



Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Estudios Superiores Iztacala



**“Análisis de la Expresión del Miembro del Grupo Polycomb BMI-1
en la Quimioresistencia de Tumores Pulmonares Tipo
Adenocarcinoma”**

TESIS

Que para obtener el título de Licenciada en Biología

PRESENTA:

Ana Luz Eréndira Espinosa García

Director de tesis:

Dr. Federico Ávila Moreno

Unidad de Biomedicina (UBIMED) Laboratorio 12

Tesis realizada bajo el financiamiento y otorgamiento de beca del proyecto UNAM, DGAPA-PAPIIT: IB202512 y RR282512. Así mismo, bajo el desarrollo de proyectos de investigación: B09-08, B21-08 y B18-12 (Dirección de Investigación, INER).

Los Reyes Ixtacala, Edo. de México, Enero, 2014.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Director de Tesis

Dr. Federico Ávila Moreno

Sinodales

Presidente: Jorge Eduardo Campos Contreras

Vocal: Yolanda Irasema Chirino

Secretario: Federico Ávila Moreno

Suplente: Elías Piedra Ibarra

Suplente: Luis Ignacio Terrazas Valdes

Agradecimientos

A la *Facultad de Estudios Superiores Iztacala*, la cual ha sido parte y testigo de mi desarrollo académico, donde he vivido experiencias inolvidables y conocido personas irremplazables.

A los Maestros, *Ángel Lara, Irma Estrella y Dolores Hurtado*, por darme las herramientas necesarias, su confianza, consejos y dedicación durante y después de haber culminado mi desarrollo académico en la FES-IZTACALA.

Al *Dr. Federico Ávila*, por darme la oportunidad y confianza de pertenecer a su grupo de investigación para poder culminar la última etapa de mi carrera de licenciatura y guiarme en el proceso de ésta tesis.

A los integrantes del *Laboratorio de Poliovirus* del Instituto de Diagnostico y Referencia Epidemiologicos, quienes me brindaron la oportunidad de convivir y aprender de grandes científicos, así como brindarme herramientas que me fueron de gran ayuda para la realización de ésta tesis.

Dedicatoria

A mi familia: mis padres *María Juana y Francisco*, quienes en todo momento me han dado las herramientas y consejos necesarios para llevar a cabo mis objetivos; mi hermana *Brenda*, que siempre me has brindado tu apoyo y consejos, pero además, cada vez que me sentía enojada o preocupada en este proceso de desarrollo académico me escuchaste y tuviste que lidiar con mi a veces mal humor. ¡Los Amo!

A mis amigos *Rubí, Saúl, Gibran, Windy, Aura y Marisol* con los que he compartido experiencias inolvidables y de los cuales he aprendido muchas cosas a lo largo de esta etapa de mi vida. Me alegro mucho de haberlos conocido.

A mis compañeros del grupo de investigación, *Oscar, Daniel, Mijail, Carlos y Leonel*, ha sido un placer el haber trabajado y aprendido de y con ustedes. Éxito en todo lo que se propongan.

A *Paco*, que durante esta etapa final, me acompañaste, me esperaste hasta tarde y me escuchaste en todo momento. Eres una persona maravillosa y un gran compañero.

Índice de contenido

1.- Introducción	
1.1.- Epidemiología del Cáncer.....	1
1.2.- Procesos de Identidad Molecular (Hallmarks) del Cáncer.....	1
1.3.- Factores Moleculares del Cáncer.....	2
1.3.1.- Alteraciones Genéticas.....	2
1.3.2.- Alteraciones Epigenéticas.....	3
2.- Cáncer de Pulmón.....	7
2.1.- Quimioterapia y Quimioresistencia en Cáncer de Pulmón.....	8
2.1.1.- Quimioresistencia Asociada a Células Tipo Stem del Cáncer.....	9
3.- Antecedentes	
3.1.- Expresión de Marcadores Relacionados a Quimioresistencia y Células Tipo Stem del Cáncer.....	11
3.1.1.- Quimioresistencia Asociada a BMI-1.....	11
3.1.2.- Correlación Transcripcional en la Expresión de BMI-1 vs ABCG2.....	13
4.- Planteamiento del Problema.....	14
5.-Justificación.....	14
6.- Hipótesis.....	15
7.- Objetivo General.....	15
8.- Objetivos Particulares.....	15
9.- Estrategia Experimental.....	16
10.- Material y Métodos	
10.1.- Cultivos Celulares.....	17
10.2.- Ensayos Farmacológicos.....	17
10.3.- Ensayos de Inhibición Epigenética Mediante el Uso de 5-aza y TSA.....	17
10.4.- Evaluación de Proliferación Celular.....	18
10.5.- Ensayos de Viabilidad Celular Mediante la Técnica de MTS.....	18
10.6.- Inhibición de BMI-1 Mediante siRNA.....	19
10.7.- Extracción de RNA.....	21
10.8.- Ensayos de Expresión Relativa.....	22
10.8.1.- Síntesis de cDNA.....	22
10.8.2.- Análisis de Expresión Relativa del mRNA Mediante PCR en Tiempo Real (q-PCR).....	22
10.9.- Análisis Estadístico.....	24
11.- Resultados	
11.1.- Establecimiento <i>in vitro</i> de Modelos Celulares Quimioresistentes de Cáncer Pulmonar Tipo Adenocarcinoma.....	25
11.2.- Análisis de Viabilidad Celular Mediante Ensayos de Citotoxicidad en Líneas Celulares de Cáncer de Pulmón.....	27

11.3.- Análisis de la Expresión Relativa de Marcadores de Células Tipo Stem Quimioresistentes: BMI-1, ABCG2 y CD133 en Modelos Celulares de Cáncer Pulmonar, bajo Tratamiento Farmacológico.....	29
11.3.1- Cambios en el Perfil de Expresión Relativa del Modelo Celular de Cáncer Pulmonar A549.....	29
11.3.2- Cambios en el Perfil de Expresión Relativa del Modelo Celular de Cáncer Pulmonar A427.....	31
11.3.3- Cambios en el Perfil de Expresión Relativa del Modelo Celular de Cáncer Pulmonar INER-37.....	32
11.3.4- Expresión Relativa en la Línea Celular INER-51.....	32
11.4- Análisis de la Expresión Relativa de Marcadores de Células Tipo Stem Quimioresistentes: BMI-1, ABCG2 y CD133 en Modelos Celulares de Cáncer Pulmonar, bajo Tratamiento Epigenético.....	33
11.4.1-Expresión Relativa en la Línea Celular A549, bajo Tratamiento Epigenético.....	33
11.4.2-Expresión Relativa en la Línea Celular A427, bajo Tratamiento Epigenético.....	34
11.4.3-Expresión Relativa en la Línea Celular INER-37, bajo Tratamiento Epigenético.....	35
11.5.- Inhibición de BMI-1 en Líneas Celulares de Cáncer de Pulmón, bajo Tratamientos Farmacológicos y Epigenéticos.....	35
11.5.1.-Expresión relativa en la Línea Celular A549 e INER-37 Posterior a la Inhibición de BMI-1 Mediante siRNA Específico para éste.....	36
11.5.2.- Inhibición de BMI-1 en la Línea Celular A549.....	37
11.5.3.- Inhibición de BMI-1 en la Línea Celular INER-37.....	39
12.- Discusión de Resultados	
12.1.- Quimioresistencia en Modelos Celulares <i>in vitro</i> de Carcinomas Pulmonares Tipo Adenocarcinoma.....	41
12.2.- Inducción en la Expresión de Fenotipo Quimioresistente en Líneas Celulares de Carcinomas Pulmonares Tipo Adenocarcinoma, Mediante Tratamiento Farmacológico y Epigenético.....	41
12.3.- El Silenciamiento de BMI-1 Aumenta la Sensibilidad Celular en Modelos <i>in vitro</i> de Carcinomas Pulmonares bajo Tratamientos Farmacológicos.....	43
12.4.- El silenciamiento de BMI-1, la Combinación de Tratamientos Farmacológicos <i>vs</i> Inhibidores Epigenéticos Aumenta la Sensibilidad Celular en Modelos <i>in vitro</i> de Carcinomas Pulmonares.....	46
13.- Conclusiones.....	48
14.- Perspectivas.....	49
15.- Bibliografía.....	50

Resumen

Las neoplasias malignas pulmonares representan al grupo de enfermedades de mayor índice de mortalidad a nivel mundial, siendo los adenocarcinomas aquellos de mayor incidencia. La quimioterapia es un componente importante del tratamiento, principalmente en estadios clínicos tardíos del cáncer pulmonar, representando las escasas opciones terapéuticas disponibles. No obstante, la resistencia a fármacos oncológicos representa una barrera significativa para disminuir la mortalidad y relapsos neoplásicos pulmonares. Dicha quimioresistencia, ha sido relacionada con la sobreexpresión de marcadores involucrados en la troncalidad celular, tales como BMI-1, CD133 y ABCG2, entre otros, considerados clave en el mantenimiento de células tipo stem del cáncer. Debido a lo anterior, en el presente trabajo nos propusimos analizar la expresión inducible del marcador de troncalidad BMI-1, durante eventos de quimioresistencia de tumores pulmonares tipo adenocarcinoma. Para ello, se realizó análisis de la expresión relativa de BMI-1 y marcadores de fenotipo stem-quimioresistente, tales como CD133 y ABCG2, en presencia de esquemas farmacológicos de cisplatino y/o doxorubicina; así como en presencia de inhibidores epigenéticos, como 5-aza y TSA para analizar los posibles mecanismos epigenéticos involucrados. Aunado a esto, para evaluar la participación de BMI-1 en la quimioresistencia, fueron realizados ensayos de silenciamiento genético por siRNAs, bajo distintas condiciones de tratamiento oncológico único o combinado con inhibidores epigenéticos antes mencionados.

Los resultados permitieron observar que bajo distintos esquemas de tratamiento por Cisplatino y/o Doxorubicina se indujo un fenotipo stem quimioresistente en líneas celulares tipo adenocarcinoma de origen caucásico y mestizo mexicano, que correlaciona con mecanismos de regulación epigenética basados principalmente en la metilación del DNA de secuencias promotoras. Así mismo, fue posible identificar que el silenciamiento del gen BMI-1, permite reducir el fenómeno de quimioresistencia en carcinomas pulmonares tipo adenocarcinoma, probablemente representando un blanco terapéutico frente al cáncer pulmonar.

Palabras clave: cáncer pulmonar, quimioresistencia, BMI-1, células stem del cáncer.

1.- Introducción

1.1.- Epidemiología del Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades que representan la segunda causa de muerte en países económicamente desarrollados y países en desarrollo, solo después de las enfermedades cardiovasculares. Lo anterior como resultado del envejecimiento de la población y la adopción de hábitos de vida que involucran la exposición a factores de riesgo, entre ellos, tabaquismo, alcoholismo, falta de actividad física y una alimentación deficiente. A nivel mundial en el 2008, se estimaron cerca de 12.7 millones de nuevos casos y 7.6 millones de muertes ocurridas por cáncer (Jemal *et al*, 2011). Al respecto, se prevé que el número de decesos por cáncer, supere los 13,1 millones para el año 2030 a nivel mundial (Ferlay *et al*, 2010).

Actualmente se describen cerca de 100 tipos de cáncer, entre ellos el cáncer pulmonar con el mayor índice de mortalidad, con más de 1.37 millones de muertes a nivel mundial, mientras que el cáncer gástrico con 736,000, cáncer hepático con 695,000, el cáncer colorectal 608,000, cáncer de mama 458,000 y el cáncer cervico uterino con 275,000 muertes son los tipos de cáncer con mayor mortalidad a nivel mundial (Ferlay *et al*, 2010).

1.2.- Procesos de Identidad Molecular (Hallmarks) del Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades que comprenden la acumulación de capacidades biológicas adquiridas durante su desarrollo que debido a su complejidad Hanahan y Weinberg los han clasificado como propiedades de identidad molecular del cáncer "Hallmarks del cáncer" (Hanahan & Weinberg, 2011), cuyos procesos



Figura 1: Hallmarks del Cáncer propuestos por Hanahan y Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2011).

constituyen un principio de organización que permiten el desarrollo ordenado de enfermedades complejas y multifactoriales como las enfermedades neoplásicas malignas (**Fig. 1**), de este modo los llamados Hallmarks del cáncer, incluyen procesos tales como: *i*) mantenimiento descontrolado de las señales de proliferación, *ii*) evasión a supresores de crecimiento, *iii*) resistencia a la muerte celular por apoptosis, *iv*) potencial replicativo ilimitado, *v*) inducción de angiogénesis, *vi*) reprogramación del metabolismo energético, *vii*) invasión y metástasis, *viii*) evasión al sistema inmune *ix*) procesos inflamatorios e *x*) inestabilidad genómica (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.3.- Factores Moleculares del Cáncer

1.3.1.- Alteraciones Genéticas

La adquisición de estos Hallmarks del cáncer, dependen de una serie de alteraciones a nivel genómico y genético (deleciones, recombinación, amplificación, mutaciones, etc.) que durante cada división dichas alteraciones proporcionan ventaja selectiva a las células en transformación, permitiendo su extensión y eventual dominancia (Hanahan & Weinberg, 2011; Bertram, 2001). Estas alteraciones proveen la capacidad de incrementar la actividad de proliferación celular y/o inactivar la función de genes involucrados en el control del ciclo celular y encargados de la reparación del daño al DNA (Bertram, 2001).

Los genes blanco en estos procesos de transformación neoplásica se conocen como **proto-oncogenes** que en su forma mutante o hiperactiva se les denominan **oncogenes** (Bertram, 2001), los cuales codifican moléculas capaces de estimular el crecimiento celular y sus receptores (Ej. Ras), proteínas antiapoptóticas (Ej. Bcl-2), factores de transcripción (Ej. Myc) y **genes supresores de tumor** los cuales codifican proteínas intracelulares que regulan o inhiben la progresión a través de un estadio específico del ciclo celular (Ej. p16 y Rb), receptores o transductores de señales para hormonas secretadas o señales de desarrollo que inhiben la proliferación celular (Ej. TGF β), proteínas de control de puntos clave del ciclo celular que participan en eventos de daño al DNA (Ej. p53) y proteínas capaces de estimular la apoptosis (Lodish *et al.* 2005). Aunado a estas alteraciones genómicas, se ha reportado que alteraciones epigenéticas también, contribuyen al establecimiento y progresión del cáncer (Herceg, 2007; Hanahan & Weinberg, 2011).

1.3.2.- Alteraciones Epigenéticas

La epigenética juega un papel importante en la regulación de diversos procesos celulares, entre los cuales podemos encontrar, la regulación de la expresión génica, interacciones DNA-proteínas, diferenciación celular, embriogénesis, inactivación del cromosoma X e impronta genómica, esto mediante mecanismos que alteran la actividad génica sin involucrar cambios en la secuencia lineal del DNA, siendo a su vez modificaciones reversibles y heredables -a nivel replicativo- (Portela & Esteller, 2010).

Al respecto, se han descrito distintos mecanismos de regulación epigenética:

Metilación del DNA: Constituye la modificación epigenética más estudiada en humanos. Proporciona un mecanismo de silenciamiento génico estable que juega un papel importante en los mecanismos de regulación transcripcional. La metilación del DNA ocurre principalmente por modificaciones covalentes en las bases de citosinas localizadas en el contexto de dinucleótidos CpGs, catalizada por las enzimas DNA metil-transferasas (DNMTs); estos dinucleótidos tienden a agruparse en regiones llamadas islas CpG localizadas preferentemente en la región 5' de los genes, ocupando aproximadamente el 60% de los promotores (Portela & Esteller, 2010). Tales patrones de metilación del DNA puede inhibir la expresión mediante el reclutamiento de proteínas de unión al DNA metilado conocidas como "MBDs" por sus siglas en inglés, que a su vez, reclutan complejos proteicos modificadores de histonas y/o remodeladores de la cromatina, modulando la unión de factores de transcripción a sitios blanco (Lopez-Serra & Esteller, 2008).

Modificación de Histonas: El octámero de histonas agrupadas en dímeros (H2A-H2B) y tetrámeros (H3-H4) de histonas, enrolladas con un segmento de aproximadamente 147 pares de bases de DNA, constituyen al nucleosoma como unidad mínima de regulación de la cromatina (Kouzarides, 2007). Dichas estructuras proteicas con dominios globulares C-terminal y colas N-terminal son objeto de modificaciones covalentes post-transduccionales que incluyen metilación, acetilación, ubiquitinización, sumoilación y fosforilación en residuos de aminoácidos en los tetrámeros de histonas (Bannister & Kouzarides, 2011). En este sentido dichas modificaciones son clave en procesos celulares de la transcripción,

replicación, reparación del daño al DNA y condensación de la cromatina (Berstein *et al*, 2007; Kouzarides, 2007; Huertas *et al*, 2009).

Al respecto se propone que, modificaciones covalentes en histonas permiten adquirir un código de memoria molecular o identidad molecular epigenética, capaz de establecer programas funcionales a nivel de la fisiología celular a partir de la estructura de la cromatina (Delage & Dashwood, 2008). Dichas modificaciones actúan ya sea reprimiendo o promoviendo la actividad de la cromatina y/o reclutando proteínas no-histónicas efectoras, estableciendo un “código histónico” particular para cada estirpe celular definido (Sharma *et al*, 2010); estas configuraciones pueden estar definidas por distintos niveles de acetilación y/o metilación, por ejemplo, la eucromatina (cromatina laxa) que se encuentra transcripcionalmente activa, se caracteriza por altos niveles de acetilación y trimetilación en la histona 3, en lisinas 4, 36 y 79 (H3K4, H3K36 y H3K79); mientras que la heterocromatina (cromatina condensada) que se encuentra transcripcionalmente inactiva, se caracteriza por niveles bajos de acetilación y niveles altos de metilación en las histonas 3 y 4 en lisinas 9, 27 y 20 (H3K9, H3K27 y H4K20) (Li *et al*, 2007). Bajo este contexto, estudios recientes han reportado que patrones en el código histónico logran ser predictivos de los patrones y niveles de expresión génica, ejemplo de ello, la activación transcripcional correlaciona con variaciones del nivel de H3K4me3, H3K27ac, H2BK5ac y H4K20me1 localizados en secuencias promotoras; mientras que, H3K79me1 y H4K20me1 localizadas dentro del marco abierto de lectura del gen, por otra parte, la trimetilación de H3K9me3 y H3K27me3 presentes en secuencias promotoras modulan negativamente la expresión transcripcional (Sharma *et al*, 2010; Karlic *et al*, 2010).

Remodelación de la Cromatina, Nucleosomas y Variantes de Histonas: Los nucleosomas constituyen una barrera en el proceso de la transcripción, al bloquear el acceso a los factores activadores y/o represores de la transcripción a secuencias promotoras del DNA genómico. En particular, el posicionamiento de los nucleosomas cercanos al sitio de inicio de la transcripción (TSSs) influye en las etapas de inicio de la transcripción, ya que, la pérdida del nucleosoma río abajo del TSS correlaciona estrechamente con la activación

génica, mientras que la compactación u oclusión del TSS por el nucleosoma está asociado con la represión génica (Cairns, 2009).

