



PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
**CATOLICA**  
**DE VALPARAISO**



UNIVERSIDAD TECNICA  
**FEDERICO SANTA MARIA**

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO  
UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

**PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA**

Memoria escaneada  
Casa Central  
1326

USM. BIBLIOTECA CENTRAL



3560900139364

"DESARROLLO DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA  
PREVENCIÓN DE CÁNCER BRONCOPULMONAR, ASOCIADO A  
CONTAMINACIÓN POR ARSÉNICO EN LA SEGUNDA REGIÓN"

**Tesis presentada para la obtención del Grado Académico  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA**

**Candidato: Christian Jesús Mandiola Quillilongo**

Director de Tesis: Dr. Jorge Escobar Fica

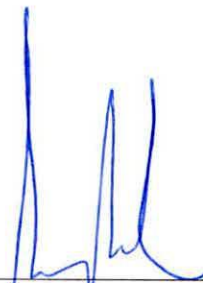
Co-Director: Dr. Miguel Ríos Ramírez

*Valparaíso:  
UTFSM; PUCV  
2008*

**U.T.F.S.M.  
BIBLIOTECAS**

Comisión Evaluadora:

Dr. Sergio Marshall G.  
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso  
Presidente



---

Dr. Ricardo Simpson R.  
Universidad Técnica Federico Santa María  
Evaluador Interno

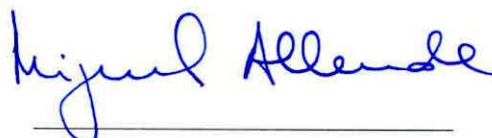


---

Dr. Alejandro Corvalán R.  
Pontificia Universidad Católica de Santiago  
Evaluador Externo

---

Dr. Miguel Allende C.  
Universidad de Chile  
Evaluador Externo



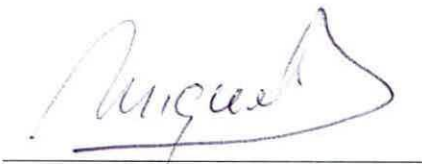
---

Dr. Jorge Escobar F.  
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso  
Director de Tesis



---

Dr. Miguel Ríos R.  
Universidad de Santiago de Chile  
Co-Director de Tesis



---

*Dedicado:*

*A la Memoria de mi Padre, Don Gastón Mandiola E.*

*Al Esfuerzo y Ejemplo de mi Madre, Doña Ruth Quililongo A.*

*A la Alegría de mi Hermano Ignacio y mis Sobrinos.*

*Y a la Esperanza del cambio...para mi Hermana Carolina.*

#### Agradecimientos:

- Al Programa Conjunto de Doctorado en Biotecnología de la PUCV y UTFSM, por darme la posibilidad de iniciar esta aventura.
- A la Distinguida y Honorable Comisión evaluadora, por su paciencia y por sus asertivas y claras observaciones para el mejoramiento de esta tesis.
- A la Dra. Mari Cleide Sogayar (USP, Brasil), por recibirme en su laboratorio durante mi pasantía en la Universidad de Sao Paulo.
- Al Dr. Luis Velazquez (USACH), al Dr. Bernardo Morales (USACH), al Dr. Nelson Osses (PUCV), al Dr. Marco Soto (PUC), al Dr. Francisco González (UV), Dr. Gustavo González (PUCV), al Dr. Frank Quina (USP, Brasil), por su participación y/o colaboración en esta tesis.
- A los Profesores y Maestros del Programa, en particular al Dr. Sergio Marshall por su siempre abierta disposición al dialogo y a compartir sus experiencias profesionales y de vida, al Dr. Hugo Peña por ser claro y honesto en sus observaciones, a Dr. Manuel Yang por ameno y franco de sus charlas y clases, al Dr. Ricardo Simpson...por la historia del chino "Chu...", a Dr. Michael Seeger por su paciencia y buena voluntad.
- A mis compañeros de Programa...simplemente por todos los bueno y duros momentos que vivimos.
- Al Dr. Miguel Ríos, porque no solo asumió la responsabilidad de ser Co-Director, si no por ser un sujeto bonachón...de esos que no aparecen siempre en la vida.
- A Carolina Gallardo y Miguel Villablanca...lo que implica también al Cristián Villablanca, obvio...porque aunque no lo esperé, no temo decir que son mis amigos y son parte de mi vida.
- A la gente que trabaja o trabajo en laboratorio de Toxicología Molecular y Biotecnología de la PUCV, Carola Gallardo (otra vez), Erika Pozo, Lissete Valencia, Constanza Maldifassi, Ninoska Delgado y muchos más que se me olvidan...porque me aguantaron o me aguantan a pesar de mi "genio".
- A Claudio Concha...por ser transparente, por tener una sonrisa a pesar de todo y por las "bebidas", que sirvieron para relajarse en momentos complicados.
- A mis amigos y colegas de una mil aventuras...Jonny, Jaime, Roberto, Juan Pablo, Iván, Rodrigo (y varios más)...y a mis amigas de las buenas y de las otras también.
- Y finalmente, y no por eso menos importante, a Jorge...no solo por ser el Director de esta Tesis, que quizás sea lo de menos, ya que infinitamente superior a eso es la amistad que se ha cultivado por todos estos años, por confirmarme que la lealtad debe ser a toda prueba...y que en la vida hay que ocuparse y no preocuparse.

¡A TODOS GRACIAS!

## Resumen

El Arsénico, ya sea natural o antrópico, es transportado en el ambiente principalmente a través del agua y aire. El As es un compuesto considerado como un poderoso cancerígeno para el ser humano. La exposición al As puede estar asociado a un envenenamiento crónico, por el consumo de alimentos y/o agua contaminada (oral) y la exposición ambiental (respiratoria).

El cómo actúa el As como cancerígeno aún no está claro, pero se ha reportado la utilización de diversos biomarcadores moleculares, para diagnosticar la formación de cáncer por presencia de As. Los biomarcadores genéticos y epigenéticos, de genes asociados a cáncer de pulmón, son determinados y complementarios entre ellos, definiendo parámetros de diagnóstico asociadas a la exposición al As (III).

El cáncer de pulmón, es la principal causa de muerte relacionada con cáncer entre hombres y mujeres en el mundo, esto porque el diagnóstico es tardío, haciendo ineficiente el desarrollo de un tratamiento. Por esta razón es que se hace necesario definir biomarcadores con capacidad preventiva (pronóstico) específicos para cada tipo de cancerígeno, ya que cada cancerígeno actúa de manera distinta.

En el caso del cáncer de pulmón, se han reportado innumerables biomarcadores genéticos y epigenéticos, pero se definió trabajar con 4 genes que se reportan asociados al arsénico y/o al cáncer de pulmón, *CDKN2 (p16)*, *Retinoblastoma 1 (Rb1)*, *O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT)*, *proteína quinasa asociada a la muerte tipo 1(DAPk-1)*.

Se postula por lo tanto que la combinación de los niveles de metilación y los niveles de expresión de mRNA de genes asociados a cáncer de pulmón, pueden ser utilizados como elementos predictivos. Planteándose el trabajo en una etapa *in vitro* y otra *in vivo*, en la primera fase se trabajó con líneas celulares de cáncer de

pulmón humano y fibroblastos humanos, y en la otra etapa se trabajo con muestras de paciente altamente expuestos a As y una población control. Este estudio de corroboró, que el proceso de metilación no el secuencial, y que por lo tanto la información obtenida es simplemente si ocurre o no, por otra parte se pudo estimar rangos de niveles de expresión de mARN, los cuales dan cuenta de una relación entre la alteración de expresión y los niveles de As (estudio *in vitro*).

Las variaciones de los niveles de expresión de los mARN y la señal de metilación de los mismos, poseen un valor pronóstico. Dichos valores son utilizados como criterios estadísticos en técnicas de análisis multivariante de datos, en un software estadístico, lo que permitirá generar análisis discriminantes que permitan asociar el análisis de una muestra (o paciente) en una población predefinida

## Summary

Arsenic, whether natural or man-made, is transported in the environment primarily through water and air and arsenic is considered a potent carcinogen to humans. Arsenic exposure can be associated to chronic poisoning, food consumption and/or contaminated water (oral) and environmental exposure (respiratory).

How arsenic works as carcinogen is not yet clear, however various molecular biomarkers, have been reported to diagnose cancer due to the presence of arsenic. Genetic and epigenetic biomarkers, genes associated with lung cancer, are complementaries between them, defining parameters of diagnosis associated with exposure to As (III).

Lung cancer is the leading cause of cancer-related death among men and women in the world, because its diagnosis is delayed, making inefficient the development of a proper treatment. For this reason is necessary to define biomarkers with preventive capacity (forecast) for each specific type of carcinogen, as each carcinogen acts differently.

In the case of lung cancer countless genetic and epigenetic biomarkers have been reported, however it was agreed to work with 4 genes that have been reported to be associated with arsenic and / or lung cancer, CDKN2 (p16), Retinoblastoma 1 (RB1), O6 metilguanina-DNA methyltransferase (MGMT), protein kinase associated with death rate 1 (DAPk-1).

We therefore hypothesize that the combination of methylation levels and mRNA expression levels of genes associated with lung cancer can be used as predictive elements. Considering to work in stages in vitro and in vivo, in the first phase we used cell lines of human lung cancer and human fibroblasts, and the other phase we used patient samples highly exposed to arsenic and a control population.

This study confirmed that the methylation process rather than sequential process, and therefore from the information obtained, this is an all or none process. On the other hand we were able to estimate ranges of expression mRNA, which account for a relationship between the alteration of expression and arsenic levels (in vitro study).

Variations in mRNA expression levels and methylation signal of them have a prognostic value. These values are used as criteria in statistical techniques of data multivariate analysis of with statistical software, which will generate discriminant analysis to link the analysis of a sample (or patient) to a predefined population.

## Índice General

Cap	Contenido	Pag.
	Resumen	<i>i</i>
	Summary	<i>iii</i>
	Índice General	<i>v</i>
	Índice de Figuras	<i>vii</i>
	Índice de Tablas	<i>ix</i>
<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
	1.1 Arsénico	1
	1.2 Arsénico y Cáncer	2
	1.2.1 Cáncer de Pulmón	12
	1.3 Biomarcadores	18
	1.3.1 Biomarcadores y Cáncer de Pulmón	19
<b>2</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>Objetivos</b>	<b>23</b>
	3.1 Objetivo General	23
	3.2 Objetivos Específicos	23
<b>4</b>	<b>Diseño experimental</b>	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	<b>25</b>
	5.1 Estudio <i>in silico</i>	25
	5.1 Pacientes y Grupo control	31
	5.2 Cultivo Celular	32
	5.3 Extracción de Material Genético	33
	5.3.1 Extracción y Purificación de ADN genómico con Solución de Chomczynski	33
	5.3.2 Extracción y Purificación de ARN total con Solución de Chomczynski-Fenol	35
	5.4 PCR y RT-PCR	36
	5.4.1 PCR	36
	5.4.2 RT-PCR	37
	5.5 Metilación del ADN	39
	5.6 PCR en tiempo Real	40
	5.7 Arreglos de ADN	44

5.7.1 Macroarreglos	45
5.7.2 Microarreglos	49
5.8 Método Estadístico	51
<b>6 Resultados</b>	<b>55</b>
6.1 Curva de Viabilidad y Crecimiento	55
6.2 Arreglos	57
6.2.1 Macroarreglos	57
6.2.2 Microarreglos	62
6.3 Metilaciones de ADN	68
6.4 PCR en Tiempo Real	75
6.5 Método Estadístico	84
<b>7 Conclusión</b>	<b>88</b>
<b>8 Proyección</b>	<b>90</b>
<b>9 Abreviaturas</b>	<b>91</b>
<b>10 Bibliografía</b>	<b>93</b>
<b>11 Anexos</b>	<b>105</b>

## Índice de Figuras

Fig.		Pag.
1	Regiones con alta concentración de arsénico	2
2	Mecanismo de metilación y modelo de carcinogenicidad del arsénico	5
3	Esquema que relaciona alteración en las metilaciones con tumores	6
4	Mecanismo propuesto para silenciamiento transcripcional	8
5	Mecanismo que se propone para hipermetilación e hipometilación	10
6	Modelo simple de regulación de ciclo celular	13
7	Modelo propuesto que asocia las proteínas de p53 y Rb1 en el cáncer de pulmón.	14
8	Sitios de regulación de p16 y p21	15
9	Mecanismo propuesto para la interacción DNMT1-Rb1	17
10	Esquema del diseño experimental	24
11	Modelo de Kegg que indica los eventos moleculares afectados en NSCLC	29
12	Modelo de Kegg que indica los eventos moleculares afectados en SCLC	29
13	Modelo propuesto del estudio <i>in silico</i>	30
14	Esquema del funcionamiento de una sonda UPSH	41
15	Página web de ROCHE® para la búsqueda de sondas UPSH y partidores	42
16	Esquema del proceso experimental del macroarreglo	45
17	Esquema del proceso experimental del microarreglo	50
18	Diagrama de flujo para seleccionar la técnica de análisis de múltiple variables de datos	52
19	Curva de crecimiento y viabilidad	56
20	Imágenes de la membranas de macroarreglo	59
21	Imagen de un segmento del microarreglo y su dendograma de jerarquización asociado	62
22	Resultado de los genes de interés del microarreglo y la jerarquización entre pacientes	64
23	Gráfico de probabilidad Q-Q "sin tendencia" para el análisis de los resultados de microarreglo de cada paciente	67
24	Imagen del gel de agarosa de $\beta$ -actina como control del análisis de metilaciones	68
25	Imágenes de geles de agarosa para el análisis de mutación de DAPk1	69

26	Gráfico de barra de las IOD max. de los geles de agarosa para el análisis de mutilación de DAPk1	70
27	Imágenes de geles de agarosa para el análisis de mutilación de p16	71
28	Gráfico de barra de las IOD max. de los geles de agarosa para el análisis de mutilación de p16	71
29	Imágenes de geles de agarosa para el análisis de mutilación de Rb1	72
30	Gráfico de barra de las IOD max. de los geles de agarosa para el análisis de mutilación de Rb1	72
31	Imágenes de geles de agarosa para el análisis de mutilación de MGMT	73
32	Gráfico de barra de las IOD max. de los geles de agarosa para el análisis de mutilación de MGMT	73
33	Geles de agarosa de los controles de metilación	75
34	Gel de agarosa de GADPH, como control del qPCR	76
35	Imágenes de los reportes del software de LightCycler 2.0, tanto para la adquisición de datos, como de la curva patrón generada	76
36	Esquemmatización de los pasos a seguir en la obtención y análisis de los datos de qPCR	77
37	Gráfico de Barra de los resultados de qPCR	80
38	Grafico en 3D de la relación entre tiempo de exposición, concentración de exposición y niveles de cADN detectados en el qPCR de DAPk1 y MGMT	82
39	Grafico en 3D de la relación entre tiempo de exposición, concentración de exposición y niveles de cADN detectados en el qPCR de Rb1 y p16	83

## Índice de Tablas

Tabla		Pag.
1	Genes asociado a islas CpG, involucrados con el control del crecimiento celular o metástasis. Se destacan genes de interés.	7
2	Indica algunos genes descritos en la literatura, que muestran una metilación anormal asociado a algún tipo de cáncer de pulmón	2
3	Se muestra una lista de 80 genes afectados por proceso de metilación, ya sea por silenciamiento como es el caso de oncogenes o control de expresión como los son factores de transcripción y genes supresores de tumores	25
4	protocolo de RT de mRNA obtenidos de las muestras expuestas a As(III) y sus controles	38
5	Se indican las secuencias de los partidores utilizados en el estudio de metilación	40
6	Se indica el resultado de la búsqueda de la sonda y partidores de los genes en estudio, en el software "buscador y diseñador de <i>sonda-primer</i> " de ROCHE®	42
7	Se indican los volúmenes y la concentración final de los reactivos utilizados en la generación de la mezcla para realizar el qPCR.	43
8	Se indican los parámetros de trabajo del termociclador LightCycler®	43
9	Se presentan los productos anexos, para el desarrollo de un arreglo, sugerido por la empresa <i>Affymetrix. Inc.</i>	51
10	tabla de viabilidad y crecimiento, cada 120 horas aproximadamente	55
11	Se indica la razón existente entre los valores (D.O.) de las células expuestas y el control	59
12	Lista de genes seleccionados del Microarreglo y analizados por jerarquización	63
13	Resultados de qPCR de diferentes muestras de productos RT a una concentración inicial de 2 ng/ $\mu$ L	81
14	Esta tabla que esquematizaría la condiciones de los resultados para definir los valores de rango o de discriminación de riesgo (R) y normalidad (N).	87



# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1 El Arsénico

El arsénico (As), es un metaloide localizado en el grupo V(a) de la tabla periódica, pertenece al grupo de los “*pnictides*”, por su capacidad de formar iones de valencia +3 ( $\text{As}^{3+}$ ) [Hughes, M. F. 2006; Del Razo *et. al.* 2001], además el As, presenta valencia 0 ( $\text{As}^0$ ), +5 ( $\text{As}^{5+}$ ) y -3 ( $\text{As}^{3-}$ ) [Santolaya, R. *et. al.* 1994; <http://www.who.int>; [http://www.hazmat.cl/HTML/Centro\\_Doc\\_Arsenico.htm#2](http://www.hazmat.cl/HTML/Centro_Doc_Arsenico.htm#2)].

El As esta presente en forma natural en el medio ambiente (tierra, agua y aire) [Hughes, M. F. 2006; Frumkin & Thun. 2001; Waxman & Anderson. 2001; Liu J. *et. al.* 2001; Liu S. *et. al.* 2001, Santolaya, R. *et. al.* 1994], y raramente se presenta como un metal (en su forma pura), es más común, formando compuestos inorgánicos con oxígeno, hierro, cloro y/o sulfuros [Hughes, M. F. 2006; Frumkin & Thun. 2001; Waxman & Anderson. 2001]. Se encuentra, además, asociado a átomos de carbono, conformando moléculas orgánicas, como monometilarsénico (MMA) y dimetilarsénico (DMA), arsina y sus variedades, carbarsona, etc., siendo moléculas más estables que las inorgánicas [Frumkin & Thun. 2001; Waxman & Anderson. 2001; Santolaya, R. *et. al.*, 1994]. También se presenta en forma de desechos industriales, asociado a la producción de la industria minera, principalmente producción de **cobre**, plomo y otros metales [Liu, J. *et. al.* 2001; Vernhet, L. *et. al.* 2001].

El arsénico, ya sea natural o antrópico, es transportado en el ambiente principalmente a través del agua y aire. En algunas zonas del mundo, como México, Argentina, **Chile** (principalmente en la zona del Norte Grande), Bangla-Desh (India), Taiwán, etc. (Fig. 1), por razones geológicas, el agua puede contener

más arsénico inorgánico del habitual [Hug, S. *et. al.* 1999; [http://www.hazmat.cl/HTML/Centro\\_Doc\\_Arsenico.htm#2](http://www.hazmat.cl/HTML/Centro_Doc_Arsenico.htm#2)].

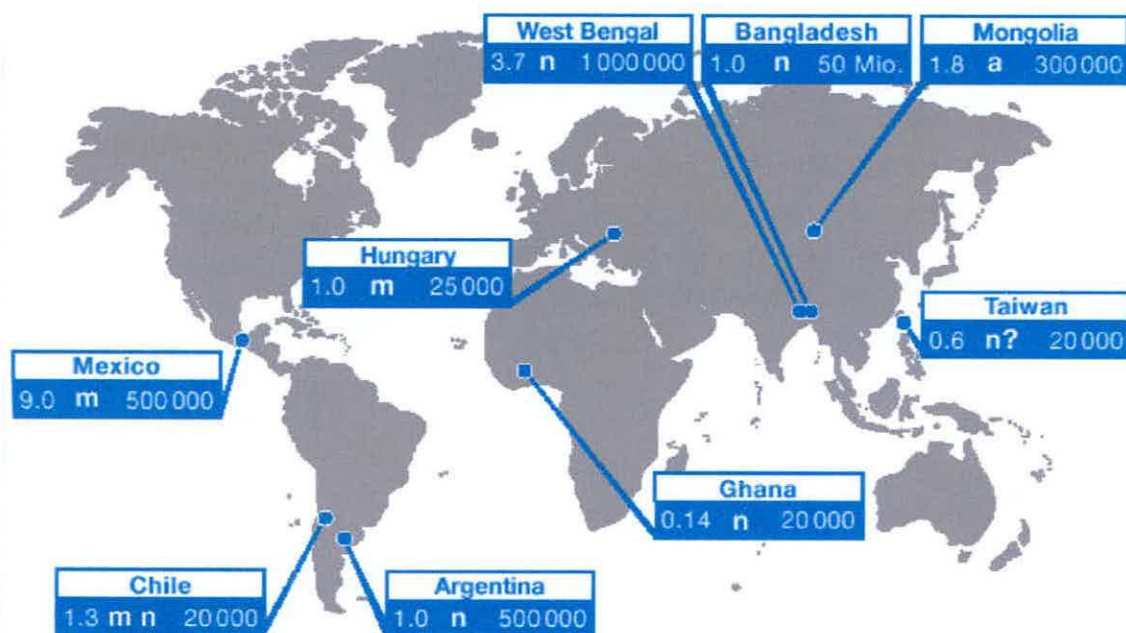


Fig. 1 Regiones con alta concentración de arsénico. En el lado izquierdo del recuadro la concentración máxima de arsénico en mg/L. La letra al centro del recuadro, indica el tipo de fuente para el arsénico (n = natural, m = minería, a = agricultura). El número a la derecha del recuadro, indica la cantidad de población afectada (en términos de miles).

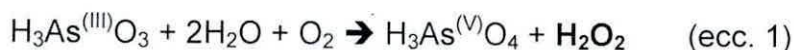
Existen también otros países, como EE.UU. y Reino Unido que también presentan contaminación antrópica por As, debido a la aplicación de pesticidas y preservantes de madera [Hughes, M. F. 2006; Frumkin & Thun. 2001].

## 1.2 Arsénico y Cáncer

El As es un compuesto considerado como un poderoso cancerígeno para el ser humano, asociado fuertemente al cáncer de piel y **pulmón** [<http://www.who.int>; Eblin, K. E. *et. al.* 2007; McNeely, S. C. *et. al.* 2006; Cui, X. *et. al.* 2006; Andrew, A. S. *et. al.* 2006; Woo, S. H. *et. al.* 2002; Huang, C. *et. al.* 1999; Del Razo, L. M. *et. al.* 2001; Liu, S. *et. al.* 2001; Thomas, D. *et. al.* 2001, Yu, R. C. *et. al.* 2000; Mass &

Wang. 1997], pero es un enigma como se genera la transformación celular a causa del metaloide [Andrew, A. S. *et. al.* 2006; Zhao, C. Q. *et. al.* 1997]. La exposición al As puede estar asociado a un envenenamiento crónico, por el consumo de alimentos y/o agua contaminada (oral) y la exposición ambiental (respiratoria), esta última asociada a una exposición laboral [<http://www.who.int>; Liu, S. *et. al.* 2001].

Se ha determinado que el Arsénico es capaz de generar especies radicalarias de oxígeno (ROS) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [Gurr, J. R. *et. al.* 1998; Chen, Y. C. *et. al.* 1998; Barchowsky, A. *et. al.* 1999; Liu, S. *et. al.* 2001; Del Razo, L. M. *et. al.* 2001; Woo, S. H. *et. al.* 2002; Shen, Z. Y. *et. al.* 2003; Liu, L. *et. al.* 2003; Shi, H. *et. al.* 2004; Huang, C. *et. al.* 2004; Chou, W. C. *et. al.* 2005]. La formación de ROS, aún no es clara, pero se postula que se puede generar por la formación de metabolitos secundarios, producto de la metabolización del As inorgánico (iAs), hipótesis que aún no ha sido demostrada [Del Razo, L. M. *et. al.* 2001]. Otra posibilidad para la formación de ROS, es por la oxidación de iAs<sup>III</sup> a iAs<sup>V</sup>, que ocurre bajo condiciones fisiológicas, produciendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ecc. 1).



$$(\Delta G^0 = -40.82 \text{ Kcal/ mol})$$

La formación de ROS, asociado a la exposición a As, es una de las aproximaciones que se realizan entre el Arsénico y la formación de cáncer [Chen, H. *et. al.* 2004; Liu, S. *et. al.* 2001]. ROS, es generado en la mitocondria durante la respiración, y por distintos sistemas enzimáticos. Los bajos niveles de ROS regulan señales celulares y la normal proliferación celular, la regulación de ROS a nivel celular, esta gobernado principalmente por sistemas enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) [Benhar, M. *et. al.* 2002]. Se ha demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro* que los niveles de enzimas antioxidantes se encuentran alteradas en cáncer. Los estudios bioquímicos más consistentes, se

basan en la variación de manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), disminuyendo en varios tipos de cánceres primarios [Oberley, T. 2002].

Otro suceso molecular (no excluyente de lo descrito anteriormente), que asocia al arsénico y el cáncer, guarda relación con la alteración epigenética, más específicamente con la **metilación del ADN** [Jacinto, F. V. & Esteller, M. 2007; Esteller, M. *et. al.* 2001; Qiu, J. 2006; Domann, F. E & Futscher, B. W. 2004; Yu, R. C. *et. al.* 2000; Mass & Wang. 1997], hoy en día, es claro que la información del genoma, está contenida de dos formas, genética y epigenéticamente. La información genética, es aquella información que está en directa relación con manufacturación de proteínas necesarias para crear y sostener la vida. La información epigenética, da cuenta del “cuando”, “cómo” y “donde” se utiliza la información genética [Jacinto, F. V. & Esteller, M. 2007; Qiu, J. 2006; Robertson, K. D. 2001]. Y se ha postulado que una relación existente entre el arsénico y el cáncer, es que el primero “ocuparía” la misma maquinaria requerida para la metilación del ADN, lo que significa alterar uno de los reguladores epigenéticos [Yu, R. C. *et. al.* 2000].

En células mamíferas, la mayor forma de la información epigenética, es la **metilación del ADN** o la adición de grupos metilos en la posición del carbono 5 de la citosina (figura 2A), donde aproximadamente el 1% está metilado, mientras que entre el 4% al 6% de estos dinucleótidos se metila y desmetila normalmente y predominantemente en el dinucleótido CpG, cuando los dinucleótidos se encuentran en regiones de un kilobase de tamaño aprox. (200 bp a 3000 bp), se les conoce como islas CpG [Esteller, M. 2005 ; Davis, C. D. & Uthus, E. O. 2004; Robertson & Wolffe, 2000]. Los efectos de la metilación del ADN incluyen represión transcripcional, modulación de la estructura de la cromatina, inactivación del cromosoma X y replicación genómica entre otros [Davis, C. D. & Uthus, E. O. 2004; Baylin & Herman, 2000; Jones & Laird, 1999; Robertson & Wolffe, 2000; Woodson, K. *et. al.* 2001]. Un modelo planteado para relacionar a As y cáncer, se basa en las

alteraciones que causa el metaloide a nivel del proceso de metilación y alteraciones en la expresión de genes. En la figura 2B, en la parte superior ( $\alpha$ ), muestra que el As puede tener actividad inhibidora de varias metiltransferasas (DNMTasa 3 y DNMTasa 4) dependientes de SAM (*s-adenosinmeteonina*), lo que permite que exista un aumento en el pool de SAM, para que pueda metilarse la citosina, y generar una **hipermetilación** de las islas CpG [Robertson, K. D. & Wolffe, A. P. 2000; Issa, J. P. *et. al.* 1993; Schumtte, C. *et. al.* 1996]. Por otro parte (parte inferior del infograma de la figura 2b, o  $\beta$ ), una arsenito metiltransferasa (As-DNMTasa) [Zakharya, R. *et. al.* 1995], consume SAM, disminuyendo el pool donador de grupos metilos, fenómeno asociado a una **hipometilación** global del genoma [Mass, M. J. 1992; Mass & Wang, 1997].

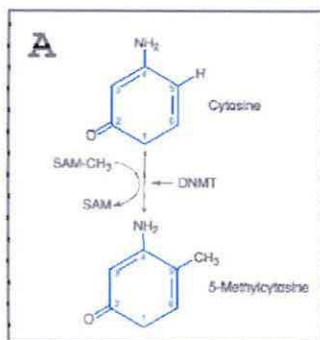
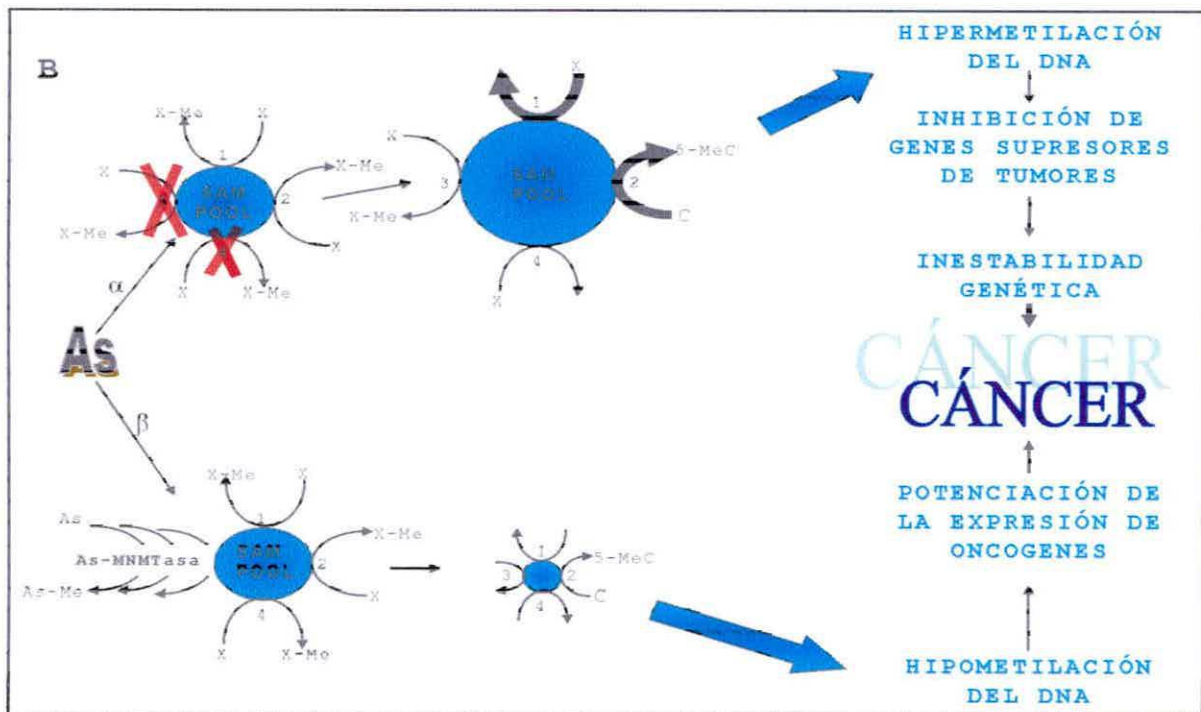


Figura 2. A) Mecanismo de metilación del ADN. La 5-metilcitosina es producida por la acción de la ADN metiltransferasa (DNMT 1, 3a o 3b), catalizando la transferencia del grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) de la S-adenosilmetionina (SAM) al carbono en posición 5 de la citosina. B) Modelo de la carcinogenicidad del As, perturbando el mecanismo de metilación del ADN. 1 (DNMTasa 1), 2 (DNMTasa 2), 3 (DNMTasa 3) y 4 (DNMTasa 4).



La carcinogénesis, involucra cambios tanto a nivel genético (mutaciones, etc.), como epigenético (metilaciones, acetilaciones, etc.). La alteración del proceso de metilación del ADN, incluye la **hipometilación**, que se relaciona directamente con la activación de protooncogenes [Lantry, L. E. *et. al.* 1999], la hipometilación del ADN, está asociada a una estructura anormal de los cromosomas, esto observado en pacientes con inmunodeficiencia de inestabilidad centromérica y en células tratadas con agentes desmetilantes (5-azadeoxycytidina) [Chen, R. *et. al.* 1998], y la **hipermetilación**, se relaciona con la inactivación y/o silenciamiento de genes supresores de tumores, genes reparadores de ADN y genes inhibidores de metástasis, y es la más estudiada y relacionada con los procesos de transformación celular. Ambos sucesos se encuentran asociados a la alteración de la homeostasis [Esteller, M. 2005; Lantry, L. E. *et. al.* 1999; Wong, I. H. N. 2001]. Estudios realizados por Woodson y colaboradores en el 2001, sugieren que la hipometilación de ADN precede a la hipermetilación de ADN y han sido asociados a varios tumores humanos [Santini. V. *et.al.* 2001], **incluyendo el cáncer de pulmón** [Dai, Z. *et. al.* 2001].

Como ya se citó, las células cancerígenas, presentan una alteración en los patrones y mecanismos de metilación, la cual ocurre básicamente en las islas CpG, independiente de la anormalidad en la metilación (hipometilación o hipermetilación), las cuales se relacionan con tumorigénesis (figura 3) [Strathdee & Brown, 2002].

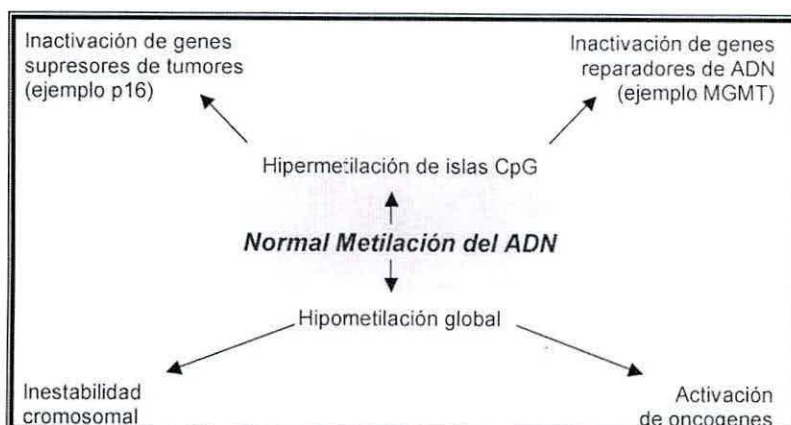


Figura 3. Esquema que relaciona alteraciones a nivel de metilación con tumores.

