



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Departamento de Química Biológica**

**Estudio de las células madre tumorales de pulmón bajo un  
contexto de quimiorresistencia.  
Implicancia del sistema del ácido retinoico como potenciador a las  
terapias convencionales y novedades en cáncer de pulmón a células  
no pequeñas.**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el  
área Química Biológica**

**Lic. Andrés Bechis**

**Directora de Tesis:** Dra. Laura Beatriz Todaro

**Director Adjunto:** Dr. Alejandro Jorge Urtreger

**Consejera de Estudios:** Dra. Mirta Ana Schattner

**Lugar de Trabajo:** Área de Investigación, Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”,  
Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, Argentina.

2026

## Índice

|                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Resumen .....</b>                                                | <b>6</b>  |
| <b>Abstract.....</b>                                                | <b>8</b>  |
| <b>Agradecimientos .....</b>                                        | <b>10</b> |
| <b>Abreviaturas .....</b>                                           | <b>11</b> |
| <b>Introducción.....</b>                                            | <b>13</b> |
| <b>Cáncer de pulmón .....</b>                                       | <b>14</b> |
| <b>Clasificación molecular del NSCLC.....</b>                       | <b>16</b> |
| <b>Terapias para el NSCLC .....</b>                                 | <b>16</b> |
| Quimioterapia .....                                                 | 17        |
| Quimiorradioterapia .....                                           | 17        |
| Terapias dirigidas.....                                             | 17        |
| Terapia antiangiogénica .....                                       | 18        |
| Inmunoterapia .....                                                 | 18        |
| <b>Resistencia a CDDP .....</b>                                     | <b>19</b> |
| <b>Células Madre Tumorales .....</b>                                | <b>20</b> |
| <b>Sistema Retinoide.....</b>                                       | <b>21</b> |
| <b>Modelos Murinos para el Estudio del Cáncer.....</b>              | <b>24</b> |
| <b>Hipótesis y Objetivos.....</b>                                   | <b>26</b> |
| <b>Materiales y Métodos .....</b>                                   | <b>30</b> |
| <b>Líneas celulares y Condiciones de cultivo.....</b>               | <b>31</b> |
| <b>Generación de Líneas Resistentes a Cisplatino.....</b>           | <b>32</b> |
| <b>Determinación de la Viabilidad Celular .....</b>                 | <b>32</b> |
| Ensayo de MTS.....                                                  | 32        |
| Ensayo de APH.....                                                  | 33        |
| <b>Ensayo de Proliferación Celular.....</b>                         | <b>33</b> |
| Monocapa .....                                                      | 33        |
| Oncoesferas.....                                                    | 34        |
| <b>Extracción de ARN .....</b>                                      | <b>34</b> |
| <b>Transcripción Reversa .....</b>                                  | <b>35</b> |
| <b>Reacción en Cadena de Polimerasa en Tiempo Real (qPCR) .....</b> | <b>35</b> |
| <b>Primers Utilizados .....</b>                                     | <b>36</b> |
| <b>Determinación de Ciclo Celular .....</b>                         | <b>36</b> |
| <b>Determinación de la Capacidad Clonogénica .....</b>              | <b>37</b> |
| <b>Ensayo de Migración Celular por Cierre de Herida .....</b>       | <b>38</b> |
| <b>Ensayo de Adhesión .....</b>                                     | <b>38</b> |