Basado en lo anterior, se conoce que diversos complejos macromoleculares mueven, desestabilizan, eyectan o reestructuran a las unidades mínimas de la cromatina, los “nucleosomas”, de forma dependiente de ATP, estos complejos son conocidos como remodeladores de la cromatina y clasificados en 4 familias principales tales como, SWI/SNF, ISWI, CHD e INO80 (Ho & Crabtree, 2010). Adicional a esto, las alteraciones físicas en el posicionamiento nucleosomal a través de los remodeladores nucleosomales, son capaces de incorporar variantes de histonas, ej. H3.3, H2A.Z, H2A.X y macroH2A entre otras, que también influyen en la ocupación nucleosomal y por tanto en la actividad génica, por ejemplo la incorporación de la variante de histona H2A.Z protege al DNA contra la metilación (Sharma *et al*, 2010; Vardabasso *et al*, 2013).

Estos mecanismos epigenéticos experimentan aberraciones importantes en cáncer, que en conjunto con alteraciones a nivel genómico y genético conducen al establecimiento y progresión de las enfermedades neoplásicas (Ellis *et al*, 2009). Entre ellas, destacan la hipometilación en secuencias repetitivas del DNA, retrotransposones y oncogenes, induciendo inestabilidad genómica y expresión aberrante de proto-oncogenes, e hipermetilación de islas CpG en secuencias promotoras de genes supresores de tumor, capaces de provocar su inactivación transcripcional (Sandoval & Esteller, 2012; Dawson & Kouzarides, 2012).

Así mismo, destacan otro tipo de cambios en el epigenoma de células neoplásicas, tales como, reducción de acetilación de H4K16 mediada por deacetilasas de histonas (HDACs), sobre-expresadas en diversos tipos de cáncer. Así como la pérdida o ganancia de marcas de activación *vs* represión transcripcional H3K4me3-H4k20me3 y H3K9me-H3K27me3, respectivamente, lo cual se debe principalmente a la expresión aberrante de metiltransferasas de histonas (HMTs) *vs* desmetilasas de histonas (HDMet) (Esteller, 2007). Aunado a esto, subunidades de complejos proteicos pertenecientes al grupo Polycomb y Trithorax cuya función en condiciones de normalidad, es establecer patrones o

modificaciones histónicas que conducen al balance represión *vs* activación transcripcional, capaces de controlar la senescencia, ciclo celular, apoptosis y estabilidad genómica; así como el desarrollo embrionario y establecimiento de la memoria epigenética, se encuentran alterados en diversos tipos de cáncer, ejemplo de esto, son alteraciones en la función de metiltransferasas de histonas como EZH2 (subunidad del grupo Polycomb), dando como resultado aumento en la proliferación celular e influyendo en la progresión de diversos tipos de cáncer (Gieni & Hendzel, 2009; Mills, 2010).

Basado en las propiedades reversibles de los mecanismos epigenéticos de metilación del DNA y modificación del código de histonas, ha tenido lugar la terapia epigenética como una opción de tratamiento frente del cáncer (Kelly *et al*, 2010). En este sentido, han destacado los inhibidores de metilación del DNA, como 5-azacytidina (5-aza/CR o azacitidina) y 5-aza/2'-deoxycytidina (5-aza/CdR o decitabina) como los primeros fármacos epigenéticos propuestos para su uso en la terapia oncológica, así como el uso de inhibidores de HDACs, entre los que se encuentran el ácido hidroxámico suberoilánilido (SAHA) y tricostatin A (TSA), fármacos que han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (por sus siglas en inglés: Food and Drug Administration de E.U.A), para el tratamiento de leucemias y otros tipos de cáncer de origen hematopoyético, o bien linfomas cutáneos de células T (Kalebic, 2003; Yoo & Jones, 2006; Kelly *et al*, 2010).

En este sentido, los diversos estudios que han incorporado el papel de la regulación epigenética, incluyen distintos tipos de cáncer de alta incidencia y mortalidad, entre ellos el cáncer pulmonar (Bowman *et al*, 2006; Tooyoka *et al*, 2006; Portela & Esteller, 2010).

2.- Cáncer de Pulmón

El cáncer pulmonar es un grave problema de salud pública en México y a nivel mundial debido a su alta incidencia y letalidad (Godoy *et al*, 2007; Jemal *et al*, 2011); es la principal causa de muerte por neoplasias malignas representando el 22.5% de todas las muertes debidas a cáncer a nivel mundial (Ferlay *et al*, 2010). En este escenario, México no es la excepción, causando altos costos económicos para instituciones del sector salud y productivo, debido en parte a la incapacidad de los servicios de salud para ofrecer un diagnóstico y tratamiento oportunos (Franco-Marina y Villalba-Caloca, 2001; Cerecedo-Zapata *et al*, 2009).

La clasificación histopatológica de esta enfermedad comprende dos grupos: carcinomas pulmonares de células pequeñas (SCLC) y carcinomas pulmonares de células no pequeñas (NSCLC), siendo este último el más frecuente representado por tres tipos histológicos principales: *i*) carcinoma de células grandes (LC), *ii*) carcinomas epidermoides o carcinomas de células escamosas (SCC) y *iii*) adenocarcinomas (AD), siendo éste el de mayor incidencia y que se ha incrementado de forma dramática durante los últimos 40 años, en mujeres no fumadoras y personas menores de 40 años de edad (Minna *et al*, 2002; Sun *et al*, 2007; Donnem, 2009).

Entre los factores de riesgo, el tabaquismo está directamente asociado al cáncer de pulmón, donde prevalece una relación dosis respuesta, entre la duración e intensidad de la exposición al humo del tabaco; no obstante, estadísticas globales estiman que 15% de los carcinomas pulmonares en hombres y 53% en mujeres no son atribuidos al tabaquismo (Sun *et al*, 2007). Adicional a ello, dentro de los factores de riesgo ocupacional-ambiental más comunes se encuentran la exposición a: radiación ionizante, asbestos, radón, arsénico, cromo, níquel y cloruro de vinilo. Así mismo, enfermedades de pulmón preexistentes tales como: fibrosis idiopática pulmonar, tuberculosis y enfermedades pulmonares obstructivas crónicas están asociadas al incremento en los índices de cáncer pulmonar (Collins *et al*, 2007).

El tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón sigue siendo un desafío para la Biología y la Medicina (Chang, 2011) a pesar de que esta enfermedad puede ser curable en etapas tempranas (Chang, 2011; Spira & Ettinger, 2004). La mayoría de los pacientes se diagnostican de manera tardía, es decir cuando el tumor ha progresado más allá del sitio primario, en este sentido, los pacientes se enfrentan a un régimen de tratamiento intensivo e invasivo el cual comprende cirugía, radioterapia y/o quimioterapia, al igual que, esquemas combinados de tratamiento físico y químico en función del estadio de la enfermedad y eficacia del esquema terapéutico. Cabe mencionar que, los pacientes con diagnóstico tardío, es decir con enfermedad clínica avanzada la opción de primera elección es la quimioterapia, incluso para pacientes candidatos a cirugía curativa, mediante esquemas neo-adyuvantes y adyuvantes (Chang, 2011). Por lo que, la disponibilidad de agentes quimioterapéuticos eficaces y técnicas quirúrgicas avanzadas, podrán contribuir de manera gradual al éxito terapéutico en contra de esta enfermedad. (Chang, 2011). Sin embargo, la disminución en la tasa de mortalidad debido entre otros criterios, al éxito del tratamiento fármaco-oncológico asociada con el grupo NSCLCs, en la actualidad se encuentra muy lejana a índices de mortalidad observados para otros tipos de cáncer de alta prevalencia, tales como cáncer de mama, próstata, colon y recto (Jemal *et al*, 2008).

2.1.- Quimioterapia y Quimioresistencia en Cáncer de Pulmón

La quimioterapia se reconoce como un componente importante del tratamiento en las distintas etapas clínicas del cáncer pulmonar. Sin embargo, debido al diagnóstico en etapas tardías de la enfermedad (clínico avanzado), la quimioterapia constituye la base de su tratamiento y es fundamental para determinar la supervivencia, sobrevida y calidad de vida del paciente (Chang, 2011). El uso de fármacos oncológicos con base en derivados de platino (cisplatino y carboplatino) constituyen el pilar de la quimioterapia en pacientes con diagnóstico de esta enfermedad, debido a su potencial citotóxico (Chang, 2011), causando estrés a organelos celulares mediante la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y daño al DNA, de esta forma activan distintas vías que evitan la replicación del DNA y proliferación celular, conduciendo a la muerte celular por apoptosis (Sancho *et al*, 2012; Florea & Büsselberg, 2011). Este grupo de antineoplásicos generalmente se administran en combinación con agentes de unión a tubulina (TBA), que incluyen a los taxanos (paclitaxel,

docetaxel) y vincalcaloides como vinorelbina, y vincristina, así como también, análogos de la camptotecina (irinotecan, topotecan) que inhiben la actividad de la topoisomerasa I, antimetabolitos como la gemcitabina o pemetrexed (Chang, 2011) y agentes inhibidores de la topoisomerasa II como la doxorubicina (Spira & Ettinger, 2004).

A pesar de la diversa gama de posibles esquemas de tratamiento farmacológico, el cisplatino permanece como el fármaco por excelencia en el tratamiento de cáncer pulmonar con una tasa de respuesta del 15%-25%(Sandler *et al*, 2000; Basu & Krishnamurthy, 2010); no obstante su éxito se ve comprometido por los efectos secundarios que éste induce, por ejemplo, daño al riñón, daño a neuronas e inmunosupresión, entre otros, así como la resistencia a éste en el transcurso del tratamiento (Florea & Büsselberg, 2011) y frente a esquemas combinados de tratamiento oncológico pulmonar (Chang, 2011); tal como ocurre frente a esquemas basados en doxorubicina, la cual es una antraciclina quimioterapéutica, perteneciente a la clase de productos naturales antineoplásicos efectiva para el tratamiento de cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC), en contraste con su baja efectividad en tumores del grupo NSCLC (Shingal *et al*, 2006). Esta quimioresistencia en carcinomas pulmonares ha sido asociada con la detoxificación por la inactivación del fármaco mediante enzimas que contienen azufre tales como las metalotioneinas (MTs) y el glutatión (GSH), así como la participación de la maquinaria de reparación del DNA por escisión de nucleótidos (NER) y la reducción de la acumulación del fármaco mediante proteínas transportadoras dependientes de ATP, pertenecientes a la familia ABC.(Arora *et al*, 2010; Shanker *et al*, 2010; Sève & Dumontet, 2005; Wu *et al*, 2003)

A pesar de los avances en el desarrollo de agentes quimioterapéuticos y datos emergentes sobre estrategias eficaces de administración de dichos fármacos oncológicos, la resistencia a los fármacos por parte de la células neoplásicas (quimioresistencia) continua representando un reto importante en el tratamiento de neoplasias humanas, por lo que, el manejo exitoso de esta enfermedad se encuentra en función de la selección de los fármacos apropiados, basados en la probabilidad de respuesta e inducción de sensibilidad al tratamiento (Chang, 2011).

2.1.1.- Quimioresistencia Asociada a Células Tipo Stem del Cáncer

Distintas evidencias, sugieren que neoplasias malignas de origen hematopoyético y tumores sólidos de origen epitelial, están conformados por grupos de poblaciones celulares responsables de la iniciación, progresión y mantenimiento de tumores, llamadas células stem del cáncer (CSCs) o células iniciadoras del cáncer, debido a características moleculares y funcionales semejantes en células stem fisiológicas (troncales) (Lobo *et al*, 2007; Houghton *et al*, 2007; Zhou & Zhang, 2008; Velázquez y De la Fuente, 2009). Entre estas características destacan la capacidad de auto-renovación, pluripotencialidad, expresión de marcadores de superficie y genes relacionados con células stem y desarrollo embrionario (Guo *et al*, 2006; Zhou & Zhang, 2008).

Los agentes terapéuticos más comunes han sido desarrollados con base a su actividad por inhibir o inducir la muerte de células neoplásicas. No obstante, dicho enfoque tradicional ignora en gran medida la presencia de poblaciones celulares tipo stem del cáncer, que prevalecen en el tumor. Además de que, ésta población celular posee propiedades que a menudo provocan resistencia inherente a terapias convencionales. Esta resistencia ha sido reportada en distintos tipos de cáncer, incluyendo en cáncer de pulmón. Por tanto, se considera que el fracaso de las terapias oncológicas se debe en parte al fracaso por erradicar a poblaciones celulares tipo CSCs, las cuales prevalecen por su alta capacidad de proliferación y generación de micrometástasis, logrando restaurar el crecimiento tumoral y generar nuevos focos neoplásicos (Zhou & Zhang, 2008; Wu *et al*, 2012).

3.- Antecedentes

3.1.- Expresión de Marcadores Relacionados a Quimioresistencia y Células Tipo Stem del Cáncer

En cáncer, resulta cada vez más evidente que los diversos genes involucrados en el desarrollo embrionario, correlacionan con eventos que gobiernan los sistemas de diferenciación en células adultas hacia el desarrollo de patrones de expresión y epigenéticos que conducen al desarrollo de enfermedades malignas, a la vez de que, han sido relacionados con diversas sub-poblaciones celulares dentro del tumor, con características similares a las células stem (Mohammad & Baylin, 2010). Ejemplo de ello, es la participación de factores de transcripción como SOX, Nanog, Oct-4 y miembros de reguladores epigenéticos como BMI-1, capaces de mantener el estado indiferenciado, la capacidad de autorenovación y pluripotencialidad de las células stem fisiológicas y probablemente sobre-expresados en CSCs en distintos tipos de cáncer (Mohammad & Baylin, 2010; Loh *et al*, 2006; Hu *et al*, 2010, Wang *et al*, 2011).

3.1.1.- Quimioresistencia Asociada a BMI-1

Dentro del análisis de neoplasias pulmonares, se han identificado numerosos genes desregulados, entre estos se encuentra BMI-1, el cual se ha distinguido por valores altos de expresión en tumores del grupo NSCLC (Vrzalikova *et al*, 2008; Volanthen *et al*, 2001), que a su vez representa un componente clave del grupo Polycomb (específicamente del Complejo Represor 1) que mediante cambios estructurales en la cromatina asociados a modificaciones histónicas a través de la formación de dos complejos multiproteicos: el Complejo Represor Polycomb 1 y el Complejo Represor Polycomb 2, regula la represión transcripcional de genes que durante el desarrollo embrionario codifican factores transcripcionales ó reguladores importantes en el control de la identidad celular y que juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer (Sparman & Van Lohuizen, 2006).

BMI-1 (por sus siglas en ingles: Polycomb group protein B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog - sitio de inserción 1 del virus Mo-MLV de linfoma de células-B) fue inicialmente identificado como oncogén capaz de cooperar con c-myc en la generación de linfomas de células B (Van Lohuizen *et al*, 1991). El potencial oncogénico de BMI-1 se

explica en parte, debido a la regulación negativa del locus Ink-4a/Arf que codifica para 2 proteínas clave con función de genes supresores de tumor, como son p16 y p19, quienes actúan inhibiendo la proliferación celular y promoviendo la apoptosis, de forma directa mediante la capacidad de p16 (InK-4a) para inhibir la progresión del ciclo celular, a través de la inhibición de la cinasa dependiente de ciclina D1, que conduce a la prevención de fosforilación del gen supresor de tumor Rb (Jacobs *et al*, 1999a), mientras que p19 (ARF), de forma paralela previene la degradación e inactivación del supresor de tumor p53 mediante la unión a MDM-2 (Jacobs *et al*, 1999b).

Así mismo, con el fin de investigar posibles mecanismos responsables de la sobreexpresión de BMI-1 en NSCLC, Volanthen y colaboradores, en el año 2001 reportaron que dicho aumento en los patrones de expresión no responde a fenómenos de amplificación en la región Chr:10p13 donde se localiza el gen BMI-1, esto mediante el análisis de 48 tumores de pacientes (Volanthen *et al*, 2001), lo que sugiere que la sobreexpresión y participación de BMI-1 en cáncer, podría deberse a mecanismos de control epigenético.

Distintos estudios han demostrado que BMI-1 es requerido durante la auto-renovación de CSCs (Crea *et al*, 2009). Al respecto, Chiba y colaboradores, demostraron que la disminución en la expresión de BMI-1 conduce a la reducción del potencial tumorigénico en líneas celulares de hepatocarcinoma (Chiba *et al*, 2008). Mientras que, Dovey y colaboradores, reportaron que BMI-1 es fundamental durante la carcinogénesis pulmonar, así como en la expansión de células tipo stem de origen bronquioalveolar mediante el estudio de modelos murinos knockout para el gen BMI-1 (Dovey *et al*, 2008).

Por otra parte, se ha demostrado que la sobre-expresión de BMI-1 está relacionada con el fracaso de la quimioterapia en pacientes con cáncer pulmonar, como es el caso de Vrzalikova y colaboradores, que en el 2008 mostraron que pacientes con NSCLC en estadios I y II bajo terapia adyuvante, los índices de supervivencia fueron superiores en pacientes con bajos niveles de expresión de BMI-1, en contraste con pacientes que presentaban sobre-expresión (Vrzalikova *et al*, 2008).

Aunado a lo anterior, se ha descrito que BMI-1 se encuentra involucrado en eventos de quimioresistencia en líneas celulares de cáncer ovárico, demostrando que, el silenciamiento de dicho gen restaura parcialmente la sensibilidad de células neoplásicas al

tratamiento farmacológico basado en cisplatino (Wang *et al*, 2011). Mientras que, Crea y colaboradores en el mismo año demostraron que, el silenciamiento de BMI-1 en líneas celulares de cáncer de próstata, aumenta la actividad antitumoral del fármaco Docetaxel y correlaciona con la disminución en la expresión de genes de respuesta frente a estrés oxidativo, afectando así la respuesta antioxidante. Adicional a ello, Wu y colaboradores en el 2011 evidenciaron que el silenciamiento de BM-I en líneas celulares de osteosarcomas, aumenta la sensibilidad al cisplatino, mediante la inducción de apoptosis a través de la inhibición de la vía PI3KAKT. Frente a ello, es posible que la activación de receptores multidrogo-resistencia y la participación de receptores tipo ABC, como ABCG2, se encuentren promoviendo la quimioresistencia.

3.1.2.- Correlación Transcripcional en la Expresión de BMI-1 vs ABCG2

Como se mencionó previamente, distintas evidencias indican que las poblaciones celulares tipo CSCs, son responsables de sostener el crecimiento tumoral, en modelos celulares *in vivo* de cáncer de mama, próstata, colon y cáncer pulmonar (Al-Hajj *et al*, 2003; Collins *et al*, 2006; Ricci-Vitiani *et al*, 2007; Eramo *et al*, 2008).

Respecto a lo anterior, previamente Goodell y colaboradores han descrito la presencia de poblaciones celulares en médula ósea, con actividad funcional tipo CSCs, denominada "Side population" (SP) debido a su localización lateral de la población celular principal, detectada por citometría de flujo (Goodell, 1996). Dichas células SP se caracterizan por su actividad de exclusión del colorante Hoechst 33342, directamente atribuida a la función del receptor ABCG2, miembro de la familia de proteínas transportadoras de membrana, ATP dependientes tipo ABC. Dicha expresión se encuentra involucrada en la capacidad de quimioresistencia a diferentes fármacos, entre ellos doxorubicina y mitoxantreno (Wu *et al*, 2012).

Al respecto en líneas celulares de cáncer de pulmón se ha identificado dicha población celular SP, con amplia capacidad tumorigenica, invasividad, y resistente a múltiples fármacos oncológicos (Ho *et al*, 2007; Sung *et al*, 2008). Adicionalmente, se ha reportado que la presencia de BMI-1, es fundamental en el mecanismo de autorenovación de poblaciones SP, en diversas neoplasias de origen epitelial (Chiba *et al*, 2008).

