_001143994	0.814609	Upstream +
chr16	CREBBP	CREB binding protein	NM_001079846	0.786144	Upstream -
chr10	HHEX	hematopoietically expressed homeobox	NM_002729	0.76877	Downstream +
chr12	POLE	polymerase (DNA directed), epsilon	NM_006231	0.766724	Upstream -
chr7	CUX1	cut-like homeobox 1	NM_181500	0.724383	Downstream +
chr4	NR3C2	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2	NM_000901	0.710935	Upstream -
chr17	CBX4	chromobox homolog 4	NM_003655	0.692789	Upstream -
chr8	RNF170	ring finger protein 170	NM_030954	0.680881	Upstream -
chr18	TSHZ1	teashirt zinc finger homeobox 1	NM_005786	0.625794	Upstream +
chr20	DNMT3B	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta	NM_175849	0.60854	Downstream +
chr3	POLR2H	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide H	NM_006232	0.593054	Upstream +
chr1	TP73	tumor protein p73	NM_005427	0.570318	Downstream +
chr10	SNCG	synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)	NM_003087	0.565272	Upstream +
chr7	EN2	engrailed homeobox 2	NM_001427	0.52065	Upstream +

8 DISCUSIÓN

La presencia nuclear del factor transcripcional *Meox2* en tumores sólidos pulmonares y citoplásmica en líneas celulares del cáncer pulmonar.

La presencia del factor transcripcional *Meox2* en núcleo pudo ser observada tanto en líneas celulares de cáncer de pulmón tipo AD, como en carcinomas pulmonares sólidos tipo AD de pacientes mexicanos, bajo atención médica en el INER. Observando además que la presencia de *Meox2*, puede encontrarse tanto en membrana nuclear, citoplasma como en membrana citoplasmática, en este mismo orden al parecer dependiente de la densidad celular en condiciones *in vitro*.

Específicamente en 4 líneas celulares tipo AD tanto de origen caucásico como mestizo mexicana, *Meox2* se encuentra en la fracción nuclear bajo condiciones de baja confluencia (baja interacción célula-célula) cercana al 40% (Fig.4 A, B, C y D). No obstante, en presencia de alta confluencia cercana del 90%, el factor transcripcional *Meox2* se deslocaliza a citoplasma. Lo anterior observado, tanto en líneas celulares INER-37 e INER-51 donde disminuye la fracción nuclear y aumenta mayoritariamente en citoplasma; como en las líneas celulares A-427 y A-549 donde la presencia de este factor es preponderante en membrana plasmática. A este respecto, dicho comportamiento ha sido observado para otros factores de transcripción en líneas celulares del grupo NSCLC, entre ellos *Foxo1* quien sufre deslocalización del núcleo a citoplasma respondiendo al estrés celular, como ejemplo la restricción de nutrientes (Maekawa T., *et al.* 2009). No obstante, aunque el factor transcripcional se observe deslocalizado, no deja de llevar a cabo sus funciones probablemente realizando otra función celular fuera del núcleo, la cual no ha sido descrita hasta el momento.

Pese a lo anterior, *Meox2* en tejido neoplásico *in situ* no sufre deslocalización evidente. Como pudo observarse en la Fig.5 A donde tejido normal libre de lesión presenta expresión basal mínima principalmente localizada en vasos sanguíneos; sin embargo es posible observar aumento en la expresión de la proteína en núcleo desde etapas tempranas de la progresión neoplásica pulmonar, es decir presente en lesiones precursoras como metaplasias y displasias pulmonares (Fig.5 B) cuyo aumento en la expresión de la proteína avanza, conforme avanza el grado de

diferenciación histológica y estadios clínicos avanzados desde un carcinoma *in situ* hasta un proceso de invasión y metástasis (Fig.5 C y D) donde es posible identificar su localización nuclear como factor transcripcional. Lo cual es contrario a lo observado por Puppin C. y cols., (2006) respecto al factor transcripcional *Hhex* miembro de la familia de los genes Homeobox, el cual sufre deslocalización en cáncer de mama, observando una clara reducción de la fracción nuclear, no obstante en tejido normal se localiza en núcleo y citoplasma (Puppin C., *et al.* 2006). No obstante los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la localización de *Meox2* preponderante en núcleo durante la progresión neoplásica pulmonar, sigue una alta actividad como factor transcripcional. Lo cual posiblemente conlleve hacia la participación activa a lo largo de la progresión histopatológica, invasión y metástasis posiblemente responsable del pronóstico del paciente asociado con la exposición a factores de riesgo ambiental.

Papel de *Meox2* como regulador transcripcional en la embriogénesis y el cáncer pulmonar

Meox2 como factor transcripcional es importante en el desarrollo embrionario del ser humano y otros mamíferos, las funciones principales lo ubican en la etapa temprana del desarrollo embrionario, su alta expresión se ve reflejada en el aumento de la proliferación celular, angiogénesis, entre otras funciones donde *Meox2* se ha demostrado juega un papel central en la génesis de extremidades de mamíferos (ratón, humano). La ausencia de este factor transcripcional en ratones *Meox2*^{-/-} se ha visto involucrada en la generación de deformaciones del eje axial esquelético, los cuales presentan un fenotipo donde la mayoría de los músculos esqueléticos están ausentes o muestran tamaño reducido o deficiente (Mankoo., *et al.* 2003). Adicionalmente *Meox2* se expresa en el embrión en el desarrollo de extremidades y músculo liso, lo cual es conservado tanto en pollos, como en mamíferos (Reijntjes S., *et al.* 2010). No obstante dicha importancia de este factor transcripcional durante la embriogénesis, a la fecha no se ha descrito su participación en cáncer pulmonar. Sin embargo, escasos antecedentes han descrito su asociación con el desarrollo de tumores de Wilms (Ohshima J., *et al.*

2009), así como patologías crónico-degenerativas como el Alzheimer (Wu Z., *et al.* 2005). Sin embargo, aunque su papel funcional esta plenamente descrito, aun se desconoce su participación en la progresión neoplásica pulmonar, a este respecto en 2008 Cortese y Cols, describen la presencia de perfiles de metilación aberrante en la región 5' UTR del gen *Meox2*, proponiéndose como un posible marcador del cáncer pulmonar, pues en tejido fetal pulmonar y tejido neoplásico se observa sobre-expresado, sin embargo ausente en tejido libre de lesión neoplásica (Cortese R., *et al.* 2008). Lo cual concuerda con los resultados obtenidos experimentalmente en el presente trabajo mediante técnicas de inmunohistoquímica.

Regulación de genes Homeobox por *Meox2*, como posible mecanismo de regulación en Feedback de *Meox2* y sobre otros genes Hox relacionados (*Evx1*).

A la fecha no existe reporte alguno sobre la regulación directa o indirecta de *Meox2* sobre los distintos miembros de la familia de genes Homeobox, así como de una posible autorregulación en feedback positiva. Sin embargo, en este trabajo postulamos la probable participación de *Meox2* como factor transcripcional, capaz de regular positivamente a genes Hox relacionados, entre ellos *Evx1*, como miembro de los genes Homeobox, ya que mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina y ensayos de validación cuantitativa de blancos génicos de *Meox2*, fue posible evidenciar que *Meox2* es capaz de unirse a la región promotora del gen *Evx1*, probablemente siendo regulando de forma positiva, ya que existe evidencia donde un gen emparentado y homólogo de *Meox2*, como es *Meox1* es capaz de regular negativamente a *HoxB2* (Kirilenko P., *et al.* 2011), el cual por cierto correlaciona con pobre pronóstico en pacientes con cáncer pulmonar.

Adicional a lo anterior, el factor transcripcional *Meox2* es capaz de unirse a su propia región promotora probablemente regulándose a si mismo, como factor transcripcional. Sin embargo, actualmente no existe evidencia publicada que apoye dicha regulación en feedback positivo. No obstante, ejemplos de esta

posibilidad en feedback positivo han sido descritos para otros genes tales como: *Pax5* otro miembro la misma familia de genes Homeobox, capaz de regular su propia expresión en Feedback (Rajani K., *et al.* 2009). Bajo lo anterior, posiblemente *Meox2* este llevando acabo este tipo de autorregulación, justificándose así, su estudio como posible participante de la progresión neoplásica pulmonar, dado que al auto-regularse de forma positiva estaría en posibilidad de promover la angiogénesis, la proliferación celular, etc. aumentando la masa tumoral, invasión y probablemente la metástasis del tumor.

Capacidad de *Meox2* por regular otras secuencias promotoras de factores de transcripción diferentes a genes *Hox*, entre ellas *Twist1* en cáncer pulmonar.

