



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE UN PERFIL DE MICRO-RNAS EN LA RESISTENCIA  
ADAPTATIVA A CISPLATINO EN CÁNCER PULMONAR**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIOL. ALDARIZ AMAYA JUAN RODRIGO**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO  
FES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. ROSAS VARGAS HAYDÉE  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
DR. ZÚÑIGA RAMOS JOAQUÍN ALEJANDRO  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS,  
ISMAEL COSÍO VILLEGAS.

**MÉXICO, Cd Mx. ENERO, 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE UN PERFIL DE MICRO-RNAS EN LA RESISTENCIA  
ADAPTATIVA A CISPLATINO EN CÁNCER PULMONAR**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:  
**BIOL. ALDARIZ AMAYA JUAN RODRIGO**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ÁVILA MORENO FEDERICO  
FES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ROSAS VARGAS HAYDÉE  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
DR. ZÚÑIGA RAMOS JOAQUÍN ALEJANDRO  
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

**MÉXICO, Cd Mx. ENERO, 2017**

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de mayo de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **ALDARIZ AMAYA JUAN RODRIGO**, con número de cuenta 407053494, con la tesis titulada "**Análisis de expresión de un perfil de micro-rnas en la resistencia adaptativa a cisplatino en cáncer pulmonar**", realizada bajo la dirección del **DR. FEDERICO ÁVILA MORENO**:

Presidente: DRA. PATRICIA PIÑA SÁNCHEZ  
Vocal: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS  
Secretario: DR. JOAQUÍN ALEJANDRO ZÚÑIGA RAMOS  
Suplente: DRA. ELENA ARÉCHAGA OCAMPO  
Suplente: DRA. BLANCA ORTÍZ QUINTERO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 3 de noviembre de 2016.



**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgar la beca no. 363089.

Financiamiento otorgado al presente trabajo por la UNAM-DGAPA través de los proyectos aprobados IACOD-PAPIIT IA201611, PAPIIT IB202512 y PAPIIT RR282512; así como al proyecto número 005364 aprobado por el Fondo SEP-CONACYT de investigación básica, conducido por el Dr. Federico Avila Moreno.

A la Dirección de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y comité de ciencia y bioética del INER por el financiamiento y aprobación del proyecto B18-12, respectivamente.

A los miembros del Comité Tutor por sus valiosas contribuciones:

DRA. ROSAS VARGAS HAYDÉE

DR. ZÚÑIGA RAMOS JOAQUÍN ALEJANDRO

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL I**

A mi madre, Juana Guadalupe Amaya Asbell.

A mi tutor, Dr. Federico Ávila Moreno.

A mis compañeros de laboratorio.

**¡GRACIAS POR TODO!**

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL II**

A los miembros del jurado evaluador:

Dra. Aréchga Ocampo Elena

Dra. Maldonado Lagunas Vilma Araceli

Dra. Ortiz Quintero Blanca

Dra. Piña Sánchez Patricia

Dr. Zúñiga Ramos Joaquín Alejandro

**GRACIAS POR SUS VALIOSAS OBSERVACIONES Y CORRECCIONES**

A Georgina García Morán, Unidad de Posgrado FES Iztacala.

**GRACIAS POR TODAS LAS ATENCIONES**

## DEDICATORIA I

A mi más grande tesoro, **Aylén Aldariz Ortiz**. Tu papá te ama mucho y siempre te amará.



## **DEDICATORIA II**

A quienes han dejado de acompañarnos:

Dr. Diego Julio Arenas Aranda†

Alejandra Bernabé Moctezuma†

**PERO CUYAS ENSEÑANZAS Y BUENOS RECUERDOS ESTÁN SIEMPRE  
PRESENTES**

“La vida es un continuo aprendizaje...”

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1.1. Cáncer.....	3
1.2. Cáncer pulmonar.....	6
1.3. QUIMIORESISTENCIA EN CÁNCER.....	11
1.4. QUIMIORESISTENCIA EN CÁNCER PULMONAR: Regulación Genética <i>Versus</i> Epigenética.....	14
1.5. QUIMIORESISTENCIA EN CÁNCER PULMONAR: Regulación post-transcripcional de microRNAs.....	20
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	27
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	28
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	30
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	31
6.1. Análisis de predicción bioinformática miRNAs versus mRNAs blanco.....	31
6.2. Cultivos celulares de cáncer pulmonar A549, A427, INER51 e INER37.....	31
6.3. Establecimiento de líneas celulares resistentes A549, A427, INER51 e INER37 resistentes a cisplatino.....	32
6.4. Ensayos de viabilidad celular por citotoxicidad a MTS; <b>Error! Marcador no definido.</b>	
6.5. Extracción y purificación de RNA total por Trizol.....	34
6.6. Diseño de oligonucleótidos para ensayos de amplificación de miRNAs..... <b>Error! Marcador no definido.</b>	
6.7. Ensayos de detección de miRNAs por RT-qPCR y SYBR green. <b>Error! Marcador no definido.</b>	
6.7.1. Síntesis de cDNA a partir de miRNAs maduros..... <b>Error! Marcador no definido.</b>	
6.7.2. Amplificación de cDNA de miRNAs maduros.....	38
6.8. Síntesis de cDNA de mRNAs.....	39
6.9. Detección de mRNAs por RT-qPCR.....	39
6.10. Extracción de proteínas mediante Trizol.....	40
6.11. Análisis de proteínas mediante Western blot.....	41
6.12. Análisis estadístico.....	43
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>

7.1. Análisis de predicción <i>in silico</i> y selección de miRNAs	<b>Error!</b>	<b>Marcador</b>	<b>no</b>
<b>definido.</b>			
7.2. Inducción de quimioresistencia a largo plazo .....			53
7.2.1. Células de cáncer pulmonar A549 quimioresistentes a 5 uM de cisplatino.....			53
7.2.2. Células de cáncer pulmonar A427 quimioresistentes a 5 uM de cisplatino....			58
7.2.3. Células de cáncer pulmonar INER51 quimioresistentes a 2.5 uM..... de cisplatino .....			63
7.2.4. Células de cáncer pulmonar INER37 quimioresistentes a 2.5 uM..... de cisplatino .....			69
7.3. Perfil de expresión de miRNAs en líneas celulares parentales y resistentes a cisplatino .....			75
7.3.1. Perfil de expresión de miRNAs en A549 P y A549 cis-R. ....			76
7.3.2. Perfil de expresión de miRNAs en A427 P y A427 cis-R .....			78
7.3.3. Perfil de expresión de miRNAs en INER51 P y INER51 cis-R .....			80
7.3.4. Perfil de expresión de miRNAs en INER37 P y INER37 cis-R (réplica experimental 1) .....			82
7.3.5. Perfil de expresión de miRNAs en INER37 P y INER37 cis-R (réplica experimental 2).....			84
7.4. RT-qPCR de ABCG2 en líneas celulares A549 y A427 (resultados preliminares .....			86
7.5. Cuantificación de las proteínas MEOX2 y ABCG2 en A549 y A427 .....			89
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....			91
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....			104
<b>10. PERSPECTIVAS</b> .....			106
<b>11. REFERENCIAS</b> .....			107

## RESUMEN

El cáncer pulmonar representa la principal causa de muerte por neoplasias malignas a nivel mundial con un índice de supervivencia global a 5 años menor al 15% de todos los casos. A pesar de los recientes avances, e incorporación de nuevas terapias, uno de los principales obstáculos en la eficacia del tratamiento oncológico está representado por la resistencia múltiple a fármacos oncológicos. Antecedentes de nuestro grupo de investigación han evidenciado la participación de los factores transcripcionales MEOX2 y TWIST1, probablemente involucrados en mecanismos de resistencia a fármacos oncológicos como cisplatino en cáncer de pulmón. Sin embargo, hasta el momento, son escasos los trabajos que reportan probables mecanismos de regulación post-transcripcional asociados con la regulación de los factores MEOX2 y TWIST1 en la quimioresistencia a cisplatino en cáncer pulmonar. Al respecto actualmente, se ha descrito la participación de microRNAs (miRNAs) en la regulación post-transcripcional de diversos procesos biológicos en cáncer de pulmón, incluido la quimioresistencia. En el presente trabajo, mediante análisis de predicción *in silico*, se determinó la posible regulación post-transcripcional de miR-301a y miR-543 sobre los blancos génicos MEOX2 y TWIST1, respectivamente. Mientras que adicionalmente, exploramos su participación durante el proceso de adaptación en la resistencia a cisplatino en líneas celulares del grupo NSCLC, por lo que se evaluaron el perfil de expresión de un panel de 7 miRNAs (miR-301a, miR-543, miR-487, miR-145, miR-221, miR-361 y miR-217) asociados a cáncer, pero cuyo papel en la resistencia a cisplatino no ha sido descrita.

**Palabras clave:** Cáncer de pulmón, microRNAs, quimioresistencia, cisplatino.

## **ABSTRACT**

Lung cancer is the leading cause of death from malignancy worldwide with an index of overall 5-year survival less than 15% of all cases. Despite recent advances, and incorporation of new therapies, one of the main obstacles to the effectiveness of cancer treatment is represented by multiple resistance to cancer drugs. Background of our research group have shown the involvement of transcription factors TWIST1 and MEOX2 probably involved in mechanisms of resistance to cancer drugs such as cisplatin in lung cancer. However, so far, there are few studies reporting probable mechanisms of post-transcriptional regulation associated with the regulation of MEOX2 and TWIST1 factors in cisplatin chemoresistance in lung cancer. About currently it described participation microRNAs (miRNAs) in post-transcriptional regulation of various biological processes in lung cancer, including chemoresistance. In this paper, by analyzing in silico prediction, the possible post-transcriptional regulation of miR-301a and miR-543 gene on white MEOX2 and TWIST1 respectively was determined. While additionally, we explore their participation in the process of adaptation in cisplatin resistance in cell lines of NSCLC group, so the expression profile of a panel 7 miRNAs (miR-301a, miR-543, miR-487, miR-145, miR-221, miR-361 and miR-217) were evaluated and associated with cancer but whose role in cisplatin resistance has not been described.

**Key words:** Lung cancer, microRNAs, chemoresistance, cisplatin.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. CÁNCER**

El cáncer es una enfermedad multifactorial que consiste en una proliferación y diseminación incontrolada de células que dan lugar a la formación de una masa tumoral maligna, estas tienen la capacidad de invadir tejidos cercanos y diseminarse a diversos órganos a través de un proceso denominado metástasis (Frank, 2007; Nguyen, 2009). A nivel mundial, en 2012, se estimaron 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de defunciones; además, se prevé que los casos anuales de cáncer aumenten de 14 millones a 22 millones en las próximas dos décadas (IARC, 2014). Por otro lado, en 2012, los tipos más frecuentes de cáncer en varones fueron el cáncer de pulmón, hígado, estómago, colon y esófago, respectivamente. En mujeres, -en orden descendente- el cáncer de mama, pulmón, estómago, colon y cérvix fueron los más comunes (WHO, 2015).

Se estima que un 30% de las muertes por cáncer son debidas a diversos factores de riesgo como el consumo de alcohol y tabaco, ingesta reducida de frutas y verduras, índice de masa corporal elevado y sedentarismo. Así mismo, se considera que el tabaquismo es responsable del 20% de las muertes por cáncer en general y cerca del 70% por cáncer de pulmón (WHO, 2015).

Actualmente, se ha logrado un consenso donde las evidencias indican que el cáncer es resultado de cambios tanto genéticos como epigenéticos -teoría de las mutaciones somáticas del cáncer- establecido a partir de diferentes hipótesis (1) donde el cáncer se origina a partir de células somáticas individuales que acumulan

múltiples mutaciones en el DNA (origen monoclonal), (2) de un estado default de proliferación celular quiescente (en ausencia de estímulos reguladores la célula se encuentra en fase G0), y (3) que el cáncer es una enfermedad de proliferación celular causado por mutaciones en genes que controlan la proliferación y el ciclo celular (Soto et al., 2004).

Por otro lado, se ha establecido que los tumores sólidos son derivados de órganos que poseen poblaciones de células troncales y que están constituidos de poblaciones heterogéneas de células que difieren en su habilidad de proliferación y formación de nuevos tumores. Este tipo de células indiferenciadas, con capacidades de autorenovación son conocidas como células troncales del cáncer o *Cancer Stem Cells* (CSC) (Weisenthal & Lippman, 1985; Al-Hajj & Clarke, 2004). Sin embargo, hasta el momento, sigue siendo materia de debate (Kise et al., 2015).

Recientemente, se ha propuesto que el desarrollo del cáncer es debido a un efecto estocástico cuando los factores hereditarios y el ambiente, no pueden explicar completamente los factores de riesgo del cáncer. Este efecto, es asociado al número de divisiones de células troncales en cada tejido, donde los cambios genómicos pueden ocurrir únicamente por alteraciones en la replicación del DNA mas que por factores carcinogénicos. Este efecto aleatorio llega a ser el principal factor que desencadena el desarrollo del cáncer y explica cómo algunos tipos de tejidos dan lugar a cánceres humanos que son millones de veces más frecuentes que otros tipos de tejidos. Por tal motivo, en la mayoría de los casos, la formación de tumores se debe a la "mala suerte" como sugieren recientemente algunos autores; es decir explicada con base en acumulación de mutaciones aleatorias que



surgen durante la replicación del DNA en células troncales fisiológicas no cancerosas, y que sólo un tercio de la variación del riesgo de cáncer, es atribuible a factores ambientales o predisposición hereditaria (Tomasetti & Vogelstein 2015).

Así mismo, Hanahan & Weinberg en 2000 propusieron seis características o marcadores del cáncer que explican cómo una célula fisiológicamente normal (no neoplásica) progresa a través de múltiples etapas a una célula cancerosa con capacidades tumorigénicas y malignas (Hanahan & Weinberg, 2000). Estos seis marcadores son: (1) señales de proliferación sostenida, (2) evasión de supresores de crecimiento, (3) resistencia a la muerte, (4) replicación celular continua (inmortalidad celular), (5) inducción de la angiogénesis y, (6) invasión y metástasis. Mientras que un trabajo actualizado en 2011, los autores Hanahan & Weinberg incluyeron cuatro nuevos marcadores que permiten la constitución e interacciones de señalización del microambiente tumoral. Estos nuevos marcadores son: (1) evasión de la respuesta inmune, (2) desequilibrio celular energético, (3) promoción tumoral de la inflamación, así como (4) inestabilidad genómica y mutaciones (Hanahan & Weinberg, 2011). Sin embargo, un artículo previo publicado por Lazebnik, señala que cinco de los marcadores descritos inicialmente, también eran característicos de tumores benignos y que el único marcador maligno es la capacidad de invasión y metástasis (Lazebnik, 2010). Por otro lado, en un artículo publicado por Sonnenschein & Soto en 2013, argumentaron que los datos originales para la mayoría de los marcadores, es deficiente, indicando que el cáncer es una enfermedad a nivel de tejidos y que los marcadores a nivel celular son engañosos (Sonnenschein & Soto en 2013).

## 1.2. CANCER PULMONAR

El cáncer de pulmón o carcinoma pulmonar, es un tumor maligno con alta capacidad de metástasis que deriva de células epiteliales pulmonares. Actualmente representa la principal causa de defunciones por neoplasias malignas a nivel mundial con una tasa de supervivencia relativa a 5 años no mayor al 15% (Siegel et al., 2014). En la mayoría de los casos, el cáncer de pulmón es detectado hasta que éste se encuentra en una etapa avanzada (no curable), por lo cual, la supervivencia relativa a 5 años varía dependiendo de la etapa al momento del diagnóstico siendo del 49% al 16% y el 2% en pacientes con estadio local, regional y distante respectivamente (Ries et al., 2013).

El tabaquismo y la exposición continua al humo del tabaco (el cual contiene cerca de 73 carcinógenos conocidos) es considerado como el principal factor de riesgo en un 80-90% del total de casos (Hecht, 2012, WHO, 2014). Así mismo, la exposición a materiales y compuestos como el radón, níquel, cromo, asbestos, arsénicos, hollín y alquitrán aumentan la probabilidad de desarrollar cáncer pulmonar. Otros factores de riesgo incluyen la predisposición genética, contaminación del aire, dietas con suplementos en beta carotenos (siendo fumadores activos), infección con VIH, radiación ionizante, entre otros (National Cancer Institute, 2015).

Con base en el tamaño y apariencia de las células cancerosas, el cáncer de pulmón es clasificado en dos grandes grupos de acuerdo al tipo histológico:

- **Carcinoma pulmonar de células pequeñas** (SCLC, por sus siglas en inglés). Cerca del 15% del total de casos de cáncer de pulmón a nivel

mundial corresponden a este tipo histológico. Se caracteriza por presentar una tasa de duplicación corta y un crecimiento tumoral rápido que es acompañado de un desarrollo temprano de metástasis (van Meerbeeck al., 2011). Una característica del SCLC es su fuerte asociación a fumadores y raramente se presenta en individuos no fumadores (Ettinger & Aisner, 2006).

- **Carcinoma pulmonar de células no pequeñas** (NSCLC, por sus siglas en inglés). El NSCLC representa el 85% del total de casos, siendo el adenocarcinoma el más frecuente con un 40%, seguido del carcinoma de células escamosas con 30% y el carcinoma pulmonar de células grandes con un 9% del total de casos de NSCLC (Lu et al., 2010). El resto de NSCLC se distribuye en otros tipos menos comunes como el tumor carcinoide, carcinoma de la glándula salival, pleomórfico y el carcinoma no clasificados (Kenfield, 2008).

Por otro lado, se han establecido diferentes estadios del NSCLC Con base enl grado de diseminación de su fuente original. La importancia de comprender el estadio de la enfermedad radica en determinar el pronóstico y tratamiento de la enfermedad. Para ello, el American Joint Committee on Cancer (AJCC) ha establecido los criterios de clasificación Con base enl estadio local -tumor primario-, regional -nodos linfáticos- y de metástasis (M), generándose un consenso de clasificación para la estadificación clínica de la enfermedad (Sthepen & Compton, 2010).

## Estadíos clínicos del cáncer pulmonar:

- **Carcinoma oculto.** El tumor primario no puede ser evaluado. Existe la presencia de células malignas en el esputo o en lavados bronquiales.
- **Estadio 0.** *Carcinoma in situ.* El tumor no ha crecido hacia los tejidos cercanos y no se ha propagado fuera del pulmón.
- **Estadio I.** Consiste en un tumor de tamaño reducido que no se ha diseminado a los ganglios linfáticos. Se divide en dos subestadios de acuerdo a su tamaño:
  - o Estadio IA: Tumor < a 3 cm en su mayor dimensión.
  - o Estadio IB: Tumor > a 3 cm pero ≤ a 5 cm en su mayor dimensión.
- **Estadio II.** Se divide en dos subestadios de acuerdo a su tamaño:
  - o Estadio IIA. Tumor > a 5 cm pero < a 7 cm que no se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos. Tumor < a 5 cm que se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos.
  - o Estadio IIB: Tumor > a 5 cm pero < a 7 cm que se ha diseminado a los ganglios linfáticos. Tumor > a 7 cm que puede o no haber crecido hacia las estructuras cercanas en el pulmón, pero que no se ha extendido a los ganglios linfáticos.
- **Estadio III.** Se divide en dos subestadios de acuerdo a su tamaño:
  - o **Estadio IIIA:** Tumor > a 7 cm. Las células se han diseminado a los nódulos linfáticos, mediastino, tráquea, esófago, pared torácica, corazón, otro lóbulo y diafragma.

- **Estadio IIIB:** El tumor puede ser de cualquier tamaño y ha invadido el mediastino, corazón, vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral, carina y en nódulos separados en diferente lóbulo pulmonar ipsilateral.
- **Estadio IV:** El cáncer llega a ser de cualquier tamaño. Puede o no haber crecido cerca de las estructuras de los ganglios linfáticos, o bien, haberlos alcanzado. Además, el cáncer se ha propagado al otro pulmón, las células cancerosas se encuentran en el derrame pleural maligno y el derrame pericárdico maligno. Así mismo, el cáncer puede haberse propagado a los ganglios linfáticos distantes, hígado, huesos y cerebro.

La terapia en pacientes con NSCLC es basada principalmente en el estadio de la enfermedad. Debido a que los pacientes con NSCLC son diagnosticados en estadios avanzados, el tratamiento es basado en cirugía, radioterapia, quimioterapia o la combinación de estas (American Cancer Society, 2015). Así, dependiendo de la etapa del cáncer NSCLC, la quimioterapia es utilizada en diferentes situaciones:

- Terapia neoadyuvante. Antes de la cirugía (a veces junto con radioterapia) para tratar de reducir el tamaño del tumor.
- Terapia adyuvante. Después de la cirugía (a veces junto con radioterapia) para tratar de destruir cualquier célula cancerosa que pueda haber quedado.
- Como tratamiento principal (a veces junto con radioterapia) para las neoplasias más avanzadas o para algunas personas que no son lo suficientemente saludable para la cirugía.

La mayoría de guías de práctica clínica recomiendan la quimioterapia adyuvante para pacientes con NSCLC en estadios II-III. La quimioterapia administrada en pacientes con NSCLC consiste en un medicamento de tercera generación y un fármaco de platino (Shi et al., 2014). Los fármacos más comúnmente usados en NSCLC son: cisplatino, carboplatino, paclitaxel, paclitaxel unido a albúmina, docetaxel, gemcitabina, vinorelbina, irinotecan, etopósido, vinblastina y pemetrexed (American Cancer Society, 2015). Actualmente, la quimioterapia basada en platino es una de las estrategias más frecuentemente usadas para curar o controlar el NSCLC de acuerdo al National Comprehensive Cancer Network (NCCN, 2014). El cisplatino por su parte, es uno de los fármacos de primera línea más ampliamente utilizados en la terapia del cáncer. Éste actúa activando diferentes vías de señalización y participando en la activación de la apoptosis mediante la generación de aductos en el DNA, que son las principales causas de la actividad antitumoral (Siddik, 2003). Sin embargo, la eficacia de la quimioterapia es limitada, con tasas de respuesta de 20 a 35%, supervivencia libre de progresión (PFS, por sus siglas en inglés) de 3.1-5.5 meses, y supervivencia total de 7.4-11.3 meses (Arrieta et al., 2010). Esto se atribuye principalmente a la resistencia a fármacos, lo cual ocurre en la mayoría de tipos de cáncer y es un gran impedimento para el éxito de la quimioterapia. Se reconoce cada vez más que la adquisición de resistencias primarias y secundarias de fármacos en las células cancerosas, son la causa más importante en el fallo de la quimioterapia (Reungwetwattana, et al., 2011).

### 1.3. QUIMIORESISTENCIA EN CÁNCER

La resistencia a múltiples fármacos oncológicos ha sido asociada con diversos mecanismos celulares tanto al exterior como al interior de las células. Las mutaciones genéticas, amplificación de genes, alteraciones en patrones de expresión genética y alteraciones epigenéticas que influyen sobre la absorción y metabolismo del fármaco oncológico, han sido los principales mecanismos de resistencia fármaco-oncológica intracelulares. Por otro lado, las interacciones de las células cancerosas con el microambiente tumoral, juegan un papel importante en la autoprotección de las células cancerosas frente a la exposición inicial del fármaco (Solyanik, 2010). Al respecto se han propuesto dos mecanismos de resistencia a fármacos: *i*) Si la administración del fármaco es incapaz de inhibir el crecimiento del tumor, se considera que existe quimioresistencia natural o intrínseca del tumor. *ii*) Si la exposición al fármaco resulta inicialmente en la inhibición del tumor, pero este efecto pierde eficacia durante la administración de la terapia, se reconoce la capacidad de quimioresistencia adquirida (Solyanik, 2010).

Actualmente se considera que la resistencia farmacológica de neoplasias malignas se conforma a partir de tres niveles de organización del tumor. El primero incluye los mecanismos intracelulares a nivel individual de cada célula. Estos han sido incluidos en tres grupos: **(I)** decremento en la acumulación del fármaco en la célula. Este es llevado a cabo por decremento en la absorción y eliminación potenciada del fármaco, así como la inactivación o degradación del fármaco a partir del metabolismo detoxificador intracelular, **(II)** incremento en los mecanismos de

reparación del DNA y **(III)** alteraciones o modificaciones de los blancos hacia donde va dirigido el fármaco (Galluzi et al., 2014).

El segundo nivel de organización tumoral incluye la formación multicelular (contactos o mecanismos de adhesión celular) que involucra el microambiente del tumor. Teicher et al (1999) demostraron que la resistencia *in vivo* de tumores difiere cuando estos son mantenidos *in vitro*. Mediante el establecimiento *in vivo* de tumores de mama en ratones resistentes a cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida y tiotepa, demostraron que cuando estos son mantenidos *in vitro*, pierden el fenotipo resistente a pesar de los altos niveles de resistencia *in vivo*, lo cual indicó que la resistencia se puede desarrollar a través de mecanismos que son expresados solo *in vivo* (Teicher et al., 1999). Por otro lado, se ha demostrado un papel importante de la adhesión celular y la quimioresistencia. Damiano et al., 2011 determinaron que la adhesión celular mediada por la resistencia a fármacos (Cell adhesion-mediated drug resistance -CAM-DR por sus siglas en inglés-) en la línea celular K562 de leucemia mieloide crónica, protege del proceso de apoptosis inducida por la inhibición de BCR/ABL, fármacos citotóxicos e irradiación gamma (Damiano et al., 2001). Así mismo, se ha determinado que la adhesión a fibronectina vía integrina alfa 1 en la enfermedad de mieloma múltiple, es capaz de regular los niveles de expresión de p27kip1 contribuyendo a la adhesión celular mediada por la resistencia a fármacos (Hazlehurst et al., 2000). Por tal motivo, la resistencia a múltiples fármacos a nivel multicelular se encuentra asociada al proceso de adhesión celular, el cual representa un mecanismo de 'defensa colectiva'. Esta defensa permite la supervivencia al disminuir la concentración del fármaco que es dirigida al tumor



(Croix et al., 1996; Solyanik, 2010). Finalmente, en el tercer nivel de organización, los mecanismos de resistencia a nivel de tejido nivel, resultan Con base en la distribución espacial no uniforme de las subpoblaciones celulares que da lugar a diferencias de la sensibilidad al tratamiento oncológico. La comparación de tumores primarios y metastásicos obtenidos cada uno de los mimos individuos, mediante ensayos de formación de colonias, indican diferencias significativas en la quimiosensibilidad de las células tumorales (Schlag & Schreml, 1982; Tanigawa et al., 1984). Así mismo, la interacción de células tumorales con componentes de la matriz extracelular, citosinas y factores de crecimiento da lugar a la formación de microambientes, lo cual confiere la capacidad de quimioresistencia. Tal es el caso de la regulación de la angiogénesis y metástasis por el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF por sus siglas en inglés) y el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés) en un modelo murino. Aquí, las interacciones recíprocas no coordinadas de ambos factores de crecimiento, interaccionan en el microambiente tumoral lo cual da lugar a la formación de vascularidades primitivas que facilitan el crecimiento y metástasis del tumor, promoviendo la supervivencia y progresión de las células tumorales sometidas a la quimioterapia no sólo a través de la inducción de la angiogénesis, sino también debido a la activación de cascadas de señales intracelulares que proporciona inhibición de la apoptosis y la activación de propiedades migratorias e invasivas de las células tumorales (Cao et al., 2008).

## **1.4. QUIMIORESISTENCIA EN CÁNCER PULMONAR: Regulación Genética Versus Epigenética**

La resistencia a fármacos es considerada uno de los mayores retos vencer en la eficacia al tratamiento oncológico en cáncer de pulmón debido a la capacidad de quimioresistencia intrínseca y/o adquirida (Stewart et al., 2010). A nivel intracelular, la resistencia al tratamiento puede ser el resultado del proceso de disminución de concentración intracelular del fármaco oncológico debido a la baja absorción o aumento en el eflujo, incremento en la inactivación del fármaco por mecanismos detoxificadores, disminución de la activación del fármaco, pérdida de unión a su blanco, aumento en los mecanismos de reparación de daño al DNA, aumento en la tolerancia del daño al DNA, resistencia a la apoptosis, alteraciones en el control del ciclo celular o factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, MYC, SMAD, STAT, AP-1, entre otros (Almeida et al., 2008; Stewart et al., 2010). Dentro de los mecanismos más citados a nivel celular, se encuentra la activación de transportadores tipo ABC, como la glicoproteína-P y la proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP o ABCG2), encargadas de expulsar los agentes quimioterapéuticos hacia el exterior de las células tumorales, protegiendo al tumor de la acción de los fármacos oncológicos (Zhang et al., 2014). La función de estas proteínas, como ABCG2 han sido ampliamente descritas por su participación en fenómenos de quimioresistencia (Cui et al., 2015). Recientemente, en tumores pulmonares tipo adenocarcinoma, se ha determinado que células sometidas a colesterol posterior a esquemas de quimioterapia, incrementan la capacidad de resistencia a cisplatino, oxiplatino y carboplatino mediante la sobreexpresión de ABCG2 (Wu et al., 2015). Por otro lado,

además de los mecanismos de eflujo, recientemente se demostró la relevancia que los mecanismos de regulación epigenética ejercen a través de las proteínas del grupo Polycomb (Crea et al., 2015). Este complejo de proteínas, actúan como silenciadores de la expresión genética mediante los mecanismos de remodelación de la cromatina dependientes de energía, los cuales han sido reportados en diferentes procesos celulares en el cáncer, incluidos la quimioresistencia (Riedel et al., 2015). En este sentido, BMI1, perteneciente al complejo represor PRC1, se encuentra sobre-expresado en líneas celulares resistentes a cisplatino del grupo NSCLC. En células A549 resistentes a cisplatino, el silenciamiento genético de BMI1 a través de RNAs de interferencia (siRNA) reduce significativamente la quimioresistencia, lo cual además se ha observado, es acompañado de la sobreexpresión de los genes P14, P16, P53, P21 y Rb, evidenciando el papel epigenético de BMI1 en promover la resistencia a cisplatino en tumores NSCLC (Mao et al., 2014). A su vez, Xu y colaboradores, empleando células de cáncer pulmonar del grupo NSCLC, han propuesto que BMI1 es requerido posterior al tratamiento con cisplatino, como mecanismo de autorenovación y adquisición de troncalidad, esto, mediante la obtención de una fracción enriquecida de células tipo troncales basado en marcadores de troncalidad, habilidad de formación de esferoides diferenciación multipotencial e inducción de xenotrasplantes; cuyos procesos, son altamente asociados al proceso de resistencia a múltiples fármacos (Xu et al., 2012; Dang et al., 2014). Así mismo, se ha demostrado que una elevada expresión de BMI1, es asociada con pobre pronóstico y sobrevida posterior al tratamiento por quimioterapia en pacientes con diagnóstico NSCLC (Shien et al., 2012). Por otra parte, la proteína EZH2, perteneciente al complejo represor

Polycomb 2, ha sido reportado por su participación en la quimioresistencia en diferentes tipos de carcinomas. Sin embargo, en cáncer de pulmón son escasos los reportes; no obstante su alta expresión se encuentra asociada con la patogénesis temprana de la enfermedad, lo cual se correlaciona con progresión tumoral de mayor malignidad (Behrens et al., 2014). Así mismo, de manera reciente se determinó que el silenciamiento genético de EZH2 en células tumorales del grupo NSCLC resistentes a cisplatino, disminuye la capacidad de resistencia al tratamiento, lo cual se ve acompañado de la sobreexpresión de genes supresores de tumor entre ellos, p15, p21 y p27, así como el miR-218, entre otros micro-RNAs (Zhou et al., 2015).

Por otro lado, al igual que otros tumores sólidos el fenómeno de quimioresistencia en cáncer pulmonar se encuentra vinculado con la presencia de subpoblaciones de células tipo troncales del cáncer, las cuales han resultado intrínsecamente con mayor resistencia al reto farmacológico “quimioterapia” comparado con el resto de la masa tumoral, ya que poseen la capacidad de frenar el ciclo celular y de reparación de daño al DNA, así como regular la concentración interna del fármaco a través de la sobreexpresión de transportadores de membrana tipo ABC (Zhang et al., 2014; Hosokawa et al., 2015). Así mismo, diferentes genes entre ellos, CD44, CD133, SOX2 y OCT4 participan de manera destacada en la resistencia a fármacos oncológicos en células tipo troncales del cáncer de pulmón (Sun et al., 2015). En este sentido, OCT4 ha sido uno de los genes ampliamente reportados en células tipo troncal del cáncer resistentes a múltiples fármacos oncológicos (Dang et al., 2014). No obstante, en cáncer de pulmón el papel de OCT4 permanece por ser

plenamente dilucidado; sin embargo, algunos autores señalan alta expresión de OCT4 asociado con la formación de esferoides *in vitro*, así como el fenotipo CD44+. En este sentido, algunos autores han determinado que células CD44+, poseen mayor capacidad de resistencia a cisplatino y menor tasa de apoptosis inducible en contraste de células OCT4- y CD44- (Leung et al., 2010).