|                                                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Evaluación del tamaño y complejidad de las células por citometría de flujo .....</b> | <b>39</b> |
| <b>Morfología nuclear y marcación de microfilamentos de actina .....</b>                | <b>39</b> |
| <b>Ensayo de Anexina V .....</b>                                                        | <b>40</b> |
| <b>Ensayo de gen reportero .....</b>                                                    | <b>41</b> |
| <b>Western Blot .....</b>                                                               | <b>42</b> |
| <b>Análisis bioinformático .....</b>                                                    | <b>42</b> |
| <b>Muestras de pacientes .....</b>                                                      | <b>43</b> |
| <b>Historias Clínicas .....</b>                                                         | <b>45</b> |
| <b>Análisis estadístico .....</b>                                                       | <b>47</b> |
| <b>Experimentación <i>In vivo</i> .....</b>                                             | <b>48</b> |
| <b>Ratones .....</b>                                                                    | <b>48</b> |
| <b>Preparación de pellets con ATRA .....</b>                                            | <b>48</b> |
| <b>Cirugía para colocación de los pellets con ATRA .....</b>                            | <b>48</b> |
| <b>Ensayo de portación tumoral .....</b>                                                | <b>49</b> |
| <b>Ensayo de metástasis experimentales con células derivadas de oncoesferas .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>Ensayo de portación tumoral en ratones inmunodeficientes .....</b>                   | <b>50</b> |
| <b>Análisis estadísticos .....</b>                                                      | <b>51</b> |
| <b>Resultados .....</b>                                                                 | <b>52</b> |
| <b>1.1. Generación de los modelos celulares .....</b>                                   | <b>53</b> |
| 1.1.1. Características de la línea A549 .....                                           | 53        |
| Generación de la variante A549 resistente a CDDP .....                                  | 53        |
| 1.1.2. Características de la línea H125 .....                                           | 55        |
| Generación de la variante H125 resistente a CDDP .....                                  | 55        |
| <b>1.2. Comparación de las líneas parentales y sus variantes resistentes .....</b>      | <b>58</b> |
| 1.2.2. Evaluación de parámetros relacionados al crecimiento celular .....               | 58        |
| Estudio de la proliferación celular .....                                               | 58        |
| Estudio de la distribución del Ciclo Celular .....                                      | 59        |
| 1.2.3. Evaluación de parámetros relacionados a la progresión tumoral .....              | 60        |
| Estudio de la capacidad migratoria .....                                                | 60        |
| Estudio de la capacidad adhesiva .....                                                  | 61        |
| Estudio de la capacidad clonogénica .....                                               | 62        |
| 1.2.4. Estudio del tamaño y complejidad celular .....                                   | 63        |
| Morfología celular .....                                                                | 63        |
| Estudio del tamaño nuclear y de fragmentos citoplasmáticos de la cromatina .....        | 64        |
| Estudio del citoesqueleto de Actina .....                                               | 67        |
| 1.2.5. Estudio de la presencia de Células Madre Tumorales (CSC) .....                   | 68        |

|                                                                                                                                   |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Expresión de genes asociados a pluripotencialidad en monocapa .....                                                               | 68         |
| Evaluación del crecimiento de las CSC .....                                                                                       | 69         |
| Cuantificación de genes pluripotenciales en las oncoesferas .....                                                                 | 72         |
| 1.2.6. Comportamiento del modelo H125 in vivo .....                                                                               | 74         |
| Evaluación del crecimiento tumoral in vivo .....                                                                                  | 74         |
| Evaluación de la frecuencia de células madre tumorales <i>ex vivo</i> .....                                                       | 75         |
| <b>2. Efecto de los tratamientos con ATRA y CDDP sobre las líneas parentales y sus<br/>variantes resistentes a CDDP .....</b>     | <b>76</b>  |
| <b>2.1. Determinación de la dosis de tratamiento óptima. Evaluación sobre la viabilidad<br/>celular .....</b>                     | <b>77</b>  |
| Dosis de CDDP .....                                                                                                               | 77         |
| Dosis de ATRA .....                                                                                                               | 78         |
| Evaluación de la expresión y funcionalidad de genes asociados al sistema del Ácido<br>Retinoico .....                             | 80         |
| <b>2.2. Evaluación del efecto del tratamiento con ATRA y CDDP sobre la viabilidad<br/>celular en los modelos A549 y H125.....</b> | <b>83</b>  |
| <b>2.3. Efecto de los tratamientos con ATRA y CDDP sobre el sistema del Ácido<br/>Retinoico.....</b>                              | <b>85</b>  |
| 2.3.1. Evaluación de la funcionalidad del sistema del Ácido Retinoico.....                                                        | 85         |
| <b>2.4. Efecto de los tratamientos con ATRA y CDDP sobre parámetros relacionados<br/>con la progresión tumoral.....</b>           | <b>87</b>  |
| 2.4.1. Estudio de la distribución del ciclo celular bajo los tratamientos con CDDP y ATRA<br>.....                                | 87         |
| 2.4.2. Estudio de la tasa de proliferación celular bajo los tratamientos con CDDP y ATRA<br>.....                                 | 89         |
| 2.4.3. Estudio de la capacidad migratoria bajo los tratamientos con CDDP y ATRA .....                                             | 90         |
| 2.4.4. Estudio de la capacidad adhesiva bajo los tratamientos con CDDP y ATRA .....                                               | 92         |
| 2.4.5. Estudio de la capacidad clonogénica bajo los tratamientos con CDDP y ATRA ...                                              | 93         |
| <b>2.5. Efecto de los tratamientos con ATRA y CDDP sobre parámetros morfológicos<br/>celulares en cultivo .....</b>               | <b>95</b>  |
| <b>2.6. Efecto de los tratamientos con ATRA y CDDP sobre procesos de muerte celular<br/>.....</b>                                 | <b>99</b>  |
| <b>2.7. Efecto de los tratamientos con ATRA y CDDP sobre el componente progenitor<br/>.....</b>                                   | <b>101</b> |
| 2.7.1. Evaluación de la expresión de genes relacionados a pluripotencialidad .....                                                | 101        |
| 2.7.2. Evaluación de la formación y el crecimiento de oncoesferas .....                                                           | 102        |
| <b>2.8. Evaluación del tratamiento de ATRA y CDDP sobre la expresión génica en<br/>oncoesferas .....</b>                          | <b>104</b> |