Adicional a lo anterior, *Meox2* es capaz de regular otros factores de transcripción como el gen *Twist1*, en este sentido *Meox2* probablemente este regulando positivamente la actividad del promotor de *Twist1*, ya que este gen esta implicado en diversas funciones celulares implicadas en la carcinogénesis, como son la adhesión celular, locomoción y motilidad celular, migración celular, organización del citoesqueleto, etc. (Mikheeva SA., *et al.* 2010). El gen *Twist1* es capaz de estimular la diferenciación celular y la progresión neoplásica, tambien se ha atribuido la capacidad de promover la metástasis en tumores e inducir la transición epitelio-mesenquimal (EMT), reportándose como *Twist1* posee la capacidad de promover el fenomeno llamado invadopodia, así como la degradación de la matriz extracelular, induciendo la expresión de *PDGFR α* que a su vez activa a *SRC*, por lo que, la co-expresión de *Twist1* y *PDGFR α* es indicativo de pobre sobrevida en pacientes con cáncer de mama (Eckert MA., *et al.* 2011). En cáncer de pulmón se ha observado que una alta expresión de *Twist1* correlaciona positivamente con el estado de diferenciación de carcinomas pulmonares (Hui L., *et al.*, 2009). Adicionalmente *Meox2* también posee la capacidad de regular genes involucrados en la respuesta inmune, de este modo *Meox2* es capaz de inhibir la señalización del factor transcripcional NF-kappaB y la activación de células epiteliales en respuesta a factores pro-angiogenicos. *Meox2* además modula la actividad del complejo RelA mediante la interacción directa con sus componentes, al respecto

se postula a *Meox2* como blanco terapéutico contra la angiogénesis (Chen Y., *et al.* 2010b). Basado en lo anterior, estaríamos bajo el planteamiento donde la participación de *Meox2* en la progresión neoplásica pulmonar, no se encuentre orientada por su capacidad de inhibir la angiogénesis; si no, por el contrario de activar transcripcionalmente genes relacionados con funciones de promoción de la proliferación celular, migración celular y metástasis, como lo son *Evx1* y *Twist1*. Por otro lado, como mecanismos de regulación postranscripcional de *Meox2*, existen 2 micro-RNAs capaces de regular la expresión de *Meox2*, una regulación positiva por parte de mir-221, quien lo regula indirectamente, pues mir-221 desregula a *ZEB2* represor natural de *Meox2* (Chen Y., *et al.* 2010). Además de una regulación negativa por parte de mir-130a, cuyo miRNA hace blanco en la región 3'UTR del transcrito de *Meox2* (Chen Y., *et al.* 2008). Aunque toda la evidencia apunta a *Meox2* como un regulador negativo del fenotipo angiogénico, el presente trabajo sugiere que su participación en la progresión neoplásica pulmonar, esta orientada por su capacidad de activar transcripcionalmente genes involucrados en la progresión de los carcinomas pulmonares, como son aquellos miembros de la misma familia de genes Homeobox o aquellos genes involucrados en la diferenciación celular, tales como *Twist1*.

Efecto ambiental sobre la capacidad de regulación transcripcional de *Meox2* en cáncer pulmonar

El ambiente repercute directamente en el proceso de carcinogénesis y progresión neoplásica, dado que la exposición prolongada a distintos factores de riesgo ambientales, entre ellos el humo de leña son capaces de aumentar el riesgo a desarrollar cáncer pulmonar (Hernández GE., *et al.* 2004). Cerca de 3 billones de personas (especialmente mujeres) en el mundo están expuestas al humo de leña y carbón, ampliamente utilizados en labores domesticas como bio-combustible. Al respecto se ha observado que los componentes químicos derivados de la combustión del humo de leña son potencialmente carcinogénicos tanto como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Hosgood HD., *et al.* 2010). Al respecto, no solamente el humo de leña esta involucrado en la carcinogénesis, sino el polvo de

leña, el cual por si mismo es un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer pulmonar (Barcenas CH., *et al.* 2005). Lo anterior, se ve reflejado en el aumento en la activación de genes involucrados en las neoplasias pulmonares, ya que de acuerdo con el presente proyecto pacientes libres de exposición a factores de riesgo ambiental poseen un menor grado de interacción con secuencias promotoras regulados por contacto directo del factor transcripcional *Meox2*. En contraste, con el aumento en la interacción de *Meox2* por blancos transcripcionales en pacientes bajo exposición a humo de leña (fig. 13, 14 y 15), donde la exposición a humo de leña aumenta la interacción física por secuencias promotoras de genes regulados por *Meox2*. Al respecto, la regulación sobre el gen *Evx1* se incrementa hasta alcanzar 40% en pacientes con exposición a humo de leña, mientras que en pacientes libres de factores de riesgo, solo alcanza 5%. A este respecto, una autorregulación positiva de *Meox2* se podría ver potenciada en pacientes con exposición a humo de leña alcanzando 70%, mientras que en pacientes libres de factores de riesgo solo alcanza un 15%, por lo que, es claro que dicho factor de riesgo aumenta o sinergia las probabilidades del desarrollo neoplásico pulmonar. Ya que, respecto a *Twis1* existe un aumento tanto en pacientes con exposición con humo de leña alcanzando 140%, como en pacientes libres de factor de riesgo con 80%. Lo cual sugiere que la exposición a humo de leña repercute directamente en la activación de genes que posiblemente conllevan al desarrollo neoplásico pulmonar. Un evento similar fue descrito por Delgado y Cols., quienes describen aumento en la expresión de la proteína de p53 en pacientes con exposición a humo de leña comparados con pacientes bajo exposición a humo de tabaco, así como pacientes libres de factores de riesgo (Delgado J., *et al.* 2005). Todo lo anterior, posiblemente indique que la exposición a estos agentes pro-carcinogénicos sean capaces de modular el perfil de expresión regulado epigenéticamente, como resultado de las aberraciones en los perfiles de metilación global del DNA genómico, como se ha sugerido en muestras de pacientes mestizos mexicanos bajo exposición a factores de riesgo en cáncer pulmonar (Cerecedo-Zapata CM., *et al.* 2009); así como de regiones promotoras modificando la expresión de genes supresores de tumor, oncogenes, etc. (Sood

A., *et al.* 2010), posiblemente bajo el control de *Meox2*, en las neoplasias pulmonares.

Blancos génicos de *Meox2* representan principalmente vías de regulación transcripcional

Como puede observarse (ver tabla 7, y anexos 12.4) un gran porcentaje de los genes blancos aquí descritos para *Meox2*, representan rutas de regulación transcripcional, están implicadas en la carcinogénesis y desarrollo neoplásico, como así lo indican aquellos 5 genes miembros de la misma familia Homeobox los cuales están implicados en distintas patologías neoplásicas. Por otro lado, TGIF2 como regulador transcripcional co-represor que limita la respuesta de TGF β e implicado en el proceso intermedio del desarrollo embrionario como es la gastrulación (Powers SE., *et al.* 2010). Además de HHEX el cual como se menciona se deslocaliza hacia la fracción citoplasmática en cáncer de mama (Puppin C., *et al.* 2006), CUX1 un importante modulador de la invasión y resistencia a la apoptosis en cáncer de páncreas (Ripka S., *et al.* 2010). Adicionalmente, EN2 el cual se ha propuesto como biomarcador altamente específico en cáncer de próstata (Morgan R., *et al.* 2011), TSHZ1 el cual sufre desregulación en cáncer de mama/próstata por metilación aberrante en su región promotora y se ha propuesto como gen supresor de tumores (Yamamoto M., *et al.* 2011). En otro aspecto, se encuentran genes que codifican para proteínas implicadas en la metilación de regiones promotoras, entre ellas las isoformas de DNMT3L al formar un complejo con otras DNMT's poseen gran influencia al modificar el patrón de metilación en mamíferos (Van Emburgh BO., *et al.* 2011), DNMT3L se ha propuesto como un marcador específico y esencial en tumores de células germinales de testículo (TCGT) (Minami K., *et al.* 2010). Así mismo, se encuentran genes a quienes se ha atribuido participación oncogénica como RASSF7, en carcinomas endometriales y a la vez se ha propuesto como un marcador molecular (Colas E., *et al.* 2011). Adicionalmente, el gen SNCG inicialmente descrito en cáncer de mama, se ha avaluado su participación en otras neoplasias como carcinoma de colon, observando que su expresión conlleva a

pobre pronóstico de los pacientes, aun con niveles normales de antígeno carcinoembrionario (CEA) (Liu C., *et al.* 2010). A su vez el presente trabajo identificó al promotor del gen RNF170 involucrado en la embriogénesis crucial en el desarrollo posterior de la medula espinal (Valdmanis PN. *et al.* 2011), RNF170 es miembro de la misma familia (RNF) a la que pertenece RNF10 quien ha sido previamente reportado por su interacción directa con *Meox2* (Lin J. *et al.* 2005), otro gen representativo del presente trabajo es CBX4 miembro de la familia CBX quien es capaz de interaccionar con BMI1 y PCGF componentes del complejo represor Polycomb (PRC1) capaz de modular negativamente la transcripción (Vandamme J., *et al.* 2011), así mismo dentro de esta lista también se encuentran regiones promotoras que codifican para microRNAs, tales como mir17-92 un cluster de microRNAs frecuentemente desregulado en distintos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de pulmón (Osada H., *et al.* 2011). Debido a todo lo anterior, el presente trabajo propone que *Meox2* participa en la modulación de distintas vías de regulación transcripcional representado por diferentes factores de la transcripción blanco participando en el desarrollo neoplásico pulmonar.

