

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

MAESTRIA EN CIENCIAS GENÓMICAS

***“Determinación del perfil de expresión genética de tumores de cáncer de
pulmón de células pequeñas (CPCP) y análisis funcional de un gen
desregulado en los tumores CPCP”***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIA GENÓMICAS

PRESENTA:

Biol. Nayely Ramírez Torres

Director de Tesis

Dr. Mario Cesar López Camarillo

México, D.F. Enero 2015.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. Mario César López Camarillo

Profesor Investigador

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES

Dra. María de los Angeles Carlos Reyes

Investigador en ciencias médicas B

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Dra. Elena Aréchaga Ocampo

Profesora Investigadora

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Profesora Investigador

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

LECTORES DE TESIS

Dra. Minerva Camacho Nuez

Profesora Investigador

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. María de los Angeles Carlos Reyes

Investigador en Ciencias Médicas B

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Dra. Elena Aréchaga Ocampo

Profesora Investigadora

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Profesora Investigador

Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo económico de la beca para obtención de grado y el apoyo académico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

También agradezco a CONACYT por la beca académica otorgada.

El trabajo experimental fue realizado en el laboratorio de Oncogenómica y Proteómica de cáncer, en el Posgrado en Ciencias genómicas de la UACM, bajo la tutoría del Dr. César López, al cual agradezco permitirme participar en su proyecto de investigación y la estancia en su laboratorio.

Así mismo reconozco el apoyo de la Dra. Angeles Carlos Reyes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por todo su apoyo académico y personal durante este tiempo.

Agradezco a la Dra. Elena Aréchaga Ocampo de la UAM-C por su apoyo académico.

También agradezco a la Dra. Elisa Azuara y Minerva Camacho, profesoras del PCG, por el tiempo dedicado a la lectura de esta tesis.

A los profesores del PCG y personal académico del PCG, por su apoyo.

ÍNDICE

Abreviaturas	I
Lista de figuras	II
Lista de tablas	III
Resumen	IV
1. Introducción	1
1.1 Antecedentes generales del tema	1
1.1.1 Generalidades del cáncer	1
1.2 Carcinogénesis	2
1.2.1 Inicio	2
1.2.2 Promoción	2
1.2.3 Progresión	3
1.3 Cáncer de pulmón	3
1.4 Impacto epidemiológico del cáncer de pulmón	3
1.5 Factores de riesgo del cáncer de pulmón	4
1.6 Detección del cáncer pulmonar	5
1.7 Estructura del pulmón	7
1.8 Clasificación del cáncer pulmonar	8
2. Estado del arte	9
2.1 El cáncer de pulmón en México	9
2.2 Diagnostico molecular de cáncer pulmonar	12
3. Antecedentes particulares del proyecto	13
3.1 Cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP)	13
3.2 Análisis de la expresión global de genes en CPCP	14
3.3 Receptores acoplados a la proteína G (GPCR)	15
3.4 Reguladores de la señalización de la proteína G (RGS)	16
3.4.1 RGS5 y su participación en cáncer	17

4. Justificación	20
5. Objetivos	21
5.1 Objetivo general	21
5.2 Objetivos particulares	21
6. Estrategia experimental	22
7. Metodología	23
7.1 Obtención de biopsias de CPCP	23
7.2 Extracción de RNA total de biopsias de CPCP.	24
7.3 Hibridación de microarreglos de expresión génica.	24
7.4 Validación de datos de expresión	25
7.5 Análisis bioinformático de los datos obtenidos del perfil de expresión genómica	26
7.6 Análisis funcional de RGS5 en líneas celulares de CPCP	28
7.6.1 Expresión de RGS5 en líneas celulares pulmonares.	29
7.7 Ensayo de interferencia de ARN de RGS5	33
7.8 Ensayo de transfección de shRGS5.1	33
7.9 Ensayo de migración celular en cámaras transwell	34
7.10 Ensayo de invasión celular en cámaras transwell con matrigel	34
8. Resultados	35
8.1 Identificación de los genes que se expresan diferencialmente en los tumores CPCP en comparación con el tejido pulmonar sano, mediante el análisis con microarreglos de expresión.	35
8.2 Validación de la expresión de 14 de los genes modulados en tumores CPCP.	49
8.3 Determinación de las vías de señalización y procesos	60

biológicos donde participan los genes desregulados en los tumores de CPCP.	
8.4 Análisis funcional de un gen desregulado en los tumores primarios de cpcp en líneas celulares de CPCP.	60
8.5 Análisis del papel de RGS5 en migración e invasión de líneas celulares de CPCP	60
8.6 El silenciamiento de RGS5 en células NCI-H187 y NCI-H128 reduce la migración	63
8.7 El silenciamiento de RGS5 en células NCI-H187 y NCI-H128 reduce la invasión celular	63
9. Discusión	75
10. Conclusiones	79
11. Bibliografía	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer a nivel mundial.	6
Figura 2. Anatomía del pulmón.	10
Figura 3. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en México.	11
Figura 4. Los receptores acoplados a proteínas G contribuyen a la activación de rutas moleculares asociadas a cáncer.	18
Figura 5. Los Receptores acoplados a proteínas G contribuyen a la activación de rutas moleculares asociadas a cáncer	19
Figura 6. Estrategia experimental para la obtención del perfil de expresión de genes desregulados en CPCP.	22
Figura 7. Mapa del vector plasmídico pSilencer 5.1-U6 Retro.	66
Figura 8. Representación grafica del total de biopsias de CP analizadas para el estudio.	37
Figura 9. Integridad del RNA total obtenido de las biopsias de CPCP y tejido pulmonar normal.	39
Figura 10. Expresión relativa de los 863 genes modulados en los tumores de CPCP.	40
Figura 11. Amplificación de los fragmentos de 14 genes desregulados en los tumores de CPCP.	51
Figura 12. Curvas de amplificación de los genes RGS17, RGS5, DIRAS2 y HPS6 desregulados en los tumores de CPCP.	53
Figura 13. Comparación de la expresión de los genes más desregulados en los tumores de CPCP.	54
Figura 14. Procesos celulares donde participan los genes desregulados en tumores de CPCP.	58
Figura 15. Expresión de RGS5 en líneas celulares derivadas de CPCP.	66
Figura 16. Purificación del DNA plasmídico de pSilencer.	68

Figura 17. Digestión y purificación del vector pSilencer.	69
Figura 18. Doble restricción para confirmar liberación de inserto de pSilencer- shRGS5.1.	70
Figura 19. Secuenciación y alineamiento de la construcción pSilencer-RGS5.1.	71
Figura 20. Silenciamiento de RGS5 mediante el uso de shRNA específico	72
Figura 21. El silenciamiento de RGS5 disminuye la migración e invasión celular en las células NCI-H187 de CPCP.	73
Figura 22. El silenciamiento de RGS5 disminuye la migración e invasión celular en las células NCI-H128 de CPCP.	74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de qRT-PCR	27
Tabla 2. Datos clínicos de las biopsias de CPCP seleccionadas	38
Tabla 3. Genes reprimidos en los tumores CPCP.	41
Tabla 4. Genes sobreexpresados en los tumores CPCP.	43
Tabla 5. Genes modulados en los tumores de CPCP con función en cáncer.	45
Tabla 6. Comparación de los perfiles de expresión de genes reportados para CPCP.	48
Tabla 7. Análisis de la expresión de los genes más desregulados en los 3 tumores de CPCP obtenida mediante qRT-PCR.	52
Tabla 8. Genes desregulados en CPCP con funciones relacionadas a los procesos de carcinogénesis	59
Tabla 9. Secuencia diseñada para el silenciamiento de RGS5 y su posición en el mRNA.	67

ABREVIATURAS

CP: Cáncer de pulmón

CPCP: Cáncer de pulmón de células pequeñas

CPCNP: Cáncer de pulmón de células no pequeñas

DNA: Ácido desoxirribonucleico

GPCR: receptor acoplado a proteína G

H: hora

INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

kDa: kilodalton

ml: mililitro

mg: miligramo

min: minuto

mRNA: RNA mensajero

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS: Amortiguador de fosfatos salino

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

qRT-PCR: PCR en tiempo real

RNA: Ácido ribonucleico

RT: Transcripción reversa

RGS: Regulador de la señalización de la proteína G

shRNA: short hairpin RNA

µg: microgramo

µl: microlitro

RESUMEN

El cáncer pulmonar es la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial. Este se clasifica en dos grandes grupos: cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) con el 85% de los casos y cáncer pulmonar de células pequeñas (CPCP) con el 15%, la mayoría de los casos son diagnosticados en etapas avanzadas y la sobrevivencia de los pacientes es menor a 5 años. En particular de CPCP no existen reportes precisos sobre el número de casos anuales, sin embargo, Siegel y colaboradores (2012) reportan que en los Estados Unidos se detectaron 33,900 casos de CPCP durante el 2011. En nuestro país se desconoce el número de casos de CPCP. Este tipo de cáncer se caracteriza por ser altamente agresivo e invasivo debido a que desde etapas iniciales genera metástasis temprana. En este trabajo nuestro objetivo fue identificar los genes que son modulados en tumores de CPCP, mediante el uso de un microarreglo de expresión de genes, en el cual, se analizaron los perfiles de expresión de 3 tumores primarios, comparados con el perfil de expresión del tejido sano. Se identificaron 863 genes desregulados de los cuales 640 se encontraron reprimidos y 223 genes se sobreexpresaron. La expresión de los 14 genes más desregulados en los tumores de CPCP, fue validada mediante PCR en tiempo real, donde se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada gen seleccionado y así corroborar eficiencia del microarreglo empleado. La función y la ruta celular en las cuales participa cada gen modulado en los tumores de CPCP se identificó mediante programas bioinformáticos. De los 863 genes modulados, 160 genes están involucrados en diversos procesos relacionados a la carcinogénesis los cuales incluyen migración, invasión, metástasis, angiogénesis y ciclo celular.

Finalmente del total de los genes identificados en el microarreglo de DNA elegimos el gen RGS5 para evaluar su función biológica en CPCP. RGS5 presentó una sobreexpresión en los tumores de CPCP y 4 líneas celulares. La inhibición de la expresión de RGS5 con shRNA disminuyó la migración e invasión en las líneas celulares NCI-H187 y NCI-H128 de CPCP.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA

1.1.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad multifactorial originada por alteraciones genéticas y epigenéticas en genes supresores de tumor y oncogenes (1). La acumulación gradual de alteraciones en estos genes conduce a que los procesos biológicos en los que participan como: ciclo celular, proliferación y diferenciación celular, favorezcan el crecimiento y proliferación descontrolada de las células (2). La proliferación de las células tumorales, se realiza de forma rápida y descontrolada lo que genera una acumulación de células tumorales conocida como tumor (3). Las células que conforman a este crecimiento pueden llegar a adquirir la capacidad de invadir tejidos vecinos (tumores invasivos) y posteriormente llegar a diseminarse hasta otros órganos y tejidos sanos del cuerpo a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático en un proceso conocido como metástasis (2,3).

Se han descrito varias formas de presentación del cáncer, siendo tres los principales grupos (4,5): El primer grupo lo forman los sarcomas. Los cuales se originan en el tejido conectivo tales como el hueso, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo (4,5). El segundo grupo son los carcinomas, los cuales proceden de los tejidos epiteliales que revisten las cavidades y órganos. Los carcinomas son los cánceres más frecuentes, estos incluyen a los adenocarcinomas que tienen una estructura glandular y los carcinomas de células escamosas que tienen una estructura parecida a la piel (5,6). En el tercer grupo se encuentran las leucemias y linfomas que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas (6).

1.2 CARCINOGENESIS

La carcinogénesis es el proceso, en el cual, una célula normal se convierte en una célula cancerosa y se caracteriza por la progresión de varios cambios celulares a nivel del material genético, que finalmente desemboca en la reprogramación de la célula provocando que se reproduzca de manera descontrolada, formando de esta manera una masa maligna. Este proceso consta de tres eventos: inicio, promoción y progresión (7).

1.2.1 INICIO

El inicio es el primer proceso de alteración de una célula a nivel del genoma de la misma. En ella se implican tres procesos fundamentales para la célula representados por el metabolismo, reparación del DNA y proliferación celular. La alteración de cualquiera de estos tres procesos puede iniciar el proceso de la carcinogénesis. El compuesto químico implicado en este proceso se le denomina agente iniciador o carcinógeno incompleto y es aquel que sólo es capaz de iniciar a las células. Algunos de los mecanismos moleculares y celulares responsables de la iniciación de la carcinogénesis son las mutaciones en el DNA genómico, transiciones y deleciones, en protooncogenes y/o oncogenes. Las mutaciones en genes implicados en la transducción de señales celulares causan alteraciones fenotípicas (7,8).

1.2.2 PROMOCIÓN

El agente promotor se define como aquel compuesto químico capaz de causar la expansión selectiva de las células iniciadas. Los agentes promotores producen una alteración en la transducción de señales celulares. Por lo tanto, su mecanismo de acción reside en una alteración de la expresión génica mediada a través de receptores específicos. Algunas características morfológicas y biológicas de este

proceso son la continuidad del estado de promoción en una población celular que depende de la administración continua del agente promotor (7,8).

1.2.3 PROGRESIÓN

El agente progresor es aquel compuesto químico capaz de convertir una célula iniciada a una célula potencialmente maligna. La progresión de la carcinogénesis se puede producir también mediante la incorporación en el genoma de información genética exógena (por ejemplo, de virus) o alteraciones cromosómicas espontáneas. Los mecanismos implicados son la inestabilidad cariotípica, la cual, es múltiple e incluye la alteración en el aparato mitótico, trastorno en la función de los telómeros, hipometilación del DNA, recombinación, amplificación y transposición génica. El estado de progresión se puede desarrollar a partir de células en estado de promoción o bien directamente a partir de células normales como resultado de la administración de dosis relativamente altas (dosis citotóxicas) de agentes carcinógenos completos (7,8).

1.3 CÁNCER DE PULMÓN

En particular el cáncer de pulmón (CP) se origina en el epitelio respiratorio (bronquio, bronquiolo y alvéolo), principalmente a la exposición de carcinógenos como benzopírenos y nitrosaminas que se encuentran en los cigarrillos. Estos carcinógenos causan la formación de aductos en el DNA, mutaciones, deleciones y amplificaciones, su acumulación conduce al crecimiento y proliferación descontrolada de las células tumorales en el epitelio respiratorio (9).

1.4 IMPACTO EPIDEMIOLÓGICO DEL CÁNCER DE PULMÓNAR

Las neoplasias pulmonares son la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial, se estima que se presentan más de 1.6 millones de casos nuevos por

año, de los cuales mueren en ese mismo año 1.3 millones de individuos (figura 1). En México, es la segunda causa de muerte en hombres mientras que en mujeres es la cuarta y se estima que el 80% de estos casos muere en un tiempo no mayor a 24 meses. Desafortunadamente, la mayoría de los pacientes con CPCNP (80%) son diagnosticados en etapas avanzadas debido, en parte, a la falta de herramientas que permita un diagnóstico temprano. Por lo tanto, los carcinomas pulmonares representan un grave problema de salud pública y social que afecta considerablemente a la población debido a los elevados costos de atención médica (10-12).

1.5 FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE PULMÓN

El hábito tabáquico es considerado como el principal factor de riesgo asociado al desarrollo de los carcinomas pulmonares (90% de los casos aproximadamente). El carcinoma pulmonar, es el resultado de la exposición crónica del tracto respiratorio a la mezcla de carcinógenos contenidos en el humo de cigarro. El riesgo de padecer esta enfermedad aumenta en proporción directa con el número de cigarrillos fumados; dejar de fumar o disminuir el consumo de cigarrillos de forma apreciable disminuye el riesgo de desarrollar la enfermedad (13). Este proceso inicia cuando el fumador inhala el humo de cigarro expone directamente el epitelio respiratorio a una mezcla de más de 4,000 compuestos químicos, de éstos, 60 compuestos son carcinógenos. Los carcinógenos más ampliamente asociados al desarrollo de carcinomas pulmonares forman parte de dos grupos: hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) como benzopirenos y las nitrosaminas, en particular 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) (13-17), estos producen aductos en la secuencia de DNA, así como alteraciones en los proto-oncogenes y genes supresores de tumores, que modifican la secuencia de DNA. También el desarrollo de carcinomas pulmonares se ha asociado a cambios epigenéticos como inestabilidad genética, activación de telomerasas, metilación de DNA, acetilación de histonas y pérdida de heterocigosidad (LOH), los cuales son

heredables, modifican el patrón de expresión génica sin afectar la secuencia del DNA. Estos cambios afectan el fenotipo sin alterar el genotipo de la célula (18-22).

Otros factores de riesgo asociados al desarrollo de los carcinomas pulmonares son la exposición humo de leña, laboral en donde se está en contacto con el carcinógenos como, radón, arsénico, asbesto, cromo, níquel, cloruro de vinilo, así como radiación ionizante (19). En relación a la exposición ambiental al humo del tabaco, lo que se conoce como tabaquismo pasivo, se ha observado que las personas fumadoras pasivas presentan alteraciones genéticas similares a las encontradas en los fumadores activos, y que marcadores biológicos de exposición al humo de tabaco ambiental (nicotina) se encuentran en concentraciones más altas que en la población no expuesta (20). Además, se ha observado que en fumadores activos, existe una relación directa entre la duración e intensidad de la inhalación pasiva del humo del tabaco y la posibilidad de desarrollar cáncer, el riesgo disminuye con el tiempo tras desaparecer la exposición (21,22).

Hasta el momento no existen reportes acerca del papel de los factores hereditarios en cáncer pulmonar en comparación con otros tipos de cáncer como es mama, colón y gástrico. Aunque no existe ninguna alteración genética concluyente que defina el riesgo de padecer cáncer de pulmón, algunos pacientes presentan susceptibilidad genética para desarrollar esta enfermedad (23,24).

1.6 DETECCIÓN DEL CANCER PULMONAR

Para realizar el diagnóstico histopatológico de los carcinomas pulmonares primero se realiza una radiografía de torax, siempre y cuando el médico tratante sospeche del desarrollo de un tumor. Posteriormente se realiza tomografías y resonancia electromagnéticas, y para confirmar el diagnóstico se toma una biopsia del tejido afectado mediante una broncoscopía, la cual es, analizada por una tinción de hematoxilina eosina y un análisis inmunohistoquímico empleando diferentes marcadores (25).

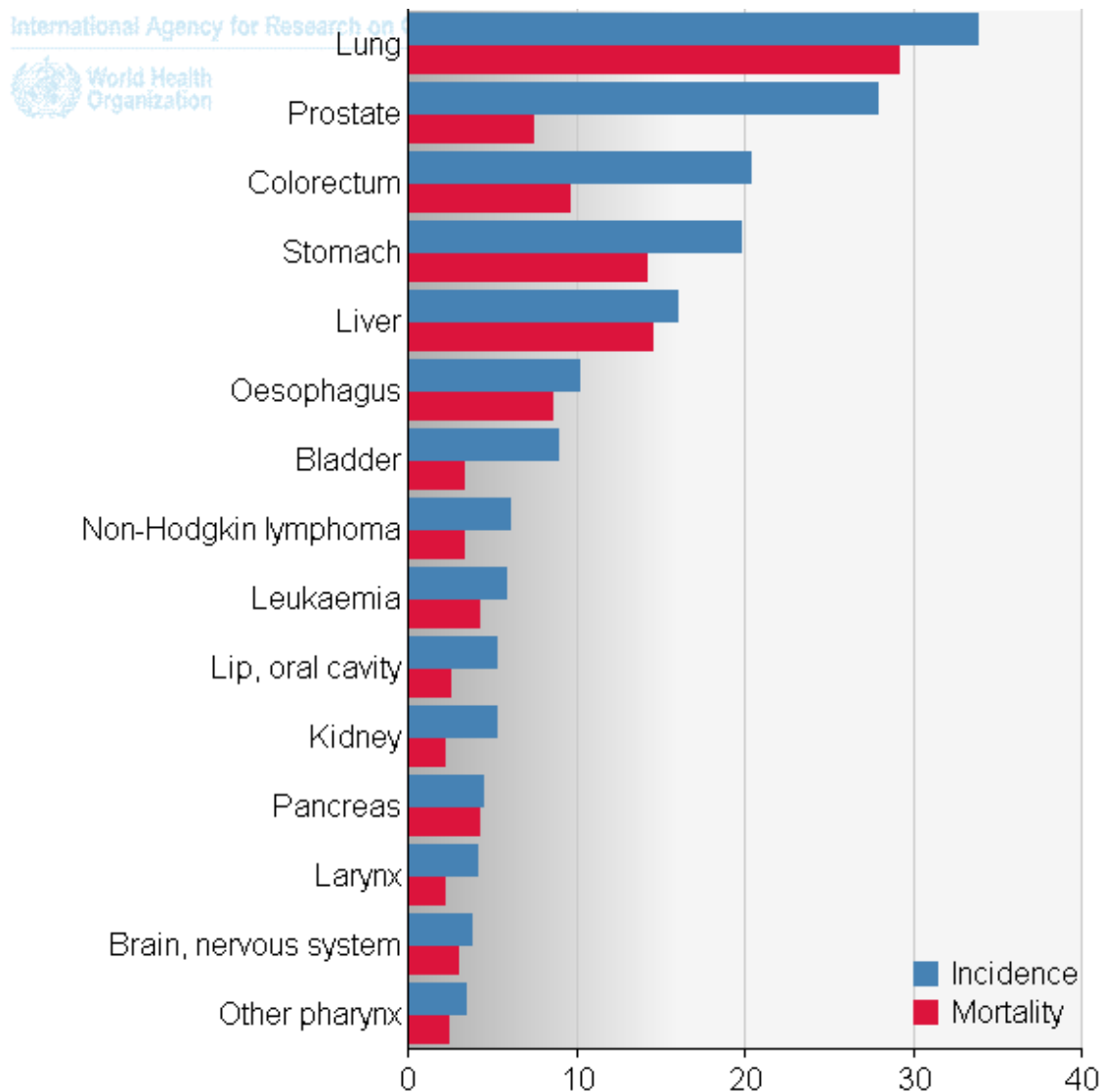


Figura 1. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer a nivel mundial. Tasa Ajustada por cada 100 mil habitantes (Imagen tomada de GLOBOCAN, 2012).

1.7 ESTRUCTURA ANATÓMICA DEL PULMÓN

Los pulmones humanos son estructuras anatómicas de origen embrionario endodérmico, pertenecientes al aparato respiratorio, se ubican en la caja torácica, delimitando a ambos lados el mediastino. Sus dimensiones varían, el pulmón derecho es más grande que su homólogo izquierdo (debido al espacio ocupado por el corazón). Poseen tres caras; mediastínica, costal y diafragmática, lo irrigan las arterias bronquiales, y las arterias pulmonares le llevan sangre para su oxigenación (26,27).

Los pulmones son los órganos responsables del intercambio de gases. El oxígeno entra en el cuerpo a través de la tráquea y va hacia los pulmones, donde la sangre es bombeada desde el corazón. Los pulmones también son responsables de la eliminación del dióxido de carbono de la sangre. El proceso cambia oxígeno por el producto de residuos del dióxido de carbono. Es por eso que se le da el término intercambio de gases. Los pulmones son el órgano principal del sistema respiratorio y un órgano secundario del sistema cardiovascular (26).

Anatómicamente cada pulmón, se divide en lóbulos (Figura 2), el pulmón derecho consta de tres superior, medio e inferior y el izquierdo, sólo de dos superior e inferior. Dentro de los lóbulos hay una gran cantidad de lobulillos conectados a un bronquiolo, que, a su vez, se divide en cavidades conocidas como vesículas pulmonares. Aquí se forman los alvéolos, que son sacos muy pequeños y elásticos, cuya principal función es producir el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono (27).

Los pulmones están revestidos por una mucosa que es el epitelio respiratorio. Es un epitelio pseudoestratificado, cilíndrico, ciliado con células caliciformes con gránulos electrodensos donde se originan los tumores. A partir de los bronquios el epitelio cambia y llega a ser simple. Es un epitelio bastante frágil y se lesiona con facilidad por el humo de tabaco y la contaminación. Cuando actúa alguno de estos agentes aumenta el número de células caliciformes y de moco. Este último se acumula en las vías respiratorias, impidiendo el paso de aire y favoreciendo

infecciones en vías respiratorias bajas. A veces el epitelio se transforma en otro más resistente como el de la piel (epitelio escamoso), a este fenómeno se le llama metacrasia. Esto es importante porque los carcinomas sólo se asientan sobre epitelio escamoso.

1.8 CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER PULMONAR

Para su diagnóstico y tratamiento clínico el cáncer de pulmón se divide en dos grupos, en el primer grupo se encuentra el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) con una incidencia del 85%, la mayoría de los pacientes son diagnosticados en etapas avanzadas por lo que la sobrevida de los pacientes es menor a 5 años. El CPCNP se subdivide en 3 subgrupos adenocarcinomas, carcinoma escamoso y carcinoma de células grandes. A continuación se describen algunas de las características de cada subtipo de CPCNP (28,29):

El adenocarcinoma es el cáncer mas prevalente de los tumores de CPCNP con incidencia del 40%, se origina en las células que recubren los alvéolos. Aunque casi todos se desarrollan en fumadores, representa el tipo histológico más frecuente en personas que nunca han fumado. La mayoría de estos tumores son periféricos, pero tiene una diseminación ganglionar temprana y metastatiza por vía hemática más rápidamente que los otros subtipos a el cerebro, glándula suprarrenal, hueso e hígado (28,29).

El carcinoma escamoso o epidermoide tiene incidencia del 30% de los tumores de CPCNP. Este tipo de cáncer se origina en las células escamosas del pulmón y es el más relacionado con el tabaco. Tiende a ser central afectando a los bronquios lobares o segmentarios. Este tumor tiene un crecimiento lento, se estima que tarda entre 3 y 4 años desde el desarrollo de un carcinoma *in situ* a un tumor plenamente establecido. En general, es localmente agresivo, produce menos metástasis pero más recidivas que otros tipos histológicos (28,29).

El carcinoma de células grandes es el subtipo de cáncer de CPCNP menos frecuente y con incidencia del 15%. Constituye un tumor indiferenciado, casi todos

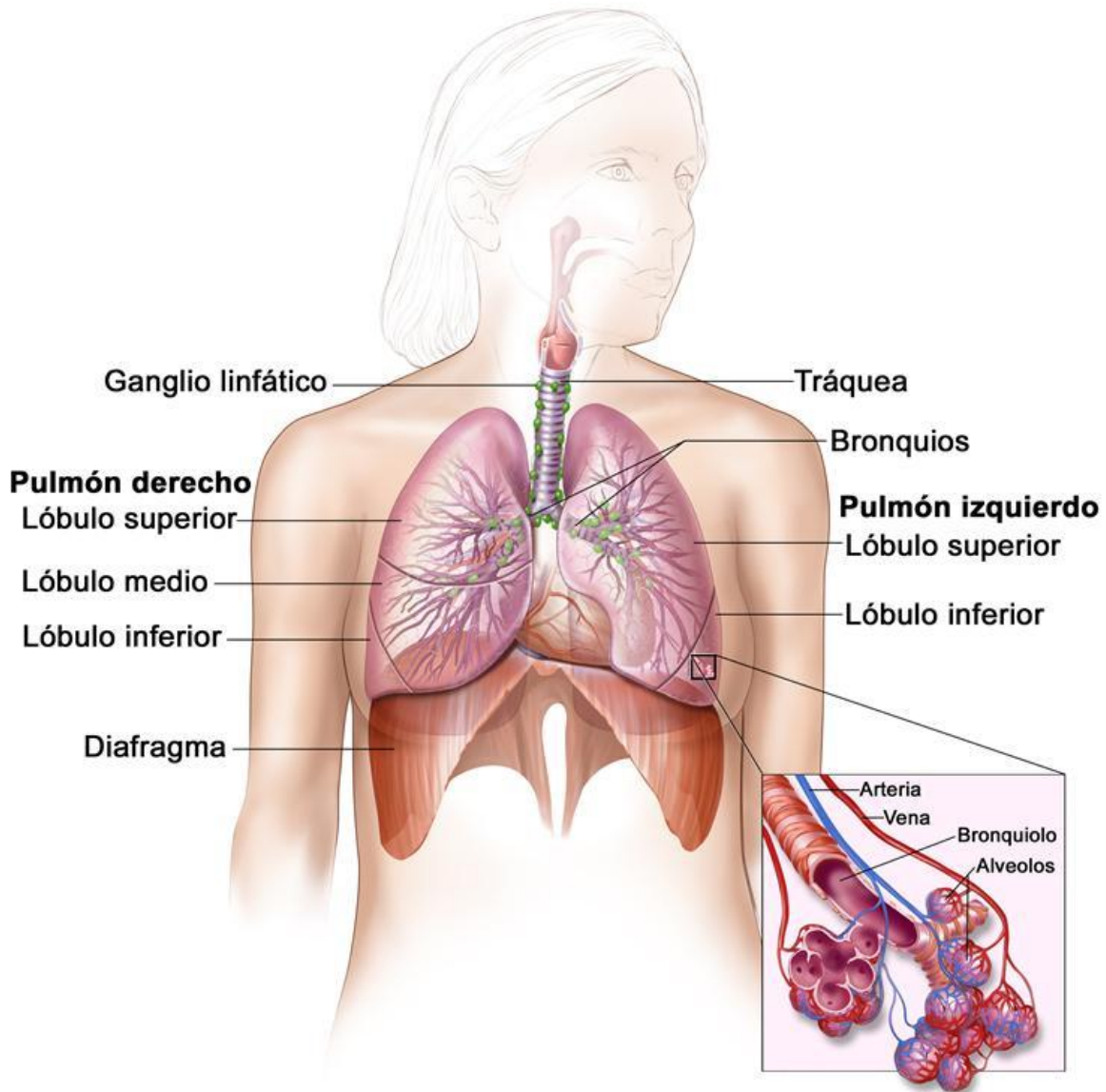
se desarrollan en fumadores y tienen una localización periférica. Hace metástasis más frecuente a los ganglios hiliares o mediastínicos, seguidos de la pleura, hígado, hueso y cerebro, (29,29).

El segundo grupo de cáncer de pulmón es el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), el cual, presenta una incidencia del 15%. El CPCP se origina de las células neuroendocrinas del epitelio bronquial, es un tumor muy agresivo e invasivo, con un tiempo de duplicación muy corto y una gran capacidad para metastatizar por vía linfática y hemática. Suele tener localización central en el 95% de los casos. Se estima que el 80% de los pacientes con CPCP muere en un tiempo no mayor a 15 meses (28,29).

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 EL CÁNCER DE PULMÓN EN MÉXICO

En el año de 2012 GLOBOCAN reportó que en nuestro país existe una incidencia de 9148 casos y una mortalidad de 8807 casos, por cada 100,000 habitantes, lo que ocasiona que el cáncer de pulmón se ubique en el primer lugar por muertes por cáncer en nuestro país (Figura 3). El 68% de estas muertes ocurrieron en el género masculino. Del total de los pacientes diagnosticados con esta neoplasia un 90% muere a causa de este padecimiento al año, en parte a la falta de herramientas para su diagnóstico oportuno y porque es detectado en etapas avanzadas. Los estados de la República mexicana más afectados por esta neoplasia son Baja California Sur, Sinaloa; Sonora, Nuevo León, Tamaulipas; Nayarit y Chihuahua (30). La frecuencia del cáncer pulmonar tiene relación directa con la edad, donde se ha observado un incremento marcado a partir de los 45 años y su pico máximo de presentación es en personas mayores de 70 años (30).



