



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular**

**Estudio de la proteína AHCYL1 como regulador del destino celular en células tumorales de pulmón con propiedad de célula madre**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**Lic. Melina Daniela Muñoz Bernart**

Directora: Dra. Carolina Perez Castro

Consejero de estudios: Dr. Omar Coso

Lugar de trabajo: Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA) -CONICET- Instituto Partner de la Sociedad Max Planck

Buenos Aires, mayo de 2022

Melina Muñoz Bernart

Carolina Perez Castro

## **Estudio de la proteína AHCYL1 como regulador del destino celular en células tumorales de pulmón con propiedad de célula madre**

El cáncer de pulmón es una patología extremadamente maligna debido a su alta capacidad invasiva y recurrencia. La alta heterogeneidad celular que posee el tumor se debe a la presencia de las células con propiedades de células madre, que son altamente indiferenciadas. Estas células atraviesan procesos de reprogramación o dediferenciación en los cuales adquieren un fenotipo tipo embrionario y progenitor, y responden con gran plasticidad a las señales del microambiente tumoral que regulan su identidad y comportamiento.

Mediante el uso del algoritmo bioinformático INSECT (desarrollado por el grupo de trabajo en colaboración con bioinformáticos), se identificó a *AHCYL1* como un gen candidato bajo la regulación por vías de señalización activadas en células embrionarias y tumorales. *AHCYL1* es una proteína multifacética vinculada a distintos procesos celulares pero su rol en cáncer es aún desconocido. En esta tesis doctoral, se postuló como hipótesis que *AHCYL1* sería un potencial regulador de la plasticidad celular y tumorigenicidad en células de carcinoma pulmonar. Como parte de la caracterización de *AHCYL1*, hemos utilizado diferentes aproximaciones experimentales *in vitro*, *in vivo* y ensayos de inmunohistoquímica y análisis transcripcional en muestras de pacientes. Los principales resultados sugieren que *AHCYL1* se expresa en correlación inversa con respecto a distintos factores de pluripotencia y al marcador de proliferación tumoral MKI67, indicando estar asociado con un fenotipo más diferenciado. Además, la disminución de la expresión de *AHCYL1* provocó un fenotipo más agresivo en los modelos *in vivo* generando tumores más grandes, acompañado de una mayor capacidad angiogénica. La identificación y caracterización de la proteína *AHCYL1* como factor clave de diferenciación celular en cáncer de pulmón y, por lo tanto, en el

proceso de tumorigénesis permitirá un mejor entendimiento de la biología tumoral y para diseñar de futuras estrategias terapéuticas.

Palabras clave: plasticidad, cáncer, pulmón, *stemness*, AHCYL1

## **Study of AHCYL1 as a regulator of cell fate in lung cancer cells with stem properties**

Lung cancer is an extremely malignant pathology due to its high invasiveness and recurrence. Within its high cellular heterogeneity, there are tumor stem cells, which are highly undifferentiated, can self-renew and/or differentiate, and respond with great plasticity to the signals of the tumor microenvironment. These cells go through reprogramming or dedifferentiation processes in which they acquire an embryonic-like phenotype.

Using the INSECT bioinformatics algorithm developed in collaboration with bioinformatics, the *AHCYL1* gene was selected from a list of candidate genes potentially regulated by activated signaling pathways in embryonic and tumor cells. AHCYL1 is a multifaceted protein linked to different cellular processes, and its role in cancer is still uncertain. In this doctoral thesis, we studied the *AHCYL1* gene as a potential regulator of cellular plasticity and tumorigenicity in lung carcinoma cells. As part of the characterization of its role in these processes, different experimental approaches were used including *in vitro*, *in vivo*, and immunohistochemical and transcriptomic assays in patient samples. The results indicate that AHCYL1 is expressed in contrast to the tumor proliferation marker MKI67 and pluripotency/stemness factors, suggesting AHCYL1 could be associated with a more differentiated phenotype. Furthermore, AHCYL1 downregulation produces a more aggressive phenotype in an *in vivo* model with larger tumors, accompanied with greater angiogenic capacity. Understanding the role of AHCYL1 in the tumorigenesis process contributes to a better understanding of tumor biology and the design of future therapeutic strategies.

Key words: plasticity, cancer, lung, stemness, AHCYL1

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quiero agradecer a las instituciones que hicieron posible esta tesis doctoral. A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y a la Universidad de Buenos Aires, por formarme. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por financiar mi doctorado. Al Instituto de Biomedicina de Buenos Aires, por ser mi segunda casa todos estos años y permitirme crecer como científica.

A mi directora, Carolina Perez Castro, porque esta tesis tiene mucho de las dos. Caro, gracias por darme un lugar en tu laboratorio, por contagiar esa fascinación por la investigación, por acompañarme en los momentos de dificultades y fomentar mi crecimiento tanto profesional como personal.

A todos los que estuvieron/están en el laboratorio y me acompañaron en este camino. Fiorella Belforte, por ayudarme a dar esos primeros pasos. Lucía Canedo, por compartir este doctorado juntas. Marina Cuenca, por mostrarme la interdisciplina es fundamental. A Laura Thomas, porque compartimos poco, pero lo disfrutamos. En especial, a Nicolás Budnik, mi compañero de proyecto, esta tesis también tiene mucho de vos, gracias por explicarme con tanta paciencia y por acompañarme en los altos y bajos.

A todo el personal del IBioBA, sobre todo a los becarios, con quienes pasé muchas horas, debatí muchos protocolos, me tomé muchos mates y me sentí muy a gusto. En especial, a mis Braulios, de quienes aprendí muchísimo y además me llevé amigos para toda la vida.

Al Dr. Carlos Vigliano, a Araceli Castro y a todo el Servicio de Anatomía Patológica y cirujanos torácicos de Fundación Favaloro. Por abrirme las puertas de su lugar de trabajo para enseñarme y colaborar con este proyecto. A la Dra. María Eugenia Monge y a la Dra. Malena Manzi del Grupo de Espectrometría de Masas Bioanalítica del CIBION – CONICET, por colaborar conmigo y su paciencia infinita a la hora de explicar, pensar protocolos y discutir resultados. De ambas

colaboraciones me llevo mucho aprendizaje, creo que le aportaron resultados muy interesantes a mi trabajo y voy a estar siempre agradecida por su calidez y compromiso.

En lo personal, esta tesis tampoco hubiese sido posible sin el apoyo de mis amigos y familia. A los So Classic, por acompañarme en la facu y en la vida científica. Los quiero mucho y me encanta seguir compartiendo con ustedes. A mis amigas del IBYME, porque siempre es momento para un café y verlas siempre es un buen plan. A los Pellemanijas, por esos ratitos de manija semanal que me hacen feliz. A Pau, por las horas de audios que escuchaste y lo mucho que te aprendí a querer en estos años. A Flor, Euge y Dani, por ser mi núcleo duro, mis hermanas de la vida y entender todo con solo mirarnos, gracias por todos estos años compartidos, las amo.

A los Bellocq, mi segunda familia. Gracias por acompañarme siempre y ser parte de mi vida.

A mi familia, a mis primos y tíos por estar. A mis abuelos, por sus enseñanzas, su amor y lo que dejaron en mí. A mi tía madrina, porque me malcrias como nadie, me acompañas y me diste la posibilidad de encarar un proyecto hermoso. A mi mamá y mi papá, no hay palabras para decirles lo mucho que los amo, gracias por criarme con libertad y con amor. A mi hermana, te amo, ya eras mi persona preferida y ahora trajiste a mi vida lo más hermoso que conocí que son Francisca y Nicanor. Gracias Juani también por ser parte de esta familia.

A Santi, mi amor, gracias por ser el compañero de vida que sos. Gracias por ser la clave para que estos años y sobre todo estos meses de escritura hayan sido posibles. Con Fardi te amamos y no vemos la hora de estar disfrutando de unos mates en el patio. La vida es mucho más linda cuando la vivo con vos.

## Índice

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
Cáncer de pulmón de células no pequeñas .....	13
Características generales .....	13
Clasificación y Tratamientos .....	15
Células madre tumorales .....	19
Ciclo de la metionina.....	22
Plasticidad celular .....	26
Cultivo 3D como modelo de plasticidad celular .....	26
Transición epitelio-mesenquimal .....	27
Proteína simil s-adenosilhomocisteina hidrolasa 1 (AHCYL1) .....	29
Estructura y modificaciones post-traduccionales .....	30
Expresión de AHCYL1 .....	33
Funciones de AHCYL1 .....	34
AHCYL1 y cáncer .....	37
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
Microbiología.....	44
Preparación de plásmidos .....	44
Plásmidos utilizados .....	45
Vectores para el silenciamiento de AHCYL1 .....	46
Cultivo Celular.....	46
Líneas Celulares.....	46
Formación de Esferas.....	47
Ensayo de conteo de esferas .....	47

Ensayo de dilución extrema limitante (ELDA).....	48
Transfecciones .....	48
Transducción de Plásmidos.....	50
Ensayos de Proliferación .....	51
Transición Epitelio-Mesenquimal inducida por TGF- $\beta$ 1 .....	52
Detección de SAM y SAH mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-HRMS).....	53
Técnicas de Biología Molecular .....	59
Aislamiento de ARN.....	59
Transcripción Reversa.....	60
PCR en tiempo real (qPCR).....	60
Western Blot .....	62
Inmunofluorescencia.....	65
Experimentos <i>in vivo</i> .....	66
Animales .....	66
Tumorigénesis .....	66
Angiógenesís .....	67
Análisis Bioinformático .....	68
Análisis de muestras de pacientes por Inmunohistoquímica.....	69
Inmunohistoquímica.....	69
Comité de Bioética.....	72
Análisis Estadístico .....	72
Análisis estadístico de los datos generados a partir de la experimentación en <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	72
Análisis Estadístico aplicado a los datos de Bioinformática.....	73
Análisis de los datos provenientes de las muestras de pacientes del Banco de Tejidos de la Fundación Favaloro.....	73

Imágenes .....	74
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>76</b>
Expresión de AHCYL1 en pulmón .....	76
Análisis de localización y expresión de AHCYL1 en líneas celulares .....	76
Análisis de la expresión de AHCYL1 en muestras de transcriptómica de pacientes .....	79
Análisis de la expresión de AHCYL1 en muestras de pacientes por inmunohistoquímica .....	83
Estudio de AHCYL1 en modelos de plasticidad tumoral .....	92
Modelo 3D .....	92
Modelo TGF- $\beta$ .....	94
Desarrollo de las líneas celulares estables para el silenciamiento de AHCYL1 .	97
Caracterización de las líneas silenciadas .....	98
Ensayos funcionales realizados con las líneas silenciadas .....	104
Silenciamiento transitorio de AHCYL1 utilizando siARN.....	107
Detección de SAM y SAH por UPLC-HRMS.....	108
Efectos de la modulación por sobreexpresión de AHCYL1 y POU5F1 .....	113
Sobreexpresión de AHCYL1 .....	113
Sobreexpresión de POU5F1 .....	116
Ensayos <i>in vivo</i> .....	118
Ensayo de crecimiento tumoral por xenoinjerto .....	118
Ensayo de angiogénesis <i>in vivo</i> .....	121
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>125</b>
Expresión de AHCYL1 en pulmón .....	126
Estudio de AHCYL1 en modelos de plasticidad tumoral .....	131
Desarrollo de las líneas celulares estables para el silenciamiento de AHCYL1 .....	133
Caracterización de las líneas silenciadas .....	133

Ensayos funcionales realizados con las líneas silenciadas .....	136
Ensayos <i>in vivo</i> .....	136
Detección de SAM y SAH por UPLC-HRMS.....	138
Efectos de la modulación por sobreexpresión de POU5F1 y AHCYL1 .....	140
Conclusión .....	141
Futuras direcciones.....	142
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO .....</b>	<b>145</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>150</b>

## ABREVIATURAS

AHCY	Adenosilhomocisteinasa o S-adenosilhomocisteína hidrolasa
AHCYL1	Adenosilhomocisteinasa tipo 1
CAF	<i>Cancer-Associated Fibroblast</i>
CD133	Antígeno CD133
CD44	Antígeno CD44
CMT	Célula Madre Tumoral
CME	Célula Madre Embrionaria
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
EMT	Transición Epitelio-Mesenquimal
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
INSECT	<i>IN-silico SEarch for Co-occurring Transcription factors</i>
iPSC	<i>induced Pluripotent Stem Cell</i>
IRBIT	<i>IP3 Receptor Binding protein released with IP3</i>
LUAD	<i>Lung Adenocarcinoma</i>
LUSC	<i>Lung Squamous cell carcinoma</i>
MKI67	Antígeno MKI67
MT	Metiltransferasa
NBC	Cotransportador de Sodio y Bicarbonato
NSCLC	<i>Non-small-cell lung cancer</i>
pEMT	Transición Epitelio-Mesenquimal parcial
PIK3C3	Subunidad catalítica de fosfatidilinositol 3-quinasa tipo 3
POU5F1	<i>POU class 5 transcription factor 1</i> (también llamado Oct4)
RNR	Ribonucleótido Reductasa
SAH	S-Adenosil Homocisteína
SAM	S-Adenosil Metionina

shARN	<i>short hairpin RNA</i>
siARN	<i>small interfering RNA</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TME	<i>Tumor microenvironment (microambiente tumoral)</i>
UA	Unidades arbitrarias
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WB	<i>Western blot</i>

# **INTRODUCCIÓN**

# INTRODUCCIÓN

## Cáncer de pulmón de células no pequeñas

### Características generales

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer (18% del total de muertes por cáncer), con un estimado de 2,2 millones de nuevos casos por año y 1,8 millones de muertes anuales a nivel mundial. En hombres es el cáncer más diagnosticado (14,3%) y el de mayor mortalidad (21,5%). En mujeres es el tercero más frecuente, siendo solo superado por el cáncer de mama y colorrectal (8,4%). En cuanto a su mortalidad, es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres (13,7%). La supervivencia luego de 5 años del diagnóstico está entre el 10 y 20% (Sung et al. 2021).

El cáncer de pulmón se puede clasificar en dos grandes grupos: de células no pequeñas o no microcítico (NSCLC, del inglés *non-small cell lung cancer*) y de células pequeñas. El 80% de los casos de cáncer de pulmón corresponden a NSCLC, donde los adenocarcinomas (LUAD, del inglés *lung adenocarcinoma*) y el cáncer de pulmón de células escamosas (LUSC, del inglés *lung squamous cell carcinoma*) son los subtipos más comunes (Herbst, Morgensztern, and Boshoff 2018).

Inicialmente es asintomático y suele ser diagnosticado en estadios avanzados de la enfermedad. Algunos de los síntomas más comunes son tos, neumonías recurrentes en una misma localización anatómica, obstrucciones pulmonares crónicas y disnea (Nasim, Sabath, and Eapen 2019). La etiología más común de la enfermedad está asociada al consumo de tabaco, salvo en LUAD donde es más común que se desarrolle en no fumadores. A su vez, el cáncer de pulmón de no fumadores es mucho más frecuente en mujeres y en el sudeste

asiático donde hay una asociación a la exposición ambiental (Herbst, Morgensztern, and Boshoff 2018). Además del tabaco y la exposición ambiental, se han descrito otros factores de riesgo para desarrollar cáncer de pulmón como la exposición laboral (por ejemplo, los asbestos), la susceptibilidad genética, la radiación y la alimentación desbalanceada (Barta, Powell, and Wisnivesky 2019; Mao et al. 2016).

Como muchos otros tumores sólidos, el cáncer de pulmón es un tumor altamente heterogéneo y se compone de distintas subpoblaciones tumorales (J. Zhang et al. 2014). La heterogeneidad intratumoral explica en parte las recurrencias y el escape a terapia, por lo que entender la complejidad de este fenómeno es fundamental para mejorar la elección terapéutica (De Sousa and Carvalho 2018; Yap et al. 2012).

Las alteraciones moleculares más frecuentes en NSCLC involucran distintas vías de señalización, como mTOR (del inglés, *mammalian Target of Rapamycin*), y procesos celulares como la respuesta al estrés oxidativo, proliferación y ciclo celular. KRAS (del inglés, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) y EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) se encuentran dentro de las mutaciones presentes en los clones fundadores, sugiriendo que tienen un rol clave en la iniciación tumoral. En general, son mutuamente excluyentes, pero en caso de existir mutaciones en KRAS esos tumores presentan resistencia a los inhibidores de EGFR. Otras mutaciones frecuentes aparecen en los genes TP53, KEAP1, STK11, NF1, ROS1, ALK, MET y CDKN2A (Shtivelman et al. 2014). La genómica de los pacientes de cáncer de pulmón es muy distinta entre no fumadores y fumadores, ya que estos últimos tienen mayores tasas de mutación y en general son mutaciones no accionables, es decir, que no pueden ser tratadas con las terapias dirigidas conocidas. En contraposición, los no fumadores suelen tener alteraciones accionables como son las mutaciones activantes en EGFR y las translocaciones de ROS1 y ALK (Barta, Powell, and

Wisnivesky 2019; Herbst, Heymach, and Lippman 2008; Herbst, Morgensztern, and Boshoff 2018; Mogi and Kuwano 2011).

Dentro de los marcadores más utilizados para diagnóstico de cáncer de pulmón se encuentra el marcador de proliferación MKI67 (antígeno MKI67). Esta proteína nuclear está presente en las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis) y no se expresa en la fase G0 (Y. Liu et al. 2017). El marcador MKI67 se encuentra altamente expresado en tumores con alta tasa de proliferación y por eso se asocia a una peor prognosis (S. S. Menon et al. 2019; C. Yang et al. 2018). MKI67 es un factor pronóstico en cáncer de próstata, mama, pulmón, cérvix y sistema nervioso central, entre otros (L. T. Li et al. 2015).

### **Clasificación y Tratamientos**

El cáncer de pulmón se clasifica y estudia de acuerdo a su histología, en algunos casos se evalúan ciertos marcadores moleculares conocidos, y a partir de ese análisis se determina el tratamiento. Recientemente, se están comenzando a estudiar mecanismos no-genéticos como la epigenética, la transcriptómica y el microambiente tumoral debido la gran heterogeneidad que hay entre pacientes y también intratumoral (Tavernari et al. 2021). Esto permite evaluar en un contexto más amplio las terapias y el posible pronóstico de los pacientes.

Luego de un diagnóstico de cáncer de pulmón se clasifica a los tumores de acuerdo a la clasificación TNM (tumor primario-nódulo/ganglio linfático-metástasis distante) como se muestra en la **Tabla 1** (Lababede and Meziane 2018).

**Tabla 1. Clasificación TNM en cáncer de pulmón de acuerdo con *The 8th Edition of TNM Staging of Lung Cancer*.**

<b>Tumor Primario (T)</b>	
<b>T<sub>x</sub></b>	Tumor no puede ser reconocido por broncoscopía
<b>T<sub>0</sub></b>	No hay evidencia de tumor
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T<sub>1</sub></b>	Tumor ≤ 3 cm, localizado en o distal a los bronquios lobulares, sin invasión local
<b>T<sub>2</sub></b>	Tumor > 3 cm ≤ 5 cm o que involucra a los bronquios principales o con invasión de la pleura visceral
<b>T<sub>3</sub></b>	Tumor > 5 cm ≤ 7 cm o que involucra la pared del tronco, la pleura parietal, el pericardio, el nervio frénico o tiene nódulos satélites en el mismo lóbulo del tumor primario
<b>T<sub>4</sub></b>	Tumor > 7 cm con invasión de la carina o la tráquea o cualquier tumor con invasión del mediastino, diafragma, corazón, vasos principales, nervio laríngeo, carina, tráquea, esófago, columna vertebral o con tumor en otro lóbulo del pulmón ipsilateral del tumor primario
<b>Nódulos linfáticos (N)</b>	
<b>N<sub>x</sub></b>	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
<b>N<sub>0</sub></b>	No están involucrados los ganglios linfáticos
<b>N<sub>1</sub></b>	Ganglios ipsilaterales peribronquiales y/o ganglios hiliares (incluye ganglios intrapulmonares)
<b>N<sub>2</sub></b>	Ganglios ipsilaterales mediastinales y/o ganglios subcarinales
<b>N<sub>3</sub></b>	Ganglios contralaterales mediastinales o hiliares; ipsilaterales o contralaterales escalenos o supraclaviculares
<b>Metástasis Distante (M)</b>	
<b>M<sub>0</sub></b>	No se observa metástasis distante
<b>M<sub>1</sub></b>	Presencia de metástasis distante
<b>M<sub>1a</sub></b>	Tumor en pulmón contralateral o en ganglio pleural/pericardial
<b>M<sub>1b</sub></b>	Metástasis extratorácica simple, incluyendo ganglios linfáticos no-regionales
<b>M<sub>1c</sub></b>	Metástasis extratorácica múltiple en uno o más órganos

Adaptada de (Lababede and Meziane 2018).

Brevemente, a partir de esta clasificación se determina el tamaño del tumor primario (T), si hay compromiso de los ganglios linfáticos (N) y si se observa metástasis en el mismo u otro órgano (M). Con esta información, se puede clasificar el cáncer de pulmón en estadios de acuerdo a la **Tabla 2**:

**Tabla 2. Estadios tumorales de acuerdo la clasificación TNM.**

Estadio		TNM
<b>Carcinoma oculto</b>		TxN0M0
<b>0</b>		TisN0M0
<b>I</b>	IA1	T1aN0M0-T1(mi)N0M0
	IA2	T1bN0M0
	IA3	T1cN0M0
<b>II</b>	IB	T2aN0M0
	IIA	T2bN0M0
<b>III</b>	IIB	T (1–2) N1M0-T3N0M0
	IIIA	T (1–2) N2M0-T3N1M0-T4N (0–1) M0
	IIIB	T (1–2) N3M0-T (3–4) N2M0
<b>IV</b>	IIIC	T (3–4) N3M0
	IVA	Cualquier T, Cualquier N, M1a, b
	IVB	Cualquier T, Cualquier N, M1c

Adaptado de (Lababede and Meziame 2018)

Para tumores detectados tempranamente en general se recurre a la cirugía (Howington et al. 2013). La quimioterapia adyuvante es recomendada para pacientes en estadio II con resección completa, en general no se recomienda para los de estadio I. La radiación post-operación solo se recomienda en casos en que la resección completa no haya sido posible. Aquellos pacientes que no son candidatos para resección quirúrgica, pueden recurrir a la radioterapia corporal estereotáctica (Stokes and Rusthoven 2018).

La elección del tratamiento para pacientes en estadios avanzados dependerá del grado de compromiso de los ganglios y/o metástasis. Los pacientes estadio III con poco compromiso linfático (N1) pueden ser candidatos para cirugía seguida de quimioterapia y/o radiación (Nasim, Sabath, and Eapen 2019). Aquellos con ganglios comprometidos (N2) tienen como alternativa la resección quirúrgica después de terapia de inducción o tratamiento primario. Pacientes clasificados como N3 ya no son considerados para cirugía. Por último, los pacientes con NSCLC estadio IV pueden recibir quimioterapia basada en platino, generalmente con protocolos que involucran dos fármacos (Ramnath et al. 2013; Socinski et al. 2013). Previo al uso de la inmunoterapia, se solía tratar los tumores

metastásicos con una combinación de un quimioterapéutico basado en platino (carboplatino o cisplatino) y gemcitabina, vinorelbina o algún taxano (paclitaxel o docetaxel) (Duma, Santana-Davila, and Molina 2019).

Actualmente, los avances en la medicina de precisión han llevado a desarrollar terapias dirigidas para ciertas mutaciones *driver* en diversos tipos de tumores, incluyendo al cáncer de pulmón (Shah and Masters 2020). En 2004, se descubrió la primera mutación accionable en EGFR. Los pacientes con tal mutación mostraron respuestas favorables frente al uso del inhibidor de tirosina quinasas (TKI) gefitinib (Lynch et al. 2004). Casi todos los pacientes con mutaciones en el EGFR responden bien a los TKIs, salvo aquellos que tienen la mutación secundaria T790M. Para esta mutación se vieron mejores respuestas utilizando osimertinib (Goss et al. 2016; Soria et al. 2018). EGFR no es la única mutación accionable en NSCLC. La fusión EML4-ALK, los rearreglos en ROS-1 y las mutaciones en BRAF también responden a terapias dirigidas (Shah and Masters 2020). Dada la variedad y especificidad de tratamientos disponibles, el estudio molecular de los tumores NSCLC se ha convertido en una herramienta fundamental para elegir la mejor opción terapéutica para el paciente,

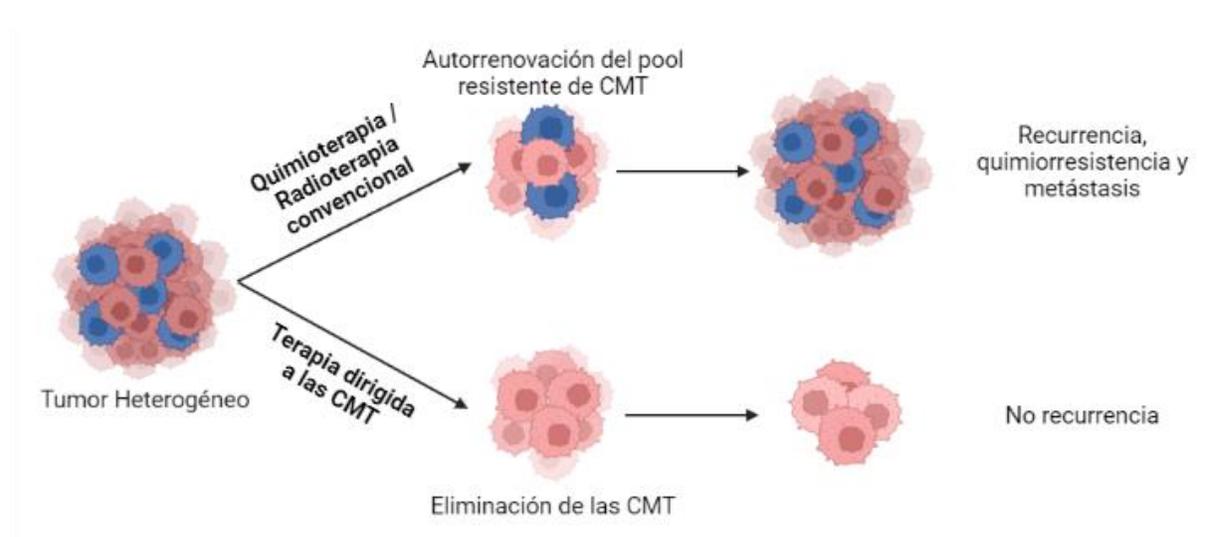
Más allá de la identificación de blancos moleculares, muchos pacientes no presentan estas mutaciones. Como se mencionó previamente, como primera línea de tratamiento se recurre a la quimioterapia basada en platino combinando dos drogas. En los últimos años, la inmunoterapia ha empezado a ganar terreno. La misma consiste en inhibidores de los *checkpoints* del sistema inmune que alteran el microambiente tumoral y desbloquean la respuesta inmune que suele ser evadida por las células tumorales. En este sentido, la expresión de PD-L1 es evaluada en pacientes, ya que está involucrada en la inhibición de las activaciones de los linfocitos T y, por ende, es un mecanismo de inmunoevasión (Van den Bulk, Verdegaal, and De Miranda 2018; Duma, Santana-Davila, and Molina 2019; Herbst et al. 2016).

En conclusión, los últimos años se ha avanzado muchísimo en entender la biología tumoral del cáncer de pulmón y se han encontrado diversas alternativas

para su tratamiento. Sin embargo, es necesario encontrar biomarcadores que permitan el diagnóstico temprano, así como también predecir la respuesta a la terapia. Seguir investigando estas alternativas permitirá encontrar terapias más efectivas y mejorar la calidad de vida de cada paciente.

## Células madre tumorales

Las células madre tumorales (CMTs, en inglés conocidas como *cancer stem cells*) son una subpoblación tumoral que posee tanto la capacidad de iniciar un tumor como de repoblarlo luego del tratamiento debido a su alta plasticidad celular. Se cree son responsables de la recurrencia, dormancia y metástasis, y se propone que su presencia es el principal motivo por el cual fracasan los tratamientos (Batlle and Clevers 2017) (**Figura 1**).



**Figura 1. Esquema sobre la importancia de encontrar un tratamiento dirigido hacia las CMTs.** Adaptado de (MacDonagh et al. 2016).

Al igual que las células madre embrionarias (CMEs, en inglés conocidas como *embryonic stem cells*), tienen tres propiedades distintivas: la capacidad de autorrenovarse, de diferenciarse en distintos linajes y de proliferar (Jordan,

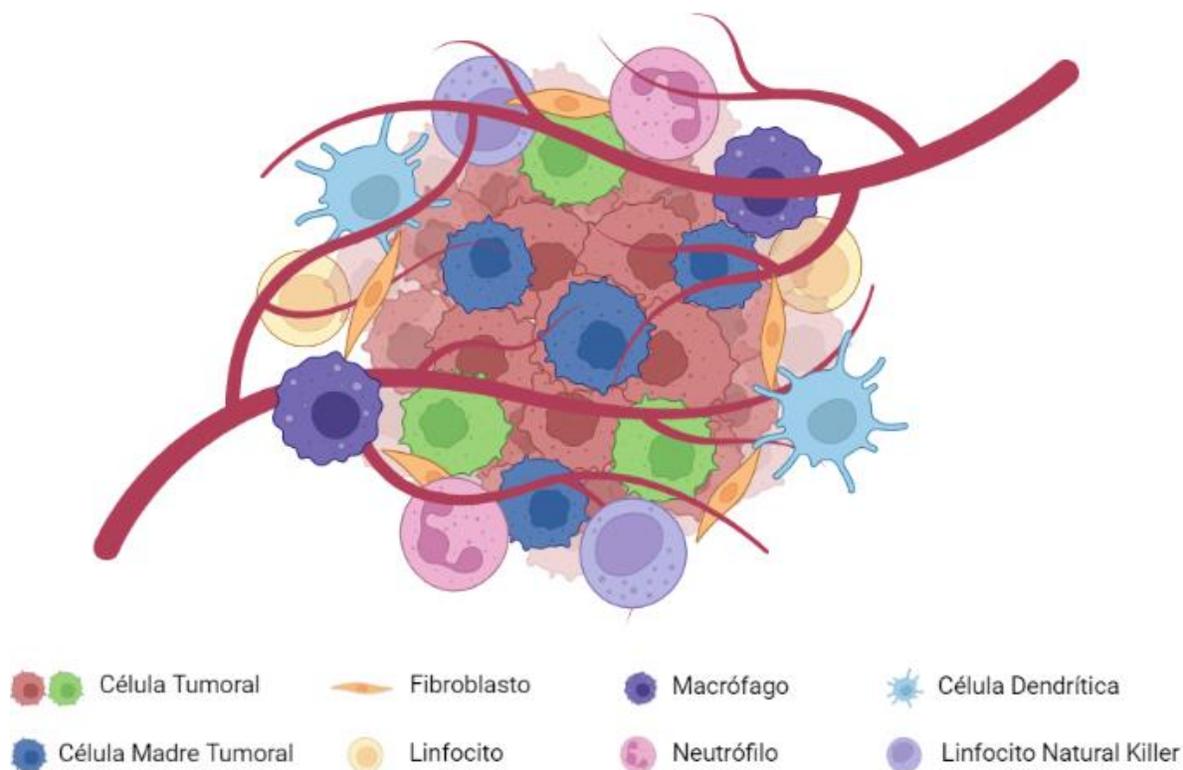
Guzman, and Noble 2006). Recientemente, se ha encontrado evidencia que sostiene que dentro de un tumor coexisten distintos subtipos de CMTs, con distinta capacidad proliferante y adaptación al medio circundante; en definitiva tienen mayor heterogeneidad y plasticidad de lo que se creía en un principio, dificultando su identificación y tratamiento (Clevers 2015; Talukdar et al. 2019).

Las CMTs comparten vías de señalización, expresión génica y mecanismos de regulación con las CMEs. La expresión de los factores del *core* transcripcional (*POU5F1-OCT4/SOX2/NANOG*) es fundamental para el mantenimiento del estado de pluripotencia en CMEs y también para la reprogramación de células somáticas *in vitro* y generación de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, del inglés, *induced pluripotent stem cells*) (Boyer et al. 2005; Okita and Yamanaka 2010).

Hay diversas hipótesis sobre el origen de las CMTs en tumores sólidos. En algunos, las células madre de los tejidos pueden ser las que sufran transformación y den lugar a la aparición de CMTs. En otros, células parcialmente diferenciadas pueden transformarse y luego adquirir un fenotipo pluripotente (Hanahan and Weinberg 2011). Debido a su relevancia, se descubrieron diversos biomarcadores de CMTs. En pulmón, se han seleccionado para esta tesis los marcadores de CMTs *CD44*, *CD133*, *POU5F1*, *SOX2*, *HMG2*, *ITGA6* (Herreros-Pomares et al. 2019; Mansoori et al. 2021; Walcher et al. 2020). Como marcadores de diferenciación en pulmón se han seleccionado *MUC5B* y *STFPC* (X. Huang et al. 2022; Jacob et al. 2017; B. Li et al. 2019; Y. L. Sun et al. 2021; Wakata et al. 2015).

Como se mencionó, los tumores de cáncer de pulmón, como muchos otros tumores sólidos, son heterogéneos (Marusyk et al. 2014; Tang 2012; Tavernari et al. 2021; Wu et al. 2021; J. Zhang et al. 2014). El ecosistema o microambiente tumoral (TME, conocido por sus siglas en inglés *tumor microenvironment*) es el nicho estructural y funcional donde ocurre la progresión tumoral. Se compone de las células tumorales; células inmunes infiltrantes, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos; células estromales como los fibroblastos asociados

al cáncer (CAFs, de sus siglas en inglés *cancer-associated fibroblasts*) o las células mesenquimales estromales; células endoteliales; y otros tipos celulares junto con componentes no-celulares del tejido (Iranmanesh et al. 2021; Jarosz-Biej et al. 2019) (**Figura 2**).



**Figura 2. Representación esquemática de la heterogeneidad celular de un tumor y del microambiente tumoral.**

La hipoxia es una propiedad importante del TME que está muy asociada a la progresión tumoral, agresividad, metástasis y resistencia a terapias (Y. Li, Zhao, and Li 2021). Frente a la hipoxia, las células tumorales secretan VEGF y activan el proceso de angiogénesis; en NSCLC la expresión de VEGF se asocia a un aumento en la microvasculatura tumoral y a una peor prognosis (Pallis and Syrigos 2013). La hipoxia también afecta el metabolismo de las células tumorales, promoviendo la acidosis debido al bajo pH extracelular. Por ende, en un ambiente

hipóxico las células tumorales son forzadas a pasar de la fosforilación oxidativa a la glucólisis. La expresión de los factores inducibles por hipoxia (HIFs) es la que lleva a un aumento de los niveles de transportadores de glucosa y de los genes del metabolismo de la glucosa (Y. Li, Zhao, and Li 2021).

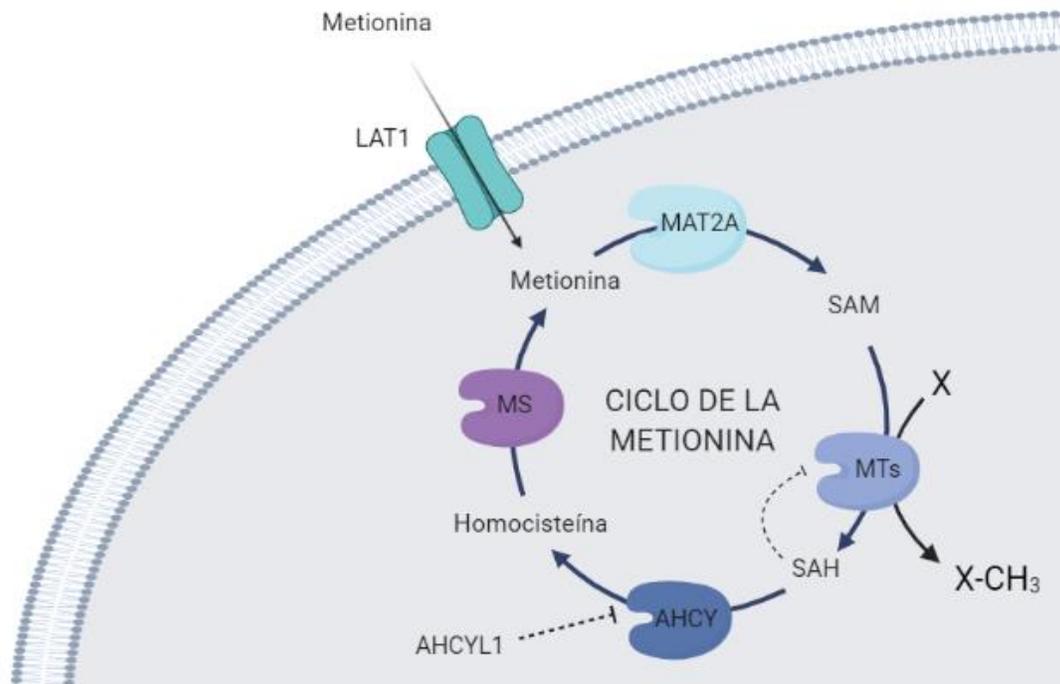
Las mutaciones genéticas que ocurren en las células tumorales de alguna manera modelan el TME. Los tumores de NSCLC tienen una alta tasa de mutación somática (en inglés se conoce como *tumor mutation burden*, TMB) y que se define como el número de mutaciones no sinónimas por megabase (Herbst, Morgensztern, and Boshoff 2018). Por ende, los TME de NSCLC son muy dinámicos, ya que hay una comunicación bidireccional entre las células tumorales *per se* y el resto del nicho. Sumado a esto, en los últimos años se ha reportado que los mecanismos epigenéticos así como los metabólicos juegan un papel importante en este proceso dinámico (D. R. Menon et al. 2020). Esto produce que los tumores NSCLC tengan mecanismos que les permitan ser resistentes a la terapia (Altorki et al. 2019; D. R. Menon et al. 2020). Por eso, a futuro se espera optimizar la combinación de terapias que se dirijan tanto a la genómica del tumor, a la regulación de la epigenética y metabólica, como a las particularidades de su TME (dirigida a angiogénesis o el sistema inmune) (Altorki et al. 2019).

### **Ciclo de la metionina**

Como se mencionó anteriormente, el TME afecta el metabolismo de las células tumorales. En particular, las CMTs se diferencian del resto de las células tumorales por su fenotipo metabólico (Cuyàs, Verdura, and Fernández-arroyo 2017). Normalmente, las células utilizan el ciclo del ácido tricarboxílico acoplado a la fosforilación oxidativa como fuente de energía; pero las células tumorales necesitan adaptar su metabolismo a una alta tasa de proliferación y a condiciones de restricción de nutrientes y oxígeno. Para ello, obtienen ATP vía glucólisis que es más rápido, pero menos eficiente que la fosforilación oxidativa y es por eso que necesitan mayor cantidad de glucosa (Sancho, Barneda, and Heeschen 2016).

Más allá de los requerimientos metabólicos bioenergéticos y para la biosíntesis, es interesante incluir la regulación epigenética de la mano del metabolismo. El metabolismo de 1-carbono involucra el ciclo de la metionina y el ciclo del folato y tiene un fuerte impacto en la regulación epigenética, ya que es fundamental en la metilación del ADN, proteínas asociadas y ARN (Clare et al. 2019; Fernández-Arroyo, Cuyàs, and Bosch-barrera 2015). Varios autores demostraron que en distintos tipos de células pluripotentes o que han sufrido procesos de reprogramación, como las CMEs en ratón, las iPSCs (Fernández-Arroyo, Cuyàs, and Bosch-barrera 2015; Shiraki et al. 2013) y las CMT de pulmón (Dann et al. 2015; Z. Wang et al. 2019), está activado este ciclo, sugiriendo que la reprogramación de estas células mediada por ciclo de la metionina sería crítica.

El ciclo de la metionina es el principal generador de S-adenosil-metionina (SAM), el dador de metilos por excelencia (**Figura 3**). La incorporación de metionina se realiza por el transportador LAT1, luego es convertida en SAM por la enzima metionina-adenosil-transferasa (MAT2A). La transferencia de grupos metilo es mediada por metiltransferasas (MTs), siendo SAM el sustrato y S-adenosilhomocisteína (SAH) el producto de esta reacción (Locasale 2013; Sanderson et al. 2019). SAH es capaz de unirse a las MTs con mayor afinidad que SAM, inhibiendo de esta manera las reacciones de metilación (Hoffman, Cornatzer, and Duerre 1979; Sanderson et al. 2019). La enzima S-adenosilhomocisteína hidrolasa (AHCY) es la que cataliza la hidrólisis de SAH a homocisteína, la cual puede ser convertida en cisteína por la vía de transulfuración o puede ser reconvertida a metionina por la metionina sintasa (MS). La proteína adenosilhomocisteína hidrolasa tipo 1 (AHCYL1) regularía negativamente la actividad de AHCY (Devogelaere, Sammels, and Smedt 2008; Grbeša et al. 2017; Huang et al. 2021).



**Figura 3. Representación esquemática del ciclo de la metionina.** El ciclo de la metionina involucra a las enzimas MAT2A, MTs, AHCY y MS, al transportador LAT1 y a los metabolitos metionina, SAM, SAH y Homocisteína. Este ciclo es fundamental para los procesos de metilación de la célula. Las líneas punteadas significan inhibición. La inhibición de las MTs por unión de SAH fue demostrada, mientras que la inhibición de AHCYL1 a AHCY está postulada. Adaptado de (Sanderson et al. 2019)

Las células detectan el estado metabólico del metabolismo de un carbono a través de la modulación de la relación SAM/SAH, que a su vez modifica la cinética de las enzimas que median la metilación de histonas y de metilación del ADN y, en última instancia, culmina en la regulación de la expresión génica en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (Kadayifci, Zheng, and Pan 2018; N. Zhang 2018). Por lo tanto, el balance entre la disponibilidad de SAM y la acumulación de SAH es importante para todas las reacciones de metilación. En particular, la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3) es generalmente una marca de activación transcripcional (Berger 2007). Shiraki demostró que la privación de metionina resulta en una reducción del nivel de SAM, una disminución de la expresión de NANOG, y una disminución de la metilación de la H3K4me3 que hace que las

CMEs e iPSCs humanas se dirijan a diferenciación, sugiriendo que los niveles intracelulares de SAM son claves para mantener el estado pluripotente (Shiraki et al. 2013). En este mismo sentido, se observó que la O-Glucosil-N-Acetilación de AHCY puede regular el estado pluripotente en CMEs de ratón (Zhu et al. 2020). Brevemente, esta modificación postraducciona de AHCY aumenta su actividad y es importante para mantener la H3K4me3 que sostiene el estado indiferenciado. Bloquear la glicosilación de AHCY o silenciar su expresión disminuye los niveles de H3K4me3 y promueve la diferenciación de las CMEs. Es decir, mayor actividad de AHCY implicaría un estado más indiferenciado de estas células.

La regulación de los niveles de SAH es otro punto importante para tener en cuenta. Previamente, se mencionó su afinidad a las MTs y consecuente inhibición de los procesos de metilación. Se ha reportado que la acumulación de SAH causaría daño al ADN y citotoxicidad en células hepáticas y de microglía (C. C. Liu et al. 2009). Además, la disminución de la expresión de AHCY (que es la enzima que convierte a SAH en homocisteína) lleva a la acumulación de SAH. Esto se ve acompañado de la activación de mecanismos de respuesta al daño del ADN, lo cual tiene como consecuencias el arresto del ciclo celular y la disminución de la proliferación (Beluzic et al. 2018).

Interesantemente, se describió en *Drosophila melanogaster* que el silenciamiento de AHCYL1 y AHCYL2 (una proteína relacionada a la familia de proteínas AHCY, ver más adelante) extiende la vida media de las moscas (Parkhitko et al. 2016) demostrando que el ciclo de la metionina varía a lo largo de la vida de las moscas. La reprogramación metabólica en moscas jóvenes por el silenciamiento de AHCYL1/2 evita la acumulación de SAH dependiente de la edad y permite aumentar la longevidad.