Por otro parte, nuestro grupo de investigación ha publicado contribuciones en la genómica funcional del cáncer pulmonar, que denotan la sobre-expresión y participación de factores de transcripción de tipo Homeobox MEOX2 y hélice-vuelta-hélice TWIST1 involucrados en fenómenos de quimioresistencia y probable pobre pronóstico en pacientes del grupo NSCLC. En este sentido, entre 51 al 66% de una cohorte de 55 pacientes con cáncer de pulmón, se encontraron variación en el número de copias en las regiones citogenéticas 7p22.3-p21.1 y 7p15.3-p15.2, cuyas regiones cromosómicas contienen a los genes MEOX2 y TWIST1. Lo anterior, no solo en correlación con elevados niveles de expresión de MEOX2 y TWIST1, sino asociado con bajos niveles del código histónico H3K27me3 y elevados niveles de H3K4me3 en secuencias promotoras. En este sentido nuestro grupo de investigación ha propuesto que las marcas de represión *versus* activación, se encuentran asociadas a nivel pronóstico de supervivencia en pacientes con cáncer pulmonar del grupo NSCLC, así como a resistencia al tratamiento oncológico, evidenciando quimioresistencia *in vitro* a cisplatino en los modelos celulares A427 e INER37 (Avila-Moreno F, et al., 2014). En contraste a los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación, Xia et al., mediante ensayos de transfección en células de pulmón, A549, encontraron que la sobreexpresión de MEOX2 puede

inhibir su proliferación a través de un mecanismo molecular que inhibe la expresión de los factores de transcripción c-fos y c-jun (Xia et al., 2006). Más tarde, el mismo grupo de investigación encontró que en esta misma línea celular, la sobreexpresión de MEOX2 induce a apoptosis a través de un posible mecanismo que es capaz de inhibir a BCL-2 para que la proteína BAX pueda ser expresada (Xia et al., 2007). Otros autores han señalado la posible función supresora de MEOX2 además del cáncer pulmonar. Yan et al., indicaron una función supresora de MEOX2 implicado en la resistencia farmacológica en cáncer gástrico regulando negativamente a MDR1 cuando aumenta la expresión de E2F1 (Yan et al., 2014). Por otro lado, Zhou et al., demostraron que la sobreexpresión de MEOX2 es asociada a baja supervivencia en 25 pacientes con carcinoma hepatocelular (Zhou et al., 2012). Estos datos son correlacionados con alta expresión de miR-130a, un miRNA que regula negativamente a MEOX2 en carcinoma hepatocelular lo cual indica una posible función supresora en este tipo de tejido (Zhou et al., 2012).

Otro factor de transcripción que ha cobrado relevancia biológica y clínica en cáncer de pulmón es el factor de transcripción GLI-1 (Ishikawa et al., 2014). GLI-1 pertenece a la vía de señalización sonic hedgehog, cuyos miembros como SHH y LYVE-1 se encuentran asociados a progresión y pronóstico en NSCLC (Hwang et al., 2014). A pesar de su relevancia en el cáncer pulmonar, son escasos los trabajos que determinan la participación de GLI-1 durante la quimioresistencia. En células H441, se ha evaluado que GLI-1 provoca resistencia a la apoptosis inducida por estaurosporina y etoposido lo cual es asociado con aumento en la expresión de NDGR1 bajo el control de miembros de la familia de proteínas MYC (Wu et al.,

2015). En este sentido la inhibición de GLI1 mediante el uso de siRNAs en células A549 recientemente ha permitido determinar la importancia de GLI1 en la terapia oncológica pulmonar inducida a través de la vía de señalización SHH-GLI1 (Wu et al., 2015). Adicionalmente, se ha descrito que GLI1 regula la expresión de SOX2 para facilitar la autorenovación de células tipo troncal en tumores pulmonares del grupo NSCLC confiriendo resistencia a inhibidores de EGFR, evidenciando una función cooperativa entre la vía EGFR y SHH-GLI1 (Bora-Singhal et al., 2015). De manera reciente nuestro grupo de investigación mediante análisis del posicionamiento de MEOX2 sobre el epigenoma de carcinomas pulmonares derivados de pacientes, que MEOX2 controla la expresión de GLI-1, promoviendo la capacidad de resistencia a cisplatino, así como frente a terapia dirigida por el uso de TKIs, probablemente contribuyendo el eje transcripcional MEOX2-GLI1 hacia un pobre pronóstico y sobrevida en pacientes con cáncer pulmonar (Armas López L, et al., 2016).

Finalmente, diferentes vías de señalización como las vía MAPK, Akt, mTOR, NF- $\kappa$ B y la vía NOTCH han sido asociadas a mecanismos de resistencia a múltiples fármacos en cáncer de pulmón (Donev et al., 2011, Maione et al., 2015), así como su regulación a través de RNAs no codificantes entre ellos los miRNAs, los cuales se contemplan de alto potencial para comprender los mecanismos moleculares asociados a mecanismos de quimioresistencia farmaco-oncológica (Ammad et al., 2015).

## **1.5. QUIMIORESISTENCIA EN CÁNCER PULMONAR: Regulación post-transcripcional microRNAs**

Los microRNAs (miRNAs) pertenecen a un grupo de RNAs de cadena sencilla no codificantes de 19 a 21 nucleótidos implicados en la regulación génica a nivel post-transcripcional. Su función se encuentra asociada a diferentes procesos biológicos como el desarrollo, diferenciación celular, metabolismo, inmunidad, proliferación, apoptosis, senescencia, identidad celular y mantenimiento de la troncalidad (Liu et al., 2012; Wang et al., 2013; Kurisetty et al., 2014; Jin et al., 2014). Así mismo, poseen patrones de expresión temporales-específicos que pueden ser propios de una célula o tejido específicos y algunos de ellos pueden expresarse durante algunas etapas del desarrollo embrionario y otros únicamente en la fase adulta (Ambros, 2004; Soriano, et al., 2013). De acuerdo a su ubicación en el genoma, los miRNAs pueden ser de origen intragénico o intergénico. Son miRNAs intergénicos cuando su secuencia se encuentra localizada en regiones intrónicas o exónicas de mRNAs codificantes y no codificantes. Los miRNAs intragénicos, en cambio, se encuentran distribuidos a lo largo del genoma (genes miRNAs) y pueden ser transcritos de manera individual bajo la regulación de su propio promotor o compartir la región promotora cuando se encuentran agrupados (clusters) a partir de la síntesis de un transcrito policistrónico (Soriano, et al., 2013).

La biogénesis de los miRNAs comienza en el núcleo y es llevada a cabo por las enzimas RNA Pol-II y RNA Pol-III las cuales sintetizan un primer transcrito de 90 nt denominado pri-miRNA. Al igual que ocurre en mRNAs, este transcrito primario cuenta en su extremo 5' con una estructura casquete 7-metil-guanosina y una cola



poli-A en el extremo 3'. Debido a la naturaleza de su secuencia, los pri-miRNAs forman una estructura en forma de tallo-asa la cual es reconocida por un complejo denominado microprocesador formado principalmente por la RNasa de tipo II Drosha, y por la proteína de unión y reconocimiento al sitio de corte DGCR8. Este complejo proteico lleva a cabo la formación de un precursor conocido como pre-miRNA de 70 nt que, posteriormente, es exportado al citoplasma a través de los poros nucleares mediante la proteína exportina-5 y la proteína de unión a GTP Ran. Una vez en citoplasma, el pre-miRNA es reconocido por la endonucleasa de tipo III Dicer1, que se unirá a la pre-forma del miRNA y cortará la estructura de tallo-asa para generar un miRNA de doble cadena de 19 a 21 nt. Finalmente ambas cadenas se separarán por acción de la RNA helicasa A y la cadena 5' o 3' será incorporada al Complejo Silenciador Inducido por RNA (RISC), formado principalmente por la proteína argonauta Ago y TRBP2. En su conjunto, el complejo RISC actúa como guía del miRNA para llevar a cabo el reconocimiento de su mRNA blanco resultando en la represión post-transcripcional a través de la unión imperfecta de su UTR 3' de los mRNAs blancos y la región semilla del miRNA (secuencias de 7-8 nt localizados en el extremo 5' de miRNAs). Una vez que esto ocurre, el transcrito es almacenado en sitios específicos de la célula denominados cuerpos-P, los cuales se caracterizan como regiones de altas tasas de degradación de mRNAs; sin embargo, bajo condiciones de estrés, estos mRNAs almacenados pueden ser liberados y traducidos (Sen & Blau, 2005; Soriano et al., 2013). Por otra parte, cuando la unión del miRNA hacia su secuencia del mRNA blanco es de manera perfecta, los RNAm blancos son degradados mediante el proceso de desadenilación (Sen & Blau, 2005). Así mismo, ha sido importante reconocer que un solo miRNA puede unirse a

múltiples mRNAs, mientras que un solo mRNA puede ser regulado por múltiples miRNAs (Beitzinger, et al., 2010; Soriano, et al., 2013). Adicional a ello, se ha descrito que los miRNAs logran unirse no solo a regiones UTR 3' de los mRNAs blanco, sino también sobre la región UTR 5' de sus mRNA blanco, así como en la región codificante y en algunos casos menos frecuente, la unión puede ser mediada a través del extremo 3' de los miRNAs (Lee et al., 2009).

Por otro lado, se ha reportado la unión de miRNAs a regiones promotoras actuando como reguladores negativos del proceso de activación de la transcripción (Majid et al., 2010). Mientras que, en otros casos, esta función reguladora la llevan a cabo mediante la unión a ribonucleoproteínas (RNP) que usualmente actúan como activadores transcripcionales o represores (Eiring et al., 2010). Adicionalmente, se ha determinado que miRNAs logran unirse a dominios proteicos que reconocen y unen a estructuras secundarias de RNAs, actuando como señuelos para prevenir el posicionamiento de las RNP para abatir su función (Beitzinger, et al., 2010).

Debido al gran número de procesos biológicos en que participan los miRNAs, es común encontrar que su función se encuentra alterada en diferentes enfermedades malignas como el cáncer pulmonar (MacDonagh, et al., 2015). Al respecto, se ha determinado que dependiendo del gen blanco que regulen, los miRNAs pueden actuar ejerciendo una función supresora o activadora como desreguladores oncogénicos (oncomiRs) sobre diferentes tipos de cáncer. Uno de los primeros reportes que destacaron la relación entre los miRNAs y el cáncer de pulmón, fue llevado a cabo por Karube y colaboradores, aquí, los autores reportaron que niveles reducidos de DICER se encuentran asociados con pobre pronóstico de supervivencia

en muestras de pacientes del grupo NSCLC (Karube et al., 2005). Por otro lado, Yanaihara y colaboradores, evaluaron un perfil de expresión de miRNAs en cáncer de pulmón para investigar su posible participación en la carcinogénesis. Mediante un ensayo de microarreglos, se identificó un perfil único de expresión capaz por discriminar entre diferentes subtipos histológicos del grupo NSCLC. Dicho perfil de expresión fue descrito en correlación con sobrevida en pacientes con tumores del tipo adenocarcinoma pulmonar incluidos aquellos clasificados en estadio clínico I. Además, se ha determinado que la sobreexpresión de miR-155 y subexpresión de Let-7a-2 correlaciona con bajo pronóstico de sobrevida (Yanaihara et al., 2006). De manera similar, Chin et al., determinaron que la familia Let-7 es subexpresada en NSCLC indicando el papel de estos miRNAs como biomarcadores de bajo pronóstico de vida (Chin et al., 2008). De igual modo, se ha encontrado que la familia miR-29 (a-c) es frecuentemente subexpresada en NSCLC. En un estudio llevado a cabo por Fabbri et al., en un panel de 172 muestras de tejidos de NSCLC se encontró que la alta expresión de Dnmt3A es significativamente asociada a la subexpresión de la familia miR-29, lo cual además se correlacionó con bajo pronóstico de vida (Fabbri et al., 2007).

Por otro lado, se ha destacado la participación de los miRNAs en mecanismos de quimioresistencia en cáncer de pulmón. Destacando diversos genes afectados por la regulación de miRNAs, a menudo involucrados en la respuesta celular a terapias oncológicas como apoptosis, proliferación y mecanismos de eflujo de fármacos. La comprensión del papel de los miRNAs y mecanismos de resistencia a los fármacos oncológicos resultan de gran importancia para mejorar los resultados del

tratamiento (MacDonagh et al., 2015). Algunos ejemplos de miRNAs asociados a quimioresistencia en cáncer de pulmón incluyen la familia miR-103, miR-221/miR-222, los cuales han sido implicados en la resistencia al factor soluble TRAIL e inhibidores de EGFR (Garofalo et al., 2009; Garofalo et al., 2012). Entre otros reportes se incluyen la participación de miR-200b el cual confiere resistencia a agentes terapéuticos como platino y taxanos, donde además, ha sido reportada por su participación en la resistencia a agentes anti-angiogénicos (Feng et al., 2012; Fang et al., 2014). En este sentido, la resistencia hacia agentes basados en platino e inhibidores de EGFR ha sido fuertemente atribuida a niveles elevados de miR-21, el cual, no sólo induce a la resistencia a cisplatino sino también a radioterapia (Li et al., 2014). Así mismo, se ha demostrado que un solo miRNA logra inducir resistencia a diferentes fármacos y tratamientos oncológicos mediante la regulación de genes blanco distintos. Un ejemplo de ello, resulta el estudio de miRNAs en la resistencia a inhibidores de tirosina-kinasas en pacientes del grupo NSCLC, reportando que miR-30b/c, miR-221/222, miR-103 y miR-203 desempeñan un papel importante en el control del proceso de apoptosis y transición epitelio-mesenquima (EMT, por sus siglas en inglés) inducida por gefitinib en células del grupo NSCLC *in vitro* e *in vivo*, mediante la regulación de Bim, Apaf-1, PKC- $\epsilon$  y genes SRCs (Garofalo et al., 2012). Por el contrario, la expresión alterada de miR-221/222 se demostró en la resistencia a TRAIL través de la regulación específica de PTEN y TIMP3 (Garofalo et al., 2008).

Con base en lo anterior, resulta obligado reconocer la participación que poseen los miRNAs en los procesos de resistencia a fármacos oncológicos como cisplatino en NSCLC. Destacando entre muchos otros, la participación de miR-21 en la

sensibilidad a cisplatino en células de cáncer pulmonar A549 (Xu et al., 2014). De manera similar, miR-92b es capaz por inducir crecimiento celular y resistencia a cisplatino en células A549 mediante la regulación negativa de PTEN (Li et al., 2013). Mientras que, mediante la regulación de la concentración interna de cisplatino a través de ABCB9, miR-31 inhibe la apoptosis inducida por cisplatino en líneas celulares resistentes *in vitro* (Dong et al., 2014).

Mientras que en muestras de suero, elevados niveles de miR-638 posterior a la quimioterapia son asociados con baja supervivencia en pacientes del grupo NSCLC (Wang et al., 2015). Así mismo, se ha descrito que miR-148b revierte la resistencia a cisplatino mediante la regulación negativa de DNMT1 (Sui et al., 2015). Por su parte, se ha reportado que miR-15b regula la resistencia a cisplatino y metástasis regulando a la baja a PEBP4 en adenocarcinomas pulmonares (Zhao et al., 2015). Así mismo Harel y colaboradores, han reportado que mediante la reactivación epigenética de miR-512 y miR-373 sensibilizan a células tumorales al efecto citotóxico por cisplatino actuando con función supresora e inhibiendo al factor de la transcripción RelA y enzima de fosforilación PIK3CA (Harel et al., 2015). Por su parte, Zhang y colaboradores establecieron que miR-107 juega un papel importante en la resistencia a cisplatino regulando negativamente a CDK8, proponiendo a miR-107 como un potencial marcador en NSCLC (Zhang et al., 2014). Sin embargo, a pesar de la creciente evidencia de los miRNAs en la resistencia a cisplatino en NSCLC, hasta el momento, no existen estudios que relacionen de manera directa la regulación post-transcripcional de miRNAs enfocada a potenciales genes blanco involucrados directa o indirectamente en la resistencia al tratamiento oncológico,

incluidos en el presente estudio; por lo cual, el estudio contemplo el análisis de asociación entre miRNAs-mRNAs de los genes MEOX2, TWIST1, GLI1, OCT4, ABCG2, BMI1 y EZH2, lo cual probablemente permitirá contribuir hacia el entendimiento de los mecanismos de regulación genético-epigenético y post-transcripcional asociados con la resistencia al tratamiento oncológico entre ellos, frente a cisplatino en pacientes con NSCLCs. Adicional a lo anterior, resultan escasos los estudios que establezcan el análisis de miRNAs como controles endógenos de expresión de miRNAs durante las reacciones de RT-qPCR en estudios de quimioresistencia oncológica. En terminos generales, U6 ha fungido como control endógeno en reacciones de cuantificación de perfiles de expresión de miRNAs por su elevada estabilidad en diversos tejidos. Sin embargo, se ha estimado que algunos miRNAs se mantienen constantes en un gran número de tejidos y líneas celulares. Mediante un estudio llevado a cabo por Applied Biosystems para evaluar la tasa de cambio de miRNAs propuestos como controles endógenos, en diferentes líneas celulares (incluidas NSCLCs), se estableció que hsa-miR-423, hsa-miR-16 y hsa-miR-374 pueden actuar como adecuados controles endógenos. Sin embargo, es amplia la evidencia que colocan a miR-16 como un miRNA altamente desregulado en diversos procesos del cáncer, incluido la quimioresistencia (Han J & Chen Q. 2015). Además, recientes trabajos indican que miR-423 puede jugar un papel importante en procesos neoplásicos (Li et al., 2015). Por otra parte, son pocos los trabajos que indican la participación de miR-374 en cáncer y quimioresistencia (Li et al., 2015), por lo que el presente trabajo contribuyó su estudio en contribución por determinar su participación en fenómenos de quimioresistencia oncológica pulmonar.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los esquemas de tratamiento fármaco-oncológico de primera y segunda línea basados en platino (Carbo y/o Cis-platino), representan los principales protocolos de tratamiento en pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas. Sin embargo, a pesar de la respuesta inicial favorable y de los recientes avances en esquemas de terapias oncológicas pulmonares, los mecanismos de resistencia a fármacos oncológicos permanecen como uno de los principales obstáculos que limitan la eficacia del tratamiento, contribuyendo a elevados índices de mortalidad.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Antecedentes previos descritos por nuestro grupo de investigación indican que MEOX2, TWIST1, y GLI1, entre otros reportados por distintos autores como OCT4, ABCG2, BMI1 y EZH2 pueden ser biomarcadores potenciales de resistencia a cisplatino. Sin embargo, actualmente son pocos los trabajos que reportan los mecanismos de regulación post-transcripcional a nivel de microRNAs en la regulación de MEOX2, TWIST1, GLI1, OCT4, ABCG2, BMI1 y EZH2 en la resistencia a cisplatino en células tumorales de NSCLC. Por tal motivo, resulta importante identificar un perfil de expresión de miRNAs asociados a genes funcionalmente asociados al proceso de resistencia a cisplatino en pacientes diagnosticados con NSCLC.



#### 4. HIPÓTESIS

La exposición continua a cisplatino en líneas celulares de NSCLC (A549, A427, INER51 e INER37) permitiría inducir la capacidad de quimioresistencia a través del incremento gradual del fármaco. Cambios de expresión de MEOX2, TWIST1, GLI1, OCT4, ABCG2, BMI1 y EZH2 podrían ocurrir durante el proceso de adaptación al fármaco así como de sus miRNAs reguladores. Por lo tanto, a partir del establecimiento de un modelo celular *in vitro* resistente a cisplatino, se podría obtener un perfil de expresión de miRNAs diferencialmente expresados en la quimioresistencia respecto a líneas celulares parentales (células sin tratamiento).

## **5. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Analizar la expresión de miRNAs predictivos que regulen la expresión de los genes MEOX2, TWIST1, GLI1, OCT4, ABCG2, BMI1 y EZH2 en líneas celulares de cáncer de pulmón resistentes a cisplatino.

### **Objetivos particulares**

1. Identificar mediante análisis bioinformático los miRNAs cuyos blancos predictivos potenciales sean los genes MEOX2, TWIST1, GLI1, OCT4, ABCG2, BMI1 y EZH2 asociados a la resistencia a fármacos.
2. Establecer líneas celulares de resistencia farmacológica a largo plazo (19 meses A549, A427 e INER37 y 17 meses INER51) frente a incrementos graduales de cisplatino usando líneas celulares de cáncer pulmonar A549, A427, INER51 e INER37.
3. Determinar el incremento en la capacidad de resistencia a cisplatino de líneas celulares quimioresistentes comparadas con células tumorales parentales de cáncer pulmonar mediante ensayos de viabilidad celular.
4. Determinar la expresión de miR-301a, miR-543, miR-487, miR-145, miR-361a, miR-221 y miR-217 en células tumorales resistentes a cisplatino comparadas con células de cáncer pulmonar.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1. Análisis de predicción bio-informática miRNA versus mRNAs blanco**

El análisis de predicción *in silico*, realizado para determinar los posibles miRNAs asociados a MEOX2, TWIST1, GLI1, OCT4, ABCG2, BMI1 y EZH2, fue llevado a cabo empleando las plataformas del [microrna.org](http://www.microrna.org), TargetScan 7.0, y miRWalk2 disponibles respectivamente en: <http://www.microrna.org>, [www.targetscan.org](http://www.targetscan.org) y <http://zmf.umh.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/index.html>.

En todos los casos se seleccionaron los miRNAs de mayor probabilidad de acuerdo al mejor valor de predicción de cada plataforma consultada.

### **6.2. Cultivos de las líneas celulares de cáncer pulmonar A549, A427, INER51 e INER37**

Las líneas celulares A549 y A427 (adenocarcinoma pulmonar, de origen caucásico), fueron adquiridas del American Type Culture Collection (ATCC). Las líneas celulares INER51 e INER37 (adenocarcinoma pulmonar) fueron establecidas en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Brevemente, éstas líneas fueron purificadas a partir de muestras de efusión pleural derivadas de pacientes mestizo-mexicanos diagnosticados con cáncer pulmonar primario del grupo NSCLC subtipo adenocarcinoma. El diagnóstico histológico fue confirmado mediante análisis morfológico e inmunohistoquímica (Lucio et al., 2005).

Los cultivos celulares fueron mantenidos en medio RPMI 1640 (BioWest) suplementado con 10% de SFB (BioWest), HEPES 1M (BioWest), 2 mM L-glutamina (Biowest), 1mM piruvato de sodio (BioWest) y solución antibiótica de penicilina

10,000 I.U. y estreptomina y 10,000 µg/ml (BioWest) a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 C° en cajas de cultivos T25 (TPP). Una vez que las células fueron confluentes (< 80-90%), el medio fue removido por aspiración y las células fueron incubadas en 1 ml de solución de tripsina 1X (Tripsina 10X -BioWest- diluida en PBS 1X -BioWest- libre calcio y magnesio), e incubadas a 37°C por 5-10 minutos. Posteriormente, la tripsina fue inactivada con 1 ml de medio RPMI complementado y las células fueron centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos. El botón de células fue diluido en 3 ml de medio RPMI complementado y una alícuota de 10 µl fue obtenida para el conteo celular mediante solución 0.5% de azul de tripano (BioWest) a partir de un factor de dilución de 1:1. Una vez obtenido el número de células estimado ( $3.5 \times 10^5$ ), éstas fueron sembradas en cajas de cultivo T25 a un volumen final de 5 ml de medio RPMI complementado.

### **6.3. Establecimiento de las líneas celulares A549, A427, INER51 e INER37 resistentes a cisplatino**

Los cultivos de las líneas celulares A549, A427, INER51 e INER37 fueron sometidos a reto farmacológico empleando una concentración inicial de 1.25 µM de cisplatino (Sigma-Aldrich). Dicha concentración inicial fue seleccionada con base a las capacidades de resistencia intrínseca de cada línea celular determinadas mediante ensayos previos de viabilidad celular frente a cisplatino empleando ensayos de MTT en nuestro laboratorio. Las células fueron sembradas a una concentración de  $3.5 \times 10^5$  células en caja de cultivo T25 y mantenidas 24 horas en medio de cultivo libre de fármaco y posteriormente 24 horas en medio con fármaco (48 horas totales), tiempo en el cual los cultivos alcanzaron confluencia en el rango de 65-75%.

Una vez que líneas celulares A549 y A427 superaron el reto farmacológico de 1.25 uM de cisplatino, la dosis del fármaco se incrementó de manera gradual empleando los siguientes intervalos de 1.5 uM, 2 uM, 3 uM, 3.5 uM, 4.5 uM hasta que la viabilidad de cultivos celulares se mantuvo estable a una concentración final de 5 uM de cisplatino a 6, 8 y 12 meses de exposición continua. A su vez, las líneas celulares INER51 e INER37 fueron sometidas a retos farmacológicos empleando intervalos de 1.5 uM, 1.75 uM y 2 uM de cisplatino hasta alcanzar cultivos estables a 2.5 uM de cisplatino a 6, 8 y 12 meses. Al término del lo anterior, las líneas celulares resistentes a cisplatino a largo plazo se denominaron A549 Cis-R, A427 Cis-R, INER51 Cis-R e INER37 Cis-R.

#### **6.4. Ensayos de viabilidad celular por citotoxicidad a MTS**

Para determinar las diferencias en la capacidad de resistencia a cisplatino entre células parentales y células tratadas con cisplatino Con base enl valor de IC:50 (concentración inhibitoria máxima media), se llevaron a cabo ensayos por MTS para estimar el número de células viables en proliferación. Debido a diferencias en la tasa de replicación entre las diferentes líneas celulares y entre células parentales y resistentes, se sembró un número de células que al cabo de 72 horas, alcanzaron una confluencia > al 95%. Para la línea celular A549 se sembraron 6,500 células (parentales y resistentes) por pozo, A427 (parentales y resistentes) 8,000 células por pozo, INER51 6,500 y 9,000 células parentales y resistentes respectivamente, INER37 4,000 y 9,000 células parentales y resistentes respectivamente. Cada pozo fue llevado a un volumen final de 100 ul y se realizó por triplicado. Posteriormente, a las 24 horas, se agregó una dosis escalda de 0, 5, 10, 17, 30, 53, 95, 169 y 340

uM de cisplatino durante 48 horas. Finalmente, se agregó 20 ul de MTS (Promega) por pozo incubando por 2 horas. La reacción se detuvo usando 25 ul de SDS 10% y las placas fueron leídas 14 horas después en un espectrofotómetro (Epic).

### **6.5. Extracción y purificación de RNA total por Trizol**

Una vez cumplidas las 24 horas con el fármaco, las células fueron incubadas con 1 ml de solución de tripsina 1X por 5-10 minutos a 37°C. Posteriormente, se inactivó con 1 ml de RPMI complementado y las células obtenidas fueron centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos. Al término de esto, se decantó la solución y brevemente se centrifugó el tubo para precipitar los remanentes de la solución, el cual fue removido con una punta de 200 ul. Inmediatamente, el botón de células se diluyó en 1 ml de solución de PBS 1X y se centrifugó a 1500 RPM por 5 minutos. La solución de PBS 1X fue decantada y el tubo se centrifugó brevemente, al término de esto, el remanente se retiró con una punta de 200 ul. Enseguida, se adicionó 1 ml de Trizol (Life Technologies) y se agitó vigorosamente por 1 minuto y dejó incubando 5 minutos a TA. Al término de esto, se agregó 200 ul de cloroformo agitando vigorosamente por 15 segundos y el tubo se aseguró colocando papel parafilm alrededor de la tapa para evitar derrames. El tubo se dejó incubando por 3 minutos a TA y se centrifugó a 12,000 x *g* por 15 minutos a 4°C. Una vez terminado el tiempo de centrifugación, se obtuvo la fase acuosa la cual fue depositada en un tubo con 500 ul de isopropanol e incubada a 10 minutos a 4°C; la fase orgánica e interfase fueron almacenadas a -20°C para futuros ensayos. Al término del tiempo de incubación, la muestra se centrifugó a 12,000 x *g* por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue decantado y el tubo fue centrifugado brevemente para remover el

remanente con una punta de 200  $\mu$ l. La pastilla fue lavada inmediatamente con dos lavados de etanol al 75% centrifugando a 7,500 x g por 5 minutos a 4°C. Al término de cada ciclo de centrifugación, el tubo fue centrifugado brevemente para remover los excedentes de alcohol con una punta de 200  $\mu$ l. La cantidad de alcohol que se dejó fue la suficiente para cubrir el volumen de la pastilla, esto con la finalidad de disminuir los problemas de dilución. Finalmente, la pastilla se diluyó en 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas.

Las muestras de RNA total fueron cuantificadas mediante espectrofotometría a 260/280 nm y 230/260 nm de longitud en un espectrofotómetro para microplacas Epoch (BioTek).

#### **6.6. Diseño de oligonucleótidos para ensayos de amplificación de miRNAs**

El diseño de primers se realizó mediante el programa miRprimer 2. Este consistió en introducir la secuencia en formato FASTA del miRNA de interés en el archivo *input\_miRs*. Posteriormente, al iniciar el ejecutable miRprimer 2, el programa generó de manera automática los archivos *result\_all\_primer\_pairs*, *result\_best\_primer\_pairs*, *result\_comparison\_of\_pairs*, *result\_f\_primers* y *result\_r\_primers*. Del archivo *result\_best\_primer\_pairs*, se seleccionó el primer juego de primers Con base en el mejor valor de *score* obtenido.

#### **6.7. Ensayos de detección de miRNAs por RT-qPCR y SYBR green**

La cuantificación de miRNAs por RT-qPCR se llevó a cabo por el método **miR-specific RT-qPCR** establecido por Balcells y Busk (Balcells et al., 2011; Busk, 2014). Brevemente, el método consistió en una reacción de poliadenilación de los

miRNAs maduros seguido de una retrotranscripción mediante un primer-RT universal (VNTTTTTTTTTTTTTTTGGACCTGGAC). El primer-RT fue diseñado para hibridar con la región de la cola poli-A de los miRNAs poliadenilados, permitiendo así, la síntesis de cDNA. Finalmente, mediante el uso de los primers descritos anteriormente, se llevó a cabo la reacción de amplificación por SYBR green. Para normalizar la reacción, se empleó el método de **cuantificación relativa**, usando como control endógeno de la reacción los primers para U6 (Saito et al., 2006) (forward primer: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', reverse primer: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3') debido a su constante estabilidad en diferentes tejidos reportado previamente (Choong et al. 2007; Corney et al. 2007; Shell et al. 2007, Yang et al., 2015), así como su expresión constante en ambas líneas celulares (parentales y resistentes. Tambié, como control endógeno de la reacción, se usaron los primers para miR-374 de acuerdo a lo publicado por Applied Biosystems (Applied Biosystems, 2007). El juego de primers para la amplificación de miR-374 fue generado de igual manera con el programa miRprimer2.



### 6.7.1. Síntesis de cDNA a partir de miRNAs maduros

La reacción de síntesis de cDNA se realizó mediante el proceso de poliadenilación y retrotranscripción de acuerdo a lo siguiente:

Reactivo	Concentración
RNA total	1000 ng
Buffer poly (A) polymerase	1 ul
ATP	0.1 mM
RT primer	1 uM
dNTPs	0.1 mM
M-MuLV*	100 U
Poly (A) polymerase*	1 U
H2O	Volumen final 10 ul

\* New England Biolabs

El tubo de la reacción se incubó a 42 °C por una hora seguido de una inactivación a 95 °C por 5 minutos. El producto obtenido fue almacenado a -20 °C.

### 6.7.2. Amplificación de cDNA de miRNAs maduros

Una vez obtenido el cDNA, se procedió a amplificar el miRNA de interés en un termociclador LightCycler480 II (Roche) de acuerdo a lo siguiente:

Reactivo	Concentración
cDNA (1:10)	1 ul
SYBR green master mix 2X*	5 ul
Primer F	250 nM
Primer R	250 nM
H2O	Volumen final 10 ul

\*KAPA Biosystems

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

# Ciclos	Tiempo	Temperatura
1	10 min	95 °C
40	45 seg	95 °C
	45 seg	60 °C

Finalmente, se realizó el análisis de las curvas de disociación en un rango de temperatura de 60°C a 99°C.

## 6.8. Síntesis de cDNA de mRNAs

La síntesis de cDNA se llevó a cabo con el kit ProtoScript First Strand (New England Biolabs) de acuerdo a lo siguiente:

Reactivo	Concentración
RNA total	1 ug
d(T)23VN (50 $\mu$ M)	2 ul
H2O	Volumen final 10 ul

El tubo de la reacción se incubó a 70°C por 5 minutos e inmediatamente se colocó en hielo. Posteriormente se adicionó 10 ul de M-MuLV Reaction Mix y 2 ul de M-MuLV Enzyme Mix. La reacción se incubó a 42 °C durante 1 hora y se inactivó 80 °C por 5 minutos.

## 6.9. Detección de mRNAs por RT-qPCR

La cuantificación de RNAs mensajeros de ABCG2 se llevó a cabo por sonda UPL (Roche) en un termociclador LightCycler 480 II (Roche) de acuerdo a lo siguiente:

Reactivo	Concentración
cDNA (1:10)	1 ul
Primer F y R (250 uM)	0.3 ul
Sonda UPL	0.1 ul
Probe master	5 ul
H2O	Volumen final 10 ul

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

# Ciclos	Tiempo	Temperatura
1	10 min	95 °C
	10 seg	95 °C
40	17 seg	60 °C
	1 seg	72 °C

#### **6.10. Extracción de proteínas mediante Trizol**

El aislamiento de las proteínas procedió del mismo lisado celular donde se obtuvo el RNA previamente descrito. Brevemente, la fase orgánica fue incubada en 0.3 ml de etanol absoluto por 1 ml de Trizol durante 3 minutos a TA. Posteriormente, se centrifugó a 2,000 x *g* por 5 minutos a 4°C y el sobrenadante fue dividido en dos tubos de 1.5 ml. Para precipitar la proteína, se agregó 1 ml de isopropanol y la muestra se incubó 10 minutos a TA. Al término del tiempo de incubación, se centrifugó a 12,000 x *g* por 10 minutos a 4° y el sobrenadante fue decantado quitando el remanente con una punta de 200 ul.

Posteriormente, se realizaron 3 lavados incubando la muestra con 1.5 ml de solución de lavado (0.3 M de clorhidrato de guanidina en 95% de alcohol) durante 20 minutos a TA. Las muestras fueron centrifugadas a 7,500 x *g* por 5 minutos a 4°C y la solución fue decantada quitando el remanente con una punta de 200 ul. Al finalizar los 3 lavados, se agregó 1.5 ml de etanol absoluto agitando en el vortex y se incubó 20 minutos a TA. La muestra se centrifugó a 7,500 x *g* por 5 minutos a 4°C y el sobrenadante se decantó y el remanente fue removido con una punta de

200 ul. Inmediatamente, se agregó 100 ul de solución 1% de SDS a incubando a 50°C hasta que las proteínas fueron totalmente disueltas. Una vez logrado esto, se centrifugó a 10,000 x g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y almacenado a - 20 °C.