9 CONCLUSIONES

- Se identificó la presencia del factor transcripcional *Meox2* en núcleo en líneas celulares de cáncer de pulmón tipo AD y carcinomas pulmonares tipo AD.
- *Meox2* se deslocaliza en líneas celulares de cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma de forma contacto-dependiente.
- En los carcinomas pulmonares sólidos tipo AD su localización es mayoritariamente en núcleo, es decir no existe deslocalización.
- *Meox2* posiblemente regula positivamente a *Evx1*.
- *Meox2* tiende a una autorregulación de su propia región promotora.
- *Twist1* posiblemente este sobre-regulado por *Meox2*.
- La exposición a humo de leña modifica los niveles de regulación epigenética de los genes *Evx1* y *Meox2*.
- *Twist1* esta sobre regulado tanto en pacientes con exposición a humo de leña, como en pacientes libres de factor de riesgo.
- La exposición a factores de riesgo ambientales como el humo de leña modifica incrementado la interacción transcripcional de blancos génicos regulados por *Meox2*, el cual se sobre-expresa en carcinomas pulmonares tipo adenocarcinoma.
- *Meox2* probablemente auto-regula su propia expresión genética en cáncer pulmonar en correlación con la exposición a factores de riesgo ambientales.
- Fueron identificados alrededor de 5,577 blancos génicos posibles de *Meox2*, de los cuales, 145 genes y sus secuencias promotoras resultaron de alta predicción de interacción física en núcleo con *Meox2*, en correlación con la presencia de *RNA Pol II*, sugiriendo que *Meox2* regula positivamente la transcripción de al menos 145 genes, principalmente relacionados funcionalmente con el control de rutas de regulación transcripcional esenciales en la biología neoplásica pulmonar.
- Se propone a *Meox2* como un factor de la transcripción central en los procesos de control transcripcional en cáncer pulmonar.

10 PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos sobre los potenciales blancos génicos de *Meox2* (ver anexo 12.4) mediante el análisis bioinformático de ChIP on chip, a partir del estudio de muestras de pacientes con cáncer pulmonar en presencia y ausencia de factores de riesgo, el presente trabajo postula como perspectivas validar un conjunto de genes con alto índice de fluorescencia y valor FDR=0. Lo cual significa el estudio de aproximadamente 145 secuencias promotoras de genes de alta predicción de interacción física con el factor transcripcional *Meox2* de un total de 5,577 genes identificados mediante nuestro análisis bioinformático. Dicho estudio de validación cuantitativa y funcional involucraría el análisis de distintos blancos génicos, que por su función resultarían de utilidad correlacionar sobre una mayor cohorte de pacientes, tanto asociados como no-asociados a distintos factores de riesgo, entre ellos el tabaquismo. Por otro lado, se propone incrementar el número de ensayos por CGH, incorporando la inmunoprecipitación del código de histonas de activación o represión transcripcional, con el objeto de correlacionar la identificación de blancos génicos sobre-representados y/o sobre expresados, bajo la influencia de factores de exposición ambiental en pacientes con cáncer pulmonar, los cuales pudieran consolidarse como una firma de blancos génicos asociados al diagnóstico oportuno, pronóstico y/o sobrevida, así como respuesta al tratamiento oncológico en los pacientes bajo tratamiento actual en los institutos nacionales de salud.

11 BIBLIOGRAFIA

1. Aviel-Ronen S., Blackhall F.H., Shepherd F.A., Tsao M.S. 2006. K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. *Clinical Lung Cancer* 8 (1): 30–38.
2. Aviel-Ronen S, Coe BP, Lau SK, da Cunha Santos G, Zhu CQ, Strumpf D, Jurisica I, Lam WL, Tsao MS. 2008. Genomic markers for malignant progression in pulmonary adenocarcinoma with bronchioloalveolar features. *Proc Natl Acad Sci U S A* 22; 105(29):10155-10160.
3. Azim H.A., Ganti A.K. 2007. Treatment options for relapsed small-cell lung cancer. *Anticancer drugs* 18 (3): 255–261.
4. Barcenas CH, Delclos GL, El-Zein R, Tortolero-Luna G, Whitehead LW, Spitz MR. 2005. Wood dust exposure and the association with lung cancer risk. *Am J Ind Med.* Apr;47(4):349-57.
5. Baird AM, Gray SG, O'Byrne KJ.. 2011. Epigenetics underpinning the regulation of the CXC (ELR) chemokines in non-small cell lung cancer. *PLoS One.* 27;6(1):e14593.
6. Barker DL, Hansen MS, Faruqi AF, Giannola D, Irsula OR, Lasken RS, Latterich M, Makarov V, Oliphant A, Pinter JH, Shen R, Sleptsova I, Ziehler W, Lai E. 2004. Two methods of whole-genome amplification enable accurate genotyping across a 2320-SNP linkage panel. *Genome Res.* 2004 May;14(5):901-7.
7. Berdasco M, Alcázar R, García-Ortiz MV, Ballestar E, Fernández AF, Roldán-Arjona T, Tiburcio AF, Altabella T, Buisine N, Quesneville H, Baudry A, Lepiniec L, Alaminos M, Rodríguez R, Lloyd A, Colot V, Bender J, Canal MJ, Esteller M, Fraga MF. 2008 Promoter DNA hypermethylation and gene repression in undifferentiated Arabidopsis cells. *PLoS One* 3(10):e3306.
8. Best AM, Chang J, Dull AB, Beutler JA, Martinez ED.2011. Identification of four potential epigenetic modulators from the NCI structural diversity library using a cell-based assay. *J Biomed Biotechnol.*:868095. Epub 2010 Dec 22.
9. Candiloro IL , Mikeska T , Dobrovic A. 2011. Assessing combined methylation-sensitive high resolution melting and pyrosequencing for the analysis of heterogeneous DNA methylation. *Epigenetics.*Apr 1;6(4). [Epub ahead of print]
10. Catelinois O., Rogel A., Laurier D., Billon S., Hemon D., Verger P., Tirmarche M. 2006. Lung Cancer Attributable to Indoor Radon Exposure in France: Impact of the Risk Models and Uncertainty Analysis. *Environmental Health Perspectives* 114 (9): 1361–1366.
11. Cerecedo-Zapata CM, Gonzaga PR, Limón RDA, Álvarez MA, Téllez B JL, Pérez PC, Ávila-Moreno F. 2009. Oncología clínica, genómica y epigenómica en cáncer broncogénico. Parte II. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex;* 22 (4) 316-327.
12. Chen Y, Banda M, Speyer CL, Smith JS, Rabson AB, Gorski DH. 2010. Regulation of the expression and activity of the antiangiogenic homeobox gene GAX/MEOX2 by ZEB2 and microRNA-221. *Mol Cell Biol.* 30(15):3902-13.
13. Chen Y, Rabson AB, Gorski DH. 2010b. MEOX2 regulates nuclear factor-kappaB activity in vascular endothelial cells through interactions with p65 and IkappaBbeta. *Cardiovasc Res.* Sep 1;87(4):723-31. Epub 2010 Apr 26.