© 2006 Terese Winslow
U.S. Govt. has certain rights

Figura 2. Anatomía del pulmón. En esta imagen observamos la estructura del epitelio respiratorio incluyendo los pulmones, bronquios, bronquiolos y alveolos, principales zonas de desarrollo de tumores pulmonares (Imagen National Cancer Institute, <http://www.cancer.gov/>).

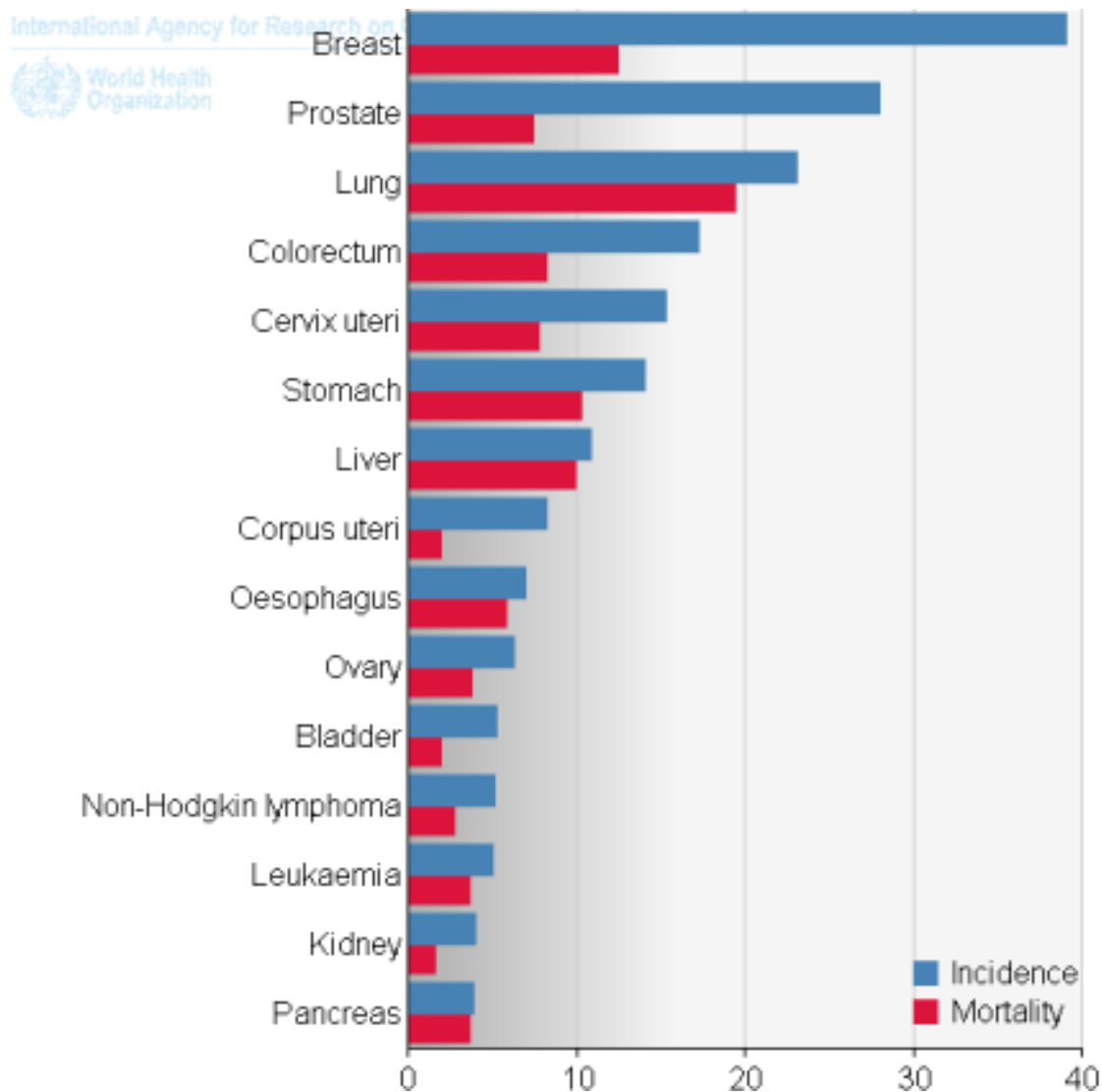


Figura 3. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en México. Tasa Ajustada por cada 100 mil habitantes (Imagen tomada de GLOBOCAN, 2012).

2.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL CÁNCER PULMONAR

En los últimos años se ha propuesto que el diagnóstico clínico para los pacientes con cáncer pulmonar sea a través de marcadores biológicos que permitan describir y aplicar un diagnóstico más oportuno, un pronóstico acertado y un tratamiento eficaz, incluso individualizado entre los diferentes tipos de cáncer pulmonar (31).

En el cáncer de pulmón existen mutaciones que se encuentran en el tumor y no en las células normales del cuerpo, razón por la cual no es una enfermedad hereditaria. En los últimos años, los avances en las herramientas empleadas para el diagnóstico del cáncer y un mejor conocimiento en las bases moleculares del proceso de carcinogénesis, han permitido identificar en los pacientes con cáncer de pulmón mutaciones en dos genes, uno a nivel de EGFR (del inglés epidermal growth factor receptor) y otra con traslocaciones a nivel del gen ALK (del inglés Anaplastic Lymphoma Kinase). Aproximadamente entre el 15-20% de los pacientes con CPCNP presentan la mutación en el gen EGFR, la cual se presenta en un 40-60% en mujeres, no fumadoras, asiáticas que desarrollan adenocarcinoma. Diversos estudios han demostrado que los inhibidores de la tirosina cinasa de EGFR bloquean el funcionamiento continuado de la proteína EGFR mutada y han observado una mejor sobrevida y libre progresión de los pacientes que desarrollaron CPCNP (31,32). Entre el 1 al 7% de la población con CPCNP son positivos a la translocación del gen ALK estos son frecuentemente no fumadores y desarrollan comúnmente adenocarcinomas. La translocación del gen ALK, es un cambio en la localización de gen en el material genético dentro de la célula tumoral. El gen ALK codifica una proteína con capacidad tumorigénica que se expresa únicamente en el tumor y es responsable del desarrollo y proliferación de las células tumorales. El uso de fármacos que bloquean la actividad del dominio tirosina cinasa de esta proteína, ha demostrado un aumento en la sobrevida y libre de progresión de estos pacientes (31,32). Estos resultados

han dado pauta a la aplicación de tratamientos dirigidos e individualizados a la población de pacientes que presentan estas mutaciones.

3. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO

3.1 CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS PEQUEÑAS (CPCP)

A nivel mundial no existen reportes precisos sobre el número de casos anuales de CPCP. Sin embargo, Siegel y colaboradores en 2012 reportan que en los Estados Unidos se detectaron 33,900 casos de CPCP durante el 2011 (33). En nuestro país se desconoce el número de casos de CPCP.

El CPCP es altamente agresivo e invasivo debido a que desde etapas iniciales genera metástasis temprana, además de que los pacientes no presentan síntomas clínicos característicos del tumor (33,34). El CPCP es de origen neuroendocrino donde las células neuroendocrinas derivan de la cresta neural y del endodermo, debido a que comparten características comunes con células neuronales y se caracterizan porque producen neuropéptidos (endorfina o angiotensina), neuromoduladores (gabapentina o pregabalina), neurotransmisores (adrenalina) y presentan gránulos de secreción. Sus características histológicas y patológicas de CPCP son muy particulares, las cuales consisten en pequeñas células con escaso citoplasma, son células con bordes celulares mal definidos, la cromatina finamente granulada y nucléolos ausentes o poco visibles. Las células son redondas u ovaladas, además presentan un elevado número de mitosis (34-36).

A nivel anatómico su localización es central o hilar e infiltran rápidamente el parénquima pulmonar, produciendo una rápida diseminación metastásica en etapas tempranas de su evolución y no es detectable hasta que se encuentra bien establecido, por lo que se considera un tumor altamente agresivo e invasivo. Los tumores de CPCP hacen metástasis a los huesos, el cerebro, el hígado y las glándulas suprarrenales (32). La mayoría de los pacientes presentan síntomas

como fatiga, tos, disnea, dolor torácico, hemoptisis, anorexia, pérdida de peso ponderal, disfonía, disfagia y debilidad (33).

El CPCP se detecta en etapas limitadas o avanzadas de acuerdo a su grado de propagación. En el estado limitado el tumor es localizado en la zona torácica cercana a los bronquios principales. La sobrevida de los pacientes con un tumor en estado limitado es de 16 a 24 meses. En estado avanzado, el tumor se detecta en otra zona del pulmón u otro órgano y la sobrevida de estos pacientes es de 7 a 12 meses (32-34). Dependiendo de la etapa de la enfermedad, se establece el tratamiento que recibirá el paciente con CPCP ya sea quimioterapia o radioterapia o una combinación de ambas. Los pacientes responden de manera positiva a los tratamientos antes, sin embargo, un 30% de los pacientes recae nuevamente y ya no responden a los tratamientos antes mencionados. Razón por la cual, surge la necesidad de realizar investigaciones a nivel de expresión de genes con el objetivo de poder identificar genes que representan potenciales blancos terapéuticos y así desarrollar tratamientos más efectivos (33).

3.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GLOBAL DE GENES EN CPCP

Existen pocos estudios enfocados a definir los perfiles de expresión genómica en CPCP. Bangur y col., (2002) analizaron 32 tumores con su respectivo tejido normal. Estos investigadores identificaron 209 genes sobreexpresados, algunos de los cuales son miembros de la familia SOX (SRY-box) están implicados en embriogénesis y determinación del sexo. Otros genes detectados en este estudio son UBQ-conjugat-E2, NUF2R (del inglés Kinetochore protein), TBP (del inglés telomerase binding protein), CRMP-1 (del inglés, Dihydropirimidinase protein), los cuales, participan de manera directa o indirecta en ciclo celular (36). Cuatro años después Taniwaki y colaboradores en 2006, identificaron 252 genes sobreexpresados en 15 muestras de CPCP. Los genes identificados ASCL1 (Achaete scute 1), NRCAM (neuronal cell adhesión molecule), y INSM1 (del inglés, insulinoma-associated 1), se caracterizan por tener acción neuroendocrina.

Además encontraron otros genes que participan en procesos importantes para el desarrollo de cáncer tales como adhesión celular, transducción de señales y proliferación celular (37). En el 2010, un estudio realizado por Voortman y colaboradores, reportaron alteraciones presentes en 33 tumores de CPCP y 13 líneas celulares de este tipo de cáncer y demostraron alteraciones en la expresión de los genes JAK2 (Janus kinase 2), FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1), miembros de la familia MYC, RB1 y p53 (38). Los reportes antes mencionados constituyen una valiosa información para el entendimiento de la expresión de genes alterados en su expresión implicados en la carcinogénesis pulmonar.

Recientemente en otros tipos de cáncer tales como cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular y CPCNP se han descrito genes asociados a eventos tumorales, en los cuales, participan los reguladores de la señalización de la proteína G o RGS, estas proteínas regulan de manera negativa al receptor acoplado a la proteína G.

3.3 RECEPTORES ACOPLADOS A LAS PROTEÍNAS G (GPCR)

Los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) son la mayor familia de moléculas de la superficie celular involucradas en la transmisión de señales. Consta de más de 800 miembros lo que representa >2% del total de genes codificados por el genoma humano. La mayoría de los receptores de esta clase tienen una estructura similar, esta consiste en una cadena polipeptídica simple con siete segmentos α -hélice transmembranales que tienen una estructura tridimensional común. Estos dominios están unidos entre sí por asas polipeptídicas tres intracelulares, el asa larga compuesta básicamente de aminoácidos hidrofílicos entre las hélices 5 y 6 que es el sitio de interacción o acoplamiento a proteína G, y tres asas extracelulares una cuarta asa citoplasmática puede formarse cuando el segmento C-terminal se une a la membrana por atracción lipídica a la cadena de aminoácidos (palmitoilación), un segmento N-terminal glucosilado extracelular, el segmento C-terminal se encuentra a nivel citoplasmático (39).

Los GPCR's controlan funciones fisiológicas clave como son, la neurotransmisión, liberación de enzimas de las glándulas endocrinas y exocrinas, la respuesta inmune, la contracción de musculo cardiaco y liso, la regulación de la presión arterial, así como también a la proliferación celular, embriogénesis, remodelación y reparación de tejidos y angiogénesis (39-43). El receptor acoplado a proteínas G es activado por una señal externa en forma de un ligando u otro mediador de señal. Esto crea un cambio conformacional en el receptor, causando la activación de una proteína G. El resto del efecto depende del tipo de proteína G

En particular se ha descrito que las células malignas a menudo secuestran las funciones fisiológicas de los GPCR's para sobrevivir, favoreciendo de esta manera la proliferación autónoma de las células tumorales, la evasión del sistema inmune, así como el aumento de oxígeno y nutrientes. La sobreexpresión aberrante de los GPCR y su activación por los ligandos liberados por las células tumorales representa la vía más empleada por las células tumorales para estimular a los GPCRs y sus redes de señalización, y de esta manera contribuir a los procesos de carcinogénesis tales como migración, invasión, proliferación y angiogénesis de las células tumorales (Figura 4) (40).

3.4 REGULADORES DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA G (RGS)

Las proteínas RGS son moléculas de transducción de señales que están implicadas en la regulación de las proteínas G heterotriméricas, al actuar como activadores de GTPasas, funcionan como interruptores moleculares ya que, hidrolizan a la subunidad $G\alpha$ que favorece la ruptura del enlace fosfodiéster del GTP a GDP, inactivando a la proteína G (41).

La familia de proteínas RGS está dividida en varias subfamilias que incluyen R4, R7, RZ y grupos RhoGEF (39). La subfamilia RhoGEF (del inglés guanine-nucleotide exchange factor) es la única familia en la que estas proteínas funcionan como una GAP (del inglés GTPaseActivating Protein), para las proteínas G (40). En la figura 5 se muestra como las proteínas RGS regulan de manera negativa a

la proteína G heterotrímica, la cual, está acoplada al receptor GPCR, este es activado después de que se une a un ligando para responder a una necesidad celular (proliferación celular, diferenciación desarrollo, etc).

Existen 9 miembros de la familia R4 como RGS4, RGS1, RGS2, RGS3, RGS8, RGS13, RGS16 RGS18 y RGS5. En particular RGS5 es una molécula que se expresa restrictivamente en células de músculo liso vasculares y en los pericitos de la mayoría de los órganos microvascularizados (42,45).

3.4.1 RGS5 Y SU PARTICIPACIÓN EN CÁNCER

Existen pocas investigaciones sobre la expresión de RGS5 en cáncer, se ha reportado que se encuentra sobreexpresado en los carcinomas gástricos y en CPCNP y carcinoma hepatocelular (42,44). Jing-Hua (2010) analizó 76 muestras de cáncer gástrico (22 casos con metástasis ganglionar y 54 casos sin metástasis ganglionar) y observó que el nivel de expresión de RGS5 en cáncer gástrico está asociado con la diferenciación del tumor y la densidad microvascular (MVD) y que además puede ser usado para determinar el pronóstico de los pacientes con este tipo de cáncer (42). Otro reporte RGS5 fue realizado por Huang (2012) y colaboradores en CPCNP donde examinó la expresión de RGS5 en 52 biopsias de CPCNP y encontró RGS5 está sobreexpresado en el 47% de las muestras tumorales. La alta expresión de RGS5 se asoció con la diferenciación de las células tumorales en el CPCNP y la baja expresión de RGS5 fue fuertemente asociada a la invasión vascular y metástasis ganglionar (42). Por otra parte Hu (2013) reportó que la sobreexpresión de RGS5 en biopsias y líneas celulares de cáncer hepático promueve la metástasis de los tumores por la inducción de la transición epitelio mesenquimal. Además demostraron que al inhibir la expresión de RGS5 con siRNAs la migración e invasión de las células tumorales disminuyó.

Estos estudios indican que RGS5 juega un importante papel en los diferentes procesos de la carcinogenesis como son migración, invasión y angiogénesis. Por lo tanto, es importante conocer más de la función de RGS5 en los diferentes tipos

The diagram illustrates the signaling pathways initiated by LPA and GRP. LPA binds to LPA1, and GRP binds to GRPR. These receptors activate various intracellular proteins, including GTPases (α₁, α₂, βγ), Src, Ras, Rac, Rho, and others. The pathways lead to outcomes like Survival (via Akt, mTOR, p70^{S6}), Protein translation (via EIF4BP1, EIF4E), Cell growth (via Transcription factors, Gene expression), and Angiogenesis (via COX2, PGE2 production). Key components like F-actin and Migration are also highlighted.

30

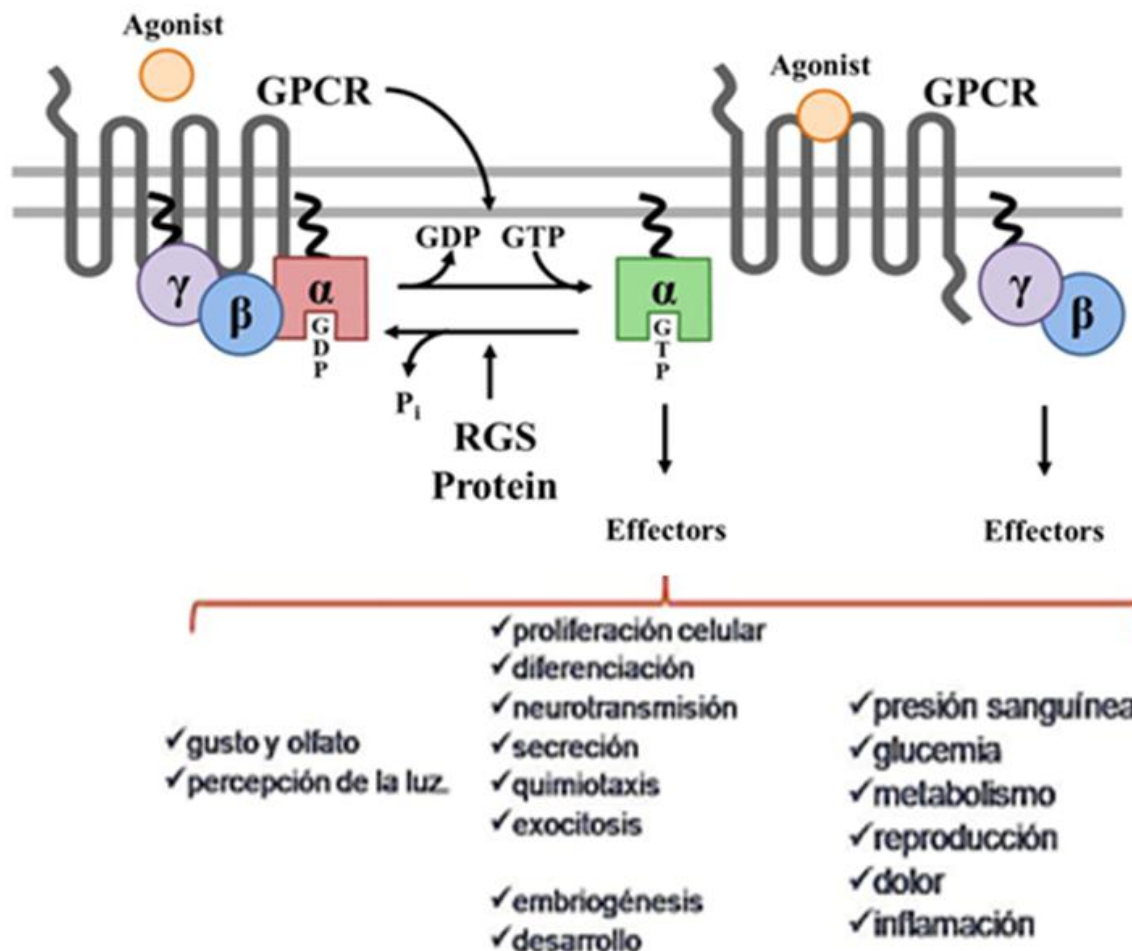


Figura 5. Señalización mediada por receptores acoplados a proteínas G. La llegada del agonista promueve la interacción del receptor con la proteína G, la cual, a través de su actividad GEF lleva a cabo el intercambio de GDP por GTP, por el cual la activa y lo que a su vez conduce a la disociación de las subunidades de la proteína G heterotrimérica ($G\alpha$ y $G\beta\gamma$), que pueden entonces interactuar con efectores específicos y controlar una gran variedad de procesos celulares básicos. Las proteínas RGS son interruptores moleculares ya que son proteínas GTPasas, hidrolizan a la subunidad $G\alpha$ que favorece la ruptura del enlace fosfodiéster del GTP a GDP por lo cual inactiva a la proteína G, esto promueve la re-asociación del complejo con el receptor en la membrana celular y el sistema vuelve a su conformación basal (Imagen tomada de Neves, 2002).

4. JUSTIFICACIÓN

El análisis de los perfiles de expresión génica ha permitido identificar algunos genes relacionados con la carcinogénesis en cáncer de pulmón. Sin embargo, el número de genes desregulados en tumores de CPCP que han sido caracterizados funcionalmente es escaso, por ello es importante buscar y caracterizar nuevos genes desregulados en este tipo agresivo de cáncer. En México, el CPCP sigue siendo una enfermedad con alto índice de mortalidad, las opciones de detección y tratamiento son limitadas, por lo que existe una necesidad urgente de identificar nuevos genes desregulados en los tumores de pacientes mexicanos con CPCP que puedan representar nuevos blancos terapéuticos y que nos permitan conocer mejor el desarrollo de este tipo de cáncer.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Búsqueda e identificación de genes desregulados en tumores primarios de pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP).

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener el transcriptoma e identificar los genes que se expresan diferencialmente en los tumores CPCP en comparación con el tejido plmonar normal mediante un análisis con microarreglos de expresión.
2. Validar la expresión de al menos 14 de los genes modulados en tumores CPCP.
3. Determinar las vías de señalización y procesos biológicos regulados por los genes desregulados en los tumores de CPCP.
4. Realizar el análisis funcional de un gen desregulado en los tumores primarios de CPCP en 2 líneas celulares de CPCP.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

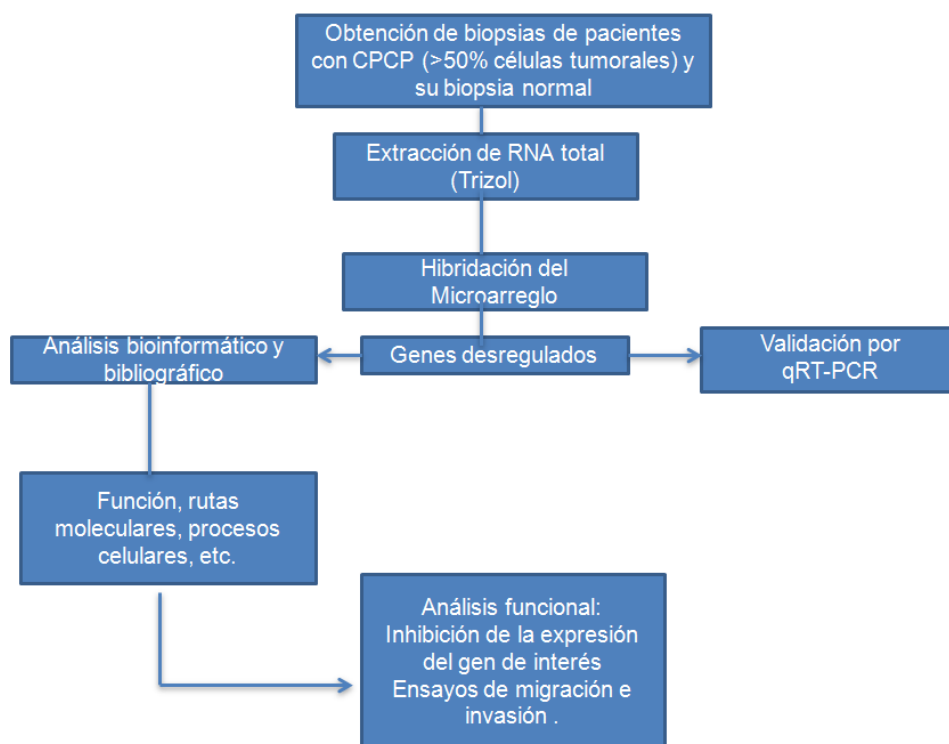


Figura 6. Estrategia experimental para la obtención del perfil de expresión de genes desregulados en CPCP. Se obtuvieron biopsias de pacientes con CPCP, las cuales, contienen al menos el 50% de células tumorales. Se realizó la extracción de RNA total, el cual, fue hibridado en un microarreglo de expresión (NimbleGene). Se seleccionaron 14 genes modulados en los tumores de CPCP para ser validados por qRT-PCR. El total de los genes desregulados fue analizado por herramientas bioinformáticas para conocer sus funciones biológicas y procesos celulares en los cuales participan. Finalmente se seleccionó un gen para ser validado de manera funcional en 2 líneas celulares de CPCP a través de ensayos de migración e invasión *in vitro*.

7. METODOLOGÍA

7.1 OBTENCIÓN DE BIOPSIAS. Las biopsias de cáncer de pulmón y de tejido pulmonar normal fueron colectadas en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), a través de una colaboración entre el INER y la UACM. Las biopsias fueron obtenidas de pacientes que llegaron voluntariamente a este centro con sospecha de carcinoma pulmonar de acuerdo a los procedimientos de ética del INER. Las biopsias de los tumores y de tejido pulmonar normal fueron obtenidas de los pacientes después de haber firmado el acuerdo de aceptación y la carta de consentimiento informado. Las biopsias de los tumores y tejidos normales fueron embebidas en un medio criosolidificable (Tissue-Tek) en criotubos de plástico y almacenados a -80°C para su preservación hasta el momento de su análisis. Posteriormente se realizó la revisión de los expedientes clínicos para confirmar el diagnóstico clínico de CPCP. De los tumores que se tenían frescos se procedió a realizar un corte de 2 µm y se tiñó con hematoxilina y eosina observándose al microscopio óptico para determinar el porcentaje de células tumorales en las muestras.

7.2 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE BIOPSIAS DE PULMÓN. Para obtener el RNA total de las muestras se emplearon homogenizadores Wheaton. El procedimiento consistió en utilizar 200 µl de Trizol (Life Technologies) y homogenizar suavemente el tejido 10 veces sobre hielo. Posteriormente el lisado fue recuperado con una jeringa de 5 ml y se depositó en un microtubo de 1.5 ml y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente con el fin de disociar los

complejos de nucleoproteínas. Después, se añadieron 40 µl de cloroformo por cada 200 µl de Trizol empleado y se mezclaron por inversión durante 15 s. El microtubo se incubó durante 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C. Después de la centrifugación, la mezcla se separó en dos fases una fase orgánica y otra acuosa. Después se recuperó la fase acuosa la cual contiene el RNA y se añadieron 100 µl de isopropanol para precipitar el RNA durante 1h a -20°C. Nuevamente, se realizó una centrifugación a 12,000 g durante 15 min a 4°C, el sobrenadante se eliminó y el RNA se lavó con etanol al 75% y se realizó otra centrifugación a 7500 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante fue desechado y el RNA se dejó secar durante un lapso de 5 min. El RNA se resuspendió en un volumen de 20 µl de agua DEPC. La cuantificación del RNA total fue realizada en un equipo Nanodrop 2000 el cual nos permitió realizar el cálculo de la relación A_{260}/A_{280} , el cual es una manera común para expresar la pureza del RNA. La integridad del RNA fue evaluada mediante geles de agarosa al 1% en buffer MOPS 1X, teñidos con Gel Red.

7.3 HIBRIDACIÓN DE MICROARREGLOS DE EXPRESIÓN GÉNICA. Se analizó la expresión génica de los tumores y tejido normal, mediante microarreglos de expresión utilizando el sistema de NimbleGene. Cada lámina contiene 43000 genes. En este ensayo se utilizó 1 µg de RNA total obtenido del tumor y tejido normal el cual fue marcado diferencialmente. Dicho marcaje, consiste en la adición de un fluoróforo (Cy3 o Cy5). Se hibridaron los microarreglos durante toda la noche a 42°C en cámaras de hibridación húmeda (Corning) para laminillas de 25x75 mm. Las laminillas se lavaron con solución de SDS-0.1%/SSC-0.1X y se

analizaron en un scanner Axon, GenPix4000A (Molecular Devices). Mediante el uso del software DEVAS y ANAIS, se eliminó el ruido de fondo, se normalizaron los datos y se capturaron los datos de intensidad de fluorescencia de cada punto.

7.4 VALIDACIÓN. Se validaron 14 genes desregulados mediante qRT-PCR usando oligonucleótidos específicos de cada gen, los cuales se diseñaron usando la secuencia de nucleótidos obtenida de la base de datos del genbank. Los oligonucleótidos diseñados se muestran en la Tabla 1 y fueron obtenidos usando el programa Primer Blast. Para el procedimiento de validación de los genes se realizó una RT en dos pasos. Primero se obtuvo el cDNA, para lo cual se empleó 1 µg de RNA total que fue mezclado con 5 mM MgCl, 50 mM KCl, 10 mM TRIS-HCl, pH 8.3, 0.25 mM de dNTP, 40 U de inhibidor de RNase, 0.25 µM de oligo-dT y 50 U de superscript II (Invitrogen). La mezcla fue incubada por 45 min a 42° C. Una vez obtenido el cDNA se empleó 1 µl para realizar el procedimiento de PCR en tiempo real, usando buffer complementado con 2.5 mM de MgCl, 0.5 µM de oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 1) y 1 U DNA polimerasa (Invitrogen). Se utilizó GAPDH como control interno de expresión. Los fragmentos amplificados se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa y se tiñeron con Gel Red. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador de tiempo real ABIPRISM 7900 (Applied Biosystems), utilizando la mezcla maestra “SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems). Las muestras se amplificaron por duplicado en placas de 96 pozos para reacciones óptimas (Applied Biosystems). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 µl con

los siguientes elementos: 10 µl de la mezcla maestra, 3 µl de agua, 1 µl de cada cebador 5 µM y 5 µl de cDNA. Las condiciones térmicas de la amplificación fueron las siguientes: un ciclo inicial de 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C. Para normalizar los datos obtenidos se uso como gen de referencia GAPDH y esta normalización se realizo con el método 2 delta-delta Ct expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control o gen de referencia.