### **6.11. Análisis de proteínas mediante Western blot**

Una vez obtenidas las proteínas, estas fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida de acuerdo a lo siguiente: gel separador 12% de 5 ml (1.7 ml de H<sub>2</sub>O, 2 ml de 30% mix de acrilamida -29.2% acrilamida y 0.8% N.N. metileno-bis-acrilamida-, 1.3 ml de 1.5 M Tris pH 8.8, 0.05 ml de SDS 10%, 0.05 ml de APS 10% y 0.002 ml de TEMED); y 2 ml de gel concentrador (1.4 ml de H<sub>2</sub>O, 0.33 ml de 30% mix de acrilamida, 0.25 ml de Tris 1M pH 6.8, 0.02 ml de SDS 10%, 0.02 ml de APS 10% y 0.002 ml de TEMED). Por cada muestra, se utilizaron 30 µg de proteína junto con 5 ul de buffer de corrida. El tubo con la muestra y el buffer fueron incubados en agua hirviendo por 10 minutos y colocados en hielo inmediatamente al término del tiempo de incubación.

La electroforesis se realizó con buffer de corrida (1 mM de tal y tal) a 120 V hasta que la banda de azul de Coomassie salió del gel. Posteriormente, se llevó a cabo una transferencia semi-seca en un equipo Pierce G2 Fast Blotter (Thermo Scientific) colocando del lado del ánodo, 2 hojas de papel filtro húmedas seguido de una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (BioRad), el gel de poliacrilamida, dos hojas de papel filtro húmedas y el cátodo. La transferencia se realizó a 25 V y 1.3 A por 10 minutos. Para confirmar la transferencia, la membrana se incubó con rojo de Ponceau hasta que las bandas fueron visibles. Al término de esto, se realizó un

lavado con H<sub>2</sub>O destilada hasta remover los remanentes de la solución de Ponceau seguido de un lavado con PBS 1X y un lavado final con solución PBS 1X, 5% de leche en polvo y 0.1 % Tween 20.

Posteriormente, se realizaron dos lavados con solución PBS 1X + 0.1 % Tween 20 por 15 minutos cada uno, seguido de dos lavados con PBS 1X por 15 minutos cada uno. Al término de ellos, la membrana se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C en solución PBS 1X, 0.1% Tween 20 y 5% de leche en polvo. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados a la membrana con solución PBS 1X + 0.1% Tween 20 por 15 minutos cada uno, seguido de 3 lavados con PBS 1X 15 minutos cada uno.

Finalmente, para llevar a cabo la detección de la proteína de ABCG2 y MEOX2 la membrana se incubó con anticuerpo secundario en solución PBS 1X, 0.1% Tween 20 y 5% de leche en polvo por 1-2 horas a TA. Posteriormente, se realizaron 3 lavados a la membrana con solución PBS 1X + 0.1% Tween 20 por 15 minutos cada uno seguido de un lavado con PBS 1X y un lavado con H<sub>2</sub>O destilada por 15 minutos cada uno. La detección de la señal quimioluminiscente se llevó a cabo incubando la membrana en 200 ul de solución SuperSignal West Femto Stable Peroxide Buffer (Thermo Scientific) y 200 ul de solución SuperSignal West Femto Luminol/ Enhancer solution (Thermo Scientific) por 1 minuto a TA. Inmediatamente, se colocó la membrana en el lector de membranas C-Digit 3600 (LI-COR) para obtener la imagen deseada.

## **6.12. Análisis estadístico**

El análisis de resultados fue realizado mediante la prueba *t* de *student* con análisis de muestras pareadas con un nivel de significancia de 95% (donde un valor de *P* calculado menor a 0.05 indica diferencias estadísticas significativas). Para el análisis de datos se utilizó el software GraphPad Prism versión 6.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Identificación *in silico* de miRNAs de genes blanco

El uso de las diferentes plataformas permitió determinar *in silico* la posible interacción miRNA-mRNA con mayor probabilidad de asociación. Para cada uno de los genes, fue seleccionado el miRNAs con mayor probabilidad de interacción en base los mejores valores de predicción de cada plataforma: 1) miRanda: mirSVR score y PhastCons score, 2) TargetScan 7.0: Context++ score, Context++ score percentile, Weighted context++ score (Agarwal et al., 2015), Conserved branch length y P<sub>CT</sub> (Friedman et al., 2009) y miRWalk 2.0: mayor valor de SUM de acuerdo la probabilidad de cada una de las bases de datos (miRDB, PITA, MicroT4, miRMap, RNA22, miRanda, miRNAMap, RNAhybrid, miRBridge, PICTAR2 y TargetScan). Posteriormente, fue seleccionado un solo miRNA para cada blanco génico entre los diferentes miRNAs predichos *in silico* Con base en el mejor valor de probabilidad. Adicionalmente, se llevó a cabo la búsqueda de antecedentes experimentales publicados en PubMed y ScienceDirect incorporando información asociada a carcinomas sólidos pulmonares del grupo NSCLC, líneas celulares de cáncer de pulmón (A549, A427, INER51 e INER37), resistencia a cisplatino y análisis de expresión de los marcadores genéticos MEOX2, TWIST1, GLI1, OCT4, ABCG2, BMI1 y EZH2. Finalmente, el resultado obtenido fue la selección de miRNAs potencialmente asociados al proceso de quimioresistencia a cisplatino en cáncer pulmonar del grupo NSCLC y cuya participación se desconoce o es parcialmente conocida (p.e. miR-145).



Con base en lo anterior, los miRNAs que se seleccionaron para cada blanco génico fueron representados de la siguiente manera: miR-301a/MEOX2 (Fig. 1), miR-543/TWIST1 (Fig. 2), miR-487a/ABCG2 (Fig. 3), miR-145/OCT4 (Fig. 4), miR-361/GLI1 (Fig. 5), miR-221/BMI1 (Fig. 6 ) y miR-217/EZH2 (Fig. 7).

## miR-301a / MEOX2

**A** **hsa-miR-301a/MEOX2 Alignment**

<pre> 3' cgAAACUGUUAUGAUACGUGAc 5' hsa-miR-301a         :  :        420:5' uaUUUGCUUUUGC--UUGCACUg 3' MEOX2                 </pre>	<pre> mirSVR score: -0.5809 PhastCons score: 0.6681                 </pre>
--	--

miR-590-3p  
 miR-152  
 miR-148b  
 miR-148a  
 miR-130a  
 miR-130b  
 miR-301a  
 miR-301b  
 miR-454

miR-1  
 miR-206 miR-342-3p  
 miR-613 miR-377

376 GAACAUUCCAGAUGUGAGAUCAUGUGUAUUACAGUGGCAGGUUUUGCUUUUGCUUGCACUGAAAAUUAAA 450

**B**

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	P <sub>CT</sub>
Position 280-286 of MEOX2 3' UTR	<pre> 5' ...UGUGUUUGCUUUUGCUUGCACUG...                  hsa-miR-301a-3p 3' CGAAACUGUUAUGAUACGUGAC                 </pre>	7mer-m8	-0.19	89	-0.19	3.875	0.67

**C**

Gene	EntrezID	RefseqID	miRNA	miRWalk	Microt4	miRanda	mirbridge	miRDB	miRMap	miRNAMap	Pictar2	PITA	RNA22	RNAhybrid	Targetscan	SUM
MEOX2	4223	NM_005924	hsa-miR-301a-3p	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	11

**Figura 1. Análisis de predicción de miR-301a para regular la expresión del gen MEOX2.** A) Plataforma: microrna.org. (Arriba) Región semilla donde se lleva a cabo la interacción por alineamiento de bases entre el miRNA y el mRNA blanco, así como el valor de score (mirSVR). (Abajo) Región de interacción entre miR-301a y el mRNA de MEOX2 junto con otros posibles miRNAs reguladores del mRNA. B) Plataforma: TargetScan. Se indica la región semilla, el número de apareamientos y los diferentes valores de predicción (score). C) Plataforma: miRWalk. Análisis con base en 11 de las 12 plataformas consultadas mediante el programa miRWalk muestran la posible interacción de miR-301a sobre el gen MEOX2.

## miR-543 / TWIST1

**A** **hsa-miR-543/TWIST1 Alignment**

3' uucuucACGUGGCGCUUACAAa 5' hsa-miR-543	mirSVR score: -1.2907
	PhastCons score: 0.6583
307:5' uuuuuuUG-ACGAAGAAUGUUu 3' TWIST1	

miR-543

miR-181d  
miR-181c  
miR-181b  
miR-181a

miR-96  
miR-1271

301 UUUUUUUUUUUUGACGAAGAAUGUUUUUUUUUUUUUUUUUCAUGCAUGCAUUCUCAAGAGGUCGUGCCAAUC 375

**B**

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	P <sub>CT</sub>

**C**

Gene	EntrezID	RefseqID	miRNA	miRWalk	Microt4	miRanda	mirbridge	miRDB	miRMap	miRNAMap	Pictar2	PITA	RNA22	RNAhybrid	Targetscan	SUM
<a href="#">TWIST1</a>	7291	<a href="#">NM_000474</a>	<a href="#">hsa-miR-543</a>	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	8

**Figura 2. Análisis de predicción de miR-543 en la regulación de la expresión del gen TWIST1.** A) Plataforma: microrna.org. (Arriba) Región semilla donde se lleva a cabo la interacción entre el miRNA y el mRNA así como el valor de score (mirSVR). (Abajo) Región de interacción entre miR-543 y el mRNA de TWIST1 junto con otros posibles miRNAs reguladores del mRNA. B) Plataforma: TargetScan. Sin resultado de predicción. C) Plataforma: miRWalk. 8 de las 12 plataformas consultadas por miRWalk muestran la posible interacción de miR-543 sobre el gen TWIST1.

## miR-487a / ABCG2

**A**

ABCG2 Alignment	
910:5' uacUUUAUAUACCUUAUGUUCUCu 3' ABCG2	mirSVR score: PhastCons score:
<p>miR-520e miR-373 miR-372 miR-302d miR-302c miR-302b miR-302a miR-520c-3p miR-520b miR-520d-3p miR-520a-3p</p> <p>1 AUUUCCCCUAAUUCAGUAUGAUUUUUAUCCUCACAUAAAAAGAAGCACUUUGAUUGAAGUAUUCAAUCAAGUUUU 75</p>	

**B**

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	P <sub>CT</sub>
Position 58-64 of ABCG2 3' UTR hsa-miR-487a-3p	5' ...ACGUGCCUUGGCUUGUAUGAUU...       3' UUGACCUACAGGGACAUACUAA	7mer-m8	-0.17	92	-0.17	3.539	N/A

**C**

Gene	EntrezID	RefseqID	miRNA	miRWalk	MicroT4	miRanda	mirbridge	miRDB	miRMap	miRNAMap	Pictar2	PITA	RNA22	RNAhybrid	Targetscan	SUM
ABCG2	9429	NM_004827	hsa-miR-487a-3p	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	8

**Figura 3. Análisis de predicción de miR-487a sobre la expresión del gen ABCG2.** A) Plataforma: microrna.org. No fue posible la detección o resultado de predicción. B) Plataforma: TargetScan. Se indica la región semilla, el número de apareamientos y los diferentes valores de predicción (score). C) Plataforma: miRWalk. 8 de las 12 plataformas consultadas por miRWalk muestran la posible interacción de miR-487a sobre el gen ABCG2.

## miR-145 / OCT4

**A**

G
POU5F1 Alignment

2:5' gugccugcccccUUCUAGGAAu 3' POU5F1

mirSVR score:  
PhastCons score:

miR-93  
miR-519d  
miR-20b  
miR-20a  
miR-17  
miR-106b  
miR-106a

miR-335      miR-299-3p

151 GCAACUGGUUGGAGGGGAAGGUGAAGUUCAAUGAUGCUCUUGAUUUUAAUCCACAUCUAUGUAUCACUUUUUUUU 225

**B**

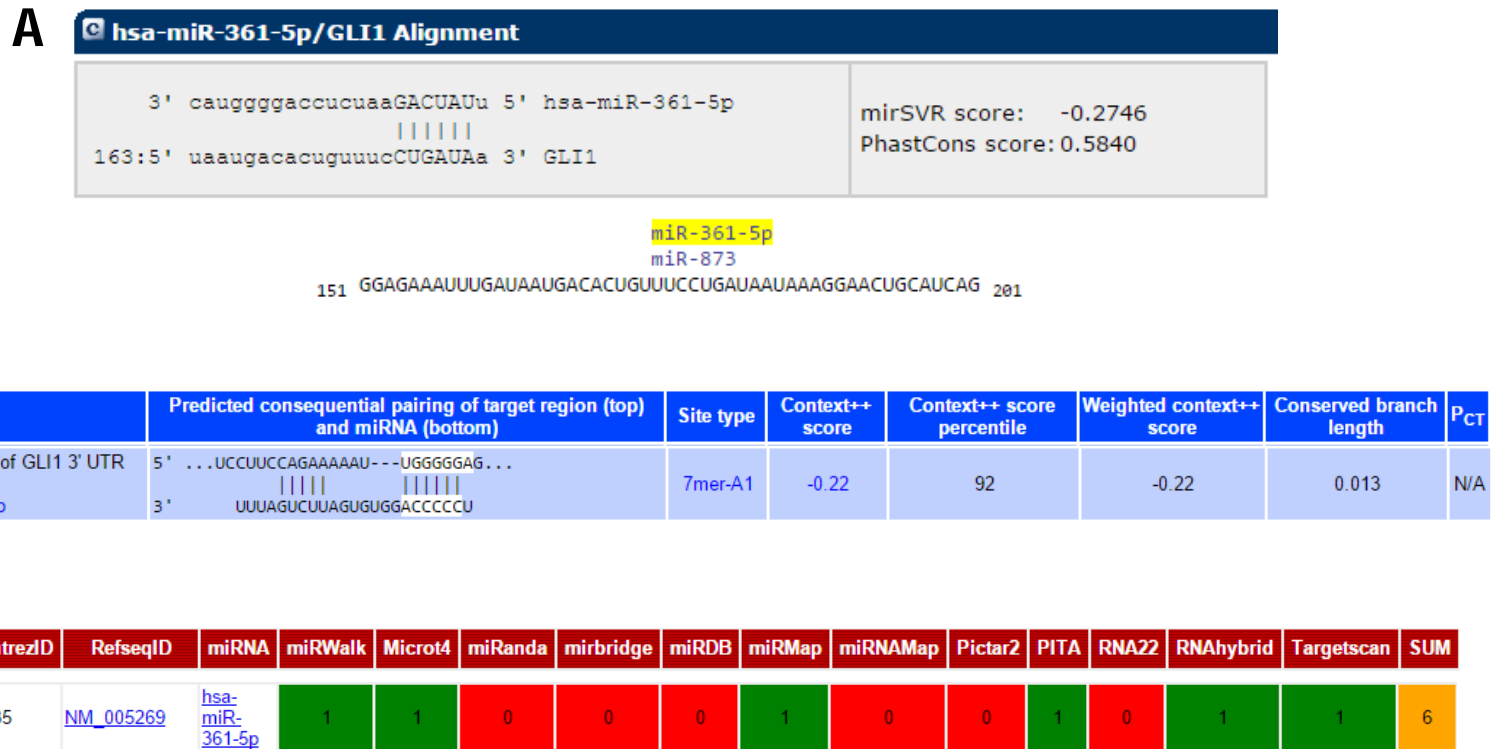
	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	P <sub>CT</sub>

**C**

Gene	EntrezID	RefseqID	miRNA	miRWalk	Microt4	miRanda	mirbridge	miRDB	miRMap	miRNAMap	Pictar2	PITA	RNA22	RNAhybrid	Targetscan	SUM
------	----------	----------	-------	---------	---------	---------	-----------	-------	--------	----------	---------	------	-------	-----------	------------	-----

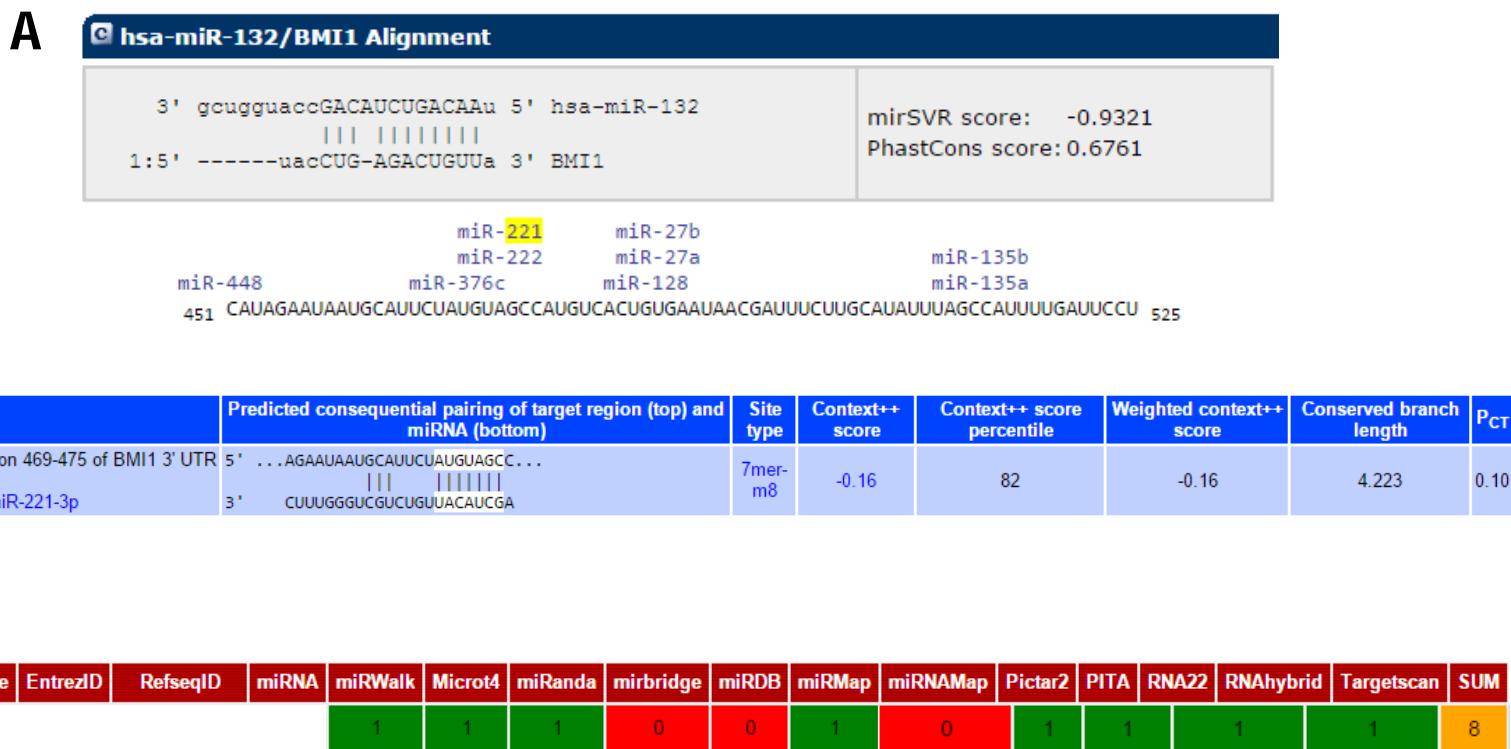
**Figura 4. Análisis de predicción de miR-145 sobre el gen OCT4.** A) Plataforma: microrna.org. Sin resultado de predicción. B) Plataforma: TargetScan. Sin resultado de predicción. C) Plataforma: miRWalk. Sin resultado de predicción. De acuerdo al análisis *in silico*, no se encontró asociación de miR-145 sobre la expresión del gen OCT4; sin embargo, estudios previos han reportado dicha asociación reportadas en versiones previas de la plataforma microrna.org (ver apartado de discusión para mayores detalles).

## miR-361 / GLI1



**Figura 5. Análisis de predicción de miR-361 para regular la expresión del gen GLI1.** A) Plataforma: microrna.org. (Arriba) Región semilla donde se lleva a cabo la interacción entre el miRNA y el mRNA así como el valor de score (mirSVR). (Abajo) Región de interacción entre miR-361 y el mRNA de GLI1 junto con otros posibles miRNAs reguladores del mRNA. B) Plataforma: TargetScan. Se indica la región semilla, el número de apareamientos y los diferentes valores de predicción (score). C) Plataforma: miRWalk. 6 de las 12 plataformas consultadas por miRWalk muestran la posible interacción de miR-361 sobre el gen GLI1.

## miR-221 / BMI1



**Figura 6. Análisis de predicción de miR-221 para regular la expresión del gen BMI1.** A) Plataforma: microrna.org. (Arriba) Región semilla donde se lleva a cabo la interacción entre el miRNA y mRNA así como el valor de score (mirSVR). (Abajo) Región de interacción entre miR-221 y mRNA de BMI1 junto con otros posibles miRNAs reguladores del mRNA. B) Plataforma: TargetScan. Se indica la región semilla, el número de apareamientos y diferentes valores de predicción (score). C) Plataforma: 8 de las 12 plataformas consultadas por miRWalk muestran la posible interacción de miR-221 sobre la expresión del gen BMI1.

## miR-217 / EZH2

A

**hsa-miR-217/EZH2 Alignment**

<pre> 3' agguuagucaaggacUACGUCAu 5' hsa-miR-217               71:5' auuuagaaaaagaacAUGCAGUu 3' EZH2                         </pre>	mirSVR score: -0.9452 PhastCons score: 0.6438
--	--

miR-144  
miR-101      miR-340

76 GAAAAAGAACAUGCAGUUUGAAAUUCUGAAUUUGCAAAGUACUGUAAGAAUUUUUAUGUAAUGAGUUUAAAAA 150

B

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	PCT

C

Gene	EntrezID	RefseqID	miRNA	miRWalk	Microt4	miRanda	mirbridge	miRDB	miRMap	miRNAMap	Pictar2	PITA	RNA22	RNAhybrid	Targetscan	SUM
EZH2	2146	NM_004456	hsa-miR-217	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	10

**Figura 7. Análisis de predicción de miR-217 para regular la expresión del gen EZH2.** A) Plataforma: microrna.org. (Arriba) Región semilla donde se lleva a cabo la interacción entre el miRNA y mRNA así como el valor de score (mirSVR). (Abajo) Región de interacción entre miR-217 y mRNA de EZH2 junto con otros posibles miRNAs reguladores del mRNA. B) Plataforma: TargetScan. Sin resultado de predicción. C) Plataforma: miRWalk. 10 de las 12 plataformas consultadas por miRWalk muestran la posible interacción de miR-217 sobre la expresión del gen EZH2.



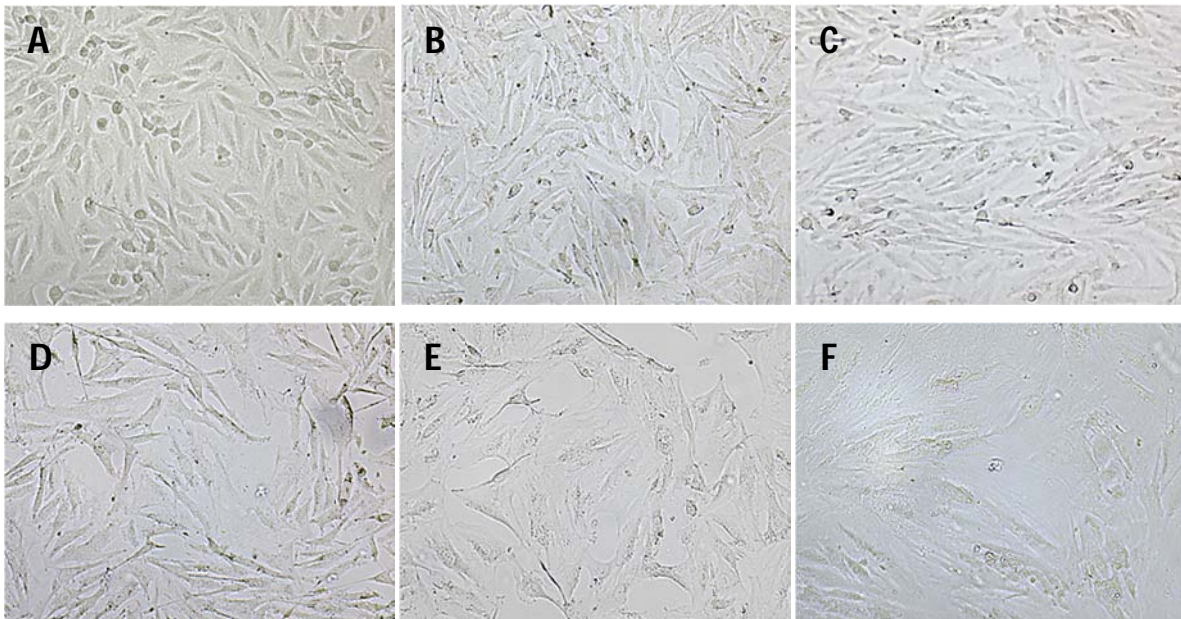
## 7.2. Inducción de Quimioresistencia a Largo Plazo

### 7.2.1. Células de Cáncer Pulmonar A549 Quimioresistentes a 5 uM de cisplatino

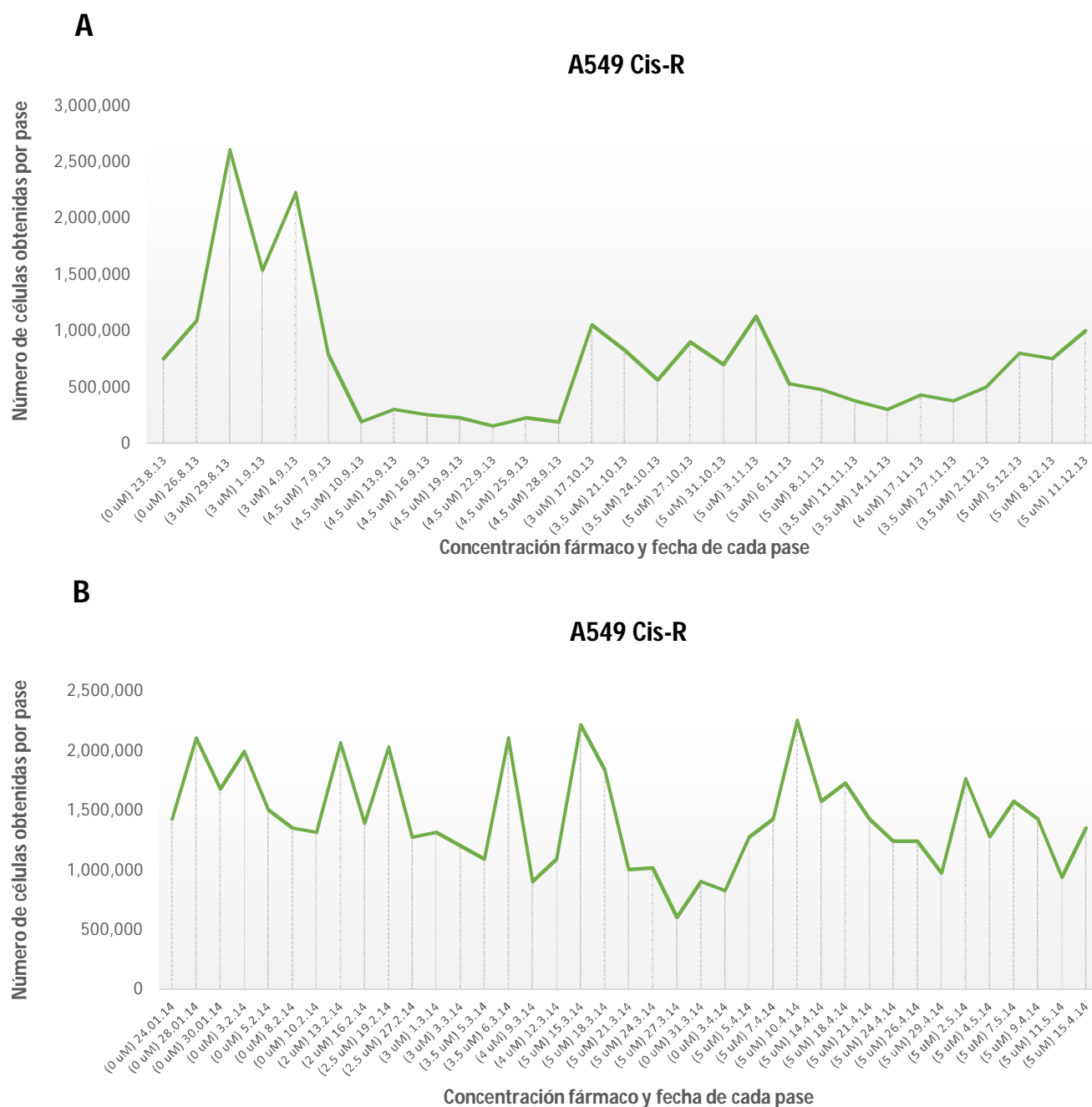
Con el objetivo de evaluar la capacidad de desarrollar resistencia a cisplatino a largo plazo de células de cáncer pulmonar A549, se realizaron cultivos en presencia de una dosis inicial de 1.25 uM de cisplatino. Las líneas celulares cultivadas en presencia de cisplastino mostraron cambios morfológicos respecto a su línea celular parental (Fig. 8A), entre ellos destaca el alargamiento celular (Fig. 8B-D) e incremento del tamaño celular (Fig. 8E-F). Estos cambios fueron acompañados además por una nula o reducida tasa de proliferación al inicio de los primeros meses del tratamiento (aproximadamente hasta el mes 6) (Fig. 9A-B), así como elevados índices de viabilidad celular. Durante este periodo las células se caracterizaron por desarrollar cambios morfológicos aberrantes con reducida estabilidad y resistencia frente dosis crecientes y continuas al fármaco cuyo periodo de adaptación se denominó **periodo de adaptabilidad**. Una condición sistemática durante el periodo de adaptación fue la interrupción temporal del fármaco durante las primeras dosis de aplicación del reto farmacológico para favoreciendo la recuperación de la población celular (los periodos de suspensión son representados como 0 uM en las figuras 9A-B).

Al mes 8 de adaptación al tratamiento fármaco-oncológico fue evidenciado que las células tumroales redujeron ligeramente su tamaño (Fig. 10A). Sin embargo, ocurrió hasta el mes 12 de tratamiento continuo que las células revirtieron su tamaño y morfología adquirida (Fig. 10B-E) alcanzando así un **periodo de estabilidad**. Dicho

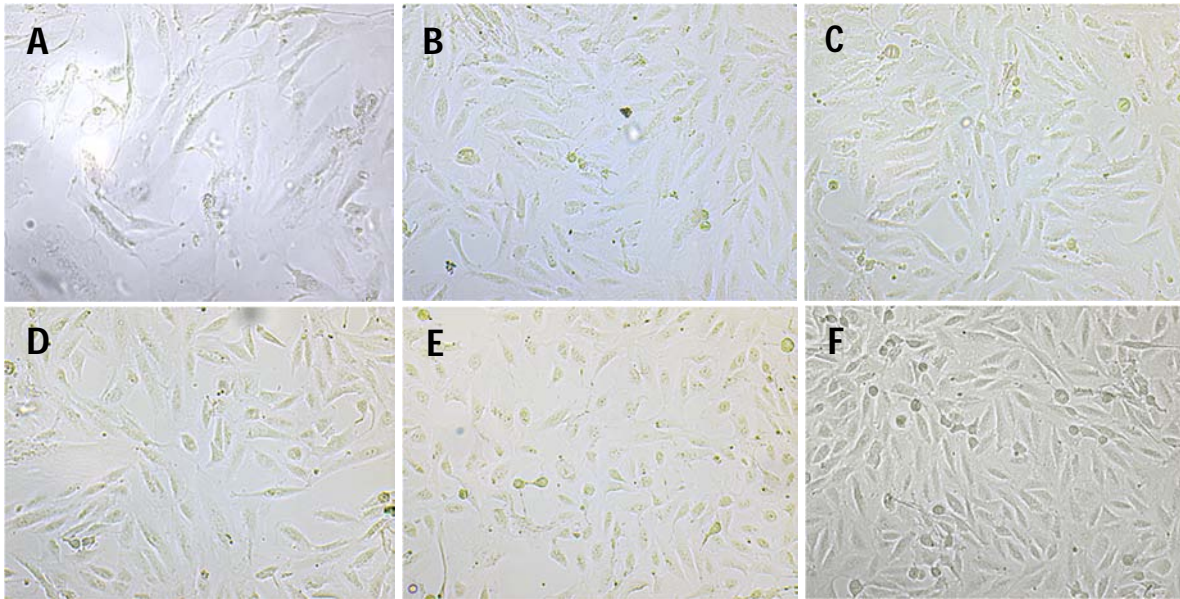
periodo se caracterizó por una tasa de proliferación constante frente al reto farmacológico continuo a **5 uM de cisplatino** (Fig. 11), además de mantener poblaciones de células de alta adherencia y viabilidad celular y presentar células ausentes de cambios morfológicos aberrantes en tamaño y morfología fusiforme. Dicho periodo de estabilidad se mantuvo hasta el mes 19 de tratamiento. Al terminos los cambios morfológicos adquiridos con respecto a su línea celular parental fueron mínimos (Fig. 10F).



