

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**EFEECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL GEN WT-1 CON ARNI EN
COMBINACIÓN CON DROGAS ANTICANCERÍGENAS EN MODELO *IN
VITRO* Y EN UN MODELO MURINO CON METÁSTASIS A PULMÓN.**

POR

M. EN C. QBP. FERNANDA GUADALUPE THOMPSON ARMENDÁRIZ

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

FEBRERO, 2018

**EFFECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL GEN WT-1 CON ARNi EN
COMBINACIÓN CON DROGAS ANTICANCERÍGENAS EN MODELO *IN VITRO*
Y EN UN MODELO MURINO CON METÁSTASIS A PULMÓN.**

COMISIÓN DE TESIS

Dr. Pablo Zapata Benavides
Presidente

Dr. Moisés A. Franco Molina
Secretario

Dra. Laura María Trejo Ávila
Vocal 1

Dra. Diana Reséndez Pérez
Vocal 2

Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Vocal 3

**EFFECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL GEN WT-1 CON ARNi EN
COMBINACIÓN CON DROGAS ANTICANCERÍGENAS EN MODELO *IN VITRO*
Y EN UN MODELO MURINO CON METÁSTASIS A PULMÓN.**

**Director Interno
Dr. Pablo Zapata Benavides**

**Director externo
Dra. Diana E. Zamora Ávila**

DEDICATORIA

A mis papás y a Romy, por creer en mí.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios, 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 doctorado.

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 doctorado en su laboratorio, por apoyarme y confiar en mí. Y además de ser un gran doctor, también es un gran amigo, gracias.

A la Dra. Laura Trejo, por iniciarme en el área de investigación, la cual me ha dado grandes satisfacciones.

A la Dra. Diana Reséndez, Dr. Moisés Franco y Dra. Diana E. Zamora Ávila, por integrar mi comité de tesis.

A mis grandes amigos del laboratorio, Santiago, Kary, Edgar, Ashanti y Karlita por su apoyo incondicional en lo profesional y en lo personal.

A mis compañeros del laboratorio, Mariel, Zacarias, por su apoyo y participación en este proyecto, gracias.

Y a todas aquellas personas que de alguna manera se involucraron en el desarrollo de este proyecto, GRACIAS.

INDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE	iii
LISTA DE TABLA.....	v
NOMENCLATURA	vii
1. INTRODUCCIÓN	3
2.- ANTECEDENTES	6
2.1. Estadísticas del Cáncer.....	6
2.2.-Cáncer pulmonar	6
2.3.-Tipos de Cáncer de Pulmón.....	7
2.3.1.-Cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC).....	8
2.3.2.-Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).....	8
2.4.-Factores de Riesgo.....	9
2.5.-Anormalidades Moleculares en Cáncer Pulmonar	10
2.6.-WT1	11
2.6.1.-Isoformas de WT1	13
2.6.2.-WT1 como regulador transcripción y post-transcripcional.....	14
2.6.3.-Expresión normal de wt1	15
2.6.4.-wt1 como gen supresor de tumor.....	15
2.6.6.- WT1 en Cáncer Pulmonar	17
2.7.-Terapia génica para cáncer pulmonar.....	17
2.7.1.-Genes supresores de tumor	18
2.7.2.-Inhibición de oncogenes	18
2.8.-ARN de interferencia.....	18
2.8.2.-Quimiosensibilización en cáncer de pulmón usando ARN de interferencia (ARNi).....	23
2.9.-Gemcitabina.....	23
2.9.1.-Mecanismos de Acción.....	24
2.9.2.-Actividad Citotóxica.....	25
2.9.3.-Resistencia.....	26
2.9.4.-Gemcitabina en Politerapias.....	28
2.10.-Cisplatino.....	30
2.11.-Terapia para el Cáncer Pulmonar	31
3.-JUSTIFICACIÓN	33
4.-HIPÓTESIS	34
5.-OBJETIVOS	35
5.1.-OBJETIVO GENERAL	35
5.2.-OBJETIVOS PARTICULARES	35
6.-METODOLOGÍA.....	36
6.1.-Cultivo celular	36
6.2.-Preparación del ARNi para el silenciamiento del gen wt1.....	36
6.2.1.-Obtención del ARNi de Interferencia.....	36
6.2.2.-Extracción de plásmido a mediana escala	37
6.2.3.-Preparación del polímero catiónico polietilenimina (PEI) de 25 kDa para los ensayos de transfección	38
6.3.-Evaluación del Efecto Sinérgico de la Politerapia con ARNi-wt1, Gemcitabina y Cisplatino en células de melanoma murino B16F10.....	38

6.3.1.-Determinación de la Concentración Citotóxica al 50% de los tratamientos.....	38
6.3.2.-Evaluación de las Combinaciones de los tratamientos con ARNi-wt1, Gemcitabina y Cisplatino en células B16F10.....	39
6.4.-RT-PCR para la determinación de la expresión de wt1 y bcl-2.....	40
6.4.1.-Obtención de las pastillas celulares para extracción de ARN.....	40
6.4.2.-Extracción de ARN.....	40
6.4.3.-Síntesis del DNA complementario (DNAc.....	40
6.4.4.-PCR convencional de <i>wt1</i> y <i>bcl-2</i>	40
6.5.-Determinación de apoptosis por medio de citometría de flujo usando anexina y yoduro de propidio.....	42
6.6.-Ensayo Clonogénico.....	43
6.7.-Evaluación del Efecto de las Diferentes Combinaciones de Tratamientos con ARNi-wt1, Gemcitabina y Cisplatino, en un Modelo Murino con Metástasis Pulmonar con las Células B16F10.....	43
6.7.1.-Material biológico.....	43
6.7.2.-Aplicación de tratamientos en el modelo murino con inducción a metástasis pulmonar.....	44
6.7.3.-Evaluación del ensayo in vivo.....	44
7.-RESULTADOS.....	45
7.1.-Preparación del ARNi para el silenciamiento del gen wt1.....	45
7.2.-Concentración Citotóxica al 50% de los tratamientos.....	45
7.3.-Evaluación de la sinergia en la combinación de tratamientos in vitro.....	50
7.4.- Determinación de la expresión de wt1 y bcl-2 en células BCL16 tratadas con ARNi-wt1 y/o cisplatino y/o gemcitabina.....	52
7.5. Incremento de apoptosis en células tratadas con los compuestos.....	53
7.6.-Efecto de los Tratamientos en la Supervivencia Mediante un Ensayo Clonogénico.....	54
7.7.-Evaluación de la supervivencia de los ratones C57/BL6 tratados con las diferentes combinaciones de terapias.....	55
8.-DISCUSIÓN.....	60
9.-CONCLUSIÓN.....	66
10.-PERSPECTIVAS.....	68
11. LITERATURA CONSULTADA.....	69

LISTA DE TABLA

No. de Tabla	Nombre de la Tabla	Página
1	Tratamientos aplicados en células B16F10 para la obtención de la DL50.	50
2.	Tratamientos aplicados en células B16F10 para la obtención de la DL50.	51
3	Oligos utilizados en la RT-PCR.	53
4	Mezclas de Reactivos para la PCR convencional.	53
5	Protocolos de la PCR.	53
6	Tratamientos aplicados en ratones C57/BL6 inducidos a una metátesis pulmonar con células B16F10.	56
7	Evaluación del ensayo de sobrevivencia.	56
8	Cálculos para la obtención de la CC50 teórica de los tratamientos en células B16F10.	58
9	Evaluación del efecto de la combinación del ARNi-wt1 con drogas quimioterapéuticas en células de melanoma murino B16F10.	63
10	Resumen de las variables evaluadas en los grupos tratados con los diferentes tratamientos.	70

LISTA DE FIGURAS

No. de Figura	Nombre de la Figura	Página
1.	Cortes histológicos de cáncer pulmonar	20
2.	Estructura de los dominios de WT1	23
3.	Funciones de WT1	24
4.	Isoformas de WT1	26
5.	Biosíntesis del RNAi	31
6.	Estructura de la Gemcitabina	36
7.	Mecanismo de acción de la Gemcitabina	37
8.	Características del plásmido pGSH1-GFP	49
9.	Células B16F10 transfectadas	58
10.	Viabilidad de células de melanoma murino B16F10 expuestas a diferentes concentraciones de tratamientos	59
11.	Viabilidad de la línea celular de melanoma murino B16F10 transfectadas con ARN- <i>wtl</i> y expuestas a diferentes concentraciones de las drogas quimioterapéuticas:	61
12.	Combinaciones de tratamientos de las drogas quimioterapéuticas Cisplatino y Gemcitabina,	63
13.	Combinaciones de tratamientos de ARNi- <i>wtl</i> y drogas quimioterapéuticas Cisplatino y Gemcitabina.	64
14.	Expresión de los gen <i>bcl-2</i> y <i>wtl</i>	65
15.	Determinación de apoptosis por medio de citometría de flujo	66
16.	Ensayo clonogénico.	67
17.	Peso final promedio de los grupos de ratones C57/BL6 sometidos a los diferentes tratamientos	68
18.	Ratones C57/BL6 con inducción a metástasis pulmonar con la línea celular de melanoma murino B16F10	68
19.	Gráfico de los días de sobrevivencia de los ratones C57/BL6 tratados con las diferentes combinaciones de tratamientos con ARNi- <i>wtl</i> , Gemcitabina y Cisplatino	69
20.	Ratones C57/BL6 con inducción a metástasis pulmonar con la línea celular de melanoma murino B16F10	71

NOMENCLATURA

%	Porcentaje
18S	Gen ribosomal 18S
°C	Grados centígrados
μl	Microlitro
AC	Adenocarcinoma
A427	Línea celular de adenocarcinoma pulmonar
A549	Línea celular de adenocarcinoma epitelial basal alveolar humano
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BAC	Carcinoma bronquioalveolar
Bak	Gen antiapoptótico Bak
Bax	Gen antiapoptótico Bax
Bcl-2	Gen Bcl-2
cat	Catalasa
Calu	Línea celular de cáncer pulmonar de células escamosas
CDKN2A	Cinasa dependiente de ciclina 2A/p16
CpG	Islas de Citocina-fosfato-Guanina
CT	Ciclo donde la curva de amplificación cruza la línea umbral
CTCs	Células tumorales circulantes

DAP	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	Inhibidor de tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento epidermal
ErbB	Receptor del factor de crecimiento epidermal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fig.	Figura
Fhit	Triada frágil de histidina
K562	Línea celular humana de leucemia mielógena crónica
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
M	Fase de mitosis
M	Molar
min	Minuto
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NSCLC	Carcinoma pulmonar de células no pequeñas
Oligo dT	DNA sintético compuesto por 15 a 18 timinas.
p14	Proteína 14
p16	Gen supresor p16

p53	Proteína de 53 kilodaltones. Gen supresor tumoral.
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
SPSS	Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales
WAGR	Síndrome del tumor Wilms-aniridia
wt1	Tumor de Wilms tipo 1

RESUMEN

La proteína del tumor de Wilms (WT1) tiene un papel en la regulación genes del crecimiento, diferenciación y proliferación celular, suprime el crecimiento celular y tumorigenicidad, regula directamente la vía apoptótica mediante la inducción de genes proapoptóticos . Además, es un oncogén sobreexpresado en diversos carcinomas, incluyendo el pulmonar, y se han utilizado oligos antisentidos para *wt1* que suprimen el crecimiento celular de líneas pulmonares (Oji et al., 1999). Recientemente, *wt1* se ha considerado como un regulador transcripcional de la angiogénesis, su silenciamiento mediante ARNi reduce la proliferación y migración de células vasculares endoteliales humanas *in vitro* (Timar et al., 2005) y al combinarse con drogas quimioterapéuticas sensibiliza a diferentes líneas celulares de cáncer pulmonar al efecto citotóxico de las drogas (Yonesaka et al., 2006). Por lo tanto, *wt1* es un buen blanco de estudio para el desarrollo de estrategias de terapia génica y su silenciamiento podría tener un beneficio dual, primero reduciendo la proliferación celular del tumor y segundo, inhibiendo la angiogénesis tumoral. En este trabajo investigamos el potencial de *wt1* como blanco terapéutico, mediante la exposición de la línea de melanoma murino B16F10 a un complejo de ARNi contra *wt1* (ARNi-*wt1*) en combinación con drogas quimioterapéuticas (Gemcitabina y Cisplatino), donde se observó un efecto sinérgico al combinar dichos tratamientos mediante un isoblograma; a su vez, se realizó un ensayo clonogénico, obteniendo una disminución en el número de focos celulares; en las técnicas de PCR se observó un decremento en la expresión de *wt1* y del gen apoptótico *bcl2*; y en la prueba de citometría se encontró una disminución de la viabilidad celular por apoptosis del 22%. *In vivo*, en ratones C57Bl6 con metástasis a pulmón por la línea de melanoma murino B16F10, se aplicó un sistema de aerosol dirigido a pulmones para la deliberación del ARNi-*wt1*, donde se observó la sobrevivencia del 100% y un valor de progresión de 0. En conclusión, la politerapia presenta un efecto sinérgico contra el cáncer pulmonar en murino, sin embargo se requieren más estudios para evaluar su eficiencia.

ABSTRACT

Wilms tumor protein (WT1) plays a role in transcriptional regulation, involving different signaling cascades: regulating growth genes, cell differentiation and proliferation, suppresses cell growth and tumorigenicity, directly, regulates the apoptotic pathway by inducing proapoptotic genes (Morrison et al., 2005) and negatively regulated receptors involved in the balance of survival and death signals (Menke et al., 1997). In addition, it is an oncogene overexpressed in various carcinomas, including the lung, and antisense oligos have been used for wt1 that suppress the growth of lung cell lines (Oji et al., 1999). Recently, wt1 has been considered as a transcriptional regulator of angiogenesis, its silencing by RNAi reduces the proliferation and migration of human endothelial vascular cells in vitro (Timar et al., 2005) and when combined with chemotherapeutic drugs sensitizes different cell lines of lung cancer to the cytotoxic effect of drugs (Yonesaka et al., 2006). Therefore, wt1 is a good target for the development of gene therapy strategies and its silencing could have a dual benefit, first reducing tumor cell proliferation and second, inhibiting tumor angiogenesis. In this work we investigated the potential of wt1 as a therapeutic target by exposing the murine melanoma line B16F10 to a complex of RNAi against wt1 (RNAi-wt1) in combination with chemotherapeutic drugs (Gemcitabine and Cisplatin), where a synergistic effect was determined by an isobologram; besides, a clonogenic test was performed, obtaining a decrease in the number of cell foci; in the PCR techniques a decrease in the expression of wt1 and the apoptotic gene bcl2 was observed; and in the cytometric test, a reduction in cell viability by apoptosis of 22% was found. In vivo, in C57B16 mice with lung metastases by the B16F10 murine melanoma line, a lung-directed aerosol system was applied for the delivery of the RNAi-wt1, where 100% survival and a progression value of 0. In conclusion, the combination therapy has a synergistic effect against murine lung cancer, however further studies are needed to evaluate its efficiency.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer pulmonar es una de las neoplasias con mayores índices de prevalencia y mortalidad a nivel mundial y en nuestro país, la frecuencia y el número de muertes por esta patología va en aumento (Minna et al., 2002; Tovar-Guzmán et al., 2005). Se han enumerado diversos factores de riesgo para el desarrollo de esta neoplasia, el mayormente asociado en más del 90% de los casos es el tabaquismo (Hackshaw et al., 1997). La incidencia, el riesgo de enfermar y la tasa de muerte prematura muestran valores más altos en las entidades federativas de ingreso económico alto. Cada año se diagnostican nueve mil pacientes de cuales ocho mil fallecen en ese periodo, el problema principal es que el 75% de los casos de cáncer de pulmón se detectan en etapas avanzadas, lo que disminuye en gran medida la sobrevida, y alrededor del 90% de los pacientes fallecen en los siguientes diez meses o antes del primer año después del diagnóstico (Franklin, 2000), con una sobrevida de cinco años en alrededor del 15% (Janne et al., 2001).

Existen dos categorías importantes de cáncer pulmonar considerando el origen y comportamiento de las células cancerosas (Alva-López et al., 2003): Cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), el cual constituye el 20% de los casos y es agresivo, por otro lado se encuentra el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), representa casi el 80% del total de los casos (Mayoral-Chávez et al., 2004).

La transformación maligna de las células de pulmón abarca una serie de eventos genéticos y moleculares involucrando alrededor de 50 genes supresores de tumores y 100 oncogenes que usualmente son proto-oncogenes que potencian el crecimiento celular y su activación puede ocurrir por muchos motivos incluyendo mutaciones puntuales, sobre expresión o pérdida de la regulación normal del ciclo celular.

En el caso de los antioncogenes, los cuales son genes celulares normales involucrados en la regulación del crecimiento que pueden tener un efecto tumorigénico y algunos están relacionados con el cáncer pulmonar como el *rb*, *p53*, *p16* y *wt1*.

El gen wt1 presenta un papel importante en la regulación transcripcional, involucrándose en diferentes cascadas de señalización como regulador de genes del crecimiento, diferenciación y proliferación celular, suprime el crecimiento celular y tumorigenicidad, regula directamente la vía apoptótica mediante la inducción de genes proapoptóticos (Morrison et al., 2005), Por lo tanto, el silenciamiento de wt1 en tumores podría tener un beneficio dual, primero reduciendo la proliferación celular del tumor y segundo, inhibiendo la angiogénesis tumoral. De esta manera, la administración de una terapia génica con ARNi para el silenciamiento de wt1 combinada con las drogas quimioterapéuticas aplicadas en la actualidad mediante un sistema de aerosol representa una tecnología.

El tratamiento de los pacientes con cáncer pulmonar consiste de varias técnicas, las cuales son la cirugía, radioterapia y quimioterapia, dependiendo del tipo histológico; sin embargo en la mayoría de los casos no son efectivas o la calidad de vida es deficiente para el paciente (Minna et al., 2002). Uno de los tratamientos prometedores son las terapias genéticas, sin embargo, en cáncer de pulmón se dificulta ya que ésta es una enfermedad multifactorial y existen diversos defectos genéticos, por lo que se han propuesto distintas alternativas como estimular al sistema inmune, la transferencia de genes suicidas, el reemplazamiento de genes supresores de tumor defectuosos, la transferencia de genes pro-apoptóticos y la inactivación de oncogenes (Swisher y Roth, 2000). Existen diversas opciones como la de la restauración de los genes supresores de tumor que se encuentran mutados en cáncer para restaurar las vías de crecimiento normal y proliferación celular, por otra parte esta la Inhibición de Oncogenes. Entre las estrategias para la inhibición de oncogenes se encuentra el ARN de interferencia (ARNi), constituido por fragmentos pequeños de ARN (siARN) y por polímeros catiónicos de aplicación local o sistémica (Aigner, 2006) como el polímero catiónico Polietilenimina (PEI), el cual es un potente agente de transfección de DNA en una gran variedad de líneas celulares y animales. Aunado, la deliberación génica por la técnica de aerosol para el tratamiento de cáncer logra que los productos lleguen específicamente y uniformemente a pulmón, incrementando su concentración, farmacocinética y evitando la toxicidad

(Gautam et al., 2000). Además es posible provocar una quimiosensibilización en cáncer de pulmón utilizando ARNi de blancos moleculares relacionados con la resistencia a multi-fármacos. La administración de una terapia génica y de las drogas quimioterapéuticas actuales por un sistema de aerosol representa una tecnología con futuro.

Este objetivo se puede lograr con el uso combinado de modelos animales *in vivo* y las técnicas de biología molecular desarrolladas hasta el momento.

2.- ANTECEDENTES

2.1. Estadísticas del Cáncer.

El Cáncer, según la OMS, provocó 14 millones de casos nuevos y 8.2 millones de muertes en el año 2012, y se espera que el número de casos incrementen un 70% (22 millones) en las siguientes 2 décadas. Los tipos de cáncer con mayor mortalidad son: pulmonar (1.59 millones), hepático (745,000), estomacal (723,000), colorrectal (694,000), de mama (521,000) y esofágico (400,000). En los hombres, los 5 tipos de cáncer con mayor frecuencia son: pulmonar, de próstata, colorrectal, estomacal y del hígado; en el caso de las mujeres: mama, colorrectal, pulmonar, cérvico-uterino y estomacal.

La tercera parte de las muertes por cáncer se han relacionado por: obesidad, dieta reducida en frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco, abuso de alcohol, infecciones virales (HPV, HCV y HBV). Especialmente, el tabaco provoca el 20% de la muertes por cáncer y el 70% de las muertes por cáncer pulmonar (WHO, 2015).

2.2.-Cáncer pulmonar.

El **cáncer pulmonar** Es una de las neoplasias con mayores índices de prevalencia y mortalidad a nivel mundial, en México; ocupa el segundo en hombres y mujeres, y aproximadamente el 14% de todos los casos nuevos, tanto el tipo histológico de células pequeñas y no pequeñas. La edad promedio de la morbilidad es de 70 años, la mayoría de los casos (2 de 3 diagnósticos) ocurren en personas de 65 años o más, mientras que menos del 2% ocurre en personas menores de 45 años. En hombres, la probabilidad de desarrollar cáncer pulmonar es de 1 en 14, y en las mujeres, 1 de 17 (American Cancer Society, 2016), a su vez, la razón de la mortalidad entre sexos es de aproximadamente 2.40 varones por cada mujer (Tovar-Guzmán et al., 2005).

En México, esta enfermedad cobra muchas vidas, debido a que el 75% de los casos de cáncer de pulmón se detectan en etapas avanzadas, lo que disminuye en gran medida la sobrevida, ya que 90% de estos pacientes fallecen en los siguientes diez meses o antes del primer año después del diagnóstico (Franklin, 2000).

Según el INER, se registra en promedio el deceso de una persona cada 10 minutos por enfermedades relacionadas con el tabaquismo, es decir, mueren 6 personas cada hora o 147 diariamente o 53 mil anualmente (Franklin, 2000).

Una vez diagnosticado el cáncer pulmonar se estima una sobrevida de cinco años en alrededor del 15% (Janne et al., 2001) este índice es el más bajo comparado con otros tipos frecuentes de cánceres (colon 63%, mama 83% y próstata 93%) (Landis et al., 1999). Sin embargo, existe una dramática diferencia en la sobrevivencia a 5 años y la relación con el estadio de la enfermedad: la forma localizada muestra una sobrevida de más del 40% (IA=67%, IB=57%, IIA=55%, IIB=39%, IIIA=23%) comparado con la forma extensiva de la enfermedad que muestra solo el 14% (Franklin, 2000).

2.3.-Tipos de Cáncer de Pulmón.