|                                                                                                                                                                                                 |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.8.1. Efecto del tratamiento de ATRA y CDDP sobre la expresión de receptores retinoides en oncoesferas A549 .....                                                                              | 104        |
| 2.8.2. Efecto del tratamiento de ATRA y CDDP sobre la expresión de genes pluripotenciales en oncoesferas A549 .....                                                                             | 105        |
| 2.8.3. Efecto del tratamiento de ATRA y CDDP sobre la expresión de receptores retinoides en oncoesferas H125.....                                                                               | 106        |
| 2.8.4. Efecto del tratamiento con ATRA y CDDP sobre la expresión de genes pluripotenciales en oncoesferas H125 .....                                                                            | 107        |
| <b>3. Validación de los resultados en modelos experimentales .....</b>                                                                                                                          | <b>108</b> |
| <b>3.1. Evaluación del efecto del CDDP sobre la proliferación celular en LP07 .....</b>                                                                                                         | <b>108</b> |
| <b>3.2. Evaluación del efecto del tratamiento con ATRA y CDDP sobre la clonogenicidad celular en LP07 .....</b>                                                                                 | <b>109</b> |
| <b>3.3. Evaluación del tratamiento de ATRA y CDDP sobre la progresión tumoral in vivo en LP07 .....</b>                                                                                         | <b>109</b> |
| <b>3.4. Evaluación del tratamiento de ATRA y CDDP sobre la capacidad metastásica de células provenientes de oncoesferas LP07 en un modelo de metástasis experimentales <i>in vivo</i> .....</b> | <b>112</b> |
| <b>4. Evaluación de muestras de pacientes del biobanco de tejidos del IOAR.....</b>                                                                                                             | <b>115</b> |
| <b>5. Evaluación del sistema del Ácido Retinoico y los genes pluripotenciales como potenciales marcadores <i>in silico</i>.....</b>                                                             | <b>121</b> |
| <b>5.1. Evaluación de la relevancia de los genes del sistema del Ácido Retinoico en la clínica .....</b>                                                                                        | <b>121</b> |
| <b>5.2. Evaluación de la relevancia de los genes pluripotenciales NANOG, SOX2 y OCT4 en NSCLC .....</b>                                                                                         | <b>125</b> |
| <b>Discusión .....</b>                                                                                                                                                                          | <b>127</b> |
| <b>Conclusiones .....</b>                                                                                                                                                                       | <b>143</b> |
| <b>Bibliografía .....</b>                                                                                                                                                                       | <b>145</b> |

## **Estudio de las células madre tumorales de pulmón bajo un contexto de quimiorresistencia. Implicancia del sistema del ácido retinoico como potenciador a las terapias convencionales y noveles en cáncer de pulmón a células no pequeñas.**

### **Resumen**

El cisplatino (CDDP) es una terapia estándar para el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), aunque su eficacia es limitada por resistencia adquirida, asociada a células madre tumorales (CSCs).

En este estudio se generó una línea celular resistente al CDDP (H125cpr) y se la utilizó junto con la A549cpr (A549 resistente a CDDP) para evaluar el efecto del tratamiento con ácido trans retinoico (ATRA) en un contexto de quimiorresistencia. H125cpr mostró menor sensibilidad al CDDP, menor proliferación y migración, pero mayor capacidad clonogénica que su control (H125ct). Al analizar la subpoblación de CSCs, H125cpr formó menos oncosferas, aunque crecieron más rápidamente. *In vivo*, los tumores derivados de H125cpr crecieron más lentamente y no respondieron al tratamiento con CDDP, a diferencia de los H125ct.