Es importante mencionar que el receptor ABCG2 se co-expresa con la glicoproteína transmembranal (five-transmembrane glycoprotein) CD133 (prominina-1), considerado el marcador más frecuente de CSCs. Por lo que, se ha propuesto que poblaciones celulares CD133+ en distintos modelos celulares de cáncer pulmonar, desarrollan dicha capacidad tumorigénica, de autorenovación y quimioresistencia (Levina *et al*, 2008; Eramo *et al*, 2008, Wu *et al*, 2012). Lo anterior, sin que hasta la fecha existan evidencias concluyentes, sobre los mecanismos que favorecen la expresión de BMI-1 frente al reto farmacológico y que a su vez favorece la capacidad de quimioresistencia en cáncer pulmonar.

4.- Planteamiento del Problema

Actualmente la disminución de la tasa de mortalidad asociada al cáncer pulmonar, se encuentra alejada de los índices de mortalidad reportados para otros tipos de cáncer, ello debido a deficiencias en el diagnóstico y esquemas de tratamiento oncológico en pacientes. Los mecanismos de quimioresistencia a largo plazo son consecuencia de dichas fallas del tratamiento, representadas por las CSCs, a las cuales se atribuye el establecimiento, progresión y mantenimiento de esta enfermedad, así como a la participación de subunidades pertenecientes al grupo polycomb, como BMI-1 que interactúan con gran número de genes involucrados en la adquisición de tales capacidades oncológicas. Por lo que, el estudio y diseño de nuevas terapias dirigidas para abatir esta capacidad de quimioresistencia, pueden contribuir al mejoramiento de los resultados terapéuticos en contra de esta enfermedad a nivel mundial.

5.- Justificación

A la fecha, el pronóstico de los pacientes con cáncer pulmonar sigue siendo malo, con tasas de respuesta a la quimioterapia por lo general menores a 30% y la adquisición de quimioresistencia durante el tratamiento; por lo que el análisis de la expresión inducible de BMI-1 frente a diferentes esquemas de tratamiento fármaco-oncológico, así como el análisis de sus patrones de regulación epigenética, en carcinomas pulmonares de alta incidencia permitirá nuevo conocimiento que apoye el posible desarrollo de estrategias terapéuticas de mayor eficacia en pacientes con cáncer pulmonar.

6.- Hipótesis

El silenciamiento de BMI-1, frente a esquemas de fármacos oncológicos en conjunto a la inhibición de los mecanismos epigenéticos involucrados en la inducción de su expresión permitirá el abatimiento controlado de la capacidad de quimioresistencia en modelos celulares de cáncer pulmonar.

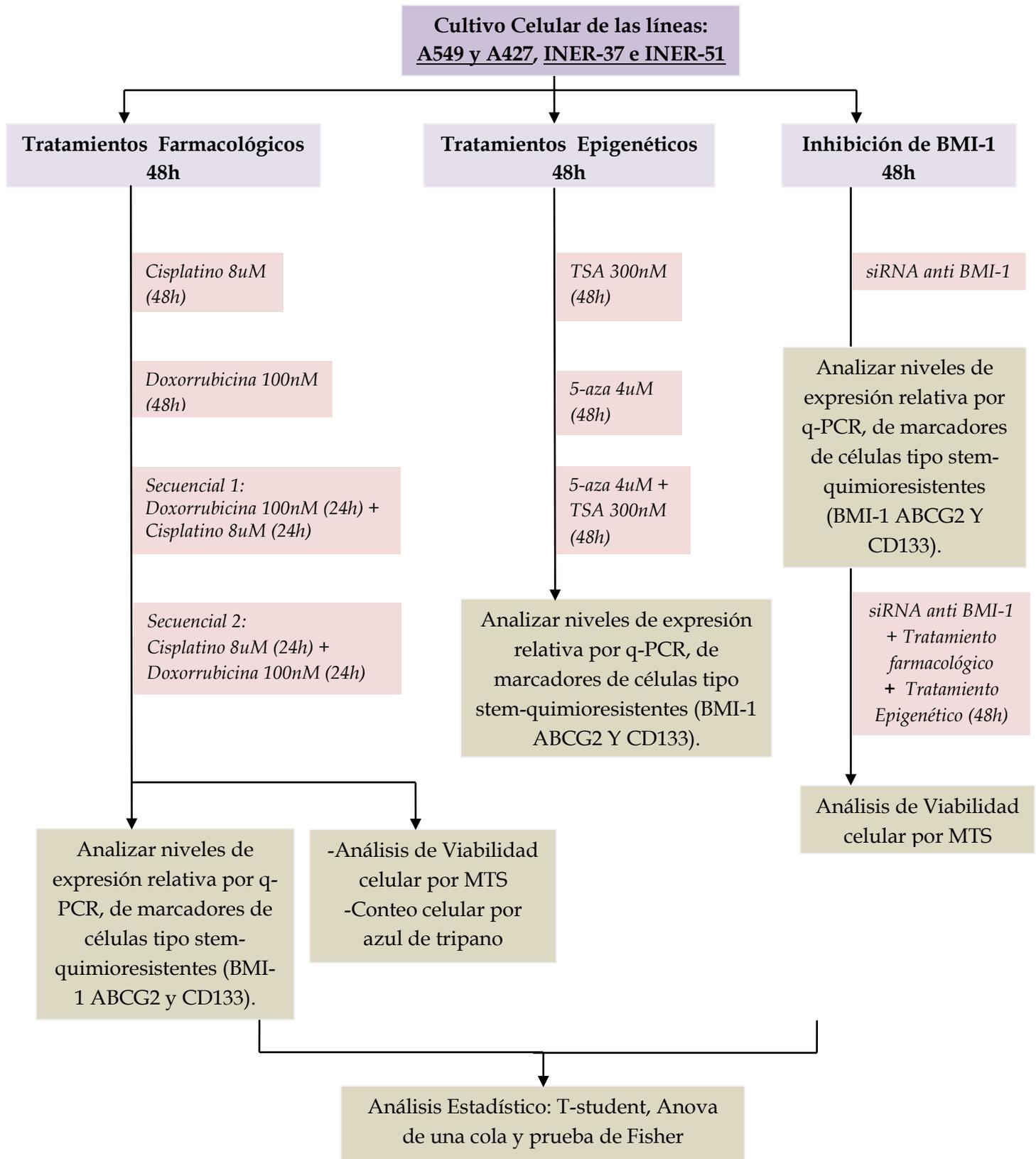
7.- Objetivo General:

Analizar la expresión inducible de BMI-1 y sus mecanismos de regulación epigenética frente a eventos de quimioresistencia en carcinomas pulmonares tipo adenocarcinoma.

8.- Objetivos Particulares:

- Utilizar modelos celulares *in vitro* que permitan evaluar la quimioresistencia en cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma.
- Analizar el patrón de expresión relativa de marcadores asociados al fenotipo stem-quimioresistente, entre ellos BMI-1, ABCG2 y CD133, frente a esquemas de reto farmacológicos por cisplatino y doxorubicina.
- Evaluar los posibles mecanismos de regulación epigenética involucrados en el control de la expresión de BMI-1 frente al reto farmacológico con cisplatino y Doxorubicina, mediante la inhibición de DNA metiltransferasas y deacetilasas de histonas.
- Analizar la participación de la expresión de BMI-1 en el mecanismo de resistencia a cisplatino y doxorubicina.

9.-Estrategia Experimental



10.- Material y Métodos

10.1.- Cultivos Celulares

Se emplearon líneas celulares de tipo adenocarcinoma pulmonar de células no pequeñas, A549 y A427 de origen caucásico, obtenidas del ATCC y las líneas celulares INER-37 e INER-51 de origen mestizo mexicano; de estas 4 se realizaron cultivos celulares en monocapa, empleando para ello, medio RPMI1 1640 complementado con 10% de Suero Fetal Bovino (Biowest), 0.1% de gentamicina (Biowest), 1% de L-glutamina (Biowest), 1% de Piruvato de sodio (Biowest) y 2.5% de Buffer HEPES (Biowest), los cuales se mantuvieron bajo 37°C y 5% de CO₂. Los cultivos se realizaron en cajas T25 y/o T75, cajas de 96 pozos y cajas de 6 pozos, a las cuales se les agregó 1, 000, 000 de células, 1800 células y 200 mil células respectivamente, lo cual dependió de las condiciones experimentales que cada ensayo requirió.

10.2.- Ensayos Farmacológicos

Tras 12h de incubación de las distintas líneas celulares en cajas T25, se administraron los monofármacos doxorrubicina 100 nM (SIGMA) y cisplatino 8µM (SIGMA) así como los secuenciales doxorrubicina 100nM vs cisplatino 8µM y cisplatino 8µM vs doxorrubicina 100nM. En el secuencial 1 se administró inicialmente doxorrubicina 100nM y a las 24hr se administró cisplatino 8µM, mientras que en el secuencial 2 se administró inicialmente cisplatino 8µM y a las 24h doxorrubicina 100nM; el tratamiento con monofármacos y secuenciales fue por 48h.

10.3.- Ensayos de Inhibición Epigenética Mediante el Uso de 5-aza y TSA

Tras 12h de incubación de las distintas líneas celulares en cajas de 6 pozos, se administró el inhibidor de DNMTs, 5-aza/2'-deoxicitidina a 4µM (5-aza) y el inhibidor de deacetilasas de histonas (HDACs) trichostatin A a 300nM (TSA) (SIGMA), tratamientos que duraron por 48h; posterior a este tiempo, el medio fue retirado cuidadosamente por pipeteo y las células fueron lisadas y homogenizadas directamente en los pozos con el reactivo TRIzol® (Invitrogen™) para la extracción de RNA y su posterior análisis de expresión relativa.

10.4.- Evaluación de Proliferación Celular

Transcurridas las 48h de tratamiento farmacológico se tripsinizaron (Tripsina 5x) (Biowest) las distintas líneas celulares con sus respectivos tratamientos. Para detener la reacción de la tripsina se agregó 2ml de medio RPMI complementado y se homogenizó, posteriormente se recolectaron las células en tubos Falcon de 15 ml, lo cual se centrifugó por 5 min a 1500rpm, a continuación se decantó y se resuspendió con 5ml de medio RPMI complementado, de lo cual se tomaron 15 μ l y se le añadió 15 μ l de azul de Tripano para la determinación del número de células por mililitro con cámara de Neubauer mediante la siguiente fórmula: # células / # campos) * factor de dilución * 1×10^5 , así como, la viabilidad celular mediante la siguiente fórmula (# células muertas / total de células) * 100) (Phelan, 2007).

10.5.- Ensayos de Viabilidad Celular Mediante la Técnica de MTS

Para realizar los ensayos de citotoxicidad se utilizaron placas de 96 pozos, a las cuales se les agregó 1800 células en cada pozo, que se dejaron incubar por 12h, transcurrido este tiempo se administraron por duplicado los tratamientos farmacológicos respectivos: cisplatino 8 μ M, doxorrubicina 100nM, secuenciales 1 y 2, utilizando como control, células sin tratamiento; posterior a las 48h de tratamiento farmacológico, para evaluar la viabilidad celular a través de la actividad metabólica de las células, se evaluó colorimétricamente, esto al administrar 10 μ l de la sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolium (MTS), dejando incubar por 3 h y posterior lectura de la densidad óptica (D.O.) mediante el espectrofotómetro de microplacas Epoch™ de Biotek® instruments a 550nm. La viabilidad celular se calculó conforme a la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad celular} = (\text{D.O. de la muestra} / \text{D.O. del Control}) \times 100$$

10.6.- Inhibición de BMI-1 Mediante siRNA

Se realizó el knock-down de BMI-1, para lo cual se utilizó el RNA pequeño de interferencia (siRNA) (Marca Santa Cruz Biotechnology, E.U.A), que consiste de tres secuencias específicas de 19-25 nucleótidos, el cual fue transfectado con lipofectamine® RNAi Reagent (Invitrogen™). El grupo control fue transfectado con secuencias Scramble que no llevan a la degradación específica de ninguna secuencia de mRNA conocida.

Para llevar a cabo la transfección, inicialmente se realizó la siembra de las células en medio con 3% de SFB sin antibiótico, las cuales se incubaron por 12h. Transcurrido este tiempo, se prepararon mezclas para transfectar de acuerdo a la tabla 1 y 2 (dependiendo del ensayo a realizar), donde los tubos A y B fueron incubados por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente el contenido de ambos tubos fue mezclado en un tercer tubo (tubo C), el cual se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tubo	Componente	Caja 6 pozos (por pozo)	Concentración final en un Vol. de 500µl
A	Medio	47µl	-
	Lipofectamina	3µl	-
B	Medio	47.5µl	-
	siRNA o Scramble (10µM)	2.5µl	50nM
Total por pozo	Tubo A+ Tubo B= Tubo C	100µl	

Tabla 1: Componentes para transfección en cajas de 6 pozos.

Tubo	Componente	Caja 96 pozos (por pozo)	Concentración final en un Vol. de 100µl
A	Medio	4.85µl	-
	Lipofectamina	0.15µl	-
B	Medio	4.5µl	-
	siRNA o Scramble (10µM)	0.5µl	50nM
Total por pozo	Tubo A+ Tubo B= Tubo C	10µl	

Tabla 2: Componentes para transfección en cajas de 96 pozos.

Para la transfección en cajas de 6 pozos se prosiguió a retirar el medio de las cajas para después agregar 400µl de medio con 3% de SFB libre de antibiótico, llevándolo a un volumen de 500µl con 100µl del tubo C (**Tabla 1**). La transfección se llevó a cabo en condiciones de cultivo durante 24h, transcurrido este tiempo, fueron agregados 500µl de medio al 3% de SFB sin antibiótico, las células se mantuvieron en condiciones de cultivo durante 48h totales, posteriormente se retiró el medio, se lisó y homogenizó directamente en los pozos con el reactivo TRIzol® (Invitrogen™) para la extracción de RNA y su posterior análisis de expresión.

Para las cajas de 96 pozos las células fueron sembradas en 50µL en medio sin complementar con 3% de SFB sin antibiótico, dejándose incubar por 12h; posterior a este tiempo, se preparó la transfección de acuerdo a la tabla 2 y el volumen total del cultivo fue llevado a 100µl con el mismo medio sin complementar y los tratamientos que se señalan en la tabla 3, lo cual se dejó incubar por 48h. Como control se utilizaron las secuencias Scramble. Transcurrido este tiempo se evaluó la viabilidad celular por MTS como previamente se describió.

Tratamientos + siRNA BMI-1
Medio
Cisplatino 8µM + Scramble
Doxorrubicina 100nM + Scramble
Cisplatino 8µM
Doxorrubicina 100nM
5-aza 4µM
TSA 300nM
5-aza 4µM + TSA 300nM
Cis 8µM + 5-aza 4µM
Cis 8µM+ TSA 300Nm
Cis 8µM+ 5-aza 4µM+ TSA 300µM
Doxo 100nM+5-AZA 4µM
Doxo 100nM+ TSA 300nM
Doxo 100nM+5-aza 4µM+ TSA 300 nM

Tabla 3: Tratamientos farmacológicos utilizados en combinación con la inhibición de BMI-1

10.7.- Extracción de RNA

Para la extracción de RNA de células en monocapa en cajas T25 y cajas de 6 pozos se utilizó el reactivo TRIzol® de la marca Invitrogen™, proceso que se llevó a cabo siguiendo su respectivo protocolo, que consiste en:

- Fase de separación: en donde la muestra se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente tras agregar 1ml de Trizol. Posteriormente se añadió 0.2ml de cloroformo, lo cual se homogenizó vigorosamente por 15 segundos, dejando incubar a temperatura ambiente por 3 minutos y centrifugar por 15 minutos a 13,000 rpm a 4°C.
- Precipitación del RNA: De las tres fases obtenidas, la fase acuosa (superior e incolora) se transfirió a un tubo nuevo a la cual se le añadió 0.5ml de isopropanol (SIGMA), lo cual se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 13,000rpm a 4°C.
- Lavado del RNA: Se removió el sobrenadante y el pellet obtenido se re-suspendió con 1ml de etanol frío (4°C) al 75%, lo cual se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C. Este paso se llevó a cabo 2 veces.
- Por último, el etanol restante de dicho lavado se dejó evaporar para posteriormente resuspender las muestras en 30µl de agua libre de RNAsas.

La determinación de su concentración se llevó a cabo mediante el espectrofotómetro para microplacas Epoch™ de Biotek® Instruments, utilizando el cociente 260/280 para observar la pureza del RNA, tomando como valor aceptable $A_{260}/A_{280} > 1.8$.

10.8.- Ensayos de Expresión Relativa

10.8.1.- Síntesis de cDNA

Tras llevar a cabo la extracción de RNA de las distintas muestras, se realizó la síntesis de cDNA de cadena simple, siguiendo el protocolo del Kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Versión 6.0 (Roche) (Tabla 4), utilizando 1µg de RNA por 20µl de reacción.

Componente	Volumen para 1 reacción	Concentración Final
<i>H₂O</i>	Variable	-
<i>Anchored-Oligo(dT) Primer (50pmol/µl)</i>	1µl	2.5µM
<i>Random Hexamer Primer (600pmol/µl)</i>	2µl	60µM
<i>RNA Total</i>	Variable	1µg
<i>Buffer Transcriptasa Reversa (5X)</i>	4µl	1X (8mM MgCl ₂)
<i>Inhibidor RNasa (40 U/µl)</i>	0.5µl	20U
<i>dNTPs Mix (10mM)</i>	2µl	1mM
<i>Transcriptasa Reversa (20U/µl)</i>	0.5µl	10U
Total	20µl	-

Tabla 4: Componentes requeridos para la reacción de síntesis de cDNA.

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador MaxyGene™ de Axygene bajo las siguientes condiciones:

	Paso 1	Paso 2	Paso 3
<i>Temperatura (°C)</i>	25	55	85
<i>Tiempo</i>	10 min	30 min	5 min

Tabla 5: Condiciones utilizadas en el termociclador para síntesis de cDNA.

10.8.2.- Análisis de Expresión Relativa del mRNA Mediante PCR en Tiempo Real (q-PCR)

Posteriormente se realizaron ensayos de expresión relativa mediante PCR en tiempo real, utilizando ProbeMaster de Roche y Sondas de la Universal Probe Library UPL (Roche) que permiten medir la cantidad del transcrito durante el proceso de amplificación a través de la emisión de fluorescencia tras su hidrólisis; sondas que se encuentran marcadas con

fluoresceína (FAM) en el extremo 5' (donador) y con un marcador oscuro en el extremo 3' (aceptor).

Inicialmente se llevaron a cabo dos mezclas por separado, tal y como se indican en las tablas 6 y 7, las cuales se mezclaron en una placa de 96 pozos (con una réplica de cada pozo por ensayo) específica para tiempo real de Roche, esto en un volumen final de 10 μ l.

Componente	Volumen
<i>cDNA</i>	1 μ l
<i>H₂O</i>	1.5 μ l
<i>Total</i>	2.5 μ l

Tabla 6: Componentes para la mezcla que contiene el cDNA (muestra).

Componente	Volumen para 1 reacción	Concentración final
<i>H₂O</i>	2.2 μ l	-
<i>UPL</i>	0.1 μ l	-
<i>ProbeMaster (2X)</i>	5 μ l	1X
<i>Oligonucleótidos (10μM)</i>	0.2 μ l	0.2 μ M
<i>Total</i>	7.5 μ l	-

Tabla 7: Componentes requeridos para llevar a cabo la reacción.