El incremento de la metilación en las islas CpG en tumores humanos, fue reportado en 1986, pero es después del desarrollo de la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que se ha podido detectar cambios en la metilación del ADN [Baylin, S. B. *et. al.* 1986]. En la tabla 1 se puede observar una lista de genes asociados a islas CpG y su función respectiva.

Tabla 1. Genes asociado a islas CpG, involucrados con el control del crecimiento celular o metástasis. Se destacan genes de interés.

Gene	Función	Referencia
pRb1	Regulador de la transición de las fases G1/S	Yu, J. <i>et. al.</i> 2004, Strathdee, G. & Brown, R. 2002; Santini, V. <i>et. al.</i> 2001; Esteller, M. 2005
p16 <sup>INK4a</sup>	Inhibidor de Cdk	Ogino, S. <i>et. al.</i> 2006; Fujiwara, K. <i>et. al.</i> 2005; Davis, C. D. & Uthus, E. O. 2004; Dai, Z. <i>et. al.</i> 2001; Strathdee, G. & Brown, R. 2002; Santini, V. <i>et. al.</i> 2001; Esteller, M. 2005
p15 <sup>INK4b</sup>	Inhibidor de Cdk	Yu, J. <i>et. al.</i> 2004; Davis, C. D. & Uthus, E. O. 2004; Strathdee, G. & Brown, R. 2002
ARF	Regulador de las concentraciones de p53	Esteller, M. 2005
hMLH1	Reparador "mismatch" de ADN	Ogino, S. <i>et. al.</i> 2006; Strathdee, G. & Brown, R. 2002
APC	Unión a $\beta$ -catenina, Regulación de actina en citosqueleto?	Yu, J. <i>et. al.</i> 2004; Esteller, M. 2005
BRCA1	Reparador de ADN	Yu, J. <i>et. al.</i> 2004 ; Koul, S. <i>et. al.</i> 2002; Strathdee, G. & Brown, R. 2002
E-cad	Adhesión célula-célula	Dai, Z. <i>et. al.</i> 2001
GSTP1	Protector del ADN de ROS	Dai, Z. <i>et. al.</i> 2001; Davis, C. D. & Uthus, E. O. 2004
O <sup>6</sup> -MGMT	Reparador/removedor de aductos voluminosos de guanina	Ogino, S. <i>et. al.</i> 2006; Koul, S. <i>et. al.</i> 2002; Fujiwara, K. <i>et. al.</i> 2005; Dai, Z. <i>et. al.</i> 2001; Santini, V. <i>et. al.</i> 2001; Esteller, M. 2005
TIMP3	metaloproteinasas Inhibidor de la matriz	Dai, Z. <i>et. al.</i> 2001; Esteller, M. 2005
DAPk1	Quinase requerida para la inducción de apoptosis porinterferón $\gamma$	Yu, J. <i>et. al.</i> 2004; Fujiwara, K. <i>et. al.</i> 2005; Dai, Z. <i>et. al.</i> 2001; Esteller, M. 2005
RASSF1A	Asociado a señales de transducción erróneas	Yu, J. <i>et. al.</i> 2004; Koul, S. <i>et. al.</i> 2002; Fujiwara, K. <i>et. al.</i> 2005

El mecanismo por el cual se metila el ADN, esta basado en el modelo en el cual participan tres enzimas (de la misma familia) involucradas, *DNA metiltransferasa* o DNMT 1, DNMT 3A y DNMT 3B [Esteller, M. 2005; Robertson, K.

D. 2001]. DNMT1 es la enzima que se encarga de mantener la metilación durante la síntesis del ADN, aumenta cuando la célula esta en crecimiento, y tienen una alta actividad durante la hemimetilación del ADN, además se relaciona con la mantención de la metilación [Strathdee & Brown, 2002; Robertson, K. D. 2001]. La familia de DNMT 3 (A y B), presenta una igual preferencia por la hemiacetilación, que por la no metilación del ADN, clasificándose las como metiltransferasas *de novo*. En el caso de DNMT 3A, esta presenta la capacidad de no solo metilar dinucleótidos CpG, sino que también CpA y CpT (aunque en menor medida) [Ramsahoye, B. H. *et. al.* 2000]

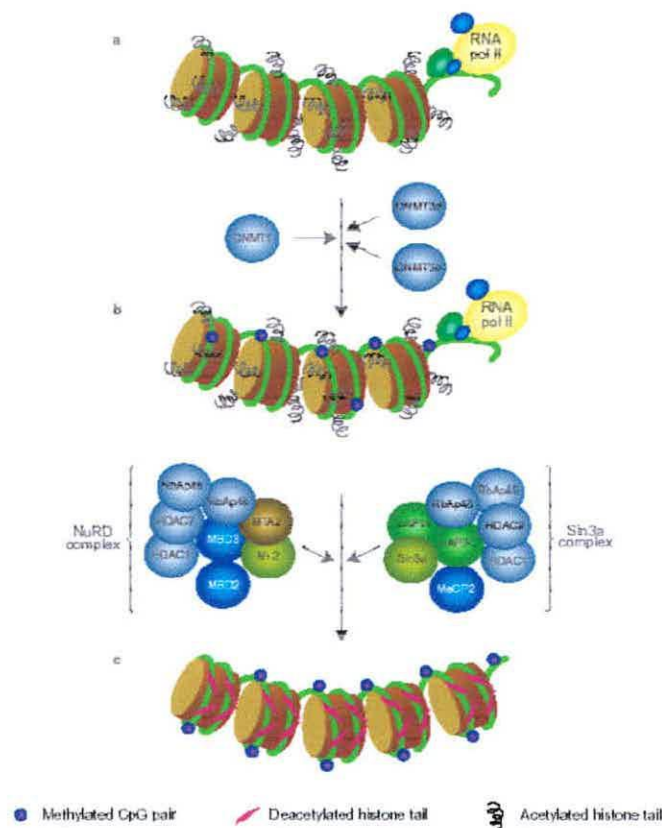


Figura 4. Mecanismo propuesto, donde la metilación del ADN llevaría al silenciamiento transcripcional.

El mecanismo sugerido para la supresión de la transcripción, por metilación de ADN, relaciona directamente la inhibición de la unión de factores

transcripcionales, los cuales son sensibles a la unión de sitios metilados en el ADN, aunque existen factores insensibles a sitios metilados [Strathdee & Brown, 2002]. En la figura 4, se muestra un modelo, en el cual, la metilación de ADN, puede mantener la represión transcripcional. La metilación del ADN, lleva a la unión de MBD (*methyl-binding domain*), que son proteínas de unión selectiva en regiones metiladas [Esteller, M. 2005; Strathdee & Brown, 2002; Robertson, K. D. 2001]. Tres de los cinco componentes de la familia de MBD (MeCP2, MBD2, MBD3), se asocian con un complejo de proteínas, que contiene histonas acetilasas (HDAC1 y HDAC2) y remodeladores de cromatina activos (Sin3a y mi-2) [Nan, X. *et. al.* 1998]. Este complejo, tiene como función el compactar la cromatina, para así evitar la transcripción, para algunas otras proteínas asociadas al complejo (figura 4), aún no se está clara su función [Laird, P. W. 2005; Tyler & Kadonaga, 1999].

En la figura 5, se indica el modelo de silenciamiento transcripcional (asociado a hipermetilación) y como este se asocia o conjuga al fenómeno de hipometilación y la activación de genes (LINE, en la figura 4), y cómo ambos fenómenos procesos se asocian a la transformación maligna de la célula. En el modelo se aprecia que las regiones que se constituyen de islas CpG, se encuentran en los extremos 5' de los promotores de los genes, y son aproximadamente de 1 kilobase de tamaño, y en el caso de los humanos, estas regiones se asocian a genes reguladores, numerosos son los ejemplos de hipermetilaciones de islas CpG asociadas a promotores, entre estos hay genes supresores de tumores, involucrados en la adhesión célula-célula, en la reparación del ADN, los cuales están más detallados en la tabla 2 [Estellar, M. 2005; Robertson, K. D. 2001].

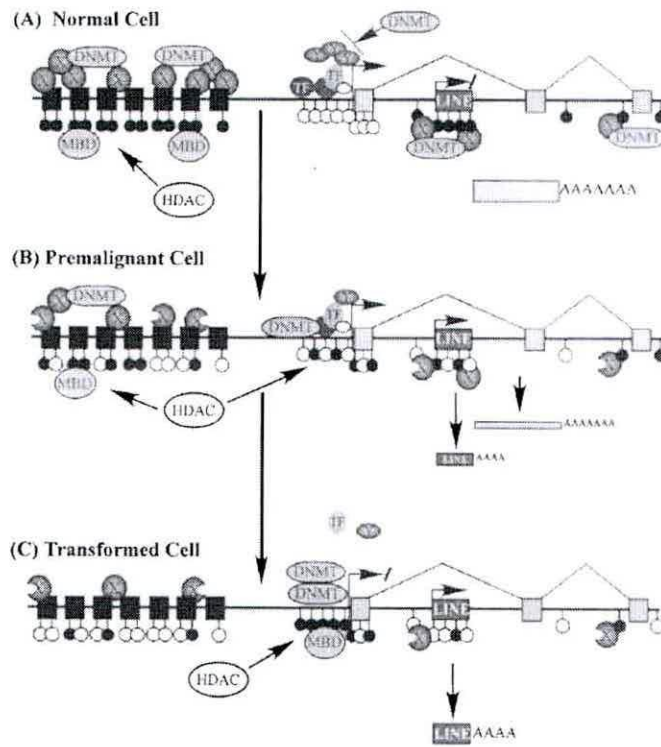


Figura 5. Modelo propuesto, de cómo la pérdida global y la ganancia en regiones específicas de grupos metilos, puede ocurrir dentro de la misma célula y potencialmente puede contribuir a una transformación maligna. Un segmento representativo de ADN que muestra un gen transcripcionalmente activo (las cuadros grises, representan exones), con una desmetilación (los círculos blancos), el promotor con islas CpG (la flecha de inclinación). Sitios de CpG dentro del cuerpo del gen o en los elementos repetitivos (los cuadros negros y "LINE"), generalmente es los hipermetilados (los círculos negros). (A) En una célula normal, DNMT se entrelaza con un factor ("X") que puede guiar el DNMT a las regiones que pueden ser metiladas o permite que el DNMT acceda, abriendo la cromatina. Puede haber un factor adicional ("Y") que permite el acceso activo de DNMT a la isla de CpG o recluta las islas de CpG a regiones subnucleares, donde DNMT no tiene acceso restringido. (B) En una célula premaligna, se aprecia un defecto en el sistema de metilación, incluyendo uno o más de lo siguiente sucesos: la mutación en el factor X, pérdida del factor Y, o una mala sincronización a nivel de la expresión de X o Y durante el ciclo celular. Esto permitiría a DNMT acceden a la isla de CpG, en una región rica en sitios de potenciales metilación, y "trasladando" a la enzima fuera de las regiones que normalmente son los metiladas. (C) Continúa la división celular y/o los defectos adicionales en el sistema del metilación exacerbaban los errores producidos por la metilación, produciendo el silenciamiento del gen en el futuro y potencialmente la reactivación de transcripción o transposición de los elementos parasitarios. Regiones repetitivas que pierden la metilación pueden volverse los descondensándose y inclinándose a la recombinación del mitótica.

El As, es enzimáticamente metilado, monometilandose o dimetilandose, para ser detoxificado, consumiendo SAM, que es el donador de grupos metilos. Este mismo sustrato es el requerido por metiltransferasas (MeTasas), incluyendo la DNMTs (responsable de la metilación del ADN). La metilación del ADN contribuye al control en la expresión de una variedad de genes, incluyendo varios oncogenes. Esta información sugiere que el consumo de SAM, para la detoxificación de As, genera una hipometilación y por lo tanto una desestabilidad estructural a nivel cromosomal, estando asociado a carcinogénesis [Zhao, C. Q. *et. al.* 1997] y la expresión de DNMTs asociados a la hipermetilación específica de regiones ricas en islas CpG, asociadas al silenciamiento transcripcional, ya antes descrito (figura 4 y 5) [Robertson, K. D. 2001].

Se cree por lo tanto que células en presencia de As, el cual genera un estímulo de estrés y alteraciones a nivel epigenético, específicamente a nivel de metilación del ADN, genera un desorden homeostático, provocando una respuesta primaria de defensa a estrés, con sistema enzimático y no enzimático de la célula, luego de una señal de estrés prolongada se activan oncogenes, asociado a mutaciones por radicales, que se saben (en términos generales), que tienen la habilidad de conducir a la célula a la senescencia y/o a la muerte celular [Evan & Vousden, 2001], y por otra parte se presentaría una desregulación con los procesos asociados a la metilación del ADN. Ahora, en términos de sobrevivencia, la transformación celular, es necesaria, para suprimir estas señales de estrés hasta lograr la muerte celular, pero dicha transformación es incompleta en el estado temprano de oncogénesis, estado conocido como “estado de potencialidad” [Benhar, M. *et. al.* 2002].

### 1.2.1 Cáncer Pulmonar

**El cáncer de pulmón, es la principal causa de muerte relacionada con cáncer entre hombres y mujeres en el mundo** [www.who.org; Dai, Z. *et. al.* 2001], **esto porque el diagnóstico es tardío, haciendo ineficiente el desarrollo de un tratamiento** [Liloglou, T. *et. al.* 2001]. El cáncer de pulmón, se clasifica en dos grandes grupos, células pequeñas de cáncer de pulmón (*small cell lung cancer*, SCLC) y células no pequeñas de cáncer de pulmón (*no-small cell lung cancer*, NSCLC) [<http://www.who.int>]. El 80% de los cánceres de pulmón, son del tipo NSCLC, y el 20% restante son del tipo SCLC. Histológicamente, la Organización Mundial de la Salud (OMS), clasifico de la siguiente forma el cáncer de pulmón: **I tipo epitelial** (clasificación de los tumores de interés), II tumores en tejido blando, III tumores de mesotelio, IV tumores misceláneos, V tumores secundarios, VI tumores no clasificados y VII lesiones semejantes a tumores [Wistuba, I. I. *et. al.* 2000 a y b].

El cáncer de pulmón, se asocia principalmente a los fumadores, como el principal factor de riesgo, para la formación del cáncer (aproximadamente el 80% de los casos), el resto del porcentaje se asocia a exposición ambiental y/u ocupacional y factores genéticos [Rom, W. N. *et. al.* 2000].

Se han asociados genes supresores de tumores, telomerasa y oncogenes, en la regulación del crecimiento y división celular, de ahí que además de considerar al cáncer como una enfermedad genética [Holland & Frei, 2000], también se puede considerar como una enfermedad en la regulación del ciclo celular [Rom, W. N. *et. al.* 2000]. El modelo clásico del ciclo celular, consiste en la síntesis del ADN (fase S), Mitosis (fase M), y dos fases de aberturas (gap, fases G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>), detallados en la figura 6.

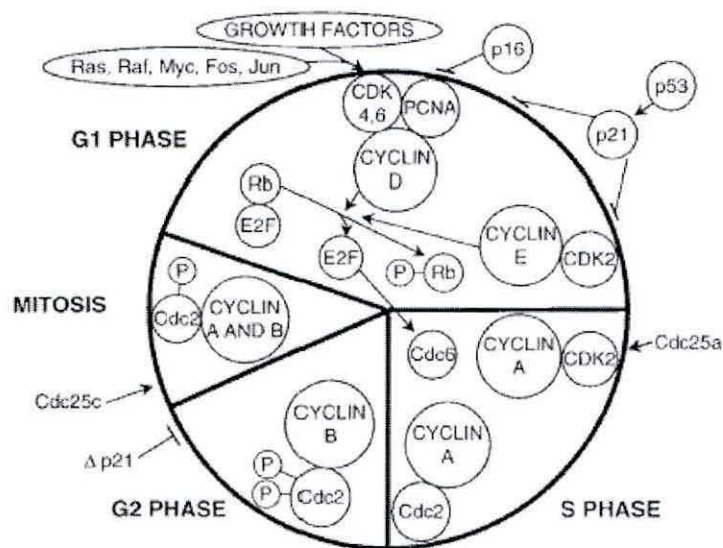


Figura 6. Regulación del ciclo celular en cáncer de pulmón.

Los principales componentes del ciclo celular, incluyen ciclinas, ciclinas dependientes de quinasa (Cdk), proteína de retinoblastoma (Rb1), p53 y proteína E2F. Cada Cdk, es regulada por una subunidad de ciclina, donde se requiere una actividad catalítica y un sustrato específico. Un primer paso crucial, en el ciclo celular, ocurre en una etapa tardía de la fase G<sub>1</sub>, y justo antes de los puntos de restricción p16 y p21 (figura 6). Este paso, compromete a los factores PDGF (*Platelet-Derived Growth Factors*) e IGF-1 (*Insulin-like Growth Factors 1*), estimulando en este punto la proliferación celular. Ambos factores pueden ser producidos por células cancerígenas (de cáncer de pulmón), para potenciar el crecimiento del tumor, en una forma autocrina, usualmente en un estado tardío de la tumorigénesis. Comprometido también están los correspondientes receptores de dichos factores de crecimiento, los que se asocian a la dimerización, fosforilación y transmisión de señales al núcleo. Las señales asociadas a IGF-I y PDGF, causan una rápida y transiente elevación en las ciclinas tipo "D", en la fase G<sub>1</sub> [Schaur, E. I. *et. al.* 1994; Hunter & Pines. 1994; Rom, W. N. *et. al.* 2000]. Ciclinas D1 forman un complejo con Cdk 4/6 y fosforilan Rb1 (figura 7), la sobre expresión de ciclina D1, es un fenómeno que esta asociado al cáncer de pulmón, dicha sobreproducción de ciclina D1, esta en directa relación con la hiperfosforilación de Rb1, en G<sub>1</sub>,

relacionándose con un factor transcripcional E2F, activando genes asociados a la fase S, del ciclo celular, esto incluye timidina quinasa, *c-myc*, dihidrofolato reductasa, Cdc 6 y DNA polimerasa- $\alpha$  (figura 7) [Schaur, E. I. *et. al.* 1994].

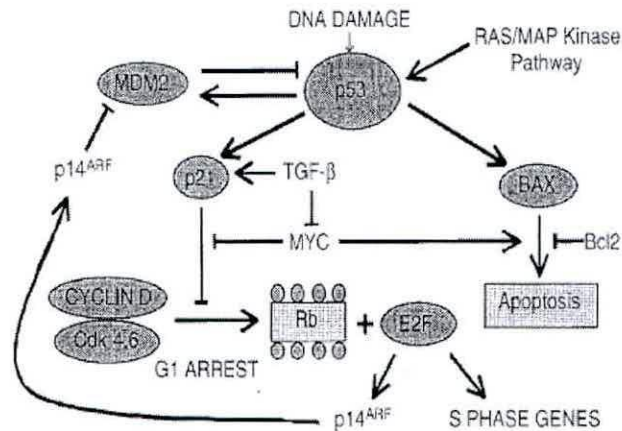


Figura 7. Modelo propuesto para el mecanismo molecular que asocia p53 y Retinoblastoma (Rb1, proteína) en el cáncer de pulmón.

Dos familias de inhibidores de Cdk, son importantes para el correcto desarrollo de la fase G<sub>1</sub>, la familia INK4 (Inhibitor of Kinase 4), que presentan su locus en el cromosoma 9, específicamente 9p21, el cual es codificado por 4 genes (INK4 a, b, c y d), estos productos se unen al dímero de ciclina D-Cdk 4/6, que inactivan la función quinasa. Miembros de la familia kip1 (p21, p27, p57), se unen a los complejos ciclina D-Cdk4/6, ciclina E-Cdk 2 y ciclina A Cdk-2, inhibiendo su función sobre Rb1/E2F (figura 8) [El-Deiry, W. S. *et. al.* 1993].

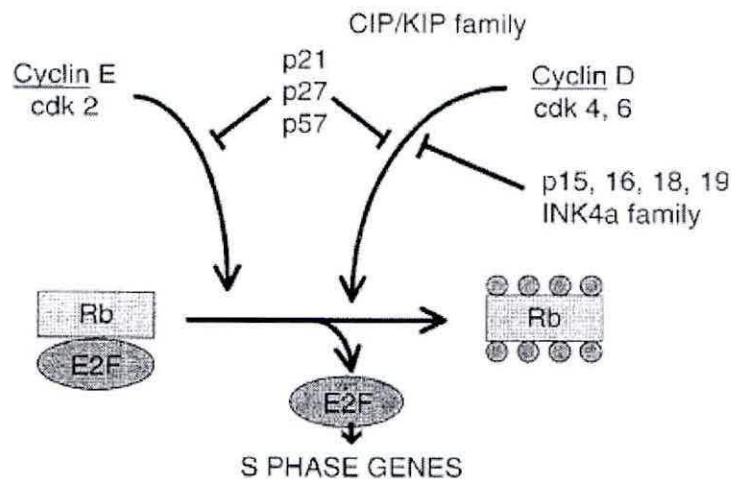


Figura 8. Sitios donde p21 y p16 actúan como inhibidores de puntos de regulación, en el ciclo celular.

El complejo de la ciclina E-Cdk 2, media la progresión entre la fase  $G_1$  a la fase S, comenzando al incrementarse los niveles de ciclina A. La función del complejo ciclina A-Cdk 2, aparentemente es requerida, para la replicación del ADN y la transición de fase  $G_2$  a la fase M. La pérdida de la función de p53 lleva a reducir los niveles de p21 e hiperactiva a los complejos ciclina D-Cdk 4/6 y ciclina E-Cdk 2, hiperfosforilando Rb1 y elevando los niveles de E2F (figura 8) [Nevins, J. R. 1992]. La correcta relación entre Rb1 y p53, probablemente determina que p53 induzca la detención del ciclo celular en la fase  $G_1$  o induzca apoptosis, en respuesta al daño del ADN, en donde la disminución de Rb1, inclina la situación hacia la apoptosis [Sherr, C. 1996]. La prevención de la apoptosis dependiente de p53 es una de las llaves a la carcinogénesis, en los cánceres de pulmón con p53 normal, generalmente presentan un incremento de la expresión del gen de *MDM*. La proteína de MDM2 se une al dominio de transactivación de p53, funcionando como señal, para la ubiquitinación de p53 [Rom, W. N. et al. 2000], la sobre expresión de MDM2 inhibe la supresión mediada por p53, alterando el crecimiento celular (figura 7).

En el caso del cáncer de pulmón, se asocia a cambios genéticos (mutaciones), a *p53* [Dai, Z. *et. al.* 2001], ***CDKN2*** [Gazzeri, S. *et. al.* 1998] y ***Rb1*** [Rom, W. N. *et. al.* 2000] y Zöchbauer-Müller y colaboradores, han demostrado que numerosos genes, incluidos *receptor  $\beta$ 2* de ácido retinoico (*RAR $\beta$* ), *metaloproteinasa 3 inhibidor de tejido (TIMP-3)*, ***O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT)***, ***proteína quinasa asociada a la muerte (DAPk)***, *E-caderina (ECAD)*, *p14<sup>ARF</sup>* y *Glutación-S-transferasa P1 (GSTP1)*, son metiladas en diferentes grados en cánceres de pulmón del tipo NSCLC. En la tabla 2, se indican algunos genes con una directa relación con cáncer de pulmón, indicándose si el estudio se realiza en NSCLC o SCLC [Tsou, J. A. *et. al.* 2002].

Un caso ejemplificador, por el hecho de complementar la regulación por parte de Rb1 y la alteración en la metilación, sobre un gen de promoción de crecimiento (GPG). Se ha demostrado que DNMT1, se asocia con Rb1 (una proteína supresora de tumores), y Rb1 esta asociada a una proteína de unión al ADN (que reconoce sitios metilados) y a un activador transcripcional, E2F (-1), en algunos reportes se ha mostrado que HDAC1 se asocia con DNMT1 [Robertson, K. D. *et. al.* 2000]. Rb1 forma un dímero con E2F, donde Rb1, reprime la función activadora de E2F, recrudesciéndose en presencia de HDAC. En células en división, el Rb1 se hiperfosforila, desvinculándose de E2F y permitiendo que este cumpla su rol de activador transcripcional (asociado a genes relacionados con la fase S del ciclo celular). Interesantemente DNMT1, se asocia a Rb1 (en el complejo Rb1-E2F), potenciando aún más la represión sobre E2F. La interacción DNMT1-Rb1, presenta varias implicaciones, la primera es que permite el blanco del mecanismo de metilación del ADN, este asociado con un sitio de unión de E2F, reportándose que la interacción E2F-ADN, esta regulada por metilación [Campanero, M. R. *et. al.* 2000]. La segunda implicación, consiste en que la interacción DNMT1-Rb1, puede potenciar la represión mediada por Rb1 a nivel de ciclo celular, esto potencialmente por la combinación de la represión de E2F por parte de Rb1 y por la maquinaria de metilación asociada a los sitios de unión de E2F en el ADN, esto asociado a la actividad de HDAC. La tercera implicación de la interacción DNMT1-Rb1, esta dada

por la defectuosa metilación y su relación con cáncer [Hanahan & Weinberg, 2000]. Una disminución en la funcionalidad de Rb1 o pérdida de la proteína Rb1 o alteraciones en la vía metabólica de Rb1, afectan el estatus de fosforilación de Rb1, lo que conlleva a una irregular localización de DNMT1, en lo que puede relacionarse con una alteración en la metilación, fenómeno observado en células cancerígenas (figura 9). Es muy importante, por lo tanto que la metilación sea la correcta, y así E2F este regulado cuando la célula no esta en el proceso de división de lo contrario, inexorablemente la célula estaría destinada a una transformación maligna [Robertson, K. D. 2001].

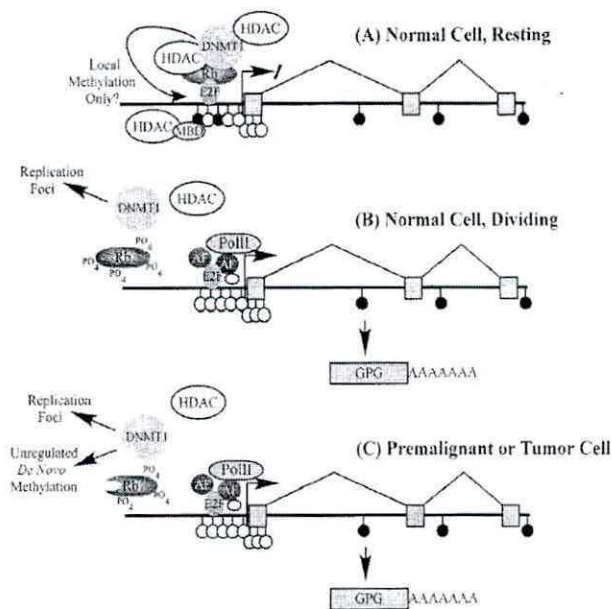


Figure 9. Modelo propuesto para la potencial función consecuencia de la interacción DNMT1-Rb1. (A) En una célula en reposo normal Rb1 se une a DNMT1, el cual puede metilar localmente a un potencial promotor, generándose una represión, por la unión MBDs y HDACs. La potenciación en la represión, puede ocurrir directamente por la unión de HADC con DNMT1, sin necesidad de metilar. La actividad de DNMT1 Puede ser restringida en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, con una

metilación *de novo*, pudiendo ser altamente indeseable. (b) con las células en división, Rb1 es fosforilado ("PO<sub>4</sub>"), y no se une a E2F1, y el DNMT1 es liberado para ir a la replicación de foci. (c) En células cancerígenas, el Rb1 mutado o alteraciones en la vía metabólica asociada a Rb1, hiperfosforilan a la proteína (Rb1), hecho muy común en estos casos. Esto permite a DNMT1 acceder a todo el genoma durante todas las fases del ciclo celular, con el resultado de una gradual acumulación de metilaciones erradas. "GPG" es gen promotor del crecimiento, "AF" es un factor de activación y "Pol II" es ARN polimerasa II. Los círculos blancos y negros, representan los dinucleótidos CpG no metilados y metilados respectivamente.

### 1.3 Biomarcadores

El análisis de tejidos y de fluidos del cuerpo, para la detección y medición de químicos, metabolitos, enzimas u otra sustancia bioquímica, definen el concepto de **biomarcadores**. El término de **biomarcador**, como lo definió “*US National Academy of Science*”, en un amplio sentido, incluye la detección, medición e interacción, tanto química, física y/o fisiológica. La medición, puede ser una respuesta funcional, fisiológicas, bioquímicas, ya sea a nivel celular o interacción molecular. Estos parámetros, permite medir riesgos a nivel individual, subgrupos poblacionales, que se comparan con la población en general. Los biomarcadores se clasifican en tres tipos:

- ☑ Biomarcadores exógenos, que son aquellas sustancias xenobióticas, que por sí misma o por su metabolización y/o reacción con el organismo, sirven como un indicador. Ejemplo, isótopos radioactivos [Inchem].
- ☑ Biomarcadores efectores, son aquellas sustancias que cambian su conducta ya sea bioquímica o fisiológicamente u otra alteración sufrida por el organismo, y que dependiendo de su magnitud se utilizan como un indicador. Ejemplo alteraciones metabólicas (Ej. Glucosa plasmática) [Inchem].
- ☑ **Biomarcadores susceptibles, son sustancias con una habilidad inherente o adquirida, de cambiar al organismo, como respuesta a la exposición a una sustancia xenobiótica. Ejemplo, alteraciones genómicas [Inchem].**

Debido a los diferentes mecanismos descritos, asociados a la tumorigénesis, los biomarcadores susceptibles, son un indicador común en lo que refiere a cáncer. El más importante de estos biomarcadores es el daño y/o alteraciones en el ADN, en algunos casos también se recurre a biomarcadores de tipo efectores, y en este caso son proteínas que se ven alteradas en su concentración en algún compartimiento del organismo [Inchem].

Holy Grail, es uno de los pioneros en estudio para el desarrollo de marcadores moleculares, útiles para la detección temprana de cáncer [Ransohoff, 2003]. Los marcadores moleculares de tumores, en la detección del desarrollo de la patología, presentan una vasta literatura, pero muy poco específica en lo referente a detección temprana de cáncer y más aún en lo referente a cáncer broncopulmonar.

### 1.3.1 Biomarcadores y Cáncer de Pulmón

En el caso del cáncer de pulmón y como ya se citó, es el cáncer con mayor índice de muertes en el mundo [Dai, Z. *et. al.* 2001], esto porque es un cáncer de difícil detección temprana, lo que dificulta la aplicación de tratamientos preventivos y/o curativos eficientes en los pacientes que desarrollan la patología [Liloglou, T. *et. al.* 2001]. De ahí la necesidad del desarrollo de nuevas y eficientes herramientas de detección temprana de dicho cáncer.

La inestabilidad genómica, es la anormalidad más común de las células tumorales humanas [Lengauer, C. *et. al.* 1998]. El desarrollo del cáncer pulmonar, esta asociado a varios estados, que al evolucionar presentan una mayor inestabilidad genómica. La detección temprana de alteración genética en preneoplásica pulmonar, ha sido reportada por varios investigadores [Liloglou, T. *et. al.* 2001], y que junto con el daño de tejido bronquial, no son evidencia de cáncer de pulmón, pero si se asocian a una alta probabilidad de desarrollar la patología.

En este sentido, en los últimos años, se han llevado a cabo estudios en hipermetilación e hipometilación de algunos genes, como biomarcadores tempranos, de transformación maligna a nivel celular y de pacientes [Tsou, J. A. *et. al.* 2002; Ransohoff, D. R. 2003; Woodson, K. *et. al.* 2001; Zöchbauer-Müller, S. *et. al.* 2001] en la tabla 2, se señalan algunos de los genes estudiados y al tipo de

cáncer pulmonar al que se le asocia. En el caso de la hipometilación, está asociada al cáncer de pulmón, ya que tiene efectos de activación transcripcional de algunos oncogenes como RAS [Tsou, J. A. *et. al.* 2002], pero cabe señalar que este fenómeno no constituye un biomarcador por sí solo, y mucho menos un biomarcador predictivo. Para el caso de hipermetilación, en este caso asociado al silenciamiento de genes supresores de tumores y/o reguladores de ciclo celular, se destacan APC, CDKN2A/p16<sup>INK4A</sup>. Pero que en el mismo caso de la hipometilación, la alteración de algún gen en particular o la hipermetilación por sí solo no constituye un biomarcador de ningún tipo [Markl, I. D. C. *et. al.* 2001].

Tabla 2. Indica algunos genes descritos en la literatura, que muestran una metilación anormal asociado a algún tipo de cáncer de pulmón.

<b>Genes</b>	<b>Nombre alternativo del gen (en inglés)</b>	<b>Tipo de cáncer</b>
APC	Adenomatous polyposis coli	NSCLC/SCLC
<b>CDKN2A</b>	<b>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, p16<sup>INK4A</sup></b>	<b>NSCLC/SCLC</b>
CDKN2B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B, p15	NSCLC/SCLC
<b>DAPk1</b>	<b>death-associated protein kinase</b>	<b>NSCLC</b>
EGFR	epidermal growth factor receptor	NSCLC/SCLC
GDF10	growth/differentiation factor (BMP3B)	NSCLC
GSTP1	glutathione S-transferase $\pi$	NSCLC/SCLC
HIC1	hypermethylated in cancer	NSCLC/SCLC
<b>MGMT</b>	<b>O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA Methyltransferase</b>	<b>NSCLC/SCLC</b>
RASSF1A	RAS effector homologue	NSCLC/SCLC
<b>Rb1</b>	<b>retinoblastoma 1</b>	<b>SCLC/NSCLC</b>
RIZ1	retinoblastoma protein- interacting zinc finger	NSCLC/SCLC

El diagnóstico precoz del cáncer de pulmón no es fácil, la detección de pequeñas lesiones ya sea por radiografía u otro sistema de imágenes, o la detección por la toma de muestra y posterior análisis histológico o citológico, están asociados a estadios avanzados de la patología, además de presentar el inconveniente de un diagnóstico invasivo [Tsou, J. A. *et. al.* 2002]. La exfoliación de

tejido epitelial de bronquios, es una metodología no invasiva, clínicamente recurrente para la recolección de células, pero se transforman en muestras no aptas para el estudio citológicos, debido a la sensibilidad de la técnica, esto ya que trabaja con células transformadas, pero estudios en modificaciones en el ADN, a través de PCR, incrementan ostensiblemente la sensibilidad [Belinsky, S. A. *et. al.* 1998; Palmisano, W. A. *et.al.* 2000].

