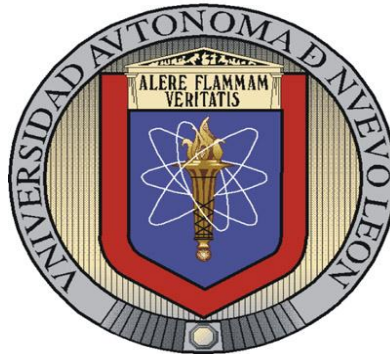


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES MOLECULARES PARA EL  
DIAGNÓSTICO TEMPRANO DE CÁNCER PULMONAR**

Por

Q.B.P. FERNANDA GUADALUPE THOMPSON ARMENDÁRIZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS con Acentuación en Microbiología

Diciembre, 2010

**BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES MOLECULARES  
PARA EL DIAGNÓSTICO TEMPRANO  
DE CÁNCER PULMONAR**

Comité de Tesis

---

Director de Tesis  
Dr. Pablo Zapata Benavides

---

Secretario  
Dra. Laura Ma. Trejo Ávila

---

Vocal  
Dra. Diana Reséndez Pérez

---

Suplente  
Dr. Moisés A. Franco Molina

---

Director Externo  
Dr. José Isaías Badillo

**TABLA DE CONTENIDO**

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
LISTA DE TABLAS .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	iv
NOMENCLATURA .....	v
RESUMEN .....	x
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. HIPÓTESIS .....	2
3. OBJETIVOS .....	3
3.1 Objetivo general .....	3
3.2 Objetivos particulares .....	3

4. ANTECEDENTES.....	4
4.1 Generalidades del cáncer de pulmón .....	4
4.2 Biomarcadores para diagnóstico de cáncer pulmonar .....	7
4.3 Diagnóstico de cáncer pulmonar a partir de muestras de esputo .....	8
4.3.1 Detección de cáncer pulmonar mediante cambios genéticos....	10
4.3.2 Detección de cáncer pulmonar mediante anomalías epigenéticas.....	10
4.4 WT1, COX-2, BCL-2 y HER-2 como biomarcadores tempranos de cáncer de pulmón .....	12
4.4.1 Tumor de Wilms 1 ( <i>wt1</i> ) .....	12
4.4.2 Bcl2 .....	15
4.4.3 Her2 .....	17
4.4.4 Ciclooxygenasa 2 ( <i>cox2</i> ) .....	21
4.5 Tratamientos en estadio temprano del cáncer .....	22
5. MÉTODOS .....	24
5.1 Obtención de muestras de células escamosas de esputo y lavados bronquiales .....	24
5.2 Extracción de RNA .....	24
5.3 Síntesis de DNA complementario (DNAc) .....	25
5.4 PCR-Tiempo Real para la expresión de <i>wt1</i> , <i>her2</i> , <i>bcl2</i> y <i>cox2</i> .....	25
5.5. Análisis estadísticos .....	26
6. RESULTADOS .....	27
6.1 Manejo de las muestras .....	27
6.2. Análisis de la Variable EDAD en los Grupos de Estudio.....	27
6.3. Análisis de la Variable Sexo en los Grupos de Estudio .....	28
6.4 Análisis de la expresión de <i>wt1</i> , <i>her-2</i> , <i>cox-2</i> y <i>bcl-2</i> en la muestras de esputo de individuos con cáncer pulmonar, fumadores y sanos.....	29
6.4.1. Análisis de la expresión de <i>wt1</i> .....	29
6.4.2. Análisis de la expresión de <i>bcl2</i> .....	31
6.4.3. Análisis de la expresión de <i>her2</i> .....	32
6.4.4. Análisis de la expresión de <i>cox2</i> .....	34
6.4.5. Análisis comparativo de las expresiones de <i>wt1</i> , <i>her2</i> , <i>bcl2</i> y <i>cox2</i> .....	35

7. DISCUSIÓN .....	38
8. CONCLUSIONES .....	44
LITERATURA CITADA .....	46
RESUMEN BIOGRÁFICO .....	51

## **DEDICATORIA**

A mi familia y amigos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestro Padre y a la virgen de Guadalupe.

Gracias a mi familia, a mis padres y a Romy por apoyarme en todo, son mi cobijo e impulso.

Le agradezco a CONACYT por el apoyo económico, y de esta manera realizar mi proyecto de maestría.

Gracias a PAICYT por brindarme el material de trabajo necesario para desarrollar el proyecto.

Al Dr. Pablo Zapata Benavides por brindarme la oportunidad de realizar mi proyecto de maestría en su laboratorio, por apoyarme y dejarme aprender de él. Y además de ser un gran doctor, también es un gran amigo, gracias.

Al Dr. Isaías Badillo por proporcionarme muestras y ser un buen amigo.

Al Dr. Raúl Barrera por donarme las líneas celulares de cáncer pulmonar.

A la Dra. Laura Trejo, Dra. Diana Reséndez, Dr. Moisés Franco y el Dr. Isaías Badillo, por integrar mi comité de tesis.

A mis compañeros y grandes amigos del laboratorio, Santiago, Manuel, Diana, Marisol, Edgar, Kary, Luis, Yanais y Emmanuel, gracias por su amistad, por tantos momentos de risas, por su apoyo incondicional en lo profesional y en lo personal.

Y a todas aquellas personas que de alguna manera participaron en el desarrollo de mi proyecto, GRACIAS.

## LISTA DE TABLA

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
I. Programa en el Termociclador para la PCR Tiempo Real .....	25
II. Juego de oligos usados para PCR cuantitativo.....	26
III. Tabla del Análisis de Correlación de Spearman de <i>wt1</i> .....	30
IV. Tabla del Análisis de Correlación de Spearman de <i>bcl2</i> .....	32
V. Tabla del Análisis de Correlación de Spearman de <i>her2</i> .....	33
VI. Tabla del Análisis de Correlación de Spearman de <i>cox2</i> .....	35
VII. Tabla del Análisis de Correlación de Spearman de las variables analizadas.....	36
VIII. Tabla del Comportamiento de las Expresiones de los Genes a partir del Análisis de Correlación de Spearman.....	37



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1.	Cortes histológicos de cáncer pulmonar. ....	4
2.	Estructura de los dominios de <i>wt1</i> .....	13
3.	Funciones de <i>wt1</i> .....	13
4.	Isoformas de <i>wt1</i> .....	14
5.	Vía de señalización de <i>bcl2</i> .....	16
6.	Características de <i>her2</i> .....	18
7.	Actividad de <i>her2</i> .....	19
8.	Funciones de <i>cox2</i> .....	21
9.	Gráfica representativa de la edad de los grupos de estudio.....	27
10.	Gráfica representativa del sexo de los grupos de estudio.....	28
11.	Gráfica representativa de la expresión de <i>wt1</i> .....	30
12.	Gráfica representativa de la expresión de <i>bcl2</i> .....	31
13.	Gráfica representativa de la expresión de <i>her2</i> . ....	33
14.	Gráfica representativa de la expresión de <i>cox-2</i> .....	34

## NOMENCLATURA

%	Porcentaje
18S	Gen ribosomal 18S
°C	Grados centígrados
μl	Microlitro
AC	Adenocarcinoma
A427	línea celular de adenocarcinoma pulmonar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Poliposis adenomatosa coli
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Apaf-1	Factor activador de proteasa proapoptótico
BAC	Carcinoma bronquioalveolar
Bak	Gen antiapoptótico Bak
Bax	Gen antiapoptótico Bax
Bcl-2	Gen Bcl-2
BETA3	Factor de crecimiento transformante beta 3
CA 125	Cáncer gastrointestinal

CA 15-3	Cáncer gastrointestinal
CA 19-9	Cáncer gastrointestinal
Calu	Línea celular de cáncer pulmonar de células escamosas
CDKN2A	Cinasa dependiente de ciclina 2A/p16
CEA	Antígeno carcinoembriónico
c-erbB-2	Receptor del factor de crecimiento epidermal 2
col.	Colaboradores
cox	Ciclooxigenasa
cox-1	Ciclooxigenasa tipo 1
cox-2	Ciclooxigenasa tipo 2
CpG	Islas de Citocina-fosfato-Guanina
CT	Ciclo donde la curva de amplificación cruza la línea umbral
DAPK	Cinasa de la proteína asociada a la muerte.
DEPC	Dietilpirocarbonato
Dr.	Doctor
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
EGFR TKI	Inhibidor de tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento epidermal
ErbB	Receptor del factor de crecimiento epidermal
Fig.	Figura
Fhit	Triada frágil de histidina

GATA4	Proteína de unión a GATA 4
GATA5	Proteína de unión a GATA 5
G2	Fase dos del ciclo celular.
HCAD	DNasa de caspasa activada humana
Her2	Receptor del factor de crecimiento epidermal 2
Her2/neu	Receptor del factor de crecimiento epidermal 2
Her3	Receptor del factor de crecimiento epidermal 3
Her4	Receptor del factor de crecimiento epidermal 4
HLHP	Proteína hélice-giro-hélice
HNC	Cáncer en cabeza y el cuello
Hyal-2	Hialuronidasa-2
IBT	Tratamiento broncoscópico intraluminal
IGFBP3	Proteína 3 de unión al receptor del factor de crecimiento insulínico
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
LAMC2	Laminina gamma 2
M	Fase de mitosis
M	Molar
MGMT	Metiltransferasa de metilguanina-O <sub>6</sub>
min	Minuto
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar

Myc	Oncogen myelocytomatosis celular
NSCLC	Carcinoma pulmonar de células no pequeñas
NSAIDs	Drogas antiinflamatorias no esteroideas
Oligo dT	DNA sintético compuesto por 15 timinas.
p14	Proteína 14
p16	Gen supresor p16.
p53	Proteína de 53 kilodaltones. Gen supresor tumoral. Guardián del genoma.
PAX5 a	Factor de transcripción Paired Box 5 a
PAX5 b	Factor de transcripción Paired Box 5 b
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-Q	Tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa
PDT	Terapia fotodinámica
PET-scan	Tomografía de emision positrón.
PTGSs	Sintetasas de prostaglandina endoperóxido
RAR	Receptor de ácido retinóico beta
Ras	Gen Ras
RASSF1A	Gen de asociación de dominio de la familia Ras 1A
Rb	Retinoblastoma
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción inversa
SCC	Carcinoma de células escamosas

SCLC	Carcinoma pulmonar de células pequeñas
SFRP1	Proteína frizzled-related secretada 1
SPSS	Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales
WAGR	Síndrome del tumor Wilms-aniridia
Wt1	Tumor de Wilms tipo 1

## RESUMEN

El cáncer de pulmón representa un problema de salud pública a nivel mundial cuyos índices de prevalencia y mortalidad van en aumento, esto debido en gran parte a su diagnóstico en etapas avanzadas y el desarrollo de metástasis previa al diagnóstico, por lo cual es importante la búsqueda de nuevos métodos diagnósticos que sean capaces de detectarlo en etapas tempranas. En este proyecto estamos proponiendo la búsqueda de nuevos biomarcadores que puedan ser utilizados como marcadores predictivos para cáncer pulmonar, entre los que se encuentran *wt1*, *her-2*, *cox-2* y *bcl-2*, cuyas expresiones se encuentran altamente asociadas a diferentes tipos de malignidades incluyendo cáncer de pulmón, sin embargo, no se han determinado las expresiones de estos genes en células escamadas presentes en el esputo y el valor predictivo como biomarcadores para dicha neoplasia, por lo que se analizaron sus expresiones en una población con cáncer pulmonar, una población de riesgo (fumadores) y una población control (individuos sanos) para su análisis, así como la asociación de las expresiones entre estos genes. En el estudio de la expresión de *wt1* se encontró una disminución de la expresión del gen conforme transcurre la carcinogénesis, en *bcl2* se encontró aumento de la expresión del gen, *her2* disminuyó su expresión y la expresión de *cox2* se incrementó. Al analizar las vías de señalización de los genes, se encontró asociación entre las expresiones durante la carcinogénesis, donde posiblemente *wt1* reprimió a *bcl2*, sin embargo, tal vez *her2* incrementó la expresión de *cox2* y este a su vez, cooperó al estimular la expresión de *bcl2*. Además, los resultados obtenidos nos ofrecen a *bcl2* como el mejor biomarcador para la detección de cáncer pulmonar y para la búsqueda temprana de la neoplasia con una relación del casi 90% de su expresión con los grupos de estudio, con lo cuales se pretendió imitar la carcinogénesis.

## ABSTRACT

Lung cancer is a worldwide public health problem whose prevalence and death rates are increasing; this is largely due to its diagnosis at advanced stages and the development of metastases prior to diagnosis, therefore it is important to search for new diagnostic methods to detect at an earlier stage. In the present study, we evaluated new biomarkers, including *wt1*, *her2*, *cox2* and *bcl2*, that might be used as predictive markers for lung cancer. Expression of such genes is highly associated with different types of malignancies including lung cancer, however, the expression of these genes in squamous cells in the sputum and predictive value as biomarkers for this malignancy have not yet been determined; it is then essential to evaluate their expression in a lung cancer population, a risk population (smokers) and a control population (healthy individuals). In our study, *wt1* expression was found to be reduced during carcinogenesis; we have also observed an increase in *bcl2* expression, decrease in *her2* expression and increase in expression of *cox2*. By analyzing the signaling pathways of genes, we found an association between expressions during carcinogenesis, where *wt1* repressed *bcl2*, however, *her2* may have increased the expression of *cox2* which in turn, induced the expression of *bcl2*. In addition, the results demonstrated that *bcl2* was the best biomarker for lung cancer detection and showed the possibility for early detection of this neoplasia with a ratio of almost 90% of its expression with study groups, with which it was intended to mimic the carcinogenesis.



## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es el tipo de neoplasia con mayor prevalencia en el mundo y que presenta la más baja tasa de supervivencia a cinco años (menos del 15%), lo cual muestra la urgente necesidad de desarrollar nuevos métodos alternativos de diagnóstico y tratamiento. La mayor parte de la evolución del cáncer pulmonar es silenciosa, a medida que avanza la enfermedad el pronóstico se torna malo y los pacientes reciben un tratamiento tardío. El pobre pronóstico depende de las características del individuo (edad, el rendimiento físico), del tumor (histología, estadio del cáncer) y de las alteraciones moleculares. En esta neoplasia, se expresan una serie de genes involucrados en la patogénesis y proliferación celular de las células cancerosas, entre los que se encuentra el gen del tumor de Wilms (*wt1*), el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (*her2*), el gen de la ciclooxigenasa 2 (*cox2*) y el gen apoptótico *bcl2*. La obtención de la muestra de esputo para la búsqueda de estos biomarcadores es una metodología simple, no invasiva y barata; además, la PCR cuantitativa o PCR-Tiempo Real es una herramienta confiable para el análisis de las muestras ya que sólo se necesita una pequeña cantidad de DNA. Dicho lo anterior, es importante evaluar el potencial de los genes *wt1*, *her2*, *cox2* y *bcl2* como biomarcadores pronóstico y diagnóstico en etapas tempranas así como su relación entre sí, que nos permita obtener un patrón diferencial de expresión entre un grupo control (individuos sanos) y un grupo de alto riesgo (fumadores), y de ésta manera podremos pronosticar el posible desarrollo de la enfermedad, y por consecuencia disminuir los índices de mortalidad.

## **2. HIPÓTESIS**

Las expresiones alteradas de los genes *w1*, *her-2*, *cox-2* y *bcl-2* en células escamosas de esputo se presentan en etapas tempranas de cáncer pulmonar, teniendo así un valor predictivo durante la carcinogénesis.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la expresión de *wt1*, *her-2*, *cox-2* y *bcl-2* en células escamosas de esputo y el valor como biomarcadores pronóstico para etapas tempranas de cáncer pulmonar, así como la asociación de las expresiones entre dichos genes.

#### **3.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar la expresión de los genes *wt1*, *her-2*, *cox-2* y *bcl-2* en células escamosas de esputo en un grupo control de individuos sanos (población no fumadora ni con patologías pulmonares)
2. Determinar la expresión de los genes *wt1*, *her-2*, *cox-2* y *bcl-2* en células escamosas de esputo en un grupo de alto riesgo (fumadores).
3. Determinar la expresión de los genes *wt1*, *her-2*, *cox-2* y *bcl-2* en células escamosas de esputo en un grupo con la patología del cáncer pulmonar.
4. Determinar la asociación de la expresión entre los genes *wt1*, *her-2*, *cox-2* y *bcl-2*, y el valor pronóstico para cáncer pulmonar.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 Generalidades del Cáncer de Pulmón

Se le llama cáncer pulmonar a los tumores que se desarrollan a partir del epitelio respiratorio (bronquios, bronquiolos y alvéolos). Es el cáncer más frecuente a nivel mundial, en el año 2000 se estimaron 1.2 millones de casos nuevos, y de ellos, aproximadamente el 90% moriría (1.1 millones). En México, el cáncer de pulmón es la causa número 13 de mortalidad general y la primera por neoplasia, en el año 2000 afectó mortalmente a 1,994 mujeres y a 4,230 hombres. La frecuencia está relacionada con la edad, se presenta un incremento a partir de los 45 años y su pico máximo en mayores de 70 años (Sánchez y col., 2005; Minna y col., 2002).

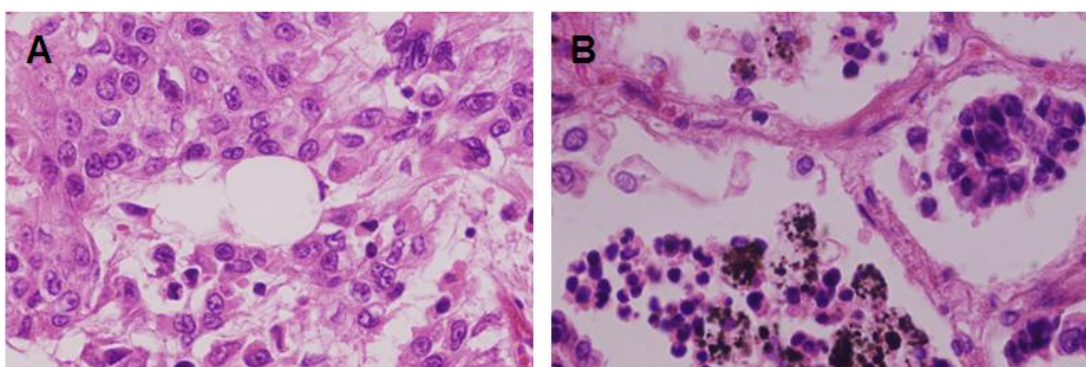


Figura 1. Cortes histológicos de cáncer pulmonar. **A** Corte histológico de tejido pulmonar diagnosticado como SCLC. **B** Corte histológico de tejido pulmonar diagnosticado como NSCLC (Adenocarcinoma).

El cáncer de pulmón está clasificado en dos subtipos, cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC) y no pequeñas (NSCLC). La distinción entre estos subtipos es

importante para el pronóstico y el tratamiento. Los tumores de SCLC (Figura 1A) avanzan rápidamente con una metástasis muy temprana. El NSCLC (Figura 1B) constituye el 75% de los casos de cáncer pulmonar, estas células se dividen lento y la metástasis es tardía a comparación de las SCLC. El carcinoma pulmonar de células no pequeñas se subdivide en adenocarcinoma (AC), carcinoma de células escamosas (SCC) y carcinoma de células grandes. El AC y el SCC representan el 85% de los casos de NSCLC. Para todos los estadíos del NSCLC, la tasa de sobrevivencia de 5 años ha sido mejorado sólo en un 15% en los últimos 15 años (Dalrymple- Drury, 2001; Tonon y col., 2005).

Clínicamente, la mayor parte de la evolución del cáncer pulmonar es silenciosa, a medida que avanza la enfermedad se van manifestando los síntomas y el pronóstico se torna malo, incluso el 70% de los pacientes presentan una enfermedad inoperable por un diagnóstico y tratamiento tardío. El pobre pronóstico depende de varias características del individuo (edad, rendimiento físico, nivel del lactato deshidrogenasa sérico, cuenta de leucocitos y neutrófilos) y del tumor (estadío de la enfermedad, histología) (Meert y col., 2003). Puesto que el proceso de desarrollo del cáncer es complejo y multifactorial, existen factores predictivos moleculares que involucran aspectos genéticos, inmunitarios, irritaciones celulares y mutaciones del DNA causadas por la dosis y duración de exposición a los carcinogénicos del ambiente, ocupacionales o recreacionales (Mayoral y col., 2004). Algunos carcinogénicos químicos de pulmón son los hidrocarburos aromáticos, nitrosamidas, polonio, arsénico, asbesto, clorometiléter, y principalmente el tabaquismo, el cual se encuentra reportado en el 87% de los casos. Se han identificado 4000 agentes químicos en el humo del cigarro, 60 de ellos son carcinogénicos, los principales

causantes del cáncer son los hidrocarburos aromáticos policíclicos como el benzopireno, pero con mayor frecuencia se encuentran el benceno y el butadieno (Sánchez y col., 2004).

En el proceso de inducción al cáncer de pulmón ocurren gran cantidad de anormalidades genéticas: oncogenes (*ras*, *myc*), genes supresores de tumor (*p53*, *rb*, *p16* y *fhit*), genes apoptóticos (*bcl-2*), alteraciones microsatelitales, pérdida de la heterocigosidad, expresión de la actividad telomérica, entre otras; o también, pueden efectuarse cambios epigenéticos, como en la reparación del DNA, la pérdida o elevada expresión de proteínas y la metilación (Hyun y col., 2006; Sánchez y col., 2004). El resultado es una selección clonal de células con capacidades de crecimiento incontrolado y de migración.

Las lesiones moleculares ocurren en epitelio normal (en ausencia de displasia), posteriormente aparecen las lesiones bronquiales preneoplásicas, la cuales comprenden de varias etapas: metaplasia, displasia leve, displasia moderada y displasia severa. Cualquier alteración molecular que provoca pérdida de regulación en el ciclo celular o de la apoptosis, se considera que posee el potencial para la carcinogénesis. Además, por la acumulación de dichas anormalidades moleculares se puede medir el grado de severidad, de tal manera se puede predecir la susceptibilidad del paciente a desarrollo y tratamiento del cáncer en el árbol bronquial (Brambilla y col., 2003).

Los avances en el entendimiento del proceso carcinogénico en pulmón han ayudado a la detección temprana de este cáncer utilizando como muestra el esputo.

Existen herramientas para lograr dicho fin, algunas son: los anticuerpos monoclonales, broncoscopía autofluorescente y de luz blanca, identificación de mutaciones y citología; sin embargo, aún no se han establecido como pruebas diagnósticas (Kennedy y col., 2000). Por lo tanto, se necesita una mayor investigación y desarrollo para la confirmación de marcadores de importancia clínica, y para la simplificación de la tecnología para que pueda ser utilizada de manera rutinaria en los laboratorios clínicos (Gazdar, 1992). Por otro lado, también es importante identificar y establecer los grupos de alto riesgo, tales como los fumadores y exfumadores, para evitar los casos agresivos en el futuro (Kennedy y col., 2000).

#### **4.2 Biomarcadores para Diagnóstico de Cáncer Pulmonar**

Los marcadores moleculares para el cáncer pulmonar ofrecen varias aplicaciones clínicas: el diagnóstico, tipificación, identificación de los individuos de alto riesgo en desarrollar cáncer, respuesta predictiva a la terapia y la identificación de otros biomarcadores de pronóstico favorable o desfavorable para el desarrollo de esta neoplasia (Gazdar, 1992).

Un buen biomarcador requiere de una técnica de muestreo nada o poco invasiva, su presencia debe ser significativamente diferente entre las muestras tumorales y las normales, debe tener correlación con la progresión del cáncer, debe ser blanco para tratamiento o para lograr la eficiencia del tratamiento. La técnica de análisis del biomarcador debe ser eficiente y de bajo costo para ser parte de un programa de

búsqueda. El sondeo de biomarcadores se ha inclinado al estudio de genes supresores tumorales y protooncogénos, dicha investigación puede realizarse en muestras de biopsias bronquiales o de pulmón pero es una difícil propuesta para una programa de búsqueda, los lavados bronquiales son menos invasivos pero se requiere una endoscopia, el DNA obtenido de la sangre es una de las mejores opciones para diagnosticar cáncer pulmonar en estadio temprano, y el DNA obtenido de muestras de esputo es una buena alternativa aunque se debe de tener cuidado en la conservación de la muestra para que sea de buena calidad. El PCR cuantitativo es una buena herramienta para el análisis de dichas muestras ya que sólo se necesita una pequeña cantidad de DNA tumoral (Brambilla y col., 2003).

El análisis de biomarcadores para detectar el riesgo a cáncer de pulmón en esputo pueden ser complementarios a la radiología o la broncoscopia para la detección temprana de tumores (Chen y col., 2005).

#### **4.3 Diagnóstico de Cáncer Pulmonar a Partir de Muestras de Esputo**

El Dr. Geno Saccomanno, pionero de la citología del esputo, detectó cambios citológicos premalignos años antes del diagnóstico clínico en sujetos de alto riesgo, pero desafortunadamente no era un estudio repetitivo (Palmesano y col., 2000). La recolección y el análisis citológico de muestras de esputo es simple, no invasiva y barata; sin embargo, perdió importancia por ser una técnica poco sensible, pero el interés en la búsqueda de biomarcadores por técnicas altamente sensibles impulsó la obtención de muestras de esputo, ésta herramienta puede ser usada para la detección



de tumores desarrollados o antes de que aparezcan, es decir, durante el estadio temprano de la carcinogénesis (Dalrymple-Drury, 2001). Los biomarcadores en esputo es una técnica que no ha sido validada clínicamente, pero recientemente ha ofrecido una gran cantidad de datos para la investigación de la carcinogénesis. Las anormalidades genéticas y epigenéticas involucradas en el ciclo celular, en la senescencia, la apoptosis, la reparación, la diferenciación y en el control de la migración celular, pueden ser detectadas en células respiratorias de esputo (Brambilla y col., 2003).

El análisis del esputo de los fumadores es un área activa para la investigación de marcadores, ya que en los fumadores se incrementan las secreciones bronquiales. Las muestras de esputo contienen células exfoliadas, macrófagos, células inflamatorias y otras células no epiteliales, correspondientes a la orofaringe y al conducto respiratorio. Para incrementar la sensibilidad en la detección temprana de cáncer pulmonar a partir de muestras de esputo, se pueden emplear varias técnicas: inmunotinción de células epiteliales anormales, análisis de la imagen de células exfoliadas de esputo asistida por computadora y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de cambios epigenéticos en oncogenes dominantes o recesivos y marcadores genéticos epidemiológicos (Gazdar-Minna, 1999). Trabajando con muestras de esputo y suero de pacientes con carcinoma bronquioalveolar (BAC), se analizaron los niveles del antígeno carcinoembrionario (CEA), el antígeno asociado al cáncer gastrointestinal (CA 19-9), CA 125 y CA 15-3, encontrando altos niveles de estos marcadores tumorales en el esputo a comparación con el suero (Hasanoglu y col., 1998).