Las condiciones necesarias para llevar a cabo las reacciones y por consiguiente la obtención de los datos, fueron programadas en el equipo LightCycler 480® de Roche (tabla 8).

	Temperatura (°C)	Tiempo
<i>Pré-incubación</i>	95	5 min
<i>Amplificación (50 ciclos)</i>	95	10 min
	60	17 segs
	72	01 segs
<i>Enfriamiento</i>	40	10 segs

Tabla 8: Condiciones utilizadas para llevar a cabo las reacciones.

Para la el análisis de expresión relativa de los genes en cuestión, se diseñaron oligonucleótidos de expresión correspondientes a cada gen, así como oligonucleótidos para los genes constitutivos que fueron utilizados como controles endógenos y por tanto contra los cuales se normalizaron los datos obtenidos. Dichos oligonucleótidos se diseñaron por medio de la herramienta bioinformática ProbeFinder© ubicada en el Assay Design Center de Roche. En la siguiente tabla se describen las características de cada uno:

Gen	Oligonucleótido	Longitud	Posición	Tm	% GC	Secuencia
<i>BMI-1</i> (112nt)	Sentido	22 nt	1048-1069	59	41	ttctttgaccagaacagattgg
	Antisentido	20 nt	1140-1159	60	50	gcatcacagtcattgctgct
<i>CD133</i> (77nt)	Sentido	24 nt	1471- 1494	59	38	tccacagaaatttacctacattgg
	Antisentido	20 nt	1528-1547	60	55	cagcagagagcagatgacca
<i>ABCG2</i> (67 nt)	Sentido	21 nt	1135-1155	60	52	tggcttagactcaagcacagc
	Antisentido	20 nt	1182-1201	60	55	tcgtccctgcttagacatcc
<i>GAPDH</i> (66nt)	Sentido	19 nt	83-101	60	58	agccacatcgctcagacac
	Antisentido	19 nt	130-148	60	53	gcccaatacgaccaaattcc
<i>HPRT</i> (102nt)	Sentido	24 nt	218-241	59	33	tgaccttgattatattgcatacc
	Antisentido	20 nt	300-319	60	35	cgagcaacgttccagtctct

Tabla 9: Características de los oligonucleótidos de expresión.

10.9.- Análisis Estadístico

Se realizó análisis de ANOVA de una sola cola, para observar diferencias entre grupos de tratamientos, sobre el análisis de viabilidad celular, considerando una diferencia significativa un valor de $p < 0.05$; así como prueba exacta de Fisher. Para observar diferencias significativas en los valores de expresión relativa del RNAm, obtenidos a partir de experimentos independientes y análisis por duplicado en placas de 96 pozos de PCR en tiempo real, se empleó la prueba estadística T-student.

11.- Resultados

11.1.-Establecimiento *in vitro* de Modelos Celulares Quimioresistentes de Cáncer Pulmonar Tipo Adenocarcinoma

Como primer objetivo fue necesario establecer modelos celulares de cáncer pulmonar que permitieran evaluar la resistencia a tratamientos farmacológicos de empleo actual en la clínica oncológica en pacientes con cáncer pulmonar. Para ello, se administraron distintas concentraciones de fármacos oncológicos (cisplatino y/o doxorubicina) sobre líneas celulares A549, A427, INER-37 e INER-51, como parte del trabajo desarrollado por nuestro grupo de investigación. A partir de curvas de resistencia concentración-respuesta se determinaron las concentraciones inhibitorias para cada modelo celular, estableciendo concentraciones para cisplatino de $8\mu\text{M}$, mientras que para doxorubicina 100nM , cuyas concentraciones permitieron evaluar la inducción de fenotipo quimioresistente, así como la obtención de muestras de calidad suficiente para su posterior análisis.

Con base en lo anterior, se realizaron ensayos farmacológicos en los diferentes modelos celulares antes mencionados, por 48h, seguido de su tripsinización para el conteo celular respectivo con azul de Tripano, mediante lo cual se obtuvo el porcentaje de cambio de células vivas con respecto al control, representando aquellas sobrevivientes al tratamiento (**Fig. 2 y 3**). Cabe mencionar que, adicional a la administración de monofármacos, se aplicaron esquemas combinados de tratamiento en forma secuencial llamados secuencial 1 “doxorubicina 100nM /cisplatino $8\mu\text{M}$ ” y secuencial 2 “cisplatino $8\mu\text{M}$ /doxorubicina 100nM ”, puesto que, el tratamiento estándar actual del cáncer pulmonar incluye la administración de esquemas de primera y segunda línea de fármacos oncológicos, empleando en primera instancia aquellos fármacos a base en cisplatino, seguido de fármacos que permiten incrementar el efecto citotóxico del primer fármaco administrado. (Grossi *et al*, 2007; Spira & Ettinger, 2004).

En la línea celular A549 se logró observar que existe susceptibilidad de las células de forma dependiente del fármaco empleado en las primeras 24h, resultando los tratamientos con cisplatino $8\mu\text{M}$ (**Fig. 2A**) los de mayor efecto adverso sobre la células con respecto al control, con una disminución de hasta 65% ($p<0.05$), mientras que, en aquellos

tratamientos con doxorubicina 100nM fue menor dicho efecto con una disminución de 37% y 54%, patrón que se asemeja en las líneas celulares A427 (**Fig. 2B**) e INER-37 (**Fig. 3A**). No obstante, la línea celular A427 presentó una mayor resistencia a los distintos tratamientos con disminución del 31%, 24%, 48% ($p<0.05$) y 40% respectivamente, resultado que no era esperado y por tanto se deba a errores metodológicos durante el conteo celular. A pesar de las variaciones observadas en el número de células, éstas no fueron significativas con respecto al control.

Por otra parte, la línea celular INER-51 (**Fig. 3B**) bajo los distintos esquemas de tratamiento, mostró los menores porcentajes de células sobrevivientes a comparación de los otros modelos celulares, siendo el monofármaco cisplatino 8 μ M, el que más redujo a la población celular hasta un 96%, indicando que el modelo celular INER-51 es el de mayor sensibilidad a los distintos esquemas de tratamiento farmacológico. Cabe destacar que los resultados graficados de dicha línea celular, son representativos de un mismo efecto observado en ensayos farmacológicos realizados por el grupo de investigación.

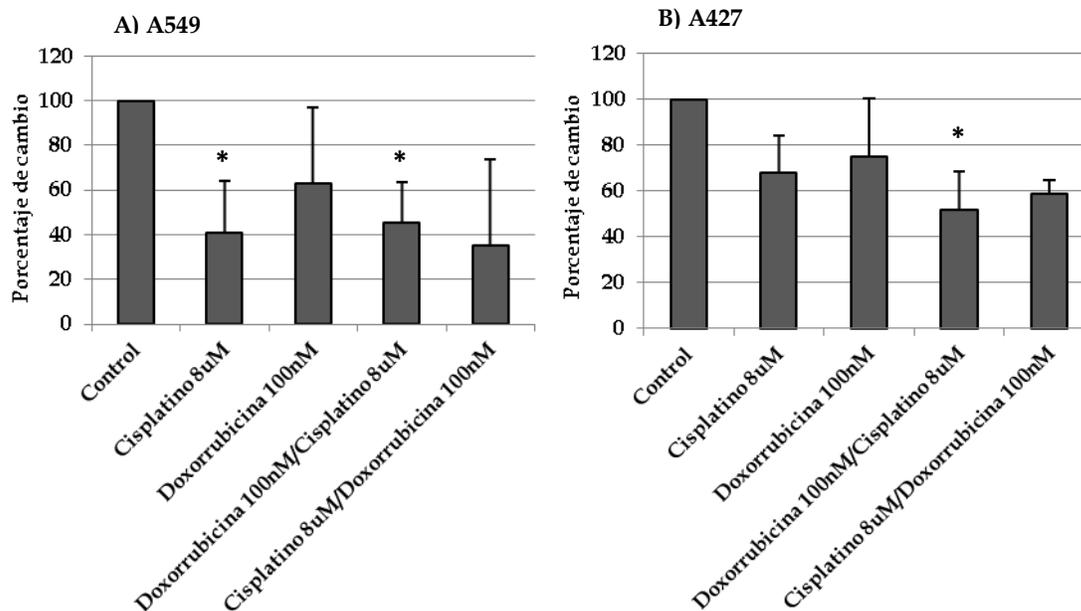


Figura 2: Porcentaje de cambio de células sobrevivientes en modelos celulares de adenocarcinoma pulmonar A) A549 y B) A427 bajo distintos esquemas de tratamiento farmacológico. Los valores fueron normalizados y comparados con relación al control. n=3 *($p<0.05$).

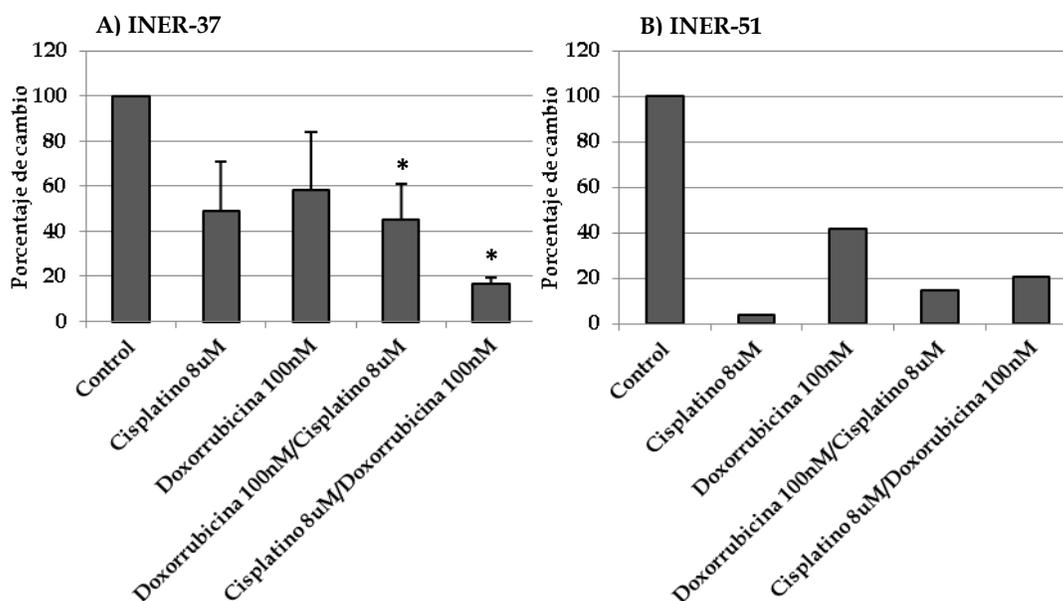


Figura 3: Porcentaje de cambio de células sobrevivientes en modelos celulares de adenocarcinoma pulmonar A) INER-37 y B) INER-51 bajo distintos esquemas de tratamiento farmacológico. Los valores fueron normalizados y comparados con relación al control. n=3. *($p < 0.05$).

11.2.- Análisis de Viabilidad Celular Mediante Ensayos de Citotoxicidad en Líneas Celulares de Cáncer de Pulmón

Con el objetivo de determinar los efectos causados sobre la viabilidad celular, frente a retos farmacológicos, se realizaron ensayos de citotoxicidad por MTS sobre las distintas líneas celulares. En donde podemos sugerir que de acuerdo a la tendencia observada entre las distintas líneas celulares, la línea A549 (Fig. 4A) es aquella que tuvo un mayor porcentaje de viabilidad en presencia de cualquier tratamiento, ya que los tratamientos solo disminuyeron de 0.5% a 6% la viabilidad, indicando que dicho modelo celular posee mayor resistencia al efecto citotóxico causado por los fármacos administrados.

Por otra parte, en los modelos celulares A427 (Fig. 4B) e INER-37 (Fig. 5A) el monofármaco cisplatino 8 μ M causó una disminución del 10% sobre la viabilidad celular, mientras que el tratamiento combinado cisplatino 8 μ M/doxorubicina 100nM causó hasta un 17%. En cambio con los tratamientos monofármaco doxorubicina 100nM y el secuencial doxorubicina 100nM/cisplatino 8 μ M, no se observaron cambios sobre la viabilidad celular.

En cuanto al modelo celular INER-51 (**Fig. 5B**) se observó alta sensibilidad a los esquemas farmacológicos monofármaco cisplatino 8 μ M y secuencial cisplatino 8 μ M/doxorubicina 100nM, que lograron disminuir la viabilidad hasta un 61%, en contraste con los tratamientos monofármaco doxorubicina 100nM que disminuyó la viabilidad celular 5% y el secuencial doxorubicina 100nM/ cisplatino 8 μ M que disminuyó hasta un 42%. Cabe destacar que, existe un patrón similar en las 4 líneas celulares, donde los tratamientos que causaron una mayor disminución en el porcentaje de viabilidad fueron el monofármaco cisplatino 8 μ M y el secuencial cisplatino 8 μ M/doxorubicina 100nM. No obstante, entre los distintos tratamientos en las 4 líneas celulares no hubo diferencia significativa, por lo que en base a esto, los tratamientos farmacológicos administrados en los modelos celulares la viabilidad no es afectada.

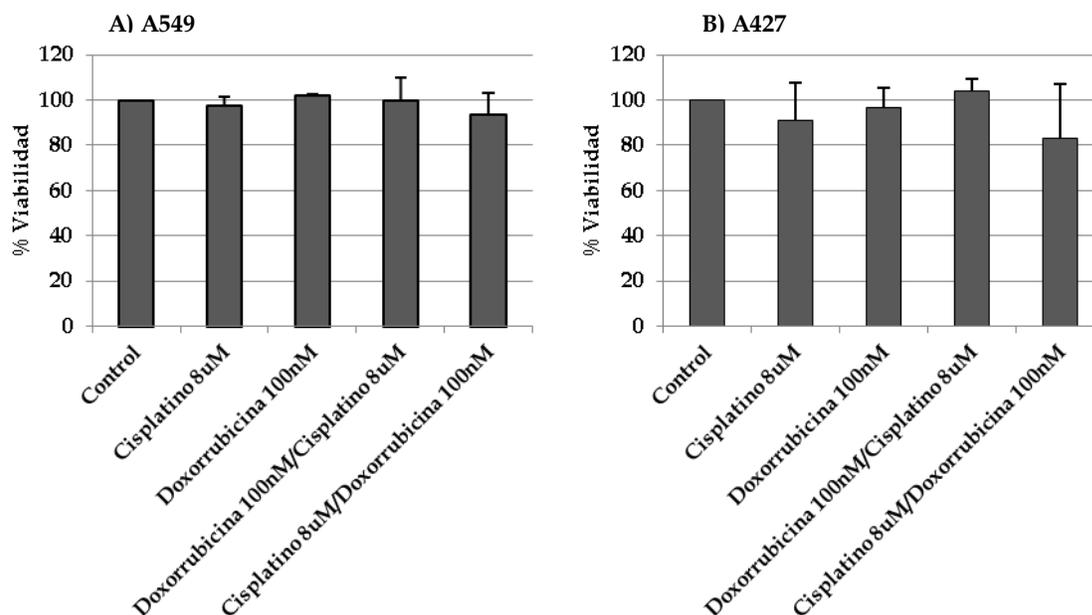


Figura 4: Ensayos de citotoxicidad por MTS indicando porcentajes de viabilidad celular en las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar A) A549 y B) A427 bajo distintos tratamientos farmacológicos; dichos valores fueron normalizados y comparados con relación al control. n=2. *($p < 0.05$)

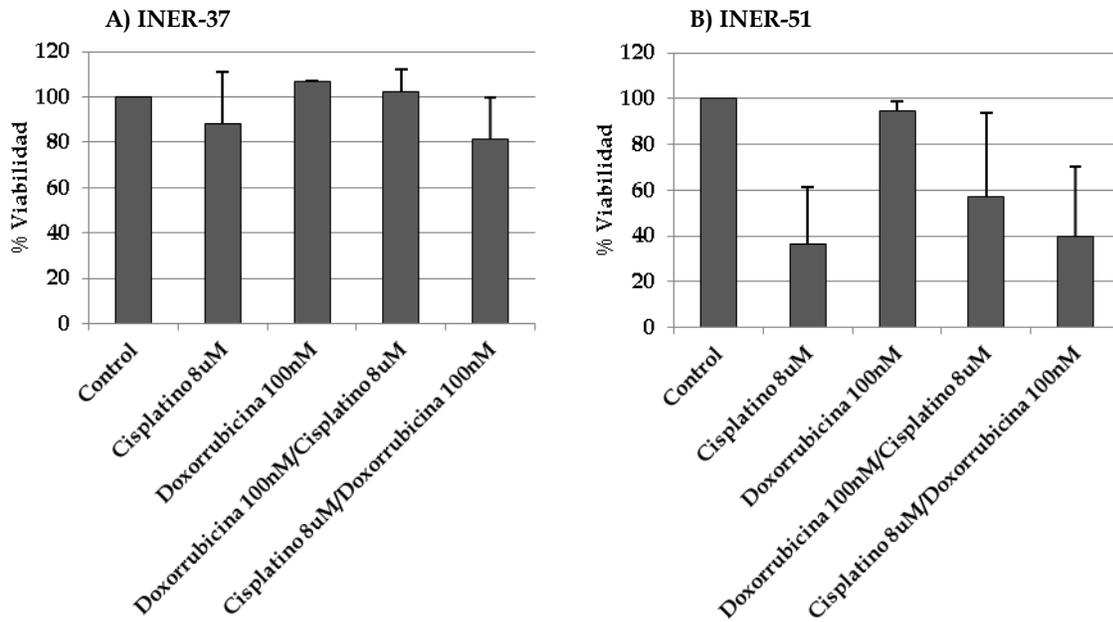


Figura 5: Ensayos de citotoxicidad por MTS, indicando porcentajes de viabilidad celular en las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar A) INER-37 y B) INER-51 bajo distintos tratamientos farmacológicos; dichos valores fueron normalizados y comparados con relación al control. n=2. *($p < 0.05$).

11.3-Análisis de la Expresión Relativa de Marcadores de Células Tipo Stem Quimioresistentes: BMI-1, ABCG2 y CD133 en Modelos Celulares de Cáncer Pulmonar, bajo Tratamiento Farmacológico

El estudio de las poblaciones celulares resistentes a esquemas de tratamientos farmacológicos sobre los diferentes modelos celulares de cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma, mediante el análisis de expresión relativa de BMI-1, ABCG2 y CD133 por q-PCR, reveló cambios cuantitativos tal como se describe a continuación.

11.3.1-Cambios en el Perfil de Expresión Relativa del Modelo Celular de Cáncer Pulmonar A549

El modelo celular A549 mostró inducción en la expresión de BMI-1, bajo la presencia de todos los tratamientos fármaco-oncológicos, siendo los tratamientos doxorubicina 100nM y la combinación cisplatino 8 μ M/doxorubicina 100nM, aquellos que presentaron una mayor inducción de la expresión genética con respecto al control (Fig. 6).

Por otra parte, la inducción de ABCG2 fue mayor en los tratamientos con cisplatino 8 μ M monofármaco ($p < 0.05$) y cisplatino 8 μ M/doxorubicina 100nM secuencial; mientras que el tratamiento con doxorubicina 100nM y doxorubicina 100nM/cisplatino 8 μ M la inducción fue menor. Así mismo se observó inducción en la expresión de CD133, bajo los tratamientos con doxorubicina 100nM y cisplatino 8 μ M/doxorubicina 100nM. Cabe destacar que la inducción de BMI-1 y CD133 fue menor en los distintos tratamientos, en contraste con la inducción de ABCG2. Ello a pesar de ausencia de cambios en la viabilidad celular bajo los diferentes tratamientos (Fig. 4A).