Es por este motivo, que el estudio de niveles de metilación en el ADN, es una herramienta útil para la estimación en el desarrollo de cáncer de pulmón, dado su alta sensibilidad y especificidad. En la sensibilidad esta la habilidad de detectar las alteraciones celulares, pero queda en definir matemáticamente, como la razón (relación) de los datos y/o información obtenida se asocia correctamente a la identificación de muestras positivas (positivos verdaderos) y minimiza la detección de falsos negativos y la alta sensibilidad de una metodología, aproxima la detección de falsos negativos a 0 (cero) [Tsou, J. A. *et.al.* 2002].

## Capítulo 2

### Hipótesis

***“La variación en los niveles de mRNA de p16, MGMT, Rb-1 y DAPk-1, asociados con las variaciones de metilación de promotores asociados a los mismos genes, podrán ser utilizados como biomarcadores de pronóstico de cáncer de pulmón inducido por arsénico.”***

## Capítulo 3

### Objetivos

#### 3.1 Objetivo General

Determinar la combinación en las alteraciones de patrones y niveles de metilación de las islas CpG, asociadas a genes (*CDKN2A*, *DAPk1*, *MGMT* y *Rb1*) relacionados con el cáncer broncopulmonar y los niveles de expresión de los mRNA de los mismos genes. Que servirían como un biomarcador de señal precoz, de la transformación de las células de pulmón, inducidas por arsénico.

#### 3.2 Objetivo Específico

- Determinar los niveles de expresión de genes asociados a cáncer broncopulmonar, en fibroblastos de pulmón humano en cultivo, en presencia crónica de arsénico.
- Determinar el orden de metilación de islas CpG asociada a genes relacionados con cáncer broncopulmonar, en fibroblastos de pulmón humano en cultivo, en presencia crónica de arsénico.
- Determinación de expresión de genes asociados a cáncer de pulmón, en tejido pulmonar.
- Análisis y modelo estadístico de los datos obtenidos.

## Capítulo 4

### Diseño experimental

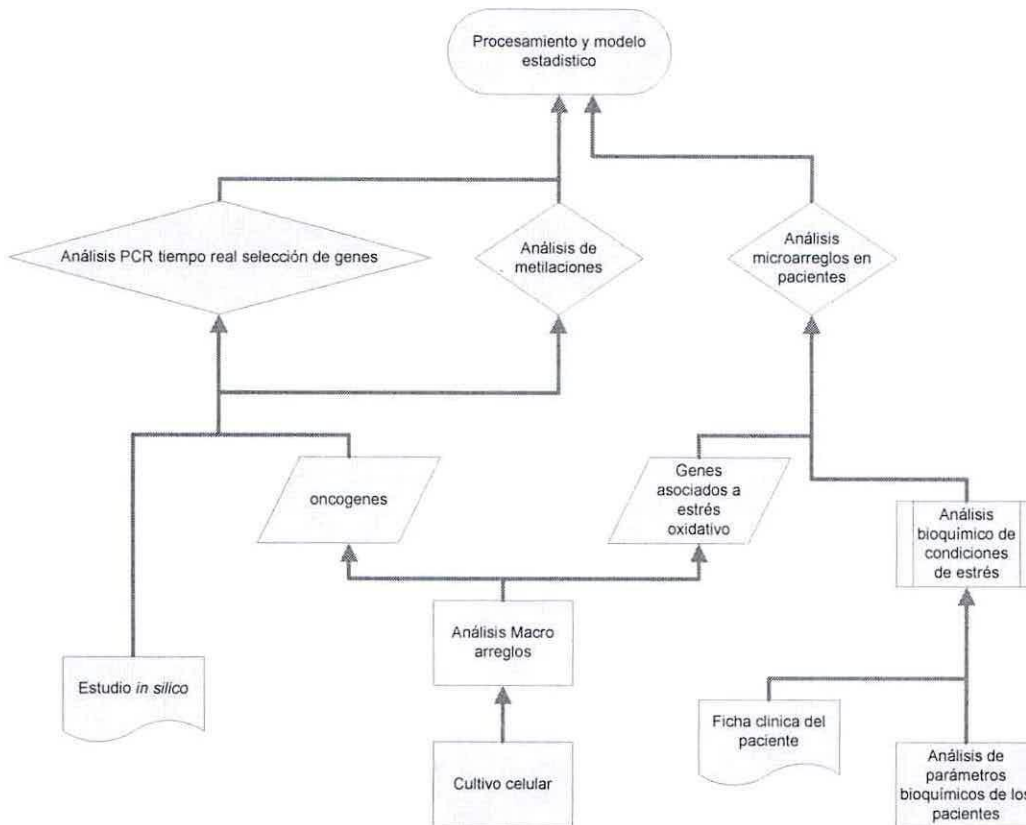


Figura 10. Esquema del diseño experimental desarrollado

Se planificó la actividad experimental según se esquematiza en el diagrama de flujo de la figura 10, se inicia el trabajo paralelamente en dos ámbitos, uno el modelo celular, a través cultivo celular de fibroblasto de pulmón humano y de controles, y por otra parte se comienza a trabajar con un grupo de personas expuestas a altas concentraciones de Arsénico y una población control, de estas líneas de trabajo se obtienen las muestras que se analizarán por las diversas técnicas descritas en materiales y métodos, para luego con estos resultados plantear el modelo estadístico a seguir en una eventual evaluación de pacientes expuestos a As y su potencialidad de desarrollar algún tipo de cáncer broncopulmonar.

## Capítulo 5

### Materiales y Métodos

#### 5.1 Estudio *in silico*

Como se describió en la introducción el estudio de biomarcadores moleculares asociados al cáncer de pulmón es muy general, y a pesar de desarrollar un diseño experimental acotado y definido, se hace muy poco viable acotar todas las posibilidades que se generan. Es de ahí la importancia de desarrollar un trabajo *in silico*, es decir, un estudio bibliográfico-informático acabado con el fin de acotar y optimizar al máximo los diseños experimentales necesarios en este tipo de investigación.

En primer lugar, se realizó (en la pasantía en la Universidad de Sao Paulo, Brasil), una búsqueda y revisión de base de datos (Ej. *DNA Methylation Society*, <http://www.dnamethsoc.com>) de los genes, para ser más precisos sus promotores descritos, asociados a islas CpG y/o procesos de metilación. Lo que llevo a determinación de una gran cantidad de “genes” asociados a metilación, a modo de ejemplo en la tabla 3, se muestra una lista de algunos (80) genes que se ven asociados a procesos de metilación.

Tabla 3. Se muestra una lista de 80 genes afectados por proceso de metilación, ya sea por silenciamiento como es el caso de oncogenes o control de expresión como los son factores de transcripción y genes supresores de tumores.

MGMT	CDH13	FHIT	ESR1	CDKN2B	ARF	SFN	TAL1
CDKN4A	CDH1	APC	MYOD1	THBS1	CTNNB1	SDO-1	OTX1
RASSF1A	p14	PTGS2	TGFBR2	HIC-1	Rb1	LGALS1	HOX II
DAPk	TIMP-3	CALCA	TYMS	ESR-2	K-RAS	GNAL	T-box brain
RAR-β	GSTP-1	MTHFR	PGR	AR1	H-RAS	IPF1	BMP3B
CD8β1	OS-9	TERT	c-MOS	VEGF	ELK1	CRIP1	CD1R3
CYPb1	I-MYC	ELK1	hMLH1	TSP	NCL	MRP5	ADCYAP1
CD34	n-MYC	CD63	N33	ERBB2	CSNK2B	APOA1	EGR4
MCT3	c-MYC	TUB B2	CDH3	c-fos	UBB	APOC2	ATP5G1
HCK	C-MYB	CD1A	EGFR	c-abl	OAT	CDF1	TNF-β

La información, a la fecha del estudio (en Brasil), no era clara y definida, en lo que refiere al tipo de gen afectado y un tipo de cáncer específico, sino más bien era genérico a lo que refiere a resultados, otro dato es que la mayoría de los artículos publicados y a base de datos de la época, presentan estudios de muchos pacientes en función de un par de genes, definiendo muy pocas veces el efecto de un cancerígeno en particular, y lo más general era citar la condición de fumador o no. Otro modelo de estudio era el trabajo con muchos mutantes de líneas celulares cancerígenas y el análisis de uno o par de genes. Estudios referente a la influencia de un producto (diferente al tabaco) sobre efectos de metilación en modelos celulares, tiene muy pocos registros, destacando estudios con Radon [Fukutsu, K. *et. al.* 2002; Su, S. *et. al.* 2006]. Pero el formato dominante es el estudio de pacientes con alguna patología y el análisis de las variaciones de metilación en comparación a un grupo control. Es por esto que se hace necesario la comparación de una selección de genes reportados con los mecanismos moleculares descritos para los diferentes tipos de cánceres de pulmón, a partir de la exposición a arsénico. Para esto se recurre a la base de datos de *KEGG*, *NCBI*, *ExPASy*, *The GDB Human Genome Database*, *European Bioinformatics Institut*, etc.

En la búsqueda se llegó a las rutas de regulación asociadas a NSCLC y SCLC en *Kegg* (<http://www.genome.jp/kegg/>), como se indica en la figura 11 y 12 respectivamente, esta información junto con las bases de datos y literatura asociada al tema (introducción), permitió generar un modelo (teórico) que asocia ambas rutas y un grupo de genes asociados tanto a metilación como a cáncer de pulmón (figura 13).

El modelo generado, más los reportes de genes afectados por arsénico y/o alterados en cáncer de pulmón, llevo a la selección de 4 genes, los cuales se estiman podrían tener relevancia en la generación de biomarcadores, estos son CDKN2A (p16), Rb1, DAPk1 y MGMT.

*Rb1*: El gen supresor Rb1 (gen del retinoblastoma), que se localiza en el cromosoma 13p, codifica una fosfoproteína (pRb) que en su forma activa está infrafosforilada y se une a varias proteínas celulares. Esta forma infrafosforilada es la predominante en G1, ejerciendo un efecto supresor sobre el crecimiento. pRb se vuelve fosforilada en el inicio de la fase G2 y permanece así en las fases G2 y M. pRb interactúa con múltiples proteínas reguladoras del ciclo celular, y se considera que regula la proliferación celular restringiendo la progresión del ciclo celular en la transición de G1/S, al unirse al factor de transcripción E2F. Constituye una vía primordial en el control del ciclo celular, al igual que la de p53. Su papel en la progresión del cáncer de pulmón parece ser de gran importancia, y se ha postulado incluso como una posible vía alternativa a la de p53 en progresión la tumoral [Xu, H. J. *et. al.* 1993; Rom, W. N. *et.al.* 2000].

*p16<sup>INK4A/CDKN2</sup>*: es un producto proteico de un gen localizados en la región 9p21, miembro de la familia de proteínas INK4, que con frecuencia se encuentra alterada precozmente en cáncer de vejiga (88). p16 junto con p15 son quinasas dependientes de las ciclinas, con efecto regulatorio sobre el ciclo celular, inhibiendo cdk4 y cdk6. Este gen supreso de tumor, es regulador del ciclo celular, inhibiendo la interacción de ciclina D1 y cdk4 (o cdk6) que media la fosforilación de Rb1, restringiendo el paso del estadio G<sub>1</sub> a S. La pérdida de expresión de p16, un inhibidor de la fosforilación de pRb, parece poseer un efecto en el aumento de expresión de Rb1, que en células transformadas hace que las células entren en la fase S de ciclo celular y/o "escapen" de la senescencia [Danesi, R. *et. al.* 2003; Shapiro *et. al.* 1998]. CDKN2, es inhibida por dos mecanismos, el primero es por la metilación de islas CpG o por delección "*homozygous*" [Danesi, R. *et. al.* 2003].

*DAPk1*: la proteína-quinasa asociada a muerte (celular) 1 o DAPk1 (*Death-associated proteína kinase 1*), pertenece a la familia de las DAPk, es una proteína del tipo serina/treonina kinasa, y que presenta un alto grado de homología de sus sitios activos con el resto de su familia tipo 1 (ZIPK-1, DRP-1, etc) y difiere de la del tipo 2. DAPk, esta regulada y/o afectada por varios estímulos, como son TGF-β,

TNF- $\alpha$ , ceramidas, trióxido de arsénico, separación de matriz extracelular, etc. las que tienen como consecuencia efectos sobre procesos apoptóticos dependiente e independiente de p53, autofagia, invaginamiento de membrana, lo que lleva como consecuencia la muerte celular. Es común que en cánceres humanos, una de las alteraciones epigenéticas más recurrente y descrita se la metilación del promotor de DAPk, siendo la salvedad que es muy claro como señal cuando se trabaja con pacientes diagnosticados. Por tener este rol inductor de muerte celular a DAPk se le clasifica como proteína supresora de tumores (por lo tanto su gen es un gen supresor de tumores). Dentro de los varios mecanismos reportados para el accionar de DAPk, para la inducción de muerte celular, es de principal atención el efecto inhibitorio que ejerce sobre ERK (MAP2K1), proteína que participa en la cascada de señales que inhibe apoptosis, es decir, cuando ERK está en altas concentraciones se inhibe el proceso de muerte celular, pero con el aumento de DAPk, baja ERK y se induce apoptosis. En el caso de una célula transformada, los niveles de DAPk bajan (efecto de la metilación) y ERK ya no es regulado y se estaría inhibiendo apoptosis.

*MGMT*: es una proteína reparadora de ADN, que remueve aductos de O<sup>6</sup>-guanina mutagénicos y citotóxicos, la alquilación en la posición O<sup>6</sup> de la guanina es un importante paso para la formación de mutaciones cancerosas, debido principalmente a la tendencia de la O<sup>6</sup>-metilguanina en formar interacción con la timina durante la replicación, resultando en la conversión de la guanina por una citosina. *MGMT* protege a las células de estas alteraciones, lo realiza interaccionando el sitio activo de *MGMT* con la guanina dañada, usando a esta última como un donador de grupo metilo, quedando así metilada para luego ser degradada por ubiquitinación. Ahora en un proceso epigenético, se describe la baja de expresión de *MGMT*, por acción de la metilación de su promotor.

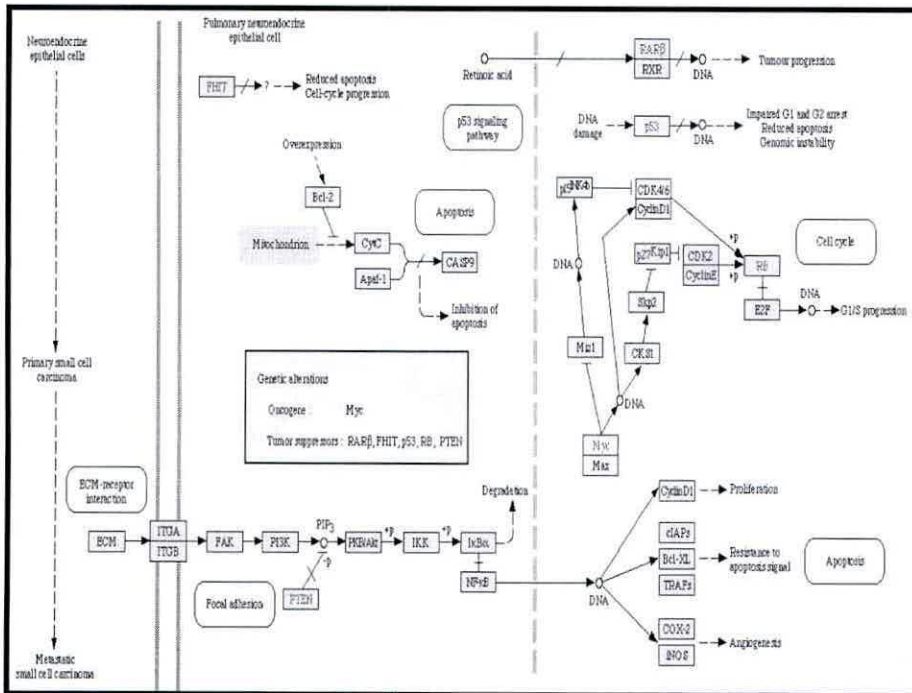


Figura 11. Mecanismos de regulación y eventos moleculares que se ven afectados en NSCLC. <http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa05223.html>

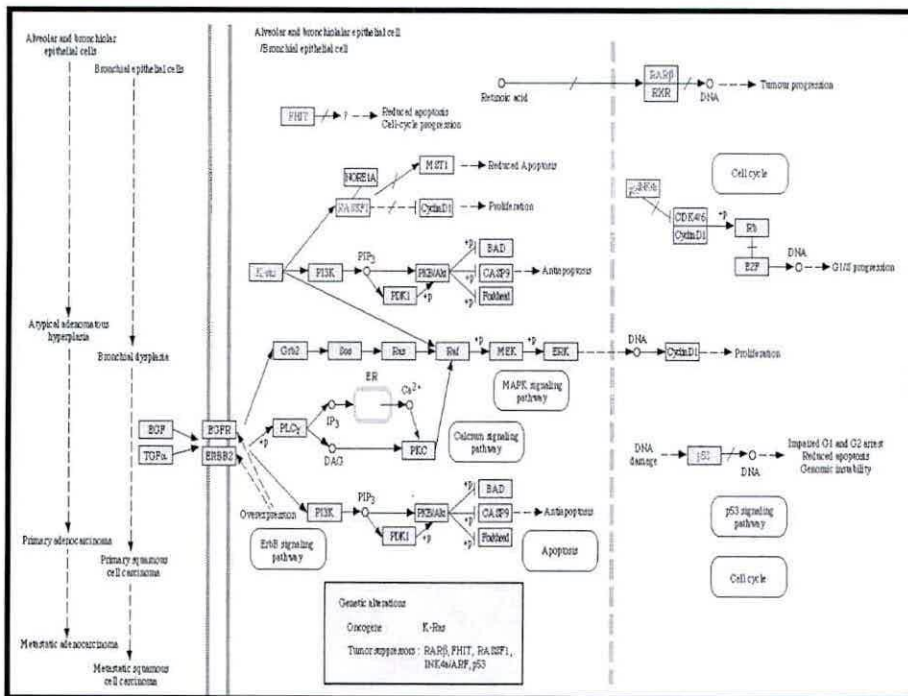


Figura 12. Mecanismos de regulación y eventos moleculares que se ven afectados en SCLC. <http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa05222.html>

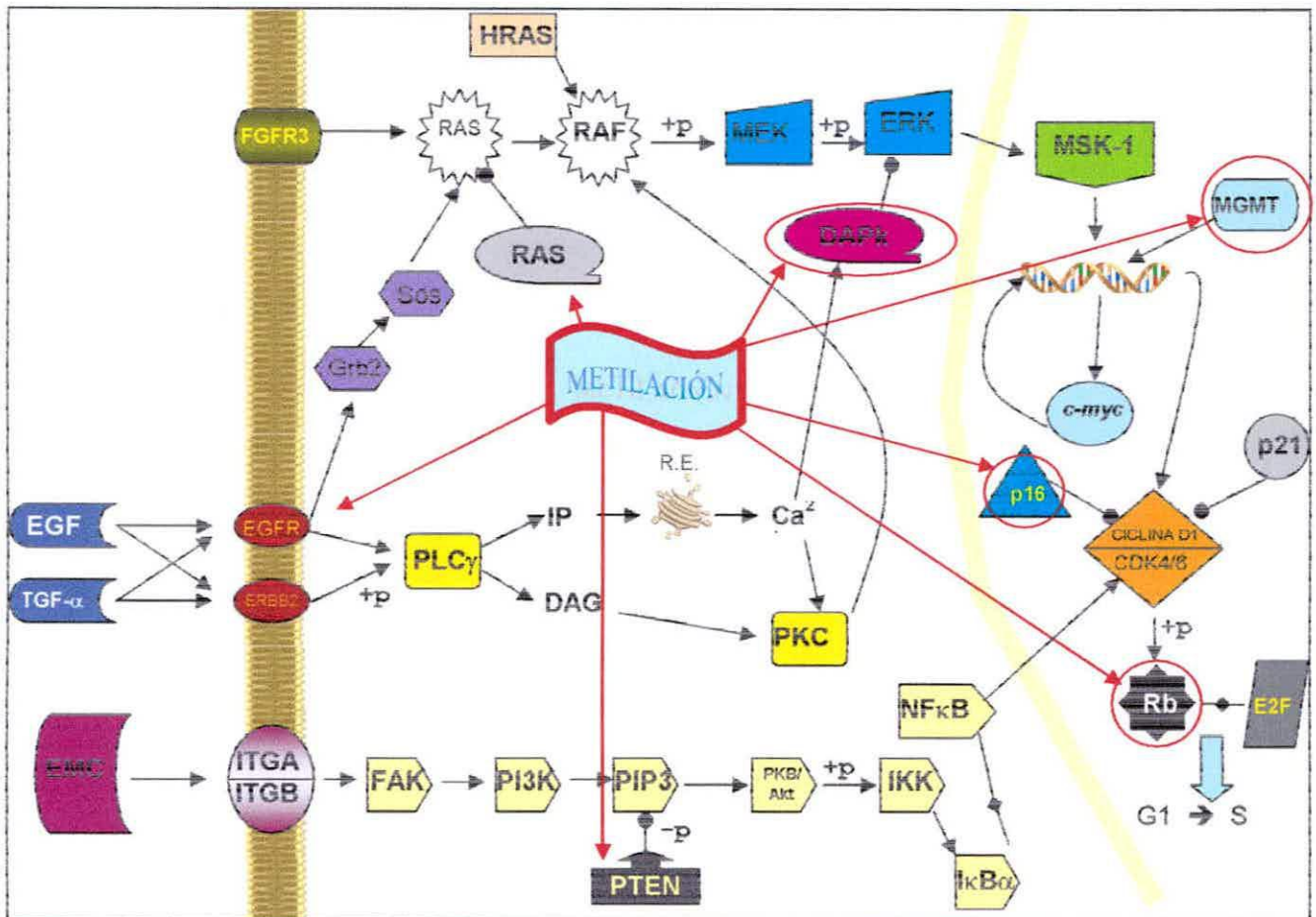


Figura 13. Se representa de manera resumida y esquemática, las rutas de regulación que podrían estar siendo afectadas durante la transformación en células pulmonares, a través de procesos de metilación (indicado por las flechas rojas). Indicándose también en que nivel estarían actuando las proteínas de los genes seleccionados para este estudio (círculo rojo). Rb1, como regulador directo del paso del estado G<sub>1</sub> a S en el ciclo celular; p16, por ser inhibidor del complejo ciclina D1/cdk4/6 actuando por lo tanto como regulador indirecto de ciclo celular; MGMT, por ser una proteína asociada a procesos de reparación de daño al ADN y DAPK1, por ser un inductor de apoptosis. Junto con la característica de verse afectados a nivel epigenético por alteraciones de metilación.

## 5.2 Pacientes expuestos a Arsénico

Se trabajo con 34 trabajadores (todos hombres) de una fundición pirometalúrgica de la Región de Antofagasta, definiéndose como una **población altamente expuesta** (por una exposición ambiental y laboral), el tiempo de exposición es mayor a 10 años, y un grupo de 40 personas voluntarias de la Región de Valparaíso, como **población control**. Cada paciente lleno una ficha de consentimiento (ver anexo IV), los grupos seleccionados son personas no fumadoras. Cabe mencionar que referente al ensayo de microarreglo, fue realizado solo con muestra de 6 pacientes, el problema se suscitó cuando llegaron las muestras a NHI, en donde se nos comunicó que de las 34 muestras, solo 6 llegaron con los estándares de calidad de su mARN, para el análisis. Cuando se fueron a tomar las replicas de las muestras faltantes, en la fundición de la minera con la que trabajábamos se nos comunicó que por orden de gerencia ya no podrían seguir colaborando con el proyecto, lo que nos llevo a decidir realizar la experiencia con las muestras que ya teníamos.

Se obtuvieron 10 mL de sangre venosa periférica, en un tubo con heparina, luego se centrifugó a 2500 xg separando el plasma de elementos figurados, posteriormente se separa el plasma en alícuotas de 1 mL para los diversos análisis, manteniéndola a -80°C. Los glóbulos blancos por su parte, se resuspendieron en medio de cultivo suplementado con 10% SFB y transportados para la extracción del material genético (ARN total) en el laboratorio. Luego de un estudio de parámetros asociados al estrés oxidativo, así como la revisión de su ficha clínica, se seleccionaran las muestras adecuadas para el análisis por microarreglo, con un chip Affymetrix® "*cDNA microarrays human 10K*".

Se realizaron estudios complementarios de niveles y actividad de enzimas antioxidantes de los paciente, para complementar la información de la ficha clínica de cada uno y así hacer la mejor selección posible para los estudios de microarreglos, estos estudios al no ser de relevancia directa en los resultados de

esta tesis no se describen en materiales y métodos, ni en resultados y discusión pero se asocia en anexo I, información sobre publicaciones asociadas a esta información.

### 5.3 Cultivo Celular

Líneas celulares: Fibroblastos de Pulmón Humano (FPH), de feto *no nato*, obtenidos del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), la línea celular fue entregada con 14 pasajes de mantención. Las líneas controles, de cáncer de pulmón GA0042 (NSCLC) y BL0002 (SCLC), fueron obtenidas de ECACC (*European Collection of Cell Cultures*), ambas líneas provienen de hombres blancos y con un número de pasajes de 5.

Para el mantenimiento y expansión de las líneas celulares, se emplearon los medios *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), para FPH y RPMI 1640 (Applichem), para líneas controles, ambos suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB, PAA), 1000 unidades/mL de Penicilina (USBIOS) y 100 mg/mL de estreptomycin (USBIOS).

Se realizaron cultivos de FPH expuestos a As (III), en concentraciones de 0.01; 0.05 y 0.1 p.p.m., valores que están tomados en función de los valores normados para la concentración de As en el agua potable en Chile. Esta exposición se logra consiguiendo esta cantidad de As (III) en el medio de cultivo.

El cultivo de las diferentes líneas celulares se llevó a cabo en una campana de flujo laminar horizontal (Labconco), usando material estéril. Los medios fueron almacenados a 4 °C y precalentados a 37 °C antes de su empleo. Las células fueron incubadas en estufas de atmósfera controlada (ShebLab) a 37 °C, 80% de

humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub> (Indura) y 95% aire. El medio se sustituía cada 2 días.

En el subcultivo y la expansión, las células fueron cultivadas hasta su confluencia y posterior separación por tripsinización. Después fueron recuperadas con medio fresco y centrifugadas a 1000 xg en tubos cónicos estériles a temperatura ambiente. Eliminando el sobrenadante y cultivando las células (precipitado) en medio fresco a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/mL.

En la tripsinización, las monocapa de células, fueron dispersadas por tratamiento con tripsina (Invitrogen) 0.7-1.0 mL por cada frasco de cultivo "T" de 75 cm<sup>2</sup> (NUNC). Para esto se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las células dos veces con 5 mL de PBSA (PBS sin Ca<sup>2+</sup> y sin Mg<sup>2+</sup>, anexo II), posteriormente se agregó la tripsina y se sacudió el frasco para facilitar la liberación de las células, finalmente se contrarresta el efecto tóxico de la tripsina agregando medio fresco suplementado.

El conteo del número de células viables y totales, se realizó utilizando Azul de Tripan (Sigma-Aldrich), como medio contrastante de células vivas y muertas, en cámaras de conteo *Neubauer Improved* (Hirschmann EM. Techcolor) 0.1 mm de profundidad, en un microscopio invertido trinocular (Carl Zeiss).

#### 5.4 Extracción de material genético

##### 5.4.1 Purificación de ADN genómico con solución de Chomczynski

La solución de Chomczynski (Winkler Ltda.), se utiliza para purificar ADN genómico a partir de células o tejidos de origen animal y vegetal, o de bacterias y

levaduras. El ADN se purifica en dos pasos: un paso de lisis celular y homogenización con la solución de Chomczynski; y otro de precipitación con alcohol etílico.

### Lisis y Homogenización

En el caso de células crecidas en monocapa, la lisis se realizó directamente en el frasco "T" (75 cm<sup>2</sup>) de cultivo, añadiendo 0.5 mL de la solución de Chomczynski por cada 10 cm<sup>2</sup> de área de cultivo, ayudándose con un "scraper" (NUNC) para el arrastre de la células y posterior homogenizado por pipeteo suave, traspasando el contenido a tubos microcentrífugos de 2 mL.

### Precipitación del ADN

Por cada mililitro de solución de Chomczynski, se añadió 0.5 mL de Alcohol etílico absoluto (Winkler Ltda.), se mezcló por inversión suave y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Luego de la incubación se centrifugó a 4000 xg por 2 minutos a 4°C, para ayudar a la precipitación del ADN. Luego se lavó el precipitado con una solución de etanol al 95% (y se almacena a -80 °C, hasta su estudio de metilación), se centrifugó a 4000 xg por 2 minutos a 4 °C, después se vuelve a realizar un lavado con etanol al 95% y volvió a centrifugar en idénticas condiciones a lo anteriormente descrito, luego se elimina el sobrenadante y se deja secar el precipitado a temperatura ambiente por 15 minutos; finalmente se resuspende el precipitado (el ADN) en 0.2 mL de una solución de hidróxido de sodio 8 mM (fresca), disolviendo por pipeteo suave.

Finalmente se determina el rango de pureza y se estima la cantidad obtenida por métodos espectrofotométricos (anexo III).

#### 5.4.2 Extracción y Purificación de ARN total con solución de Chomczynski-Fenol (C-F)

La solución C-F (Winkler Ltda.) se utiliza fundamentalmente para la purificación de ARN total, aunque se puede utilizar para ADN y proteínas, esta solución se puede utilizar en células y tejido de origen animal y vegetal, o en bacterias y levaduras. El ARN se purifica en tres pasos: un paso de lisis celular y homogenización con la solución C-F; adición de Cloroformo (Merck), el cual produce la formación de dos fases, una acuosa, que contiene al ARN y otra orgánica, que contiene el ADN y proteínas; y un último paso de precipitación con alcohol iso-Propílico (Winkler Ltda.).

##### Lisis y Homogenización

Para las células que crecen en monocapa, la lisis se realizó directamente en el frasco "T" (75 cm<sup>2</sup>) de cultivo, añadiendo 0.5 mL de la solución de Chomczynski por cada 10 cm<sup>2</sup> de área de cultivo, ayudándose con un "scraper" para el arrastre de la células. Para el caso de las células en suspensión (muestra de pacientes), se añadió 0.5 mL de la solución C-F por cada  $5-6 \cdot 10^6$  células. Finalmente y para ambos casos se homogenizo por pipeteo suave, traspasando el contenido a tubos microcentrífugos de 2 mL.

##### Separación de fases

Se incubaron las muestras con solución C-F, por 5 minutos a temperatura ambiente, luego se añadió 0.2 mL de cloroformo por cada mL de solución C-F usada, luego se agitó vigorosamente por 30 segundos y se incubo a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalmente se centrifugó a 12000 xg, a 4°C por un tiempo de 15 minutos, recuperándose la fase incolorota (acuosa) formada.

## Precipitación del ARN

La fase acuosa se transfiere a un nuevo tubo, añadiéndose 0.5 mL de alcohol iso-Propílico, por cada mL de solución C-F usada. Se mezcla por inversión suave y se incuba a temperatura ambiente por 10 minutos, luego se centrifugó a 12000 xg, a 4 °C por un tiempo de 15 minutos, generándose la precipitación del ARN total. Se elimina el sobrenadante y el precipitado se lava con una solución de etanol al 75% (en este punto se almacenan los ARN obtenidos hasta su utilización) una vez lavados se centrifugan a 7500 xg por 5 minutos, se rescata el precipitado y se repite el lavado, una vez obtenido el precipitado se resuspende en 50  $\mu$ L agua DEPC y estéril.

Finalmente se determina el rango de pureza y se estima la cantidad obtenida por métodos espectrofotométricos (anexo III).

## 5.5 PCR y RT-PCR

### 5.5.1 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) fue realizada en un volumen total de 50  $\mu$ L, en tubos para PCR Axygen PCR-02D-C de 200  $\mu$ L. La mezcla de reacción es de 47  $\mu$ L del MIX (5  $\mu$ L de solución amortiguadora de amplificación 10X, 8  $\mu$ L de la mezcla de desoxinucleótidos 1,25 mM cada uno, 0,5  $\mu$ L de *Taq DNApolimerasa* 5U/ $\mu$ L y 33,5  $\mu$ L de agua destilada ultrapura autoclavada, todo Invitrogen menos el agua), 2  $\mu$ L del partidor (Promega) 10 pmoles/ $\mu$ L y 1.5  $\mu$ g ADN genómico, purificado y procesado para metilación. Para cada partidor se realizó un control negativo que contenía todos los reactivos anteriormente descritos, excepto el ADN genómico que se reemplaza por 1 $\mu$ L de agua destilada ultrapura autoclavada. Este procedimiento se lleva a cabo en baño

de hielo (aproximadamente 4 °C). Cuando están todos los reactivos en los tubos, estos se centrifugan a 2500 Xg durante 1 minuto, luego los tubos se colocan en el termociclador (LabNet) con el siguiente programa: se inicia con una denaturación completa del ADN por 3 minutos a 94 °C, prosiguiendo con 45 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a X °C (temperatura dependiente del partidador ver tabla 5) y 2 minutos a 72 °C, y finalizando con una síntesis de 10 minutos a 72 °C. Luego, estos productos se deben mantener a 4 °C hasta su utilización.