El ATRA no afectó directamente la viabilidad celular, pero modificó la expresión de los receptores retinoides hacia un fenotipo más diferenciado en todas las líneas celulares, sensibles o resistentes a CDDP. La combinación de ATRA y CDDP tuvo un efecto sinérgico *in vivo*, reduciendo el crecimiento tumoral en un modelo subcutáneo singéico LP07.

Además, se analizó mediante estudios de muestras de pacientes del IOAHR y en bases de datos públicas de pacientes con cáncer de pulmón y encontramos que tanto RAR $\alpha$  como NANOG y OCT4 presentan una relevancia clínica en esta patología, siendo posible su potencial uso como marcadores pronósticos de la enfermedad.

Estos hallazgos destacan el potencial de ATRA como agente sensibilizante al CDDP y presentan una nueva línea celular resistente para estudiar mecanismos de resistencia y posibles terapias.

Palabras Clave:

Cisplatino

Ácido Trans-Retinoico

Quimioresistencia

Cáncer de Pulmón de Células no Pequeñas

Célula Madre Tumoral

**Study of lung cancer stem cells in a context of chemoresistance.  
Implication of the retinoic acid system as an enhancer for conventional  
and novel therapies in non-small cell lung cancer.**

**Abstract**

Cisplatin (CDDP) is a standard therapy for non-small cell lung cancer (NSCLC), although its efficacy is often limited by acquired resistance, which has been linked to cancer stem cells (CSCs). The retinoic acid system has emerged as a potential therapeutic target.

This study generated a CDDP-resistant cell line (H125cpr) and used it alongside A549cpr (A549 CDDP-resistant) to evaluate the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) in a chemoresistance context. H125cpr showed reduced sensitivity to CDDP, lower proliferation and migration, but increased clonogenic capacity compared to its control (H125ct). Besides, when we analyzed their CSC, H125cpr formed fewer oncospheres, but these grew faster. *In vivo*, tumors derived from H125cpr grew more slowly and did not respond to CDDP treatment, unlike those from H125ct.

ATRA did not directly affect cell viability but altered the expression of retinoid receptors toward a more differentiated phenotype in both sensitive and resistant cell lines. The combination of ATRA and CDDP had a synergic effect *in vivo*, reducing tumor growth in a LP07 subcutaneous syngeneic model.

Furthermore, we analyzed samples from IOAHR patients and public databases of lung cancer patients and found that RAR $\alpha$ , NANOG, and OCT4 have clinical relevance in this pathology, making their potential use as prognostic markers of the disease possible. These findings highlight the potential of ATRA as a CDDP-sensitizing agent and present a new resistant NSCLC cell line, useful for studying resistance mechanisms and evaluating new therapeutic strategies.

Key Words:

Cisplatin

All-Trans Retinoic Acid

Chemoresistance

Non-Small Cell Lung Cancer

Cancer Stem Cell

## **Agradecimientos**

Nunca fui bueno en las palabras, así que seré breve.

Fueron cerca de 16 años los que hicieron que el Andrés que vino de Bariloche llegase hasta este momento. Muchas personas pasaron por mi vida en esos años, así como en los anteriores. Yo sé el rol que cada uno tuvo en mi vida y en la importancia que tuvieron para que llegue hasta donde estoy. Familia, amigos, directores, compañeros de trabajo, de facultad, de colegio, de juego, de vida. Todos y cada uno son parte de la historia que me llevó a este punto. Agradezco a todos, así como lo fui haciendo a lo largo de estos años. Espero poder agradecerles personalmente y no a través de estas páginas. Agradezco a las instituciones que me dieron el lugar para formarme, así como las que me brindaron las becas que permitieron que me dedique a lo que me gusta: gracias a la UBA, al CONICET, al IBYME y al Roffo.

Sin más palabras, gracias a todos.