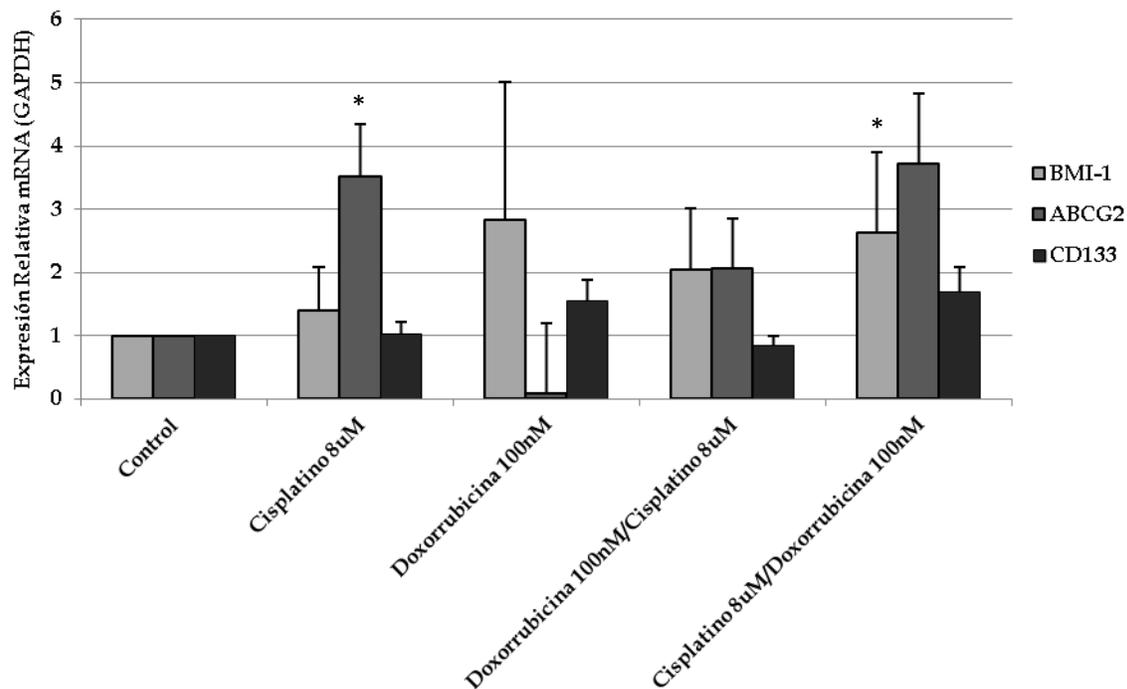


Figura 6: Expresión Relativa (mRNA) de BMI-1, ABCG2 Y CD133 en la línea celular A549, bajo distintos tratamientos farmacológicos. Valores normalizados con GAPDH. Análisis de resultados por duplicado, $*(p < 0.05)$.

11.3.2- Cambios en el Perfil de Expresión Relativa del Modelo Celular de Cáncer Pulmonar A427

En la línea celular A427 (Fig. 7) podemos observar que comparado con el control existe inducción significativa ($p < 0.05$) de la expresión de BMI-1 en todos los tratamientos farmacológicos; así como también de ABCG2 y CD133, llamando la atención que el tratamiento secuencial doxorubicina 100nM/cisplatino 8 μ M generó mayor inducción de la expresión para todos los genes: BMI-1, ABCG2 y CD133.

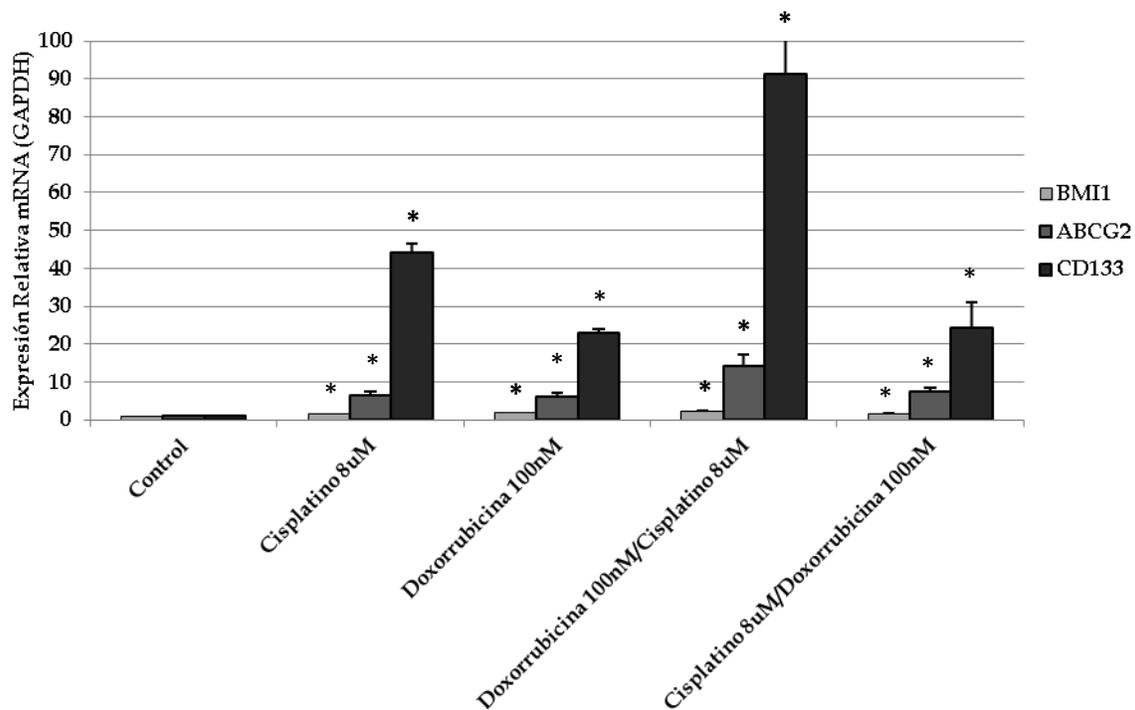


Figura 7: Expresión Relativa (mRNA) de BMI-1, ABCG2 Y CD133 en la línea celular A427, bajo distintos tratamientos farmacológicos. Valores normalizados con GAPDH. Análisis de resultados por duplicado, $(p < 0.05)$.

11.3.3.- Cambios en el Perfil de Expresión Relativa del Modelo Celular de Cáncer Pulmonar INER-37

En la línea celular INER-37 (Fig. 8) pudimos observar inducción de la expresión de BMI-1 en casi todos los tratamientos farmacológicos, siendo el tratamiento monofármaco cisplatino 8 μ M y secuencial cisplatino 8 μ M/ doxorubicina 100nM los de mayor inducción en su expresión ($p<0.05$). Por otra parte, el monofármaco doxorubicina 100 μ M fue el único capaz de inducir la expresión de ABCG2. Mientras que, la inducción de CD133 con cisplatino 8 μ M y secuencial cisplatino 8 μ M/ doxorubicina 100 μ M fueron de mayor efecto.

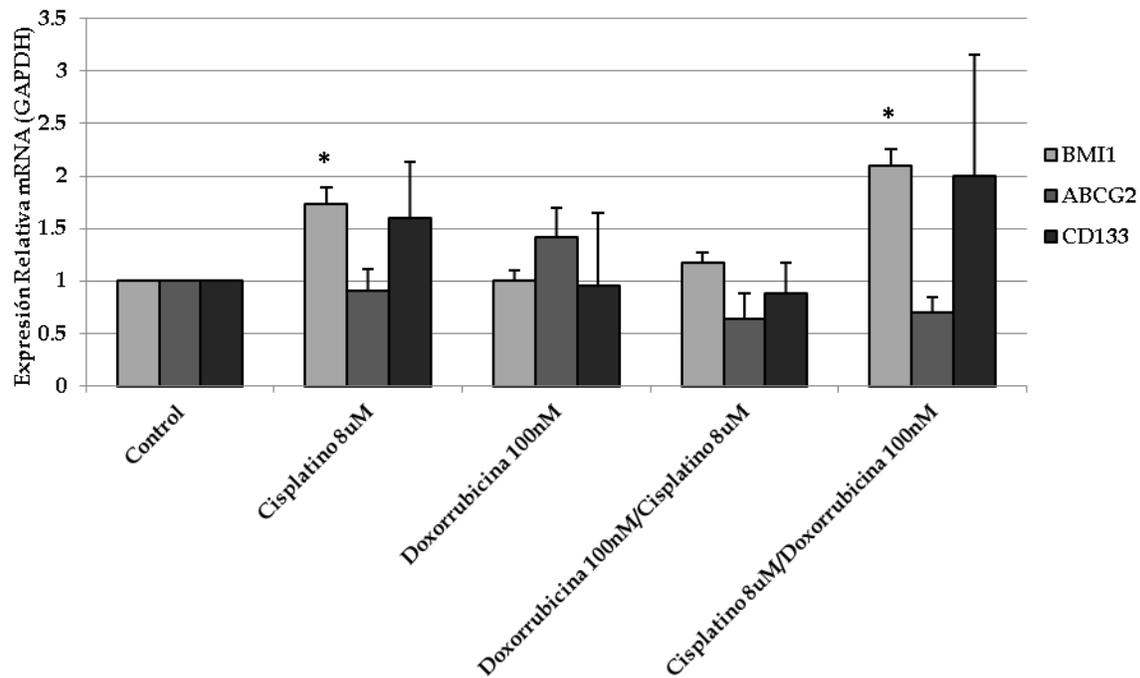


Figura 8: Expresión Relativa (mRNA) de BMI1, ABCG2 Y CD133 en la línea celular INER-37, bajo distintos tratamientos farmacológicos. Valores normalizados con GAPDH. Análisis de resultados por duplicado, * ($p<0.05$).

11.3.4-Expresión Relativa en la Línea Celular INER-51

En esta línea celular no hubo inducción de los distintos marcadores antes señalados, por lo que no se pudo obtener la representación gráfica de estos resultados. Esto concuerda con los resultados de índice de cambio y viabilidad celular, en donde dicha línea es la más sensible a los distintos tratamientos farmacológicos administrados. Por tal razón, esta línea celular no se incluyó en los siguientes ensayos.

11.4- Análisis de la Expresión Relativa de Marcadores de Células Tipo Stem Quimioresistentes: BMI-1, ABCG2 y CD133 en Modelos Celulares de Cáncer Pulmonar, bajo Tratamiento Epigenético

Para analizar los posibles mecanismos de regulación epigenética que controlan la expresión de los marcadores relacionados con la quimioresistencia, se realizó el análisis de expresión relativa de BMI-1, ABCG2 y CD133, en líneas celulares de cáncer pulmonar tipo adenocarcinoma bajo tratamiento epigenético con 5-aza (Inhibidor de DNA metiltransferasas) y TSA (Inhibidor de deacetilasas de histonas).

11.4.1-Expresión Relativa en la Línea Celular A549, bajo Tratamiento Epigenético

Como podemos observar en la línea A549 (Fig. 9) bajo los distintos tratamientos epigenéticos, existe inducción significativa ($p < 0.05$) de la expresión de BMI-1 con el tratamiento TSA, mientras que el tratamiento 5-aza causó un efecto adverso en la detección del RNAm. Por lo que, estos resultados sugieren que la regulación en la inducción de la expresión de BMI-1 se debe de forma preponderante a modificaciones histónicas.

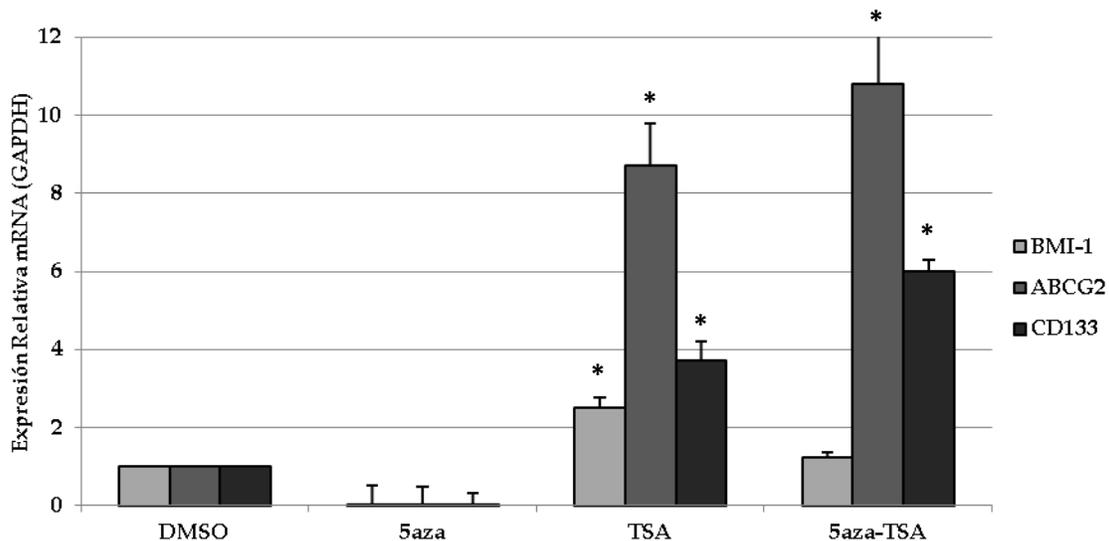


Figura 9: Expresión Relativa (mRNA) de BMI1, ABCG2 Y CD133 en la línea celular A549, bajo distintos tratamientos epigenéticos. Valores normalizados con GAPDH. Análisis de resultados por duplicado, $(p < 0.05)$.

Por otra parte, en los tratamientos TSA y 5aza-TSA (**Fig.9**) se observó una inducción significativa ($p<0.05$) en la expresión de ABCG2 y CD133, en contraste con lo obtenido bajo el tratamiento 5aza, lo cual sugiere que la inducción de su expresión se podría deberse a modificaciones histónicas.

11.4.2-Expresión Relativa en la Línea Celular A427, bajo Tratamiento Epigenético

En la línea celular A427 (**Fig. 10**) se observa que los tratamientos con 5-aza y TSA generaron inducción significativa ($p<0.05$) de la expresión de BMI-1, sugiriendo que tanto mecanismos de metilación y modificaciones covalentes de histonas estén regulando la expresión de dicho gen. Mientras que, bajo los tratamientos con TSA y 5aza-TSA se observa una tendencia de inducción de ABCG2, lo que sugiere que el posible efecto preponderante en la regulación de la expresión de éste gen, sea mediante modificaciones histónicas. Por otra parte los tratamientos 5aza y 5aza-TSA causan un efecto adverso en la expresión de CD133.

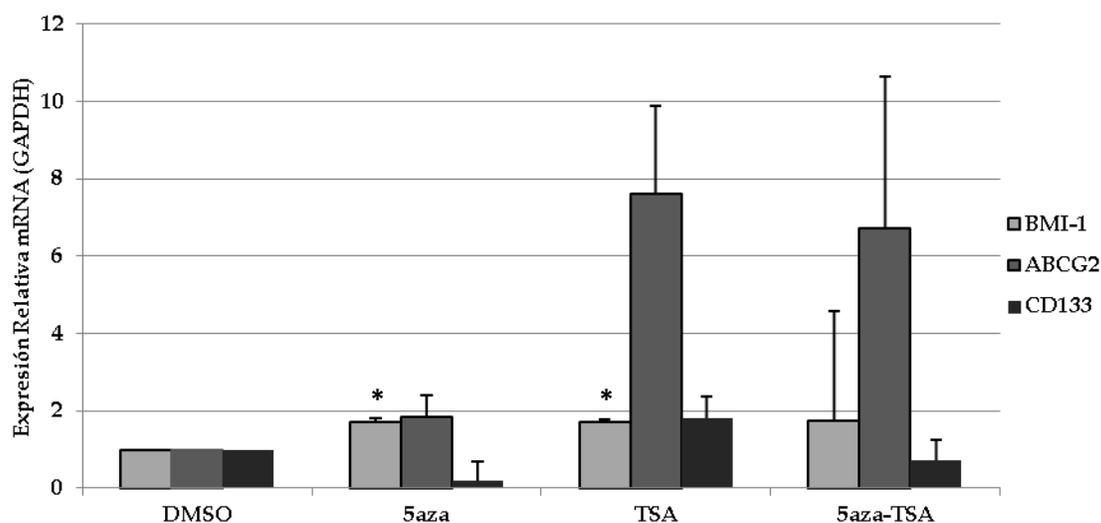


Figura 10: Expresión Relativa (mRNA) de BMI1, ABCG2 Y CD133 en la línea celular A427, bajo distintos tratamientos epigenéticos. Valores normalizados con GAPDH. Análisis de resultados por duplicado, *($p<0.05$).

11.4.3-Expresión Relativa en la Línea Celular INER-37, bajo Tratamiento Epigenético

En la línea celular INER-37 (Fig. 11) a pesar de que bajo ningún tratamiento epigenético se induce significativamente la expresión de BMI-1, se observa que tiende a aumentar bajo el tratamiento con 5-aza, sugiriendo que su regulación podría deberse a modificaciones a nivel metilación del DNA en esta línea celular. Por otra parte, la inducción de ABCG2 y CD133 fue significativa ($p<0.05$) bajo los tratamientos con TSA y su combinación 5-aza/TSA, indicando que las modificaciones histónicas podrían tener un mayor peso en la inducción transcripcional de estos genes.

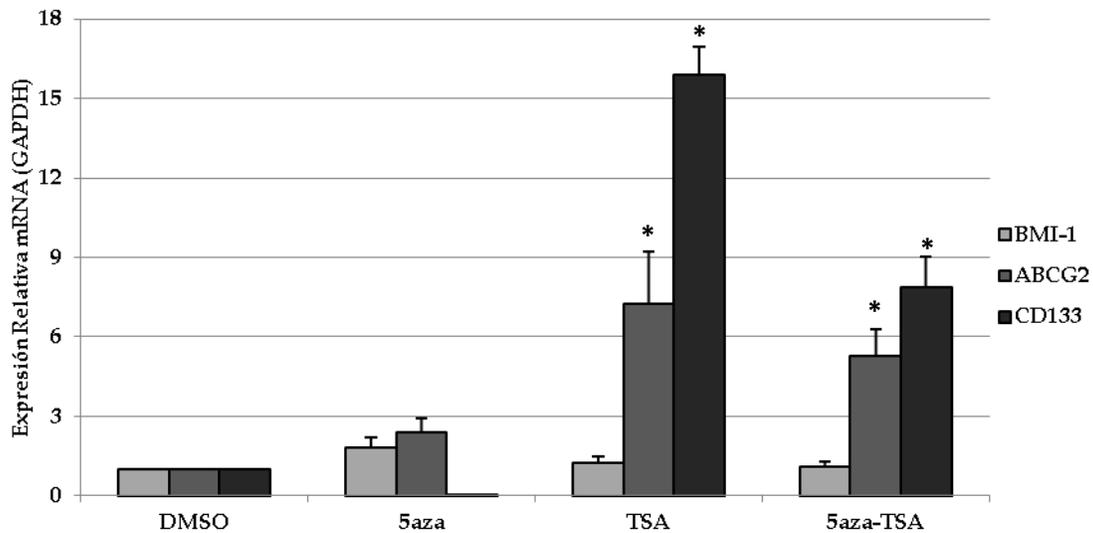


Figura 11: Expresión Relativa (mRNA) de BMI1, ABCG2 Y CD133 en la línea celular INER-37, bajo distintos tratamientos epigenéticos. Valores normalizados con GAPDH. Análisis de resultados por duplicado, $(p<0.05)$.