7.5 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO. Los datos obtenidos del perfil de expresión de DNA de los tumores, fueron analizados por herramientas bioinformáticas, para conocer la función, localización, interacciones con proteínas y las vías de señalización en las que cada gen participa. Las herramientas que se emplearon fueron DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) y KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación por qRT-PCR

Gen	Número de acceso ^a	Oligos en sentido	Oligo en anti-sentido	Tamaño del amplicon (pb)
ASPH	<u>NM_032466</u> 3	GAAGTCTTCCCAGGTGCTG	ATTCTTACGCTGGGCCATTG	300
PAFAH2	<u>BC0011158.1</u>	CAGGAAGCCGAGAGGAAAC	GGAGATTCTGACCCTCCATC	300
TTC19	<u>AK025958.1</u>	AGAGTTGGCTGAGCTGTC	ACAACCCCTCCTTCACTAAG	300
TMC8	<u>AK090478.1</u>	GTGATGCTGGGTGAGACAA	GCACTTGAAAAGCCTCTAGC	300
SFTPB	<u>NM_198843</u> 2	CCTACCTCACTCTCTCCCTT	CTTCCAGGCATTTCACTCTT	300
RGS5	<u>BC030059.1</u>	GATTCCCTGGACAAACTCCT	CTTTAGGAGCCTCCGTTTGA	300
RGS17	<u>BC013117.1</u>	CAGAGAGTTCCTCCGAACAG	ACTCGAGAATCAAGACTGACC	300
POU4F3	<u>NM_002700</u> 2	TGATTCCATGTCACCCGC	AGGCTCTCATCAAAGCTTCC	300
PPP2R2C	<u>BC032954.2</u>	AGAACATCATTGCCATCGCC	CAGTGCTGTGACTTTCTTCC	300
DIRAS2	<u>NM_017594</u> 3	TTTGTGAAAGGCACATTCCG	GGAGTACACCAGGATGAAGG	300
PTCHD2	<u>NM_020780</u> 1	GGCGGCAAGATCTACTATGA	CTGAGTAGTAGTTGGGCAGG	300
H3F3A	<u>BC029405.1</u>	GATTCGCAAACCTCCCTTCC	TAGCTGGATGTCTTTTGCA	300
FABP2	<u>BC111791</u>	TAGCAGACGGAAGTGAAGTC	GCGCCAAGAATAATGCTCAA	300
HPS6	<u>NM_024747</u> 5	ATGACTACCCTTCAGGCATC	AGTATTGCATACACAGGTCCA	300

^a GenBank database; pb, pares de bases.

7.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE RGS5 EN LÍNEAS CELULARES PULMONARES.

7.6.1 CULTIVO CELULAR

Se cultivaron cuatro líneas celulares de CPCP representadas por NCI-H209, NCI-H187, NCI-H128 y NCI-H69, en frascos de cultivo de 75cm² usando medio de cultivo RPMI 1640 complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% penicilina/estreptomicina. Las células fueron incubadas a 37°C con CO₂ al 5%. Para el mantenimiento de los cultivos celulares se realizaron pases cuando la confluencia alcanzo el 80%. Para esto se recuperaron las células en un tubo estéril y se centrifugaron a 1500 g por 5 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en medio de cultivo RPMI complementado, inoculando nuevamente en frascos de cultivo desechables de 75 cm². Para los distintos ensayos realizados en este proyecto las células fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia del 80%.

7.6.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Las células cultivadas se recuperaron en un tubo de 50 ml y se centrifugaron a 1500 g, 5 min a 4°C. Se retiró el medio con una pipeta Pasteur procurando no tomar el paquete celular. Las células fueron homogenizadas en 0.960 ml de buffer de lisis TNTE 0.5% a 4°C mezclado con inhibidores de proteasas complete (ROCHE). La homogenización se llevó a cabo con ayuda de una micropipeta, el producto homogenizado fue centrifugado a 14,000 g por 5 min a 4°C, el sobrenadante recuperado fue cuantificado mediante la técnica de Bradford (BioRad).

7.6.3 ENSAYO DE WESTERN BLOT

Se realizó un ensayo de western blot para conocer la expresión de la proteína de RGS5 en las cuatro líneas celulares de CPCP (NCI-209, NCI-H187, NCI-H69, NCI-128). Se corrieron las

proteínas geles de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE) y se verificó la calidad de los extraxtos. Se cargaron en cada pozo 50 µg de proteínas totales de cada línea celular. Los geles se corrieron por electroforesis a 100 volts durante 2 h. Un gel fue teñido con solución azul de Coomassie por 2 h y se lavó con solución desteñidora. Finalmente fue visualizado en el fotodocumentador (BioRad). El segundo gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa de un poro de 0.5 µm (BioRad) por transferencia semi-húmeda a 25 volts por 30 min. La membrana fue bloqueada con leche al 5% en PBS1X en agitación toda la noche a 4°C. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces 5 min con PBS1X, se incubó con el anticuerpo primario antiRGS5 (goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology cat. Sc-28491) a una concentración de 1:1000 en PBS 1X durante 2 h, la membrana se lavó 3 veces con PBS 1x durante 5 min. Se incubó con un anticuerpo secundario anticabra (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:4000 en PBS 1X durante 1 h. Nuevamente se lavó la membrana 3 veces por 5 min usando PBS1X y fue revelada con ECL (GE healthcare).

7.6.4 ENSAYO DE INTERFERENCIA DE RNA

Para evaluar las funciones biológicas de RGS5 en células de cáncer de pulmón. Se procedió a silenciar su expresión mediante RNA de interferencia. Se diseñaron short hairping RNAs (shRNA) con el programa siRNA selection tool (Life Technologies). Para minimizar la posibilidad de inespecificidad de los shRNAs, se realizó un alineamiento de nucleótidos contra el genóma usando BLAST. Los oligonucleótidos de doble cadena que codifican para los shRNAs se clonaron en el plásmido pSilencer 5.1 U6 retro (Ambion) la secuencia fue confirmada por secuenciación automática. La efectividad de la construcción en el silenciamiento de genes se analizó mediante transfección transitoria en líneas celulares de

CPCP y la detección de RGS5 se hizo realizando un Western blot 48 h después de la transfección.

7.6.5 PREPARACIONES DEL VECTOR DE CLONACIÓN pSILENCER 5.1-U6 RETRO

En este estudio se utilizó como vector de silenciamiento al pSilencer 5.1 U6 Ambion, el cual es un sistema de vector retroviral que permite el estudio a largo plazo de la reducción de la expresión génica en modelos de cultivo de células mediante la expresión estable de siRNAs.

A) TRANSFORMACIÓN DEL PLÁSMIDO pSILENCER 5.1-U6 RETRO

Para este procedimiento se descongelaron en hielo 50 µl de células competentes DH5α. Se les adicionó 150 ng/µl de plásmido y se incubaron 20 min en hielo. Posteriormente se les dió un choque térmico a 42°C por 90 seg para permitir que el plásmido se integrará a la bacteria. Después se incubaron 3 min en hielo y se adicionaron 200 µl de medio Luria Broth (LB) temperado sin antibiótico. Finalmente se incubaron en agitación a 200 g por 60 min a 37 °C y se espatularon 100 µl en cajas LB ampicilina y se crecieron toda la noche a 37 °C.

B) EXPANSIÓN Y OBTENCIÓN DEL PLÁSMIDO pSILENCER 5.1-U6 RETRO Para este procedimiento se empleo GeneJet Plasmid Kit (Thermo Scientific), el paquete celular se resuspendió en 250 µl de solución de resuspensión, y se transfirió a un tubo de 1.5 ml. Después se añadió 250 µl de solución de lisis y se mezcló. Se agregaron 350 µl de solución de neutralización y se mezclaron por inversión. El tubo fue centrifugado por 5 min a 12,000 g para sedimentar los restos celulares y el DNA cromosómico. Después el sobrenadante fue transferido a una columna y nuevamente el tubo se centrifugo 1 min a 12,000 g y se desecho el filtrado. A la mezcla se le agregó 500 µl de buffer de lavado y se procedió a centrifugar 1

min a 12,000 g. El residuo se desechó y se repitió el paso anterior. Después la columna fue transferida a un tubo nuevo añadiendo 50 µl de agua estéril dentro de la columna para eluir el DNA plasmídico, fue incubado 2 min a temperatura ambiente y centrifugado 2 min a 12,000 g. Finalmente, el plásmido se cuantificó y almacenó a -20°C hasta su uso.

C) LINEARIZACIÓN DEL VECTOR PARA LIGACIÓN:

Para linearizar el plásmido se prepararon digestiones con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III. Para ello se realizaron cuatro reacciones para cortar el plásmido con buffer amortiguador 2 µl, 1 µl BSA 1X, 2 µg de vector, 1 µl enzima de corte *Bam*HI, 1 µl enzima de corte *Hind*III, 10 µl H₂O, en un volumen final de 20 µl totales. La mezcla se incubó a 37°C toda la noche. El producto digerido fue visualizado en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X. Después se cortó la banda de interés del gel de agarosa y se purificó el plásmido cortado.

D) PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO LINEARIZADO

Para la purificación se empleó el kit Pure link quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). A la banda cortada se le agregaron 30 µl de solución GS1 por cada 10 mg de gel obtenido, después se incubó a 50°C por 15 min hasta que se disolvió el gel. Una vez disuelto la mezcla se transfirió a una columna en un tubo de 1.5 ml, y fue centrifugado 1 min a 12,000 g, se eliminó sobrenadante y se añadieron 700 µl de solución de W9 con etanol y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Nuevamente el tubo fue centrifugado a 12000 g 1 min. Se eliminó el sobrenadante. El contenido en la columna se centrifugó y fue eluido en 20 µl de agua estéril.

E) PREPARACIÓN DEL INSERTO

Para la preparación del inserto se inició con la resuspensión de los shRNA de RGS5 diseñados.

		Secuencia	sentido,	5`
ATCCGCAGAACAACTATGGACTTGCTTCAAGAGAGCAAGTCCATAGTTGTTCTGCTTTTGG				
AAA	3´.	Secuencia	antisentido,	3´

GCGTCTTGTTGATCCTGAACGAAGTTCTCTCGTTCAGGTATCAACAAGACGAAAAACCTTT

TCGA 5´. Los oligonucleótidos se resuspendieron en H₂O estéril a una concentración final de 10 µg/µl y fueron cuantificados en el Nanodrop 2000. Se visualizaron en un gel de agarosa al 1% para evaluar su integridad. Se preparó un stock de trabajo a una concentración de 1 µg/µl. Posteriormente se realizaron reacciones de alineamiento de 50 µl para cada par de oligonucleótidos (tabla 9) que contienen 2 µl de oligonucleótido sentido (10 µg/µl), 2 µl de oligonucleótido antisentido (10 µg/µl) y 46 µl de buffer de alineamiento 1X (30 mM HEPES pH 7.4, 100 mM acetato de potasio y 2 mM de acetato de magnesio). Las reacciones se mezclaron y se incubaron a 90 °C por 3 min y se enfriaron a 37° C 1 h. De esta mezcla se tomaron 5 µl de templado de shRNA alineado y se diluyó en 45 µl de H₂O de ampollita para obtener una concentración final de 8 ng/µl. Los oligonucleótidos alineados se almacenaron a -20°C hasta su uso.

F) LIGACIÓN DEL INSERTO EN EL VECTOR pSILENCER

Para la ligación se prepararon reacciones de 10 µl para cada shRNA alineado que contiene 1 µl inserto shRNA diluido, 6 µl H₂O, 1 µl buffer 10X de T4 ligasa, 1µl de vector pSilencer, 1 µlT4 DNA ligasa (5U/µl). Como control negativo se usó una reacción que contiene 1µl de buffer de alineamiento 1X, 6 µl de H₂O, 1 µl de buffer 10X de ligasa T4, 1 µl de vector pSilencer y 1 µl

de T4 DNA ligasa. Las reacciones fueron incubadas 12 h a 14°C. Después la mezcla total de cada reacción fue transformada en placas LB ampicilina, usando células competentes DH5α. Las colonias que crecieron aun en presencia de antibiótico se consideraron como positivas y se procedió a expandirlas y purificarlas por miniprep usando el kit GeneJet Plasmid Kid.

7.6.6 ENSAYO DE TRANSFECCIÓN

Para este ensayo se cultivaron 50×10^5 células de CPCP en placas de pozos 24 h antes de la transfección usando medio de cultivo normal (RPMI 1640 complementado). Al día siguiente fue retirado el medio de cultivo y se transfectaron las células con dos concentraciones 4 µg y 5 µg de la construcción pSilencer-RGS5.1 usando el reactivo lipofectamine 2000 (Invitrogen). Como control negativo se uso un shRNA scramble y células no transfectadas. Las células transfectadas fueron incubadas a 37°C en presencia de CO₂ al 5%, después de 48 h. Las células transfectadas se emplearon para ensayos funcionales. Para evaluar la eficacia de transfección, se realizó un Western blot para detectar disminución de la expresión de RGS5 en líneas celulares de CPCP.

7.6.7 ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR EN CÁMARAS TRANSWELL

Los ensayos de migración celular se realizaron empleando cámaras transwell (Corning) con un poro de 0.8 micras. Las líneas celulares NCI-H187 y NCI-H128 previamente fueron transfectadas en placas de 6 pozos con la construcción pSilencer-RGS5.1 (5 µg). Se sembraron 10×10^{10} células en las cámaras transwell. En el pozo superior el medio de cultivo carece de suero fetal bovino, mientras que el de la cámara inferior se encontraba debidamente complementado con suero fetal bovino funcionando como quimioatrayente. Al día siguiente de la resiembra, el número de células que atravesaron la membrana y se establecieron en el

fondo del pozo inferior fueron contabilizadas de manera manual en cámara de Newbauer. Se considero como referencia la cantidad de células que migran en la condición control (células sin transfectar y células transfectadas con shRNA scramble). Dicho conteo se expresó en porcentaje considerando a la totalidad de células migrantes en la condición control como un 100%.

7.6.8 ENSAYO DE INVASIÓN CELULAR EN CÁMARAS TRANSWELL CON MATRIGEL

La invasión celular fue evaluada mediante el uso de cámaras transwell (Corning, poro 0.8 micras) con una base de matrigel (Basement Membrane Matrix-BD Bioscience) la cual solo es degradada por células invasivas mediante la secreción de proteasas. Células NCI-H187 y NCI-H128 previamente transfectadas en placas de 6 pozos con la construcción pSilencer-RGS5.1 (5 µg) fueron sembradas en cámaras transwell con una base de matrigel (100,000 células por cámara). En el pozo superior el medio de cultivo carece de suero fetal bovino, mientras que el de la cámara inferior se encuentra debidamente complementado con suero fetal bovino funcionando como quimioatrayente. Al día siguiente de la resiembra, el número de células que atravesaron la membrana y se establecieron en el fondo del pozo inferior fueron contabilizadas de manera manual en cámara de Newbauer. Se consideró como referencia la cantidad de células que migran en la condición control (células sin transfectar y células transfectadas con shRNA scramble). Dicho conteo se expresó en porcentaje, considerando a la totalidad de células migrantes en la condición control como un 100%.

7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para su análisis a los datos de los ensayos experimentales se les calculo la media de dos ensayos independientes y la desviación estándar. Considerando diferencia significativa cuando los valores de p fueron menores a 0,05 (GraphPad Prism 5).

8. RESULTADOS

8.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES QUE SE EXPRESAN DIFERENCIALMENTE EN LOS TUMORES CPCP EN COMPARACIÓN CON EL TEJIDO PULMONAR SANO, MEDIANTE UN ANÁLISIS CON MICROARREGLOS DE EXPRESIÓN.

La tecnología de los microarreglos de expresión es una herramienta ideal para el estudio de patrones de expresión de miles de genes de forma simultánea. Los estudios basados en el uso de microarreglos, han permitido identificar diferencias de expresión de genes implicados en diversos procesos biológicos, como las respuestas a enfermedades o a cambios ambientales e incluso han permitido identificar nuevos genes y funciones génicas.

En este estudio se analizaron 30 biopsias tumorales de cáncer de pulmón (figura 8), 21 biopsias correspondieron a adenocarcinoma (CPCNP) y 9 a cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP). Las 9 biopsias de CPCP fueron revisadas por un patólogo y 5 biopsias presentaron más del 50% de células tumorales. Estas fueron empleadas en el estudio de microarreglos de DNA. En la tabla 2 se muestran las características clínicas de cada biopsia. Las 5 biopsias fueron tumores primarios, 3 corresponden a varones y dos a mujeres. El principal factor de riesgo asociado fue tabaquismo en todas las muestras. También se obtuvo tejido sano de cada paciente. De estas 5 biopsias tumorales, se emplearon tres especímenes con su respectivo tejido sano para el microarreglo de DNA.

Se procedió a extraer el RNA total de las biopsias utilizando el método de TRIZOL. La calidad del RNA fue visualizada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer MOPS1X y fue cuantificado en el equipo Nanodrop. La figura 9 nos ilustra la integridad de

cada muestra procesada en donde se observan las bandas correspondientes al RNA ribosomal 28s, 18s.

El RNA obtenido de cada biopsia normal y biopsia tumoral fue convertido en cDNA mediante una reacción de transcripción reversa. El cDNA fue marcado con Cy3 (tumor) y Cy5 (normal) e hibridado en el microarreglo de DNA. De este análisis se detectaron un total de 863 genes desregulados de manera significativa (índice de cambio = 2, $p < 0.05$). En el Anexo 1 se muestran los 863 genes desregulados en las diferentes biopsias tumorales comparadas con el tejido sano. Del total de 863 genes, 640 genes se encontraron reprimidos y 223 genes se encontraron sobreexpresados en los tumores de CPCP. La figura 10 nos muestra un grafico del total de los genes identificados. De manera representativa en la tabla 3 y 4 se muestran 20 genes reprimidos y 20 genes sobreexpresados en los tumores CPCP. Otro dato interesante encontrado en este análisis de microarreglo de DNA es que varios genes desregulados tiene una función descrita en cáncer (tabla 5). Un ejemplo es PCDH10 tiene como función el establecimiento de las conexiones célula a célula en el cerebro y se ha reportado reprimido en CPCNP donde induce proliferación y migración celular (51) Otro ejemplo es el gen ACLY el cual genera resistencia a medicamentos en cáncer de colon (47). El gen BRSK2 que en cáncer de páncreas se encuentra reprimido, esto tiene consecuencia que estas células tumorales hagan metástasis a ganglios linfáticos (49).

Posteriormente se realizó un análisis comparativo entre los resultados de los microarreglos de expresión reportados por Bangur (2002); Taniwaki (2006) y los obtenidos en esta investigación. Estos datos se enlistan en la tabla 6. Comparando con los datos reportados por Bangur y cols; (2002) detectamos una similitud de 4 genes sobreexpresados ADCYAP1,

COLT1, STAT1 y CTSB, mientras que encontramos 6 genes similares a los reportados por Taniwaki y cols; (2006), dos genes sobreexpresados (CTSB, MT2A), y cuatro reprimidos (HIST1H2BM, TOP1, FNTA y NEB). En común con ambos reportes detectamos el gen CTSB el cual Bangur lo reporta como sobreexpresado 2.0 veces y Taniwaki lo reporta reprimido -3 veces, al igual que en este trabajo donde lo encontramos reprimido -2.5 veces.

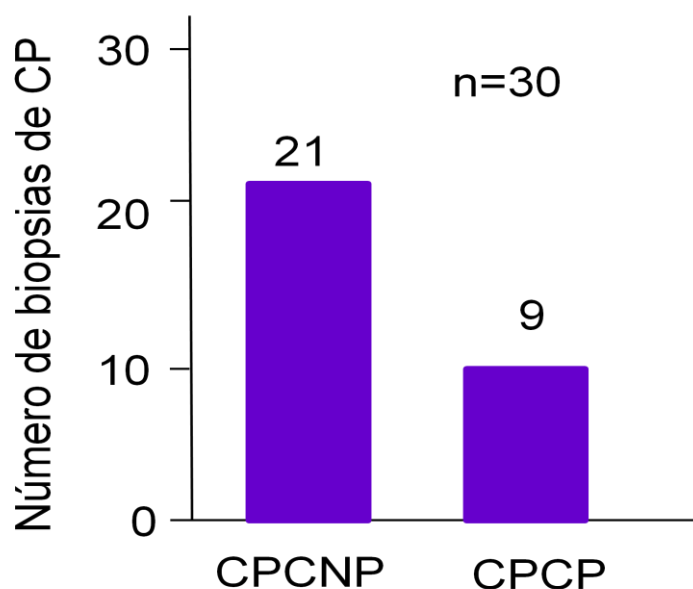


Figura 8. Representación grafica del total de biopsias de CP analizadas para el estudio.

(n=30). De las 30 biopsias tumorales, 21 biopsias correspondieron a adenocarcinoma y 9 biopsias fueron de CPCP.

Tabla 2. Datos clínicos de los tumores de CPCP seleccionados

Paciente	Edad	Sexo	Diagnóstico clínico	Grado tumoral	Presencia de metástasis	Principal factor de riesgo
1	67	F	CPCP	3	SNC	Tabaco
2	56	M	CPCP	4	SNC	Tabaco
3	71	M	CPCP	3	SNC	Tabaco
4	86	M	CPCP	ND	SNC	Tabaco
5	57	F	CPCP	ND	SNC	Tabaco

F, Femenino; M, masculino; CPCP, Cáncer de pulmón de células pequeñas; ND, No determinado; SNC, Sistema nervioso central.

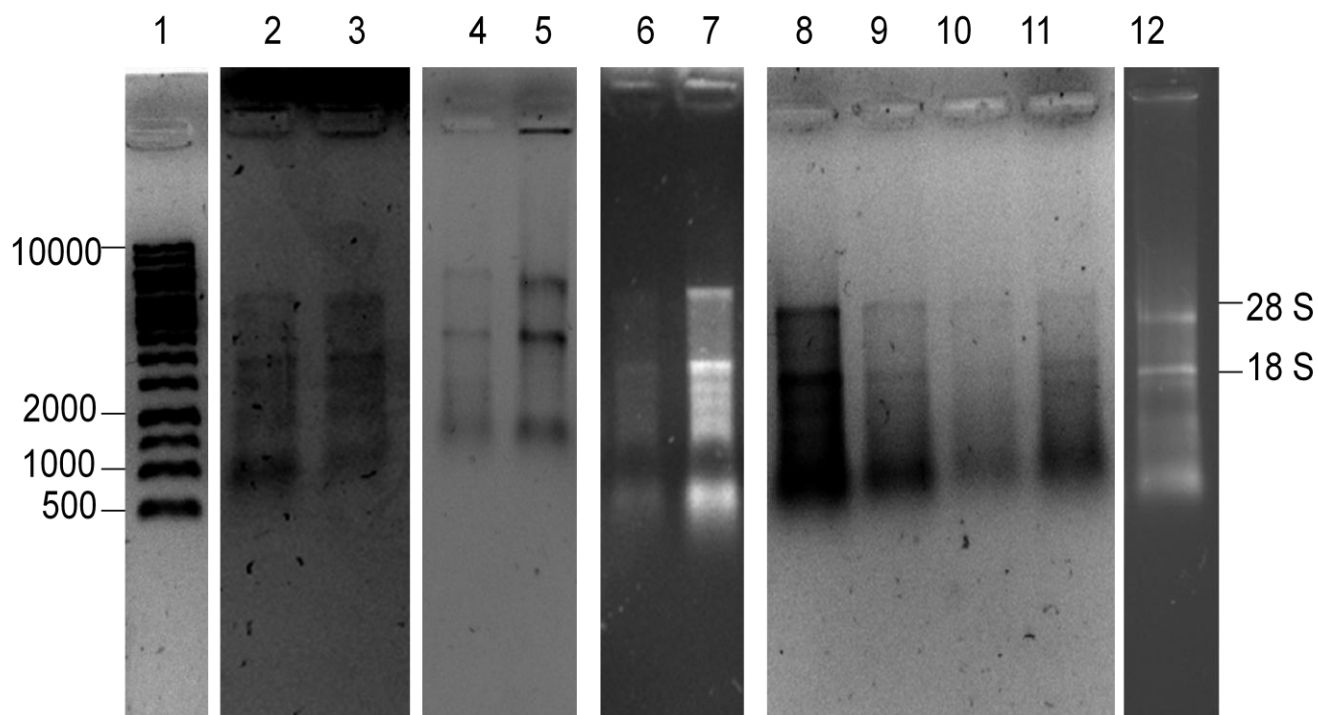


Figura 9. Integridad del RNA total obtenido de las biopsias de CPCP y tejido pulmonar normal. Se muestran geles de agarosa al 1% y el corrimiento electroforético de las muestras de RNA (500 ng). Carril 1, MW 1Kb. Carril 2, RNA biopsia tumoral 1; Carril 3, RNA tejido sano 1; Carril 4, RNA biopsia tumoral 2; Carril 5, RNA tejido sano 2; Carril 6, RNA biopsia tumoral 3; Carril 7, RNA tejido sano 3; Carril 8, RNA biopsia tumoral 4; Carril 9, RNA tejido sano 4; Carril 10, RNA biopsia tumoral 5; Carril 11, RNA tejido sano 5; Carril 12, RNA MDA-MB-231 (control).

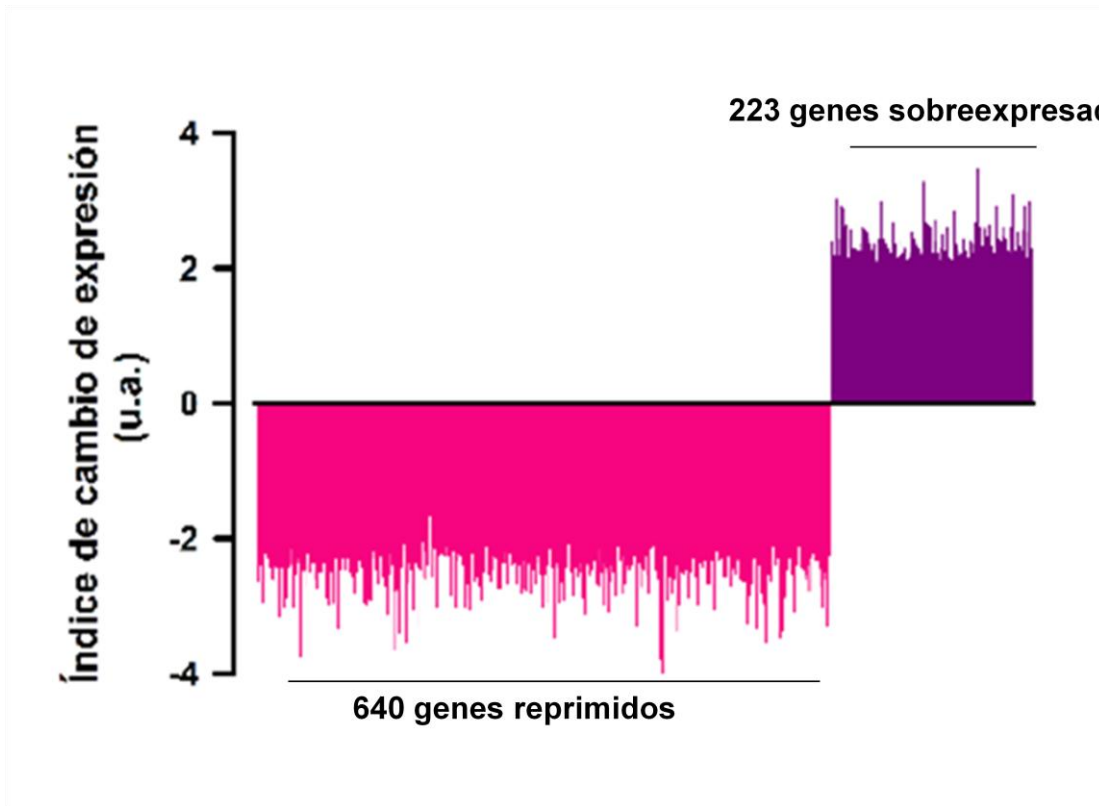


Figura 10. Expresión relativa de los 863 genes modulados en los tumores de CPCP. El grafico muestra un agrupamiento del total de los genes desregulados, de los cuales se detectaron 640 genes reprimidos y 223 genes sobreexpresados.

Tabla 3. Genes reprimidos en los tumores CPCP.

Símbolo del gen ^a	Proteína ^b	Valor de p	Nivel de cambio
PPP2R2C	Proteína fosfatasa 2 , subunidad reguladora B	0.0264	-3.394
DIRAS2	RAS con unión a GTP	0.00803	-3.391
POU4F3	Dominio POUF, clase 4	0.0108	-3.476
PTCHD2	Dominio parcheado que contiene 2	0.0399	-3.267
FABP2	Ácido graso proteína de unión 2 , intestinal	0.0469	-3.045
HPS6	Síndrome Hermansky-Pudlak 6	0.0277	-3.033
PTPRT	proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor	0.000601	-2.626
H3F3A	Histona H3	0.0228	-2,625
DYNC2H1	Dineína citoplasmática 2	0.0103	-2.485
VMD2	Bestrofina 1	0.0642	-2.438
HACE1	Dominio hect y ankitina	0.0026	-2.405
EPN1	Epsina 1	0.0277	-2.306
CDC2L2	Ciclina dependiente de cinasa 11A	0.00572	-2.225
KIF1B	Kinesina 1B	0.00393	-2.23
PCBP2	Proteína de unión poli (rC) 2	0.00539	-2.213
TSC1	Esclerosis tuberosa 1	0.0149	-2,158

NCR3	Receptor 3 de activación de la citotoxicidad natural	0.0428	-2.110
ZNFX1	Dedo de Zinc que contiene NFX1 z	0.0461	-2.095
GPSN2	Cadena muy larga reductasa enoil - CoA	0.00286	-2.066
PTK9	Twinfiling proteína de unión a actina	0.00545	-2.055
^a GenBank database; ^b UniProt database.			

Tabla 4. Genes sobreexpresados en los tumores CPCP.

Gen ^a	Nombre de la proteína ^b	Valor de p	Nivel de cambio
ASPH	Aspartil/asparaginil beta hidoxylasa	0.0207	3.481
RGS5	Regulador de la señalización de la proteína G 5	0.00184	3.33
PAFAH2	Factor activador de plaquetas acetilhidrolasa 2	0.000749	3.078
EWSR1	Proteína EWS de unión a RNA	0.04	3.036
MON1A	Proteína MON1 homologa A	0.15	2.919
SFTPB	Surfactante pulmonar asociada a la proteína B	0.0242	2.904
SLC4A11	Proteína transportadora de bicarbonato de sodio	0.0125	2.446
C16orf60	Proteína N	0.189	2.423
DREV1	Proteína metiltransferasa 9	0.0116	2.388
TP53AP1	Proteína TP53	0.138	2.331
RGS17	Regulador de la señalización de la proteína G 17	0.0277	2.24
FES	Proteína tirosina cinasa Fes	0.00183	2.238
FBXO4	proteína F-caja 4	0.00109	2.198
BRSK2	proteína cinasa serina / treonina	0.00936	2.191

TMC8	Proteína de transmembrana 8	0.06	2.180
TTC19	Proteína mitocondrial tetratricopeptido19	0.00632	2.145
RHOT2	Rho GTPasa 2	0.00124	2.144
RPTN	Repetina	0.00192	2.104
CMTM5	CKLF-like dominio MARVEL que contiene CKLF	0.031	2.073
C1orf14	Proteína de unión del dominio SH2 SHC	0.0172	2.043
^a GenBank database; ^b UniProt database.			

Tabla 5. Genes modulados en los tumores de CPCP con función alterada en cáncer.