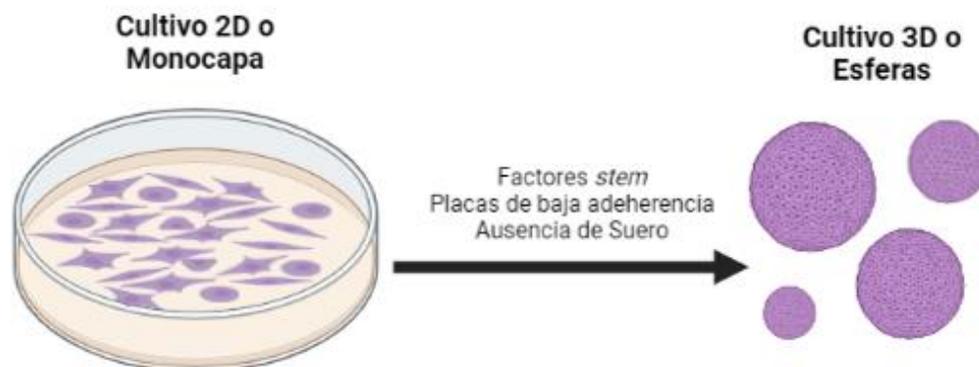
En resumen, el metabolismo de las CMTs tiene características distintivas. Dentro de estas características, el ciclo de la metionina es crítico para la regulación epigenética, debido a que las reacciones de metilación dependen de su funcionamiento.

## Plasticidad celular

La plasticidad celular se define como la habilidad de las células para cambiar de manera reversible su fenotipo (Nieto 2013). La identidad celular es una característica fundamental para las células. Esto permite que se organicen en tejidos, los cuales se componen de células de distinta jerarquía y que tienen distinto grado de diferenciación (Rao Tata and Rajagopal 2016). Las CMTs tienen alto grado de plasticidad celular y recientemente se propuso que las células tumorales pasan de estados CMT a estados no-CMT de manera dinámica y dependiente de señales intra y extratumorales (da Silva-Diz et al. 2018).

## Cultivo 3D como modelo de plasticidad celular

Los cultivos tridimensionales (3D), también llamados esferas o esferoides, se utilizan como modelo de tumores sólidos, ya que, en parte, recapitulan mejor algunas de sus propiedades que los cultivos en dos dimensiones (2D) (Bahmad et al. 2018) (**Figura 4**).

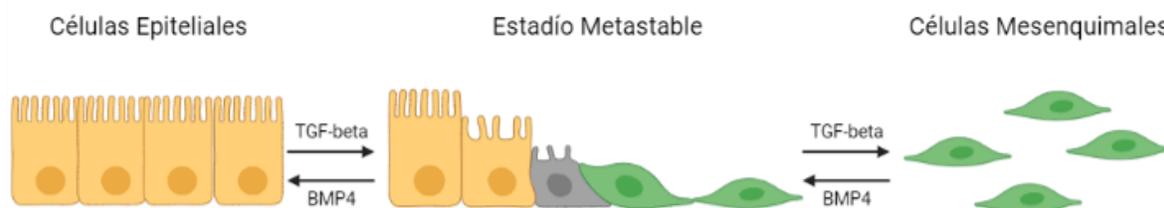


**Figura 4. Esquema sobre modelos de cultivo celular.** En el cultivo de 2 dimensiones (2D) o monocapa, las células están mayormente diferenciadas. Al cultivar esas mismas células en placas de no adherencia, en ausencia de suero y con factores stem (como B27, FGF y EGF) las células crecen en un formato tridimensional formado esferas (cultivo 3D).

Los cultivos 3D se realizan en placas de baja adherencia y en presencia de medio *stem* formulado (ver **Materiales y Métodos**) con factores inductores de pluripotencia (Jeongyub Kim et al. 2012; Yuan et al. 2004). Son estas condiciones particulares de cultivo que permiten que las células crezcan en esferoides y se enriquezca la población de CMTs, aumentando la expresión de marcadores de pluripotencia. Estos cultivos presentan alto grado de heterogeneidad celular y se permite una mayor interacción célula-célula. Es interesante mencionar que solo las CMEs y las CMTs son capaces de crecer en medios libre de anclaje como esferoides *in vitro* (Manzo 2019).

### **Transición epitelio-mesenquimal**

La transición epitelio-mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés *epithelial-to-mesenchymal transition*) es un ejemplo de plasticidad con gran relevancia para la embriogénesis, la cicatrización de heridas y la progresión maligna (Dongre and Weinberg 2019). Es un proceso reversible, condicionado en parte por el ambiente, en el cual una célula epitelial adquiere un fenotipo mesenquimal, lo cual le permite migrar e invadir otros tejidos (Fabregat, Malfettone, and Soukupova 2016). A la inversa, el proceso de transición mesenquimal-epitelial (MET) permite que la célula migratoria colonice un cierto nicho y se diferencie (Bakir et al. 2020). Esto se ve esquematizado en la **Figura 5**.



**Figura 5. Esquema del proceso de Transición epitelio-mesenquimal.** Las células epiteliales pueden transformarse en células mesenquimales mediante la inducción con agentes inductores como TGF- $\beta$ , pasando por un estadio metaestable de mayor plasticidad (también llamado EMT parcial (pEMT)). El proceso es reversible y puede inducirse por ejemplo con BMP4. Adaptado de (Bakir et al. 2020).

Durante el EMT, se remodelan las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, lo que conduce al desprendimiento de las células epiteliales entre sí y de la membrana basal subyacente, y se activa un nuevo programa transcripcional para promover el destino mesenquimatoso. Este complejo programa transcripcional está mediado por diversos factores de transcripción, como son SNAIL, SNAI2, TWIST, ZEB1 y ZEB2. En algunas células tumorales, al expresar los TFs de EMT aumenta el potencial de iniciación tumoral y las evidencias indican que las CMTs muestran en general tener inducido el programa de EMT (Lamouille, Xu, and Derynck 2014; Mani et al. 2008; Pirozzi et al. 2011). Los factores de transcripción de EMT reprimen la expresión de genes del fenotipo epitelial como E-cadherina, claudinas, ocludinas, entre otros y aumentan la expresión de los genes mesenquimales, como N-cadherina, vimentina, fibronectina, SNAIL, TWIST, ZEB (Lamouille, Xu, and Derynck 2014).

Durante el proceso de EMT, hay un estadio intermedio (llamado metaestable o EMT parcial, pEMT) en el cual las células atraviesan algún grado de reprogramación e incluso se propone que hay inducción de genes embrionarios (Bakir et al. 2020; Fabregat, Malfettone, and Soukupova 2016; Friedmann-Morvinski and Verma 2014). En este sentido, tanto el EMT como el estado de pluripotencia se proponen como estados flexibles, dinámicos y no como estadios fijos (Medema 2013).

Uno de los inductores más conocidos del proceso de EMT es el factor de crecimiento transformante TGF- $\beta$ . La vía de TGF- $\beta$  se encuentra involucrada en procesos de diferenciación celular y también de sostenimiento del estado indiferenciado, donde este rol dual sugeriría que el contexto celular es capaz de regular su función. Parte de sus funciones son ejercidas por las proteínas SMAD que son sus intermediarios intracelulares y funcionan como factores de transcripción (Derynck and Zhang 2016). El rol de TGF- $\beta$  en los procesos tumorales también sería dual, donde en estadios tempranos sería un supresor tumoral y en estadios avanzados promueve la progresión (Bellomo, Caja, and

Moustakas 2016; Cantelli et al. 2017). Además, la expresión y activación de los factores de transcripción de EMT se da en respuesta a otros inductores como EGF, FGF, PDGF, Wnt, Notch, por mencionar algunos (Dongre and Weinberg 2019; Gonzalez and Medici 2014).

Si bien durante muchos años se asoció la invasión y la metástasis a procesos de EMT y a las CMTs, reducirlo solo a eso sería simplificar un proceso que es mucho más complejo. Esa complejidad reside no solo en heterogeneidad de las CMTs sino también en los nichos primario y metastásico, el rol del sistema inmune, los factores secretados por las células involucradas, entre otros (Medema 2013). En la actualidad, se cree que los procesos de EMT-MET dependen mucho del tipo celular y de su contexto. Las células tumorales se moverían dentro del espectro EMT-MET con fluidez y no considerando dos destinos celulares dicotómicos, como evidencia el concepto de EMT parcial (pEMT) (Bakir et al. 2020).

### **Proteína simil s-adenosilhomocisteina hidrolasa 1 (AHCYL1)**

El gen *AHCYL1* fue seleccionado como gen candidato a partir de una búsqueda *in silico* utilizando la herramienta bioinformática INSECT (*IN-silico SEarch for Co-occurring Transcription factors*) desarrollada por nuestro grupo en colaboración con bioinformáticos (Parra et al. 2016; Rohr et al. 2013). El algoritmo INSECT permite seleccionar genes que tengan elementos regulatorios en cis para diferentes factores de transcripción a nivel genómico, es decir, genes que sean corregulados por distintos factores de transcripción de interés. Para realizar esta búsqueda se partió de bases de datos públicas (Grskovic et al. 2007; Jonghwan Kim et al. 2008; Y. Sun et al. 2007, 2008) y se analizaron regiones regulatorias de genes expresados en células pluripotentes embrionarias y de carcinoma embrionario. Se buscó la presencia de módulos cis-regulatorios (CRMs, del inglés *Cis-regulatory modules*) a donde se unieran potencialmente tanto los factores del core como las proteínas SMAD, con el fin de encontrar genes blanco que fueran

corregulados por ambos complejos. De una megalista inicial de 6000 genes, se encontraron 13 genes candidatos con estas características y que no habían sido previamente reportados bajo esta potencial vía de co-regulación. Entre ellos, se seleccionaron 6 (3 genes ortólogos humanos y murinos) que presentaron mayor score. Se estudió la regulación de estos genes seleccionados por la familia de TGF- $\beta$  en células embrionarias humanas y murinas y se descartaron aquellos que no respondieron frente a estimulación de la vía de interés en ensayos bioquímicos. Dentro del grupo de genes respondedores a la vía de señalización por citoquinas de la familia de TGF- $\beta$ , se seleccionen dos genes candidatos: *KANSL2* ((Ferreira Solari et al. 2016) y tesis doctoral de Lucía Canedo en colaboración con el grupo de trabajo) y *AHCYL1* (seminario de licenciatura de Nicolas Budnik). En esta tesis nos focalizaremos en el estudio de *AHCYL1*.

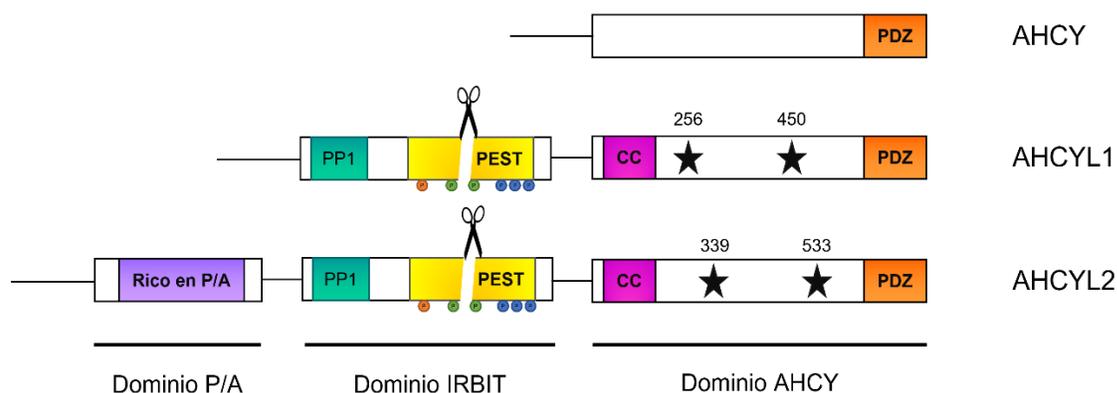
### **Estructura y modificaciones postraduccionales**

La familia *AHCY-like* (*AHCYL*) está compuesta por las proteínas *AHCYL1* y *AHCYL2*. Reciben este nombre por tener alta homología de secuencia con la enzima *AHCY*, la cual participa en el ciclo de la metionina y está relacionada a las reacciones de metilación en la célula. Tanto *AHCYL1* como *AHCYL2* poseen un dominio *AHCY*, pero con ciertas mutaciones puntuales que determinan que no sea funcional y por este motivo no tengan actividad hidrolasa, de ahí su nombre *AHCY-like* (Devogelaere, Sammels, and Smedt 2008).

Además del dominio *AHCY*, la subfamilia *AHCYL* posee otros dominios estructurales (**Figura 6**). El dominio *IRBIT* se compone de un sitio de unión a la proteína fosfatasa 1 (*PP1*) seguido de un motivo *PEST* que puede ser clivado y que contiene múltiples sitios de fosforilación (Devogelaere, Sammels, and Smedt 2008)). Estas fosforilaciones son las que regulan el clivaje proteolítico, así como la función y localización subcelular de *AHCYL1*. Se ha propuesto que la forma fosforilada de *AHCYL1* favorece la unión a sus blancos citoplasmáticos, mientras que su desfosforilación o clivaje proteolítico inducen la translocación a núcleo. El

dominio IRBIT es 92% idéntico y tiene una similitud de 97% entre AHCYL1 y AHCYL2, lo cual sugiere que podrían tener funciones en común.

Finalmente, solamente AHCYL2 posee un dominio P/A en el extremo N-terminal. El mismo es rico en prolinas y alaninas y por su alto contenido en prolinas sugiere que este dominio es no-estructurado y su función todavía no es clara (Devogelaere, Sammels, and Smedt 2008).



**Figura 6. Esquema de los dominios estructurales de la familia AHCY.** El dominio AHCY de las proteínas AHCYL posee mutaciones puntuales (estrellas) que hacen que no tenga actividad enzimática y cuenta con un dominio coiled-coil (CC). El motivo PDZ ligando está conservado en todas. El dominio IRBIT tiene un sitio de unión a la fosfatasa PP1 seguido de un motivo PEST que es susceptible a múltiples fosforilaciones y puede ser clivado. La fosforilación de la Ser-68 (naranja) por una quinasa no identificada permite la subsecuente fosforilación de las Ser-71 y Ser-74 por CK1 (verdes). Las quinasas de Thr-82, Ser-84 y Ser-85 (azules) no fueron identificadas. AHCYL2 además tiene un dominio P/A adicional rico en prolinas y alaninas. Figura adaptada de (Devogelaere, Sammels, and Smedt 2008).

AHCYL1 es capaz de interactuar con diversas proteínas (Devogelaere, Sammels, and Smedt 2008; D. Yang, Shcheynikov, and Muallem 2011). La interacción con el receptor de IP3 (IP3R) es lo más descrito en bibliografía y ésta depende de diversas fosforilaciones en el motivo PEST (Ando et al. 2006; Devogelaere et al. 2006). La fosforilación de la serina (Ser) 68 por una proteína quinasa desconocida permite la fosforilación subsiguiente de las Ser-71 y Ser-74

por la caseína quinasa 1 (CK1). Estas últimas dos serían necesarias y suficientes para la interacción entre AHCYL1 e IP3R. Asimismo, los cotransportadores de  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (NBCs) interactúan con AHCYL1 y también requieren de la fosforilación de las Ser-71 y Ser-74, lo cual podría implicar que esto es una característica más universal para las interacciones entre proteínas a través del dominio IRBIT (Shirakabe et al. 2006). La función de AHCYL1 es dependiente de la fosforilación, por ende, el proceso de desfosforilación es fundamental para su regulación. PP1 desfosforila la Ser-68 y previene la fosforilación sucesiva de Ser-71 y Ser-74 (Devogelaere et al. 2007). Se propone que la falta de fosforilación promueve el clivaje y AHCYL1 transloca a núcleo.

Además de las fosforilaciones/desfosforilaciones reversibles, AHCYL1 se puede clivar de manera irreversible. El sitio de clivaje es dentro del dominio IRBIT entre los residuos 73 y 74 y una vez clivada ni AHCYL1-(1-73) ni AHCYL1-(74-530) puede interactuar con IP3R (Devogelaere et al. 2006). Cuando las proteínas AHCYL son clivadas (**Figura 6**) pierden parte de su porción N-terminal y queda su extremo C-terminal que es muy similar a AHCY.

Tanto AHCYL1 como AHCY fueron reportadas en citoplasma y en núcleo (Devogelaere, Sammels, and Smedt 2008; Grbeša et al. 2017). AHCYL1 fue descrita principalmente en citoplasma, con parte anclada al retículo endoplasmático. Como ya fue mencionado, el dominio IRBIT de AHCYL1 es funcional cuando está fosforilado y en ese contexto se une a proteínas blanco en el citoplasma. La inactivación de este dominio, ya sea por desfosforilación o clivaje, favorecería la unión a blancos nucleares como AHCY (Devogelaere, Sammels, and Smedt 2008). Muchas de las reacciones de transmetilación de ADN, ARN y proteínas se dan en el núcleo, donde es fundamental que estén MTs y también AHCY para hidrolizar rápidamente a SAH (Grbeša et al. 2017). Considerando que AHCY es funcional únicamente cuando forma homotetrámero (Ault-Riché, Yuan, and Borchardt 1994; Turner et al. 1998), se postuló que la translocación a núcleo de AHCYL1 clivado (de su extremo C-terminal que

mencionamos es muy similar a AHCY) podría formar heterotetrámeros que no fueran enzimáticamente activos y de esa manera AHCYL1 convertirse en un regulador de AHCY (Devogelaere, Sammels, and Smedt 2008). Grbeša y colaboradores demostraron por ensayos de co-inmunoprecipitación y de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC) que efectivamente AHCYL1 y AHCY interactúan; sorpresivamente lo hacen en núcleo y en citoplasma, aunque no se investigó si la unión en el citoplasma es con AHCYL1 clivada o no. En ese trabajo también se describió que el silenciamiento de AHCYL1 provocó un aumento en la fracción nuclear de AHCY, sugiriendo que AHCYL1 podría estar involucrada en su translocación a núcleo (Grbeša et al. 2017).

### **Expresión de AHCYL1**

En cuanto a su expresión, AHCYL1 posee dos isoformas (AHCYL1-A y AHCYL1-B) producto de *splicing* alternativo (Cooper et al. 2006). La isoforma canónica tiene un peso molecular de 58,9 kDa, mientras que a la isoforma B le faltan 47 aminoácidos y pesa 53,8 kDa (<https://www.uniprot.org/uniprot/O43865>). Es una proteína de expresión ubicua en diversos tejidos, como el cerebro, tejidos reproductivos, tracto gastrointestinal, riñón, timo, bazo pulmón y páncreas (Ando et al. 2003; Uhlén et al. 2015). Debido a su fuerte inducción en la activación de células dendríticas también se la conoce como DCAL (*Dendritic Cell-expressed AHCY-Like molecule*) (Dekker et al. 2002).

Con respecto a la evolución de los genes de la familia *AHCY* y *AHCYL*, se observó la importancia de *AHCY* en mamíferos cuando se reportó que ratones con deleción cromosómica del gen sufren letalidad embrionaria (Miller et al. 1994). Se han descrito genes ortólogos de *AHCY* en bacterias, levaduras, vertebrados, entre otros. Pero solamente los organismos multicelulares segmentados muestran predicciones de los miembros de la familia *AHCYL*, las cuales también están altamente conservadas entre especies (Cooper et al. 2006). Esto sugiere que las

proteínas AHCYL podrían tener funciones novedosas en organismos más complejos.

### **Funciones de AHCYL1**

AHCYL1 es una proteína multifacética, con diversas funciones intracelulares y que interactúa con distintas proteínas. Una de ellas es el Receptor de IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R), motivo por el cual AHCYL1 también recibe el nombre de IRBIT (del inglés, *IP<sub>3</sub> Receptor Binding protein released with IP<sub>3</sub>*) debido a que originalmente fue identificada por esa interacción (Ando et al. 2003). AHCYL1 funciona como un pseudoligando del IP<sub>3</sub>R, ya que si bien puede unirse al receptor no es capaz de abrir el canal y por ende retiene el calcio intracelular en el retículo endoplasmático, resultando en un regulador de la señalización de calcio intracelular (Devogelaere et al. 2006). Como se mencionó, la capacidad de unión al IP<sub>3</sub>R está regulada por el grado de fosforilación de AHCYL1 (Devogelaere, Sammels, and Smedt 2008). Cooper y colaboradores describieron que los niveles de expresión de AHCYL1 son sumamente importantes en el desarrollo embrionario de zebrafish (Cooper et al. 2006). La inyección de un morfolino antisentido contra AHCYL1 indujo la formación de embriones ventralizados, mientras que la sobreexpresión provocó embriones dorsalizados similares a los obtenidos al depletar el calcio intracelular mediante el tratamiento con taspigargina. Es muy importante esta regulación fina, ya que cualquier desbalance produce morfologías atípicas. Este trabajo le atribuye a AHCYL1 un rol clave en la embriogénesis mediante la modulación del calcio intracelular a través de la interacción con el IP<sub>3</sub>R.

Además, AHCYL1 es capaz de regular otros canales y transportadores iónicos, como NBCe1-B (Shirakabe et al. 2006), NHE3 (He, Zhang, and Yun 2008), CFTR (D. Yang et al. 2009) y Slc26a6 (Park et al. 2013). En células pancreáticas, se observó que AHCYL1 interactúa con el cotransportador electrogénico pNBC1, produciendo la secreción de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y una disminución en el pH intracelular (D. Yang et al. 2009). También, interactúa con cotransportadores

NBCs electroneutros que son fundamentales para regular el pH neuronal (Devogelaere, Sammels, and Smedt 2008).

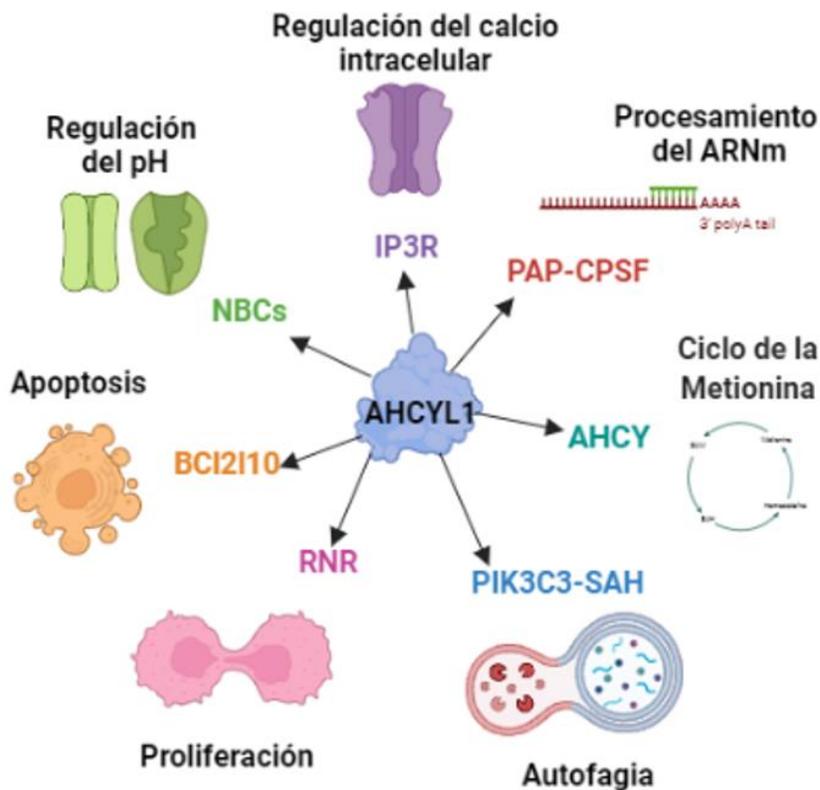
AHCYL1 también promueve la apoptosis (Bonneau et al. 2016). Una de las maneras en que se induce el proceso de apoptosis es mediante la transferencia masiva de  $Ca^{2+}$  desde el retículo endoplasmático (RE) hacia la mitocondria. AHCYL1 se puede unir a la proteína anti-apoptótica Bcl2l10 (homóloga de Bcl-2) en las zonas de contacto entre mitocondrias y el retículo endoplasmático. En condiciones de estrés apoptótico, AHCYL1 inhibe a Bcl2l10 y promueve el contacto RE-mitocondria facilitando la transferencia de  $Ca^{2+}$  que desencadena el proceso de muerte celular programada. Vinculado con la regulación del calcio, también se observó que AHCYL1 inhibe a CAMKII $\alpha$  y contribuye a la homeostasis de catecolaminas en el sistema nervioso central (Kawaai et al. 2015).

La ribonucleótido reductasa (RNR) es otra de las proteínas que interacciona con AHCYL1 (Arnaoutov and Dasso 2014). La RNR es una enzima que provee de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), por lo tanto, es necesaria para la replicación del ADN y el mantenimiento de la integridad genómica. Arnaoutov y Dasso describieron que AHCYL1 forma un complejo con la RNR y la inhibe. Esta interacción está regulada como muchas de las funciones de AHCYL1 por su estado de fosforilación. En células HeLa se demostró que en ausencia de AHCYL1 hay un desbalance de dNTPs y se altera la progresión del ciclo celular. Recientemente, Arnaoutov y colaboradores reportaron que AHCYL1 a través de la inhibición de la RNR cumple un rol clave durante la homeostasis del epitelio del intestino medio en *Drosophila melanogaster*. AHCYL1 se expresa en progenitores de células madre intestinales postmitóticas para suprimir RNR y colaborar en la diferenciación en células epiteliales adultas, un proceso que es esencial para la sustentabilidad del tejido durante la vida del animal (Arnaoutov et al. 2020). Estos resultados también remarcan la participación de AHCYL1 en la toma de decisiones del destino celular a través de mecanismos que regulan el ciclo celular impactando en la transición de estados celulares durante el proceso de diferenciación.

Otro proceso regulado también por AHCYL1 es el procesamiento del ARNm (Kiefer et al. 2009), vía el factor específico de poliadenilación (CPSF) y la poli-A polimerasa (PAP). La PAP es reclutada por CPSF para elongar la cola de poli-A y AHCYL1 sería un inhibidor de la actividad de la PAP. Estos hallazgos sugieren que AHCYL1 también puede regular la expresión génica a través de esta interacción.

Recientemente, AHCYL1 también ha sido vinculado al proceso de autofagia en células de osteosarcoma (W. Huang et al. 2021). Huang y colaboradores proponen a AHCYL1 como un sensor de SAH, donde SAH ya no sería únicamente un metabolito intermediario del ciclo de la metionina sino una molécula de señalización. La unión de SAH a la porción C-terminal de AHCYL1 promueve la unión de la porción N-terminal al dominio catalítico de PIK3C3 (la subunidad catalítica de fosfatidilinositol 3-quinasa tipo 3), una proteína clave en autofagia. PIK3C3 es una proteína quinasa que fosforila lípidos y es la única quinasa clase III de fosfatidilinositol en eucariotas que produce fosfatidilinositol-3-fosfato, lo cual es fundamental para promover la autofagia (Russell et al. 2013). En este trabajo se demostró que el eje SAH-AHCYL1-PIK3C3 inhibe el proceso autofágico.

Estas observaciones indican que AHCYL1 cumple diversas funciones celulares básicas y la relevancia de cada una en la fisiología celular estaría relacionada al tipo celular (**Figura 7**).



**Figura 7. Funciones principales de AHCYL1.** En este se observan las principales proteínas o moléculas que interactúan con AHCYL1 y cuáles son los procesos celulares que regulan.

### AHCYL1 y cáncer

*AHCYL1* fue descrito por primera vez como un gen asociado a la resistencia a drogas en un modelo de melanoma (Wittig et al. 2002). Además, en períodos cortos de exposición a drogas, se había observado una disminución de la expresión de *AHCYL1* en pacientes con cáncer gástrico (Nakazawa et al. 2019). Sus ensayos consistieron en evaluar la supervivencia y la progresión libre de enfermedad en pacientes que fueron intervenidos quirúrgicamente y que luego recibieron quimioterapia adyuvante. Encontraron que aquellos pacientes tratados con quimioterapia y con baja expresión de *AHCYL1* tuvieron peor pronóstico y recurrencia.

Los primeros reportes de AHCYL1 en cáncer fueron publicados por Jeong en cáncer de ovario epitelial. En su primer trabajo, demostró que AHCYL1 funciona como un oncogen en pollos y paradójicamente como un supresor tumoral en humanos (Jeong, Kim, Kim, et al. 2012). En particular, mujeres con moderada o alta expresión de AHCYL1 mostraron tener mayor sobrevida libre de progresión de la enfermedad. En el mismo año publicó otro trabajo en el cual describió que la expresión de AHCYL1 se induce por agonistas sintéticos de estrógenos en oviducto de pollos (Jeong, Kim, Ahn, et al. 2012). Allí, se propuso que AHCYL1 sería clave para regular el crecimiento y desarrollo del oviducto maduro en pollo en respuesta a estrógenos y mediado por la vía de señalización ERK1/2 MAPK.

En contraposición a la hipótesis sobre AHCYL1 como un supresor tumoral, se describió que AHCYL1 podría favorecer la migración de células tumorales (Hwang, Shin, and Hong 2020). En este trabajo se estudió cómo AHCYL1 impacta en la regulación de NBCn1, un cotransportador de  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ . Se observó que AHCYL1 se une a NBCn1 y lo estabiliza en la membrana plasmática, teniendo un efecto positivo sobre la migración de células tumorales de pulmón e imitando el efecto de EGF como estímulo migratorio. Teniendo en cuenta que la inhibición conjunta de AHCYL1 y NBCn1 inhibe la migración, sería interesante aplicar esto como estrategia terapéutica frente tumores metastásicos.

Por otro lado, el FGFR2 es un receptor de tipo tirosina quinasa que está asociado a fusiones aberrantes en distintos tumores (Duma, Santana-Davila, and Molina 2019). AHCYL1 se encontró como parte de una fusión génica FGFR2-AHCYL1 en tumores, con actividad oncogénica mayoritariamente en colangiocarcinoma (Arai et al. 2013). Esta fusión permite la formación de un dímero que señala vía MAPK de manera aberrante, lo cual promueve la tumorigénesis. En este sentido, se mostró la utilidad de inhibidores de FGFR como una posibilidad terapéutica. Si bien se ha encontrado en cáncer de pulmón (Pacini et al. 2021), no es de las fusiones prevalentes en este tipo de cáncer.

En conclusión, el rol de AHCYL1 en procesos tumorales no se encuentra muy explorado hasta el momento. La mayoría de las publicaciones apuntan a su rol como supresor tumoral, pero también se observó lo opuesto en ovario de gallinas y se lo describió como un regulador positivo de la migración.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Planteamos como **hipótesis** que *los niveles de expresión de AHCYL1 modularían la capacidad plástica y el comportamiento celular en cáncer de pulmón.*

El objetivo de nuestro grupo de trabajo es conocer los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la formación de tumores que se originan a partir de células que sufren “reprogramación” y cómo las citoquinas del microambiente tumoral contribuyen en este proceso (en particular, la vía de señalización de TGF- $\beta$ ). El **objetivo general** de esta tesis es *caracterizar el rol de AHCYL1 como potencial moderador de la identidad, plasticidad y el comportamiento de células tumorales en un modelo tumoral de pulmón.*

Como **objetivos específicos**:

- 1- Estudiar la expresión de AHCYL1 en líneas celulares de pulmón (normales y tumorales) y analizar su nivel de expresión y localización subcelular.
- 2- Analizar la expresión de AHCYL1 en muestras de pacientes mediante análisis de bioinformática y en biopsias mediante inmunohistoquímica.
- 3- Analizar la modulación de la expresión de AHCYL1 en distintos modelos de plasticidad.
  - a. En distinto formato de cultivo: en monocapa (en 2 dimensiones) y en esferas (en 3 dimensiones).
  - b. En un modelo de transición epitelio mesenquimal inducida por TGF- $\beta$ 1.
- 4- Analizar los niveles de expresión de AHCYL1 en la modulación de la expresión de marcadores de identidad celular.

- 5- Analizar los niveles de expresión de AHCYL1 en el comportamiento celular *in vitro*.
- 6- Analizar los niveles de expresión de AHCYL1 en el balance intracelular de metabolitos del ciclo de la metionina.
- 7- Analizar los niveles de expresión de AHCYL1 en el comportamiento celular utilizando un modelo de tumorigénesis *in vivo* y en un modelo de angiogénesis *in vivo*.
- 8- Analizar los niveles de expresión de AHCYL1 en la expresión de factores de pluripotencia.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Microbiología

### Preparación de plásmidos

#### Transformación de bacterias y aislamiento de plásmidos

Se utilizaron bacterias competentes *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$  y se siguió el protocolo de transformación descrito por Hanahan (Hanahan 1983). Se incubaron 50  $\mu$ l de bacterias competentes con 10-50 ng de plásmido durante 30 minutos en hielo. Luego, se les aplicó un shock térmico de 90 segundos a 42 °C y nuevamente se las colocó en hielo. Se agregaron 700  $\mu$ l de medio LB sin antibiótico durante 45-60 minutos a 37 °C. Finalmente, se tomó volumen necesario (50-500  $\mu$ l dependiendo de calidad y cantidad inicial de plásmido) y se plaqueó en placas de LB con antibiótico correspondiente al plásmido de interés.

Para corroborar la identidad del plásmido transformado se realizó un chequeo por restricción. Brevemente, el ADN plasmídico fue sometido a digestión utilizando enzimas de restricción elegidas teniendo en cuenta el mapa de cada plásmido. Las soluciones de plásmido-enzima de restricción (según instrucciones del proveedor) fueron incubadas 2 horas a 37 °C y posteriormente resueltas mediante electroforesis en geles de agarosa. Se corroboró que las bandas reveladas fueran del tamaño esperado según el mapa.

#### Preparación de plásmidos a gran escala (Maxi-prep)

Para la preparación de plásmidos a gran escala, se picó una colonia para crecer en 200 mL de LB líquido suplementado con el correspondiente antibiótico. En el caso de los plásmidos de gran tamaño como los shARN, se prepararon pre-cultivos de 5 mL que fueron crecidos durante 8 horas en agitación a 37 °C. El

cultivo (ya sea a partir de colonia o de pre-cultivo) fue crecido toda la noche en agitación a 37 °C. Para el procesamiento, se siguieron las instrucciones del fabricante utilizando el kit de QIAGEN para preparaciones a gran escala (#12163). Brevemente, este procedimiento se basa en la lisis alcalina de las bacterias y su posterior purificación a partir de la unión a una columna cromatográfica específica para ADN plasmídico. Utilizando esta metodología se obtiene un alto rendimiento de plásmido y de gran pureza (hasta 500 µg).

### **Plásmidos utilizados**

#### Para transfección

- **pEGFP-C1:** vector de expresión de la proteína fluorescente GFP (Clontech #6084-1)
- **pLM-vexGFP-Oct4:** vector de expresión de la proteína de fusión GFP-POU5F1 (Oct4) (Addgene #22240)
- **pTagRFP-N:** vector de expresión de la proteína fluorescente RFP (Evrogen #FP142)
- **tdTomato-AHCYL1:** vector de expresión de la proteína de fusión tdTomato-AHCYL1 desarrollado y gentilmente cedido por el Dr. Arnaoutov (Arnaoutov and Dasso 2014).

#### Para transducción

Los plásmidos utilizados para empaquetar las partículas virales, los shARNs específicos y los controles fueron gentilmente cedidos por el Dr. Joaquín Espinosa, colaborador del grupo de trabajo.

- **VSV-G:** (Addgene #8454)
- **Delta 8.9:** (Addgene #12263)
- **NT5:** (Addgene #SHC216)
- **pLKO.1-GFP:** (Addgene #30323)

## Vectores para el silenciamiento de *AHCYL1*

Tabla 3. Vectores de shARN dirigidos al gen *AHCYL1*.

Nombre	Clone_ID	Target	Región
<b>KD-AHCYL1-1</b>	TRCN0000299611	GCACTGATAGAACTCTATAAT	Codificante
<b>KD-AHCYL1-2</b>	TRCN0000299610	CGGCAAGTCGATGTCGTAATA	Codificante
<b>KD-AHCYL1-3</b>	TRCN0000303728	CAATGTCTAAATCGCCTTAAA	3' UTR
<b>KD-AHCYL1-4</b>	TRCN0000310439	GATGTGATGTTTGGTGGGAAA	Codificante

Se resumen los nombres de los shARNs, su código de identificación (*Clone\_ID*) en el consorcio de ARN de interferencia del Instituto Broad (Estados Unidos), la secuencia a la que están dirigidos (*Target*) y la región del gen donde se ubica esa secuencia.

## Cultivo Celular

### Líneas Celulares

En esta tesis se utilizaron las siguientes líneas celulares:

**HEK293T** Línea humana de células embrionarias renales (ATCC CRL-3216). Esta línea es capaz de generar partículas retrovirales en alto título.

**A549** Línea celular humana de adenocarcinoma de pulmón (de células no pequeñas) (ATCC CCL-185). Es una línea ampliamente utilizada como modelo de cáncer de pulmón.

**H1299** Línea celular humana de carcinoma de pulmón (de células no pequeñas) derivada de nódulo linfático (ATCC CRL-5803). Es una línea ampliamente utilizada como modelo de cáncer de pulmón.

**MRC-5** Línea celular humana de fibroblastos de pulmón (ATCC CCL-171). A diferencia de A549 y H1299, corresponde a células normales, no tumorales.

Todas ellas fueron cultivadas rutinariamente con medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* DMEM (alta glucosa) suplementado con bicarbonato de sodio 2,4 g/L, HEPES 2,2 g/L, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomina 100

µg/mL y suero fetal bovino (SFB) al 10%. Todos los reactivos son Thermo Fisher salvo el suero, adquirido en Natocor.

Las líneas celulares fueron incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Se mantuvieron en crecimiento con pasajes cada 72-96 horas, evitando sobrepasar el 90% de confluencia. Tanto para el mantenimiento como para el plaqueo, las células fueron lavadas con PBS y luego despegadas de la placa en presencia de Tripsina durante 1-3 minutos (dependiendo la línea) a 37°C. Se utilizaron líneas celulares de bajo repique y libres de micoplasma, las cuales fueron rutinariamente chequeadas por qPCR.

### **Formación de Esferas**

Para la formación de cultivos en tres dimensiones (3D, esferas), se cultivaron 400.000 células A549 o H1299 en placas de baja adherencia de 60 mm en medio apropiado para el enriquecimiento de células madre tumorales (medio *stem*). El medio *stem* es DMEM/F12 suplementado con B-27 (20 µL/mL), bFGF (20 ng/mL), EGF (20 ng/mL), L-glutamina (2 mM) y penicilina/estreptomicina (50 U/ml). Se agregó medio fresco cada dos días y se mantuvo el cultivo durante 7 días. A los 7 días se tomó material para extracción de ARN o proteínas. Las fotografías fueron tomadas bajo microscopio Zeiss AxioVert A1 FL de contraste de fase acoplado a cámara Canon EOS. Todos los suplementos del medio *stem* son de Thermo Fisher.

### **Ensayo de conteo de esferas**

Se sembraron 40.000 células por pocillo por cuadruplicado en placas de 24 pocillos. Se incubaron las células 48 horas en medio *stem* y se tomaron fotografías utilizando un microscopio de contraste de fase y aumento 50X (Zeiss AxioVert A1 FL acoplado a cámara Canon EOS). Se procesaron las imágenes utilizando el programa ImageJ. Brevemente, se sustrajo el fondo de todas las imágenes y se

ajustó el umbral de manera tal que se consideren solo las células que forman esferoides y no se consideren partículas de suero o células individuales. Se procesaron las imágenes convirtiendo a una máscara binaria y se cuantificó el porcentaje de área cubierta. Es importante que todas las fotos se tomen en el mismo aumento para poder compararlas.

### **Ensayo de dilución extrema limitante (ELDA)**

Se sembraron suspensiones de distintas concentraciones de células (10, 25, 50, 100 y 200 células por pocillo) por sextuplicado en placas de 96 pocillos y ultra baja adherencia en medio *stem*. A los 3 y 7 días después de la siembra, se cuantificó el número de esferas formadas (de un diámetro mayor a 40  $\mu\text{m}$ ) en cada pocillo utilizando un microscopio de contraste de fase y aumento 100X (Zeiss AxioVert A1 FL acoplado a cámara Canon EOS). La frecuencia de células iniciadoras de tumor *in vitro* y los valores de p se calcularon usando el software ELDA (Hu 2009).

### **Transfecciones**

#### Transfección de plásmidos de sobreexpresión

Las células fueron plaqueadas al menos 24 horas antes en la confluencia adecuada. Las transfecciones se realizaron con PEI (Sigma), Lipofectamina 2000 (Invitrogen) o Lipofectamina 3000 (Invitrogen) según instrucciones del proveedor.

En resumen, se colocó en un tubo *ependorf* (tubo A) la masa correspondiente de ADN plasmídico y en otro tubo (tubo B) el agente de transfección. Para las transfecciones con PEI a ambos tubos se les agregó cloruro de sodio (NaCl 100 mM). En el caso de ambas Lipofectaminas se utilizó OptiMEM (Invitrogen). Como complemento a la Lipofectamina 3000, el tubo A también llevó el reactivo P3000. Se dejó incubar 5 minutos y luego se transfirió el contenido del tubo A al tubo B. Se mezcló vigorosamente y se permitió la formación de

complejos entre el ADN y el agente de transfección por incubación durante 15 minutos. Se cambió el medio de las células por medio completo fresco y se agregó la mezcla con los complejos por goteo. A las 3 horas, se cambió el medio por medio completo fresco nuevamente. Los experimentos de sobreexpresión fueron cosechados 48 horas post-transfección.

Las masas de ADN y agentes de transfección para cada línea celular se indican en la siguiente tabla:

**Tabla 4. Protocolo de transfección.**

Línea celular	Placa	Masa ADN	Agente de Transfección	Relación ADN:Agente
<b>A549</b>	6 pocillos	0,5 - 2 µg	Lipofectamina 2000 Lipofectamina 3000	1:2
<b>HEK239T</b>	P 100mm	5 µg	PEI	1:6

Se especifica el tipo de placa, la masa de ADN, el agente de transfección y la relación entre ambos para las líneas celulares utilizadas.

#### Transfección de siARN

Se plaquearon 100.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos al menos 24 horas antes de la transfección. Se realizó la transfección utilizando el agente de transfección Lipofectamina RNAiMAX (#13778-075, ThermoFisher) en una relación 2:1 con el siARN (50 nM) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizó un siARN específico para AHCYL1 (#sc-88017, Santa Cruz Biotechnology) y un siARN control fue gentilmente cedido por el Dr. Videla-Richardson (LIAN, FLENI-CONICET).

En resumen, se colocó en un tubo *ependorf* (tubo A) el siARN en la concentración final indicada y en otro tubo (tubo B) la lipofectamina RNAi max, ambos conteniendo previamente OptiMEM (Invitrogen). Se dejó incubar 5 minutos y luego se transfirió el contenido del tubo A al tubo B. Se mezcló vigorosamente y se permitió la formación de complejos entre el ARN y el agente de transfección por

incubación durante 15 minutos. Se cambió el medio de las células por medio completo fresco y se agregó la mezcla con los complejos por goteo. A las 3 horas, se cambió el medio por medio completo fresco nuevamente. Los experimentos fueron cosechados 48 horas post-transfección.

## **Transducción de Plásmidos**

### *Síntesis de partículas virales*

Se transfectaron células HEK293T utilizando PEI como agente de transfección y los plásmidos pVSVG – pD8.9 – plásmido de interés (shARN) en una proporción 2:2:1. Se reemplazó el medio luego de 4 horas por DMEM 10% SFB y se colectó el sobrenadante dos veces 24 y 48 horas después. El mismo contenía las partículas virales de interés en suspensión, las cuales fueron filtradas a través de filtros de jeringa de 0,45 µm de tamaño de poro. Dichos sobrenadantes fueron utilizados inmediatamente o guardados en alícuotas del volumen de uso a -80 °C hasta su utilización.