14. Chen Y, Gorski DH. 2008. Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood*. Feb 1;111(3):1217-26. Epub 2007 Oct 23.
15. Colas E, Perez C, Cabrera S, Pedrola N, Monge M, Castellvi J, Eyzaguirre F, Gregorio J, Ruiz A, Llauro M, Rigau M, Garcia M, Ertekin T, Montes M, Lopez-Lopez R, Carreras R, Xercavins J, Ortega A, Maes T, Rosell E, Doll A, Abal M, Reventos J, Gil-Moreno A. 2011. Molecular markers of endometrial carcinoma detected in uterine aspirates. *nt J Cancer*. Jan 4. [Epub ahead of print]
16. Collins L.G., Haines C., Perkel R., Enck R.E. 2007. Lung cancer: diagnosis and management. *American Family Physician* 75 (1): 56–63.
17. Cortese R., Hartmann O., Berlin K., Eckhar F. 2008. Correlative gene expression and DNA methylation profiling in lung development nominate new biomarkers in lung cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 40: 1494–1508.
18. Coyle Y.M., Minahjuddin A.T., Hynan L.S., Minna J.D. 2006. An ecological study of the association of metal air pollutants with lung cancer incidence in Texas. *Journal of Thoracic Oncology* 1 (7): 654–661
19. de Lucio B, Manuel V, Barrera-Rodríguez R. 2005. Characterization of human NSCLC cell line with innate etoposide-resistance mediated by cytoplasmic localization of topoisomerase II alpha. *Cancer Sci*. Nov;96(11):774-83.
20. Delgado J, Martinez LM, Sánchez TT, Ramirez A, Iturria C, González-Avila G. 2005. Lung cancer pathogenesis associated with wood smoke exposure. *Chest*. Jul;128(1):124-31.
21. Douglas H., Weinberg R.A. 2000. The Hallmarks of cancer. *Cell*. 100:57-70.
22. Eckert MA, Lwin TM, Chang AT, Kim J, Danis E, Ohno-Machado L, Yang J. 2011. Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis. *Cancer Cell*. Mar 8;19(3):372-86.
23. Esteller M, Catusus L, Matias-Guiu X, Mutter GL, Prat J, Baylin SB, Herman JG. 1999. hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *Am J Pathol*. 155(5):1767-72.
24. Esteller M., Corn PG., Baylin SB., Herman JG. 2001. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61:3225–9.
25. Esteller M, Almouzni G. 2005. How epigenetics integrates nuclear functions. *EMBO Rep*. (7):624-8.
26. Feinber PA., Ohlsson R., Henikoff. 2006. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Rev. Genetics*. 7: 21-33.
27. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. 2006. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet*. (2):85-97.
28. Fiedler U., Christian S., Koidl S., Kerjaschki D., Emmett MS., Bates DO., Christofori G., Augustin HG. 2006. The sialomucin CD34 is a marker of lymphatic endothelial cells in human tumors. *Am J Pathol*. 168(3):1045-53.
29. Fong, K.M., Sekido Y., Gazdar A.F., Minna J.D. 2003. Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax* 58 (10): 892–900.
30. Garcia-Fernández J. 2005. The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nat Rev Genet*. Dec;6(12):881-92.

31. Gorlova O.Y., Weng S., Zhang Y., Amos C. I., Spitz M.R. 2007. Aggregation of cancer among relatives of never-smoking lung cancer patients. *International Journal of Cancer*. 121: 111-118.
32. Hackshaw A.K., Law M.R., Wald N.J. 1997. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *British Medical Journal* 315 (7114): 980–988
33. Hahn M, Dambacher S, Schotta G. 2010 Heterochromatin dysregulation in human diseases. *J Appl Physiol.*; 109(1):232-42.
34. Hernández-Garduño E, Brauer M, Pérez-Neria J, Vedal S. 2004 Wood smoke exposure and lung adenocarcinoma in non-smoking Mexican women. *nt J Tuberc Lung Dis*. Mar;8(3):377-83.
35. Hosgood HD 3rd, Boffetta P, Greenland S, Lee YC, McLaughlin J, Seow A, Duell EJ, Andrew AS, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, Lissowska J, Fabiánová E, Mates D, Bencko V, Foretova L, Janout V, Morgenstern H, Rothman N, Hung RJ, Brennan P, Lan Q. 2010. In-home coal and wood use and lung cancer risk: a pooled analysis of the International Lung Cancer Consortium. *Iron Health Perspect*. Dec;118(12):1743-7. Epub 2010 Sep 15.
36. Hui L, Liu B, Zhao L, Zhang S, Zhou B, Qiu X, Cui Z. 2009. High expression of twist is positively correlated with the differentiation of lung cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. Apr 20;12(4):294-9.
37. Hung RJ, Boffetta P, Brockmüller J, Butkiewicz D, Cascorbi I, Clapper ML, Garte S, Haugen A, Hirvonen A, Anttila S, Kalina I, Le Marchand L, London SJ, Rannug A, Romkes M, Salagovic J, Schoket B, Gaspari L, Taioli E. 2003. CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a pooled analysis. *Carcinogenesis*. May;24(5):875-82.
38. Irelan JT, Gutierrez Del Arroyo A, Gutierrez A, Peters G, Quon KC, Miraglia L, Chanda SK. 2009. A functional screen for regulators of CKDN2A reveals MEOX2 as a transcriptional activator of INK4a. *PLoS One*. 4(4):e5067.
39. Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Taylor. 2008. *Cancer Statistics*. *Cancer J Clin*. 58:71-96.
40. Kaminker P. 2001. Epigenética, ciencia de la adaptación biológica heredable. *Arch Argent Pediatr*. 105 (6): 529-531
41. Kim JH., Bogner PN., Baek SH., Ramnath N., Liang P., Kim HR., Andrews C., Park YM. 2008. Up-regulation of peroxiredoxin 1 in lung cancer and its implication as a prognostic and therapeutic target. *Clin Cancer Res.*; 14(8):2326-33.
42. Kimura M, Takenobu H, Akita N, Nakazawa A, Ochiai H, Shimosato O, Fujimura YI, Koseki H, Yoshino I, Kimura H, Nakagawara A, Kamijo T. 2011. Bmi1 regulates cell fate via tumor suppressor WWOX repression in small cell lung cancer cells. *Cancer Sci.*: 10.1111/j.1349-7006.2011.01891.
43. Kirilenko P, He G, Mankoo BS, Mallo M, Jones R, Bobola N. 2011. Transient activation of meox1 is an early component of the gene regulatory network downstream of hoxa2. *Mol Cell Biol*. Mar;31(6):1301-8. Epub 2011 Jan 18.
44. Kuo MH., Allis CD. 1999. In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment.. *Methods*. 19(3):425-33.

45. Lewis EB. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*. Dec 7;276(5688):565-70.
46. Limón R.D.A., Serrano R.R., Avalos B.A., Téllez B.J.L., Morales G.J., Guzman A.E., Uribe F.L., Hidalgo M.A., Pérez P.C., Piña S.P., Ávila M.F. 2011. High frequency copy number variation, promoters-methylation and gene expression changes of probable new early genetic markers on lung cancer at subtelomeric regions 7p22.3-p22.1, 7p21.3-p21.1 and subcentromeric 7p15.3-p15.2. *Manuscript In Advanced. Genes, Chrom and Cancer 2011*.
47. Lin J, Friesen MT, Bocangel P, Cheung D, Rawszer K, Wigle JT. 2005. Characterization of Mesenchyme Homeobox 2 (MEOX2) transcription factor binding to RING finger protein 10. *Mol Cell Biochem*. Jul;275(1-2):75-84.
48. Liu C, Dong B, Lu A, Qu L, Xing X, Meng L, Wu J, Eric Shi Y, Shou C. 2010. Synuclein gamma predicts poor clinical outcome in colon cancer with normal levels of carcinoembryonic antigen. *BMC Cancer*. Jul 7;10:359.
49. Maekawa T, Maniwa Y, Doi T, Nishio W, Yoshimura M, Ohbayashi C, Hayashi Y, Okita Y. 2009. Expression and localization of FOXO1 in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. Jul;22(1):57-64.
50. Mankoo BS, Skuntz S, Harrigan I, Grigorieva E, Candia A, Wright CV, Arnheiter H, Pachnis V. 2003. The concerted action of Meox homeobox genes is required upstream of genetic pathways essential for the formation, patterning and differentiation of somites. *Development*. Oct;130(19):4655-64.
51. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. 2005. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer*. Oct 3;93(7):825-33.
52. Mikheeva SA, Mikheev AM, Petit A, Beyer R, Oxford RG, Khorasani L, Maxwell JP, Glackin CA, Wakimoto H, González-Herrero I, Sánchez-García I, Silber JR, Horner PJ, Rostomily RC. 2010. TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma. *Mol Cancer*. Jul 20;9:194.
53. Minami K, Chano T, Kawakami T, Ushida H, Kushima R, Okabe H, Okada Y, Okamoto K. 2010. DNMT3L is a novel marker and is essential for the growth of human embryonal carcinoma. *Clin Cancer Res*. May 15;16(10):2751-9. Epub 2010 May 11.
54. Morgan R, Boxall A, Bhatt A, Bailey M, Hindley R, Langley S, Whitaker HC, Neal DE, Ismail M, Whitaker H, Annels N, Michael A, Pandha H. 2011. Engrailed-2 (EN2): A Tumor Specific Urinary Biomarker for the Early Diagnosis of Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. Mar 1;17(5):1090-8. Epub 2011 Mar 1.
55. Muller-Zochbauer S., Minna DJ., Gazdar AF. 2002. Aberrant DNA methylation in lung cancer: Biological and clinical implications. *The Oncologist*. 7: 451-457
56. Ohshima J, Haruta M, Arai Y, Kasai F, Fujiwara Y, Ariga T, Okita H, Fukuzawa M, Hata J, Horie H, Kaneko Y. 2009. Two candidate tumor suppressor genes, MEOX2 and SOSTDC1, identified in a 7p21 homozygous deletion region in a Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer*. Dec;48(12):1037-50.
57. Osada H, Takahashi T. 2011. let-7 and miR-17-92: small-sized major players in lung cancer development. *Cancer Sci*. Jan;102(1):9-17. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01707.x.
58. O'Reilly K.M., Mclaughlin A.M., Beckett W.S., Sime P.J. 2007. Asbestos-related lung disease. *American Family Physician* 75 (5): 683–688.