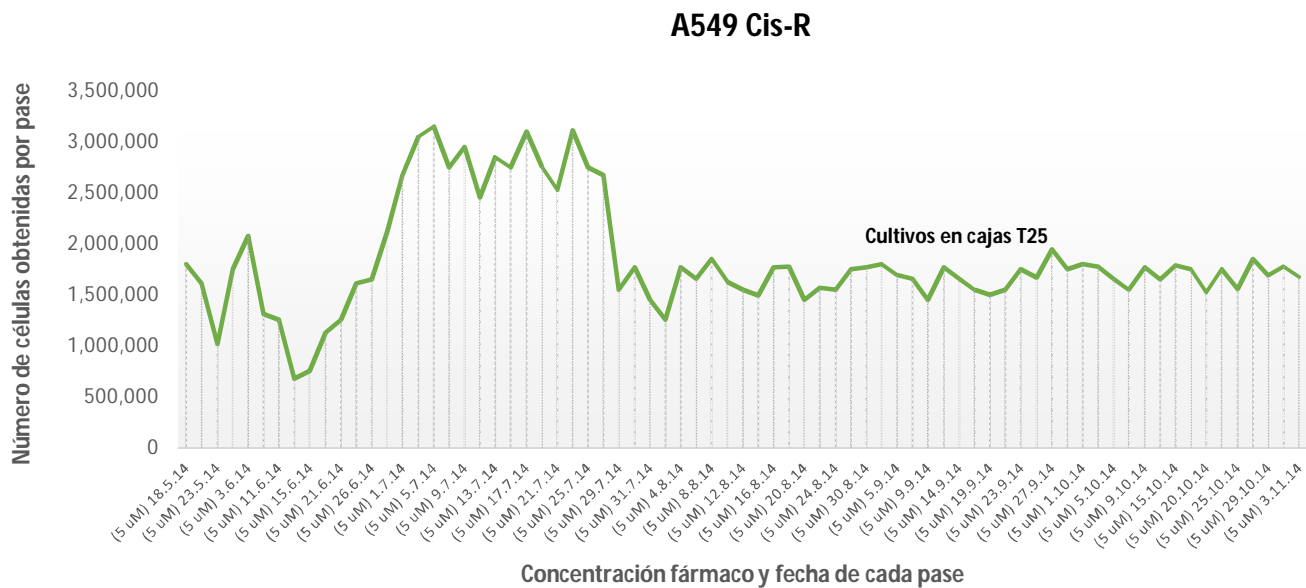
**Figura 8. Análisis de los cambios morfológicos en línea celular de cáncer pulmonar A549 durante el periodo de adaptabilidad.** A) Células A549 parental (libre de tratamiento). B) Células A549 expuestas a 1.5 uM de cisplatino día 13 de tratamiento. C) Células A549 expuestas a 1.5 uM de cisplatino día 17 de tratamiento. D) Células A549 expuestas a 1.5 uM de cisplatino día 30 de tratamiento. E) Células A549 expuestas a 1.75 uM de cisplatino día 41 de tratamiento, y F) Células A549 expuestas a 3.5 uM de cisplatino posterior a 6 meses de tratamiento. Imágenes obtenidas a un objetivo de 10X.



**Figura 9. Análisis del conteo celular de línea celular de cáncer pulmonar A549 durante el periodo de adaptabilidad.** A) Número de células obtenidas (eje Y) por fecha y dosis (eje X) correspondientes al periodo de inducción de quimioresistencia de agosto-diciembre de 2013. B) Número de células obtenidas (eje Y) por fecha y dosis (eje X) correspondientes al periodo de inducción a quimioresistencia de enero-abril.

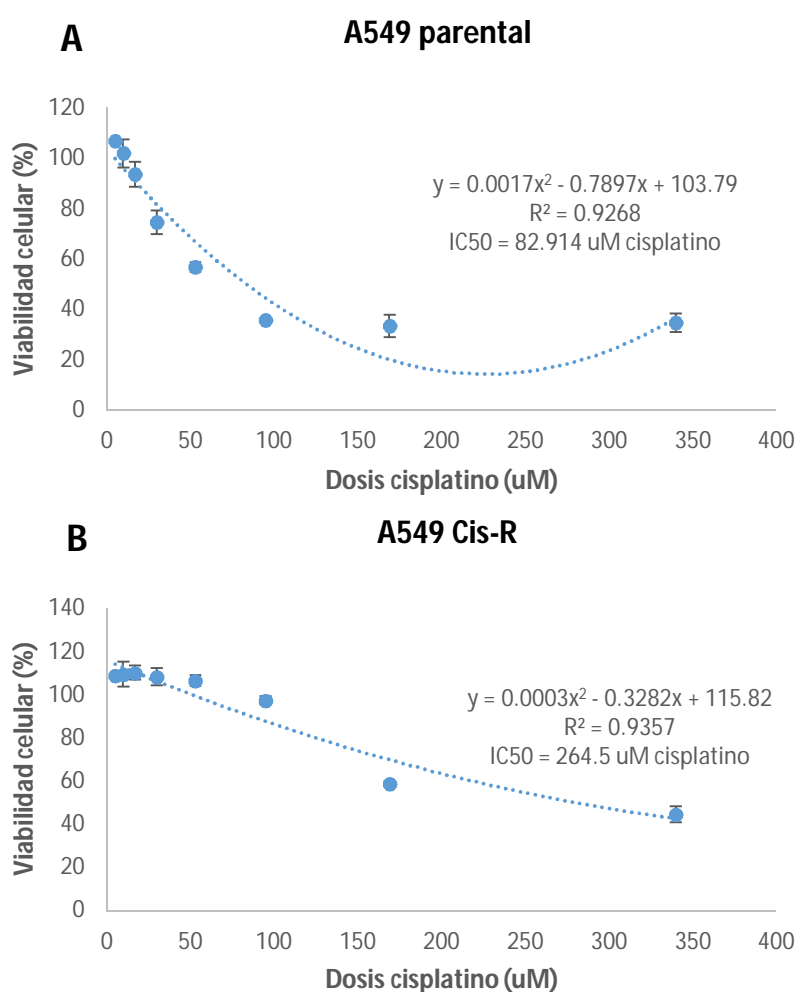


**Figura 10. Análisis de los cambios morfológicos reversibles en línea celular de cáncer pulmonar A549 durante el periodo de estabilidad.** A) Células A549 expuestas a 3.5 uM de cisplatino mes 8 de tratamiento. B) Células A549 expuestas a 5 uM de cisplatino mes 12 de tratamiento. C) Células A549 expuestas a 5 uM de cisplatino mes 13 de tratamiento. D) Células A549 expuestas a 5 uM de cisplatino mes 14 de tratamiento. E) Células A549 expuestas a 5 uM de cisplatino mes 19 de tratamiento. F) Células A549 parental (sin tratamiento). Imágenes obtenidas a un objetivo de 10X.



**Figura 11. Análisis del conteo celular de línea celular A549 durante el periodo de estabilidad.** Número de células obtenidas (eje Y) por fecha y dosis (eje X) correspondientes al periodo de mayo-noviembre de 2014. A partir de la fecha 29.7.14 los cultivos celulares se mantuvieron en cajas de cultivo T25.

Para determinar diferencias significativas en la capacidad de resistencia *versus* sensibilidad al tratamiento por cisplatino entre células A549 Parental (P) y células A549 resistentes (Cis-R), se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular empleando la técnica de MTS para determinar diferencias en la concentración inhibitoria 50 "IC:50" (Fig. 12A-B). Así mismo, mediante análisis estadístico (prueba *t*, con  $p \leq 0.05$ ) se demostraron diferencias significativas, en la cuantificación de valores IC:50 entre ambos líneas celulares mencionados.

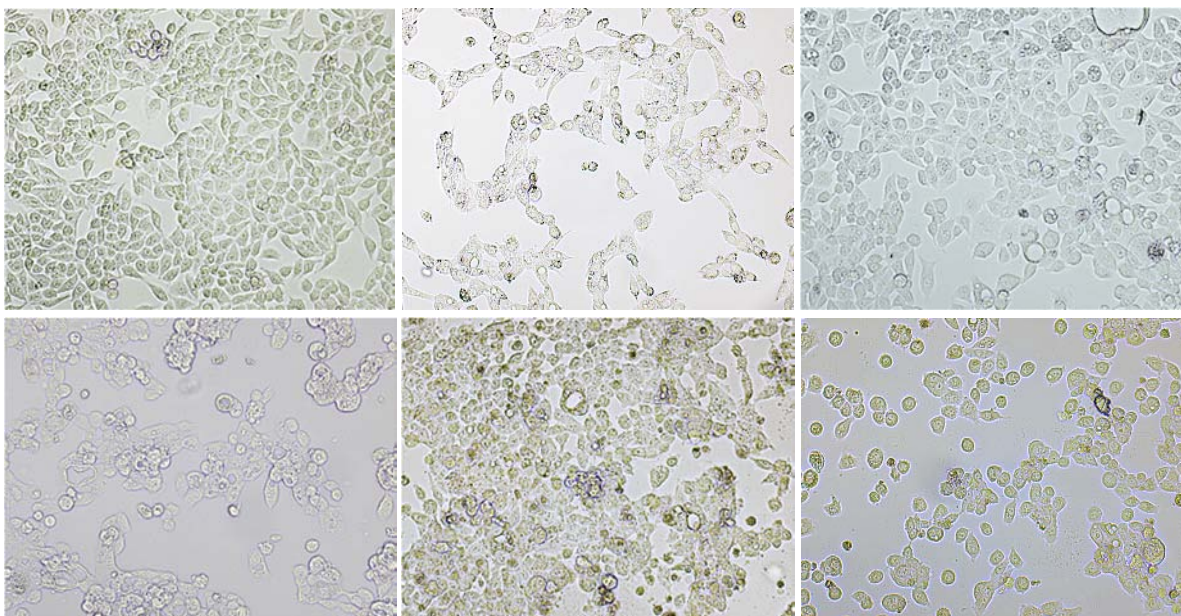


**Figura 12. Análisis de viabilidad celular mediante ensayos MTT para determinar la concentración inhibitoria 50% (IC:50) en células de cáncer pulmonar A549 parental y A549 Cis-R.** A) Células A549 parental poseen IC50=82.914 uM de cisplatino. B) Células A549 Cis-R poseen IC50=264.5 uM de cisplatino. Ensayos realizados por triplicado.

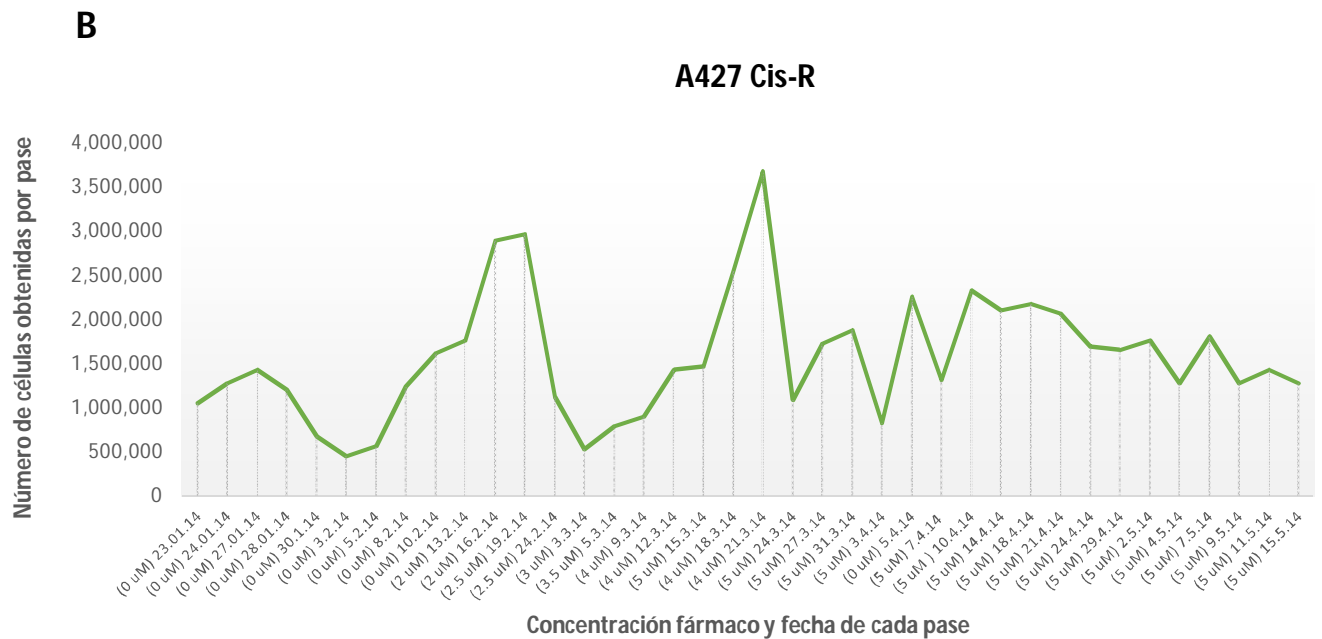
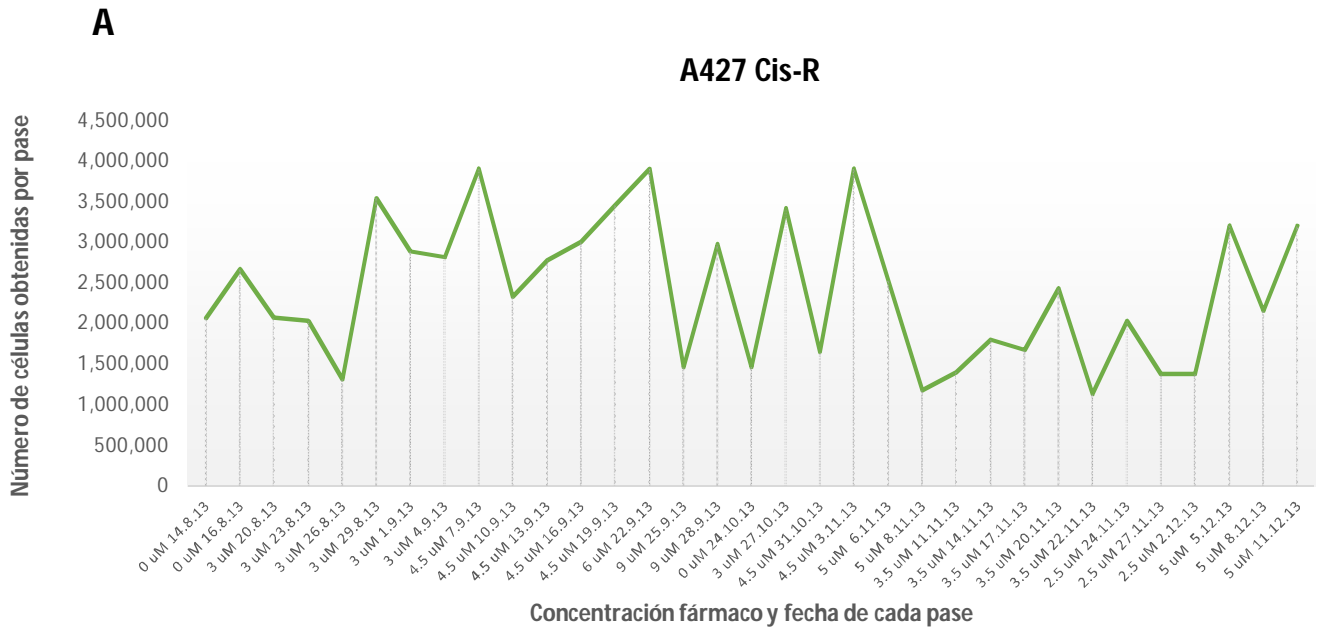


### 7.2.2. Células de Cáncer Pulmonar A427 Quimioresistentes a 5 uM de cisplatino

El proceso de inducción de resistencia a cisplatino en células de cáncer pulmonar A427 comenzó el 29 de abril de 2013 empleando una dosis inicial de 1.25 uM de cisplatino. Los cambios morfológicos observados en línea celular parental (Fig. 13A), con respecto a células bajo tratamiento fármaco-oncológico durante el periodo de adaptabilidad fueron mínimos (Fig. 13B-F). Mientras que la tasa de proliferación no fue afectada posterior a resistir los retos farmacológicos iniciales (Fig. 14 A-B).



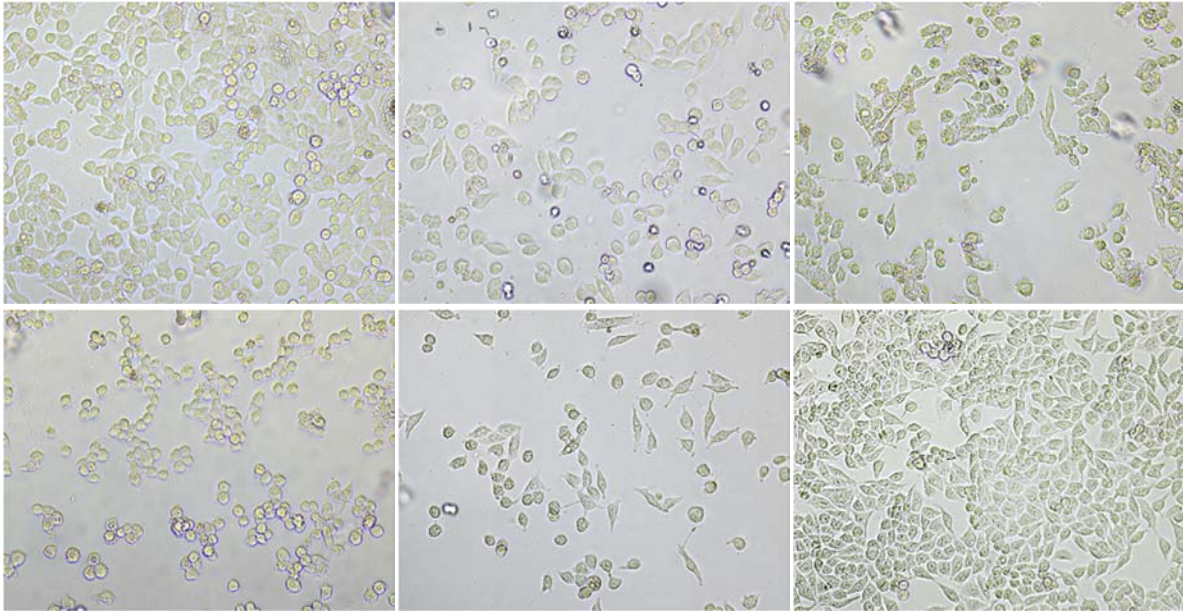
**Figura 13. Análisis de los cambios morfológicos en línea celular de cáncer pulmonar A427 durante el periodo de adaptabilidad .** A) Células A427 parental (sin tratamiento). B) Células A427 expuestas a 1.5 uM de cisplatino día 7 de tratamiento. C) Células A427 expuestas a 2 uM de cisplatino día 19 de tratamiento. D) Células A427 expuestas a 2.25 uM de cisplatino día 21 de tratamiento. E) Células A427 expuestas a 2.5 uM de cisplatino día 49 de tratamiento. F) Células A427 expuestas a 4 uM de cisplatino al mes 4 de tratamiento. Imágenes obtenidas a un objetivo de 10X.



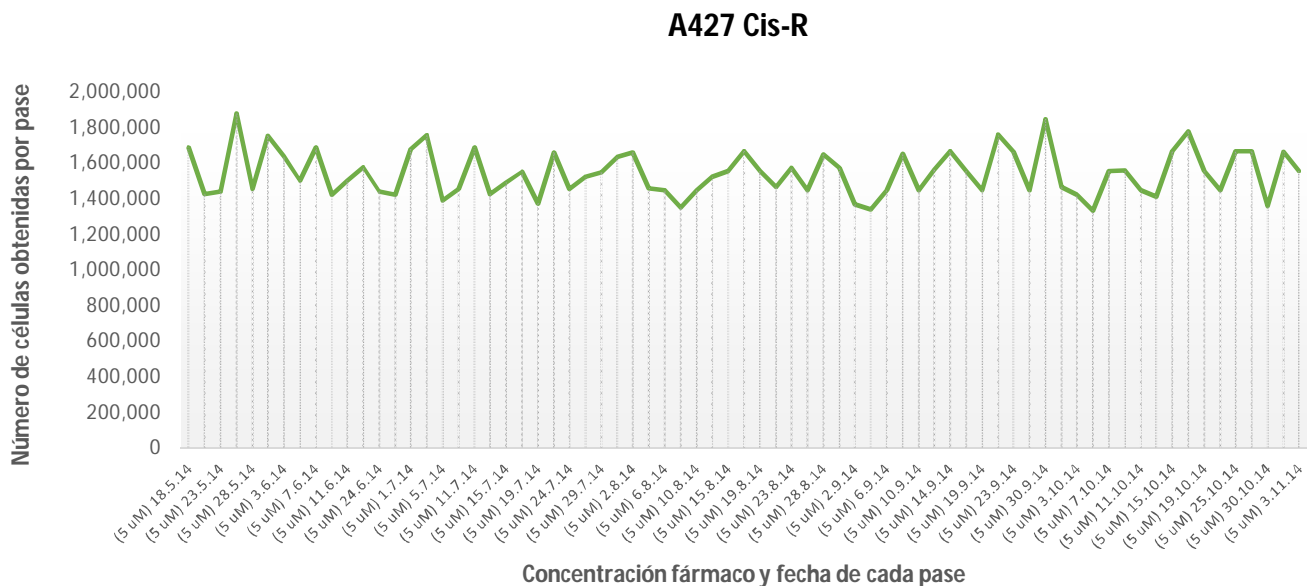
**Figura 14. Análisis del conteo celular de línea celular de cáncer pulmonar A427 durante el periodo de adaptabilidad . A) Número de células obtenidas (eje Y) por fecha y dosis (eje X) correspondientes al periodo de inducción a quimioresistencia de agosto-diciembre de 2013. B) Número de células obtenidas (eje Y) por fecha y dosis (eje X) correspondientes al periodo de inducción a quimioresistencia de enero-mayo.**

Posterior al periodo de estabilidad los cultivos celulares se mantuvieron estables a concentraciones de 3.5, 4 y 5 uM de cisplatino (Fig. 15 A-C), logrando observar que las poblaciones celulares fueron sensibles a confluencias mayores a 85-90%. Lo anterior, fue evidenciado al tiempo de observar la adquisición de una morfología circular y débil adherencia a superficie en cultivo (Fig. 15D). Posteriormente, fue evaluado y determinó que los cultivos celulares se mantuvieran estables a confluencia celular entre 45-60%. Estas condiciones fueron llevadas a cabo hasta el mes 19 de tratamiento empleando una dosis final de 5 uM de cisplatino (Fig. 15E), tiempo en el cual, no se observaron células estresadas, muertas o restos celulares. Al término del tratamiento, las células quimioresistentes adquirieron un fenotipo fusiforme alargado semejante a su línea celular parental (Fig. 15F). Por otra parte, la tasa de proliferación permaneció estable y continua frente al reto farmacológico ininterrumpido por cerca de 19 meses (Fig. 16).



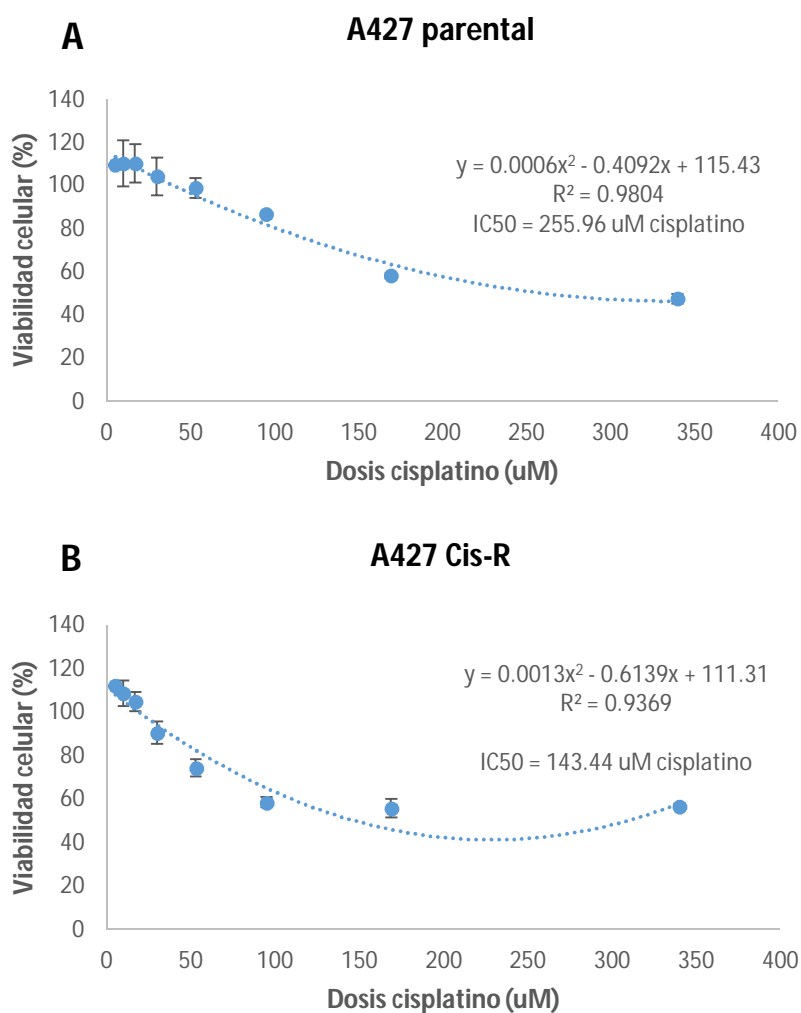


**Figura 15. Análisis de los cambios morfológicos reversibles en línea celular de cáncer pulmonar A427 durante el periodo de estabilidad .** A) Células A427 expuestas a 3.5 uM de cisplatino al mes 4 de tratamiento. B) Células A427 expuestas a 4 uM de cisplatino al mes 6 de tratamiento. C) Células A427 expuestas a 5 uM de cisplatino al mes 7 de tratamiento. D) Células A427 expuestas a 5 uM de cisplatino al mes 8 de tratamiento. E) Células A427 expuestas a 5 uM de cisplatino al mes 19 de tratamiento. F) Células A427 parental (sin tratamiento). Imágenes obtenidas a un objetivo de 10X.



**Figura 16. Análisis del conteo celular de línea celular A427 durante el periodo de estabilidad.** Número de células obtenidas (eje Y) por fecha y dosis (eje X) correspondientes al periodo de mayo-noviembre de 2014.

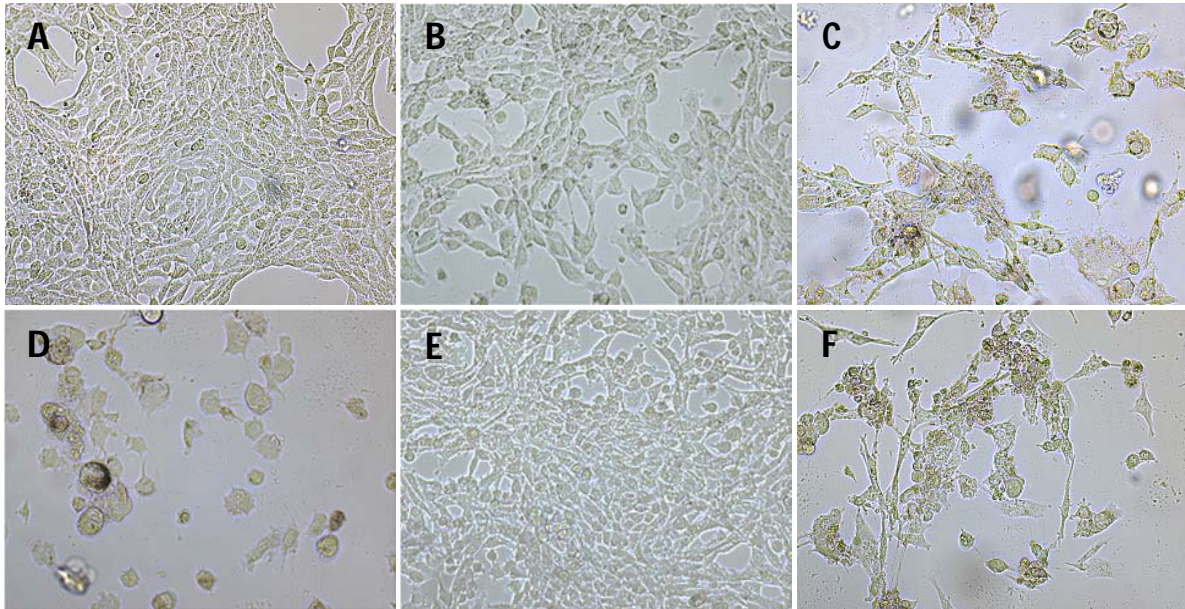
Al término del tiempo de inducción, se realizaron ensayos de análisis funcional MTS para determinar diferencias entre los valores de IC50 entre A427 parental y A427 Cis-R (Fig. 17A-B). Mediante análisis con la prueba *t*, (*p value* de 0.05), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos valores de IC50.



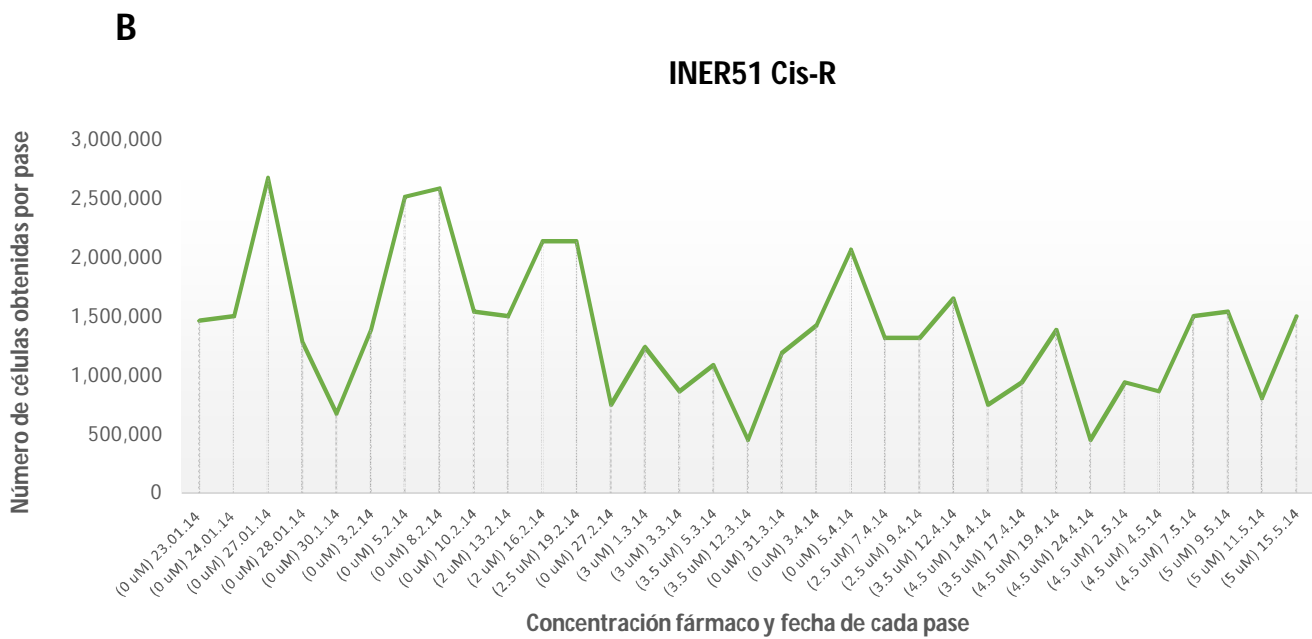
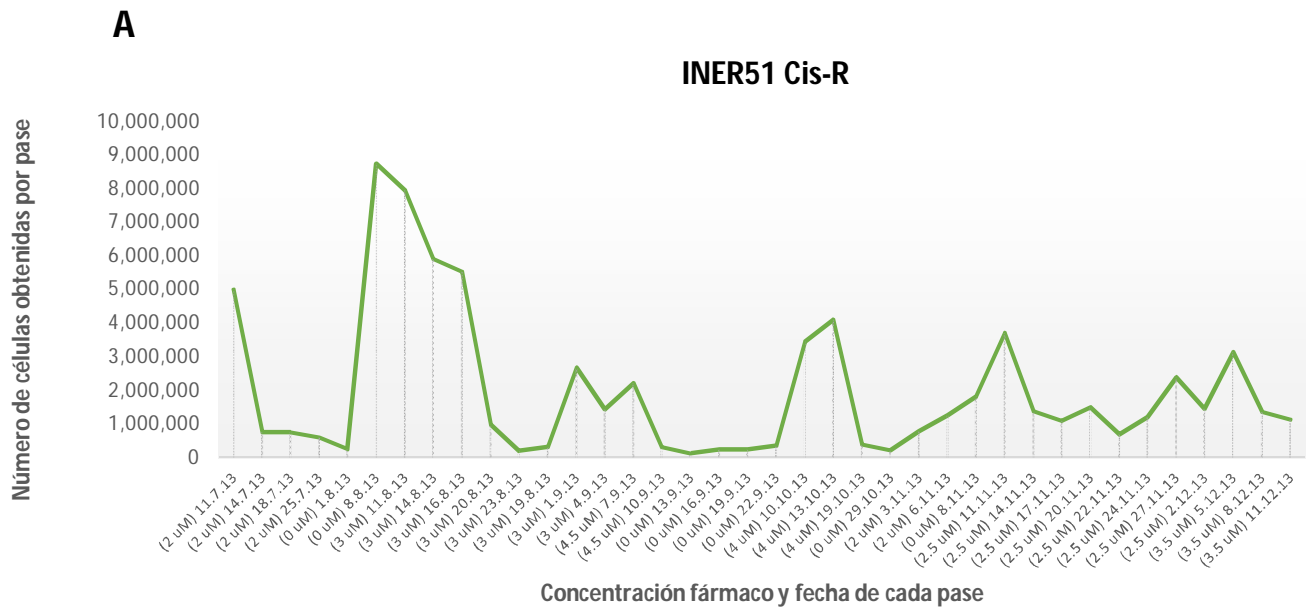
**Figura 17. Análisis de viabilidad celular mediante ensayos MTT para determinar la concentración inhibitoria 50% (IC:50) en células de cáncer pulmonar A427 parental y A427 Cis-R.** A) Células A427 parental IC50=143.44 uM de cisplatino. B) Celulas A427 Cis-R IC50=255.96 uM de cisplatino. Ensayos realizados por triplicado por pozo.