### *Infección de líneas celulares y selección*

La transducción se realizó mediante incubación durante 3 horas de la línea celular elegida junto con el sobrenadante con partículas lentivirales, durante dos días consecutivos. Transcurrido el tiempo de incubación, se renovó el medio por DMEM 10% SFB. Se realizó la transducción de GFP como control de la técnica. A las 48 horas de la última incubación con partículas virales se observó la expresión de GFP y en ese momento se inició la selección suplementando medio DMEM 10% SFB con puromicina. La concentración de puromicina fue elegida a partir de una curva de concentraciones realizada previamente, en la cual se buscó aquella concentración que el antibiótico elimine en 7 días al control negativo (línea celular sin *cassette* de resistencia). La línea celular A549 fue seleccionada con puromicina (3 µg/ml) durante una semana y luego para su mantenimiento se disminuyó la concentración de puromicina a la mitad (1,5 µg/ml). Los experimentos

se realizaron con al menos 2 shARNs independientes para descartar que los efectos observados se deban a efectos *off-target*. Los niveles de expresión de AHCYL1 fueron monitoreados rutinariamente y previo a realizar los experimentos. Cuando fue necesario se generó nuevo *batch* de células silenciadas.

## Ensayos de Proliferación

### Ioduro de Propidio

Se sembraron 500.000 células por placa de 60 mm por quintuplicado 48 horas antes de ser utilizadas. Al momento de comenzar el experimento se recomienda que las células estén aproximadamente al 80% de confluencia para asegurar que se encuentren en división activa. Se agregaron 500  $\mu$ L de tripsina por placa para levantar las células. Luego se agregó 1 mL de PBS y se las colocó en tubos de citometría. Se centrifugó a 1000 g durante 5 minutos a 4 °C (cuando se mencione centrifugación en este protocolo deberán respetarse estas condiciones de tiempo, velocidad y temperatura). Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de PBS. Se repitió la centrifugación y lavado una vez más. Luego, se fijaron las células agregando al pellet 2 ml de etanol 70 % frío. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó y se lavó el pellet con 1 ml de PBS. Nuevamente, se centrifugó y al pellet se le agregaron 300  $\mu$ L de ioduro de propidio (#P1304MP, Life Technologies). Se debe dejar incubando 30 minutos a 4 °C. La solución de ioduro de propidio se prepara realizando una dilución 1:20 de un stock cuya concentración es 1 mg/mL y agregándole 200  $\mu$ L de ARNasa (100  $\mu$ g/ $\mu$ L).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se adquirieron las mediciones de ioduro de propidio utilizando el citómetro FACS Canto II (BD Biosciences) y se analizaron los datos obtenidos con el software FlowJo versión 10.

### Resazurina

Se preparó un stock de Resazurina (#199303, Sigma) 15 mM en agua y se filtró usando filtros de 0,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Para realizar el ensayo, es necesario suplementar previamente DMEM 10% SFB con resazurina tal que su concentración final sea 30  $\mu\text{M}$ .

Se sembraron 2.500 células en cada pocillo en placas de 96 pocillos por quintuplicado. Al día siguiente, se cambió el medio por medio con Resazurina y se incubó por 2 horas. Cumplido el tiempo de incubación, se midió la fluorescencia emitida en el lector *Multimode Plate Reader EnSpire*<sup>®</sup> (Perkin-Elmer). Para la cuantificación es necesario tener dos placas independientes: una placa que se mide al día siguiente de plaqueo y se toma como el basal y luego a las 72 horas de plaqueo (48 horas después del basal) se cuantifica la otra placa.

### Cristal violeta

Se sembraron 5.000 células en placas de 96 pocillos por triplicado. Luego de 24, 48, 72 y 96 horas, se removió el medio y se fijaron las células con 150  $\mu\text{L}$  de metanol durante 15 minutos. Una vez finalizada la fijación de 96 horas, se enjuagó cada pocillo con agua por inmersión y se colorearon las células con 150  $\mu\text{L}$  de una solución de cristal violeta 0,06 % durante 15 minutos. Luego de la incubación, se removió el excedente del colorante mediante lavados con agua por inmersión y se resuspendieron los cristales agregando 150  $\mu\text{L}$  de metanol. Se midió la absorbancia a 595 nm y graficaron las curvas de proliferación. A partir de estas curvas, se calculó el tiempo de duplicación utilizando una herramienta online ([https://www.doubling-time.com/compute\\_more.php](https://www.doubling-time.com/compute_more.php)). También se cuantificó la proliferación al igual que con Resazurina para poder comparar ambos métodos.

### **Transición Epitelio-Mesenquimal inducida por TGF- $\beta$ 1**

Se sembraron 30.000 células en pocillos de 60 mm. La noche anterior al estímulo las células fueron deprivadas de suero (0,2 % SFB). Se realizó un

pretratamiento de 1 hora con el inhibidor SB (10  $\mu$ M) antes del tratamiento con TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL). El tratamiento con TGF- $\beta$ 1 se realizó a distintos tiempos. Parte de estos experimentos fueron realizados en colaboración con la Dra. Fiorella Belforte (becaria postdoctoral del grupo).

### **Detección de SAM y SAH mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-HRMS)**

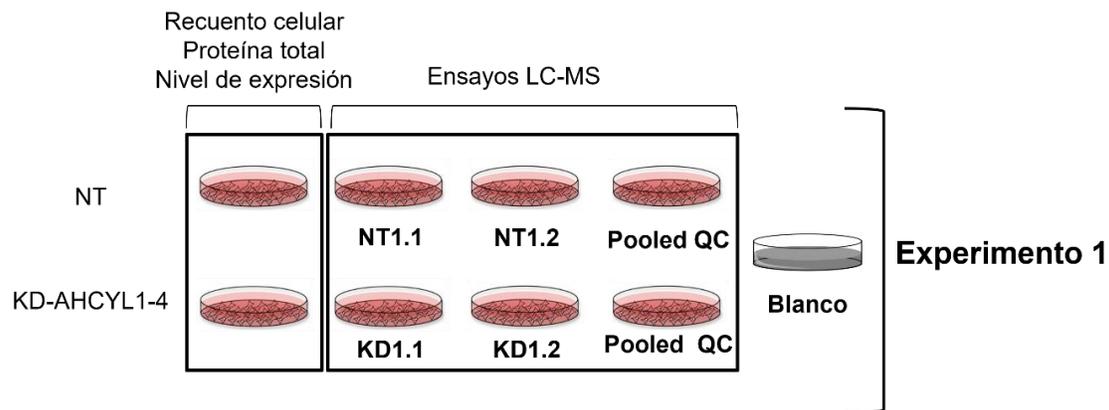
#### Compuestos Químicos

Para la preparación de las fases móviles utilizadas en los métodos cromatográficos, la preparación de muestras, y las soluciones de estándares químicos, se utilizó agua ultrapura con 18,2 M $\Omega$ ·cm de resistividad (Thermo Scientific Barnstead Micropure UV ultrapure water system, USA), metanol y acetato de amonio calidad Optima y grado LC-MS (Fisher Chemical, USA) y ácido acético de grado analítico (Fisher Chemical, USA). También se utilizó Leu-enkefalina (Waters Corp, USA) e hidróxido de sodio (EMSUREISO, Merck Millipore, USA) para preparar soluciones de calibración del analizador de tiempo de vuelo del espectrómetro de masas. Los estándares químicos cloruro de S-Adenosil-L-metionina (SAM) (hidrocloruro; pureza  $\geq$ 95%, Código 13956) y S-Adenosilhomocisteína (pureza  $\geq$ 98%, Código 13603) fueron adquiridos en Cayman Chemical (USA). El cloruro de sodio fue comprado en Anedra (Argentina).

#### Cultivo celular para la extracción de SAM y SAH

Se diseñó el protocolo para el cultivo celular y extracción de metabolitos con el objetivo de evaluar los niveles intracelulares de SAM y SAH en las líneas celulares NT y KD-AHCYL1-4 mediante la técnica de cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas de alta resolución, utilizando un analizador de cuadrupolo tiempo de vuelo (UPLC-QTOF-MS). Dicho diseño se realizó en colaboración con el Grupo de Espectrometría de Masas Bioanalítica del CIBION – CONICET, liderado por la Dra. María Eugenia Monge. Los experimentos

de UPLC-QTOF-MS fueron llevados a cabo en el CIBION por la Dra. Malena Manzi, en el marco de su formación postdoctoral dirigida por la Dra. Monge. El protocolo para la preparación de las muestras se indica esquemáticamente en la **Figura 8**.



**Figura 8. Esquema de generación de muestras para la extracción de SAM y SAH intracelular.** Por cada experimento se generaron 3 muestras para los análisis por UPLC-HRMS (2 réplicas y 1 “pooled QC”) y 1 placa se utilizó para el recuento celular, cuantificación de proteínas y nivel de expresión de AHCYL1 para corroborar el silenciamiento. Además, se utilizó un blanco de preparación de muestras o de proceso (medio sin células). Se realizaron 10 experimentos independientes.

Brevemente, se realizaron 10 experimentos independientes incluyendo a ambas líneas celulares. Cada experimento consistió en el cultivo paralelo en 4 placas de Petri de 10 cm para cada línea celular. Una de las placas se utilizó para recuento celular, determinación de proteínas totales, y la determinación de RNA para corroborar la expresión de AHCYL1 y el monitoreo del silenciamiento del gen *AHCYL1*. Las otras 3 placas fueron procesadas para la extracción de SAM y SAH intracelular, una de las cuales fue utilizada para el desarrollo del método analítico y la generación de muestras de control de calidad (*pooled QC*), generadas a partir de alícuotas iguales de todos los especímenes analizados en el estudio. Por lo tanto, se generaron 2 placas para cada línea celular por cada experimento. El conteo de las células permitió la normalización de los datos (Muschet et al. 2016). Además, por cada experimento se realizó un blanco de proceso, que fue generado

por incubación de una placa de Petri de 10 cm con medio de cultivo sin células siguiendo el mismo protocolo que se utilizó con las muestras. Junto a las muestras del estudio se analizaron en el mismo lote analítico sus respectivos blancos de proceso, además de una muestra de adecuación del sistema y las muestras de *pooled QC*.

Todos los experimentos fueron realizados dentro de un periodo de 3 semanas, y las líneas celulares fueron utilizadas con un número de pasaje similar (entre 8 a 17). El estado y la confluencia de la monocapa previo a la siembra de las células fue similar para cada experimento. Cada suspensión celular fue contada 3 veces para minimizar errores en el cálculo de la dilución y se sembraron  $1 \times 10^6$  células de cada línea celular en placas de Petri de 10 cm.

Luego de 24 horas desde la siembra de las células, se removió el medio de cultivo; las células fueron lavadas suavemente con medio fresco, seguido de 18 horas de incubación con el medio de cultivo correspondiente. El número de células sembradas fue optimizado para que alcancen un 80% de confluencia al momento de la cosecha y pasos de extracción. Previo a la etapa de *quenching* del metabolismo, el medio fue descartado y las monocapas fueron lavadas suave y rápidamente una única vez con 8 mL de solución fisiológica (NaCl 0,9% m/v) (Dietmair et al. 2010; Kapoore et al. 2017). Luego, cada placa se colocó en un baño de agua-hielo e inmediatamente después se realizó el *quenching* del metabolismo utilizando nitrógeno líquido para minimizar alteraciones en los niveles de los metabolitos (Bi et al. 2013; Lorenz, Burant, and Kennedy 2011). Luego de la evaporación del nitrógeno, se agregó 1 mL de metanol frío (colocado previamente en el baño de agua-hielo) para la extracción de metabolitos. Las células fueron cosechadas usando un *scraper*. Se adicionaron 400  $\mu$ L de metanol frío para cosechar la totalidad de las células de cada placa. Cada muestra, incluidos los blancos de proceso, fue congelada en nitrógeno líquido, descongelada y mezclada utilizando un vórtex. Este ciclo se repitió una segunda vez y luego se centrifugaron las muestras a  $2000 \times g$  durante 4 minutos a 4 °C para remover el *debris* celular.

Los sobrenadantes fueron colectados y mantenidos a -20 °C durante 2 horas para favorecer la precipitación de proteínas (Sarafian et al. 2014). Luego, se centrifugaron las muestras a 15000  $\times g$  durante 15 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes fueron recolectados e inmediatamente congelados a -80 °C luego de haberles agregado agua ultrapura para su congelación a esa temperatura. Todas las muestras del mismo experimento fueron liofilizadas en el mismo momento junto con los respectivos blancos de proceso, para evaluar una posible contaminación cruzada. Las muestras y los blancos de proceso fueron liofilizados en 6 lotes a -80 °C y 50 mTorr durante 72 horas utilizando un liofilizador *Telstar LYOQuest-85 freeze-dryer* (Telstar, España). Los residuos congelados fueron descongelados a 0 °C en baño de agua-hielo y reconstituidos en 80  $\mu L$  de una solución de agua/metanol (90:10 v/v) y ácido acético 0,1%; fueron centrifugados a 13000  $\times g$  por 10 minutos a 4°C y las muestras se analizaron por UPLC-HRMS dentro de las 6 horas posteriores a su reconstitución.

Se realizaron diferentes procedimientos de control de calidad previos a la adquisición de los datos para evaluar el rendimiento del instrumento y la reproducibilidad del método analítico. La muestra de adecuación del sistema consistió en una solución de SAM y SAH 1  $\mu M$ , preparada a diario en una mezcla de agua/metanol (90:10 v/v) y ácido acético 0,1%. Dicha muestra, el blanco de solvente y un blanco de proceso fueron analizados al principio y al final de cada lote analítico. Las muestras correspondientes a los especímenes fueron analizadas aleatoriamente balanceando los tipos de muestra durante los dos días consecutivos de análisis, junto con las muestras de *pooled QC*. Éstas se utilizaron para verificar la estabilidad de los tiempos de retención, de los valores de relación masa-carga ( $m/z$ ), de la forma de los picos cromatográficos y de las áreas correspondientes durante el análisis (**Tabla Suplementaria 1**). Además, las muestras de *pooled QC* se utilizaron para acondicionar el sistema de UPLC-QTOF-MS. Para este fin, se realizaron cuatro inyecciones consecutivas de la muestra de *pooled QC* antes del análisis de las muestras del estudio en cada lote

analítico. Las primeras tres inyecciones en el sistema de UPLC-QTOF-MS fueron descartadas. Las muestras de *pooled* QC fueron usadas para monitorear la reproducibilidad intra e inter- día. Las cuatro muestras generadas en cada experimento se analizaron consecutivamente, alternando entre experimentos el orden entre NT y KD-AHCYL1-4, y las muestras de *pooled* QC se inyectaron cada cuatro muestras de los especímenes en estudio (**Tabla Suplementaria 1**).

Debido a problemas durante el proceso de liofilización, se descartaron las muestras correspondientes a los experimentos 4 y 5. Por lo tanto, se analizaron muestras de 8 experimentos independientes (en total 16 muestras por línea celular) por UPLC-HRMS a lo largo de 2 días consecutivos de mediciones.

### UPLC-HRMS

El análisis de SAM y SAH se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-HRMS) usando el sistema de cromatografía modelo *ACQUITY UPLC I- Class* de Waters Corp., con una columna *HSS T3* (2,1 × 100 mm, tamaño de partícula = 1,8µm) de Waters Corp. (Milford, MA, USA), acoplado a un espectrómetro de masas modelo *Xevo G2S QTOF* de Waters Corp. (Manchester, UK) con una fuente de ionización por electrospray (ESI). La fuente fue utilizada en modo de ionización positivo, el poder resolutivo y la precisión del espectrómetro de masas fueron 32,000 fwhm y 0,2 ppm a  $m/z$  556,2771, respectivamente. La fase móvil A consistió en una solución acuosa con 10 mM de acetato de amonio y 0,1% de ácido acético y la fase B en metanol. La separación cromatográfica se realizó con el siguiente programa de elución por gradiente: 0-2 min 10% B; 2-6 min 10-25% B; 6-8 min 25-65% B; 8-9 min 65-95% B; 9-13 min 95% B. El caudal se mantuvo constante a 0,20 mL min<sup>-1</sup>. Luego de cada inyección, el gradiente volvió a sus condiciones iniciales en 13 minutos. Después de 7 minutos de análisis, los eluidos de la columna cromatográfica fueron dirigidos a descarte para minimizar el ensuciamiento de la fuente de ionización y el espectrómetro de masas, lo cual

podría afectar la sensibilidad del método. El volumen de inyección fue de 6  $\mu\text{L}$  para las muestras y los controles de calidad y de 2  $\mu\text{L}$  para las muestras de adecuación del sistema. Las temperaturas de la columna y de la bandeja de muestras fueron fijadas a 35  $^{\circ}\text{C}$  y 5  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. El espectrómetro de masas fue operado en modo de ionización positivo con un voltaje en el capilar de 2,5 kV y un voltaje en el cono de 30 V. Las temperaturas de la fuente y del gas de desolvatación fueron fijadas a 120  $^{\circ}\text{C}$  y 300  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. El caudal de nitrógeno usado como gas de desolvatación fue 600  $\text{L h}^{-1}$  y el caudal de nitrógeno en el cono fue 10  $\text{L h}^{-1}$ . El espectrómetro de masas fue calibrado a diario antes del análisis de cada lote analítico en el intervalo de  $m/z$  50–1200, usando una solución de formiato de sodio 0,5 mM preparada en una mezcla de isopropanol/agua (90:10 v/v). Para corregir posibles derivas en el valor de masa exacta, los datos fueron corregidos durante la adquisición utilizando una solución de referencia la leucina encefalina ( $m/z$  556.2771) inyectada con un caudal de 2  $\mu\text{L min}^{-1}$  cada 45 s. La adquisición de los datos fue realizada en el modo MS continuo en el intervalo de  $m/z$  50–1200 y el tiempo de escaneo fue de 1 s. En la **Figura 26** (ver **Resultados**) se muestra un cromatograma representativo de iones extraídos (EIC) para SAM y SAH para una muestra de NT5 y una de KD-AHCYL1-4. Para confirmar la identidad de SAM y SAH, se comparó el tiempo de retención observado en el análisis de la solución estándar y en una muestra de *pooled* QC. Además, se compararon los valores de masas exactas y sus perfiles isotópicos en ambas muestras y estos últimos fueron contrastados con un perfil simulado. Adicionalmente, se realizaron experimentos de espectrometría de masas en tándem (UPLC-QTOF-MS/MS) en las muestras de *pooled* QC y en las soluciones de mezcla de estándares para confirmar los patrones de fragmentación. Los espectros de fragmentación de los iones precursores se adquirieron con voltajes aplicados en la celda de colisiones entre 10 y 20 V y se utilizaron dos ventanas de análisis del cuadrupolo correspondientes a 3Da y 1Da para evitar la co-selección de iones. El gas utilizado en la celda de colisiones utilizado fue argón de ultra alta pureza ( $\geq 99.999\%$ ). La adquisición y el procesamiento de datos fue llevado a cabo

usando el programa *MassLynx* versión 4.1 (Waters Corp., Milford, MA, USA). Para la integración de las áreas de los picos cromatográficos en los cromatogramas EIC correspondientes a SAM ( $[M]^+ = m/z 399.1451$ ) y SAH ( $[M+H]^+ = m/z 385.1294$ ) se utilizó una ventana de  $\pm 10$  mDa. El área de los picos fue utilizada para el cálculo de niveles relativos de los analitos. Para analizar estadísticamente los datos se realizó una prueba de Mann-Whitney U y los p valores  $< 0,05$  fueron considerados significativos.

## **Técnicas de Biología Molecular**

### **Aislamiento de ARN**

Para realizar la extracción de ARN se partió de *pellets* congelados ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) o de células recién centrifugadas ( $0,5-1 \times 10^6$  células), previamente lavadas con PBS. Se utilizó el reactivo TRIzol Reagent (ThermoFisher, 15596018) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Brevemente, se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de reactivo a las muestras y se homogeneizaron con micropipeta. Los lisados se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de cloroformo. Se homogeneizaron las muestras mediante el uso de vórtex durante 15 segundos y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. Se centrifugaron durante 20 minutos a 12000g en centrífuga refrigerada previamente a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recuperaron las respectivas fases acuosas (no coloreadas, en la parte superior de cada tubo) en tubos nuevos, cuidando de no tocar la interfase. A las fases acuosas recuperadas se les adicionaron 250  $\mu\text{l}$  de isopropanol y se homogeneizaron con vórtex nuevamente durante unos segundos. Se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 10 minutos a 12000 g y  $4^{\circ}\text{C}$ . Se descartaron los sobrenadantes por volcado y se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de etanol 75%. Utilizando el vórtex, se homogeneizaron hasta observar desprendimiento del *pellet* y se centrifugaron a 7500g durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Luego de centrifugar, se descartaron los sobrenadantes por volcado y se dejaron secar durante 20 minutos aproximadamente.

Se resuspendieron los *pellets* de ARN en 20  $\mu$ l de agua miliQ. Se cuantificó la concentración de ARN correspondiente a cada muestra utilizando Nanodrop (Nanodrop lite, Thermo Fisher Scientific). Las muestras se mantuvieron a  $-80$  °C hasta su uso.

### **Transcripción Reversa**

Para realizar la síntesis de ADN copia (cADN), se siguieron las instrucciones del protocolo provisto por el fabricante de la enzima Transcriptasa Reversa (MMLV-RT, Promega) con algunas modificaciones.

Se colocó una solución de 1  $\mu$ g de ARN (según cuantificación de Nanodrop) en agua miliQ tal que el volumen final sea 13,75  $\mu$ l. Esa solución se incubó durante 15 minutos a  $55$  °C y luego se le adicionó a cada muestra una mezcla de volumen 6,25  $\mu$ l (compuesta por 4  $\mu$ l de buffer de RT 5X, 0,25  $\mu$ l de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,5  $\mu$ l de oligodTs 100  $\mu$ M (oligo de 15 nucleótidos), 0,25  $\mu$ l de inhibidor de ARNasas 40 U/ $\mu$ l y 0,5  $\mu$ l de enzima M-MLV RT 200 U/ $\mu$ l). Esa solución de 20  $\mu$ l fue incubada durante 1 hora a  $37$  °C para dar lugar a la reacción de síntesis de ADNc y luego 5 minutos a  $95$  °C para frenarla por inactivación de la enzima. El cADN proveniente de este procedimiento fue almacenado a  $-20$  °C hasta su uso.

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

La qPCR se utilizó como herramienta para medir expresión génica utilizando como molde el ADNc obtenido luego de la transcripción reversa. Todas las reacciones de qPCR fueron realizadas en un volumen final de 25  $\mu$ l que fueron colocados en placas de 96 pocillos compatibles con el termociclador CFX96 *touch real-time* (BioRad). A cada pocillo se le colocaron 20  $\mu$ l de *mastermix* y 5  $\mu$ l de una

dilución 1:5 de ADNc. La *mastermix* se preparó considerando que cada muestra se incubó con 2,5 µl de *buffer* de reacción 10X, 0,75 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,75 µl de *Sybr Green* (dilución 1:1000, Roche), 0,5 µl de una solución de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, Productos Bio-Lógicos), 0,5 µl de *primer forward* 10 µM, 0,5 µl de *primer reverse* 10 µM, 0,3 µl de Taq ADN Polimerasa (5 U/ µl, Productos Bio-Lógicos) y agua libre de ADNAsas c.s.p 20 µl.

Las condiciones de ciclado fueron un ciclo a 95 °C durante 10 minutos, luego 40 ciclos de la secuencia 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos. Luego, se realizó una curva de disociación térmica (o curva de melting) para evaluar la especificidad de la reacción. El detalle de las secuencias de *primers* utilizados se encuentra en la **Tabla 5**.

**Tabla 5. Información sobre las secuencias analizadas por RT-qPCR.**

Gen		Secuencia (5'-3')	Información
AHCYL1	Fw	CGATGTGACCAGCCTCCGCAC	Gen de interés
	Rv	TGCTTGTATCGCCCCTCGGGT	
AHCY	Fw	ATCCTTGCCCGGCACTTTGAG	Gen relacionado a AHCYL1
	Rv	TCCACCTGCGGCTTGATGTTC	
CD44	Fw	TCCAACACCTCCCAGTATGACA	Marcador <i>Stem</i>
	Rv	GGCAGGTCTGTGACTGATGTACA	
CD133	Fw	ACAACACTACCAAGGACAAGG	Marcador <i>Stem</i>
	Rv	GGACTTAATCTCATCAAGAACAGG	
HMGA2	Fw	GCCAAGAGGCAGACCTAGGAAA	Marcador <i>Stem</i>
	Rv	CATGGCAATACAGAATAAGTGGTCA	
ITGA6	Fw	ATTCAGGAGTAGCTTGGTGGAT	Marcador <i>Stem</i>
	Rv	TTCTCTTGAAGAAGCCACACTTC	

<b>MUC5B</b>	<b>Fw</b>	TACAACGTGCGTGTGCTTTG	Marcador Diferenciación
	<b>Rv</b>	CTGTTGTGGTCGGCTTTGTG	
<b>POU5F1</b>	<b>Fw</b>	GCTGGAGAAGGAGAAGCTGG	Marcador <i>Stem</i>
	<b>Rv</b>	GCTAAGCTGCAGAGCCTCAA	
<b>RPL19</b>	<b>Fw</b>	CAATGCCAACTCCCGTCAGCAGAT	<i>Housekeeping</i>
	<b>Rv</b>	GTGTTTTTCCGGCATCGAGCCC	
<b>SFTPC</b>	<b>Fw</b>	AGCAAAGAGGTCCTGATGGA	Marcador Diferenciación
	<b>Rv</b>	ACAATCACCACGACGATGAG	
<b>SNAIL</b>	<b>Fw</b>	ACAATCACCACGACGATGAG	Marcador Transición Epitelio-Mesenquimal
	<b>Rv</b>	CTGCTGGAAGGTAAACTCTGG	
<b>VEGF-A</b>	<b>Fw</b>	AGCTACTGCCATCCAATCGA	Marcador Angiogénesis
	<b>Rv</b>	GGTGAGGTTTGATCCGCATA	

*Fw: Forward; Rv: Reverse*

Para el análisis de expresión y comparación entre condiciones, se utilizó el método delta Ct, considerando el Ct del gen de interés y el Ct de un gen de referencia (en nuestro caso, RPL19) (Livak and Schmittgen 2001).

## Western Blot

### Preparación de extractos celulares

Las muestras fueron cosechadas en buffer de lisis RIPA (NaCl 250mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaF 25 mM, EDTA 2mM y Tritón-X 0.1%), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM (Sigma, #P7626), ortovanadato de sodio 8 mM (Sigma, #S6508) y un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche, #11836145001). Para extraer las proteínas, las muestras fueron incubadas durante 30 minutos en rotación a 4°C y luego centrifugadas a 13300 rpm a 4°C. Las muestras fueron usadas inmediatamente o congeladas a -80°C hasta su uso. La cuantificación de

proteínas se realizó con el kit comercial BCA Protein Assay Kit (Pierce), según especificaciones de Thermo Fisher Scientific. Por último, se lisaron las muestras en buffer Laemmli 6X (Tris-HCl (pH 6.8) 375 mM, SDS 12% m/v, glicerol 50% v/v,  $\beta$ -mercaptoetanol 15% v/v, azul de bromofenol).

Alternativamente, se cosecharon muestras directamente en buffer Laemmli 2X (Tris-HCl (pH 6,8) 125 mM, SDS 2% m/v, glicerol 25% v/v y  $\beta$ -mercaptoetanol 5% v/v, azul de bromofenol) utilizando un *scraper* sobre la placa de cultivo en hielo. Estas muestras fueron sonicadas en sonicador Bioruptor (Next Gen Diagenode).

En ambos casos, los lisados fueron calentados a 95°C por 5 minutos antes de ser sembrados en geles de poliacrilamida.

#### Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), electrotransferencia y revelado

Las muestras fueron resueltas en geles de poliacrilamida de porcentaje variable en condiciones desnaturalizantes en buffer de corrida Tris-Glicina-SDS (Tris 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, SDS 0.1% m/v). El porcentaje de poliacrilamida varió entre 10 y 15% y fue decidido en función de las proteínas de interés a revelar. Como marcador de peso molecular se usó *Precision Plus Protein All Blue Prestained* (BioRad #1610373). Se realizó la corrida electroforética a voltaje constante de 100V hasta observar la caída del frente de corrida.

Luego, se realizó la transferencia a membranas de PVDF previamente activadas en metanol durante 1 minuto (BioRad #1620177). La misma fue realizada durante 90 minutos a voltaje constante de 100V y utilizando buffer de transferencia (Tris 25 mM pH 8.3, Glicina 192 mM, metanol 20% v/v) a 4 °C. Al finalizar, se procedió a teñir las membranas con Rojo Ponceau para corroborar la presencia de proteínas y que las masas sembradas en las distintas calles fuesen comparables. Luego, se incubaron las membranas en agitación durante 1 hora en solución de bloqueo (TBS-Tween 0,05% (Tris 25 mM pH 7.4, NaCl 150 mM,

Tween-20 0.05% v/v) con 5% leche descremada 5% m/v) con el fin de evitar el pegado inespecífico.

La incubación con anticuerpos primarios se realizó en agitación a 4°C durante toda la noche y las diluciones de anticuerpos fueron preparadas en una solución de BSA 3% m/v en TBS-Tween 0.05%. La lista de anticuerpos utilizados, sus diluciones y marcas se detalla en la siguiente sección.

Posterior a la incubación con anticuerpo primario, se realizaron tres lavados con TBS-Tween 0.05% durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario de la especie correspondiente acoplado a peroxidasa de rabanito (HRP) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. La dilución de anticuerpo secundario se preparó en solución de bloqueo. Se lavaron nuevamente las membranas tres veces durante 10 minutos en TBS-Tween 0.05% en agitación a temperatura ambiente.

El revelado de la unión de los anticuerpos se realizó en presencia del kit de quimioluminiscencia *SuperSignal West Dura* (ThermoFischerScientific, #34075) utilizando el equipo G:BOX-CHEM-XT4 (Sygene). Para analizar las imágenes obtenidas se utilizó el programa ImageJ (NIH) que permite realizar la cuantificación de la señal.

### Anticuerpos utilizados

**Tabla 6. Anticuerpos utilizados en ensayos de *Western Blot*.**

Anticuerpo	Dilución	Catálogo	Marca
AHCYL1	1:1000	SAB2100076	Sigma-Aldrich
POU5F1	1:1000	ab19857	Abcam
AHCY	1:1000	RN126PW	MBLI
H3K4me3	1:1000	ab8580	Abcam
H3K9me2	1:1000	4658	Cell Signaling
H3	1:3000	4499	Cell Signaling

<b>GAPDH</b>	1:20000	ab8245	Abcam
<b>B-ACTINA</b>	1:3000	sc-47778	Santa Cruz Biotechnology
<b>RATÓN-HRP</b>	1:3000	17106516	BioRad
<b>CONEJO-HRP</b>	1:3000	1721019	BioRad

Detalle de diluciones, catálogo y marca de cada anticuerpo.

## Inmunofluorescencia

Las células fueron sembradas en pocillos con vidrios del tamaño elegido 24 horas antes de realizar la inmunofluorescencia. En primer lugar, se lavó 3 veces durante 5 minutos con PBS (de ahora en adelante, a esta repetición se la denominará “lavados”). Luego, las células fueron fijadas con PFA 4% durante 10 minutos. Se realizaron los lavados y luego se incubó con una solución de permeabilización (Tritón X-100 0.1% en PBS) durante 10 minutos. Nuevamente se realizaron lavados. Para el bloqueo, se incubaron las células durante 30 minutos con solución de bloqueo (BSA 3% m/v en PBS) y luego se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario en cámara húmeda a 4 °C.

Al día siguiente, se realizaron los lavados y se incubó con anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 1 hora en oscuridad (debido a que el anticuerpo secundario es fluorescente). La dilución de los anticuerpos primario y secundario se realizó en la solución de bloqueo.

Una vez terminada la incubación con anticuerpo secundario, se procedió a lavar nuevamente y se incubó con DAPI (1:3000 en PBS) durante 15 minutos. Finalmente, luego de lavar se procedió al montaje con Mowiol (#81381, Sigma).

Las fotos fueron tomadas con un microscopio confocal LSM 710 AxioObserver (Zeiss) y se utilizó el software ZEN 2011 para la adquisición de las imágenes.

**Tabla 7. Anticuerpos utilizados en ensayos de inmunofluorescencia.**

Anticuerpo	Dilución	Catálogo	Marca
AHCYL1	1:250	SAB2100076	Sigma-Aldrich
Alexa Fluor647 anti-conejo	1:1000	A21245	ThermoFisher Scientific

Detalle de diluciones, catálogo y marca de cada anticuerpo.

## **Experimentos *in vivo***

### **Animales**

Los ratones fueron criados en condiciones estándar de laboratorio (temperatura  $22\pm 2$  °C y  $55\pm 5\%$  de humedad) con comida y agua *ad libitum*. Su mantenimiento, apareo, sacrificio y uso experimental fue realizado bajo las normas y protocolos aprobados por el Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires para los ensayos de tumorigénesis *in vivo* y por la CICUAL del IBioBA para los ensayos de angiogénesis *in vivo*. Los experimentos fueron diseñados teniendo en cuenta las guías ARRIVE (Percie du Sert et al. 2019) y se desarrollaron con asistencia permanente de los Bioteristas del Bioterio del IBioBA.

### **Tumorigénesis**

Ratones NOD SCID de 6-8 semanas de edad fueron inyectados de manera subcutánea en el flanco derecho mientras se encontraban anestesiados. Se les inyectó una suspensión de  $2 \times 10^6$  células A549 (ya sea el control NT o alguna de las líneas silenciadas KD-AL1-2 o KD-AL1-4) preparada en DMEM sin suero. Se utilizaron 7-8 animales por tratamiento para el chequeo de las células KD-AL1-4 y 3 animales para las células KD-AHCYL1-2. En ambos casos, los animales fueron inyectados bajo flujo laminar estéril. Se midió semanalmente el crecimiento tumoral y peso de cada animal (también en flujo laminar estéril). Junto con el peso, se evaluó el estado general de cada individuo. Luego de 7-8 semanas (tiempo en

que los tumores que crecen más rápido llegan a 1000 mm<sup>3</sup>), se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se removieron los tumores para su análisis. Se registró el peso (mg) y volumen final (mm<sup>3</sup>) de los tumores extirpados. El volumen tumoral fue calculado usando la siguiente fórmula (Euhus et al. 1986; Tomayko and Reynolds 1989):

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = \frac{\text{largo (mm)} \times \text{ancho}^2 \text{ (mm}^2\text{)}}{2}$$

### Angiógenesis

Ratones NODS SCID de 6-8 semanas fueron inyectados de manera intradérmica con 10<sup>6</sup> células A549 (NT o KD-AL1-4) en 100 µL de una solución conformada por 90 µL de DMEM sin suero y 10 µL de Azul de Tripán diluido 1:10 en el flanco derecho (Tedesco et al. 2019). Como control se inyectó una solución de DMEM-Azul de Tripán sin células en el flanco izquierdo. Para este procedimiento los animales fueron previamente anestesiados y posteriormente se esperó a su total recuperación para volver al bioterio.

Pasados 7 días de la inyección, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se removió su piel para poder fotografiar las regiones inyectadas utilizando un estereomicroscopio (modelo Stemi 305, Zeiss) y el software ZEN 2011.

Una vez obtenidas las fotos, se realizó una cuantificación de vasos medianos y pequeños utilizando el software ImageJ y calculando la densidad de vasos según la siguiente ecuación:

$$\text{Densidad de vasos (mm}^{-2}\text{)} = \frac{n^{\circ} \text{ vasos}_{\text{células}} - n^{\circ} \text{ vasos}_{\text{control}}}{\text{área de la imagen}}$$

## **Análisis Bioinformático**

Los datos utilizados fueron obtenidos de la base pública de “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA), mediante la herramienta *UCSC Xena browser* (Goldman et al. 2018) y se eligió el uso de la *dataset* TCGA Pan-Cancer (PANCAN). Luego, se aplicó un filtro para trabajar con los datos de adenocarcinoma (LUAD, *lung adenocarcinoma*) y cáncer de células escamosas (LUSC, *lung squamous cell carcinoma*).

Para el análisis de tejido normal versus tumoral, se utilizaron datos de expresión de mRNA de *AHCYL1* de muestras normales y tumorales. Para confeccionar los gráficos de los distintos estadios tumorales, se aplicaron filtros para seleccionar dentro del *dataset* tumoral las categorías tumor primario, recurrencia locorregional y metástasis distante. En este caso, se trabajó con las categorías puras; las categorías “tumor primario/metástasis” o “recurrencia/metástasis” no fueron tenidas en cuenta para realizar este análisis. Esto se realizó utilizando los *datasets* TCGA-LUAD y TCGA-LUSC.

La correlación de *MKI67* y *AHCYL1* se realizó utilizando el *dataset* de tumores LUAD y LUSC (filtrados a partir de Pan-Cancer) y se graficaron en gráfico XY que se evaluó mediante una correlación de Spearman. A su vez, se estudió la correlación entre la expresión de *AHCYL1* con un índice de pluripotencia confeccionado por Malta y colaboradores mediante un algoritmo de aprendizaje automático (Malta et al. 2018). El algoritmo fue entrenado con datos de transcriptómica de células pluripotentes embrionarias (no tumorales) y luego fue puesto a prueba indagando sobre el perfil molecular de células tumorales obtenidas a partir de 12.000 muestras de 33 tipos de tumores distintos. Para cada tipo de tumor se hizo un entrenamiento independiente con el objetivo de jerarquizar genes específicos para cada tipo tumoral en particular. A partir de este trabajo, se desprenden dos índices de pluripotencia, uno a partir de expresión génica (ARNm) y otro basado en epigenética. Ambos van de 0 (bajo) a 1 (alto), donde los tumores con mayores rasgos de pluripotencia mostraron valores

cercanos a 1 y fueron asociados a procesos biológicos activos en CMTs, en tumores que tenían mayor grado de dediferenciación y de grado histopatológico. El índice de expresión génica se basa en todo el transcriptoma para cada tipo de tumor. Fue validado con *datasets* externos para células *stem* y también células diferenciadas y demostró que todos los genes de *stemness* publicados se encontraron enriquecidos. El índice de pluripotencia basado en epigenética también está basado en datos de transcriptómica, pero considera un universo menor de genes. Los genes seleccionados fueron aquellos cuyos promotores estuviesen hipometilados en estadios pluripotentes de células madre pluripotentes y células madre pluripotentes inducidas. La mayoría de estos genes tenían sitios de unión para SOX2-POU5F1. Teniendo en cuenta los datos de AHCYL1 y MKI67, se confeccionaron dos subgrupos “alto AHCYL1 – bajo MKI67” y “bajo AHCYL1 – alto MKI67” y se analizó cómo afectó esta división a los índices de pluripotencia generados a partir de expresión de ARNm y a partir de datos epigenéticos. El gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier fue generado a partir de la herramienta KMPlotter (<https://kmplot.com/analysis>) (Gyorffy et al. 2013). Para ello, se utilizó la base de datos *Lung Cancer* y un análisis basado en la expresión media de dos genes (AHCYL1 y MKI67). Se analizó mediante una prueba de Mantel-Cox (log-rank test), que es una prueba estadística no paramétrica para contrastar la sobrevida de dos poblaciones.

El análisis de los datos fue realizado en colaboración con el Lic. Nicolás Budnik, becario doctoral del grupo.

## **Análisis de muestras de pacientes por Inmunohistoquímica**

### **Inmunohistoquímica**

Se realizó un estudio retrospectivo de muestras de pacientes operados en el Hospital Universitario Fundación Favaloro entre noviembre del 2009 y diciembre del 2020 y cuyas piezas quirúrgicas fueron estudiadas en el Servicio de Anatomía

Patológica. Se seleccionaron muestras histológicas de tejido tumoral procedente de resecciones quirúrgicas de cáncer de pulmón. Se analizaron 20 casos de adenocarcinomas de pulmón. Además, se sumaron como control 6 casos de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico no clasificados como adencarcinomas: 3 escamosos, 2 neuroendocrinos y 1 de células grandes. Como control, se determinó la marcación de AHCYL1 en tejido pulmonar normal en seis muestras de tejido de donantes cadavéricos sanos, cuyos órganos fueron utilizados para trasplante de pulmón, fallecidos por otras causas y sin patología pulmonar macroscópica ni histológica. Se seleccionaron bloques de tejido representativos de cada lesión conteniendo tumor, con exclusión de las zonas con hemorragia, necrosis y/o fibrosis para las pruebas de inmunohistoquímica para AHCYL1 y MKI67. Los ensayos de inmunohistoquímica fueron realizados utilizando una plataforma de tinción automática (BenchMark, GX, Ventana Medical Systems/Roche). Las muestras se fijaron en formaldehído al 4% y se incluyeron en parafina, realizándose secciones de 3  $\mu\text{m}$  de espesor. Los cortes fueron tratados con acondicionador celular 1 (CC1, #950-124, Roche) para la recuperación antigénica. Se utilizó un anticuerpo primario que reconoce a la proteína humana AHCYL1 (anti-AHCYL1, SAB2100076, Sigma) en una concentración final 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y uno que reconoce a la proteína humana MKI67 (anti-MKI67, #790-4286, Roche) en una concentración final 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Todos los anticuerpos primarios fueron incubados por 32 minutos. Para la visualización se utilizó el *OptiView DAB IH Detection Kit* (#760-700, Roche) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los cortes fueron lavados con agua destilada, contrastados con hematoxilina (12 minutos) y reactivo de *bluing* (4 minutos), deshidratados en orden decreciente de alcoholes, aclarados con xileno y luego montados con bálsamo de Canadá. Las secciones contiguas fueron teñidas con hematoxilina y eosina para evaluar el grado histológico de las neoplasias, que se clasificó de 1 a 4 según el criterio del *College of American Pathologists* (CAP) (Butnor et al. 2021). Tanto las diluciones de los anticuerpos utilizados, así como los tiempos de incubación fueron puesto a punto utilizando controles negativos (en ausencia de anticuerpo primario) y

controles positivos (tejidos disponibles del banco de tejidos del Servicio de Anatomía Patológica de la Fundación Favaloro). Estos experimentos se realizaron mediante la colaboración técnica entre la tesista y el personal técnico del Servicio (la Técnica Araceli Castro). La determinación de positividad y negatividad de la marca fue realizada por patólogos del Servicio de la Fundación Favaloro.

Para realizar la cuantificación de AHCYL1, se definió la intensidad de la tinción de AHCYL1 de manera semi-cuantitativa de 0 a 4, siendo: 0, sin tinción; 1, tinción débil; 2, tinción moderada y 3-4, tinción intensa. Se empleó el antígeno MKI67 como indicador de ingreso en ciclo celular de las células neoplásicas, realizándose una cuantificación según la proporción de células neoplásicas con núcleos con tinción positiva a una alta magnificación (400x). En todos los casos, las evaluaciones de las muestras fueron realizadas de forma independiente por dos patólogos (Dr. Kevin Davies y Dr. Juan Pablo Santillán) cegados a las características clínicas de los pacientes. Las discordancias relativas a los diagnósticos histológicos y la evaluación inmunohistoquímica fueron discutidas y resueltas en consenso con un tercer patólogo (Dr. Carlos Vigliano). De manera independiente y sin conocimiento de las características clínicas, la Tesista realizó las evaluaciones a fin de corroborar las observaciones de los patólogos, como parte formativa de la tesis.