El carcinoma pulmonar (CP) o broncogénico representa el 97% de los tumores pulmonares. De este 97%, el 93% corresponde al cáncer de pulmón primario y el 4% lo forman tumores secundarios o metastáticos, el 2% corresponde al adenoma bronquial y el 1% son tumores benignos (Minna et al., 2002).

Sin embargo, existen dos categorías clínicamente importantes de cáncer pulmonar considerando el origen y comportamiento de las células cancerosas (Alva-López et al., 2003):

2.3.1.-Cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC).

El Cáncer de pulmón de células pequeñas (Fig. 1a) constituye el 20% de los cánceres pulmonares, es un cáncer de comportamiento agresivo donde las células se multiplican rápidamente y poseen la capacidad de extenderse a otros órganos mayores como: ganglios linfáticos, huesos, cerebro, glándulas suprarrenales e hígado. Dentro de este grupo se reconocen los subtipos: carcinoma de células pequeñas, carcinoma mixto de células pequeñas y grandes y carcinoma combinado de células pequeñas. La causa principal de este tipo de cáncer es el tabaco (Mayoral-Chávez et al., 2004).

2.3.2.-Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).

El Cáncer de pulmón de células no pequeñas (fig.1b) representa casi el 80% del total de los casos cáncer de pulmón. Se extiende más lentamente que el carcinoma de células pequeñas. Existen tres subtipos:

- a) Carcinoma de células escamosas o epidermoide (30%), que suele iniciarse en los tubos bronquiales y evolucionar en un periodo largo.
- b) Adenocarcinoma (40%), de origen glandular y ocupa el primer lugar en frecuencia epidemiológica.
- c) Carcinoma indiferenciado de células grandes (10%), el cual tiende a crecer y extenderse rápidamente en cualquier parte del pulmón, dando un mal pronóstico para el paciente (Mayoral-Chávez et al., 2004).

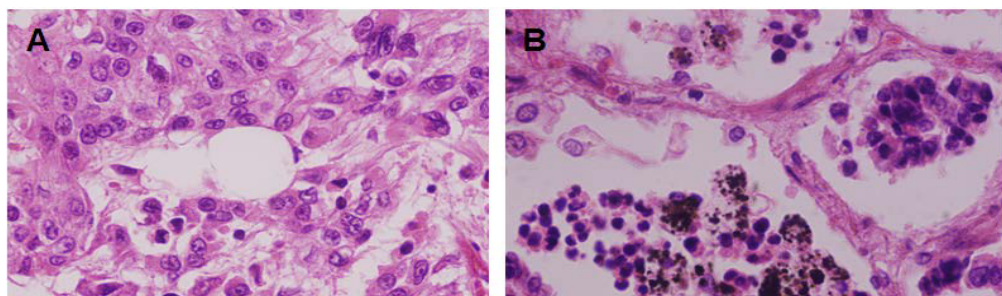


Figura 1. Clasificación histológica de cáncer pulmonar. *A)* Corte histológico de tejido pulmonar diagnosticado como SCLC. *B)* Corte histológico de tejido pulmonar diagnosticado como NSCLC (Adenocarcinoma).

En un estudio realizado durante el periodo de 1997 al 2002 en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de México, ingresaron 845 pacientes con diagnóstico de cáncer pulmonar, de los cuales 577 (68.3%) presentaron adenocarcinoma, 175 (20.7%) presentaron carcinomas celulares escamosos, y 93 (11%) presentaron otro tipo histopatológico. Se encontró que el adenocarcinoma es el subtipo histopatológico más frecuente en hombres jóvenes y con menor incidencia al tabaquismo (Tovar-Guzmán et al., 2005).

2.4.-Factores de Riesgo

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, genética) y del tumor (estadío de la enfermedad, histología) (Meert et al., 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 et al., 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 et al., 2004).

2.5.-Anormalidades Moleculares en Cáncer Pulmonar.

En el proceso de inducción al cáncer de pulmón ocurren gran cantidad de anomalías 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 et al., 2006; Sánchez et al., 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, las cuales comprenden 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 anomalías 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 et al., 2003).

Los principales genes supresores de tumor que se encuentran alterados incluyen a *p53* (90% en SCLC; 50% NSCLC), *rb* (90% SCLC; 20% NSCLC) y *p16* (50% NSCLC; 1% SCLC) (Landis et al., 1999). Otros genes supresores de tumores involucrados con menor frecuencia son PTEN, hOGG1 (reparador del DNA), BAP1. El principal modo de inactivación de la expresión de un gran número de genes supresores de tumores involucra la hipermetilación del promotor (Zochbauer-Muller et al., 2001).

El gen de tumor de Wilms o *wt1* es otro supresor tumoral que codifica para un factor transcripcional (Figura 2) involucrado en procesos de diferenciación celular y apoptosis (Wagner et al., 2003). Dicho gen se ha encontrado expresado en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de pulmón. Mensen et al. detectaron la expresión de *wt1* en 5 de 11 líneas celulares de cáncer de pulmón (45%) por medio de RT-PCR, en 5 líneas SCLC se encontraron 2 positivas (40%) y en 3 de 6 de NSCLC (50%), en otra investigación WT1 también se encontró sobreexpresado en 12 de 15 líneas celulares de cáncer pulmonar (Menssen et al., 2000). Por lo anterior se considera a *wt1* como un blanco atractivo para generar una terapia génica para lograr su silenciamiento.

2.6.-WT1.

El gen de *wt1* se encuentra localizado en el cromosoma 11p13 y codifica para un ARNm de 3kb formado por 10 exones (Call et al., 1990). El dominio N-terminal de *wt1* está compuesto de secuencias ricas en prolina-glutamina y está involucrado en interacciones ARN y proteína, este dominio es crítico para la función de regulación transcripcional ya que contiene dominios de represión y activación. El dominio C-terminal está formado por cuatro dedos de zinc tipo Kruppel Cisteína²-Histidina², que representan su dominio de unión a DNA, pero también está involucrado en interacciones ARN y proteína, ver Figura 2 (Menke et al., 1998).

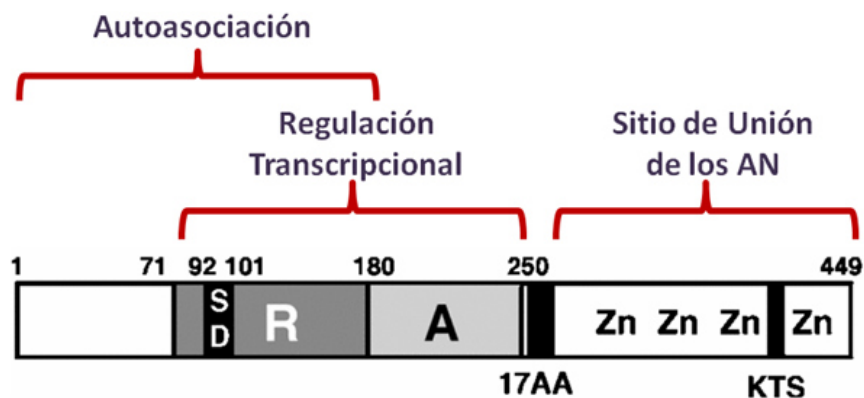


Figura 2. Estructura de los dominios de WT1. el esquema de WT1 muestra el dominio de represión (R), dominio de activación (A) y los dedos de zinc (Zn), el dominio de supresión de 10 aminoácidos (SD) es incorporado y los splicing alternativos de WT1 (Kts y 17AA) son indicados en las barras rellenas de negro. La región de autoasociación N-terminal también es presentada, El número de aminoácidos descritos se refiere a las isoformas de WT1 que contiene ambos splicing, la inserción de KTS y de 17 aminoácidos.

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

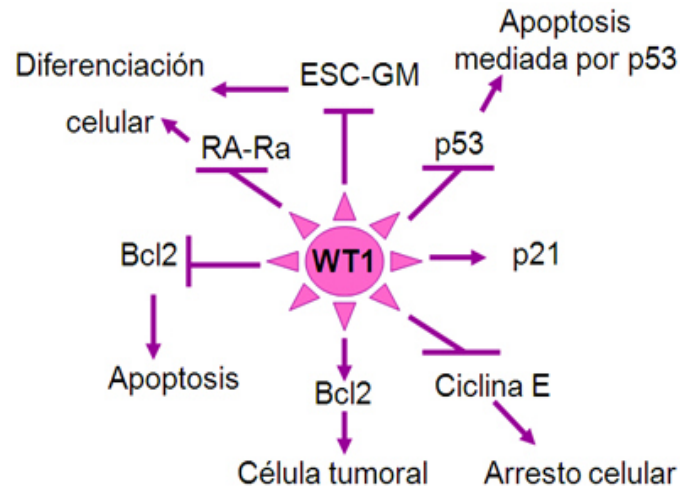


Figura 3. Funciones de WT1. el gen WT1 reprime la expresión de ESC-GM, RA-Ra, p53, Ciclina E y Bcl-2, provocando la diferenciación celular, la apoptosis y el arresto celular, según sea el caso, además, WT1 estimula la expresión de p21 y Bcl-2, promoviendo la generación de una célula tumoral

En pacientes con cáncer y en modelos murinos, 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).

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 *wt1* en el corazón contribuye a la neovascularización (Wagner et al., 2003).

Además, se ha encontrado una alta expresión de *wt1* en leucemia y diferentes tumores en humanos (Oji et al., 1999). En cáncer de pulmón, se ha encontrado la expresión de *wt1* en el 96% (54/56) por RT-PCR, de igual manera se demostró la elevada expresión de *wt1* 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 *wt1* tipo silvestre juega un papel importante en la tumorigénesis del cáncer pulmonar (Oji et al., 2002).

2.6.1.-Isoformas de WT1.

Se han descrito alrededor de 24 isoformas diferentes de WT1 resultado de los fenómenos de splicing, sitios de inicio de la traducción y edición del ARN. Los splicing del ARNm de WT1 son dos: uno en el exón 5 donde se insertan o no 17 AA (51pb) y la inserción de tres aminoácidos KTS (lisina, .treonina, serina) entre los dedos de zinc 3 y 4. Bajo condiciones fisiológicas normales, la expresión del radio KTS+/KTS- se mantiene aproximadamente 2:1 (Hohenstein y Hastie, 2006).

Otras isoformas alternativas se derivan del uso del codón de inicio CTG que se encuentra río arriba, del codón de inicio ATG interno que se encuentra al final del exón 1 y un residuo en el exón 6 para edición del ARN (Roberts, 2005).

La conservación de las isoformas de WT1 durante la evolución nos da una idea de la importancia de sus funciones. Primero, la edición del ARN de WT1 solamente ha sido descrita en ratón y humano, en donde las variantes del exón 5 y de los sitios alternativos de inicio de la traducción están conservados en todos los mamíferos. No hay datos publicados de la conservación de las isoformas, solo de la KTS(+)(-), que se encuentra conservada en todos los vertebrados. En base a esto, se sospecha que las isoformas KTS comprenden la variación más importante (Roberts, 2005).



Figura 4. Isoformas de WT1. el gen WT1 puede sufrir modificaciones: puede agregarse una secuencia de 17 aminoácidos entre el dominio de transactivación y el área del dominio de unión al DNA, la inserción de los 3 aminoácidos (Lisina, treonina y serina) entre el tercer y cuarto dedo de zinc, ambas inclusiones pueden presentarse o ninguna.

2.6.2.-WT1 como regulador transcripción y post-transcripcional.

La primera función asignada a WT1 fue como regulador de la transcripción debido a la presencia de los dedos de zinc en el extremo C-terminal (Roberts, 2005). Entre los genes que regula incluye genes de crecimiento celular y metabolismo, componentes de la matriz extracelular, factores de crecimiento y otros factores de transcripción.

Hay resultados paradójicos en el papel exacto de WT1 en la transcripción ya que parece que puede ser tanto activador como represor transcripcional dependiendo del contexto celular y experimental (Reddy et al., 1995; Wang et al., 1995; Laity et al., 2000). Por ejemplo, se ha demostrado que la expresión exógena de WT1 en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-468 y MCF-7 y en la línea leucémica K562 puede activar al promotor de *c-myc* y estimular la proliferación celular (Han et al., 2005).

En contraste, en la línea HeLa se ha mostrado una represión del promotor de *c-myc* por WT1 (Hewitt et al., 1995). Otro ejemplo relevante es el del gen antiapoptótico *bcl-2* en células HeLa y DHL-4, una co-transfección transiente de WT1 con el promotor de *bcl-2* ligado a un gen reportero resulta en una represión significativa del promotor de *bcl-2* (Heckman et al., 1997); mientras que en la línea celular rabdoide G401 una sobre expresión estable de WT1 conlleva a un incremento endógeno de la proteína de Bcl-2 (Mayo et al., 1999).

Se ha visto que varias proteínas se pueden asociar y regular a WT1 tanto *in vitro* como *in vivo*. Una de ellas es la proteína del gen supresor de tumor *p53*, que puede unirse a los dominios de los dos primeros dedos de zinc de WT1. Cuando WT1 es co-expresado con *p53* wild-type en las células Saos-2 nulas de *p53*, hay un incremento en la estabilidad y vida media de *p53*. Después una radiación con UV las células entran a arresto celular en G1 pero no hay apoptosis mediada por *p53* y las células escapan a la muerte inducida por UV (Maheswaran et al., 1995).

Además de un papel en la regulación transcripcional, hay evidencia circunstancial de un posible rol de WT1 en el metabolismo del ARN, posiblemente por splicing, mediado vía el dedo de zinc 1 y con algo de especificidad para la isoforma KTS+ (Larsson et al., 1995; Davies et al., 1998; Lodomery et al., 2003).

2.6.3.-Expresión normal de wt1.

WT1 es una molécula regulatoria importante involucrada en el crecimiento celular y desarrollo y está expresado de una manera tejido específica. Durante el desarrollo embrionario, WT1 se encuentra primariamente en el sistema urogenital, bazo, ciertas áreas del cerebro, espina dorsal, órganos mesoteliales, diafragma, limbo, epitelio coleómico proliferativo, epicardio y mesenquima subepicardial (Menke et al., 1998). En los tejidos adultos, WT1 se encuentra en el sistema urogenital, el sistema nervioso central y en los tejidos involucrados en la hematopoyesis, incluyendo la médula ósea y nódulos linfáticos (Hohenstein et al., 2006). En corazón, WT1 se expresa durante el desarrollo en la capa subepicardial pero después se apaga y así se mantiene en la etapa adulta. Sin embargo, se ha observado que condiciones de hipoxia o isquemia estimulan la expresión de WT1 en corazón (Dallosso et al., 2004).

2.6.4.-wt1 como gen supresor de tumor.

wt1 es aceptado como gen supresor de tumor en la formación del Tumor de Wilms, una enfermedad pediátrica del riñón que afecta aproximadamente a 1:10,000 niños, solamente un 15% de las mutaciones de WT1 están asociadas a una forma esporádica de la enfermedad, estas incluyen deleciones y mutaciones transgénicas (10- y 5% de los casos de TW) (Little y Wells, 1997).

Sin embargo, la mayoría de los Tumores de Wilms expresan WT1 wild-type a altos niveles, no se sabe si contribuye al desarrollo de la enfermedad o es solo un reflejo de la ontogenia del tumor. Hay tres síndromes asociados a mutaciones heterocigóticas de WT1: síndrome WAGR (WT, aniridia esporádica, anomalías genitourinarias y retraso mental), síndrome Denys-Drash (DDS) y síndrome Frasier (Little y Wells, 1997).

La habilidad de WT1 para inducir supresión en el crecimiento y tumorigenicidad en ratones da muestra de su rol como gen supresor de tumor, por ejemplo, la expresión ectópica de WT1 en las células derivadas de riñón RM1 resulta en un decremento en el número de colonias en el cultivo celular (Haber, 1997).

También, WT1 puede regular directamente la vía apoptótica mediante la inducción de genes proapoptóticos como BAK (Morrison et al., 2005). WT1 también puede regular negativamente receptores de factores de crecimiento como el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y el receptor de insulina, alterando el balance de las señales de sobrevivencia y muerte (Menke et al., 1997).

2.6.5.- wt1 como oncogen.

La primera evidencia que soporta el papel de oncogén es la elevada expresión de WT1 wild-type en una variedad de cánceres humanos, tanto de origen hematológico como no hematológico. La mayoría de los primeros estudios fueron en leucemia donde hay mucha evidencia que demuestra la importancia biológica o clínica de WT1 en la sobrevivencia celular, diferenciación y proliferación. Sin embargo, con el pasar de los años, se acumularon datos de la expresión de WT1 en tumores adultos de diferente origen, incluyendo colorrectal (Koesters et al., 2004), de mama (Loeb et al., 2001), desmóide (Amini et al., 2005) y de cerebro (Oji et al., 2004), partiendo del principio que estos tejidos normalmente no expresan WT1 y además no se encontraron mutaciones, sugiriendo que la expresión de WT1 puede jugar el rol de oncogén en estos tejidos (Tuna et al., 2005).

2.6.6.- WT1 en Cáncer Pulmonar.

En un estudio realizado por Oji et al. encontraron la expresión de WT1 en el 96% (54/56) por RT-PCR, de igual manera se demostró la sobreexpresión de WT1 en el 83% (5/6) de los casos de cáncer de pulmón por inmunohistoquímica, además se realizó la secuenciación de 7 casos y no se encontraron mutaciones, sugiriéndose así que WT1 wild type juega un papel importante en la tumorigénesis del cáncer pulmonar (Oji et al., 2002).

Por otra parte, se han utilizado oligos antisentidos para WT1 que suprimen el crecimiento celular de la línea pulmonar OS3, concluyendo que la expresión de WT1 juega un rol importante en el crecimiento de este tipo de cáncer (Oji et al., 1999).

2.7.-Terapia génica para cáncer pulmonar.

La terapia génica es una estrategia en desarrollo atractiva por ser efectiva, específica y menos tóxica, donde un gen(es) o fragmento génico es introducido intencionalmente en las células somáticas humanas.

El tratamiento genético del cáncer de pulmón se dificulta ya que esta es una enfermedad multifactorial y existen múltiples defectos genéticos, por lo que se han propuesto diversas alternativas como estimular al sistema inmune, la transferencia de genes suicidas, el reemplazamiento de genes supresores de tumor defectuosos, la transferencia de genes pro-apoptóticos y la inactivación de oncogenes (Swisher y Roth, 2000).

2.7.1.-Genes supresores de tumor.

Se basan en la restauración de los genes supresores de tumor que se encuentran mutados en cáncer pulmonar para restaurar las vías de crecimiento normal y proliferación celular. Uno de los genes más comúnmente mutados (50-70% en pacientes con cáncer de pulmón) es *p53*, los productos de los genes *p16* y retinoblastoma (*Rb*) también han mostrado inhibir el crecimiento tumoral en modelos animales (Mukhopadhyay et al., 1991). Otra alternativa es la transferencia de genes pro-apoptóticos; como son los miembros de la familia de Bcl-2 los cuales son importantes en la regulación de apoptosis. Otro gen que induce apoptosis es el gen *fas*, el cual en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas está relacionado con una mayor sobrevivencia.

2.7.2.-Inhibición de oncogenes.

Este tipo de terapia se basa en la identificación e inhibición de aquellos genes críticos para el desarrollo de una carcinogénesis. Los oncogenes de la familia ras son algunos de los más comunes oncogenes activados en cáncer de pulmón y por lo tanto son blanco para este tipo de terapia, otros genes potenciales que se han estudiado son Her-2/neu y el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-Ir) (Mukhopadhyay et al., 1991; Zhang et al., 1995).

Entre las estrategias para la inhibición de oncogenes se encuentran: el uso de oligonucleótidos antisentidos (degradación del ARNm del oncogén), ribozimas (corte directo del ARNm del oncogén) y **ARN de interferencia (ARNi)**.

2.8.-ARN de interferencia.

El ARNi es un fenómeno de silenciamiento génico postranscripcional, específico de secuencia y evolutivamente conservado. Fue descrito inicialmente en *C. elegans* por Fire y cols. (1998) al introducir moléculas ARN doble cadena. El ARNi es una vía intracelular de múltiples pasos que puede ser dividido en dos fases: fase de iniciación y fase efectora.

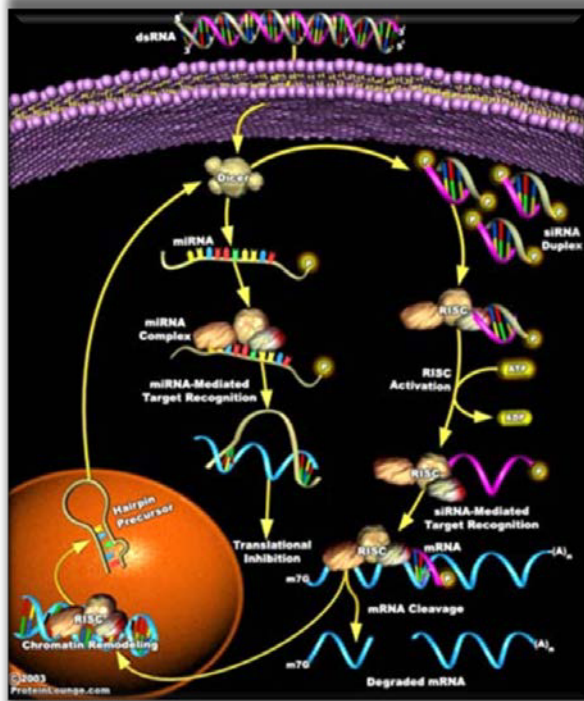


Figura 5. Biosíntesis del RNAi

En la *fase de iniciación* moléculas ARN doble cadena de origen endógeno o exógeno presentes en la célula son procesadas por una actividad de corte por la proteína DICER que es una ribonucleasa tipo 3 (Hamilton y Baulcombe, 1999; Zamore et al., 2000), en fragmentos pequeños nucleotídicos de 21 a 23 bp llamados siARNs. Estos contienen un extremo simétrico de 2nt en el extremo 3' y en el 5' fosfato y un grupo OH en el 3'.

En la *fase efectora*, los siARN son incorporados en un complejo celular de multiproteínas nucleasas llamado RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN) (Hammond et al., 2000).

La cadena dúplex de siARN es separada por actividad de una ARN helicasa (Nykanen et al., 2001), este complejo se activa por la cadena sencilla del siARN y guía al complejo RISC a su ARNm complementario blanco, este siARN hibridiza con el ARNm y el complejo cataliza el corte endonucleolítico del ARNm en el sitio blanco, resultando en extremos de ARN no protegidos que rápidamente son degradados. Para el desarrollo de la generación de siARN óptimos se deben seguir algunas consideraciones: debe ser largo, de 19-25pb combinado con un bajo contenido de GC entre un 36% y un 52% y el requerimiento de extremos simétricos 2nt en el 3' (Elbashir et al., 2001).