#### **4.3.1 Detección de cáncer pulmonar mediante cambios genéticos.**

En células preneoplásicas de muestras de esputo se encontró la elevada expresión de la riboproteína nuclear heterogénea (A2/B1), alteraciones en secuencias microsatélites, metilaciones de genes, mutaciones en *p53* con una frecuencia del 56% en tumores escamosos (centrales) y *ras* del 27% en adenocarcinomas (periféricos) (Gazdar-Minna, 1999), deleciones de los genes *hyal-2* y *fhit* en fumadores sin cáncer coincidieron con los resultados obtenidos en fumadores con NSCLC estadio I, observando que este ensayo fue más sensible que el diagnóstico por citología del esputo (Li y col., 2007). Estos genes son considerados como marcadores para el diagnóstico temprano del cáncer pulmonar ya que se asociaron con una posterior carcinogénesis pulmonar.

La combinación de tecnologías es una opción favorable. En un grupo de 160 pacientes con patologías pulmonares, al 47.1% se le detectó cáncer pulmonar mediante la citología del esputo incrementando a un 80.2% con el análisis de la expresión del RNAm de survivin por RT-PCR, el valor predictivo negativo de 37.9% aumentó a 57.9% al asociar las técnicas de diagnóstico (Chen y col., 2005).

#### **4.3.2 Detección de cáncer pulmonar mediante anomalías epigenéticas.**

La transcripción de genes silenciosos por la metilación de los islotes CpG es reconocida como un componente de la iniciación y progresión del cáncer pulmonar. Incrementando la sensibilidad del PCR para detectar secuencias de DNA metiladas

en muestras de esputo, Palmisano y col. (2000) encontraron en el 48% de pacientes con cáncer pulmonar metilación aberrante de CDKN2A (p16) relacionado con el estadio temprano del SCC y la metiltransferasa de metilguanina-O<sub>6</sub> de DNA (MGMT) en el estadio temprano del NSCLC, incluso las detectaron 3 años antes del diagnóstico clínico del SCC. Sin embargo, también se ha encontrado metilaciones aberrantes de los promotores de MGMT y p16 en el 100% de las muestras de esputo de pacientes con SCC y en personas que fueron diagnosticadas clínicamente con tumores de 5 a 35 meses después de la toma de muestra. Ambos genes en esputo se relacionaron con el aumento del riesgo a cáncer en fumadores y en personas expuestas a radón (Belinsky y col., 2006; Palmisano y col., 2000).

La hipermetilación de 6 genes: p16, MGMT, PAX5 b, DAPK, GATA5 y RASSF1A, se asoció con un incremento mayor al 50% de riesgo a cáncer pulmonar en un grupo de alto riesgo de 98 personas a partir de muestras de esputo (Belinsky y col., 2006). Mediante PCR se encontró metilación anormal de la regiones de p16, poliposis adenomatosa coli (APC) y receptor de ácido retinóico beta (RAR), detectándolos en el 21.7%, 28.2% y 26.9% de los pacientes con cáncer, respectivamente, sin observar asociación con la histología, género, edad, y si fumaban o no los pacientes (Kono y col., 2004).

#### **4.4 WT1, COX-2, BCL-2 y HER-2 como Biomarcadores Tempranos de Cáncer de Pulmón.**

*wt1*, *cox-2*, *bcl-2* y *her-2* son genes involucrados en la generación de distintos tipos de cáncer, y para determinar su valor predictivo en cáncer pulmonar se analizaron sus expresiones en muestras de esputo de grupos de alto riesgo (fumadores), no fumadores y pacientes con cáncer pulmonar. A continuación se menciona el papel de cada uno de los genes de nuestro interés en el cáncer:

##### **4.4.1 Tumor de Wilms 1 (WT1).**

El gen de tumor de Wilms o *wt1* codifica para un factor transcripcional (Figura 2) involucrado en procesos de diferenciación celular y apoptosis. Se ha encontrado inactivado en algunos tipos de cáncer de riñón, llamados nefroblastomas o tumores de Wilms, de ahí su nombre (Wagner et al, 2003).

WT1 tiene distintas funciones (Figura 3) ya que sus modificaciones postranscripcionales del pre-RNA<sub>m</sub> permiten la producción de 24 isoformas (Figura 4), pero también sus funciones celulares y de desarrollo se traslapan (Figura 3) (Wagner et al., 2003).

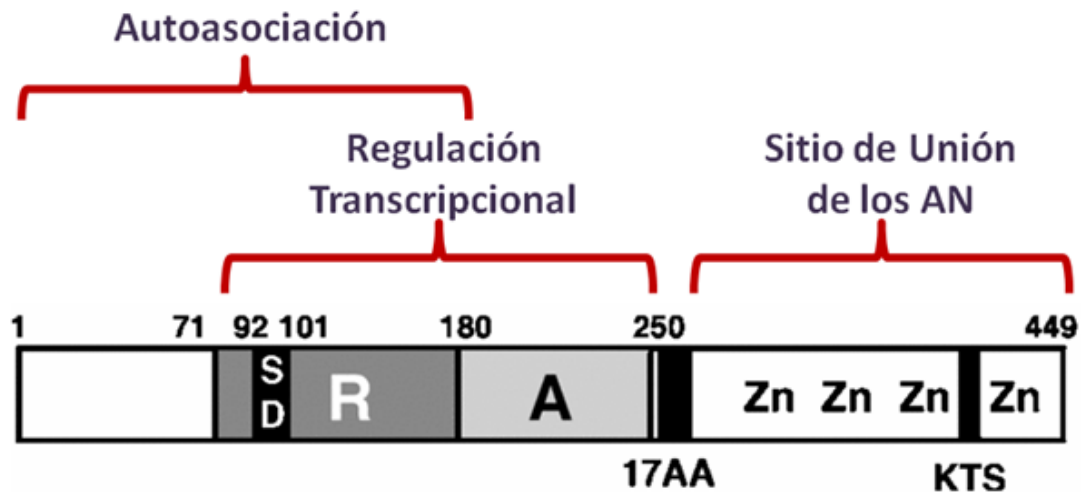


Figura 2. Estructura de los dominios de *wtl*. Esquema de *wtl* donde se muestra el dominio de represión (R), dominio de activación (A) y los dedos de zinc (Zn). El dominio de supresión de 10 aminoácidos (SD) es incorporado, y los "splicing" alternativos de *wtl* (KTS y 17AA) son indicados por barras rellenas de negro. La región de autoasociación N-terminal también es presentada. El número de aminoácidos descritos se refieren a la isoforma de *wtl* que contiene ambos "splicing", la inserción de KTS y de 17 aminoácidos.

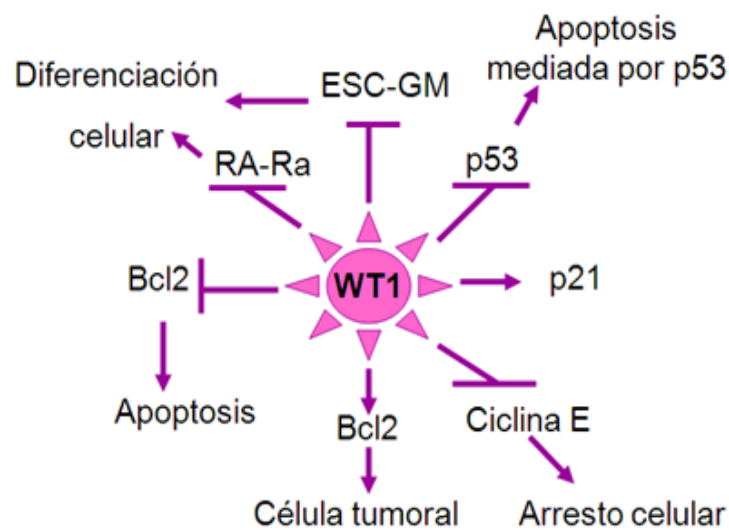


Figura 3. Funciones de *wtl*. El gen *wtl* reprime la expresión de ESC-GM, RA-Ra, p53, Ciclina E y Bcl2, provocando la diferenciación celular, la apoptosis y el arresto celular, según sea el caso. Además, *wtl* estimula la expresión de p21 y Bcl2, promoviendo la generación de una célula tumoral.

Analizando pacientes con cáncer y en experimentos con ratones, se ha revelado que WT1 presenta varias actividades durante el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la función de los órganos, su mutación es causante de varios síndromes (Denys-Drash, Frasier y WAGR) y su expresión en varios tipos de cáncer (leucemias, tumores de células pequeñas redondas desmoplásticas, mama, retinoblastoma y pulmonar) (Wagner et al, 2003).



Figura 4. Isoformas de *wt1*. El gen *wt1* puede sufrir modificaciones: puede agregársele una secuencia de 17 aminoácidos entre el dominio de transactivación y el área de unión al ADN, la inserción de tres aminoácidos (lisina, treonina y serina) entre el tercer y cuarto dedo de zinc, ambas inclusiones pueden presentarse o ninguna.

En cepas de ratones carentes de *wt1* (-KTS) o *wt1* (+KTS) se generaron variantes en el exón 9 (Ver Isoformas de *wt1* en la Figura 5). En ratones carentes de *wt1* (-KTS) se observaron defectos en riñones y gónadas. En animales sin *wt1* (+KTS) se presentó alteración en la función de los podocitos y revertimiento del sexo masculino al femenino. La reducción de los niveles de *wt1* en riñón genera una

glomeruloesclerosis y un incremento de *wtl* en el corazón contribuye a la neovascularización (Wagner et al, 2003).

Además, se ha encontrado una alta expresión de *wtl* en leucemia y diferentes tumores en humanos (Oji y col., 1999). En cáncer de pulmón, se ha encontrado la expresión de *wtl* en el 96% (54/56) por RT-PCR, de igual manera se demostró la elevada expresión de *wtl* en el 83% (5/6) de los casos de cáncer de pulmón por inmunohistoquímica, y al realizar la secuenciación de 7 casos no se encontraron mutaciones, sugiriéndose así que *wtl* tipo silvestre juega un papel importante en la tumorigénesis del cáncer pulmonar (Oji y col., 2002).

#### **4.4.2 Bcl2**

*bcl-2* es un protooncogen de 230 kb y codifica para una proteína de 26 kDa se encuentra en el interior de la membrana mitocondrial (Hyun y col., 2006). La familia de proteínas Bcl-2 consiste en miembros con funciones antiapoptóticos y proapoptóticos, que regulan la muerte celular programando la permeabilidad de la membrana mitocondrial por el bloqueo de Bax y Bak, dicho bloqueo permite la liberación de los activadores de caspasas, incluyendo citocromo c, y por consecuencia ocurren los cambios morfológicos típicos de la apoptosis (Figura 6).

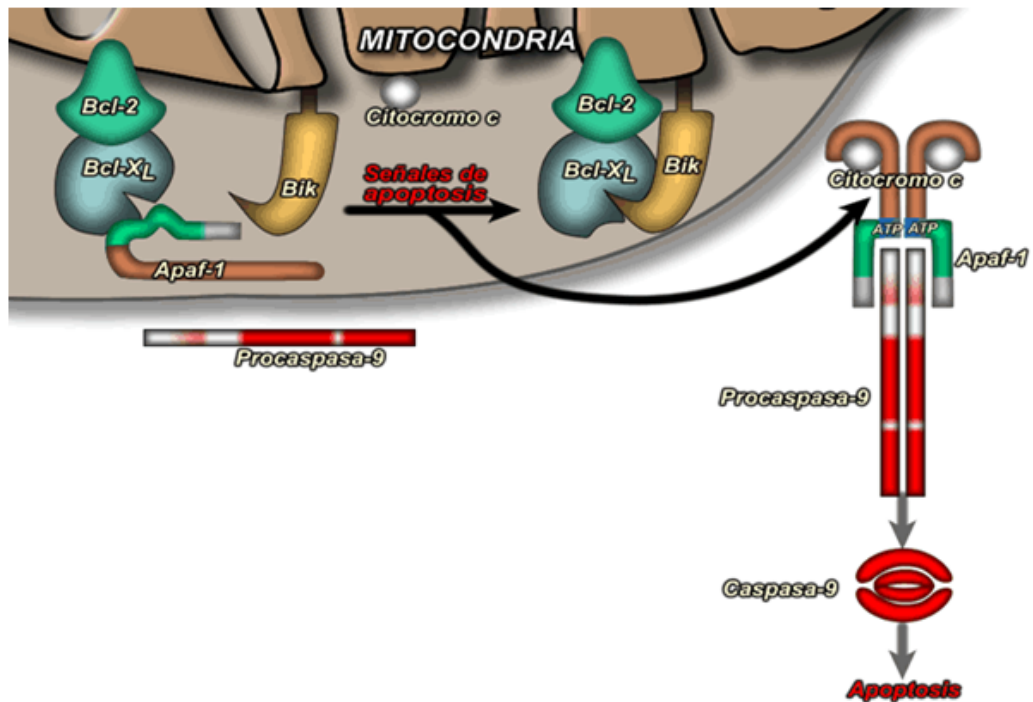


Figura 5. Vía de señalización de *bcl2*. Los miembros de la familia Bcl-2 son de las proteínas mas importantes que regulan la permeabilidad mitocondrial. Bcl2 se localiza en la membrana mitocondrial externa, en el reticulo endoplásmico y la cubierta nuclear. Al unirse los otros miembros de la familia a Bcl-2, se puede favorecer la apoptosis (con Bax o Bad) o inhibir este proceso (con Bcl-XL). Bcl-2 suprime la apoptosis de 2 maneras: por acción directa sobre las mitocondrias para impedir el aumento de la permeabilidad y con efectos mediados con otras proteínas. Bcl-2 puede suprimir la apoptosis fijando proteínas del citosol (Apaf-1) y secuestrándolas en la membrana mitocondrial. Se ha postulado que cuando el citocromo c es liberado por la mitocondria por señales de muerte celular, se une al Apaf-1 y lo activa, estimulando a la caspasa iniciadora y poniendo en marcha los acontecimientos proteolíticos que destruyen a la célula. Así la unión de la Bcl-2 a la Apaf-1 evita la apoptosis. Por lo tanto, Bcl-2 suprime la apoptosis mediante la inhibición de la liberación de citocromo c y a través de su unión al Apaf-1 con inactivación del mismo.