Los datos demográficos, clínicos, quirúrgicos (tipo de resección tumoral) y anatomopatológicos (tamaño, tipo histológico y estadio tumoral) de los pacientes se incorporaron a una base de datos a la que se agregaron los datos de evolución clínica del postoperatorio y aquellos provenientes de los controles periódicos de los pacientes, destinados a evaluar la recurrencia tumoral y la sobrevida (Kadota et al., 2014). También se registró el tiempo de seguimiento de los pacientes, que fue calculado haciendo la diferencia entre la fecha de la última consulta y la fecha de la cirugía. En este análisis se incluyeron datos hasta enero del 2022.

Por otro lado, se evaluó la infiltración de células atípicas en la pleura debido a su relevancia para determinar el estadio tumoral. Se definió la infiltración pleural

de manera semicuantitativa, siendo 0: sin infiltración pleural; 1: con infiltración pleural; 2-3: con infiltración pleural y compromiso de la pleura parietal.

### **Comité de Bioética**

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética de Fundación Favaloro DDI (1473) 0719.

### **Análisis Estadístico**

#### **Análisis estadístico de los datos generados a partir de la experimentación en *in vitro* e *in vivo***

El tratamiento estadístico de los datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). En los casos en los que se cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se realizaron estudios paramétricos: T de Student para comparaciones de dos grupos y ANOVA seguido de una prueba de Dunnett a posteriori para comparaciones entre grupo control y tratamientos (para tres o más grupos) o de Tukey para comparar todos los grupos entre sí. Para aquellos datos en los cuales se cumpla la normalidad, pero las varianzas no sean homogéneas, se utilizó T de Student con corrección de Welch para comparaciones entre dos grupos y la prueba de Brown-Forsythe y Welch seguida de una prueba de Dunnett para comparaciones entre grupo control y tratamientos (tres o más grupos). En caso de no cumplirse los supuestos, se realizaron análisis no paramétricos, prueba de Mann-Whitney para comparar dos medias y Kruskal-Wallis en reemplazo del ANOVA seguido de prueba de Dunn para comparaciones entre el grupo control y tratamientos (tres o más grupos). Para indicar diferencias significativas se utilizó la siguiente referencia: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,005$  y \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

### **Análisis Estadístico aplicado a los datos de Bioinformática**

Para el análisis de datos bioinformáticos se tomaron las mismas consideraciones que fueron mencionadas para los datos obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo* (chequeo de supuestos y elección de prueba paramétrica o no paramétrica). Además, se realizó un análisis de correlación entre la expresión de MKI67 y de AHCYL1. Se eligió utilizar la correlación de Spearman que no asume que la distribución de ambas variables es gaussiana. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se analizaron mediante una prueba de Mantel-Cox (*log-rank test*). Esta prueba estadística es no paramétrica y permite contrastar la supervivencia de dos poblaciones.

### **Análisis de los datos provenientes de las muestras de pacientes del Banco de Tejidos de la Fundación Favaloro.**

Para las variables cuantitativas, se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para explorar su distribución. Las variables numéricas que presentaron distribución normal se exhibieron como media y desviación estándar. Las variables con distribución no gaussiana se presentaron como medianas y rango intercuartilo 25-75%. Las variables categóricas se reportaron como porcentajes del total y se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado de Fisher. Para el análisis de las variables cuantitativas con distribución normal, se utilizó la prueba de t o ANOVA para muestras independientes. Para el análisis de variables con distribución no paramétrica, se utilizó la prueba de Mann Whitney o de Kruskal-Wallis, según corresponda.

Para evaluar si existen diferencias en la tasa de supervivencia de acuerdo a las variables demográficas, clínicas, quirúrgicas, anatomopatológicas, marcación con MKI67 e intensidad de la marcación inmunohistoquímica para AHCYL1, se utilizó la regresión de Cox, informando el *hazard ratio* (HR) y los intervalos de confianza (IC95%) para cada variable. Las variables con HR mayor a 1 se consideran de riesgo, mientras que las de HR menor a 1 son consideradas

variables protectoras. Todas las  $p$  comunicadas se realizaron a dos colas y un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois). Estas determinaciones se realizaron tanto por personal de Fundación Favaloro (Dr. Vigliano) así como por la Tesista y se realizaron reuniones periódicas para discutir los resultados como parte de la colaboración y de la formación de la doctorando.

## **Imágenes**

Las imágenes 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 35 fueron realizadas a través de la plataforma BioRender.com

# **RESULTADOS**

## RESULTADOS

El objetivo de esta tesis fue caracterizar el rol de la proteína AHCYL1 en un modelo tumoral de pulmón y su impacto en la tumorigénesis. Para ello, se evaluó su expresión en células de modelo de cáncer de pulmón, se estudió su modulación de expresión en distintos modelos de plasticidad celular, y se realizaron experimentos de sobreexpresión y reducción de la expresión mediante la transfección de vectores de expresión heteróloga para la proteína de fusión tdTomato-AHCYL1 y la técnica de interferencia mediante infección lentiviral (shARNs) y transfección transitoria (siARN), respectivamente. Además, se realizaron experimentos *in vivo* y análisis de expresión en muestras de pacientes para entender el potencial impacto de esta proteína en un contexto más cercano a la clínica.

### **Expresión de AHCYL1 en pulmón**

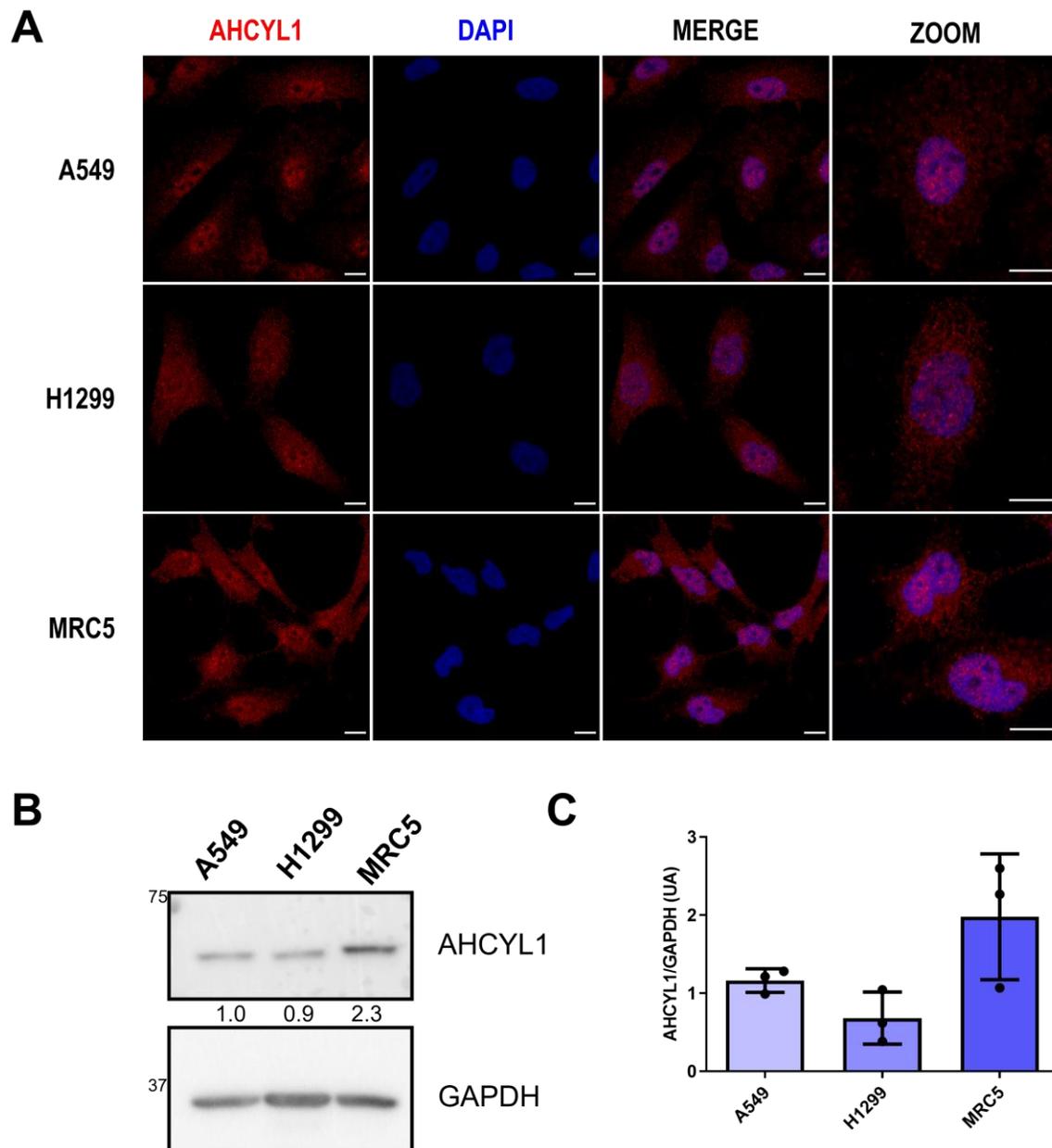
AHCYL1 es una proteína a la cual se le atribuyen diversas funciones (ver **Introducción**). En cuanto al rol de AHCYL1 en cáncer se sabe muy poco y al momento de comenzar esta tesis no había reportes que vincularan a esta proteína con cáncer de pulmón ni con plasticidad celular. Por tal motivo, el primer objetivo fue estudiar la expresión y localización de AHCYL1 en las líneas celulares que fueron elegidas como modelo.

### **Análisis de localización y expresión de AHCYL1 en líneas celulares**

En primer lugar, se realizó una caracterización de expresión y localización de AHCYL1 en líneas celulares humanas de pulmón. Para ello, se seleccionaron dos líneas tumorales ampliamente utilizadas en la bibliografía como modelo de cáncer de pulmón (A549 y H1299) y una línea celular de fibroblastos de pulmón (MRC-5) correspondiente a células no tumorales. Según la bibliografía, AHCYL1

está descrita como una proteína citoplasmática que puede eventualmente translocar al núcleo cuando sufre de clivaje proteolítico (Devogelaere, Sammels, and Smedt 2008). Al momento de la escritura de esta tesis, no se encontraron reportes sobre la expresión y localización endógena de AHCYL1 en líneas de pulmón humanas. Como se puede observar en la **Figura 9 A**, el estudio de AHCYL1 endógeno mediante inmunofluorescencia (IF) reveló que su localización es tanto citoplasmática como nuclear en las líneas analizadas, mostrando mayor intensidad en el compartimento nuclear. A su vez, se observó una mayor intensidad en la marca observada en la línea no tumoral MRC-5 en comparación con lo observado para las líneas tumorales A549 y H1299.

Para corroborar esta observación, se analizó la expresión de la proteína AHCYL1 mediante *Western blot* (WB) y se observó que la línea MRC-5 expresa mayores niveles de AHCYL1 endógeno que las líneas tumorales A549 y H1299 (**Figura 9 B**). El análisis densitométrico semicuantitativo indica una tendencia a mayores niveles de expresión en las células no tumorales (al borde de la significancia estadística,  $p=0,0541$ ) (**Figura 9 C**).

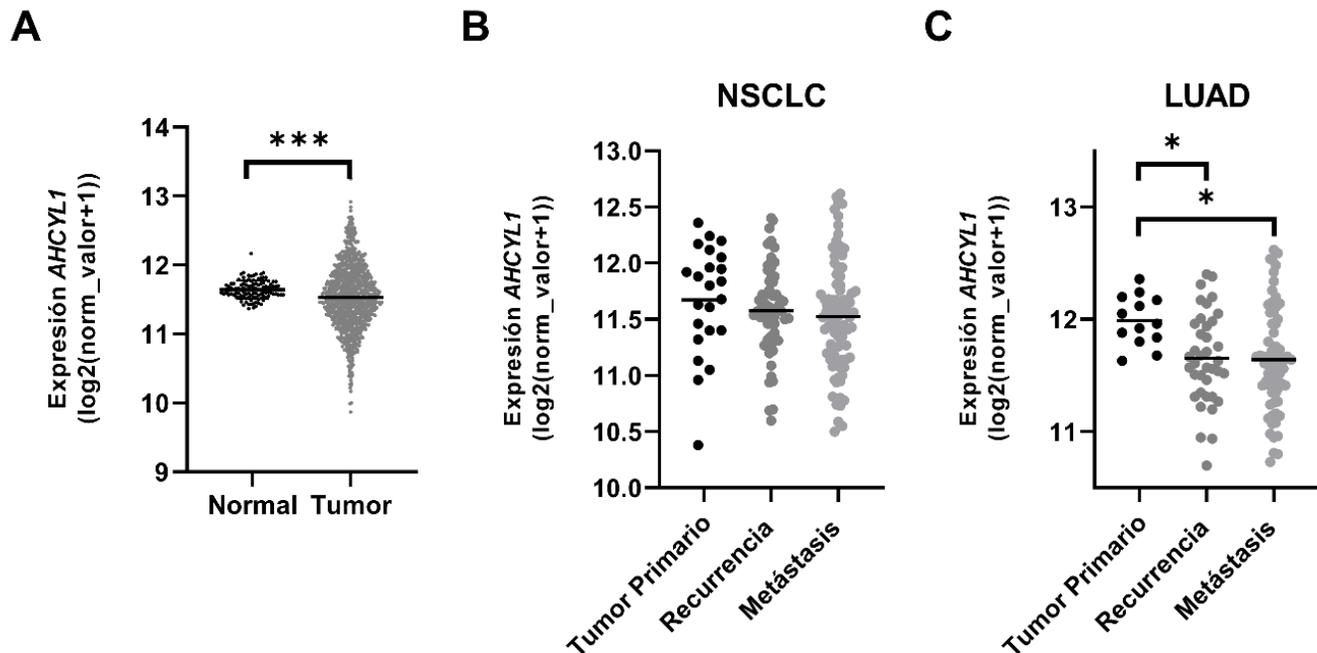


**Figura 9. Análisis de expresión y localización subcelular de AHCYL1.** **A)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia de células A549, H1299 y MRC-5 donde se observa la localización de AHCYL1 (rojo). Se utilizó el marcador nuclear DAPI (azul). La barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m. Se analizaron más de 100 células provenientes de dos experimentos independientes. **B)** *Western blot* representativo de AHCYL1 (60 kDa) para las líneas A549, H1299 y MRC-5. Se utilizó GAPDH (37 kDa) como control de carga. **C)** Cuantificación de 3 experimentos independientes de *Western blot* donde se relativizó la expresión de AHCYL1 a la carga de GAPDH expresado en unidades arbitrarias (UA) ( $p=0,00541$ ;  $n=3$ ).

## **Análisis de la expresión de AHCYL1 en muestras de transcriptómica de pacientes**

Para poder determinar el rol de AHCYL1 en cáncer de pulmón y analizarlo en un contexto más próximo a la clínica, se evaluó su expresión a partir de datos provenientes de bancos de muestras de pacientes. En primer lugar, se utilizó información de secuenciación de ARN (ARN-seq) de la base de datos pública *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), en su *dataset* Pan-Cancer y se analizó lo correspondiente a cáncer de pulmón, en muestras de adenocarcinoma (LUAD) y de cáncer de células escamosas (LUSC). También se usaron las bases de datos TCGA-LUAD y TCGA-LUSC.

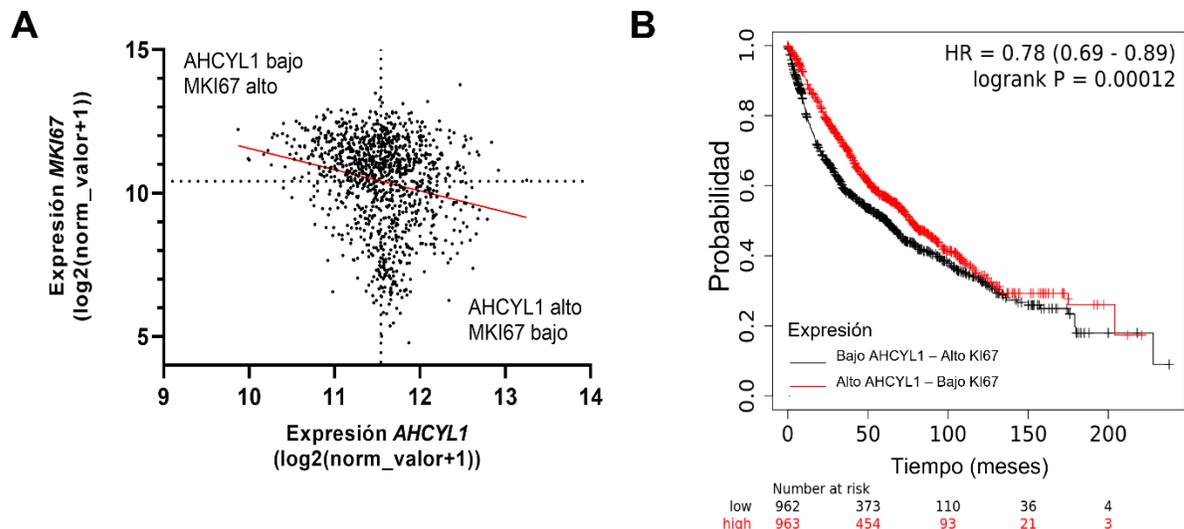
En una primera instancia, se evaluó la expresión de AHCYL1 a nivel de ARNm en muestras de tejido normal sano en comparación con muestras tumorales. La expresión de AHCYL1 en los tumores de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, *non-small cell lung cancer*) fue significativamente menor (**Figura 10 A**). Esto fue consistente con lo observado en las líneas celulares (**Figura 9**). Luego evaluamos los niveles de expresión de *AHCYL1* entre tumores primarios, recurrencias y metástasis. Observamos que en los NSCLC las diferencias no fueron significativas (**Figura 10 B**). Sin embargo, al analizar los adenocarcinomas, se observó que AHCYL1 posee una expresión significativamente menor en recurrencias y metástasis en comparación con los tumores primarios (**Figura 10 C**). Esto indicaría que los adenocarcinomas que presentan características de mayor agresividad y resistencia tendrían menor expresión de *AHCYL1*.



**Figura 10. Expresión de AHCYL1 en muestras de pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas obtenidas a partir de la base de datos TCGA. A)** Expresión de AHCYL1 en muestras de pacientes provenientes de TCGA, donde se analizaron muestras de tejido normal (n=110) y tumores NSCLC (n=1016) utilizando una prueba de Mann-Whitney ( $p=0,0008$ ). **B)** Expresión de AHCYL1 en distintos estadios tumorales en NSCLC. Se compararon tumores primarios (n=23), recurrencias (n=60) y metástasis (n=89) y se analizaron mediante ANOVA seguido de una prueba de Tukey ( $p=0,6546$  para recurrencia;  $p=0,3482$  para metástasis). **C)** Expresión de AHCYL1 en distintos estadios tumorales en adenocarcinomas. Se compararon tumores primarios (n=13), recurrencias (n=38) y metástasis (n=67) y se analizaron mediante ANOVA seguido de una prueba de Tukey ( $p=0,0403$  para recurrencia;  $p=0,0209$  para metástasis); NSCLC: non-small cell lung cancer; LUAD: lung adenocarcinoma \*  $p\leq 0,05$ , \*\*  $p\leq 0,01$ , \*\*\*  $p\leq 0,005$  y \*\*\*\*  $p\leq 0,0001$ .

Actualmente, MKI67 es utilizado como un marcador de alta proliferación y como variable predictiva de tumores con peor pronóstico (Y. Liu et al. 2017; Martin et al. 2004). En la cohorte de pacientes provenientes de la base de datos, se observó una correlación inversa entre la expresión de ARNm de AHCYL1 y MKI67 (Figura 11 A). En base a estos resultados seleccionamos dos subpoblaciones, aquellas que poseían expresión de AHCYL1 alto y de MKI67 bajo por un lado y aquellas que tenían la relación inversa por otro. Al confeccionar las curvas de

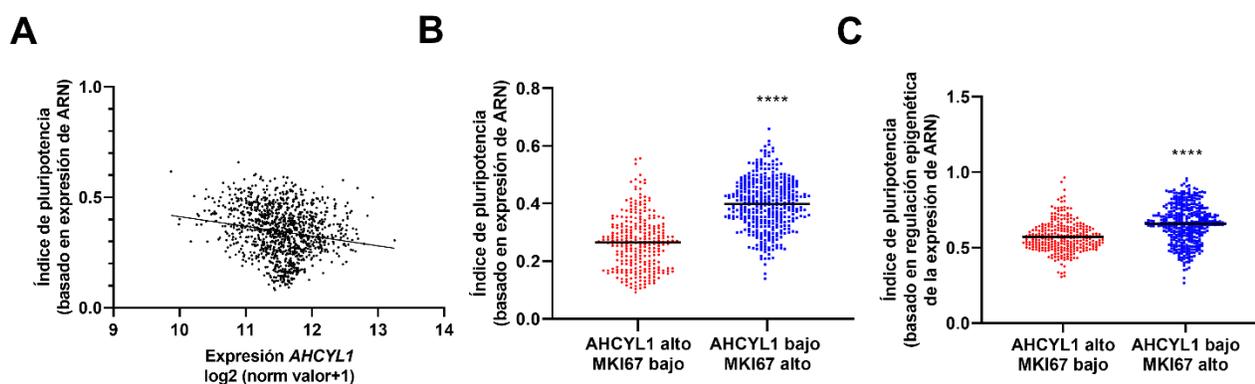
sobrevida de estas dos subpoblaciones, se observó que los pacientes con bajo *AHCYL1* y alto *MKI67* tenían un peor pronóstico (**Figura 11 B**).



**Figura 11. Análisis de *AHCYL1* y *MKI67* en muestras de pacientes en cáncer de pulmón de células no pequeñas. A)** Correlación entre la expresión de *AHCYL1* y *MKI67*, analizado por correlación de Spearman (n=1105, p<0,0001). **B)** Curvas de Kaplan-Meier para pacientes con bajo *AHCYL1*-alto *MKI67* y alto *AHCYL1*-bajo *MKI67* analizado por prueba de Mantel-Cox (n=1925, p=0,00012).

El cáncer de pulmón es altamente heterogéneo como ocurre en otros tipos de tumores sólidos. Dentro de esta heterogeneidad, se encuentran subpoblaciones de células tumorales que son plásticas y que suelen presentar elevados los niveles de expresión de genes de pluripotencia (Shenoy 2020). Teniendo en cuenta estos antecedentes, Malta y colaboradores desarrollaron un algoritmo de aprendizaje automático para identificar rasgos de pluripotencia asociado a la desdiferenciación oncogénica (Chen et al. 2021; Malta et al. 2018). Utilizando esta herramienta bioinformática, encontramos que la correlación entre la expresión de *AHCYL1* y el índice de pluripotencia basado en expresión génica fue negativa (**Figura 12 A**), sugiriendo que aquellos tumores con mayor expresión de *AHCYL1* poseen escasos rasgos de pluripotencia. Luego, se evaluó este índice en las subpoblaciones *AHCYL1* bajo-*MKI67* alto y *AHCYL1* alto-*MKI67* bajo y se

observó que los tumores con *AHCYL1* bajo-*MKI67* alto son los que presentan mayor índice de pluripotencia (**Figura 12 B**). Esta herramienta permite inferir un índice de pluripotencia también basado en datos epigenéticos (ver **Materiales y Métodos**). El análisis de este índice en las subpoblaciones de expresión de *AHCYL1/MKI67* mostró resultados similares (**Figura 12 C**). Estos resultados sugieren que los tumores con *AHCYL1* bajo-*MKI67* alto tienen mayor índice de pluripotencia y por lo tanto serían tumores con mayor grado de dediferenciación y mayor grado histopatológico.



**Figura 12. Relación entre índice de pluripotencia y *AHCYL1* en tumores de pulmón de células no pequeñas.** **A**) Correlación entre el índice de pluripotencia vs. *AHCYL1*, analizado por correlación de Spearman (n=1105, p<0,0001). **B**) Comparación de índice de pluripotencia basado en ARNm para las subpoblaciones alto *AHCYL1*-bajo *MKI67* (n=279) y bajo *AHCYL1*-alto *MKI67* (n=381), analizado con una prueba de T (p<0,0001). **C**) Comparación de índice de pluripotencia basado en datos de epigenética para las subpoblaciones alto *AHCYL1*-bajo *MKI67* (n=279) y bajo *AHCYL1*-alto *MKI67* (n=381), analizado con una prueba de T con corrección de Welch (p<0,0001). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

Del conjunto de resultados de esta sección podemos concluir que *AHCYL1* se encuentra menos expresado en tejido tumoral respecto al normal y que en adenocarcinomas su expresión disminuye en tumores con perfil más agresivo y migratorio. A su vez, *AHCYL1* y *MKI67* se correlacionan negativamente. El análisis de la subpoblación bajo *AHCYL1*-alto *MKI67* reveló que poseen una predicción de menor sobrevida y mayores índices de pluripotencia asociados que su contraparte

alto *AHCYL1*-bajo *MKI67*. En resumen, la expresión de *AHCYL1* pareciera ser indicio de mejor pronóstico en tumores de cáncer de pulmón.

### **Análisis de la expresión de *AHCYL1* en muestras de pacientes por inmunohistoquímica**

Para poder comprender el rol de *AHCYL1* en cáncer de pulmón no microcítico, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica utilizando una cohorte de muestras de 26 pacientes provenientes del banco de tejidos del Hospital Favaloro. Dentro de las muestras analizadas, 20 correspondieron a adenocarcinomas y 6 a tumores no microcíticos de otro origen (3 escamosos, 2 neuroendocrinos y 1 de células grandes). Además, se analizaron otros 6 casos de tejido pulmonar normal como control. Estos ensayos fueron realizados en colaboración con el Servicio de Anatomía Patológica de Fundación Favaloro.

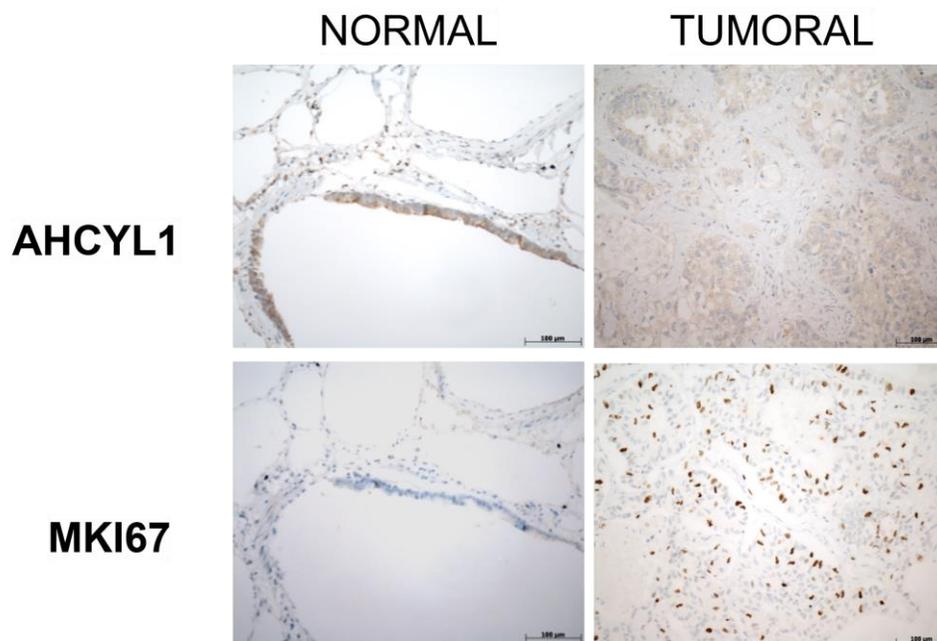
En los resultados que se muestran a continuación, se estudió la expresión de *AHCYL1* mediante una determinación de intensidad semi-cuantitativa, donde 1-2 se consideró como bajo y 3-4 como alto. A su vez, se analizó la marcación del marcador de entrada al ciclo celular *MKI67*. También se realizó la tinción con Hematoxilina-Eosina para poder determinar el grado histológico de las muestras. Brevemente, los tumores de bajo grado histológico (1-2) son aquellos que aún conservan características similares al tejido del cual se originan, por lo tanto, se consideran diferenciados. En cambio, los de alto grado histológico (3-4) son los que se encuentran menos diferenciados, y la histología del tumor ya no se asemeja al tejido original. Además, éstos tumores tienden a crecer y diseminarse más fácilmente (Yasukawa et al. 2018).

#### Análisis tejido normal vs. tumoral

En tejidos normales se encontró que la marcación de *AHCYL1* se detecta preferentemente en el revestimiento epitelial de las vías aéreas distales (bronquiolos) (**Figura 13, NORMAL**). Esto es relevante debido a que esta región

es considerada como el sitio de origen de lesiones preneoplásicas en los adenocarcinomas (Wistuba and Gazdar 2006). Se observó además que la marcación intensa de AHCYL1 en el tejido normal se asocia a una ausencia o muy aislada marcación de MKI67 (**Figura 13, NORMAL**).

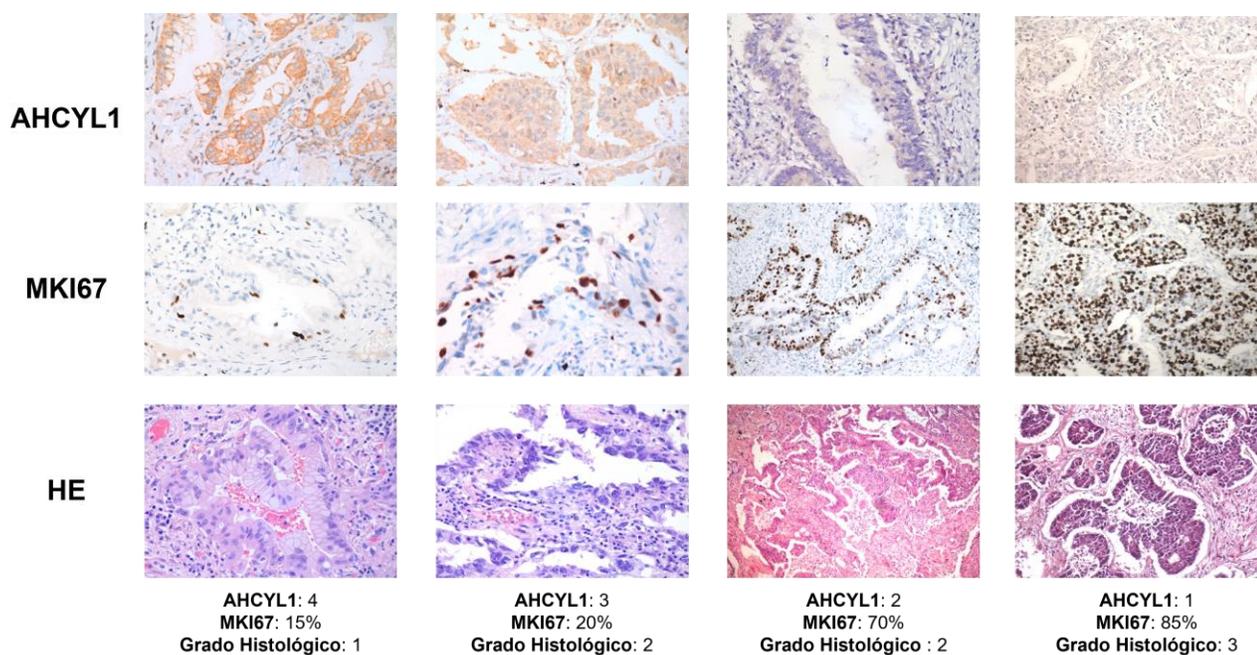
En este mismo sentido, dentro de los adenocarcinomas evaluados se observó una marcación intensa de AHCYL1 predominantemente en tumores bien diferenciados. Los adenocarcinomas poco diferenciados –de peor pronóstico–, mostraron una marca de AHCYL1 débil o poco intensa asociada a una marcación intensa de MKI67 (**Figura 13, TUMORAL**).



**Figura 13. Expresión de AHCYL1 y MKI67 en tejido pulmonar normal y en tejido tumoral (adenocarcinoma).** Análisis de inmunohistoquímica para la detección de las proteínas AHCYL1 y MKI67 en pulmón normal y en una muestra quirúrgica de adenocarcinoma (normal vs. adenocarcinoma de grado histológico 3), seleccionados del banco de tumores de Fundación Favaloro. Los cortes fueron incubados con un anticuerpo anti-AHCYL1 (paneles superiores) y con un anticuerpo anti-MKI67 (paneles inferiores). Magnificación original x200. La barra de escala corresponde a 100 µm.

### Análisis de los adenocarcinomas

Dentro de los 20 adenocarcinomas analizados, se encontró 1 caso con intensidad de marcación de AHCYL1 de 1 (5%); 4 casos con intensidad de marcación 2 (20%); 9 casos con intensidad de marcación 3 (45%); y 6 casos con intensidad de marcación 4 (30%) (**Tabla Suplementaria 2**). En la **Figura 14** se muestran casos representativos para distintas marcaciones de AHCYL1 junto con la inmunomarcación de MKI67. También se incluyó la Hematoxilina-Eosina correspondiente, que fue utilizada para determinar el grado histológico.



**Figura 14. Expresión de AHCYL1 y MKI67 en muestras de adenocarcinoma.** Análisis de inmunohistoquímica para la detección de las proteínas AHCYL1 y MKI67 en casos seleccionados de cáncer de pulmón del banco de tumores del Hospital Favaloro. Los cortes fueron incubados con un anticuerpo anti-AHCYL1 (paneles superiores), con un anticuerpo anti-MKI67 (paneles medios) y con Hematoxilina-Eosina (paneles inferiores) para determinar su grado histológico y estructura tisular (n=20). Magnificación original x200 o x400 (para poder observar el detalle de la marcación).

Se observó que los tumores que presentan menor expresión de AHCYL1 exhiben una mayor expresión de MKI67 y mayor grado histológico (**Figura 14**). La utilización de MKI67 se encuentra descrita como un marcador potencial de peor

prognosis en cáncer de pulmón (Y. Liu et al. 2017; Martin et al. 2004; Warth et al. 2014).

Luego se realizó un análisis de los parámetros clínicos e histopatológicos de las muestras de pacientes con adenocarcinoma de acuerdo al nivel de expresión de AHCYL1. Las muestras de los tumores se agruparon según su intensidad de marcación de AHCYL1 en mínima-leve (1-2: baja) o moderada-intensa (3-4: alta). Con esta nueva categorización se realizó el análisis en la siguiente tabla (**Tabla 8**):

**Tabla 8. Parámetros clínicos e histopatológicos de las biopsias de pacientes con adenocarcinoma de acuerdo al nivel de expresión de AHCYL1.**

	Total	AHCYL1 Bajo	AHCYL1 Alto	P valor
<b>Pacientes</b>	20	5	15	-
<b>Edad (años ± DS)</b>	64,9 (9,9)	67,3 (8,2)	64,0 (10,6)	0.539 <sup>a</sup>
<b>Sexo (%)</b>				
Masculino	11 (55%)	5 (100%)	6 (40%)	<b>0.038</b> * <sup>b</sup>
Femenino	9 (45%)	0 (0%)	9 (60%)	-
<b>Tiempo de seguimiento (mediana - IQR)</b>	452 (30-1976)	379(365-833)	1694 (1246-2535)	0.098 <sup>c</sup>
<b>Tamaño (mm ± DS)</b>	29,5 (16,5)	24,2 (9,9)	31,3(18,1)	0.417 <sup>a</sup>
<b>Infiltración pleural (%)</b>	8 (40%)	2 (40%)	6 (40%)	1.000 <sup>b</sup>
<b>MKI67 (% mediana - IQR)</b>	15 (5 – 35)	60 (30 – 70)	5 (5 – 17)	<b>0.004</b> * <sup>c</sup>

Los datos están expresados como números absolutos (%), media (DE) o mediana (rango intercuartílico). \* corresponde a diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) evaluadas por <sup>a</sup> Prueba T de Student, <sup>b</sup> Prueba exacta de Fisher, <sup>c</sup> Prueba de Mann-Whitney.

Como se observa en la **Tabla 8**, no se encontraron diferencias en la edad, tiempo de seguimiento, tamaño e infiltración pleural entre los tumores de baja y

alta expresión de AHCYL1. Se encontró una asociación significativa entre la expresión de AHCYL1 y el sexo, donde se observa que AHCYL1 se asocia a una expresión leve en hombres y a una expresión alta en mujeres. Dentro del total de hombres, 5/11 tuvieron marcación leve de AHCYL1 y 6/11 marcación alta, mientras que 9/9 mujeres tuvieron alta expresión de AHCYL1. De manera relevante y en concordancia con lo observado en la **Figura 14**, se encontró una fuerte asociación inversa entre AHCYL1 y MKI67 (**Tabla 8**). Estos resultados indicarían que los tumores con alto índice de proliferación poseen menor expresión de AHCYL1, y validarían los datos observados a partir de los análisis bioinformáticos utilizando los datos de expresión de ARNm de la base pública TCGA (**Figura 11**).

Luego, se realizaron análisis de correlación entre AHCYL1 y el grado histológico, la marcación de MKI67 y el estadio tumoral, que se resumen en la **Tabla 9**:

**Tabla 9. Correlaciones entre AHCYL1 y Grado Histológico, MKI67 o estadio para los 20 adenocarcinomas analizados.**

Variable	Coefficiente de Spearman	P valor
Grado histológico	-0,419	0,066
MKI67	-0,645	<b>0,002*</b>
Estadio	0,037	0,878

\*corresponde a diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) evaluados mediante análisis de correlación de Spearman

La correlación entre el grado histológico de los adenocarcinomas y AHCYL1 para los pacientes analizados presenta una tendencia negativa y al borde de la significancia estadística. Esto implica que los casos que poseen menor marcación de AHCYL1 serían los de mayor grado histológico, es decir, aquellos menos

diferenciados (**Tabla 9, Figura 14**). La correlación negativa entre AHCYL1 y MKI67 en adenocarcinomas fue estadísticamente significativa (**Tabla 9, Figura 14**), consistente nuevamente con los hallazgos en los datos de transcriptómica (**Figura 11**). Por último, se realizó la correlación entre AHCYL1 y los diferentes estadios (de I a III) pero no se observaron diferencias significativas. Esto probablemente se deba a que son pocos casos analizados.

#### Análisis de Supervivencia en casos de Adenocarcinomas

Se realizó un estudio de supervivencia por análisis de univariado mediante regresión de Cox. Este tipo de análisis considera la aparición del evento (en este caso, el deceso) a lo largo del seguimiento. Si bien fueron muy pocos casos y solo hubo 6 eventos (fallecidos) dentro del grupo de adenocarcinomas, el análisis determinó como variables de predicción a MKI67 y a AHCYL1 (**Tabla 10**). Teniendo en cuenta los valores que toman los HR (*hazard ratio*), AHCYL1 se considera una variable protectora y a MKI67 como una variable de mayor riesgo.

**Tabla 10. Regresión de Cox univariada en pacientes con adenocarcinoma de pulmón.**

Variable	Regresión de Cox	
	<i>Hazard Ratio (95%IC)</i>	<b>P valor</b>
Edad (años)	1,174 (0,995-1,323)	0,059
Sexo (masculino)	1,744 (0,319-9,544)	0,522
Grado Histológico	2,118(0,574-7,822)	0,260
Estadio	1,319 (0,763-2,280)	0,321
MKI67	1,048 (1,007-1,090)	<b>0,022*</b>
AHCYL1	0,169 (0,033-0,869)	<b>0,033*</b>

\*corresponde a diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Análisis adenocarcinomas vs. otros tumores no microcíticos

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se amplió la cohorte analizada sumando los tumores no clasificados como adenocarcinomas (“otros tumores”) y se obtuvieron los datos que se resumen en la **Tabla 11** (para más detalles ver **Tabla Suplementaria 2**). No se observaron diferencias en la edad, sexo, tamaño tumoral, grado histológico ni estado entre los dos grupos anteriormente mencionados. A su vez, se encontró que los “otros tumores” son más agresivos, debido a que muestran mayor marcación de MKI67 ( $p=0,002$ ) y menor tiempo de seguimiento de los pacientes ( $p=0,008$ ); esto sugiere que los tumores que no se clasificaron como adenocarcinomas tuvieron mayor proliferación y mortalidad más cercana a la fecha de la cirugía. Si bien no vimos diferencias significativas probablemente por la poca cantidad de casos, un 67% de los otros tumores tuvieron una baja marcación de AHCYL1, mientras que el 75% de los adenocarcinomas mostraron alta marcación de AHCYL1.

**Tabla 11. Parámetros clínicos e histopatológicos de pacientes con adenocarcinomas vs. otros tumores no microcíticos.**

	Total	Adenocarcinomas	Otros tumores	P valor
<b>n</b>	26	20	6	
<b>Edad (años±DE)</b>	65,2 (9,2)	64,9 (9,9)	66,4 (7,1)	0,732 <sup>a</sup>
<b>Sexo (masculino) (%)</b>	15 (57,7%)	11 (55,0%)	4 (66,7%)	1,000 <sup>b</sup>
<b>Tiempo de seguimiento (mediana - IQR)</b>	1117 (365-2285)	1489 (607-2535)	190 (9-554)	<b>0,008</b> <sup>*c</sup>
<b>Tamaño (mm ± DE)</b>	34,4 (25,6)	29,5 (16,5)	50,5 (42,9)	0,290 <sup>a</sup>
<b>Infiltración pleural (%)</b>	10 (38,5%)	8 (40%)	2 (33%)	1,000 <sup>b</sup>
<b>Grado Histológico (3-4)</b>	13 (50%)	9 (45%)	4 (67%)	0,645 <sup>b</sup>

				Resultados
<b>Estadio (II-III)</b>	11 (42,3%)	8 (40%)	3 (50%)	1,000 <sup>b</sup>
<b>MKI67 (% mediana - IQR)</b>	20 (5 – 60)	15 (5 – 35)	72 (65 – 90)	<b>0,002</b> <sup>*c</sup>
<b>AHCYL1 (3-4)</b>	17 (65%)	15 (75%)	2 (33%)	0,138 <sup>b</sup>
<b>AHCYL1 (1-2)</b>	9 (35%)	5 (25%)	4 (67%)	0,138 <sup>b</sup>

Los datos están expresados como números absolutos (%), media (DE) o mediana (rango intercuartílico). \* corresponde a diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) evaluadas por <sup>a</sup> Prueba T de Student, <sup>b</sup> Prueba exacta de Fisher, <sup>c</sup> Prueba de Mann-Whitney.

Al igual que para el análisis de los adenocarcinomas (**Tabla 9**), se realizó un análisis de correlación entre AHCYL1 y el grado histológico evaluando todos los casos de cáncer de pulmón no microcíticos (NSCLC) y este resultado fue estadísticamente significativo (coeficiente de correlación de Spearman = - 0,403;  $p = 0,041$ ).

Del conjunto de resultados de esta sección podemos concluir que la proteína AHCYL1 se expresa menos en el tejido tumoral respecto al normal. Además, dentro de la población de adenocarcinomas encontramos una asociación negativa entre AHCYL1 y MKI67, siendo la baja expresión de AHCYL1 y alta de MKI67 posibles variables de mayor riesgo para la supervivencia. Al ampliar la cohorte estudiada sumando otros tumores de cáncer de pulmón (todos no microcíticos, NSCLC) hallamos una asociación negativa entre la expresión de AHCYL1 y el grado histológico. Todos estos resultados fueron validados mediante el estudio de datos de transcriptómica provenientes de la base de datos TCGA.

En resumen, la expresión de AHCYL1 pareciera ser indicio de mejor prognosis en cáncer de pulmón no microcítico. Si bien es necesario ampliar la cantidad de pacientes y tener en cuenta el tiempo de seguimiento para poder determinar con certeza su utilidad como biomarcador pronóstico, la correlación

preliminar con un marcador conocido como MKI67 podría ser explorada en combinación con el uso de AHCYL1.