Los mecanismos para liberar el siARN son por inyección intravenosa en donde el hígado es el sitio primario de absorción del siARN, los liposomas y lípidos catiónicos, polímeros catiónico con aplicaciones locales o sistémicas (Aigner, 2006).

Dentro de los polímeros catiónicos, actualmente se utiliza como alternativa formar complejos de los siARN no modificados con el polímero catiónico Polietilenimina (PEI), un polímero sintético disponible en forma ramificada o lineal, y de un amplio rango de pesos moleculares de <1000Da a >1000kd (Godbey et al., 1999). La PEI tienen una carga catiónica alta puesto que contiene un grupo amino protonable en cada tercera posición (Boussif et al., 1995); como no tiene grupos aminos cuaternarios, las cargas catiónicas son generadas por protonación de los grupos amino y es dependiente del pH del ambiente (Neu et al., 2005).

Debido a su habilidad para condensar y compactar el ADN, forma complejos en forma de pequeñas partículas coloidales que son tomadas eficientemente por endocitosis. La PEI ha demostrado ser un potente agente de transfección de DNA en una gran variedad de líneas celulares y animales (Kichler, 2004; Wagner et al., 2004). De hecho la PEI ha sido capaz de liberar moléculas largas de ADN de hasta 2.3Mb de cromosomas artificiales de levadura (Marschall et al., 1999) así como plásmidos y pequeños oligonucleótidos en células de mamífero *in vitro* e *in vivo*.

El ratio N/P indica el ratio de átomos de nitrógeno de PEI y los fosfatos del ADN en el complejo y describe la cantidad de PEI a usarse en la formación del complejo lo que influye en la eficiencia de liberación del DNA (Oh et al., 2002).

Los avances más recientes son la aplicación de siARNs *in vivo* en modelos animales, en donde complejos de PEI-siARN con regiones conservadas del virus de la influenza permiten tratar la influenza en ratones. Después de una inyección IV, la PEI promueve la liberación del siARN en los pulmones (Ge et al., 2004).

La mayoría de los efectos biológicos de la aplicación sistémica de PEI – siARN se ha determinado en modelos animales tumorales teniendo como blancos a varias proteínas, como el receptor del factor de crecimiento epidermal Her-2, el factor de crecimiento pleiotrofina (PTN), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su receptor (VEGF R2), y la proteína de unión del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-BP).

2.8.1.-Deliberación génica por la técnica de aerosol para el tratamiento de cáncer.

La mayoría de las drogas y complejos de DNA-vectores se han administrado por las vías convencionales: oral o intravenosa, pero la biodistribución de las drogas por medio de estas estrategias es diseminada y la cantidad de la misma que se deposita en el pulmón es baja. Otro aspecto importante a considerar en estos tipos de sistemas es la toxicidad que se observa después de una inyección (Koshkina et al., 1999). La habilidad para expresar transgenes de una manera selectiva en el pulmón facilitaría el desarrollo de la terapia génica para una variedad de enfermedades humanas.

La administración de una terapia génica y drogas quimioterapéuticas por un sistema de aerosol representa una tecnología con futuro para lograr que los productos lleguen específicamente y uniformemente a pulmón, incrementando su concentración y farmacocinética (Gautam et al., 2000).

Si se utilizan liposomas catiónicos administrados por una vía aérea en aerosol se muestran las siguientes ventajas: los liposomas catiónicos median eficientemente la transfección de células que no se dividen, esto es importante porque las células epiteliales del tracto respiratorio son muy diferenciadas y se dividen muy despacio o no del todo, en segundo lugar los liposomas no son infecciosos ni inmunogénicos (Lesoon-Wood et al., 1995).

El polímero catiónico mayormente utilizado para la deliberación génica por aerosol es la polietilenimina (PEI), la cual favorece los altos niveles de expresión de un transgén en pulmón con una toxicidad y respuesta de citocinas mínima y sin un fenómeno de inflamación aguda (Densmore et al., 2000).

Para optimizar la expresión génica en pulmón por aerosol se ha utilizado un 5% de CO₂ en el aire de la nebulización, lográndose aumentar hasta tres veces más la expresión del transgén. En un estudio con el gen *cat* se observó que la mayor expresión se observó 24hrs después de la deliberación por aerosol y se lograba detectar expresión en un 40%-50% después de una semana, en otro estudio se encontró la expresión de *cat* hasta 28 días después de una sola exposición por aerosol (Gautam et al., 2000).

La efectividad de la técnica de aerosol se ha demostrado *in vivo* en modelos murinos con metástasis a pulmón de las células B16F10 en donde se ha reestablecido la función del gen p53 que se encuentra mutado lográndose una reducción significativa en el tamaño de los tumores y un incremento de un 50% en la sobrevivencia (Gautam et al., 2003).

Zamora et al. (2009), utilizaron un sistema de aerosol para la deliberación de 2 complejos de RNAi de *wtl* y PEI en ratones B16F10, donde se logró la reducción el número y el tamaño de focos tumorales, así como los vasos sanguíneos del tumor, sugiriendo que también disminuye la angiogénesis. Además, las células en la infiltración tumoral mostraron apoptosis y una elevada expresión de los genes proapoptóticos *bcl-Xs* y *bax*, sugiriendo la activación de la vía intrínseca apoptótica.

2.8.2.-Quimiosensibilización en cáncer de pulmón usando ARN de interferencia (ARNi).

Diversos estudios han demostrado la efectividad del silenciamiento específico mediante ARNi de blancos moleculares relacionados con la resistencia a multi-fármacos, esto a través de su interacción directa o indirecta con proteínas cuya participación ha sido ampliamente reconocida en la modulación de este proceso. En recientes investigaciones se ha observado que el silenciamiento mediante ARNi es capaz de sensibilizar a diferentes líneas celulares de cáncer pulmonar al efecto citotóxico de drogas usadas en quimioterapia convencional. Tal es el caso de Survivin (Yonesaka et al., 2006), cuyo silenciamiento incrementa la sensibilidad a doxorubicina en células de cáncer pulmonar mutantes de p53 *in vitro*; el silenciamiento del gen Bcl-XL (Lei et al., 2007), que sensibiliza a células de adenocarcinoma resistentes a cisplatino *in vitro*; el silenciamiento del gen Nrf2 (Factor nuclear eritroide-2-relacionado con el factor 2) (Singh et al., 2008), que aumenta la eficacia del carboplatino *in vitro* e *in vivo* y KLF6-SV1 (Sangodkar et al., 2009) (Variante 1 del factor 6 tipo Kruppel), cuyo bloqueo restaura la sensibilidad de células de adenocarcinoma resistentes a cisplatino *in vitro* y en un modelo xerógrafo.

2.9.-Gemcitabina.

La Gemcitabina es un tratamiento aprobado por la FDA para los pacientes con cáncer avanzado y metastásico. Se ha probado sólo y combinado, *in vitro* e *in vivo*, con otras drogas en diferentes líneas celulares hematológicas y sólidas, incluyendo NSCLC, prologando la sobrevivencia e incrementando la calidad de vida, incluso se considera como el tratamiento más efectivo contra NSCLC, presentando un efecto sinérgico con compuestos platinos, como el cisplatino (Kim et al., 2011).

Trabajando con el tipo histológico de NSCLC, se ha determinado una mayor sensibilidad en el efecto de Gemcitabina al combinarlo con terapia génica, por

ejemplo, al inhibir el gen NF- κ B (Kim *et al.*, 2011), o también, Liao *et al.* (2014), encontraron inhibición de la migración celular e invasión mediante la inactivación de la vía HFG/cMET y de la transición epitelial-mesenquimal (EMT), en células tumorales circulantes (CTCs) y en la línea de adenocarcinoma pulmonar A549. Debido a estas investigaciones podemos sugerir que la resistencia a Gemcitabina puede ser superada por su combinación con agentes citotóxicos o con terapia génica, seleccionando como blanco prometedor a un gen involucrado en la vía de señalización apoptótica; sin embargo, es necesario conocer su farmacocinética para determinar las causas de su resistencia.

2.9.1.-Mecanismos de Acción.

Gemcitabina o dFdC (2',2'-difluoro 2'-deoxicidina) es un análogo de la citidina, la cual atraviesa la membrana celular mediante múltiples transportadores de nucleósidos (hNTs), tanto transportadores independientes (hENT1, hENT2) y dependientes de sodio (hCNT1, hCNT2, hCNT3); sin embargo, hENT1 presenta mayor afinidad hacia Gemcitabina, incluso las células deficientes de hENT1, muestran alta resistencia a esta droga; por lo tanto, cualquier inhibición de dichos transportadores podría resultar en resistencia a Gemcitabina. Dentro de la célula, Gemcitabina es fosforilada a Gemcitabina monofosfato (dFdCMP) por la desoxicitidina cinasa (dCK), para posteriormente sufrir dos fosforilaciones más y convertirse en Gemcitabina difosfato (dFdCDP) y gemcitabine trifosfato (dFdCTP), dichos metabolitos son la droga activa y presentan múltiples blancos intracelulares, por consiguiente se ha demostrado resistencia a Gemcitabina *in vitro* e *in vivo* por la deficiencia de dCK (Mini *et al.*, 2006).

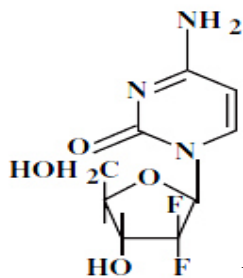


Figura 6. Estructura de la Gemcitabina. Obtenida de Mini *et al.*, 2006.

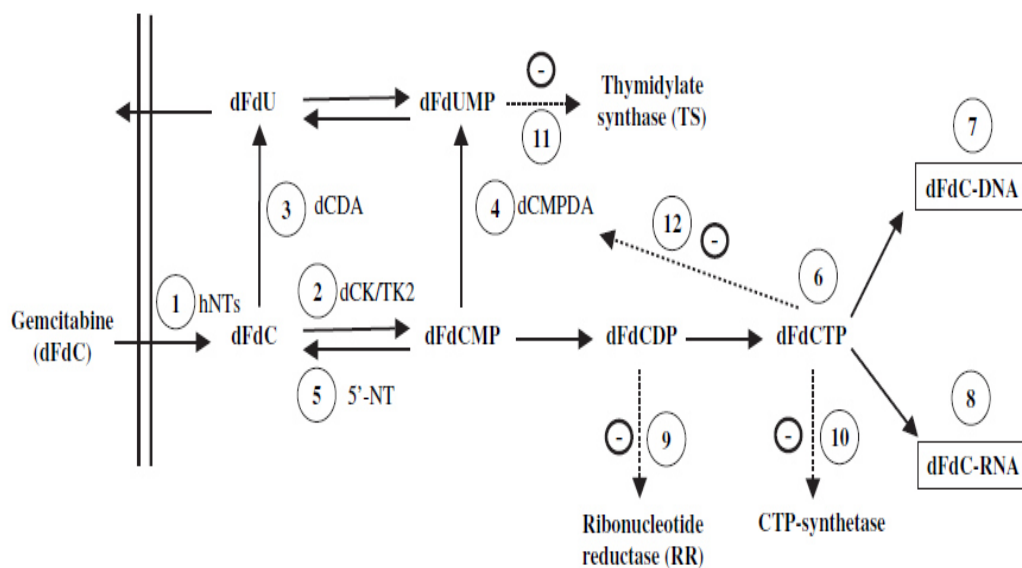


Figura 7. Mecanismo de acción de la Gemcitabina. 1, transporte por los transportadores de nucleósidos (hNTs); 2, fosforilación; 3 y 4, desaminación; 5, desfosforilación; 6, acumulación de trifosfatos; 7, incorporación al ADN; 8, incorporación al ARN; 9, inhibición del ribonucleótido reductasa (RR); 10, inhibición del CTP-sintetasa; 11, inhibición del timidilato sintasa (TS); 12, inhibición del monofosfato desaminasa (dCMPDA): ⊖, efecto inhibitorio. Otras abreviaciones: dCK, deoxicitidina cinasa; TK2, timidina cinasa 2; dCDA, deoxicitidina desaminasa; 59-NT, 59-nucleotidasa. *Imagen obtenida de Mini et al., 2006.*

2.9.2.-Actividad Citotóxica

El dFdCTP funciona como un inductor de la apoptosis, puesto que inhibe a la ADN polimerasa, finaliza la elongación de la cadena de ADN al incorporarse en ella, además evita la detección y la reparación por las enzimas del mecanismo de reparación del ADN al ubicarse en la posición no-terminal; por otro lado, también se intercala en el ARN, pero su efecto no está definido. El dFdCTP también es un inhibidor de la citidina trifosfato sintetasa (CTP sintetasa) y de la desoxicitidilato desaminasa (dCMP desaminasa). El dFdCDP es un inhibidor de la ribonucleótido reductasa (RR), provocando una disminución de los desoxiribonucleótidos necesarios para la síntesis de ADN. Gemcitabina induce a la topoisomerasa I mediada por la ruptura del ADN. Por otro lado, la tirosina cinasa 2 (TK2) se encuentra relacionada con la actividad antitumoral, sin embargo no está clara dicha función (Mini *et al.*, 2006).

Siena *et al.*, 2014, en la línea celular H292 de NSCLC, evaluaron la expresión de FasL (ligando Fas/Fas) con Gemcitabina por PCR en Tiempo Real, Western Blot y citometría de flujo, se encontró que Gemcitabina incrementa la expresión del ARNm y la proteína total de FasL, al igual el porcentaje de células con mFasL

(FasL unido a membrana) y células apoptóticas positivas a mFasL, así como la caspasa-8 y -3, incrementó CH1 1 inducido por caspasa -8 y -3 y la actividad proteolítica. Las células LAK (células asesinas linfocina activada) y los linfocitos del fluido pleural aumentaron, dicho incremento se inhibió al agregar un anticuerpo anti-FasZB4. Concluyeron que Gemcitabina induce un aumento de la regulación de FasL, activando la vía de la apoptosis autocrina y paracrina, induce una apoptosis dependiente de Fas y mediada por la activación de las caspasas-8 y 3, incrementa la sensibilidad celular a la actividad citotóxica de las células LAK y de los linfocitos del fluido pleural malignos, mediante la vía Fas/FasL.

2.9.3.-Resistencia.

La Gemcitabina es inactivada por desoxicitidina desaminasa (dCDA), convirtiéndola a 2'2'-difluorodesoxiuridina (dFdU). Por otra parte, la desaminación de dFdCMP a difluorodesoxiuridina monofosfato (dFdUMP) por la acción de dCMP-desaminasa y subsecuentemente a dFdU. También, la 5'-nucleotidasa (5'-NT) contrapone la acción de la nucleósido cinasa, catalizando la conversión de nucleótidos a nucleósidos; se ha observado que la sobreexpresión de 5'-NTI confiere resistencia a varios análogos de la pirimidina en las líneas celulares leucémicas K562 y HEK293 (Mini *et al.*, 2006). En modelos tumorales *in vitro* e *in vivo*, la sensibilidad a Gemcitabina se ha relacionado con la retención intracelular de dFdCTP, puesto que es utilizado como nucleótido en la fase S del ciclo celular y es retenido durante horas, las necesarias para que ocurra el ciclo celular; en células de leucemia se le ha visto una vida media de 3.9 y 16 horas. La Gemcitabina no es degradada ni excretada de la célula puesto que no es sustrato para las pirimidina nucleósido fosforilasas. Sin embargo, la droga no sólo es efectiva en la fase S sino también en células confluentes.

El dFdCTP compite con la dCTP como un inhibidor de la ADN polimerasa; dFdCTP es incorporado en el ADN y después de la incorporación de un nucleótido, permite la terminación de la polimerización del ADN y una hebra rota. Probablemente, la incorporación del último nucleótido es importante para esconder el dFdCTP de las enzimas reparadoras de ADN, puesto que Gemcitabina tiene la cualidad de ser resistente a los mecanismos de reparación normales. Por

otro lado, al disminuir la cantidad de dCTP, aumenta la incorporación de dFdCTP en el ADN. La dCMP-desaminasa es directamente inhibida por dFdCTP en altas concentraciones, y por consecuencia una disminución del catabolismo de la Gemcitabina. La CTP puede competir con el dFdCTP por su incorporación en el ARN, la inhibición de la CTP-sintetasa, la cual puede mantener la concentración de CTP durante la exposición de la droga, la alta concentración de dFdCTP provoca una disminución de CTP, posiblemente incrementando la incorporación de dFdCTP en el ARN y limitando la síntesis de ARN.

La incorporación de Gemcitabina en el ARN depende del tiempo y la concentración, provocando la inhibición de ARN, sin embargo este mecanismo no está claro.

Además, la variedad de los metabolitos de Gemcitabina pueden inhibir varias enzimas, provocando una potenciación de sus efectos por sí misma. La inhibición de RR permite la disminución de dCTP, el cual es un potente inhibidor de dCK, provocando la fosforilación eficiente de Gemcitabina. Por lo contrario, se presentaría una reducción de la actividad de la droga si se incrementa la presencia de RR, lo cual se ha observado en líneas NSCLC y cáncer de colon, sin embargo se ha observado un incremento en la sobrevivencia al combinar Gemcitabina con cisplatino.

La posible inhibición de timidilato sintasa (TS) por Gemcitabina resulta en la disminución de timidina monofosfato (TMP).

Gemcitabina potencia la estabilidad de los complejos de anclaje de la topoisomerasa I, generando la ruptura de la cadena de ADN por la colisión con las horquillas de replicación y transcripción, llevando a la célula a muerte.

Los genes reguladores de la apoptosis, como p53, bcl-2, bcl-xL y bax, regulan la sensibilidad y la resistencia a Gemcitabina; en algunos tumores sólidos (NSCLC y cáncer de páncreas), Gemcitabina induce la apoptosis por la activación de varias caspasas (caspasa 8 y 3) (Mini *et al.*, 2006).

Kuramitsu et al., 2013, proponen a DDX39 como un posible biomarcador de resistencia, puesto que es una ARN helicasa que ha sido reportada por estar altamente expresada en células tumorales, incluyendo el cáncer pulmonar de células escamosas. DDX39 se encontró altamente regulada en células de cáncer de páncreas que son resistentes a Gemcitabina (KLM1-R), al comparar su expresión en las células sensibles (KLM1).

Gemcitabina ha mostrado carecer de resistencia cruzada con otros agentes anticáncer, por lo tanto representa un buen candidato para la quimioterapia combinada. En modelos *in vitro* e *in vivo* se ha presentado sinergismo con cisplatino, taxanos, trastuzumab, antifolatos, camptotecinas y antraciclinas. Sin embargo, la resistencia y sensibilidad depende del individuo y del tipo de línea celular blanco, puesto se relaciona con los niveles de los metabolitos, los transportadores intracelulares de la droga, enzimas metabolizadoras, enzimas blanco y enzimas involucradas en la apoptosis. El conocimiento de dichos mecanismos de acción de la Gemcitabina nos otorga las bases para seleccionar la droga a combinar y su dosis de tolerancia (Mini *et al.*, 2006).

2.9.4.-Gemcitabina en Politerapias.

La Gemcitabina es considerada como un fármaco muy prometedor por sus diversos mecanismos de acción, sin embargo para disminuir su efecto citotóxico, así como en la búsqueda de un efecto sinérgico, se propuesto incluirla en terapias combinadas con otros fármacos. Pant et al. (2014), combinaron Gemcitabina (1000 mg/m semanalmente durante 3 semanas en ciclos de 28 días) con tivantinib (inhibidor de c-MET) en pacientes con NSCLC, cáncer de ovario, pancreático y colangiocarcinoma, donde se obtuvo una actividad antitumoral temprana.

Zhao et al., 2014, encontraron que la Gemcitabina con dihydroartemisinina (DHA), inducen apoptosis intrínseca mediada por Bak, pérdida de la membrana mitocondrial, activación de las caspasas 3 y 9, además motivo a la apoptosis por la vía extrínseca, activando Fas y caspasa-8.

Gridellic et al. (2014), encontraron un aumento en los días de supervivencia libre de progresión (PFS) al combinar Gemcitabina con vandetanib en NSCLC, además evaluaron supervivencia total (OS), tasa de respuesta (RR), tiempo de respuesta, tasa de control de la enfermedad, tiempo de deterioro y eventos adversos (AEs), sin embargo ninguno de los puntos resultó significativo entre los tratamientos.

Aunque la Gemcitabina es una droga muy efectiva, para su aplicación se deberá considerar la presencia o ausencia de biomarcadores moleculares. Chen et al. (2014), analizaron una serie de polimorfismos relacionados con la farmacocinética de la droga, afectando la supervivencia total y la tasa de respuesta en pacientes con NSCLC avanzado, se analizaron polimorfismos SLC29A3, SULT1E1 y TBXAS1, relacionadas con las enzimas metabolizadoras y transportadores, donde se presentó mayor supervivencia total en pacientes con el genotipo SLC29A3 C/T+T/T, dicho genotipo se puede utilizar como un biomarcador para la selección de terapia.

Gronberg et al. (2013), probaron la combinación con carboplatino en pacientes con NSCLC de células no escamosas avanzados, encontrando que la presencia del factor de transcripción tiroideo (TTF-1) y los bajos niveles de TS están asociados al aumento de la supervivencia total.

Wu et al. (2014), en pacientes asiáticos con NSCLC y mutaciones en EGFR, Gemcitabina (1000 mg/m², día 1 y 8) más cisplatino (75 mg/m², día 1) en un período de 3 semanas por 6 ciclos se obtuvo una supervivencia libre de progresión (PFS) de 5.6 meses, comparado con la PFS de 11 meses encontrada con afatinib.

En la implementación de politerapias es importante considerar la farmacocinética de las drogas, puesto que Damaraju et al. (2014), determinaron que los TKIs (inhibidores de tirosina cinasa), como erlotinib, gefitinib y vandetanib, inhibieron el transporte de uridina y la toma de Gemcitabina en 4 líneas celulares de cáncer pulmonar y páncreas, al reducir la actividad de hENT1, dicha inhibición fue reversible a las 24 horas posteriores de retirar las drogas. Se

observó mayor citotoxicidad al administrar Gemcitabina antes que los TKIs, que al agregarlos juntos. Vandetanib inhibió hENT1, hENT2, hCNT1, hCNT2 y hCNT3, erlotinib suprimió a hENT1 y hCNT3, y gefitinib inhibió a hENT1 y hCNT1.