*bcl-2* posee varios sitios de fosforilación, a los cuales se les adjudica las distintas funciones de Bcl-2, como la de supresor de la apoptosis y el iniciar el ciclo celular, se ha reportado que algunos sitios al ser fosforilados inactivan a Bcl-2 específicamente en la fase G2 a M facilitando la muerte celular durante dicha fase



(Deng y col., 2004). Se ha documentado la pérdida de regulación de *bcl-2* en células tumorales, como: el linfoma folicular, la neoplasia linfocítica, cáncer de mama, en NSCLC y SCLC; y la sobreexpresión ha sido observada en quimioresistencia a la acción de drogas inductoras de apoptosis. En NSCLC se ha reportado la expresión de *bcl-2* como factor pronóstico (Hyun y col., 2006), y su expresión tiene impacto en la sobrevivencia a 5 años, cuando los pacientes son negativos a *bcl-2* tienen una tasa de 45% de sobrevivencia, mientras que en casos positivos a *bcl-2* la tasa aumenta a 65% (Yoo y col., 2007). La sobre-expresión de *bcl-2* y la pérdida de *bax* se ha relacionado con el incremento de la severidad de las lesiones preneoplásicas.

A *bcl-2* se le considera uno de los genes claves para la detección de cáncer pulmonar en estadio temprano a partir de células preneoplásicas de esputo puesto que los participantes en la vía de señalización controlada por p53 o Rb son candidatos a ser biomarcadores de cáncer (Brambilla y col., 2003).

#### **4.4.3 Her2**

Her2 (*her2/neu*) es un protooncogén también conocido como *c-erbB-2* o *p185 neu*. Se encuentra en células humanas normales en una sola copia en el brazo largo (q21) del cromosoma 17. El gen codifica para un receptor transmembranal de tirosina cinasa de 185 kDa y 1255 aminoácidos, similar al EGFR. Pertenece a la familia ErbB (EGFR, Her2, Her3 y Her4) y se distingue de los otros miembros de esta familia por el desconocimiento de su ligando. La proteína se compone de 3 dominios (Figura 7): dominio de unión extracelular, dominio transmembranal hidrofóbico y un dominio

intracelular con actividad de tirosina cinasa. La cualidad de Her2 (Figura 8) es homo- o heterodimerizarse con otro miembro de ErbB después de que éste se une a su ligando, regulando el crecimiento y la diferenciación celular, y se asocia a diversas vías de señalización (Bose y col., 2006; Gazdar, 1992; Meert y col., 2003; Pelosi y col., 2005; Zhang-Chang, 2008).

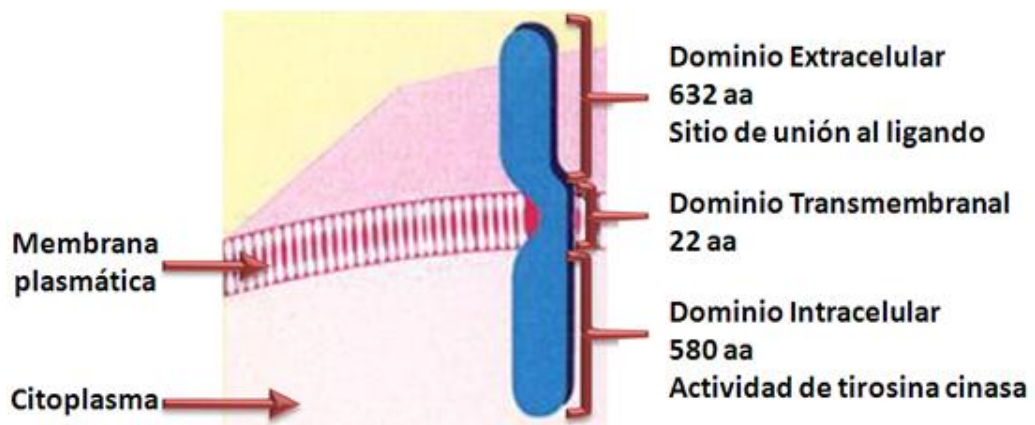


Figura 6. Características de *her2*. Her2 es una proteína localizada en la membrana celular, constituido por tres regiones: el dominio extracelular de 632 aminoácidos donde ocurre la unión al ligando, el dominio transmembranal de 22 aminoácidos y el dominio intracelular de 580 aminoácidos con actividad de tirosina cinasa, allí ocurre el inicio de la vía de señalización de *her2*.

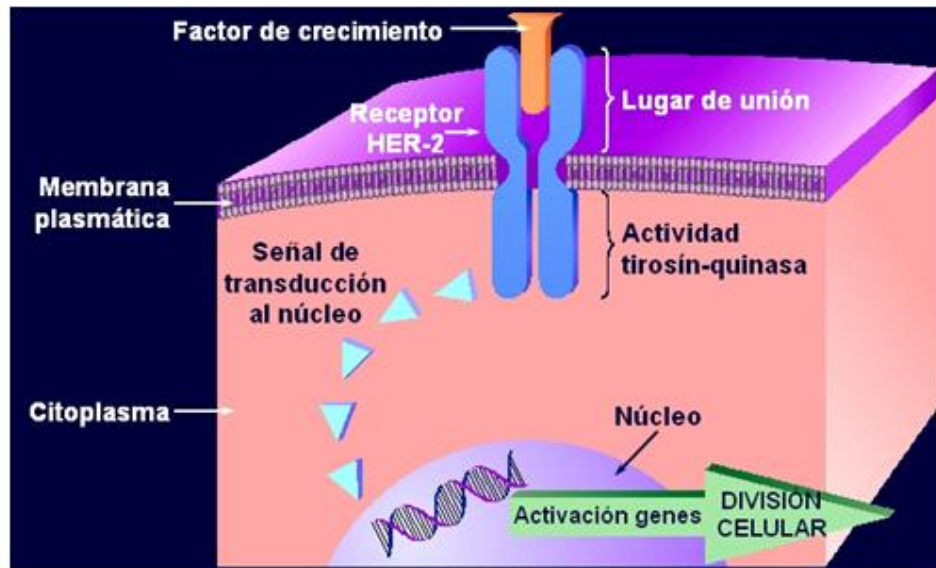


Figura 7. Actividad de *her2*. *her2* es un gen que controla el crecimiento, la división y la reparación celular, al producir proteínas especiales: receptores Her2. Her 2 al dimerizarse recibe mensajes de su ligando, probablemente factores de crecimiento, para que la célula inicie su división y crecimiento. Al presentarse mayor cantidad de genes de *her2*, también aumentaría el número de receptores, formando así una célula cancerígena.

La amplificación del gen *her2* y/o la elevada expresión de la proteína ha sido documentada en diferentes malignidades humanas. La alta expresión da como resultado la activación de la señalización de tirosina cinasa independiente de ligando, encontrándose en el 20 al 30% de los cánceres de NSCLC y el 10% en adenocarcinoma. La expresión de *her2* se ha asociado con pobre pronóstico y disminuye aún más la sobrevivencia al estar altamente coexpresado con EGFR, Bcl-2 y K-ras (Meert y col., 2003; Stahel, 2007). La amplificación de *her2* provee de información predictiva que puede ser útil para evaluar los pacientes con NSCLC sometidos a terapia con inhibidor de tirosina cinasa EGFR (EGFR-TKI) (Sheperd-Rosell, 2007). Las mutaciones en Her2, EGFR y Kras resultaron mutuamente exclusivas (Stahel, 2007); sin embargo, el NSCLC con mutación en Her2 e

inactivación de p14/p53 es raro en pacientes no fumadores, donde la mutación de EGFR es común (Mounawar y col., 2007).

En el análisis de fluidos broncoalveolares o el esputo de pacientes con sospecha de cáncer pulmonar, se observó la correlación de la alta expresión de Her2 con la amplificación del gen *her2*, la diferencia significativa entre la alteración de Her-2 en tumores NSCLC (19%) y en tejido no neoplásico (0%), además, la asociación de la alta expresión de la proteína con el subtipo histológico: adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas (23% y 9%, respectivamente) (Jacobson y col., 1995; Tan y col., 2003). Por otra parte, en el 2008, Cebollero y col. determinaron una alta expresión de Her-2 en un 33.3% de SCLC, asociándose a la enfermedad diseminada. En un grupo de 90 pacientes con NSCLC, el 68.9% presentaron elevados niveles de expresión del gen, además de encontrar una relación entre el valor predictivo y el sexo, puesto que *her-2* se puede considerar como un factor de buen o pobre pronóstico en la mujer, pero no es útil en el hombre (Vallböhmer y col., 2006).

Sin embargo, Pelosi y col. (2005) al encontrar *her-2* en un 23% de tumores de NSCLC mediante inmunohistoquímica, no se encontró relación con el pronóstico. Se determinó poco incremento en el número de copias de *her-2* en 44% de tumores NSCLC y la alta expresión de la proteína en 26%, además de una mayor frecuencia de la elevada expresión en adenocarcinomas que en los carcinomas de células escamosas, sin embargo no se encontró una correlación significativa entre el incremento de número de copias y la alta expresión, tampoco alguna relación con la sobrevivencia (Nakamura y col., 2003). Por lo descrito anteriormente, se necesita

aclarar el papel de *her-2* en la progresión del cáncer pulmonar ya que los resultados de los distintos grupos de investigación son inconsistentes.

#### 4.4.4 Ciclooxygenasa 2 (Cox2)

Las ciclooxigenasas (COXs) también son llamadas sintetasas de prostaglandina endoperoxido (PTGSs), son las enzimas clave para mediar la producción de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico, la cuales promueven el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la metástasis. Existen 2 isoformas de COX: COX1 y COX2. El gen de COX1 se expresa en células normales

constitutivamente, en cambio, *cox2* no se detecta. *cox2* se encuentra en el cromosoma 1q25.2-q25.3, su RNAm mide 4.5 kb y codifica para una proteína de 70 kD encontrada en la envoltura perinuclear. COX2 está asociado a la inflamación, se ha presentado elevadamente en muchos tipos de tumores, incluyendo cáncer de pulmón, y se cree que el incremento de su regulación se presenta en eventos

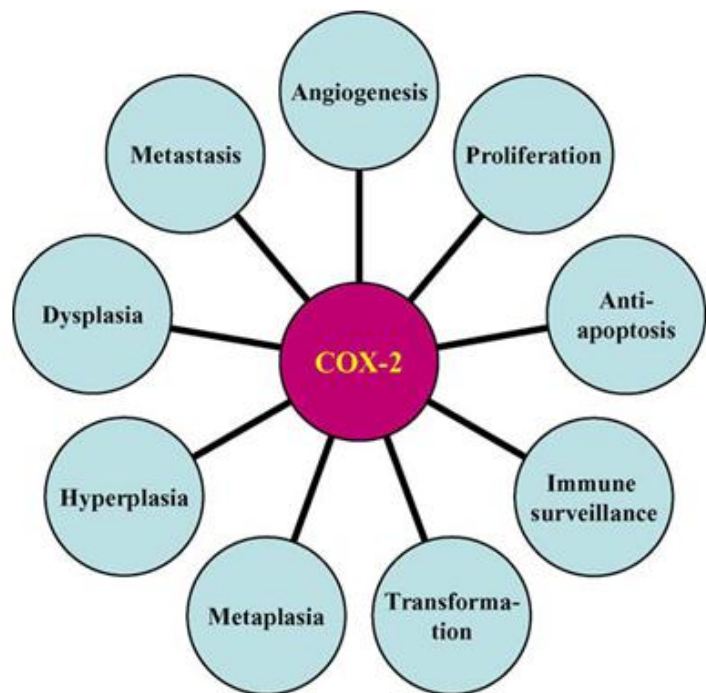


Figura 8. Funciones de *cox2*. *cox-2* codifica para una proteína involucrada en varias vías de señalización, las cuales pueden afectar la proliferación celular, anti-apoptosis, vigilancia inmunológica, transformación celular, metaplasia, hiperplasia, displasia, metástasis y angiogénesis.

tempranos de dicha carcinogénesis (Campa y col., 2004), involucrándose en la invasión, la angiogénesis y la apoptosis, a través de la producción de la prostaglandina E<sub>2</sub> (Wolf y col., 1998). En células de NSCLC con alta expresión de COX-2 se observó que la prostaglandina E<sub>2</sub> activa a STAT3 induciendo la expresión de la IL-6, dicha vía puede contribuir a la formación del tumor al promover la resistencia a la apoptosis dependiente de survivin y la producción de VEGF (Dalwaldi y col., 2005).