### **7.2.3. Células de Cáncer Pulmonar INER51 Quimioresistentes a 2.5 uM de cisplatino**

Nuestro análisis de inducción de resistencia a cisplatino en células de cáncer pulmonar INER51 comenzó el 8 de julio de 2013 empleando una dosis inicial de 1.25 uM de cisplatino. Identificando en ambas líneas celulares A549 y A427 crecimiento en grupos de células (Fig. 18 A) así como reducida tolerancia a los retos farmacológicos durante la fase inicial del tratamiento (Fig. 18B). Tales características provocaron que continuamente se suspendiera la aplicación del fármaco para favorecer la recuperación de la confluencia celular (Fig. 18C-E). Una vez que las células se mantuvieron estables libres de fármaco, se restableció la dosis inmediata anterior para continuar con el tratamiento, no obstante los cultivos continuaron con baja viabilidad celular (Fig. 18F). Este comportamiento se mantuvo durante los primeros meses de tratamiento (Fig. 19A-B), periodo en el cual, las células se encontraban en un periodo de adaptabilidad, el cual fue mayor en tiempo, comparado con células A549 y A427.



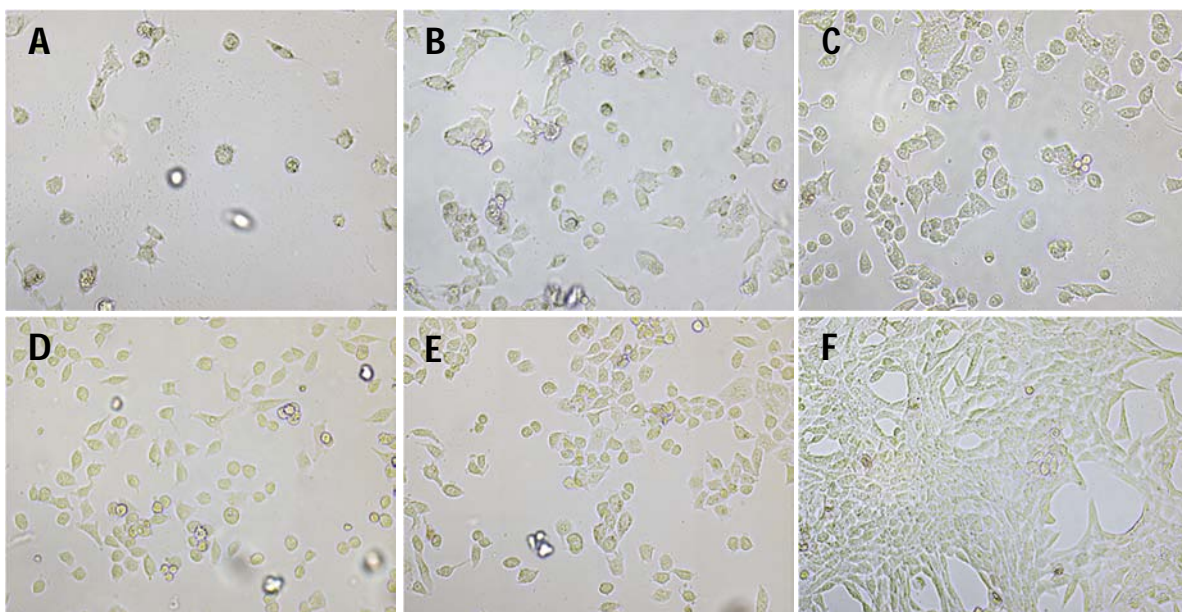
**Figura 18. Análisis de los cambios morfológicos en línea celular de cáncer pulmonar INER51 durante el periodo de adaptabilidad.** A) Células INER51 parental (sin tratamiento). B) Células INER51 expuestas a 1.5 uM de cisplatino día 9 de tratamiento. C) Células INER51 expuestas a 1.75 uM de cisplatino día 20 de tratamiento. D) Células INER51 expuestas a 1.75 uM de cisplatino día 25 de tratamiento. E) Células INER51 medio libre sin fármaco (descanso) día 36 de tratamiento. F) Células INER51 expuestas a 3.5 uM de cisplatino mes 2 de tratamiento. Imágenes obtenidas a un objetivo de 10X.



**Figura 19. Análisis del conteo celular de línea celular de cáncer pulmonar INER51 durante el periodo de adaptabilidad.** A) Número de células obtenidas (eje Y) por fecha y dosis (eje X) correspondientes al periodo de inducción a quimioresistencia de julio-diciembre de 2013. B) Número de células obtenidas (eje Y) por fecha y dosis (eje X) correspondientes al periodo de inducción a quimioresistencia de enero-mayo.

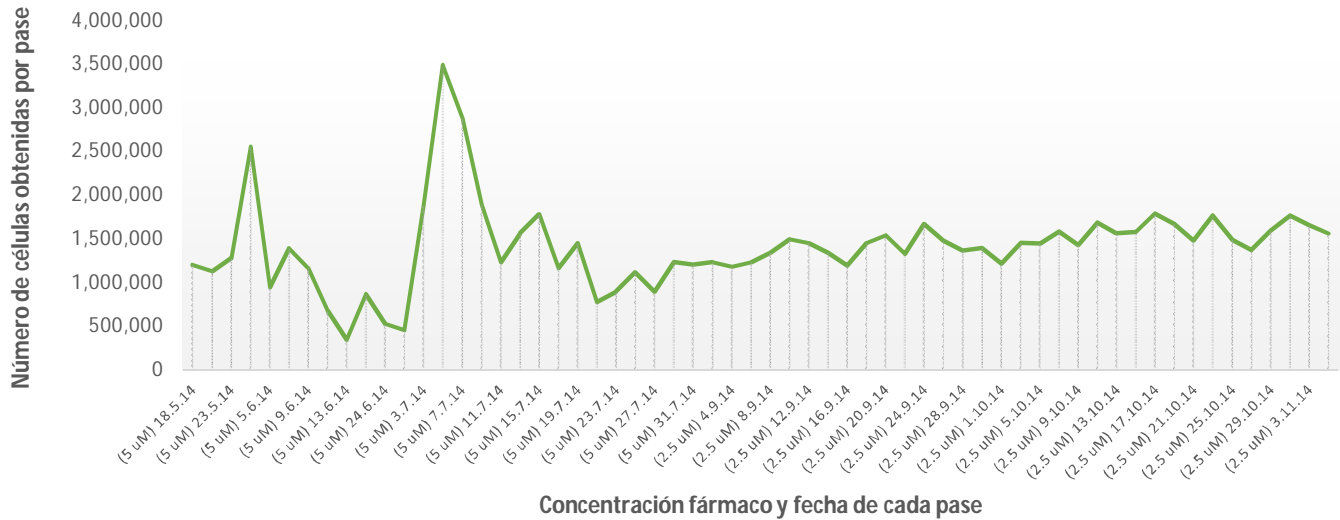


Unos de los cambios más importantes observados en las células de tratamiento, fue observado durante el periodo de inducción. Al inicio del tercer mes de tratamiento (Fig 20A) se observó que la recuperación de los cultivos celulares fue acompañada de células que crecieron de manera aislada y no agrupada como en los meses anteriores. Este comportamiento fue mantenido a lo largo de los pases posteriores (Fig. 20B-E) resultando en células con pérdida de adherencia como lo observado en la línea parental (Fig. 20F). Así mismo, las células resistentes mostraron mayor sensibilidad a confluencias elevadas como lo observado en A427 cis-R, por lo cual fueron mantenidas a una densidad celular menor al 65 %. La dosis final tolerada fue de 2.5 uM de cisplatino, periodo en el cual, las células mostraron un crecimiento continuo sin interrupción periódica del fármaco (Fig. 21).



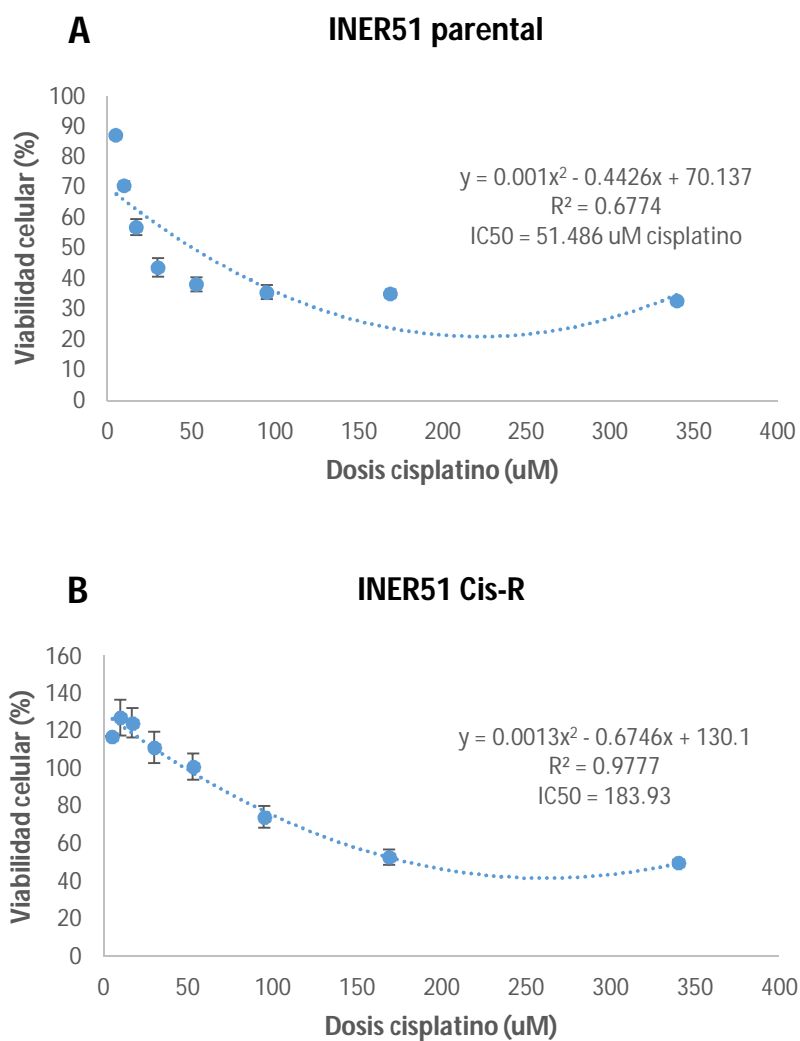
**Figura 20. Análisis de los cambios morfológicos reversibles en línea celular de cáncer pulmonar INER51 durante el periodo de estabilidad.** A) Células INER51 expuestas a 3.5 uM de cisplatino mes 3 de tratamiento. B) Células INER51 expuestas a 5 uM de cisplatino mes 4 de tratamiento. C) Células INER51 expuestas a 1.75 uM de cisplatino mes 5 de tratamiento. D) Células INER51 expuestas a 2.5 uM de cisplatino mes 10 de tratamiento. E) Células INER51 expuestas a 2.5 uM de cisplatino mes 17 de tratamiento. F) Células INER51 parental (sin tratamiento). Imágenes obtenidas a un objetivo de 10X.

## INER51 Cis-R



**Figura 21. Análisis del conteo celular de línea celular INER51 durante el periodo de estabilidad.** Número de células obtenidas (eje Y) por fecha y dosis (eje X) correspondientes al periodo de mayo-noviembre de 2013.

Una vez concluido el periodo de inducción, el cual finalizó el 3 de noviembre de 2014, se compararon los valores de IC50 entre la línea parental y su contraparte resistente mediante ensayos de análisis funcional de MTS (Fig. 22A-B). El análisis estadístico con la prueba *t*, (*p value* de 0.05) permitió determinar diferencias estadísticamente significativas entre los distintos valores de IC50.

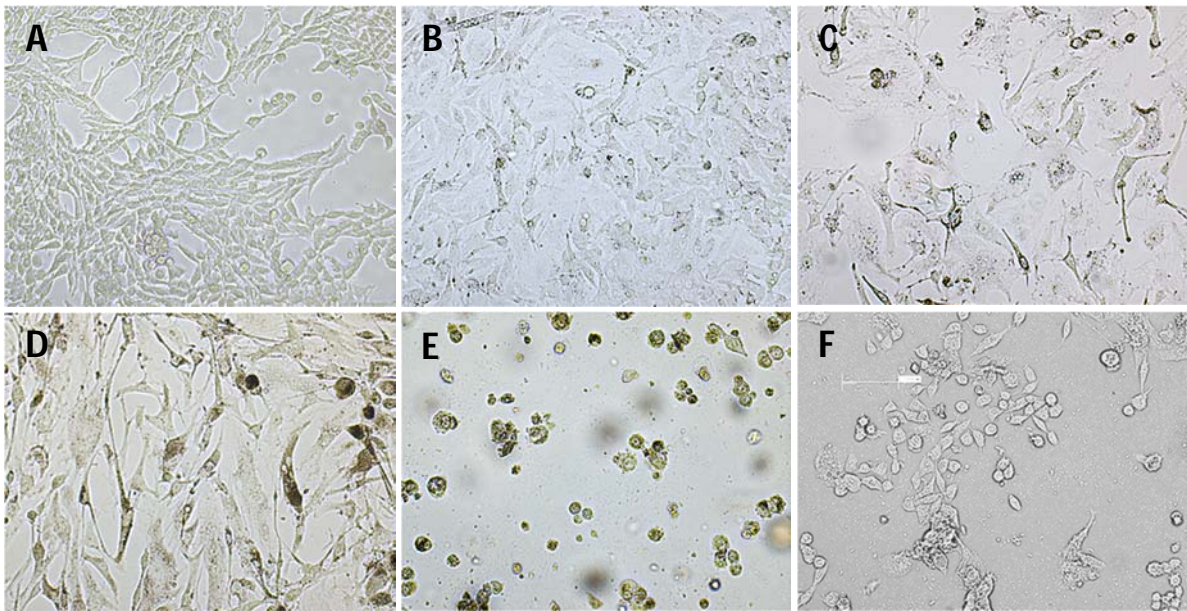


**Figura 22. Análisis de viabilidad celular mediante ensayos MTT para determinar la concentración inhibitoria 50% (IC:50) en células de cáncer pulmonar INER51 parental y INER51 Cis-R. A) INER51 parental IC50=51.486 uM de cisplatino. B) INER51 Cis-R IC50=183.93 uM de cisplatino. Ensayos realizados por triplicado por pozo.**

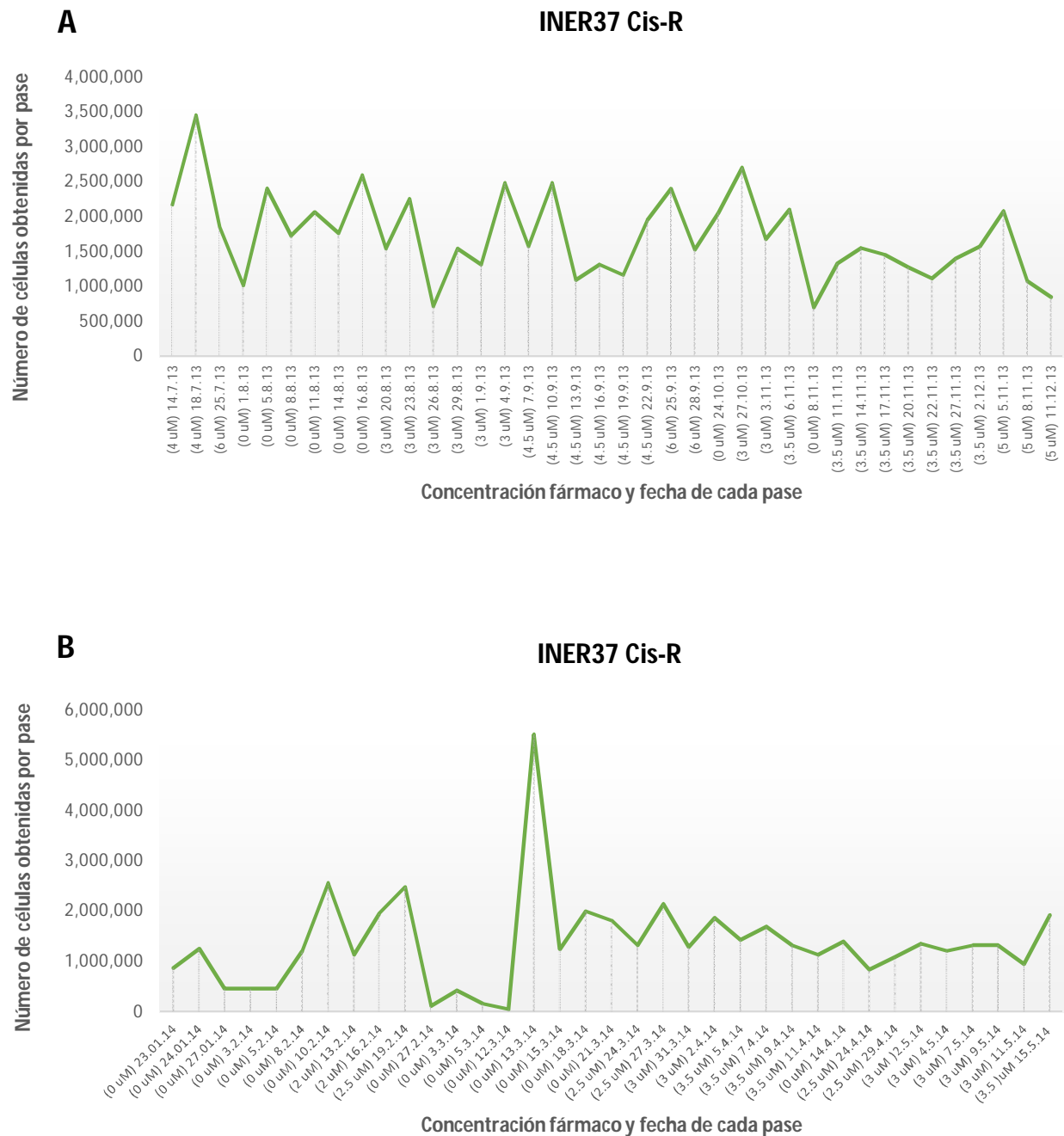


#### **7.2.4. Células de Cáncer Pulmonar INER37 Quimioresistentes a 2.5 uM de cisplatino**

La inducción de resistencia a cisplatino en la línea celular INER37 comenzó el 29 de abril de 2013 a una dosis inicial de 1.25 uM de cisplatino. Al igual que las células parentales INER51, la línea celular INER37 mostró un crecimiento similar agrupado entre célula-célula (Fig. 23A). Durante las primeras semanas de tratamiento, se observaron cambios morfológicos evidentes como aumento en el tamaño celular y fenotipo alargado (Fig. 23B-D). De manera similar a las células INER51, las células INER37 fueron más sensibles al efecto citotóxico de los retos farmacológicos de cisplatino respecto a las células A549 y A427, resultando en baja viabilidad celular durante los primeros meses de tratamiento (Fig. 24A-B) a pesar de las interrupciones continuas del fármaco para favorecer su crecimiento. Así mismo, dosis de 3.5 uM de cisplatino resultaron en reducida viabilidad de los cultivos celulares (Fig. 23E) por lo cual, las células fueron incubadas en medio libre de fármaco para inducir su recuperación. Una característica similar a las células INER51 de tratamiento, fue que conforme a los pases posteriores, las células comenzaron a crecer de manera no agrupada (Fig. 23F). Este comportamiento se mantuvo durante los primeros meses de tratamiento (Fig. 12A-B), periodo en el cual, las células se encontraban en un periodo de adaptabilidad, el cual fue mayor que en A549 y A427.

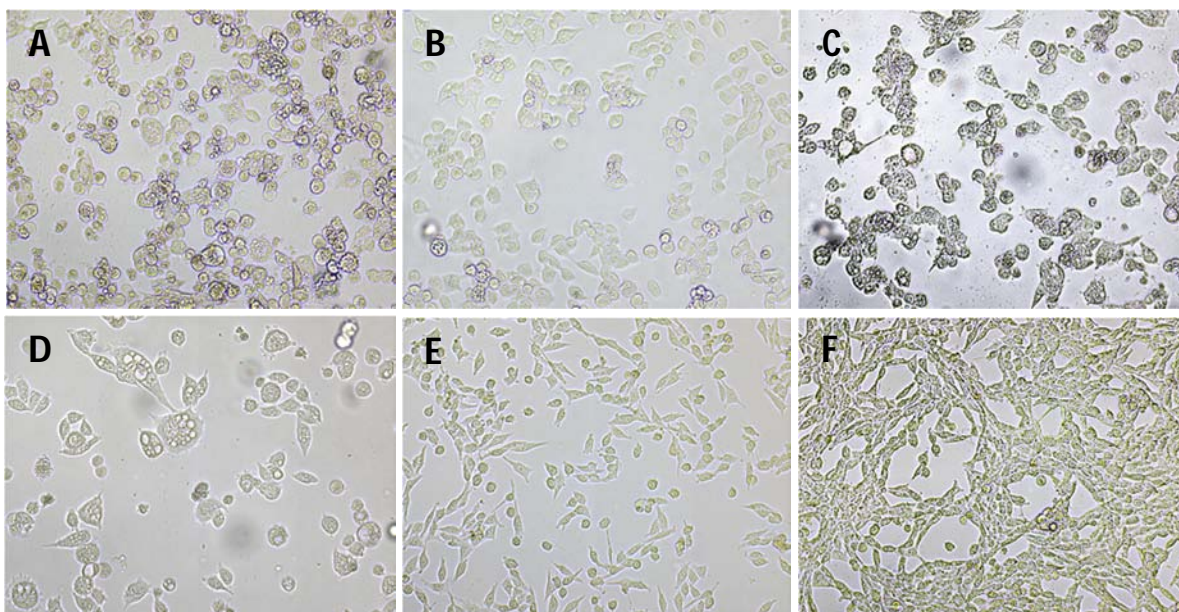


**Figura 23. Análisis de los cambios morfológicos en línea celular de cáncer pulmonar INER37 durante el periodo de adaptabilidad .** A. INER37 parental (sin tratamiento). B. Células INER37 expuestas a 1.5  $\mu$ M de cisplatino día 12 de tratamiento. C. INER37 expuestas a 1.5  $\mu$ M de cisplatino día 30 de tratamiento. D. INER37 expuestas a 2  $\mu$ M de cisplatino día 52 de tratamiento. E. INER37 expuestas a 3.5  $\mu$ M de cisplatino mes 2 de tratamiento. F. INER37 expuestas a 3.5  $\mu$ M de cisplatino mes 3 de tratamiento. Imágenes obtenidas a un objetivo de 10X.

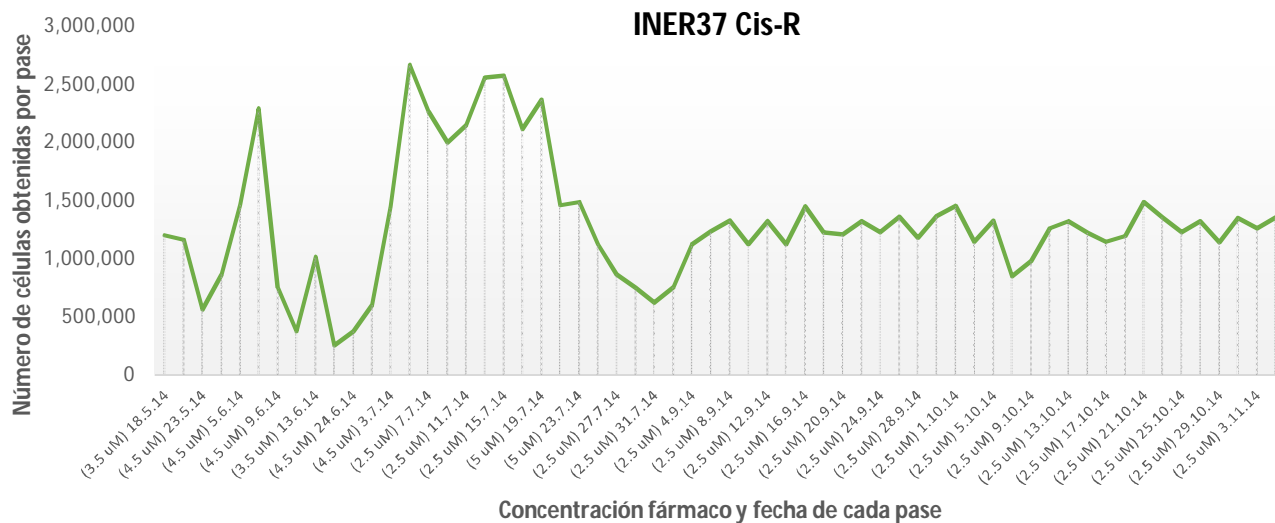


**Figura 24. Análisis del conteo celular de línea celular de cáncer pulmonar INER37 durante el periodo de adaptabilidad. A) Número de células obtenidas (eje Y) por fecha y dosis (eje X) correspondientes al periodo de julio-diciembre de 2013. B) Número de células obtenidas (eje Y) por fecha y dosis (eje X) correspondientes al periodo de enero-mayo de 2014.**

Posterior al cuarto mes de tratamiento (Fig. 25A), la recuperación de las células, previo a la aplicación de la dosis correspondiente, permitió observar un crecimiento similar a lo ocurrido en la línea celular INER51 de tratamiento, en el cual, las células fueron creciendo de manera aislada unas con otras (Fig. 25B-D). Al término del tratamiento, se observó un fenotipo alargado (Fig. 25E) el cual difirió de manera significativa a lo observado en su parental (Fig. 25F). Así mismo, las células comenzaron un periodo de estabilidad al año de tratamiento, cuya característica al igual que en los demás líneas celulares, fue el crecimiento continuo sin estrés celular y sin la interrupción frecuente del fármaco (Fig. 26A).



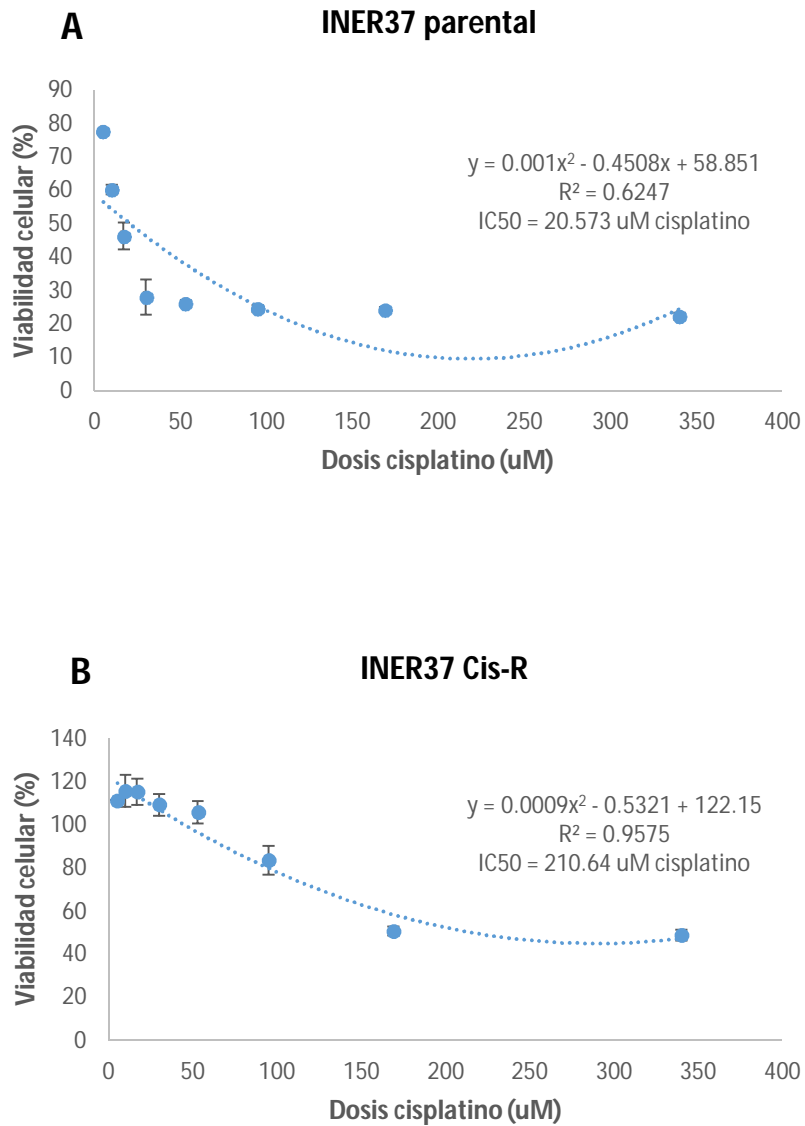
**Figura 25. Análisis de los cambios morfológicos reversibles en línea celular de cáncer pulmonar INER37 durante el periodo de estabilidad.** A) INER37 expuestas a 4 uM de cisplatino mes 4 de tratamiento. B) INER37 expuestas a 4 uM de cisplatino mes 4 de tratamiento. C) INER37 expuestas a 1.5 uM de cisplatino mes 7 de tratamiento. D) INER37 expuestas a 3.5 uM de cisplatino mes 12 de tratamiento. E) INER37 expuestas a 2.5 uM de cisplatino mes 19 de tratamiento. F) INER37 parental (sin tratamiento). Imágenes obtenidas a un objetivo de 10X.



**Figura 26. Análisis del conteo celular de línea celular INER37 durante el periodo de estabilidad.** Número de células obtenidas (eje Y) por fecha y dosis (eje X) correspondientes al periodo de mayo-noviembre de 2014.

Finalmente, se compararon los valores de IC50 entre la línea parental y su contraparte resistente mediante ensayos de análisis funcional de MTS (Fig. 27A-B).

El análisis estadístico con la prueba *t*, (*p value* de 0.05) permitió determinar diferencias estadísticamente significativas entre los distintos valores de IC50.



**Figura 27. Análisis de viabilidad celular mediante ensayos MTT para determinar la concentración inhibitoria 50% (IC:50) en células de cáncer pulmonar INER37 parental y INER37 Cis-R. A. INER37 parental IC50=20.573 uM de cisplatino. B. INER37 Cis-R IC50=210.64 uM de cisplatino. Ensayos realizados por triplicado por pozo.**

### **7.3. Análisis del Perfil de Expresión de miRNAs en Líneas Celulares de Cáncer Pulmonar Quimioresistentes a Cisplatino**

Se analizó los niveles de expresión de miR-301a, miR-543, miR-487a, miR-145, miR-361a, miR-221 y miR-217 en líneas celulares de cáncer pulmonar quimioresistentes a cisplatino. U6 y miR-374 fueron empleados como genes endógenos de referencia como fue propuesto originalmente. Sin embargo, durante nuestro análisis de miR-374 este fue normalizado con U6, encontrando niveles de expresión que sugieren su desregulación significativa para cada uno de los cuatro líneas celulares de cáncer pulmonar quimioresistentes; por lo que en el presente trabajo, miR-374 resultó ser de gran interés por su posible relevancia en la resistencia a cisplatino en células del grupo NSCLC. Así mismo, la estabilidad de U6 como gen de referencia, ha sido reportada previamente con base en su estabilidad y expresión constante bajo condiciones experimentales, y debido a su abundancia similar a otros miRNAs (Choong et al. 2007; Corney et al. 2007; Shell et al. 2007, Yang et al., 2015). De manera experimental, la expresión de U6 resultó constante en cada una de las líneas celulares de este trabajo (parentales y resistentes), esto en concordancia con lo reportado previamente; mas no así la expresión de miR-374, cuya expresión varió significativamente en las líneas celulares resistentes.

Por otro lado, de acuerdo a los perfiles de expresión obtenidos las líneas celulares resistentes a fármacos oncológicos, se pudo evidenciar la regulación de los miRNAs candidatos en respuesta a la resistencia a cisplatino. Sin embargo, los perfiles de



expresión resultaron diferentes en todos los casos, logrando determinar diferencias significativas entre cada uno de los líneas celulares resistentes a tratamiento.