### **Hallazgos sobre la expresión de AHCYL1 en cáncer de pulmón**

#### **Análisis de localización y expresión de AHCYL1 en líneas celulares**

- AHCYL1 se acumula tanto en núcleo como en citoplasma de las líneas MRC-5, H1299 y A549.
- Se observó una marca de mayor intensidad en la inmunofluorescencia y una mayor cantidad de la proteína AHCYL1 en la línea no tumoral MRC-5, en comparación con las líneas tumorales, A549 y H1299.

#### **Análisis bioinformático de AHCYL1 en tumores de pulmón**

Los datos de transcriptómica muestran que:

- Hay una menor expresión de *AHCYL1* en tumores (comparado con tejido normal).
- *AHCYL1* se expresa en todos los estadios tumorales y, en adenocarcinomas, su expresión disminuye en muestras de recurrencias y metástasis.
- Hay una correlación inversa entre la expresión de *AHCYL1* y *MKI67*.
- Hay una correlación inversa entre la expresión de *AHCYL1* e índices de pluripotencia.

#### **Estudio de la expresión de AHCYL1 en muestras de tumores de pacientes**

En las muestras de pacientes con cáncer de pulmón se encontró que:

- La marcación de AHCYL1 es más intensa en tejido normal que en muestras de adenocarcinoma.
- Hay una asociación negativa entre AHCYL1 y MKI67.
- En el análisis de regresión de Cox (univariado), AHCYL1 sería una variable protectora mientras que MKI67 sería una variable de riesgo.
- AHCYL1 es candidato potencial para biomarcador junto con MKI67.

## **Estudio de AHCYL1 en modelos de plasticidad tumoral**

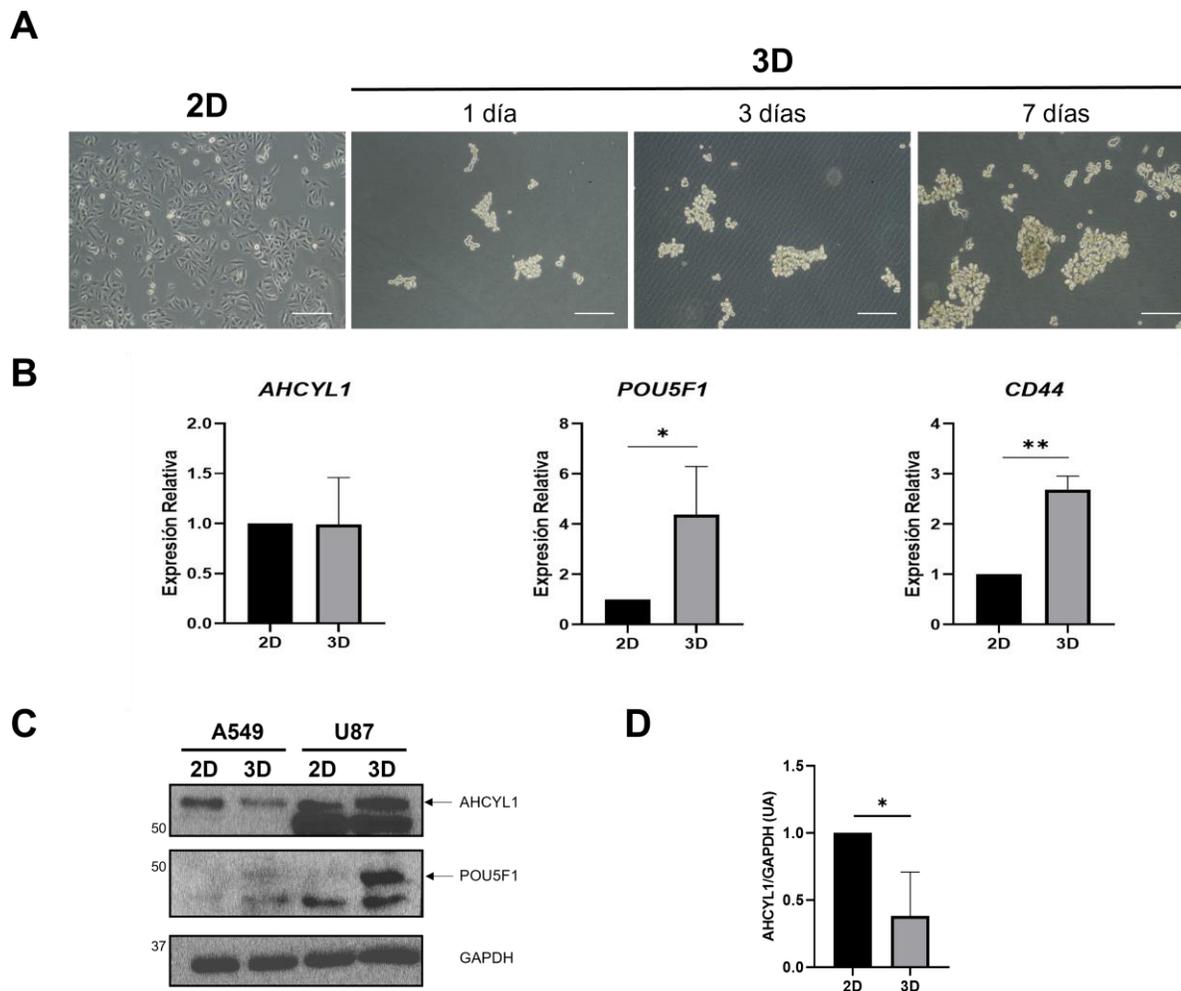
### **Modelo 3D**

Los cultivos tridimensionales (3D) o esferas se utilizan como modelo de tumores sólidos, ya que, en parte, recapitulan mejor algunas de las propiedades del tumor original en comparación a los cultivos en dos dimensiones (2D) (Bahmad et al. 2018). Las células capaces de crecer en medios libre de anclaje como esferas *in vitro* son las células embrionarias y las CMTs (Manzo 2019).

Para evaluar la expresión de AHCYL1 y su potencial nexo con el estado de identidad celular, se realizó un análisis comparativo entre cultivos en 2D que están enriquecidos en células diferenciadas y cultivos en 3D en condiciones de *stem*. Se cultivó entonces la línea de adenocarcinoma humano, A549 como monocapa y como esferoides, y se tomaron fotografías a los 3 y 7 días para analizar su morfología. Como se puede observar en la figura (**Figura 15 A**), las células A549 formaron estructuras libres de anclaje tipo esferoides similar a lo reportado previamente para esta línea celular (Zhao, Setrerrahmane, and Xu 2015).

A los 7 días de cultivo, se tomaron muestras tanto de ARNm como de proteína para estudiar la expresión de AHCYL1 y de marcadores de interés. Como control, se analizó la expresión de *POU5F1* y *CD44* (marcadores de pluripotencia) para corroborar que la formación de estructuras esferoides estuviese reflejada en su patrón de expresión molecular (J. B. Kim et al. 2009; Leung et al. 2010). Ambos

marcadores mostraron una inducción en su expresión y no se observaron diferencias en la expresión de *AHCYL1* al comparar las muestras de monocapa (2D) con esferoides (3D) (**Figura 15 B**).



**Figura 15. Análisis de la expresión de AHCYL1 en la línea celular A549 en monocapa (2D) y esferoides (3D).** **A)** Fotografías de la monocapa (2D) y de los esferoides (3D) tomadas a los 1, 3 y 7 días. Barra de escala: 1 mm. **B)** RT-qPCR para *AHCYL1*, *POU5F1* y *CD44*, donde *POU5F1* y *CD44* son controles positivos de inducción de estado de desdiferenciación. La expresión relativa es sobre la expresión en monocapa. RPL19 fue utilizado como control de normalización. Se analizó mediante prueba de T con corrección de Welch, para *AHCYL1* (n=3-5). **C)** *Western blot* para las proteínas AHCYL1 (60 kDa) y POU5F1 (proteína control de pluripotencia en esferas, 48 kDa). GAPDH (37 kDa) fue utilizado como control de carga. La línea celular U87 fue utilizada como control de formación de esferoides e inducción de pluripotencia. Las muestras corresponden a esferoides de 7 días. El blot corresponde a un experimento representativo de tres. **D)** Densitometría de bandas realizada con ImageJ. Analizado mediante prueba de T (n=3). \* p≤0,05, \*\* p≤0,01, \*\*\* p≤0,005 y \*\*\*\* p≤0,0001.

A diferencia de lo observado a nivel de ARNm, cuando se estudió la expresión proteica de AHCYL1 se observó una disminución significativa en su expresión en las muestras correspondientes a esferoides de 7 días de la línea pulmonar A549 (**Figura 15 C, D**). A su vez, en las mismas condiciones, se evaluó la expresión de POU5F1 la cual mostró una expresión aumentada. Como control, se corrieron en paralelo muestras de la línea celular U87, una línea ya utilizada en nuestro laboratorio que permitió corroborar la inducción de POU5F1 a nivel de proteína y el tamaño de la banda esperada (Ferreyra Solari et al. 2016). En esta línea de glioblastoma, la expresión de AHCYL1 no se encuentra disminuida en estas condiciones (a diferencia de pulmón), como fue demostrado previamente en la tesis de Licenciatura del Licenciado Nicolás Budnik, indicando que la regulación de la expresión de AHCYL1 es diferente según el tejido analizado.

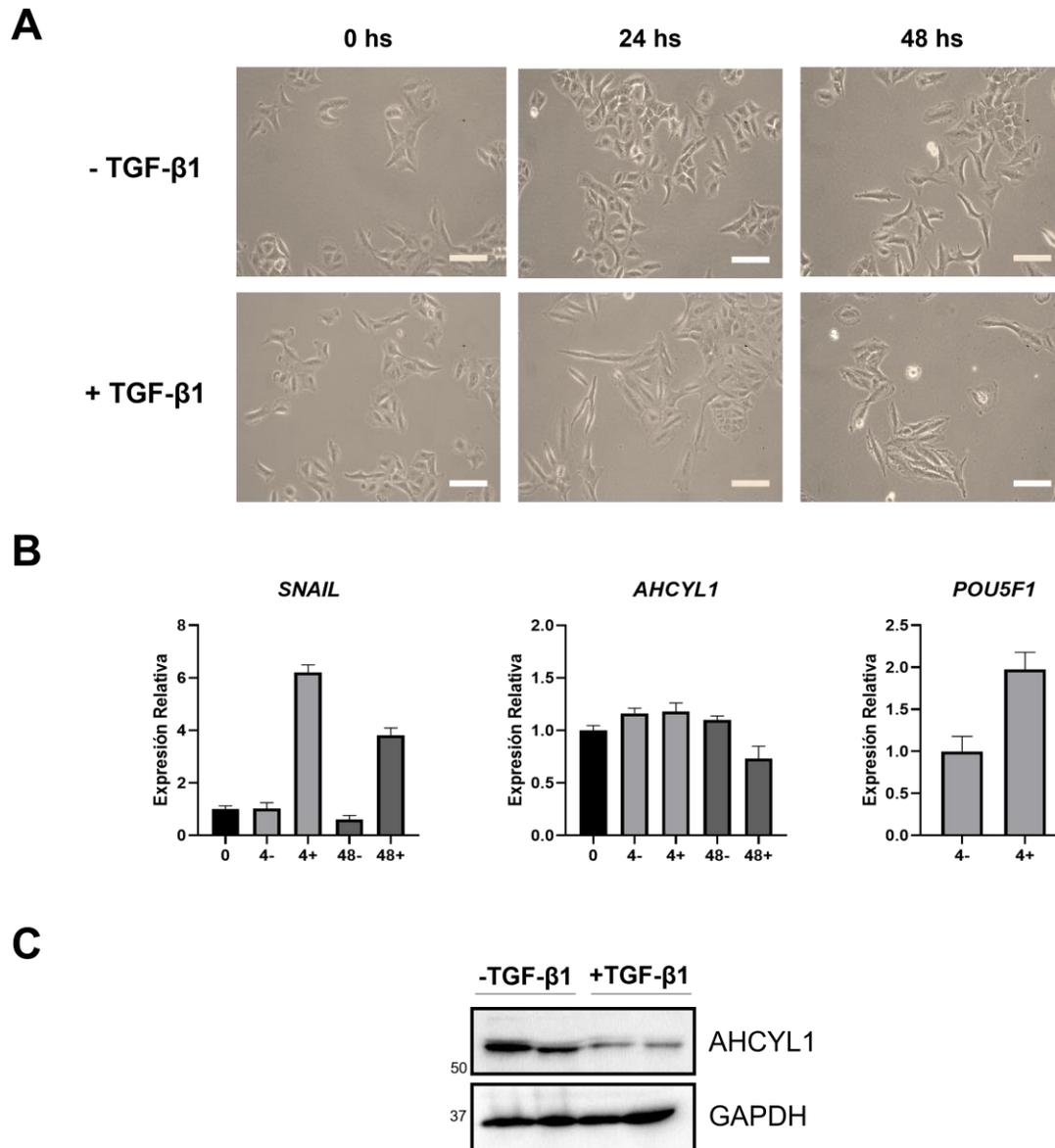
Estos resultados indicarían que la expresión de AHCYL1, al menos a nivel de proteína, se encuentra disminuida en cultivos enriquecidos en células que poseen un perfil tipo progenitor o CMTs (o que han pasado por un evento de desdiferenciación celular) en células tumorales de pulmón.

### **Modelo TGF- $\beta$**

El proceso de transición epitelio-mesénquimal (EMT) es inducido por la citoquina TGF- $\beta$  (entre otros) y considerado como un evento de plasticidad celular, vinculado a procesos de invasión, migración y metástasis. La línea A549 es utilizada como un modelo conocido *in vitro* para el estudio del EMT (Bellomo, Caja, and Moustakas 2016; Pirozzi et al. 2011). Durante este proceso (EMT) se hipotetiza que las células pasan por un estadio de transición más indiferenciado o metaestable (también heterogéneo) en el cual adquieren características pluripotentes para adoptar finalmente su fenotipo mesénquimal (Roy et al. 2021; Weidenfeld and Barkan 2018). Teniendo en cuenta que AHCYL1 fue seleccionado a partir de la búsqueda realizada con el *INSECT* (Parra et al. 2016; Rohr et al. 2013) como un gen potencialmente coregulado por proteínas de la vía de TGF- $\beta$  y

factores del *core* transcripcional, y en función del análisis de bioinformática (**Figura 10**) que indicaría que la expresión de *AHCYL1* estaría asociado a un fenotipo menos agresivo e invasivo, decidimos evaluar la expresión de este gen bajo inducción de la citoquina TGF- $\beta$ 1.

En la **Figura 16 A** se observa que frente al tratamiento con TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) durante 24 y 48 horas las células A549 adquieren una morfología de tipo mesenquimal, como fue reportado previamente (Kawata et al. 2012; B. N. Kim et al. 2020). Para verificar a nivel molecular el EMT, se evaluó la expresión del gen *SNAIL* que es un gen directamente regulado por la vía de TGF- $\beta$ /SMAD y que responde a la señalización de EMT (R. Y. Liu et al. 2014). Se observó que, a 4 horas del tratamiento, la expresión de *SNAIL* aumentó respecto del control y se mantuvo elevada a las 48 horas (**Figura 16 B**). Esto es consistente con lo descrito en bibliografía acerca de la inducción temprana de *SNAIL* y sostenida a lo largo del proceso (Sterneck, Poria, and Balamurugan 2020). A su vez, bajo estas condiciones experimentales, se observó que la expresión del ARNm de *AHCYL1* disminuye sus niveles a las 48 horas de tratamiento con TGF- $\beta$ 1 (**Figura 16 B**). De manera consistente, los niveles de la proteína de *AHCYL1* disminuyen frente al tratamiento con TGF- $\beta$ 1 (**Figura 16 C**) a las 48 horas. Por otro lado, a las 4 horas de tratamiento se observó un aumento en la expresión de *POU5F1* (**Figura 16 B**), lo cual estaría de acuerdo con lo propuesto por diversos autores acerca del pasaje por un estadio más indiferenciado en la transición epitelio-mesenquimal (Bhatia et al. 2020; Jolly and Celià-Terrassa 2019).



**Figura 16. Transición Epitelio-Mesenquimal en A549 estimulada por TGF-β1.** **A)** Imágenes representativas del tratamiento con TGF-β1 (5 ng/ml) durante 24 y 48 horas. Barra de escala: 100 μm. **B)** RT-qPCR para la expresión de *SNAIL*, *AHCYL1* y *POU5F1*, donde *SNAIL* es el control positivo de EMT. La expresión relativa es en comparación con el control (0 hs) (*SNAIL*, *AHCYL1*) o con respecto al control de 4 horas sin TGF-β1 (*POU5F1*). RPL19 fue utilizado como control de normalización. Los resultados corresponden a un experimento representativo de tres. **C)** *Western blot* para AHCYL1 (60 kDa) con y sin el tratamiento con TGF-β1 a tiempo final 48 horas. GAPDH (37 kDa) fue utilizado como control de carga.

En base a estas observaciones, concluimos que la expresión de AHCYL1 estaría regulada por TGF- $\beta$ 1 en la línea de cáncer de pulmón ensayada (A549), y vincularía la expresión del AHCYL1 con un fenotipo más epitelial. A su vez, estos resultados sostienen nuestra hipótesis acerca de la regulación de AHCYL1 en procesos de plasticidad celular.

### **Hallazgos sobre el estudio de AHCYL1 en modelos de plasticidad tumoral**

#### **Modelo 3D**

- AHCYL1 disminuye su expresión a nivel de proteína cuando se cultiva como esferoide en condiciones de *stemness* en células de cáncer de pulmón.

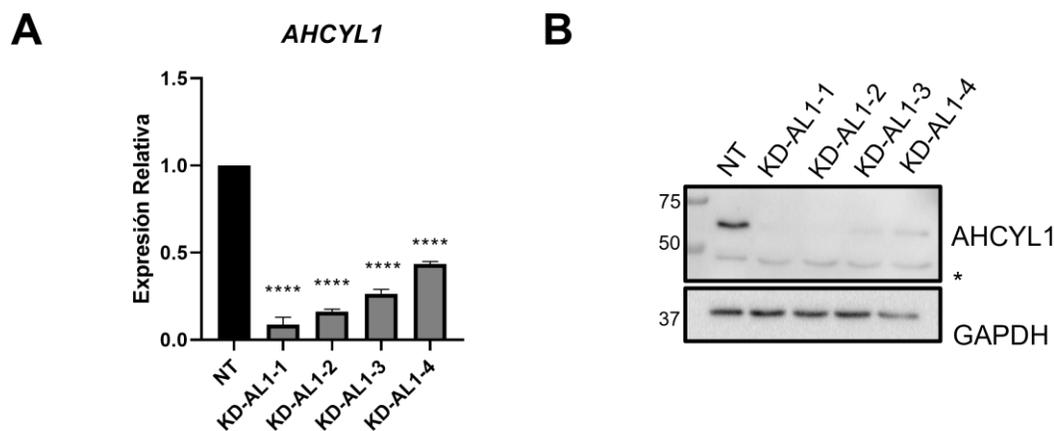
#### **Modelo TGF- $\beta$**

- AHCYL1 disminuye su expresión a nivel de ARNm y de proteína cuando se induce con TGF- $\beta$ 1 el proceso de EMT.

### **Desarrollo de las líneas celulares estables para el silenciamiento de AHCYL1**

Para poder estudiar el rol de AHCYL1 en cáncer de pulmón, se generaron líneas A549 silenciadas para la expresión de AHCYL1 de manera estable. Para ello, se realizaron infecciones lentivirales con cuatro shARNs independientes validados *in silico* para el transcritto de AHCYL1 por la empresa SIGMA. De los shARNs seleccionados, tres están dirigidos a la región codificante (shARN #1: KD-AL1-1, shARN #2: KD-AL1-2 y shARN #4: KD-AL1-4) y uno de ellos a la región 3'UTR (shARN #3: KD-AL1-3). Como control se utilizó el vector de expresión *non-targeting* (NT). Se confirmó un silenciamiento significativo de AHCYL1 por RT-qPCR y por WB (**Figura 17 A, B**) y se controló que en los experimentos

subsiguientes realizados con estas líneas, el silenciamiento fuera de al menos 50%.



**Figura 17. Silenciamiento estable de AHCYL1 en la línea celular A549. A)** RT-qPCR representativa para *AHCYL1* utilizada confirmar el silenciamiento de las líneas generadas. La expresión relativa es sobre la expresión del control *non-targeting* (NT). RPL19 fue utilizado como control de normalización. Analizado mediante ANOVA seguido de prueba de Dunnet (n=3). **B)** *Western blot* para corroborar silenciamiento de las líneas generadas. La banda \* es una banda inespecífica revelada con el anticuerpo de AHCYL1 (60 kDa). Como control de carga se utilizó GAPDH (37 kDa). El blot corresponde a un experimento representativo de tres. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,005$  y \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

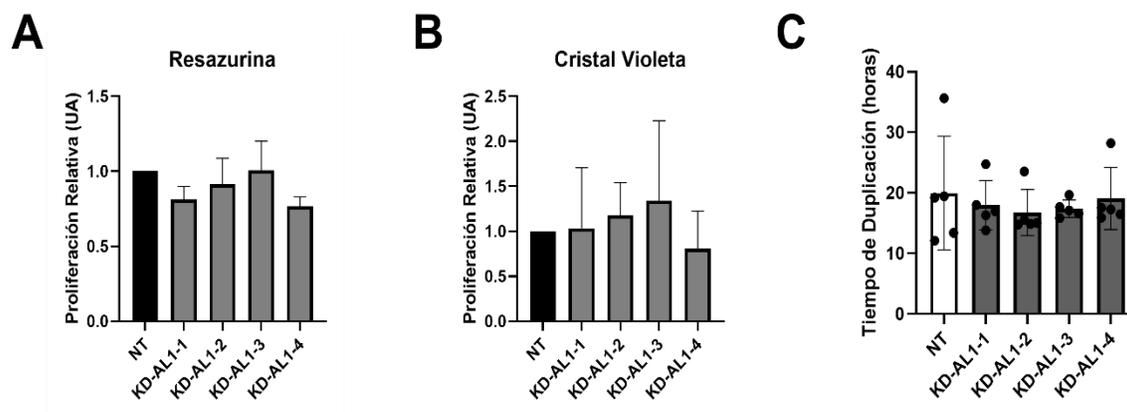
## Caracterización de las líneas silenciadas

### Proliferación

En primer lugar, estudiamos si las líneas generadas presentaban diferencias en su proliferación, ya que en bibliografía se encontraba reportado que AHCYL1 funciona como inhibidor alostérico de la ribonucleótido reductasa (RNR), una enzima fundamental para la síntesis de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) y por ende para la replicación celular en células HeLa (Arnaoutov and Dasso 2014). Utilizamos tres metodologías para la medición: tinción con Resazurina, Cristal Violeta y Ioduro de Propidio.

La Resazurina es un colorante fluorescente, permeable, que es reducido enzimáticamente en presencia de células metabólicamente activas (y por ende

vivas). Este ensayo es una herramienta efectiva para evaluar proliferación debido a que es sencillo, sensible, no es tóxico para las células y es costo-efectivo (Czekanska 2011; Marima et al. 2020). Se realizó este ensayo con todas las líneas silenciadas y no se observaron diferencias significativas en su proliferación (**Figura 18 A**).

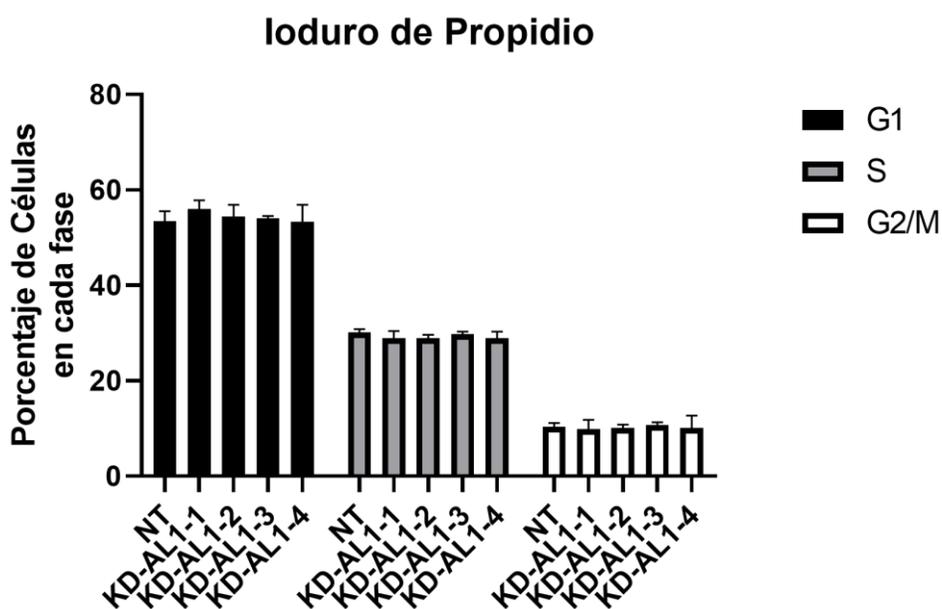


**Figura 18. Ensayos de proliferación de las líneas silenciadas con Resazurina y Cristal Violeta. A)** Proliferación a 48 horas con resazurina y comparación de las medias de todas las líneas mediante un ANOVA ( $n=3$ ). **B)** Proliferación a 48 horas con cristal violeta y comparación de las medias de todas las líneas mediante un ANOVA con corrección de Brown-Forsythe y Welch ( $n=5$ ). **C)** Tiempo de duplicación para cada línea calculado a partir de una curva de tiempo realizada con cristal violeta y comparación de las medias mediante Kruskal-Wallis ( $n=5$ ).

A su vez, se estudió la proliferación de las líneas silenciadas utilizando cristal violeta. Este colorante se adhiere a las proteínas y ADN de las células. Las células que utilizamos se mantienen adheridas a la placa mientras estén vivas y cuando entran en apoptosis o mueren se desprenden del plástico (Feoktistova, Geserick, and Leverkus 2016). Debido a su simplicidad y bajo costo, es posible realizar este ensayo en distintos días y construir una curva. Primero, evaluamos a tiempo final 48 horas la proliferación relativizada a un control de siembra y no se observaron diferencias significativas entre las líneas silenciadas y la línea control (**Figura 18 B**). Luego, utilizando la información de 4 días distintos, se construyó una curva de proliferación y se calculó el tiempo de duplicación para cada línea.

En este caso, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de duplicación de las líneas silenciadas (**Figura 18 C**).

Por último, utilizando yoduro de propidio se calculó el porcentaje de células en cada fase para cada una de las líneas. El yoduro de propidio es un colorante fluorescente que tiñe estequiométricamente al ADN, por lo que se puede diferenciar entre fases. En la fase G2/M la fluorescencia detectada será el doble que durante G1 y entre esos dos picos se ubicará la fase S (Darzynkiewicz, Juan, and Bedner 1999). Al evaluarlo en las líneas silenciadas no se hallaron diferencias en los porcentajes de células correspondientes a cada fase del ciclo celular (**Figura 19**).

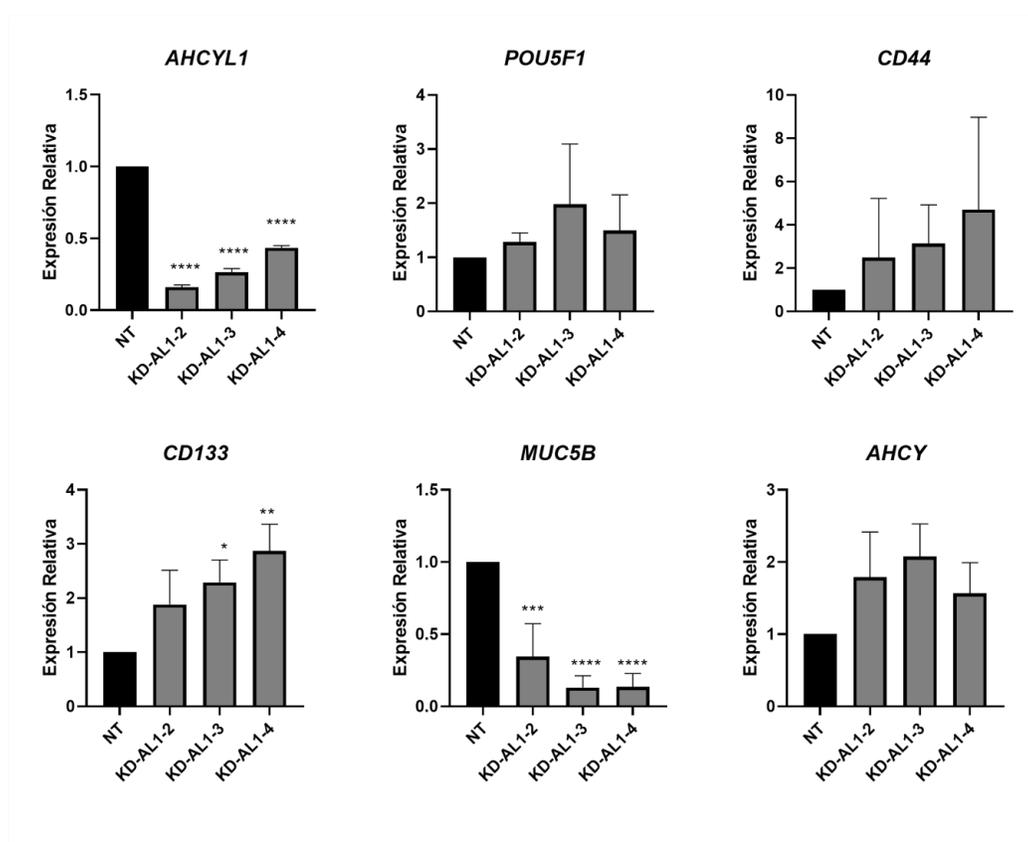


**Figura 19. Ensayo de ciclo celular en las líneas silenciadas realizado con yoduro de propidio.** Se graficaron los porcentajes de células en cada fase del ciclo. Los valores mostrados corresponden a quintuplicados técnicos (n=1). Se compararon las medias mediante un ANOVA y no se observaron diferencias significativas.

Se concluye a partir de los ensayos realizados por tres metodologías diferentes que no hay diferencias en la proliferación de las líneas A549 silenciadas para AHCYL1.

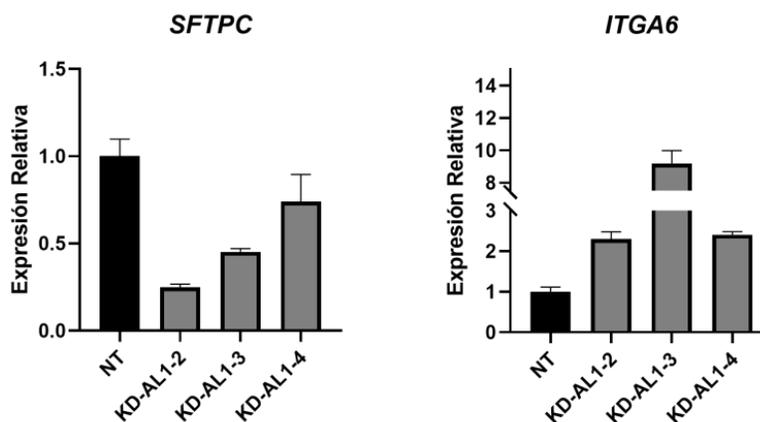
Expresión de genes y proteínas asociados a diferenciación y pluripotencia

Nosotros postulamos que la expresión de AHCYL1 podría modular las propiedades plásticas de las células de cáncer de pulmón; sin embargo, no podemos descartar que los genes que modulan la plasticidad celular regulen la expresión de AHCYL1 (ver sección **Sobreexpresión de POU5F1**). Por lo tanto, para evaluar nuestra hipótesis, se analizó la expresión de marcadores asociados al estado de diferenciación en las líneas silenciadas. Observamos que las líneas KD-AL1-2, KD-AL1-3 y KD-AL1-4 se comportaban de manera similar entre ellas, mientras que KD-AL1-1 en forma diferencial (datos no mostrados), por lo cual decidimos excluirla de la mayoría de los análisis posteriores.



**Figura 20. Expresión de marcadores de pluripotencia y diferenciación en las silenciadas para AHCYL1.** RT-qPCR para *AHCYL1* utilizada para confirmar el silenciamiento de las líneas estables generadas. *POU5F1*, *CD44* y *CD133* son marcadores de pluripotencia. *MUC5B* es un marcador de diferenciación en pulmón. *AHCY* pertenece a la familia de AHCYL1. La expresión relativa es sobre la expresión del control *non-targeting* (NT). RPL19 fue utilizado como control de normalización. Analizado mediante ANOVA seguido de prueba de Dunnet (n=3). \* p≤0,05, \*\* p≤0,01, \*\*\* p≤0,005 y \*\*\*\* p≤0,0001.

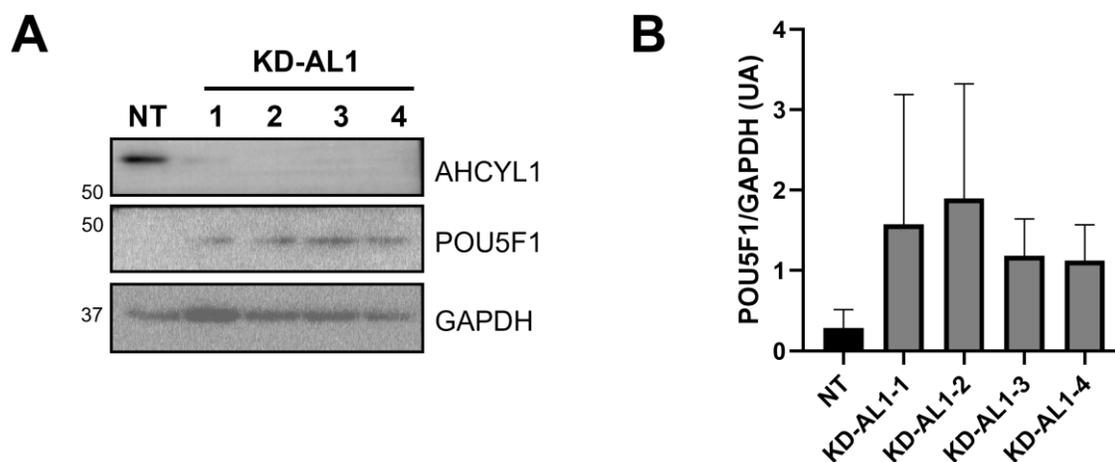
En la **Figura 20** se puede observar que al silenciar *AHCYL1* las células presentan una tendencia al aumento de los niveles de ARNm en los marcadores de pluripotencia *POU5F1*, *CD44* y *CD133* y una disminución significativa en el marcador de diferenciación pulmonar de *MUC5B* evaluados por RT-qPCR. Se analizó la expresión de *AHCY* en las líneas silenciadas ya que se encontraba reportado un aumento de expresión de este gen en células en condiciones *stem* (Z. Wang et al. 2019; Zhu et al. 2020), y se encontró una tendencia en ese sentido. A su vez, se sumó de manera preliminar el análisis de *SFTPC* e *ITGA6* (**Figura 21**), marcadores de diferenciación y pluripotencia respectivamente, y fueron consistentes con lo observado en la **Figura 20**. Estos resultados indicaron que las células con *AHCYL1* silenciado en forma estable pierden identidad diferenciada en forma leve y variada.



**Figura 21. Expresión de marcadores de pluripotencia y diferenciación en las silenciadas para *AHCYL1*.** RT-qPCR para la expresión de *SFTPC* como marcador de diferenciación y *ITGA6* como marcador de pluripotencia. RPL19 fue utilizado como control de normalización. La expresión relativa es sobre la expresión del control *non-targeting* (NT) (n=1).

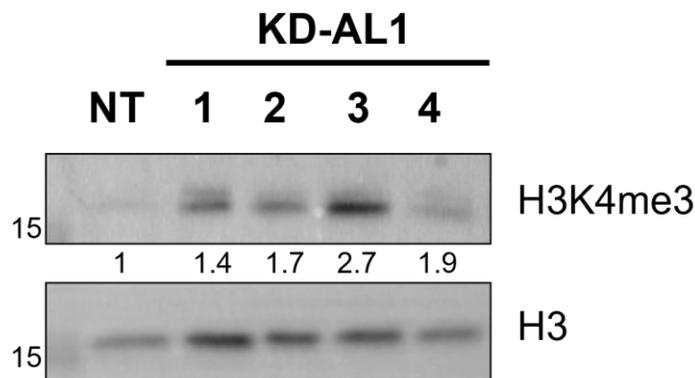
También se evaluó la expresión del marcador *POU5F1* (**Figura 22**) a nivel de proteína y se encontró una inducción en su expresión en todas las líneas

silenciadas al compararlas con las del control NT. Las unidades arbitrarias para cada cuantificación se expresan como veces (*fold*) de inducción relativas al control. Todos los experimentos mostraron una inducción, aunque se observan mucha dispersión de los datos en cada muestra. Todos los *blots* que se usaron para la cuantificación corresponden a eventos de silenciamiento independientes. Estos resultados, junto con los resultados que se mostraron anteriormente, sugieren que las líneas silenciadas para AHCYL1 presentan un menor grado de diferenciación en comparación con su control.



**Figura 22. Expresión de POU5F1 en las líneas silenciadas para AHCYL1.** **A)** *Western blot* de AHCYL1 (60 kDa) y POU5F1 (48 kDa). Como control de carga se utilizó GAPDH. El blot corresponde a un experimento representativo de tres. **B)** Densitometría de bandas realizada con el programa ImageJ. Analizado mediante ANOVA seguido de prueba de Dunnet ( $n=3$ ).

La trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3) está fuertemente asociada con la activación transcripcional y mala prognosis en cáncer (S. Li, Shen, and Chen 2018; Z. Wang et al. 2019). Por tal motivo, se evaluó el nivel de H3K4me3 en las líneas silenciadas y se observó una leve tendencia de aumento en la marca de para las 4 líneas silenciadas para AHCYL1 (**Figura 23**). Similar al aumento para los niveles de POU5F1, la marca epigenética H3K4me3 mostró dispersión entre los distintos experimentos con una clara tendencia a aumentar.



**Figura 23. Expresión de H3K4me3 en las líneas silenciadas para AHCYL1.** *Western blot* de H3K4me3 (17 kDa). Como control de carga se utilizó H3 (17 kDa). El blot corresponde a un experimento representativo de dos con resultados similares.

En conclusión, la caracterización de las líneas silenciadas para AHCYL1 no mostró diferencias en relación a la capacidad de proliferación. En cambio, se observó una disminución leve en su estado de diferenciación evidenciada por los marcadores *MUC5B* y *SFTPC* y una tendencia en el incremento de la expresión de marcadores de pluripotencia *CD44*, *CD133*, *AHCY*, *ITGA6* a nivel de ARNm y también a nivel proteico en el caso de POU5F1. En cuanto a la marca epigenética H3K4me3 también se observó un incremento leve en algunas de las líneas silenciadas. Todo esto indicaría que la pérdida de AHCYL1 podría asociarse a la pérdida del fenotipo diferenciado.

### Ensayos funcionales realizados con las líneas silenciadas

Para algunos de los ensayos funcionales y también para los experimentos realizados *in vivo*, trabajamos con las líneas KD-AHCYL1-2 y KD-AHCYL1-4. Elegimos estas líneas porque ambas presentaban una expresión aumentada de POU5F1, así como una disminución en las marcas de diferenciación.

Para evaluar si un menor grado de diferenciación podía afectar el comportamiento celular, se realizó un ensayo de dilución limitante (ELDA); el cual permite evaluar la capacidad iniciadora de tumores *in vitro* y se utiliza también

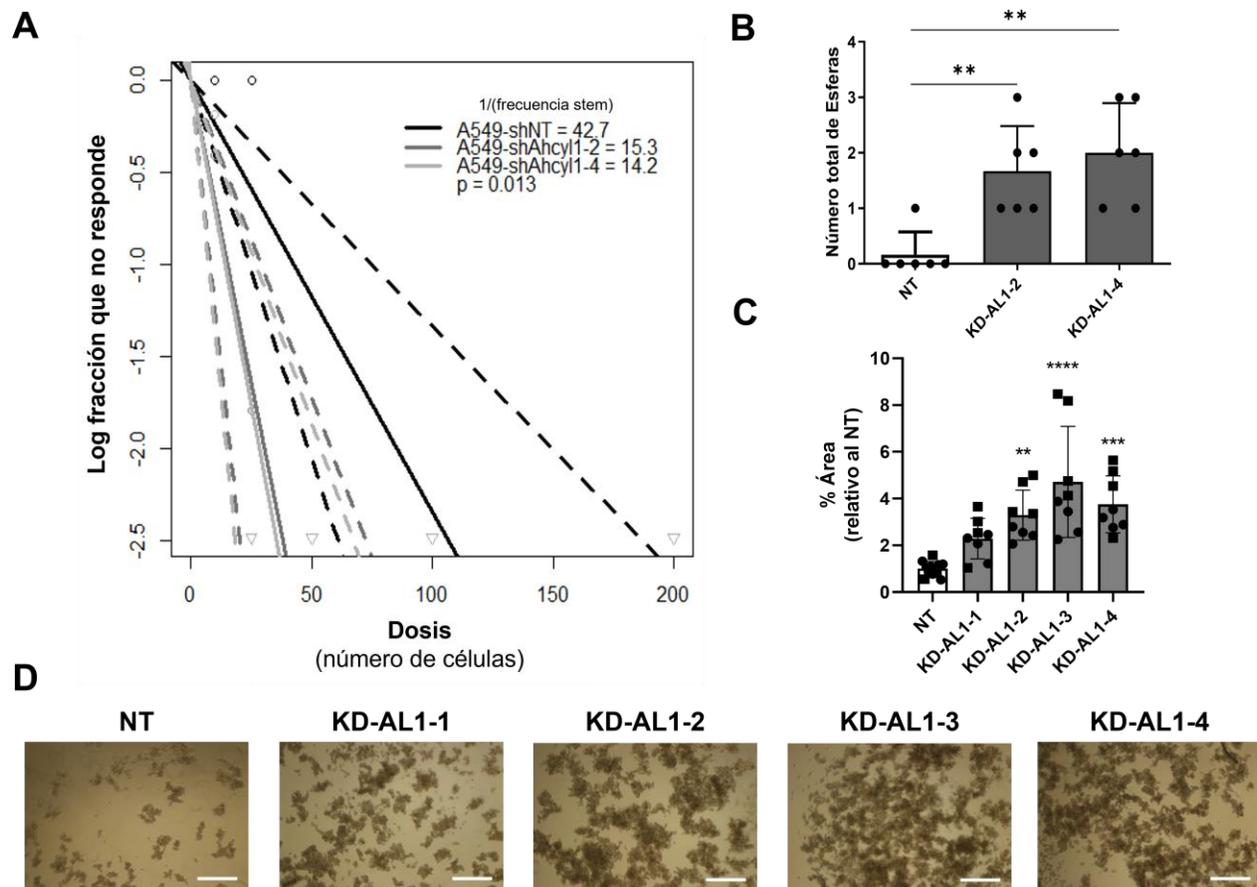
como ensayo biológico para la medición de la potencia *stem* (Ferreyra Solari et al. 2016; Y. Hu and Smyth 2009; Zhao, Setrerrahmane, and Xu 2015). El ensayo consiste en plaquear diluciones extremas de células en placas de 96 pocillos en condiciones favorables para la formación de esferas en condiciones *stem* (ver **Materiales y Métodos**). Se contabilizó la cantidad de eventos positivos (es decir, formación de esferas) para cada línea y luego se analizó con el *software* correspondiente (Y. Hu and Smyth 2009).

Como resultado, se obtuvo el gráfico que se muestra en la **Figura 24 A**. Para interpretar estos gráficos se debe considerar que a mayor módulo de la pendiente le corresponde mayor potencial tumoral o potencia *stem*. Dado que para las líneas silenciadas la frecuencia de formación de esferas es mayor, se concluye que la disminución en la expresión de AHCYL1 aumenta la capacidad iniciadora de tumores *in vitro* de manera significativa. Observamos que para la línea KD-AL1-2 la frecuencia *stem* hallada fue 1/15,3 y para KD-AL1-4 1/14,2, lo cual es significativamente mayor que para NT que fue de 1/42,7. No se observaron diferencias significativas entre las líneas silenciadas para AHCYL1.