59. Paz MF., Fraga MF., Avila S., Mingzhou G., Herman JG., Esteller M. 2003. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res* 63:1114–21.
60. Ponce de León V, Barrera-Rodríguez R. 2005. Changes in P-glycoprotein activity are mediated by the growth of a tumour cell line as multicellular spheroids. *Cancer Cell Int.* Jul 7;5(1):20.
61. Powers SE, Taniguchi K, Yen W, Melhuish TA, Shen J, Walsh CA, Sutherland AE, Wotton D. 2010. Tgif1 and Tgif2 regulate Nodal signaling and are required for gastrulation. *Development.* Jan;137(2):249-59.
62. Puppini C., Puglisi F., Pellizzari L., Manfioletti G., Pestrin M., Pandolfi M., Piga A., Di Loreto C., Damante G., 2006. HEX expression and localization in normal mammary gland and breast carcinoma. *BMC Cancer.* 19;6:192.
63. Rajani Kanteti, Vidya Nallasura, Sivakumar Loganathan, Maria Tretiakova, Todd Kroll, Soundararajan Krishnaswamy, Leonardo Faoro, Philip Cagle, Aliya N. Husain, Everett E. Vokes, Deborah Lang, and Ravi Salgia. 2009. PAX5 is expressed in small cell lung cancer and positively regulates c-Met transcription. Lab Invest. Author manuscript; available in PMC 2009 September 11.
64. Rakyan VK, Preis J, Morgan HD, Whitelaw E. 2001. The marks, mechanisms and memory of epigenetic states in mammals. *Biochem .J* 356: p. 1-10.
65. Rauch TA, Wang Z, Zhang X, Zhong X, Wu X, Lau SK, Kernstine KH, Riggs AD, Pfeifer GP. 2007. Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 27;104(13):5527-32. Epub 2007 Mar 16.
66. Rauch TA, Zhong X, Wu X, Wang M, Kernstine KH, Wang Z, Riggs AD, Pfeifer GP. 2008. High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 8;105(1):252-7. Epub 2007 Dec 27.
67. Raz D.J., He B., Rosell R., Jablons D.M. 2006. Bronchioloalveolar carcinoma: a review. *Clinical Lung Cancer* 7 (5): 313–322.
68. Reijntjes S, Francis-West P, Mankoo BS. 2010. Retinoic acid is both necessary for and inhibits myogenic commitment and differentiation in the chick limb. *Int J Dev Biol.* 54(1):125-34.
69. Ripka S, Riedel J, Neesse A, Griesmann H, Buchholz M, Ellenrieder V, Moeller F, Barth P, Gress TM, Michl P. 2010. Glutamate receptor GRIA3--target of CUX1 and mediator of tumor progression in pancreatic cancer. *Neoplasia.* Aug;12(8):659-67.
70. Rosti G., Bevilacqua G., Bidoli P., Portalone L., Santo A., Genestreti G. 2006. Small cell lung cancer. *Annals of Oncology* 17: 5–10.
71. Ruas M, Peters G. 1998. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta.* Oct 14;1378(2):F115-77
72. Salgia R., Skarin A.T. 1998. Molecular abnormalities in lung cancer». *Journal of Clinical Oncology* 16 (3): 1207–1217.
73. Schumacher A., Kapranov P. 2006. Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications. *Nucleic Acids Reserch.* 34 (2): 528-542.
74. Seo J.B., Im J.G., Goo J.M., Chung M.J., Kim M.Y. 2001. Atypical pulmonary metastases: spectrum of radiologic findings. *Radiographics* 21 (2): 403–417.

75. Sherr CJ. 2001. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Oct;2(10):731-7.
76. Smiraglia DJ., Rush LJ., Fruhwald MC. 2001. Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Hum Mol Genetics* 10: 1413–9.
77. Sood A, Petersen H, Blanchette CM, Meek P, Picchi MA, Belinsky SA, Tesfaigzi Y. 2010. Wood smoke exposure and gene promoter methylation are associated with increased risk for COPD in smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* Nov 1;182(9):1098-104. Epub 2010 Jul 1.
78. Rodenhiser D, Mann M. 2006. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ.* Jan 31;174(3):341-8.
79. Subramanian J., Govindan R.2007. Lung cancer in never smokers: a review. *Journal of Clinical Oncology* 25 (5): 561–570.
80. Sun S., Schiller J.H., Gazdar A.F. 2007. Lung cancer in never smokers a different disease. *Nature.* 7: 778-790.
81. Tammemagi C.M., Neslund-Dudas C., Simoff M., Kvale P. 2004. Smoking and lung cancer survival: the role of comorbidity and treatment. *Chest* 125 (1): 27–37
82. Travis, W.D., Travis L.B., Devesa S.S.1995. Lung cancer. *Cancer* 75: 191–202.
83. Toh CK.. 2009. The changing epidemiology of lung cancer. *Methods Mol Biol.* 472:397-411
84. Valdmanis PN, Dupré N, Lachance M, Stochmanski SJ, Belzil VV, Dion PA, Thiffault I, Brais B, Weston L, Saint-Amant L, Samuels ME, Rouleau GA. 2011. A mutation in the RNF170 gene causes autosomal dominant sensory ataxia. *Brain.* Feb;134(Pt 2):602-7. Epub 2010 Nov 28.
85. Van Emburgh BO, Robertson KD. 2011. Modulation of Dnmt3b function in vitro by interactions with Dnmt3L, Dnmt3a and Dnmt3b splice variants. *Nucleic Acids Res.* Mar 4. [Epub ahead of print]
86. Vandamme J, Volkel P, Rosnoblet C, Le Faou P, Angrand PO. 2011. Interaction proteomics analysis of Polycomb proteins defines distinct PRC1 complexes in mammalian cells. *Mol Cell Proteomics.* Jan 31. [Epub ahead of print]
87. Wagner JM, Hackanson B, Lübbert M, Jung M. 2010. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors in recent clinical trials for cancer therapy. *Clin Epigenetics.* Dec;1(3-4):117-136. Epub 2010 Nov 9.
88. Wu Z, Guo H, Chow N, Sallstrom J, Bell RD, Deane R, Brooks AI, Kanagala S, Rubio A, Sagare A, Liu D, Li F, Armstrong D, Gasiewicz T, Zidovetzki R, Song X, Hofman F, Zlokovic BV. 2005. Role of the MEOX2 homeobox gene in neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Med.* Sep;11(9):959-65. Epub 2005 Aug 14.
89. Yamamoto M, Cid E, Bru S, Yamamoto F. 2011. Rare and Frequent Promoter Methylation, Respectively, of TSHZ2 and 3 Genes That Are Both Downregulated in Expression in Breast and Prostate Cancers. *PLoS One.* Mar 14;6(3):e17149.
90. Zapata BP, Saavedra AS, Zamora AD, Vargas RC, Barrera RR, Salinas SJ, Rodríguez PC, Tamez GR, Trejo AL. 2007. Mouse mammary tumor virus-like gene sequences in breast cancer samples of Mexican women. *Intervirolgy.*;50(6):402-7. Epub 2007 Oct 31.

91. Zhang C, Jin Y, Xu H, Zhang H, Zhang W, Sun X, Tan C, Chen C, Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 2011. Relationship between promoter methylation of p16, DAPK and RAR beta genes and the clinical data of non-small cell lung cancer. *Chinese* 8(1):23-28.
92. Zhou W, Liu G, Miller DP, Thurston SW, Xu LL, Wain JC, Lynch TJ, Su L, Christiani DC. 2003. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2, smoking, and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* Apr;12(4):359-65.

12 ANEXOS

12.1 DISEÑO DE PRIMER'S PARA EL PROMOTOR DEL GEN EVX1

Se diseñaron 2 juegos de primer's resaltados en azul y amarillo, uno en la región media de la posición: 338-637 pb en azul, con una longitud de 300 pb. y otro en la región final de la posición: 684-900 pb en amarillo, con una longitud de 217 pb. Los primer's utilizados fueron los de la región media resaltados en azul.