Símbolo del gen ^a	Proteína ^b	Nível de cambio	Función	Función en cáncer	Referencia
RGS5	Regulador de la señalización de la proteína G 5	3.33	Está involucrada en la formación de vasos sanguíneos y pericitos vasculares.	Sobreexpresado en CPCNP, carcinoma hepatocelular en el cual promueve metástasis.	46
ACLY	ATP citrato liasa	2.88	ATP citrato liasa es la principal enzima responsable de la síntesis de acetil-CoA citosólico en muchos tejidos.	ACLY genera resistencia a irinocetan en la línea celular SN38 de cáncer colorrectal, en las cuales esta sobreexpresado.	47
RGS17	Regulador de la señalización de la proteína G 17	2.24	La proteína atenúa la actividad de señalización de proteínas G activadas mediante la unión a GTP.	La inhibición de RGS17 mediante el uso de siRNA reduce la toxicidad celular inducida por quimioterapia en células de cáncer de ovario.	48
BRSK2	BR serina / treonina cinasa 2	2.19	Se expresa mayoritariamente en cerebro, donde juegan un papel clave en el	En cáncer de páncreas se encuentra reprimido, y esto tiene una estrecha	. 49

			establecimiento de la polaridad neuronal y sinaptogénesis.	relación con metástasis linfática y metástasis a distancia.	
CMTM5	Dominio transmembrana MARVEL	2.129	La proteína codificada puede exhibir actividad supresora de tumores.	CMTM5 se encuentra reducido en cáncer de próstata, lo cual se asocia a la reducción del crecimiento celular <i>in vivo e invitro</i>	50
PCDH10	Protocaderina 10	-2.81	Desempeñan un papel en el establecimiento y la función de las conexiones célula-célula específicos en el cerebro.	En CPCNP, PCDH10 esta reprimido y esto se debe a la metilación de su promotor. La expresión ectópica de PCDH10 en células tumorales, puede reducir de la proliferación celular y la migración.	51
GOLPH3	Fosfoproteína Golgi 3	-2.58	La proteína codificada por este gen es una proteína de membrana periférica de la pila de Golgi y puede tener un papel regulador en el tráfico de Golgi.	En cáncer gástrico tiene expresión elevada, esto se asoció con el tamaño del tumor, grado histológico, la profundidad de la invasión y la metástasis a ganglios linfáticos.	52
DSCP1	Proteína p53 inducible de		Es un gen inducible por estrés. Puede	En cáncer esta reprimida, la sobreexpresión	53

	Tumor 1	-2.5	inhibir el crecimiento de células de cáncer.	exógena de DSCP1 retardó el crecimiento celular en líneas tumorales.	
LAPTM4B	Lisosomal asociada a la proteína transmembrana 4B	-2.44	ND	En Cáncer de mama, LAPTM4B esta sobreexpresado, y esto se asocio positivamente con el estadio TNM, afectación ganglionar y la recurrencia a recaer. Los pacientes con niveles elevados de LAPTM4B tienen sobrevida corta	54
DYNLRB1	Dineina tipo 1	-2.1	La proteína citoplasmática codificado es capaz interactúa con factor de crecimiento TGF beta, y se ha implicado en la regulación de proteínas de la modulación de actina.	DYNLRB1 se encuentra reprimido en cáncer de ovario, sin embargo al inducir su expresión reduce la formación de tumores <i>in vivo</i> .	55

^a GenBank database; ^b UniProt database.

Tabla 6. Comparación de los perfiles de expresión de genes reportados por Bangur, Taniwaki y el obtenido en este trabajo.

Gen ^a	Proteína ^b	Bangur FC	Taniwaki FC	Este trabajo FC	Referencia
ADCYAP1	Adenilato ciclasa activadora del polipéptido 1	2.6	ND	-2	56
COTL1	Coactosina	3.63	ND	2.13	57,58
STAT1	Transductor de señal y activador de la transcripción 1	2.97	ND	-2.101	59
CTSB	Catepsina B	2.02	-3	-2.5	60
MT2A	Metalotioneina 2A		-4.1	-2.03	61
HIST1H2BM	Cluster de Histona 1	ND	2.2	-2.15	62
TOP1	Topoisomerasa 1	ND	2.2	-2.34	63
FNTA	Farnesiltransferasa	ND	2.3	2.2	64
NEB	Nebulina	ND	6.6	-2.63	65
^a GenBank database. ^b UniProt database. ND. No detectado					

8.2 VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE 14 GENES MODULADOS EN LOS TUMORES CPCP.

Generalmente los resultados de los experimentos de microarreglos tienen que ser validados por medio de otras técnicas entre ellas la PCR en tiempo real es la más extendida. Un método muy utilizado por su menor costo es el emplear fluoróforos que se unen a DNA de doble cadena y produce fluorescencia. Nosotros empleamos Sybr Green para lo cual diseñamos los oligonucleótidos procurando que contengan un porcentaje de G y C mayor al 50%, que tuvieran una T_m similar, para evitar la formación de dímeros y una amplificación inespecífica. Del total de los 863 genes desregulados en los tumores CPCP, se eligieron los 14 genes con mayor grado de modulación. Como criterio se seleccionaron genes con un nivel de cambio mayor a 2 o menores a -2 para validar el microarreglo. Se realizó una PCR usando DNA genómico para cada par de oligonucleótidos para verificar su especificidad. En la figura 11 se muestra la amplificación de los fragmentos de los genes elegidos y se confirmó que corresponden al amplicón de 300 pb. Como control de carga empleamos GAPDH el cual, amplificó un fragmento de 450 pb. Una vez comprobada la especificidad de cada par de oligonucleótidos, se realizó la qRT-PCR para cada las de RNA de tejido tumoral y tejido sano empleadas en el microarreglo de DNA. Los datos fueron normalizados mediante el método de $2^{-\Delta\Delta ct}$, para obtener el nivel de expresión de cada gen. En la figura 12 se muestran las curvas de amplificación de cuatro genes obtenida en tejido tumoral y tejido sano. Los datos de la expresión de cada gen obtenidos de muestran en la tabla 6, así como el promedio obtenido en la tres muestras analizadas. Posteriormente, realizamos una comparación del promedio del nivel de cambio de cada gen obtenido en la qRT-PCR y la expresión obtenida en el microarreglo. Como se muestra

en la figura 13 la expresión de cada gen en los dos diferente ensayos es muy similar con lo que con lo comprobamos que los resultados del microarreglo de DNA son confiables.

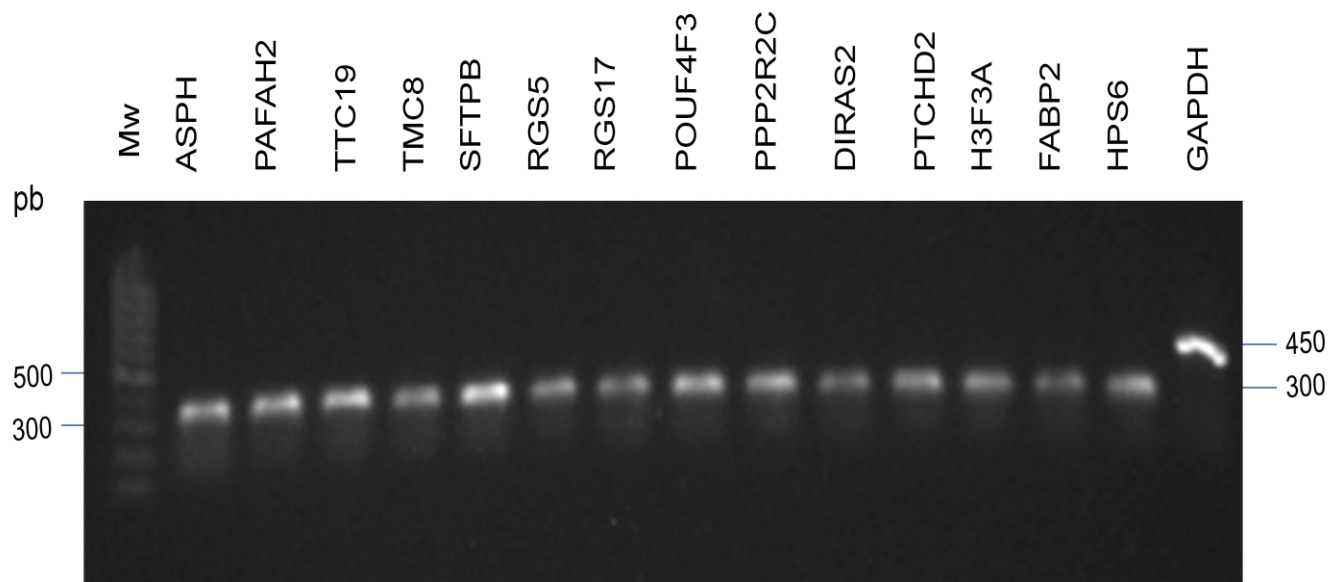


Figura 11. Amplificación de los fragmentos de 14 genes desregulados en los tumores de CPCP. PCR a partir de 100 ng/μl de DNA genómico donde se observa la amplificación del fragmento (300 pb) de cada gen. Como se amplificó GAPDH (450pb).

Tabla 7. Expresión de los 14 genes más desregulados en cada uno de los 3 tumores de CPCP obtenida mediante qRT-PCR.

Gen	Tumor 1	Tumor 2	Tumor 3	Promedio	SD
RGS5	3.025	3.38	3.25	3.22	0.18
RGS17	2.95	3.18	3.32	3.15	0.19
ASPH	3.28	3.44	3.29	3.34	0.09
PAFAH2	3.02	2.72	3.65	3.14	0.47
TTC19	3.47	3.68	3.36	3.51	0.16
TMC8	3.3	3	2.4	2.9	0.46
SFTPB	3.3	3	2.5	2.94	0.40
POU4F3	-3.39	-3.5	-3.45	-3.45	0.06
PPP2R2C	-2.95	-3.23	-3.52	-3.23	0.29
DIRAS2	-3.06	-3.23	-3.54	-3.28	0.24
PTCHD2	-3.73	-2.76	-2.88	-3.12	0.53
H3F3A	-4.37	-2.56	-2.2	-3.05	1.16
FABP2	-2.88	-3.07	-3.15	-3.03	0.14
HPS6	-2.88	-3.07	-3.15	-3.03	0.14

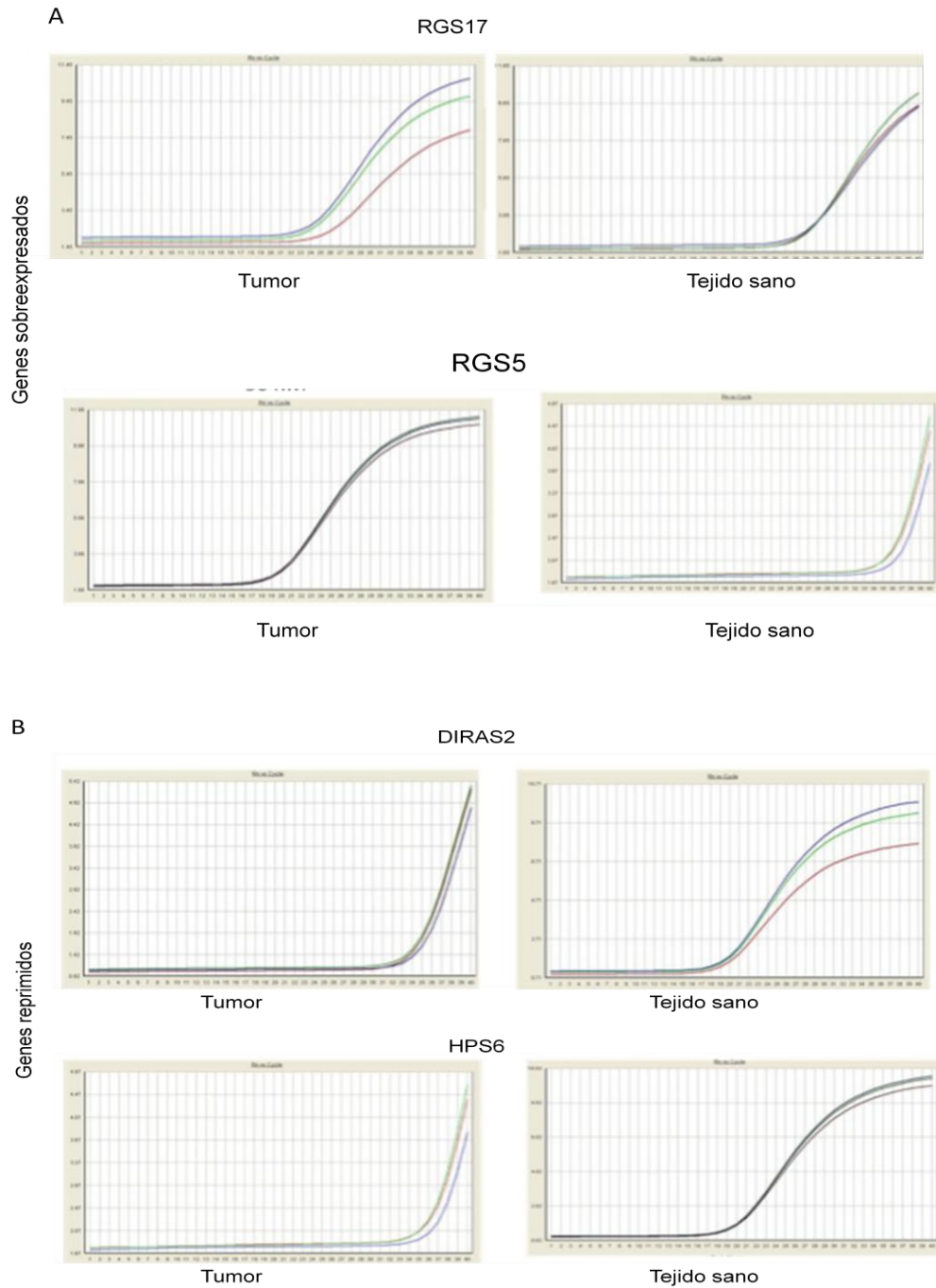


Figura 12. Curvas de amplificación de los genes RGS17, RGS5, DIRAS2 y HPS6 desregulados en los tumores de CPCP. (A) Plots de amplificación de genes sobreexpresado (RGS17 y RGS5) en tumores y tejido sano. (B) Plots de amplificación de genes reprimidos (DIRAS2 y HPS6) en tumores y tejido sano.

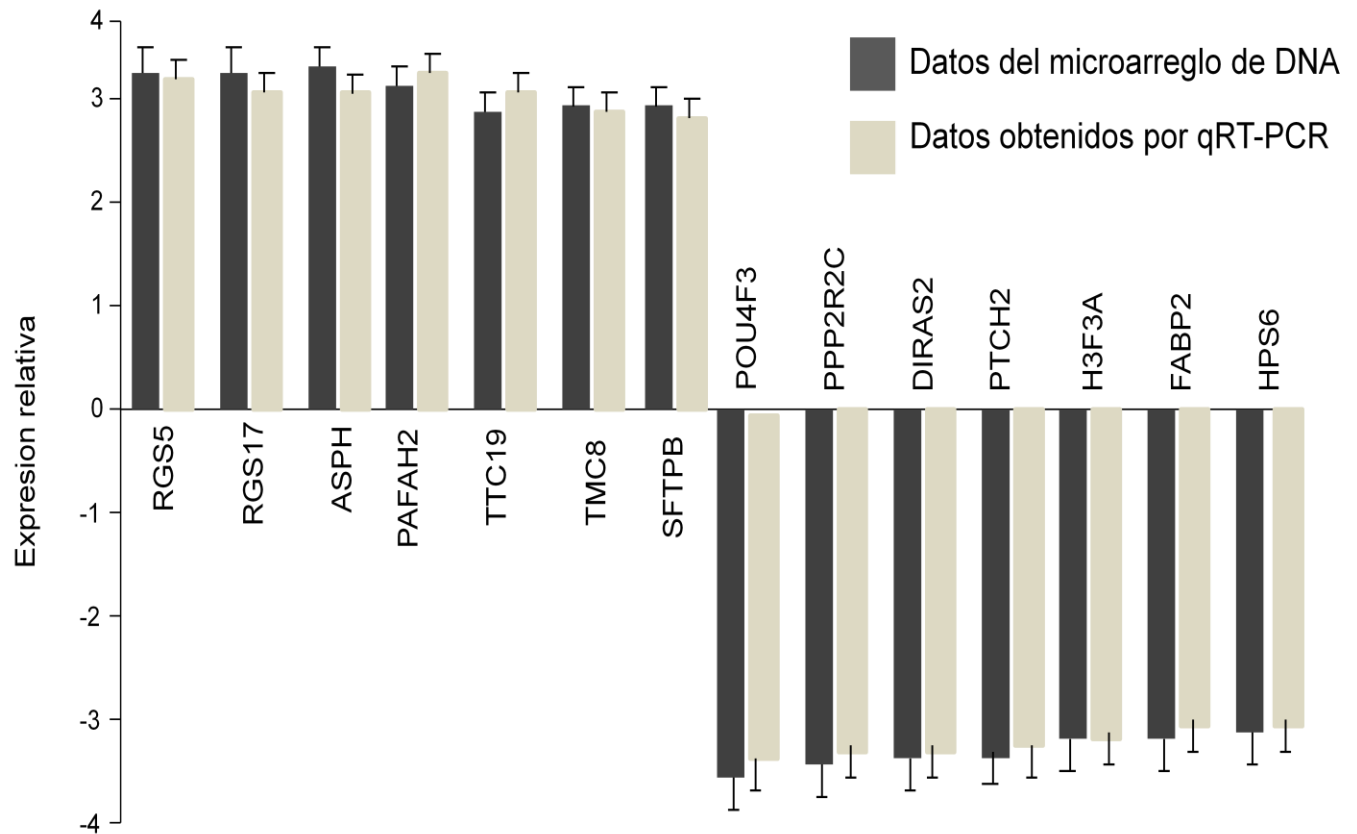


Figura 13. Comparación de la expresión de los genes más desregulados en los tumores de CPCP. Se muestran los datos del promedio de la expresión de cada gen en las diferentes muestras obtenidos mediante microarreglo de DNA y qRT-PCR y se incluye su desviación estándar.

8.3 DETERMINACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y PROCESOS BIOLÓGICOS DONDE PARTICIPAN LOS GENES DESREGULADOS EN LOS TUMORES DE CPCP.

Los procesos celulares en los cuales participan los genes desregulados detectados en los tumores de CPCP fueron determinados mediante herramientas bioinformáticas. El programa DAVID proporciona la interpretación funcional de grandes listas de genes derivados de estudios de genómica, tales como microarreglos y proteómica. DAVID brinda un conjunto de herramientas de anotación funcional para entender el significado biológico de una lista de genes. El programa es capaz de identificar temas biológicos enriquecidos, en términos de ontología de genes y descubre grupos de genes relacionados funcionalmente. También predice genes que participen en alguna vía molecular y relaciona genes con enfermedades. La segunda herramienta empleada fue KEGG esta base de datos consiste en una colección de bases de datos de genomas, rutas enzimáticas, y químicos biológicos. La base de datos PATHWAY registra las redes de interacciones moleculares dentro de las células y variantes de ellas específicas a organismos particulares. La base de datos KEGG puede ser utilizada para la modelización, simulación, la navegación y extracción de datos.

El análisis con las dos herramientas bioinformáticas nos permitió agrupar a los 863 genes desregulados significativamente en los tumores de CPCP de acuerdo al proceso biológico en el cual, están involucrados. En la figura 14 se muestra el resultado obtenido en el agrupamiento realizado en el programa DAVID, obteniendo diferentes procesos celulares. Uno de ellos es el proceso de reacciones de óxido reducción donde participan 29 genes (ERO1L, NDUFB11, NDUFA11, NDUFV2, ALDH8A1, AKR1A1, ASPH, BCKDHD, CYP1A1, CYP1A2, CYP2C18, CYP2C19, CYP2R1, CYP21A2, CYP26AB1, DEGS2, FADS2,

FRRS1, G6PD, PIWIL2, PAM, PRDX4, PCYOX1, CYP4F12, UQCRB, STEAP1, SLC1A3, TM7SF2, TPH1). Otro proceso celular es la cadena transportadora de electrones donde participan 25 genes (ATP5G2, ATP5J2, ATP13A5, ATP1B4, ATP2B4, ATP6V0A4, RHAG, DRD2, KCT16, KCNA2, PSEN1, STEAP1, SLC11A2, SLC13A5, SLC17A4, SLC24A2, SLC31A1, SLC39A14, SLC39A9, SLC4A8, SLC4A11, SLC5A1, SLC5A2, SLC8A3, TSC1). Procesos relevantes asociados a cáncer son la trasducción de señales con 17 genes involucrados (ARL1, ARL4A, ARL8B, DIRAS2, RAB28, RAB38, RAN7L1, RAB9A, RAPGEF2, RASGEF1C, RHOBTB1, RHOBTB2, GNA13, RHOQ, RHOT2, RRAS, ROPN1B), replicación del DNA (RAD51, WRNIP1, ACHE, CTGF, MCM3AP, ORC5L, POLD2, POLE2, RPA3, TERF1, TOP1) y la adhesión celular con 10 genes (CDH23, DSG4, PTPRT, PCDH10, PCDH17, PCDHA13, PCDHA3, PCDHA9, PCDHB18, PCDHGA10). También se realizó un agrupamiento de genes mediante revisión bibliográfica para enriquecer estos resultados. De los 863 genes se identificaron 156 genes que están involucrados en diversos procesos de la carcinogénesis, los cuales, como migración, invasión, metástasis, angiogénesis, y ciclo celular (tabla 8). Por mencionar algunos genes, se identificaron 3 metaloproteínas, las cuales se encuentran en niveles aumentados en los tumores humanos y esto se asocia a la metástasis. La MMP23B se ha identificado sobreexpresada en glioblastoma (36) y la MMP26 esta sobreexpresado en linfoma de células B difusas (37). Estos niveles de expresión no coinciden con lo encontrado en este estudio ya que nosotros los encontramos reprimidos. Sin embargo, la MMP25 se detectó sobreexpresada como es el caso de carcinoma de células escamosas oral (38) y cáncer gástrico (39), donde la alta expresión se asoció a la invasión y metástasis. Otro grupo de genes identificados en nuestro estudio fueron los RGS (regulador de la señalización de la

proteína G), los cuales, modulan de manera negativa a los receptores GPCR. Estos por mencionar algunos de los genes desregulados en CPCP, sin embargo los datos obtenidos en un microarreglo de DNA nos brindan muchos datos para futuras investigaciones en este tipo agresivo de cáncer.

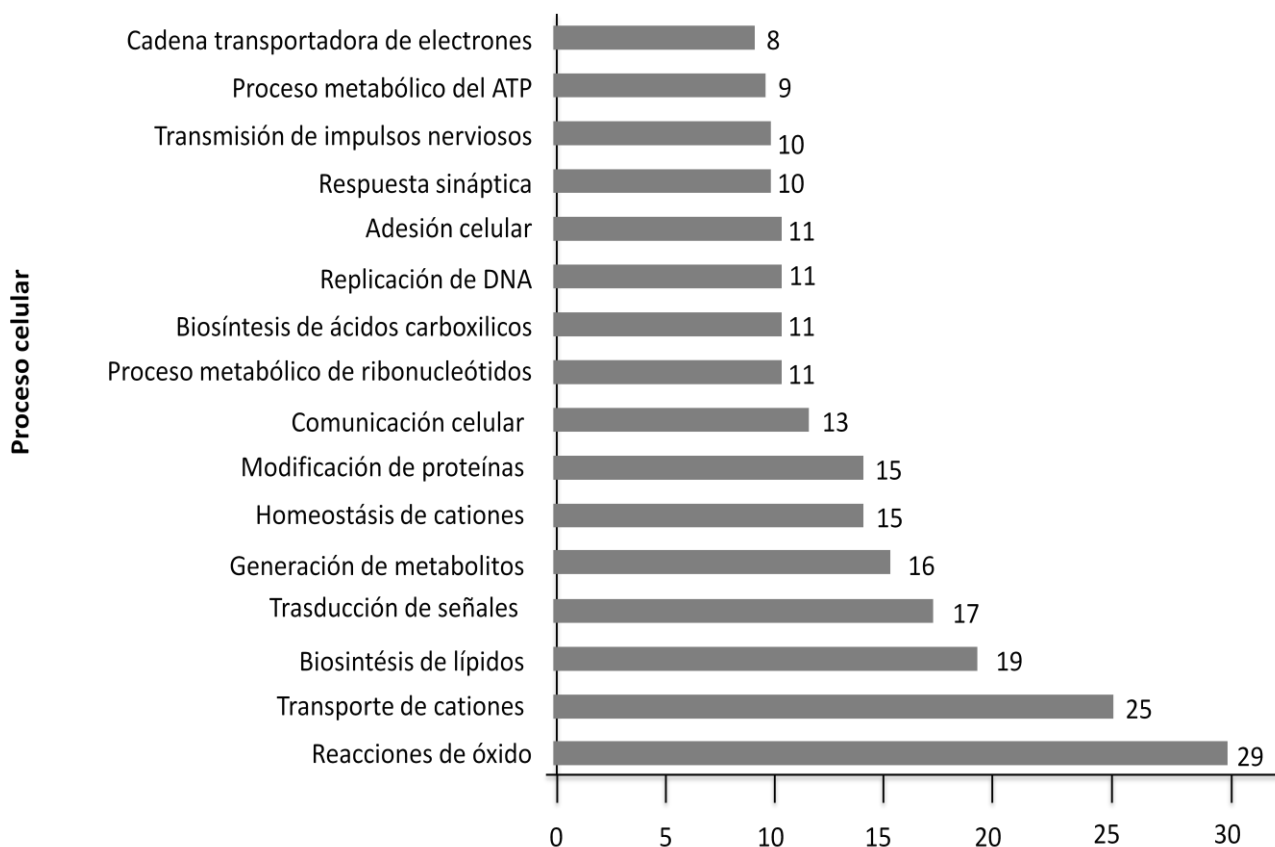


Figura 14. Procesos celulares donde participan los genes desregulados en los tumores de CPCP. Análisis obtenido mediante el programa bioinformático DAVID donde se muestran los procesos celulares en los cuales participan los genes desregulados en los tumores CPCP.

Tabla 8. Genes desregulados en CPCP con funciones relacionadas a los procesos de carcinogénesis.

Proceso celular	Número de genes	Gen
Metástasis, invasión celular y angiogénesis	59	MMP23B, KIF1B, HACE1, PTK9, EPN1, DRCTN, SEMA3B, STOML2, PALMD, FISH, CTGF, DPFG, HYAL3, CTSB, NDRG2, RNF125, RAB38, PRKCB, LY96, EPS8, RHOBTB2, TAJ, GAD1, DPAGT1, MBPER, SBSN, WNT1, AHI1, LITAF, WNT10B, MMP26, CCR8, ZNF300, FUT3, SMARCD3, CPLX2, HERPUD1, RAB28, BRCC3, PODXL, TRIM17, DEC1, LAPTM4B, PTBP2, TMSL8, PERP, CDH23. BRSK2, HNRPA1, RGS17, RGS5, ALCAM, CCL26, HAX1, CD22, MMP25, CREB3L1, IL19
Ciclo celular y proliferación celular	54	CDC2L2, PTPRT, TSC1, MAP4K4, EHF, DMTF1, MNT, ZNF185, NPDC1, HSF2, RQCD1, SSBP1, SH3GL, PPPR2C, DLEU2C, RHOBTB1, ADCYAB, CDC14A, AKT1, RPL6, NDRG4, GOLPH, HRH2, TLE6, CHPT1, NCR1, ELOVL1, CYP4F12, SLC11A2, FADS2, TOMM34, NRF1, ELOVL2, CYP2C18, IPF1, JMDJ1A, CMTM5, ACLY, FES, HIG2, TERF1, PBX2, FMNL1, BCHE, CD33, LRG5, TPH1, NOTCH4, DDX17, PIWIL2, IRF4.
Mecanismos epigenéticos	34	ARID1B, TSC1, BESTROPHIN1, SLC11A, DRD2A, NBEAL2, RAD51, LDOC1, MT2A, ASL, SLC29A2, PIGK, H3F3A, DNASE1, COL25A1, HIP2, CYP1A2, HTR4, ATP6V04, FABP2, MYO15A, PPR2R1B, SGCA, CHPT1, NCR1, ELOVL1, CYP4F12, SLC11A2, FADS2, TOMM34, NRF1, ELOVL2, CYP2C18, IPF1, JMDJ1A.
Respuesta inmune	8	BTN3A2, CD209, PPIA, FKBPL, CXCL11, CD96, CD6, KIR2DL3.

En negritas se muestra los genes sobreexpresados y el color claro muestra a los genes reprimidos.

8.4 ANÁLISIS FUNCIONAL DE UN GEN DESREGULADO EN LOS TUMORES PRIMARIOS DE CPCP EN LÍNEAS CELULARES DE CPCP.

Para la selección del gen a estudiar, se tomaron en cuenta varios criterios que incluyen el valor de cambio, el proceso celular, en el cual, participa y la evidencia de reportes previos en cáncer. De manera particular se seleccionó el Regulador de la Señalización de la proteína G 5 (RGS5), el cual, en condiciones fisiológicas participa como una molécula de transducción de señales, debido a que regula de manera negativa al receptor GPCR, al inactivar a la subunidad $G\alpha$ de la proteína G heterotrimérica. En los tumores analizados en este estudio RGS5 mostró una sobreexpresión de 3.3, al igual que en otros tipos de cáncer tales como el cáncer gástrico, CPCNP y carcinoma hepatocelular. Su sobreexpresión se asocio a migración e invasión celular. Sin embargo a la fecha se desconoce su función en CPCP razón por la cual es importante determinar su participación en este tipo de cáncer.

8.5 ANÁLISIS DEL PAPEL DE RGS5 EN LA MIGRACIÓN E INVASIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE CPCP

8.5.1 EXPRESIÓN DE RGS5 EN LÍNEAS CELULARES DE CPCP

Inicialmente se evaluó la expresión de la proteína RGS5 en cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas (NCI-H187, NCI-H128, NCI-H209, NCI-H69), mediante ensayos de western blot. La figura 15 nos muestra que RGS5 se expresó en niveles similares en las cuatro líneas celulares de CPCP analizadas,

por lo que se seleccionaron las líneas H187 y H128 para evaluar la función de RGS5 en la migración e invasión celular.

8.5.2 SILENCIAMIENTO DE RGS5 MEDIANTE RNA DE INTERFERENCIA CON shRNAs EN LÍNEAS CELULARES DE CPCP

Para realizar el silenciamiento del gen RGS5 se empleo un shRNA, el cual, forma un loop que es usado para silenciar la expresión del gen diana a través de RNAi. Para proceder al silenciamiento de RGS5, se uso la secuencia que muestra la tabla 9, en rojo se marca las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, en verde se muestra la secuencia sentido y antisentido, en azul la secuencia que forma el loop y en negro la secuencia terminadora para la RNA polimerasa III.

8.5.3 PREPARACIÓN DEL VECTOR pSILENCER 5.1-U6 RETRO

El plásmido pSilencer (figura 7) fue transformado, purificado y cuantificado tal como se describe en los métodos. La figura 16 nos muestra la integridad del DNA plasmídico purificado. Posteriormente se preparó el plásmido para obtener una estructura lineal y así poderlo ligar en el inserto correspondiente a la secuencia blanco de RGS5. Esto se realizó mediante una doble restricción utilizando las enzimas de corte específicas para este plásmido (*Bam*HI y *Hind*III). El producto total de las digestiones fue visualizado en un gel de agarosa al 1% (figura 17), del cual, se corto una banda y fue purificada. La integridad del producto purificado también se visualizó en un gel de agarosa al 1%.