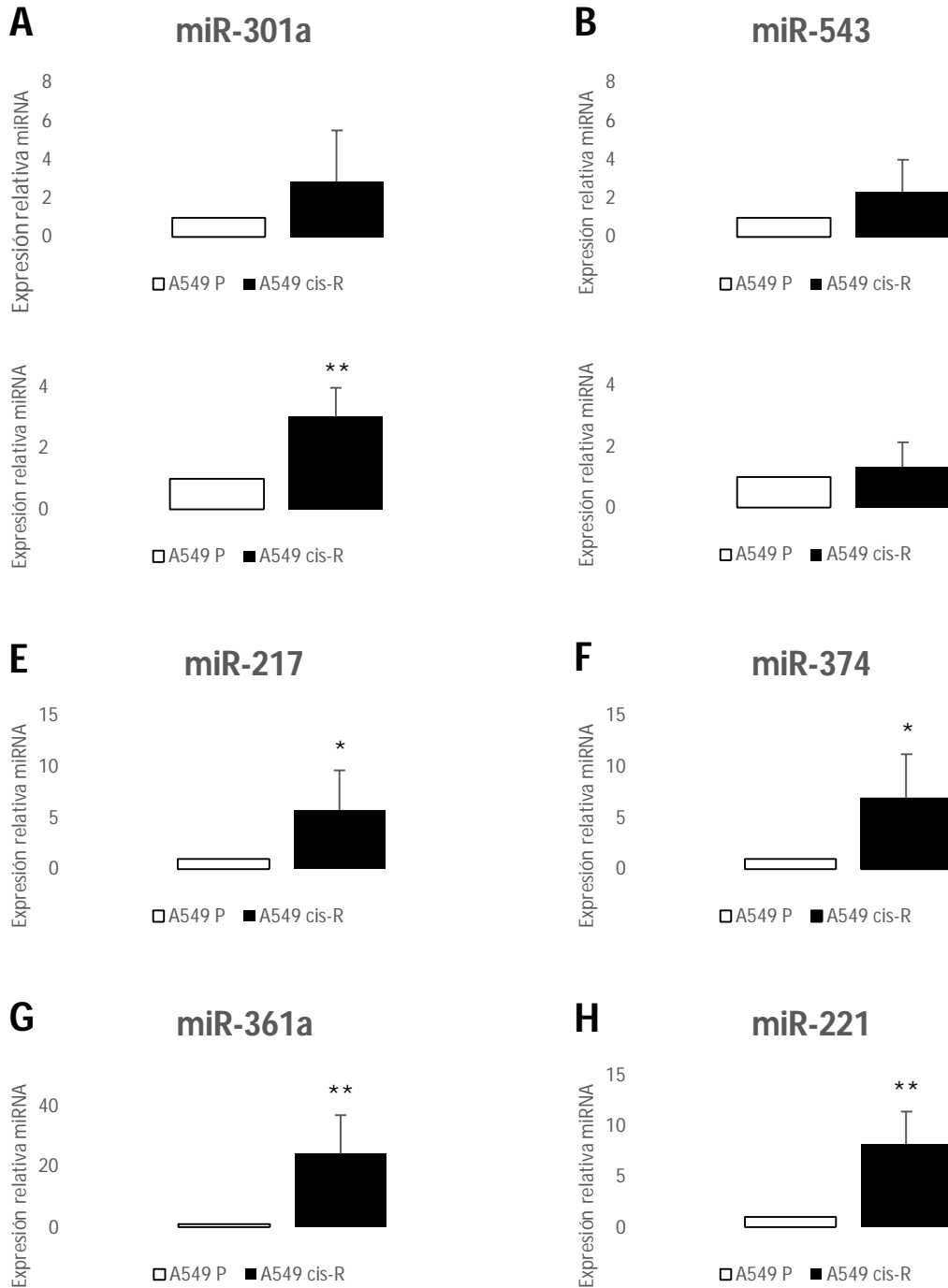
### 7.3.1. Perfil de expresión de miRNAs en Células de Cáncer Pulmonar A549 Quimioresistentes

Nuestro análisis de expresión del panel de miRNAs seleccionados, sobre el modelo celular A549 cis-R posterior a 19 meses de resistencia inducible, permitió determinar la sobre expresión de cada uno de los miRNAs, con respecto a su línea celular parental (Tabla 1 y Fig. 28A-H). Así mismo miR-361a resultó con la mayor tasa de cambio seguido de miR-221 y miR-374. En contraste, la expresión de miR-145 resultó con menos cambios entre el modelo celular quimioresistente y línea celular parental de cáncer pulmonar A549.

miRNA	Índice de cambio
miR-301a	+ 2.88
miR-543	+ 2.35
miR-487a	+ 3.03
miR-145	+ 1.32
miR-361a	+ 24.25
miR-221	+ 8.22
miR-217	+ 5.76
miR-374	+ 6.93

Tabla 1. Índice de cambio en el perfil de expresión de miRNAs en A549 cis-R respecto su parental.





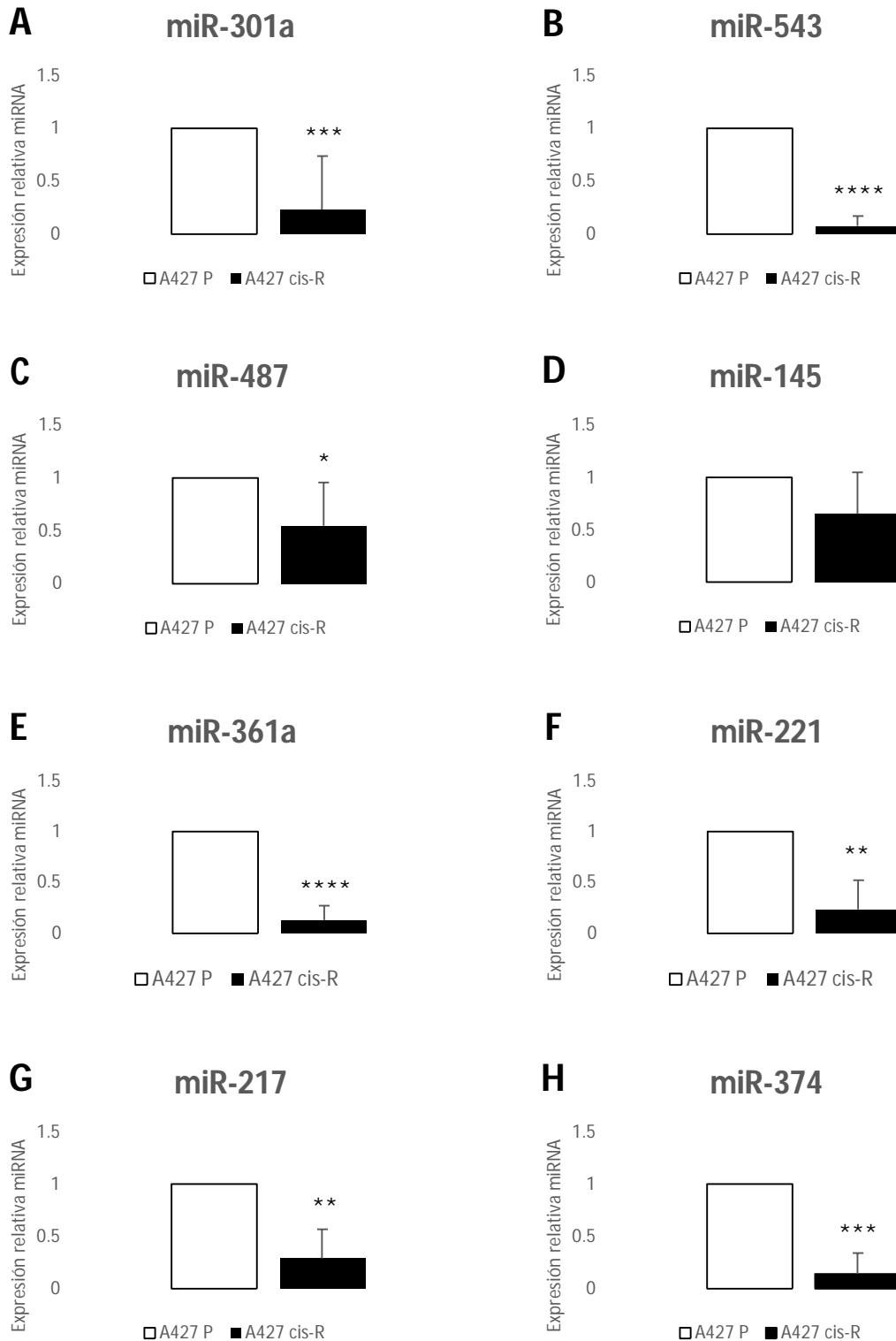
**Figura 28. Perfil de expresión de miRNAs por RT-qPCR SYBR green en A549 P y A549 cis-R.** Expresión relativa de miR-301a (A), miR-543 (B), miR-487a (C), miR-145 (D), miR-361a (E), miR-221 (F), miR-217 (G) y miR-374 (H). Ensayos realizados por triplicado por pozo. Cada gráfico incluye las réplicas experimentales 1 y 2. Análisis estadístico con prueba de *t* de *student* (pareada). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

### 7.3.2. Perfil de expresión de miRNAs Células de Cáncer Pulmonar A427 Quimioresistentes

Nuestro análisis de expresión de miRNAs en el modelo celular de cáncer pulmonar A427 mostró perfiles de expresión opuestos a los observados en células A549 (Tabla 2 y Fig. 29A-H). En dicho modelo celular quimioresistente, cada uno de los miRNAs evaluados resultó con baja expresión, siendo miR-543 el de menor tasa de expresión seguido de miR-374 y miR-361. De manera similar en células A549, miR-145 resultó con menor tasa de cambio en contraste del resto de miRNAs analizados, los cuales mostraron expresión significativamente menor en células A427, en contraste de células A549 quimioresistentes de cáncer pulmonar.

miRNA	Índice de cambio
miR-301a	0.233
miR-543	0.074
miR-487a	0.550
miR-145	0.652
miR-361a	0.128
miR-221	0.234
miR-217	0.288
miR-374	0.142

Tabla 2. Índice de cambio en el perfil de expresión de miRNAs en células A427 quimioresistentes con respecto su línea celular parental.



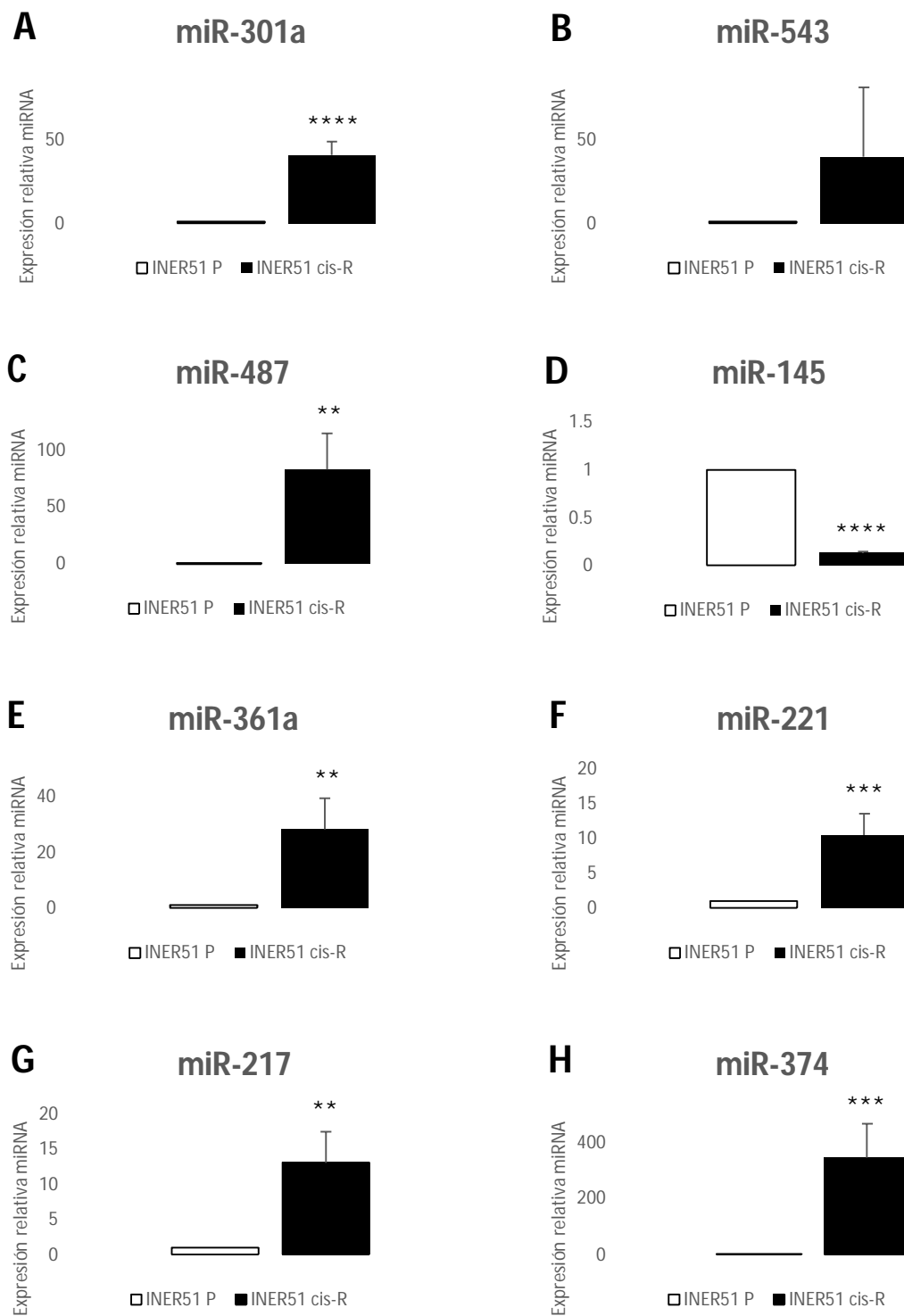
**Figura 29. Perfil de expresión de miRNAs por RT-qPCR SYBR green en A427 P y A427 cis-R.** Expresión relativa de miR-301a (A), miR-543 (B), miR-487a (C), miR-145 (D), miR-361a (E), miR-221 (F), miR-217 (G) y miR-374 (H). Ensayos realizados por triplicado por pozo. Cada gráfico incluye las réplicas experimentales 1 y 2. Análisis estadístico con prueba de *t* de *student* (pareada). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

### 7.3.3. Perfil de expresión de miRNAs en Células de Cáncer Pulmonar INER51 Quimioresistentes

Por su parte, cambios drásticos en la expresión de miRNAs fueron observados en las líneas celulares derivadas de pacientes con cáncer pulmonar bajo atención médica en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). En este sentido para el caso del modelo celular INER51 (Tabla 3 y Fig. 30A-H) miR-374 fue detectada inducción en la expresión de hasta 343 veces más, con respecto a su línea celular parental. Mientras que miR-487a resultó con sobreexpresión 82 veces mayor seguido de miR-301a y miR-543 con abundancias relativas a 40 veces la tasa de cambio. De manera contraria, miR-145 fue el único miRNA que fue detectado subexpresado.

miRNA	Índice de cambio
miR-301a	+ 40.662
miR-543	+ 39.638
miR-487a	+ 82.836
miR-145	0.130
miR-361a	+ 28.205
miR-221	+ 10.446
miR-217	+ 13.073
miR-374	+ 343.920

Tabla 3. Tasa de cambio en el perfil de expresión de miRNAs en INER51 cis-R respecto su parental.



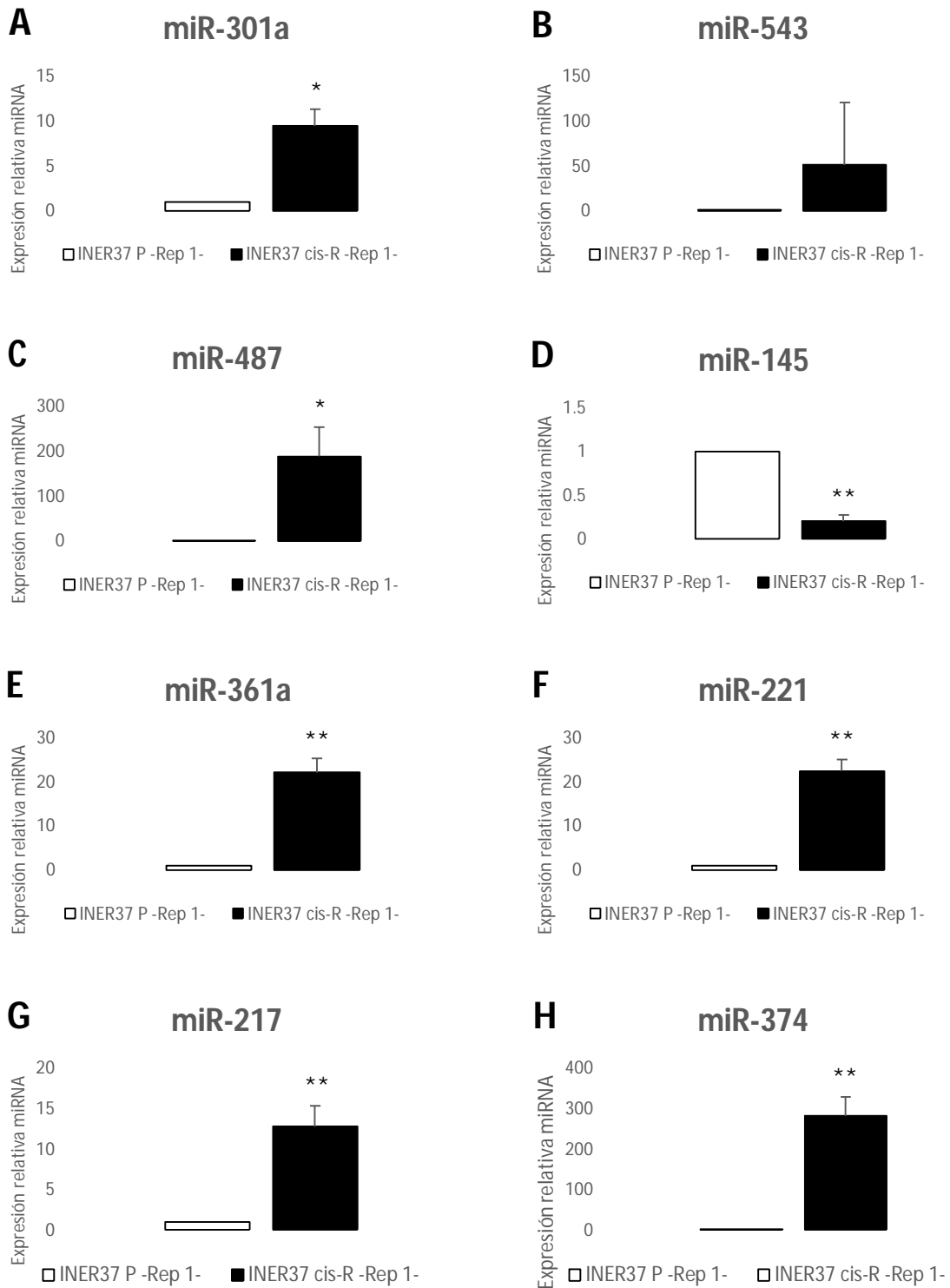
**Figura 30. Perfil de expresión de miRNAs por RT-qPCR SYBR green en INER51 P e INER51 cis-R.** Expresión relativa de miR-301a (A), miR-543 (B), miR-487a (C), miR-145 (D), miR-361a (E), miR-221 (F), miR-217 (G) y miR-374 (H). Ensayos realizados por triplicado por pozo. Cada gráfico incluye las réplicas experimentales 1 y 2. Análisis estadístico con prueba de *t* de *student* (pareada). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

### 7.3.4. Perfil de expresión de miRNAs en Células de Cáncer Pulmonar INER37 Quimioresistentes (réplica experimental 1)

Debido a la detección de mayores diferencias en la expresión es decir de mayor contraste entre réplicas experimentales 1 y 2, por lo que, los resultados obtenidos fueron analizados de manera independiente. En la réplica 1, los datos obtenidos reflejaron cambios drásticos en el perfil de expresión de miRNAs (Tabla 4 y Fig. 31A-H). La diferencia más notable entre ambas réplicas experimentales es el periodo de obtención de las muestras (mes y medio aproximadamente), siendo en réplica 1, de fecha 1.10.14 y réplica experimental 2 de fecha 21.11.14. Los datos obtenidos de réplica 1 muestran a miR-374 sobreexpresado hasta 282 veces, con respecto a su línea parental, seguido de miR487a con índice de cambio de 188 veces mayor, así como sobreexpresión de 51 veces mayor en miR-543. De manera similar en células INER51, miR-145 fue el único miRNA que resultó con menor índice de cambio en la expresión, siendo subexpresado de manera similar que en el modelo celular INER51.

miRNA	Índice de cambio
miR-301a	+ 9.449
miR-543	+ 51.251
miR-487a	+ 188.783
miR-145	0.2017
miR-361a	+ 22.215
miR-221	+ 22.514
miR-217	+ 12.809
miR-374	+ 282.635

**Tabla 4. Índice de cambio en el perfil de expresión de miRNAs en células INER37 quimioresistentes correspondientes a primera réplica experimental con respecto su línea celular parental.**



**Figura 31. Perfil de expresión de miRNAs por RT-qPCR SYBR green en INER37 P e INER37 cis-R.** Expresión relativa de miR-301a (A), miR-543 (B), miR-487a (C), miR-145 (D), miR-361a (E), miR-221 (F), miR-217 (G) y miR-374 (H). Ensayos realizados por triplicado por pozo. Análisis estadístico con prueba de *t* de *student* (pareada). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

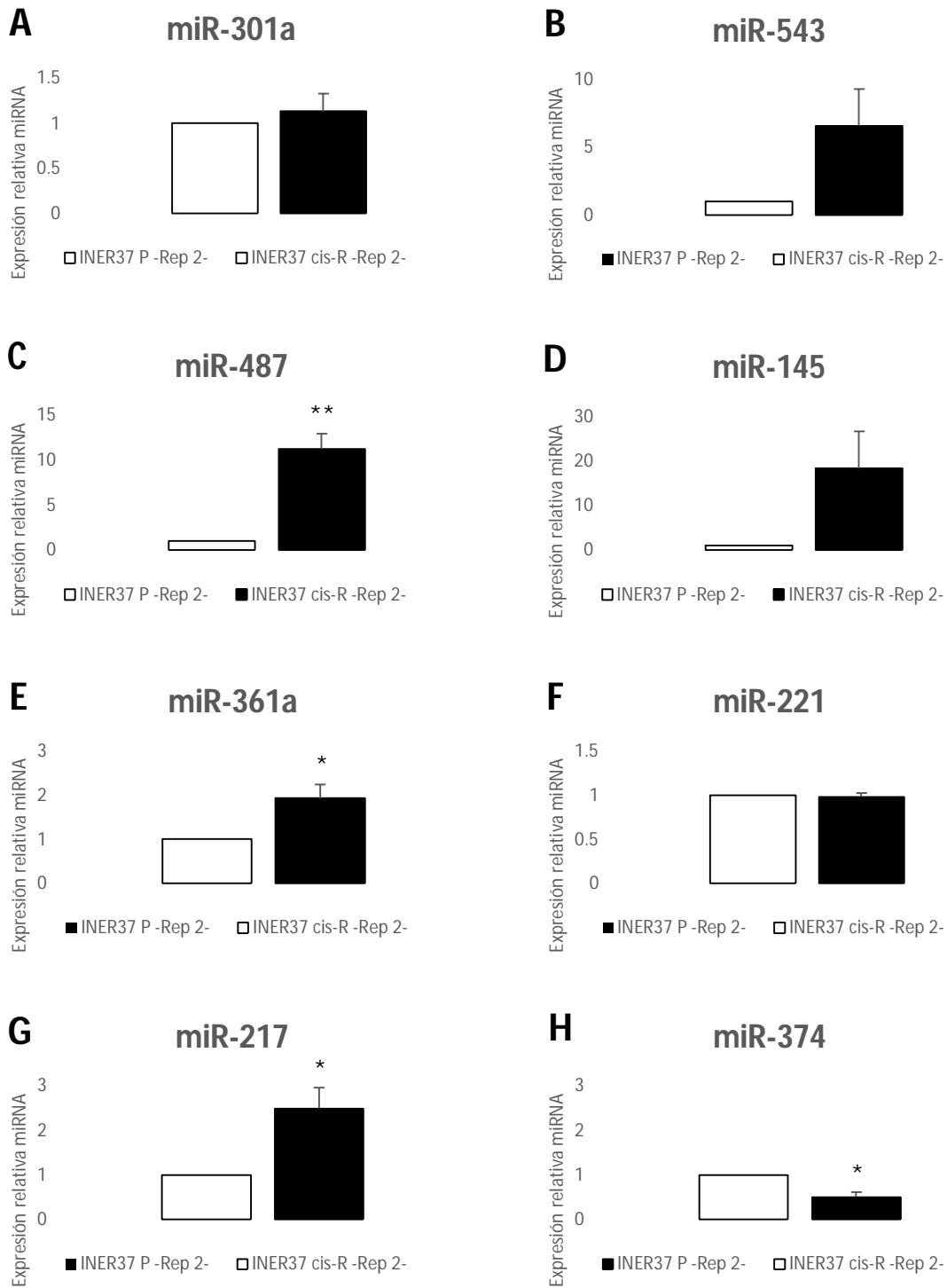
### 7.3.5. Perfil de expresión de miRNAs en Células de Cáncer Pulmonar INER37 Quimioresistentes (réplica experimental 2)

Finalmente, nuestro análisis sobre la segunda réplica experimental mostró un perfil de expresión con cambios de menor variación entre miRNAs, con respecto a la réplica experimental 1 (Tabla 5 y Fig. 32A-H). El cambio de mayor significancia fue miR-145 donde a diferencia de la réplica 1 en modelo celular INER51, su expresión resultó elevada. Por su parte, miR-487a fue el segundo miRNA con tasa índice de cambio mayor seguido de miR-543. De manera contraria a la réplica experimental 1 y del modelo celular INER51, se observaron pocos cambios en miR-221 seguido de miR-374.

miRNA	Tasa de cambio
miR-301a	+ 1.133
miR-543	+ 6.594
miR-487a	+ 11.218
miR-145	+ 18.341
miR-361a	+ 1.930
miR-221	0.980
miR-217	+ 2.493
miR-374	0.504

**Tabla 5. Índice de cambio en el perfil de expresión de miRNAs en células INER37 quimioresistentes segunda réplica experimental con respecto su línea celular parental.**

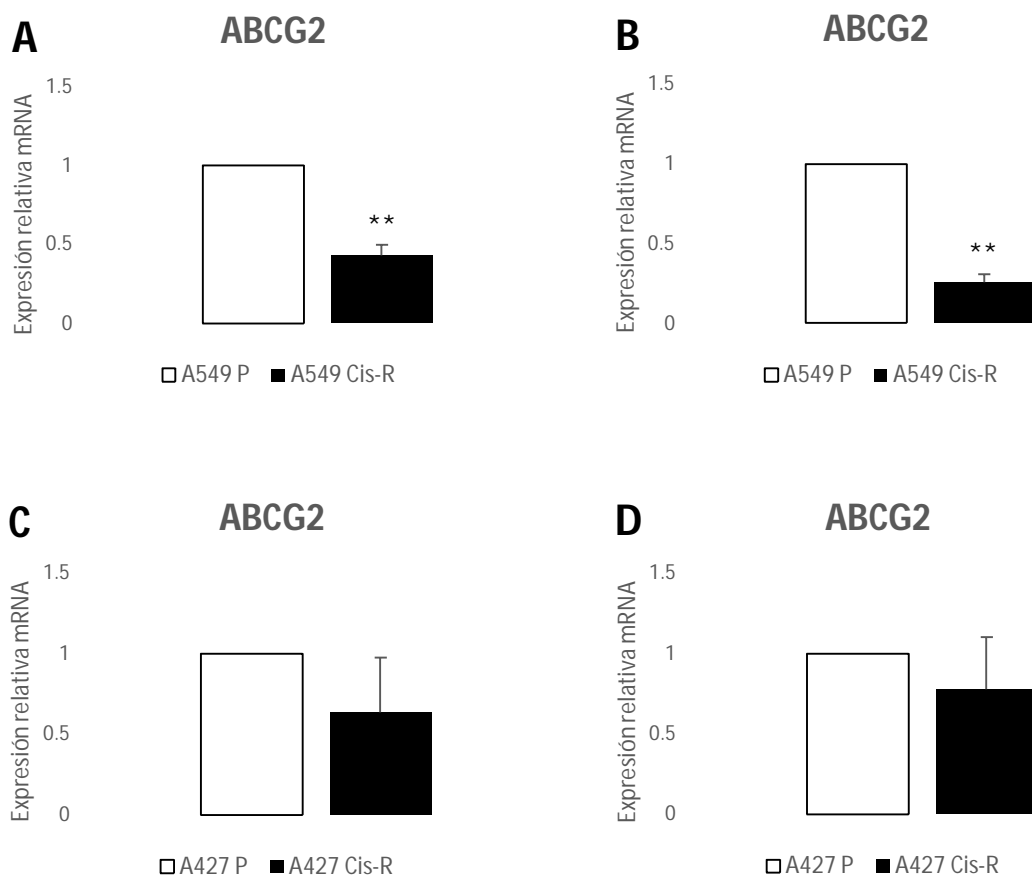




**Figura 32. Perfil de expresión de miRNAs por RT-qPCR SYBR green en INER37 P e INER37 cis-R.** Expresión relativa de miR-301a (A), miR-543 (B), miR-487a (C), miR-145 (D), miR-361a (E), miR-221 (F), miR-217 (G) y miR-374 (H). Ensayos realizados por triplicado por pozo. Análisis estadístico con prueba de *t* de *student* (pareada). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

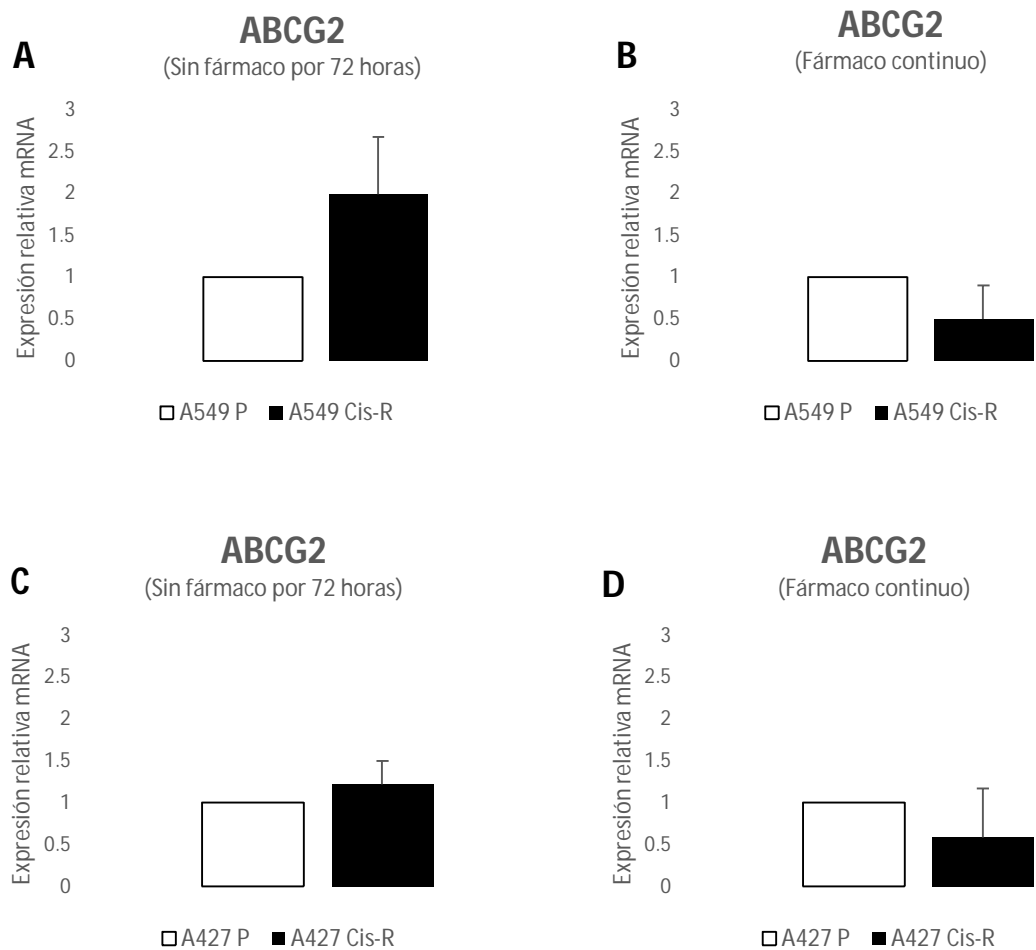
#### 7.4. Análisis de expresión de ABCG2 en células A549 y A427 Quimioresistentes.

A continuación se muestran resultados preliminares sobre la expresión del gen ABCG2 blanco de miR-487a mediante ensayos por RT-qPCR en líneas celulares A549 y A427. El análisis de expresión permitió observar que la expresión de ABCG2 disminuye en ambos líneas celulares quimioresistentes A549 y A427 (Fig. 33A y C), con respecto a su línea celular parental (Fig. 33B y D).

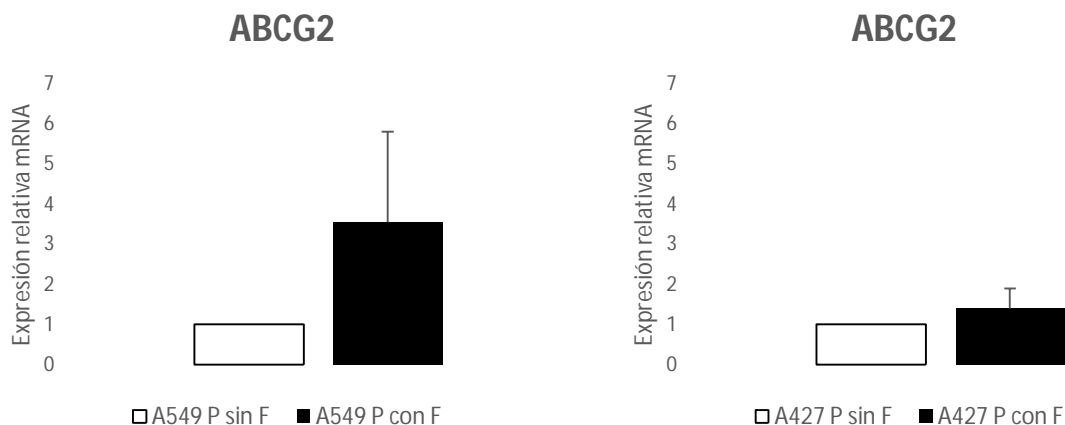


**Figura 33. Perfil de expresión relativa mRNA de ABCG2 en los líneas celulares A549 y A427.** A) A549 primera réplica experimental. B) A549 segunda réplica experimental. C) A427 primera réplica experimental. D) A427 segunda réplica experimental. Ensayos realizados por triplicado por pozo. Análisis estadístico con prueba de *t* de *student* (pareada). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Adicionalmente para determinar si el fármaco tiene la capacidad de inducir la expresión de ABCG2 a corto plazo, se comparó la expresión de éste en cultivos celulares A549 P y A549 cis-R y A427 P y A427 cis-R con una interrupción de 72 horas del fármaco respecto a cultivos sin interrupción del mismo. Los resultados obtenidos mostraron que el fármaco influencia la expresión de ABCG2 en células que fueron privadas por 72 horas de cisplatino al observar una mayor expresión de ABCG2 (Fig 34A y C). De manera contraria, una menor expresión de ABCG2 ocurrió en células que fueron sometidas a fármaco continuo (Fig. 34B y D). Los datos muestran que las células quimioresistentes mantienen niveles bajos de ABCG2 a dosis continuas del fármaco, lo cual se correlaciona con elevados niveles de expresión de miR-487a. Así mismo, se comparó la expresión de ABCG2 en células parentales A549 y A427 sin fármaco por 72 horas respecto a células parentales A549 y A427 con fármaco continuo, observándose mayor expresión de ABCG2 en células con fármaco continuo (Fig. 35A-B). Con base en los datos obtenidos, se puede concluir que la expresión de ABCG es modulada por la presencia del fármaco.