En cuanto a Gemcitabina combinada con una terapia génica, Khatri *et al.* (2014), utilizaron un ARNi para disminuir los niveles de RRM1 en la línea celular A-549, obteniendo una IC₅₀ 5 veces menor comparado con la droga sola. Esto comprueba que una terapia génica puede quimiosensibilizar a las células cancerígenas en caso de una remisión de cáncer pulmonar.

2.10.-Cisplatino.

Cisplatino (cis-diaminodicloroplatino) es uno de los agentes antineoplásicos utilizados con frecuencia, y usualmente, es administrado combinado con otros agentes antineoplásicos y en etapas avanzadas de los NSCLC, donde el 30% responde al tratamiento y el 70% sufre la toxicidad sin el beneficio de la droga, provocando nefrotoxicidad, ototoxicidad, neuropatía periférica, mielosupresión y reacciones de hipersensibilidad, incluso vómito y náusea (Wittgen et al., 2007). El Cisplatino y análogos basados en platino, se aplican en casos de cáncer de pulmón, ovario, cabeza y cuello, testicular y vejiga, sin embargo, del porcentaje que responde el tratamiento, la mayoría genera resistencia. El Cisplatino se enlaza al ADN para formar enlaces cruzados interhebra e intrahebra entre las bases de purina, provocando una distorsión en la hélice de ADN, la cual es reconocida por el grupo de proteínas de alta movilidad (HMG) y otras proteínas involucradas en la respuesta de daño al ADN. Lo anterior perjudica la replicación y la transcripción, provocando el estancamiento de los anillos de replicación y la formación de rompimientos en la doble hebra.

Varias vías de reparación de ADN, incluyendo MMR (reparación por desajuste) y NER (reparación por escisión de nucleótidos) han sido implicadas en la reparación por Cisplatino y con su resistencia. así como las vías donde se involucra la NF-kB, c-ABL, JNK y p73 (Oliver et al., 2010).

2.11.-Terapia para el Cáncer Pulmonar.

El tratamiento de los pacientes consiste de varias técnicas que son la cirugía, radioterapia y quimioterapia.

Los pacientes con NSCLC confinado al pecho son evaluados para cirugía para remoción del tumor primario (uno de los lóbulos de pulmón o el pulmón entero). Para los pacientes donde ya se ven involucrados los nódulos linfáticos pueden recibir primero quimioterapia, después cirugía o bien una combinación de radio y quimioterapia. Dependiendo del estadio de la enfermedad con la cirugía se puede lograr una sobrevivencia y potencial de cura de un 30-50% Desafortunadamente, la mayoría de los pacientes terminan con metástasis (Bunn, 2001).

Los pacientes con SCLC con enfermedad confinada al pecho, reciben radioterapia de pecho y quimioterapia que comúnmente incluye cisplatino y etopósido y aquellos pacientes en un estadio más avanzado reciben solo quimioterapia con combinaciones de drogas como cisplatino, etopósido, irinotecan, topotecan o plactaxel, los pacientes generalmente sobreviven de 10-16 meses (*Minna et al., 2002*). A su vez, la dosis efectiva de la quimioterapia disminuye la calidad de vida del paciente, provocándole diversos efectos secundarios, como: daño en las células que producen sangre en la médula ósea (neutropenia, leucopenia, trombocitopenia, anemia), daño en los folículos pilosos (caída del cabello), daño en las células de la boca, tracto digestivo y órganos del sistema reproductor (vómito, diarrea), algunos pueden dañar las células del corazón, los riñones, la vejiga, los pulmones y el sistema nervioso.

Por tal motivo, se continúa con la búsqueda de nuevas opciones de terapia, que sean selectivas y/o que requieran dosis efectivas bajas, con la finalidad de dañar las células cancerígenas, y a su vez, evitar o disminuir el daño en las células sanas. Este objetivo se puede lograr con el uso combinado de la terapia génica y la quimioterapia, donde la terapia génica nos brinda la selectividad y la disminución

de la resistencia de las células a la quimioterapia, y a su vez, la quimioterapia nos da el efecto citotóxico en la célula cancerígena.

3.-JUSTIFICACIÓN

El cáncer pulmonar es una de las neoplasias con mayor prevalencia y mortalidad a nivel mundial, presentando una supervivencia a 5 años del 15% y una mortalidad del 90 % en el primer año. En México, ocupa el segundo lugar en cáncer de hombres y mujeres con mayor frecuencia (American Cancer Society, 2016). Por tal motivo, no cesa la búsqueda de tratamientos alternativos eficaces contra el cáncer pulmonar, como la Inhibición de Oncogenes utilizando como estrategia el RNA de Interferencia (RNAi), mediante un complejo constituido por un siRNA y un polímero catiónico Polietilenimina (PEI), donde la PEI es un potente agente de transfección en una gran variedad de líneas celulares y animales. En este proyecto se planteó la utilización de la técnica para el silenciamiento de WT1 combinado con 2 drogas quimioterapéuticas aplicadas en la actualidad, Gemcitabina y Cisplatino, puesto que la terapia génica puede sensibilizar diferentes líneas celulares de carcinoma pulmonar al efecto citotóxico de drogas. Dicha evaluación se realizó *in vitro* para determinar el efecto sinérgico de esta politerapia, con la finalidad de disminuir las dosis efectivas de los fármacos y/o aumentar el efecto citotóxico en las células cancerígenas; a su vez, en un modelo murino con metástasis a pulmón se analizó el efecto de la terapia génica vía aerosol en combinación con las drogas vía intraperitoneal, con la finalidad de llegar específicamente a los tumores y uniformemente a pulmón, incrementando la concentración, farmacocinética y evitando la toxicidad del tratamiento.

4.-HIPÓTESIS

El silenciamiento del gen *w1* mediante ARNi es capaz de potenciar el efecto antiproliferativo de las drogas anticancerígenas *in vitro* en células B16F10 y en un modelo murino con metástasis a pulmón.

5.-OBJETIVOS

5.1.-OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de las drogas antiproliferativas en células B16F10 después del silenciamiento del gen *wtl* mediante ARNi, así como, en un modelo murino con metástasis a pulmón mediante las células B16F10.

5.2.-OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.-Determinar la Concentración Citotóxica (CC50) del ARNi, la Gemcitabina y el Cisplatino en la línea celular de melanoma murino B16F10.
- 2.-Analizar el efecto sinérgico de las combinaciones de los tratamientos: Cisplatino + ARNi-*wtl*, Gemcitabina + ARNi-*wtl*, Cisplatino + Gemcitabina y Cisplatino + Gemcitabina + ARNi-*wtl*, en células B16F10 mediante un Isoblograma.
- 3.-Determinar la expresión del gen *wtl* y del gen antiapoptótico *bcl-2*, posterior a la aplicación de las diferentes combinaciones de tratamientos en la línea celular B16F10 *in vitro* por medio de la técnica de RT-PCR.
- 4.-Detectar la activación de la apoptosis en las células B16F10 sometidas a las diferentes combinaciones de los tratamientos mediante una citometría de flujo.
- 5.-Determinar el efecto en la sobrevivencia de la línea celular B16F10 expuestas a las diferentes combinaciones de tratamientos mediante un ensayo clonogénico.
- 6.- Determinar el efecto antitumoral del ARNi, la Gemcitabina y el Cisplatino en ratones C57BL/6 con metástasis pulmonar
- 7.- Determinar el efecto antitumoral combinacional del ARNi, la Gemcitabina y el Cisplatino en ratones C57BL/6 con metástasis pulmonar
- 8.-Analizar la sobrevivencia de los ratones con inducción de los tumores tratados y no tratados.

6.-METODOLOGÍA.

6.1.-Cultivo celular.

La línea celular que se utilizó en los ensayos fue melanoma murino B16F10, proveniente de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA). Las células fueron incubadas a 37 °C, en una atmósfera con 95% O₂ y 5% CO₂, cultivadas en medio Dulbecco's Eagle's modificado (DMEMF-12) (Life Technologies, Invitrogen, Burlington, Ontario, Canadá), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Grand Island, NY, EUA).

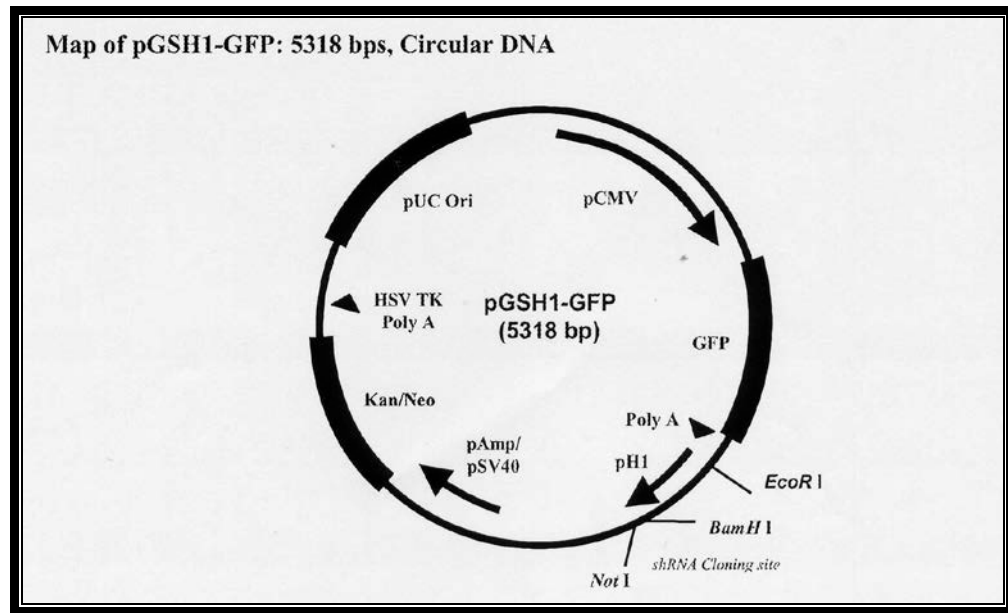
Para control positivo se decidió usar la línea celular humana de leucemia mielógena crónica K562 por tener alta expresión del gen *wt1*, esta línea fue donada por el Instituto de Bioquímica de la UNAM. Dicha línea se cultivó en medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute médium*) con 10% de SFB, incubadas a 37 °C, con 95% O₂ y 5% CO₂.

6.2.-Preparación del ARNi para el silenciamiento del gen *wt1*.

6.2.1.-Obtención del ARNi de Interferencia.

El ARNi utilizado para el silenciamiento de *wt1* está basado en la construcción descrita por Zamora et al. (2009), etiquetada como RNAi-WT1-1. El plásmido portador del ARNi es pGSH1-GFP, el mapa del plásmido se describe en la Figura 8.

A



B

Vector Elements		
Element	Start-End	Description
pCMV	59-808	Human CMV promoter sequence
GFP	843-1500	Green Fluorescent Protein gene sequence
Poly A	1572-1801	Transcription stop and polyadenylation sequence
pH1 promoter	1808-1900	H1 RNA Polymerase III promoter
pAmp/pSV40	2689-3030	Ampicillin and SV40 promoters (in tandem)
Kan/Neo	3152-3942	Kanamycin and Neomycin resistance gene sequence
HSV TK Poly A	4182-4200	HSV Thymidine Kinase polyadenylation signal sequence.
pUC Ori	4531-5174	pUC origin of replication sequence.

Figura 8. Características del plásmido pGSH1-GFP. A, Mapa del plásmido pGSH1-GFP; B, Descripción de los componentes del plásmido pGSH1-GFP.

6.2.2.-Extracción de plásmido a mediana escala.

Para obtener cantidades suficientes del plásmido para las transfecciones en las líneas celulares y para los ensayo *in vivo*, se realizó la purificación del plásmido a mediana escala utilizando el juego de reactivos QIAGEN Plasmid Midi. Las instrucciones se siguieron de acuerdo al inserto provisto por el fabricante.

6.2.3.-Preparación del polímero catiónico polietilenimina (PEI) de 25 kDa para los ensayos de transfección.

Se utilizó el polímero catiónico polietilenimina (PEI) ramificada de 25 KDa (Sigma Aldrich, Milwaukee, IL EUA) para los ensayos de transfección tanto *in vitro* como *in vivo*. La PEI se preparó en NaCl 150 mM y se siguieron las indicaciones del inserto del fabricante para la preparación del complejo PEI/DNA (ARNi-*wt1*).

6.3.-Evaluación del Efecto Sinérgico de la Politerapia con ARNi-*wt1*, Gemcitabina y Cisplatino en células de melanoma murino B16F10.

6.3.1.-Determinación de la Concentración Citotóxica al 50% de los tratamientos.

La Concentración Citotóxica al 50% (CC₅₀) fue evaluada mediante ensayos de viabilidad celular con MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromuro]), en placas de 96 pozos con el 70% de confluencia de células B16F10, donde se agregaron diferentes concentraciones de los siguientes tratamientos:

Tratamiento	Concentraciones
ARNi- <i>wt1</i>	PEI, 100, 300, 500, 700 y 900 ng
Cisplatino	2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 ng/μl
Gemcitabina	0.5, 1, 5, 10, 50 y 100 pg/μl

Los ensayos se detuvieron a las 48 horas y se prosiguió con el ensayo de MTT; para este ensayo, se adicionaron 20 μl a cada pozo de una solución de MTT a una concentración de 5 μg/ml en PBS 1X. Las placas se incubaron a 37 °C por 1h, después el medio fue removido y se adicionaron 100 μl de DMSO por pozo, finalmente, se tomó lectura a 570nm en un lector de microplacas.

La obtención de la CC50 teórica de cada tratamiento fue obtenida de acuerdo a lo señalado a Palomeque Et al.

Posteriormente, se utilizó la concentración CC₅₀ obtenida del ARNi-*wt1* como base en los ensayos de células B16F10 transfectadas y sometidas a diferentes concentraciones de Cisplatino y Gemcitabina, por separado, para obtener la CC₅₀ teórica de cada droga en combinación con el ARNi-*wt1*. A continuación se describen los tratamientos probados:

Tabla 2. Tratamientos aplicados en células B16F10 para la obtención de la DL50.			
Combinación de Tratamientos	Tratamiento	Concentraciones	Tiempo de aplicación
RNAi- <i>wt1</i> + Cisplatino	RNAi- <i>wt1</i>	700 ng	0 h
	Cisplatino	1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 ng/ μ l	24 h
RNAi- <i>wt1</i> + Gemcitabina	RNAi- <i>wt1</i>	700 ng	0 h
	Gemcitabina	0.5, 1, 5, 10, 50 y 100 pg/ μ l	24 h

Los ensayos se detuvieron a las 48 horas y la viabilidad se analizó mediante un ensayo de MTT, como se describió anteriormente.

Las pruebas se realizaron por triplicado adicionando en la gráfica de resultados el error estándar.

6.3.2.-Evaluación de las Combinaciones de los tratamientos con ARNi-*wt1*, Gemcitabina y Cisplatino en células B16F10.

El efecto de la combinación de ARNi-*wt1*, Cisplatino y Gemcitabina fue evaluado mediante ensayos de viabilidad celular con MTT, en células B16F10 sometidas a las diferentes combinaciones de tratamientos: Cisplatino + Gemcitabina y ARNi-*wt1* + Cisplatino + Gemcitabina. Cada combinación fue evaluada a diferentes concentraciones citotóxicas debajo del 50% (CC12.5%, CC25% y CC37.5%), como se describe en la Tabla 2. El efecto sinérgico fue calculado mediante el programa informático CompuSyn, señalado por Morán-Santibañez, et al. 2016. El valor de CC menor a 0.9, indica la presencia de sinergia, valores de 0.9 a 1.1 indica efecto aditivo, y valores mayores a 1.1 indican un efecto aditivo.

6.4.-RT-PCR para la determinación de la expresión de *wt1* y *bcl-2*.

6.4.1.-Obtención de las pastillas celulares para extracción de ARN.

Se obtuvieron pastillas celulares de B16F10 cultivadas en cajas de 25 cm² con las DL50 de los tratamientos y sus combinaciones. Las células se disgregaron utilizando 1ml de Tripsina-EDTA (ácido diaminotetracético) al 0.5% y se incubaron por 1 min, posteriormente se eliminó la tripsina-EDTA y se agregó PBS 1X para desprenderlas. Las células fueron transferidas a viales de 1.5 ml y se centrifugaron a 3000 r.p.m. para obtener las pastillas celulares.

6.4.2.-Extracción de ARN.

Las pastillas celulares se lisaron con 1 ml de trizol e incubaron por 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 200 µl de cloroformo, se agitaron vigorosamente por 15 segundos y la mezcla se centrifugó a 12,000 g por 5 min a 4°C. Después se tomó la fase acuosa, donde se encuentra el ARN, y se precipitó en un vial de 1.5. ml con 0.6 volúmenes de isopropanol. A continuación, se lavó el paquete de ARN obtenido con etanol al 70% y se disolvió la pastilla con agua DEPC (dietilpirocarbonato) para después ser almacenados a -70° C.

6.4.3.-Síntesis del DNA complementario (DNAc).

Se utilizaron 5 µg de ARN, 1 µl de oligo dT 0.5mg/ul y 1ul de una mezcla de dNTP 10mM; después, la reacción se llevó a un volumen de 12 µl con agua DEPC, se incubó a 65°C por 5 min, e inmediatamente se colocó en hielo; posteriormente, se adicionaron 4 µl de Buffer First Strand 5x, 2 µl de DTT 0.1M, 1µl de Inhibidor de Ribonucleasa y 1µl de Superscript RT 1 u/µl, para ser después incubada la reacción a 42°C por 50 min y se inactivó a 70°C por 15 min.

6.4.4.-PCR convencional de *wt1* y *bcl-2*.

El diseño de los oligos utilizados para analizar la expresión total de *wt1*, *bcl-2* y *β-actina* se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligos utilizados en la RT-PCR.

Gen	Secuencia Río Arriba	Secuencia Río Abajo	Proveedor
	5'-	3'-	
<i>wt1</i>	AACGCCCTTCATGTGTGC-	GCTGGTCTGAACGAGAAAACCT	Invitrogen
	3'	TC-5'	
<i>bcl-2</i>	Juego de reactivos MPCR Kit for Mouse Apoptotic Genes Set-1.		Maxim Biotech, Inc.
	5'-	5'-	
<i>g3pdh</i>	GTGGGGCGCCCCAGGCACC	GTCCTTAATGTCACGCOACGATTTC	Invitrogen
	A-3'	-3	

Las mezclas de reactivos aplicadas para cada gen se indican en la Tabla 4 .

Tabla 4. Mezclas de Reactivos para la PCR convencional.

Reactivo	<i>wt1</i> (μ l)	<i>bcl-2</i> (μ l)	<i>g3pdh</i> (μ l)
Agua grado molecular	19	De acuerdo al inserto del Juego de reactivos <i>MPCR Kit for Mouse Apoptotic Genes Set-1, Maxim Biotech, Inc.</i>	18
Buffer 10x	2.5		2.5
MgCl ₂ (25 mM)	0.75		0.75
dNTPs (10 mM)	0.5		0.5
Secuencia Río Arriba	0.5 (50 ng/ μ l)		1 (100 ng/ μ l)
Secuencia Río Abajo	0.5 (50 ng/ μ l)		1 (100 ng/ μ l)
Taq Polimerasa (1 U/ μ l)	0.25		0.25
ADN problema (10 ng)	1		1

Los protocolos aplicados en la PCR convencional se describen en la Tabla 5, utilizando un termociclador.

Tabla 5 . Protocolos de la PCR.

Gen	<i>wt1</i>		<i>bcl-2</i>		<i>g3pdh</i>	
Parámetros	°C	Tiempo	°C	Tiempo	°C	Tiempo
Desnaturalización	94	3 min	De acuerdo al inserto del Juego de reactivos <i>MPCR Kit for Mouse Apoptotic Genes Set-1, Maxim Biotech, Inc.</i>		95	4 min
Hibridación	96	40 seg			94	45 seg
	64	30 seg			64	30 seg
	72	40 seg			72	1.5 min
(No. de ciclos)	35				35	
Elongación	72	10 min			72	10 min

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y fueron teñidos con bromuro de etidio para ser visualizados bajo la luz UV de un transiluminador.

6.5.-Determinación de apoptosis por medio de citometría de flujo usando anexina y yoduro de propidio.

La citometría de flujo fue empleada para dilucidar el tipo de muerte celular, para ello se sembraron 4×10^4 células por pozo en placas de 24 pozos, dejando que las células se adhirieran al plástico, incubando 24 h a 37°C. Pasado dicho periodo, las placas se expusieron a las diferentes combinaciones de tratamientos (RNAi-wt1, Gemcitabina y Cisplatino) con las concentraciones obtenidas en el ensayo de isoblograma. El tiempo de la exposición fue a diferentes horas (24, 48 y 72 h), pasando los respectivos tiempos se recuperaron los sobrenadantes en tubos eppendorf, agregando 150µL de PBS 1X estéril a modo de lavado, posteriormente se agregaron 100µL tripsina dejándola por 2min y se neutralizó con 200 µL de medio DMEM, tomando todo en el tubo eppendorf, seguido de un lavado extra con PBS1X. Una vez que se recuperaron todas las células, se centrifugaron a 1,600rpm por 15min, se desechó el sobrenadante con ayuda de la micropipeta, y al pellet se le agrega una mezcla de Anexina-APC (0.25 µL) más Yoduro de propidio (0.5 µg/mL) en 100 µL de Buffer de unión (HEPES 10mM pH 7.4, NaCl 140mM, Ca₂Cl 2.5mM, filtrado y almacenado a 4°C) por muestra. Posteriormente, se incubó en oscuridad a 4°C durante 20min, y por último se leyó en el citómetro de flujo (Accuri C6 BD) y se analizó con el software proporcionado por la compañía Becton Dickinson. Cabe mencionar que los experimentos se realizaron por triplicado y se graficaron con su desviación estándar.

6.6.-Ensayo Clonogénico.

Se sembraron 100 células de la línea B16F10 por pozo en una placa de 6 para los controles, y 500 células para ser retadas con los tratamientos. Se dejaron incubar a condiciones previamente descritas por 24 h, pasado el tiempo se retiró el medio y se adicionaron 2 mL medio fresco con las diferentes combinaciones de Gemcitabina, Cisplatino y ARNi-*wt1*, utilizando las concentraciones obtenidas en el ensayo de isoblograma, y se incubó por 24 h. Posteriormente se retiró el medio con tratamiento, se agregaron 3 mL de medio nuevo y se dejó incubar por 8 días a 37°C en una atmósfera de humedad al 50% y CO₂ al 5%, revisando el crecimiento de las células cada 48h. Concluyendo el octavo día, se retiró el medio y se fijaron las células con 0.5 mL de Metanol:Ácido acético (3:1), dejándose incubar a -20°C durante 30min. Después se retiró el metanol:ácido acético, se lavó la placa con 1 mL de PBS1X, se retiró el buffer y se adicionó 1mL del colorante cristal violeta, incubándose a 37°C durante 4 h. Pasando el tiempo de incubación, se retiró el tinte y fueron realizados 3 lavados con PBS1X para quitar el exceso de cristal violeta. A continuación se procedió a contar cada colonia, considerando una colonia a un grupo de más de 50 células.