8.5.4 CONSTRUCCIÓN pSILENCER-RGS5.1

Se procedió a la clonación del inserto RGS5 en el vector pSilencer de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para evaluar la ligación se realizó una doble digestión utilizando las enzimas de corte BamHI y HindIII y confirmar la liberación de inserto (Figura 18). Para confirmar la identidad del inserto liberado, se realizó la secuenciación automática del plásmido recombinante pSilencer-RGS5 (figura 19).

8.5.5 SILENCIAMIENTO DE RGS5 EN LÍNEAS CELULARES DE CPCP

Para realizar el silenciamiento de RGS5 se transfectaron las células NCI-H187 con la construcción pSilencer-RGS5.1 a una concentración de 4 y 5 µg. En la figura 20 se muestra un ensayo de western blot donde se observa que la expresión de la proteína RGS5 se ve disminuida 50% cuando se transfectan las células a una concentración de shRGS5.1 de 4 µg, y disminuye un 20% cuando se transfectan las células con la construcción shRGS5.1 a una concentración de 5 µg. Con este resultado se decidió realizar los ensayos funcionales de migración e invasión celular transfectando a las células de CPCP con la construcción a una concentración de 5 µg. La expresión de β-actina utilizada como control no presentó cambios significativos en su expresión.

8.6 EL SILENCIAMIENTO DEL RGS5 EN LAS CÉLULAS NCI-H187 Y NCI-H128 REDUCE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR

El efecto del silenciamiento del gen RGS5 en la migración se analizó en cámaras transwell a 24 h y 48 h. El número de células que migraron a la parte inferior de la cámara en la condición control fue considerado como el 100%. La figura 21 c muestra que las células NCI-H187 no transfectadas y las células transfectadas con el scramble (5 ug) no mostrarán diferencias estadísticas significativas en la migración celular respecto del control (células no transfectadas). Sin embargo las células H187 transfectadas con la construcción shRGS5.1 mostraron una reducción en la migración en un 35% y 30% a las 24 h y 48 h respectivamente. En las células NCI-H128 también se observó una reducción en la migración de un 45% a 24 h y un 40% a 48 h comparadas con los grupos control (figura 22 C). Este ensayo demostró que RGS5 puede estar participando en el proceso de la migración celular en las dos líneas celulares de CPCP analizadas.

8.7 EL SILENCIAMIENTO DE RGS5 EN CÉLULAS NCI-H187 Y NCI-H128 REDUCE LA INVASIÓN CELULAR

Este ensayo se basa en el principio de que las células con capacidad invasiva secretan proteasas que les permite degradar la matriz extracelular y atravesar la lámina basal. En este caso, las cámaras transwell fueron preparadas con una capa de matrigel que simula la matriz extracelular que será degradada por proteasas excretadas por las células con capacidad invasiva. Los resultados

muestran que número de células que migraron a la parte inferior de la cámara en la condición control fue considerado como el 100%. La figura 21 D las células transfectadas con el scramble no muestran diferencias estadísticas significativas en la invasión respecto del control que son las células no transfectadas. Sin embargo las células H187 transfectadas con la construcción shRGS5.1 mostraron una reducción en la invasión del 40% en 24 h y 48 h. En la línea celular NCI-H128 se observó su capacidad de invadir y degradar la matrigel fue en un 55% a 60% comparadas con las células no transfectadas (figura 22 D). Considerando este resultado indica que RGS5 posiblemente participa en el proceso de invasión celular en CPCP..

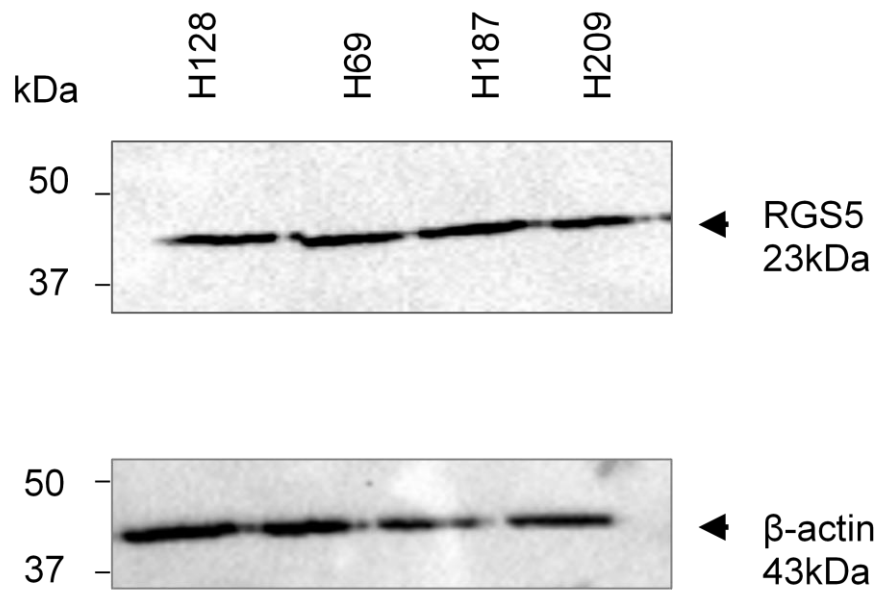


Figura 15. Expresión de RGS5 en líneas celulares derivadas de CPCP.

Evaluación de la expresión de RGS5 en extractos proteícos de las líneas celulares de CPCP H128, H69, H187 y H209 por Western blot. (A) Expresión de RGS5 (23 kDa). (B) expresión de β -actina (43 kDa) utilizada como control.

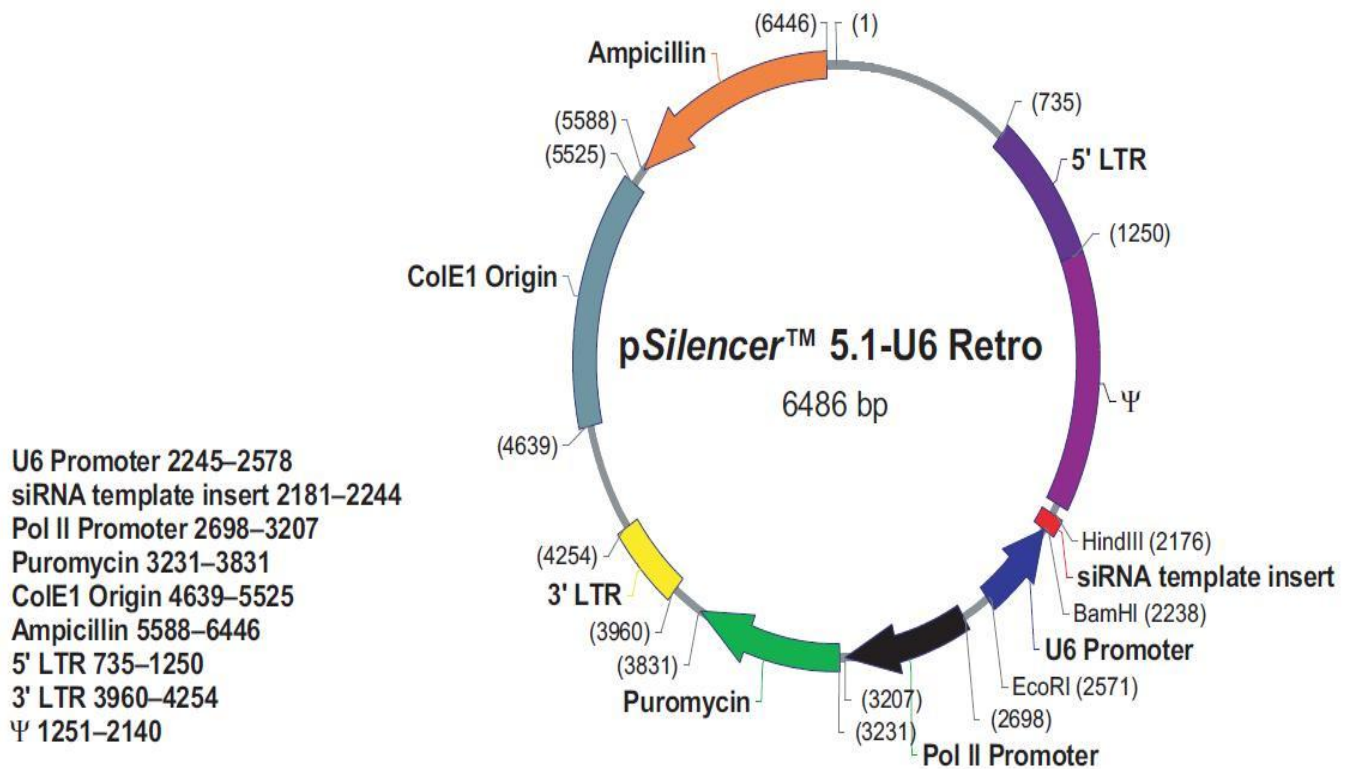


Figura 7. Mapa del vector plasmídico pSilencer 5.1-U6 Retro. El vector pSilencer 5.1-U6 Retro tiene un tamaño de 6486 pb, proporciona resistencia a ampicilina y puromicina, tiene secuencias de reconocimiento a las enzimas de corte a *Bam*H1 y *Hind*III (sitio de clonación donde se inserta el shRNA).

Tabla 9. Secuencia diseñada para el silenciamiento de RGS5 y su posición en la secuencia del gen.

Secuencia sentido	5' ATCCGCAGAACAACTATGGACTTGCTTCAAGAGAGCAAGTCCATAGTTGTTCTGC TTTTT GGAAA – 3'
Secuencia antisentido	3' – G CGTCTTGTTGATCCTGAACG AAGTTCTCT CGTTCAGGTATCAACAAGACG AAAAA CCTT TTCGA – 5'
Posición en el gen RGS5	GTTTTGAAGTTTTCAAAGACTGGCTCTGCTGTTAAGAAGTTGTAAGCTTAAAGCGGAGGAGCTA AGCCACCTGCCAAAATGTGCAAAGGACTTGCAGCTTTGCCCCACTCATGCCTGGAAAGGGC CAAGGAGATTAAGATCAAGTTGGGAATTCTCCTCCAGAAGCCAGACTCAGTTGGTGACCTTG TCATTCCGTACAATGAGAAGCCAGAGAAACCAGCCAAGACCCAGAAAACCTCGCTGGACGA GGCCCTGCAGTGGCGTGATTCCCTGGACAACTCCT GCAGAACAACTATGGAC TTGCCAGT TTCAAAAGTTTCTGAAGTCTGAATTCAGTGAGGAAAACCTTGAGTTCTGGATTGCCTGTGA GGATTACAAGAAGATCAAGTCCCCTGCCAAGATGGCTGAGAAGGCAAAGCAAATTTATGAA GAATTCATTCAAACGGAGGCTCCTAAAGAGGTGAATATTGACCACTTCACTAAGGACATCAC AATGAAGAACCTGGTGGAACCTTCCCTGAGCAGCTTTGACATGGCCCAGAAAAGAATCCAT CCCTGATGAAAAGGATTCTCTGCCTCGCTTTGTGCGCTCTGAGTTTTATCAGGAGTTAATC AAGTAGTAATTTAGCCAGGCTATGAAATCATCCTGTGAGTTATTTCTCCATAATAACCCTGC ATTTCCCATTAATCTACATATCTTCCACAGCAGCTTTGCTCAGTGATACCCACATGGGAAAA ATCCCAGGGGATGTTGCTTACTCTTTTGGCCACACTGCTTTGGATACTTATCTACTGTCCGA AGGCCTTCTTTCCCCACTCAATTCTTCTGCCCTGTTATTAATTAAGATATCTTCAGCTTGTA GTCAGACACAATCAGAATCACAGAAAAATCCTGCCTAAGGCAAAGAAATATAAGACAAGACT ATGATATCAATGAATGTGGGTTAAGTAATAGATTTCCAGCTAAATTGGTCTAAAAAAGAATAT TAAGTGTGGACAGACCTATTTCAAAGGAGCTTAATTGATCTCACTTGTTTTAGTTCTGATCCA GGGAGATCACCCCTCTAATTATTTCTGAACTTGGTTAATAAAAGTTTATAAGATTTTACGAA GCAGCCACTGTATGATATTNAAAGCAAGCGGNGCTGAATTCTATACNTGCCCGGGCGGCA GCTCGAGCCCTNTAGTGAGTGAGCCNAATTCTGCAGATATCCCCACACTGGCGGGCGGTC GANCATGCNTCTACANGGCCAATTCGCCTAATNTNANTCGTATT

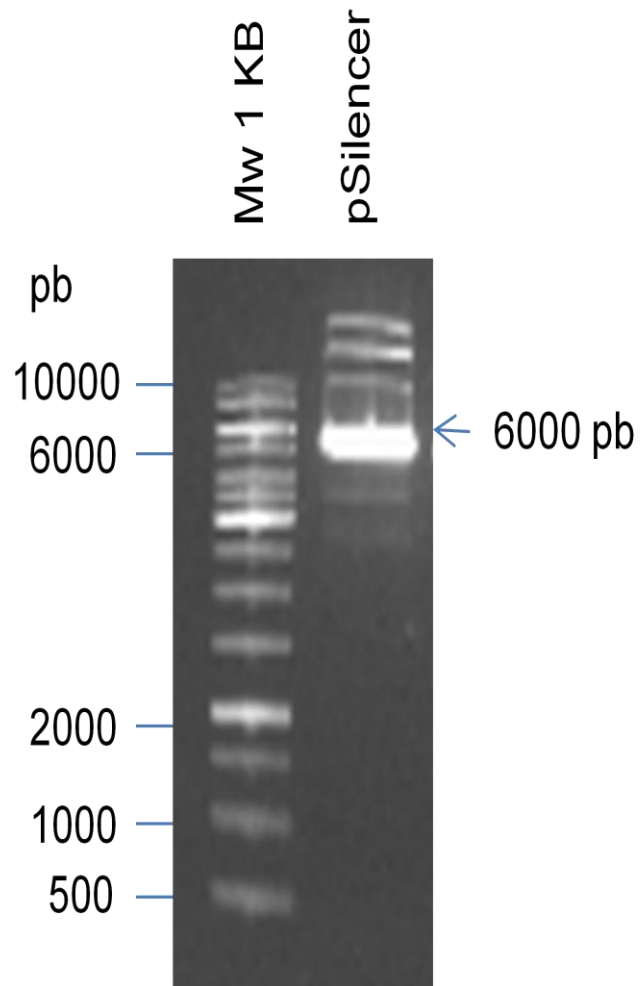


Figura 16. DNA plasmídico del plásmido pSilencer purificado. Se observa el plásmido en estructura enrollada, superenrollada y relajada. Gel de agarosa 1%. Carril 1 Mw 1Kb, Carril 2 plasmido p Silencer (500 ng).

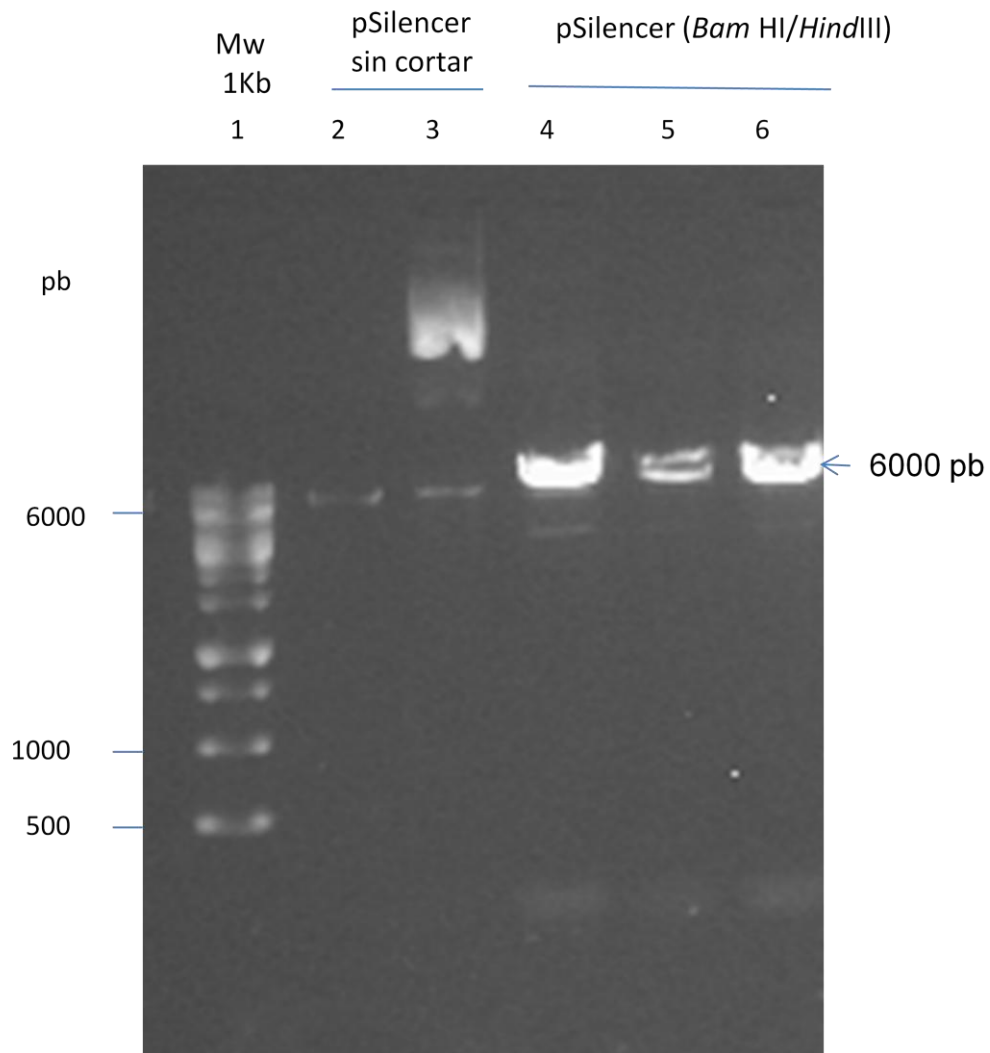


Figura 17. Digestión y purificación del vector pSilencer. Gel de agarosa al 1% donde se muestra la doble digestión del vector pSilencer (1ug) con las enzimas de corte *Bam*HI y *Hind*III. Carril 1 Mw 1Kb, carril 2 y 3, pSilencer sin cortar, carril 4,5 y 6, plásmido cortado.

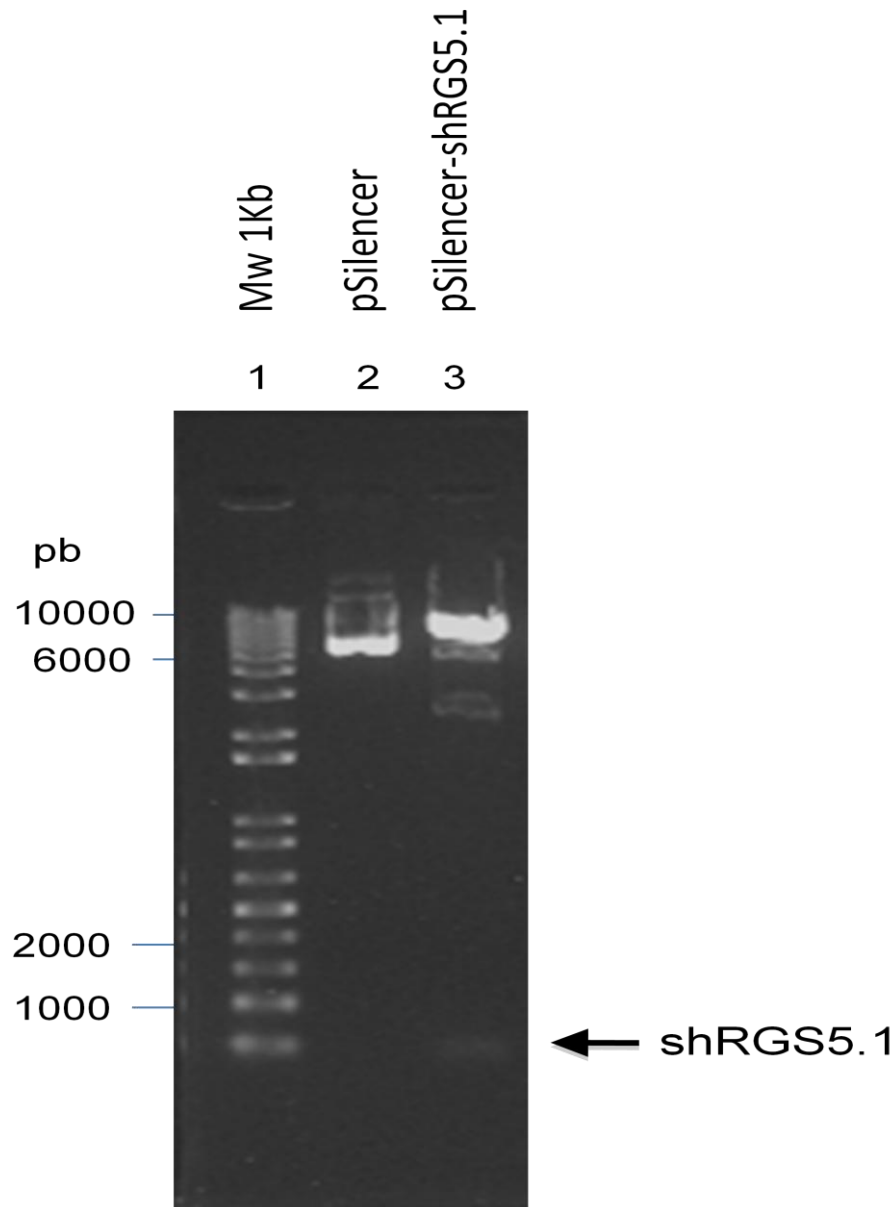


Figura 18. Doble restricción para confirmar la liberación del fragmento de shRGS5.1. Gel de agarosa al 1% donde se muestra una doble restricción usando enzimas de corte *Bam*HI y *Hind*III para confirmar la liberación del inserto correspondiente a shRGS5. Carril 1, Mw 1 Kb, carril 2 pSilencer sin cortar (500 ng); Carril 3, construcción pSilencer-shRGS5.1.

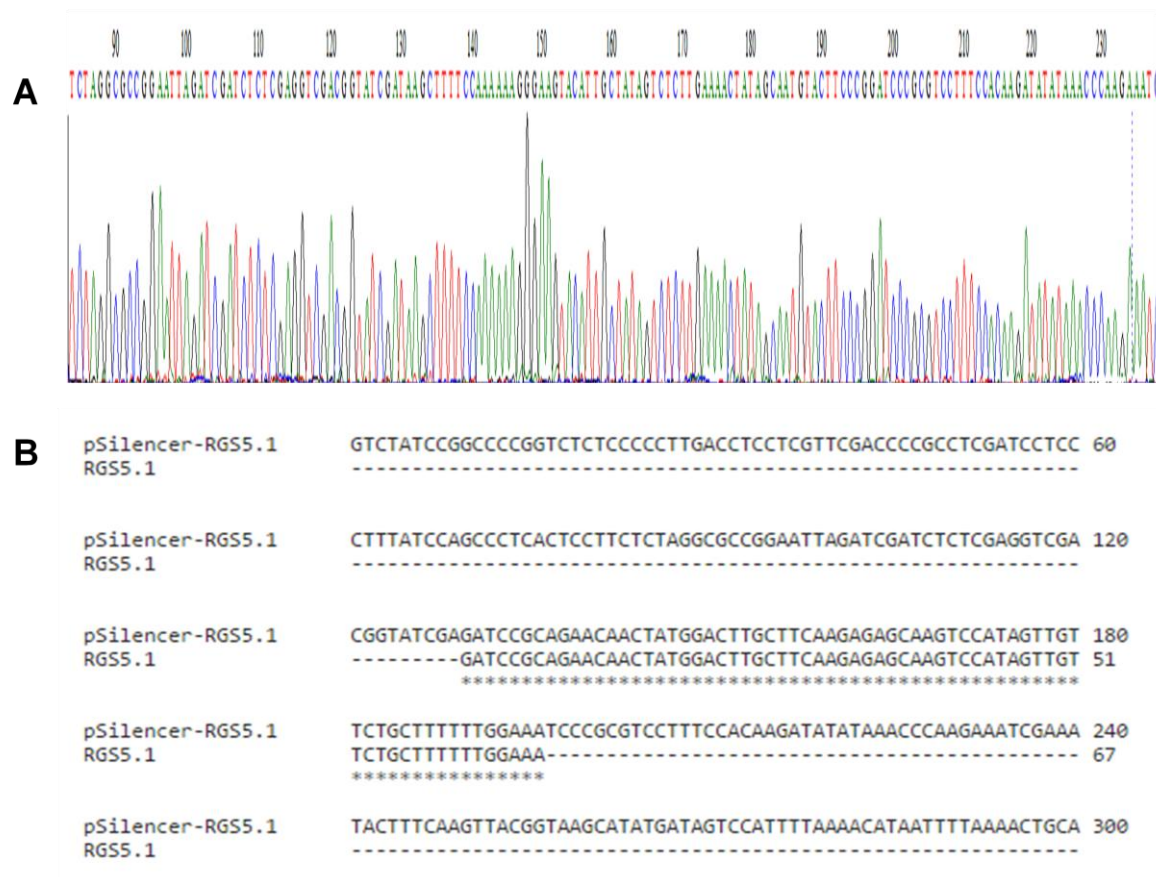


Figura 19. Secuenciación y alineamiento de la secuencia de la construcción pSilencer-RGS5.1. (A) Electroferograma correspondiente a la secuenciación de la construcción pSilencer-RGS5.1. (B) Alineamiento de la construcción pSilencer-RGS5.1 con el oligonucleótido shRGS5.1.

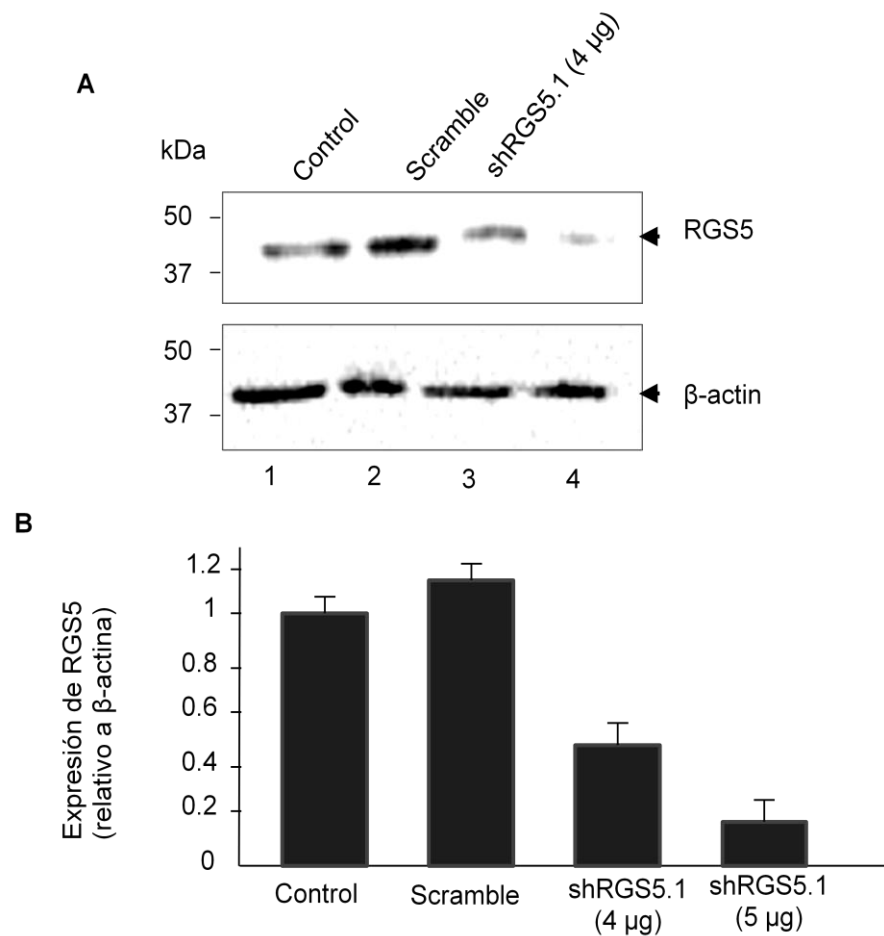


Figura 20. Silenciamiento de RGS5 mediante el uso de la construcción pSilencer-RGS5.1. Células H187 transfectadas con la construcción shRGS5 en dos concentraciones (4 ug y 5 ug). Las células no transfectadas y transfectadas con scramble se utilizaron como controles. (A) Western Blot donde se evaluó el silenciamiento usando un anticuerpo específico para RGS5. Se uso β -actina como control. La línea 1 corresponde al control, línea 2 pertenece al scramble, línea 3 muestra shRGS5.1 (4ug) y la línea 5 muestra shRGS5.1 (5ug). (B) Densitometría de las bandas de A. Los datos representan la media de dos ensayos independientes y su desviación estándar.

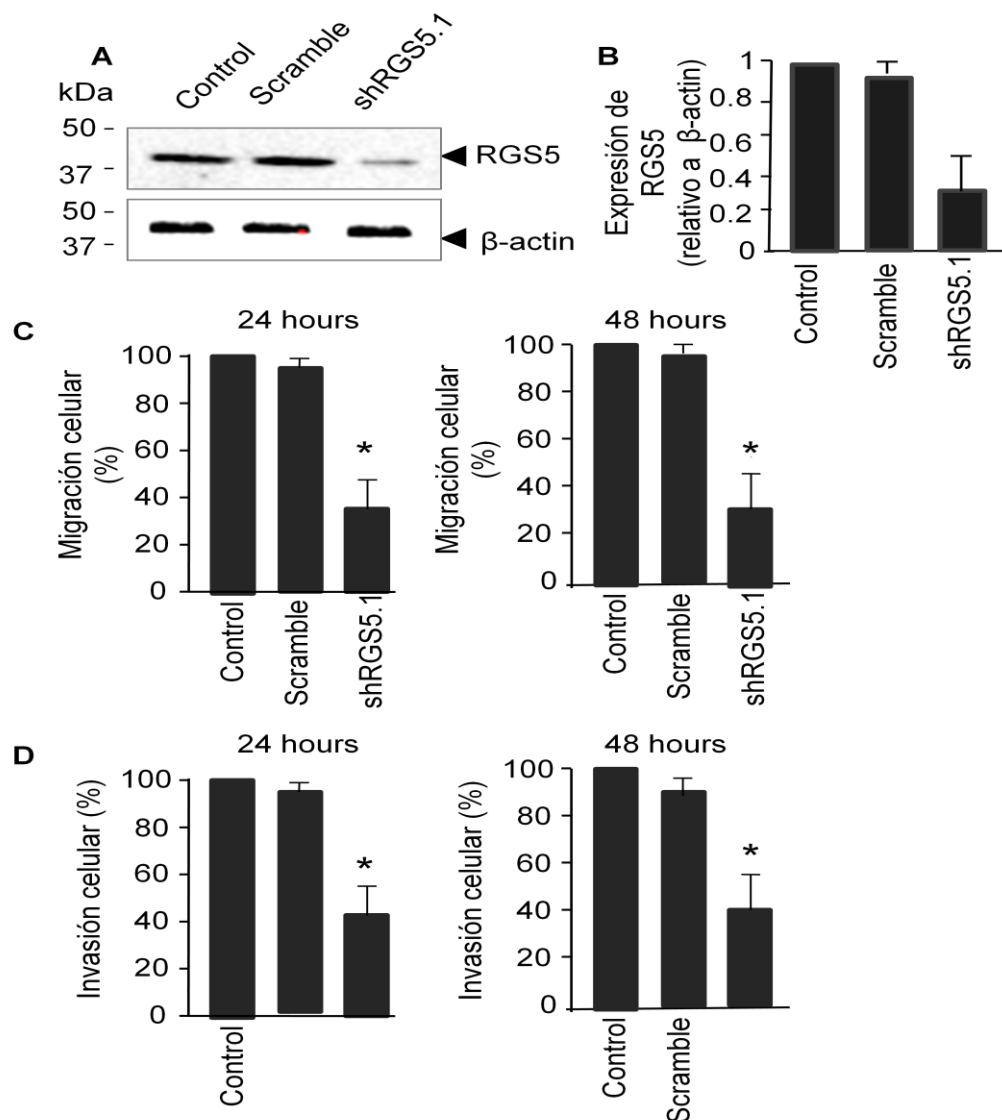


Figura 21. El silenciamiento de RGS5 disminuye la migración e invasión de las células H187 de CPCP. (A) Western blot del silenciamiento del gen RGS5. Carril 1 control, carril 2 scramble, carril 3 shRGS5.1. (B) Desnsitometría de las bandas descritas en A. (C) Ensayo de migración a 24 h y 48 h. (D) Ensayo de invasión celular a 24 h y 48 h. Los datos muestran la media de dos ensayos independientes y su desviación estándar.