En paralelo, se contabilizó el número total de esferas para la dilución de 50 células sembradas. Se eligió esta dilución porque es la primera a la cual se ven esferas formadas en todas las líneas. El recuento de esferas demostró que las líneas silenciadas generan mayor número de esferas a una concentración de células dada (**Figura 24 B**).

De manera similar al ensayo anterior, se plaquearon células de todas las líneas silenciadas y del control NT y al segundo día se tomaron fotos de las esferas formadas. Utilizando el programa Image J se cuantificó el porcentaje de área ocupada por esferas (detalle en **Materiales y Métodos**), teniendo la precaución de no cuantificar células individuales. En la **Figura 24 C**, se observa que todas las líneas silenciadas (a excepción de KD-AL1-1) ocupan mayor porcentaje de área que el control y esto correspondería a una mayor cantidad de

esferas. Esto mismo se puede observar en la **Figura 24 D** que muestra un ejemplo de las fotografías que fueron cuantificadas.

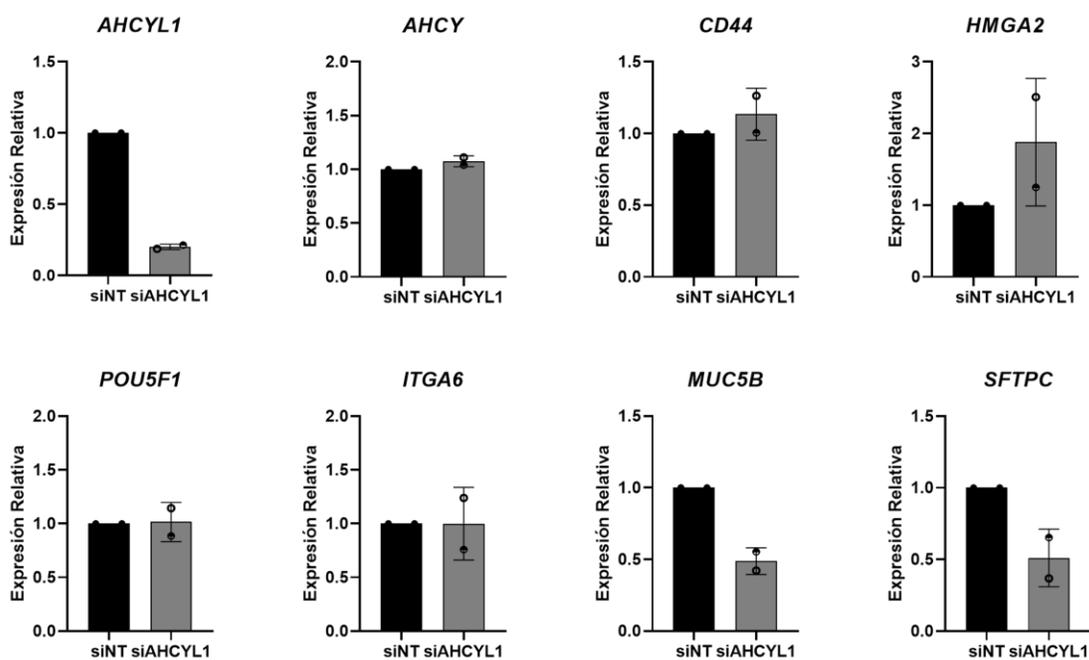


**Figura 24.** Ensayos de capacidad iniciadora de tumores *in vitro* para las líneas con disminución estable de la expresión de AHCYL1. **A)** Frecuencia *stem* calculada usando ELDA para las líneas representativas A549 NT, KD-AL1-2 y KD-AL1-4. El gráfico corresponde a un ensayo representativo (n=3, p=0,013, por sextuplicado). En línea sólida se muestra la media y en líneas punteadas el intervalo de confianza. **B)** Cuantificación de esferas formadas en la dilución 50 células/pocillo. El gráfico corresponde a un experimento representativo, analizado mediante ANOVA seguido de prueba de Dunnet (n=3). **C)** Porcentaje de área ocupada por esferas cuantificado con ImageJ. La expresión relativa es sobre la expresión del control NT. Los distintos símbolos corresponden a experimentos independientes (n=2, por cuadruplicado). Analizado mediante Kruskal-Wallis seguido de prueba de Dunn. **D)** Fotografías tomadas de las líneas silenciadas para cuantificar el porcentaje de área cubierto. Barra de escala: 500  $\mu$ m. \* p $\leq$ 0,05, \*\* p $\leq$ 0,01, \*\*\* p $\leq$ 0,005 y \*\*\*\* p $\leq$ 0,0001.

Teniendo en cuenta estos resultados de manera colectiva, se puede concluir que AHCYL1 regularía negativamente las propiedades de CMTs en células de cáncer de pulmón, ya que las líneas silenciadas mostraron una mayor frecuencia *stem* y un mayor número de esferas formadas a partir de una misma densidad de células plaqueadas.

### Silenciamiento transitorio de AHCYL1 utilizando siARN

Para validar los resultados obtenidos mediante silenciamiento estable de AHCYL1 utilizando shARN, se realizaron experimentos de silenciamiento transitorio con siARN y se evaluó la expresión de distintos marcadores mediante RT-qPCR.



**Figura 25. Expresión de marcadores de pluripotencia y diferenciación en las silenciadas para AHCYL1 utilizando siARN.** RT-qPCR para *AHCYL1* utilizada chequear el silenciamiento. *POU5F1*, *CD44* y *HMGA2* son marcadores de pluripotencia. *MUC5B* y *SFTPC* son marcadores de diferenciación en pulmón. *AHCY* pertenece a la familia de AHCYL1. La expresión relativa es sobre la expresión del control utilizando un siARN *non-targeting* (siNT). RPL19 fue utilizado como control de normalización. Resultados preliminares correspondientes a dos experimentos independientes.

Como se observa en la **Figura 25**, el silenciamiento transitorio con siARN es del 80%. En ese contexto, los marcadores de pluripotencia *CD44*, *POU5F1*, *ITGA6*, ni *AHCY* mostraron diferencias en su expresión. Otro marcador de pluripotencia *HMGA2* mostró una tendencia a aumentar. Consistente con lo observado para los experimentos utilizando shARN, tanto *MUC5B* como *SFTPC* (los marcadores de diferenciación) mostraron una disminución en su expresión.

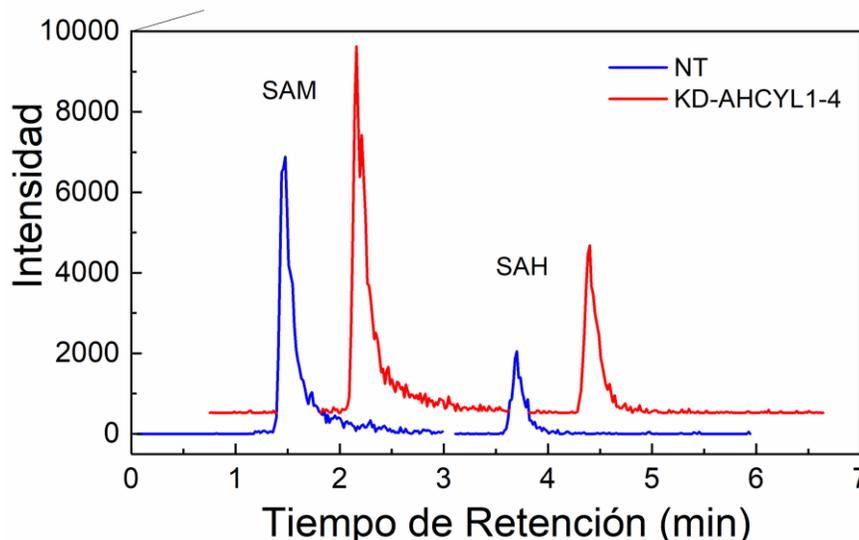
En conclusión, el silenciamiento transitorio realizado con siARN permitió corroborar los resultados de expresión de ARNm en cuanto a la pérdida de la identidad diferenciada. Con respecto a los marcadores de pluripotencia, no se observó la tendencia a aumentar como se vio en los ensayos realizados con shARN. La consistencia sobre la expresión de los genes de diferenciación indicaría que la expresión de *AHCYL1* es importante para la identidad diferenciada.

### **Detección de SAM y SAH por UPLC-HRMS**

Recientemente se describió que el ciclo de la metionina (esto es expresión de enzimas y el flujo del ciclo, así como la dependencia de metionina) regula la capacidad iniciadora tumoral (Z. Wang et al. 2019). En particular, *AHCY* es la enzima que cataliza la hidrólisis de SAH a homocisteína y adenosina en este ciclo (Devogelaere, Sammels, and Smedt 2008) de manera reversible y recientemente se la ha asociado a plasticidad celular en cáncer aunque su mecanismo no ha sido descrito (Z. Wang et al. 2019). Debido a la interacción *AHCY-AHCYL1* (Grbeša et al. 2017), nos propusimos explorar el efecto de la expresión de *AHCYL1* en el metabolismo tumoral, mediante la determinación de la abundancia de dos metabolitos clave del ciclo como SAM y SAH..

Los niveles de SAM y SAH intracelular fueron determinados mediante UPLC-QTOF-MS. Las especies iónicas detectadas de SAM y SAH fueron  $[M]^+$  y  $[M+H]^+$ , respectivamente, y no se observó fragmentación en la fuente de ionización. El tiempo de retención observado fue de 1,46 y 3,68 minutos para SAM

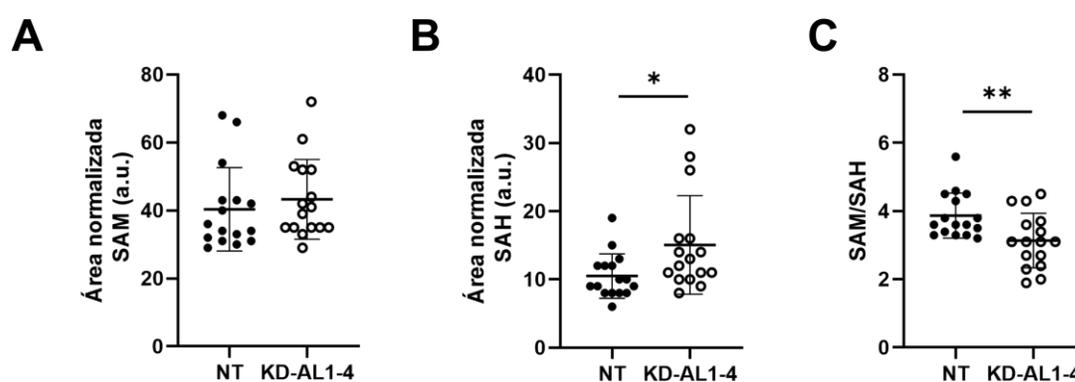
y SAH, respectivamente (**Figura 26**). El análisis estadístico se realizó sobre el área de picos cromatográficos obtenidos de las 16 muestras biológicas independientes provenientes de 8 experimentos, para cada línea celular.



**Figura 26. Detección de SAM y SAH por UPLC-QTOF-MS.** Cromatogramas de los iones extraídos para ion  $[SAM]^+$  con  $m/z$   $399.1451 \pm 0.0100$ ; y ion  $[SAH+H]^+$  con  $m/z$   $385.1294 \pm 0.0100$ , generados a partir de células A549 NT (azul) y KD-AHCYL1-4 (rojo). El tiempo de retención fue de 1,46 y 3,68 minutos para SAM y SAH, respectivamente. Hay un desplazamiento en el eje z para evitar la superposición de los picos cromatográficos entre las muestras.

AHCYL1 está descrito como un potencial regulador negativo de AHCY (Grbeša et al. 2017) y recientemente se demostró que interactúa directamente con SAH (W. Huang et al. 2021), por lo que la depleción de AHCYL1 podría alterar el ciclo de la metionina o 1C. Para ello, se evaluaron los niveles de SAM y SAH entre las líneas control NT y KD-AHCYL1-4. Se normalizaron los datos obtenidos con respecto al número de células totales para cada experimento. No se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de SAM entre las células NT y las KD-AHCYL1-4 (**Figura 27 A**), mientras que las células KD-AHCYL1-4 mostraron levemente mayores niveles de SAH intracelular ( $p < 0,05$ ) (**Figura 27 B**).

El potencial de metilación está determinado por la relación SAM/SAH (Fernández-Arroyo, Cuyàs, and Bosch-barrera 2015). En nuestras mediciones, la relación para la línea silenciada KD-AHCYL1-4 ( $3.14 \pm 0.76$ ), fue significativamente menor ( $p < 0,01$ ) en comparación con las células control NT ( $3.88 \pm 0.67$ ) (**Figura 27 C**). Este resultado, es contrario en principio a lo esperado, ya que se esperaba una menor cantidad relativa de SAH al disminuir la expresión de AHCYL1 por estar postulado como un inhibidor de AHCY y porque células reprogramadas y tumorales poseen mayor capacidad metilante (Z. Wang et al. 2019).

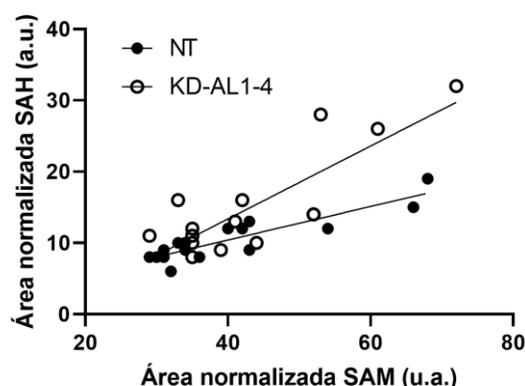


**Figura 27.** Áreas normalizadas de los picos cromatográficos para SAM (**A**) y SAH (**B**) ( $p=0,026$ ) para células NT y KD-AHCYL1-4 ( $n=16$  para cada línea celular). **C**) Relación SAM/SAH para células NT y KD-AHCYL1-4 calculada para cada muestra ( $n=16$ ,  $p=0,007$ ). \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,005$  y \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

Debido a la disminución en la relación SAM/SAH, estudiamos la marca epigenética H3K4me3 para determinar si efectivamente las reacciones de metilación (al menos a nivel de esta marca) estaban afectadas en las células KD-AHCYL1-4 (o si este leve cambio en los valores de SAH afectaba el potencial de metilación). La trimetilación de la histona 3 en la lisina 4 (H3K4me3) es una marca epigenética relacionada a células transcripcionalmente activas y a células con propiedades de célula madre en un modelo de pulmón (Shiraki et al. 2013; Z. Wang et al. 2019). Se observó que la marca H3K4me3 está levemente aumentada en la línea KD-AHCYL1-4 (**Figura 23**), sugiriendo que la metilación no se vería afectada a pesar de que SAM/SAH esté levemente disminuido y que el pequeño

aumento de SAH observado no sería suficiente para inhibir las reacciones de metilación (Devogelaere, Sammels, and Smedt 2008). Si bien la acumulación de SAH ha sido vinculada a citotoxicidad, daño al ADN y arresto del ciclo (Beluzic et al. 2018; C. C. Liu et al. 2009), el aumento leve detectado estaría en concordancia con que no observamos diferencias significativas en la tasa de proliferación celular y el ciclo celular (**Figura 18, Figura 19**). En su conjunto, estos resultados sugieren que el silenciamiento de AHCYL1 no afecta la proliferación celular, aunque si altera el ciclo 1C levemente, con un leve aumento de la capacidad de metilación de H3K4me3.

Por otro lado, evaluamos la correlación entre los niveles de SAM y SAH para las dos líneas celulares (**Figura 28**). En el caso de las células control NT se observó una correlación positiva y significativa (coeficiente de correlación de Spearman 0,808,  $p < 0,001$ ), mientras que para las KD-AHCYL1-4 se observó una correlación positiva, aunque moderada (coeficiente de correlación de Spearman 0,538,  $p < 0,05$ ). El menor índice de correlación en la línea silenciada puede deberse a que existan otras vías de consumo de SAM o SAH. Esto sería consistente con los resultados observados en la **Figura 27** que señalarían que el silenciamiento de AHCYL1 provocaría alteraciones en el ciclo de la metionina.



**Figura 28. Análisis de correlación para las áreas normalizadas de SAM y SAH.** El coeficiente de correlación de Spearman fue de 0,808 para las células NT ( $p < 0,001$ ) y 0,538 para las células KD-AHCYL1-4 ( $p < 0,05$ ).

A partir de estos resultados podemos concluir que la línea KD-AHCYL1-4 tiene alterado el ciclo de la metionina, presentando un leve aumento de los niveles de SAH, que determina una disminución en la relación SAM/SAH. Además, la línea KD-AHCYL1-4 tendría aumentada la metilación de la H3K4me3 (consistente con las otras líneas silenciadas independientes), lo cual podría afectar su capacidad tumorigénica.

### **Hallazgos sobre el desarrollo de las líneas celulares estables para el silenciamiento de AHCYL1 y el silenciamiento transitorio de AHCYL1 utilizando siARN**

#### **Caracterización**

El silenciamiento estable de AHCYL1:

- No modifica la proliferación de las líneas estables generadas ni su tiempo de duplicación
- Produce una disminución significativa en los marcadores de diferenciación y una tendencia al aumento en los marcadores de pluripotencia a nivel de expresión de ARNm.
- Produce un aumento la expresión de POU5F1 a nivel de proteína en todas las líneas estables independientes ensayadas y se correlaciona con un aumento de marca epigenética de activación transcripcional H3K4me3.
- El conjunto de los datos indicaría que la disminución de la expresión endógena de AHCYL1, estaría asociada con una pérdida de la identidad diferenciada y una inducción a la desdiferenciación.

#### **Ensayos funcionales**

El silenciamiento estable de AHCYL1:

- Aumenta la capacidad iniciadora de tumores *in vitro*.
- Genera un mayor número de esferas a una concentración de células dada.

**Silenciamiento transitorio de AHCYL1 utilizando siARN**

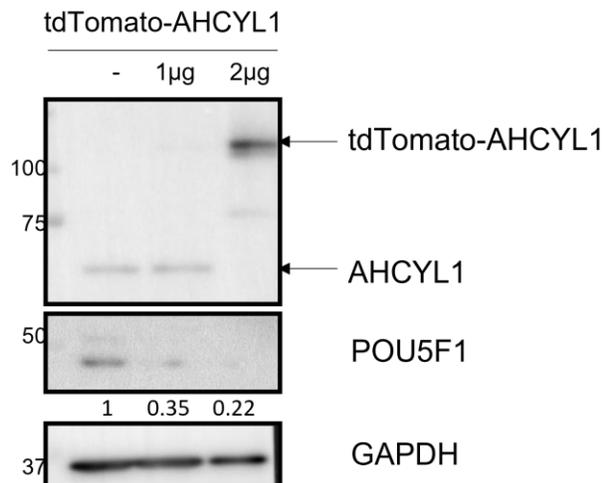
- Permite corroborar los resultados observados en las líneas estables sobre la pérdida de identidad diferenciada.

**Detección de SAM y SAH por UPLC-HRMS**

- En la línea KD-AHCYL1-4 observamos un leve aumento en los niveles de SAH, acompañado de una disminución de SAM/SAH.
- El aumento en la marca epigenética H3K4me3 acompañado de un leve aumento en los niveles de SAH indicaría que las células silenciadas para AHCYL1 tendrían un ciclo de la metionina activo y acorde a lo publicado para CMTs de pulmón.

**Efectos de la modulación por sobreexpresión de AHCYL1 y POU5F1****Sobreexpresión de AHCYL1**

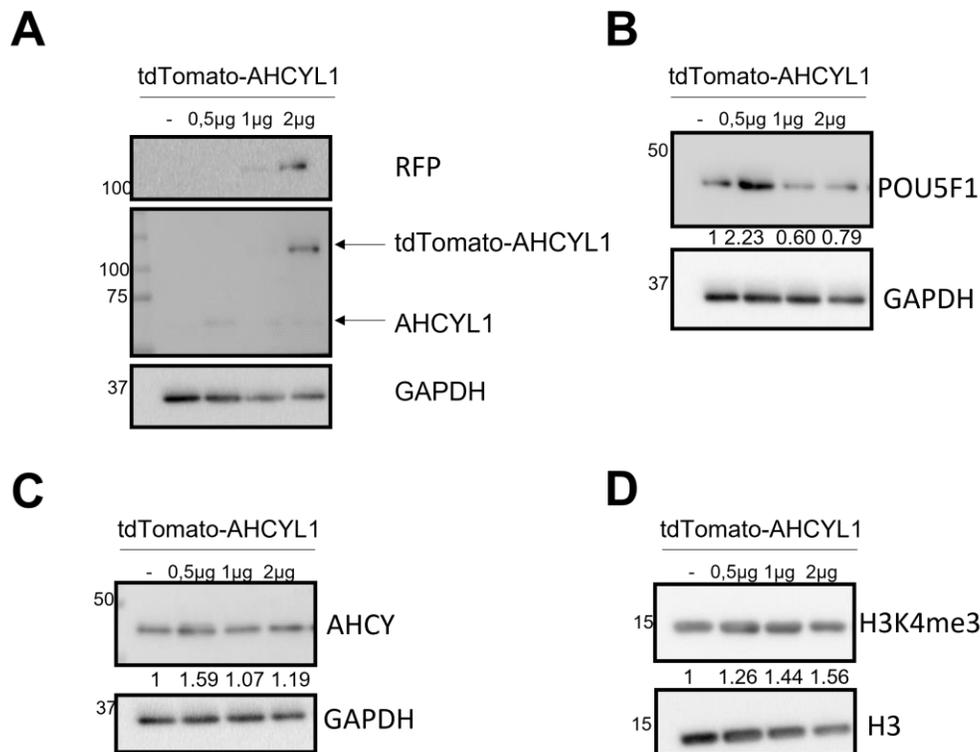
Debido a lo observado con el silenciamiento de AHCYL1, decidimos evaluar también los efectos de sobreexpresar AHCYL1 en células de cáncer de pulmón. Para ello, en primer lugar, sobreexpresamos la proteína de fusión tdTomato-AHCYL1 en A549.



**Figura 29. Análisis de la sobreexpresión de tdTomato-AHCYL1 en células A549.** *Western blot* de la sobreexpresión de AHCYL1 donde se analiza la expresión POU5F1 (48 kDa). El tamaño esperado para tdTomato-AHCYL1 es aproximadamente 120 kDa y el de AHCYL1 endógeno es 60 kDa. Se utilizó GAPDH (37 kDa) como control de carga y se realizó la densitometría para cuantificar la expresión de POU5F1.

Como se puede observar en la **Figura 29**, al sobreexpresar AHCYL1 observamos una fuerte disminución de la expresión de POU5F1 a nivel de proteína. La proteína de fusión tdTomato-AHCYL1 posee un peso molecular de aproximadamente 120 kDa y se detecta más tenue con 1 µg de plásmido transfectedo y más claramente con 2 µg de plásmido. Cabe aclarar que la eficiencia de transfección de la línea A549, si bien es una línea ampliamente utilizada, en nuestras manos fue de alrededor del 30% (utilizando Lipofectamina 2000, ver **Materiales y Métodos**).

Estos resultados fueron repetidos utilizando una masa menor de plásmido por debajo del límite de detección (0,5 µg). En la **Figura 30 A**, se puede observar la sobreexpresión creciente de tdTomato-AHCYL1.



**Figura 30. Curva de distintas masas de sobreexpresión de tdTomato-AHCYL1.** Análisis por *Western Blot* de AHCYL1 (**A**), POU5F1 (48 kDa) (**B**), AHCY (48 kDa) (**C**) y H3K4me3 (17 kDa) (**D**). Se utilizaron GAPDH (37 kDa) y H3 (17 kDa) como controles de carga. Corresponde a un experimento representativo de dos independientes. Las variaciones en los niveles de AHCY y de H3K4 me3 se consideraron preliminares y sin cambios.

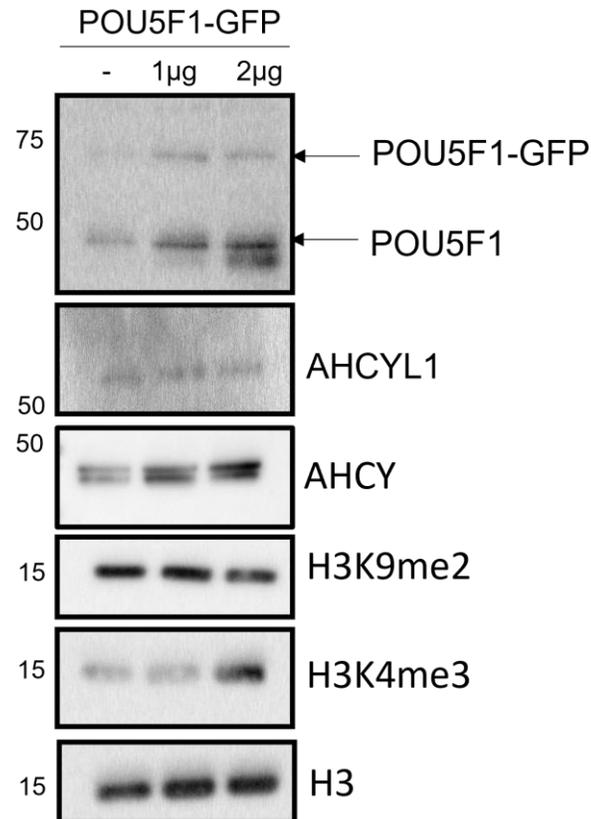
Interesantemente, esta nueva condición muestra que la sobreexpresión de AHCYL1 produce una modulación de POU5F1 endógeno de tipo bifásico; observándose que a bajas concentraciones de sobreexpresión aumentan los niveles de POU5F1 mientras que bajan a mayores concentraciones (**Figura 30 B**). Estos ensayos analizados (**Figura 29** y **Figura 30**) corresponden a dos de cuatro experimentos independientes en donde los resultados de modulación bifásica de POU5F1 fueron consistentes para 0,5 μg y 2 μg, pero para el caso de 1 μg hubo variaciones entre ensayos que pueden ser producto de variaciones en la eficiencia de transfección. Entonces consideramos que estos resultados son preliminares y que es necesario profundizar este análisis para comprender qué efectos genera la sobreexpresión de AHCYL1. Sin embargo, la consistencia para baja y alta

concentración de AHCYL1 podría indicar que los niveles de POU5F1 efectivamente estarían respondiendo a diferentes niveles de AHCYL1. Dado que AHCYL1 interactúa con muchas proteínas y regula diferentes funciones celulares, es posible que el efecto sobre los niveles proteicos de POU5F1 estén relacionados con diferentes funciones de AHCYL1 (ver **Discusión**) y se requiere de mayor grado de investigación. Los datos sobre AHCY y la H3K4me3 corresponden a un solo western blot y no muestran diferencias claras (**Figura 30 C, D**).

### **Sobreexpresión de POU5F1**

Para evaluar un potencial nexo entre AHCYL1 y POU5F1, se sobreexpresó la proteína de fusión POU5F1-GFP en las células A549. Preliminarmente, observamos que AHCYL1 no sufre modificaciones en su expresión por el agregado exógeno de POU5F1 (**Figura 31**). La proteína de fusión POU5F1-GFP tiene un peso molecular aproximado de 75 kDa.

Además de la expresión de AHCYL1, se analizó la expresión de AHCY que muestra un leve aumento, lo cual es consistente con trabajos que postulan el aumento de AHCY en condiciones de pluripotencia (Z. Wang et al. 2019; Zhu et al. 2020). También se evaluaron las marcas epigenéticas H3K4me3 y H3K9me2, la primera asociada a activación transcripcional y la segunda a represión de la transcripción. Si bien ambas modulaciones son leves, para la condición de 2 µg de transfección se observó un aumento de H3K4me3 y una leve disminución de H3K9me2, de acuerdo con lo esperado para células con mayor expresión de POU5F1 que se consideran más plásticas y con mayor actividad transcripcional. Al igual que los experimentos de sobreexpresión de AHCYL1, estos resultados son preliminares y requieren mayor número de repeticiones.



**Figura 31. Análisis de la sobreexpresión de POU5F1-GFP en células A549.** *Western blot* de la sobreexpresión de POU5F1 (POU5F1 endógeno 48 kDa, POU5F1-GFP 75 kDa) donde se analiza la expresión AHCYL1 (60 kDa), AHCY (48 kDa), H3K9me2 (17 kDa), H3K4me3 (17 kDa). Se utilizó H3 (17 kDa) como control de carga.

### Hallazgos preliminares de los efectos de la modulación de POU5F1 y AHCYL1

#### **Sobreexpresión de AHCYL1**

- POU5F1 muestra un patrón de modulación bifásico en cuanto a su expresión proteica cuando se sobreexpresa AHCYL1 en cantidades crecientes.
- Bajo sobreexpresión de AHCYL1 se observó una tendencia a aumentar para H3K4me3, así como una potencial modulación sobre la expresión de AHCY; sin embargo, se requiere mayor caracterización.

### **Sobreexpresión de POU5F1**

- No se observaron diferencias en la expresión de AHCYL1 causada por la sobreexpresión de POU5F1.
- AHCY, H3K4me3 y H3K9me2 sufren alteraciones en su expresión por la sobreexpresión de POU5F1, consistentes con lo esperable para una célula con mayor expresión de POU5F1.

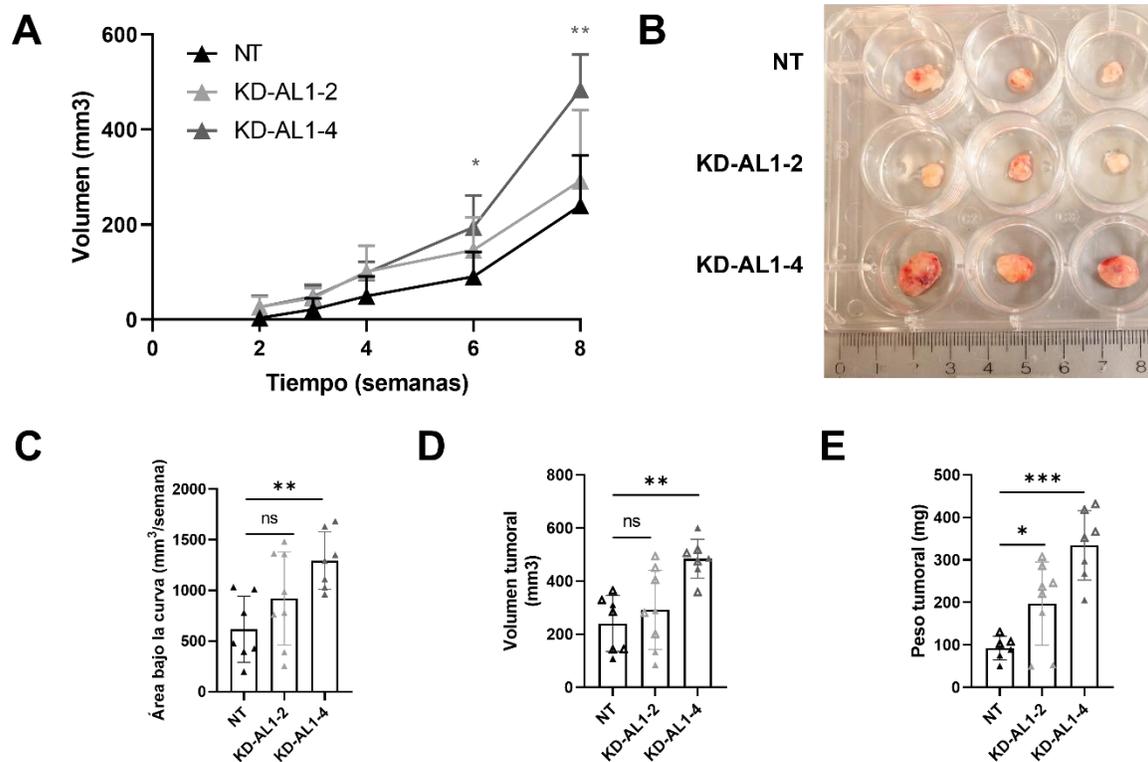
### **Ensayos *in vivo***

#### **Ensayo de crecimiento tumoral por xenoinjerto**

Para comprender mejor el rol de AHCYL1 en la fisiopatología del cáncer de pulmón, se realizaron experimentos de crecimiento tumoral *in vivo*. Para ello, se inyectaron subcutáneamente células A549 tanto líneas control (NT) como silenciadas para AHCYL1 (KD-AL1-2 y KD-AL1-4), en el flanco de ratones macho y hembra NOD SCID de 6-8 semanas. Durante el experimento, se monitoreó el estado general del animal y se registró su peso corporal (ver **Figura Suplementaria 1**).

Al analizar las curvas de crecimiento tumoral (**Figura 32 A**), se observó que las líneas silenciadas generan la aparición de tumores antes que las células control: una tendencia en la línea KD-AL1-2 (por la alta dispersión de los datos) y una diferencia significativa en la línea KD-AL1-4. Utilizando esos datos, se cuantificó el área bajo la curva (AUC) para cada individuo y se corroboró lo observado al analizar las curvas de crecimiento tumoral (**Figura 32 C**). En la **Figura 32 B** se muestra una fotografía de los tumores extraídos al final de experimento y sus tamaños. Al evaluar el volumen final de los tumores se observó lo mismo que en el análisis de la curva, una tendencia de aumento para KD-AL1-2 y un aumento significativo en el caso de KD-AL1-4 en comparación a lo medido en el control NT (**Figura 32 D**). En cuanto al peso tumoral final se observaron

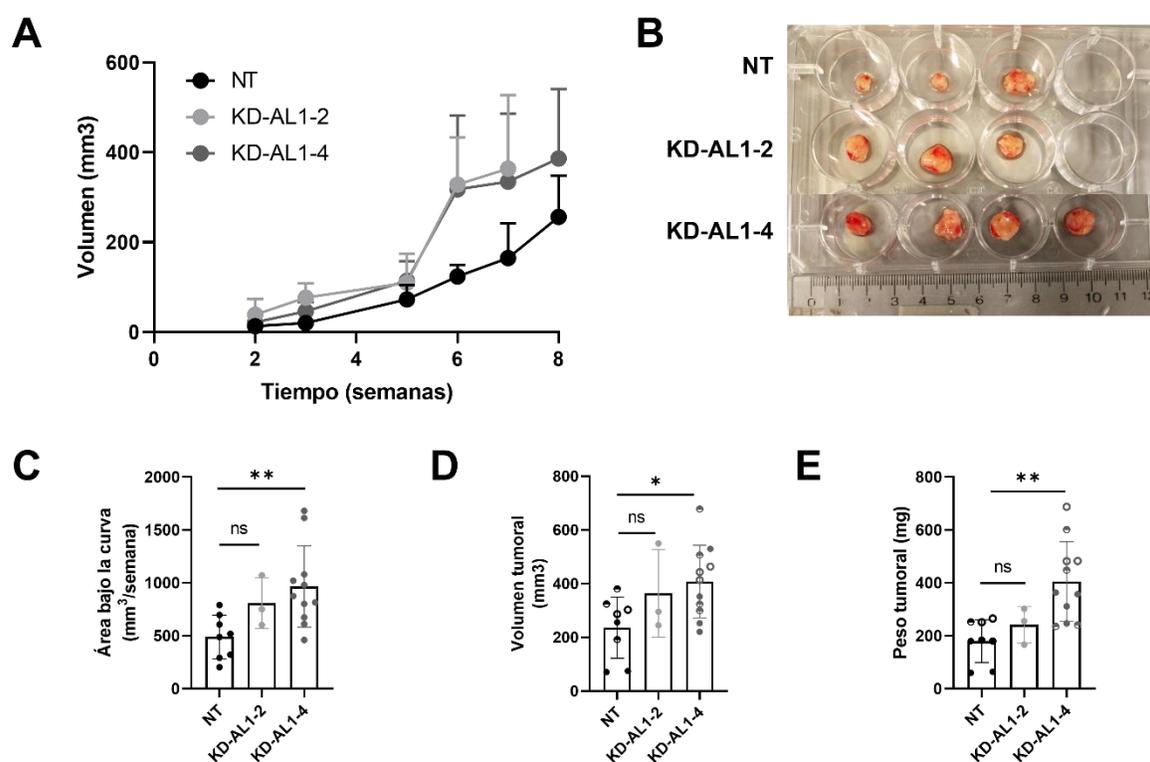
diferencias significativas para ambas líneas silenciadas en comparación con el control (**Figura 32 E**).



**Figura 32. Ensayo de crecimiento tumoral por xenoinjerto con líneas silenciadas para AHCYL1 en ratones NOD SCID macho.** Se inyectaron células control (NT) o silenciadas para AHCYL1 (KD-AL1-2, KD-AL1-4) de manera subcutánea en ratones macho ( $n = 7-8$  ratones por grupo, distinto sombreado corresponde a dos experimentos independientes). **A)** Curva de crecimiento tumoral medido a lo largo de las semanas que duró el experimento. Las diferencias se evaluaron utilizando un Diseño de Medidas Repetidas (en el cual se evaluó el efecto del tiempo y de la línea celular considerando que las unidades experimentales no son independientes). **B)** Fotografías de los tumores extraídos en uno de los experimentos. **C)** Análisis de Área bajo la curva para cada individuo. Las medias se compararon mediante un ANOVA seguido de una prueba de Dunnet. **D)** Volumen final de los tumores analizados. Las medias se compararon mediante un ANOVA seguido de una prueba de Dunnet. **E)** Peso final de los tumores. Las medias se compararon mediante un ANOVA seguido de una prueba de Dunnet. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,005$  y \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

Este ensayo también fue realizado en hembras NOD SCID de la misma edad. No se observaron diferencias en la curva de crecimiento tumoral de los tumores generados a partir de las líneas KD-AL1-2 y KD-AL1-4 (**Figura 33 A**),

pero al analizar las áreas bajo la curva si se encontró significancia para KD-AL1-4 (**Figura 33 C**). Al analizar las imágenes de los tumores extraídos al final del experimento se observó algo similar a lo observado para los machos, donde los tumores NT son menores que los de las líneas silenciadas (**Figura 33 B**). Al comparar los volúmenes y pesos tumorales finales se encontró que ambos fueron mayores para KD-AL1-4 (**Figura 33 D, E**). Es importante tener en cuenta que para KD-AL1-2 se cuenta con solo 3 individuos y esto produce que cualquier valor *outlier* sea difícil de detectar.



**Figura 33. Ensayo de crecimiento tumoral por xenoinjerto con líneas silenciadas para AHCYL1 en ratones NOD SCID hembra.** Se inyectaron células control (NT) o silenciadas para AHCYL1 (KD-AL1-2, KD-AL1-4) de manera subcutánea en ratones hembra ( $n = 3-8$  ratones por grupo, distinto sombreado corresponde a dos experimentos independientes). **A)** Curva de crecimiento tumoral medido a lo largo de las semanas que duró el experimento. Las diferencias se evaluaron utilizando un Diseño de Medidas Repetidas (en el cual se evaluó el efecto del tiempo y de la línea celular considerando que las unidades experimentales no son independientes). **B)** Fotografías de los tumores extraídos en uno de los experimentos. **C)** Análisis de Área bajo la curva para cada individuo. Las medias se compararon mediante un ANOVA seguido de una prueba de Dunnett. **D)** Volumen final de los tumores analizados. Las medias se compararon mediante un

ANOVA seguido de una prueba de Dunnet. **E)** Peso final de los tumores. Las medias se compararon mediante un ANOVA seguido de una prueba de Dunnet. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,005$  y \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

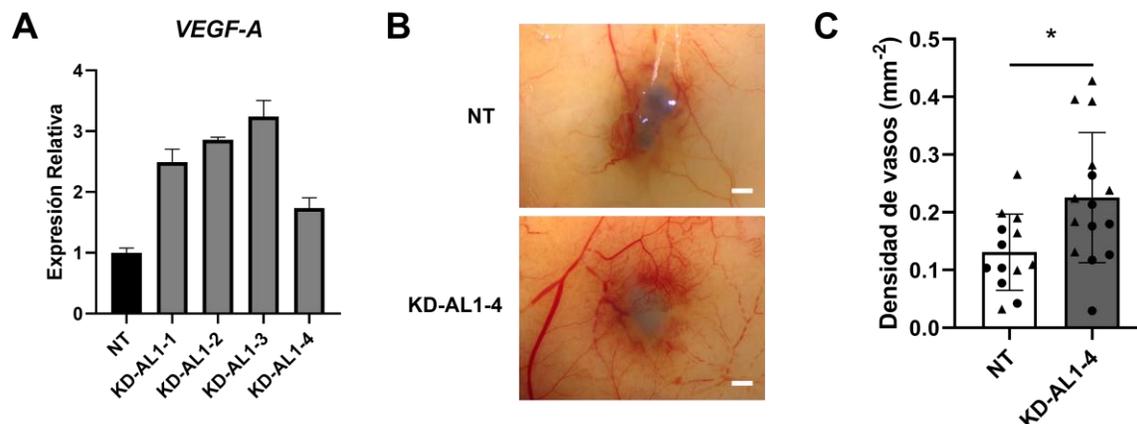
A partir de estos resultados, se puede concluir que la depleción de AHCYL1 promovería un mayor crecimiento tumoral y por ende incrementa la capacidad tumorigénica *in vivo*. Esto es consistente con los ensayos *in vitro* para el estudio de la capacidad de iniciación tumoral, siendo la línea KD-AHCYL1-4 más potente que la KD-AHCYL1-2.

### **Ensayo de angiogénesis *in vivo***

Numerosos estudios indican que la presencia de CMTs está asociado a procesos de angiogénesis (Kise, Kinugasa-Katayama, and Takakura 2016; Markowska et al. 2017). El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es uno de los genes clave para este proceso en distintos tipos de tumores, incluyendo el de pulmón (Pallis and Syrigos 2013). Teniendo en cuenta estos antecedentes y considerando que nuestra hipótesis propone a AHCYL1 como un modulador de la plasticidad celular, evaluamos la expresión de *VEGF-A*, una de las isoformas mayoritariamente expresadas en cáncer de pulmón (Frezzetti et al. 2017), en las líneas celulares silenciadas para AHCYL1 (**Figura 34 A**) y observamos que el silenciamiento de AHCYL1 indujo los niveles de expresión de *VEGF-A*.

Para evaluar el rol de AHCYL1 en un contexto fisiológico y su efecto en la expresión de *VEGF-A*, se realizó un ensayo de angiogénesis *in vivo*. El mismo consistió en inyectar ratones NOD SCID de 6-8 semanas en el flanco de manera intradérmica con la línea silenciada KD-AL1-4 y la línea control, NT. A los 7 días de la inyección se realizó el sacrificio de los animales y se tomaron fotografías para realizar el posterior conteo de vasos (Tedesco et al. 2019). En la **Figura 34 B** se pueden observar fotografías representativas de ambas condiciones experimentales. Luego de realizar la cuantificación se observó un aumento

significativo de la densidad de vasos en la línea KD-AL1-4 (**Figura 34 C**). Este aumento observado sería consistente con los resultados mostrados anteriormente, los cuales indicarían que las líneas silenciadas para AHCYL1 son más plásticas y menos diferenciadas que su control.



**Figura 34. Ensayos de angiogénesis *in vivo* utilizando las líneas NT y KD-AL1-4.** **A)** RT-qPCR para *VEGF-A*. RPL19 fue utilizado como control de normalización. La expresión relativa es sobre la expresión del control *non-targeting* (NT) (n=1). **B)** Fotografías representativas tomadas bajo estereomicroscopio. Barra de escala: 5 mm. **C)** Cuantificación de la densidad de vasos formados en cada una de las condiciones experimentales (NT o KD-AL1-4) (n=13-15 por grupo). Círculos y triángulos se utilizan para identificar los individuos de dos experimentos independientes. Las medias fueron comparadas mediante una prueba de T. \* p≤0,05, \*\* p≤0,01, \*\*\* p≤0,005 y \*\*\*\* p≤0,0001.