En ratones se encontró la inducción de *cox-2* por el humo del cigarrillo condensado y por un carcinógeno específico del tabaco, la 4-(metilnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanona nitrosamina. La actividad de COX-2 es inhibida por las drogas antiinflamatorias no esteroideas (NSAIDs) (Campa y col., 2004). El RNAm de COX-2 fue detectado en todos los tejidos tumorales de pacientes con NSCLC, y fue asociado con el pobre pronóstico (Brabender y col., 2002); además, se encontraron niveles mayores del RNAm en la sangre periférica de pacientes con cáncer en cabeza y el cuello (HNC), que en los grupos controles, y dichos niveles elevados se encontraron correlacionados con el tamaño de tumor (Grau y col., 2007).

#### **4.5 Tratamientos en Estadío Temprano del Cáncer**

La distinción entre los subtipos histológicos de cáncer pulmonar (SCLC y NSCLC) es importante para el pronóstico y el tratamiento. Los tumores de SCLC avanzan rápidamente con una metástasis muy temprana, para este caso la quimioterapia sería una buena elección. El NSCLC presenta características

patológicas distintivas y el tratamiento es inefectivo, a pesar de las drogas citotóxicas y la radioterapia, lo más recomendable es la cirugía. En fase II de la carcinogénesis es mejor el tratamiento broncoscópico intraluminal (IBT) para el SCC intraluminal. En fase III, cirugía combinada con varias modalidades de IBT, otra opción sería la terapia fotodinámica (PDT), donde se inyectan fotosensibilizadores y se combina con iluminación láser, y un tratamiento PDT antes de una cirugía. La terapia en casos de adenocarcinoma sería una lobectomía y disección del nódulo linfático del mediastino (Sutedja, 2003). Sin embargo, lo importante en todas las situaciones es la detección temprana del cáncer ya que pronosticaría la severidad de la enfermedad y definiría el tratamiento a seguir, de tal manera se reduciría la mortalidad o se incrementaría la sobrevivencia a 5 años.

En nuestro estudio nos proponemos la búsqueda mediante PCR-Q de la expresión de los genes *wtl*, *bcl-2*, *her-2* y *cox-2* como biomarcadores en la etapa temprana del cáncer de pulmón en fumadores (grupo de alto riesgo), no fumadores (sujetos sanos) y pacientes con cáncer pulmonar; realizando el análisis de dichos marcadores para determinar la asociación entre ellos durante la carcinogénesis, para así en un futuro, ayudar a la disminución de la tasa de mortalidad previniendo a la población de alto riesgo.

## **5. MÉTODOS**

### **5.1 Obtención de Muestras de Células Escamosas de Esputo**

Se obtuvieron 50 muestras de esputo y lavados bronquiales de cada uno de los grupos estudiados: GRUPO I, población control de individuos sanos; GRUPO 2, población de alto riesgo (con hábito de fumar o expuestos a humo de leña por largos períodos de tiempo); GRUPO 3, pacientes con cáncer pulmonar, las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Isaías Badillo Almaráz de la Unidad de Enfermedades Respiratorias-Medicina Interna del Centro Médico de Zacatecas. Además, se analizó un cuarto grupo constituido por las líneas celulares de carcinoma pulmonar (A427, Calu, INER 51, SKMS y VP1), concedidas por el Dr. Raúl Barrera del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, de la Ciudad de México.

### **5.2 Extracción de RNA**

Las muestras de esputo, lavados bronquiales y las líneas celulares se lisaron con 1 ml de trizol y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 200 µl de cloroformo y se agitaron vigorosamente por 15 segundos, la mezcla se incubó por 3 min y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min a 4°C. Después de centrifugar la mezcla se tomó la fase acuosa superior, donde se encuentra el RNA, y se precipitó en un tubo Eppendorf con 0.5 ml de isopropanol, se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C. Posteriormente se lavó el paquete de RNA con etanol al 70% y se disolvió la pastilla con agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato), se incubó durante 10 min a 55 ó 60°C y se determinó la concentración del RNA con el espectrofotómetro Smart



Spec3000 de BIO-RAD a una longitud de onda de 260/280. Los RNA se almacenaron a -70°C para posteriormente obtener el DNA complementario.

### 5.3 Síntesis de DNA Complementario (DNAc)

Para cada muestra, en un tubo Eppendorf se agregaron 5 µg de los RNA obtenido, 1 µl de oligo dT 0.5 mg/µl, 1 µl de una mezcla de dNTP 10 mM y se llevó a un volumen de 12 µl con agua DEPC. Posteriormente, la mezcla se calentó a 65°C por 5 min. Después, se adicionaron 4 µl de Buffer First Strand 5x, 2 µl de DTT 0.1 M, 1 µl de Inhibidor de Ribonucleasa y 1ul de Superscript RT. La mezcla se incubó a 42°C por 50 min y se inactivó la reacción a 70°C por 15 min.

### 5.4 PCR-Tiempo Real para la Expresión de *wt1*, *her2*, *bcl2* y *cox2*

Para cada PCR se realizó una mezcla de 10 µl de agua tratada con DEPC, 5 µl del Taqman PCR Master Mix, 1 µl de la sonda Taqman del gen a analizar (*wt1*, *bcl2*, *her2*, *cox2* o *18S*) (Tabla II) y 1 µl del DNAc obtenido; todas las reacciones se realizaron por duplicado. Las condiciones programadas en el termociclador de PCR Tiempo Real de BIO-RAD se describen en la Tabla I.

<b>Tabla I. Programa en el Termociclador para la PCR Tiempo Real</b>			
Paso	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	1	94	4 min
2	40	94	1 min
3		60	1 min
4		72	1:30 min
5		1	72
6	1	4	∞

<b>Tabla II. Juego de oligos usados para PCR cuantitativo</b>		
<b>Gen</b>	<b>Sentido</b>	<b>Antisentido</b>
<i>wt1</i>	GATAACCACACAACGCCCATC	CACACGTCGCACATCCTGAAT
<i>bcl2</i>	Provisto por Applied Biosystems. ID: Hs00236808_s1	
<i>her2</i>	GAGGCACCCAGCTCTTTGA	CGGGTCTCCATTGTCTAGCA
<i>cox2</i>	AGGGATTTTGGAAACGTTGTGAATA	AGCGGGAAGAACTTGCATTG
<i>18S</i>	Provisto por Applied Biosystems. No. de parte: 4308310	

### 5.5 Análisis Estadísticos.

En el software del Termociclador PCR en Tiempo Real (Bio-rad), se obtuvieron los radios de cada uno de los genes analizados a partir de los CT's, utilizando como gen endógeno a 18S y como calibrador a la línea celular de cáncer pulmonar de células escamosas Calu, excepto en *bcl2* se aplicó como calibrador la línea celular de adenocarcinoma pulmonar A427. Los radios obtenidos de cada gen se ingresaron en el programa estadístico SPSS y se agruparon en 4 distintas categorías (1, 2, 3 y 4), las cuales se graficaron para cada grupo de estudio, conforme aumenta el radio de expresión incrementa el número de la categoría (1 = menor expresión/ 4 = mayor expresión). El análisis estadístico para corroborar la relación de la expresión del gen con el grupo de estudio analizado fue la correlación de Spearman ( $\rho$ ) y se utilizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para obtener las significancias entre las distintas variables disponibles en el estudio, como la Edad y el Grupo de Estudio.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Manejo de las muestras.

Se obtuvieron el RNA y el DNA complementario de 107 muestras de esputo: 9 de pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar, 43 de fumadores y 55 de personas sanas. Posteriormente, el DNAc de cada muestra fue sometida a PCR Tiempo Real para analizar las expresiones de los 4 genes de nuestro interés: *wil*, *her-2*, *cox-2* y *bcl-2*.

### 6.2. Análisis de la Variable EDAD en los Grupos de Estudio.

Al comparar el grupo de estudio contra la edad mediante un análisis de ANOVA, se encontró que los pacientes con cáncer están relacionados significativamente con un rango de edad de los 45 a los 70 años, teniendo como punto máximo los 60; los fumadores obtuvieron un rango de los 45 a 55 años y de pico máximo los 50; y las personas sanas, de 35 a 45 años, acentuándose en los 40 (Figura 9).

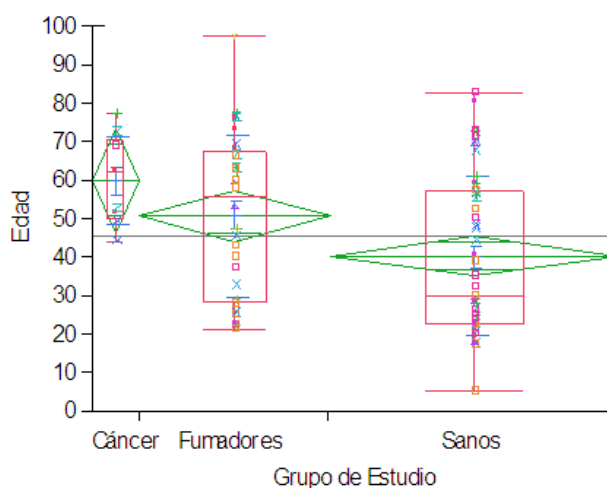


Figura 9. Gráfica representativa de la edad de los grupos de estudio. Se muestra la edad de los casos analizados en cada uno de los grupos de estudio de interés: personas diagnosticadas con cáncer pulmonar, grupo de riesgo y personas sanas.

### 6.3. Análisis de la Variable Sexo en los Grupos de Estudio.

Con el apoyo de un análisis de correspondencia se analizó cada grupo de estudio con el sexo, y se determinó una relación significativa del sexo femenino con el grupo sano, y entre el sexo masculino con los fumadores, los pacientes con cáncer no presentaron una correlación significativa, pero su tendencia fue hacia el sexo masculino (Figura 10).

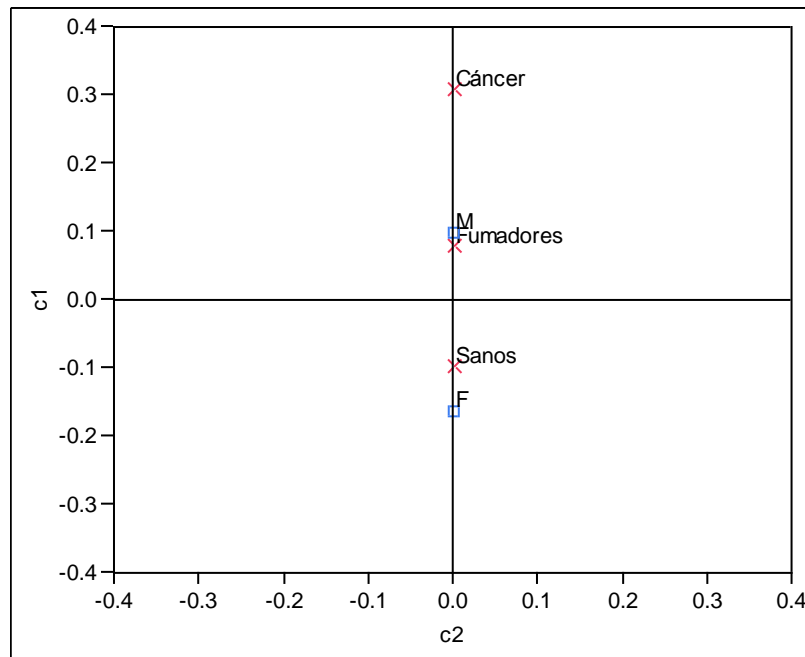


Figura 10. Gráfica representativa del sexo de los grupos de estudio. Se muestra la edad de los casos analizados en cada uno de los grupos de estudio de interés: personas diagnosticadas con cáncer pulmonar, grupo de riesgo y personas sanas.

#### **6.4 Análisis de la expresión de *wt1*, *her-2*, *cox-2* y *bcl-2* en la muestras de esputo de individuos con cáncer pulmonar, fumadores y sanos.**

Se obtuvieron los radios de cada uno de los genes analizados a partir de los CT's ofrecidos por el software de PCR-Tiempo Real, utilizando como gen endógeno a 18S y como calibrador a la línea celular de cáncer pulmonar de células escamosas Calu, excepto en *bcl2* se aplicó como calibrador la línea celular de adenocarcinoma pulmonar A427. Los radios obtenidos de cada gen se agruparon en 4 distintas categoría (1, 2, 3 y 4), las cuales se graficaron para cada grupo de estudio, conforme aumenta el radio de expresión incrementa el número de la categoría (1 = menor expresión/ 4 = mayor expresión). El análisis estadístico utilizado fue la correlación de Spearman ( $\rho$ ) para corroborar la relación de la expresión del gen con el grupo de estudio analizado.

##### **6.4.1. Análisis de la expresión de *wt1*.**

En el análisis del gen *wt1* se encontró mayor expresión en las personas sanas y en el grupo de riesgo (Figura 11). En las personas sanas y de riesgo (fumadores) se obtuvo la categoría 3 y disminuyó la expresión en los pacientes con cáncer y en las líneas celulares: A427, Calu, INER 51, SKMS y VP1 (categoría 1 y 2, respectivamente). El método estadístico de Spearman mostró una correlación negativa del 21% de la expresión de *wt1* con los grupos de estudio (Tabla III).