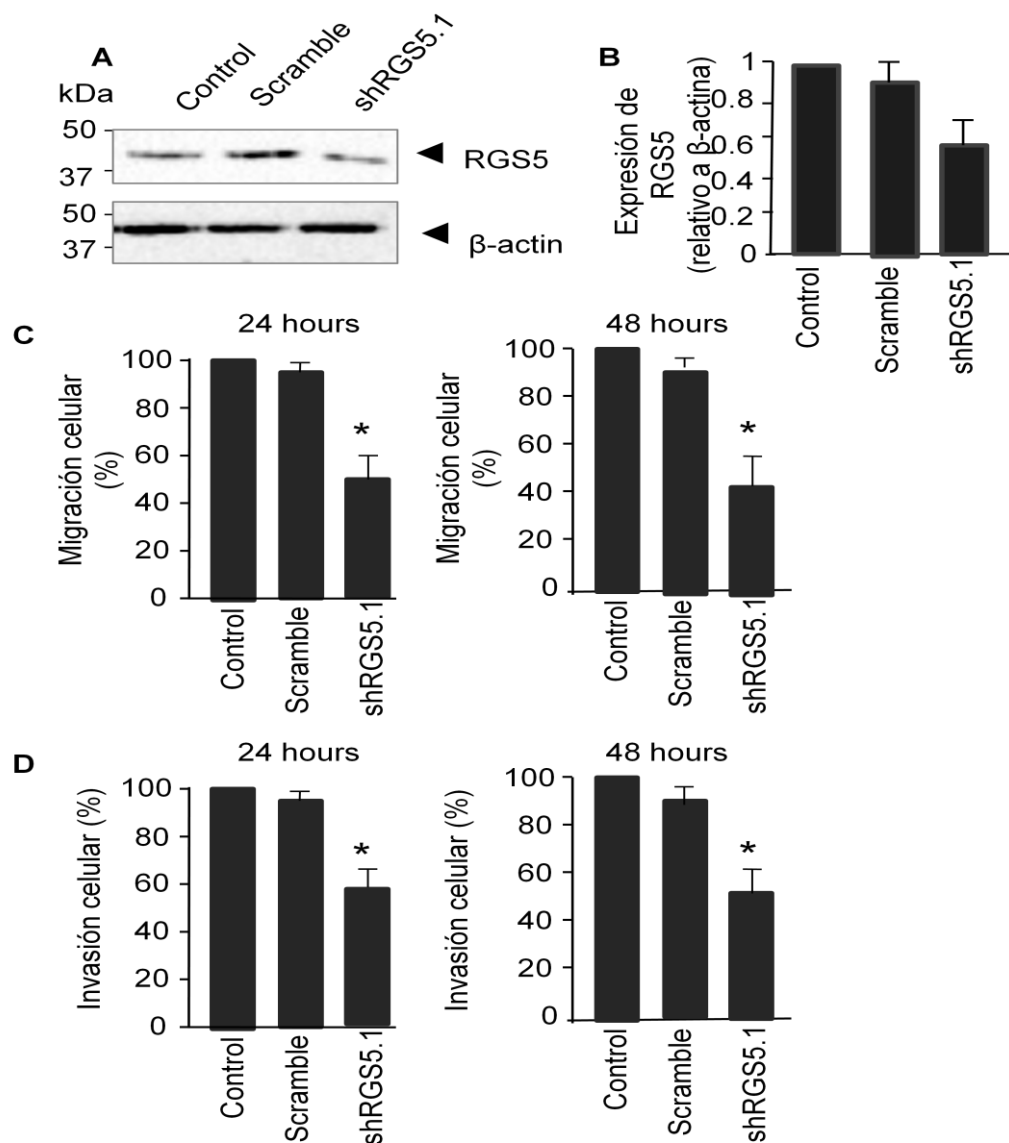


Figura 22. El silenciamiento de RGS5 disminuye la migración e invasión celular en las células H128 de CPCP. (A) Western blot del silenciamiento del gen RGS5. Carril 1 control, carril 2 scramble, carril 3 shRGS5.1. (B) Densitometría de las bandas descritas en A, (C) Ensayo de migración a 24 h y 48 h. (D) Ensayo de invasión celular a 24 h y 48 h. Los datos muestran la media de dos ensayos independientes y su desviación estándar.

9. DISCUSIÓN

El cáncer de pulmón es la neoplasia que ocupa el primer lugar de muertes por cáncer a nivel mundial. Aunque es una enfermedad ampliamente estudiada, hasta el momento los métodos y estrategias de detección temprana son insuficientes, por lo que, aunado a un incremento en la incidencia de la enfermedad, hacen que el cáncer pulmonar sea un problema importante de salud pública. Existen tratamientos moleculares contra este tipo de cáncer pero estos son pocos en comparación con la amplia heterogeneidad molecular de esta enfermedad. En particular el CPCP presenta una incidencia del 15% de los carcinomas pulmonares, pero se considera que es el tipo de cáncer pulmonar más agresivo, debido a que cuenta con un tiempo de duplicación muy corto y una gran capacidad para metastatizar por vía linfática y hemática. Se estima que el 80% de los pacientes con CPCP muere en un tiempo no mayor a 5 años. Razón por la cual, surge la necesidad de realizar investigaciones a nivel de expresión de genes con el objetivo de poder identificar genes como posibles candidatos a nuevos potenciales blancos terapéuticos y así desarrollar tratamientos más efectivos.

La tecnología de los microarreglos de expresión es una herramienta ideal para el estudio de patrones de expresión de miles de genes de forma simultánea. Los estudios basados en el uso de microarreglos, han permitido identificar diferencias de expresión de genes implicados en diversos procesos biológicos, como las respuestas a enfermedades o a cambios ambientales e incluso han

permitido identificar nuevos genes y funciones génicas. Por ello la finalidad de este trabajo fue determinar el perfil de expresión de genes de tumores de CPCP de pacientes mexicanos.

El análisis de microarreglos de DNA nos permitió obtener el perfil de expresión de genes de tumores de CPCP. Hasta el momento solo existen dos reportes enfocados en identificar los genes desregulados en tumores de CPCP, sin embargo no existe ninguno en población mexicana. Uno de ellos fue el de Bangur y colaboradores en 2002 y el segundo pertenece a Taniwaki y colaboradores de 2006.

Los resultados obtenidos del análisis de expresión global utilizando microarreglo de DNA mostraron una modulación de 863 genes desregulados con un $FC = \pm 2$ y un valor de $P = 0.05$ en tres biopsias tumorales de CPCP. Estos 221 corresponden a genes sobreexpresados y 641 a genes reprimidos. Estudios previos han reportado un número similar de genes sobreexpresados en tumores de CPCP, como es el estudio de Bangur en 2002, reporta que en 35 biopsias tumorales de CPCP identifican 209 genes sobreexpresados y en 2006 Taniwaki identifica 232 genes sobreexpresados. Comparando los genes desregulados de los reportes de Bangur, Taniwaki y este estudio, se encontró una similitud de 4 genes ADCYAP1, COLT1, STAT1 y CTSB entre este estudio y el reportado por Bangur. Por el contrario con lo reportado por Taniwaki encontramos 6 genes similares CTSB, MT2A, HIST1H2BM, TOP1, FNTA y NEB. En común con ambos reportes identificamos a CTSB donde Bangur lo reporta sobreexpresado 2.0

veces y Taniwaki lo reporta reprimido -3 veces, al igual que en este trabajo donde lo hayamos reprimido -2.5 veces. Esto puede ser por el tipo de población de la cual se obtuvieron las muestras. Cada estudio aporta gran información que nos ayuda a conocer los genes pueden estar involucrados en CPCP, por lo que existe la necesidad de estudiar a profundidad cada dato obtenido.

Los programas bioinformáticos nos permiten agrupar jerárquicamente a los genes y asociarlos a las diferentes vías moleculares en las cuales participan así como ver si éstas se encuentran alteradas en cáncer. La base de datos DAVID nos permitió agrupar a los 863 genes en diversos procesos celulares. Este análisis, nos permitió definir que un gran número de genes se agrupan en procesos de óxido reducción, trasducción de señales, comunicación celular, replicación del DNA y adhesión celular. Al realizar la revisión bibliográfica de cada uno de los genes detectados en el microarreglo encontramos que 160 genes ya han sido reportados en algún tipo de cáncer incluyendo CPCP. Por mencionar alguno genes se incluyen como son MMP23B, KIFIB, HACE1, PTK9, EPN1, DRCTN, SEMA3B, STOML2, PALMD, FISH, CTGF, DPF3, HYAL3, CTSB, CDC2L2, PTPRT, TSC1, MAP4K4, EHF, DMTF1, MNT, ZNF185, NPDC1, HSF2, RQCD1, SSBP1, SH3GL, PPR2C, DLEU2C, RHOBTB1 y ADCYAB, entre otros que participan en eventos de metástasis, invasión y proliferación celular. Un ejemplo es el gen PCDH10 (protocaderina 10), el cual, participa en conexiones celulares del cerebro, esta reprimido y favorece la proliferación y migración celular en CPCNP. Otro ejemplo de genes reprimidos corresponde a

DYNLRB1 (Dineína tipo 1), el cual, está implicado en la regulación de actina. Además se ha reportado que en cáncer de ovario este gen está reprimido y si se re-establece su expresión reduce la formación de tumores *in vivo*.

Muchos genes aquí mencionados merecen ser objetos de estudios funcionales, en particular nos llama la atención el gen RGS5 debido a que se encuentra sobreexpresado en nuestras muestras de CPCP y no existen reportes de su participación en CPCP. Finalmente considerando estos criterios este gen, fue seleccionado para su estudio funcional. Se ha demostrado que el gen RGS5 (Regulador de la señalización de la proteína G 5), participa en la formación de vasos sanguíneos y de los pericitos vasculares. En cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular y CPCNP RGS5 lo reportan sobreexpresado y demostraron que está asociado a migración e invasión celular, así como a la metástasis de los tumores inducida por la transición epitelio-mesenquimal. Razón, por la cual, nosotros proponemos que posiblemente RGS5 puede ser RGS5 es un blanco potencial para la terapia antitumoral.

10. CONCLUSIONES

- Se identificaron 863 genes desregulados (223 sobreexpresados y 640 reprimidos).
- Existe una similitud de 9 genes reportados como desregulados previamente y lo encontrado en este estudio.
- La expresión de los 14 genes más desregulados es similar a la expresión obtenida en el microarreglo de expresión.
- Se demostró que RGS5 se expresa en 4 líneas celulares de CPCP (NCI-H128, NCI-H69, NCI-209, NCIH187). Mediante ensayos funcionales al inhibir la expresión de RGS5 en las células de CPCP en las cuales se ve reducida de manera considerable la migración e invasión celular, por lo que RGS5 participa en los procesos de invasión y migración de las células tumorales de CPCP
- Debido a su papel fisiológico y su participación en la carcinogénesis de CPCP, proponemos a este gen RGS5 como un potencial blanco terapéutico en CPCP.

ANEXO 1

Genes desregulados en tres tumores de CPCP

Gen ^a	Valor de P	Tumor 1	Tumor 2	Tumor 3	Promedio	Gen ^a	Valor de P	Tumor 1	Tumor 2	Tumor 3	Promedio
PTPRT	0.000601	- 3,347	- 1,905	- -	-2,626	ATP8B2	0.00154	- 3,876	- 1,930	- 1,787	-2,531
MMP23B	0.0745	- 2,401	- 1,543	- 3,665	-2,536	NDRG4	0.00383	- 2,943	- 2,746	- 1,103	-2,264
KIF1B	0.00393	- 2,548	-2.23	- 2,183	-2.23	KCTD16	0.00455	- 2,281	- 2,583	- 1,923	-2,262
ARID1B	0.00754	- 3,256	- 2,256	- 1,509	-2,340	PCDH10	0.0355	- 2,535	- 1,766	- 4,132	-2,811
HACE1	0.0026	- 2,657	- 1,390	- 3,169	-2,405	KIAA1622	0.0827	- 3,475	- 1,158	- 2,067	-2,233
DYNC2H1	0.0103	- 1,689	- 1,170	- 4,596	-2,485	SCN2A2	0.00374	- 4,987	- 1,717	- 1,709	-2,804
N/A	0.0718	- 1,217	- 1,181	- 6,468	-2,955	HIST2H3C	0.221	- 1,862	- 2,361	- 2,215	-2,146
PCBP2	0.00539	- 2,396	- 1,387	- 2,856	-2,213	NDUFV2	0.0995	- 2,694	- 1,340	- 2,236	-2,090
TSC1	0.0149	- 1,537	- 1,599	- 3,338	-2,158	COTL1	0.00506	- 2,416	- 1,612	- 2,372	-2,133
CDC2L2	0.00572	- 3,064	- 2,219	- 1,393	-2,225	PTBP2	0.0111	- 2,049	- 2,051	- 2,140	-2,080
PTK9	0.00545	- 2,131	- 2,530	- 1,504	-2,055	MID1IP1	0.0196	- 2,518	- 2,185	- 1,464	-2,056
N/A	0.0242	- 1,093	- 2,406	- 3,353	-2,284	TMSL8	0.00438	- 2,049	- 1,056	- 4,328	-2,478
NCR3	0.0428	- 1,820	- 1,440	- 3,070	-2,110	PERP	0.0333	- 1,660	- 1,622	- 2,983	-2,088
VMD2	0.0642	- 3,776	- 1,430	- 2,108	-2,438	CDH23	0.000419	- 2,945	- 1,774	- 2,524	-2,414
SLC11A2	0.0141	- 1,995	- 1,359	- 3,370	-2,241	GOLPH3	0.00115	- 3,319	- 3,107	- 1,323	-2,583
EPN1	0.0277	- 3,519	- 1,265	- 2,134	-2,306	HRH2	0.0764	- 2,245	- 1,530	- 2,532	-2,102
N/A	0.0108	- 2,228	- 1,009	- 4,388	-2,542	IQCH	0.0695	- 1,820	- 1,656	- 3,268	-2,248
MAP4K4	0.0264	- -	- -	- -	-2,594	SMN2	0.000383	- -	- -	- -	-3,801

		1,789	1,087	4,907				6,381	2,450	2,571	
EIF3S12	0.00803	- 2,020	- 1,962	- 2,425	-2,136	DNAI2	0.000294	- 1,689	- 1,660	- 3,592	-2,314
N/A	0.0399	- 2,532	- 2,013	- 2,677	-2,407	CYP2R1	0.00786	- 1,769	- 1,181	- 3,937	-2,296
N/A	0.0228	- 2,079	- 1,832	- 3,964	-2,625	C13orf7	0.00146	- 6,163	- 1,912	- 4,566	-4,214
EHF	0.0469	- 2,607	- 3,355	- 1,001	-2,321	FLJ22709	0.00809	- 2,281	- 2,317	- 1,696	-2,098
DRD2	0.0277	- 1,679	- 1,133	- 4,435	-2,416	TLE6	0.0995	- 1,801	- 1,565	- 3,345	-2,237
N/A	0.0817	- 2,061	- 2,304	- 1,788	-2,051	C14orf161	0.00793	- 1,879	- 2,200	- 1,981	-2,020
CHPT1	0.0472	- 1,536	- 1,803	- 6,122	-3,154	RABEP2	0.0243	- 2,895	- 1,240	- 2,435	-2,190
DMTF1	0.000511	- 1,668	- 1,742	- 2,912	-2,107	C12orf30	0.000291	- 4,622	- 1,646	- 2,511	-2,926
MNT	0.0214	- 1,080	- 2,205	- 3,749	-2,345	RP5-1119A7.4	0.165	- 2,105	- 1,462	- 3,219	-2,262
N-PAC	0.00338	- 2,440	- 1,564	- 3,300	-2,435	C14orf45	0.0193	- 3,557	- 1,346	- 1,963	-2,289
STATIP1	0.044	- 1,887	- 1,200	- 6,006	-3,031	TOE1	0.0301	- 2,317	- 1,792	- 3,625	-2,578
MYO3B	0.0495	- 2,742	- 1,613	- 2,140	-2,165	TMEM93	0.009	- 1,922	- 1,778	- 2,638	-2,113
N/A	0.0193	- 2,205	- 2,212	- 2,916	-2,444	PCDHA3	0.000831	- 3,693	- 3,563	- 1,203	-2,820
TNAP	0.00124	- 3,530	- 2,105	- 3,042	-2,892	PCDHA13	0.00633	- 1,968	- 1,196	- 3,656	-2,273
C20orf161	0.0215	- 2,289	- 2,586	- 1,475	-2,117	KRTAP17-1	0.0282	- 2,375	- 2,656	- 2,125	-2,385
NCR1	0.0673	- 1,837	- 1,976	- 2,520	-2,111	RNF26	0.00549	- 1,716	- 1,412	- 4,658	-2,595
C12orf41	0.00355	- 2,224	- 1,524	- 3,505	-2,418	PCDHGA10	0.00184	- 4,640	- 2,346	- 3,150	-3,379
CCDC76	0.0111	- 2,595	- 1,471	- 2,464	-2,177	RP11-217H1.1	0.0179	- 3,061	- 1,834	- 1,506	-2,134
PHCA	0.0017	- 3,016	- 1,727	- 2,401	-2,381	ZCCHC9	0.0123	- 1,644	- 2,433	- 3,074	-2,384
FLJ11996	0.113	2,632	-	-	-312	C10orf58	0.0104	-	-	-	-2,095

			1,622	1,947				2,784	2,149	1,352	
CRSP6	0.0596	-	-	-		DMRTB1	0.0327	-	-	-	
		2,309	1,240	2,854	-2,134			1,370	1,624	5,994	-2,996
FLJ14126	0.033	-	-	-		RP11-298P3.3	0.00158	-	-	-	
		3,064	1,674	1,787	-2,175			2,114	1,901	1,991	-2,002
DRCTNNB1A	0.00311	-	-	-		SIGLEC10	0.0293	-	-	-	
		3,028	1,865	4,176	-3,023			4,097	1,436	1,958	-2,497
ELOVL5	0.00149	-	-	-		SLC8A3	0.0217	-	-	-	
		1,976	1,641	3,207	-2,275			2,185	1,857	2,225	-2,089
SEMA3B	0.0404	-	-	-		MMAB	0.00657	-	-	-	
		1,627	2,187	3,317	-2,377			2,248	2,097	1,980	-2,108
NBEAL2	0.0343	-	-	-		KIAA1893	0.0305	-	-	-	
		1,648	1,361	4,550	-2,520			3,612	2,308	1,524	-2,481
KIAA1833	0.0298	-	-	-		CSMD3	0.0219	-	-	-	
		2,410	1,927	2,543	-2,293			3,633	1,824	2,174	-2,544
N/A	0.0798	-	-	-		PRR8	0.0148	-	-	-	
		1,979	2,307	1,911	-2,066			2,681	1,248	3,429	-2,453
ZNF185	0.00212	-	-	-		TECTB	0.00032	-	-	-	
		1,564	1,332	4,147	-2,348			2,190	1,215	3,095	-2,167
N/A	0.00802	-	-	-		APEX1	0.0065	-	-	-	
		4,814	2,237	4,213	-3,755			1,303	1,561	4,517	-2,460
PCDHB18	0.057	-	-	-		BAT3	0.00387	-	-	-	
		2,472	1,450	2,522	-2,148			4,804	2,339	1,464	-2,869
N/A	0.0105	-	-	-		ASB11	0.0111	-	-	-	
		2,728	1,470	2,112	-2,103			1,971	1,757	3,246	-2,325
FAM87B	0.00206	-	-	-		WRNIP1	0.016	-	-	-	
		2,997	1,340	3,091	-2,476			1,649	1,358	4,471	-2,493
N/A	0.134	-	-	-		EPS8L3	0.00507	-	-	-	
		2,333	1,527	2,901	-2,254			2,140	1,787	2,529	-2,152
N/A	0.0266	-	-	-		FCAR	0.117	-	-	-	
		3,257	2,937	1,035	-2,410			1,331	1,944	3,465	-2,247
C4orf14	0.0505	-	-	-		MYOZ3	0.00288	-	-	-	
		1,524	1,949	3,958	-2,477			2,859	1,261	2,408	-2,176
N/A	0.0194	-	-	-		ZNF545	0.00308	-	-	-	
		3,302	1,529	3,311	-2,714			2,779	1,147	2,893	-2,273
N/A	0.142	-	-	-		RLN2	0.041	-	-	-	
		2,715	1,928	1,958	-2,200			2,842	1,127	3,198	-2,389
N/A	0.0577	-	-	-		TP53I13	0.00821	-	-	-	
		1,231	1,994	3,380	-2,202			2,313	2,336	2,996	-2,548
N/A	0.0249	-	-	-		SAMD1	0.0018	-	-	-	
					-2,497						-2,195

		2,853	2,202	2,435				2,844	1,895	1,847	
N/A	0.0766	- 2,100	- 1,224	- 3,333	-2,219	ZFAND2B	0.0274	- 2,376	- 1,583	- 2,705	-2,221
EPB41L1	0.057	- 1,800	- 2,500	- 2,011	-2,104	DNER	0.0198	- 1,600	- 1,438	- 5,929	-2,989
FLJ45224	0.00455	- 1,863	- 1,274	- 3,954	-2,364	COMTD1	0.079	- 1,973	- 1,772	- 3,836	-2,527
N/A	0.0103	- 2,740	- 1,858	- 1,601	-2,066	LRRC39	0.0387	- 2,026	- 1,120	- 3,822	-2,323
N/A	0.0255	- 3,142	- 1,642	- 2,992	-2,592	LPIN1	0.00279	- 2,338	- 1,637	- 3,094	-2,356
N/A	0.0014	- 2,119	- 1,326	- 3,597	-2,347	ZNRF2	0.00437	- 2,271	- 1,632	- 2,181	-2,028
N/A	0.0183	- 2,241	- 1,103	- 3,336	-2,227	AKAP9	0.000727	- 2,022	- 1,127	- 4,095	-2,415
N/A	0.0375	- 4,604	- 2,255	- 1,399	-2,753	PPP3R2	0.0563	- 1,572	- 1,550	- 4,199	-2,440
STOML2	0.00418	- 4,089	- 1,878	- 1,368	-2,445	DMBX1	0.0309	- 1,667	- 2,002	- 2,818	-2,162
N/A	0.0263	- 1,498	- 1,395	- 4,261	-2,385	C19orf40	0.229	- 1,200	- 1,881	- 3,846	-2,309
N/A	0.0679	- 2,292	- 1,980	- 1,984	-2,085	CHMP4C	0.0594	- 2,923	- 1,405	- 2,274	-2,201
PALMD	0.00728	- 2,416	- 1,836	- 3,244	-2,499	ARRDC1	0.0307	- 2,023	- 1,134	- 4,104	-2,420
CYP4F12	0.0013	- 2,732	- 2,805	- 1,921	-2,486	C1orf158	0.0207	- 1,659	- 1,604	- 4,735	-2,666
SH3PXD2A	0.0793	- 1,701	- 1,600	- 3,141	-2,147	ELOVL3	0.00137	- 1,976	- 1,596	- 2,784	-2,119
LSM14A	0.00856	- 2,534	- 2,213	- 2,289	-2,345	ZNF548	0.00153	- 1,877	- 1,471	- 4,617	-2,655
N/A	0.00755	- 3,525	- 1,463	- 2,638	-1,567	AOF1	0.0131	- 2,180	- 1,554	- 3,961	-2,565
CD209	0.128	- 2,593	- 2,230	- 2,261	-2,361	ZNF524	0.00598	- 2,435	- 1,640	- 2,874	-2,316
EVC2	0.0273	- 2,100	- 2,094	- 2,180	-2,125	AKR1A1	0.00145	- 2,046	- 1,613	- 3,056	-2,238
DSG4	0.00294	- 1,571	- 2,024	- 2,839	-2,145	IL17RC	0.0127	- 2,772	- 1,996	- 3,464	-2,744
N/A	0.004	-	-	-	-2,877	NOD9	0.00936	-	-	-	-3,056

		3,563	1,131	3,936				5,926	1,899	1,344	
N/A	0.00779	- 1,630	- 1,497	- 3,891	-2,339	OR4Q3	0.024	- 1,494	- 1,588	- 5,078	-2,720
CTGF	0.00627	- 5,404	- 1,795	- 1,747	-2,982	MGC43122	0.00689	- 2,849	- 2,151	- 1,449	-2,150
SPINK9	0.00541	- 3,965	- 1,452	- 3,308	-2,908	C6orf146	0.0078	- 3,008	- 2,117	- 1,406	-2,177
HSUP1	0.0461	- 2,266	- 1,728	- 2,290	-2,095	BCMP11	0.117	- 2,743	- 1,755	- 1,814	-2,104
IZUMO1	0.166	- 4,316	- 1,753	- 1,368	-2,479	SLC13A5	0.0465	- 3,019	- 1,834	- 2,114	-2,322
DPF3	0.00501	- 2,837	- 1,878	- 1,830	-2,182	DYNLRB1	0.0195	- 2,002	- 1,425	- 2,991	-2,139
C14orf2	0.00474	- 3,375	- 1,806	- 1,653	-2,278	ZNF598	0.00619	- 2,599	- 2,139	- 1,827	-2,188
UBE2I	0.039	- 2,996	- 4,530	- 1,378	-2,968	LCE1B	0.0033	- 2,676	- 1,444	- 2,752	-2,291
HDLBP	0.0349	- 2,778	- 1,709	- 2,384	-2,290	LCN8	0.0542	- 3,555	- 1,762	- 1,469	-2,262
RAD51	0.115	- 3,219	- 1,032	- 2,650	-2,300	ENPP7	0.0613	- 2,360	- 1,605	- 2,513	-2,159
GPSN2	0.00286	- 2,277	- 1,452	- 2,468	-2,066	CUTL1	0.00292	- 1,917	- 2,107	- 3,632	-2,552
RAB7L1	0.00239	- 4,127	- 1,778	- 4,067	-3,324	C1orf88	0.00177	- 3,894	- 1,275	- 1,740	-2,303
SLC11A2	0.000293	- 3,421	- 1,316	- 2,439	-2,392	CPEB2	0.0152	- 2,465	- 2,551	- 2,702	-2,573
BTN3A2	0.00495	- 1,799	- 1,207	- 3,714	-2,240	WDR27	0.00509	- 2,516	- 1,300	- 3,006	-2,274
LDOC1	0.00238	- 2,334	- 1,452	- 3,591	-2,459	TMEM17	0.062	- 3,034	- 1,505	- 1,861	-2,133
ATP5J2	0.00207	- 3,021	- 1,531	- 1,765	-2,106	CXorf23	0.00954	- 2,739	- 1,217	- 2,843	-2,266
NPDC1	0.000631	- 2,235	- 1,753	- 2,730	-2,239	ATP13A5	0.00131	- 3,424	- 1,179	- 3,469	-2,691
YPEL3	0.0185	- 1,787	- 1,750	- 3,372	-2,303	MGC4728	0.0178	- 2,646	- 1,654	- 2,000	-2,100
CPA1	0.0248	- 1,838	- 1,877	- 2,849	-2,188	BGLAP	0.00881	- 3,797	- 2,436	- 1,871	-2,701
HSF2	0.00928	-	-	-	-2,447	PSG11	0.0207	-	-	-	-2,114

		2,102	1,406	3,834				2,023	1,466	2,853	
HYAL3	0.122	-	-	-				-	-	-	
		2,087	1,140	3,747	-2,325	LOC221091	0.0217	3,012	1,473	2,073	-2,186
MGC12760	0.0428	-	-	-				-	-	-	
		3,003	1,152	2,733	-2,296	FAM9B	0.0318	1,390	1,253	4,696	-2,446
MT2A	0.00351	-	-	-				-	-	-	
		2,475	1,716	1,900	-2,030	MUSTN1	0.00272	3,118	2,409	2,073	-2,533
RQCD1	0.00334	-	-	-				-	-	-	
		1,433	1,499	3,778	-2,237	DEGS2	0.000303	1,598	1,691	3,632	-2,307
PPIA	0.147	-	-	-				-	-	-	
		3,307	2,920	1,248	-2,492	DKFZp547C195	0.0084	3,823	1,024	2,116	-2,321
MGC16186	0.119	-	-	-				-	-	-	
		2,249	1,362	2,997	-2,203	FLJ45187	0.00432	3,421	1,133	2,318	-2,291
SSR1	0.00867	-	-	-				-	-	-	
		2,473	1,852	2,339	-2,221	FLJ42986	0.000457	3,034	1,020	3,349	-1,788
ATPBD1B	0.00168	-	-	-				-	-	-	
		1,362	2,191	4,116	-2,556	ZNF662	0.0154	1,788	1,603	4,458	-2,616
C20orf116	0.00122	-	-	-				-	-	-	
		2,789	2,306	2,221	-2,439	FLJ45244	0.0736	2,129	1,368	2,845	-2,114
HMBS	0.0123	-	-	-				-	-	-	
		3,082	1,912	1,459	-2,151	FLJ41046	0.00487	2,345	1,383	3,552	-2,427
ASL	0.0544	-	-	-				-	-	-	
		2,126	1,558	4,744	-2,809	NEBL	0.00493	2,609	1,452	3,865	-2,642
FADS2	0.0421	-	-	-				-	-	-	
		1,209	2,042	4,266	-2,506	PTAFR	0.0239	2,458	1,338	2,624	-2,140
CTSB	0.0467	-	-	-				-	-	-	
		1,877	2,195	3,448	-2,507	GYPB	0.00146	3,486	1,674	1,715	-2,292
NDRG2	0.0143	-	-	-				-	-	-	
		1,979	1,422	2,880	-2,094	BMPR2	0.0172	3,254	2,608	2,076	-2,646
SLC29A2	0.000786	-	-	-				-	-	-	
		1,788	1,247	3,924	-2,320	KIR2DL4	0.053	2,119	1,178	4,009	-2,435
FKBPL	0.000778	-	-	-				-	-	-	
		2,572	1,977	1,877	-2,142	HLA-C	0.00126	3,036	2,344	1,298	-2,226
RPP14	0.117	-	-	-				-	-	-	
		3,353	1,510	1,989	-2,284	PTCHD2	0.000276	4,464	1,803	3,535	-3,267
RNF125	0.0246	-	-	-				-	-	-	
		3,731	1,491	2,055	-2,426	CCDC85A	0.0371	2,598	2,053	2,042	-2,231
TSPAN6	0.00351	-	-	-				-	-	-	
		3,034	2,347	1,838	-2,406	SLC45A1	0.00627	2,745	2,710	2,476	-2,644
CXCL11	0.0436	-	-	-				-	-	-	
					-2,892	LOC149086	0.00562				-2,842