## **Abreviaturas**

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALK: Quinasa de linfoma anaplásico

ATRA: Ácido trans-retinoico

CDDP: Cisplatino, cis-diaminodicloroplatino(II)

CDKs: Ciclinas dependientes de quinasas

CSC: Célula madre tumoral

DISC: Complejo de señalización inductor de muerte

DMEM: Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

GSH: Glutación

HDAC: Proteínas deacetilasa de histonas

HIF: Factor inducible por hipoxia

IP: Ioduro de propidio

LIC: Células iniciadoras de leucemia

MET: Migración transendotelial

NSCLC: Cáncer de pulmón de células no pequeñas

PBS: Buffer fosfato salino

RARE: Elemento de respuesta al ácido retinoico

RARs: Receptores de ácido retinoico

RPMI: Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

RXRs: Receptores X de retinoides

SCLC: Cáncer de pulmón de células pequeñas

SFB: Suero fetal bobino

SG: Sobrevida global

SLE: Sobrevida libre de enfermedad

TEM: Transición epitelio-mesenquimal

TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

VEGFR: Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial

# Introducción

---

## Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial y el tercero en cuanto a su incidencia, solo detrás del cáncer de próstata, según datos del 2022 (Global Cancer Observatory, 2022). En Argentina la incidencia es de 215,8 casos por cada 100.000 habitantes por año, mientras que la tasa de mortalidad es de 102,7 por cada 100.000 habitantes por año, siendo el tercer país con mayor mortalidad por este tipo de tumor en América Latina, detrás de Uruguay (128,3) y Cuba (110,2) (Figura 1). Estas estadísticas subrayan la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas capaces de reducir la mortalidad asociada a este tumor.

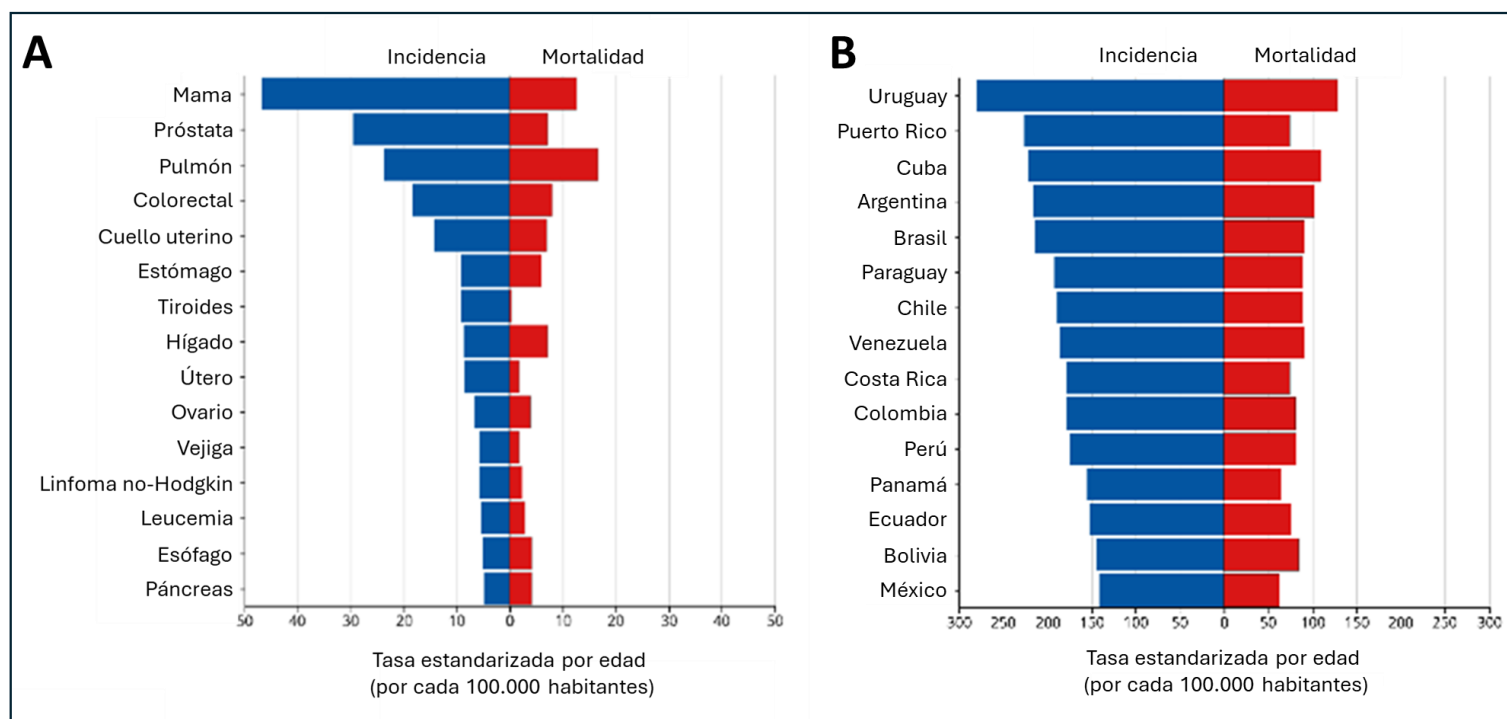


Figura 1. (A) Incidencia y mortalidad mundial por cada 100.000 habitantes por año para cada tipo tumoral. (B) Incidencia y mortalidad para pacientes con cáncer de pulmón por cada 100.000 habitantes en los distintos países de Latinoamérica.