1	ACACACTCTT ACAGAAAGCA AGGGGGGTCT TTAATTAARA AATAATAAT AAGGTATTA TTCTTGCC CTTAGGGAG AAAAATAGCA U.GTTTGGTT TGTGTGAGAR TGTCTTGGT TCCGCCAGCA AATTTAATT TTATTAATTA TCCATAAAT AAAGAACGGG GU.TCCCTTC TTTTATCGT TCAAAACCA
101	CGCAGGAGTA AGGAGACAGA GGTGGGTAGG GAGAGGGAGG AGAAAAGAGG AAAAGATGGG CGAGCCTCAR GCTCTCCAGT CAACTTGGGG CGGGGGAATA GGTGTCTCAT TCTCTGTCT GCACCCATCC CTCCTCCCTC TCTTTTCTCC TTITCTACCG GTTCGGAGIT CGAGAGTCA GTGTU.CCCC GCCCCTTAT
201	CATTTTTCCG TAGCTTGTAA AAGGACTTTT CAGCCACTTT GAGGTAGCT GCCAGGGGCA GACAGTCTTATAATCCCGA CAGAATTGAG GCTGTU.GC GTAAATAAGG ATCGAACATT TTCTGAAAA GTCCGTCAAA CTCCAATCGA CGGTCCCGST CTGTCAACAT TATTACGGCT GTCTAACCTC CGAAGATTGG
301	CGGGCTTCAC ACTTCTAAA TGCAGTTATG GATTCCTTCA TCCGCTTAG ATCAAGGCAC CAAGTTAAGA AAACAAAAT CAAAGCAACA ATAAAAGAAA GCCCGAAGTG TGAAGATTTT AGTCAATATC CTAAGAAAAT AGCCCAATC TACTTCCGTC GTTCAATTCT TTGTJTTC A GTTTGTGTGT TATTTTCTTT
401	AAATCAAAAG CTATTTAART TACCGAGTCC CGCTGCCCTT GGGGAATCTG CCGCGCGGCT TAAGCTCTCT TTCTTTCTG CGGAATTCCA TTGCATGCC TTTAGTTTTT GAATAAATTA ATGGCTCAGG GCGACGGGCA GCGCTTGACC GGGCCCGCA ATTCCAGAGA AAAGAAAGAC GCTTAAAGT AAACGTAGGG
50	CTCTGCCGAG GTGTCTCCCT CTCACACTGT GTGTGTCTCT CTGTCTGTTT TCACACTCTC CTCCCCAATC GAGCGAGGGC CACACCTGGC GCATCACTGC GAGACGGACC CACAGAGGGA GAGAGTCACA CACACAGAGA GACAGACARA AGTGTGAGAG GAGGGGTTAG CTCCCTCCGG GTGTGGACCG CGTAGTACGG
601	CGAGCCATTA GCTGGGGGTT TCCITTCATC TTGCTGTGG CAGACCTTTC TATTTATCCA CTTGCGCTCG CCGAGTGGG TCACAGCGCG TACTGTAAATG GCTCGGTART CGACGCCCAR AGCAAAATRC AAGCGACCC GTCTGCAARG ATAAATAGGT GAACCGGAGC GGCCTACCGC AGTGGTCCGC ATGACATTAC
70	ACGATTGCAG CAGGAGGATG ACAGCTTAGA AAGAAAGAGG CAATGGGGCT TCCCTCCAGA GGGGGTCCG CACAGAGGAG CGCTCCCTTC ACAAGGTGAC TGCTAAGGTC GTCCCTCTAC TGTCGAATCT TTCTTCTCCG GTTACCCCGA AGGAGGGTCT CGGCCACGCC GTGTCTCTC GCGAGCGAAG TGTTCCACTG
801	CCTAGCTCCC ACCGCCACCG CCGCGGTGCG GGTCCAGACC GCGCTCCAGC AGCTCCCGCC CTCCCCAGGC ACCCGGCCIT TCTTTCTCC TCTTGCACCC GGATCGAGCG TGGCGGTGGC GCGCCCAAGC CCAGGCTGCG CCGGAGGTG TCGAGCGCGG GGAGGGTCCG TGGGCCCGAR AGAAGAGCGG AAGACCTTGC
901	AAATCCGTC CCGCGGCTGG AGACCCAGGG AGCCCGGGTT AGGAACCTAC TTGGGGCTTT CCGCTCCCC ACCCGAGAGC CCGGGATGG AGACCCGARA TTCTAGGCGC GCGCGGACC TCTGGGTCC TCGGCCCGAA TCTTTGAGT AACCCCGAAA GGGGAGGGGG TGGCCTCTCG GGGCCCTIACC TCTGGGCTTT
1001	GGACATGGTT GTGTTTCTGG ATGGGGGTCA GCTTGGCACT CTGGTTGGCA AGAGAGTCTC AAATTITGCC GAAGCCGTGG GCAGCCCGCT GCGCGAGCCG CCTGTACARA CACAAAGACC TACCCCGAGT CGAACCGTCA GACCAACCGT TCTCTCAGAG TTAAACAGG CTTCCGCAAC CTTCCGGGCA CGGCTCCGC
1101	CGGAGGAAA TGGTCCCGG TGGTTGCTG AGCCCTCGGG CCGTCCCTCC GGCACCGCG GAGCGCGCGG GGGGAGGGCC GGAGGAGGAG CCGGTAGATG GGGCTCTTTT ACCACGGGGC ACCAACGGAC TCGGGAGCCC GCGAGGGAGG CCGGTGGCC CTGCGCCCGC CCGCTCCCGG CCGCTCTCTC GGGCATCTAC
1201	GACTGGCAGG CAGCGCGGGG GGGCGGGGCG CCGAGCCCGA GGTAGCTGGG GCGGCCATGC TCGGCCCAGG ACCCGCGGGC CCGTCACTCG ACAGCCCTCTC CTGAGCGTCC GTGCGCCCGC CCGCGCCCGC GCGTGGGGT CCATCCAGCC CCGCCGTACG AGCCGGGTC TGGGGGCGGG GGGAGTACG TGTGGGAGG
1301	CGGACAGGG CAAACCACTA GCTCGGACAC CGAGTGGGAT TTCTATGAG AAATCGAGGT GAGCTGCAC CCGGACTGCG CCAACGGGAA GCGCGAGTAC GCGTGTCCCG GTTGGGTCAT CGAGCCCTGCG GCTCAGCCTA AAGATACTTC TTAGCTCCA CTCGACGTGG GCGCTGACCG GGTGGCCCTT GCGGCTCATG
1401	CAGCACACA AAGGTAGCCA CCGT GTCTGTGCT TTCCATCGGT GGCA