		2,910	2,091	3,676				2,205	1,768	4,552	
ARL8B	0.0101	- 3,133	- 2,042	- 3,668	-2,948	LOC645537	0.000968	- 3,804	- 3,008	- 1,213	-2,675
MGC21675	0.00326	- 2,935	- 1,192	- 2,999	-2,375	LOC347376	0.0078	- 1,841	- 2,629	- 2,468	-2,313
METAP2	0.00126	- 2,338	- 2,032	- 3,091	-2,487	LOC441582	0.0323	- 2,813	- 2,419	- 1,566	-2,266
TOMM34	0.0142	- 1,262	- 1,063	- 6,606	-2,977	LOC388076	0.00814	- 1,921	- 1,346	- 3,159	-2,142
HPS6	0.0286	- 2,879	- 3,070	- 3,151	-3,033	TBC1D24	0.0734	- 1,422	- 2,163	- 3,263	-2,283
C16orf56	0.0015	- 3,886	- 1,277	- 3,525	-2,896	LOC286297	0.0346	- 2,580	- 1,804	- 1,891	-2,092
RAB38	0.00267	- 3,840	- 1,436	- 2,777	-2,684	LOC391749	0.0015	- 3,440	- 1,540	- 1,849	-2,276
PRKACB	0.00388	- 1,730	- 1,538	- 4,125	-2,464	LOC392222	0.00498	- 3,757	- 2,709	- 3,545	-3,337
KIAA1143	0.000569	- 4,157	- 2,213	- 2,391	-2,920	RP11-487F23.3	0.00928	- 4,159	- 1,450	- 1,570	-2,393
NRF1	0.101	- 1,798	- 1,528	- 4,104	-2,477	LOC644162	0.0379	- 2,807	- 1,945	- 1,817	-2,190
SSBP2	0.0229	- 2,502	- 1,967	- 2,065	-2,178	LOC401911	0.0336	- 1,855	- 2,081	- 2,081	-2,006
LMAN2	0.12	- 2,200	- 1,245	- 2,943	-2,129	LOC401915	0.0351	- 4,608	- 2,673	- 1,155	-2,812
ZNF506	0.043	- 1,358	- 1,514	- 3,999	-2,290	ANKIB1	0.0133	- 2,370	- 2,026	- 1,959	-2,118
C12orf48	0.179	- 2,393	- 1,405	- 2,475	-2,091	LOC400456	0.0213	- 1,179	- 1,266	- 6,474	-2,973
PRO0132	0.0297	- 1,850	- 1,977	- 3,521	-2,449	LOC653224	0.0378	- 1,892	- 1,130	- 3,971	-2,331
LY96	0.0645	- 1,939	- 1,690	- 4,372	-2,667	LOC401677	0.12	- 1,850	- 1,103	- 4,665	-2,539
PIGK	0.0119	- 3,020	- 1,611	- 1,824	-2,152	LOC642613	0.00162	- 6,934	- 1,519	- 2,125	-3,526
CD96	0.173	- 2,165	- 1,573	- 3,039	-2,259	LOC441770	0.00576	- 2,912	- 1,625	- 3,304	-2,614
C6orf148	0.00543	- 3,202	- 1,433	- 1,912	-2,182	LOC441864	0.00543	- 3,401	- 2,198	- 1,406	-2,335
C6orf69	0.0144	-	-	-	-2,268	LOC391276	0.0199	-	1,037	-	-1,797

		2,417	1,624	2,764				1,989	4,439		
N/A	0.0968	- 3,291	- 1,046	- 2,764	-2,367	LOC402096	0.000316	- 3,376	- 1,760	- 2,474	-2,537
N/A	0.00238	- 2,424	- 1,735	- 3,570	-2,576	LOC400723	0.0101	- 2,705	- 1,580	- 3,590	-2,625
C10orf13	0.00285	- 2,897	- 1,181	- 3,562	-2,547	LOC642314	0.143	- 4,472	- 1,260	- 2,015	-2,582
C10orf137	0.00351	- 3,833	- 1,507	- 1,739	-2,360	LOC653056	0.0325	- 4,428	- 1,306	- 2,791	-1,971
CA1	0.00572	- 4,450	- 1,237	- 2,429	-2,705	LOC642578	0.25	- 1,861	- 2,131	- 2,024	-2,005
KIAA0179	0.00511	- 1,743	- 1,340	- 5,007	-2,697	LOC642628	0.0188	- 2,253	- 2,441	- 1,680	-2,125
H3F3A	0.00108	- 3,726	- 2,756	- 2,882	-3,121	LOC643083	0.128	- 1,157	- 3,213	- 2,455	-2,275
DNASE1	0.000277	- 2,955	- 2,390	- 3,299	-2,881	LOC643479	0.0149	- 2,717	- 1,369	- 2,892	-2,326
FLJ32658	0.0106	- 1,553	- 1,316	- 4,751	-2,540	FAM22A	0.0138	- 1,720	- 1,312	- 4,126	-2,386
NDP	0.0243	- 2,692	- 1,994	- 1,506	-2,064	LOC653324	0.0674	- 2,175	- 1,659	- 2,667	-2,167
MCTP1	0.0189	- 1,544	- 1,928	- 3,163	-2,212	LOC643671	0.00606	- 1,450	- 1,725	- 3,654	-2,276
EPS8	0.0483	- 2,297	- 1,571	- 2,511	-2,126	ANTXRL	0.00592	- 4,034	- 1,673	- 2,506	-2,738
LARP2	0.000564	- 2,908	- 2,155	- 2,068	-2,377	RP11-98I6.3	0.00257	- 3,731	- 3,320	- 3,343	-3,465
N/A	0.0203	- 1,098	- 1,082	- 8,778	-3,653	LOC643820	0.0602	- 3,474	- 1,818	- 1,982	-2,425
B3GNT2	0.00176	- 3,085	- 1,789	- 3,489	-2,788	LOC643680	0.00559	- 6,031	- 2,247	- 1,833	-3,370
STAM	0.00401	- 1,584	- 1,478	- 4,545	-2,536	LOC644147	0.06	- 2,170	- 1,619	- 4,445	-2,745
N/A	0.0309	- 2,959	- 1,861	- 3,457	-2,759	LOC221710	0.0799	- 2,770	- 1,442	- 2,175	-2,129
RP11-308B5.5	0.0647	- 2,447	- 1,488	- 3,438	-2,458	LOC644508	0.00958	- 4,108	- 3,440	- 1,035	-2,861
ARMC8	0.0101	- 2,818	- 1,858	- 2,287	-2,321	PRDM6	0.00539	- 2,254	- 1,551	- 2,447	-2,084
SH3GL2	0.132	-	-	-	-2,065	LOC653326	0.0193	-	-	-	-2,381

		2,682	1,694	1,818				1,354	1,643	4,146	
PPP2R2C	0.0287	- 1,283	- 1,289	- 7,600	-3,391	LOC645541	0.0279	- 3,039	- 2,296	- 1,149	-2,161
CD6	0.000942	- 1,340	- 1,342	- 4,645	-2,442	LOC645620	0.000863	- 3,361	- 1,478	- 2,569	-2,469
RHOBTB2	0.000233	- 1,766	- 1,744	- 3,683	-2,398	LOC645942	0.0257	- 2,635	- 1,572	- 2,289	-2,165
TNFRSF19	0.0279	- 1,839	- 1,668	- 2,849	-2,119	LOC653688	0.00547	- 3,111	- 1,388	- 2,365	-2,288
KLHDC8A	0.011	- 2,288	- 2,328	- 1,534	-2,050	LOC653689	0.00412	- 2,271	- 2,148	- 1,969	-2,129
SAMHD1	0.107	- 2,544	- 1,737	- 1,909	-2,063	LOC646047	0.00884	- 2,903	- 2,206	- 2,135	-2,415
COL25A1	0.00327	- 2,367	- 1,765	- 2,474	-2,202	LOC646139	0.00479	- 1,604	- 1,369	- 4,665	-2,546
GAD1	0.0228	- 1,811	- 2,068	- 2,652	-2,177	LOC440902	0.00277	- 1,765	- 2,708	- 4,815	-3,096
ZNF553	0.0261	- 3,150	- 1,641	- 5,877	-3,556	LOC285679	0.00714	- 1,640	- 1,704	- 3,074	-2,139
RP13-401N8.2	0.0293	- 2,828	- 1,944	- 2,301	-2,358	LOC646277	0.00311	- 3,565	- 1,907	- 1,704	-2,392
N/A	0.0246	- 2,270	- 1,680	- 2,425	-2,125	LOC646325	0.00102	- 2,166	- 1,230	- 3,775	-2,390
EBP	0.0254	- 1,431	- 3,065	- 3,471	-2,656	LOC646435	0.0035	- 2,571	- 1,885	- 2,624	-2,360
DPAGT1	0.00392	- 1,430	- 1,496	- 4,480	-2,469	LOC646512	0.00814	- 2,598	- 2,398	- 2,060	-2,352
ELOVL2	0.0473	- 2,084	- 2,467	- 2,514	-2,355	LOC646552	0.00615	- 2,757	- 1,812	- 1,738	-2,102
KATNA1	0.00239	- 2,423	- 1,845	- 1,919	-2,062	LOC653765	0.0348	- 2,946	- 1,552	- 1,826	-2,108
HIP2	0.00816	- 2,832	- 1,391	- 4,903	-3,042	LOC653781	0.00674	- 2,018	- 1,977	- 3,325	-2,440
PCYOX1	0.0101	- 2,730	- 1,777	- 1,654	-2,054	LOC645021	0.0068	- 2,303	- 1,941	- 2,423	-2,222
FAM53C	0.0133	- 4,095	- 1,758	- 1,256	-2,370	LOC644423	0.0014	- 3,406	- 1,986	- 1,948	-2,447
N/A	0.000334	- 2,350	- 1,664	- 2,495	-2,170	LOC647306	0.00991	- 1,806	- 1,407	- 3,506	-2,240
DLEU2	0.0221	-	-	-	-3,316	LOC646240	0.00203	-	1,058	-	-2,472

		2,323	1,740	5,886				3,192		5,281	
DERL3	0.00576	-	-	-				-	-	-	
		2,062	1,265	3,518	-2,282	LOC642929	0.00604	2,468	1,258	4,066	-2,597
KIAA1012	0.0106	-	-	-				-	-	-	
		1,409	1,343	4,568	-2,440	LOC653102	0.00307	2,780	2,557	2,266	-2,534
BMPER	0.00192	-	-	-				-	1,068	-	
		2,795	2,703	1,406	-2,301	LOC653107	0.0216	3,784		3,722	-2,146
OAS1	0.0776	-	-	-				-	-	-	
		1,616	1,869	3,879	-2,455	LOC642778	0.00401	3,067	1,217	2,894	-2,393
SLC31A1	0.249	-	-	-				-	-	-	
		2,083	2,751	1,469	-2,101	C10orf18	0.00154	2,121	1,490	2,902	-2,171
N/A	0.159	-	-	-				-	-	-	
		2,240	1,856	2,076	-2,057	ANXA8L1	0.00579	1,541	1,851	4,941	-2,778
SBSN	0.00964	-	-	-				-	-	-	
		1,857	1,089	4,924	-1,897	LOC92497	0.00408	2,498	1,272	4,136	-1,787
SLC39A9	0.00571	-	-	-				-	-	-	
		2,632	2,100	3,032	-2,588	LOC644558	0.0309	1,605	1,681	3,617	-2,301
N/A	0.000835	-	-	-				-	-	-	
		2,913	2,470	1,148	-2,177	LOC645396	0.0174	1,895	1,334	3,454	-2,228
NUP43	0.0123	-	-	-				-	-	-	
		2,422	1,725	2,037	-2,061	LOC645574	0.0882	3,151	1,787	1,606	-2,181
HIST1H2BM	0.0154	-	-	-				-	-	-	
		2,143	1,569	2,643	-2,118	LOC644019	0.00686	3,012	1,424	2,019	-2,152
N/A	0.00173	-	-	-				-	-	-	
		1,883	1,605	3,701	-2,396	LOC643441	0.00178	1,770	1,177	3,969	-2,305
CYP1A2	0.00845	-	-	-				-	-	-	
		2,877	1,598	2,169	-2,215	LOC643730	0.00897	2,699	1,354	2,204	-2,086
SPTLC1	0.00661	-	-	-				-	-	-	
		2,207	1,043	3,828	-1,664	LOC653696	0.00364	2,113	1,508	2,739	-2,120
AMELY	0.00714	-	-	-				-	-	-	
		2,419	1,682	2,311	-1,016	LOC646296	0.00785	1,740	3,702	1,493	-2,312
OR2C1	0.00469	-	-	-				-	-	-	
		2,183	1,131	3,426	-1,493	LOC646413	0.179	2,572	2,228	1,755	-2,185
CAV3	0.136	-	-	-				-	-	-	
		2,373	1,391	2,526	-2,097	LOC646562	0.00345	1,779	1,613	3,940	-2,444
CYP26B1	0.00693	-	-	-				-	-	-	
		2,256	1,234	4,207	-2,566	LOC400807	0.00326	3,014	1,530	2,272	-2,272
CES7	0.0369	-	-	-				-	-	-	
		1,985	1,974	2,181	-2,047	LOC441034	0.0175	2,309	2,078	3,715	-2,701
SLC24A2	0.0264	-	-	-				-	-	-	
			1,108		-2,136	C3orf46	0.000571				-2,251

		3,490		4,025				2,142	1,269	3,341	
RPS11	0.00386	-	-	-	-	LOC284701	0.00259	-	-	-	-
		2,526	1,607	3,202	-2,445			5,603	1,542	1,932	-3,026
N/A	0.0627	-	-	-	-	FLJ21767	0.000835	-	-	-	-
		1,581	2,764	4,728	-3,024			2,097	3,020	2,677	-2,598
CHM	0.00614	-	-	-	-	LOC653479	0.00808	-	-	-	-
		3,103	2,065	2,370	-2,513			2,419	1,597	3,478	-2,498
HTR4	0.0054	-	-	-	-	RAPGEF2	0.00111	-	-	-	-
		3,210	1,155	2,358	-2,241			1,304	1,702	3,634	-2,213
WNT1	0.0138	-	-	-	-	LOC645030	0.0312	-	-	-	-
		2,786	1,628	2,034	-2,149			2,602	1,182	6,137	-3,307
USMG5	0.0216	-	-	-	-	LOC645317	0.00148	-	-	-	-
		2,025	1,242	3,436	-2,234			3,590	1,371	3,150	-2,704
FLJ35834	0.0343	-	-	-	-	NBPF1	0.0899	-	-	-	-
		2,665	1,591	2,422	-2,226			1,409	1,766	3,514	-2,230
N/A	0.102	-	-	-	-	FLJ43663	0.0559	-	-	-	-
		2,370	1,594	2,367	-2,110			2,763	1,743	1,768	-2,091
RHOBTB1	0.00462	-	-	-	-	LOC654350	0.0289	-	-	-	-
		1,934	1,773	2,542	-2,083			3,049	1,077	2,601	-2,242
PDZRN4	0.0301	-	-	-	-	TP53AP1	0.138	-	-	-	-
		2,751	2,339	1,705	-2,265			1,593	1,233	4,167	2,331
ADCYAP1	0.00382	-	-	-	-	DREV1	0.0116	-	-	-	-
		3,287	1,600	1,520	-2,136			1,633	2,317	3,215	2,388
LOC113444	0.00359	-	-	-	-	C1orf14	0.0172	-	-	-	-
		2,676	1,337	2,342	-2,118			2,551	1,837	1,740	2,043
RNF122	0.00528	-	-	-	-	GOLGA2LY1	0.0163	-	-	-	-
		2,358	1,787	1,962	-2,036			2,075	1,219	3,280	2,191
CDC14A	0.000834	-	-	-	-	BRSK2	0.00936	-	-	-	-
		2,458	1,829	2,539	-2,275			1,856	1,481	3,257	2,198
AHI1	0.000293	-	-	-	-	FBXO4	0.00109	-	-	-	-
		1,694	1,686	3,233	-2,204			3,842	1,304	2,122	2,423
LITAF	0.0111	-	-	-	-	C16orf60	0.189	-	-	-	-
		2,679	1,818	2,220	-2,239			1,814	1,506	3,115	2,145
CYP2C18	0.0102	-	-	-	-	TTC19	0.00632	-	-	-	-
		4,413	1,364	1,706	-2,494			5,991	1,634	1,482	3,036
WNT10B	0.0183	-	-	-	-	LOC440894	0.0487	-	-	-	-
		1,380	1,506	5,609	-2,832			2,366	2,760	1,306	2,144
SOAT2	0.00509	-	-	-	-	EWSR1	0.04	-	-	-	-
		3,237	1,421	2,155	-2,271			2,328	1,278	2,934	2,180
IFNE1	0.0316	-	-	-	-	RHOT2	0.00124	-	-	-	-
					-2,175			2,476	1,250	3,613	2,446

		1,868	1,384	3,272							
C4orf12	0.0132	- 2,707	- 2,006	- 1,712	-2,142	TMC8	0.06	5,943	1,232	1,581	2,919
CNFN	0.00637	- 1,409	- 1,457	- 4,579	-2,482	SLC4A11	0.0125	2,822	1,611	1,785	2,073
PLD5	0.000658	- 4,810	- 1,865	- 2,373	-3,016	MON1A	0.15	5,174	1,390	1,245	2,603
C12orf51	0.00662	- 3,406	- 2,266	- 2,724	-2,799	CMTM5	0.031	2,154	1,532	2,703	2,130
MMP26	0.0337	- 2,189	- 1,903	- 2,072	-2,055	ACLY	0.0207	1,111	1,143	6,389	2,881
SIGLEC10	0.00102	- 1,640	- 1,373	- 3,637	-2,217	N/A	0.000749	4,476	1,823	1,429	2,576
TAS2R48	0.0269	- 2,168	- 1,344	- 3,489	-2,334	KIAA0556	0.0242	1,597	2,120	4,173	2,630
PSMB2	0.0117	- 2,148	- 1,540	- 2,810	-2,166	N/A	0.00184	2,415	2,456	2,997	2,623
C6orf129	0.209	- 2,119	- 1,695	- 2,942	-2,252	N/A	0.105	2,370	1,703	2,375	2,149
CCR8	0.00541	- 3,326	- 1,626	- 2,222	-2,391	N/A	0.0114	2,719	2,008	1,568	2,098
N/A	0.00182	- 1,506	- 2,394	- 2,238	-2,046	N/A	0.058	3,606	1,171	2,231	2,336
ATP6V0A4	0.0137	- 2,498	- 1,668	- 2,319	-2,162	LOC401070	0.00904	2,093	1,609	2,539	2,080
DLX6	0.00618	- 1,967	- 1,650	- 3,764	-2,460	C1orf35	0.00136	3,468	2,462	1,820	2,583
KIR2DL3	0.00518	- 1,739	- 2,724	- 4,554	-3,006	N/A	0.00522	1,699	1,505	3,685	2,296
LOC168850	0.0051	- 2,596	- 1,347	- 4,682	-2,875	N/A	0.0108	2,977	1,100	2,452	2,176
POLR1B	0.0779	- 1,843	- 1,263	- 4,910	-2,672	N/A	0.124	1,878	1,808	2,806	2,164
N/A	0.00292	- 3,471	- 1,394	- 2,444	-2,436	N/A	0.00385	2,350	1,210	3,153	2,238
TAGAP	0.067	- 2,580	- 1,551	- 2,072	-2,068	N/A	0.0146	2,759	1,179	2,937	2,292
FABP2	0.00749	- 4,374	- 2,561	- 2,201	-3,045	FLJ46419	0.00236	1,941	1,380	3,460	2,260
ALDH8A1	0.00709	-	-	-	-2,408	N/A	0.0216	1,681	1,826	2,940	2,149

		3,111	2,154	1,959							
MYO15A	0.00655	- 1,831	- 1,333	- 3,508	-2,224	C22orf24	0.0241	2,303	1,587	3,215	2,368
AKT1	0.00155	- 2,328	- 1,948	- 2,192	-2,156	KIAA1191	0.0623	2,769	1,183	2,798	2,250
ZNF300	0.00309	- 3,598	- 2,661	1,194	-1,688	CHRD2	0.00324	2,621	1,600	2,002	2,074
C1orf103	0.000675	- 2,078	- 1,494	- 4,375	-2,649	RPTN	0.00183	2,528	1,280	2,505	2,104
PPP2R1B	0.00177	- 1,681	- 1,891	- 2,931	-2,168	FES	0.00192	2,406	1,999	2,308	2,238
N/A	0.0316	- 3,923	- 2,387	- 1,390	-2,567	DOCK11	0.0362	1,422	1,136	5,231	2,596
N/A	0.00527	- 3,135	- 1,682	- 1,876	-2,231	GYG1	0.00444	2,510	1,676	1,976	2,054
CCDC102B	0.0742	- 1,860	- 2,214	- 3,283	-2,452	MGLL	0.0409	4,593	1,921	1,198	2,571
N/A	0.0602	- 4,051	- 1,536	- 2,543	-2,710	PAFAH2	0.0654	1,525	1,379	6,331	3,078
RBP3	0.0258	- 1,730	- 1,285	- 4,866	-2,627	HNRPA1	0.0578	1,488	1,088	4,959	2,512
MAN2A2	0.000285	- 4,318	- 2,140	- 1,308	-2,589	RNF5	0.0101	2,097	1,878	2,227	2,067
SGCA	0.00377	- 4,436	- 2,723	- 1,590	-2,916	FLJ13149	0.0389	1,644	1,195	4,251	2,363
BCKDHB	0.0439	- 3,276	- 1,884	- 1,584	-2,248	FLJ13149	0.0389	1,644	1,195	4,251	2,363
F7	0.00664	- 1,421	- 1,329	- 4,414	-2,388	HIG2	0.0442	2,065	1,300	3,955	2,440
FUT3	0.00325	- 3,540	- 1,453	- 2,450	-2,481	GLUL	0.207	1,771	1,566	3,032	2,123
HMGCL	0.00146	- 2,548	- 2,494	- 1,268	-2,103	PI3	0.0678	2,558	1,397	2,850	2,268
IPF1	0.00985	- 2,929	- 1,547	- 1,880	-2,119	SETMAR	0.00154	3,218	1,769	2,073	2,353
RHAG	0.00186	- 2,286	- 1,669	- 2,146	-2,034	SGTB	0.0191	2,731	1,706	2,147	2,195
ABCB4	0.00238	- 2,394	- 1,612	- 2,999	-2,335	HEXIM2	0.0119	3,027	1,917	1,497	2,147
THRB	0.0172	-	-	-	-2,291	SMPD3	0.262	2,623	1,418	2,170	2,070

		2,878	2,490	1,505							
AMT	0.0131	- 3,075	- 2,313	- 2,227	-2,538	RGS17	0.00132	2,610	1,789	1,888	2,096
CYP1A1	0.00825	- 3,231	- 2,834	- 1,875	-2,647	C20orf45	0.0604	1,723	1,319	3,819	2,287
CYP21A2	0.0162	- 2,335	- 2,260	- 1,569	-2,055	PPP1CC	0.0962	2,087	1,430	3,102	2,206
HTR2A	0.00515	- 3,033	- 1,172	- 3,175	-2,460	KIF9	0.192	1,392	1,432	4,484	2,436
IL10RB	0.0346	- 3,380	- 1,426	- 1,920	-2,242	SLC39A14	0.0543	1,565	1,422	3,830	2,272
CALCB	0.0066	- 1,472	- 1,615	- 3,598	-2,228	HBLD1	0.0753	1,425	1,598	4,131	2,385
GRM8	0.174	- 2,122	- 1,491	- 2,733	-2,115	FCGR2A	0.063	1,080	1,691 up	4,902	2,991
IL12A	0.00137	- 1,573	- 1,715	- 3,603	-2,297	GIMAP4	0.167	1,782	1,862	3,626	2,423
bA9F11.1	0.136	- 1,780	- 1,317	- 4,184	-2,427	SGCB	0.00145	2,252	1,521	2,994	2,256
MAP3K15	0.00579	- 2,710	- 1,702	- 3,826	-2,746	CTBS	0.037	2,252	1,807	2,202	2,087
FLJ25996	0.0178	- 2,503	- 1,888	- 2,202	-2,198	RHPN1	0.000572	4,117	1,900	1,048	2,355
C10orf130	0.0721	- 2,974	- 2,080	- 1,905	-2,320	CD4	0.0103	3,196	2,022	1,291	2,170
ATP5G2	0.0678	- 2,301	- 1,328	- 4,587	-2,739	LOC399818	0.008	2,657	1,699	1,787	2,048
SMARCD3	0.00225	- 2,533	- 2,464	- 1,838	-2,278	TERF1	0.0618	1,730	1,643	3,458	2,277
OR2AG2	0.0303	- 3,456	- 1,548	- 1,675	-2,226	RGS5	0.0303	1,743	1,109	7,124	3,325
H3/o	0.00833	- 1,839	- 1,695	- 3,560	-2,365	KIAA1128	0.0421	3,666	1,656	1,365	2,229
OR5H2	0.0292	- 3,013	- 1,257	- 2,805	-2,358	N/A	0.0389	2,471	2,037	1,634	2,047
OR4K15	0.0134	- 2,293	- 1,980	- 2,107	-2,127	LCN12	0.0148	2,736	1,873	2,142	2,250
C8orf48	0.0586	- 3,278	- 1,727	- 1,589	-2,198	FCER1G	0.017	3,624	1,727	2,641	2,664
FLJ40453	0.182	-	-	-	-2,683	DMD	0.00507	2,018	1,156	3,758	2,311

		4,447	1,765	1,836							
CPLX2	0.00818	- 2,727	- 1,471	- 2,577	-2,258	MIB2	0.00206	2,133	1,850	2,457	2,147
AZI1	0.206	- 2,372	- 1,661	- 2,196	-2,076	KIAA0789	0.00562	3,207	1,589	2,258	2,351
C1orf69	0.04	- 1,427	- 2,051	- 3,044	-2,174	ARL4A	0.00591	1,955	1,255	3,296	2,169
HERPUD1	0.00466	- 4,779	- 2,952	1,088	-2,214	SYNCRIP	0.0153	1,706	1,568	2,998	2,091
TMEM44	0.00934	- 2,505	- 2,238	- 2,458	-2,400	WDR54	0.0907	2,276	1,442	2,672	2,130
RP11-165H20.1	0.00847	- 3,012	1,066	- 3,433	-1,793	ATP10A	0.00168	2,762	1,452	2,129	2,114
RP5-1153D9.3	0.0082	- 2,510	- 1,447	- 2,662	-2,206	MEF2A	0.02	2,832	2,042	1,682	2,185
LOC400145	0.00149	- 2,277	- 2,544	- 1,601	-2,141	ALCAM	0.122	1,745	1,289	4,144	2,393
RBM3	0.00615	- 1,427	- 2,548	- 3,111	-2,362	OPA3	0.00467	2,627	1,857	2,137	2,207
VMAC	0.00541	- 2,370	- 2,000	- 3,301	-2,557	C7orf28A	0.0056	2,336	1,997	1,779	2,037
RAB28	0.0106	- 2,234	- 1,496	- 2,412	-2,047	PBOV1	0.0117	2,328	2,270	1,663	2,087
BRCC3	0.0113	- 3,830	- 2,314	- 1,840	-2,661	EPS8L2	0.00141	2,997	1,293	2,439	2,243
PODXL	0.00296	- 2,005	- 1,019	- 4,177	-2,400	PBX2	0.154	3,340	1,728	1,856	2,308
RPL6	0.0788	- 2,304	- 1,788	- 2,941	-2,344	RHOQ	0.0118	1,714	2,163	2,212	2,030
CBWD5	0.00257	- 2,064	- 1,765	- 2,361	-2,063	ACHE	0.0557	2,443	1,810	2,067	2,107
TRIM17	0.0273	- 1,982	- 2,325	- 3,519	-2,609	PPYR1	0.039	1,740	2,174	2,769	2,228
CHI3L2	0.00194	- 2,718	- 3,593	- 2,126	-2,812	KDEL3	0.00234	1,414	3,205	1,847	2,155
CTRB2	0.0689	- 3,148	- 1,449	- 3,634	-2,744	COX6B2	0.0184	2,004	1,565	2,817	2,129
U2AF1	0.00463	- 2,844	- 1,201	- 2,928	-2,324	CCL26	0.00257	4,041	1,593	1,940	2,525
REP15	0.00299	-	-	-	-2,212	PCDHA9	0.208	2,270	2,031	1,843	2,048

		1,691	1,368	3,576							
UNQ6125	0.0111	- 1,883	- 1,365	- 3,549	-2,266	CHST2	0.0258	3,157	1,336	2,892	2,462
CCDC78	0.0588	- 3,450	- 2,038	- 2,865	-2,784	FLJ36070	0.11	1,654	1,679	3,984	2,439
FLJ35725	0.0331	- 2,176	- 1,970	- 3,080	-2,409	BTG2	0.0112	2,479	2,412	2,120	2,337
RASGEF1C	0.0104	- 2,614	- 1,553	- 2,016	-2,061	RKHD3	0.0285	1,397	1,517	4,124	2,346
OAS2	0.00785	- 2,122	- 2,420	- 2,544	-2,362	FMNL1	0.000546	2,305	1,802	2,851	2,319
DEFB134	0.000596	- 1,606	- 2,001	- 3,085	-2,231	GPBP1	0.00172	3,251	1,703	1,858	2,271
RABGAP1L	0.0951	- 2,254	- 1,785	- 4,376	-2,805	N/A	0.0109	1,773	2,298	2,756	2,276
SUSD4	0.0121	- 2,312	- 1,275	- 2,935	-2,174	KBTBD3	0.00395	3,020	2,619	1,097	2,245
RUFY3	0.0593	- 2,313	- 1,697	- 2,506	-2,172	C6orf60	0.00605	2,416	1,864	2,354	2,211
ALKBH1	0.0017	- 3,197	- 2,375	- 1,804	-2,459	K5B	0.0144	1,883	1,283	3,384	2,183
LOC643079	0.000379	- 2,264	- 1,464	- 3,770	-2,499	N/A	0.0117	1,923	1,746	2,792	2,154
FLJ45508	0.014	- 1,875	- 1,717	- 4,435	-2,676	CYP2C19	0.0585	1,769	1,400	6,680	3,283
LOC440896	0.000624	- 2,917	- 2,146	- 2,148	-2,404	BCHE	0.0818	2,260	1,634	2,257	2,050
SLC4A8	0.0715	- 1,323	- 1,769	- 3,677	-2,256	SLC5A1	0.0301	2,095	1,643	2,905	2,214
ACR	0.00749	- 2,576	- 1,182	- 2,846	-2,201	G6PD	0.116	3,493	2,262	2,287	2,681
ARL1	0.0903	- 3,735	- 1,613	- 1,696	-2,348	CHRNA4	0.0196	1,813	1,754	3,810	2,459
DNMT1	0.0281	- 1,526	- 1,137	- 4,970	-2,544	PAM	0.00121	2,235	1,436	2,576	2,082
ESRRG	0.00622	- 1,802	- 1,802	- 3,584	-2,396	PRRG1	0.0132	2,921	1,883	3,061	2,622
KLF5	0.00295	- 2,727	- 2,009	- 3,036	-2,591	ATP2B4	0.00224	3,398	1,884	1,375	2,219
COL4A2	0.0414	-	-	-	-3,024	ROPN1B	0.00992	2,556	1,283	2,536	2,125