6.7.-Evaluación del Efecto de las Diferentes Combinaciones de Tratamientos con ARNi-*wt1*, Gemcitabina y Cisplatino, en un Modelo Murino con Metástasis Pulmonar con las Células B16F10.

6.7.1.-Material biológico.

Se utilizaron hembras de la cepa C57/BL6, de 7 a 8 semanas de edad (20-25g) obtenidas de Harlan México (México, D.F.). Los animales se mantuvieron en un ciclo de 12 horas luz - 12 horas oscuridad y fueron alimentaron con una dieta balanceada para roedores.

6.7.2.-Aplicación de tratamientos en el modelo murino con inducción a metástasis pulmonar.

En el establecimiento de la metástasis en ratones C57/BL6, se administraron 5×10^5 de células B16F10 vía intravenosa (día 0), a 5 ratones por grupo, de acuerdo a lo reportado por Zamora et al. (2009). A partir del día 2 se inició la aplicación de los tratamientos de acuerdo a la tabla 7 mostrada a continuación:

Grupos por Tratamiento	Tratamiento	Concentraciones	Vía de Administración	Día de Administración
RNAi- <i>wt1</i>	RNAi- <i>wt1</i>	25 µg	Aerosol	2, 8 y 14
Gemcitabina	Gemcitabina	60 mg/kg	Intraperitoneal	3 y 9
Cisplatino	Cisplatino	3 mg/kg	Intraperitoneal	3 y 9
Gemcitabina + Cisplatino	Gemcitabina	60 mg/kg	Intraperitoneal	3 y 9
	Cisplatino	3 mg/kg	Intraperitoneal	4 y 10
RNAi- <i>wt1</i> + Gemcitabina	RNAi- <i>wt1</i>	25 µg	Aerosol	2, 8 y 14
	Gemcitabina	60 mg/kg	Intraperitoneal	3 y 9
RNAi- <i>wt1</i> + Cisplatino	RNAi- <i>wt1</i>	25 µg	Aerosol	2, 8 y 14
	Cisplatino	3 mg/kg	Intraperitoneal	3 y 9
RNAi- <i>wt1</i> + Gemcitabina + Cisplatino	RNAi- <i>wt1</i>	25 µg	Aerosol	2, 8 y 14
	Gemcitabina	60 mg/kg	Intraperitoneal	3 y 9
	Cisplatino	3 mg/kg	Intraperitoneal	4 y 10

6.7.3.-Evaluación del ensayo in vivo.

Los ratones fueron monitoreados hasta su fallecimiento, reportando el número de días de sobrevivencia en cada grupo y la diferencia de peso; aunado a esto, se les realizó una necropsia, donde se tomaron los siguientes valores de acuerdo al examen físico:

Valor	Descripción
1	Menos de 10 focos tumorales.
2	Entre 10-100 focos tumorales.
3	Uno de los lóbulos pulmonares está lleno de tumor.
4	Ambos lóbulos pulmonares llenos de tumor.
5	Pulmones llenos de tumor y éste crece fuera de los pulmones a la cavidad torácica.

Los resultados *in vivo* se analizaron por ANOVA y por la prueba de Mann Whitney.

7.-RESULTADOS

7.1.-Preparación del ARNi para el silenciamiento del gen wt1.

Se realizó la extracción del plásmido pGSH1-GFP portando el ARNi para el silenciamiento del gen wt1 (ARNi-*wt1*), de un cultivo bacteriano de *Escherichia coli* DH5 α con el kit de Quiagen a mediana escala, obteniendo una producción de 7.64 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, el cual se diluyó en agua grado molecular para obtener la concentración deseada para los tratamientos.

7.2.-Concentración Citotóxica al 50% de los tratamientos.

La Concentración Citotóxica al 50% (CC₅₀) fue obtenida mediante ensayos de viabilidad celular con MTT, en células de melanoma murino B16F10 sometidas a los diferentes tratamientos y concentraciones por separado: ARNi-*wt1*, Cisplatino y Gemcitabina.

La línea celular B16F10 se utilizó en este proyecto por su alta expresión del gen *wt1*, el cual se desea silenciar con el ARNi-*wt1*, además, tienen la capacidad de inducir metástasis pulmonar en el modelo murino con ratones de la cepa C57/BL6, dicho modelo se aplicó en el ensayo *in vivo* de este proyecto.

Primeramente, se realizaron los ensayos de transfección las células B16F10 con el plásmido RNAi-WT1 para determinar su integridad y funcionalidad ya que este plásmido se caracteriza por la producción de la proteína verde fluorescente (GFP) como se observa en la figura 9 A y B y la expresión del RNA de interferencia contra el gen WT1 se manifiesta con muerte celular en las B16F10, y para determinar el CC50 teórica del ARNi-*wt.1*

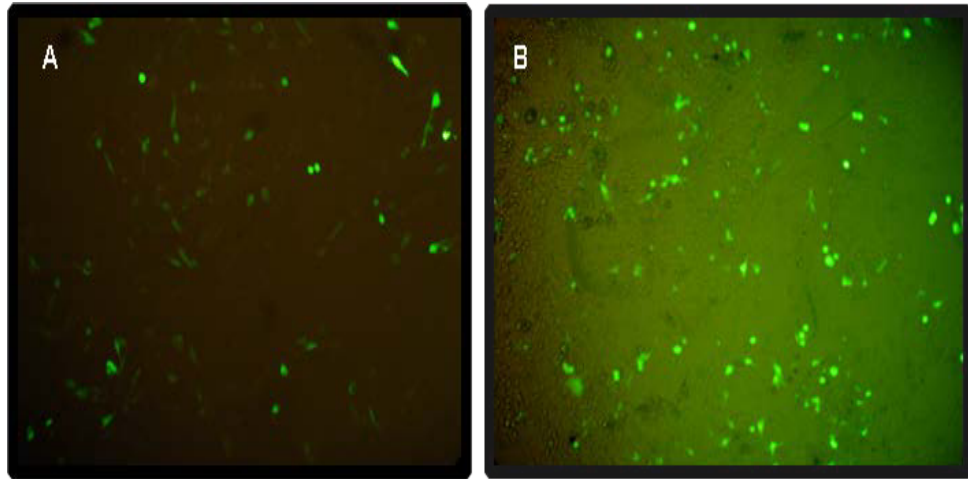
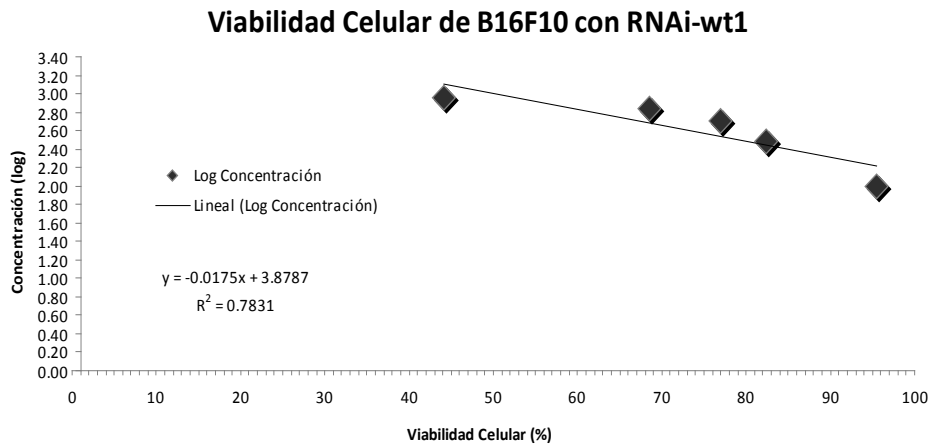


Figura 9. Células B16F10 transfectadas el plásmido pGSH1-GFP portador del ARNi-*wt1*. A), Tratamiento a las 24 horas; B), tratamiento a las 48 horas.

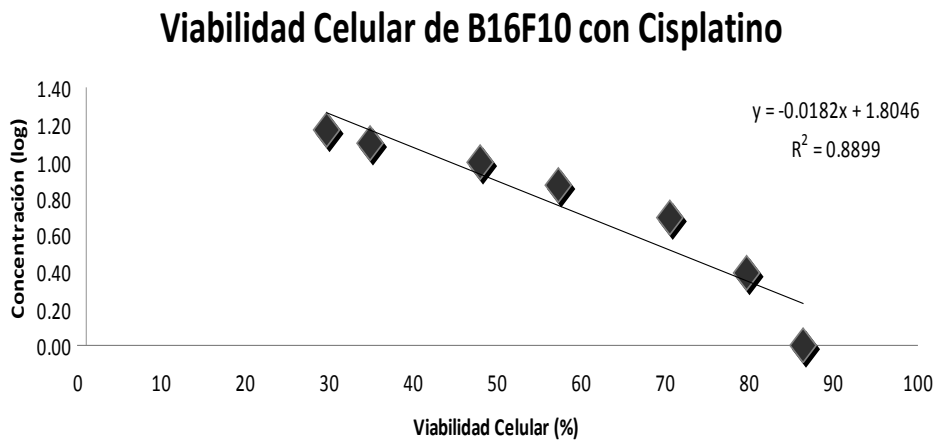
Las CC50 teóricas para cada tratamiento se determinaron mediante el cálculo mostrado en la Tabla 8, donde los datos para la fórmula $\log 50 = m(50) + b$ se obtienen a partir de la fórmula arrojada por los gráficos logarítmicos $y = mx + b$ (figura 10 A, B y C). Las CC50 teóricas obtenidas fueron: ARNi-*wt1*, 8 ng/ μ l; Cisplatino, 8000 pg/ μ l; y Gemcitabina, 50 pg/ μ l.

Tabla 8. Cálculos para la obtención de la CC50 teórica de los tratamientos en células B16F10.			
Tratamiento	Log CC50 = (m(50)) + b	CC50 (Potencia base 10 de Log CC50)	Unidades
ARNi-<i>wt1</i>	3.0037	10	ng/ μ l
Cisplatino	0.8946	8000	pg/ μ l
Gemcitabina	1.7044	50	pg/ μ l
Cisplatino + ARNi-<i>wt1</i>	0.3808	2400	pg/ μ l
Gemcitabina + ARNi-<i>wt1</i>	0.865	7.4	pg/ μ l

A



B



C

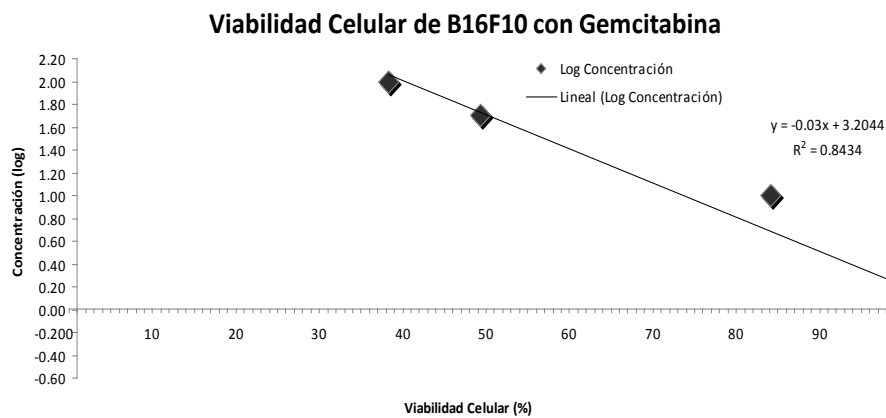
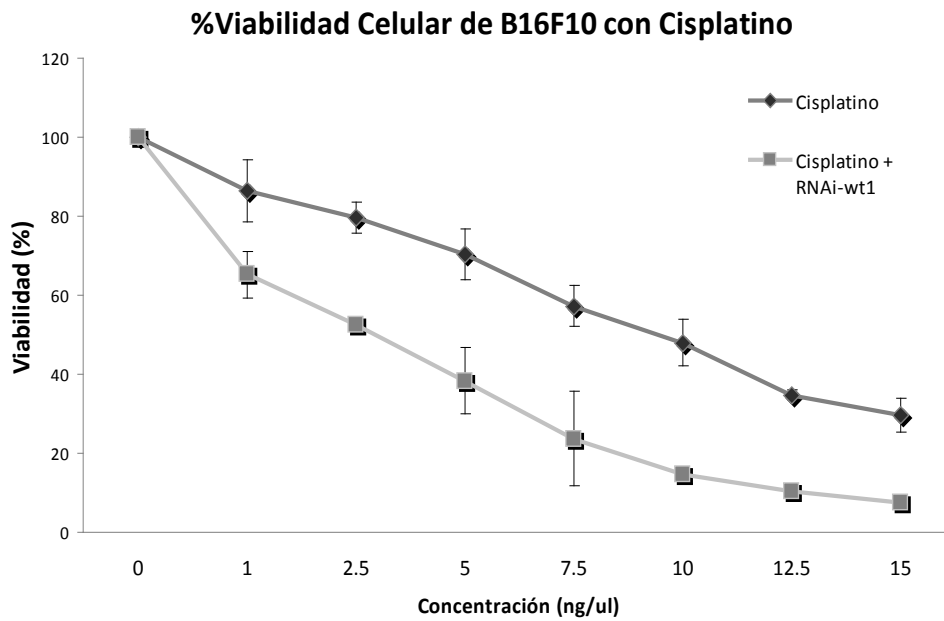


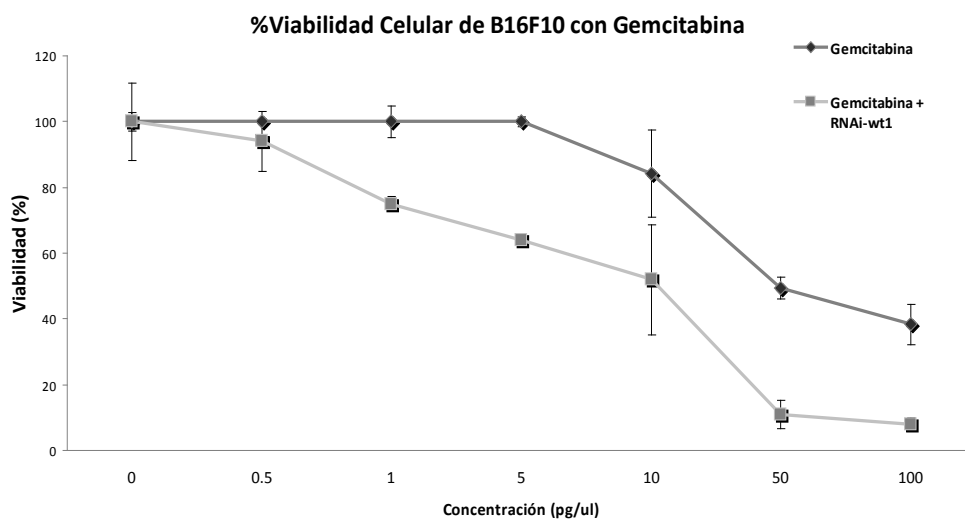
Figura 10. Gráficos de la viabilidad de células de melanoma murino B16F10 expuestas a diferentes concentraciones de tratamientos (concentraciones logarítmicas): A) *ARNi-wt1*, B) Cisplatino y C) Gemcitabina.

Posteriormente, se utilizó la concentración obtenida del ARNi-*wt1* como base en los ensayos de células B16F10 transfectadas con 8 ng/μl, y sometidas a diferentes concentraciones de Cisplatino y Gemcitabina, por separado, para obtener la CC₅₀ teórica de cada droga en combinación con el ARN-*wt1*, las cuales fueron: Cisplatino + ARNi-*wt1*, 2400 pg/μl; y Gemcitabina + ARNi-*wt1*, 7.4 pg/μl (Tabla 8 y Figura 11 A y B).

A



B



C

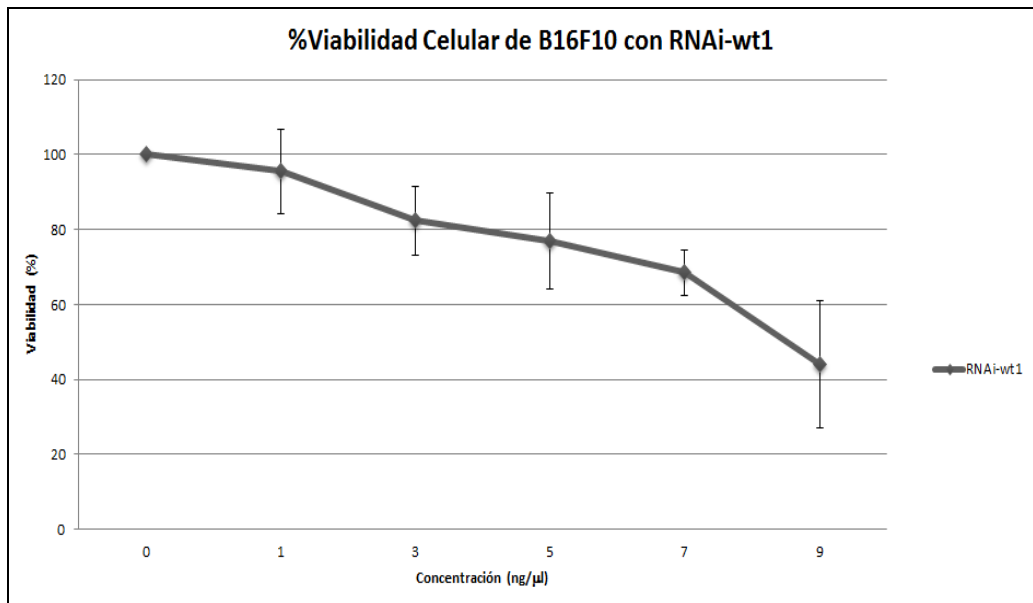


Figura 11. Gráficos de viabilidad de la línea celular de melanoma murino B16F10 transfectadas con ARN-*wt1* y expuestas a diferentes concentraciones de las drogas quimioterapéuticas: a) Cisplatino y Cisplatino + *ARNi-wt1*, b) Gemcitabina y Gemcitabina + *ARNi-wt1*, y c) *ARNi-wt1*.

Las CC_{50} teóricas obtenidas, fueron utilizadas en la obtención del isoblograma para determinar el efecto sinérgico de las diferentes combinaciones de concentraciones de las drogas.

7.3.-Evaluación de la sinergia en la combinación de tratamientos in vitro.

El efecto en la combinación de las drogas quimioterapéuticas Cisplatino y Gemcitabina, en células B16F10 fue analizado, cada tratamiento fue probado a diferentes concentraciones correspondientes a las CC al 12.5, 25 y 37.5%. $C_{12.5}$, C_{25} y $C_{37.5}$ corresponden a la $CC_{12.5}$, CC_{25} y $CC_{37.5}$ de Cisplatino, y las $G_{12.5}$, G_{25} y $G_{37.5}$ se refieren a las CC de Gemcitabina, respectivamente (Tabla 9). En la evaluación del efecto combinacional basada en la ecuación del efecto de la mediana y el isoblograma normalizado (Figura12), mediante el programa informático CompuSyn, se determinó la presencia de efecto sinérgico en las 3 combinaciones de Gemcitabina y Cisplatino. El mejor efecto citotóxico fue encontrado en la combinación $C_{25} - G_{25}$.

Posteriormente, se determinó el efecto de la combinación de Cisplatino y Gemcitabina en células B16F10 transfectadas con de ARNi-*wt1* (8 ng/ μ l). En este ensayo, también cada droga fue probada a diferentes concentraciones: CC al 12.5, 25 y 37.5%. $CC_{12.5}$, CC_{25} y $CC_{37.5}$ corresponden a la $CR_{12.5}$, CR_{25} y $CR_{37.5}$ de Cisplatino encontrada en células sometidas previamente a ARNi-*wt1*, y las $GR_{12.5}$, GR_{25} y $GR_{37.5}$ se refieren a las CC de Gemcitabina en células sometidas a ARNi-*wt1*, respectivamente (Tabla 10). En la evaluación del efecto combinacional basada en la ecuación de la mediana y el isoblograma normalizado (Figura 13), mediante el programa informático CompuSyn, se determinó la presencia de efecto sinérgico en las 3 combinaciones de Gemcitabina y Cisplatino en células B16F10 transfectadas con ARNi-*wt1*. El mejor efecto citotóxico fue encontrado en la combinación $CR_{25} - GR_{25}$.

Tabla 9. Evaluación del efecto de la combinación del ARNi-wt1 con drogas quimioterapéuticas (Cisplatino y Gemcitabina) en células de melanoma murino B16F10.

Combinación de Tratamientos	Dosis de Cisplatino (pg/ μ l)	Dosis de Gemcitabina (pg/ μ l)	Total de la Dosis (pg/ μ l)	Desviación Estándar	Concentración Citolóxica	Efecto
C_{37.5} - G_{12.5}	6000	12.5	6012.5	3.9	69.93	Sinergismo
C₂₅ - G₂₅	4000	25	4025	2.1	86.13	Sinergismo
C_{12.5} - G_{37.5}	2000	37.5	2037.5	5.4	73.65	Sinergismo
CR_{37.5} - GR_{12.5}	1800	1.9	1801.9	6.6	87.75	Sinergismo
CR₂₅ - GR₂₅	1200	3.7	1203.7	3.0	98.21	Sinergismo
CR_{12.5} - GR_{37.5}	600	5.5	605.5	7.3	80.03	Sinergismo

C = Cisplatino, G = Gemcitabina, ARNi-wt1= ARN de interferencia contra wt1, CR =Cisplatino en células sometidas a ARNi-wt1, GR = Gemcitabina en células sometidas a ARNi-wt1, pg/ μ l = picogramo por microlitro.