El principal factor de riesgo para el cáncer de pulmón continúa siendo el consumo del tabaco. Los fumadores presentan un riesgo aproximadamente 20 veces mayor de contraer cáncer de pulmón que los no fumadores (Schabath, 2020). Otros factores de riesgo importantes son la

exposición al humo de otros fumadores (conocido como humo ambiental o tabaquismo pasivo), o a otros agentes carcinógenos, como el radón, el amianto y el asbesto.

El cáncer de pulmón se origina por la transformación maligna de células del epitelio pulmonar (por lo que todos los tumores son carcinomas). Dependiendo de la zona donde se origine, va a derivar en un tumor con determinadas características histopatológicas, subdividiéndose en dos grandes grupos: el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).

El SCLC es un carcinoma neuroendócrino que representa cerca del 15% de los casos. Se caracteriza por una alta tasa proliferativa, alta propensión a la metástasis temprana y mal pronóstico, agravado por diagnósticos generalmente tardíos (Rudin, 2021). El origen de este tipo tumoral suele ser en el bronquio primario o secundario, presentando células de gran tamaño y cuyo núcleo abarca gran parte de la superficie celular. Estos tumores suelen responder inicialmente a la quimioterapia con compuestos basados en platino. Sin embargo, la supervivencia a 5 años apenas alcanza el 7% (American Cancer Society, 2025).

El NSCLC comprende todos los tipos tumorales que no incluyen los SCLC, y su clasificación depende de la célula tumoral que le dio origen. Dentro de los NSCLC se encuentran los adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas y los carcinomas de células grandes. Los adenocarcinomas se desarrollan en las zonas distales de los pulmones, en los epitelios lindantes con las cavidades y glándulas. Los carcinomas de células escamosas se originan en el centro del pulmón, cerca de los bronquios. Por último, los carcinomas de células grandes pueden ocurrir en cualquier parte del pulmón y tiende a crecer y diseminarse más rápido que los otros dos subtipos (Tai, 2020).

### Clasificación molecular del NSCLC

Si bien el cáncer de pulmón no se clasifica en subtipos moleculares tan definidos como en cáncer de mama, resultan importantes ciertas mutaciones con valor pronóstico y predictivo. Mutaciones en EGFR, KRAS, MET o rearrreglos en ALK suelen ser las modificaciones más frecuentes, como se muestra en la Figura 2. Además, mutaciones en el gen PT53, que codifica para la proteína supresora tumoral P53, aparecen en cerca del 80% de los tumores de pulmón (Akira Mogi, 2011). Estas alteraciones guían la elección de terapias dirigidas y constituyen variables centrales en el manejo del NSCLC. En esta tesis usaremos dos líneas celulares de NSCLC: NIH-A549 (CCL-185), que posee mutaciones en KRAS, PT53 y SKT11 y NCI-H125 (CRL-5801), con solo PT53 mutado.