12.2 DISEÑO DE PRIMER'S PARA EL PROMOTOR DEL GEN MEOX2

Se diseñaron 2 juegos de primer's resaltados en amarillo y en azul, uno en la región inicial de la posición: 188-517 pb en amarillo, con una longitud de 330 pb. y otro en la región media de la posición: 347-551 pb en azul, con una longitud de 205 pb. Los primer's utilizados fueron los de la región media resaltados en azul.

```

1 |GGGCACGGGA AGATGCAAAG TTTGAAAAAC TCGAGGGGTG CGCCAAACTA GCTCTGGICT TTTCTTTAA CCTATTACT TCTTTCGIGT TCCTGAAAGG
|CCCGTCCCT TCTACGTTTC AAACTTTTTG AAGCTCCAC GCGGTTTGAT CGAGACCAGA AAAGGAAATT GGGATAATGA AGAAAGCACA AGGACTTTCC

101 |ATAGGCGTAT CCTAGCTTT TCTGCAGGTG ACASTCCCA AATGACACTG ACAAGTCACG TTTCCCGAG AGGAAAGTGA GTAGGTAAGG ATCAGGGTGC
|TATCCGCATA GGGATCGAAA AGACGTCCAC TGTCAAGGGT TTAAGTGTGAC TGTTCAAGTC AAAGGGGCTC TCCTTCACT CATCCATCCT TAGTCCACG

201 |TAGGTTGGGG GTGGTGTGCG CCGGCCAG GCTCCAGAG TCTGGAGGC AGAGCTGCTG CCCTCCCGG CGGGACTTAG ACGTTGGCGT GCCGTTGTA
|ATCCAAACCC CACCACACGC GCGCGGGTC CGGAGGTC AGACCTCCG TCTCGACGAC GGGAGGGCC GCCCTGAATC TGCAACCGCA CGGCGAACAT

301 |GTCCTGGCAG CCGGCAGTGC TGGCGGGCG TGGACGCTCT ACGTCCG TCC AGCAGGAGAT AGGAAGTGA ACTGGGAGCG CGTGGCGCAG GCTGAGCGGG
|CAGGACCCCTC GGCCGTCACG ACCCGCCCG ACCTGCGAGA TGCAGGCAGG TCGTCTCTA TCCTTCACT TGACCCTCGC GCACCCGCTC CGACTCGCCC

40 |AGTTTTGGAG GGAGTTTGA TGTGGTCAAC TCTGGGCTCC TAAGCCAGCC CCCAGCTCAC GTTACACTCT ATTTATAACT TCTCAGAGCC ATTTCCCCCT
|TCAAAACCTC CCTCAAACGT ACACCAGTTG AGACCCGAGG AITCGGTGCG GGGTCGAGTG CAATGTGAGA TAAATATTGA AGAGTCTCGG TAAAGGGGGA

501 |GAAAGCAGTT CTCGGGACC ACCTTCTTTT GGCTTCAACC TCTCCACTC TTGACATCTG AGTAGCTCAG GGAAGCTCTT CCAGGTCCGA CTGTTCATAT
|CTTTCGTCAA GAGACCCCTG TGAAGAAAA CGAAGTTGG AGAGGGTGAG AACTGTAGAC TCATCGAGTC CCTTCGAGAA GGICCAGGT GACAAGTATA

601 |GTAAAGGAGA CTGGCCGCTG GGGCTCAGGA CCGGGATTAT CCGAGCTCTG CAGAAGTGCA CCGCTATTGC TTTGGGAGGT TAAAAAATA ATCACACGGT
|CATTTCTCTT GACCGGGCAC CCGGAGTCTT GCGCCATAA TGCTCGAGAC GTCTTCAAGT GCGGATAACG AAACCCCTCA AIIIIIIIIII TAGTGTGCCA

701 |TTCCAGTGAA AAAGTGACAG AGGGTGGTGG CCTTTGGAAC CGCCGTGAAG TCTTCTGCCT GGAACCCGAA ACTTGCATGC TATGGAACAC CGCTCTITG
|AAGGTCACCT TTTCACTGTC TCCACCACC GGAACCTTG GCGGCACITC AGAAGACGGA CCTTGGGCTT TGAACGTACG ATACCTTTGTG GGGGAGAAAC

801 |GCTGCCTGCG CAGCCCTCAC GCCACGGCG AAGGCTTGCA CCGGTTCTCC CAATCCTCTC TCGCCCTCA TGGAAGATCT GAC
|CGACGGACGC GTCGGGAGTG CCGTCCGCG TTCCGAACGT GGCAGAGAG GTTAGGAGAG AGCGGGAGGT ACCTTCTAGA CTG

```

12.3 DISEÑO DE PRIMER´S PARA EL PROMOTOR DEL GEN TWIST1

Se diseñaron 2 juegos de primer´s resaltados en amarillo y en azul, uno en la región inicial de la posición: 90-364 pb en amarillo , con una longitud de 275pb. y otro en la región media de la posición: 353-636 pb en azul, con una longitud de 284 pb. Los primer´s utilizados fueron los de la región media resaltados en azul.



12.4 BLANCOS GÉNICOS DE *MEOX2* IDENTIFICADOS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE CHIP ON chip EN MICROARREGLOS DE PROMOTORES DE NIMBLEGEN 3X720 (Roche)

Chr	Gen	Descripción	Número. de Acceso	Índice (Ratio)	Posición relativa del gen / cadena
chrX	CXorf40B	chromosome X open reading frame 40	NM_001013845	1.075679	Upstream -
chrX	TSPYL2	TSPY-like 2	NM_022117	1.033496	Upstream +
chr11	ZBTB44	zinc finger and BTB domain containing 44	NM_014155	1.018261	Upstream -
chr2	NEUROD1	neurogenic differentiation 1	NM_002500	1.017496	Upstream -
chr21	DNMT3L	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3-like	NM_175867	1.00829	Upstream -
chr13	MIRHG1	miR-17-92 cluster host gene (non-protein coding)	NR_027350	1.006268	Upstream +
chr9	NANR6A1	nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1	NM_033334	0.999001	Downstream -
chr19	ZSWIM4	zinc finger, SWIM-type containing 4	NM_023072	0.996059	Downstream +
chr4	FAM149A	family with sequence similarity 149, member A	NM_001006655	0.991	Upstream +
chr21	C21orf81	chromosome 21 open reading frame 81	NR_027270	0.98637	Upstream -
chr4	SH3BP2	SH3-domain binding protein 2	NM_001122681	0.969457	Downstream +
chr3	NPHP3	nephronophthisis 3 (adolescent)	NM_153240	0.966459	Upstream -
chr21	CLIC6	chloride intracellular channel 6	NM_053277	0.964451	Downstream +
chr20	CTCFL	CCCTC-binding factor (zinc finger protein)-like	NM_080618	0.959621	Upstream -
chr22	PRAME	preferentially expressed antigen in melanoma	NM_206955	0.958492	Downstream -
chr20	TGIF2	TGFB-induced factor homeobox 2	NM_021809	0.936216	Downstream +
chr8	CYHR1	cysteine/histidine-rich 1	NM_138496	0.930538	Upstream -
chr8	KIFC2	kinesin family member C2	NM_145754	0.930538	Upstream +
chr7	MMD2	monocyte to macrophage differentiation-associated 2	NM_001100600	0.928116	Upstream -
chrX	ASMTL	acetylserotonin O-methyltransferase-like	NM_004192	0.928037	Downstream -
chr10	CAMK2G	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma	NM_001222	0.927046	Downstream -
chr8	RGS20	regulator of G-protein signaling 20	NM_003702	0.907842	Upstream +
chr8	GPIHBP1	glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1	NM_178172	0.907842	Upstream +
chrX	ARSD	arylsulfatase D	NM_001669	0.906945	Downstream -
chr5	BASP1	brain abundant, membrane attached signal protein 1	NM_006317	0.905282	Downstream +
chr12	C12orf42	chromosome 12 open reading frame 42	NM_198521	0.902029	Downstream -

chr12	WSB2	WD repeat and SOCS box containing 2	NM_018639	0.902029	Upstream -
chr21	SUMO3	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 3 (<i>S. cerevisiae</i>)	NM_006936	0.898693	Downstream -
chr8	KCNK9	potassium channel, subfamily K, member 9	NM_016601	0.885146	Upstream -
chr16	CBFA2T3	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 3	NM_175931	0.884412	Upstream -
chr4	CCDC96	coiled-coil domain containing 96	NM_153376	0.883283	Upstream -
chr4	TADA2B	transcriptional adaptor 2B	NM_152293	0.883283	Downstream +
chr2	KCMF1	potassium channel modulatory factor 1	NM_020122	0.88183	Downstream +
chr3	GATA2	GATA binding protein 2	NM_001145661	0.878599	Upstream -
chr14	DIO3	deiodinase, iodothyronine, type III	NM_001362	0.873064	Upstream +
chr14	TMEM121	transmembrane protein 121	NM_025268	0.873064	Upstream +
chrX	PRKX	protein kinase, X-linked	NM_005044	0.864762	Downstream -
chrX	MTMR1	myotubularin related protein 1	NM_003828	0.864762	Upstream +
chr11	MTL5	metallothionein-like 5, testis-specific (tesmin)	NM_004923	0.859865	Downstream -
chr9	C9orf89	chromosome 9 open reading frame 89	NM_032310	0.859606	Upstream +
chr1	PLEKHG5	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 5	NM_020631	0.844071	Upstream -
chr1	FBLIM1	filamin binding LIM protein 1	NM_017556	0.844071	Downstream +
chr11	INPPL1	inositol polyphosphate phosphatase-like 1	NM_001567	0.837237	Upstream +
chr5	CXXC5	CXXC finger protein 5	NM_016463	0.816962	Upstream +
chr11	RASSF7	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N-terminal) member 7	NM_001143994	0.814609	Upstream +
chr2	ACVR1	activin A receptor, type I	NM_001111067	0.813997	Upstream -
chr17	ATXN7L3	ataxin 7-like 3	NM_001098833	0.812236	Upstream -
chr12	B4GALNT1	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1	NM_001478	0.811826	Downstream -
chr14	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	NM_003300	0.805906	Upstream +
chrX	ZNF275	zinc finger protein 275	NM_001080485	0.801486	Downstream +
chr1	NADK	NAD kinase	NM_023018	0.798446	Upstream -
chr1	EPHB2	EPH receptor B2	NM_017449	0.798446	Downstream +
chr1	CSMD2	CUB and Sushi multiple domains 2	NM_052896	0.798446	Downstream -
chr8	HEY1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	NM_001040708	0.794361	Upstream -
chr7	SP4	Sp4 transcription factor	NM_003112	0.792294	Upstream +
chr7	EZH2	enhancer of zeste homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	NM_152998	0.792294	Downstream -