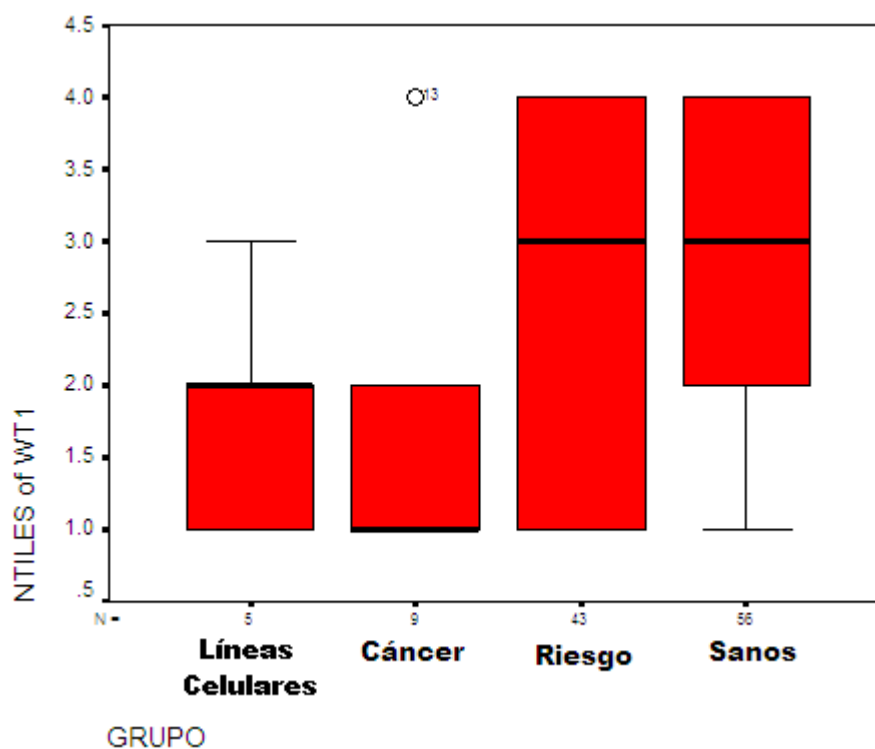


Figura 11. Gráfica representativa de la expresión de *wt1*. Se muestran los resultados obtenidos mediante PCR-Tiempo Real de la expresión de *wt1* ( $2^{-\Delta CT}$ ), a partir del RNA de las líneas celulares (A427, Calu, INER 51, SKMS y VP1) y de las muestras de esputo de los diferentes grupos de interés: personas diagnosticadas con cáncer pulmonar, grupo de riesgo y sanos.

<b>Tabla III. Análisis de Correlación de Spearman del Grupo de Estudio y <i>wt1</i></b>	
Coefficientes de Correlación	<b>-.206</b>
Sig. (2-tailed)	.028
N	113

La correlación es significativa al nivel .05 (de 2 colas).

Tabla III. Tabla del Análisis de Correlación de Spearman de *wt1*. El análisis muestra una correlación negativa del 21 % de los resultados obtenidos de la expresión de *wt1* ( $2^{-\Delta CT}$ ) contra el grupo de estudio.

#### 6.4.2. Análisis de la expresión de *bcl2*.

En el análisis del gen *bcl2* se encontró mayor expresión en los pacientes de cáncer y en las líneas celulares (A427 e INER51) (Figura 12). En las personas sanas se obtuvo la categoría 1 y aumentó en el grupo de riesgo a 3. Al analizar los pacientes con cáncer y líneas celulares la categoría fue mayor (categoría 4). El método estadístico de Spearman mostró una correlación positiva del 88% de la expresión de *bcl2* con los grupos de estudio (Tabla IV).

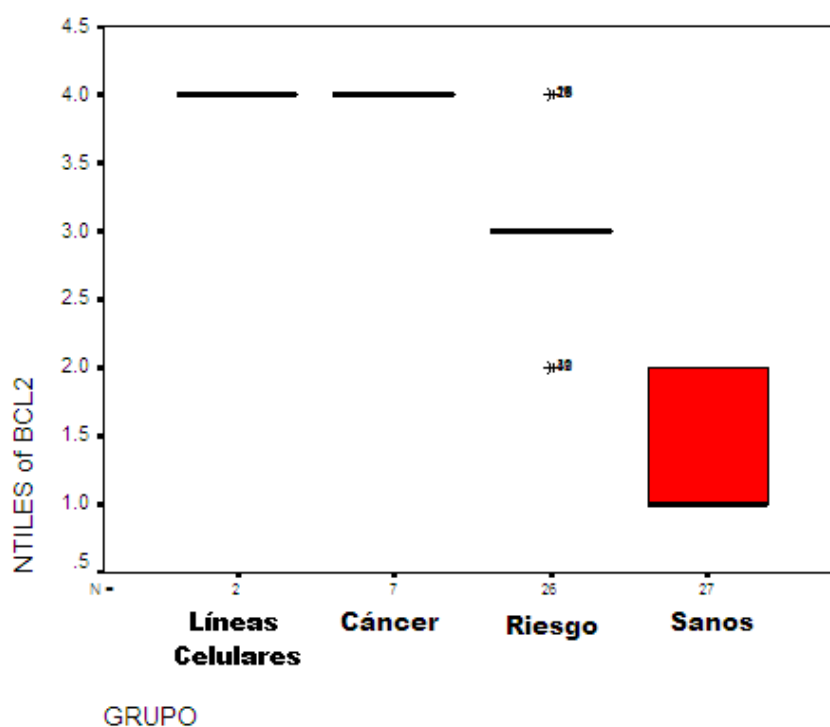


Figura 12. Gráfica representativa de la expresión de *bcl2*. Se muestran los resultados obtenidos mediante PCR-Tiempo Real de la expresión de *bcl2* ( $2^{-\Delta CT}$ ), a partir del RNA de las líneas celulares (A427 e INER51) y de las muestras de esputo de los diferentes grupos de interés: personas diagnosticadas con cáncer pulmonar, grupo de riesgo y sanos.

<b>Tabla IV. Análisis de Correlación de Spearman del Grupo de Estudio y <i>bcl2</i></b>	
Coeficientes de Correlación	<b>.883</b>
Sig. (2-tailed)	.000
N	62

La correlación es significativa al nivel .01 (de 2 colas).

Tabla IV. Tabla del Análisis de Correlación de Spearman de *bcl2*. El análisis muestra una correlación positiva del 88 % de los resultados obtenidos de la expresión de *bcl2* ( $2^{-\Delta CT}$ ) contra el grupo de estudio.

#### **6.4.3. Análisis de la expresión de *her2*.**

En el análisis del gen *her2* se encontró mayor expresión en las personas sanas (Figura 13). Se observó la categoría 3 en el grupo de personas sanas y disminuyó a la categoría 2 al analizar los grupos de riesgo y pacientes con cáncer, y aún más en las líneas de cáncer: Calu y VP1 (categoría 1). El método estadístico de Spearman mostró una correlación negativa del 20% de la expresión de *her2* con los grupos de estudio (Tabla V).



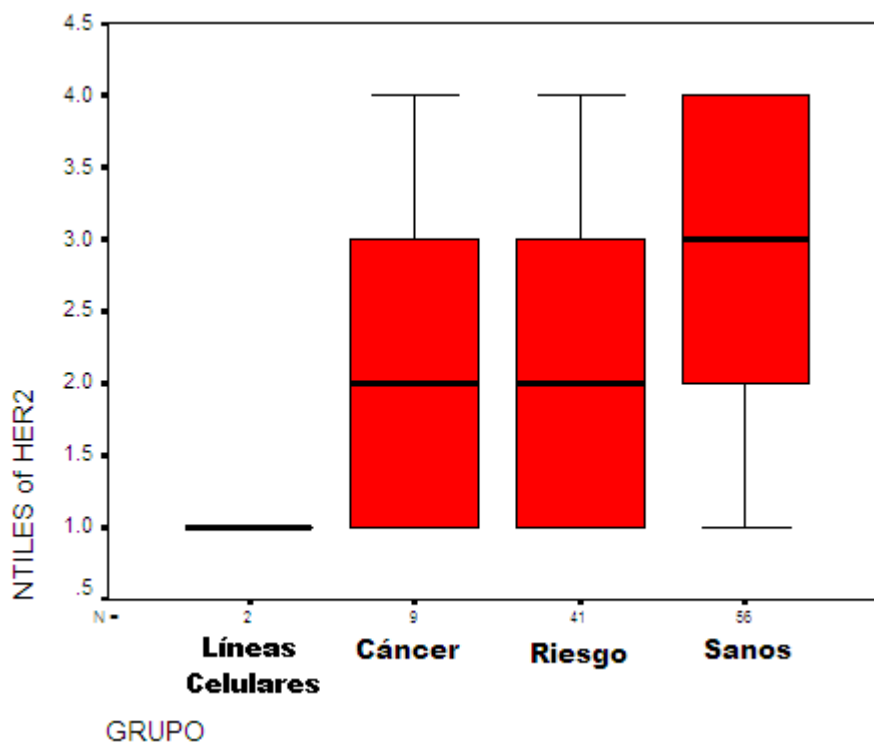


Figura 13. Gráfica representativa de la expresión de *her2*. Gráfica representativa de los resultados obtenidos mediante PCR-Tiempo Real de la expresión de *her-2* ( $2^{-\Delta CT}$ ), a partir del RNA de las líneas celulares (Calu y VP1) y de las muestras de esputo de los diferentes grupos de interés: personas diagnosticadas con cáncer pulmonar, grupo de riesgo y sanos.

Coefficientes de Correlación	<b>-.204</b>
Sig. (2-tailed)	.035
N	108

La correlación es significativa al nivel .05 (de 2 colas).

Tabla V. Tabla del Análisis de Correlación de Spearman de *her2*. El análisis muestra una correlación negativa del 20 % de los resultados obtenidos de la expresión de *her2* ( $2^{-\Delta CT}$ ) contra el grupo de estudio.

#### 6.4.4. Análisis de la expresión de *cox2*.

En el análisis del gen *cox2* se encontró un incremento de la expresión en las personas de riesgo y los pacientes con cáncer (Figura 14). Se observaron el grupo de personas sanas y las líneas de cáncer pulmonar (Calu y U933) en la categoría 2, por otro lado se obtuvo la categoría 3 en el grupo de riesgo y de cáncer. El método estadístico de Spearman mostró una correlación del 8.3% de la expresión de *cox2* con los grupos de estudio (Tabla VI).

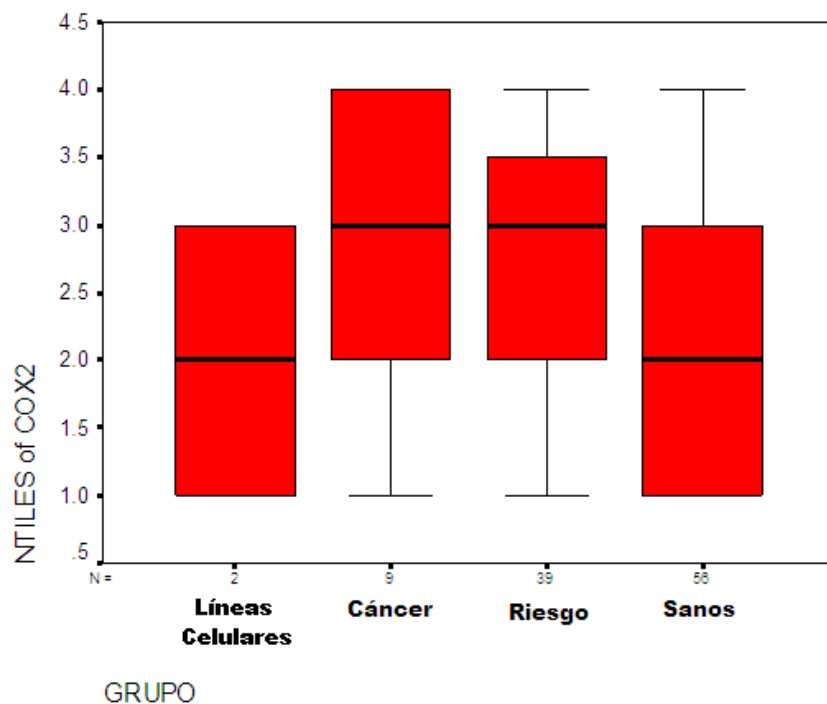


Figura 14. Gráfica representativa de la expresión de *cox-2*. Gráfica representativa de los resultados obtenidos mediante PCR-Tiempo Real de la expresión de *cox-2* ( $2^{-\Delta CT}$ ), a partir del RNA de las líneas celulares (Calu y U933) y de las muestras de esputo de los diferentes grupos de interés: personas diagnosticadas con cáncer pulmonar, grupo de riesgo y sanos.

<b>Tabla VI. Análisis de Correlación de Spearman del Grupo de Estudio y <i>cox2</i></b>	
Coefficientes de Correlación	<b>.083</b>
Sig. (2-tailed)	.395
N	106

Tabla VI. Tabla del Análisis de Correlación de Spearman de *cox2*. El análisis muestra una correlación del 8.3 % de los resultados obtenidos de la expresión de *cox2* ( $2^{-\Delta CT}$ ) contra el grupo de estudio.