11.5.- Inhibición de BMI-1 en Líneas Celulares de Cáncer de Pulmón, bajo Tratamientos Farmacológicos y Epigenéticos

Con la finalidad de validar la participación de BMI-1 en la quimioresistencia del cáncer pulmonar, se inhibió la expresión BMI-1 mediante el silenciamiento genético por siRNAs específicos para éste gen. Sobre ello, se llevó a cabo el análisis de viabilidad celular, mediante ensayos de citotoxicidad celular en líneas celulares de cáncer de pulmón de mayor quimioresistencia intrínseca, frente a los diferentes esquemas farmacológicos, seleccionando aquellas de origen caucásico (A549) y origen mestizo mexicano (INER-37).

11.5.1.-Expresión Relativa en la Línea Celular A549 e INER-37 Posterior a la Inhibición de BMI-1 Mediante siRNA Específico para éste.

Inicialmente, para corroborar que la inhibición de BMI-1 se esté llevando a cabo en los modelos celulares seleccionados, se realizó el análisis de expresión del RNAm. En la figura 12, se observa que posterior a la inhibición de BMI-1 mediante el siRNA específico, en líneas celulares A549 (A y B) e INER-37 (C y D), se redujo la expresión de manera significativa ($p < 0.05$) de BMI-1, así como de los marcadores de asociados a CSCs quimioresistentes, previamente mencionados. Cabe mencionar que debido a que el gen HPRT presentaba una mayor estabilidad en su expresión dentro de estos ensayos de inhibición, los valores fueron normalizados con ambos genes endógenos.

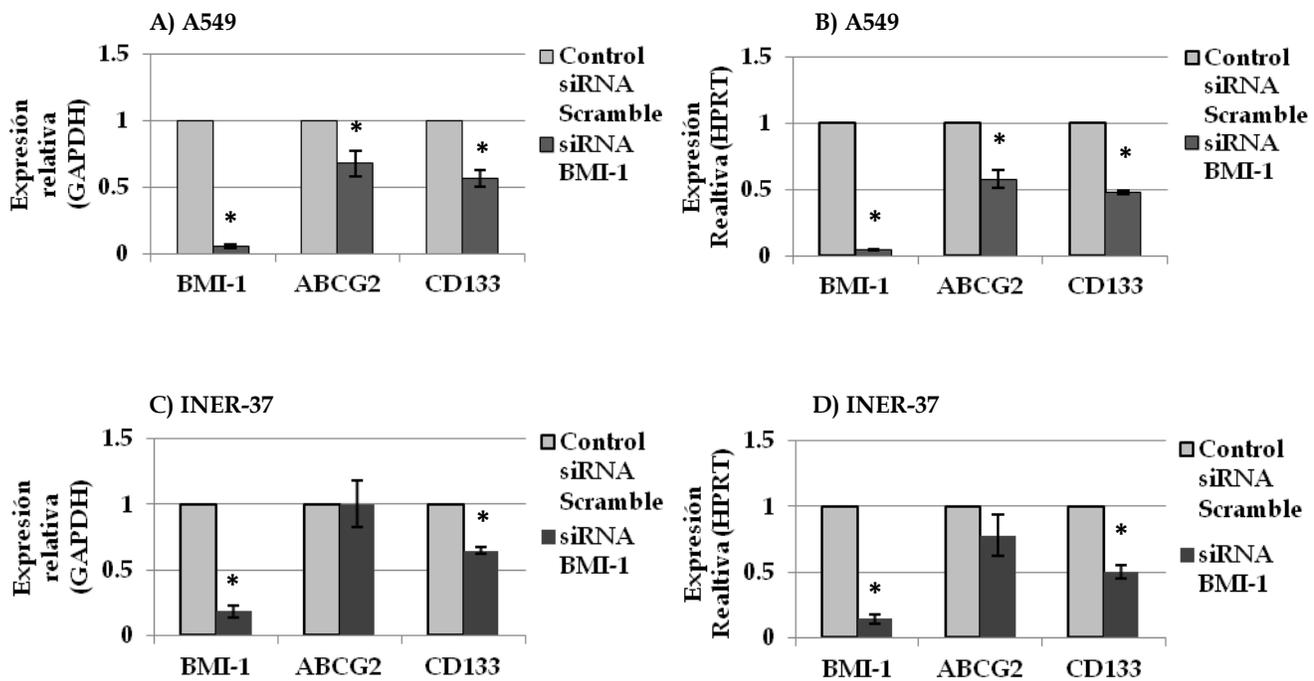
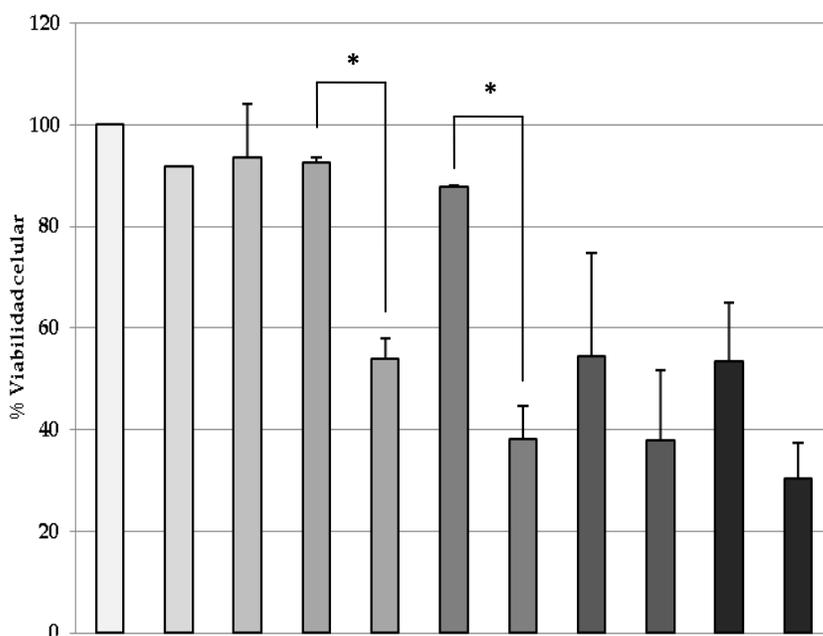


Figura 12: Expresión Relativa (mRNA) de BMI1, ABCG2 Y CD133 en las líneas celulares A-B) A549 y C-D) INER-37, posterior a la inhibición de BMI-1. Valores normalizados sobre los genes endógenos GAPDH y HPRT. Análisis de resultados por triplicado, $*(p < 0.05)$.

11.5.2.- Inhibición de BMI-1 en la Línea Celular A549

En el análisis sobre la línea celular A549 (Fig. 12) se observó que la inhibición de BMI-1, no redujo la viabilidad celular, mientras que, la administración del monofármaco cisplatino 8 μ M solo redujo la viabilidad un 7.5%, no obstante al combinar este fármaco y la inhibición de BMI-1 la viabilidad disminuyó significativamente ($p<0.05$) hasta 37.7%. En combinación al cisplatino 8 μ M se administraron los tratamientos 5-aza, TSA y 5-aza/TSA, que lograron reducir la viabilidad celular 12%, 45.5% y 46.5% respectivamente y que en conjunto con la inhibición de BMI-1, disminuyó hasta 53.7% ($p<0.05$), 53.8% y 61%.



Control (-) Medio de Cultivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control (-) siRNA Scramble)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Control (+) siRNA BMI-1	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Cisplatino 8 μ M	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
5-aza 4 μ M	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
TSA 300nM	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Figura 12: Porcentaje de Viabilidad Celular. Análisis de la inhibición de BMI-1 en la línea celular A549 bajo tratamiento con cisplatino e inhibidores epigenéticos. Valores normalizados. * Indica cambios significativos ($p<0.05$) en la viabilidad celular, posterior al silenciamiento de BMI-1; n=2.

Por otra parte, el tratamiento con el monofármaco doxorubicina 100nM (Fig. 13) comparado con su control respectivo, redujo la viabilidad 15% que al combinarlo con la inhibición de BMI-1 disminuyó hasta 22%, esto sin que sea estadísticamente significativo.

Al combinar doxorubicina 100nM con los tratamientos 5-aza, TSA y 5-aza/TSA la viabilidad disminuyó en un 12.9%, 23.7% y 17.5% respectivamente, y al combinarse con la inhibición de BMI-1 disminuyeron 15.6%, 60% y 52% significativamente ($p<0.05$) en los últimos dos.

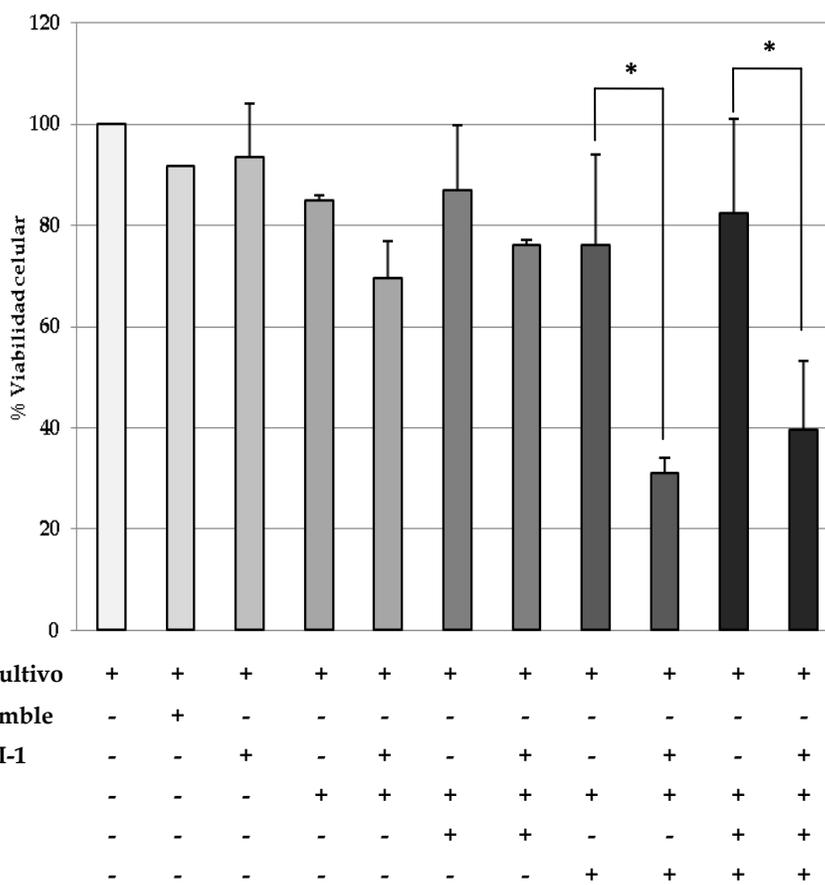
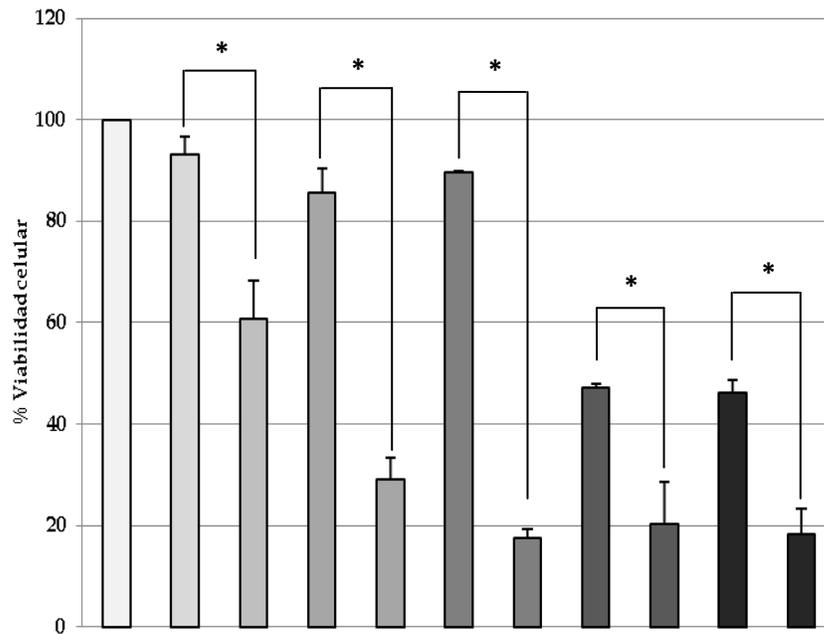


Figura 13: Porcentaje de Viabilidad Celular. Análisis de la inhibición de BMI-1 en la línea celular A549 bajo tratamiento con doxorubicina e inhibidores epigenéticos. Valores normalizados. * Indica cambios significativos ($p<0.05$) en la viabilidad celular, posterior al silenciamiento de BMI-1; n=2.

Los resultados obtenidos sugieren que el silenciamiento de BMI-1 aumenta la sensibilidad de las células neoplásicas a fármacos oncológicos, cuyo efecto citotóxico mayor fue observado en dicho modelo celular de cáncer pulmonar frente a cisplatino, mientras que con doxorubicina se observó un efecto mayor solo en combinación de inhibición epigenética al administrar TSA y 5-aza/TSA.

11.5.3.- Inhibición de BMI-1 en la Línea Celular INER-37

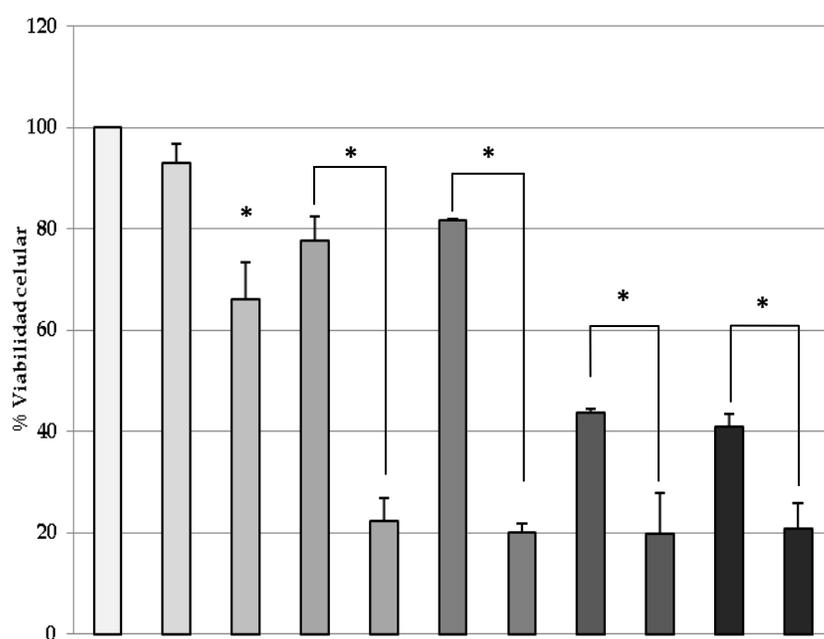
En la línea INER-37 (Fig. 14) se observa que la inhibición de BMI-1 comparado con su respectivo control, disminuyó significativamente ($p<0.05$) la viabilidad celular hasta un 32%, mientras que el monofármaco cisplatino $8\mu\text{M}$ solo redujo la viabilidad 14.4%; no obstante la combinación del fármaco y la inhibición de BMI-1 logró reducirla significativamente ($p<0.05$) hasta un 64%. Por otra parte, la combinación de cisplatino $8\mu\text{M}$ y los tratamientos epigenéticos 5-aza, TSA y 5-aza/TSA la viabilidad disminuyó significativamente ($p<0.05$) 10.3%, 52.8% y 53.8% respectivamente, que al ser combinados con la inhibición de BMI-1, el efecto citotóxico fue mayor puesto que redujo significativamente ($p<0.05$) hasta un 75.4%, 72.6%, y 74.71%.



Control (-) Medio de Cultivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control (-) siRNA Scramble)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Control (+) siRNA BMI-1	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Cisplatino $8\mu\text{M}$	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
5-aza $4\mu\text{M}$	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
TSA 300nM	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Figura 14: Porcentaje de Viabilidad Celular. Análisis de la inhibición de BMI-1 en la línea celular INER-37 bajo tratamiento con cisplatino e inhibidores epigenéticos. Valores normalizados. * Indica cambios significativos ($p<0.05$) en la viabilidad celular, posterior al silenciamiento de BMI-1; n=2.

Con respecto a la inhibición de BMI-1 y el tratamiento monofármaco doxorrubicina 100nM (Fig. 15), se observa que este último logra reducir la viabilidad hasta un 22% y que en combinación con la inhibición de BMI-1, ésta disminuyó significativamente ($p<0.05$) hasta 70.7%. Al respecto, la combinación de doxorrubicina 100nM y tratamientos epigenéticos 5-aza, TSA y 5-aza/TSA generaron un efecto considerable ($p<0.05$) sobre la viabilidad, disminuyendo hasta un 18.3%, 56.3% y 59.1% respectivamente, que en conjunto con el silenciamiento de BMI-1, el efecto generado fue mayor, logrando reducir la viabilidad significativamente ($p<0.05$) hasta un 72.9%, 73.2% y 72.3%.



Control (-) Medio de Cultivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control (-) siRNA Scramble)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Control (+) siRNA BMI-1	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Doxorrubicina 100nM	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
5-aza 4μM	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
TSA 300nM	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Figura 15: Porcentaje de Viabilidad Celular. Análisis de la inhibición de BMI-1 en la línea celular INER-37 bajo tratamiento con doxorrubicina e inhibidores epigenéticos. Valores normalizados. * Indica cambios significativos ($p<0.05$) en la viabilidad celular, posterior al silenciamiento de BMI-1; n=2.

12.- Discusión de Resultados

12.1.-Quimioresistencia en Modelos Celulares *in vitro* de Carcinomas Pulmonares Tipo Adenocarcinoma

La resistencia a fármacos oncológicos por parte de células neoplásicas, resulta en la causa del fracaso al tratamiento basado en quimioterapia en pacientes con NSCLC, dicho fenómeno resulta ampliamente común en diversos estudios (Chen *et al*, 2010; D'amato *et al*, 2006). Aunado a esto, se ha descrito multi-drogo resistencia, entre ellos a cisplatino y doxorubicina (Chang, 2011; D'Amato 2006). Al respecto en el presente trabajo, se logró evidenciar mediante ensayos de citotoxicidad (**Fig. 4 y 5**) que modelos celulares como A549, A427, INER-37 e INER-51, poseen diferentes niveles de quimioresistencia, donde A549 posee la mayor resistencia, como ha sido previamente reportado (Chen *et al*, 2010; Sung *et al*, 2008).

12.2.- Inducción en la Expresión de Fenotipo Quimioresistente en Líneas Celulares de Carcinomas Pulmonares Tipo Adenocarcinoma, Mediante Tratamiento Farmacológico y Epigenético

La sobreexpresión del miembro del grupo Polycomb BMI-1 se encuentra asociado al cáncer pulmonar, así como al fracaso en la quimioterapia (Vrzalikova *et al*, 2008) y causa importante del fracaso al tratamiento en pacientes del grupo NSCLC (Scagliotti *et al*, 1999) siendo el principal obstáculo para el éxito del tratamiento contra esta enfermedad (Shanker *et al*, 2010). A su vez, se han considerado diversos factores involucrados en la quimioresistencia, por ejemplo, la disminución en la absorción de fármacos que requieren transportadores de ingreso a la célula, alteraciones en genes reguladores del ciclo celular y disminución de la apoptosis (Roberti *et al*, 2006); así como la adquisición de un fenotipo de CSCs (Ho *et al*, 2007). Así mismo, factores como el daño al DNA provocado por agentes quimioterapéuticos a base de platino y su respectivo mecanismo de reparación como la reparación por escisión de nucleótidos (NER) también ha sido asociado a quimioresistencia en cáncer pulmonar (Sève & Dumontent, 2005; Chang, 2011), cuyo mecanismo de reparación se encuentra acoplado al mecanismo de la transcripción (Dinant *et al*, 2008).