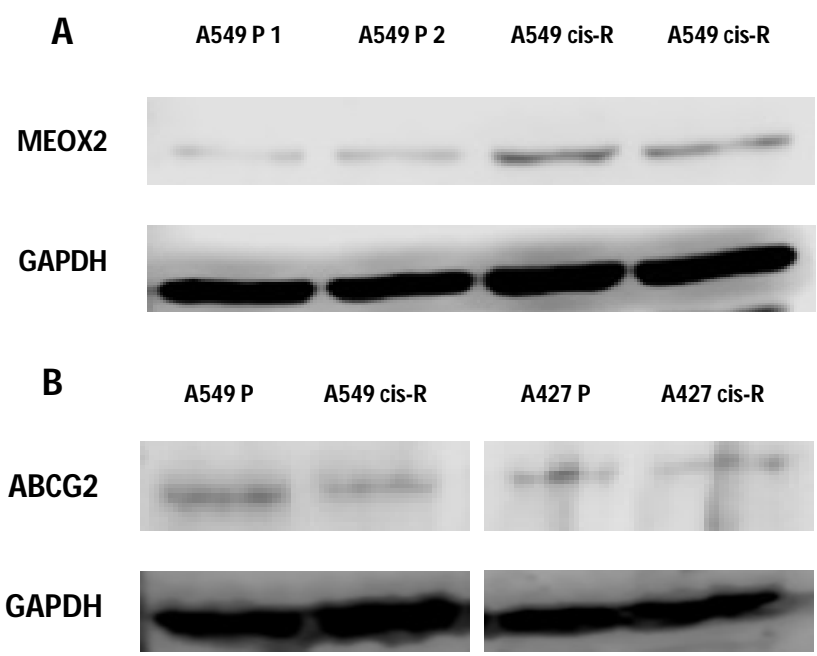
**Figura 34. Expresión relativa mRNA de ABCG2 en A549 parental y A549 Cis-R con y sin interrupción del fármaco.** A) A549 Cis-R sin fármaco por 72 horas previo a la obtención de los extractos de RNA total. B) A549 Cis-R sin interrupción del fármaco previo a la obtención de los extractos de RNA total. Análisis estadístico con prueba de *t* de *student* (pareada) con nivel de significancia de 0.05. \*  $P < 0.05$ .



**Figura 35. Expresión relativa mRNA de ABCG2 en A549 y A427 parentales con y sin interrupción del fármaco.** A) A549 P sin fármaco por 72 horas y A549 P con fármaco continuo previo a la obtención de los extractos de RNA total. B) A427 P sin fármaco por 72 horas y A427 P con fármaco continuo previo a la obtención de los extractos de RNA total. Ensayos realizados por triplicado por pozo. Análisis estadístico con prueba de *t* de student (pareada) con nivel de significancia de 0.05. \*  $P < 0.05$ .

### 7.5. Análisis de expresión a nivel de proteína de los blancos génicos de MEOX2 y ABCG2 en líneas celulares quimioresistentes A549 y A427

Nuestro análisis de expresión de blancos génicos a nivel de proteína mediante ensayos por Western blot reveló que MEOX2 se incrementa en ambas réplicas experimentales de células A549 quimioresistentes (Fig. 36A). Mientras que por el contrario, ABCG2 al igual que su mRNA se subexpresa en ambas líneas celulares de cáncer pulmonar A549 y A427 (Fig. 36B), lo cual se correlaciona en A549 con elevados niveles de expresión de miR-487a, indicando una posible regulación de este miRNA con la baja expresión de ABCG2.



**Figura 36. Detección de la proteína de ABCG2 por Western blot en las líneas celulares A549 y A427.** Mediante análisis densitométrico se determinó que existen diferencias significativas en los niveles de intensidad entre ambas bandas.

## 8. DISCUSIÓN

El establecimiento de líneas celulares de cáncer pulmonar del grupo NSCLC resistentes a cisplatino permitió desarrollar un análisis de inducción y/o cambio en la expresión de un perfil de miRNAs diferencialmente expresado en líneas celulares de origen caucásico A549 cis-R y A427 cis-R, así como de origen mestizo Mexicano INER51 cis-R e INER37 cis-R, con respecto a sus líneas celulares originales parentales. A lo largo del tratamiento, se observaron cambios morfológicos significativos en cada una de las líneas celulares. Estos cambios fueron evidenciados únicamente en las células de tratamiento a lo largo del tiempo de inducción, lo cual sugiere que el fenotipo final adquirido, es fuertemente asociado a células con capacidad de resistencia a cisplatino. Así mismo, se pudo determinar que las células parentales con mayor sensibilidad a cisplatino fueron las líneas celulares INER51 e INER37. Una característica distintiva de estas células respecto a A549 y A427, es el crecimiento agrupado que forma una monocapa homogénea en las cajas de cultivos, cuyo fenotipo, es característico de células epiteliales. Durante la adquisición del fenotipo resistente por parte de las líneas celulares INER51 cis-R e INER37 cis-R, se observó la pérdida gradual de adherencia célula-célula en los cultivos celulares, cuyo resultado final, fue la adquisición de un fenotipo similar a células mesenquimales. Se ha establecido que durante la invasión tumoral, las células epiteliales adquieren capacidad de migración e invasión, lo cual es asociado a cambios fenotípicos que involucran la pérdida de adhesión celular (Luczka et al., 2013). Esto sugiere que las células INER51 cis-R e INER37 cis-R, han cambiado sus propiedades epiteliales por un fenotipo asociado a células

mesenquimales que es llevado a cabo durante el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés), lo cual permitiría explicar el cambio fenotípico observado en estas células. Por otro lado, la EMT es fuertemente asociada a la capacidad de quimioresistencia a múltiples fármacos (Chen et al., 2010; Gungor et al., 2011; Sun et al., 2012). El cambio morfológico observado en las líneas celulares INER51 e INER37, son similares a los reportados por Liu y colaboradores. Aquí, los autores evaluaron la capacidad de resistencia a cisplatino acompañado de la EMT en la línea celular de cáncer de lengua CAL27 y su contraparte resistente, DDP-resist CAL27. La línea celular parental CAL27 muestra un crecimiento similar a las células INER51 e INER37 parentales; sin embargo, DDP-resist CAL27, al igual que las células INER51 cis-R e INER37 cis-R muestran cambios morfológicos similares asociados a células mesenquimales (Liu et al., 2013). Por su parte, las líneas celulares A549 y A427 sufrieron cambios morfológicos finales menos evidentes. Respecto a A549 cis-R, se observó un ligero alargamiento de las células el cual ha sido evidenciado además por Wang y colaboradores en un modelo de A549 resistente a cisplatino (A549/CDDP). Los autores reportaron que A549/CDDP tiene una mayor capacidad de migración respecto a su parental así como una reducida expresión de E-cadherina y una sobreexpresión de vimentina, ambos, marcadores comúnmente usados para evaluar la EMT (Wang et al., 2014). Sin embargo, no fue posible encontrar reporte alguno sobre el aumento del tamaño celular de A549 a lo largo del proceso de inducción de resistencia a cisplatino (Zhang et al., 2010; Zhou et al., Meng et al., 2012; 2013; Zhang et al., 2015; Corte-Rodríguez et al., 2015; Zheng et al., 2015). Por otro lado, A427 cis-R fue la línea celular con menor cambio fenotípico durante



el periodo de inducción. El único cambio evidente, fue un ligero alargamiento en su estructura; sin embargo, al igual que las demás células resistentes, resultó ser afectada si es mantenida a confluencias elevadas (>90%).

Por su parte, los cambios obtenidos en el perfil de expresión de los miRNAs entre células parentales y resistentes, permitió determinar su posible participación en la resistencia a cisplatino; sin embargo, es necesario realizar ensayos de análisis funcional mediante la transfección de *mimics* o *antagomiRs* para demostrar su posible importancia en la quimioresistencia. Sin embargo, los perfiles de expresión no fueron similares entre cada modelo celular, difiriendo significativamente el sentido de expresión entre A549 y A427. De acuerdo a los datos obtenidos, los miRNAs desregulados en el modelo de A549, así como en INER51 e INER37, pudieran actuar como oncomiRs, favoreciendo la resistencia a cisplatino. Sin embargo, los datos obtenidos en el modelo de A427, la función de los miRNAs pudiera ser totalmente contraria debido a su baja expresión, por lo cual, indicaría un papel como supresores de tumores. Por su parte, las líneas celulares de las líneas celulares INER51 e INER37, conservan un patrón de sobreexpresión al igual que en A549, a diferencia que la sobreexpresión no es tan pronunciada. Los datos obtenidos entre cada uno de las líneas celulares, indicaría diferentes vías en la regulación en el mecanismo o mecanismos de resistencia a cisplatino, lo cual sería mayormente evidenciado en A427. Con base en ello, la función de un mismo miRNA puede estar inhibida o alterada en respuesta a la resistencia a cisplatino. Tal es el caso de miR-130a, cuya expresión en líneas celulares de carcinoma hepatocelular resistentes a cisplatino es fuertemente inducida, y, disminuida en líneas celulares

de cáncer de ovario resistentes a cisplatino (Xu et al., 2012; Zhang et al., 2013). De igual modo, se ha reportado la participación de miR-181 como oncomiR en cáncer de próstata regulando negativamente la expresión de DAX1, y con función supresora de tumor en NSCLC mediante la regulación de Bcl-2 (Tong et al., 2014; Huang et al., 2015). Por tal motivo, los miRNAs pueden tener una función dual de acuerdo al contexto de resistencia o tipo celular, tal como se observa en los modelos establecidos en este trabajo.

Inicialmente, miR-374 fue propuesto como control endógeno normalizador junto con U6; sin embargo, resultó ser el miRNA promedio con mayor tasa de cambio en los 4 líneas celulares. Recientemente, ha sido reportada la participación miR-374 junto miR-130a en la regulación de la resistencia a cisplatino en la línea celular A2780 de cáncer de ovario. Mediante ensayos de análisis funcional a partir de la transfección con un *mimic* de miR-374 y miR-130a, se redujo la sensibilidad a cisplatinato en A2780; de manera contraria, la inhibición de ambos miRNAs en la línea celular resistente A2780/DDP potenció el efecto citotóxico del fármaco, permitiendo así, evidenciar el papel de miR-374 en la resistencia a cisplatino. (Li et al., 2015). Además, miR-374 ha sido reportado como un oncomiR que favorece la proliferación, migración e invasión celular mediante la regulación de SRCIN1 en cáncer gástrico (Xu et al., 2015), así como un promotor de la proliferación celular en cáncer de esófago (mediante la supresión de Axin2) y en osteosarcoma a partir de la subexpresión de FOXO1 (Wang et al., 2015; He et al., 2015). Con base en las recientes evidencias, y a los resultados obtenidos en este trabajo, miR-374 es

propuesto como un miRNA clave en la quimioresistencia y demás procesos del cáncer, que hasta hace poco, permaneció poco estudiado.

Por otra parte, miR-543 resultó ser el segundo miRNA promedio en ser desregulado en las líneas celulares resistentes. Una característica interesante, de acuerdo al análisis de predicción de miRanda, es que miR-543 podría regular el mensajero de TWIST1 en la misma región donde se une la familia miR-181 (a-d). En líneas celulares CAL27 de carcinoma de células escamosas de lengua resistentes a cisplatino, se encontró que la subexpresión de miR-181a y sobreexpresión de TWIST1 contribuyen a la quimioresistencia a cisplatino. Mediante la restauración transitoria de la expresión de miR-181a, a través de la transfección de su mimic, se pudo revertir el fenotipo resistente que fue acompañado de la inhibición de TWIST1 (Liu et al., 2013). Con base en ello, estudios en cáncer endometrial, se ha reportado que miR-543 suprime la capacidad oncogénica mediante la regulación de TWIST1 y FAK (Bing et al., 2014). Por tal motivo, miR-543, al igual que lo reportado por Liu et al., pudiera participar de manera importante en la resistencia a cisplatino mediante la regulación negativa de TWIST1 en A427 cis-R. Así mismo, miR-543 es desregulado en cultivos de esferoides derivados de líneas celulares de cáncer de mama. Los esferoides destacan por la expresión de genes asociados a la autorenovación y quimioresistencia. Mediante análisis por microarreglos, se identificaron 37 miRNAs diferencialmente expresados, dentro de los cuales, miR-543 fue subexpresado junto con otros 12 miRNAs más (entre ellos, miR-145 y miR-181a) (Feifei et al., 2012). De manera contraria, miR-543 ha sido reportado con función de oncomiR en carcinoma hepatocelular, cáncer

de ovario y adenocarcinoma gástrico (Yu et al., 2014; Song et al., 2015; Li et al., 2015). Por tal motivo, en los modelos de A549, INER51 e INER37, la capacidad de oncogen de miR-543, pudiera favorecer el establecimiento de la resistencia a cisplatino.

El tercer miRNA que resultó ser mayormente desregulado en las líneas celulares fue miR-487a. Actualmente, no hay reportes sobre su participación en la resistencia a cisplatino; sin embargo, se ha evidenciado su participación en la resistencia a mitoxantrona en células MCF-7 a partir de la regulación de ABCG2. Células MCF-7/MX (resistentes a mitoxantrona) son caracterizadas por presentar elevados niveles de expresión de ABCG2. Mediante análisis de predicción, los autores determinaron que miR-487a era un posible blanco regulador de ABCG2. La expresión ectópica de miR-487a mediante la transfección de su mimic, redujo significativamente la expresión de ABCG2 aumentando la toxicidad de mitoxantrona sugiriendo que miR-487a regula la resistencia a mitoxantrona mediante la regulación negativa de ABCG2 (Ma et al., 2013). Así mismo, la concentración interna del fármaco es uno de los principales mecanismos de resistencia a cisplatino, lo cual es acompañado de la alta expresión de genes como ABCG2 (Reed et al., 2011), por tal motivo, la sobreexpresión de miR-487a en A427 cis-R, pudiera incrementar la apoptosis inducida por cisplatino de manera similar a lo reportado por Ma y colaboradores.

Otro de los miRNAs que resultó mayormente desregulado fue miR-221. MiR-221, junto con miR-222, han sido ampliamente reportados por su papel en diferentes procesos del cáncer de diversos tumores (Liu et al., 2015; Goto et al., 2015; Hung

et al., 2015; Zhao et al., 2015; Khella et al., 2015; Wang et al., 2015; Bazot et al., 2015). Los resultados de sobreexpresión de miR-221 obtenidos en las líneas celulares de A549, INER51 e INER37, son similares a los reportados por diversos autores en la resistencia a cisplatino. En osteosarcoma, miR-221 induce la sobrevivencia celular y resistencia a cisplatino mediante la regulación de la vía PI3K/Akt. Aquí, mediante la transfección del mimic de miR-221, en las líneas celulares SOSP-9607 y MG63 condujo a la disminución del efecto citotóxico de cisplatino. Así mismo, la inhibición de miR-221 en los mismo líneas celulares, sensibilizaron la apoptosis mediada por cisplatino. Finalmente, los autores mediante ensayos de luciferasa determinaron que miR-221 regula negativamente a PTEN para activar la vía PI3K/Akt (Zhao et al., 2013). Así mismo, la supresión PTEN por miR-221 en cáncer de mama, induce la resistencia a TRAIL, lo cual favorece la EMT (Wang et al., 2014). Por otro lado, mediante un perfil de expresión miRNAs por microarreglo, un total de 103 miRNAs fueron diferencialmente expresados en un modelo celular de MCF7 resistente a cisplatino. Entre estos miRNAs, miR-221/miR-222 resultaron ser significativamente desregulados junto con miR-146a, miR-10a, miR-345, miR-200b y miR-200c. Los autores determinaron que los miRNAs diferencialmente expresados están involucrados en el control de señalizaciones celulares, sobrevivencia celular, metilación del DNA e invasividad. La elevada expresión de miR-221 fue asociada con la regulación negativa de p27, p57 y ER-alfa que fue relacionado con la sobrevivencia celular y falta de respuesta a estrógeno (Pogribny et al., 2010). Hasta el momento, no hay evidencia sobre la participación de miR-221 en la resistencia a cisplatino en cáncer de pulmón. Sin embargo, se ha reportado elevada expresión de miR-221 junto con miR-222 en

células NSCLC (A549, CALU-1 y H460) resistentes a TRAIL mediante la regulación negativa de Kit y p27<sup>kip1</sup> (Garofalo et al., 2008).

MiR-361 fue uno de los miRNAs con mayor tasa de cambio entre los modelos A549 y A427. Actualmente, no hay reportes de miR-361 en la quimioresistencia; sin embargo, en un trabajo publicado por Koutova y colaboradores, se analizó cuantitativamente la expresión de miR-361 en conjunto de miR-199b-5p, miR-301b, miR-326, miR-625 y miR-655 en muestras de plasma de individuos diagnosticados con leucemia mieloide aguda en contraste de individuos clínicamente sanos. Estos miRNAs mostraron ligeros cambios en su nivel de expresión comparado con plasma de individuos sanos y abundantemente expresados en pacientes al momento del diagnóstico. Así mismo dichos autores, reportan que posterior a la quimioterapia, estos miRNAs disminuyeron en pacientes. Mientras que, en sólo 1 de 8 pacientes que no respondió a la quimioterapia, fueron detectados elevados niveles de expresión de miR-361 evidenciando su posible participación en la quimioresistencia en individuos con leucemia mieloide aguda (Koutova et al., 2015). La función de miR-361 como oncomiR ha sido previamente descrita por su participación en el fenómeno de la EMT en cáncer de cérvix en conjunto con AEG1, Sam-68 y FTS (Qureshi et al., 2015) facilitando la progresión tumoral e invasión a través de la EMT inhibiendo a E-cadherina (Wu et al., 2013). En contraste, se ha establecido la participación de miR-361 con función supresora de tumor inhibiendo la metástasis en cáncer de colon y gástrico mediante la regulación negativa de SND1 (Ma et al., 2015), regulando negativamente a STAT6 en cáncer de próstata (Liu et al., 2014), inhibiendo la angiogénesis en mieloma cuando la expresión de AGO2 no está

alterada (Wu et al., 2014), en carcinoma de células escamosas cutáneo mediante la subexpresión de VEGFA (Kanitz et al., 2012) e incrementando la apoptosis mediante la regulación negativa de caspasa 3/7 induciendo arresto del ciclo celular en la fase S (Du et al., 2013). Con base en lo anterior, los líneas celulares de cancer pulmonar A549, INER51 e INER37 al presentar elevada expresión de miR-361, probablemente ayudaría a favorecer un mecanismo de resistencia asociado a la EMT, inhibiendo entre otros blancos, a E-cadherina (Wu et al., 2013). Mientras que el modelo celular A427, fue el único que presentó bajos niveles de expresión de miR-361, sugiriendo que la baja expresión de este miRNA podría favorecer el aumento en la expresión de GLI1, cuya predicción in silico señala como probable blanco post-transcripcional. Lo anterior correlacionaria con antecedentes de nuestro grupo respecto del eje de expresión MEOX2-GLI1, involucrado en la quimioresistencia en cáncer pulmonar (Armas López L, et al., 2016).

miR-145 fue el único miRNA que, en promedio, resultó negativamente expresado en los líneas celulares resistentes. Inicialmente, miR-145 fue seleccionado de acuerdo a la capacidad regulatoria de OCT4 (Xu et al., 2009); sin embargo, no fue posible establecer relación entre miR-145 y el mRNA de OCT4 en los análisis de predicción, a pesar que éste se llevó a cabo de igual manera en miRanda como Xu y colaboradores. En cáncer de pulmón, la subexpresión de miR-145 es asociada a carcinoma pobremente diferenciado y bajo pronóstico de vida en muestras de tejido tumoral de NSCLC (Shen et al., 2015). Los autores proponen a miR-145 como un útil marcador pronóstico que puede ser usado para predecir pobre diferenciación, quimioresistencia y una tasa de sobrevida más corta. Los resultados obtenidos por

estos autores, coincide con lo obtenido en la línea celular A427, INER51 e INER37 (réplica 1) donde la expresión de miR-145 es reducida. Con base en ello, se sugiere que miR-145 podría actuar como un gen supresor de tumor al inhibir la función de OCT4 como ha sido reportado previamente (Yamaguchi et al., 2011; Sripathi et al., 2012; Wang et al., 2013). En contraste, miR-145 ha sido altamente expresado en NSCLC resistente a cisplatino con baja expresión de CDK6 (Bar et al., 2015). Aquí, los autores indujeron la resistencia a cisplatino en la línea celular Calu6 y compararon el perfil de expresión de miRNAs mediante ensayos por microarreglos. La modulación de miR-145 por sí sola no afectó la sensibilidad a cisplatino. CDK6, al ser un potencial blanco de miR-145 se encontró subexpresado en las células resistentes; sin embargo, su subexpresión no fue causada directamente por miR-145. Posteriormente se determinó que la inhibición de CDK6 antagoniza la citotoxicidad de cisplatino sugiriendo evitar inhibir a CDK6 durante el tratamiento la terapia con cisplatino. De acuerdo a lo reportado por estos autores, la expresión de miR-145 puede ser sobreexpresada en líneas celulares resistentes a cisplatino como lo observado en A549 cis-R. Con base en lo anterior, diferentes trabajos describen a miR-145 como un miRNA con capacidad de actuar con función supresora o a favor de la resistencia a cisplatino. Los líneas celulares establecidos en este trabajo, permiten observar un comportamiento similar a lo reportado por diferentes autores.

miR-301a fue un miRNA altamente desregulado en A427 cis-R e INER51 cis-R. El papel de miR-301a como oncomiR, ha sido ampliamente reportado por su participación diferentes tipos de cáncer regulando negativamente a RUNX3 en



cáncer gástrico (Wang et al., 2013), activando la vía de señalización Wnt/beta-catenina en cáncer de mama mediante la inhibición de PTEN (Ma et al., 2014), promoviendo la migración e invasión en cáncer de colon regulando a la baja a TGFBR2 (Zhang et al., 2014) y SOCS6 (Fang et al., 2015), entre otros. Actualmente, hay pocos trabajos respecto a la participación de miR-301a en la quimioresistencia. En células de osteosarcoma, miR-301a modula la resistencia a doxorubicina regulando negativamente la expresión de AMPK alfa 1, donde su inhibición en células quimioresistentes, sugiere que su sobreexpresión es asociada a la resistencia a doxorubicina (Zhang et al., 2015). Por otro lado, en células de cáncer pancreático, miR-301a es altamente expresado activando la vía de NF-kB (Lu et al., 2011). Así mismo, la vía NF-kB es fuertemente asociada a la quimioresistencia a cisplatino en NSCLC (Heavey et al., 2014). De acuerdo a los antecedentes de nuestro grupo de investigación, MEOX2 participa de manera importante en la resistencia a cisplatino en NSCLC. Hasta el momento, no se ha evaluado la participación de miR-301a y MEOX2 en la resistencia a cisplatino a través de la activación de NF-kB. MEOX2 regula la actividad de NF-kB en células vasculares endoteliales a través de la interacción con p65 I $\kappa$ B $\beta$  (Chen et al., 2010), y miR-301a es frecuentemente sobreexpresado en carcinoma hepatocelular modulando la expresión de NF-kB mediante la regulación negativa de MEOX2 (Zhou et al., 2012); por lo cual, la asociación entre miR-301a-MEOX2-NF-kB podría describir un mecanismo aún no reportado en la resistencia a cisplatino en NSCLC.

Finalmente, miR-217 fue uno de los miRNAs desregulados en este estudio. Recientemente, en células de cáncer de mama, se determinó que miR-217 induce

a la quimioresistencia e invasión regulando negativamente la vía PTEN inhibiendo la actividad de las caspasas 3/7 (Zhang et al., 2015). En contraste, la expresión de miR-217 es sobrerregulada posterior al tratamiento con quercetina/cisplatino en células 143B de osteosarcoma, lo cual es acompañado de bajos niveles de KRAS a nivel de mensajero y proteína. La inhibición de miR-217 mostró menor efecto al tratamiento de quercetina/cisplatino indicando un papel clave durante la sensibilidad al tratamiento (Zhang et al., 2015). Sin embargo, de igual modo como algunos otros miRNAs aquí descritos, miR-217 ha sido reportado con función dual en cáncer. Además de su participación en la resistencia y sensibilidad al tratamiento oncológico, miR-217 es subexpresado junto con miR-646 en osteosarcoma, lo cual es asociado a progresión, metástasis y mal pronóstico (Azam et al., 2015). Así mismo, en un trabajo publicado por Xi y colaboradores, se determinó que miR-217 es subexpresado en células inmortalizadas de epitelio de esófago y adenocarcinoma de esófago cuando son sometidas a condensado de humo tabaco. Mediante diferentes ensayos de validación de miRNA-mRNA, se demostró la interacción de miR-217 a KLK7 implicado en la formación de adenocarcinoma de esófago. A partir de análisis epigenéticos, se demostró que el condensado de humo tabaco además de reprimir a miR-217, coincidió con hipermetilación dependiente de DMT3b y un descenso en la ocupación del factor nucleolar 1 en el locus de miR-217 (Xi et al., 2015). Por otro lado, en cáncer gástrico, miR-217 actúa con función supresora inhibiendo a GPC5 (Wang et al., 2015) así como a EZH2 (Chen et al., 2015). Al inicio de este trabajo, y de acuerdo al análisis de predicción, miR-217 se consideró como un probable regulador de EZH2, quedando evidenciado por lo

establecido por Chen y colaboradores. Sin embargo, no ha sido establecida una asociación de miR-217-EZH2 en la resistencia a cisplatino en cáncer de pulmón.

## CONCLUSIONES

- I. Nuestros resultados sugieren que miR-374 (inicialmente propuesto como control endógeno), resultó el miRNA con mayor índice de cambio de expresión, siendo éste el primer reporte que demuestra la probable asociación de miR-374 en la quimioresistencia a cisplatino en cáncer pulmonar.
- II. El perfil de expresión de miR-301a, miR-543, miR-487a, miR-361a, miR-221, miR-217 y miR-374 en todos los líneas celulares quimioresistentes excepto A427, resultaron sobreexpresados con respecto a sus líneas celulares parentales, sugiriendo una posible función oncomiR que favorece la resistencia a cisplatino. De manera contraria, miR-145 fue el único miRNA que resultó con bajo índice de expresión.
- III. En contraste, el perfil de expresión de miRNAs aquí propuesto resultó subexpresado en el modelo celular A427 quimioresistente, indicando una posible función supresora, en contraste a lo observado en los 3 líneas celulares de cáncer pulmonar estudiados.
- IV. De acuerdo a los resultados preliminares obtenidos a nivel de proteína, MEOX2 resultó más expresado en A549 cis-R respecto a su parental. Esto concuerda con los datos publicados previamente por nuestro grupo de investigación donde se reporta la sobreexpresión de MEOX2 en la quimioresistencia.
- V. A nivel de proteína, ABCG2 resultó subexpresado en A549 cis-R y A427 cis-R respecto a sus parentales, lo cual contrasta con lo reportado actualmente.

VI. En el modelo de A427, la reducción de la expresión de ABCG2 a nivel de proteína se correlaciona con elevados niveles de miR-487, indicando una posible vía de regulación de ABCG2 a través de miR-487.

## 9. PERSPECTIVAS

Para evidenciar aun más la participación de los miRNAs incluidos en este estudio, se requiere realizar ensayos de análisis funcional mediante la transfección de inhibidores (antagomiR) o *mimics* que permitan consolidar el papel de alguno de estos miRNAs en la quimioresistencia.

Así mismo, como estrategia para inhibir la sobreexpresión de los miRNAs en la quimioresistencia, se sugiere llevar a cabo estudios con lncRNA circulares (RNAs esponja) que incluyan las regiones semilla de los miRNAs que se deseen silenciar; el cual a su vez, sea capaz de inhibir más de un miRNA.

Por otro lado, la restauración de la expresión de aquellos miRNAs que se encuentren silenciados o subexpresados, se puede llevar a cabo mediante el diseño y de construcciones que permitan aumentar la expresión de miRNAs con función supresora. Estas construcciones pueden basarse en el principio del modelo GAL4/UAS, donde la región promotora sería activada en presencia de alguno de los genes que participan en la quimioresistencia, de este modo, la expresión del gen induciría la producción de su propio miRNA regulador evitando así, su expresión y atenuando el proceso de quimioresistencia.

## REFERENCIAS

1. Almeida GM, Duarte TL, Farmer PB, Steward WP & Jones GD. Multiple end-point analysis reveals cisplatin damage tolerance to be a chemoresistance mechanism in a NSCLC model: implications for predictive testing. *Int J Cancer*. 2008;122(8):1810–1819.
2. Ammad A. Farooqi, Muhammad Z. Qureshi & Muhammad Ismail. Chapter 16 - Epigenetic Modifications of miRNAs in Cancer. *Personalized Epigenetics*, 2015, Pages 461-474.
3. Applied Biosystems. Endogenous Controls for Real-Time Quantitation of miRNA Using TaqMan MicroRNA Assays. En red. Disponible en: [https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_044972.pdf](https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_044972.pdf)
4. Soriano A, Jubierre L, Almazán-Moga A, Molist C, Roma J, de Toledo JS, Gallego S & Segura MF. microRNAs as pharmacological targets in cancer. *Pharmacol Res*. 2013 Sep;75:3-14. doi: 10.1016/j.phrs.2013.03.006.
5. Arrieta O, González-De la Rosa CH, Aréchaga-Ocampo E, Villanueva-Rodríguez G, Cerón-Lizárraga TL, Martínez-Barrera L, Vázquez-Manríquez ME, Ríos-Trejo MA, Alvarez-Avitia MA, Hernández-Pedro N, Rojas-Marín C & De la Garza J. Randomized phase II trial of All-trans-retinoic acid with chemotherapy based on paclitaxel and cisplatin as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28: 3463–3471. doi: 10.1200/JCO.2009.26.6452.
6. Azam AT, Bahador R, Hesarikia H, Shakeri M, Yeganeh A. Downregulation of microRNA-217 and microRNA-646 acts as potential predictor biomarkers in progression, metastasis, and unfavorable prognosis of human osteosarcoma. *Tumour Biol*. 2016 May;37(5):5769-73. doi: 10.1007/s13277-015-3821-4.
7. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;2(136):215–33.
8. Behrens C, Solis LM, Lin H, Yuan P, Tang X, Kadara H, Riquelme E, Galindo H, Moran CA, Kalhor N, Swisher SG, Simon GR, Stewart DJ, Lee JJ, Wistuba II. EZH2 protein expression associates with the early pathogenesis, tumor progression, and prognosis of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2013 Dec 1;19(23):6556-65. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3946.
9. Beitzinger M, Meister G. Preview. MicroRNAs: from decay to decoy. *Cell* 2010;5(140):612–4.
10. Li-Xin S & Wei G. MicroRNA-543 suppresses endometrial cancer oncogenicity via targeting FAK and TWIST1 expression. 2014 Sep;290(3):533-41
11. Bing L, Hong C, Li-Xin S, Wei G. MicroRNA-543 suppresses endometrial cancer oncogenicity via targeting FAK and TWIST1 expression. 2014 Sep;290(3):533-41.
12. C. Gungor, H. Zander, K.E. Effenberger, et al., Notch signaling activated by replication stress-induced expression of midkine drives epithelial– mesenchymal transition and chemoresistance in pancreatic cancer, *Cancer Res*. 71 (2011) 5009–5019.
13. Cao R, Hedlund EM. R Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways. *J Mol Med (Berl)*. 2008 Jul;86(7):785-9. doi: 10.1007/s00109-008-0337-z.
14. Chen Y, Rabson AB, Gorski DH. MEOX2 regulates nuclear factor-kappaB activity in vascular endothelial cells through interactions with p65 and IkappaBbeta. *Cardiovasc Res*. 2010 Sep 1;87(4):723-31.

15. Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, Babar I, et al. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res* Oct 15 2008;68(20):8535–40.
16. Choong, M.L., Yang, H.H., McNiece, I. (2007) MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. *Exp. Hematol.*4:551–564
17. Corney, D.C., Flesken-Nikitin, A., Godwin, A.K., Wang, W., Nikitin, A.Y. (2007) MicroRNA-34b and microRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res.* 18:8433–8438.
18. Crea F, Paolo AD, Liu HH, Polillo M, Clermont PL, Guerrini F, Ciabatti E, Ricci F, Baratè C, Fontanelli G, Barsotti S, Morganti R, Danesi R, Wang Y, Petrini M, Galimberti S, Helgason CD. Polycomb genes are associated with response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Epigenomics.* 2015 Sep 7.
19. Cristian Tomasetti & Bert Vogelstein. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. 2 January 2015 • vol 347 issue 6217.
20. Croix S, Florenes B, Rak VA, et al. Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nat Med* 1996; 2: 1204–10
21. Cui H, Zhang AJ, Chen M, Liu JJ. ABC Transporter Inhibitors in Reversing Multidrug Resistance to Chemotherapy. *Curr Drug Targets.* 2015 Apr 22.
22. Damiano JS, Hazlehurst LA, Dalton WS. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) protects the K562 chronic myelogenous leukemia cell line from apoptosis induced by BCR/ABL inhibition, cytotoxic drugs, and  $\gamma$ -irradiation. *Leukemia (Baltimore)* 2001; 15: 1232–9. 35.
23. Donev IS, Wang W, Yamada T, et al. Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(8):2260–2269.
24. Du L, Borkowski R, Zhao Z, Ma X, Yu X, Xie XJ, Pertsemelidis A. A high-throughput screen identifies miRNA inhibitors regulating lung cancer cell survival and response to paclitaxel. *RNA Biol.* 2013 Nov;10(11):1700-13.
25. Eiring AM, Harb JG, Neviani P, Garton C, Oaks JJ, Spizzo R, et al. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell* 2010;5(140):652–65.
26. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* Oct 2 2007;104(40):15805–10.
27. Feifei N, Mingzhi Z, Yanyun Z, Fang R, Mingzhu H, Mingzhi C, Yafei S, Fengchun Z. MicroRNA expression analysis of mammospheres cultured from human breast cancers. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012 Nov;138(11):1937-44.
28. G.I. Solyanik. Multifactorial nature of tumor drug resistance. *Exp Oncol* 2010 32, 3, 181–185.
29. Garofalo M et al. EGFR and MET receptor tyrosine kinase-altered microRNA expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers. *Nat Med* 2012;18(1):74–82.
30. Garofalo M et al. MicroRNA signatures of TRAIL resistance in human nonsmall cell lung cancer. *Oncogene* 2008;27(27):3845–55.
31. Hao Wang a , Ge Zhang a , Huan Zhang b , Fan Zhang a , Binhua Zhou a , Fen Ning a , Hong-Sheng Wang a , Shao-Hui Cai b,n , Jun Du. Acquisition of epithelial–mesenchymal transition phenotype and cancer stem cell-like properties in cisplatin-resistant lung cancer cells through AKT/ $\beta$ -catenin/Snail signaling pathway. *European Journal of Pharmacology* 723 (2014) 156–166.