#### **6.4.5. Análisis comparativo de las expresiones de *wt1*, *her2*, *bcl2* y *cox2*.**

Se utilizó el análisis de correlación de Spearman para determinar la relación entre las diferentes variables de estudio (Tabla VII), las cuales fueron el grupo de estudio, la edad, el sexo y los genes (*wt1*, *bcl2*, *her2* y *cox2*). Se encontraron las siguientes relaciones (Tabla VIII):

- Aumentó la expresión de *bcl2* conforme incrementó la edad, con una relación del 53%, y presentando una dependencia con los grupos de estudio con una relación positiva del 88%. Además, se intensificó *bcl2* junto con la expresión de *cox2* (30%), disminuyó con *her2* (13%) y con *wt1* (27%).
- Incrementó la expresión de *cox2* a mayor edad (31%) y se observó una asociación positiva con los grupos de estudio (8.3%). Creció *cox2* con la expresión de *bcl2* (30%), con *her2* (63%) y con *wt1* (31%).
- La expresión de *her2* se relacionó negativamente en un 20% con los grupos de estudio, sin embargo se encontró una relación positiva con la edad (23%). Bajó *her2* con la expresión de *bcl2* (13%), aumentó con *cox2* (63%) y con *wt1* (26%).

➤ Decreció la expresión de *wt1* a mayor edad (2.7%) y la asociación con los grupos de estudio resultó negativa (21%). Bajó *wt1* con la expresión de *bcl2* (27%) y aumentó con *cox2* (31%) y con *her2* (26%).

Tabla VII. Análisis de Correlación de Spearman (rho)								
		GRUPO DE ESTUDIO	SEXO	EDAD	<i>bcl2</i>	<i>cox2</i>	<i>her2</i>	<i>wt1</i>
GRUPO DE ESTUDIO	Correlation Coefficient	1.000	.092	-.322**	.883**	.083	-.204*	-.206*
	Sig. (2-tailed)	.	.346	.001	.000	.395	.035	.028
	N	114	107	107	62	106	108	113
SEXO	Correlation Coefficient	.092	1.000	-.025	-.282*	-.061	.052	.138
	Sig. (2-tailed)	.346	.	.799	.030	.542	.598	.157
	N	107	107	107	59	103	105	107
EDAD	Correlation Coefficient	-.322**	-.025	1.000	.527**	.307**	.229*	-.027
	Sig. (2-tailed)	.001	.799	.	.000	.002	.019	.782
	N	107	107	107	59	103	105	107
<i>bcl2</i>	Correlation Coefficient	.883**	-.282*	.527**	1.000	.303*	-.132	-.272*
	Sig. (2-tailed)	.000	.030	.000	.	.019	.316	.033
	N	62	59	59	62	60	60	62
<i>cox2</i>	Correlation Coefficient	.083	-.061	.307**	.303*	1.000	.633**	.307**
	Sig. (2-tailed)	.395	.542	.002	.019	.	.000	.001
	N	106	103	103	60	106	105	105
<i>her2</i>	Correlation Coefficient	-.204*	.052	.229*	-.132	.633**	1.000	.255**
	Sig. (2-tailed)	.035	.598	.019	.316	.000	.	.008
	N	108	105	105	60	105	108	108
<i>wt1</i>	Correlation Coefficient	-.206*	.138	-.027	-.272*	.307**	.255**	1.000
	Sig. (2-tailed)	.028	.157	.782	.033	.001	.008	.
	N	113	107	107	62	105	108	113

\*\* La correlación es significativa al nivel .01 (de 2 colas).

\* La correlación es significativa al nivel .05 (de 2 colas).

Tabla VII. Tabla del Análisis de Correlación de Spearman de las variables analizadas. El análisis muestra la correlación entre las distintas variables: Grupo de estudio, Sexo, Edad, *bcl2*, *cox2*, *her2* y *wt1*.

<b>Tabla VIII. Comportamiento de las Expresiones de los Genes a partir del Análisis de Correlación de Spearman</b>						
Gen	Edad	Carcinogénesis	<i>bcl2</i>	<i>cox2</i>	<i>her2</i>	<i>wt1</i>
<i>bcl2</i>	↑	↑	/	↑	↓	↓
<i>cox2</i>	↑	↑	↑	/	↑	↑
<i>her2</i>	↑	↓	↓	↑	/	↑
<i>wt1</i>	↓	↓	↓	↑	↑	/

Tabla VIII. Tabla del Comportamiento de las Expresiones de los Genes a partir del Análisis de Correlación de Spearman. La tabla muestra la relación de la expresión de cada uno de los genes analizados (*bcl2*, *cox2*, *her2* y *wt1*) con las distintas variables de estudio: Grupo de estudio, Edad, *bcl2*, *cox2*, *her2* y *wt1*. Definiendo si la expresión Aumenta (↑) o Disminuye (↓) en la relación descrita.

## 7. DISCUSIÓN

El cáncer pulmonar es la neoplasia de mayor prevalencia a nivel mundial y con la más baja tasa de sobrevivencia a cinco años, incluso menor del 15%, gran parte debido al diagnóstico en etapas tardías de la enfermedad y a los tratamientos ineficaces en dichas etapas. Lo anterior nos lleva a la necesidad de desarrollar nuevos métodos de diagnóstico temprano y tratamiento.

En nuestro proyecto nos propusimos buscar nuevos biomarcadores moleculares para el diagnóstico de cáncer pulmonar en etapas tempranas a partir de muestras de esputo en diferentes grupos de interés: población diagnosticada con cáncer pulmonar, una población de riesgo (fumadores y personas sometidas a otros carcinógenos) y una población control (individuos sanos). Los marcadores seleccionados fueron cuatro genes: *wt1*, *her2*, *cox-2* y *bcl-2*, los cuales están relacionados en la patogénesis de diferentes tipos de neoplasia, incluyendo la pulmonar. En nuestro trabajo determinamos la expresión de dichos genes mediante PCR-Tiempo Real y evaluamos el valor pronóstico de cada uno.

Puesto que la frecuencia está relacionada con la edad, se comparó el grupo de estudio contra la edad mediante un ANOVA, se encontró que los pacientes con cáncer están relacionados a la edad de 60 años, los fumadores con los 50 y las personas sanas, 40 años. Dichas edades coinciden con lo reportado, el cáncer

pulmonar se presenta generalmente en personas de la tercera edad, principalmente mayores a los 70 años, pero el incremento de la frecuencia ocurre a partir de los 45 años (Sánchez y col., 2005).

Con el apoyo de un análisis de correspondencia se analizó cada grupo de estudio con el sexo. Confirmando los estudios mencionados por Sánchez y col. (2005), se determinó una relación significativa del sexo femenino con el grupo sano, y entre el sexo masculino con los fumadores; sin embargo, los pacientes con cáncer no presentaron una relación significativa, pero su tendencia fue hacia el sexo masculino.

Para analizar la expresión de cada uno de los posibles biomarcadores (*wt1*, *bcl2*, *her2* y *cox2*), se obtuvieron los radios de cada uno de los genes analizados a partir de los CT's ofrecidos por el software de PCR-Tiempo Real, utilizando como gen endógeno a *18S* y como calibrador a la línea celular Calu, excepto en *bcl2* se aplicó la línea A427. Los radios obtenidos de cada gen se agruparon en 4 distintas categorías: 1, 2, 3 y 4 (1 = menor expresión; 4 = mayor expresión). El análisis estadístico utilizado fue la correlación de Spearman ( $\rho$ ) para corroborar la relación de la expresión del gen con el grupo de estudio analizado. En el análisis de *wt1* se encontró una relación negativa de su expresión en los grupos de estudio, ya que se encontró mayor expresión en las personas sanas y en el grupo de riesgo, disminuyendo la expresión en los pacientes con cáncer y en las líneas celulares; sin embargo, la correlación negativa fue del 21%. Lo mencionado concuerda con el estudio de Silberstein y col. de la expresión de *wt1* en cáncer de mama, se encontró expresado en tejido normal y baja o nula expresión en tejido tumoral, posiblemente

porque *wt1* funciona como un inductor de la apoptosis, y al estar nulo se permite la proliferación de las células anormales. Por otro lado, la baja expresión de *wt1* en cáncer contradice trabajos reportados, donde la elevada expresión de *wt1* se encuentra relacionada con cáncer, debido a que *wt1* también es un inductor de la proliferación celular al modular otros genes (*ciclina D*, *bcl2*, entre otros) relacionados en el desarrollo y mantenimiento neoplásico (Hernández-Herrera et al, 2004). Posiblemente, la variabilidad de resultados encontrados corresponda a las diversas isoformas del gen, por consecuencia de los splicing alternativos, la edición del RNA y los múltiples sitios de iniciación de la traducción (Wagner et al, 2003). En la cascada de señalización de *wt1*, éste activa o reprime una variedad de genes, en el caso de *bcl2*, *wt1* realiza ambas cosas (Hernández-Herrera et al, 2004); dicha relación de ambos genes, en esta investigación *wt1* posiblemente reprime a *bcl2*, ya que se observó una relación negativa de *wt1* y *bcl2*, es decir, aumentó *bcl2* conforme disminuyó *wt1*.

La expresión de *bcl2* presentó una correlación positiva del 88% con los grupos de estudio, puesto que fue incrementando la expresión en el grupo de riesgo y aún más en los pacientes con cáncer y en las líneas celulares de cáncer. Lo mencionado anteriormente, se asemeja a los trabajos publicados, donde *bcl2* probablemente funcione como un supresor de la apoptosis y/o como promovedor del inicio del ciclo celular, sin embargo, las funciones del gen no sólo dependen de la expresión, sino también de los sitios de fosforilación, si se presenta en la serina 70 (S70) ocurre la función antiapoptótica y si sucede la fosforilación en varios sitios (treonina 69, S70 y S87) acontece la inactivación de *bcl2* (Deng y col., 2004). El interés del comportamiento de *bcl-2* observado en este trabajo es la aplicación temprana de



tratamientos preventivos, esto es, proporcionar el agente supresor de *bcl2* cuando la persona se encuentre en riesgo de generar cáncer al irse incrementando la expresión de *bcl2*; algunos tratamientos en investigación son el ABT-263 (pequeña molécula antagonista de Bcl2, derivado oralmente activo de ABT-737) (Vogle et al, 2008), RNA de interferencia para algún miembro de la familia *bcl2* (Wang et al, 2008), el ligando de la tubulina IG-105 (N-(2,6-dimetoxipiridina-3-il)-9-metilcarbazol-3-sulfonamida) contra células cancerígenas resistentes a drogas (Wang et al, 2008), entre otros. Además, se encuentra la importancia de inhibir a *bcl2* para eliminar la resistencia de la célula a la quimioterapia, como el cisplatino (Riedel et al, 2008).

En el análisis del gen *her2* se encontró una correlación negativa del 20%, apreciando la disminución de la expresión del gen conforme transcurre la carcinogénesis, ya que se determinó mayor expresión en las personas sanas y decreció en el grupo de riesgo, además del cáncer, y aún más disminuyó en las líneas celulares de carcinoma. Los resultados obtenidos en este trabajo no se relacionaron a lo reportado anteriormente, puesto que la expresión de *her2* se encuentra a elevada en distintos carcinomas, cabe mencionar que *her2* es un biomarcador bien establecido del cáncer de mama. Al observar disminución de la presencia de *her2* en cáncer y en el estudio de riesgo, esto es favorable para el paciente, ya que no se presentó una co-expresión de los genes *her2* y *bcl2*, puesto que al estar ambos expresados elevadamente es un mal pronóstico. Por otro lado, se observó la co-expresión de *her2* con *wtl* y *cox2*, donde *cox2* juega un papel como gen marcador de mal pronóstico

En el análisis del gen *cox2* se determinó una correlación positiva en todos los parámetros estudiados, acompañado de la expresión de los genes *bcl2*, *her2* y *wt1*. Se esperaba obtener el incremento de *cox2* puesto que es un gen indicador de inflamación y que la inflamación se encuentra ligada a la generación de cáncer. Dicho proceso está ocurriendo en las personas con riesgo porque la inflamación es producto de la constante inhalación del humo de cigarro o de otros contaminantes carcinogénicos; a este nivel, la inflamación puede ser evitada mediante drogas antiinflamatorias no esteroideas y por consecuencia evadir la formación de cáncer. En cáncer de mama se ha descrito a Her2 como un inductor de *cox2* mediante la activación de Akt (Simeone y col., 2004), y a su vez, Cox2 es un activador de *bcl2* (Trifan-Hla, 2003), esto posiblemente describa lo encontrado en cáncer pulmonar al obtener una relación positiva en los genes *her2*, *cox2* y *bcl2*. Dichos resultados ayudan a la elección del tratamiento, ya que los inhibidores de *cox2* (cualquier NSAID) sensibilizan al tumor, quitando la resistencia de la célula a los medicamentos contra *Her2* (Simeone y col., 2004); sin embargo, las muestras de pacientes con cáncer pulmonar analizadas en este trabajo presentaron mal pronóstico al estar expresándose *bcl2* y *cox2*.

Los resultados obtenidos nos ofrecen a *bcl2* como el mejor biomarcador para la detección de cáncer pulmonar y para la búsqueda temprana de la neoplasia con una relación del casi 90% de su expresión con los grupos de estudio (pacientes con cáncer, grupo de riesgo y personas sanas). Además de comprobar que la obtención de muestras de esputo es una técnica de muestreo sencilla, barata y nada invasiva para la búsqueda de biomarcadores moleculares de cáncer pulmonar; el esputo, al contener células correspondientes a la orofaringe y al conducto respiratorio, es factible para el

análisis de biomarcadores en los fumadores por presentar mayor secreción bronquial. El PCR cuantitativo es una buena herramienta para el análisis de dichas muestras ya que sólo se necesita una pequeña cantidad de DNA tumoral. Dichas técnicas de muestreo y análisis pueden aplicarse complementariamente con la tecnología de rutina, incrementando así la posibilidad de un diagnóstico oportuno (Brambilla y col., 2003; Chen y col., 2005).