Al respecto, dado que la replicación y transcripción requieren de modificaciones en la estructura de la cromatina con el fin de permitir el reclutamiento y unión de los factores implicados en dichos procesos, evidencias señalan que dichas modificaciones se requieren durante mecanismos de reparación del DNA, donde ocurren también modificaciones epigenéticas a nivel del DNA e histonas, capaces de influir en la estructura (laxa) de la cromatina, y permitiendo mayor accesibilidad hacia el DNA de factores de transcripción y maquinaria de reparación en paralelo (Dinant *et al*, 2008). Lo cual, sugiere la capacidad de inducción de la sobre-expresión de genes relacionados a quimioresistencia transcripcionalmente activos en poblaciones celulares como CSCs del cáncer pulmonar, probablemente enriquecidas posterior a la administración de esquemas farmacológicos por cisplatino y doxorrubicina en correlación con la inducción del RNAm de BMI-1, así como ABCG2 y CD133 (Fig.6, 7 y 8). Modelos *in vitro* e *in vivo* de AD pulmonares, han reportado que la quimioresistencia a cisplatino induce la expresión de ABCG2 y CD133 (Bertolini *et al*, 2009). Mientras que BMI-1 se requiere para la ubiquitinación de la histona H2A en la lisina 119 en la reparación de ruptura de doble cadena del DNA (Ginjala *et al*, 2011). Además Chekhum y colaboradores han reportado que en modelos celulares *in vitro* de cáncer de mama frente tratamientos con doxorrubicina y cisplatino, existe un cambio global a nivel metilación de DNA (hipometilación) y cambios en los patrones del código histónico tales como: disminución de la Histona H4K20me3, y aumento en la fosforilación de la histona H3S10 (Chekhum *et al*, 2007).

Con relación al uso de inhibidores epigenéticos como 5-aza y TSA (Fig. 9, 10 y 11), los datos sugieren que la inducción de BMI-1 puede deberse a modificaciones histónicas, teniendo en cuenta que el único reporte de estas modificaciones epigenéticas en BMI-1 señala que en un modelo de células mieloides 32D, ocurre un aumento en marcas de activación transcripcional H3K4me3 y H3K79me durante la transcripción de BMI-1 mediada por SALL4 (Yang *et al*, 2007). Debido a ello, resulta importante profundizar sobre las modificaciones histónicas involucradas en el control epigenético de la transcripción de BMI-1.

En cuanto a ABCG2, con base en los resultados tras el tratamiento con los distintos inhibidores epigenéticos, se sugiere que la inducción de su expresión ocurre mediante modificaciones histónicas, contrario a lo reportado en líneas celulares de leucemia linfoblástica y cáncer ovárico, donde su tratamiento con agentes fármaco-oncológicos - sulfasalazina y topotecan- ocurre desmetilación del promotor de ABCG2, resultando en la re-expresión de ABCG2, así mismo posterior a su tratamiento con 5-aza (Bram *et al*,2009).

Por otra parte, en base a los resultados, la regulación de la expresión de CD133, puede deberse principalmente a modificaciones histónicas, lo que, en parte concuerda con lo reportado en cáncer ovárico donde posterior al tratamiento con Decitabina y TSA, observan un cambio en los niveles del transcrito en células CD133-, así como en células CD133+, donde a su vez los niveles de expresión se relacionan con metilación parcial o completa de su promotor (Baba, 2009).

Con base en ello, se sugiere que la inducción de BMI-1, ABCG2 y CD133 en líneas celulares de AD pulmonar, puede atribuirse a modificaciones epigenéticas como consecuencia de mecanismos de reparación de daño al DNA, causado por tratamientos farmacológico-oncológicos, no obstante es necesario un análisis más detallado de estos cambios epigenéticos sobre los genes en cuestión en modelos celulares del cáncer pulmonar.

12.3.- El Silenciamiento de BMI-1 Aumenta la Sensibilidad Celular en Modelos *in vitro* de Carcinomas Pulmonares bajo Tratamientos Farmacológicos

Como previamente se ha mencionado, BMI-1 se encuentra sobre-expresado en cáncer pulmonar, a su vez relacionado al fracaso en el tratamiento terapéutico de esta enfermedad. Al respecto, en el presente estudio se validó la participación de BMI-1 en quimioresistencia en AD pulmonares *in vitro*, mediante el silenciamiento genético por siRNAs para el gen BMI-1. Los resultados (**Fig. 12-15**) señalan que posterior al silenciamiento, el porcentaje de viabilidad celular mostró mínimos cambios en células libres de tratamiento antineoplásico, sugiriendo que dichas células tras la inhibición de BMI-1 podrían presentar arresto del ciclo celular, evitando la apoptosis (**Fig. 16A**), posiblemente de acuerdo con lo reportado por Yu y colaboradores en 2007, donde observan acumulación de células en fase G₀/G₁ en línea celular A549 tras la inhibición de

BMI-1. Así como, Dovey y colaboradores en el 2008, quienes reportan que modelos murinos knock-out para BMI-1, no poseen diferencias significativas en apoptosis entre murinos K-ras^{LA2} WT y K-ras^{LA2}BMI-1^{-/-}, mientras que, existe disminución en la capacidad de proliferación celular en murinos K-ras^{LA2} BMI-1^{-/-} principalmente a través de p19^{ARF}.

Aunado a esto, en los modelos celulares aquí utilizados, los resultados frente al tratamiento por cisplatino (**Fig. 12 y 14**) ó doxorubicina (**Fig. 13 y 15**) tras la inhibición de BMI-1, la sensibilidad celular aumentó de manera importante, lo cual sugiere que se requiere un daño considerable al DNA para inducir el mecanismo de muerte por apoptosis (Wang *et al*, 2011) y por tanto la disminución en la viabilidad celular observada en las distintas líneas celulares tipo AD como consecuencia de dicho mecanismo; ya que BMI-1, como previamente se ha mencionado, se encuentra encargado de inhibir el locus INK4a,4b/ARF principalmente a p19^{ARF} en cáncer de pulmón (Dovey *et al*, 2008), el cual mediante la inhibición de MDM2 permite aumento en la concentración de p53, conduciendo a la muerte celular por apoptosis posterior al daño del DNA (Jacobbs *et al*, 1999b). Por tanto, la administración de dichos fármacos oncológicos e inhibición de BMI-1, actuaron de manera sinérgica (**Fig. 16B**), en congruencia con lo observado en modelos celulares de cáncer ovárico y de mama (Wang *et al* 2011; Wu *et al* 2011).

Así mismo, el reclutamiento de BMI-1 contribuye a la eficiencia en la reparación de rupturas de doble cadena del DNA, sugiriendo que BMI-1 y proteínas asociadas al grupo Polycomb pueden estar ligados a cambios estructurales de la cromatina, involucrados con respuesta al daño del DNA mediante la represión transcripcional cerca del sitio de daño al DNA (Ginjala, 2011). De manera que al inhibir BMI-1 en líneas celulares tipo AD pulmonar, se sugiere que la eficacia de reparación del daño al DNA podría disminuir, aumentando la sensibilidad de daño al DNA causado por cisplatino principalmente (**Fig. 12**), provocando aumento de la muerte celular por apoptosis.

Por otra parte, en la línea celular A549 el efecto causado por combinación de doxorubicina e inhibición de BMI-1, no fue sinérgico en contraste con lo observado con cisplatino, sugiriendo mayor eficacia del efecto citotóxico por cisplatino en distintos tipos

de cáncer (Florea & Büsselberg, 2011; Basu & Krishnamurthy, 2010), entre ellos el cáncer pulmonar (Chang *et al*, 2011); sin embargo, el de mayor citotoxicidad para el paciente oncológico.

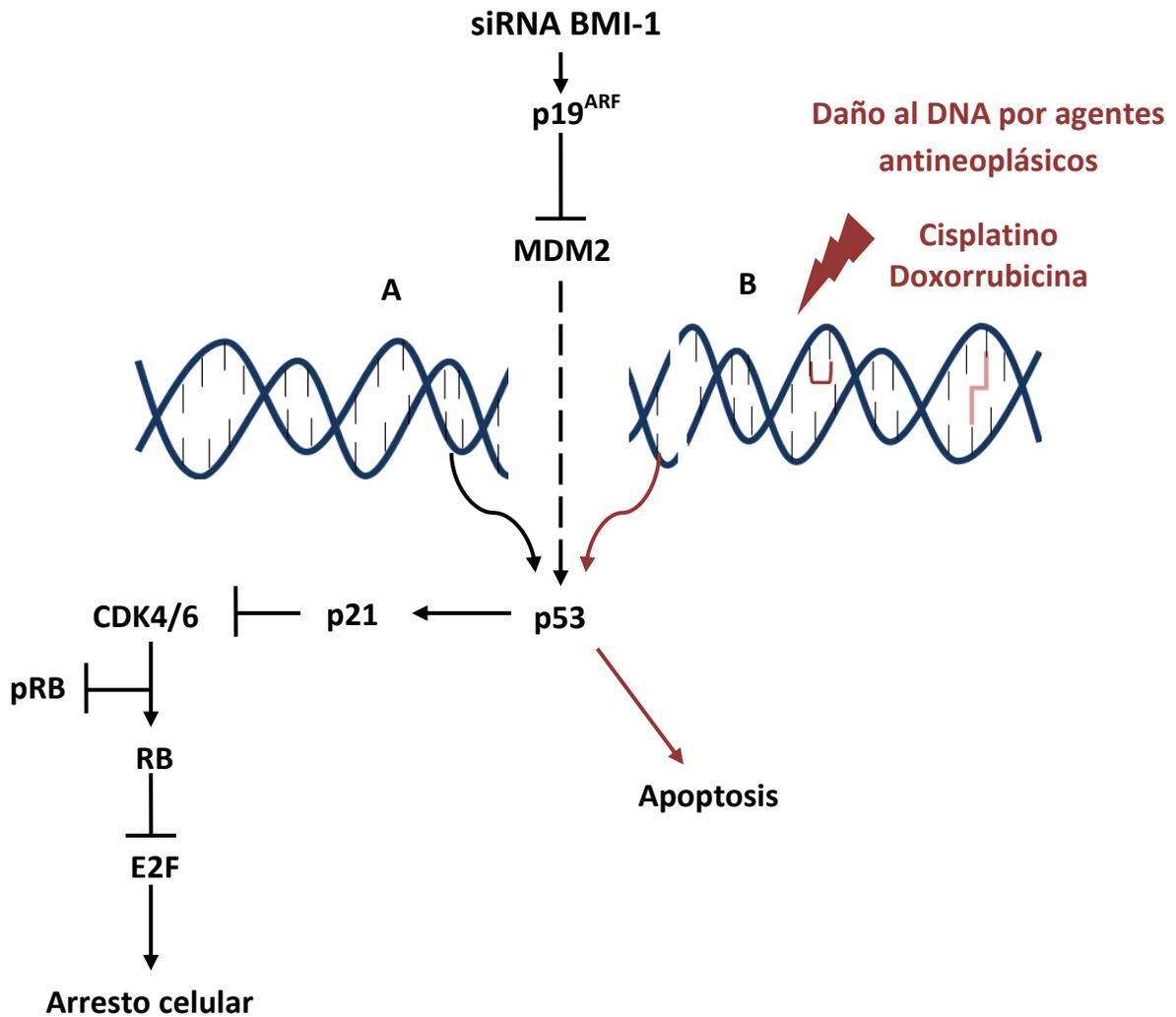


Figura 16: Posibles formas de inducción del arresto celular y apoptosis mediante la inhibición de BMI-1. Tras la inhibición de BMI-1, p19^{ARF} inhibe MDM2, evitando así la degradación de p53, lo que produce el aumento en la concentración de p53 en las células A) la cual estimula la transcripción de p21, que codifica para una proteína inhibidora de Cdk. Al inhibir CDK4/6, no se permite la fosforilación de RB y por tanto mediante la interacción con E2F, bloquea la transcripción de los genes de la fase S, provocando arresto celular. B) Para que se induzca una muerte celular por apoptosis se necesita causar daño al DNA considerable por parte de los fármacos oncológicos.

12.4.- El Silenciamiento de BMI-1, la Combinación de Tratamientos Farmacológicos vs Inhibidores Epigenéticos Aumenta la Sensibilidad Celular en Modelos *in vitro* de Carcinomas Pulmonares

Diversos fármacos contra el cáncer tienen como blanco el DNA o enzimas que actúan sobre el DNA y dado que la cromatina se puede encontrar fuertemente compactada, la accesibilidad del fármaco a su blanco puede reducir la eficiencia de estos fármacos oncológicos (Kim *et al*, 2003). Actualmente los fármacos que se dirigen a procesos enzimáticos específicos implicados en la regulación epigenética están surgiendo como métodos eficaces para el tratamiento y prevención de algunos tipos de cáncer. En este sentido, el uso de inhibidores epigenéticos como desmetilantes e inhibidores de desacetilasas de histonas, 5-aza y TSA respectivamente, en combinación con los fármacos cisplatino y doxorubicina aumenta en mayor o menor medida el efecto citotóxico de estos (Diyabalanage *et al*, 2013; Kim *et al*, 2003), tal como podemos observar en los resultados obtenidos en las líneas celulares A549 e INER-37 (**Fig. 12-15**). Al respecto se han reportado distintos mecanismos por los cuales, el uso de inhibidores epigenéticos pueden aumentar la sensibilidad de las células neoplásicas a los fármacos oncológicos, entre los cuales se encuentran la alteración de la estructura de la cromatina que permite el relajamiento de la cromatina, por tanto mayor accesibilidad del fármaco e inducción de la expresión de genes que controlan el ciclo celular y proteínas asociadas a la inducción de apoptosis, tales como p53, p21, citrocromo C, y caspasa-3 (Zhu *et al*, 2004; Carey & Thangue, 2006; Yoon *et al*, 2011; Diyalalanage *et al*, 2013).

No obstante, en el caso de inhibidores de metilación, se ha reportado que puede provocar la inducción en la expresión del fenotipo tipo-stem quimioresistente (Bram *et al*, 2009; Baba *et al*, 2009), lo cual sugiere que, la moderada disminución de la viabilidad celular en A549 e INER-37 bajo los tratamientos con cisplatino ó doxorubicina en combinación con 5aza 12% y 15.6% respectivamente se deba a dicho efecto (**Fig. 12-15**). Esto en contraste con los resultados obtenidos bajo la combinación cisplatino-5aza-siRNA de BMI-1 en A549, donde la disminución en la viabilidad es de hasta 53.7% (**Fig. 12**), en comparación con lo obtenido con doxorubicina (**Fig. 13**), lo cual se podría atribuir, como se ha comentado previamente, a la efectividad de cisplatino para causar daño al DNA es mayor a

comparación con doxorrubicina, aunado a la reducción en la eficiencia de reparación del DNA y la inducción de mecanismos de apoptosis a través p19^{ARF}, dado por la inhibición de BMI-1.

Por otra parte, la disminución de la viabilidad celular observada en las distintas líneas celulares posterior a la administración de TSA (**Fig. 12-15**), se puede deber al aumento en la accesibilidad a la cromatina causada por la inhibición de HDACs y por tanto un incremento en la cantidad de lesiones al DNA (Lutter *et al*, 1992); y/o debido a la inducción de apoptosis, toda vez que se ha reportado que A549 bajo tratamiento por TSA en conjunto con radiación gamma aumenta la expresión de p21, a su vez responsable del arresto del ciclo celular, así como de aumentar la actividad de la enzima proapoptótica caspasa-3 y citocromo-C (Zhang *et al*, 2009). De esta forma los resultados obtenidos, al combinar TSA, cisplatino ó doxorrubicina y la inhibición de BMI-1, nos sugieren un posible mecanismo sinérgico capaz de elevar la sensibilización de células quimioresistentes del cáncer pulmonar, a través de la participación de genes maestros controladores del ciclo celular como p53 y p21 de forma dependiente e independiente de la regulación del locus INK4/ARF por BMI-1.

13.- Conclusiones

1. Las líneas celulares A549 y A427 poseen mayor quimioresistencia, mientras que aquellas establecidas de pacientes mestizo-mexicano INER-51 e INER-37, poseen mayor sensibilidad al tratamiento oncológico.
2. Posterior al tratamiento farmacológico por cisplatino y doxorubicina se generó inducción en la expresión del fenotipo stem quimioresistente en 3 modelos celulares de cáncer pulmonar, A549, A427 e INER-37.
3. La sensibilidad a fármacos oncológicos en el modelo celular INER-51, se puede relacionar con falta de inducción (RNAm) del fenotipo stem quimioresistente representado en BMI-1, ABCG2 y CD133.
4. Los resultados sugieren que la inducción de BMI-1 en el modelo celular de cáncer pulmonar A549 e INER-37, bajo tratamiento por cisplatino $8\mu\text{M}$ y tratamiento secuencial cisplatino $8\mu\text{M}$ /doxorubicina 100nM , se deben posiblemente a mecanismos de re-programación epigenética por metilación.
5. El silenciamiento de BMI-1 en línea celular A549 generó sensibilidad al tratamiento por cisplatino, mientras que en INER-37, fue tanto al cisplatino como a doxorubicina, lo cual demuestra su importancia en la quimioresistencia de tumores pulmonares tipo AD, apoyando nuestra hipótesis como probable estrategia de sensibilidad al tratamiento por quimioterapia en pacientes con AD pulmonares de origen mestizo mexicano.

14.- Perspectivas

- Profundizar sobre el análisis del fenotipo stem quimiorresistente inducible en modelos de cáncer pulmonar *in vitro* e *in vivo*, tomando como argumento fundamental la re-programación epigenética, resultando obligado su estudio inmediato sobre el papel de BMI-1 a nivel biomédico.
- Realizar el análisis de los mecanismos de reparación del DNA e inducción de apoptosis a través de p53 involucrados en la quimiorresistencia a través del control de la expresión de BMI-1, frente a esquemas de tratamiento fármaco-oncológico.
- Llevar a cabo el análisis de correlación de la participación de BMI-1 en la progresión y pronóstico de pacientes mexicanos con cáncer pulmonar.