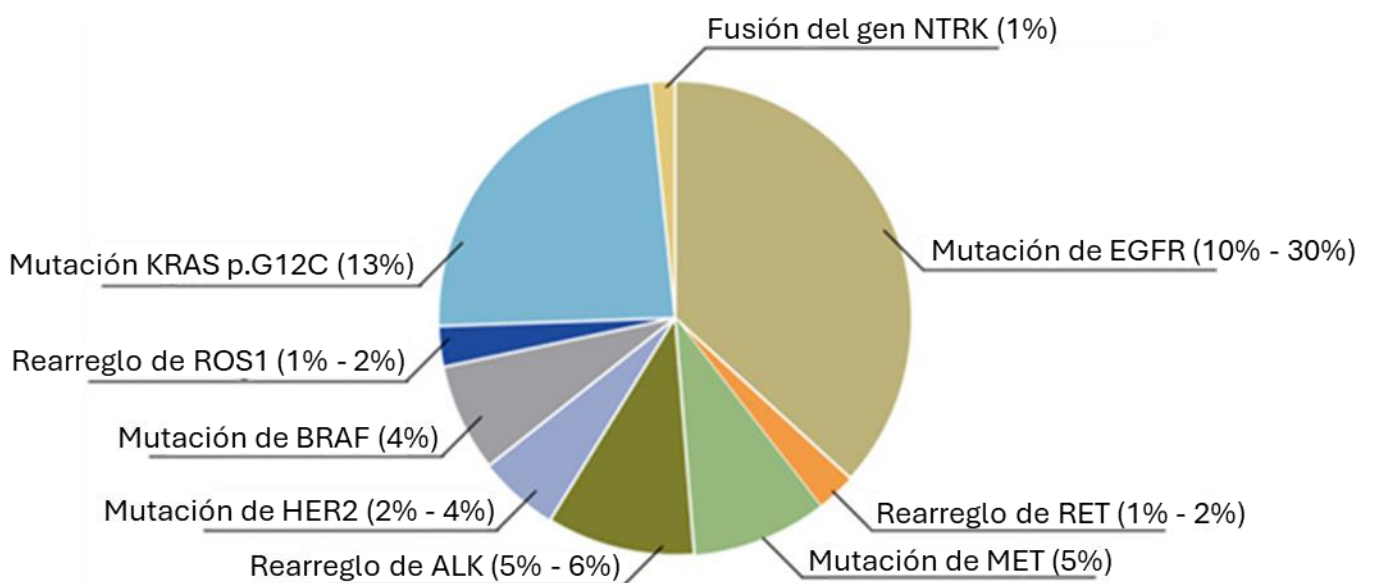


Figura 2. Mutaciones de oncogenes presentes en pacientes con NSCLC (Qianqian Guo, 2022).

### Terapias para el NSCLC

Los síntomas iniciales del cáncer de pulmón (tos persistente, disnea, dolor torácico y sibilancias) suelen ser ignorados por los pacientes, impidiendo el diagnóstico temprano y el tratamiento eficaz (Gershman E, 2019). Las opciones terapéuticas incluyen quimioterapia, quimiorradioterapia, terapia dirigida, terapia antiangiogénica, inmunoterapia y terapia

combinada (Qianqian Guo, 2022). Para el tratamiento de la enfermedad en estadios II-IV pueden agregarse tratamientos adyuvantes o neoadyuvantes, además de las terapias mencionadas anteriormente, para optimizar los resultados quirúrgicos.

### Quimioterapia

Antes del surgimiento de la terapia dirigida, la quimioterapia dominaba el tratamiento clínico del cáncer de pulmón. Luego del descubrimiento de los genes mutados presentes en NSCLC, la terapia dirigida comenzó a tener mayor relevancia. Sin embargo, la quimioterapia combinada con algún otro compuesto sigue siendo un tratamiento recurrente. Actualmente, la quimioterapia en NSCLC involucra esquemas basados en cisplatino o carboplatino, combinados con gemcitabina, taxanos o pemetrexed, y en algunos casos agentes dirigidos como el bevacizumab (inhibidor de VEGFR) o el erlotinib (inhibidor de EGFR) (Hanna, 2021).

### Quimiorradioterapia

La radioterapia se utiliza habitualmente en el control local de diferentes estadios del cáncer de pulmón. Sin embargo, aunque la radioterapia es la terapia estándar para pacientes con NSCLC en estadio III, su impacto en la supervivencia es limitado. Dado que el daño al ADN inducido por la radioterapia puede estimular respuestas inmunes, la terapia combinada con inmunoterapia podría producir mejores resultados terapéuticos (Miyasaka, 2021).

### Terapias dirigidas

Gracias al estudio de los múltiples oncogenes mutados en el NSCLC, es posible la terapia dirigida con compuestos diseñados contra ellos (Tan, 2002). Para administrar una terapia dirigida en pacientes con cáncer de pulmón, las mutaciones moleculares en el tumor deben confirmarse mediante ensayos de diagnóstico, siendo la más efectiva la secuenciación de nueva generación (NGS). Así, existen numerosos medicamentos dirigidos hacia estos oncogenes,

aprobados para su utilización en NSCLC: dirigidos a EGFR, a ALK, a ROS1, a RET, a HER2, a KRAS, a BRAF, a NTRK y a MET (Tabla 1).

| Oncogenes Blanco | Medicamentos                                             |
|------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>EGFR</b>      | gefitinib, erlotinib, afatinib, dacomitinib, osimertinib |
| <b>ALK</b>       | crizotinib, alectinib, brigatinib, ceritinib, lorlatinib |
| <b>ROS1</b>      | crizotinib, lorlatinib, entrectinib, brigatinib          |
| <b>RET</b>       | pralsetinib, selpercatinib                               |
| <b>HER2</b>      | pirotinib, tucatinib, trastuzumab                        |
| <b>KRAS</b>      | adagrasib, sotorasib                                     |
| <b>BRAF</b>      | dabrafenib, trametinib                                   |
| <b>NTRK</b>      | larotrectinib, entrectinib                               |
| <b>MET</b>       | crizotinib                                               |

Tabla 1. medicamentos específicos dirigidos hacia los distintos oncogenes vinculados a NSCLC.