#### Análisis de los productos de PCR

Los productos de PCR del estudio de todos los partidadores se resuelven en geles de agarosa al 1% (anexo II). En los bolsillos del gel se colocan las muestras que consisten en 9 µL del producto de PCR y 1 µL de la solución amortiguadora para cargar geles 10× (Winkler Ltda.), intercaladamente en el gel se pone una muestra control de tamaño molecular de 100 bp de ADN en una concentración de 1µg/µL (Promega). Se corre el gel a 75 V constante utilizando la fuente de poder, utilizando la solución amortiguadora TBE 1×. Luego, el gel es teñido por 20 minutos con una solución de bromuro de etidio de 0,75 µg/mL (Winkler Ltda.) y lavado por 10 minutos con agua destilada. Los fragmentos amplificados de ADN se visualizan directamente bajo luz ultravioleta (UV), mediante una cámara de video y un programa computacional del equipo BIO RAD Gel Doc 1000 con el cual se obtiene una imagen digitalizada del gel. Esta imagen es luego analizada por el programa computacional Gel-Pro Analyzer<sup>TM</sup> versión 4.0 que analiza las bandas obtenidas, dando sus pesos moleculares.

#### 5.5.2 RT-PCR

Mediante esta reacción se generó el cADN, a partir de los mARN de los genes de estudio y el partidador reverso de la pareja de partidadores para el posterior PCR (para el caso de qPCR) o con un *polidT* (para el caso de los microarreglos).

Luego de la extracción de ARN, como se describe en el punto 6.3.2. se cuantificación por espectrofotómetro (tanto PCR, como producto RT) y se evaluó en gel de agarosa. Para las muestras analizadas por PCR en tiempo real (FPH expuestos a As), se tomo una cantidad de 10 ng. del producto RT con el partidor reverso de cada gen (tabla 6). Para el caso de las muestras utilizadas en el estudio de macroarreglos, se tomo una cantidad de 1 µg. de mARN de cada muestra. Finalmente se procedió a una reacción de RT, como indica la tabla 4.

Tabla 4: protocolo de RT de mARN obtenidos de las muestras expuestas a As (III) y sus controles.

<b>Solución y/o muestra</b>	<b>Volumen y/o Cantidad</b>
mARN	100 ng (promedio 3 µL de muestra)
Primer (reverse) (promega)	2 pmol (1 µL)
dNTPs <sup>f</sup>	1 µL
H <sub>2</sub> O grado PCR	12 µL
Incubación de las muestras a 65°C por 5 minutos con un rápido enfriado	
First Strand Buffer <sup>f</sup> 4X	4 µL
DTT <sup>f</sup> 0.1 M	2 µL
RNAse OUT <sup>f</sup>	1 µL
Mezcla por pipeteo suave, incubación a 37°C por 2 minutos	
M-MLV-RT <sup>f</sup>	1 µL
Incubar a 25°C, por 10 minutos	
Incubar a 37°C, por 50 minutos	
Incubar a 70°C, por 10 minutos (con el fin de terminar la reacción)	

<sup>f</sup>Productos Invitrogen

Una vez obtenidos los productos del RT, se utilizó el material para los diversos estudios.

## 5.6 Metilación del ADN

El proceso de metilación se realizó como lo describe Herman J. G. *et.al.* 1996, el proceso completo del estudio de MSP, consta de los siguientes pasos:

Extracción y purificación del ADN.

Como se describe en el punto 6.3.1.

Tratamiento con Bisulfito de Sodio.

1.5  $\mu\text{g}$  de ADN en un volumen de 50  $\mu\text{L}$ , es denaturado con NaOH 0.2 M, por 10 minutos a 37 °C. Luego a la muestra se le agregan, 30  $\mu\text{L}$  de 10 mM de hidroquinona y 520  $\mu\text{L}$  de Bisulfito de Sodio 3 M, a pH 5, y son incubados a 50 °C por 16 horas. Una vez modificado el ADN es purificado a través de resinas (idealmente *Wizard DNA purification resine*, Promega), eluyendo el ADN con un volumen de 50  $\mu\text{L}$  de agua DEPC. Las modificación son complementadas con un tratamiento de la muestra con NaOH 0.3 M, por 5 minutos a temperatura ambiente, para finalmente precipitar el ADN con etanol y almacenando a temperaturas menores a -20 °C. Resuspender el ADN en una solución e NaOH 8 mM para su uso [Herman, J. G. *et. al.* 1996].

PCR

Una vez definidos los partidores para detección de metilación (tabla 5), se procede al desarrollo de un clásico ensayo de PCR, como se describe en el punto 5.5.1.

Tabla 5. Se indican las secuencias de los partidores utilizados en el estudio de metilación.

Gene	partidores 5' → 3'		amplicón	TM
DAPk1	Met	L: GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC R: CCCTCCCAAACGCCGA	98	60
	Unmet	L: GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT R: CAAATCCCTCCCAAACACCAA	106	60
Rb1	Met	L: GGGAGTTTTCGCGGACGTGAC R: ACGTCGAAACACGCCCG	173	55
	Unmet	L: GGGAGTTTTGTGGATGTGAT R: ACATCAAAACACACCCCA	173	55
MGMT	Met	L: TTTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC R: GCACTCTTCCGAAAACGAAACG	81	59
	Unmet	L: TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT R: AACTCCACACTCTTCCAAAACAAAACA	93	59
p16	Met	L: TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC R: GACCCCGAACCGCGACCGTAA	150	60
	Unmet	L: TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT R: CAACCCCAAACCACAACCATAA	151	60
β-actina	control	L: CCA ACC GCG AGA AGA TGA (18) R: CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG (20)	97	60 59

La detección es a través de gel de agarosa al 1% (anexo II)

## 5.7 PCR en tiempo real

En el PCR en tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN o ARN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de producto formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

Luego de la obtención de los productos del RT, se procedió con el PCR en tiempo real (qPCR), se utilizó la tecnología de la empresa ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, *LightCycler*®2.0. Dentro de las opciones del qPCR de *LightCycler*®, se decidió por la utilización del método de detección más sensible y cuantitativo que posee la empresa ROCHE, la detección por *TaqMan*® *Master* asociado con

*Universal ProbeLibrary Set Human (UPSH)*. El sistema de detección de UPSH, se basa en la utilización de sondas específicas de un tamaño pequeño, el cual posee un fluoróforo y un apagador de fluorescencia, y al estar juntos en la sonda, esta no emite señal, luego bajo condiciones de temperatura adecuada la sonda se hibridiza a la muestra, para posteriormente cuando se inicia el proceso de replicación del PCR, la sonda es degradada por la polimerasa y libera al fluoróforo generando la señal que es detectada por el equipo (figura 14).

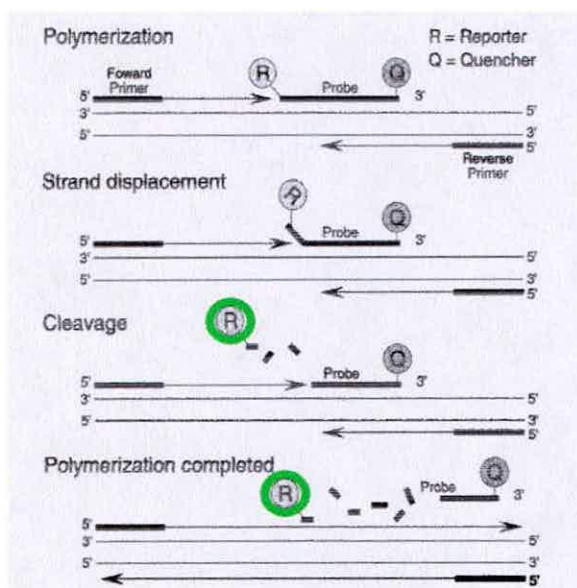


Figura 14. Se presenta una esquematización de cómo funciona la sonda del sistema UPSH. La letra R, representa al fluoróforo y en verde se indica la emisión de la sonda, mientras que la letra Q identifica al apagador.

Las sondas UPSH, son sondas prediseñadas y estandarizadas para el uso de genes humanos, que permiten ahorrar tiempo en el diseño de la sonda en sí y los partidores asociados. El procedimiento es ingresar a [www.universaprobeklibrary.com](http://www.universaprobeklibrary.com), se selecciona el link de humano, lo que abrirá una página que permitirá la búsqueda de la sonda y partidores adecuados para los genes de interés (figura 14).

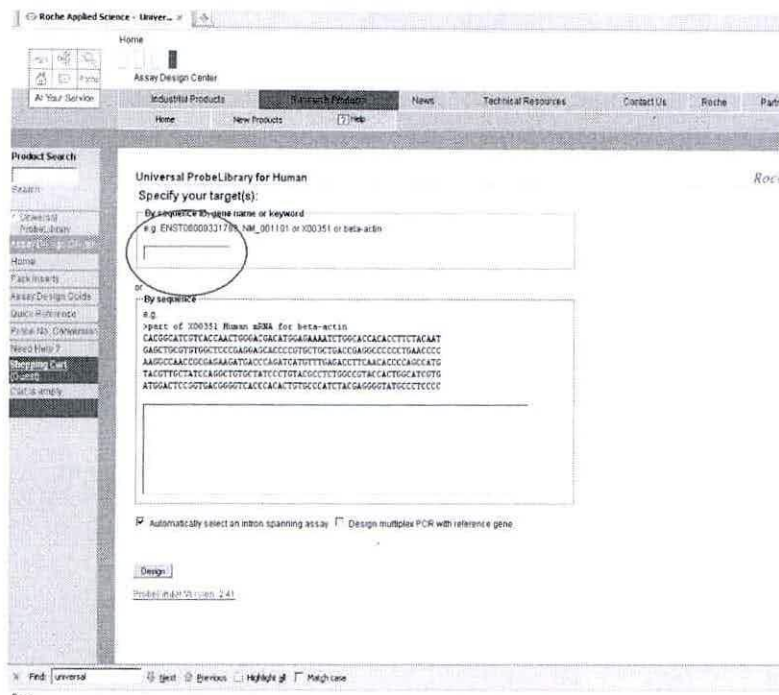


Figura 15. Se representa la página que posee ROCHE®, para la búsqueda de la sonda y partidores de los genes de estudio.

Luego a través de códigos de clasificación del mRNA de gen en estudio se incorporan en la página (círculo rojo en la figura 15) y se obtienen los datos deseados, es decir, la sonda necesaria y la pareja de partidores a utilizar (tabla 6).

Tabla 6. Se indica el resultado de la búsqueda de la sonda y partidores de los genes en estudio, en el software “buscador y diseñador de sonda-primer” de ROCHE®.

Gene	sonda	Partidor 5' → 3'	amplicón	TM
DAPk1	86	L: GCA GGA AAA CGT GGA TGA TT (20) R: CAT TTC TTC ACA ACC GCA AA (20)	75	59 59
Rb1	2	L: CAG AAT AAT CAC ACT GCA GCA GAT A (25) R: CAC GCG TAG TTG AAC CTT TTT (21)	76	60 59
MGMT	47	L: CAC CGT TTG CGA CTT GGT (18) R: GCT CCA GCT TCC CCA AAG (18)	89	60 60
p16	34	L: GAC CTG GCT GAG GAG CTG (18) R: TTT CAA TCG GGG ATG TCT G (19)	128	59 59
GADPH	60	L: AGC CAC ATC GCT GAG ACA (18) R: GCC CAA TAC GAC CAA ATC C (19)	66	60 60

Nota: ROCHE®, no especifica la secuencia de la sonda, solo indica de forma esquemática en que segmento de amplicón de uniría. “L” representa al partidor que se une a la cadena primaria del cADN y “R” representa al partidor que se une a la cadena secundaria.

Luego de determinada la sonda a utilizar y la pareja de partidores a usar en el qPCR, se procede en protocolo según especificaciones del fabricante.

En primer lugar se genera una mezcla de los ingredientes que provee el kit TaqMan® Master, la sonda y los partidores, como se indica en la tabla 7.

Tabla 7. Se indican los volúmenes y la concentración final de los reactivos utilizados en la generación de la mezcla para realizar el qPCR. Se indican los volúmenes para preparar una muestra, estos volúmenes aumentan proporcionalmente dependiendo del número de muestras.

Componente	Volumen	Concentración final
Agua grado PCR	5.2 $\mu$ L	--
Sonda (10 $\mu$ M)	0.1 $\mu$ L	100 nM
Partidores (20 $\mu$ M c/u)	0.1 $\mu$ L	200 nM (c/u)
Solución TaqMan® 5X	2.0 $\mu$ L	1X
<b>Volumen Total</b>	<b>7.5 <math>\mu</math>L</b>	

Luego se procede a tomar los capilares de vidrio (pequeño “tubo de ensayo” donde ocurre la reacción de qPCR), y se procede a trasvasiar 7.5  $\mu$ L de la mezcla antes descrita y 2.5  $\mu$ L de producto de RT. Se procede a centrifugar los capilares a 700 Xg por 30 segundos, con el fin de mezclar y depositar la solución en el fondo del capilar. Luego se instala en el carrusel del LightCycler® y se introducen los parámetros de trabajo para iniciar el qPCR.

Tabla 8. Se indican los parámetros de trabajo del termociclador LightCycler®.

Modo de Análisis	Ciclos	Temperatura de trabajo (°C)	Tiempo del proceso (s)	Adquisición de datos
Incubación UNG	1	40	120	No
Preincubación	1	95	600	No
Amplificación	50	95 (denaturación)	10	No
		60 (unión)	30	No
		72 (extención)	1	Si
Enfriamiento	1	40	30	No

Cabe destacar que a diferencia de PCR convencionales o incluso otros modelos de qPCR, en el momento en que se amplifica la muestra, la temperatura de unión de los partidores esta definida por los  $T_m$  de los mismos (generalmente información que es teórica cuando se diseñan y viene con los datos del fabricante cuando se mandan a sintetizar), pero en este tipo de qPCR la temperatura la define el  $T_m$  de la sonda, y para el caso de USPH, se diseña de tal manera que tanto la sonda como los partidores posean el mismo  $T_m$  (ver tabla 6).

### 5.8 Arreglos de ADN

El funcionamiento de un organismo vivo, se sustenta en una complicada y orquestada función de muchos genes y sus productos, sin embargo en los antiguos métodos de biología molecular, generalmente se trabajaba “un gen (o producto), un experimento”, donde se genera una limitación en la interpretación de los resultados [Shi, L. 2002]. Los ensayos de hibridización, se comenzaron a desarrollar en la década del setenta, utilizando membrana flexible tal como nitrocelulosa y nylon [Schena, M. 2000]. En el desarrollo de nuevas tecnologías, se generó una nueva metodología, que permite analizar simultáneamente varios miles de genes, esto gracias al desarrollo de los “arreglos de ADN”. Esta tecnología, permite el monitoreo de genomas completos o miles de genes en un simple “chip” o membrana [Shi, L. 2002].

Un arreglo, en forma simplificada, es el ordenamiento de genes en un soporte. El cual es usado para identificar la presencia y/o expresión de dicho gen en una muestra biológica, fundamentado en la hibridización de las hebras ya sea de ADN o ARN. En general los arreglos se definen como *macroarreglos* o *microarreglos*, según la cantidad de genes (secuencias u oligonucleótidos) que se depositan en el soporte [Shi, L. 2002].

La terminología utilizada en la literatura para describir esta tecnología incluye términos como *membranas* para macroarreglos y *biochip*, *DNA chip*, *DNA microarray* y *genes array*, para microarreglos. Pero *Affymetrix, Inc.* tiene registrado el término de *GeneChip®*, en referencia a chip de alta densidad basados en arreglos de oligonucleótidos de ADN, sin embargo en varios artículos científicos el término "gene chip(s)" es utilizado como una terminología general para referirse a los micro arreglos [<http://www.affimetix.com>; Shi, L. 2002]. El estudio de la expresión de genes, utilizando microarreglos de cADN, permite un análisis simultáneo de múltiples marcas, lo que ha sido muy recurrente en los últimos años, en lo que a estudio de cánceres se refiere [Khan, J. *et. al.* 1999].

### 5.8.1 Macroarreglo

Una vez obtenido el ARN total de las células expuestas a As (III) 0.05 p.p.m., por un periodo de 30 días, como se describe en el punto 5.3.2. Se llevan a cabo 4 etapas, todas desarrolladas en la USACH, y que se representan en la figura 16.

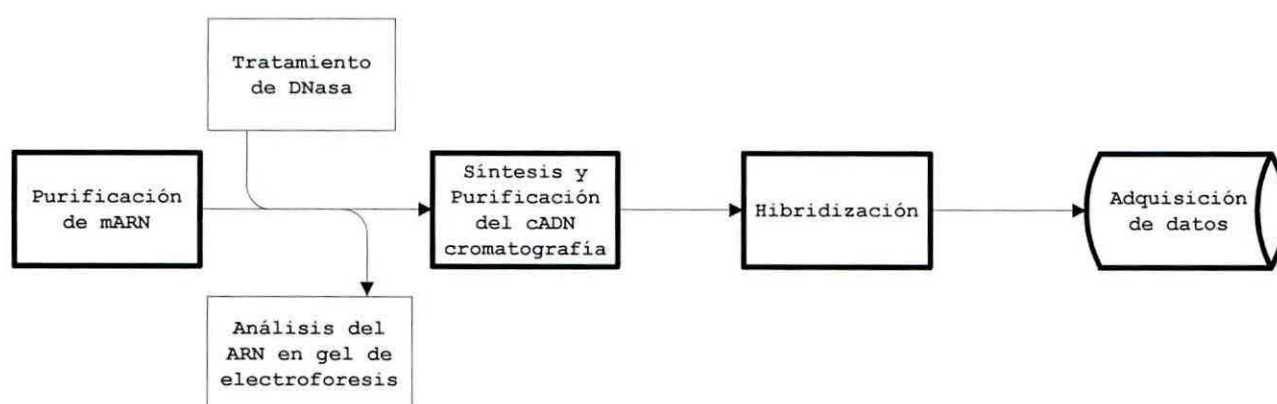


Figura 16. Esquema que representa la secuencia de pasos desde la purificación del mRNA hasta la adquisición de los datos representados en la tabla 11, en resultados. Todos procesos indicados, con excepción de la electroforesis, se realizan por medio de kit Clontech.

En la primera etapa, la purificación del ARN, se requieren de 500 a 1000  $\mu\text{g}$  de ARN extraído, el cual fue determinado de manera espectrofotométrica (Anexo II), para poder obtener toda la cantidad máxima necesaria para el ensayo (1000  $\mu\text{g}$ ), durante la etapa de extracción se procedió a generar dos pool de ARN total, uno control y otro de células expuestas por 30 días. Una vez determinado los 1000  $\mu\text{g}$  por muestra, se continuó con el tratamiento con DNasa I.

En la etapa de tratamiento de DNasa I se procedió según el fabricante:

Para la muestra de ARN, se combinaron los reactivos del Kit, en un tubo microcentrífugo de 1.5 mL:

500  $\mu\text{L}$  ARN total (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )  
100  $\mu\text{L}$  10X DNase I *Buffer*  
50  $\mu\text{L}$  DNase I (1 U/ $\mu\text{L}$ )  
350  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O grado PCR  
**1.0 ml Total Volumen**

Esta mezcla se incuba por 30 minutos a 37 °C, en la incubadora de CO<sub>2</sub>, esto solo con el fin de minimizar las posibilidades contaminación de la muestra. Luego se adiciona 100  $\mu\text{L}$  de solución de “término” 10X. Para mayor comodidad se separa la mezcla en dos tubos de 1.5 mL (550  $\mu\text{L}$  por tubo), se adicionan 550  $\mu\text{L}$  de una solución de fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico (25:24:1; pH 4.5) a cada tubo y se mezcla en vortex por 30 segundos. Luego se deja en reposo por 2 minutos a 4 °C y pasa este tiempo se centrifuga de 14000 r.p.m. por 10 minutos a 4 °C, separándose 2 fases. Cuidadosamente se separa la fase incolora (o fase acuosa) en un nuevo tubo de 1.5 mL, en este punto se agregan 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo y se agita en vortex por 30 segundos y luego se centrifuga a 14000 r.p.m. por 10 minutos a 4 °C nuevamente, luego se separa la fase acuosa (es muy importante no contaminar con cloroformo la fase acuosa) y se guarda en un tubo de 2.0 mL. Obtenida la fase acuosa, a esta se le agregan 50  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 2[M] a pH 4.5 y 1.5 mL de etanol al 95%, la solución se mezcla en vortex por 10 segundos y

se incuba en hielo por 10 minutos, terminado este tiempo se centrifuga a 14000 r.p.m. por 15 minutos a 4 °C. Luego se aísla cuidadosamente el sobrenadante y se resuspende en etanol al 80%, homogenizando por pipeteo suavemente por un minuto, luego se vuelve a centrifugar a 14000 r.p.m. por 5 minutos a 4 °C, se extrae el sobrenadante y se deja secar el precipitado a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente se resuspende el ARN en agua de grado PCR, libre de *DNasa* y *RNasa* pudiendo almacenarse a -70 °C.

Una vez obtenido el ARN, se dispone de ~500 µg (aproximadamente 50 µL) en un tubo de 0.2 mL (recordar que hay 2 tubos), se adicionan 45 µL de agua grado PCR y 1 µL de Oligo dT biotinilado (marcado específicamente), esta solución se incuba en el termociclador a 70 °C por un periodo de 2 minutos, para posteriormente dejar enfriar por 10 minutos a temperatura ambiente, finalizado los 10 minutos, se adicionan 45 µL de tampón de “unión” 2X y se homogeniza por pipeteo, para luego adicionar 15 µL de estreptavidina magnéticamente marcada (previamente lavada y resuspendida en tampón de “unión” 1X), se mezcla la solución en un agitador orbital por 30 minutos exactos a 1500 r.p.m. a temperatura ambiente, luego con separador magnético (un imán), fija el ARN marcado y se descarta (por pipeteo) la solución que posee y se lava con 45 µL de tampón de lavado (el proceso de lavado se repite 2 veces), luego se resuspende la muestra marcada en 50 µL tampón de reacción, homogenizando por pipeteo suave, luego aplicar separador magnético y descartar el sobrenadante, para finalmente resuspende la muestra en agua grado PCR (50 µL con <1000 µg).

Para realizar la síntesis de cADN, se utilizaron los reactivos del kit “*Atlas cDNA Expression Arrays*” proveído por el set del arreglo.

Se prepara un “*Master Mix*”, para todas las reacciones de marcaje que se vayan a realizar, combinando en un tubo de 0.2 mL los siguientes reactivos a temperatura ambiente:

	por reacción	4 reacciones
Tampón de reacción 5X	4 $\mu$ L	16 $\mu$ L
Mezcla de dNTP(sin dATP)	2 $\mu$ L	8 $\mu$ L
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dATP (3000 Ci/mmol, 10 $\mu$ Ci/ $\mu$ L)	5 $\mu$ L	20 $\mu$ L
DTT (100 mM)	0.5 $\mu$ L	2 $\mu$ L
<b>Volumen total</b>	<b>11.5 <math>\mu</math>L</b>	<b>46 <math>\mu</math>L</b>

Luego la reacción se incuba (en el termociclador) a 65 °C, por 2 minutos, luego se agregan 1  $\mu$ L de la mezcla de partidores CDC y 6  $\mu$ L del ARN purificado anteriormente, la nueva mezcla se incuba a 65 °C por dos minutos y luego se baja la temperatura a 50 °C por otros dos minutos. Concluido este tiempo, se adicionan 2  $\mu$ L de transcriptasa reversa (MMLV RT) por una reacción (4 reacciones 8  $\mu$ L), mezclando suavemente por pipeteo, para luego incubar la reacción a 50 °C por 25 minutos. Finalizado este tiempo, se adicionan 2 mL de solución “de termino” mezclando bien. El producto RT, se purifica con columnas cromatográficas “*NucleoSpin*”, quedando la muestra (radiactiva) en 100  $\mu$ L de tampón NE, para su uso en la hibridización de la membrana.

Para la hibridización de la membrana (la de células control y células expuestas), se procede preparando una solución “*ExpressHyb*”, calentando 5 mL a 68 °C por 2 minutos y se incuba 500  $\mu$ g de ADN de salmón (parte del kit), a 95 °C por 5 minutos, y luego se enfría rápidamente a 4 °C, para ser mezclada con la solución *ExpressHyb*, almacenándola a 68 °C hasta su uso. Luego la membrana es humectada con agua desionizada estéril, y es puesta en una botella de hibridización, quedando la membrana adherida a las paredes de la botella, siendo muy importante que no quede ninguna burbuja de aire ni que se seque la membrana, luego se agrega la solución preparada anteriormente. Una vez puesta en contacto la muestra con la membrana con la muestra se prehibridiza por 30 minutos a 68 °C. Luego se agregan 5  $\mu$ L del muestra purificada por *NucleoSpin*, la cual fue previamente incubada a 95 °C por 2 minutos, una vez agregada la muestra se deja por 16 horas a 68 °C en oscuridad, teniendo como precaución agregar *ExpressHyb*, preincubado a 68 °C, para que no se seque la membrana si es

necesario. Luego de la hibridización, se agrega dos soluciones de lavado, la 1<sup>ra</sup> solución que posee tampón SSC 2X y SDS al 1%, se agregan 200 mL y se lava por 30 minutos a 68 °C, repitiendo este lavado a lo menos 3 veces. Luego la solución (SSC 0.1X y SDS al 0.5%) también se agregan 200 mL y se lava por 30 minutos a 68 °C (todos los lavados en agitación por shaker). Finalmente se lava con una solución de SSC 2X (200 mL) por 5 minutos a temperatura ambiente.

El último paso es tomar la membrana (cuidadosamente) y montarla *Phosphoimager G5-525* (Bio-Rad), y se procede a la digitalización de la imagen con el *ScanAlyze Software* (Standford, USA) y analizado con *GEArray Software* (SuperArray, USA).

### 5.8.2 Microarreglo

Luego de la selección de las muestras más adecuadas, proveniente de los pacientes (grupo altamente expuesto en forma individual y un pool del grupo control), se procedió a la extracción del ARN total. Posteriormente este ARN total se purifica con el kit OLIGOTEX® (Qiagen).

En la figura 17, se representan los pasos a seguir en el desarrollo de un ensayo de arreglos genético, esto comienza con la obtención de mARN, hibridización del partidor, síntesis del cADN, limpieza del cADN, amplificación y marcaje del antisentido de cARN, limpieza de biotina, fragmentación, hibridización en chip, lavado teñido/revelado, lectura del chip [Affymetrix. Inc. 2003].

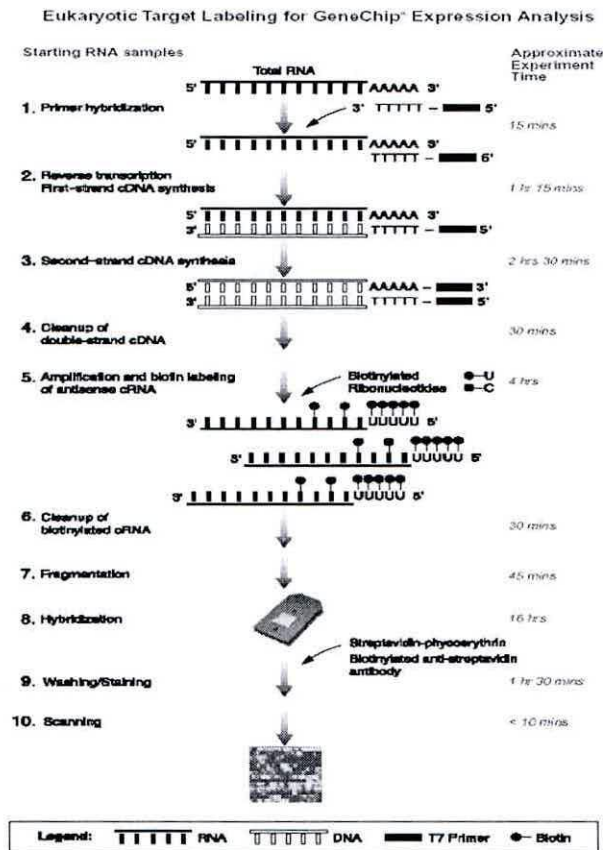


Figura 17. Se representan los pasos a realizar en el ensayo de arreglo, a partir de una muestra de ARN.

El fabricante, en este caso *Affymatrix, Inc.*, sugieren la utilización de diversos productos, para el desarrollo de los diversos pasos, en el desarrollo de un arreglo, los cuales se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Se presentan los productos anexos, para el desarrollo de un arreglo, sugerido por la empresa *Affymetrix. Inc.* En negrilla los procesos realizados en Chile, mientras que el resto de los pasos se realizaron en NIH, EE.UU.

<b>Aislamiento de ARN total</b>	<b>Como se indica en el punto 6.3.2.</b>
<b>Aislamiento por Poli-A del mARN</b>	<b>Kit directo de mARN, Oligotex (aislamiento de mARN de cualquier célula), QIAGEN</b>
<b>Síntesis de cADN</b>	<b>A través de una reacción de RT, como se indica en el punto 6.4.2. (envío a NIH)</b>
Síntesis de biotin-etiquetado de cARN	Enzo BioArray, kit de etiquetado de transcripto de ARN, <i>Affymetrix</i>
IVT limpieza y cuantificación de cARN	GeneChip sample Cleanup module, <i>Affymetrix</i> 10X TBE, <i>Cambrex</i>
Fragmentación de cARN	GeneChip Sample Cleanup module, <i>Affymetrix</i>

## 5.9 Modelo Estadístico

El uso de herramientas estadísticas es imprescindible, para el desarrollo de cualquier método de pronóstico y/o detección dentro de los modelos biológicos, dichas herramientas o modelos estadístico variara dependiendo de la complejidad del diseño experimental, así como también del modelo biológico en estudio. Para el caso de esta investigación el modelo en estudio es uno de los más complejos, dada su condición de multivariables (muchos factores que afectan el o los parámetro(s) en estudio), lo que limita las posibilidades de escoger y/o diseñar el método más adecuado para la interpretación de los datos obtenidos, además de definir si estos datos son cuantitativos, cualitativos o simultáneos. Un tratamiento tan completo, unido a la diversidad de enfoques teóricos y prácticos que puede darse en un estudio multidimensional, explica la dificultad matemática que se va generando en el proceso, que por fuerza, se va apoyando en el cálculo matricial y en técnicas no básicas. Es por esto que es necesario el procesamiento autónomo de los datos, a través de potentes programas de computación (Ej. SAS o SPSS), que permitan minimizar el error de cálculo así como la capacidad de procesar un gran número de datos simultáneamente, además de una alta velocidad en el procesamiento de los mismos.

La utilización de un paquete estadístico como SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) es un software estadístico, que permite el análisis de de datos con aplicación en varias áreas del saber, incluyendo las ciencias básicas y la medicina.

Para poder definir cual de las opciones que presenta el programa SPSS 15.0, es necesario definir la técnica de análisis de multivariantes que se presentan, y para ello es prioritario respondiendo ciertas interrogantes que permite ir descartando metodología hasta llegar a la óptima (figura 18).

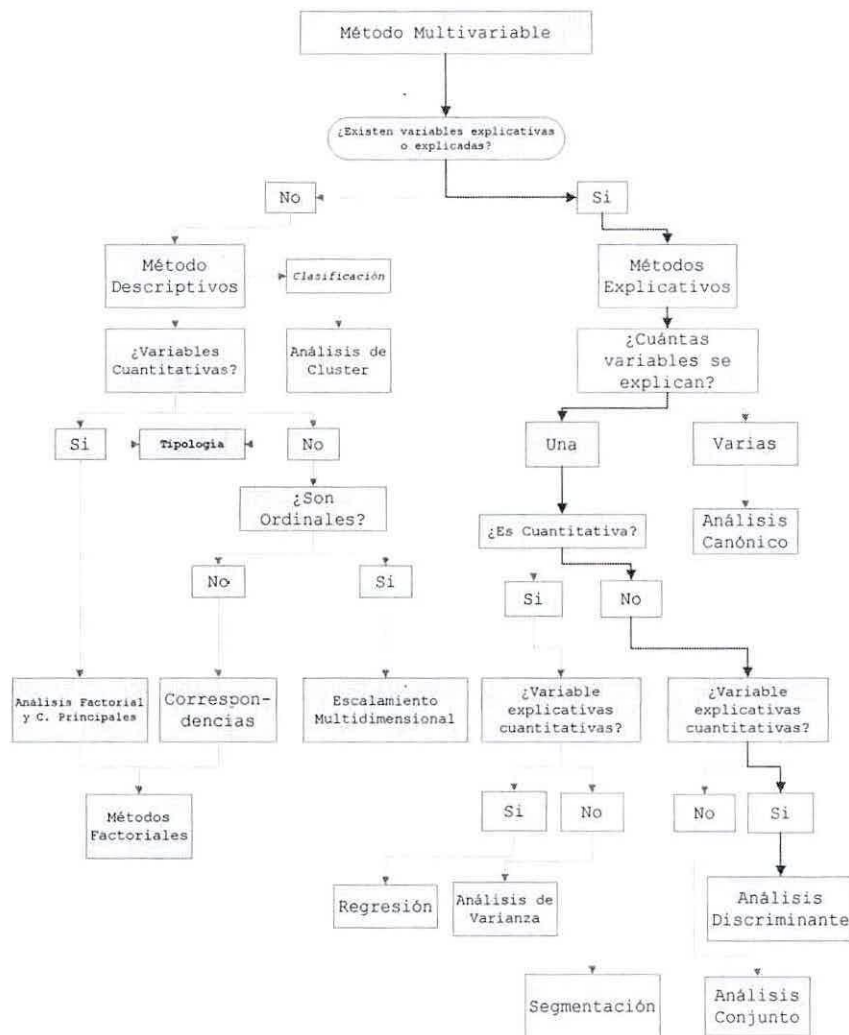


Figura 18. Diagrama de flujo que facilita la decisión de la metodología de análisis de multivariantes de datos a utilizar, en flechas rojas se indica la ruta que lleva al tipo de análisis adecuado.