### Hallazgos sobre los Ensayos *in vivo*

#### Ensayo de crecimiento tumoral por xenoinjerto

- Se observó que los tumores derivados de líneas silenciadas para AHCYL1, en especial la línea KD-AHCYL1-4, genera mayor potencial tumorigénico *in vivo*.

**Ensayo de angiogénesis *in vivo***

- El silenciamiento de AHCYL1 produciría un aumento en la expresión de VEGF-A.
- Se observó una mayor densidad de vasos generada por la inyección *in vivo* de la línea KD-AHCYL1-4.

# **DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer, representando el 18% del total de éstas a nivel mundial (Sung et al. 2021). Este tipo de tumores se caracteriza por ser altamente heterogéneos y estar compuesto por distintas subpoblaciones celulares (J. Zhang et al. 2014). Dentro de ellas se encuentran las células con propiedades de célula madre (CMTs) que se asocian a agresividad, resistencia, recurrencia y fenómenos de plasticidad celular (Batlle and Clevers 2017; Clevers 2015). Las CMTs comparten marcadores y propiedades con las CMEs, que son en parte lo que impulsaría el inicio y resistencia del tumor (Boyer et al. 2005; Okita and Yamanaka 2010).

Debido a la importancia de entender los mecanismos moleculares y celulares que regulan la biología tumoral, el objetivo de esta tesis fue caracterizar el rol de *AHCYL1* (identificado a través de la herramienta INSECT (Parra et al. 2016; Rohr et al. 2013)) como potencial moderador de la identidad, plasticidad y comportamiento de células tumorales en un modelo de cáncer de pulmón. Para ello, primero se realizó una caracterización de la expresión de *AHCYL1* en pulmón, utilizando líneas celulares, datos bioinformáticos provenientes de bases de datos públicas y biopsias de pacientes. A su vez, se estudió la modulación de la expresión de *AHCYL1* en dos modelos de plasticidad celular (en distinto formato de cultivo y en un modelo de transición epitelio-mesenquimal inducida por TGF- $\beta$ ). Se generaron líneas estables silenciadas para la expresión de *AHCYL1* donde se realizó una caracterización, ensayos funcionales *in vitro* y ensayos *in vivo* para evaluar el comportamiento celular. También se realizaron ensayos preliminares de sobreexpresión para la proteína *AHCYL1* y el factor *POU5F1*, mediante el uso de vectores de expresión para proteínas de fusión fluorescentes.

Los principales hallazgos de esta tesis sugieren que la expresión de *AHCYL1* correlaciona inversamente con la expresión de distintos factores de

pluripotencia y con la de MKI67. Esto indicaría que AHCYL1 podría asociarse a un fenotipo más diferenciado. Además, disminuir la expresión de AHCYL1 demostró generar un fenotipo más agresivo en un modelo de tumorigénesis *in vivo* y mayor capacidad angiogénica. En ensayos de capacidad iniciadora de tumores se observó que AHCYL1 regularía negativamente dicha capacidad que suelen tener las CMTs. Colectivamente, estos resultados sugieren que AHCYL1 regula el comportamiento celular y podría ser utilizado como un marcador de buena prognosis, dado que su silenciamiento promueve la tumorigenicidad.

### **Expresión de AHCYL1 en pulmón**

AHCYL1 es una proteína ubicua que se localiza en diversos tejidos (Ando et al. 2003; Uhlén et al. 2015). Ando y colaboradores habían mostrado su expresión en distintos tejidos de ratón, incluyendo el pulmón. En ese mismo trabajo, al realizar un fraccionamiento subcelular de cerebelo, se observó la expresión de AHCYL1 en todas las fracciones (Ando et al. 2003). El único reporte conocido en pulmón humano es el reciente trabajo de Hwang y colaboradores en donde muestra la expresión de AHCYL1 en A549 en una inmunofluorescencia, posterior al comienzo del desarrollo de este trabajo (Hwang, Shin, and Hong 2020). En esta tesis, mostramos la expresión de AHCYL1 en tres líneas celulares de pulmón humano A549 y H1299 (tumoraes) y MRC-5 (normal) (**Figura 9**).

AHCYL1 está sujeto a diversas modificaciones postraduccionales como la fosforilación y el clivaje proteolítico. La fosforilación de AHCYL1 promueve la unión a otras proteínas citoplasmáticas, mientras que la desfosforilación induce el clivaje del dominio IRBIT y favorece la translocación a núcleo de las formas clivadas y desfosforiladas de AHCYL1 (Devogelaere, Sammels, and Smedt 2008; Grbeša et al. 2017). Al evaluar la localización subcelular de AHCYL1 endógeno mediante inmunofluorescencia pudimos corroborar que efectivamente podía localizarse tanto en núcleo como en citoplasma en las tres líneas celulares (**Figura 9**). A pesar de estar descripta como una proteína mayoritariamente citoplasmática,

encontramos una marca nuclear intensa en todos los casos (Devogelaere, Sammels, and Smedt 2008; D. Yang, Shcheynikov, and Muallem 2011). Sería interesante investigar si coincide con la localización de AH CY u otros potenciales blancos nucleares que aún no hayan sido explorados. Es importante mencionar que el anticuerpo utilizado está direccionado a los aminoácidos 71 a 121 (**Figura 6**), lo cual nos permite sugerir que tanto la isoforma completa como la isoforma clivada son reconocidas por nuestro anticuerpo. Datos previos del laboratorio y ensayos de fraccionamiento subcelular en diferentes líneas celulares (en la tesina del Lic. Nicolás Budnik) demostraron que la isoforma revelada en ensayos de WB para células de pulmón es la correspondiente a la versión canónica y citoplasmática con una movilidad electroforética de aproximadamente 60 kDa (**Figura 9**). Por el contrario, la versión nuclear de la proteína (tamaño menor a 60 y mayor a 50 kDa) se expresa en muy baja proporción en estas células y con abundancia en células de glioblastoma.

El trabajo de Jeong en ovario de pollos y humanos muestra la expresión de AH CYL1 en líneas celulares tumorales de ovario donde algunas de éstas muestran una marcada expresión nuclear, mientras que otras son detectadas principalmente en el citoplasma (Jeong, Kim, Kim, et al. 2012). Esto sugeriría que su localización subcelular no solo depende del tipo celular sino también del contexto y que AH CYL1 tendría funciones en ambos compartimientos subcelulares.

Para caracterizar a AH CYL1 en un contexto clínico, primero realizamos un análisis bioinformático utilizando la base de datos pública TCGA. Como habíamos determinado que la expresión era levemente mayor en la línea celular normal al compararla con las líneas tumorales (**Figura 9**), realizamos el mismo análisis con los datos de la transcriptómica de los pacientes. Encontramos un resultado similar, donde los pacientes de NSCLC tienen la expresión de *AH CYL1* disminuida (**Figura 10 A**). En este sentido Jeong ya había postulado que AH CYL1 en

humanos tendría función de supresor tumoral (Jeong, Kim, Kim, et al. 2012), lo cual sería consistente con nuestras observaciones.

Al analizar en los diferentes estadios tumorales, observamos una disminución en la expresión de *AHCYL1* en recurrencias y metástasis (**Figura 10 B, C**). Considerando que las recurrencias y metástasis son más agresivas y plásticas que los tumores primarios (Das et al. 2020; Shenoy 2020), una menor expresión de *AHCYL1* implicaría un peor pronóstico. En la misma línea que nuestros resultados, Wittig y colaboradores demostraron en células de melanoma que *AHCYL1* disminuye su expresión frente a la exposición a quimioterapéuticos que generan daño al ADN como el etopósido (Wittig et al. 2002). Teniendo en cuenta los roles proapoptótico e inhibidor de la autofagia, la disminución de la expresión de *AHCYL1* en este contexto evitaría que la célula entre en apoptosis y/o active mecanismos de autofagia, los cuales pueden considerarse como señales de sobrevida para la célula. Todo en su conjunto, explicaría por qué la disminución de *AHCYL1* podría generar quimiorresistencia. Este punto en particular y dentro del contexto de esta tesis requiere futuras investigaciones.

Por otra parte, *MKI67* es un marcador de proliferación utilizado como predictivo de peor pronóstico en muchos tumores (Y. Liu et al. 2017; Martin et al. 2004). Encontramos que *AHCYL1* se correlaciona inversamente con *MKI67* en pacientes con NSCLC y que aquellos que muestran bajo *AHCYL1* y alto *MKI67* poseen peor pronóstico (**Figura 11**). Teniendo en cuenta que *AHCYL1* había sido seleccionado en primer lugar de un algoritmo que indicaba que sería blanco de la corregulación de factores de transcripción asociado a pluripotencia y plasticidad (Parra et al. 2016; Rohr et al. 2013), utilizamos la herramienta publicada por Malta (Malta et al. 2018) para evaluar distintos índices de pluripotencia en los datos de transcriptómica. Consistente con lo que veníamos observando, también encontramos que *AHCYL1* se correlaciona negativamente con uno de esos índices de pluripotencia y que los pacientes bajo *AHCYL1* y alto *MKI67* poseen mayores rasgos de pluripotencia (**Figura 12**). Esto indicaría, entonces, que en

tumores con mayor proliferación (alto *MKI67*) y menores niveles de *AHCYL1* presentan mayores rasgos de pluripotencia y, por lo tanto, un peor pronóstico. Esto puede ser vinculado con los resultados de Nakazawa, quien demostró que en pacientes con cáncer gástrico, la baja expresión de *AHCYL1* está asociada a fenómenos de quimiorresistencia y, por lo tanto, a una menor supervivencia (Nakazawa et al. 2019). Esto último también corrobora los resultados de Wittig en líneas celulares de melanoma que discutimos previamente (Wittig et al. 2002).

Considerando los resultados provenientes del análisis bioinformático, se analizaron las biopsias de pacientes. Para ello, establecimos una colaboración con el Servicio de Anatomía Patológica de Fundación Favaloro y evaluamos la marcación de *AHCYL1* y de *MKI67* mediante ensayos de inmunohistoquímica. En primer lugar, observamos una mayor expresión de *AHCYL1* en muestras de pulmón normal al compararlas con muestras tumorales (**Figura 13**). Coincidentemente, Jeong demostró resultados similares en cáncer epitelial de ovario en mujeres (Jeong, Kim, Kim, et al. 2012).

Luego, comparamos la expresión de *AHCYL1* y *MKI67* en muestras de adenocarcinomas de distinto grado histológico y encontramos que los tumores de mayor grado histológico (que son aquellos más agresivos, menos diferenciados) fueron aquellos que expresan menos *AHCYL1* y más *MKI67* (**Figura 14**). En línea con esto, Jeong mostró que las pacientes con mayor respuesta al tratamiento y mayor supervivencia libre de progresión eran aquellas que expresaban niveles intermedios-altos de *AHCYL1* (Jeong, Kim, Kim, et al. 2012). En conjunto, nuestros resultados y de otros sugieren que la expresión de *AHCYL1* sería indicio de un pronóstico favorable.

Con estos resultados, realizamos un análisis más detallado en el cual separamos las muestras según el nivel de expresión como leve o alta de *AHCYL1* (**Tabla 8**). Ese análisis reveló una asociación significativa entre el nivel de expresión de *AHCYL1* y el sexo, donde observamos que *AHCYL1* tiene una expresión elevada en todas las mujeres analizadas (9/9), mientras que en

hombres 5 tuvieron marcación leve y 6 alta. Esta observación podría tener relación con otro trabajo de Jeong, quien mostró que agonistas sintéticos de estrógenos podían inducir la expresión de AHCYL1 en pollos (Jeong, Kim, Ahn, et al. 2012). Esto es interesante de ser considerado, teniendo en cuenta que el mismo autor ha demostrado que lo que ocurre en pollos y en humanos es paradójicamente opuesto (Jeong, Kim, Kim, et al. 2012). Según estadísticas recientes, el cáncer de pulmón es la causa principal de muerte por cáncer en hombres, mientras que es el tercero en incidencia y segundo en mortalidad para mujeres (Sung et al. 2021). Las tasas de incidencia y mortalidad son dos veces mayores en hombres que en mujeres, lo cual nos permite pensar que, si la expresión de AHCYL1 está controlada por estrógenos, podría ser una de las causas por las cuales las mujeres se ven menos afectadas por esta patología.

Luego, se realizaron correlaciones entre AHCYL1 y diversos parámetros. Al igual que los datos de TCGA, la correlación con MKI67 fue inversa y significativa (**Tabla 8, Tabla 9**). Se observó una tendencia negativa de correlación con respecto al grado histológico, aunque no fuese así para el estadio tumoral. Dado que el estadio tumoral es considerado una variable predictiva fuerte, pensamos que el motivo de esta falta de correlación se deba al tamaño de la cohorte y la poca cantidad de pacientes. Este estudio comenzó en 2017 y fueron considerados todos los pacientes desde entonces. La dificultad para aumentar el número de pacientes tiene que ver con la necesidad de esperar un tiempo prudencial para poder establecer un tiempo de seguimiento que permita evaluar la recurrencia y los fallecimientos. Sumado a estas limitaciones, aquellos pacientes a los que se les diagnostica un estadio metastásico no se consideran operables y por ende tenemos un sesgo en nuestra población de estudio.

Se realizó también un análisis de supervivencia con los casos disponibles (**Tabla 10**). Allí, es importante considerar que por la poca cantidad de casos no se puede realizar un estudio multivariado, sino que únicamente pudimos evaluar una variable a la vez. Interesantemente, tanto AHCYL1 como MKI67 resultaron

variables predictivas de supervivencia, siendo AHCYL1 una variable favorable y MKI67 una variable de riesgo (L. T. Li et al. 2015). El sexo mostró una tendencia a ser una variable predictiva y observamos que 4/6 fallecimientos correspondieron a hombres, apoyando lo que muestran las estadísticas en términos de incidencia y mortalidad (Sung et al. 2021).

Por último, se realizó una comparación entre adenocarcinomas y otros tumores NSCLC y se vio que los otros eran más agresivos, por ende, presentaban menor tiempo de seguimiento y mayor marcación de MKI67 (**Tabla 11**). Si bien el análisis de AHCYL1 no mostró diferencias significativas, 67% de los otros tumores mostraron baja expresión de AHCYL1 y 75% de los adenocarcinomas alta marcación, lo cual nos alienta a pensar que sumando más pacientes a este análisis podríamos proponer a AHCYL1 como un potencial biomarcador de mejor prognosis en cáncer de pulmón no microcítico y utilizarlo como complementario a la marcación ya utilizada de rutina de MKI67.

### **Estudio de AHCYL1 en modelos de plasticidad tumoral**

Dado que el objetivo de este trabajo era evaluar el rol de AHCYL1 en la plasticidad celular de cáncer de pulmón, decidimos utilizar para su estudio modelos de plasticidad conocidos como los cultivos en 3D y la transición epitelio-mesenquimal (EMT) inducida por TGF- $\beta$ .

El cultivo celular en 3D es uno de los grandes avances en el campo de las células madre en la última década; este tipo de cultivo permite el enriquecimiento en células con propiedades plásticas como las CMEs, iPSCs y CMTs (Azar et al. 2021). En los ensayos realizados con las células A549 se observó una disminución de AHCYL1 en los cultivos en 3D en condiciones de *stemness* (**Figura 15**). Estos resultados indicarían que las células con mayor plasticidad (que han pasado por procesos de reprogramación/desdiferenciación) expresarían menos AHCYL1, contrario a lo observado en los cultivos en 2D que son más

homogéneos y están enriquecidos en células diferenciadas. Esto sería consistente con las conclusiones obtenidas a partir del análisis de la expresión de AHCYL1 discutida en la sección anterior.

Los ensayos de EMT inducida por TGF- $\beta$  son otro modelo de plasticidad muy descrito en pulmón (Kawata et al. 2012; R. Y. Liu et al. 2014; Schelch et al. 2021). Utilizamos este inductor del microambiente tumoral para poder poner a prueba a TGF- $\beta$  como regulador de la expresión de AHCYL1 en este contexto y de acuerdo a las predicciones *in silico* provenientes del INSECT. (Parra et al. 2016; Rohr et al. 2013). Los resultados muestran una disminución de AHCYL1 al ser inducido el EMT por TGF- $\beta$ 1, lo cual fue corroborado por la inducción de *SNAIL* y el fenotipo celular (**Figura 16**) (Sterneck, Poria, and Balamurugan 2020). *AHCYL1* no sería un gen de respuesta temprana de modulación ya que a corto tiempo del tratamiento con TGF- $\beta$ 1 no se observa modulación.

Varios reportes proponen que el EMT no es una transición entre un estado y otro de manera dicotómica, sino que existe un espectro en el cual las células pueden adoptar más o menos características de uno y otro fenotipo; estas células serían más plásticas (Bakir et al. 2020; Roy et al. 2021; Weidenfeld and Barkan 2018). Dado que la expresión del gen de pluripotencia *POU5F1* se ha reportado por participar en eventos de plasticidad que dirigen EMT y en respuesta a TGF- $\beta$  (Mandal et al. 2018; Tirino et al. 2013), evaluamos la expresión de *POU5F1*, observando su inducción. Futuros experimentos deberán realizarse en células de cáncer de pulmón para profundizar los mecanismos de acción sobre la expresión de AHCYL1 modulada por señales del entorno tumoral, así como adicionar un análisis de expresión de otros marcadores, tanto epiteliales y mesenquimales como asociados a pluripotencia.

Considerando nuestros resultados hasta ahora, podríamos plantear que AHCYL1 disminuye su expresión en células con fenotipo tipo mesenquimal dirigido por TGF- $\beta$ 1, generando un fenotipo potencialmente más invasivo/plástico, y extrapolando, hacia un cuadro clínico de peor prognosis.

## **Desarrollo de las líneas celulares estables para el silenciamiento de AHCYL1**

Como estrategia para estudiar el rol de AHCYL1 en un contexto tumoral, realizamos un silenciamiento estable utilizando vectores lentivirales que contenían distintos shARNs (**Figura 17**). Observamos que la eficiencia de silenciamiento dependía de cada shARN y que luego de sucesivos pasajes la línea estable comenzaba a perder el silenciamiento. Es por eso que en todos los experimentos realizados se corroboró que el silenciamiento de las líneas fuera de al menos un 50%. Además, decidimos descartar la línea KD-AHCYL1-1 porque los resultados no eran consistentes con las demás líneas generadas, lo cual puede deberse a *efectos off-target* de ese shARN en particular.

### **Caracterización de las líneas silenciadas**

Como parte de la caracterización de estas líneas, evaluamos la proliferación debido al antecedente previo sobre la regulación de AHCYL1 a la RNR (Arnaoutov and Dasso 2014), en el que se describe que células HeLa depletadas de AHCYL1 presentan alteraciones en la progresión del ciclo celular. También, Arnaoutov describió que AHCYL1 se expresa en las células madre del intestino de *Drosophila melanogaster*, permitiendo la diferenciación celular a través de la supresión de la actividad de la RNR (Arnaoutov et al. 2020). Considerando que tanto AHCYL1 como RNR son proteínas conservadas, podría plantearse que las líneas de pulmón silenciadas para AHCYL1 tengan desregulada la proliferación y se vea afectada la diferenciación. Sin embargo, el estudio de la proliferación por tres metodologías distintas indicó que no hay alteración en la proliferación de las líneas silenciadas (**Figura 18**, **Figura 19**). Estos resultados fueron reproducidos por el Licenciado Nicolás Budnik en la línea H1299; restaría corroborar en las MRC-5

para evaluar si esto es consistente en las células de pulmón o está asociado a la tumorigenicidad en este tejido.

Los resultados que obtuvimos en muestras de pacientes, tanto *in silico* como en los ensayos de inmunohistoquímica, nos indican una correlación inversa entre MKI67 y AHCYL1, por lo cual era esperable que la proliferación se viera afectada al disminuir el nivel de AHCYL1. Es necesario tener en cuenta que estos ensayos fueron realizados en condiciones de 2D, lo cual tiene sus limitaciones y no recapitula la heterogeneidad tumoral observada en las biopsias. Futuras determinaciones en un contexto 3D y bajo modulación de la expresión de AHCYL1 serán necesarias para profundizar estos resultados

Al momento de la realización de esta tesis, se desconocían los mecanismos que regulan la expresión de AHCYL1 y se tenía poca evidencia del rol de esta proteína en un contexto tumoral. Al evaluar la expresión de genes de pluripotencia y diferenciación en las líneas silenciadas para AHCYL1, observamos un aumento de la expresión de los marcadores de pluripotencia (*CD44*, *CD133*, *ITGA6* y *POU5F1*) y una disminución en la expresión de los marcadores de diferenciación (*MUC5B* y *SFTPC*), aunque en algunos casos se observó como tendencia debido principalmente al error inter experimento (**Figura 20**, **Figura 21**). Además, analizamos la expresión de AHCY inducida en células con mayor plasticidad (Z. Wang et al. 2019; Zhu et al. 2020) y en nuestras líneas pudimos observar resultados similares.

Estos resultados también fueron corroborados utilizando el siARN de AHCYL1 (**Figura 25**) y en la línea H1299 en ensayos realizados por el Licenciado Nicolás Budnik, lo cual les aporta solidez a los resultados en A549. A futuro, sería interesante evaluar la expresión de marcadores de EMT en estas líneas silenciadas. Con ello, podríamos vincular lo observado en los ensayos con TGF- $\beta$ 1.

POU5F1 es un factor de transcripción asociado a pluripotencia y expresado en CMTs (Walcher et al. 2020). Diversos estudios muestran que los pacientes con cáncer de pulmón que presentan mayor expresión de POU5F1 tienen peor pronóstico (S. J. Li et al. 2016; Su et al. 2021; L. Zhang, Shen, and Wu 2021). Hasta ahora, nuestros resultados nos permitieron asociar la expresión de AHCYL1 con un fenotipo menos pluripotente y, por ende, con una mejor prognosis. Cuando estudiamos la expresión de POU5F1 a nivel de proteína en las líneas silenciadas observamos que en todas ellas hay un aumento en su expresión, lo cual es consistente con nuestros resultados (**Figura 22**). Es importante mencionar que estos ensayos fueron realizados en condiciones 2D, donde la subpoblación de CMTs se encuentra menos representada. Este resultado es alentador y a futuro nos proponemos repetirlo en condiciones 3D, profundizando en la caracterización de la relación entre AHCYL1 y POU5F1 en un contexto tumoral.

Retomando lo discutido previamente para AHCY, se ha descrito en células tumorales de osteosarcoma U2OS que niveles reducidos de AHCYL1 modifican la distribución intracelular de AHCY hacia una localización nuclear, indicando que AHCYL1 puede influir ligeramente la distribución intracelular de AHCY (Grbeša et al. 2017) y, por lo tanto, esto podría regular en parte su actividad. Hasta la fecha no se ha descrito como la regulación subcelular de AHCY afecta el ciclo o la actividad de la enzima. Sin embargo, se ha demostrado que en CMEs AHCY se ubica en el núcleo y ocupa regiones de cromatina asociada al factor tumoral MYC sugiriendo que AHCY podría reclutarse para facilitar una metilación CAP eficiente de ARNm en genes específicos en CMEs (Aranda et al. 2019). Dentro del contexto de nuestros resultados en células de cáncer de pulmón sería interesante evaluar si el silenciamiento de AHCYL1 induce el reclutamiento de AHCY al núcleo influenciando la expresión de genes de *stemness* como POU5F1 y/o el estado de metilación del ADN.

En el marco de esta caracterización, también evaluamos la marca epigenética de activación transcripcional H3K4me3 debido a su inducción en

líneas derivadas de pacientes con cáncer de pulmón (Z. Wang et al. 2019). El silenciamiento de AHCYL1 conlleva a un aumento en la marca de H3K4me3 (**Figura 23**), la cual se encuentra asociada a una peor prognosis en cáncer (S. Li, Shen, and Chen 2018). Este resultado se discutirá luego en la sección *Detección de SAM y SAH por UPLC-HRMS*.

### **Ensayos funcionales realizados con las líneas silenciadas**

La caracterización de las líneas silenciadas nos demostró que en ausencia de AHCYL1 las células inducen la expresión de genes asociados a pluripotencia y plasticidad, disminuyen la expresión de genes de diferenciación y presentarían mayores niveles de POU5F1 y H3K4me3. Todos estos resultados sugieren que las líneas silenciadas poseen un menor grado de diferenciación. Por este motivo, decidimos estudiar la capacidad tumorigénica *in vitro*.

Primero, realizamos un ensayo de dilución limitante (ELDA) (Y. Hu and Smyth 2009). Este ensayo permite sembrar células en diluciones extremas y determinar a qué dilución son capaces de formar esferas; esto recapitula la capacidad de iniciación tumoral y se espera que células con mayor capacidad iniciadora puedan formar esferas a mayores diluciones (Ferreyra Solari et al. 2016; Zhao, Setrerrahmane, and Xu 2015). Como esperábamos, las líneas silenciadas formaron esferas a diluciones más extremas y el recuento de esferas fue mayor, demostrando tener mayor potencial tumoral (**Figura 24**). Por lo tanto, la capacidad de iniciación tumoral *in vitro* es dependiente de AHCYL1.

### **Ensayos *in vivo***

Los resultados obtenidos *in vitro* nos alentaron a poner a prueba en ensayos *in vivo*. Realizamos el ensayo de xenoinjerto en ratones NOD SCID machos y hembras (**Figura 32, Figura 33**) para medir el crecimiento tumoral de células depletadas de AHCYL1. En ambos casos, la línea KD-AHCYL1-4 demostró

tener mayor capacidad tumorigénica. La línea KD-AHCYL1-2 demostró una tendencia en ambos, aunque en hembras sería necesario aumentar la cantidad de individuos.

Al evaluar los pesos tumorales, observamos que los valores control y para hembras son mayores que para machos, pero los valores en tumores silenciados fueron similares; esto sugeriría que el efecto de AHCYL1 afectaría más a machos que a hembras. Retomando la discusión de las publicaciones de Jeong y colaboradores (Jeong, Kim, Ahn, et al. 2012; Jeong, Kim, Kim, et al. 2012), podríamos proponer que si AHCYL1 está inducido por estrógenos las hembras podrían verse menos afectadas que los machos. Nos restaría corroborar en las muestras tumorales que la expresión de AHCYL1 es mayor en los tumores control de hembras cuando se los compara con los ratones macho.

En relación con lo que observamos en las muestras de pacientes, donde las mujeres muestran una mayor expresión de AHCYL1, nuestros resultados sugieren que la expresión de AHCYL1 impactaría positivamente en el contexto de sobrevida. Por otro lado, vinculado al aumento de expresión de POU5F1 en las líneas silenciadas, existen evidencias de relación entre la sobreexpresión de POU5F1 y la malignidad, que se traducirían en peor prognosis con la inducción de *stemness* (Chiou et al. 2010; S. J. Li et al. 2016; Mohiuddin, Wei, and Kang 2020; Xin et al. 2013). Esto daría una posible explicación a nuestros resultados en el modelo de xenoinjerto.

Las CMTs están asociadas también al proceso de angiogénesis, aspecto que quisimos explorar por estar ligado a la plasticidad celular (Kise, Kinugasa-Katayama, and Takakura 2016; Markowska et al. 2017). Con esta premisa, realizamos un ensayo de angiogénesis *in vivo*, sabiendo que la isoforma de VEGF mayoritaria en pulmón se encontraba sobreexpresada en las líneas silenciadas. Lo realizamos únicamente con KD-AHCYL1-4 debido a que había mostrado el mayor potencial tumorigénico *in vivo*, y observamos un aumento en la densidad de vasos (**Figura 34**). Estos resultados son alentadores para continuar el estudio del rol de AHCYL1 en angiogénesis.

## **Detección de SAM y SAH por UPLC-HRMS**

En el marco del desarrollo de esta tesis, establecimos una colaboración con la Dra. María Eugenia Monge y la Dra. Malena Manzi del Grupo de Espectrometría de Masas Bioanalítica del CIBION – CONICET para medir los niveles de SAM y SAH en las líneas depletadas de AHCYL1 como primera caracterización del potencial impacto de AHCYL1 en el ciclo de la metionina. Esto se basa en que en los últimos años se ha relacionado este ciclo con el fenotipo de células plásticas (Fernández-Arroyo, Cuyàs, and Bosch-barrera 2015; Z. Wang et al. 2019; Zhu et al. 2020) y con la actividad/función de AHCY que impacta sobre la progresión tumoral en NSCLC (Z. Wang et al. 2019).

Acerca del ciclo de la metionina, se sabe que SAH es el sustrato de AHCY y además el producto de las reacciones de metilación que ocurren en la célula (tanto a nivel de proteínas como las histonas, así como a nivel de metilación del ADN). La hidrólisis de SAH mediada por AHCY es necesaria para mantener baja su concentración debido a que inhibe a las metiltransferasas (Devogelaere, Sammels, and Smedt 2008). Algunos autores han demostrado la interacción entre AHCY y AHCYL1 (Grbeša et al. 2017; W. Huang et al. 2021), pero nadie ha demostrado si AHCYL1 inhibe directamente la actividad de AHCY.

Recientemente, se ha publicado que SAH puede interactuar con AHCYL1, con mayor afinidad que con AHCY (W. Huang et al. 2021). Esa interacción entre AHCYL1 y SAH inhibe el proceso de autofagia (mediante la inhibición de la PIK3C3), por lo que las células con silenciamiento de AHCYL1 podrían tener activado el mecanismo de autofagia y de esa manera aumentar la supervivencia de la célula.

Los resultados en la línea silenciada KD-AHCYL1-4 no mostraron variaciones en las mediciones de SAM, en cambio mostraron un leve aumento de SAH. Una explicación que encontramos es que este leve aumento de SAH se deba a que exista un leve incremento de metilación, como se observó con la

marcación de la H3K4me3 (**Figura 23**) sin que AHCY pueda hidrolizar todo el SAH que se genera. La marca epigenética H3K4me3 se encuentra inducida en células transcripcionalmente activas como las CMEs, las iPSCs y CMTs (Shiraki et al. 2013; Z. Wang et al. 2019). Además, se ha reportado que una acumulación de SAH podría resultar tóxica para la célula, generando daño al ADN y arresto del ciclo celular (Beluzic et al. 2018; C. C. Liu et al. 2009). Beluzic y colaboradores mostraron que el silenciamiento de AHCY provoca un aumento de SAH de 100 veces, por lo que la variación de SAH en nuestro modelo sería despreciable. De todas formas, evaluamos la proliferación y viabilidad de estas líneas celulares y no se observaron diferencias significativas (**Figura 18**). Además, al marcar las células con yoduro de propidio (**Figura 19**) observamos que su ciclo no se encuentra arrestado en G1 como se ha observado bajo silenciamiento de AHCY (Beluzic et al. 2018), lo cual indicaría que el aumento de SAH, como consecuencia del silenciamiento estable de AHCYL1, no se encontraría en niveles de toxicidad para la célula. Para corroborar esto sería necesario realizar otros ensayos celulares como marcación con  $\gamma$ H2AX (Beluzic et al. 2018).

Los resultados sugieren que en las células silenciadas para AHCYL1 habría mayor generación de SAH, un leve aumento en la marca de metilación de la H3K4me3 (**Figura 27**) y tendrían alterado el ciclo de la metionina. Esto también se puede ver en la diferencia en las correlaciones entre SAM y SAH en ambas líneas (**Figura 28**). Nuestro modelo posee limitaciones asociadas a los pocos metabolitos analizados y a las preguntas que aún restan por responder acerca de la regulación de este ciclo, por lo que es necesario continuar con la investigación del ciclo de la metionina en el contexto de la heterogeneidad tumoral.

Como se mencionó, recientemente, se ha demostrado que AHCYL1 inhibe el proceso autofágico en células de osteosarcoma (W. Huang et al. 2021) a través de la interacción con SAH y la inhibición de la PIK3C3, así como interactuando con la proteína Tau en células Hela (Wischof et al. 2022). Si bien en esta tesis no se realizaron ensayos de medición de autofagia (así como tampoco de apoptosis),

postulamos que la alteración de los niveles endógenos de AHCYL1 (por silenciamiento estable) podría generar menor inhibición de la PIK3C3 (al no interactuar con la enzima PIK3C3) y de esta manera promover el proceso de la autofagia (W. Huang et al. 2021). El uso de SAH como 2do mensajero para otras funciones celulares hasta la fecha no se ha descrito.

La autofagia es un proceso conservado evolutivamente que permite mantener la homeostasis celular en condiciones de estrés o privación de nutrientes y fundamentalmente promueve la supervivencia (Eskelinen and Saftig 2009). Dependiendo del contexto, se ha reportado a la autofagia como pro y anti oncogénica (Kenific, Thorburn, and Debnath 2010; White, Mehnert, and Chan 2015). Evidencias recientes demuestran que la autofagia puede aumentar la pluripotencia en CMTs, pero todavía no se comprenden del todo los mecanismos subyacentes (Cufí et al. 2011; Marcucci, Ghezzi, and Rumio 2017; Maycotte et al. 2015). En pulmón, Wang demostró que la autofagia aumenta la plasticidad de CMTs mediante la degradación del supresor tumoral p53 (J. Wang et al. 2021). En la misma línea, Hao describió que la inhibición de la autofagia con cloroquina inhibe la pluripotencia en células A549 CD133+, promoviendo la eficiencia del tratamiento con cisplatino; concluyendo que la inhibición de la autofagia en CMTs promueve la eficiencia del tratamiento antitumoral (Hao, Liu, and Tian 2019). Estos aportes, proponen que la autofagia puede ser considerado un proceso que sostiene el estado plástico celular en pulmón. Siendo AHCYL1 un inhibidor de la autofagia (W. Huang et al. 2021), su expresión podría ser beneficiosa en cáncer de pulmón. Estos antecedentes sumados a los datos de esta tesis indicarían que AHCYL1 podría ser considerado como un regulador de la plasticidad celular.

### **Efectos de la modulación por sobreexpresión de POU5F1 y AHCYL1**

Al sobreexpresar la proteína de fusión tdTomato-AHCYL1 observamos una respuesta bifásica en la expresión de POU5F1. Esto se ve acompañado de la

expresión de AHCY y una tendencia al aumento de H3K4me3 (**Figura 29, Figura 30**). Es posible que el efecto bifásico observado sobre POU5F1 esté relacionado con las diversas funciones que regula AHCYL1 y de su interacción con otras proteínas (Devogelaere, Sammels, and Smedt 2008; D. Yang, Shcheynikov, and Muallem 2011); esto requiere una investigación más profunda que pueda dilucidar los efectos de la regulación fina que tiene AHCYL1.

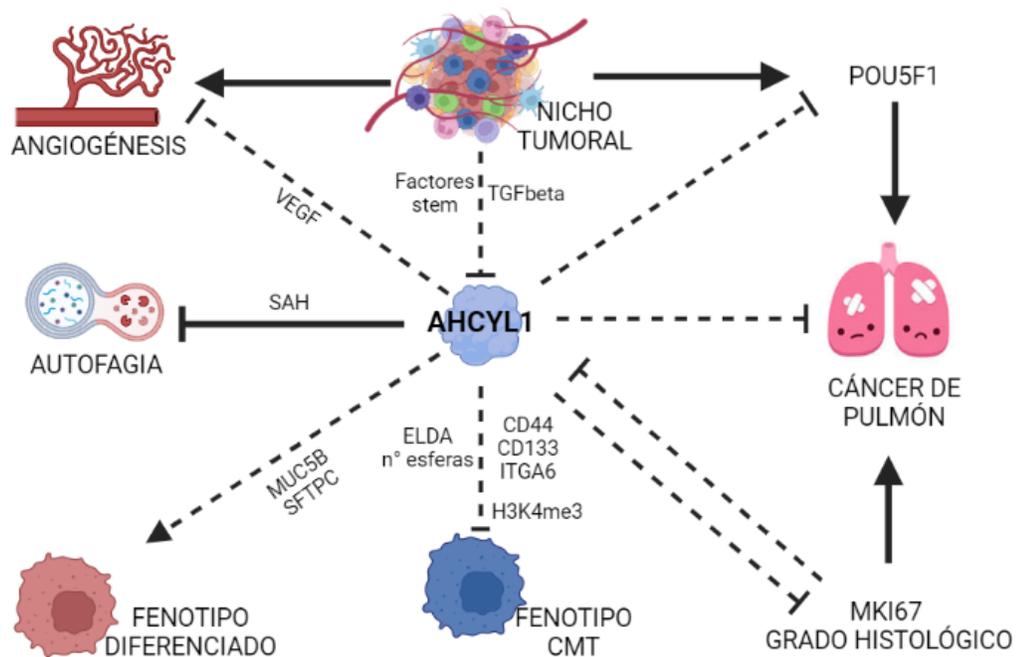
Por la aparente regulación que ejerce AHCYL1 sobre POU5F1, sobreexpresamos la proteína de fusión POU5F1-GFP para indagar si existía alguna relación en ese sentido (**Figura 31**). De manera preliminar no observamos modificaciones en AHCYL1, pero si corroboramos que tanto AHCY como H3K4me3 (inducidos en condiciones de *stemness*) se ven aumentados por la expresión exógena de POU5F1. Al igual que los experimentos de sobreexpresión de AHCYL1, requieren una caracterización más extensa.

## **Conclusión**

Teniendo en cuenta lo discutido en esta sección, proponemos a AHCYL1 como un supresor tumoral, debido a su rol de favorecer la diferenciación celular, el cual podría ser explorado con un biomarcador de buena prognosis en cáncer de pulmón.

Es importante destacar que aún está poco explorado cómo los diferentes ciclos metabólicos afectan a las CMTs (y su relación con las no CMTs), y pareciera poco probable que una única firma metabólica pueda ser suficiente para explicar la compleja regulación de estas células. La intersección entre el metabolismo y la regulación del destino celular es un área de investigación muy interesante, y está siendo explorada intensamente (Ahmed Fouad and Aanei 2013; Batlle and Clevers 2017; Intlekofer and Finley 2019; Pavlova and Thompson 2016) y seguramente en los próximos años comencemos a entender cómo afecta la progresión tumoral. Del mismo modo, estudios recientes han demostrado que la

alteración de las vías epigenéticas puede modificar la actividad autofágica e impactar en la supervivencia celular (L.-F. Hu 2019). Serán necesarias mayores determinaciones para abordar el papel de AHCYL1 como conector entre estos dos reguladores de la homeostasis y la identidad celular.



**Figura 35. Resumen de los principales hallazgos sobre el rol de AHCYL1 en cáncer de pulmón.** AHCYL1 sería un modulador de la plasticidad y lo asociamos a un fenotipo diferenciado, pudiendo actuar como un supresor tumoral en este tipo de tumores. La expresión de AHCYL1 no favorecería la expresión de POU5F1 ni de MKI67, por lo que no promovería el fenotipo CMT ni los procesos de tumorigénesis o angiogénesis. Las líneas completas muestran los resultados conocidos por bibliografía y las líneas punteadas los aportes realizados a partir de esta tesis. Las puntas de flecha indican activación/inducción y las puntas romas indican inhibición.

### Futuras direcciones

El desarrollo de esta tesis nos permitió realizar una primera caracterización del rol de AHCYL1 en un modelo de cáncer de pulmón.

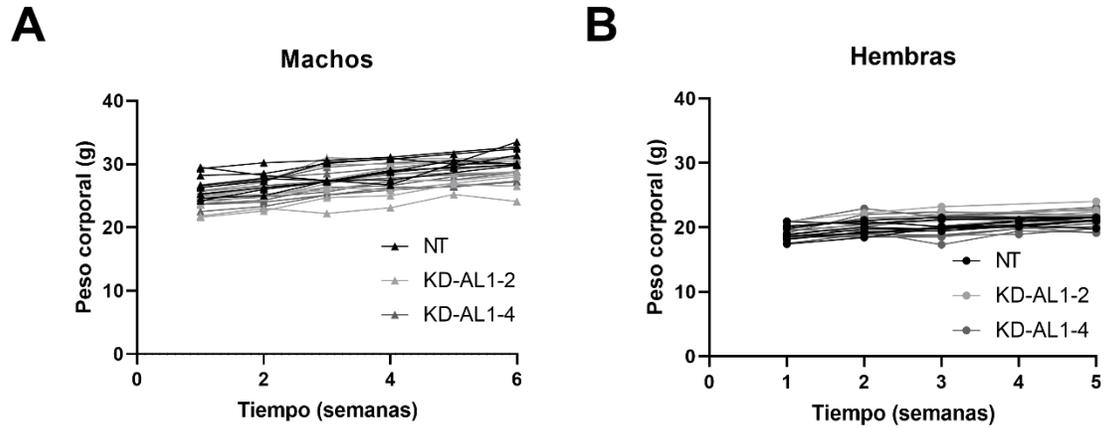
A futuro, se planea profundizar la caracterización de la expresión de AHCYL1 en mayor muestra de pacientes para poder validar el potencial uso de esta proteína como biomarcador en la clínica.

Además, se proyecta una caracterización más profunda de su rol en la identidad celular mediante la experimentación con los modelos de sobreexpresión presentados en esta tesis de manera preliminar. A nivel mecanístico, se planea evaluar si hay una regulación a nivel transcripcional entre AHCYL1 y POU5F1. Otro aspecto importante para definir es si efectivamente AHCYL1 influye en el cáncer de pulmón en la regulación de la vía de autofagia como modulador de la capacidad *stem* y adaptación al medio circundante tumoral que vincularía su participación como modulador del estado metabólico celular, como es el ciclo de la metionina. Por último, la evidencia preliminar presentada sobre citoquinas del microambiente tumoral como TGF- $\beta$  que modulen la expresión de AHCYL1 abre una nueva línea de investigación que conecta a AHCYL1 como una proteína clave en la regulación de la identidad y el ecosistema tumoral.

Los resultados de esta tesis son los primeros que relacionan a AHCYL1 con procesos de plasticidad e identidad celular y, en particular, su estudio en cáncer de pulmón. Profundizar en el entendimiento acerca de cómo AHCYL1 modula los procesos de plasticidad en un contexto tumoral resulta fundamental. En conclusión, AHCYL1 es un gen con gran potencial para ser explorado en la oncología clínica.

**MATERIAL  
SUPPLEMENTARIO**

## MATERIAL SUPLEMENTARIO



**Figura Suplementaria 1. Pesos corporales de ratones utilizados en ensayos de tumorigénesis para (A) Machos y (B) Hembras.** Esto se siguió como medida de bienestar animal junto con una evaluación de su estado general.