15.- Bibliografía

1. Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernández, A., Morrison, S.J. & Clarke, M.F. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:3983-3988
2. Arora, S., Kothandapani, A., Tillison, K., Kalman-Maltese, V., Patrick, S. M. 2010. Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. *DNA Repair*. 9:745-753
3. Baba, T., Convery, P. A., Matsumura, N., Whitaker, R. S., Kondoh, E., Perry, T., Huang, Z., Bentley, R. C., Mori, S., Fujii, S., Marks, J. R., Berchuck, A. & Murphy, S. K. 2009. Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133+ ovarian cancer cells *Oncogene*. 28:209-218
4. Bannister, A. J. & Kouzarides, T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*. 21:381-395
5. Basu, A. & Krishnamurthy, S. 2010. Cellular Responses to Cisplatin- Induced DNA Damage. *Journal of Nucleic Acids*. 2010:1-16
6. Bertram, J. S. 2001. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med*. 21(6):167-223.
7. Bhattacharyya, J. Mihara, K. Yasunaga, S. Tanaka, H. & Hoshi, M. 2009. BMI-1 expression is enhanced through transcriptional and posttranscriptional regulation during the progression of chronic myeloid leukemia. *Ann. Hematol*. 88:333-340
8. Bowman, R. V., Yang, I. A., Semmler, A. B.T. & Fong, K.M. 2006. Epigenetics of Lung Cancer. *Respirology*. 11:355-365
9. Bram, E. E., Stark, M., Raz, S. & Assaraf, Y. G. 2009. Chemotherapeutic Drug-Induced ABCG2 Promoter Demethylation as a Novel Mechanism of Acquired Multidrug Resistance. *Neoplasia*. 11(12):1359-1370

10. Cao, L., Bombard, J., Cintron, K., Sheedy, J., Weetall, M. L. & Davis, T. W. 2011. BMI1 as a novel target for drug discovery in cancer. *J Cell Biochem.* 112:2729-2741
11. Carey, N. & Thangue, N. 2006. Histone Deacetylase Inhibitors: Gathering Pace. *Current Opinion in Pharmacology.* 6:369-375
12. Cairns, B. R. 2009. The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *NATURE.* 461(10): 193-198
13. Cerecedo-Zapata C.M., Limon R. D., Gonzaga P. R., Serrano-Ramírez, R., Álvarez, M. A., Téllez, B, J. L. y Ávila-Moreno, F. 2009. Oncología clínica, genómica y epigenómica en cáncer broncogénico. Parte I. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 22(3): 217-219
14. Chang, A. 2011. Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer.* 71: 3-10
15. Chen, J., Emara, N., Solomides, C., Parekh, H., & Simpkins, H. 2010. Resistance to Platinum-Based Chemotherapy in Lung Cancer Cell Lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 66(6):1103-1111.
16. Chekhun, V. F., Lukyanova, N. Y., Kovalchuk, O., Tryndyak, V. P. & Pogribny, I. P. 2007. Epigenetic profiling of multidrug-resistant human MCF-7 breast adenocarcinoma cells reveals novel hyper- and hypomethylated targets. *Mol Cancer Ther.* 6:1089-1098
17. Chiba, T., Miyagi, S., Saraya, A., Aoki, A., Seki, A., Morita, Y., Yonemitsu, Y., Yokosuka, O., Taniguchi, H., Nakauchi, H. & Iwama, A. 2008. The polycomb gene products BMI contributes to the maintenance of tumor-initiating side population cells in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 68: 6507-6515
18. Crea, F., Danesi, R. & Farrar, W. L. 2009. Cancer stem cell epigenetics and chemoresistance. *Epigenomics.* 1(1): 63-79

19. Crea, F., Serrat, D. M. A., Hurt, E. M. , Suneetha B. Thomas, S. B., Danesi, R. & Farrar, W. L. BMI1 silencing enhances docetaxel activity and impairs antioxidant response in prostate cancer
20. Christine B. Yoo, C. B. & Jones, P. A. 2006. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 5:37-50
21. Collins, A. T. & Maitland, N. J. 2006. Prostate cancer stem cells. *Eur J Cancer*. 42: 1213-1218.
22. Collins, G. L., Haines, C., Perkel, R. & Enck, E. R. 2007. Lung Cancer: Diagnosis and Management. *American Family Physician*. 75(1):56-63
23. D'Amato, T. A., Landreneau, R. J., McKenna, R. J., Santos, R. S. & Parker, R. J. 2006. Prevalence of In Vitro Extreme Chemotherapy Resistance in Resected Nonsmall-Cell Lung Cancer. *Ann Thorac Surg*. 81:440-447
24. Dawson, M. A. & Kouzarides, T. 2012. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell*. 150:12-27
25. Delage, B. & Dashwood, H. R. 2008. Dietary Manipulation of Histone Structure and Function *Annu. Rev. Nutr.* 28:347-366
26. Diyabalanage, H. V.K., Granda, M. L. y Hooker, M. J. 2013. Combination therapy: Histone deacetylase inhibitors and platinum-based chemotherapeutics for cancer. *Cancer Letters*. 329:1-8
27. Dinant, C., Houtsmuller, A B. & Vermeulen, W. 2008. Chromatin structure and DNA damage repair. *Epigenetics & Chromatin*. 1(9):1-13
28. Donnem, T. 2009. Molecular Analysis of Angiogenic Markers as Prognostic Factors for Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). University of Troms. Institute of Clinical Medicine Department of Oncology. A dissertation for the degree of Philosophiae Doctor (PhD). 53p

29. Dovey, S. J., Zacharek, J. S., Kim, F. C. & Lees, A. J. 2008. Bmi1 is critical for lung tumorigenesis and bronchioalveolar stem cell expansion. *PNAS*. 105(33):11857-11862.
30. Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Piloizzi, E., & Biffoni, M. 2008. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*. 15:504-514.
31. Esteller, M. 2007. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps *Nature Reviews. Genetics*. 8:286-298.
32. Franco-Marina, F. y Villalba-Caloca, J. 2001. La epidemia de cáncer pulmonar en México. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 14(4):207-214
33. Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. & Parkin, D. M. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, acceso por última vez el 04/Septiembre/2012.
34. Florea, A. M. & Büsselberg, D. 2011. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers*. 3:1351-1371
35. Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S. & Mulligan, R.C. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med*. 183:1797-1806
36. Godoy, L., Rios, R. P., Cervantes, S. F., Osornio-Vargasa, A., García-Cuellar, C. & Meneses, G. A. 2007. Mortality due to lung cancer in Mexico. *Lung Cancer*. 58:184-190
37. Gieni, R.S. & Hendzel, M.J. 2009. Throwing the cancer switch: reciprocal roles of polycomb and trithorax proteins *Biochem. Cell. Biol*. 87:711-746

38. Ginjala, V., Nacerddine, K., Kulkarni, A., Oza, J., Hill, S. J., Yao, M. Citterio, E., Lohuizen, M., y Ganesan, S. 2011. BMI1 Is Recruited to DNA Breaks and Contributes to DNA Damage-Induced H2A Ubiquitination and Repair. *Mol. Cell. Biol.* 31(10):1972
39. Grossi, F., Aita, M. Follador, A. Defferrari, C. Brianti, A., Sinaccio, A & Belvedere, O. 2007. Sequential, alternating, and maintenance/consolidation chemotherapy in advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A review of the literature. *The Oncologist.* 12:451-464
40. Guo, W., Lasky III, L. J., & Wu, H. 2006. Cancer Stem Cells. *Pediatr Res.* 59:59-64
41. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. 2011. The hallmarks of cancer: The next Generation. *Cell.* 144:646-674
42. Herceg, Z. 2007. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis.* 22(2):91-103
43. Houghton, J. M., Morozov A., Smirnova, I. & Wang, C. T. 2007. Stem cells and cancer. *Seminars in Cancer Biology.* 17:191-203
44. Ho, M. M., Ng, V. A., Lam, S., & Hung Y. J. 2007. Side Population in Human Lung Cancer Cell Lines and Tumors Is Enriched with Stem-like Cancer Cells. *Cancer Res.* 67:4827-4833
45. Ho L. & Crabtree, G. R. 2010. Chromatin remodelling during development. *NATURE.* 463(28):474-484
46. Hu, L., McArthur, C. & Jaffe, R. B. 2010. Ovarian cancer stem-like side-population cells are tumorigenic and chemoresistant. *British Journal of Cancer.* 102:1276-1283
47. Huertas, D., Sendra R. & Muñoz, P. 2009. Chromatin dynamics coupled to DNA repair. *Epigenetics* 4(1): 31-42

48. Jacobs, J. J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R.A. & Van Lohuizen, M. 1999a. The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature*. 397:164-168
49. Jacobs, J. J., Scheijen, B., Voncken, J. W., Kieboom, K., Berns, A. & Van Lohuizen, M. 1999b. *Bmi-1* collaborates with *c-Myc* in tumorigenesis by inhibiting *c-Myc*-induced apoptosis via *INK4a/ARF*. *Genes Dev*. 13:2678-2690
50. Jemal, A., Bray, F., Melissa, M., Ferlay, J., Ward, E. & Forman, D. 2008. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 90:61-69
51. Jiang, L., Li, J. & Song, L. 2009. *Bmi-1*, stem cells and cancer. *Acta Biochim Biophys Sin.* 41(7):527-534
52. Junco, M. J., Loza, M. A. y González A. A. 2006. Bases moleculares del cáncer. *Rev Invest Clin.* 58(1):56-70
53. Kalebic, T. 2003. Epigenetic Changes: Potencial Therapeutic Targets. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 983:278-285
54. Karlić, R., Chunga, H-R., Lasserrea, J., Vlahovičekb, K. & Vingrona, M. 2010. Histone modification levels are predictive for gene expression. *PNAS.* 107(7):2926-2931
55. Kelly, T. K., Carvalho, D. & Jones, P. A. 2010. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nature Biotechnology.* 28(10):1069-10678
56. Kim M. S., Blake, M., Baek, H. J., Kohlhagen, G., Pommier, Y. & Carrier, F. 2003. Inhibition of Histone Deacetylase Increases Cytotoxicity to Anticancer Drugs Targeting DNA. *Cancer Res.* 63:7291-7300
57. Kouzarides, T. 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell.* 128:693-705

58. Levina, V., Marrangoni, M. A., DeMarco, R., Gorelik, E., & Lokshin, E. A. 2008. Drug-Selected Human Lung Cancer Stem Cells: Cytokine Network, Tumorigenic and Metastatic Properties. *PLoS ONE* 3(8): e3077. doi:10.1371/journal.pone.0003077
59. Li, B., Carey, M. & Workman, J. L. 2007. The Role of Chromatin during Transcription. *Cell*. 128:707-719
60. Lobo, A. N., Shimono, Y., Qian, D. & Clarke, M. F. 2007. The Biology of Cancer Stem Cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23:675-699
61. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H. & Matsudaira, P. 2005. *Biología celular y Molecular*. 5ª Ed. Editorial Panamericana. México.
62. Loh, Y-H., Wu, Q., Chew, J. L., Vega, W.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K-Y., Sung, K. W., Lee, C. W. H., Zhao, X-D., Chiu, K-P., Lipovich, L., Kuznetsov, V. A., Robson, P., Stanton, L. W., Wei, C-L., Ruan, Y., Lim, B. & Ng, H-H. 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics*. 38:431-440
63. Lopez-Serra, L. & Esteller, M. 2008. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *British Journal of Cancer* 98:1881-1885
64. Lutter, L. C., Judis, L. & Paretto, R. F. 1992. Effects of Histone Acetylation on Chromatin Topology In Vivo. *Molecular and Cellular Biology*. 12(11):5004-5014
65. Mohammad, H. P. & Baylin, S. B. 2010. Linking cell signaling and the epigenetic machinery. *Nature Biotechnology*. 28(10):1033-1038
66. Minna, J. D., Roth, J. A. & Gazdar, A. F. 2002. Focus on lung cancer. *Cancer Cell*. 1:49-52
67. Mills, A. A. 2010. Throwing the cancer switch: Reciprocal roles of Polycomb and Trythorax proteins. *Nature Reviews*. 10:669-682

68. Portela, A. & Esteller, M. 2010. Epigenetic modifications and human Disease. *Nature Biotechnology*. 28(10):1057-1068
69. Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M. & Todaro, M. 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 445:111-115
70. Roberti, A., La Sala, D. & Cinti, C. 2006. Multiple Genetic and Epigenetic Interacting Mechanisms Contribute to Clonally Selection of Drug-Resistant Tumors: Current Views and New Therapeutic Prospective. *Journal of Cellular Physiology*. 207:571-581
71. Sánchez, L. E y Monge, S. T. 2007. Epigenética y cáncer. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXIV*. 580:177-182
72. Sancho-Matinez S. M., García, L. P., Prieto, M., López-Novoa, J. M. y López-Hernández, F. J. 2012. Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: An integrated view. *Pharmacology & Therapeutics*. 136:35-55
73. Sandler, A. B., Nemunaitis, J., Denham, C., Von Pawel, J. , Cormier, Y., Gatzemeier, U., Mattson, K., Manegold, Ch., Palmer, M. C., Gregor, A., Nguyen, B., Niyikiza, C. & Einhorn, L. H. 2000. Phase III Trial of Gemcitabine Plus Cisplatin Versus Cisplatin Alone in Patients With Locally Advanced or Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 18(1):122-130
74. Sandoval, J. & Esteller, M. 2012. Cancer epigenomics: beyond genomics *Current Opinion in Genetics & Development*. 22:50-55
75. Scagliotti, G.V., Novello, S. & Selvaggi, G. 1999. Multidrug resistance in non-small-cell lung cancer *Annals of Oncology*. 10(5):83-86
76. Sève, P., & Dumontet, C. 2005. Chemoresistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Curr. Med. Chem.- Anti-Cancer Agents*. 5: 73-88

77. Shanker, M., Willcutts, D., & Ramesh, R. J. A. R. 2010. Drug resistance in lung cancer. *Lung Cancer: Targets and Therapy*. 1:23-36
78. Sharma, S., Kelly, K. T., & Jones, A. P. 2010. Epigenetics in cancer *Carcinogenesis*. 31(1):27-36
79. Singhal, S. S., Wickramarachchia, D., Singhala, J., Yadava, S., Awasthib, Y. C. & Awasthia, S. 2006. Determinants of differential doxorubicin sensitivity between SCLC and NSCLC. *FEBS Letters*. 580:2258-2264
80. Sparmann, A. & Van Lohuizen, M. 2006. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 6:846-856
81. Spira, A. & Ettinger, S. D. 2004. Multidisciplinary Management of Lung Cancer. *N Engl J Med*. 350(4):379-392
82. Sung, J.M., Cho H. J., Yi, H., Lee C. L., Kim, H. C., Kim, D. K., Ab, A.M., Aty, E., Kim, J. S., Landowski, P. C., Hediger, A. M. & Shin, H. C. 2008. Characterization of a stem cell population in lung cancer A549 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 371:163-167
83. Sun, S., Schiller, J. H. & Gazdar, A. F. 2007. Lung cancer in never smokers—a different disease. *Nature Reviews Cancer*. 7:778-790
84. Toyooka, S., Tokumo, M., Shigematsu, H., Matsuo, K., Hiroaki Asano Kunitoshi, T. H. A., Ichihara, S., Suzuki, M., Aoe, M., Date, H., Gazdar, A. F. & Shimizu1, N. 2006. Mutational and Epigenetic Evidence for Independent Pathways for Lung Adenocarcinomas Arising in Smokers and Never Smokers. *Cancer Res*. 66:1371-1375
85. Van Lohuizen, M., Verbeek, S., Scheijen, B., Wientjens, E., Guiden, H. & Berns, A. 1991, Identification of Cooperating Oncogenes in Ep-myc Transgenic Mice by Provirus Tagging. *Cell*. 65:737-752

86. Vardabasso, C., Hasson, D., Chi-Yeh, C. K. R., Duarte, L. D. & Bernstein, E. 2013, Histone variants: emerging players in cancer biology. *Cell. Mol. Life Sci.* DOI 10.1007/s00018-013-1343-z
87. Velázquez, V. M. A. y De la Fuente, G. M. 2009. Papel de las células madre oncogénicas en la resistencia terapéutica de tumores de mama. *Rev Venez Oncol.* 21(3):174-182
88. Vrzalikova, K., Skarda, J., Ehrmann, J., Murray, P. G., Fridman, E., Kopolovic, J., Knizetova, P., Hajdich, M., Klein, J., Kolek, V., Radova, L. & Kolar, Z. 2008. Prognostic value of Bmi-1 oncoprotein expression in NSCLC patients: a tissue microarray study. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 134:1037-1042
89. Vonlanthen, S., Heighway, J., Altermatt, H. J., Gugger, M., Kappeler, A., Borner, M. M. y Lohuizen M, & Betticher, D. C. 2001. The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression. *Br J Cancer.* 84(10):1372-1376
90. Wang, L., Park, P., Zhang, H., La Marca, F. & Lin, C-Y. 2011. Prospective identification of tumorigenic osteosarcoma cancer stem cells in OS99-1 cells based on high aldehyde dehydrogenase activity. *Int. J. Cancer.* 128:294-303
91. Wang, E., Bhattacharyya, S., Szabolcs, A. Rodriguez-Aguayo, C., Jennings, N. B., Lopez-Berestein, G., Mukherjee, P., Sood, A. N., & Bhattacharya, R. 2011. Enhancing Chemotherapy Response with Bmi-1 Silencing in Ovarian Cancer. *PLoS ONE* 6(3): e17918
92. Wu, X., Fan, W., Xu, S. & Zhou, Y. 2003. Sensitization to the Cytotoxicity of Cisplatin by Transfection with Nucleotide Excision Repair Gene Xeroderma Pigmentosum Group A Antisense RNA in Human Lung Adenocarcinoma Cells. *Clin Cancer Res.* 9:5874-5879

93. Wu, Z., Min, L., Chen, D., Hao, D., Duan, Y. Qiu, G. & Wang, Y. 2011. Overexpression of BMI-1 Promotes Cell Growth and Resistance to Cisplatin Treatment in Osteosarcoma. PLoS ONE. 6(2):e14648
94. Wu, X., Liu, X., Sengupta, J., Bu, Y., Yi, F., Wang, C., Shi, Y., Zhu, Yong., Jiao, Q. & Song, F. 2011. Silencing of Bmi-1 gene by RNA interference enhances sensitivity to doxorubicin in breast cancer cells. Indian Journal of Experimental Biology. 49:105-112
95. Wu, X., Chen, H. & Wang, X. 2012. Can lung cancer stem cells be targeted for therapies?. Cancer Treat Rev. 38(6): 580-588
96. Yang, J., Chai, L., Liu, F., Fink, L. M., Lin, P., Silberstein, L. E., Amin, H. M., Ward, D. C. & Ma, Y. 2007. Bmi-1 is a target gene for SALL4 in hematopoietic and leukemic cells. PNAS. 104(25): 10494-10499
97. Yoon, C. Y., Park, M. J., Lee, J. S., Lee, S. C., Oh, J. J., Park, H., Chung, C.W., Abdullajanov, M. M., Jeong, S. J., Hong, S. K., Byun, S. S. Lee, E. S. & Lee, S. E. 2011. The Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A Synergistically Resensitizes a Cisplatin Resistant Human Bladder Cancer Cell Line. The Journal of Urology. 185:1102-1111
98. Yoo, C. B. & Jones, P. A. 2006. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. Nature Reviews Drug Discovery. 5:37-50
99. Zhang, F., Zhang, T., Teng, Z., Zhang, R., Wang, J. & Mei, Q. 2009. Sensitization to γ -irradiation-induced cell cycle arrest and apoptosis by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. Cancer Biology & Therapy 8(9):823-831
100. Zhou, J., & Zhang Y. 2008. Cancer stem cells: Models, mechanisms and implications for improved treatment. Cell Cycle. 7(10):1360-1370

101. Zhu, W. G., Hileman, T., Ke, Y., Wang, P., Lu, S., Duan, W., Dai, Z., Tong, T., Villalona-Calero, M. A., Plass, C. & Otterson, G. A. 2004. 5-aza/2'-deoxycytidine Activates the p53/p21^{Waf1/Cip1} Pathway to Inhibit Cell Proliferation. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(15):15161-15166