El análisis discriminante enfoca un problema de identificación relacionado con la pregunta de a cuál grupo pertenece, de entre varios, la variable o unidad estadística en observación. Por ejemplo, el análisis discriminante clasificaría a una persona como sana o enferma, en función de dos poblaciones diferentes, basados en la información de los niveles de las variables X. Es decir, el análisis definiría las características para pertenecer a un grupo o a otros. Los siguientes pasos son necesarios para resolver el problema:

- (a) Conocer las densidades de probabilidad  $P_1(y), \dots, P_z(y)$  para clasificar las variables y en z grupos diferentes.
- (b) Conocer las probabilidades *a priori*  $p_1, \dots, p_z$  para las poblaciones, las cuales son frecuencias relativas de unidades estadísticas de los z grupos.
- (c) Especificar valores  $r_{ij}$  que representen la pérdida por identificar una variable y en el grupo i cuando en realidad pertenece a la población j.

A las variables “y” se les asocia un puntaje S que consiste en un promedio ponderado de las probabilidades de que cada variable muestre los atributos que definen a una población en particular. Es decir:

$$S_i = \sum_{n=1}^z \pi_n P_n(y) r_{ni} \quad \text{ecc. 2}$$

A la variable “y<sub>i</sub>” se asigna a la población para la cual su puntaje discriminante es el más alto. En el caso de que las variables sean normales, el puntaje discriminante se puede calcular como:

$$S_i = -\frac{1}{2} \ln |\Sigma_i| - \frac{1}{2} (y - y_i)' \Sigma_i^{-1} (y - y_i) + \ln \pi_i \quad \text{ecc. 3}$$

el cual es el logaritmo de la función de verosimilitud de la variable “y<sub>i</sub>”.

Cuando existen sólo dos poblaciones (por ej. bueno o malo), la regla de decisión para la asignación de un banco en un grupo o en el otro está dada por la

diferencia de dos puntajes discriminantes:  $S_1 - S_2$ . En términos de la verosimilitud normal, la diferencia de los discriminantes sería:

$$(y'_1 - y'_2)\Sigma^{-1}Y - \frac{1}{2}(y'_1\Sigma^{-1}y_1 - y'_2\Sigma^{-1}y_2) + \ln \pi_1 - \ln \pi_2$$

ecc. 4

Si se denota el primer sumando de la ecuación anterior como  $L(Y)$  y los dos últimos como  $c$ , la regla de decisión es la siguiente: asigne el  $i$ -ésimo banco al grupo de bancos con utilidades altas si  $L(Y) > c$  o, al contrario, al grupo con utilidades bajas si  $L(Y) < c$ .

Este método estadístico, a pesar de ser muy excluyente, es decir, definir si los datos definen a un paciente (o modelo de estudio) en una condición específica sin posibilidad a condiciones intermedias, permite definir condiciones claras de pronóstico, lo cual llevaría a tomar una decisión más clara y definida de las acciones a seguir.

#### Algunos indicadores

Lambda de Wilks: para determinar la significancia de las variables que se introducen, se emplea el estadístico *Lambda de Wilks* que se obtiene de la razón entre el determinante de la matriz de varianzas y covarianzas dentro de grupos y el determinante de la matriz de varianzas y covarianzas total; este se aproxima con una  $F$ .

Para saber si una variable es o no significativa para discriminar se realiza una prueba de significancia de esos estadísticos de la forma usual.

## Capítulo 6

### Resultados y Discusiones

#### 6.1 Curva de viabilidad y crecimiento

Los cultivos de FPH, fueron realizados en a diferentes concentraciones de As (0.01; 0.05; 0.1 p.p.m.), presente en el medio de cultivo, por un periodo de 3 meses continuos de exposición.

Los datos de viabilidad y crecimiento son los siguientes:

Tabla 10: tabla de viabilidad y crecimiento, cada 120 horas aproximadamente.

[ ]	0.01 ppm		0.05 ppm		0.1 ppm		control	
	Viabiles *10 <sup>5</sup>	Totales *10 <sup>5</sup>	Viabiles *10 <sup>5</sup>	Totales *10 <sup>5</sup>	Viabiles *10 <sup>5</sup>	Totales *10 <sup>5</sup>	Viabiles *10 <sup>5</sup>	Totales *10 <sup>5</sup>
0	2.5±0.9	2.6±0.9	2.6±0.9	2.5±0.9	2.6±0.9	2.6±0.9	2.6±0.9	2.6±0.9
120 (tiempo 1)	60±5	63±9	60±1	65±12	59±5	64±2	66±9	69±8
240 (tiempo 2)	63±9	66±9	59±11	66±8	58±6	60±9	65±5	71±11
360 (tiempo 3)	61±5	71±8	58±2	62±9	75±2	77±9	65±9	66±3
480 (tiempo 4)	61±2	68±5	55±6	59±3	52±6	56±2	66±9	69±5
600 (tiempo 5)	55±2	75±5	51±2	65±5	50±9	53±6	63±5	66±5
790 (tiempo 6)	52±6	63±5	52±4	75±12	46±6	57±8	62±5	69±7
1000 (tiempo 7)	45±6	53±8	41±5	56±8	39±5	49±5	55±2	61±5
1440 (tiempo 8)	44±5	49±2	45±2	59±9	38±4	45±9	56±5	62±2

Nota: Se recolectaron 3 muestras por tiempo para conteo de las células, las cuales se contaron por triplicado

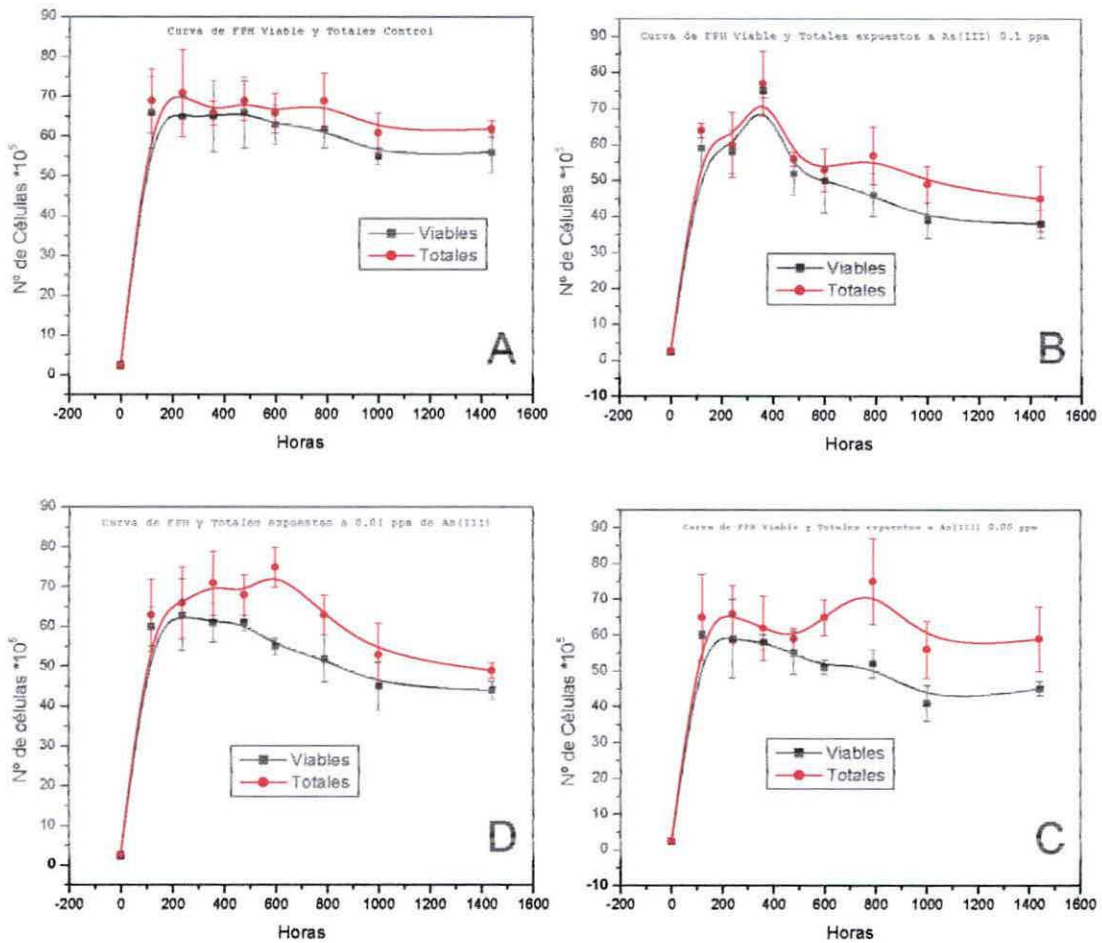


Figura 19. Gráficos de FPH totales y viables, expuestos a diferentes concentraciones de As (III). A se presenta la curva control (sin exposición), mientras que B, C y D muestra las curvas de FPH expuesto a 0.1; 0.05 y 0.01 ppm respectivamente.

En la curva de curvas de crecimiento y mortalidad (figura 19), básicamente se quiere establecer el como las diversas concentraciones de As (III) utilizadas es esta investigación afectan la sobrevivencia de las células (FPH) en función de un periodo de tiempo prolongado (1440 hrs), para así presentar los primeros antecedentes de alteraciones en los procesos de celulares que ejerce el arsénico. Como se muestra en la figura 19, A indica la curva de FPH control (no expuesto), que muestra una tasa de mortalidad prácticamente estable durante todo el periodo de trabajo (4.38%), con una pequeña baja en el número de células totales y viables, que esta en relación con el tiempo con el cual se trabajo con las células, efecto que absolutamente normal en estas condiciones. Las curvas B, C y D, muestran el

crecimiento y viabilidad de FPH expuestos a diversas concentraciones de As (III) (0.1; 0.05 y 0.01 p.p.m. respectivamente). Aunque gráficamente no es muy evidente, la exposición a As(III), aumenta la tasa de mortalidad promedio, siendo del 5.50% para 0.1 p.p.m.; 7.34% para 0.05 p.p.m. y de 8.38% para 0.01 p.p.m., además si correlacionamos estas tasas de mortalidad promedio con el número de células totales por cada experimento (tabla 10), se puede apreciar que a mayor concentración de arsénico es menor el número de células totales y menor es la tasa de mortalidad, lo que puede estar asociado al uso de mecanismos moleculares que normalmente se asocia con el crecimiento celular, para la reparación de procesos afectados por el Arsénico, teniendo presente que dichos efectos tóxicos no son mortales, lo que hace que las células no disminuyan su tasa de viabilidad.

## 6.2 Arreglos

### 6.2.1 Macroarreglos

Los macroarreglos realizados en membranas Clontech, *Atlas® Human Cancer cDNA Expresión Array (Cat. N° 634513)*. Permitió obtener los niveles de expresión de un pool de células en cultivos expuesta a As (III) por 30 días y su correspondiente control no expuesto. Una vez obtenidas las membranas hibridizadas y reveladas (figura 20), se procede a generar una imagen digitalizada para posteriormente ser analizada por el software *AtlasImagen™*, el que transforma los pixeles de la densidad óptica de la imagen en datos relativos (por no poseer unidad dimensional), la correcta determinación de estos valores se logra debido a que el software se guía por una columna y una fila (resaltadas con un recuadro azul en la figura 20) formada por “spots” que se hibridizan con cADN de housekeeping, de la membrana que permite la correcta alineación leyendo las coordenadas de los genes en la membrana. Al mismo tiempo el software analiza los niveles de expresión de un grupo de genes (Ubiquitina, fosfolipasa A2,  $\alpha$ -tubulina,  $\beta$ -actina, y

G3PDH), que se transforman en los controles positivos de la técnica (es cuadro rojo en la figura 20). Además los resultados (numéricos) de estos genes (controles positivos) permite normalizar los valores de los genes estudiados permitiendo la comparación de ambas membranas (control y expuesta a As (III)), ya que estos valores pueden variar entre hasta 5 veces en términos de densidad óptica (siendo el valor máximo permitido para corrección). Para es caso se determinó que la membrana de las células expuestas a As (III) 0.05 p.p.m. (figura 20 B), esta 1.693 veces más densa (en términos de densidad óptica, D.O.) que respecto a la membrana de las células control (figura 20 A), una vez corregidos los valores de la membrana control con el factor de normalización (1.693), se procedió a dividir los valores de D.O. obtenidos de la membrana de las células expuestas a As con los valores ajustados de la membrana de las células control ( $D.O.As/D.O.C$ ), lo que se da como resultado los valores de la tabla 11. En términos simples el resultado de esta división da como información la variación de las cantidades de los mARN, si el valor de  $D.O.As/D.O.C$ , es mayor que 1 se define el aumento de los niveles de expresión y si los valores son menores a 1 se define la disminución de los niveles de expresión, pero si se considera los estadísticos de confianza (o los errores) asociados a procesos experimentales, se generan rangos que permiten definir de manera cualitativa dichas variaciones en los niveles de expresión, así los valor inferiores 0.499 se consideran como cantidades muy bajos de mARN (verde vivo), entre 0.500 y 0.750 (verde lima) se considera como cantidades bajas de mARN, entre 0.751 y 1.199 se considera que no hay variación significativa en las cantidades de mARN (amarillo), entre 1.200 y 1.399 se asume un leve aumento de la cantidad de mARN (color oro), entre 1.400 y 1.699 se asocia a una alza significativa en la cantidad de mARN (anaranjado claro), entre 1.700 y 1.999 se asocia a una alta cantidad de mARN (anaranjado) y sobre 2.000 se asocia a una gran cantidad de mARN (rojo), en función de la presencia de As. Los valores de la tabla 11, además se destacan con colores facilitando identificar la condición de los niveles de expresión de cada mARN.

Tabla 11. Se indica la razón existente entre los valores (D.O.) de las células expuestas y el control, se destacan en calipso los valores de los genes de interés, p16 (A3g), DAPK1 (B3I), Rb1 (B7f) y MGMT (C2g).

A							B							C								
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	
a	0.608	0.661	0.730	0.775	1.365	0.774	1.010	1.017	1.805	0.857	0.905	0.612	0.553	0.695	0.508		1.276	0.708	0.557	0.455	1.076	
b	0.894	0.844	0.528	1.180	0.765	0.651	1.055	1.110	1.470	1.520	0.670	1.117	1.714	0.703		0.599	2.398	1.044	1.247	1.162		
c	0.588	0.707	0.883	0.529	0.940	0.957	1.469	0.793	1.274	1.349	0.541	1.677	1.754		17.923	0.495	0.894	0.712	0.374	1.505	0.856	
d	0.809	1.006	0.862	1.859	1.131	1.322	1.530	1.262	0.897	1.750	0.661	1.037	0.950	0.958		1.321	0.667	1.797	1.454	1.024	0.862	1.091
e	0.701	1.197	0.883	0.760	1.724	2.088	1.200	0.942	0.328	1.546	1.003	0.852	2.382	1.088		0.785	45.764	1.133	0.778	0.518	0.819	0.785
f	0.436	2.224	0.545	1.663	0.639	0.736	1.701	2.238	1.450	2.148	1.887	1.113	3.844	1.284		0.821	0.793	1.723	1.854	0.545	0.822	0.708
g	0.837	0.720	1.928	0.529	0.577	0.695	1.012	0.864	1.146	1.375	1.251	0.983	2.381	0.763		0.971	0.988	0.765	2.078	0.225	0.833	0.754
h	0.827	0.932	0.222	0.891	0.872	1.084	1.008	0.739	1.314	1.289	2.531	0.472	2.391	1.205		0.909	0.848	1.118	0.395	1.795	0.589	1.485
i	0.671	0.821	0.743	0.653	0.803	0.940	0.608	1.167	0.780	1.383	0.137	2.593	1.146	0.999		0.805	0.703	0.840	2.355	0.854	0.677	0.791
j	0.971	0.987	0.795	0.576	0.634	0.455	0.379	0.816	0.573	1.168	1.122	1.506	0.744	0.915		1.014	0.702	0.830	0.730	0.808	0.653	0.533
k	0.789	1.075	0.936	0.659	0.871	1.233	0.631	1.093	1.440	1.340	1.066	0.945	0.634	0.879		1.312	0.239	2.383	0.491	0.511	0.871	1.588
l	0.307	8.198	0.757	0.775	0.458	2.853	0.875	1.324	0.701	2.787	1.142	1.525	0.895	1.018		0.878	2.148	0.568	1.133	1.183	0.282	0.416
m	0.757	1.399	1.220	0.599	0.845	0.981	0.408	0.960	0.234	0.899	1.590	0.973	1.431	0.899		0.780	0.297	1.018	0.597	1.442	0.871	0.833
n	0.611	0.470	0.504	0.565	0.463	0.614	0.793	0.973	0.617	2.682	0.891	0.921	0.857	0.722		0.558	2.344	0.803	0.316	1.124	0.288	0.798
a	2.763	2.997	0.701	0.400	0.582	0.466	0.917	1.228	2.293	0.784	1.202	1.111	0.908	0.689		1.117	0.948	0.905	0.404	1.044	1.318	1.174
b	0.587	0.833	0.938	0.384	0.874	0.357	0.623	0.925	4.155	1.018	1.452	0.705	0.680	0.422		0.599	0.580	0.881	0.845	1.684	0.672	1.418
c	2.229	0.954	0.251	0.635	0.681	0.635	0.527	4.563	0.844	0.878	1.556	0.677	0.530	0.455		0.517	0.637	0.591	0.843	0.907	2.226	0.601
d	0.656	0.639	0.724	0.715	0.879	0.573	0.673	0.839	0.523	0.830	0.716	0.871	0.755	0.935		0.754	1.023	0.678	0.960	0.947	0.739	0.397
e	0.813	0.394	0.897	0.551	0.376	0.243	0.882	0.378	0.564	0.581	0.723	0.670	0.890	0.909		0.908	0.423	0.838	0.642	0.604	1.001	0.184
f	0.840	1.586	0.794	0.735	0.605	0.840	0.386	0.381	0.902	0.608	0.837	0.848	0.635	0.708		0.582	0.718	0.614	0.607	2.933	4.325	0.785
g	0.421	0.424	0.447	1.370	0.282	0.286	0.378	0.322	0.188	1.081	0.540	0.806	0.575	0.278		1.112	0.738	1.029	1.328	0.280	0.628	2.420
h	0.381	0.239	0.199	0.158	1.593	0.109	0.109	1.069	0.104	7.239	0.397	0.503	1.239	0.618		0.962	0.939	1.100	0.458	0.425	0.668	0.559
i	0.133	1.411	0.661	0.224	0.344	2.173	0.708	0.436	3.813	1.182	0.619	0.655	0.636	0.902		0.867	0.816	0.599	0.782	0.669	1.166	0.822
j	0.674	0.673	1.413	1.927	3.014	2.457	1.638	0.757	0.389	0.542	0.956	0.844	0.668	1.399		0.611	0.843	0.906	0.702	0.382	0.738	1.416
k	2.373	0.565	0.365	1.292	0.834	0.686	0.620	1.045	0.863	0.988	0.631	0.887	1.203	0.333		1.309	0.644	0.588	0.611	0.675	0.605	0.605
l	0.216	0.806	0.750	2.607	0.243	0.732	0.820	1.163	2.482	0.717	0.217	2.008	2.203	1.601		0.682	0.568	0.938	0.953	0.474	1.138	0.280
m	0.188	4.186	0.436	5.535	0.729	0.910	3.453	1.231	1.351	0.678	0.920	0.345	0.395	0.838		0.45	0.873	0.237	0.520	0.842	1.807	0.748
n	0.844	0.680	0.360	3.051	0.442	0.633	0.581	0.724	0.821	2.071	0.850	0.677	0.634	0.224		0.500	0.665	0.614	0.434	0.724	0.672	0.672

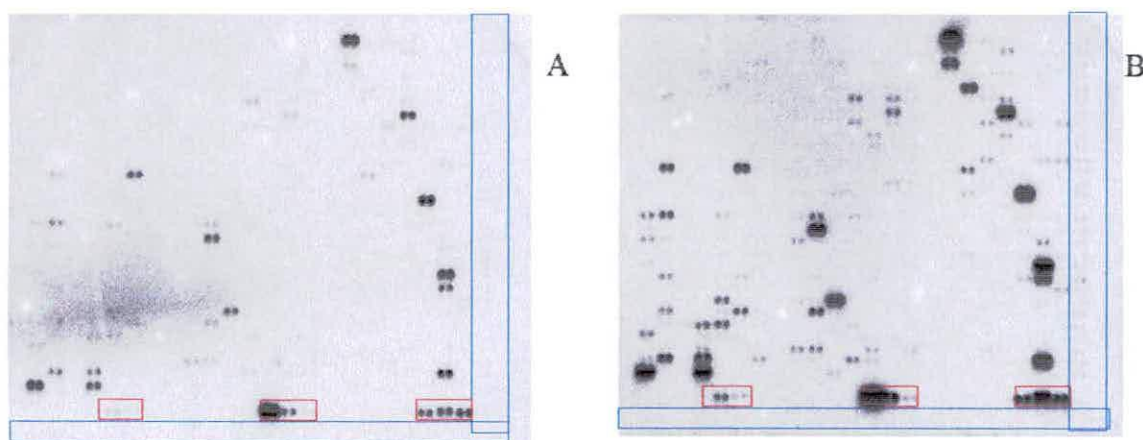


Figura 20. imágenes digitalizadas de las membranas Clontech, A) es la imagen de la membrana donde se aplicaron los mARN (cADN en estricto rigor) de las células control y B) es la imagen de la membrana donde se aplicaron los mARN de las células expuestas a As(III). En recuadro azul se destacan la columna y fila de los spots para los mARN de genes *housekeeping*, para alinear las membranas en el software de análisis, y en rojo se destaca la posición de los controles positivos.

De los valores obtenidos, los primeros resultados a destacar son los referentes a los genes de estudio de esta tesis (destacados en calipso en la tabla 11). Para el caso de p16 (coordenadas A3g) los niveles de expresión no varían significativamente en las células expuestas a As (III), arrojando un valor de 1.026. En el caso de Rb1 (coordenadas B7f), se ve un aumento significativo en la cantidad de su mRNA por la presencia de As (III), presentando un valor de 1.298. Luego spot que señala la posición de DAPk1, ubicado en las coordenadas B3l, acusa la presencia de una gran cantidad de mRNA, presentando un valor de 2.287. Finalmente en el caso de MGMT (coordenada C2g), se aprecia un valor bajo de las cantidades de mRNA, presentando un valor de 0.668. Los resultados de estos cuatro genes presentan valores dentro de lo esperado, ya que en el caso de los genes asociados a regulación de ciclo celular (p16 y Rb1), estos están en el rango de estimación que permite inferir que sus niveles de expresión no son significativamente afectados por la presencia de arsénico, a pesar que Rb1 presente un valor considerado significativo, este se encuentra en el límite inferior de dicho rango, lo que permite asociar dicho valor a procesos normales de regulación de ciclo celular u otro mecanismo molecular en que participe Rb1 y que coincidiera con el momento de realizar la extracción del mRNA. Para el caso de DAPk1, las proyecciones y la información bibliográfica, también coinciden con el aumento de las cantidades de mRNA, justificándose, por el largo periodo de exposición al As (III) por parte de la célula, lo estaría generando un nivel de daño, que estaría gatillando la maquinaria de muerte celular programada, donde DAPk1 es un importante y polifuncional regulador, para el caso del modelo desarrollado en el estudio *in silico*, DAPk1, estaría inhibiendo a ERK, quien a su vez es inhibidor de procesos apoptóticos tipo I, pero también DAPk1, induce procesos apoptóticos tipo II, estimulando a Syntaxin-1A, proteína asociada a la autofagia celular. El caso de MGMT, presenta reportes bibliográficos [Jacinto, F. & Esteller, M. 2007] de una disminución tanto a nivel proteico como a nivel mRNA, y que en la actualidad está asociado inequívocamente a procesos de metilación del promotor asociado a MGMT, entendiendo que esta disminución se relaciona con el aumento de DAPk1, en el contexto de que las células al no poder reparar el daño causado por el

arsénico, disminuiría la formación de proteínas reparadoras dando inicio a la síntesis de las proteínas asociadas a procesos de muerte celular programada.

En un aspecto más global, los resultados del macroarreglo, están organizados (ordenados así en la membrana y no reacomodados), en cuadrantes, los que están identificados en letras mayúsculas (de la A a F, tabla 11), estos grupos asocia genes que se relacionan con procesos celulares definidos, así podemos ver que el cuadrante "A", presenta una tendencia general a la disminución de mRNA, en este cuadrante se presentan los genes que sintetizan proteínas involucradas en ciclo celular, principalmente ciclinas, cdks, inhibidores de cdks, etc. Para el caso del cuadrante "B", este asocia genes con procesos de muerte celular programada, para el cuadrante "C" se agrupan los genes que sintetizan proteínas involucradas con la mantención y reparación genómica, y receptores intracelulares (principalmente de núcleo). En el cuadrante "D" se encuentran genes que generan proteínas de adhesión celular y receptores de membrana, en el cuadrante "E" esta la información para genes asociados a señal celular y comunicación extracelular, y en el cuadrante "F" se organizan genes de citoesqueleto, efectores y moduladores. La tendencia de los cuadrantes A, D, E y F es el de disminuir las cantidades de mRNA siendo 40%; 64%; 50% y 56% respectivamente los valores significativamente bajos, siendo indicativo que los procesos de evolución normal de la célula están siendo minimizados y que simultáneamente los mRNA de las proteínas asociadas a muerte celular programada están a lo menos presentando un aumento significativo, ya que entre los valores no significativo y los que aumentaron en cualquier magnitud, conforman el 82% de los resultados del cuadrante (cuadrante B); en el caso del cuadrante C, se clasifica como un cuadrante en "equilibrio", ya que existe una proporcionalidad entre el número de valores que suben (aprox. 38%) y bajan (aprox. 40%), en este contexto es evidente que un número significativo de las células en cultivo están por ingresar a un proceso apoptosis, fenómeno que explica el aumento de la tasa de mortalidad de las células expuesta a As (III), que se evidencio en los resultados de crecimiento y viabilidad (punto 7.1).

## 6.2.2 Microarreglos

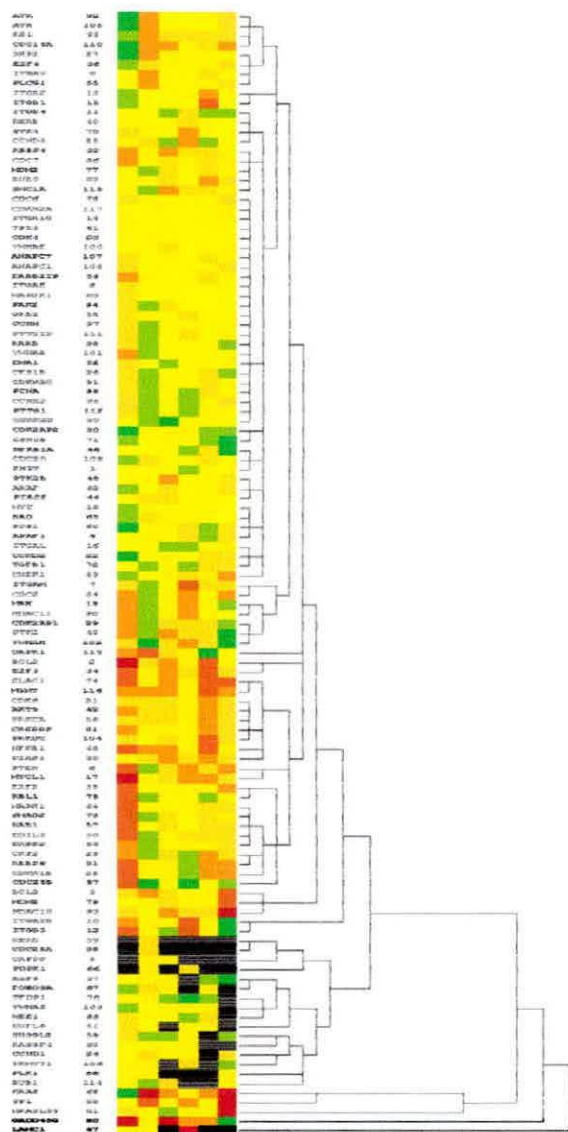


FIGURA 21. Muestra representación de un segmento del microarreglo con relación al modelo *in silico* realizado y ciclo celular, indicando la organización *cluster*, con un dendrograma.

Dos grupos de personas, uno proveniente de trabajadores laboralmente expuestos a humos de fundición y el otro grupo control. Este último grupo fue considerado para estimar los valores referenciales (normales) de expresión, para cada uno de los genes estudiados. A los grupos de trabajo se le tomaron muestras de sangre. A partir de estas, se purificaron linfocitos los que posteriormente fueron almacenados en nitrógeno líquido. A la población control (de la Región de Valparaíso) se le extrajo sangre y se purificaron linfocitos, luego se procedió a extraer ARN total de ambas poblaciones. Ambas preparaciones de ARN total fueron analizadas mediante microarreglos de cADN para establecer las variaciones que induce el As sobre el patrón de expresión de genes en trabajadores laboralmente expuestos.

Los *GeneChip* de microarreglos "*cDNA microarrays human 10K*" de la empresa *Affymetrix*® utilizados, son de 10000 genes, de los cuales se analizó sólo aquellos genes que claramente presenten un connotación fisiológica en el contexto

de nuestro análisis, ya que muchos de los genes que evidentemente variaron sus niveles de expresión (en todo el microarreglo) no han sido aún relacionados con una función directa. Dado el costo de este análisis se seleccionaron los siguientes genes que se encuentran asociados o relacionados con el modelo generado en el estudio *in silico*, realizado al inicio de este estudio (tabla 12).

Tabla 12. Lista de genes seleccionados del Microarreglo y analizados por agrupamiento jerárquico.

ATR 1	YWHAE	PTTGIP	<b>DAPk1</b>	PDPK1
ATR 2	ANAPC7	RARB	BCL2	E2F8
<b>Rb1</b>	ANAPC1	YWHAB	E2F3	FOXO3A
CDC14A	ERBB2IP	EMR1	ELAC1	TFDP1
SKP2	ITGAE	CKS1B	<b>MGMT</b>	YWHAZ
E2F4	MAP2K1	CDKN2C	CDK6	WEE1
ITGAV	PAK2	PCNA	AKT3	EGFL6
PLCG1	GRB2	CCNA2	PRKCA	SH3GL2
ITGB2	CCNH	PTTG1	CREBBP	RASSF4
ITGB1	TGFB1	CDKN2D	PRKDC	CCND1
ITGB4	CHEK1	CDK2AP2	NFKB1	PKMYT1
RXRB	ITGAM	GSK3B	PIAS1	PLK1
STK4	CDC2	NFKBIA	PTEN	BUB1
CCND3	MAX	CDC20	MYCL1	KRAS
RBBP4	HDAC11	FHIT	E2F2	SP1
CDC7	CDK2AP1	PTK2B	RBL1	HRASLS3
MDM2	PTK2	ARAF	MAPK1	GADD45G
BUB3	YWHAH	PIAS2	SMAD2	LAMC1
SMC1A	CDC25B	MYC	GAB1	RXRG
CDC6	BCL2	BAD	EDIL3	CDC25A
<b>CDKN2A</b>	MCM2	SOS1	ERBB2	CASP9
ITGA10	HDAC10	APAF1	CKS2	
TP53	ITGA2B	ITGAL	RBBP6	
CDK4	ITGB5	CCND2	CDKN1B	

Referente a los genes de interés la información arrojada por los microarreglos, es la siguiente:

	P1	P2	P3	P4	P5	P6
RB	0.5533	1.4085	1.3026	1.2238	1.2509	1.2590
p16	0.9761	0.809	0.782	0.7888	0.8164	0.9099
DAPk1	1.4441	1.7611	1.2381	0.8077	0.5091	0.9899
MGMT	1.7128	1.5344	1.5321	0.7923	1.7917	1.5195

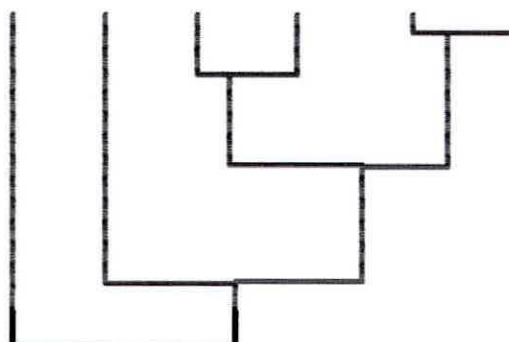


Figura 22. Muestra los valores medición de los genes de interés de cada paciente seleccionado y confrontado contra el pool del grupo control. Además se indica dendograma de la distribución jerárquica de los pacientes entre ellos, cabe recordar que esta jerarquización se hizo con todos los genes del microarreglo.

De la misma manera que con los valores de macroarreglos, los resultados que se presentan en los microarreglos son la razón (división) existente entre la muestra de las personas expuestas y el pool de personas control (esto significa que una vez seleccionados los mARN con la calidad necesaria para el ensayo, de las personas control, se genera una mezcla única que se utiliza con cada persona expuesta), he identificando los bajo niveles de mARN con valores menores que 1 y el aumento de las cantidades de mARN, con valores superiores a 1, de igual manera, pero esta vez de manera estandarizada por procesos estadísticos, se definen rangos de niveles de mARN, que se destacan con colores. Muy bajo nivel se define al resultado inferior a 0.51000 (verde vivo); un bajo nivel de mARN se define en el rango de 0.5001 a 0.7000 (verde); un nivel de variación no significativo presenta un rango de 0.7001 a 1.0999 (amarillo), un valor moderadamente alto esta entre 1.1000 y 1.1999 (amarillo oro), los valores entre 1.2000 y 1.6900 (anaranjado claro) se consideran como un alto nivel de mARN; un nivel alto de mARN se

clasifica al valor entre 1.6901 y 1.9999 (anaranjado) se asume un muy alto nivel de mARN y cualquier valor sobre 2.000 (rojo) se considera una gran cantidad de mARN.

Para el caso de p16<sup>INK4</sup>, independiente de la persona expuesta, este presenta un nivel de mARN normal (o de variación no significativa), lo que es indicativo de que los mecanismos de regulación (epigenética y proteica) de la expresión de los mARN son normales, aunque debe ser considerado que en los seis casos, los valores numéricos presentan una tendencia a la disminución del mARN, de manera que se puede especular con la posibilidad de que p16 este bajo sus niveles de mARN, como consecuencia de la exposición a As, pero se insiste en la idea que solo es una especulación, pero esta hipótesis se ve reforzada al ver el análisis de otra proteínas de la familia de p16<sup>INK4/CDKN2A</sup> (p15<sup>INK4/MTS2</sup> y p14<sup>ARF</sup>) en el microarreglo (datos numéricos no mostrados), estas presentan una más clara evidencia de la disminución de los niveles de mARN.