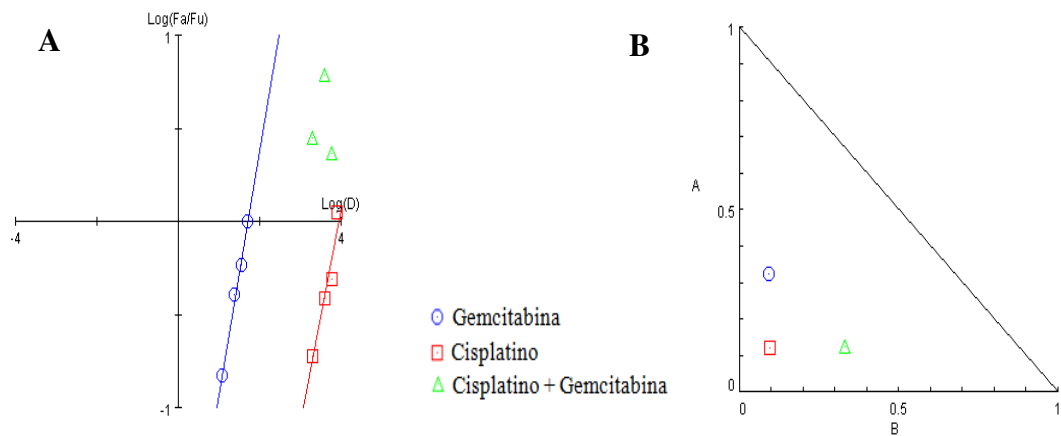


Figura 12. Gráficos de las combinaciones de tratamientos de las drogas quimioterapéuticas Cisplatino y Gemcitabina, mediante el programa informático CompuSyn. A) Gráfico del efecto de la mediana de las combinaciones: *Fa*, fracción afectada; *Fu*, fracción no afectada; *D*, concentración utilizada. B) Isoblograma normalizado: los valores de la CC representados por puntos por debajo de las líneas, indican sinergismo.

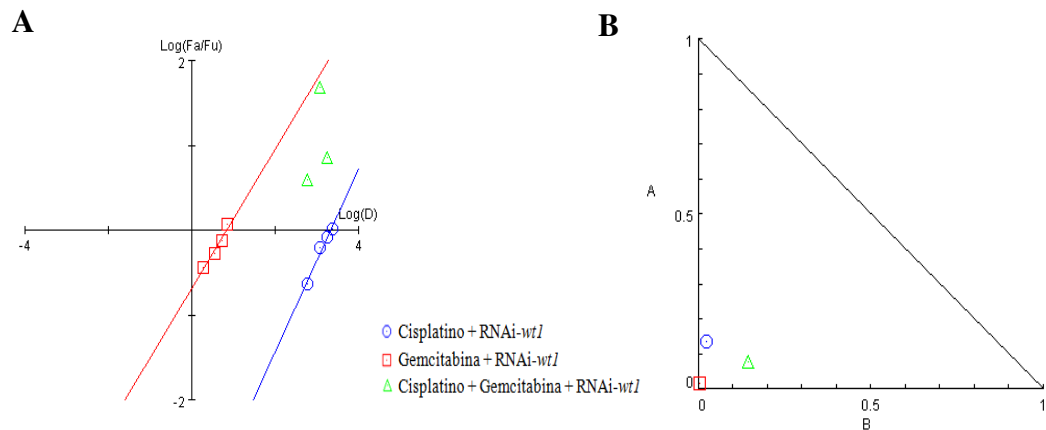


Figura 13. Gráficos de las combinaciones de tratamientos de ARNi-*wt1* y de las drogas quimioterapéuticas Cisplatino y Gemcitabina, mediante el programa informático CompuSyn. A) Gráfico del efecto de la mediana de las combinaciones: *Fa*, fracción afectada; *Fu*, fracción no afectada; *D*, concentración utilizada. B) Isoblograma normalizado: los valores de la CC representados por puntos por debajo de las líneas, indican sinergismo.

Las combinaciones con mejor efecto sinérgico, fueron seleccionadas para los ensayos de PCR convencional para evaluar la expresión del gen *wt1* y el gen apoptótico *bcl-2*.

7.4.- Determinación de la expresión de *wt1* y *bcl-2* en células BCL16 tratadas con ARNi-*wt1* y/o cisplatino y/o gemcitabina

Se obtuvieron pastillas celulares de la línea celular B16F10 expuestas a las CC50 de los tratamientos de ARNi-*wt1*, Gemcitabina, Cisplatino, Gemcitabina + ARNi-*wt1*, Cisplatino + ARNi-*wt1*, así como la combinación de tratamientos con mejor efecto sinérgico, C₂₅ – G₂₅ y CR₂₅ – GR₂₅; la exposición de las células a los tratamientos fue de 24 horas. Mediante PCR convencional, se evaluó la expresión del gen WT1 y del gen antiapoptótico *bcl-2*, donde se observó una disminución en la expresión de *wt1* en los tratamientos con ARNi-*wt1*, Cisplatino + ARNi-*wt1*, CR₂₅ – GR₂₅, sin embargo se encontró mayor expresión en los tratamientos con Gemcitabina, Gemcitabina + ARNi-*wt1*, C₂₅ – G₂₅. En la determinación de la expresión de *bcl-2*, se observó menor expresión en los tratamientos con ARNi-*wt1* y Cisplatino y una fuerte disminución en Cisplatino + ARNi-*wt1*, CR₂₅ – GR₂₅ y Gemcitabina + ARNi-*wt1* (figura 14).

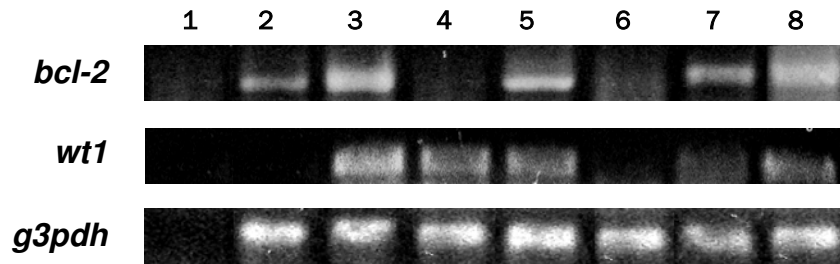


Figura 14. Expresión del gen *bcl-2* (235 pb), gen *wt1* (120 pb) y gen constitutivo *g3pdh* (452 pb) en células B16F10 expuestas a diferentes tratamientos: (1) control negativo de la PCR (agua), (2) ARNi de *wt1*, (3) gemcitabina, (4) ARNi de *wt1* con gemcitabina, (5) cisplatino con gemcitabina, (6) ARNi de *wt1* con cisplatino y gemcitabina, (7) células B16F10 sin tratamiento, (8) células K562 sin tratamiento.

7.5. Incremento de apoptosis en células tratadas con los compuestos.

Para determinar si la combinación de shRNA-WT1, gemcitabina y cisplatino, induce apoptosis, se utilizó la citometría de flujo mediante anexina-V-FITC y yoduro de propidio (PI) dual. El ensayo puso de manifiesto que la tasas de apoptosis aumentó el 14,8% en las células tratadas con las células shRNA-WT1, a comparación con el 1,9% del control, mientras que en las células tratadas con gemcitabina y cisplatino, presentaron yoduro de propidio de 7,9% y 9,3%, respectivamente, pero no para anexina V; sin embargo, en la combinación de drogas con shRNA-WT1, se observa una disminución de la viabilidad celular por apoptosis del 21,2% en shRNA-WT1 / gen, 18% en shRNA-WT1cis y 22% en shRNA-WT1 / GEN / cis (Figura 15). La combinación de shRNA-WT1 y el fármaco mostró muy poca tinción con yoduro de propidio, lo cual indica un patrón de cambio de muerte celular a comparación del fármaco solo.

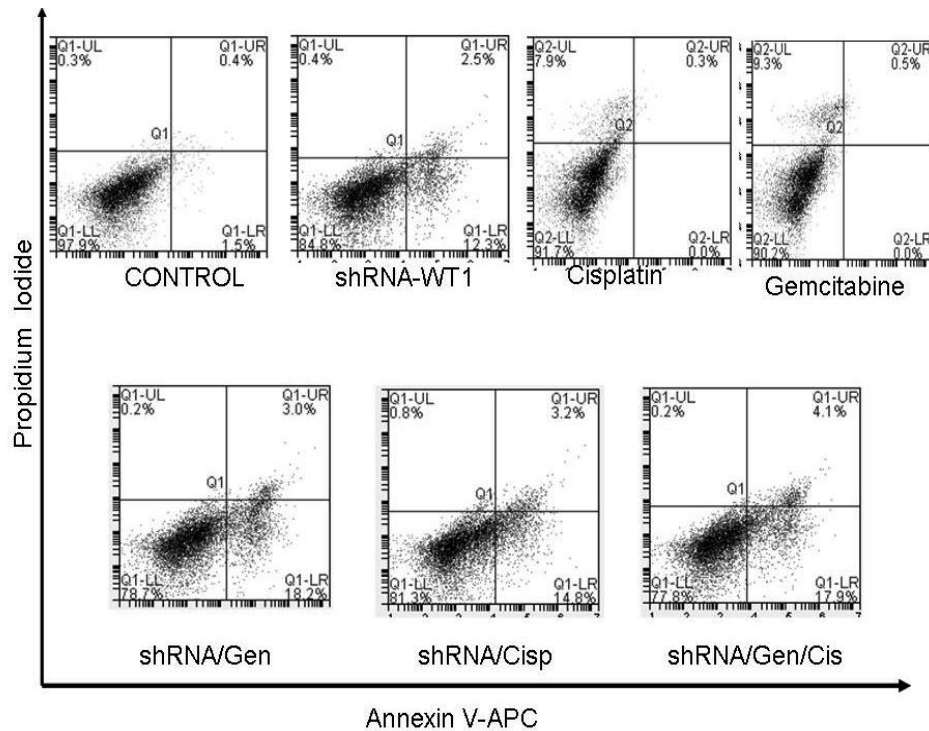


Figura.15 Determinación de apoptosis por medio de citometría de flujo

7.6.-Efecto de los Tratamientos en la Supervivencia Mediante un Ensayo Clonogénico.

El ensayo clonogénico o ensayo de formación de colonias, se usa para evaluar efectos de radiación o quimioterapia, con el objetivo de evaluar si una célula es capaz de dividirse y formar una colonia, luego de haber sido expuesta a un tratamiento. Es una técnica sencilla, reproducible y para la selección de nuevos agentes quimioterapéuticos; además, se correlación con los ensayos de viabilidad del MTT.

Al terminar el tiempo de incubación, se realizó el conteo de colonias de las células B16F10 fijadas y posteriormente se tiñeron con cristal violeta, las cuales, con anterioridad, fueron tratadas con ARNi-*wt1*, ARNi-*wt1* + Gemcitabina, ARNi-*wt1* + Cisplatino y ARNi-*wt1* + Gemcitabina + Cisplatino, donde se observó una disminución drástica en los diferentes tratamientos con respecto a las células no tratadas, como se observa en la figura 16.

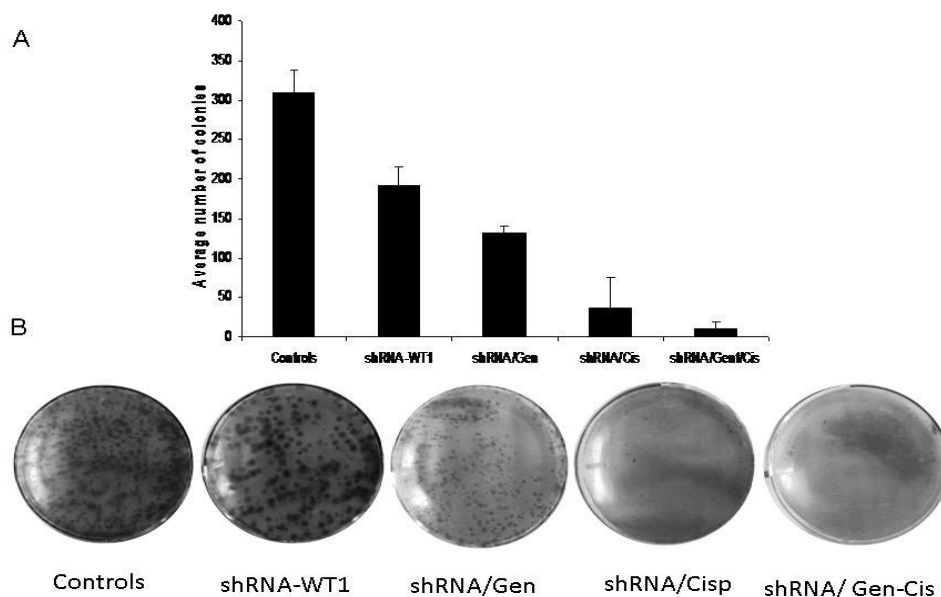


Figura 16. Ensayo clonogénico. A) Gráfico del promedio del número de colonias en cada tratamiento aplicado en las células B16F10. B) El ensayo muestra los efectos a largo plazo de la combinación de los tratamientos de las células de melanoma murino B16F10 expuestas a un ARNi para el silenciamiento del gen wt1, en combinación con las drogas quimioterapéuticas, Gemcitabina y Cisplatino.

7.7.-Evaluación de la supervivencia de los ratones C57/BL6 tratados con las diferentes combinaciones de terapias.

Se realizaron los ensayos *in vivo* en ratones cepa C57/BL6 tratados con las diferentes combinaciones de las terapias con ARNi-*wt1*, Gemcitabina y Cisplatino. Los ratones presentaron un peso inicial promedio de 20 g y fueron inyectados con 5×10^5 de células B16F10 vía intravenosa en la vena caudal. Los ratones se trataron durante 14 días, con 3 aplicaciones de 25µg ARNi-*wt1* vía aerosol, 2 aplicaciones de 60 mg/kg Gemcitabina vía intraperitoneal y 2 aplicaciones de 3 mg/kg de Cisplatino también por vía intraperitoneal, el esquema de tratamiento se describe acuerdo al grupo de estudio en la tabla 6, el monitoreo de pesos de los ratones se realizó un durante el tiempo que duro el experimento, el peso final promedio se muestra en la figura 17, presentándose una notable pérdida de peso en los grupos de ratones con los tratamientos con Gemcitabina sola y combinada con ARNi-*wt1*, en un 33.59% y 39.06%, respectivamente. También se pudo observar que estos grupos de ratones eran los mas afectados en su estado físico como se puede ver en la figura 18.

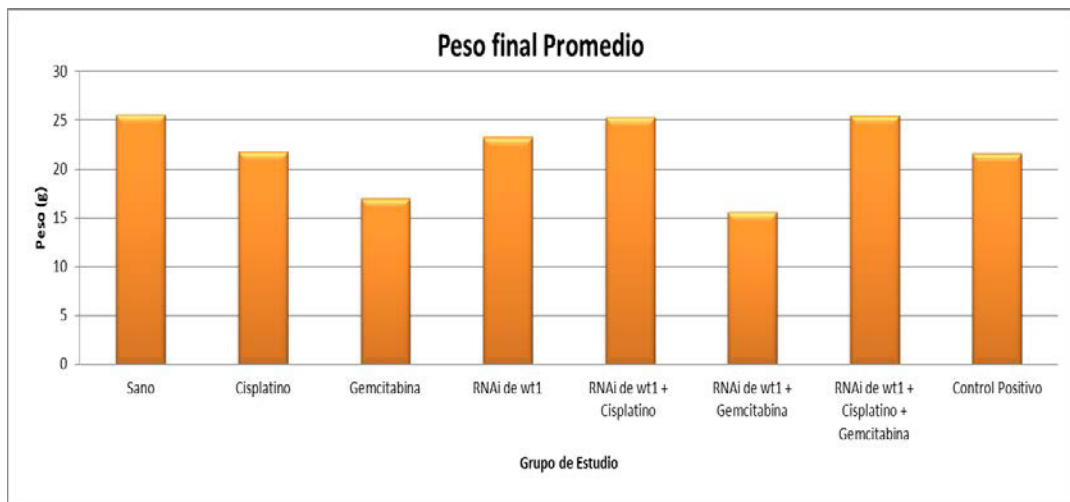


Figura 17. Gráfica del peso final promedio de los grupos de ratones C57/BL6, sometidos a los diferentes tratamientos de ARNi-*wt1*, Gemcitabina y Cisplatino.

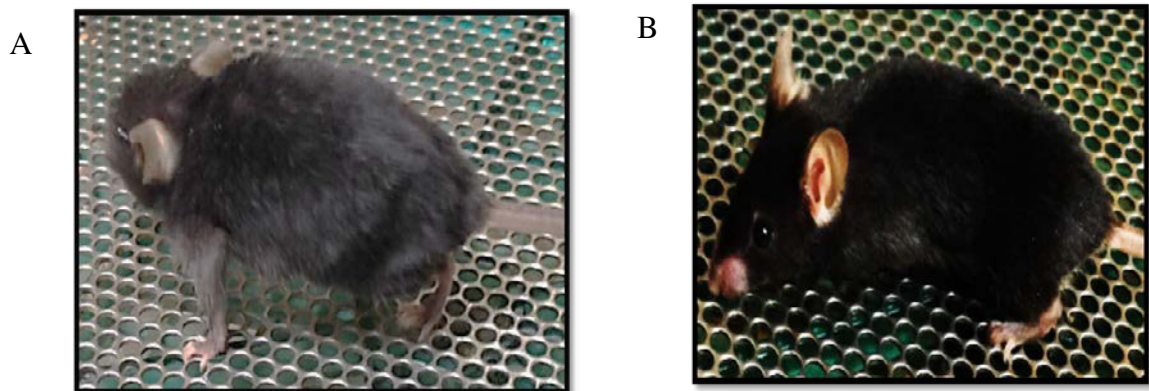


Figura. 18. Ratones C57/BL6 con inducción a metástasis pulmonar con la línea celular de melanoma murino B16F10 en el día 20 del tratamiento. A) Ratón con tratamiento Gemcitabina. B) Ratón con tratamiento RNAi + Cisplatino + Gemcitabina.

7.7.1 Curva de supervivencia

En la determinación del tiempo de supervivencia, los ratones tratados con cualquiera de los diferentes tratamientos presentaron un mayor porcentaje de supervivencia comparado con el grupo control sin tratamiento, así como en el periodo de tiempo de supervivencia, en comparación de los ratones no tratados. La figura 18 nos muestra la curva de supervivencia, se grafican los días (31 días que duro el experimento) de supervivencia contra el número de ratones sobrevivientes, donde se observa el 100% de supervivencia en los grupo tratados con las drogas solas y con la combinación de las dos drogas y ARNi-*wt1* y la combinación + Cisplatino + Gemcitabina, el 80 % del grupo control sin tratamiento murieron a los 31 días

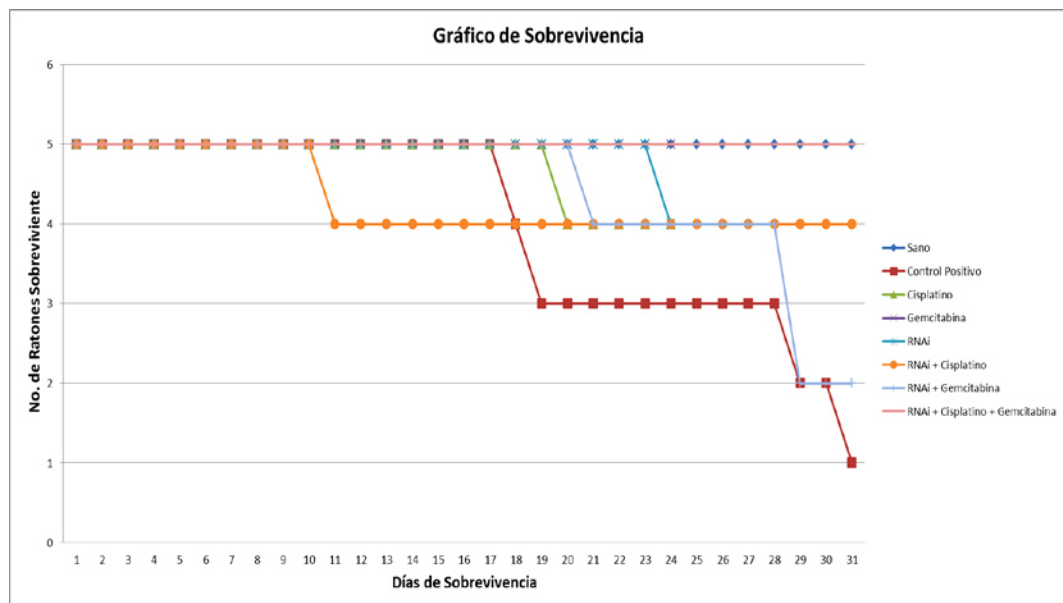


Figura. 19. Gráfico de los días de supervivencia de los ratones C57/BL6 tratados con las diferentes combinaciones de tratamientos con ARNi-*wt1*, Gemcitabina y Cisplatino.

7.7.2.-Exámen físico de los grupos tratados con los diferentes tratamientos.

En la tabla 10 se muestran los datos de sobrevivencia de cada grupo de estudio así como la examinación física de cada grupo de ratón tratado indicando que las drogas solas protegen contra la metástasis de las células B16F10, sin embargo presentan condiciones físicas deplorables.

Tabla 10.- Resumen de las variables evaluadas en los grupos tratados con los diferentes tratamientos.					
Grupo	Peso Final Promedio (g)	Examen visual	% de Sobrevivientes a los 30 días	Días de Sobrevivencia	Valor de la progresión
Sano	25.6	Aspecto saludable	100	>30	0
Cisplatino	21.75	Pasivos, buena apariencia	80	28.80 ± 4.92	0
Gemcitabina	17	Muy pasivos, pequeños, encorvados, pelo crespo.	100	>30	0
ARNi de <i>w11</i>	23.3	Activos, buena apariencia	80	29.60 ± 3.13	2
ARNi de <i>w11</i> + Cisplatino	25.3	Pasivos, buena apariencia	80	27.2 ± 8.50	0
RNi de <i>w11</i> + Gemcitabina	15.6	Muy pasivos, pequeños, encorvados, pelo crespo.	40	28.4 ± 3.72	2
ARNi de <i>w11</i> + Cisplatino + Gemcitabina	25.5	Activos, buena apariencia, timo engrandecido	100	>30	0
Control Positivo (con metástasis pulmonar y sin tratamiento)	21.6	Muy pasivos.	20	25.00 ± 6.76	4

En la necropsia se realizó la disección de los pulmones para establecer el valor en la progresión del cáncer inducido, encontrándose un valor de 2 en los grupos con RNAi-*wt1* y RNAi-*wt1* + gemcitabina. En el resto de los grupos no se observó la formación de tumores, ver figura 20.