chr9	KIAA0649	KIAA0649	NM_014811	0.789908	Upstream +
chr12	FOXN4	forkhead box N4	NM_213596	0.789275	Upstream -
chr12	GALNT9	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 9	NM_001122636	0.789275	Upstream -
chr22	PPARA	peroxisome proliferator-activated receptor alpha	NM_005036	0.786455	Downstream +
chr16	CREBBP	CREB binding protein	NM_001079846	0.786144	Upstream -
chr14	NFATC4	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4	NM_004554	0.783519	Downstream +
chr13	EFNB2	ephrin-B2	NM_004093	0.782653	Upstream -
chr1	KLHL17	kelch-like 17 (Drosophila)	NM_198317	0.775633	Downstream +
chr1	NOC2L	nucleolar complex associated 2 homolog (S. cerevisiae)	NM_015658	0.775633	Upstream -
chr1	TRIM17	tripartite motif containing 17	NM_001024940	0.775633	Downstream -
chr7	TRIP6	thyroid hormone receptor interactor 6	NM_003302	0.769657	Upstream +
chr7	WDR60	WD repeat domain 60	NM_018051	0.769657	Downstream +
chr11	TEAD1	TEA domain family member 1	NM_021961	0.769353	Downstream +
chr11	FGF3	fibroblast growth factor 3	NM_005247	0.769353	Downstream -
chr3	LHFPL4	lipoma HMGIC fusion partner-like 4	NM_198560	0.768774	Downstream -
chr3	PLCL2	phospholipase C-like 2	NM_001144382	0.768774	Upstream +
chr3	ATXN7	ataxin 7	NM_001128149	0.768774	Upstream +
chr3	THOC7	THO complex 7 homolog	NM_025075	0.768774	Upstream -
chr10	HHEX	hematopoietically expressed homeobox	NM_002729	0.76877	Downstream +
chr12	POLE	polymerase (DNA directed), epsilon	NM_006231	0.766724	Upstream -
chr12	PXMP2	peroxisomal membrane protein 2,	NM_018663	0.766724	Downstream +
chr6	SCUBE3	signal peptide, CUB domain, EGF-like 3	NM_152753	0.756871	Upstream +
chr4	PPP2R2C	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma	NM_020416	0.754022	Upstream -
chr19	CARM1	coactivator-associated arginine methyltransferase 1	NM_199141	0.747044	Downstream +
chr19	GRAMD1A	GRAM domain containing 1 ^a	NM_020895	0.747044	Downstream +
chr3	ADCY5	adenylate cyclase 5	NM_183357	0.746809	Upstream -
chr3	SIAH2	seven in absentia homolog 2 (Drosophila)	NM_005067	0.746809	Downstream -
chrX	PDZD4	PDZ domain containing 4	NM_032512	0.738211	Downstream -
chr7	CUX1	cut-like homeobox 1	NM_181500	0.724383	Downstream +
chr21	CRYZL1	crystallin, zeta (quinone reductase)-like 1	NM_145858	0.723338	Upstream -
chr21	ITSN1	intersectin 1 (SH3 domain protein)	NM_003024	0.723338	Downstream +

chr16	ZCCHC14	zinc finger, CCHC domain containing 14	NM_015144	0.712443	Upstream -
chr4	KCNIP4	Kv channel interacting protein 4	NM_147182	0.710935	Upstream -
chr4	NR3C2	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2	NM_000901	0.710935	Upstream -
chr17	CBX4	chromobox homolog 4	NM_003655	0.692789	Upstream -
chr16	CPNE7	copine VII	NM_153636	0.687876	Downstream +
chr5	NKD2	naked cuticle homolog 2 (Drosophila)	NM_033120	0.684481	Upstream +
chr8	HOOK3	hook homolog 3 (Drosophila)	NM_032410	0.680881	Downstream +
chr8	RNF170	ring finger protein 170	NM_030954	0.680881	Upstream -
chr2	BOLL	bol, boule-like (Drosophila)	NM_197970	0.678331	Downstream -
chrX	TBL1X	transducin (beta)-like 1X-linked	NM_005647	0.674936	Downstream +
chr16	FBXL19	F-box and leucine-rich repeat protein 19	NM_001099784	0.663309	Upstream +
chr16	NCRNA00095	non-protein coding RNA 95	NR_024348	0.663309	Upstream -
chr1	RYR2	ryanodine receptor 2	NM_001035	0.661569	Downstream +
chr11	KDM2A	lysine (K)-specific demethylase 2A	NM_012308	0.656213	Upstream +
chr21	COL6A2	collagen, type VI, alpha 2	NM_058174	0.635661	Upstream +
chr2	ANKRD57	ankyrin repeat domain 57	NM_023016	0.633109	Downstream +
chr2	SEPT10	septin 10	NM_178584	0.633109	Upstream -
chrX	SHROOM2	shroom family member 2	NM_001649	0.632752	Upstream +
chr18	TSHZ1	teashirt zinc finger homeobox 1	NM_005786	0.625794	Upstream +
chr18	ZADH2	zinc binding alcohol dehydrogenase domain containing 2	NM_175907	0.625794	Downstream -
chr18	PQLC1	PQ loop repeat containing 1	NM_025078	0.625794	Upstream -
chr22	MAPK12	mitogen-activated protein kinase 12	NM_002969	0.614418	Upstream -
chr2	SLC20A1	solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1	NM_005415	0.610498	Downstream +
chr12	KCNH3	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 3	NM_012284	0.608869	Upstream +
chr20	DNMT3B	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta	NM_175849	0.60854	Downstream +
chr20	NPEPL1	aminopeptidase-like 1	NM_024663	0.60854	Downstream +
chr13	COL4A1	collagen, type IV, alpha 1	NM_001845	0.603761	Upstream -
chr17	EIF5A	eukaryotic translation initiation factor 5A	NM_001970	0.597232	Downstream +
chr3	CLCN2	chloride channel 2	NM_004366	0.593054	Upstream -
chr3	POLR2H	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide H	NM_006232	0.593054	Upstream +
chr21	BRWD1	bromodomain and WD repeat domain	NM_033656	0.591822	Upstream -

		containing 1			
chr7	SDK1	sidekick homolog 1, cell adhesion molecule (chicken)	NM_152744	0.588561	Upstream +
chr7	LRRC4	leucine rich repeat containing 4	NM_022143	0.588561	Upstream -
chr7	AGAP3	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 3	NM_031946	0.588561	Upstream +
chr7	FASTK	Fas-activated serine/threonine kinase	NM_033015	0.588561	Upstream -
chr7	TMUB1	transmembrane and ubiquitin-like domain containing 1	NM_031434	0.588561	Upstream -
chr10	KIAA1274	KIAA1274	NM_014431	0.587883	Upstream +
chr10	GOLGA7B	golgin A7 family, member B	NM_001010917	0.587883	Upstream +
chr17	NOTUM	notum pectinacylesterase homolog (Drosophila)	NM_178493	0.573343	Upstream -
chr1	FLJ42875	hypothetical LOC440556	NR_024371	0.570318	Downstream -
chr1	PRDM16	PR domain containing 16	NM_022114	0.570318	Upstream +
chr1	TP73	tumor protein p73	NM_005427	0.570318	Downstream +
chr1	WDR8	WD repeat domain 8	NM_017818	0.570318	Upstream -
chr8	PDE7A	phosphodiesterase 7 ^a	NM_002604	0.567401	Downstream -
chr8	SCXA	scleraxis homolog A (mouse)	NM_001008271	0.567401	Upstream +
chr11	PACS1	phosphofurin acidic cluster sorting protein 1	NM_018026	0.565701	Upstream +
chr10	MMRN2	multimerin 2	NM_024756	0.565272	Upstream -
chr10	SNCG	synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)	NM_003087	0.565272	Upstream +
chr6	FRS3	fibroblast growth factor receptor substrate 3	NM_006653	0.556523	Upstream -
chr6	PRICKLE4	prickle homolog 4 (Drosophila)	NM_013397	0.556523	Upstream +
chr3	VWA5B2	von Willebrand factor A domain containing 5B2	NM_138345	0.549124	Downstream +
chr1	PLEKHN1	pleckstrin homology domain containing, family N member 1	NM_032129	0.547506	Upstream +
chr7	EN2	engrailed homeobox 2	NM_001427	0.52065	Upstream +
chr6	SLC22A23	solute carrier family 22, member 23	NM_015482	0.422957	Upstream -
chr5	LPCAT1	lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	NM_024830	0.419521	Upstream -
chr22	MAPK8IP2	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2	NM_016431	0.417804	Upstream +

En negritas se indican aquellos genes de alta representatividad o nivel de fluorescencia inmunoprecipitados por *Meox2*, mostrados en la tabla 7.