Para el caso MGMT, con solo la excepción del paciente n° 4 que presenta un valor sin variación significativa, los demás presentan elevados los niveles de mARN, lo que es una muy clara señal de un daño a ADN y del funcionamiento de maquinarias de reparación del mismo. Otras metiltransferasas como PRMT2, COQ 3 *homolog*, DNMT1 y 3, As3MT, presentan también elevados niveles de mARN. Esto lleva a concluir que a los niveles de metilación están siendo afectados, lo que hace necesario presentar altos niveles de metiltransferasas, y esto puede ser atribuido a la exposición crónica a As, el cual se relaciona directamente con variaciones de metilaciones normales.

Los niveles de mARN de Rb1, en términos generales presentan una marcada alza de los niveles de mARN, con excepción del paciente n° 1, que presenta el efecto opuesto. En el contexto general el alza de estos niveles se puede asociar a la necesidad de detener procesos de síntesis de ADN, durante el proceso

de reparación que esta (o estaría) ejerciendo MGMT o alguna proteína reparadora de ADN. Para el caso del paciente nº 1, el bajo nivel de Rb1, junto con el alto valor de MGMT, permite especular en la posibilidad que este en un estadio más avanzado de daño al ADN, lo que estaría asociado, quizás, a una mayor posibilidad de iniciar transformación celular.

En el caso de DAPk1, presenta la mayor variabilidad de resultados entre los pacientes, segmentando el análisis de los resultados en la siguiente forma, para el caso de los pacientes 1; 2 y 3, se presentan elevados valores de mARN, lo que permite pensar en la posibilidad de estar en presencia de una regulación negativa de la muerte celular programada tipo I, ya que DAPk1, estaría inhibiendo a ERK, quien regula de manera negativa la apoptosis. En el caso de los paciente 4 y 6, estos presentan resultados que no son significativamente alterados, aunque presentan una tendencia a la baja. En el caso del paciente nº 5, este presenta un valor muy bajo en los niveles de mARN, que en conjunto con los altos niveles de MGMT y Rb1, permiten especular que el daño al ADN esta superando a los procesos de reparación, que es necesario comenzar a activar los procesos de muerte celular programada tipo I (regulada por DAPk1).

En el contexto de el grupo de genes seleccionados del microarreglo, se realiza una jerarquización de los niveles mARN, y se hace evidente el “agrupamiento” de genes que presentan características muy semejantes de funcionalidad, en donde la genes asociados a receptores (Ej. EGFR; ERBB2), intermediarios de señalización (Ej. MAPk1, ERK), proteínas nucleares (Ej. E2Fs, Rb1), presentan, en términos generales, valores que están considerados “normales” (es decir, sin variación significativa) y genes asociados a procesos de regulación directa, y por lo tanto sensibles a las variaciones toxico-fisiológicas que se presentan (exposición a As), muestran los valores más disímiles que no se aglomeran en ningún grupo de genes de relación directa (*cluster próximo*) sino más bien se encuentran solo o formando parejas, esto se evidencia al analizar si la

distribución de la variable coincide con la distribución esperada, observándose el alejamiento en los datos de valor extremo con respecto al valor esperado (figura 23).

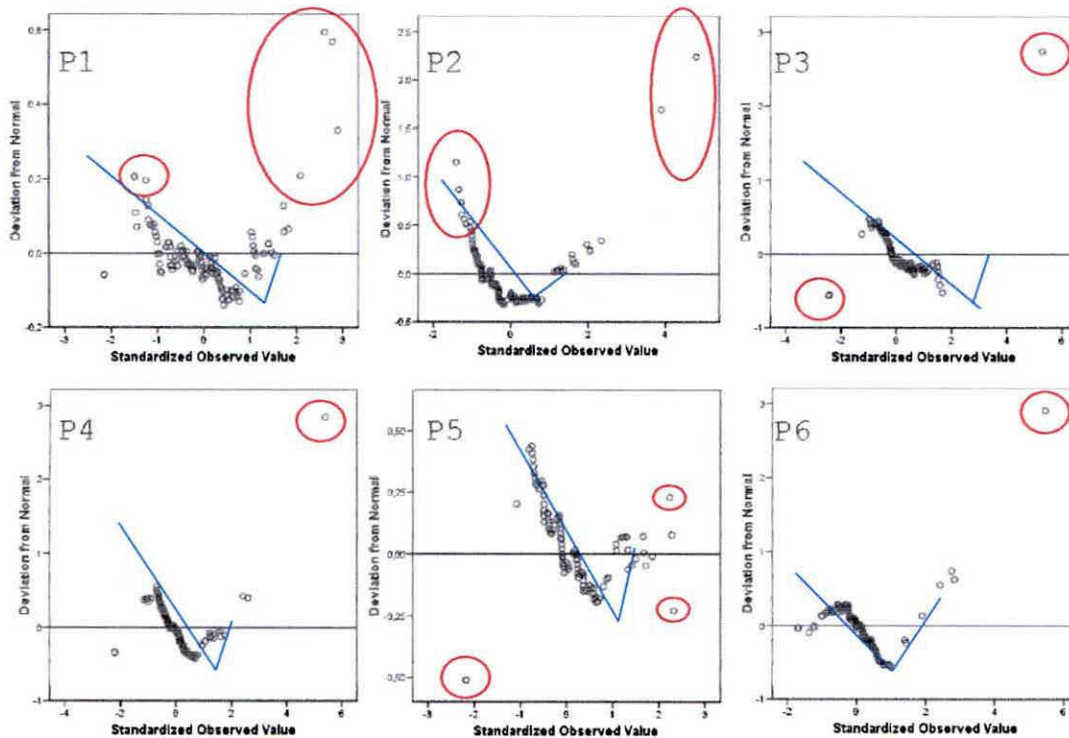


Figura 23. Se presentan en gráficos de probabilidad Q-Q “sin tendencia”, muestra el alejamiento de normal estimada (0 en eje y) de los valores extremos (en la mayoría de los casos) en círculos rojos, de los valores entregados en el microarreglo. Esta información permite corroborar estadísticamente lo que se encuentra en la jerarquización de los resultados, es decir, los genes de baja capacidad de agrupamiento son los que presentan valores de los niveles de mRNA muy altos o muy bajos, alejándose de la expectativa, la tendencia de los datos en azul.

Los gráficos de probabilidad Q-Q “sin tendencia”, permiten apreciar que independiente de la magnitud de los valores de cada paciente, estos presentan una misma tendencia, mediciones que se alejan tanto de la normalización, como de la tendencia de los datos, los datos que están por sobre 0 (cero, como valor estandarizado observado eje X), son los valores que se asocian al aumento de los niveles de mRNA, mientras que los valores que están por muy debajo este valor 0, son los que presentan bajos niveles de mRNA, es decir, tanto los valores que salen

por muy sobre la norma como por muy bajo la norma, son los que están afectados por As(III).

### 6.3 Metilaciones

En el caso de las metilaciones, estas presentaron resultados complejos, ya que no respondieron a un proceso secuencial (o un “cinética” de metilación) como se esperaba, pero esta información hoy en día se condice con la literatura asociada al tema [Esteller, M. *et.al.* 2001; Esteller, M. 2005; Laird, P. W. 2005], en donde se ha reportado que las metilaciones son evento prácticamente exclusivos en el desarrollo de diferentes tipos de canceres y que a medida que se trata de ubicar la metilación de más de un promotor (o más de un gen), las posibilidades son muy bajas.

Se utilizó como control de los ensayos de PCR, a  $\beta$ -actina (con un amplicón de 97 bp), como se indica en la figura 24.

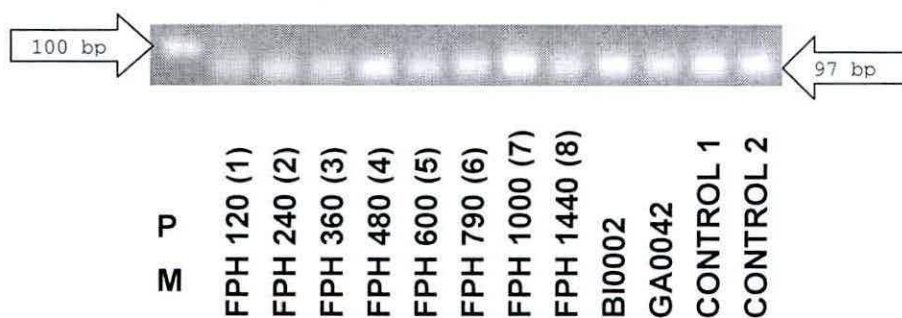


Figura 24. Control de  $\beta$ -Actina para PCR de metilaciones, Gel de agarosa al 1%.

En el caso de los genes de interés, se aprecia que DAPk1 presenta la mejor calidad de amplificación y por lo tanto de señal en las bandas de mutilación (figura 25).

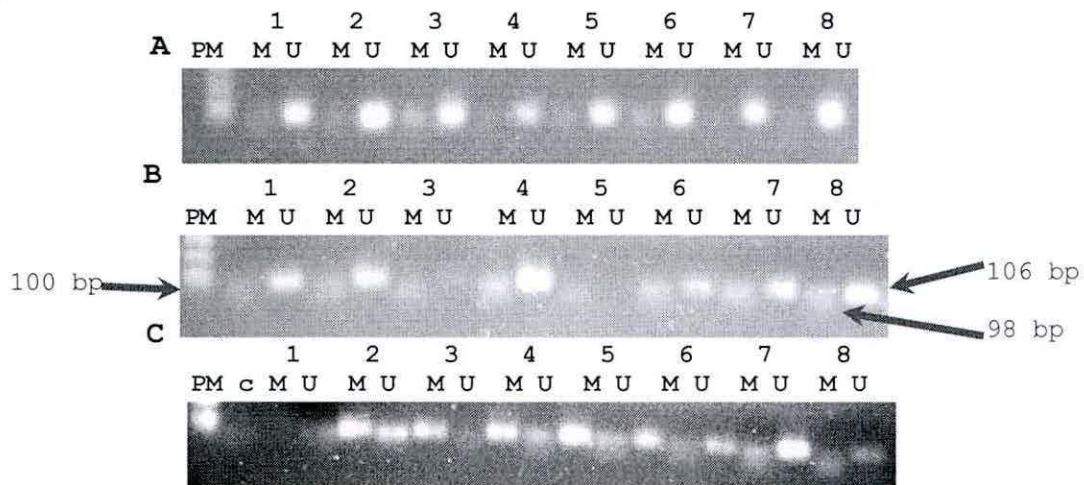


Figura 25. Se presentan geles de agarosa (1%), donde se presentan las señales de metilación de DAPk1, expuesto a diferentes concentraciones de As (III); A FPH sin As; B FPH 0.01 p.p.m. y C 0.05 p.p.m. y en el caso del gel C además va incorporado un control negativo (c).

Las variaciones de metilación de DAPk1, de FPH expuestos a diferentes concentraciones de As(III), donde se hace evidente las variaciones de metilaciones, pero de manera irregular, tanto a medida que transcurre el tiempo en una misma muestra, como cuando se varía la concentración de As (III),

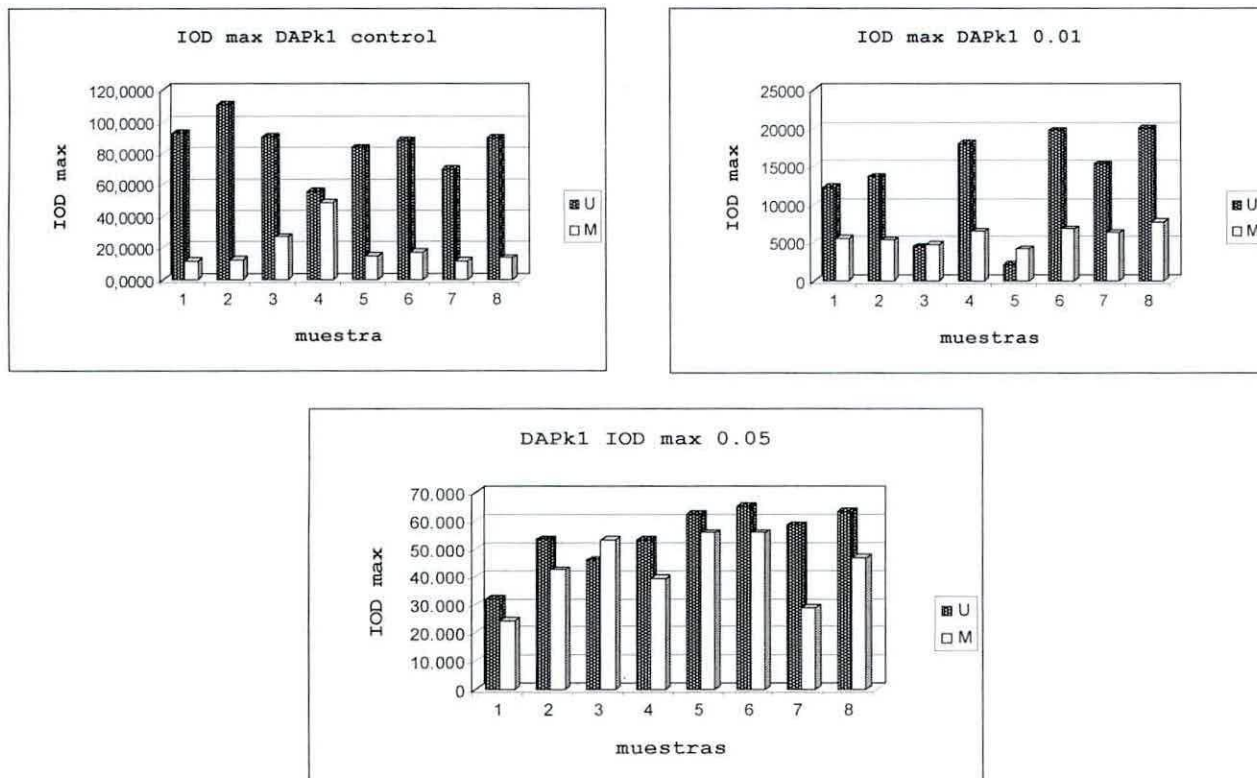


Figura 26. Se muestra a través de gráfico de barras los valores de intensidad óptica máxima, de los gels de análisis de metilación de DAPk1 a diversas concentraciones de As (III).

El análisis de la IOD (*Intensity Optic Density*) máxima, de los gels de DAPk1, muestra que existe un aumento entre las muestra en la intensidad de las bandas correspondiente a la metilación, pero no se aprecia una clara disminución de la bandas correspondientes a la no metiladas (o desmetiladas) si se compara muestra a muestra en función de la concentración de As (III), referente a la correlación temporal en función de una misma concentración, no es claro que exista un influencia significativa del tiempo de exposición a las diferentes concentraciones de As, con lo que respecta a los niveles de metilación.

Los resultados asociados a p16, son menos claros en sus datos, esto porque la intensidad de la banda hace que cueste más el análisis densitométrico (figura

28), pero que al igual que DAPk1, se puede definir metilaciones del promotor de p16<sup>INK4A</sup>.

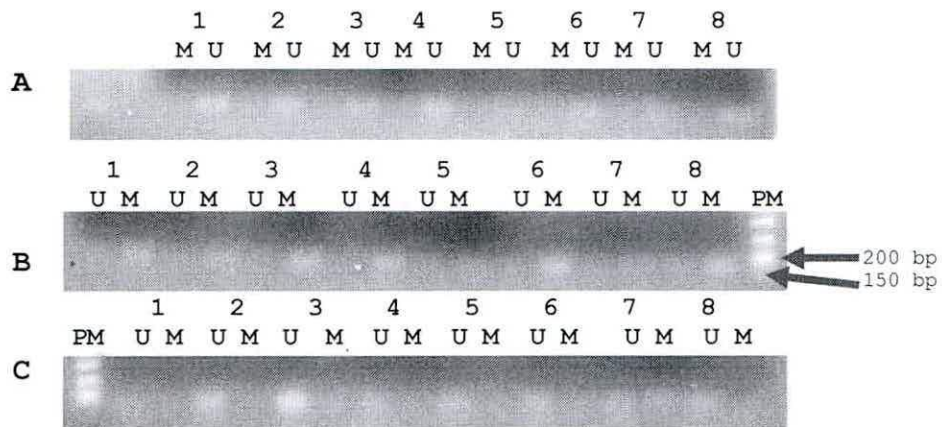


Figura 27. Se presentan gels de agarosa (1%), donde se muestran las señales que acusan la metilación de p16, expuesto a diferentes concentraciones de As (III); A FPH sin As; B FPH 0.01 p.p.m. y C 0.05 p.p.m. y en el caso del gel C además va incorporado un control negativo (c).

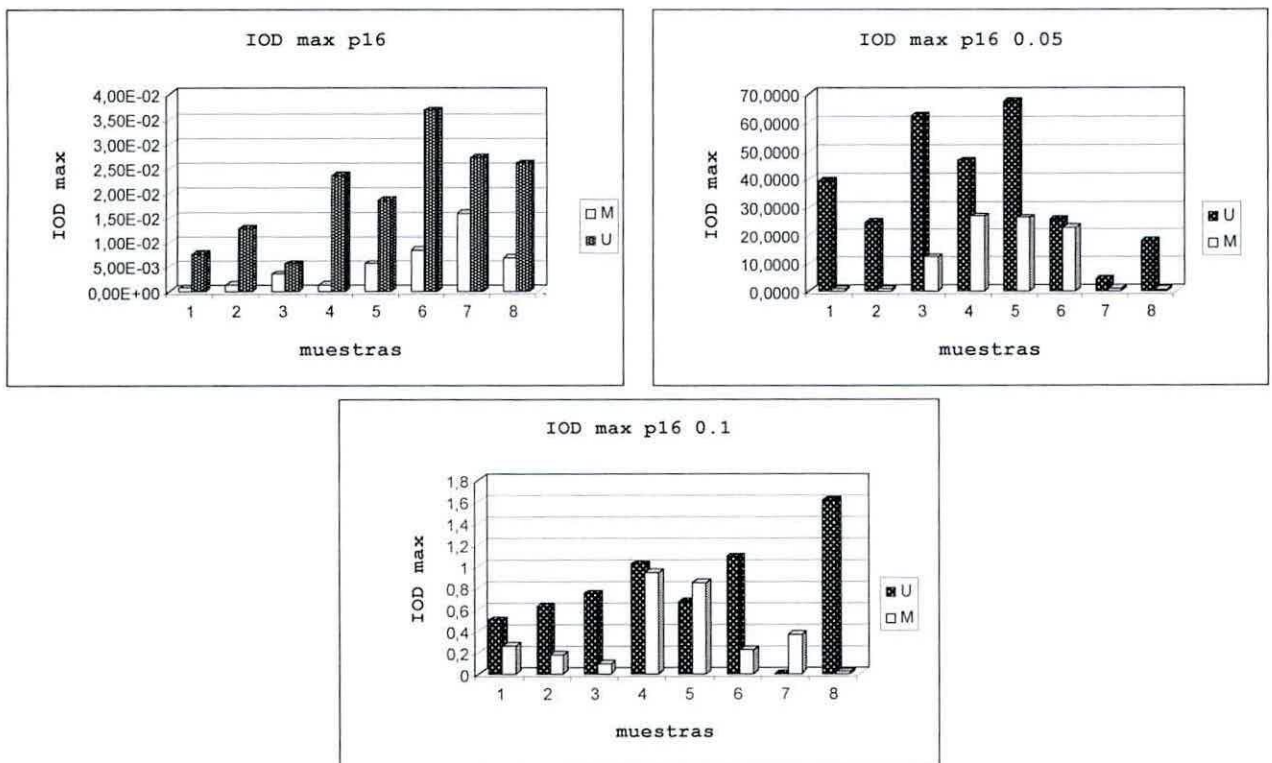


Figura 28. Se muestra a través de gráfico de barras los valores de intensidad óptica máxima, de los gels de análisis de metilación de p16 a diversas concentraciones de As (III).

Para el caso de Rb1, calidad de la banda es un poco mejor, pero al igual que los casos anteriores, no se presenta un patrón de metilación que sea dependiente de la concentración de As (III) o del tiempo, solamente se puede definir si hay o no metilación, lo que se evidencia en el análisis densitométrico, y la gráfica de dichos análisis, donde no se puede apreciar ningún tipo de tendencia definida, ya sea en los resultados de bandas no metiladas o de las bandas metiladas (figura 30) y solo queda resaltar que a pesar de la irregularidad no existe un aumento sostenido de la metilación.

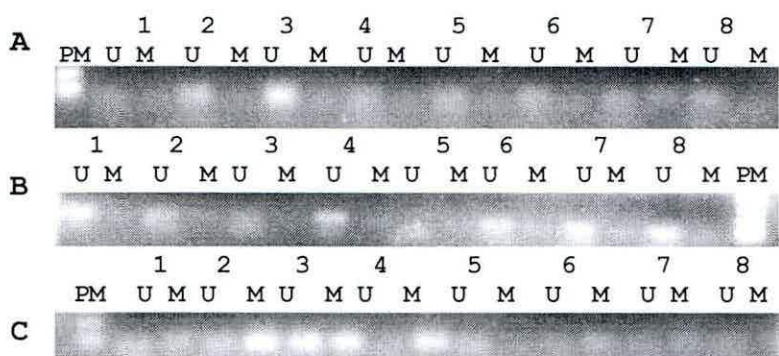


Figura 29. Se presentan geles de agarosa (1%), donde se muestran las señales que acusan la metilación de Rb1, expuesto a diferentes concentraciones de As (III); A FPH sin As; B FPH 0.01 p.p.m. y C 0.05 p.p.m. y en el caso del gel C además va incorporado un control negativo (c).

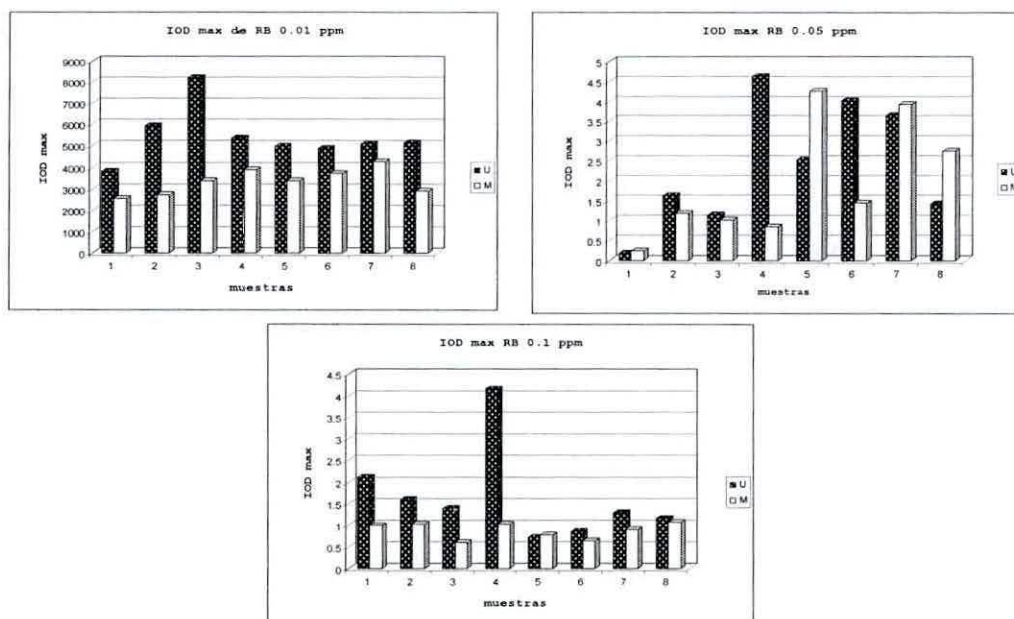


Figura 30. Se muestra a través de gráfico de barras los valores de intensidad óptica máxima, de los geles de análisis de metilación de Rb1 a diversas concentraciones de As (III).

En el análisis de MGMT, se presentó la dificultad de la mala calidad de la digitalización de la imagen, además de baja capacidad de amplificación del PCR, tal vez por la baja cantidad de producto de RT (10 ng), pero se puede apreciar un leve aumento de las bandas que acusan la presencia de fenómenos de metilación, resultados que se hacen más evidentes por el análisis densitométrico, que es capaz de determinar las sutiles variaciones de intensidad de los píxeles, bandas que si son apreciables de forma directa en transiluminador UV, con el filtro adecuado.

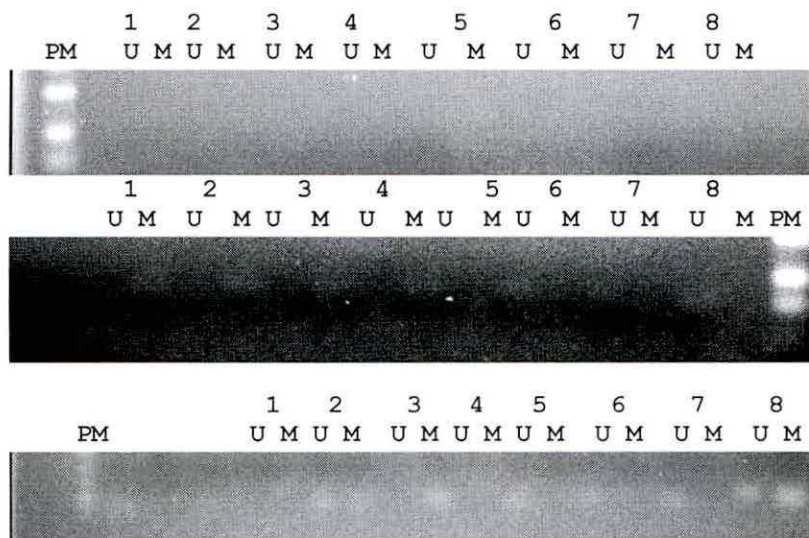


Figura 31. Se presentan geles de agarosa (1%), donde se muestran las señales que acusan la metilación de MGMT, expuesto a diferentes concentraciones de As (III); A FPH sin As; B FPH 0.01 p.p.m. y C 0.05 p.p.m.

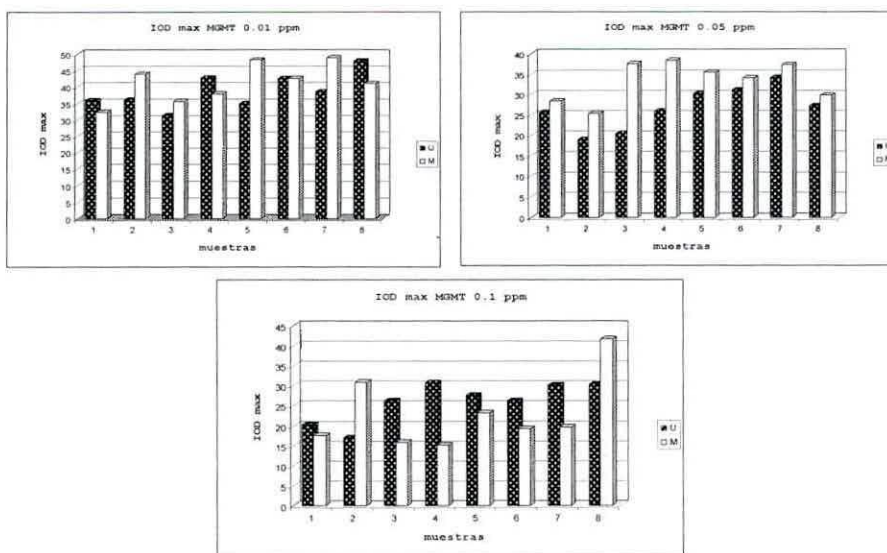


Figura 32. Se muestra a través de gráfico de barras los valores de intensidad óptica máxima, de los geles de análisis de metilación de MGMT a diversas concentraciones de As (III).

En el caso MGMT, este es el único de los genes estudiados en metilación, que presenta una superioridad densitométrica en las bandas asociadas a metilación, con respecto a las no metiladas. Apreciándose claramente en la exposición a 0.05 p.p.m. de As (III). Esta condición puede ser asociada a que quizás a estas concentraciones de As, se esté afectando la calidad del ADN, lo que permite tener expuesta la región del ADN donde se presenta el promotor de MGMT para iniciar procesos de transcripción y poder así mARN de MGMT, y consecuentemente la proteína para poder reparar el ADN afectado. Evento que no estaría ocurriendo con los otros genes en estudio lo que hace irregular los procesos de metilación, ya sea por las diferentes concentraciones de arsénico, como por el tiempo de exposición.

Ahora bien, independiente de calidad de la metilación, esta ocurre en los cuatro genes y si se revisa el control de FPH no expuestos no presentan banda que evidencie una metilación (en ninguno de los casos, figura 33). El resultado de mejor calidad es DAPk1, y si este se compara con la condición que presenta las células control de cáncer broncopulmonar, se aprecia presenta la misma tendencia que las células del tipo NSCLC (GA0042) y la SCLC (BI0002) (figura 33). Para el caso de p16, que también acusó la existencia de metilación por presencia de As, presenta el formato solo de las células del tipo NSCLC, caso similar presenta MGMT, es decir, p16 y MGMT, en presencia de As, no estarían respondiendo al modelo de células cancerosas tipo SCLC. Finalmente el caso de Rb1, es un poco dificultoso de comparar con el control, ya que los niveles de metilación de las células control no es muy buena, esto de todas formas coincide con lo reportado en la literatura sobre metilación, retinoblastoma y cáncer broncopulmonar, esto es que la metilación es baja tanto en calidad como en cantidad (número de casos estudiados) [Esteller, M. *et. al.* 2001], pero esta información es clara en lo referente a pacientes, y no hay una referencia clara de Rb1 en modelos celulares, por lo tanto se generó un registro claro el As, si genera una metilación en Rb1, pero que esta se puede deber al tipo de homeostasis que se genera en modelos celulares y que a pesar de la

calidad de los controles, se esta respondiendo al modelo de las células tipo NSCLC.



Figura 33. Se presentan los controles de metilación de los cuatro genes en estudio, donde C, es el control de no exposición a As (III) a las 600 horas, mientras que B10002 es el control de células cancerosas del tipo SCLC y GA0042 es el control de células cancerosas del tipo NSCLC.

#### 6.4 PCR en tiempo real (qPCR)

Los resultados del qPCR, se generan en el software del equipo LygthCycler 2.0, en donde lo imprescindible es la generación de la curva de calibrado ya sea con un patrón interno, es decir, la misma muestra generada en cantidades conocidas a través de la amplificación de por plásmidos, o como se utilizo en esta tesis, a través de un patrón externo, para este caso GADPH, aconsejado cuando la cuantificación se realiza por métodos espectrofotométricos (anexo III). Para el caso de esta curva, se realizó tres veces y cada punto de la curva a medir a su vez esta por triplicado; con un total de cinco diluciones, conformando así la curva almacenada para la cuantificación de las muestras, las muestras por su parte fueron realizadas 2 veces y medidas una vez cada una. Inicialmente se cuantificó la cantidad de 100 ng producto de la reacción de RT, en un volumen de 50  $\mu$ L, de la cual se tomo una alícuota de 2  $\mu$ L, diluyéndolo a un volumen final de 20  $\mu$ L, y de la misma forma se generó una dilución seriada, con la que se realizó la curva patrón

de GADPH. Para el caso de las muestras también comienzan de 100 ng del producto RT, con su correspondiente partidior reverso (tabla 5).

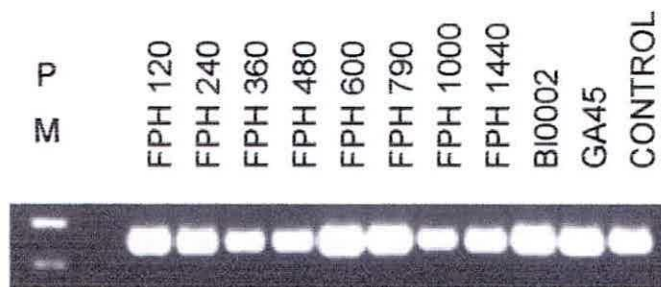


Figura 34. A) Control de GADPH para qPCR, Gel de agarosa al 1%. B) muestras de purificación de mARN de las distintas muestras en gel de agarosa al 1.2%

En la figura 35, se muestran los reportes del software de LigthCycler 2.0, de la curva patrón, en donde se aprecian el reporte de obtención de datos, como la curva control *per sé*, en donde los datos de la curva son: coeficiente de regresión (r), -0.98; el valor de intercepto (en eje Y, *Cycle Number*), es 20.08 y la pendiente es de -2.468 [nº de ciclos/ (log µg/µL)].

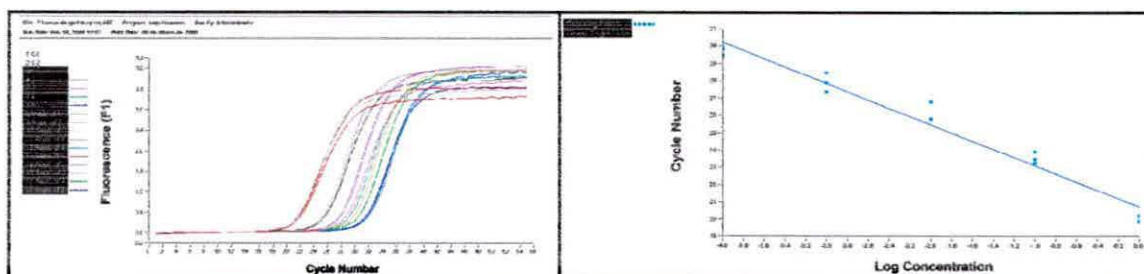


Figura 35. Se presenta el reporte del software de LightCycler 2.0, relacionado con la obtención de los datos de la curva patrón de GADPH, a la izquierda la curva de medición de fluorescencia de las muestras y a la derecha la regresión lineal generada con los datos.