## 8. CONCLUSIONES

1. En el estudio de la expresión de *wt1* en las células escamosas de esputo del grupo control de individuos sanos (población no fumadora ni con patologías pulmonares), de alto riesgo (fumadores) y de los pacientes con la patología de cáncer pulmonar, se encontró una relación negativa de la expresión del gen con los grupos analizados.
2. En el análisis de la expresión de *bcl2* en las células escamosas de esputo del grupo control de individuos sanos (población no fumadora ni con patologías pulmonares), de alto riesgo (fumadores) y de los pacientes con la patología de cáncer pulmonar, se encontró una asociación positiva de la expresión del gen con los grupos de estudio.
3. En la determinación de la expresión de *her2* en las células escamosas de esputo del grupo control de individuos sanos (población no fumadora ni con patologías pulmonares), de alto riesgo (fumadores) y de los pacientes con la patología de cáncer pulmonar, se encontró una correlación negativa de la expresión del gen con las poblaciones analizadas.
4. En la investigación de la expresión de *cox2* en las células escamosas de esputo del grupo control de individuos sanos (población no fumadora ni con patologías pulmonares), de alto riesgo (fumadores) y de los pacientes con la patología de cáncer pulmonar, se encontró una relación positiva de la expresión del gen con los grupos estudiados.

5. De acuerdo a la literatura y a las expresiones obtenidas de los genes *wl1*, *her-2*, *cox-2* y *bcl-2* en los grupos de estudio (líneas celulares, pacientes con cáncer, grupo de riesgo a cáncer y personas sanas), probablemente *wl1* reprimió a *bcl2*; sin embargo, posiblemente *her2* incrementó del expresión de *cox2* y este a su vez, coopera al estimular la expresión de *bcl2*.

## LITERATURA CITADA

1. Belinsky SA, Liechty KC, Gentry FD, Wolf HJ, Rogers J, Vu K, Haney J, Kennedy TC, Hirsch FR, Miller Y, Franklin WA, Herman JG, Baylin SB, Bunn PA, Byers T. 2006. Promoter Hypermethylation of Multiple Genes in Sputum Precedes Lung Cancer Incidence in a High-Risk Cohort. *Cancer Res.* 66:3338-3344.
2. Bose R, Molina H, Scott A, Bitok JK, Periaswamy B, Bader JS, Pandey A, Cole PA. 2006. Phosphoproteomic analysis of Her2/neu signaling and inhibition. *PNAS.* 103:9773–9778.
3. Brabender J, Park J, Metzger R, Schneider PM, Lord RV, Holscher AH, Danenberg KD, Danenberg PV. 2002. Prognostic Significance of Cyclooxygenase 2 mRNA Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *Ann Surg.* 235:440–443.
4. Brambilla C, Fievet F, Jeanmart M, Fraipont F, Lantuejoul S, Frappat V, Ferretti G, Brichon PY, Moro-Sibilot D. 2003. Early detection of lung cancer: role of biomarkers. *Eur Respir J.* 21:36–44.
5. Campa D, Zienolddiny S, Maggini V, Skaug V, Haugen A, Canzian F. 2004. Association of a common polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene with risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis.* 25:229-235.
6. Cebollero M, Sánchez-Mora N, García-Gómez R, Herranz ML, Alvarez-Fernández E. 2008. Prognostic Value of ERBB2 Amplification and Protein Expression in Small Cell Lung Cancer. *Arch Bronconeumol.* 44:122-126.
7. Chen YQ, Li DM, Cai YY, Liu C, Xia XM, Hu JF. 2005. The expression of survivin messenger RNA in sputum and cancerous tissue in human lung cancer. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 28:225-229.
8. Dalwaldi H, Krysan K, Heuze-Vor'ch N, Dohadwala M, Elashoff D, Sharma S, Carcalano N, Lichtenstein A, Dubinett S. 2005. Cyclooxygenase-2-Dependent Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 by Interleukin-6 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 11:7674-7682.
9. Dalrymple-Hay MJR, Drury NE. 2001. Screening for lung cancer. *J R Soc Med.* 94:2-5.

10. Deng X, Gao F, Flagg T, May WS. 2004. Mono- and multisite phosphorylation enhances Bcl2's antiapoptotic function and inhibition of cell cycle entry functions. *PNAS*. 101:153–158.
11. Gazdar AF. 1992. Molecular markers for the diagnosis and prognosis of lung cancer. *Cancer*. 69:1592- 1598.
12. Gazdar AF, Minna JD. 1999. Molecular Detection of Early Lung Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 91:299-301.
13. Grau J, Monzo M, Caballero M, Carles J, Palmero R, Artells R, Pico C, Gascon P. 2007. Expression of cyclooxygenase-2 mRNA in peripheral blood of head and neck cancer patients and in healthy controls. A pilot study. *Acta Otolaryngol*. 127:71-75.
14. Hasanoglu HC, Yildirim Z, Gokirmak M. 1998. Tumor markers in sputum of patients with bronchioloalveolar carcinoma. *Chest*. 113:1144-1149.
15. Hernández-Herrera AD, Aguirre-Cavazos AM, Fuentes-Vélez H, Rodríguez-Padilla C, Trejo-Ávila L, Zapata-Benavides P. 2004. Wt1: sexo, vida y muerte. *Ciencias UANL*. 8:342-347.
16. Hyun K, Hee Y, Ryoo B-Y, Hyun S, Lee JC, Hyun C, Seog S, Min J, Joon M, June H, Choi W, Haeng J. 2006. Prognostic Value of Immunohistochemical Staining of p53, bcl-2, and Ki-67 in Small Cell Lung Cancer. *J Korean Med Sci*. 21:35-39.
17. Jacobson DR, Fishman CL, Mills NE. 1995. Molecular genetic tumor markers in the early diagnosis and screening of non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 6:3-8.
18. Kennedy T, Miller Y, Prindiville S. 2000. Screening for lung cancer revisited and the role of sputum cytology and fluorescence bronchoscopy in a high-risk group. *Chest*. 117:72S-79S.
19. Konno S, Morishita Y, Fukasawa M, Shu Y, Wang D, Tanaka R, Minami Y, Ijima T, Noguchi M. 2004. Anthracotic Index and DNA Methylation Status of Sputum Contents can be Used for Identifying the Population at Risk of Lung Carcinoma Sato. *Cancer (Cancer Cytopathol)*. 102:348–354.

20. Li R, Todd NW, Qiu Q, Fan T, Zhao RY, Rodgers WH, Fang HB, Katz RL, Stass SA, Jiang F. 2007. Genetic deletions in sputum as diagnostic markers for early detection of stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 13:482-487.
21. Mayoral MA, Zenteno E, Espinosa B, Martínez S, Guevara J. 2004. Perspectiva monográfica del cancer pulmonary, un enfoque molecular y la metástasis al cerebro. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 17:283-292.
22. Meert AP, Martin B, Paesmans M, Berghams T, Mascaux C, Verdebout JM, Delmotte P, Lafitte JJ, Sculier JP. 2003. The role of HER-2/neu expresión on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. *Br J Cancer.* 89:959-965.
23. Minna JD, Roth JA, Gazdar AF. 2000. Focus on lung cancer. *Cancer Cell.* 1:49-52.
24. Mounawar M, Mukeria A, Le Calvez F, Hung RJ, Renard H, Cortot A, Bollart C, Zaridze D, Brennan P, Boffetta P, Brambilla E, Hainaut P. 2007. Patterns of EGFR, HER2, TP53, and KRAS mutations of p14arf expression in non-small cell lung cancers in relation to smoking history. *Cancer Res.* 67:5667-5672.
25. Nakamura H, Saji H, Ogata A, Hosaka M, Hagiwara M, Kawasaki N, Kato H. 2003. *Int. J. Cancer.* 103:61-66.
26. Oji Y, Ogawa H, Tamaki H, Oka Y, Tsuboi A, Ho Kim E, Soma T, Tatekawa T, Kawakami M, Asada M, Kishimoto T, Sugiyama H. 1999. Expresión of the Wilm's Tumor Gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res.* 90:194-204.
27. Oji Y, Shinchiro M, Hajime M. 2002. Overexpression of the Wilm's tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *Int J Cancer.* 100:297-303.
28. Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, Belinsky SA. 2000. Predicting Lung Cancer by Detecting Aberrant Promoter Methylation in Sputum. *Cancer Res.* 60:5954-5958.



29. Pelosi G, Del Curto B, Dell'Orto P, Pasini F, Veronesi G, Spaggiari L, Maisonneuve P, Iannucci A, Terzi A, Lonardoni A, Viale G. 2005. Lack of Prognostic Implications of HER-2/neu Abnormalities in 345 Stage I Nonsmall Cell Carcinomas (NSCLC) and 207 Stage I-III Neuroendocrine Tumours (NET) of the Lung. *Int J Cancer*. 113:101-108.
30. Riedel RF, Porello A, Pontzer E, Chenette EJ, Hsu DS, Balakumaran B, Potti A, Nevins J, Febbo PG. 2008. A genomic approach to identify molecular pathways associated with chemotherapy resistance. *Mol Cancer Ther* 7:3141-3149.
31. Sánchez S, Franco R, Flores LJ, Zepeda A. 2004. Cáncer pulmonar (1ª. de 2 partes). *Rev Fac Med UNAM*. 47:64-68.
32. Shepherd FA, Rosell RJ. 2007. Weighing tumor biology in treatment decisions for patients with non-small cell lung cancer. *Thorac Oncol*. 2:S68-S76.
33. Stahel RA. 2007. Adenocarcinoma, a molecular perspective. *Ann Oncol*. 18:ix147-ix149.
34. Sutedja G. 2003. New techniques for early detection of lung cancer. *Eur Respir J*. 21:57-66.
35. Tan D, Deeb G, Wang J, Slocum HK, Winston J, Wiseman S, Beck A, Sait S, Anderson T, Nwogu C, Ramnath N, Loewen G. 2003. HER-2/neu protein expression and gene alteration in stage I-III non-small-cell lung cancer: a study of 140 cases using a combination of high throughput tissue microarray, immunohistochemistry, and fluorescent in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol*. 12:201-211.
36. Thunnissen FBJM. 2003. Sputum examination for early detection of lung cancer. *J Clin Pathol*. 56:805-810.
37. Tonon G, Wong KK, Maulik G, Brennan C, Feng B, Zhang Y, Khatri DB, Protopopov A, You MJ, Aguirre AJ, Martin ES, Yang Z, Ji H, Chin L, DePinho RA. 2005. High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *PNAS*. 102:9625-9630.
38. Vallböhmer D, Brabender J, Yang DY, Danenberg K, Schnheider PM, Metzger R, Holscher AH, Danenberg PV. 2006. Sex differences in the predictive power of the molecular prognostic factor HER2/neu in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 7:332-337.

39. Vogler M, Dyer MJS, Cohen GM. 2008. Bcl-2 inhibitors: small molecules with a big impact on Cancer therapy. *Cell Death Differ*:1–8.
40. Wagner KD, Wagner N, Schedl A. 2003. The complex life of WT1. *J Cell Sci*. 116:1653–1658.
41. Wang YM, Hu LX, Liu ZM, You XF, Zhang SH, Qu JR, Li ZR. 2008. N-(2,6-Dimethoxypyridine-3-yl)-9-Methylcarbazole-3 Sulfonamide as a Novel Tubulin Ligand against Human Cancer. *Clin Cancer Res*. 4:6218-6227.
42. Wang X, Chen W, Zeng W, Bai L, Tesfaigzi Y, Belinsky SA, Lin Y. 2008. Akt-mediated eminent expression of c-FLIP and Mcl-1 confers acquired resistance to TRAIL-induced cytotoxicity to lung cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 7:1156-1163.
43. Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimäki A. 1998. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res*. 58:4997-5001.
44. Yoo J, , Jung JH, Lee MA, Seo KJ, Shim BY, Kim SH, Cho DG, Ahn MI, Kim CH, Cho KD, Kang SJ, Kim HK Immunohistochemical Analysis of Non-Small Cell Lung Cancer. 2007. Correlation with Clinical Parameters and Prognosis. *J Korean Med Sci*. 22:318-325.
45. Zamora-Avila DE, Rodríguez-Padilla C, Trejo-Avila L, Zapata-Benavides P. 2006. Cáncer de Pulmón y Terapia Génica. *Ciencias UANL*. 9:236-240.
46. Zhang X, Chang A. 2008. Molecular Predictors of EGFR-TKI Sensitivity in Advanced Non-small Cell Lung Cancer. *Int J Med Sci*. 5:209-207.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Fernanda Guadalupe Thompson Armendáriz

Candidato para el grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Inmunología

Tesis: **BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES MOLECULARES PARA EL  
DIAGNÓSTICO TEMPRANO DE CÁNCER PULMONAR**

Campo de Estudio: Epidemiología Molecular del Cáncer

Datos Personales: Nacida en Monclova, Coahuila el 12 de diciembre de 1983, hija de Rosa Ma. Armendáriz Nóris y Fernando Thompson Pruneda.

Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en el 2004.

Experiencia Profesional: asistente en la Unidad de Virología y Cáncer del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas del 2003 al 2006, practicante en el control de calidad en Quimiproducos, S.A. de C.V. del 2005 al 2006. Química en el Área de Biología Molecular del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nuevo León del 2009 a la fecha.