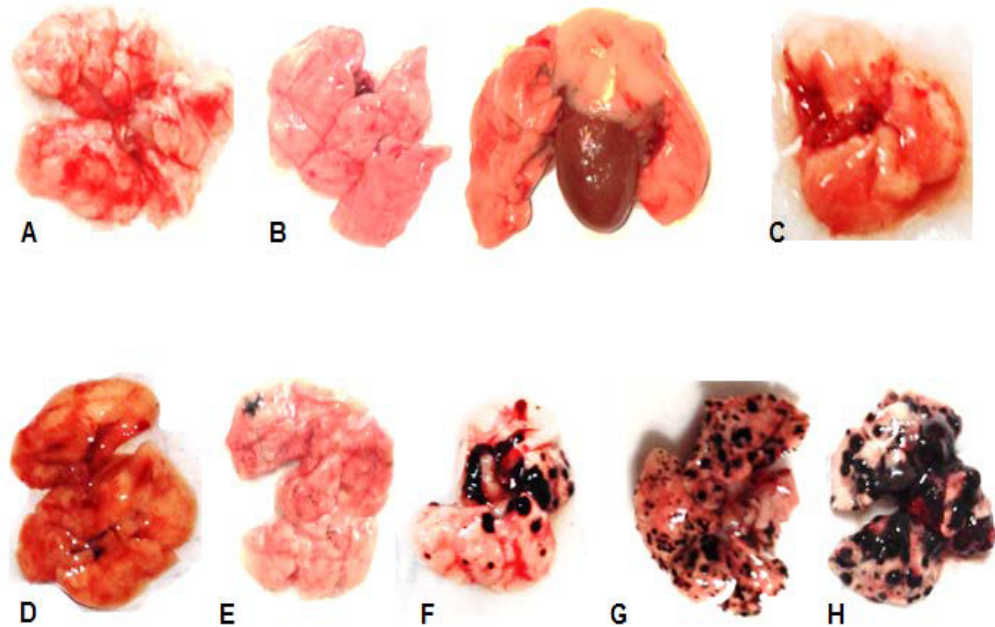


Figura 20. Tejido pulmonar provenientes de ratones C57/BL6 inoculados vía intravenosa con la línea celular B16F10, y sometidos a los diferentes tratamientos: A) Tejido pulmonar del grupo sano (sin metástasis pulmonar ni tratamiento), B) Tratamiento de RNAi de *wt1* con cisplatino y gemcitabina (timo engrandecido), C) RNAi de *wt1* con cisplatino, D) gemcitabina, E) RNAi de *wt1*, F) RNAi de *wt1* con gemcitabina, G y H) grupo control positivo (con metástasis pulmonar y sin tratamiento).

8.-DISCUSIÓN

El cáncer pulmonar se ha convertido en una neoplasia con altos índices de prevalencia y mortalidad en ambos sexos, a nivel mundial y en nuestro país, y se espera que el número de casos incrementen un 70% (WHO, 2015); dicha enfermedad se origina por la transformación maligna de las células de pulmón, donde ocurre una serie de eventos genéticos y moleculares que conducen alteraciones en la regulación del ciclo celular y en los mecanismos de proliferación y apoptosis (Weinberg, 1989). El gen *wtl* es un regulador transcripcional con múltiples funciones en el desarrollo celular, sin embargo, también tiene potencial oncogénico, es capaz de inducir fenotipos celulares malignos, suprimir la apoptosis y promover la proliferación celular, y se encuentra altamente expresado en diversos carcinomas, incluyendo el pulmonar; por lo tanto, *wtl* se ha utilizado como blanco de estudio para el desarrollo de estrategias de terapia génica. Mediante el diseño de un sistema en aerosol para la deliberación de dos complejos de PEI-ARNi contra *wtl*, Zamora et al. (2009) observaron una disminución del número de focos tumorales en un modelo murino con ratones C57/BL6 inducidos a una metástasis pulmonar con la línea celular B16F10.

Debido a la resistencia presentada por las drogas quimioterapéuticas en los pacientes con reincidencia al cáncer, en este proyecto se diseñó una politerapia, seleccionando el ARNi de Zamora et al. (2009) con mayor efecto antitumoral *in vivo* (RNAi-WT1-1), combinándolo con 2 drogas utilizadas actualmente en las quimioterapias para el cáncer pulmonar (cisplatino y gemcitabina). Gemcitabina es análogo del nucleósido citidina, como trifosfato, reemplaza a la citidina durante la replicación del ADN provocando la activación de la vía de la apoptosis; por otro lado, Cisplatino es un compuesto a base de platino, el cual se intercalan en las hebras del ADN. Los mecanismos moleculares que producen la quimioresistencia al utilizar la combinación de estas 2 drogas, aún son desconocidas (Cao et al., 2015).

Anteriormente, se ha determinado la quimiosensibilidad celular al aplicar ARNi's en politerapias, esto se ha observado en Survivin (Yonesaka et al., 2006), cuyo silenciamiento incrementa la sensibilidad a doxorubicina en células de cáncer pulmonar mutantes de p53 *in vitro*; el silenciamiento del gen bcl-x1 (Lei et al., 2007) sensibiliza a células de adenocarcinoma resistentes a cisplatino *in vitro*; inhibición de WT1 isoforma +17AA, potencializó el efecto citotóxico de la doxorubicina en las células leucémicas K562 (Shen et al., 2007); el silenciamiento del gen Nrf2 (Factor nuclear eritroide-2-relacionado con el factor 2) aumenta la eficacia del carboplatino *in vitro* e *in vivo* (Singh et al., 2008); el bloqueo de KLF6-SV1 (Variante 1 del factor 6 tipo Kruppel) restaura la sensibilidad de células de adenocarcinoma resistentes a cisplatino *in vitro* y en un modelo xerógrafo (Sangodkar et al., 2009); el silenciamiento de la intergrina $\beta 1$ sensibiliza al adenocarcinoma pancreático ductal a la gemcitabina (Yang et al., 2016).

Para evaluar la politerapia propuesta, primeramente se comprobó la actividad citotóxica de los 3 agentes terapéuticos por separado (ARNi-*wt1*, Cisplatino y Gemcitabina) en las células de melanoma murino B16F10, las cuales se aplicarán en el modelo murino por su capacidad de provocar metástasis pulmonar al inocularlas vía intravenosa en ratones c57bl6. Se obtuvo una CC₅₀ teórica de 10 ng/ μ l en el ARNi-*wt1*; Cisplatino, 10 ng/ μ l; y Gemcitabina, 50 pg/ μ l; sin embargo, en el caso del ARNi-*wt1* se utilizó la CC₅₀ práctica de 8 ng/ μ l, la cual fue determinada en el gráfico de viabilidad celular (figura 11, c). Dichos valores son cercanos a lo reportado anteriormente, Zamora et al. (2009) encontraron una CC₅₀ de ng/ μ l con la misma construcción de ARNi contra *wt1*, Blancas-Mosqueda et al. (2012) obtuvo 3 ng/ μ l en Cisplatino, en cuanto a gemcitabina, no se encontraron antecedentes en células B16F10.

Para evaluar la quimiosensibilidad de Cisplatino y Gemcitabina en las células B16F10, basado en el trabajo de Blancas-Mosqueda et.al. (2012), las células fueron expuestas a la CC₅₀ del ARNi-*wt1* (8 ng/ μ l) y co-tratadas con

diferentes concentraciones de Cisplatino y Gemcitabina, por separado. Se determinó un efecto sinérgico en ambas drogas, disminuyendo la CC_{50} de Cisplatino y Gemcitabina a 2.4 ng/ μ l y 7.4 pg/ μ l, respectivamente. Por lo tanto, el ARNi-*wt1* provoca sensibilidad en las células B16F10 a las drogas, Cisplatino y Gemcitabina, puesto que sus concentraciones bajaron hasta un 70% y 85%, como corresponde. Al silenciarse *wt1*, se inhibe la proliferación de células cancerígenas, se induce la apoptosis, la caspasa-3 y la poly-(ADP-ribosa) (Zamora et al., 2009), sensibilizando a las células tumorales a la quimioterapia y radioterapia.

Posteriormente, se requirió probar el efecto de la politerapia en las células B16F10, combinando los 3 agentes terapéuticos (ARNi-*wt1*, Cisplatino y Gemcitabina), mediante un isoblograma (Morán-Santibañez et al., 2016), aplicando la CC_{50} de ARNi-*wt1* (8 ng/ μ l) con diferentes combinaciones y concentraciones de Cisplatino y Gemcitabina, en base a las concentraciones citotóxicas determinadas anteriormente (2.4 ng/ μ l y 7.4 pg/ μ l, respectivamente). En todas las combinaciones analizadas se encontró efecto sinérgico (tabla 9), sin embargo, el mejor efecto citotóxico fue encontrado en la combinación CR₂₅ – GR₂₅, esto es, en el tratamiento con 8 ng/ μ l de ARNi-*wt1*, 1.2 ng/ μ l de Cisplatino y 3.7 pg/ μ l de Gemcitabina. No hay antecedentes de la combinación de gemcitabina y cisplatino en células B16F10, no obstante, esta terapia combinada ha sido utilizada en el cáncer pulmonar en pacientes en fase II y III. Para comprender el efecto citotóxico de este tratamiento, se obtuvieron las pastillas celulares de B16F10 expuestas a las CC_{50} de las diferentes combinaciones: ARNi-*wt1*, Cisplatino, Gemcitabina, ARNi-*wt1* + Cisplatino, ARNi-*wt1* + Gemcitabina y la politerapia CR₂₅ – GR₂₅ y fueron sometidas a una RT-PCR convencional para la determinación de la expresión del gen *wt1* y el gen apoptótico *bcl-2*. El silenciamiento del gen *wt1* se reflejó en la disminución de su expresión en los tratamientos ARNi-*wt1*, ARNi-*wt1* + Cisplatino y CR₂₅ – GR₂₅, en contraste en los tratamientos Gemcitabina, ARNi-*wt1* + Gemcitabina y Cisplatino + Gemcitabina se observó un incremento de la expresión de *wt1*.

De acuerdo a Takahara et al. (2011), Gemcitabina promueve el aumento de la expresión del ARNm de *wt1* en células de cáncer de páncreas humano mediante la activación de NF-kB, la cual se ha encontrado activa en diferentes tumores malignos y se ha implicado en la resistencia celular al efecto citotóxico de varias drogas, como la Gemcitabina, escapando de la apoptosis. Takahara et al. (2011) Encontraron el cambio de localización de WT1, del núcleo celular al citoplasma, y por lo tanto cambiando su función, puesto que su ubicación en el citoplasma se ha relacionado con diferentes tipos de cáncer, donde su fosforilación provoca la retención de WT1 en el citoplasma, teniendo como consecuencia la inhibición de la unión del ADN y la alteración de la actividad transcripcional. Dicha fosforilación y translocación de WT1 puede ser mediada por Gemcitabina, a través de la activación de NF-kB. Debido a lo anterior, Gemcitabina puede provocar quimioresistencia en las células malignas debido a la activación de WT1 y NF-kB, sin embargo, la presencia del ARN de interferencia y Cisplatino en este proyecto, lograron sinergia al silenciar a *wt1*, a diferencia del tratamiento de Cisplatino + Gemcitabina y ARNi-*wt1* + Gemcitabina, donde sí se observó la expresión de *wt1*.

El gen *wt1* se ha encontrado relacionado en la activación de la vía de señalización apoptótica, especialmente con los miembros de la familia *bcl-2*. Por tal motivo, se determinó la expresión del gen antiapoptótico *bcl-2* en cada terapia, donde se presentó menor expresión en los tratamientos con Cisplatino + ARNi-*wt1*, Gemcitabina + ARNi-*wt1* y CR₂₅ – GR₂₅, por otra parte, se incrementó la expresión en Gemcitabina y Cisplatino + Gemcitabina. Wu et al. (2016), Determinaron el efecto inductor de la gemcitabina sobre la autofagia y la apoptosis en células de cáncer pulmonar (A549 y SPC-A1), sin embargo, la gemcitabina al activar la autofagia, afecta la quimiosensibilidad de las células, puesto que al inhibir la autofagia con 3-MA, se activaron los genes pro-apoptóticos (caspasa-3, bax, BNIP3 y BNIP3L) y disminuyó la expresión de *bcl-2*, potencializándose el efecto apoptótico de la gemcitabina.

Para determinar dicho efecto apoptótico en las diferentes combinaciones de tratamientos, se realizó un ensayo clonogénico, el cual mostró que las células B16F10 tratadas con ARNi-wt1 + Cisplatino y CR₂₅ – GR₂₅, no fueron capaz de dividirse ni formar una colonia, después de haber sido expuesta a al tratamiento, a su vez, el tratamiento con ARNi-wt1 + Gemcitabina mostró una alta citotoxicidad; los resultados anteriores, fueron consistentes con el ensayo para la determinación de apoptosis por medio de citometría de flujo usando anexina y yoduro de propidio, donde estas 3 combinaciones presentaron mayor porcentaje de células en fase de apoptosis temprana, a comparación de los tratamientos individuales, así como presentaron la disminución del gen antiapoptótico *bcl-2* en la RT-PCR convencional.

En la fase *in vivo* de este trabajo, la politerapia resultó efectiva para incrementar la sobrevivencia y la calidad de vida del ratón C57/BL6 en un 100%, reduciendo la metástasis a pulmón inducida por la inoculación de la línea celular B16F10 vía intravenosa, aunado a esto, no se presentó pérdida de peso, a comparación de los ratones no tratados. También, se observó el 100% de sobrevivencia en el tratamiento con Gemcitabina sola, sin embargo, los ratones presentaron un menor peso, bajó un 33.6%. Zamora et al. (2009), encontraron que el silenciamiento de wt1 se relaciona con la reducción de la vascularización debido a la disminución de la expresión del gen ETS-1 y el factor de crecimiento endotelial vascular, así como, la presencia de células apoptóticas en el área periférica del tumor, dicha área es de fácil acceso para las drogas.

La eficacia de los agentes quimioterapeúticos se ha limitado por la quimioresistencia encontrada en los carcinomas pulmonares, especialmente en NSCLC. Gemcitabina combinada con Cisplatino es un tratamiento ampliamente aplicado en el tratamiento para NSCLC, a pesar del desarrollo de quimioresistencias, sin embargo no se conoce bien el mecanismo de resistencia utilizando dicha combinación (Cao et al., 2015).

En este proyecto encontramos que la combinación de la terapia génica para el silenciamiento de wt1 con Gemcitabina y Cisplatino activan la vía de apoptosis al

disminuir la expresión de bcl-2, contrarrestando el efecto antiapoptótico de la Gemcitabina, así como su efecto tóxico *in vivo*, donde la mejor supervivencia y peso final fue obtenida en los ratones tratados con la combinación de los 3 agentes. Por tal motivo, se propone estudiar los mecanismos moleculares de la politerapia propuesta en líneas celulares de carcinoma pulmonar humano, con la finalidad de aplicarla como terapia contra el cáncer pulmonar evitando la resistencia generada por las drogas quimioterapéuticas.

9.-CONCLUSIÓN

1.- Se determinó una Concentración Citotóxica del 50% (CC₅₀) con la terapia génica para el silenciamiento de *wt1* mediante un ARN de interferencia (ARNi-*wt1*) de 8 ng/μl, con Gemcitabina de 50 pg/μl y con Cisplatino de 8 ng/μl, en la línea celular de melanoma murino B16F10.

2.- Se encontró efecto sinérgico en células B16F10 expuestas a las diferentes combinaciones de los tratamientos con 8 ng/μl de ARN-*wt1*, al lograr disminuir la concentración de los fármacos en la politerapia hasta un 85% y 92.6%, para Cisplatino y Gemcitabina, respectivamente.

3.-En los tratamientos con ARNi-*wt1* se encontró disminución de *wt1*, a excepción de los tratamientos con Gemcitabina, donde se ha reportado el incremento de la expresión de *wt1* mediante la activación de NF-kB (Takahara et al., 2011). Sin embargo, se determinó la activación de la vía de apoptosis en la politerapia con ARNi-*wt1* + Cisplatino a 1.2 ng/μl + Gemcitabina a 3.7 pg/μl, al observar la disminución de la expresión del gen antiapoptótico *bcl-2*.

4.- Mediante un ensayo clonogénico, se determinó la alta citotoxicidad de la politerapia ARNi-*wt1* + Cisplatino + Gemcitabina en la línea celular B16F10, donde no se logró la formación de colonias debido al impedimento de la división celular por el tratamiento.

5.- De acuerdo al ensayo de citometría de flujo, se encontró la activación de la vía de apoptosis en fase temprana en las combinaciones de tratamientos que incluyen la terapia génica ARNi-*wt1*.

6.- En los ratones C57BL/6 con inducción a metástasis pulmonar mediante la línea celular B16F10 y expuestos a tratamientos ARNi-*wt1*, Cisplatino y Gemcitabina, de manera individual, se encontró mejor sobrevivencia (mayor a 30 días) en los ratones tratados con Gemcitabina, a comparación de los 25 días de sobrevivencia de los ratones no tratados, además, en la autopsia no se encontraron focos tumorales; no obstante, se encontró su calidad de vida deteriorada, observándose el actividad física pasiva, encorvados, pelo crespo y una disminución de peso del 33.6%, en relación con los ratones pertenecientes al grupo sano. Los ratones tratados con ARNi-*wt1* y Cisplatino, presentaron una sobrevivencia de 29.60 ± 3.13 y 28.80 ± 4.92 días, y en su autopsia, 0 y de 10 - 100 focos tumorales, respectivamente, donde su calidad de vida fue considerada como buena, pero no normal.

8.- Se presentó sinergia, además de un efecto menos tóxico *in vivo*, en los ratones C57BL/6 con inducción a metástasis pulmonar mediante la línea celular B16F10 y expuestos a la politerapia con ARNi-*wt1* + Cisplatino + Gemcitabina. Los ratones tratados con la politerapia presentaron una sobrevivencia mayor a 30 días a comparación de los 27.2 ± 8.50 y 28.4 ± 3.72 días de sobrevivencia de los ratones tratados con ARNi-*wt1* + Cisplatino y ARNi-*wt1* + Gemcitabina. Aunado a esto, los ratones tratados con la politerapia no presentaron deterioro en la calidad de vida, donde se observó una actividad física, apariencia del pelo y peso normales, igual que en el grupo control de ratones sanos, además, en la autopsia no se encontraron focos tumorales, sin embargo en 1 de los 5 ratones tratados, se encontró el timo engrandecido. En el tratamiento ARNi-*wt1* + Cisplatino, también no se mostraron focos tumorales, no obstante, resultó mejor la sobrevivencia y la calidad de vida en la politerapia.

10.-PERSPECTIVAS

Debido a la presencia de sinergia en la politerapia con ARNi-*wtl* + Cisplatino + Gemcitabina, tanto *in vitro* como *in vivo*, encontrada en este proyecto, se espera probar dicha politerapia *in vitro* en células de carcinoma pulmonar humano, analizando la expresión de genes relacionados con la fase temprana de la vía de señalización apoptótica. A su vez, *in vivo* se desea alargar el tiempo de sobrevivencia en los ratones c57bl6 con inducción a metástasis pulmonar mediante la línea celular B16F10 y expuestos a la politerapia, así como realizar el análisis de la generación de resistencia, analizando la expresión de los genes y proteínas relacionadas a la quimioresistencia, aunado a esto, se podrá determinar la ubicación de las proteínas en la célula, para determinar su impacto en el metabolismo de los tratamientos. También, se propondrá realizar estudios histológicos para evaluar el efecto tóxico de la politerapia en los tejidos, puesto que no se observó dicho efecto en el examen visual del ratón.

11. LITERATURA CONSULTADA.

1. Aigner A: Gene silencing through ARN interference (ARNi) *in vivo*: Strategies based on the direct application of siARNs. J Biotechnol 2006;124:12-25.
2. Alva-López LF, García-Sancho Figueroa C, Salazar-Flores M, Rébora-Togno F, Franco-Marina F, Falcón-Solís V, Sotelo-Robledo R, López-Luna JJ: Epidemiología del cáncer pulmonar en México; hallazgos por imagen. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2003;16:197-204.
3. <http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/detailedguide/non-small-cell-lung-cancer-key-statistics>, American Cancer Society. Actualizado el 16 de mayo del 2016.
4. Amini Nik S, Hohenstein P, Jadidizadeh A, Van Dam K, Bastidas A, Berry RL, Patek CE, Van der Schueren B, Cassiman JJ, Tejpar S: Upregulation of wilms' tumor gene 1 (wt1) in desmoid tumors. Int J Cancer 2005;114:202-208.
5. Bach PB, Kattan MW, Thornquist MD, Kris MG, Tate RC, Barnett MJ, Hsieh LJ, Begg CB: Variations in lung cancer risk among smokers. J Natl Cancer Inst 2003;95:470-478.
6. Blancas-Mosqueda M, Zapata-Benavides P, Zamora-Ávila D, Saavedra-Alonso S, Manilla-Muñoz E, Franco-Molina M, DE LA Peña CM, Rodríguez-Padilla C. 2012. CD133 antisense suppresses cancer cell growth and increases sensitivity to cisplatin *in vitro*. Exp Ther Med.;4(5):901-905.
7. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP: A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: Polyethylenimine. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:7297-7301.

8. Bunn PA, Jr.: Triplet combination chemotherapy and targeted therapy regimens. *Oncology (Williston Park)* 2001;15:26-32.
9. Cao J, He Y, Liu HQ, Wang SB, Zhao BC, Cheng YS. 2015. MicroRNA 192 regulates chemo-resistance of lung adenocarcinoma for gemcitabine and cisplatin combined therapy by targeting Bcl-2. *Int J Clin Exp Med.*;8(8):12397-403.
10. Chen X, Zhang L, Ren S, Li X, Zhou F, Li W, Gao G, He Y, Zhou C. 2014. Genomic polymorphisms of SLC29A3 associated with overall survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with gemcitabine. *Medical Oncology* 31(4):865.
11. Chiba I, Takahashi T, Nau MM, D'Amico D, Curiel DT, Mitsudomi T, Buchhagen DL, Carbone D, Piantadosi S, Koga H, et al.: Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. Lung cancer study group. *Oncogene* 1990;5:1603-1610.
12. Dallosso AR, Hancock AL, Brown KW, Williams AC, Jackson S, Malik K: Genomic imprinting at the wt1 gene involves a novel coding transcript (awt1) that shows deregulation in wilms' tumours. *Hum Mol Genet* 2004;13:405-415.
13. Damaraju VL, Scriver T, Mowles D, Kuzma M, Ryan AJ, Cass CE, Sawyer MB. 2014. Erlotinib, gefitinib, and vandetanib inhibit human nucleoside transporters and protect cancer cells from gemcitabine cytotoxicity. *Clinical Cancer Research* 20(1):176-86.
14. Davies RC, Calvio C, Bratt E, Larsson SH, Lamond AI, Hastie ND: Wt1 interacts with the splicing factor u2af65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes Dev* 1998;12:3217-3225.
15. Densmore CL, Orson FM, Xu B, Kinsey BM, Waldrep JC, Hua P, Bhogal B, Knight V: Aerosol delivery of robust polyethyleneimine-DNA complexes for gene therapy and genetic immunization. *Mol Ther* 2000;1:180-188.

16. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T: Functional anatomy of siARNs for mediating efficient ARNi in drosophila melanogaster embryo lysate. *EMBO J* 2001;20:6877-6888.
17. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B: Waf1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75:817-825.
18. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ: Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 1988;8:531-539.
19. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded ARN in caenorhabditis elegans. *Nature* 1998;391:806-811.
20. Franklin WA: Diagnosis of lung cancer: Pathology of invasive and preinvasive neoplasia. *Chest* 2000;117:80S-89S.
21. Gautam A, Densmore CL, Xu B, Waldrep JC: Enhanced gene expression in mouse lung after pei-DNA aerosol delivery. *Mol Ther* 2000;2:63-70.
22. Gautam A, Waldrep JC, Kleinerman ES, Xu B, Fung YK, T'Ang A, Densmore CL: Aerosol gene therapy for metastatic lung cancer using pei-p53 complexes. *Methods Mol Med* 2003;75:607-618.
23. Gazdar AF, Carney DN, Becker KL, Deftos LJ, Liang V, Go W, Marangos PJ, Moody TW, Wolfsen AR, Zweig MH: Expression of peptide and other markers in lung cancer cell lines. *Recent Results Cancer Res* 1985;99:167-174.
24. Ge Q, Filip L, Bai A, Nguyen T, Eisen HN, Chen J: Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by ARN interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8676-8681.
25. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG: Size matters: Molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J Biomed Mater Res* 1999;45:268-275.

26. Gridelli C, Novello S, Zilembo N, Luciani A, Favaretto AG, De Marinis F, Genestreti G, Crinò L, Grossi F, Caffo O, Ferrà F, Cruciani G, Brandes AA, Galetta D, Barni S, Fasola G, Cerea G, Ferrari S, Iannacone C, Ciardiello F. 2014. Phase II randomized study of vandetanib plus gemcitabine or gemcitabine plus placebo as first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer in elderly patients. *JouARNI of Thoracic Oncology* 9(5):733-7.
27. Grimsrud TK, Berge SR, Haldorsen T, Andersen A: Exposure to different forms of nickel and risk of lung cancer. *Am J Epidemiol* 2002;156:1123-1132.
28. Grønberg BH, Lund-Iversen M, Strøm EH, Brustugun OT, Scott H. 2013. Associations between TS, TTF-1, FR- α , FPGS, and overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer receiving pemetrexed plus carboplatin or gemcitabine plus carboplatin as first-line chemotherapy. *JouARNI of Thoracic Oncology* 8(10):1255-64.
29. Haber DA: Splicing into senescence: The curious case of p16 and p19arf. *Cell* 1997;91:555-558.
30. Hamilton AJ, Baulcombe DC: A species of small antisense ARN in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 1999;286:950-952.
31. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ: An ARN-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in drosophila cells. *Nature* 2000;404:293-296.
32. Han Y, San-Marina S, Liu J, Minden MD: Transcriptional activation of c-myc proto-oncogene by wt1 protein. *Oncogene* 2004;23:6933-6941.
33. Harbour JW, Lai SL, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD, Kaye FJ: Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in sclc. *Science* 1988;241:353-357.
34. Heckman C, Mochon E, Arcinas M, Boxer LM: The wt1 protein is a negative regulator of the normal bcl-2 allele in t(14;18) lymphomas. *J Biol Chem* 1997;272:19609-19614.

35. Hensel CH, Hsieh CL, Gazdar AF, Johnson BE, Sakaguchi AY, Naylor SL, Lee WH, Lee EY: Altered structure and expression of the human retinoblastoma susceptibility gene in small cell lung cancer. *Cancer Res* 1990;50:3067-3072.
36. Hewitt SM, Hamada S, McDonnell TJ, Rauscher FJ, 3rd, Saunders GF: Regulation of the proto-oncogenes bcl-2 and c-myc by the wilms' tumor suppressor gene wt1. *Cancer Res* 1995;55:5386-5389.
37. Hohenstein P, Hastie ND: The many facets of the wilms' tumour gene, wt1. *Hum Mol Genet* 2006;15 Spec No 2:R196-201.
38. Janne PA, Rodriguez-Thompson D, Metcalf DR, Swanson SJ, Greisman HA, Wilkins-Haug L, Johnson BE: Chemotherapy for a patient with advanced non-small-cell lung cancer during pregnancy: A case report and a review of chemotherapy treatment during pregnancy. *Oncology* 2001;61:175-183.
39. Jänne PA, Paz-Ares L, Oh Y, Eschbach C, Hirsh V, Enas N, Brail L, von Pawel J. 2014. Randomized, double-blind, phase II trial comparing gemcitabine-cisplatin plus the LTB4 antagonist LY293111 versus gemcitabine-cisplatin plus placebo in first-line non-small-cell lung cancer. *JouARNI Thoracic Oncology*. 9(1):126-31.
40. Khatri N, Rathi M, Baradia D, Misra A. 2014. cRGD Grafted siARN Nano-constructs for Chemosensitization of Gemcitabine Hydrochloride in Lung Cancer Treatment. *Pharm Research* May 2014.
41. Kim MK, Jeon YK, Woo JK, Choi Y, Choi DH, Kim YH, Kim CW. 2011. The C-terminal region of Bfl-1 sensitizes non-small cell lung cancer to gemcitabine-induced apoptosis by suppressing NF-kB activity and down-regulating Bfl-1. *Molecular Cancer* 10(1):98.
42. Kelley MJ, Nakagawa K, Steinberg SM, Mulshine JL, Kamb A, Johnson BE: Differential inactivation of cdkn2 and rb protein in non-small-cell and small-cell lung cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:756-761.

43. Kichler A: Gene transfer with modified polyethylenimines. *J Gene Med* 2004;6 Suppl 1:S3-10.
44. Koesters R, Linnebacher M, Coy JF, Germann A, Schwitalle Y, Findeisen P, von Knebel Doeberitz M: Wt1 is a tumor-associated antigen in colon cancer that can be recognized by *in vitro* stimulated cytotoxic t cells. *Int J Cancer* 2004;109:385-392.
45. Koshkina NV, Gilbert BE, Waldrep JC, Seryshev A, Knight V: Distribution of camptothecin after delivery as a liposome aerosol or following intramuscular injection in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44:187-192.
46. Kuramitsu Y, Suenaga S, Wang Y, Tokuda K, Kitagawa T, Tanaka T, Akada J, Maehara S, Maehara Y, Nakamura K. 2013. Up-regulation of DDX39 in human pancreatic cancer cells with acquired gemcitabine resistance compared to gemcitabine-sensitive parental cells. *Anticancer Research* 33(8):3133-6.
47. Lodomery M, Sommerville J, Woolner S, Slight J, Hastie N: Expression in xenopus oocytes shows that wt1 binds transcripts *in vivo*, with a central role for zinc finger one. *J Cell Sci* 2003;116:1539-1549.
48. Laity JH, Chung J, Dyson HJ, Wright PE: Alternative splicing of wilms' tumor suppressor protein modulates DNA binding activity through isoform-specific DNA-induced conformational changes. *Biochemistry* 2000;39:5341-5348.
49. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA: Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999;49:8-31, 31.
50. Larsson SH, Charlier JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, Cuzin F, van Heyningen V, Hastie ND: Subnuclear localization of wt1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 1995;81:391-401.
51. Lei X, Huang Z, Zhong M, Zhu B, Tang S, Liao D: Bcl-xl small interfering RNA sensitizes cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007;39:344-350.

52. Lesoon-Wood LA, Kim WH, Kleinman HK, Weintraub BD, Mixson AJ: Systemic gene therapy with p53 reduces growth and metastases of a malignant human breast cancer in nude mice. *Hum Gene Ther* 1995; 6:395-405.
53. Liao ZJ, Guo YH, Zhao Z, Yao JT, Xu R, Nan KJ. 2014. Gemcitabine inhibits the micrometastasis of non-small cell lung cancer by targeting the EpCAM-positive circulating tumor cells via the HGF/cMET pathway. *Int J Cancer* 134(2):651-8.
54. Lim KH, Lee HY, Song SY. 2013. Efficacy and feasibility of gemcitabine and carboplatin as first-line chemotherapy in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer. *Chin Med J (Engl)* 126(24):4644-8.
55. Little M, Wells C: A clinical overview of wt1 gene mutations. *Hum Mutat* 1997; 9:209-225.
56. Loeb DM, Evron E, Patel CB, Sharma PM, Niranjana B, Buluwela L, Weitzman SA, Korz D, Sukumar S: Wilms' tumor suppressor gene (wt1) is expressed in primary breast tumors despite tumor-specific promoter methylation. *Cancer Res* 2001;61:921-925.
57. Maheswaran S, Englert C, Bennett P, Heinrich G, Haber DA: The wt1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev* 1995;9:2143-2156.
58. Marschall P, Malik N, Larin Z: Transfer of yacs up to 2.3 mb intact into human cells with polyethylenimine. *Gene Ther* 1999;6:1634-1637.
59. Mayo MW, Wang CY, Drouin SS, Madrid LV, Marshall AF, Reed JC, Weissman BE, Baldwin AS: Wt1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *EMBO J* 1999;18:3990-4003.
60. Mayoral Chávez MA ZGE, Espinosa Mancilla B, ..2004; 17: 283-292. : Perspectiva monográfica del cáncer pulmonar: Un enfoque molecular y la metástasis al cerebro. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2004;17:283-292.

61. Menke AL, Shvarts A, Riteco N, van Ham RC, van der Eb AJ, Jochemsen AG: Wilms' tumor 1-kts isoforms induce p53-independent apoptosis that can be partially rescued by expression of the epidermal growth factor receptor or the insulin receptor. *Cancer Res* 1997;57:1353-1363.
62. Menke AL, Van Der Eb AJ, Jochemsen AG: The wilms' tumor 1 gene: Oncogene or tumor suppressor gene? *Int Rev Cytol* 1998;181:151-212.
63. Menssen HD, Bertelmann E, Bartelt S, Schmidt RA, Pecher G, Schramm K, Thiel E: Wilms' tumor gene (wt1) expression in lung cancer, colon cancer and glioblastoma cell lines compared to freshly isolated tumor specimens. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126:226-232.
64. Michael M, White SC, Abdi E, Nott L, Clingan P, Zimet A, Button P, Gregory D, Solomon B, Dobrovic A, Do H, Clarke S. 2014. Multicenter randomized, open-label phase II trial of sequential erlotinib and gemcitabine compared with gemcitabine monotherapy as first-line therapy in elderly or ECOG PS two patients with advanced NSCLC. *Asian-Pacific JouARNI of Clinical Oncology*. 2014 Feb 27.
65. Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. 2006. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology* 17 (5): v7–v12.
66. Minna JD, Roth JA, Gazdar AF: Focus on lung cancer. *Cancer Cell* 2002; 1:49-52.
67. Mlak R, Krawczyk P, Ramlau R, Kalinka-Warzocha E, Wasylecka-Morawiec M, Wojas-Krawczyk K, Kucharczyk T, Homa I, Koziół P, Ciesielka M, Chudziak D, Milanowski J. 2013. Predictive value of ERCC1 and RRM1 gene single-nucleotide polymorphisms for first-line platinum- and gemcitabine-based chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Oncology Reports* 30(5):2385-98.
68. Morrison DJ, English MA, Licht JD: Wt1 induces apoptosis through transcriptional regulation of the proapoptotic bcl-2 family member bak. *Cancer Res* 2005; 65:8174-8182.

69. Neu M, Fischer D, Kissel T: Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *J Gene Med* 2005;7:992-1009.
70. Oji Y, Miyoshi S, Maeda H, Hayashi S, Tamaki H, Nakatsuka S, Yao M, Takahashi E, Nakano Y, Hirabayashi H, Shintani Y, Oka Y, Tsuboi A, Hosen N, Asada M, Fujioka T, Murakami M, Kanato K, Motomura M, Kim EH, Kawakami M, Ikegame K, Ogawa H, Aozasa K, Kawase I, Sugiyama H: Overexpression of the wilms' tumor gene wt1 in de novo lung cancers. *Int J Cancer* 2002;100:297-303.
71. Oh YK, Suh D, Kim JM, Choi HG, Shin K, Ko JJ: Polyethylenimine-mediated cellular uptake, nucleus trafficking and expression of cytokine plasmid DNA. *Gene Ther* 2002;9:1627-1632.
72. Oji Y, Ogawa H, Tamaki H, Oka Y, Tsuboi A, Kim EH, Soma T, Tatekawa T, Kawakami M, Asada M, Kishimoto T, Sugiyama H: Expression of the wilms' tumor gene wt1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:194-204.
73. Oji Y, Suzuki T, Nakano Y, Maruno M, Nakatsuka S, Jomgeow T, Abeno S, Tatsumi N, Yokota A, Aoyagi S, Nakazawa T, Ito K, Kanato K, Shirakata T, Nishida S, Hosen N, Kawakami M, Tsuboi A, Oka Y, Aozasa K, Yoshimine T, Sugiyama H: Overexpression of the wilms' tumor gene w t1 in primary astrocytic tumors. *Cancer Sci* 2004;95:822-827.
74. Oliver T, Mercer K, Sayles L, Burke J, Mendus D, Lovejoy K, Cheng M-H, Subramanian A, Mu D, Powers S, Crowley D, Bronson R, Whittaker C, Bhutkar A, Lippard S, Golub T, Thomale J, Jacks T and Sweet-Cordero A. 2010. Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer. *GENES & DEVELOPMENT* 24:837–852.
75. Swisher SG, Roth JA: Gene therapy in lung cancer. *Curr Oncol Rep* 2000;2:64-70.

76. Morán-Santibañez K, Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Robledo D, Freile-Peigrín Y, Peña-Hernández MA, Rodríguez-Padilla C, Trejo-Avila LM. 2016. Synergistic Effects of Sulfated Polysaccharides from Mexican Seaweeds against Measles Virus. Hindawi Publishing Corporation; 2016(11): 1-11.
77. Mukhopadhyay T, Tainsky M, Cavender AC, Roth JA: Specific inhibition of k-ras expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense ARN. *Cancer Res* 1991;51:1744-1748.
78. Nykanen A, Haley B, Zamore PD: Atp requirements and small interfering ARN structure in the ARN interference pathway. *Cell* 2001; 107:309-321.
79. Pant S, Saleh M, Bendell J, Infante JR, Jones S, Kurkjian CD, Moore KM, Kazakin J, Abbadessa G, Wang Y, Chen Y, Schwartz B, Camacho LH. 2014. A Phase I Dose Escalation Study of Oral c-MET Inhibitor Tivantinib (ARQ 197) in Combination with Gemcitabine in Patients with Solid Tumors. *Annals of Oncology* 2014 Apr 15.
80. Prives C: Signaling to p53: Breaking the mdm2-p53 circuit. *Cell* 1998;95:5-8
81. Reddy JC, Hosono S, Licht JD: The transcriptional effect of wt1 is modulated by choice of expression vector. *J Biol Chem* 1995;270:29976-29982.
82. Roberts SG: Transcriptional regulation by wt1 in development. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:542-547.
83. Rom WN, Hay JG, Lee TC, Jiang Y, Tchou-Wong KM: Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1355-1367.
84. Rom WN, Tchou-Wong KM: Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Methods Mol Med* 2003;75:3-26.
85. Sangodkar J, DiFeo A, Feld L, Bromberg R, Schwartz R, Huang F, Terzo EA, Choudhri A, Narla G: Targeted reduction of klf6-sv1 restores chemotherapy sensitivity in resistant lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2009;66:292-297.

86. Scholz H, Wagner KD, Wagner N: Role of the wilms' tumour transcription factor, wt1, in blood vessel formation. *Pflugers Arch* 2009; 458:315-323.
87. Shen H, Xu W, Wu Z, Tang H, Xie Y, Zhong X. 2007. Down-regulation of WT1/+17AA gene expression using RNAi and modulating leukemia cell chemotherapy resistance. *Haematologica*; 92(9):1270-2.
88. Siena L, Pace E, Ferraro M, Di Sano C, Melis M, Profita M, Spatafora M, Gjomarkaj M. 2014. Gemcitabine sensitizes lung cancer cells to Fas/FasL system-mediated killing. *Immunology* 141(2):242-55.
89. Singh A, Boldin-Adamsky S, Thimmulappa RK, Rath SK, Ashush H, Coulter J, Blackford A, Goodman SN, Bunz F, Watson WH, Gabrielson E, Feinstein E, Biswal S: ARNi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy. *Cancer Res* 2008;68:7975-7984.
90. Stillman B: Cell cycle control of DNA replication. *Science* 1996;274:1659-1664.
91. Takahara A, Koido S, Ito M, Nagasaki E, Sagawa Y, Iwamoto T, Komita H, Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M, Mineno J, Shiku H, Nishida S, Sugiyama H, Tajiri H, Homma S. 2011. Gemcitabine enhances Wilms' tumor gene WT1 expression and sensitizes human pancreatic cancer cells with WT1-specific T-cell-mediated antitumor immune response. *Cancer Immunol Immunother*; 60(9):1289-97.
92. Takeda Y, Nakahira S, Katsura Y, Kagawa Y, Okishiro M, Takeno A, Sakisaka H, Suzuki R, Taniguchi H, Egawa C, Kato T, Tamura S. 2013. Erlotinib plus gemcitabine combination therapy in patients with unresectable advanced pancreatic cancer - a single-institution experience. *Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy* 40(12):1884-6.
93. Tang Y, Wang Y, Teng X. 2013. Sequence dependent effect of gemcitabine and cisplatin on A549 non small cell lung cancer cells. *Molecular Medicine Reports* 8(1):221-6.

94. Timar J, Meszaros L, Orosz Z, Albini A, Raso E: Wt1 expression in angiogenic tumours of the skin. *Histopathology* 2005;47:67-73.
95. Tovar-Guzman VJ, Lopez-Antunano FJ, Rodriguez-Salgado N: [trends in mortality from lung cancer in Mexico, 1980-2000]. *Rev Panam Salud Publica* 2005;17:254-262.
96. Tovar Guzman VJ, Lopez Antunano FJ, Rodriguez Salgado N: Recent trends in mortality due to chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in Mexico, 1980-2002. *Arch Med Res* 2005;36:65-69.
97. Tuna M, Chavez-Reyes A, Tari AM: Her2/neu increases the expression of Wilms' tumor 1 (WT1) protein to stimulate S-phase proliferation and inhibit apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 2005;24:1648-1652.
98. Turner S, Sherratt JA: Intercellular adhesion and cancer invasion: A discrete simulation using the extended Potts model. *J Theor Biol* 2002;216:85-100.
99. Wagner E, Kircheis R, Walker GF: Targeted nucleic acid delivery into tumors: New avenues for cancer therapy. *Biomed Pharmacother* 2004;58:152-161.
100. Wagner KD, Wagner N, Bondke A, Nafz B, Flemming B, Theres H, Scholz H: The Wilms' tumor suppressor WT1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *FASEB J* 2002;16:1117-1119.
101. Wagner N, Wagner KD, Theres H, Englert C, Schedl A, Scholz H: Coronary vessel development requires activation of the TrkB neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor WT1. *Genes Dev* 2005;19:2631-2642.
102. Wang ZY, Qiu QQ, Huang J, Gurrieri M, Deuel TF: Products of alternatively spliced transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, have altered DNA binding specificity and regulate transcription in different ways. *Oncogene* 1995;10:415-422.
103. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, World Health Organization (WHO). Actualizado en Febrero 2015.

104. Weinberg RA. 1989. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res*; 49: 3713-3721.
105. Wittgen B, Kunst P, Van Der Born K, Van Wijk A, Perkins W, Pilkiewicz F, Perez-Soler R, Nicholson S, Peters G y Postmus P. 2007. Phase I Study of Aerosolized SLIT Cisplatin in the Treatment of Patients with Carcinoma of the Lung. *Clinic Cancer Research*;13: 2414-2421.
106. Wu ZY, Guan HH, Lin ZX, Yang HK, Zhou L, Cai QC. 2013. Combination of low-dose gemcitabine in 6-hour infusion and carboplatin is a favorable option for patients in poor performance status with advanced non-small cell lung cancer. *Journal of Chemotherapy*, Dec 6.
107. Wu YL, Zhou C, Hu CP, Feng J, Lu S, Huang Y, Li W, Hou M, Shi JH, Lee KY, Xu CR, Massey D, Kim M, Shi Y, Geater SL. 2014. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncology* 15(2):213-22.
108. Wu HM, Shao LJ, Jiang ZF, Liu RY. 2016. Gemcitabine-Induced Autophagy Protects Human Lung Cancer Cells from Apoptotic Death. *Lung*; 194(6):959-966.
109. Yang D, Shi J, Fu H, Wei Z, Xu J, Hu Z, Zhang Y, Yan R, Cai Q. 2016. Integrin β 1 modulates tumour resistance to gemcitabine and serves as an independent prognostic factor in pancreatic adenocarcinomas. *Tumour Biol.*; 37(9):12315-12327.
110. Yonesaka K, Tamura K, Kurata T, Satoh T, Ikeda M, Fukuoka M, Nakagawa K: Small interfering ARN targeting survivin sensitizes lung cancer cell with mutant p53 to adriamycin. *Int J Cancer* 2006;118:812-820.
111. Zamora-Avila DE, Zapata-Benavides P, Franco-Molina MA, Saavedra-Alonso S, Trejo-Avila LM, Reséndez-Pérez D, Méndez-Vázquez JL, Isaias-Badillo J y Rodríguez-Padilla C. WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI-RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth. *Cancer Gene Therapy* (2009), 1–8.

112. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP: ARNi: Double-stranded ARN directs the atp-dependent cleavage of mARN at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000; 101:25-33.
113. Zhao C, Gao W, Chen T. 2014. Synergistic induction of apoptosis in A549 cells by dihydroartemisinin and gemcitabine. *Apoptosis* 19(4):668-81.
114. Zhang Y, Yu D, Xia W, Hung MC: Her-2/neu-targeting cancer therapy via adenovirus-mediated e1a delivery in an animal model. *Oncogene* 1995;10:1947-1954.
115. Zochbauer-Muller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD: Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2001;61:249-255.