En la figura 36, se presenta la secuencia de eventos en la obtención y procesamiento de los resultados de qPCR, primero se obtiene intensidad de fluorescencia de la sonda asociada al amplicón de los genes en estudio, e identificando las muestras en función de su tiempo de crecimiento y/o exposición, así como a las cantidades de As (III) a la que se expusieron. Una vez obtenida la medición de fluorescencia, se ajustan y extrapolan con la curva de calibrado de

patrón externo realizada para la cuantificación de la cantidad de cADN, generado en el qPCR, para esto siempre es necesario cada vez que se ejecuta una medición incorporar un muestra con un punto de la curva patrón (con el cual es software de LigthCycler 2.0 corrige los valores). En el tercer paso los valores ajustados de las muestras en estudio, se tabulan entregando el resultado de cantidad (en ng/ $\mu$ L) de cADN producido en cada ciclo del qPCR. Finalmente se define un ciclo y se seleccionan las cantidades calculadas de producto PCR. Estos resultados tabulados (tabla 13), se grafican para analizar la evolución de las muestras.

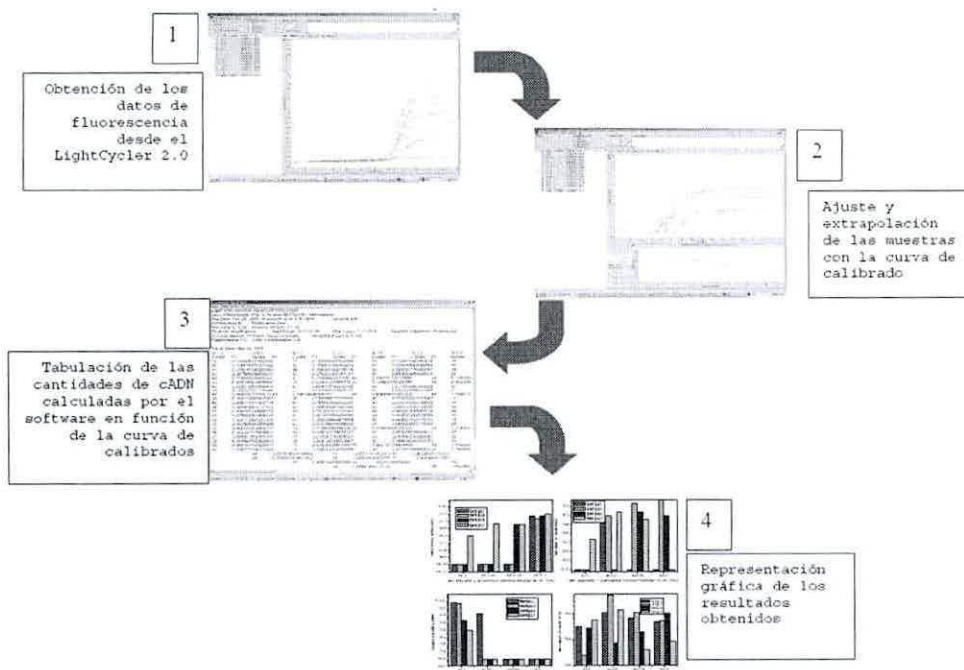


Figura 36. Se muestra los pasos a seguir en el análisis de las muestras para obtener los resultados en forma gráfica.

Una vez graficados los resultados de los qPCR (figura 37), se hace posible apreciar, las diferencias en los resultados tanto en función del tiempo, como en función de la concentración de As (III), pudiendo ser clara la influencia del As. Para el caso de DAPK1, lo primero a destacar, es la influencia en los niveles de expresión del gen, ya que a tiempo 7 (equivalente a 1000 horas de exposición), la

muestra control se presenta más de 1000 veces más que los otros tiempos controles, fenómeno que también se repite en los FPH expuesto a 0.01 p.p.m. de As (III), pero que en el caso de las 1000 horas, el nivel de muestra cuantificado es 10000 veces más, diferencia que puede ser atribuible al As. En el caso de la exposición a 0.05 p.p.m. de AS, no solo se ve incrementado el nivel de muestra a las mil horas, sino que también el de tiempo 5 (correspondiente a 600 horas de exposición) y que en ambos casos son superiores a las 10000 veces los tiempo 1 y 3. Finalmente en la exposición a 0.1 p.p.m. de As, los niveles de DAPk1, se presentan totalmente elevados, haciendo indistinto los tiempos de exposición, pero que si se compara a nivel los mismo tiempos es evidente que el As comienza a ejercer influencia desde de el tiempo 1 (o 120 horas) en comparación a las otras concentraciones de As y es control. Esto queda mucho mejor reflejado en el gráfico 3D de DAPk1, en donde se puede apreciar el efecto del As y el tiempo simultáneamente, pudiendo definir el claro efecto del As, y las tendencia que toman los niveles de exposición, en función de ambas variables fijas.

Para el caso de MGMT, el gráfico de los datos, muestra un comportamiento un poco más complejo, ya que los niveles de expresión se ven aumentados en tiempos intermedios de exposición más que en algún extremo, esto puede ser razonablemente explicado porque a cortos tiempos de exposición al As, recién se estaría comenzando a censar el daño al ADN, por parte de las maquinarias moleculares adecuadas, mientras que a muy largos periodos de exposición pudiese ser que los sensores del daño al ADN, reporte un daño irreversible y que por lo tanto ahora se estén gatillando procesos de muerte celular programada. Esto que mucho mejor plasmado al revisar el gráfico 3D de MGMT, en el cual se aprecia un aumento al inicio de los tiempos de exposición y una disminución en los mayores tiempos de estar expuesta a As, pasando por un *pick* en los tiempos intermedios, el mayor efecto también se ve influenciado por la mayor concentración de As. La idea de la relación entre la disminución de los procesos de reparación (MGMT) y el aumento de procesos de apoptosis, toma fuerza al revisar los resultados de DAPk1 (regulador apoptótico), ya que a mayor nivel de DAPk1, y siguiendo un proceso

lógico se estarían inhibiendo a ERK, quien es inhibidor directo de la muerte celular programada tipo I.

En el caso de retinoblastoma (Rb1), no existe una tendencia definida o clara que pueda ser atribuida a la presencia de As, en sus diversas concentraciones, o al paso del tiempo, y el análisis en los gráficos 3D de cantidad cADN v/s tiempo v/s concentración de As, no indican una tendencia clara, más bien se ve una distribución pareja de los resultados, aunque a simple vista parezca lo contrario, ya que estos resultados son los menos diferentes entre sí y por lo tanto hay una desproporción en comparación a los otros gráficos, tanto de barra como en 3D (los valores presentan una diferencia menor a las 100 veces).

Finalmente el caso de p16<sup>INK4a</sup>, este presenta una clara tendencia, tanto en relación al tiempo como a la concentración de As a la que se expusieron las células. En este caso la influencia del As y el tiempo es a disminuir los niveles de p16, que se aprecia claramente en las gráficas de barra como en la gráfica 3D, es leve y es gradual para el caso del análisis del tiempo, visto en la muestra control sin arsénico donde la diferencia se aprecia claramente a tiempos de 600 y 1000 horas. Mientras que la presencia de As, hace que la disminución sea drástica. La disminución de p16 en presencia de As (cualquiera de sus concentraciones) se asocia a la posibilidad que el As, este afectando los procesos de muerte celular, generando así el inicio de procesos de transformación celular, aunque esto debe ser corroborado con otros tipos de marcadores moleculares, como antígenos de proliferación celular nuclear, p120, Ki-67/MIB, AgNOR, Fas/FasL, EGF, algunas ciclinas, etc. [Chimenes-Küstner. E. *et.al.* 2004].

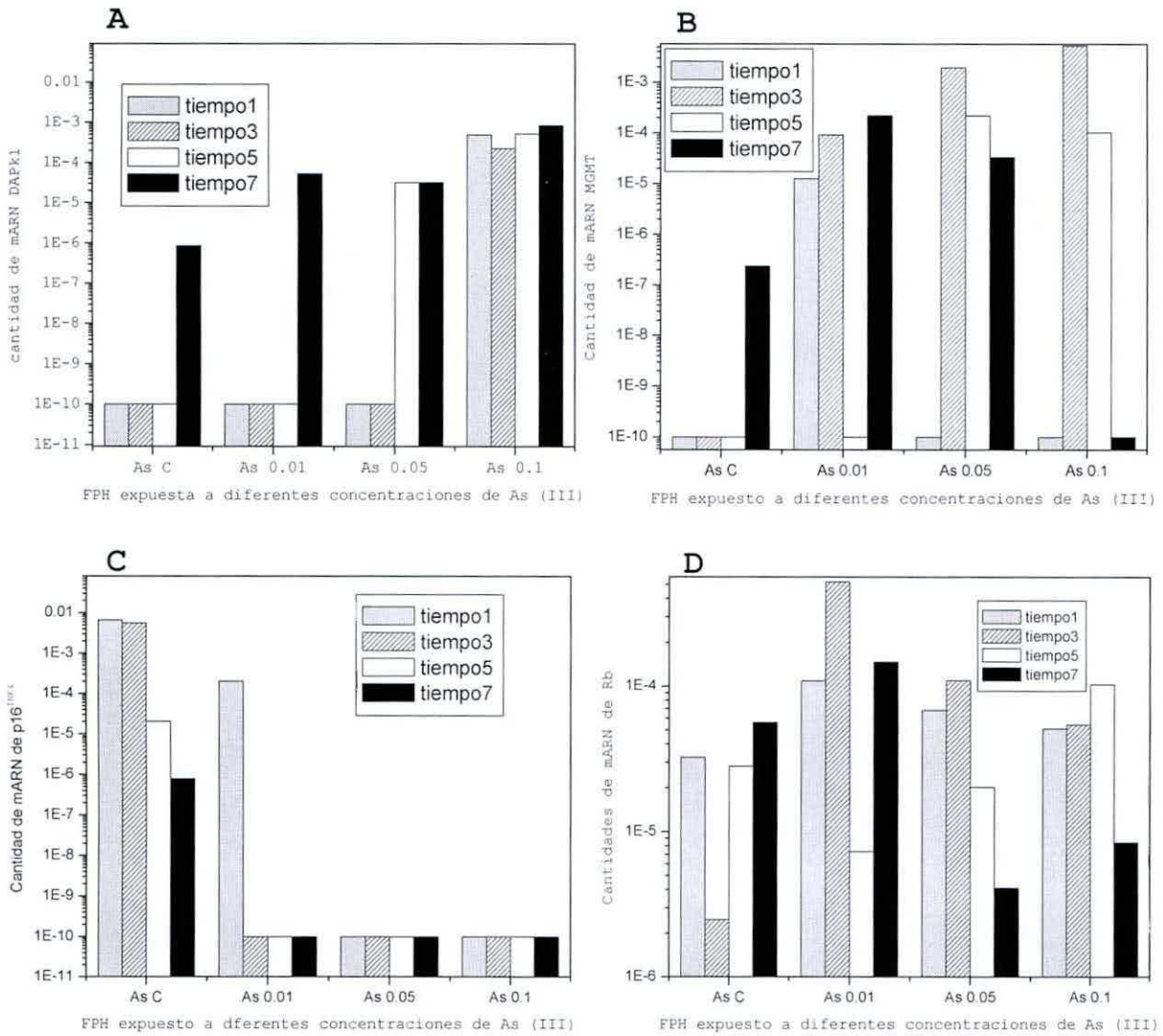
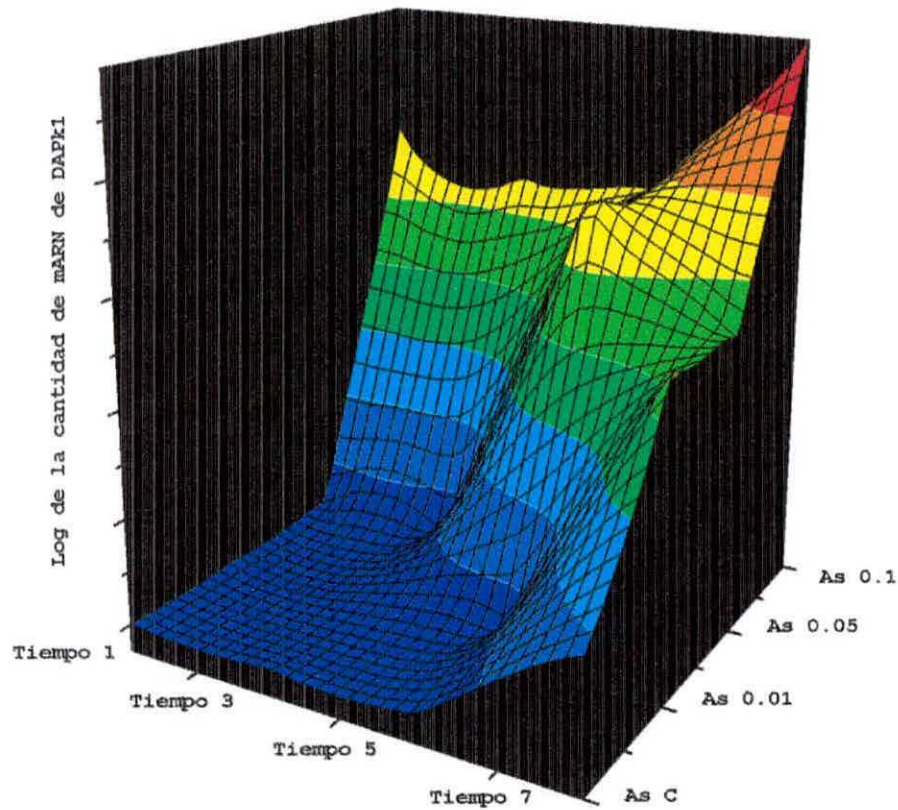


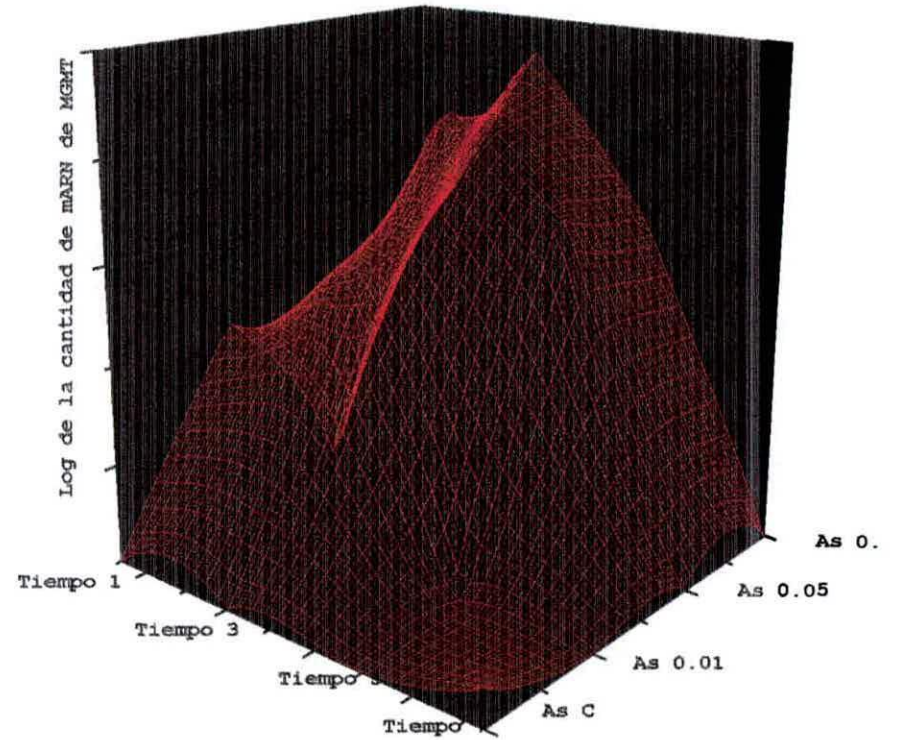
Figura 37. Se presenta gráficos de barra de los resultados procesados por el software de LigthCycler 2.0, para cada uno de los genes en estudio. A) DAPk1; B) MGMT; C) p16 y D) Rb1. El nivel de certeza de todos por resultados es de 97.5 ( $p > 0.25$ ).

Tabla 13. Resultados de qPCR de diferentes muestras de productos RT a una concentración inicial de 2 ng/ $\mu$ L. para los valores como  $<10^{-10}$ , se indica que el la sensibilidad del equipo no los puede cuantificar, pero tampoco se asumen como que no existiera amplificación.

Tiempo de exposición horas	Concentración de As (III) p.p.m.	P16 ng/ $\mu$ L	Rb1 ng/ $\mu$ L	MGMT ng/ $\mu$ L	DAPk1 ng/ $\mu$ L
120/tiempo 1	0	$<10^{-10}$	$3.235 \cdot 10^{-5}$	$1.247 \cdot 10^{-5}$	$<10^{-10}$
360/tiempo 3	0	$7.693 \cdot 10^{-7}$	$2.482 \cdot 10^{-6}$	$<10^{-10}$	$5.191 \cdot 10^{-4}$
600/tiempo 5	0	$<10^{-10}$	$2.813 \cdot 10^{-5}$	$1.034 \cdot 10^{-4}$	$<10^{-10}$
1000/tiempo 7	0	$5.577 \cdot 10^{-3}$	$5.629 \cdot 10^{-5}$	$1.538 \cdot 10^{-5}$	$<10^{-10}$
120/tiempo 1	0.01	$<10^{-10}$	$1.093 \cdot 10^{-4}$	$5.279 \cdot 10^{-3}$	$8.562 \cdot 10^{-7}$
360/tiempo 3	0.01	$6.583 \cdot 10^{-3}$	$5.215 \cdot 10^{-4}$	$9.281 \cdot 10^{-5}$	$5.22 \cdot 10^{-5}$
600/tiempo 5	0.01	$<10^{-10}$	$7.305 \cdot 10^{-6}$	$1.964 \cdot 10^{-3}$	$4.891 \cdot 10^{-4}$
1000/tiempo 7	0.01	$2.025 \cdot 10^{-4}$	$1.469 \cdot 10^{-4}$	$<10^{-10}$	$8.442 \cdot 10^{-3}$
120/tiempo 1	0.05	$<10^{-10}$	$6.818 \cdot 10^{-5}$	$2.206 \cdot 10^{-4}$	$<10^{-10}$
360/tiempo 3	0.05	$2.047 \cdot 10^{-5}$	$1.098 \cdot 10^{-4}$	$<10^{-10}$	$2.251 \cdot 10^{-4}$
600/tiempo 5	0.05	$<10^{-10}$	$2.017 \cdot 10^{-5}$	$2.369 \cdot 10^{-7}$	$3.180 \cdot 10^{-5}$
1000/tiempo 7	0.05	$<10^{-10}$	$4.102 \cdot 10^{-6}$	$3.341 \cdot 10^{-5}$	$<10^{-10}$
120/tiempo 1	0.1	$<10^{-10}$	$5.083 \cdot 10^{-5}$	$<10^{-10}$	$<10^{-10}$
360/tiempo 3	0.1	$<10^{-10}$	$5.439 \cdot 10^{-5}$	$<10^{-10}$	$2.268 \cdot 10^{-4}$
600/tiempo 5	0.1	$<10^{-10}$	$1.028 \cdot 10^{-4}$	$<10^{-10}$	$<10^{-10}$
1000/tiempo 7	0.1	$<10^{-10}$	$8.429 \cdot 10^{-6}$	$<10^{-10}$	$<10^{-10}$

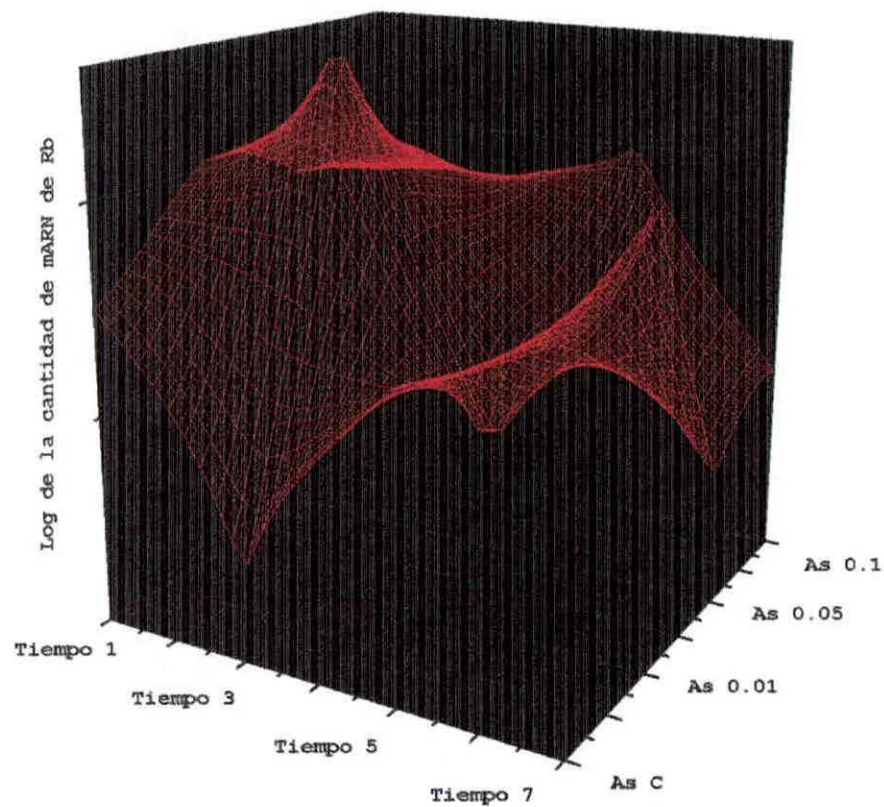


A, DAPk1

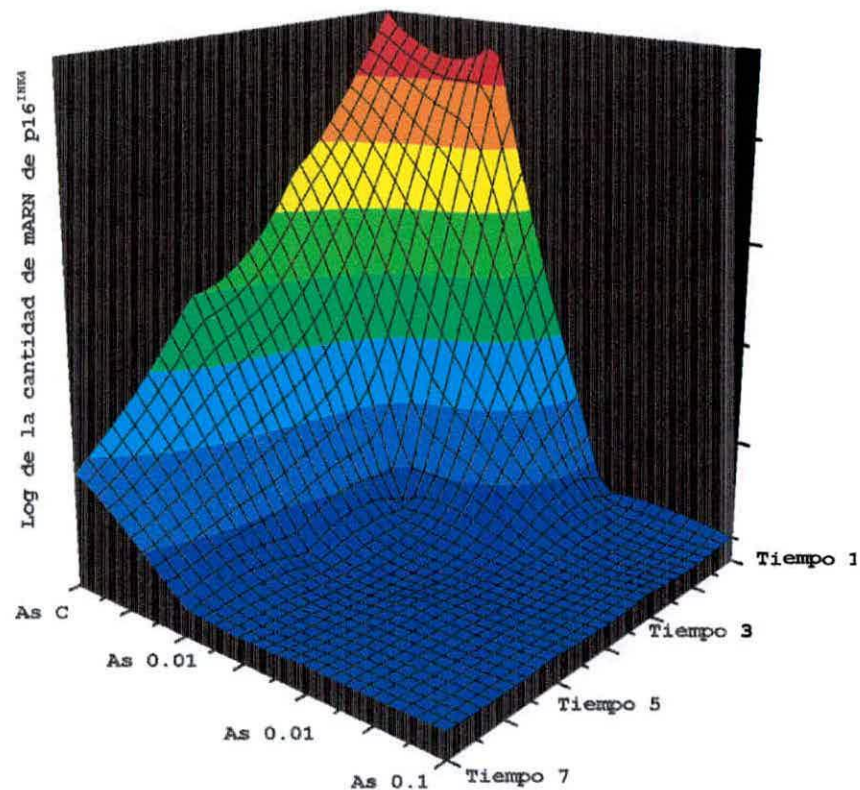


B, MGMT

Figura 38. Se muestran los gráficos 3D de DAPk1 (A) y MGMT (B), en donde se puede apreciar las tendencias de las cantidades de cADN cuantificadas en qPCR, dependiente tanto del tiempo como de la cantidad de As a la que se expusieron los FPH. Tiempo 1 (120 horas), tiempo 3 (320 horas), tiempo 5 (600 horas) y tiempo 7 (1000 horas).



A, Rb1



B, p16

Figura 39. Se muestran los gráficos 3D de Rb1 (A) y p16 (B), en donde se puede apreciar las tendencias de las cantidades de cADN cuantificadas en qPCR, dependiente tanto del tiempo como de la cantidad de As a la que se expusieron los FPH. Tiempo 1 (120 horas), tiempo 3 (320 horas), tiempo 5 (600 horas) y tiempo 7 (1000 horas).

## 6.5 Modelo Estadístico

Como ya se describió, el modelo estadístico con el cual se pretende generar una tabla crítica, es decir, la combinación de valores (información) en donde se deba prestar más atención al paciente, para así minimizar el riesgo a la formación de un cáncer broncopulmonar, se realiza en Análisis de Múltiples Variantes, con variables de dependencia, en un análisis discriminante. Método estadístico frecuentemente usado en estudio clínicos [Pérez, C. 2004]. Para facilitar este tipo de análisis se utiliza el software comercial SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) 15.0, el cual una vez definidos las variables a considerar permite generar una tabla discriminante del análisis de pacientes.

El análisis de  $n$  individuos en los que se han medido  $p$  variables cuantitativas o “explicativas” y variables cualitativas no numéricas (segmentarias) o “clasificativa”. El fin de los datos analizados, es relacionar las variables cualitativas con estas variables cualitativas, en lo que corresponde a metilación, niveles de expresión cuantificados (por qPCR) y niveles de expresión (no cuantitativo) con zona geográfica y/o nivel de exposición a arsénico, por ejemplo.

La información generada con el análisis de metilación, permite generar una variable de tipo cuantitativa (no se puede confundir el concepto trivial de la estadística analítica típica donde lo cuantitativo es un número y/o una medición), donde se discrimina si se está o no metilado, lo que se puede representar por los números enteros 1 y 0 (donde 1 es metilado y 0 es no metilado), es criterio tan tajante se da en el contexto que los datos generados en los estudios de mutación son discretos. Esta condición de 1 o 0, es independiente del gen (DAPk1, Rb1, MGMT, p16), pero es independiente entre ellos, es decir, la condición de mutación de uno de ellos puede ser condición suficiente para generar el criterio de potencial daño celular.

En el caso de la información procesada por los análisis del macroarreglo, este permite determinar rangos que definan una condición de sobre expresión, de normalidad o de silenciamiento (como mínimo), este rango permitirá al paquete estadístico de análisis, poder clasificar el valor de análisis de una muestra (paciente), considerando el número como alto, normal o bajo. Para el caso de una patología, este caso el cáncer broncopulmonar, se define cual de las condiciones (valor de rango que define alto, normal o bajo), medidos de la misma manera que el ensayo, es óptima y cual (o cuales) es de riesgo. En el caso de rango, se definen como bajo a los valores menores a 0.750, como normales (estadísticamente no significativamente) a los valores entre 0.751 y 1.199, y sobre 1.200 como valores altos. Para el caso de p16, se considera de riesgo los valores bajos. Con Rb1, también se consideran de riesgo los valores bajos, pero para el caso de MGMT y DAPk1, serán considerados de riesgo los valores altos. Esta misma información se puede generar con el micrarreglo, lo que generaría una pequeña variación el valor de los rangos, pero dado que los otros dos experimentos están realizados solo en el modelo experimental, se decide generar el rango solo con el macroarreglo.

En el caso de los resultados generados por el qPCR, el análisis de la muestra se condiciona a iniciar el proceso de detección de la muestra, de la misma forma como se realizó en el estudio, es decir, misma pareja de partidores, misma sonda y tipo de curva de calibrado, además de trabajar con las mismas condiciones de laboratorio. Para definir el criterio de normalidad o riesgo, se utilizará la condición de máximo valor detectado en condiciones de no exposición a As (III), de esta forma para el caso de p16, todos los valores por debajo de  $5.577 \cdot 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L, serán considerados como valores de riesgo. En el caso de DAPk1, todo valor por sobre  $5.191 \cdot 10^{-4}$ , también serán considerados como riesgosos. Para los valores de MGMT, se considera de riesgo cualquier valor sobre  $1.538 \cdot 10^{-5}$  ng/ $\mu$ L, siempre y cuando también se vea riesgo en el resultado de cualquier de los dos genes anteriores, ya que el valor de MGMT por sí solo puede ser o estar relacionado con

otros procesos, que no guarden relación con inicio de procesos de transformación celular. El caso de Rb1, es el más complicado de los 4 genes para definir un valor de corte, ya que presenta valores muy parejos en todas las condiciones de experimentación (tiempo de exposición y concentración de As (III)), lo que sí es claro que valores bajos en los niveles de mARN de Rb1, son los que se deben de considerar valores de riesgo, por lo tanto y siguiendo con el criterio de selección del valor crítico, este sería  $2.482 \cdot 10^{-6}$  ng/ $\mu$ L.

Luego la otra variable a definir es la clasificativa o segmentaria, y esta se genera en base a información y criterios de la población, es decir, se puede generar una variable segmentaria en función a la ubicación geográfica, definiendo si las zonas definidas, son alto bajo o nulo riesgo, ejemplo Chuquicamata (zona altamente expuesta), Antofagasta (zona expuesta), Valparaíso (zona no expuesta). Otro criterio puede ser la ocupación laboral o el sexo, historial clínico, etc. lo recomendable si es la selección de solo una, que en combinación con las anteriormente definidas, genera la información para la tabla crítica, que debe ser entendida como información incorporada y aplicada por un software estadístico y no como un número discriminatorio en un papel. Esto por que una vez incorporados criterios de las variable, se condiciona en el software la combinatoria de estos variables para definir una condición, esto significa que cada variable por si sola no es suficiente para calificar que un paciente o una muestra generaran alguna transformación real.

Tabla 14. Esta tabla que esquematizaría la condiciones de los resultados para definir los valores de rango o de discriminación de riesgo (R) y normalidad (N).

	DAPk1		p16		Rb1		MGMT		Zona de geográfica de exposición
	1	R	1	R	1	R	1	R	
Metilación	0	N	0	N	0	N	0	N	Alta
	<0.750	R	<0.750	N	<0.750	R	<0.750	N	
Expresión macroarreglo	0.751 – 1.199	N	0.751 – 1.199	N	0.751 – 1.199	N	0.751 – 1.199	N	Baja
	> 1.20	N	> 1.20	R	> 1.20	N	> 1.20	R*	Ninguna
qPCR	5.191*10 <sup>-4</sup>	R	5.577*10 <sup>-3</sup> ng/μL	N	2.482*10 <sup>-6</sup> ng/μL	N	1.538*10 <sup>-5</sup> ng/μL	R	
		N		R		N			

Luego se define, a través de estadísticos de múltiples variables (selección hecha en el software) como los criterios de riesgo se combinan para definir o generar la toma de decisión, por ejemplo, bastará sólo con la presencia de un factor de riesgo (R), por cada metodología para considerar la potencialidad de daño, o que a lo menos 2 de estos factores de riesgo pertenezca a un mismo gen, etc. Para esto criterios de combinación, será necesario trabajar con el estamento clínico (oncólogos), ya que en este caso a diferencia de una patología definida, la combinación de los factores de riesgo supondrá que existe la posibilidad de generar la patología, con lo que se pretende disminuir las condiciones de riesgo del paciente.

## Capítulo 7

### Conclusiones

En el caso individual de cada gen de estudio, se ve que DAPk1, los niveles de metilación están afectados bajo cualquier concentración de arsénico, y que no se puede asegurar que a mayor concentración de As, mayor el nivel de metilación. En el caso de los resultados asociados al estudio en arreglos, se puede definir que existe una correlación en los resultados del modelo celular con las muestras de pacientes, presentando un aumento en los niveles, lo que se asocia (en el caso de los pacientes) a la presencia del metaloide de manera crónica, y finalmente en el caso de los análisis por qPCR, indica una relación directa entre los niveles de mARN y la concentración de As.

Para p16<sup>INK4A</sup> o CDKN2A, el análisis de metilación, indica aumento en las metilaciones del promotor asociado, confirmando que el arsénico afecta hipermetilando el promotor; que los niveles de mARN analizados por arreglos de cADN, son congruentes entre el modelo de FPH y los pacientes, la variación no es significativa, concluyendo que el As todavía no afecta los niveles de expresión de mARN, y por lo tanto tampoco al ciclo celular (por esta vía), en el caso de los resultados de qPCR, la relación entre las cantidades de mARN de p16 y las concentraciones de As son inversa (a mayor concentración de As menor nivel de p16).

En el caso de MGMT, este presenta señal de metilación, es muy baja pero detectable, lo que indicaría que el As no estaría afectando considerablemente, en lo que a procesos de metilación se refiere. En el caso de los arreglos, estos presentan resultados dispares (bajos en el macroarreglo y altos en el microarreglo), son atribuidos a la capacidad homeostática del paciente, dada la naturaleza de la

función proteica (reparación de ADN), finalmente en el caso de los resultados de qPCR, solo se les puede interpretar si están asociados a otros valores.

Retinoblastoma, por otra parte, también presenta señal de metilación, pero que al ser de baja calidad, supondría una baja influencia del arsénico. Referente a los arreglos, Rb1 presenta la misma tendencia, a aumentar los niveles de mRNA en las células y pacientes expuestos (en términos generales), pero en pacientes en más leve el alza, esto junto con el resultado de qPCR, en donde no se presenta un diferencia evidente entre el control y las células expuesta, ni donde tampoco se genera algún tipo de tendencia, hace creer que el tiempo de exposición ni la concentración de As, están afectando directamente procesos de regulación del ciclo celular.

Las variaciones (en FPH) de los niveles de expresión de los mRNA, de los genes seleccionados y la señal de metilación de los mismo, poseen un valor pronostico, asociado a la variación, regulación o alteración de algunos procesos moleculares, que se asocian a un proceso inicial de muerte celular programada o transformación celular, en donde este último se proyecta y/o asocia con mecanismos moleculares descritos en cáncer de pulmón.

Los valores pronósticos, antes señalados, utilizados como criterios estadísticos en técnicas de análisis multivariante de datos, en un software estadístico (SPSS®), permitirá generar junto con variables segmentarias, permitirá generar análisis discriminantes que permitan asociar el análisis de una muestra (o paciente) en una población predefinida.