32. Hazlehurst LA, Damiano JS, Buyuksal I, et al. Adhesion to fibronectin via  $\alpha$ 1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAMDR). *Oncogen* 2000; 19: 4319–27.
33. Hien T. Dang, Anuradha Budhu, Xin W. Wang. The origin of cancer stem cells. *Journal of Hepatology* 2014 vol. 60 j 1304–1305.
34. [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_044972.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_044972.pdf).
35. Hung CH, Hu TH, Lu SN, Kuo FY, Chen CH, Wang JH, Huang CM1, Lee CM, Lin CY, Yen YH, Chiu YC. Circulating microRNAs as biomarkers for diagnosis of early hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus. *Int J Cancer*. 2015 Aug 11. doi: 10.1002/ijc.29802.
36. IARC. International Agency for Research on Cancer. Consultado en 2015. Disponible en: <http://www.iarc.fr>
37. Jin M, Zhang T, Liu C, Badeaux MA, Liu B, Liu R et al. MiRNA-128 suppresses prostate cancer by inhibiting BMI-1 to inhibit tumor-initiating cells. *Cancer Res* 2014; DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0404
38. Jin-shan Yang, Bao-jian Li, Hua-wei Lu, Yu Chen, Chuan Lu, Rui-xia Zhu, Si-hai Liu, Qingting Yi, Jing Li & Chun-hui Song. Serum miR-152, miR-148a, miR-148b, and miR-21 as novel biomarkers in non-small cell lung cancer screening. *Tumor Biol.* (2015) 36:3035–3042.
39. Kenfield, S. A, Wei, E. K, Stampfer, M. J, Rosner, B. A & Colditz, G. A. (2008). Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer. *Tobacco Control* 17 (3): 198–204.
40. Kise K, Kinugasa-Katayama Y, Takakura N. Tumor microenvironment for cancer stem cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Sep 8. pii: S0169-409X(15)00195-7. doi: 10.1016/j.addr.2015.08.005.
41. Komaki R et al 2011 Phase I study of celecoxib with concurrent irinotecan, cisplatin, and radiation therapy for patients with unresectable locally advanced non-small cell lung cancer *Front. Oncol*
42. Kurisetty VV, lakshmanswamy R, Damodaran C. Pathogenic and therapeutic role of miRNAs in breast cancer. *Front Biosci (landmark Ed)* 2014; 19:1-11.
43. L. Sun, Y. Yao, B. Liu, et al., MiR-200b and miR-15b regulate chemotherapy-induced epithelial–mesenchymal transition in human tongue cancer cells by targeting BMI1, *Oncogene* 31 (2012) 432–445.
44. Lee I, Ajay SS, Yook JI, Kim HS, Hong SH, Kim NH, et al. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Research* 2009;7(19):1175–83.
45. Linda Koutovaa, Monika Sterbova b, Eva Pazourkova b, Sarka Pospisilova b, Iveta Svobodova b, Ales Horinek b, Daniel Lysaka, Marie Korabecna. The impact of standard chemotherapy on miRNA signature in plasma in AML patients. *Leukemia Research xxx* (2015) xxx–xxx
46. Liu C. MicroRNA Regulation of Prostate Cancer Stem/Progenitor Cells and Prostate Cancer Development. *UT GSBS Dissertations and Theses (Open Access)* 2012; 236.
47. Liu W1, Song N2, Yao H2, Zhao L1, Liu H1, Li G1. miR-221 and miR-222 Simultaneously Target RECK and Regulate Growth and Invasion of Gastric Cancer Cells. *Med Sci Monit.* 2015 Sep 13;21:2718-25.
48. Liyun Xu, Yanyan Huang, Dongdong Chen, Jianying He, Wangyu Zhu, Yongkui Zhang, Xiaoguang Liu. Downregulation of miR-21 increases cisplatin sensitivity of non–small-cell lung cancer. *Cancer Genetics*, Volume 207, Issue 5, May 2014, Pages 214-220

49. Lu C, Onn A, Vaporciyan AA et al. (2010). "78: Cancer of the Lung". Holland-Frei Cancer Medicine (8th ed.). People's Medical Publishing House.
50. Lu Z, Li Y, Takwi A, Li B, Zhang J, Conklin DJ, Young KH, Martin R, Li Y. miR-301a as an NF- $\kappa$ B activator in pancreatic cancer cells. *EMBO J*. 2011 Jan 5;30(1):57-67. doi: 10.1038/emboj.2010.296.
51. M. Corte-Rodríguez, M. Espinab, L.M. Sierrab, E. Blancoa, T. Amesc, M. Montes-Bayóna, A. Sanz-Medela. Quantitative evaluation of cellular uptake, DNA incorporation and adduct formation in cisplatin sensitive and resistant cell lines: Comparison of different Pt-containing drugs. *Biochemical Pharmacology xxx* (2015) xxx–xxx.
52. Majid S, Dar AA, Saini S, Yamamura S, Hirata H, Tanaka Y, et al. MicroRNA- 205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer* 2010;24(116):5637–49.
53. Mao N, He G, Rao J, Lv L. Effect of silencing Bmi-1 expression in reversing cisplatin resistance in lung cancer cells and its mechanism. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2014 Jun;34(7):1000-4.
54. Mo Liu, Jianguang Wang, Hongzhang Huang, Jingsong Hou, Bin Zhang, Anxun Wang. miR-181a–Twist1 pathway in the chemoresistance of tongue squamous cell carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 441, Issue 2, 15 November 2013, Pages 364-370.
55. Morrison R, Schleicher SM, Sun Y, et al. Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *J Oncol*. 2011;2011:941876.
56. Muhammad Al-Hajj & Michael F Clarke. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* (2004) 23, 7274–7282
57. Na Xu, Thales Papagiannakopoulos, Guangjin Pan, James A. Thomson, Kenneth S. Kosik. MicroRNA-145 Regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and Represses Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, Volume 137, Issue 4, 15 May 2009, Pages 647-658.
58. Network NCC. Clinical Practice Guidelines in Oncology: Non-Small Cell Lung Cancer(v.4). 2014. Disponible en: <http://www.nccn.org>.
59. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 2009 Apr;9(4):274-84. doi: 10.1038/nrc2622.
60. Paolo Maione, Paola Claudia Sacco, Assunta Sgambato, Francesca Casaluze, Antonio Rossi and Cesare Gridelli. Overcoming resistance to targeted therapies in NSCLC: current approaches and clinical application. *Ther Adv Med Oncol* 2015, Vol. 7(5) 263–273 DOI: 10.1177/ 1758834015595048.
61. Pogribny IP, Filkowski JN, Tryndyak VP, Golubov A, Shpyleva SI, Kovalchuk O. Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. *Int J Cancer*. 2010 Oct 15;127(8):1785-94.
62. Qureshi R, Arora H, Rizvi MA. EMT in cervical cancer: its role in tumour progression and response to therapy. *Cancer Lett*. 2015 Jan 28;356(2 Pt B):321-31. doi: 10.1016/j.canlet.2014.09.021.
63. Reed E: Cisplatin and platinum analogs. *Cancer Principles and Practice of Oncology*. 8th edition. DeVita VT, Rosenberg SA and Lawrence T: Lippincott Williams and Wilkins; Philadelphia: pp. 419–426. 2008
64. Rehana Qureshi a, Himanshu Arora b, M.A. Rizvi. EMT in cervical cancer: Its role in tumour progression and response to therapy. *Cancer Letters* 356 (2015) 321–331.
65. Reungwetwattana T, Weroha SJ, Molina JR. Oncogenic pathways, molecularly targeted therapies, and highlighted clinical trials in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Clin Lung Cancer*. 2012;13: 252–266. doi: 10.1016/j.clcc.2011.09.004. pmid:22154278.

66. Ries L, Eisner M, Kosary C, et al., eds.: *Cancer Statistics Review, 1975-2002*. Bethesda, Md: National Cancer Institute, 2005. Available online. Last accessed May 30, 2013.
67. Schlag P, Schreml W. Heterogeneity in growth pattern and drug sensitivity of primary tumor and metastases in the human tumor colony-forming assay. *Cancer Res* 1982; 42: 4086–9.
68. Sen GL, Blau HM. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* 2005;7:633-6
69. Shell, S., Park, S.M., Radjabi, A.R., Schickel, R., Kistner, E.O., Jewell, D.A., Feig, C., Lengyel, E., Peter, M.E. (2007) Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:11400–11405.
70. Shien K, Toyooka S, Ichimura K, Soh J, Furukawa M, Maki Y, Muraoka T, Tanaka N, Ueno T, Asano H, Tsukuda K, Yamane M, Oto T, Kiura K, Miyoshi S. Prognostic impact of cancer stem cell-related markers in non-small cell lung cancer patients treated with induction chemoradiotherapy. *Lung Cancer*. 2012 Jul;77(1):162-7. doi: 10.1016/j.lungcan.2012.02.006. Epub 2012 Mar 3.
71. Shintaro Yamaguchi a, Kenichi Yamaharaa,b,\*, Koichiro Hommaa, Sayuri Suzuki a, Shizuka Fujii a, Ryuji Morizane, Toshiaki Monkawaa, Yumi Matsuzaki c, Kenji Kangawa d, Hiroshi Itoh. The role of microRNA-145 in human embryonic stem cell differentiation into vascular cells. *Atherosclerosis* 219 (2011) 468–474.
72. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014 Jan-Feb;64(1):9-29. doi: 10.3322/caac.21208.
73. Simone S, Riedel, Tobias Neff, Kathrin M. Bernt. Histone profiles in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, Volume 154, October 2015, Pages 87-109.
74. Song N, Liu H, Ma X, Zhang S. Placental Growth Factor Promotes Metastases of Ovarian Cancer Through MiR-543-Regulated MMP7. *Cell Physiol Biochem*. 2015 Sep 25;37(3):1104-1112.
75. Songshu Meng, Zhizhi Zhou, Fei Chen, Xiangang Kong, Huairan Liu, Ke Jiang, Wenbo Liu, Maozhi Hu, Xiaorong Zhang, Chan Ding, Yantao Wu. Newcastle disease virus induces apoptosis in cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma A549 cells in vitro and in vivo. *Cancer Letters* 317 (2012) 56–64.
76. Soto AM, Sonnenschein C. The somatic mutation theory of cancer: growing problems with the paradigm? *Bioessays*. 2004 Oct;26(10):1097-107.
77. Sripathi M, Sureban, Dongfeng Qu, Randal May, Naushad Ali, Courtney W. Houchen. Su1869 DCAMKL-1 Regulates Pluripotency Factors Oct4, SOX2 and KLF4 via miR-145 MicroRNA Dependent Mechanism. *Gastroenterology*, Volume 142, Issue 5, Supplement 1, May 2012.
78. Stephen S. Hecht Lung Carcinogenesis by Tobacco Smoke, *Int J Cancer*. 2012 Dec 15; 131(12): 2724–2732.
79. Stephen B. Edge & Carolyn C. Compton. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Annals of Surgical Oncology*
80. Steven A Frank. *Dynamics of Cancer. Incidence, Inheritance, and Evolution*. Princeton (NJ): Princeton University Press; 2007. ISBN-13: 978-0-691-13366-9.
81. Stewart DJ, Johnson C, Lopez A, Glisson B, Rhee JM, Bekele BN. Extensive disease small cell lung cancer dose-response relationships: implications for resistance mechanisms. *J Thorac Oncol*. 2010;5(11): 1826–1834.
82. Tanigawa N, Mizuno Y, Hashimura T, Honda K, Satomura K, Hikasa Y, Niwa O, Sugahara T, Yoshida O, Kern DH, et al. Comparison of drug sensitivity among tumor cells within a tumor, between primary tumor and metastases, and between different metastases in the human tumor colony-forming assay. *Cancer Res*. 1984 Jun;44(6):2309-12.

83. Teicher BA, Herman TS, Holden SA, Wang YY, Pfeiffer MR, Crawford JW, Frei E 3rd. Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only in vivo. *Science*. 1990 Mar 23;247(4949 Pt 1):1457-61.
84. van Meerbeeck JP, Fennell DA, De Ruyscher DK. Small-cell lung cancer. *Lancet*. 2011 Nov 12;378(9804):1741-55. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60165-7.
85. Wang H, Xu C, Kong X, Li X, Kong X, Wang Y, Ding X, Yang Q. Trail resistance induces epithelial-mesenchymal transition and enhances invasiveness by suppressing PTEN via miR-221 in breast cancer. *PLoS One*. 2014 Jun 6;9(6):e99067. doi: 10.1371/journal.pone.0099067.
86. Wang L, Li B, Lei L, Wang T. MicroRNA-497 Suppresses Proliferation and Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Asian Pacific J Cancer Prevention* 2013; 14 (6): 3499-502.
87. Weisan Zhang Ping Lei Xifeng Dong Cuiping Xu. The new concepts on overcoming drug resistance in lung cancer. *Drug Design, Development and Therapy* 2014;8 735–744.
88. Weisenthal L and Lippman ME. (1985). *Cancer Treat. Rep.*, 69, 615–632.
89. Wu S, Yu W, Qu X, Wang R, Xu J, Zhang Q, Xu J, Li J, Chen L. Argonaute 2 promotes myeloma angiogenesis via microRNA dysregulation. *J Hematol Oncol*. 2014 May 7;7:40.
90. X. Chen, S. Lingala, S. Khoobyari, et al., Epithelial mesenchymal transition and hedgehog signaling activation are associated with chemoresistance and invasion of hepatoma subpopulations, *J. Hepatol*. 55 (2010) 838–845.
91. Xu N, Shen C, Luo Y, Xia L, Xue F, Xia Q, Zhang J. Upregulated miR-130a increases drug resistance by regulating RUNX3 and Wnt signaling in cisplatin-treated HCC cell. *BiochemBiophys Res Commun*. 2012 Aug 24;425(2):468-72
92. Xu Y, Hu YD, Zhou J, Zhang MH, Yuan WW, Luo Y. shRNA targeting Bmi1 impedes the self-renewal of cisplatin-enriched stem-like cells in human A549 cells. *Oncol Rep*. 2012 Aug;28(2):629-39. doi: 10.3892/or.2012.1843. Epub 2012 Jun 1.
93. Yan Li, Li Li, Yan Guan, Xiuju Liu, Qingyong Meng, Qisen Guo. MiR-92b regulates the cell growth, cisplatin chemosensitivity of A549 non small cell lung cancer cell line and target PTEN. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 440, Issue 4, 1 November 2013, Pages 604-610
94. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* Mar 2006;9(3):189–98
95. Youwei Zhang, Xiang Wang, Liang Han, Yizhou Zhou, Sanyuan Sun. Green tea polyphenol EGCG reverse cisplatin resistance of A549/DDP cell line through candidate genes demethylation. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 69 (2015) 285–290.
96. Yue Wang, Zhenyu Xu, Junfeng Jiang, Chen Xu, Jiahong Kang, Lei Xiao, Minjuan Wu, Jun Xiong, Xiaocan Guo, Houqi Liu. Endogenous miRNA Sponge lincRNA-RoR Regulates Oct4, Nanog, and Sox2 in Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Developmental Cell*, Volume 25, Issue 1, 15 April 2013, Pages 69-80
97. Yuri Lazebnik. What are the hallmarks of cancer? *Nature Reviews Cancer* 10, 232-233 (April 2010) | doi:10.1038/nrc2827.
98. Z.H. Siddik, Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, *Oncogene* 22 (2003) 7265–7279.
99. Zhang AX, Lu FQ, Yang YP, Ren XY, Li ZF, Zhang W. MicroRNA-217 overexpression induces drug resistance and invasion of breast cancer cells by targeting PTEN signaling.
100. Zhao G, Cai C, Yang T, Qiu X, Liao B, Li W, Ji Z, Zhao J, Zhao H, Guo M, Ma Q, Xiao C, Fan Q, Ma B. MicroRNA-221 induces cell survival and cisplatin resistance through PI3K/Akt pathway in human osteosarcoma. *PLoS One*. 2013;8(1):e53906. doi: 10.1371/journal.pone.0053906.

101. Zhao Z, Zhang L, Yao Q, Tao Z. miR-15b regulates cisplatin resistance and metastasis by targeting PEBP4 in human lung adenocarcinoma cells. *Cancer Gene Ther.* 2015 Apr;22(3):108-14. doi: 10.1038/cgt.2014.73. Epub 2015 Feb 27.
102. Zhou W, Wang J, Man WY, Zhang QW, Xu WG. siRNA silencing EZH2 reverses cisplatin-resistance of human non-small cell lung and gastric cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(6):2425-30.
103. Zhang X, Huang L, Zhao Y, Tan W. Downregulation of miR-130a contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells by targeting X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) directly. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2013 Dec;45(12):995-1001
104. Zhou P, Jiang W, Wu L, Chang R, Wu K, Wang Z. miR-301a is a candidate oncogene that targets the homeobox gene Gax in human hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci.* 2012 May;57(5):1171-80. doi: 10.1007/s10620-012-2099-2.
105. He W, Feng L, Xia D, Han N. MiR-374a promotes the proliferation of human osteosarcoma by downregulating FOXO1 expression. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Mar 15;8(3):3482-9.
106. Wang Y, Xin H, Han Z, Sun H, Gao N, Yu H. MicroRNA-374a promotes esophageal cancer cell proliferation via Axin2 suppression. *Oncol Rep.* 2015 Oct;34(4):1988-94.
107. Goto Y, Kojima S, Nishikawa R, Kurozumi A, Kato M, Enokida H, Matsushita R, Yamazaki K, Ishida Y, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N. MicroRNA expression signature of castration-resistant prostate cancer: the microRNA-221/222 cluster functions as a tumour suppressor and disease progression marker. *Br J Cancer.* 2015 Sep 1. doi: 10.1038/bjc.2015.300.
108. M Garofalo, C Quintavalle, G Di Leva, C Zanca, G Romano, C Taccioli, CG Liu, CM Croce & G Condorelli. MicroRNA signatures of TRAIL resistance in human non-small cell lung cancer. *Oncogene* (2008) 27, 3845–3855
109. Yuankai Shi & Yan Sun. Medical management of lung cancer: Experience in China. *Thoracic Cancer* ISSN 1759-7706. 2015.
110. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004 Sep 16;431(7006):350-5.
111. Ettinger, DS; Aisner, J. Changing face of small-cell lung cancer: real and artifact.. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (28): 4526–7. doi:10.1200/jco.2006.07.3841. PMID 17008688.
112. Ettinger, DS; Aisner, J. Changing face of small-cell lung cancer: real and artifact. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (28): 4526–7. doi:10.1200/jco.2006.07.3841. PMID 17008688
113. Zhang W, Zhang T, Jin R, Zhao H7, Hu J, Feng B, Zang L, Zheng M, Wang M. MicroRNA-301a promotes migration and invasion by targeting TGFBR2 in human colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014 Dec 31;33:113. doi: 10.1186/s13046-014-0113-6.
114. Pelosi G, Sonzogni A, Galetta D et al. (April 2011). "Combined small-cell carcinoma of the lung with quadripartite differentiation of epithelial, neuroendocrine, skeletal muscle, and myofibroblastic type". *Virchows Arch.* 458 (4): 497–503.
115. National Cancer Institute. Consultado en 2015. Disponible en: <http://www.cancer.gov/>
116. WHO. World Health Organization. Consultado en 2015. Disponible en: [www.who.int](http://www.who.int)
117. Ávila-Moreno F, Armas-López L, Álvarez-Moran AM, López-Bujanda Z, Ortiz-Quintero B, Hidalgo-Miranda A, Urrea-Ramírez F, Rivera-Rosales RM, Vázquez-Manríquez E, Peña-Mirabal E, Morales-Gómez J, Vázquez-Minero JC, Téllez-Becerra JL, Ramírez-Mendoza R, Ávalos-Bracho A, de Alba EG, Vázquez-Santillán K, Maldonado-Lagunas V, Santillán-Doherty P, Piña-Sánchez P & Zúñiga-Ramos J. Overexpression of MEOX2 and

- TWIST1 is associated with H3K27me3 levels and determines lung cancer chemoresistance and prognosis. *PLoS One*. 2014 Dec 2;9(12):e114104. doi: 10.1371/journal.pone.0114104. eCollection 2014.
118. Sui C, Meng F, Li Y, Jiang Y miR-148b reverses cisplatin-resistance in non-small cell cancer cells via negatively regulating DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1(DNMT1) expression. *J Transl Med*. 2015 Apr 28;13:132. doi: 10.1186/s12967-015-0488-y.
  119. Khella HW, Butz H, Ding Q, Rotondo F, Evans KR, Kupchak P, Dharsee M, Latif A, Pasic MD, Lianidou E, Bjarnason GA & Yousef GM miR-221/222 Are Involved in Response to Sunitinib Treatment in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Mol Ther*. 2015 Jul 23. doi: 10.1038/mt.2015.129.
  120. Garofalo M, Romano G, Di Leva G, Nuovo G, Jeon YJ, Ngankeu A, Sun J, Lovat F, Alder H, Condorelli G, Engelman JA, Ono M, Rho JK, Cascione L, Volinia S, Nephew KP, Croce CM. EGFR and MET receptor tyrosine kinase-altered microRNA expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers. *Nat Med*. 2011 Dec 11;18(1):74-82. doi: 10.1038/nm.2577.
  121. Liu M, Wang J, Huang H, Hou J, Zhang B, Wang A. miR-181a-Twist1 pathway in the chemoresistance of tongue squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Nov 15;441(2):364-70.
  122. Wang M, Li C, Yu B, Su L, Li J, Ju J, Yu Y, Gu Q, Zhu Z, Liu B. Overexpressed miR-301a promotes cell proliferation and invasion by targeting RUNX3 in gastric cancer. *J Gastroenterol*. 2013 Sep;48(9):1023-33. doi: 10.1007/s00535-012-0733-6.
  123. Zhang Z, Zhang L, Yin ZY, Fan XL, Hu B, Wang LQ, Zhang D. miR-107 regulates cisplatin chemosensitivity of A549 non small cell lung cancer cell line by targeting cyclin dependent kinase 8. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014 Sep 15;7(10):7236-41. eCollection 2014.
  124. Wu F, Rom WN, Koshiji M, Mo Y, Hosomi Y, Tchou-Wong KM. Role of GLI1 and NDRG1 in Increased Resistance to Apoptosis Induction. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2015;34(3):213-25.
  125. Yu L, Zhou L, Cheng Y, Sun L, Fan J, Liang J, Guo M, Liu N, Zhu L. MicroRNA-543 acts as an oncogene by targeting PAQR3 in hepatocellular carcinoma. *Am J Cancer Res*. 2014 Nov 19;4(6):897-906.
  126. Zhao JJ, Chu ZB, Hu Y, Lin J, Wang Z, Jiang M, Chen M, Wang X, Kang Y, Zhou Y, Ni Chonghaile T, Johncilla ME, Tai YT, Cheng JQ, Letai A, Munshi NC, Anderson KC, Carrasco RD. Targeting the miR-221-222/PUMA/BAK/BAX pathway abrogates dexamethasone resistance in multiple myeloma. *Cancer Res*. 2015 Aug 6. pii: canres.0457.2015.
  127. Ma F, Song H, Guo B, Zhang Y, Zheng Y, Lin C, Wu Y, Guan G, Sha R, Zhou Q, Wang D, Zhou X, Li J, Qiu X. MiR-361-5p inhibits colorectal and gastric cancer growth and metastasis by targeting staphylococcal nuclease domain containing-1. *Oncotarget*. 2015 Jul 10;6(19):17404-16.
  128. Chen DL, Zhang DS, Lu YX, Chen LZ, Zeng ZL, He MM, Wang FH, Li YH, Zhang HZ, Pelicano H, Zhang W, Xu RH. microRNA-217 inhibits tumor progression and metastasis by downregulating EZH2 and predicts favorable prognosis in gastric cancer. *Oncotarget*. 2015 May 10;6(13):10868-79.
  129. Yoshimasa Saito, Gangning Liang, Gerda Egger, Jeffrey M. Friedman, Jody C. Chuang, Gerhard A. Coetzee, and Peter A. Jones. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *CANCER CELL* 9, 435–443. 2006.

130. Elaine Lai-Han Leung, Ronald R. Fiscus, James W. Tung, Vicky Pui-Chi Tin, Lik Cheung Cheng, Alan Dart-Loon Sihoe, Louis M. Fink, Yupo Ma, Maria Pik Wong. Non-Small Cell Lung Cancer Cells Expressing CD44 Are Enriched for Stem Cell-Like Properties. November 2010 | Volume 5 | Issue 11 | e14062.
131. Bazot Q, Paschos K, Skalska L, Kalchschmidt JS, Parker GA, Allday MJ. Epstein-Barr Virus Proteins EBNA3A and EBNA3C Together Induce Expression of the Oncogenic MicroRNA Cluster miR-221/miR-222 and Ablate Expression of Its Target p57KIP2. *PLoS Pathog.* 2015 Jul 8;11(7):e1005031. doi: 10.1371/journal.ppat.1005031.
132. Binhua Zhou, Jianing Huang, Yinglin Zuo, Baojian Li, Qiang Guo, Baicheng Cui, Weiyan Shao, Jun Du, Xianzhang Bu. A novel curcumin analog, sensitizes cisplatin-resistant A549 cells to cisplatin by inhibiting thioredoxin reductase concomitant oxidative stress damage. *European Journal of Pharmacology* 707 (2013) 130–139.
133. Jian Zhang, Tao Zhang, Xinyu Ti, Jieran Shi, Changgui Wu, Xinling Ren, Hong Yin. Curcumin promotes apoptosis in A549/DDP multidrug-resistant human lung adenocarcinoma cells through an miRNA signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 399 (2010) 1–6.
134. Kanitz A, Imig J, Dziunycz PJ, Primorac A, Galgano A, Hofbauer GF, Gerber AP, Detmar M. The expression levels of microRNA-361-5p and its target VEGFA are inversely correlated in human cutaneous squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2012;7(11):e49568. doi: 10.1371/journal.pone.0049568.
135. Mo Liu, Jianguang Wang, Hongzhang Huang, Jingsong Hou, Bin Zhang, Anxun Wang. miR-181a–Twist1 pathway in the chemoresistance of tongue squamous cell carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 441 (2013) 364–370.
136. Ruijie Zhang, Wei Yao, Pin Qian, Yingjie Li, Chaowen Jiang, Zhi Ao, Guisheng Qian a , Changzheng Wang a , Guoming Wu a , Jin Li a , Fuyun Ji a , \*, Jianping Xu. Increased sensitivity of human lung adenocarcinoma cells to cisplatin associated with downregulated contactin-1. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 71 (2015) 172–184.
137. Wenjing Zheng, Chengwen Cao, Yanan Liu, Qianqian Yu, Chuping Zheng, Dongdong Sun, Xiaofan Ren, Jie Liu. Multifunctional polyamidoamine-modified selenium nanoparticles dual-delivering siRNA and cisplatin to A549/DDP cells for reversal multidrug resistance. *Acta Biomaterialia* 11 (2015) 368–380.
138. Hosokawa Y, Takahashi H, Inoue A, Kawabe Y, Funahashi Y, Kameda K, Sugimoto K, Yano H, Harada H, Kohno S, Ohue S, Ohnishi T, Tanaka J. Oct-3/4 modulates the drug-resistant phenotype of glioblastoma cells through expression of ATP binding cassette transporter G2. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Jun;1850(6):1197-205.
139. Bora-Singhal N, Perumal D, Nguyen J, Chellappan S. Gli1-Mediated Regulation of Sox2 Facilitates Self-Renewal of Stem-Like Cells and Confers Resistance to EGFR Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Neoplasia.* 2015 Jul;17(7):538-51. doi: 10.1016/j.neo.2015.07.001.
140. Ma F, Zhang J, Zhong L, Wang L, Liu Y, Wang Y, Peng L, Guo B. Upregulated microRNA-301a in breast cancer promotes tumor metastasis by targeting PTEN and activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Gene.* 2014 Feb 10;535(2):191-7. doi: 10.1016/j.gene.2013.11.035.
141. Sun FF, Hu YH, Xiong LP, Tu XY, Zhao JH, Chen SS, Song J, Ye XQ1. Enhanced expression of stem cell markers and drug resistance in sphere-forming non-small cell lung cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Jun 1;8(6):6287-300. eCollection 2015.
142. Wang F, Lou JF, Cao Y, Shi XH, Wang P, Xu J, Xie EF, Xu T, Sun RH, Rao JY, Huang PW, Pan SY, Wang H. miR-638 is a new biomarker for outcome prediction of non-

- small cell lung cancer patients receiving chemotherapy. *Exp Mol Med*. 2015 May 8;47:e162. doi: 10.1038/emm.2015.17.
143. Xu X, Wang W, Su N, Zhu X, Yao J, Gao W, Hu Z, Sun Y. miR-374a promotes cell proliferation, migration and invasion by targeting SRCIN1 in gastric cancer. *FEBS Lett*. 2015 Jan 30;589(3):407-13.
  144. Zhang X, Guo Q, Chen J, Chen Z. Quercetin Enhances Cisplatin Sensitivity of Human Osteosarcoma Cells by Modulating microRNA-217-KRAS Axis. *Mol Cells*. 2015 Jul;38(7):638-42. doi: 10.14348/molcells.2015.0037.
  145. Xi S, Inchauste S, Guo H, Shan J, Xiao Z, Xu H, Miettinen M, Zhang MR, Hong JA, Raiji MT, Altorki NK, Casson AG, Beer DG, Robles AI, Bowman ED, Harris CC, Steinberg SM, Schrupp DS. Cigarette smoke mediates epigenetic repression of miR-217 during esophageal adenocarcinogenesis. *Oncogene*. 2015 Feb 23. doi: 10.1038/onc.2015.10.
  146. Heavey S, Godwin P, Baird AM, Barr MP, Umezawa K, Cuffe S, Finn SP, O'Byrne KJ, Gately K. Strategic targeting of the PI3K-NFκB axis in cisplatin-resistant NSCLC. *Cancer Biol Ther*. 2014 Oct;15(10):1367-77. doi: 10.4161/cbt.29841
  147. Liu B, Guo Z, Dong H, Daofeng T, Cai Q, Ji B, Zhang S, Wu L, Wang J, Wang L1, Zhu X1, Liu Y2, Chen Q. LRIG1, human EGFR inhibitor, reverses multidrug resistance through modulation of ABCB1 and ABCG2. *Brain Res*. 2015 Jun 22;1611:93-100.
  148. Dong Z, Zhong Z, Yang L, Wang S, Gong Z. MicroRNA-31 inhibits cisplatin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells by regulating the drug transporter ABCB9. *Cancer Lett*. 2014 Feb 28;343(2):249-57. doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.034. Epub 2013 Oct 4.
  149. Liu D, Tao T, Xu B, Chen S, Liu C, Zhang L, Lu K, Huang Y, Jiang L, Zhang X, Huang X, Zhang L, Han C, Chen M. MiR-361-5p acts as a tumor suppressor in prostate cancer by targeting signal transducer and activator of transcription-6(STAT6). *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Feb 28;445(1):151-6.
  150. Wang L, Liu C, Li C, Xue J, Zhao S, Zhan P, Lin Y, Zhang P, Jiang A, Chen W. Effects of microRNA-221/222 on cell proliferation and apoptosis in prostate cancer cells. *Gene*. 2015 Nov 10;572(2):252-8. doi: 10.1016/j.gene.2015.07.017.
  151. Wu Y, Si R, Tang H, He Z, Zhu H, Wang L, Fan Y, Xia S, He Z, Wang Q. Cholesterol reduces the sensitivity to platinum-based chemotherapy via upregulating ABCG2 in lung adenocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Feb 20;457(4):614-20.
  152. MacDonagh L, Gray SG, Finn SP, Cuffe S, O'Byrne KJ, Barr MP. The emerging role of microRNAs in resistance to lung cancer treatments. *Cancer Treat Rev*. 2015 Feb;41(2):160-9. doi: 10.1016/j.ctrv.2014.12.009.
  153. MacDonagh L, Gray SG, Finn SP, Cuffe S, O'Byrne KJ, Barr MP. The emerging role of microRNAs in resistance to lung cancer treatments. *Cancer Treat Rev*. 2015 Feb;41(2):160-9. doi: 10.1016/j.ctrv.2014.12.009.
  154. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
  155. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
  156. Galluzzi L, Vitale I, Michels J, Brenner C, Szabadkai G, Harel-Bellan A, Castedo M, Kroemer G. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis*. 2014 May 29;5:e1257. doi: 10.1038/cddis.2013.428.