**Tabla Suplementaria 1.** Orden de corrida por día para el análisis de SAM y SAH por UPLC-QTOF-MS

Día de Corrida	Día 1	Día de Corrida	Día 2
Experimento	2,4,9,6	Experimento	1,3,8,10,7
Número de inyección	Tipo de Muestra	Número de inyección	Tipo de Muestra
1	Volumen cero de inyección	1	Volumen cero de inyección
3	Blanco de Solvente	3	Blanco de Solvente
5	Blanco de Proceso	5	Blanco de Proceso
7	Muestra de adecuación del sistema (SAM & SAH)	7	Muestra de adecuación del sistema (SAM & SAH)
9	Muestra pooled QC	9	Muestra pooled QC
11	Muestra pooled QC	11	Muestra pooled QC
13	Muestra pooled QC	13	Muestra pooled QC
15	Muestra pooled QC	15	Muestra pooled QC
17	sh4 2.1	17	NT5 1.1
19	sh4 2.2	19	NT5 1.2
21	NT5 2.1	21	sh4 1.1
23	NT5 2.2	23	sh4 1.2
25	Muestra pooled QC	25	Muestra pooled QC
27	sh4 9.1	27	sh4 3.1
29	sh4 9.2	29	sh4 3.2
31	NT5 9.1	31	NT5 3.1
33	NT5 9.2	33	NT5 3.2
35	Muestra pooled QC	35	Muestra pooled QC
37	NT5 6.1	37	NT5 8.1
39	NT5 6.2	39	NT5 8.2
41	sh4 6.1	41	sh4 8.1
43	sh4 6.2	43	sh4 8.2
45	Muestra pooled QC	45	Muestra pooled QC
47	Muestra pooled QC	47	sh4 10.1
49	Muestra de adecuación del sistema (SAM & SAH)	49	sh4 10.2
51	Blanco de Proceso	51	NT5 10.1
53	Blanco de Solvente	53	NT5 10.2
		55	Muestra pooled QC
		57	NT5 7.1
		59	NT5 7.2
		61	sh4 7.1

## Material Suplementario

			63	sh4 7.2
			65	Muestra pooled QC
			67	Muestra pooled QC
			69	Muestra de adecuación del sistema (SAM & SAH)
			71	Blanco de Proceso
			73	Blanco de Solvente

Nota: los números de inyección pares corresponden a los lavados de la columna

**Tabla Suplementaria 2. Datos completos de los 26 pacientes analizados por inmunohistoquímica.**

Tipo de Tumor	Caso n°	AHCYL1	MKI67	Sexo	Edad (años)	Tiempo de Seguimiento (Días)	Fallecidos	pTNM	Estadio	Tamaño (mm)	Infiltración Pleural	Grado Histológico
ADC	1	2	30	1	53	3294	1	pT2a pN0	IB	35	1	2
ADC	2	4	5	0	57	1694	1	pT1B pN0	IA	16	0	2
ADC	3	3	1	1	75	3687	1	pT1B pN0	IA	12	0	2
ADC	4	4	10	0	70	2822	1	pT1A pNx	IA	16	0	1
ADC	5	3	5	0	76	1680	0	pT1B pN0	IA	22	0	3
ADC	6	3	5	1	55	2759	1	pT2a pN0	IB	25	1	3
ADC	7	4	5	1	63	1274	0	pT4 pN1	IIIA	22	0	3
ADC	8	4	15	0	57	2285	1	pT2b pN0	IB	36	0	1
ADC	9	4	5	1	67	2312	1	pT2b pN0	IIA	62	1	2
ADC	10	4	5	0	70	2258	1	pT4 pN0	IIIA	35	0	2
ADC	11	3	5	0	54	9	1	pT1A pN0	IA	8	0	3
ADC	12	3	20	1	75	1298	0	pT2a pN1	IIA	47	1	2
ADC	13	2	70	1	72	379	0	pT1b pNx	IA	13	0	2
ADC	14	3	45	1	42	2962	1	pT2A pN0	IB	34	0	3
ADC	15	1	85	1	70	5	0	pT3 pN1	IIIA	26	1	3
ADC	16	2	60	1	72	365	1	pT1b pN1	IB	15	0	3
ADC	17	3	15	0	80	382	0	pT2a pN0	IB	29	1	2
ADC	18	3	40	0	55	1219	1	pT2a pN1	IIB	33	1	3
ADC	19	3	21	0	66	1016	1	pT3 pN0	IIB	73	1	1
ADC	20	2	20	1	70	833	1	pT2a pN0	IB	32	0	3
OT	21	2	90	1	66	554	1	pT1c pN0	IA3	25	0	2
OT	22	3	95	0	73	351	0	pT2a pN1	IIB	23	2	3
OT	23	4	40	1	58	30	0	pT1B pN0	IB	36	0	2
OT	24	2	68	1	60	9	0	pT4 pN1	IIIA	73	0	4
OT	25	2	65	0	76	904	1	pT1b pN0	IA2	18	0	3
OT	26	1	77	1	66	3	1	pT4 pN0	IIIA	128	3	3

Tipo de tumor (ADC: adenocarcinoma; OT: otro tipo de tumor de pulmón); Sexo (0: femenino; 1: masculino); Fallecidos (0: fallecido; 1: vivo); Recurrencias (0: no; 1: sí); Infiltración Pleural (0: no; 1: sí)

# **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed Fouad, Yousef, and Carmen Aanei. 2013. "Revisiting the Hallmarks of Cancer." *American Journal of Cancer Research* 26(1): 62.
- Altorki, Nasser K. et al. 2019. "The Lung Microenvironment: An Important Regulator of Tumour Growth and Metastasis." *Nature Reviews Cancer* 19(1): 9–31.  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41568-018-0081-9>.
- Ando, Hideaki et al. 2006. "IRBIT Suppresses IP3 Receptor Activity by Competing with IP3 for the Common Binding Site on the IP3 Receptor." *Molecular Cell* 22(6): 795–806.  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276506003327>.
- Ando, Hideaki, Akihiro Mizutani, Toru Matsu-ura, and Katsuhiko Mikoshiba. 2003. "IRBIT, a Novel Inositol 1,4,5-Trisphosphate (IP3) Receptor-Binding Protein, Is Released from the IP3 Receptor upon IP3 Binding to the Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 278(12): 10602–12. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M210119200>.
- Arai, Yasuhito et al. 2013. "Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Tyrosine Kinase Fusions Define a Unique Molecular Subtype of Cholangiocarcinoma." *Hepatology*: 1427–34.
- Aranda, Sergi et al. 2019. "Chromatin Capture Links the Metabolic Enzyme AHCY to Stem Cell Proliferation." *Science Advances* (March).
- Arnautov, Alexei et al. 2020. "IRBIT Directs Differentiation of Intestinal Stem Cell Progeny to Maintain Tissue Homeostasis." *iScience* 23(3): 100954.  
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100954>.
- Arnautov, Alexei, and Mary Dasso. 2014. "IRBIT Is a Novel Regulator of Ribonucleotide Reductase in Higher Eukaryotes." *Science* 171.
- Ault-Riché, Dana B., Chong Sheng Yuan, and Ronald T. Borchardt. 1994. "A Single Mutation at Lysine 426 of Human Placental S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Inactivates the Enzyme." *Journal of Biological Chemistry* 269(50): 31472–78.
- Azar, Joseph et al. 2021. "The Use of Stem Cell-Derived Organoids in Disease Modeling: An Update." *International Journal of Molecular Sciences* 22(14).
- Bahmad, Hisham F. et al. 2018. "Sphere-Formation Assay: Three-Dimensional in Vitro Culturing of

- Prostate Cancer Stem/Progenitor Sphere-Forming Cells." *Frontiers in Oncology* 8(AUG): 1–14.
- Bakir, Basil, Anna M Chiarella, Jason R Pitarresi, and Anil K Rustgi. 2020. "EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis." *Trends in Cell Biology* 30(10): 764–76.  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892420301446>.
- Barta, Julie A., Charles A. Powell, and Juan P. Wisnivesky. 2019. "Global Epidemiology of Lung Cancer." *Annals of Global Health* 85(1): 1–16.
- Batlle, Eduard, and Hans Clevers. 2017. "Cancer Stem Cells Revisited." *Nature Medicine* 23(10): 1124–34. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4409>.
- Bellomo, Claudia, Laia Caja, and Aristidis Moustakas. 2016. "Transforming Growth Factor  $\beta$  as Regulator of Cancer Stemness and Metastasis." *British Journal of Cancer* 115(7): 761–69.  
<http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2016.255>.
- Beluzic, Lucija et al. 2018. "Knock-down of AHCY and Depletion of Adenosine Induces DNA Damage and Cell Cycle Arrest." *Scientific Reports*: 1–16.
- Berger, Shelley L. 2007. "The Complex Language of Chromatin Regulation during Transcription." *Nature* 447(7143): 407–12.
- Bhatia, Sugandha, Peiyu Wang, Alan Toh, and Erik W. Thompson. 2020. "New Insights Into the Role of Phenotypic Plasticity and EMT in Driving Cancer Progression." *Frontiers in Molecular Biosciences* 7(April): 1–18.
- Bi, Huichang et al. 2013. "Optimization of Harvesting, Extraction, and Analytical Protocols for UPLC-ESI-MS-Based Metabolomic Analysis of Adherent Mammalian Cancer Cells." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(15): 5279–89.
- Bonneau, Benjamin et al. 2016. "IRBIT Controls Apoptosis by Interacting with the Bcl-2 Homolog, Bcl2l10, and by Promoting ER-Mitochondria Contact." *eLife* 5(DECEMBER2016): 1–27.
- Boyer, Laurie A. et al. 2005. "Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells." *Cell* 122(6): 947–56. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867405008251>.
- Van den Bulk, Jitske, Els M.E. Verdegaal, and Noel F.C.C. De Miranda. 2018. "Cancer Immunotherapy: Broadening the Scope of Targetable Tumours." *Open Biology* 8(6): 1–10.
- Butnor, Kelly J. et al. 2021. "Protocol for the Examination of Specimens from Patients with Primary Non-Small Cell Carcinoma, Small Cell Carcinoma, or Carcinoid Tumor of the Lung." *Archives*

- of Pathology and Laboratory Medicine* 133(10): 1552–59.
- Cantelli, Gaia, Eva Crosas-Molist, Mirella Georgouli, and Victoria Sanz-Moreno. 2017. “TGFβ-Induced Transcription in Cancer.” *Seminars in Cancer Biology* 42: 60–69.
- Chen, Peiwen et al. 2021. “Cancer Stemness Meets Immunity: From Mechanism to Therapy.” *Cell Reports* 34(1): 108597. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124720315862>.
- Chiou, Shih Hwa et al. 2010. “Coexpression of Oct4 and Nanog Enhances Malignancy in Lung Adenocarcinoma by Inducing Cancer Stem Cell-like Properties and Epithelial-Mesenchymal Transdifferentiation.” *Cancer Research* 70(24): 10433–44.
- Clare, Constance E., Amey H. Brassington, Wing Yee Kwong, and Kevin D. Sinclair. 2019. “One-Carbon Metabolism: Linking Nutritional Biochemistry to Epigenetic Programming of Long-Term Development.” *Annual Review of Animal Biosciences* 7: 263–87.
- Clevers, Hans. 2015. “What Is an Adult Stem Cell?” *Science* 350(6266): 1319–20.
- Cooper, Benjamine J et al. 2006. “Suppression and Overexpression of Adenosylhomocysteine Hydrolase-like Protein 1 ( AHCYL1 ) Influences Zebrafish Embryo Development.” *The Journal of Biological Chemistry* 1.
- Cufí, Sílvia et al. 2011. “Autophagy Positively Regulates the CD44+CD24-/Low Breast Cancer Stem-like Phenotype.” *Cell Cycle* 10(22): 3871–85.
- Cuyàs, Elisabet, Sara Verdura, and Salvador Fernández-arroyo. 2017. “Metabolomic Mapping of Cancer Stem Cells for Reducing and Exploiting Tumor Heterogeneity.” *Oncotarget* 8(59): 99223–36.
- Czekanska, Ewa M. 2011. “Assessment of Cell Proliferation with Resazurin-Based Fluorescent Dye.” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 740: 27–32.
- Dann, Stephen G et al. 2015. “Reciprocal Regulation of Amino Acid Import and Epigenetic State through Lat 1 and EZH2.” *The EMBO Journal* 34(13): 1773–85.
- Darzynkiewicz, Zbigniew, Gloria Juan, and Elzbieta Bedner. 1999. “Determining Cell Cycle Stages by Flow Cytometry.” *Current Protocols in Cell Biology* 1(1).
- Das, Plabon Kumar et al. 2020. “Plasticity of Cancer Stem Cell: Origin and Role in Disease Progression and Therapy Resistance.” *Stem Cell Reviews and Reports* 16(2): 397–412.
- Dekker, James W. et al. 2002. “Identification of an S-Adenosylhomocysteine Hydrolase-like Transcript Induced during Dendritic Cell Differentiation.” *Immunogenetics* 53(12): 993–1001.

- Derynck, Rik, and Ying Zhang. 2016. "SMAD-Dependent and SMAD-Independent Pathways in TGF-Beta Family Signalling. *Nature* 425, 577-584." *Nature* (November 2003): 577–84.
- Devogelaere, Benoit et al. 2006. "Binding of IRBIT to the IP3 Receptor: Determinants and Functional Effects." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343(1): 49–56.
- . 2007. "Protein Phosphatase-1 Is a Novel Regulator of the Interaction between IRBIT and the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor." *Biochemical Journal* 407(2): 303–11.  
<https://portlandpress.com/biochemj/article/407/2/303/42108/Protein-phosphatase-1-is-a-novel-regulator-of-the>.
- Devogelaere, Benoit, Eva Sammels, and Humbert De Smedt. 2008. "The IRBIT Domain Adds New Functions to the AHCY Family." *BioEssays* (4): 642–52.
- Dietmair, Stefanie et al. 2010. "Towards Quantitative Metabolomics of Mammalian Cells: Development of a Metabolite Extraction Protocol." *Analytical Biochemistry* 404(2): 155–64.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2010.04.031>.
- Dongre, Anushka, and Robert A. Weinberg. 2019. "New Insights into the Mechanisms of Epithelial–Mesenchymal Transition and Implications for Cancer." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20(2): 69–84. <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>.
- Duma, Narjust, Rafael Santana-Davila, and Julian R. Molina. 2019. "Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment." *Mayo Clinic Proceedings* 94(8): 1623–40. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.013>.
- Eskelinen, Eeva Liisa, and Paul Saftig. 2009. "Autophagy: A Lysosomal Degradation Pathway with a Central Role in Health and Disease." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1793(4): 664–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.07.014>.
- Euhus, David M., Charles Hudd, Marie C. Laregina, and Frank E. Johnson. 1986. "Tumor Measurement in the Nude Mouse." *Journal of Surgical Oncology* 31(4): 229–34.
- Fabregat, Isabel, Andrea Malfettone, and Jitka Soukupova. 2016. "New Insights into the Crossroads between EMT and Stemness in the Context of Cancer." *Journal of Clinical Medicine*.
- Feoktistova, Maria, Peter Geserick, and Martin Leverkus. 2016. "Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells." *Cold Spring Harbor Protocols* 2016(4): 343–46.
- Fernández-Arroyo, Salvador, Elisabet Cuyàs, and Joaquim Bosch-barrera. 2015. "Activation of the Methylation Cycle in Cells Reprogrammed into a Stem Cell-like State." *Oncoscience* 2(12).

- Ferreira Solari, Nazarena E. et al. 2016. "The NSL Chromatin-Modifying Complex Subunit KANSL2 Regulates Cancer Stem-like Properties in Glioblastoma That Contribute to Tumorigenesis." *Cancer Research* 76(18): 5383–94.  
<http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-15-3159>.
- Frezzetti, Daniela et al. 2017. "VEGF as a Potential Target in Lung Cancer." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 21(10): 959–66. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1371137>.
- Friedmann-Morvinski, Dinorah, and Inder M Verma. 2014. "Dedifferentiation and Reprogramming: Origins of Cancer Stem Cells." *EMBO reports* 15(3): 244–53.
- Goldman, Mary et al. 2018. "The UCSC Xena Platform for Public and Private Cancer Genomics Data Visualization and Interpretation." *bioRxiv*. 326470.
- Gonzalez, David M., and Damian Medici. 2014. "Signaling Mechanisms of the Epithelial-Mesenchymal Transition." *Science Signaling* 7(344): re8.
- Goss, Glenwood et al. 2016. "Osimertinib for Pretreated EGFR Thr790Met-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (AURA2): A Multicentre, Open-Label, Single-Arm, Phase 2 Study." *The Lancet Oncology* 17(12): 1643–52. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30508-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30508-3).
- Grbeša, Ivana et al. 2017. "Mutations in S-Adenosylhomocysteine Hydrolase ( AHCY ) Affect Its Nucleocytoplasmic Distribution and Capability to Interact with S-Adenosylhomocysteine Hydrolase-like 1 Protein." *European Journal of Cell Biology* 96: 579–90.
- Grskovic, Marica et al. 2007. "Systematic Identification of Cis-Regulatory Sequences Active in Mouse and Human Embryonic Stem Cells" ed. Anne C Ferguson-Smith. *PLoS Genetics* 3(8): e145. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.0030145>.
- Gyorffy, Balázs, Pawel Surowiak, Jan Budczies, and András Lánckzy. 2013. "Online Survival Analysis Software to Assess the Prognostic Value of Biomarkers Using Transcriptomic Data in Non-Small-Cell Lung Cancer." *PLoS ONE* 8(12).
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144(5): 646–74.
- Hao, Chengcheng, Guiping Liu, and Guangliang Tian. 2019. "Autophagy Inhibition of Cancer Stem Cells Promotes the Efficacy of Cisplatin against Non-Small Cell Lung Carcinoma." *Therapeutic Advances in Respiratory Disease* 13: 1–11.
- He, Peijian, Huanchun Zhang, and C. Chris Yun. 2008. "IRBIT, Inositol 1,4,5-Triphosphate (IP3) Receptor-Binding Protein Released with IP3, Binds Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger NHE3 and Activates

- NHE3 Activity in Response to Calcium.” *Journal of Biological Chemistry* 283(48): 33544–53.
- Herbst, Roy S., John V. Heymach, and Scott M. Lippman. 2008. “Lung Cancer.” *The New England Journal of Medicine* 359(September): 141.
- Herbst, Roy S., Daniel Morgensztern, and Chris Boshoff. 2018. “The Biology and Management of Non-Small Cell Lung Cancer.” *Nature* 553(7689): 446–54.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature25183>.
- Herbst, Roy S et al. 2016. “Predictive Correlates of Response to the Anti-PD-L1 Antibody MPDL3280A.” *Nature* 515(7528): 563–67.
- Herreros-Pomares, Alejandro et al. 2019. “Lung Tumorspheres Reveal Cancer Stem Cell-like Properties and a Score with Prognostic Impact in Resected Non-Small-Cell Lung Cancer.” *Cell Death and Disease* 10(9): 1–14. <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-019-1898-1>.
- Howington, John A. et al. 2013. “Treatment of Stage I and II Non-Small Cell Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd Ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines.” *Chest* 143(5 SUPPL): e278S-e313S.  
<http://dx.doi.org/10.1378/chest.12-2359>.
- Hu, Li-Fang. 2019. “Epigenetic Regulation of Autophagy.” In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, , 221–36. [http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-0602-4\\_11](http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-0602-4_11).
- Hu, Yifang, and Gordon K. Smyth. 2009. “ELDA: Extreme Limiting Dilution Analysis for Comparing Depleted and Enriched Populations in Stem Cell and Other Assays.” *Journal of Immunological Methods* 347(1–2): 70–78.
- Huang, Wei et al. 2021. “AHCYL1 Senses SAH to Inhibit Autophagy through Interaction with PIK3C3 in an MTORC1-Independent Manner.” *Autophagy* (May).
- Huang, Xuan et al. 2022. “MUC5B Regulates Goblet Cell Differentiation and Reduces Inflammation in a Murine COPD Model.” *Respiratory Research* 23(1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01920-8>.
- Hwang, Soyoung, Dong Min Shin, and Jeong Hee Hong. 2020. “Protective Role of IRBIT on Sodium Bicarbonate Cotransporter-N1 for Migratory Cancer Cells.” *Pharmaceutics* 12(9): 816.
- Intlekofer, Andrew M., and Lydia W.S. Finley. 2019. “Metabolic Signatures of Cancer Cells and Stem Cells.” *Nature Metabolism* 1(2): 177–88. <http://dx.doi.org/10.1038/s42255-019-0032-0>.
- Iranmanesh, Yasaman et al. 2021. “Mitochondria’s Role in the Maintenance of Cancer Stem Cells in

- Glioblastoma." *Frontiers in Oncology* 11(February): 1–11.
- Jacob, Anjali et al. 2017. "Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Functional Lung Alveolar Epithelial Cells." *Cell Stem Cell* 21(4): 472-488.e10.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.08.014>.
- Jarosz-Biej, Magdalena, Ryszard Smolarczyk, Tomasz Cichoń, and Natalia Kułach. 2019. "Tumor Microenvironment as a 'Game Changer' in Cancer Radiotherapy." *International Journal of Molecular Sciences* 20(13): 18–20.
- Jeong, Wooyoung, Jinyoung Kim, Suzie E Ahn, et al. 2012. "AHCYL1 Is Mediated by Estrogen-Induced ERK1 / 2 MAPK Cell Signaling and MicroRNA Regulation to Effect Functional Aspects of the Avian Oviduct." *PlosOne* 7(11).
- Jeong, Wooyoung, Hee Seung Kim, Yong Beom Kim, et al. 2012. "Paradoxical Expression of AHCYL1 Affecting Ovarian Carcinogenesis between Chickens and Women." *Experimental Biology and Medicine*.
- Jolly, Mohit Kumar, and Toni Celià-Terrassa. 2019. "Dynamics of Phenotypic Heterogeneity during Emt and Stemness in Cancer Progression." *Journal of Clinical Medicine* 8(10).
- Jordan, Craig T, Monica L Guzman, and Mark Noble. 2006. "Cancer Stem Cells." *The New England journal of medicine* 355(12): 1253–61. [http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-49651-0\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-49651-0_2).
- Kadayifci, Fatma Zehra, Shasha Zheng, and Yuan Xiang Pan. 2018. "Molecular Mechanisms Underlying the Link between Diet and DNA Methylation." *International Journal of Molecular Sciences* 19(12).
- Kapooore, Rahul Vijay et al. 2017. "Influence of Washing and Quenching in Profiling the Metabolome of Adherent Mammalian Cells: A Case Study with the Metastatic Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231." *Analyst* 142(11): 2038–49.
- Kawaai, Katsuhiko et al. 2015. "IRBIT Regulates CaMKII $\alpha$  Activity and Contributes to Catecholamine Homeostasis through Tyrosine Hydroxylase Phosphorylation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(17): 5515–20.
- Kawata, Mikiko et al. 2012. "TGF- $\beta$ -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition of A549 Lung Adenocarcinoma Cells Is Enhanced by pro-Inflammatory Cytokines Derived from RAW 264 . 7 Macrophage Cells." *The Journal of Biochemistry* 151(2): 205–16.
- Kenific, Candia M., Andrew Thorburn, and Jayanta Debnath. 2010. "Autophagy and Metastasis: Another Double-Edged Sword." *Current Opinion in Cell Biology* 22(2): 241–45.

- Kiefer, Hélène et al. 2009. "Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor-Binding Protein Released with Inositol 1,4,5-Triphosphate (IRBIT) Associates with Components of the MRNA3' Processing Machinery in a Phosphorylation-Dependent Manner and Inhibits Polyadenylation." *Journal of Biological Chemistry* 284(16): 10694–705.
- Kim, Bit Na et al. 2020. "TGF- $\beta$  Induced EMT and Stemness Characteristics Are Associated with Epigenetic Regulation in Lung Cancer." *Scientific Reports* 10(1): 1–11.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-67325-7>.
- Kim, Jeong Beom et al. 2009. "Oct4-Induced Pluripotency in Adult Neural Stem Cells." *Cell* 136(3): 411–19.
- Kim, Jeongyub et al. 2012. "Cancer Stem-like Cells Persist in Established Cell Lines through Autocrine Activation of EGFR Signaling." *Oncology Letters* 3(3): 607–12.
- Kim, Jonghwan et al. 2008. "An Extended Transcriptional Network for Pluripotency of Embryonic Stem Cells." *Cell* 132(6): 1049–61.
- Kise, Kazuyoshi, Yumi Kinugasa-Katayama, and Nobuyuki Takakura. 2016. "Tumor Microenvironment for Cancer Stem Cells." *Advanced Drug Delivery Reviews* 99: 197–205.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.08.005>.
- Lababede, Omar, and Moulay A. Meziane. 2018. "The Eighth Edition of TNM Staging of Lung Cancer: Reference Chart and Diagrams." *The Oncologist* 23(7): 844–48.
- Lamouille, Samy, Jian Xu, and Rik Derynck. 2014. "Molecular Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(3): 178–96.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3758>.
- Leung, Elaine Lai Han et al. 2010. "Non-Small Cell Lung Cancer Cells Expressing CD44 Are Enriched for Stem Cell-like Properties." *PLoS ONE* 5(11): 1–13.
- Li, Bin et al. 2019. "MiR-629-3p-Induced Downregulation of SFTPC Promotes Cell Proliferation and Predicts Poor Survival in Lung Adenocarcinoma." *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 47(1): 3286–96. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1648283>.
- Li, Lian Tao, Guan Jiang, Qian Chen, and Jun Nian Zheng. 2015. "Predict Ki67 Is a Promising Molecular Target in the Diagnosis of Cancer (Review)." *Molecular Medicine Reports* 11(3): 1566–72.
- Li, Shuang Jiang et al. 2016. "Clinicopathological and Prognostic Significance of Oct-4 Expression in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis."

- Journal of Thoracic Disease* 8(7): 1587–1600.
- Li, Simin, Luyan Shen, and Ke Neng Chen. 2018. “Association between H3K4 Methylation and Cancer Prognosis: A Meta-Analysis.” *Thoracic Cancer* 9(7): 794–99.
- Li, Yue, Long Zhao, and Xiao Feng Li. 2021. “Hypoxia and the Tumor Microenvironment.” *Technology in cancer research & treatment* 20: 1–9.
- Liu, Chia Chyuan et al. 2009. “Effects of S-Adenosylhomocysteine and Homocysteine on DNA Damage and Cell Cytotoxicity in Murine Hepatic and Microglia Cell Lines.” *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 23(5): 349–56.
- Liu, Reng Yun et al. 2014. “JAK/STAT3 Signaling Is Required for TGF- $\beta$ -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells.” *International Journal of Oncology* 44(5): 1643–51.
- Liu, Yifei et al. 2017. “Expression of Kruppel-like Factor 8 and Ki67 in Lung Adenocarcinoma and Prognosis.” *Experimental and Therapeutic Medicine* 14(2): 1351–56.
- Livak, Kenneth J, and Thomas D Schmittgen. 2001. “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method.” *Methods* 408: 402–8.
- Locasale, Jason W. 2013. “Serine, Glycine and One-Carbon Units: Cancer Metabolism in Full Circle.” *Nature Reviews Cancer* 13(8): 572–83. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3557>.
- Lorenz, Matthew A., Charles F. Burant, and Robert T. Kennedy. 2011. “Reducing Time and Increasing Sensitivity in Sample Preparation for Adherent Mammalian Cell Metabolomics.” *Analytical Chemistry* 83(9): 3406–14.
- Lynch, Thomas et al. 2004. “Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib.” *The New England Journal of Medicine*: 2129–39.
- MacDonagh, Lauren et al. 2016. “Lung Cancer Stem Cells: The Root of Resistance.” *Cancer Letters* 372(2): 147–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.012>.
- Malta, Tathiane M. et al. 2018. “Machine Learning Identifies Stemness Features Associated with Oncogenic Dedifferentiation.” *Cell* 173(2): 338-354.e15.
- Mandal, Gunjan et al. 2018. “Heterodimer Formation by Oct4 and Smad3 Differentially Regulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Associated Factors in Breast Cancer Progression.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1864(6): 2053–66.

- <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.03.010>.
- Mani, Sendurai A et al. 2008. "The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells." *Cell*: 704–15.
- Mansoori, Behzad et al. 2021. "Hmga2 as a Critical Regulator in Cancer Development." *Genes* 12(2): 1–23.
- Manzo, Giovanni. 2019. "Similarities between Embryo Development and Cancer Process Suggest New Strategies for Research and Therapy of Tumors: A New Point of View." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7(MAR): 1–18.
- Mao, Yousheng, Ding Yang, Jie He, and Mark J. Krasna. 2016. "Epidemiology of Lung Cancer." *Surgical Oncology Clinics of North America* 25(3): 439–45.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.soc.2016.02.001>.
- Marcucci, Fabrizio, Pietro Ghezzi, and Cristiano Rumio. 2017. "The Role of Autophagy in the Cross-Talk between Epithelial-Mesenchymal Transitioned Tumor Cells and Cancer Stem-like Cells." *Molecular Cancer* 16(1): 1–8. <http://dx.doi.org/10.1186/s12943-016-0573-8>.
- Marima, Rahaba, Rodney Hull, Zodwa Dlamini, and Clement Penny. 2020. "Efavirenz and Lopinavir/Ritonavir Alter Cell Cycle Regulation in Lung Cancer." *Frontiers in Oncology* 10(August): 1–11.
- Markowska, Anna, Stefan Sajdak, Janina Markowska, and Adam Huczyński. 2017. "Angiogenesis and Cancer Stem Cells: New Perspectives on Therapy of Ovarian Cancer." *European Journal of Medicinal Chemistry* 142: 87–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.030>.
- Martin, B. et al. 2004. "Ki-67 Expression and Patients Survival in Lung Cancer: Systematic Review of the Literature with Meta-Analysis." *British Journal of Cancer* 91(12): 2018–25.
- Marusyk, Andriy et al. 2014. "Non-Cell-Autonomous Driving of Tumour Growth Supports Sub-Clonal Heterogeneity." *Nature* 514(7520): 54–58.
- Maycotte, Paola et al. 2015. "Autophagy Supports Breast Cancer Stem Cell Maintenance by Regulating IL6 Secretion." *Molecular Cancer Research* 13(4): 651–58.  
<http://mcr.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1541-7786.MCR-14-0487>.
- Medema, Jan Paul. 2013. "Cancer Stem Cells: The Challenges Ahead." *Nature Cell Biology* 15(4): 338–44. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2717>.
- Menon, Dinoop Ravindran et al. 2020. "Epigenetics and Metabolism at the Crossroads of Stress-

- Induced Plasticity, Stemness and Therapeutic Resistance in Cancer.” *Theranostics* 10(14): 6261–77.
- Menon, Sunil Sankunny, Chandrasekharan Guruvayoorappan, Kunnathur Murugesan Sakthivel, and Rajan Radha Rasmi. 2019. “Ki-67 Protein as a Tumour Proliferation Marker.” *Clinica Chimica Acta* 491(November 2018): 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.01.011>.
- Miller, Miles W et al. 1994. “The Mouse Lethal Nonagouti (Ax) Mutation Deletes the S-Adenosylhomocysteine Hydrolase (Ancy) Gene Miles.” *The EMBO Journal* 1(8).
- Mogi, Akira, and Hiroyuki Kuwano. 2011. “TP53 Mutations in Nonsmall Cell Lung Cancer.” *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011.
- Mohiuddin, Ismail S., Sung Jen Wei, and Min H. Kang. 2020. “Role of OCT4 in Cancer Stem-like Cells and Chemotherapy Resistance.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1866(4): 165432. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.03.005>.
- Muschet, Caroline et al. 2016. “Removing the Bottlenecks of Cell Culture Metabolomics: Fast Normalization Procedure, Correlation of Metabolites to Cell Number, and Impact of the Cell Harvesting Method.” *Metabolomics* 12(10).
- Nakazawa, Nobuhiro et al. 2019. “Low IRBIT Levels Are Associated with Chemo-Resistance in Gastric Cancer Patients.” *Anticancer Research* 39(8): 4111–16.
- Nasim, Faria, Bruce F. Sabath, and George A. Eapen. 2019. “Lung Cancer.” *Medical Clinics of North America* 103(3): 463–73. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.12.006>.
- Nieto, M. Angela. 2013. “Epithelial Plasticity: A Common Theme in Embryonic and Cancer Cells.” *Science* 342(6159).
- Okita, Keisuke, and Shinya Yamanaka. 2010. “Induction of Pluripotency by Defined Factors.” *Experimental Cell Research* 316(16): 2565–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.04.023>.
- Pacini, Laura, Andrew D. Jenks, Nadia Carvalho Lima, and Paul H. Huang. 2021. “Targeting the Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) Family in Lung Cancer.” *Cells* 10(5): 1154. [http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-0602-4\\_11](http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-0602-4_11).
- Pallis, Athanasios G., and Konstantinos N. Syrigos. 2013. “Targeting Tumor Neovasculature in Non-Small-Cell Lung Cancer.” *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 86(2): 130–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.10.003>.
- Park, S et al. 2013. “Irbit Mediates Synergy Between Ca<sup>2+</sup> and cAMP Signaling Pathways During

- Epithelial Transport in Mice.” *Gastroenterology* 23(1): 1–7.
- Parkhitko, Andrey A et al. 2016. “Tissue-Specific down-Regulation of S-Adenosyl-Homocysteine via Suppression of DAhcyL1 / DAhcyL2 Extends Health Span and Life Span in *Drosophila*.” *Genes and Development*. 1409–22.
- Parra, R. Gonzalo et al. 2016. “INSECT 2.0: A Web-Server for Genome-Wide Cis-Regulatory Modules Prediction.” *Bioinformatics* 32(8): 1229–31.
- Pavlova, Natalya N., and Craig B. Thompson. 2016. “The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism.” *Cell Metabolism* 23(1): 27–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>.
- Percie du Sert, Nathalie et al. 2019. “The ARRIVE Guidelines 2019: Updated Guidelines for Reporting Animal Research.” *bioRxiv* (July): 703181. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/703181v1>.
- Pirozzi, Giuseppe et al. 2011. “Epithelial to Mesenchymal Transition by TGF b -1 Induction Increases Stemness Characteristics in Primary Non Small Cell Lung Cancer Cell Line.” *PlosOne* 6(6).
- Ramnath, Nithya et al. 2013. “Treatment of Stage III Non-Small Cell Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd Ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines.” *Chest* 143(5 SUPPL): e314S-e340S. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.12-2360>.
- Rao Tata, Purushothama, and Jayaraj Rajagopal. 2016. “Cellular Plasticity: 1712 to the Present Day HHS Public Access Introduction to Plasticity.” *Curr Opin Cell Biol* 43: 46–54. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5154913/pdf/nihms-807269.pdf>.
- Rohr, Cristian O., R. Gonzalo Parra, Patricio Yankilevich, and Carolina Perez-Castro. 2013. “INSECT: IN-Silico SEArch for Co-Occurring Transcription Factors.” *Bioinformatics* 29(22): 2852–58.
- Roy, Sayoni et al. 2021. “EMT Imparts Cancer Stemness and Plasticity: New Perspectives and Therapeutic Potential.” *Frontiers in Bioscience*: 6.
- Russell, Ryan C. et al. 2013. “ULK1 Induces Autophagy by Phosphorylating Beclin-1 and Activating VPS34 Lipid Kinase.” *Nature Cell Biology* 15(7): 741–50. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2757>.
- Sancho, Patricia, David Barneda, and Christopher Heeschen. 2016. “Hallmarks of Cancer Stem Cell Metabolism.” *British Journal of Cancer* 114(12): 1305–12.

- Sanderson, Sydney M., Xia Gao, Ziwei Dai, and Jason W. Locasale. 2019. "Methionine Metabolism in Health and Cancer: A Nexus of Diet and Precision Medicine." *Nature Reviews Cancer* 19(11): 625–37. <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-019-0187-8>.
- Sarafian, Magali H. et al. 2014. "Objective Set of Criteria for Optimization of Sample Preparation Procedures for Ultra-High Throughput Untargeted Blood Plasma Lipid Profiling by Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry." *Analytical Chemistry* 86(12): 5766–74.
- Schelch, Karin et al. 2021. "EGF Induces Migration Independent of EMT or Invasion in A549 Lung Adenocarcinoma Cells." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9(March): 1–16.
- Shah, Dhaval R, and Gregory A Masters. 2020. "Precision Medicine in Lung Cancer Treatment." *Surgical Oncology Clinics of North America* 29(1): 15–21. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1055320719300729>.
- Shenoy, Santosh. 2020. "Cell Plasticity in Cancer: A Complex Interplay of Genetic, Epigenetic Mechanisms and Tumor Micro-Environment." *Surgical Oncology* 34(February): 154–62.
- Shirakabe, Kyoko et al. 2006. "IRBIT, an Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor-Binding Protein, Specifically Binds to and Activates Pancreas-Type Na<sup>+</sup>/HCO<sup>3-</sup> Cotransporter 1 (PNBC1)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(25): 9542–47.
- Shiraki, Nobuaki et al. 2013. "Article Methionine Metabolism Regulates Maintenance and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells." *Cell Metabolism* 19(5): 780–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.017>.
- Shtivelman, Emma et al. 2014. "Molecular Pathways and Therapeutic Targets in Lung Cancer." *Oncotarget* 5(6).
- da Silva-Diz, Victoria et al. 2018. "Cancer Cell Plasticity: Impact on Tumor Progression and Therapy Response." *Seminars in Cancer Biology* 53: 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.08.009>.
- Socinski, Mark A. et al. 2013. "Treatment of Stage IV Non-Small Cell Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd Ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines." *Chest* 143(5 SUPPL): 341–68.
- Soria, Jean-Charles et al. 2018. "Osimertinib in Untreated EGFR -Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer ." *New England Journal of Medicine* 378(2): 113–25.

- De Sousa, Vitor Manuel Leitão, and Lina Carvalho. 2018. "Heterogeneity in Lung Cancer." *Pathobiology* 85(1–2): 96–107.
- Sterneck, Esta, Dipak K. Poria, and Kuppusamy Balamurugan. 2020. "Slug and E-Cadherin: Stealth Accomplices?" *Frontiers in Molecular Biosciences* 7(July).
- Stokes, William A., and Chad G. Rusthoven. 2018. "Surgery vs. SBRT in Retrospective Analyses: Confounding by Operability Is the Elephant in the Room." *Journal of Thoracic Disease* 10(Suppl 17): S2007–10.
- Su, Yu-chu et al. 2021. "The Pro-Survival Oct4/Stat1/Mcl-1 Axis Is Associated with Poor Prognosis in Lung Adenocarcinoma Patients." *Cells* 10(10): 2642. <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/10/2642>.
- Sun, Yu et al. 2007. "Cross-Species Transcriptional Profiles Establish a Functional Portrait of Embryonic Stem Cells." *Genomics* 89(1): 22–35.
- . 2008. "Evolutionarily Conserved Transcriptional Co-Expression Guiding Embryonic Stem Cell Differentiation" ed. Debbie Fox. *PLoS ONE* 3(10): e3406. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0003406>.
- Sun, Yuliang L. et al. 2021. "Heterogeneity in Human Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Alveolar Epithelial Type II Cells Revealed with ABCA3/SFTPC Reporters." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 65(4): 442–60.
- Sung, Hyuna et al. 2021. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71(3): 209–49.
- Talukdar, Sarmistha et al. 2019. 141 *Advances in Cancer Research Dormancy and Cancer Stem Cells: An Enigma for Cancer Therapeutic Targeting*. 1st ed. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.acr.2018.12.002>.
- Tang, Dean G. 2012. "Understanding Cancer Stem Cell Heterogeneity and Plasticity." *Cell Research* 22(3): 457–72.
- Tavernari, Daniele et al. 2021. "Nongenetic Evolution Drives Lung Adenocarcinoma Spatial Heterogeneity and Progression." *Cancer Discovery* 11(6): 1490–1507.
- Tedesco, Lucas et al. 2019. "Von Hippel-Lindau Mutants in Renal Cell Carcinoma Are Regulated by Increased Expression of RSUME." *Cell Death and Disease*. <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-019-1507-3>.

- Tirino, V. et al. 2013. "TGF- $\beta$ 1 Exposure Induces Epithelial to Mesenchymal Transition Both in CSCs and Non-CSCs of the A549 Cell Line, Leading to an Increase of Migration Ability in the CD133+ A549 Cell Fraction." *Cell Death and Disease* 4(5): e620-11.  
<http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2013.144>.
- Tomayko, Mary M., and C. Patrick Reynolds. 1989. "Determination of Subcutaneous Tumor Size in Athymic (Nude) Mice." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 24(3): 148–54.
- Turner, Mary A. et al. 1998. "Structure Determination of Selenomethionyl S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Using Data at a Single Wavelength." *Nature Structural Biology* 5(5): 369–76.
- Uhlén, Mathias et al. 2015. "Tissue-Based Map of the Human Proteome." *Science* 347(6220).
- Wakata, Kouki et al. 2015. "A Favourable Prognostic Marker for EGFR Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Immunohistochemical Analysis of MUC5B." *BMJ Open* 5(7): 1–8.
- Walcher, Lia et al. 2020. "Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies." *Frontiers in Immunology* 11(August): 1–33.
- Wang, Jianyu et al. 2021. "Autophagy Augments the Self-Renewal of Lung Cancer Stem Cells by the Degradation of Ubiquitinated P53." *Cell Death and Disease* 12(1).  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41419-021-03392-6>.
- Wang, Zhenxun et al. 2019. "Methionine Is a Metabolic Dependency of Tumor-Initiating Cells." *Nature Medicine* 25(May). <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0423-5>.
- Weidenfeld, Keren, and Dalit Barkan. 2018. "EMT and Stemness in Tumor Dormancy and Outgrowth : Are They Intertwined Processes ?" *Frontiers in Oncology* 8(September): 1–6.
- White, Eileen, Janice M. Mehnert, and Chang S. Chan. 2015. "Autophagy, Metabolism, and Cancer." *Clinical Cancer Research* 21(22): 5037–46.
- Wischhof, Lena et al. 2022. "Unbiased Proteomic Profiling Reveals the IP3R Modulator AHCYL1/IRBIT as a Novel Interactor of Microtubule-Associated Protein Tau." *Journal of Biological Chemistry*: 101774. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101774>.
- Wistuba, Ignacio I., and Adi F. Gazdar. 2006. "Lung Cancer Preneoplasia." *Annual Review of Pathology* 1(October): 331–48.
- Wittig, Rainer et al. 2002. "Candidate Genes for Cross-Resistance against DNA-Damaging Drugs 1 , 2." *Cancer Research*: 6698–6705.
- Wu, Fengying et al. 2021. "Single-Cell Profiling of Tumor Heterogeneity and the Microenvironment

- in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer.” *Nature Communications* 12(1): 1–11.  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-22801-0>.
- Xin, Yan Hong et al. 2013. “POU5F1 Enhances the Invasiveness of Cancer Stem-like Cells in Lung Adenocarcinoma by Upregulation of MMP-2 Expression.” *PLoS ONE* 8(12): 2–9.
- Yang, C. et al. 2018. “Ki67 Targeted Strategies for Cancer Therapy.” *Clinical and Translational Oncology* 20(5): 570–75.
- Yang, Dongki et al. 2009. “IRBIT Coordinates Epithelial Fluid and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Secretion by Stimulating the Transporters PNBC1 and CFTR in the Murine Pancreatic Duct.” *Journal of Clinical Investigation* 119(1): 193–202.
- Yang, Dongki, Nikolay Shcheynikov, and Shmuel Muallem. 2011. “IRBIT: It Is Everywhere.” *Neurochemical Research* 36(7): 1166–74. <http://link.springer.com/10.1007/s11064-010-0353-6>.
- Yap, Timothy A. et al. 2012. “Intratumor Heterogeneity: Seeing the Wood for the Trees.” *Science Translational Medicine* 4(127): 8–11.
- Yasukawa, Motoaki et al. 2018. “Histological Grade: Analysis of Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer after Complete Resection.” *In Vivo* 32(6): 1505–12.
- Yuan, Xiangpeng et al. 2004. “Isolation of Cancer Stem Cells from Adult Glioblastoma Multiforme.” *Oncogene*: 9392–9400.
- Zhang, Jianjun et al. 2014. “Intratumor Heterogeneity in Localized Lung Adenocarcinomas Delineated by Multiregion Sequencing.” *Science* 346(6206): 256–59.
- Zhang, Liang, Lianglan Shen, and Dijun Wu. 2021. “Clinical Significance of Cancer Stem Cell Markers in Lung Carcinoma.” *Acta Biochimica Polonica* 68(2): 187–91.
- Zhang, Naifeng. 2018. “Role of Methionine on Epigenetic Modification of DNA Methylation and Gene Expression in Animals.” *Animal Nutrition* 4(1): 11–16.  
<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.08.009>.
- Zhao, Changhong, Sarra Setrerrahmane, and Hanmei Xu. 2015. “Enrichment and Characterization of Cancer Stem Cells from a Human Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line.” *Oncology Reports*: 2126–32.
- Zhu, Qiang et al. 2020. “O-GlcNAcylation Regulates the Methionine Cycle to Promote Pluripotency of Stem Cells.” *PNAS*: 1–9.