## Capítulo 8

### Proyecciones

Sin lugar a duda, que el simple estudio de parámetros predictivos en modelos *in vitro*, no son suficientes para generar los parámetros de selección en análisis discriminantes con pacientes, pero si son una aproximación, que permitiría acotar el desarrollo y determinación de los parámetros con el estudio a realizar en pacientes, que es el paso siguiente a esta tesis.

Además de comenzar con los procesos de patentación (de ser posible), la gestión y desarrollo de la transferencia tecnológica, asociada al “producto final”, en este caso un paquete estadístico de aplicación clínica y/o un protocolo o kit específico de selección de biomarcadores preventivos,

## Capítulo 9

### Abreviaturas

<b>As</b>	<i>Arsénico</i>
<b>ADN</b>	<i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
<b>APC</b>	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
<b>ARN</b>	<i>Ácido Ribonucleico</i>
<b>cADN</b>	<i>ADN copia</i>
<b>Cdk</b>	<i>Ciclinas dependientes de quinasa</i>
<b>CDKN2A</b>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, p16<sup>INK4A</sup></i>
<b>C-F</b>	<i>Chomczynski-Fenol</i>
<b>DAPk</b>	<i>Death-Associated Protein kinase</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DNMTasa</b>	<i>Metiltransferasas</i>
<b>dNTPs</b>	<i>Desoxy nucleótidos fosfatados</i>
<b>DTT</b>	<i>Dititritol</i>
<b>ECACC</b>	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
<b>FPH</b>	<i>Fibroblastos de Pulmón Humano</i>
<b>HIC</b>	<i>hypermethylated in cancer</i>
<b>IGF-1</b>	<i>Insulin-like Growth Factors 1</i>
<b>INK4</b>	<i>Inhibitor of Kinase 4</i>
<b>mARN</b>	<i>ARN mensajero</i>
<b>MBD</b>	<i>Methyl-binding domain</i>
<b>Met</b>	<i>Metilado</i>
<b>MGMT</b>	<i>O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA-metiltransferasa</i>
<b>NSCLC</b>	<i>No-small cell lung cancer</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PDGF</b>	<i>Platelet-Derived Growth Factors</i>
<b>qPCR</b>	<i>PCR en Tiempo Real</i>

<b>RASSF1A</b>	<i>RAS effector homologue</i>
<b>Rb</b>	<i>Retinoblastoma</i>
<b>ROS</b>	<i>Radical oxygen species</i>
<b>RT</b>	<i>Reverse Transcriptase</i>
<b>SAM</b>	<i>S-adenosinmeteonina</i>
<b>SCLC</b>	<i>Small cell lung cancer</i>
<b>SPSS</b>	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
<b>Tm</b>	<i>Temperatura de melting</i>
<b>UnMet</b>	<i>No metilado</i>
<b>UPSH</b>	<i>Universal ProbeLibrary Set Human</i>

## Capítulo 10

### Bibliografía

- ❖ Affymetrix. Inc. 2003 ***“Manuals GeneChip® Expression Analysis.”***
- ❖ Andrew, A. S. Burgess, J. L. Meza, M. M. Demidenko, E. Waugh, M. G. Hamilton, J. W. and Karagas, M. R. 2006 ***“Arsenic Exposure Is Associated with Decreased DNA Repair in Vitro and in Individuals Exposed to Drinking Water Arsenic”*** Environ Health Perspect 114:1193–1198.
- ❖ Barchowsky, A. Roussel, R. R. Klei, L. R. James, P. E. Ganju, N. Smith, K. R. and Dudek, E. J. 1999 ***“Low levels of arsenic trioxide stimulate proliferative signals in primary vascular cells without activating stress effector pathway.”*** Toxicol. Appl. Pharmacol. 159: 65-75.
- ❖ Baylin, S. B. & Herman, J. G. 2000 ***“DNA hypermethylation in tumorogenesis: epigenetics joins genetics.”*** Trends Genet. 16: 168-174.
- ❖ Baylin, S. B. Hoppener, J. W. de Bustros, A. Steenbergh, P. H. Lips, C. J. and Nelkin, B. D. 1986 ***“DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas.”*** Cancer Res. 46: 2917-2922.
- ❖ Belinsky, S. A. Nikula, K. J. Palmisano, W. A. Michels, R. Saccomanno, G. Gabrielson, E. Baylin, S. B. Herman, J. G. 1998 ***“Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis.”*** P.N.A.S. 95: 11891-11896.
- ❖ Benhar, M. Engelberg, D. and Levitzki, A. 2002 ***“ROS, stress-activated kinases and stress signalling in cancer.”*** EMBO reports 3: 420-425.

- ❖ Campanero, M. R. Armstrong, M. I. and Erik K. Flemington 2000 ***“CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity.”*** P.N.A.S. 97: 6481-6486.
  
- ❖ Chen, H. Li, S. F. Liu, J. Diwan, B. A. Barrett, J. C. and Waalkes, M. P. 2004 ***“Chronic inorganic arsenic exposure induces hepatic global and individual gene hypomethylation: implications for arsenic hepatocarcinogenesis”*** Carcinogenesis 25(9):1779-1786.
  
- ❖ Chen, R. Pettersson, U. Beard, C. Jackson-Grusby, L. and Jaenisch, R. 1998 ***“DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates.”*** Nature 395: 89-93.
  
- ❖ Chen, Y. C. Lin-Sshiau, S. Y. Lin, J. K. 1998 ***“Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis.”*** J. Cell. Physiol. 177:324-333.
  
- ❖ Chimenos-Küstner, E. Font-Costa, I. López-López, J. 2004 ***“Riesgo de cáncer oral y marcadores moleculares.”*** Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal 9: 377-84.
  
- ❖ Chou, W. C. Chen, H. Y. Yu, S. L. Cheng, L. Yang, P. C. and Dang, C. V. 2005 ***“Arsenic suppresses gene expression in promyelocytic leukemia cells partly through Sp1 oxidation”*** Blood. 106:304-310.
  
- ❖ Cui, X. Wakai, T. Shirai, Y. Hatakeyama, K and Hirano, S. 2006 ***“Chronic Oral Exposure to Inorganic Arsenate Interferes with Methylation Status of p16<sup>INK4a</sup> and RASSF1A and Induces Lung Cancer in A/J Mice”*** TOXICOLOGICAL SCIENCES 91(2), 372–381.
  
- ❖ Dai, Z. Lakshmanan, R. R. Zhu, W. G. Smiraglia, D. J. Rush, L. J. Frühwald, M. C. Brena, R. M. Li, B. Wright, F. A. Ross, P. Otterson, G. A. & Plass, P. 2001

***“Global Methylation Profiling of Lung Cancer Identifies Novel Methylated Genes.”*** Neoplasia 3: 314-323.

- ❖ Danesi, R. De Braud, F. Fogli, S. De Pas, T. M. Di Paolo, A. Curigliano, G. AND Del Tacca, M. 2004 ***“Pharmacogenetics of Anticancer Drug Sensitivity in Non-Small Cell Lung Cancer”*** Pharmacol Rev 55:57–103.
- ❖ Davis, C. D. & Uthus, E. O. 2004 ***“DNA methylation, Cancer Susceptibility, and Nutrient Interactions.”*** Exp. Biol. Med. 229: 988-995.
- ❖ Del Razo, L. M. Quintanilla-Vega, B. Brambila-Colombres, E. Calderón-Aranda, E. S. Manno, M and Albores, A. 2001 ***“Stress Proteins iduced by Arsenic.”*** Toxicol. Appl. Pharmacol 177: 132-148.
- ❖ Doman, F. E. & Futscher, B. W. 2004 ***“Commentary: Flipping the epigenetic Switch.”*** AJP 164 (6): 1883-1886.
- ❖ Eblin, K. E. Bredfeldt, T. G. Buffington, S and Gandolfi, A. J. 2007 ***“Mitogenic Signal Transduction Caused by Monomethylarsonous Acid in Human Bladder Cells: Role in Arsenic-Induced Carcinogenesis”*** TOXICOLOGICAL SCIENCES 95(2), 321–330.
- ❖ El-Deiry, W. S. Tokino, T. Velculescu, V. E. 1993 ***“WAF 1, a potential mediator of p53 tumor supresión.”*** Cell 75: 817-825.
- ❖ Esteller, M. 2005 ***“Aberrant DNA methylation as a Cancer-Inducing mechanism.”*** Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45: 629-656.
- ❖ Esteller, M. Corn, P. G. Baylin, S. B. and Herman, J. G. 2001 ***“A gene hypermethylation profile of human cancer.”*** Cancer Research 61: 3225-3229.

- ❖ Evan, G. I. & Vousden, K. H. 2001 "***Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer.***" Nature 411: 342-348.
- ❖ Frumkin, H. & Thun, M. J. 2001 "***Arsenic.***" CA Cancer J. Clin. 51: 254-262.
- ❖ Fujiwara, K. Fujimoto, N. Tabata, M. Nishii, K. Matsuo, K. Hotta, K. Kozuki, T. Aoe, M. Kiura, K. Ueoka, H. and Tanimoto, M. 2005 "***Identification of Epigenetic Aberrant Promoter Methylation in Serum DNA Is Useful for Early Detection of Lung Cancer***" Clinical Cancer Research Vol. 11, 1219–1225.
- ❖ Fukutsu, K. Zhuo, W. Yamada, Y. Ishikawa, K. and Koizumi, A. 2002 "***Biological effects for the tracheal epithelial cells by Radon Exposure.***" Journal Radiation Research 43(4): 447.
- ❖ Gazzeri, S. Gouyer, V. Vour'ch, C. Brambilla, C. Brambilla, E. 1998 "***Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers.***" Oncogene 16: 497-504.
- ❖ Gurr, J. R. Liu, F. Lynn, S. and Jan, K. Y. 1998 "***Calcium-dependent nitric oxide production is involved in arsenite-induced micronuclei.***" Mutat. Res. 416: 137-148.
- ❖ Hanahan, D and Weinberg, R. A. 2000 "***The Hallmarks of Cancer.***" Cell 100: 57-70.
- ❖ Herman, J. G. Graff, J. R. Myohanen, S. Nelkin, B. D. Baylin, S. B. 1996 "***Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands.***" P.N.A.S. 93:9821-9826.
- ❖ Holland & Frei ed. 2000 "***Cancer Medicine*** <sup>e</sup>5" American cancer society. Cap. 1 Pag.1

- ❖ <http://www.affimetix.com>
- ❖ [http://www.hazmat.cl/HTML/Centro\\_Doc\\_Arsenico.htm#2](http://www.hazmat.cl/HTML/Centro_Doc_Arsenico.htm#2)
- ❖ <http://www.dnamethsoc.com>
- ❖ <http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa05222.html>
- ❖ <http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa05223.html>
- ❖ <http://www.who.int>
- ❖ Huang, C. Ma, W. Y. Li, J. and Dong, Z. 1999 ***“Arsenic Induces Apoptosis through a c-Jun NH2 -Terminal Kinase-dependent, p53-independent Pathway.”*** Cancer Res. 59: 3053-3058.
- ❖ Huang, C. Ke, Q. Costa, M. and Shi, X. 2004 ***“Molecular mechanisms of arsenic carcinogenesis”*** Mol. Cell. Biochem 255: 57-66.
- ❖ Hug, S. Wegelin, M. Gechter, D. Canonica, L. 1999 ***“Arsenic Contamination of Ground Water: Disastrous Consequences in Bangladesh.”*** EAWAG news 49: 18-20. <http://www.bicn.com/acic>
- ❖ Hughes, M. F. 2006 ***“Biomarkers of Exposure: A Case Study with Inorganic Arsenic”*** Environ Health Perspect 114:1790–1796.
- ❖ Hunter, T. & Pines, J. 1994 ***“Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age.”*** Cell 79: 573-582.

- ❖ Inchem, INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 155, 1993 ***“Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles.”*** World Health Organization.
- ❖ Issa, J. P. Vertino, P. M. Wu, J. Sazawal, S. Celano, P. Nelkin, B. D. Hamilton, S. R. Baylin, S. B. 1993 ***“Increased cytosine DNA-methyltransferase activity during colon cancer progression.”*** J. Natl. Cancer Inst. 85: 1235-1240.
- ❖ Jacinto, F. V. & Esteller, M. 2007 ***“MGMT hypermethylation: A prognostic foe, a predictive friend.”*** DNA repair 6:1155-1160.
- ❖ Jones, P. A & Laird, P. W. 1999 ***“Cancer-epigenetics comes of age.”*** Nature Genet. 21: 163-166.
- ❖ Khan, J. Saal, L. H. Bittner, M. L. Chen, Y. Trent, J. M. Meltzer, P. S. 1999 ***“Expression profiling in cancer using cDNA microarrays.”*** Electrophoresis 20: 223-229.
- ❖ Koul, S. Houldsworth, J. Mansukhani, M. M. Donadio, A. McKiernan, J. M. Reuter, V. E. Bosl, G. J. Chaganti, R. S. and Murty, V. V. 2002. ***“Characteristic promoter hypermethylation signatures in male germ cell tumors.”*** Molecular Cancer 1: 8-16.
- ❖ Laird, P. W. 2005 ***“Cancer epigenetics.”*** Hum. Mol. Genet. 14: R65-R76.
- ❖ Lantry, L. E. Zhang, Z. Crist. K. A. Wang, Y. Kelloff, G. J. Lubet, R. A. and You, M. 1999 ***“5-aza-2'-deoxycytidine is chemopreventive in a 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3.pyridyl)-1-butanone – induced primary mouse lung tumor model.”*** Carcinogenesis 20: 343-346.

- ❖ Lengauer, C. Kinzler, K. W. Vogelstein, B. 1998 ***“Genetic instabilities in human cancers.”*** Nature 396: 643-649.
- ❖ Liloglou, T. Maloney, P. Xinarianos, G. Hulbert, M. Walshaw, M. J. and Gosney, J. R. 2001 ***“Cancer-specific Genomic Instability in Bronchial lavage: A Molecular Tool for Lung Cancer Detection.”*** Cancer Res. 61: 1624-1628.
- ❖ Liu, J. Chen, H. Miller, D. S. Saavedra, J. E. Keefer, L. K. Johnson, D. R. Klaassen, C. D. and Waalkes, M. P. 2001 ***“Overexpression of Glutathione S-Transferase II and Multidrug Resistance Transport Proteins Is Associated with Acquired Tolerance to Inorganic Arsenic.”*** Mol. Pharmacol. 60: 302-309.
- ❖ Liu, L. Trimarchi, J. R. Navarro, P. Blasco, M. A. and Keefe, D. L. 2003 ***“Oxidative Stress Contributes to Arsenic-Induced Telomere Attrition, Chromosome Instability and Apoptosis.”*** JBC Papers in Press. Published on May 26, 2003 as Manuscript M303553200.
- ❖ Liu, S. Athar, M. Lippai, I. Waldren, C. and Hei, T. K. 2001 ***“Induction of oxyradicals by arsenic: Implication for mechanism of genotoxicity.”*** P.N.A.S. 98: 1643-1648.
- ❖ McNeely, S. C. Xu, X. Taylor, B. F. Zacharias, W. McCabe, M. J. Jr. and Status, J. C. 2006 ***“Exit from Arsenite-Induced Mitotic Arrest Is p53 Dependent”*** Environ Health Perspect 114:1401–1406.
- ❖ Markl, I. D. Cheng, J. Liang, G. Shibata, D. Laird, P. W. Jones, P. A. 2001 ***“Global and gene-specific epigenetic patterns in human bladder cancer genomes are relatively stable in vivo and in vitro over time.”*** Cancer Res. 61: 5875-5884.
- ❖ Mass, M. J. 1992 ***“Human carcinogenesis by arsenic.”*** Environ. Geochem. Health 14: 49-54.

- ❖ Mass & Wang, 1997 ***“Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis.”*** Mutat Res. 386: 263-277.
  
- ❖ Nan, X. Ng, H. H. Johnson, C. A. Laherty, C. D. Turner, B. M. Eisenman, R. N. Bird, A. 1998 ***“Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex.”*** Nature 393: 386-389.
  
- ❖ Nevins, J. R. 1992 ***“E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoprotein.”*** Science 258: 424-429.
  
- ❖ Oberley, T. 2002 ***“Oxidative Damage and Cancer.”*** American Journal of Pathology, 160(2): 403-408.
  
- ❖ Ogiono, S. Kawasaki, T. Brahmandam, M. Cantor M. Kirkner, G. J. Spiegelman, D. Makrigiorgos, G. M. Weisenberger, D. J. Laird, P. W. Loda, M. and Fuchs, C. S. 2006 ***“Precision and performance characteristics of Bisulfite conversion and real-time PCR (MethyLight) for Quantitative DNA methylation analysis.”*** J. Mol. Diagn. 8: 209-217.
  
- ❖ Palmisano, W. A. Divine, K. K. Saccomanno, G. Gilliland, F. D. Baylin, S. B. Herman, J. G. Belinsky, S. A. 2000 ***“Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum.”*** Cancer Res. 60: 5954-5958.
  
- ❖ Pérez, C. 2004 ***“Técnicas de Análisis Multivariante de Datos, aplicaciones con SPSS.”*** Editorian Pearson Educación, S. A. Madrid 2004. Capitulo 1, 15 y 16.
  
- ❖ Qiu, J. 2006. ***“Unfinished symphony.”*** Nature 44: 143-145.

- ❖ Ramsahoye, B. H. Biniszkiwicz, D. Lyko, F. Clark, V. Bird, A. P. and Jaenisch, R. 2000 ***“Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a.”*** PNAS 97: 5237-5242.
  
- ❖ Ransohoff, D. F. 2003 ***“Cancer. Developing molecular biomarkers for cancer.”*** Science. 299: 1679-1680.
  
- ❖ Robertson, K. D. 2001 ***“DNA methylation, methyltransferases, and cancer.”*** Oncogene 20: 3139-3155.
  
- ❖ Robertson, K. D. Ait-Si-Ali, S. Yokochi, T. Wade, P. A. Jones, P. L. Wolffe, A. P. 2000 ***“DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters.”*** Nature Genet. 25: 338-342.
  
- ❖ Robertson, K. D. & Wolffe, A. P. 2000 ***“DNA methylation in health and disease.”*** Nature Rev. Genet. 1: 11-19.
  
- ❖ Rom, W. N. Hay, J. G. Lee, T. C. Jiang, Y. and Tchou-Wong, K. M. 2000 ***“Molecular and Genetics Aspects of lung cancer.”*** Am. J. Respir. Crit. Care Med. 161: 1355-1367.
  
- ❖ Santini. V. Kantarjian, H. M. and Issa, J. P. 2001 ***“Changes in DNA methylation in neoplasia: Pathophysiology and Therapeutic Implications.”*** Ann. Inter. Med. 134: 573-586.
  
- ❖ Santolaya-Biondi, R. Salazar, L. Sandoval, M. Santolaya-Cohen, R. Alfaro, R. 1994 ***“Arsénico Impacto sobre el hombre y su entorno.”*** Centro de investigaciones ecobiológicas y medicina de altura (C.I.E.M.A.) División Chuquicamata-CODELCO Chile.
  
- ❖ Shapiro, P. S. Vaisberg, E. Hunt, A. J. Tolwinski, N. S. Whalen, A. M. McIntosh, J. R. and Ahn, N. G. 1998 ***“Activation of the MKK/ERK Pathway during***

***Somatic Cell Mitosis: Direct Interactions of Active ERK with Kinetochores and Regulation of the Mitotic 3F3/2 Phosphoantigen*** J. Cell Biol., Sep 1998; 142: 1533.

- ❖ Schaur, E. I. Siriwardana, S. Lagan, T. A. and Sciafani, R. A. 1994 ***“Cyclin D1 overexpression vs. retinoblastoma inactivation: implications for growth control evasion in non-small cell lung cancer.”*** P.N.A.S. 91: 7827-7831.
- ❖ Schena, M. 2000 ***“DNA Microarray. A practical approach”*** Oxford University Press. Cap. 1 (Schena & Davis).
- ❖ Shen, Z. Y. Shen, W. Y. Chen, M. H. Shen, J. and Zeng, Y. 2003 ***“Reactive oxygen species and antioxidants in apoptosis of esophageal cancer cells induced by As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>”*** Int. J. Mol. Med. 11: 479-484.
- ❖ Sherr, C. 1996 ***“Cancer cell cycles”*** Science 274:1672-1677.
- ❖ Shi, L. 2002 ***“DNA Microarray (Genome Chip).”*** <http://www.gene-chips.com>
- ❖ Stratthdee, G. & Brown, R. 2002 ***“Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions”*** Exp. Rev. Mol. Med. 4 March, <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/02004222h.htm>
- ❖ Thomas, D. Styblo, M. and Lin, S. 2001 ***“The cellular metabolism and Systemic toxicity of Arsenic.”*** Toxicol. Appl. Pharmacol. 176: 127-144.
- ❖ Tsou, J. A. Hagen, J. A. Carpenter, C. L. Laird-Offringa, I. A. 2002 ***“DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis.”*** Oncogene. 21: 5450-5461.

- ❖ Tyler, J. K. & Kadonaga, J. T. 1999 ***“The ‘dark side’ of chromatin remodeling: repressive effects of transcription.”*** Cell 99: 443-446.
  
- ❖ Vernhet, L. Séité, M. P. Allain, N. Guillouzo, A. and Fardel, O. 2001 ***“Arsenic Induces Expression of the Multidrug Resistance-associated Protein 2 (MRP2) Gene in Primary Rat and Human Hepatocytes.”*** J.P.E.T. 298: 234-239.
  
- ❖ Waxman, S. & Anderson, K. C. 2001 ***“History of the Development of Arsenic Derivates in Cancer Therapy.”*** The Oncologist 6: 3-10.
  
- ❖ Wistuba, I. I. Berry, J. Behrens, C. Maitra, A. Shivapurkar, N. Milchgrub, S. Mackay, B. Minna, J. D. and Gazdar, A. F. 2000a ***“Molecular Changes in the Bronchial Epithelium of Patients with Small Cell Lung Cancer.”*** Clin. Cancer Res. 6: 2604-2610.
  
- ❖ Wistuba, I. I. Behrens, C. Virmani, A. K. Mele, G. Milchgrub, S. Girard, L. Fondon III, J. W. Garner, H. R. Mackay, B. Lalif, F. Lerman, M. I. Lam, S. Gazdar, A. F. and Minna, J. D. 2000b ***“High Resolution Chromosome 3p Allelotyping of Human Lung Cancer and Preneoplastic/Preinvasive Bronchial Epithelium Reveals Multiple, Discontinuous Sites of 3p Allele Loss and Three Regions of Frequent Breakpoints.”*** Cancer Res. 60: 1949-1960.
  
- ❖ Wong, I. H. N. 2001 ***“Methylation profiling of human cancers in blood: Molecular monitoring and prognostication (Review).”*** Int. J. Oncol. 19: 1319-1324.
  
- ❖ Woo, S. H. Park, I. C. Park, M. J. Lee, H. C. Lee, S. J. Chun, Y. J. Lee, S. H. Hong, S. I. and Rhee, C. H. 2002 ***“Arsenic trioxide induces apoptosis through a reactive oxygen species-dependent pathway and loss of mitochondrial membrane potential in HeLa cells.”*** Int. J. Oncol. 21: 57-63.

- ❖ Woodson, K. Mason, J. Choi, S. W. Hartman, T. Tangrea, J. Virtamo, J. Taylor, P. R. and Albanes, D. 2001 ***“Hypomethylation of p53 in Peripheral Blood DNA Is Associated with the Development of Lung Cancer.”*** Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 10: 69-74.
  
- ❖ Xu H.J., Cairns P., Hu S.X., et al. 1993 ***“Loss of RB protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumor progresión”***. Int. J. Cancer 53: 781–784.
  
- ❖ Yu, J. Zhang, H. Gu, J. Lin, S. Li, J. Lu, W. Wan, Y. and Zhu, J. 2004 ***“Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma”*** BMC Cancer, 4:65
  
- ❖ Yu, R. C. Hsu, K. H. Chen, C. J. and Froines, J. R. 2000 ***“Arsenic methylation capacity and skin cancer.”*** Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 9: 1259-1262.
  
- ❖ Zhao, C. Q. Young, M. R. Diwan, B. A. Coogan, T. P. and Waalkes, M. P. 1997 ***“Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression.”*** P.N.A.S. 94: 10907-10912.
  
- ❖ Zöchbauer-Müller, S. Fong, K. M. Virmani, A. K. Geradts, J. Gazdar, A. F. and Minna, J. D. 2001 ***“Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers.”*** Cancer Res. 61: 249-255.
  
- ❖ Zöchbauer-Müller, S. Minna, J. D. Gazdar, A. F. 2002 ***“Aberrant DNA Methylation in Lung Cancer: Biological and Clinical Implications.”*** The Oncologist 7: 451–457.

## Capítulo 11

### Anexos

Anexo I. Títulos de Artículos asociados a la tesis.

- Mandiola, C. Rios, M. Jara-Leon, M. Sandoval, M. Escobar-Fica, J. 2008 **“Niveles de Estrés Oxidativos en poblaciones expuestas a Arsénico, en la Región de Antofagasta.”** Enviado a la Revista Medica Chilena, en Enero 2008.
- Miguel Rios, Lorena Varela-Nallar, Maria Soledad Hidalgo, Claudio Acuña-Castillo, Claudio Coddou<sup>1</sup>, Mónica Imarai<sup>1</sup>, Pablo Nelson<sup>1</sup>, Kevin Maisey<sup>1</sup>, Christian Mandiola, Jorge Escobar **“Chronic exposure to arsenic induces an in vivo increase of oxidative damage in human lymphocytes”** Enviado a *Biological Research*, Enero 2008.

Anexo II. Soluciones y Mezclas.

Gel de agarosa al 1% en TBE

- 1.- Solución amortiguadora de Tris-Boratos-EDTA (TBE). La solución se prepara 5X y se utiliza 1X. Para preparar 1 L de una solución 5X TBE mezclar: 54 g de Tris Base, 27.5 g de ácido bórico, 4.7 g de EDTA sódico, llevar a 1 L con agua y autoclavar.
- 2.- Pesarse la cantidad de agarosa requerida para obtener un gel de agarosa al 1%. El volumen final es de 50 mL o 250 mL
- 3.- Disolver en placa de agitación magnética con placa calefactora a una temperatura aproximada de 60 °C, hasta obtener una solución homogénea.

4.- Rellenar la bandeja de la cámara electroforética horizontal y esperar que cuaje la agarosa.

5.- "pre cocer" el gel por 7 minutos a 70 V.

6.- cargar las muestras y patrones y correr a 7 V/cm.

Solución de Bromuro de Etidio

Bromuro de etidio (10 mg/mL) 100 mg Agua destilada 10 mL, agitar y aislar de la luz, conservar a 4 °C.

Solución de tinción con Bromuro de etidio es de 0.75 µg/mL.

Solución de PBS 1X

Pesar y mezclar 8 g NaCl; 0.2 g KCl; 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; in 800 mL of distilled H<sub>2</sub>O. Adjustar el valor de pH a 7.4 con HCl 1 M; ajustar con H<sub>2</sub>O a 1 litro de volumen final, esterilizar en autoclave.

Anexo III. Cálculos.

Cuantificación espectrofotométrica de ADN y ARN. Concentración de Oligonucleótido en Unidades de Densidad Óptica (O.D.)

La cantidad de oligonucleótido también se expresa como Unidades de Densidad Óptica (O.D.); esto es, la cantidad de Oligo disuelto en 1 mL de agua con un valor de A<sub>260</sub> igual a 1.00 en una celda de 1 cm de longitud, y se calcula por la ecuación:

Unidades O.D.= A<sub>260</sub> X volumen del stock X factor de dilución

El valor de A<sub>260</sub> se convierte a µg/ml usando el coeficiente de extinción para dsADN la cual es 1 ml/50 µg para una celda de 1 cm de longitud. Por lo tanto, para un valor de O.D. de 1.0, en principio la muestra contiene 50 µg de dsADN por mL o en la ecuación:

1 unidad de O.D.de dsADN = 50 µg

El cálculo de la relación  $A_{260} / A_{280}$  es una manera común para expresar la pureza del DNA. Dependiendo de la composición nucleica, un valor de 1.65 a 1.9 indican una muestra pura.

La concentración de ARN se determina por el mismo protocolo que el utilizado para la medición de dsDNA. Sin embargo se aplica la siguiente relación:

1 unidad  $A_{260}$  de ssARN = 40 $\mu$ g / ml

Las preparaciones puras de RNA tienen una relación  $A_{260} / A_{280}$  de 2.0

Anexo IV Modelo de la carta consentimiento informado para las muestras de pacientes y grupo control utilizadas en los microarreglos.

*Proyecto BIOMARCADORES  
Información a los voluntarios y Consentimiento Informado*

*Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, U de Santiago, U de Antofagasta y  
Asociación Chilena de Seguridad*

*Biomarcadores tempranos para cáncer de pulmón  
Sub-estudio de ADN de células epiteliales bronquiales en muestras de esputo.*

*Este consentimiento puede contener palabras que usted no entienda. Por favor pregunte a los investigadores por cualquier palabra o información que usted no entienda claramente.*

*Antes de comprometer su participación en este estudio, es importante que usted lea esta información que describe el propósito, procedimientos, beneficios, riesgos, molestias y precauciones de este estudio.*

*Su participación es completamente voluntaria.*

*Descripción del proyecto.*

*Usted ha sido invitado a participar en el sub-estudio sobre evaluación de la forma de sus células (citología) y del material genético de las células que cubren las paredes de la vía aérea (ADN), las cuales pueden verse afectadas por numerosos mecanismos, entre los cuales está el tabaco y arsénico. Ciertos genes (piezas del*

ADN que instruyen a la célula para producir sustancias químicas) son heredados (están presentes al nacer) y pueden ser completamente funcionales o estar dañados desde el nacimiento o por efecto de sustancias nocivas. Por otra parte, la expresión de estos genes puede verse modificada también por la acción de estas sustancias nocivas. Al daño de un gen que no es reparado o su reparación es defectuosa se le denomina mutación genética. En este estudio nosotros evaluaremos tanto los genes genéticamente alterados como la expresión alterada de estos. Nosotros deseamos encontrar los patrones genéticos relacionados específicamente a modificaciones celulares precancerosas relacionadas a la exposición a arsénico.

#### *Antecedentes.*

Los cambios en la forma de las células pulmonares toman muchos años y pasan por diferentes etapas. Algunos de estos cambios se conocen en etapas tempranas de la progresión al cáncer y entonces pueden identificarse antes de que el cáncer ocurra. Estos cambios son denominados biomarcadores intermedios. Algunas de las pruebas de ADN servirán para ser usados como estos biomarcadores intermedios.

#### *Análisis genético.*

Si usted está de acuerdo en participar en este estudio, sus muestras de esputo obtenidas serán usadas para pruebas genéticas (ADN). También serán aislados linfocitos presentes en el esputo. Se procesará el ADN para buscar las variaciones en genes específicos.

#### *Riesgo y/o discomfort.*

Usted puede experimentar una respiración más corta o fatiga respiratoria leve luego de hacer el esfuerzo de toser.

#### *Beneficios.*

La participación en este estudio no le garantiza recibir ningún beneficio en salud, excepto la satisfacción de colaborar en aclarar un problema de salud que afecta la región y el país donde usted vive.

#### *Fuentes de Financiamiento.*

Las instituciones Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Universidad de Santiago, Universidad de Antofagasta, Asociación Chilena de Seguridad y FONDEF aportan recursos humanos y financieros para el estudio en curso.

#### *Costos.*

Este estudio no implica ningún costo para usted.

#### *Pagos.*

No hay pagos por la participación en este estudio.

#### *Retiro del Estudio.*

*Usted puede decidir no ingresar al estudio o retirarse en cualquier momento de éste. Sin embargo, el retiro una vez ingresado perjudica en forma importante la marcha del estudio, del mismo modo que no seguir las instrucciones. Por otro lado los investigadores pueden suspender su participación por (no exclusivamente): si usted está cursando con alguna enfermedad que no permita un buen análisis de sus muestras, no seguimiento del plan de estudio, uso de medicamentos no declarados.*

*Uso de los Datos de las muestras de ADN.*

*Las instituciones que desarrollan este proyecto lo realizan con fines de investigación y desarrollo de nuevas herramientas para enfrentar el cáncer, tanto en sus aspectos preventivos, de tratamiento, curativos o de adquisición de conocimiento para la comprensión del proceso canceroso. Por favor indique si usted autoriza a que las muestras de usted obtenidas se utilicen en otros análisis futuros.*

Autorizo \_\_\_\_\_

No autorizo \_\_\_\_\_

*Confidencialidad.*

*Los datos obtenidos en este estudio serán tratados con fines estadísticos y científicos y no involucran su identificación en términos públicos.*

*En caso de encontrar información relevante para su salud, esta será entregada por los investigadores sólo a usted.*

*Los hallazgos pueden ser publicados, sin identificaciones particulares de los voluntarios, en revistas de científicas y en informes técnicos a los organismos estatales e institucionales. Los informes técnicos entregados a FONDEF de carácter público y por lo tanto pueden ser conocidos por medios de prensa. En estos informes no serán mencionados los nombres de los voluntarios.*

*Ninguna información sobre sus resultados será entregada a su médico, familiares u otras personas sin su solicitud y consentimiento escrito.*

*Invitación a resolver sus dudas.*

*Usted recibirá una copia de este consentimiento. Por favor siéntase libre de preguntar respecto de este ahora o en el futuro. Usted puede contactarse directamente con el Dr. Mario Sandoval (02-6852723), Dra. Isabel Lilayu (055-.....), PhD Miguel Ríos (.....) o PhD Jorge Escobar (.....)*

**AUTORIZACIÓN**

*He leído este consentimiento respecto del estudio genético. El objetivo de la investigación me ha sido completamente explicado. Yo conozco el plan de muestreos. Yo escojo estar en este estudio. Se que puedo retirarme en cualquier momento. He recibido copia de este consentimiento (todas las páginas deben tener las iniciales del voluntario)*

Autorizo \_\_\_\_\_

No autorizo \_\_\_\_\_