		1,852	1,779	5,441							
CSN1S1	0.0406	- 1,529	- 1,007	- 6,012	-2,849	C1orf190	0.0493	1,987	1,316	4,484	2,596
DRP2	0.0128	- 2,501	- 1,755	- 2,886	-2,381	FRRS1	0.00451	3,029	2,051	1,530	2,203
LAMB2	0.00105	- 3,187	- 1,776	- 2,620	-2,528	FNTA	0.00506	2,716	1,657	2,227	2,200
LTB	0.0121	- 2,503	- 2,281	- 4,111	-2,965	HAX1	0.0834	1,777	2,228	2,245	2,083
MAFG	0.00158	- 3,166	- 2,053	- 1,992	-2,404	BCL7A	0.00297	4,099	2,193	1,819	2,704
MAX	0.00224	- 2,614	- 1,059	- 3,097	-2,257	ACVR2A	0.0284	2,871	1,973	1,987	2,277
NPTX1	0.00363	- 1,780	- 1,798	- 2,913	-2,164	CD22	0.00268	2,039	3,002	2,103	2,381
ORC5L	0.0829	- 2,243	- 1,836	- 2,173	-2,084	CD33	0.0429	2,284	1,622	2,174	2,027
PABPC1	0.0401	- 2,045	- 1,979	- 2,423	-2,149	INHBB	0.0316	2,667	1,690	2,312	2,223
CFP	0.000978	- 2,354	- 1,206	- 3,718	-2,426	SECTM1	0.0165	3,393	2,094	1,367	2,285
PNMT	0.00795	- 1,412	- 1,485	- 4,241	-2,379	KLF11	0.000579	2,533	2,110	1,682	2,108
POLE2	0.216	- 2,555	- 1,873	- 1,819	-2,082	SUPT3H	0.0117	3,834	2,317	- 1,020	1,710
POU4F3	0.0311	- 1,266	- 1,011	- 8,150	-3,476	LGR5	0.0117	4,023	2,368	1,141	2,511
RNASE4	0.0816	- 4,088	- 1,510	- 2,231	-2,610	RIOK3	0.0586	2,324	1,728	2,238	2,097
RPA3	0.00292	- 1,585	- 1,878	- 3,006	-2,156	TPH1	0.0508	1,977	1,379	3,996	2,451
S100A9	0.00839	- 1,909	- 1,973	- 3,209	-2,364	RAB9A	0.0994	2,280	1,215	3,229	2,241
SATB1	0.000427	- 2,613	- 1,248	- 3,448	-2,436	NOTCH4	0.137	1,869	1,585	2,947	2,134
SLC5A2	0.0134	- 3,478	- 2,383	- 3,016	-2,959	MTMR7	0.0439	2,720	1,131	2,886	2,246
SLIT1	0.00126	- 2,589	- 1,781	- 3,292	-2,554	PRPF3	0.00307	1,956	1,942	3,930	2,609
TM7SF2	0.0015	-	-	-	-2,654	STX8	0.00385	3,985	2,042	1,119	2,382

		1,559	1,522	4,881							
TOP1	0.0394	- 2,712	- 1,133	- 3,200	-2,348	MCF2	0.0137	2,245	1,750	2,058	2,018
ZFX	0.000893	- 2,551	- 1,933	- 1,836	-2,107	NCL	0.00625	2,228	1,806	2,392	2,142
HIST1H2AI	0.102	- 2,331	- 1,413	- 2,547	-2,097	AP1M2	0.00376	2,645	2,606	1,358	2,203
HIST1H3A	0.000236	- 4,374	- 1,843	- 2,563	-2,927	MLLT6	0.0157	2,450	1,469	2,231	2,050
HIST1H4F	0.0319	- 2,109	- 1,763	- 3,192	-2,355	DDX17	0.0402	3,131	1,639	1,560	2,110
HIST1H4K	0.00262	- 1,755	- 1,579	- 3,975	-2,436	PRDX4	0.0826	3,037	2,394	1,639	2,357
IFITM1	0.0262	- 2,295	- 2,745	- 1,792	-2,277	HYPE	0.0115	2,833	1,063	4,675	2,857
RIPK1	0.0191	- 2,619	- 1,625	- 1,905	-2,050	PSEN1	0.00134	1,641	1,326	3,804	2,257
HRK	0.0498	- 1,565	- 1,886	- 2,747	-2,066	AUP1	0.103	4,013	1,237	1,771	2,340
MCM3AP	0.00746	- 2,462	- 1,538	- 2,111	-2,037	EPB41L1	0.00144	2,549	1,536	2,442	2,176
SLC1A3	0.0163	- 1,371	- 1,302	- 4,766	-2,480	KIR2DS3	0.0824	3,629	2,017	1,101	2,249
GBF1	0.00058	- 2,366	- 1,026	- 3,472	-2,288	SRP68	0.0221	2,242	1,900	1,907	2,016
CD83	0.0146	- 3,747	- 2,021	- 2,314	-2,694	VPS41	0.0222	3,046	1,661	1,880	2,196
PLAA	0.0905	- 1,986	- 1,751	- 4,825	-2,854	LKAP	0.217	2,935	1,384	2,217	2,179
GDA	0.0573	- 1,902	- 1,831	- 2,337	-2,023	ADARB1	0.0229	2,479	1,343	2,467	2,096
BIN1	0.00532	- 3,117	- 1,592	- 2,582	-2,430	COPB	0.0592	2,682	1,497	2,453	2,211
FIGF	0.0172	- 1,921	- 2,110	- 2,609	-2,213	LOC51333	0.00134	3,824	1,870	1,290	2,328
COIL	0.12	- 1,502	- 2,345	- 2,298	-2,048	BTBD5	0.018	2,254	2,178	2,872	2,435
DAPK1	0.00229	- 4,375	- 1,335	- 1,997	-2,569	FLJ20647	0.037	2,823	1,945	1,534	2,101
KCNA2	0.00729	-	-	-	-2,135	C8orf32	0.0854	3,011	1,151	2,594	2,252

		2,873	1,221	2,312							
NDUFAB1	0.00357	- 2,960	- 1,755	- 1,960	-2,225	PIWIL2	0.000766	1,554	1,661	3,114	2,110
WDR1	0.15	- 1,554	- 1,348	- 4,135	-2,346	KRT24	0.0504	2,348	1,587	2,457	2,131
GPR6	0.0468	- 4,501	- 1,955	- 1,030	-2,495	UBE2O	0.0144	2,070	1,282	3,058	2,137
SLC17A4	0.0045	- 4,510	- 2,291	- 1,840	-2,880	NSUN3	0.0033	1,970	1,554	2,796	2,107
KRT6B	0.0409	- 2,483	- 2,667	- 1,227	-2,126	MMP25	0.00611	3,390	1,805	1,345	2,180
PTPRCAP	0.0122	- 3,634	- 3,161	- 2,558	-3,118	VPS16	0.00874	2,324	2,106	2,796	2,409
S100A12	0.00638	- 3,277	- 1,563	- 4,277	-3,039	ARSJ	0.123	2,141	1,424	3,101	2,222
SLC35A2	0.0254	- 2,047	- 1,644	- 2,878	-2,190	QSER1	0.042	2,770	1,471	2,075	2,105
PBEF1	0.0294	- 2,621	- 1,152	- 3,357	-2,377	KIAA1683	0.0464	2,945	1,230	2,857	2,344
RNF41	0.00173	- 3,745	- 1,588	- 1,707	-2,347	OR2W1	0.0611	3,265	3,208	1,547	2,673
MANBA	0.000953	- 2,642	- 1,310	- 2,491	-2,148	FBXW10	0.0302	2,518	2,092	1,652	2,087
MIPEP	0.0595	- 2,580	- 1,311	- 2,964	-2,285	ANKRD20A1	0.0545	1,654	1,534	3,361	2,183
TSPAN31	0.00137	- 4,334	- 1,287	- 2,023	-2,548	MEGF11	0.00186	3,267	1,501	1,898	2,222
B3GALT5	0.0355	- 2,381	- 1,549	- 2,832	-2,254	ASPH	0.0914	3,873	2,111	4,458	3,481
POLD2	0.000637	- 2,510	- 1,868	- 3,018	-2,465	DSCR8	0.0666	4,986	1,402	1,450	2,613
RRAS	0.0209	- 3,265	- 2,627	- 1,167	-2,353	TMEM128	0.0787	2,774	1,409	3,162	2,448
UQCRB	0.054	- 2,254	- 1,737	- 3,011	-2,334	C9orf26	0.052	2,185	1,338	2,830	2,118
RABAC1	0.00077	- 2,223	- 1,377	- 3,157	-2,252	CREB3L1	0.000625	2,981	1,829	1,737	2,182
DPYSL4	0.0103	- 2,874	- 1,697	- 1,812	-2,128	ACPT	0.00526	3,293	2,100	1,541	2,311
SLCO1B1	0.0035	-	-	-	-2,276	DCN	0.00237	2,582	1,984	2,158	2,241

		1,595	1,293	3,939							
POLR3F	0.00424	- 2,922	- 1,392	- 3,656	-2,657	DNAJC19	0.00619	4,236	1,923	1,020	2,393
DYRK1B	0.00325	- 2,221	- 1,679	- 2,500	-2,133	ZNF519	0.000881	4,620	2,141	1,001	2,587
USP3	0.00399	- 2,912	- 1,710	- 1,675	-2,099	PFDN5	0.0371	2,482	1,968	2,891	2,447
GNA13	0.0138	- 3,547	- 1,737	- 2,818	-2,701	PSMA3	0.000689	1,684	1,875	3,221	2,260
BTN3A1	0.00119	- 2,180	- 1,444	- 3,911	-2,512	FLJ25660	0.00607	3,625	1,502	1,667	2,265
LDB3	0.00121	- 2,893	- 1,906	- 2,009	-2,269	ARL6IP6	0.085	2,336	1,749	2,097	2,061
MAP4K1	0.0357	- 1,242	- 1,108	- 6,597	-2,982	LRRC35	0.00662	3,393	2,547	1,984	2,641
WIF1	0.0081	- 3,597	- 1,234	- 1,896	-2,242	RBM24	0.0283	2,875	1,427	2,214	2,172
PTK9L	0.0317	- 3,225	- 2,188	- 1,636	-2,350	IL19	0.0243	2,391	1,466	3,141	2,333
STAT1	0.0114	- 2,610	- 2,234	- 1,459	-2,101	PLA2G4D	0.00581	1,910	1,523	3,064	2,166
ATP1B4	0.00224	- 2,143	- 1,956	- 3,200	-2,433	TDRD10	0.00814	3,555	1,921	1,218	2,231
DPF3	0.00715	- 3,277	- 2,687	- 1,504	-2,489	TMEM95	0.014	3,278	1,925	1,335	2,179
AP3M1	0.00386	- 2,554	- 1,855	- 2,845	-2,418	FLJ32363	0.00203	2,038	1,403	2,919	2,120
P2RX2	0.00476	- 2,375	- 1,906	- 4,968	-3,083	KRTAP10-12	0.0329	2,679	2,507	2,109	2,432
SLC27A5	0.000285	- 1,894	- 1,180	- 4,072	-2,382	SFTPB	0.0101	3,834	1,243	3,635	2,904
PFDN2	0.0478	- 2,264	- 1,647	- 2,452	-2,121	C21orf123	0.0353	1,709	1,213	4,349	2,424
PTPN22	0.0277	- 2,583	- 1,919	- 3,445	-2,649	IKIP	0.0237	2,146	1,782	2,741	2,223
STEAP1	0.00091	- 2,906	- 1,261	- 3,354	-2,507	CLEC12A	0.00319	2,408	1,559	3,071	2,346
ZNF281	0.0293	- 1,728	- 1,381	- 3,380	-2,163	OR10P1	0.0382	1,455	1,247	4,452	2,385
FTSJ2	0.00736	- -	1,114	- -	-2,087	ARL9	0.0207	3,750	1,582	1,473	2,268

		1,905		5,471								
C6orf49	0.0216	- 1,458	- 1,670	- 5,362	-2,830	MYADML	0.066	1,189	1,301	5,289		2,593
TNPO2	0.0259	- 2,323	- 1,467	- 3,661	-2,484	IRF4	0.0215	4,021	1,412	1,693		2,375
NUDT5	0.0372	- 1,959	- 1,969	- 2,259	-2,062	LOC120824	0.108	1,691	1,273	4,445		2,470
EVI2A	0.0425	- 2,490	- 1,358	- 2,524	-2,124	CR1L	0.0185	4,122	2,066	1,105		2,431
TGDS	0.00145	- 1,970	- 1,597	- 2,656	-2,074	KIAA1462	0.0373	3,684	1,574	1,525		2,261
RBM9	0.00942	- 3,411	- 2,901	- 1,104	-1,736	LIPL3	0.00111	2,351	1,989	1,773		2,038
PDSS1	0.00795	- 2,367	- 2,008	- 2,554	-2,310	LOC347544	0.106	1,867	1,393	3,446		2,235
CLEC4E	0.0134	- 1,897	- 2,819	- 3,720	-2,812	LOC387753	0.00793	1,876	1,897	2,359		2,044
PCDH17	0.0157	- 3,423	- 2,111	- 1,226	-2,253	XRRA1	0.151	2,434	1,321	2,876		2,210
ERO1L	0.0575	- 2,694	- 1,093	- 2,976	-2,254	LOC440330	0.184	2,725	2,061	1,491		2,092
SOCS7	0.000574	- 1,965	- 1,586	- 2,678	-2,076	LOC653604	0.025	3,983	1,601	2,230		2,605
KIAA0274	0.000335	- 3,661	- 1,172	- 3,197	-2,677	LOC642790	0.0215	5,356	1,537	2,383		3,092
WDR47	0.0113	- 2,049	- 2,025	- 3,374	-2,483	LOC643222	0.00781	3,199	1,780	1,687		2,222
ARL6IP	0.0139	- 2,615	- 1,634	- 2,927	-2,392	EPAG	0.00208	2,738	1,869	1,780		2,129
SYNE2	0.00712	- 1,554	- 1,285	- 4,074	-2,304	LOC133993	0.0254	2,608	1,478	2,280		2,122
MYRIP	0.0376	- 2,340	- 1,018	- 3,628	-1,650	LOC644527	0.00304	3,319	1,348	2,086		2,251
ADIPOR1	0.046	- 2,446	- 2,324	- 2,622	-2,464	LOC643069	0.00297	2,944	1,367	2,634		2,315
RPL26L1	0.00119	- 2,734	- 2,286	- 1,560	-2,193	LOC653514	0.112	2,038	1,916	3,624		2,526
AADAT	0.00125	- 2,449	- 1,448	- 2,542	-2,146	LOC645231	0.0697	3,028	1,288	2,467		2,261
PADI3	0.0134	-	-	-	-2,384	LOC645964	0.0366	1,736	1,800	2,674		2,070

		2,736	1,248	3,169							
C11orf73	0.00529	- 2,535	- 1,437	- 2,369	-2,114	LOC646147	0.00884	1,780	1,327	3,851	2,319
C21orf66	0.196	- 1,736	- 2,071	- 2,565	-2,124	LOC646759	0.16	1,391	2,546	2,774	2,237
DEC1	0.0102	- 1,892	- 1,985	- 2,912	-2,263	FLJ46121	0.199	1,724	2,178	2,553	2,152
EPDR1	0.00476	- 1,987	- 1,231	- 3,400	-2,206	LOC642468	0.00691	1,947	1,766	3,938	2,550
DIRAS2	0.00132	- 2,953	- 2,410	- 4,520	-3,294	LOC642867	0.084	2,490	1,015	5,201	2,902
ALKBH4	0.00261	- 3,986	- 1,839	- 1,364	-2,396	ODZ3	0.0281	1,768	1,282	4,883	2,644
CDKAL1	0.0321	- 3,596	- 1,683	- 1,820	-2,366	LOC644173	0.0138	2,141	1,542	3,904	2,529
BTBD2	0.0511	- 2,727	- 1,330	- 2,551	-2,203	LOC645355	0.000949	2,318	1,658	2,310	2,095
LIMS2	0.00236	- 3,475	- 2,588	- 2,111	-2,725	KIAA1713	0.0151	1,829	1,436	3,137	2,134
ZNF83	0.00907	- 4,522	2,539	- 1,209	-1,064	LOC646035	0.0999	3,565	1,876	3,478	2,973
LAPTM4B	0.00768	- 1,440	- 1,273	- 4,597	-2,437	LOC646729	0.00458	1,865	1,615	2,943	2,141
JMJD1A	0.0664	- 2,116	- 1,559	- 2,870	-2,182	LOC653492	0.0248	1,882	1,734	3,067	2,228
NDUFB11	0.031	- 1,409	- 1,926	- 4,067	-2,467	LOC645676	0.058	2,357	1,216	3,263	2,279

^a Nombre recomendado de la base de datos GeneBank

11. BIBLIOGRAFIA

1. Moctezuma C. Patiño M. 2009. Cáncer Pulmonar. Anales de radiología México. 1:33-47.
2. NCI (*National Cancer Institute*). 2009. Lo que usted necesita saber sobre: Cáncer de Pulmón. Última modificación: 2009 Internet. Fecha de acceso: 15/05/2013. <http://www.cancer.gov/espanol>.
3. Martínez J.L. 2008. Cancer. Boletín de práctica médica efectiva. INSP. Secretaría de salud pública.
4. www.who.int/es
5. Ruddon RW. 2007. Cancer biology. Oxford. University Press Inc. Fourth edition. Pp545
6. <http://csite2.tripod.com/id20.htm>
7. Devi PU. Basics of carcinogenesis. 2005. Health Administrator. 17(1): 16-24.
8. Hennings H. Glick AB, Greenhalgh DA. 1993. Promotion and progresión in multistage epidermal carcinogenesis. Exp Biol Med. 202: 1-8.
9. Herbst RS, Heymach JV and Lippman SM. Molecular origins of cancer lung cancer. 2008. N Engl J Med; 359 (13): 1367-1380.
10. NCI (*National Cancer Institute*). 2011. Tendencias en los índices de incidencia y de mortalidad. Última Modificación 2011. Fecha de acceso: 20/05/2011. <http://seer.cancer.gov>.

11. Tovar V, López F, Rodríguez N. 2005. Tendencias de la mortalidad por cáncer pulmonar en México, 1980-2000. *Rev Panam Salud Pública*. 17(4):254-62.
12. Globocan, 2012. <http://globocan.iarc.fr>
13. Gurrola-Díaz CM, González-Santiago AE, Troyo-Sanromán R y Memdoza-Topec LA. Tipos histológicos y métodos diagnósticos en cáncer pulmonar en un centro hospitalario de tercer nivel. 2009. *Gac Med Méx*; 146(2): 97-101.
14. Rom WR, Hay JG, Lee TC, Jiang Y and Tchou-Wong KM. Molecular and genetic aspects of lung cancer. 2000. *Am J Respir Crit Care Med*; 161: 1355-1367.
15. Stephen H. Smooth delivery. 1999. *Nurs Stand*; 13(31): 14-15.
16. Stepanov I, Upadhyaya P, Carmella SG, Feuer R, Jensen J, Hatsukami DK and Hecht SS. Extensive metabolic activation of the tobacco-specific carcinogen 4-(metylnitrosamino)-1-3(3-pyridil)-1-butanone in smokers. 2008. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 17(7): 1764-1773.
17. Hoffmann D and Djordjevic MV. Chemical composition and carcinogenicity of smokeless tobacco. 1997. *Adv Dent Res*; 11(3): 322-329.
18. Danesi R, De Braud F, Fogli S, De PAS MT, Di Paolo A, Curigliano G and Del Tacca M. Pharmacogenetics of anticancer drug sensitivity in non-small cell lung cancer. 2003. *Pharmacol Rev*; 55: 57-103.
19. Sekido Y, Fong KM, and Minna JD. Molecular genetics of lung cancer. 2003. *Annu Rev Med*; 54:73-87.

20. Forgacs E, Zöchbauer-Müller S and Minna JD. Molecular genetic abnormalities in the pathogenesis of human lung cancer. 2001. *Pathol Oncol Res*; 7(1):1-8
21. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. 2002. *Oncogene*, 21(48): 7435-7451.
22. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers
23. Ducasse M and Brown MA. Epigenetic aberrations and cancer. 2006. *Mol Cancer*; 5(60): 1-10
24. Lagos-Sánchez E and Soto-Monge T. Epigénetica y cáncer. 2007. *Revista médica de Costa Rica y CentroAmerica*; LXIV (580): 177-182.
25. <http://mexico.cnn.com/salud/2013/02/04/cancer-de-pulmon>
26. <http://www.icarito.cl/enciclopedia/articulo/>
27. <http://incan-mexico.org/>
28. González C. Bruno C. Salaiato O. Alvarez C. 2012. Actualización de la estadificación del cáncer de pulmón. *Oncología. RAR - Volumen 76 - Número 4*. 325-330.
29. <http://www.cancer.org/>
30. GLOBOCAN, 2012. <http://globocan.iarc.fr/>
31. Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF. 2003. Lung Cáncer. *Molecular Biology of lung cancer: clinical implications. Thorax* ; 58:892-900.

32. <http://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-pulm%C3%B3n/diagn%C3%B3stico>
33. Zhang Y. He J. 2013. The development of targeted therapy in small cell lung cancer. *Thorac Dis.* 5(4):538- 548
34. Zakowski MF. 2013. Pathology of small cell carcinoma of the lung. *Semin Oncol.* 30:3–8.
35. Difilippantonio S. Chen Y. Pietas A. Schluns K. Pacyna M. Deutschmann N Padilla-Nash HM. Ried T. 2003. Gene expression profiles in human non-small and small-cell lung cancers Original Research Article *European Journal of Cancer.* 39: 13:1936-1947.
36. Bangur CS. Suiza A. Fan L. Marton MJ. Meyer MR. Wang T. 2002. Identification of genes over-expressed in small cell lung carcinoma using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray expression analysis. *Oncogene.* 21(23): 3814-25
37. Taniwaki M. Daigo Y. Ishikawa N. Takano A. Tsunoda T. Yasui W. Inai K. Kohno Y. Nakamura Y. 2006. Gene expression profiles of small-cell lung cancers: Molecular signatures of lung cancer. *International Journal of Oncology* 29: 567-575.
38. Voortman J, Lee JH, Killian JK, Suuriniemi M et al. Array comparative genomic hybridization-based characterization of genetic alterations in pulmonary neuroendocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Jul 20;107(29):13040-5.

39. Pierce, K. L., Premont, R. T. & Lefkowitz, R. J. Seven- transmembrane receptors. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 639–650 (2002).
40. Neves, S. R., Ram, P. T. & Iyengar, R. G protein pathways. *Science* 296, 1636–1639 (2002).
41. Dorsam T. Gutkind S. 2010. G-protein-coupled receptors and cáncer. *Nature Review.* Vol 7.79-94.
42. Huang G. Haizhu S. Rui W. Xiaodong H. Longbang C. 2012. The Relationship Between RGS5 Expression and Cancer Differentiation and Metastasis in Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Surgical Oncology* 2012;105:420–424.
43. Jing-Hua Wang, Wei-Sun Huang, Cheng-Ru Hu, Xiao-Xiang Guan, Hang-Bo Zhou, Long-Bang. 2010. Relationship between RGS5 expression and differentiation and angiogenesis of gastric carcinoma. *Chen World J Gastroenterol.* 28; 16(44): 5642-5646.
44. Neubig R. Siderovski D. 2002. Regulator of G-protein signalling as new central nervous system drug targets. *Nature reviews.* Vol 1. 187-195.
45. Geetanjali Bansal, Kirk M. Druey. 2007. RGS Proteins: Regulation of G Protein Signaling and Beyond. *Pharmacol Ther.* 116(3): 473–495.
46. Zhou Y, Bollu LR, Tozzi F, Ye X, Bhattacharya R, Gao G, Dupre E, Xia L, Lu J, Fan F, Bellister S, Ellis LM, Weihua Z. 2013. ATP citrate lyase

- mediates resistance of colorectal cancer cells to SN38. Mol Cancer Ther. 2013 Dec;12(12):2782-91.
47. Niu GM, Ji Y, Jin DY, Hou J, Lou WH. 2010. [Clinical implication of BRSK2 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma]. Apr 27;90(16):1084-8.
 48. Xiao Y, Yuan Y, Zhang Y, Li J, Liu Z, Zhang X, Sheng Z, Xu T, Wang X. 2014. CMTM5 is reduced in prostate cancer and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo. Clin Transl Oncol. 2014 Nov 12.
 49. Tang X1, Yin X, Xiang T, Li H, Li F, Chen L, Ren G. 2012. Protocadherin 10 is frequently downregulated by promoter methylation and functions as a tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer. Cancer Biomark. 2012-2013;12(1).
 50. Hu BS1, Hu H, Zhu CY, Gu YL, Li JP. Overexpression of GOLPH3 is associated with poor clinical outcome in gastric cancer. Tumour Biol. 2013 Feb;34 (1):515-20.
 51. Hata T1, Ogawa T, Yokoyama TA, Fukushige S, Horii A, Furukawa T. 2004 DSCP1, a novel TP53-inducible gene, is upregulated by strong genotoxic stresses and its overexpression inhibits tumor cell growth in vitro. Int J Oncol, Mar;24(3):513-20.
 52. Xiao M1, Jia S, Wang H, Wang J, Huang Y, Li Z. 2013. Overexpression of LAPTM4B: an independent prognostic marker in breast cancer. Cancer Res Clin Oncol.

53. Pulipati NR, Jin Q, Liu X, Sun B, Pandey MK, Huber JP, Ding W, Mulder KM. 2011. Overexpression of the dynein light chain km23-1 in human ovarian carcinoma cells inhibits tumor formation in vivo and causes mitotic delay at prometaphase/metaphase. *Int J Cancer*. 2011 Aug 1;129(3):553-64.
54. Pulipati NR, Jin Q, Liu X, Sun B, Pandey MK, Huber JP, Ding W, Mulder KM. 2011. Overexpression of the dynein light chain km23-1 in human ovarian carcinoma cells inhibits tumor formation in vivo and causes mitotic delay at prometaphase/metaphase. *Int J Cancer*. 2011 Aug 1;129(3):553-64.
55. Scrideli CA, Carlotti CG Jr, Okamoto OK, Andrade VS, Cortez MA, Motta FJ, Lucio-Eterovic AK, Neder L, Rosemberg S, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Tone LG. 2008. Gene expression profile analysis of primary glioblastomas and non-neoplastic brain tissue: identification of potential target genes by oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *J Neurooncol*. 2008 Jul;88(3):281-91. doi: 10.1007/s11060-008-9579-4. Epub 2008 Apr 9.
56. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2013 Expression and significance of MMP-26, TIMP-4 and MMP-9 in diffuse large B-cell lymphoma cells. *Oct*;21(5):1167-72.

57. de la Peña S, Sampieri CL, Ochoa-Lara M, León-Córdoba K, Remes-Troche JM. 2014. Expression of the matrix metalloproteases 2, 14, 24, and 25 and tissue inhibitor 3 as potential molecular markers in advanced human gastric cancer. *Dis Markers*. 2014.
58. Bodle CR, Mackie DI, Roman DL. 2013. RGS17: an emerging therapeutic target for lung and prostate cancers. *Future Med Chem*. 2013 Jun;5(9):995-1007.
59. Rozengurt, E., Guha, S. & Sinnett-Smith, J. Gastrointestinal peptide signalling in health and disease. *Eur. J. Surg. Suppl.* 23–38 (2002).
60. Han P, Liang W, Baxter LC, Yin J, Tang Z, Beach TG, Caselli RJ, Reiman EM, Shi J. 2014 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is reduced in Alzheimer disease. *Neurology*. 2014 May 13;82(19):1724-8.
60. Sun W, Guo C, Meng X, Yu Y, Jin Y, Tong D, Geng J, Huang Q, Qi J, Liu A, Guan R, Xu L, Sun D, Ji W, Liu P, Liu F, Sun H, Ji G, Fu S, Bai J. 2012. Differential expression of PAI-RBP1, C1orf142, and COTL1 in non-small cell lung cancer cell lines with different tumor metastatic potential. *J Investig Med*. 2012 Apr;60(4):689-94.
61. Jeong HC, Kim GI, Cho SH, Lee KH, Ko JJ, Yang JH, Chung KH. 2011. Proteomic analysis of human small cell lung cancer tissues: up-regulation of coactosin-like protein-1. *J Proteome Res*. 2011 Jan 7;10(1):269-76.

62. Zhang Y, Molavi O, Su M¹, Lai R. 2014. The clinical and biological significance of STAT1 in esophageal squamous cell carcinoma. BMC Cancer. 2014 Oct 29;14:791.
63. Bao W, Fan Q, Luo X, Cheng WW, Wang YD, Li ZN, Chen XL, Wu D. Silencing of Cathepsin B suppresses the proliferation and invasion of endometrial cancer. Oncol Rep. 2013 Aug;30(2):723-30
64. Pan Y, Huang J, Xing R, Yin X, Cui J, Li W, Yu J, Lu Y. 2013. Metallothionein 2A inhibits NF- κ B pathway activation and predicts clinical outcome segregated with TNM stage in gastric cancer patients following radical resection. J Transl Med. 2013 Jul 19;11:173.
65. Siuti N¹, Roth MJ, Mizzen CA, Kelleher NL, Pesavento JJ. 2006. Gene-specific characterization of human histone H2B by electron capture dissociation. J Proteome Res. 2006 Feb;5(2):233-9.
66. Meisenberg C, Ward SE, Schmid P, El-Khamisy SF. 2014. TDP1/TOP1 Ratio as a Promising Indicator for the Response of Small Cell Lung Cancer to Topotecan. J Cancer Sci Ther. 2014 Jul 25;6(7):258-267.
67. Andres DA, Milatovich A, Ozçelik T, Wenzlau JM, Brown MS, Goldstein JL, Francke U. 1993. cDNA cloning of the two subunits of human CAAX farnesyltransferase and chromosomal mapping of FNTA and FNTB loci and related sequences. Genomics. 1993 Oct;18(1):105-12.

68. Laitila J, Hanif M, Paetau A, Hujanen S, Keto J, Somervuo P, Huovinen S, Udd B, Wallgren-Pettersson C, Auvinen P, Hackman P, Pelin K. Expression of multiple nebulin isoforms in human skeletal muscle and brain. *Muscle Nerve*. 2012 Nov;46(5):730-7.