### Terapia antiangiogénica

El crecimiento del tumor depende de la angiogénesis, mecanismo necesario para brindarle nutrición a las células en constante duplicación (Chen, 2021). Entonces, terapias dirigidas a inhibir este proceso pueden tener buen resultado en pacientes. El factor inducible por hipoxia (HIF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su receptor (VEGFR) son blancos de este tipo de terapias (Jayson, 2016). Además, combinar la terapia anti VEGF con inmunoterapia puede resultar particularmente beneficioso ya que se ha demostrado que el VEGF cumple un rol como inhibidor de respuesta inmune en el microambiente tumoral (Lapeyre, 2016).

### Inmunoterapia

La inmunoterapia en NSCLC usualmente usa anticuerpos bloqueantes del reconocimiento de antígenos en inmunocitos y ligandos en células tumorales (Mielgo-Rubio, 2021). Los inhibidores de puntos de control inmunológicos (checkpoints) se utilizan en estadios avanzados y metastásicos (Roller, 2022). Las proteínas blanco de estas terapias son CTLA-4 (ipilimumab), PD-1 (pembrolizumab y nivolumab) y PD-L1 (atezolizumab, durvalumab y avelumab) (Nasser, 2020). La inmunoterapia puede ser además combinada ya sea tanto con quimioterapia o radioterapia, para aumentar su eficacia.

**Resistencia a CDDP**

A pesar del avance de terapias con agentes dirigidos no citotóxicos, la quimioterapia sistémica continúa siendo central en el tratamiento tanto del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) como del cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC). La resistencia a cisplatino (CDDP), tanto intrínseca como adquirida, representa una de las principales limitaciones del tratamiento (Kim, 2016).

Los mecanismos descritos de resistencia a CDDP suelen estar vinculados a la expulsión activa del fármaco, lo que genera la disminución de la concentración de platino intracelular (Florean, 2011). Esta expulsión está dada por proteínas como el transportador de cobre CTR1, cuya baja expresión en pacientes con NSCLC se asocia a peor pronóstico y resistencia al tratamiento basada en platino (Kim, 2014), así como la bomba de eflujo BCRP, que también se vinculan con la resistencia a compuestos derivados del platino en NSCLC. En el caso de BCRP, su sobreexpresión se ha observado tanto en tumores con baja respuesta a CDDP, como en muestras de sangre de estos pacientes (Zattoni, 2022).

Otro mecanismo relevante en la resistencia al CDDP es la concentración de glutatión (GSH) intracelular. Esta molécula es capaz de unir CDDP, impidiendo la formación de los aductos de ADN y disminuyendo la concentración de CDDP intracelular. Además, se ha reportado que el mismo GSH es capaz de reparar dichos aductos ((Zhou, 2020) por lo que la resistencia dada por GSH podría estar actuando a través de dos mecanismos complementarios.

Por otro lado, la quimiorresistencia al cisplatino no debe entenderse únicamente como una falla en los mecanismos de transporte o reparación del ADN a nivel celular, sino como un proceso de selección poblacional. Al eliminar la masa tumoral altamente proliferativa, el cisplatino produce un enriquecimiento relativo de las células madre tumorales (CSC), las cuales poseen una plasticidad intrínseca que les permite persistir en un estado de quiescencia o latencia. Esta persistencia de las CSC tras la terapia convencional es, en última instancia, el motor de las

recaídas clínicas en el NSCLC, lo que resalta la urgencia de identificar agentes capaces de vulnerar este nicho específico (Bhat, 2024). Más aún, es destacada la importancia en la generación de modelos que permitan estudiar en profundidad este tipo de resistencia dando cuenta de la presencia de CSC.

### **Células Madre Tumorales**

El cáncer de pulmón es una neoplasia heterogénea que contiene células con propiedades stem. Estas células, que poseen carácter embrionario, se las conoce como células madre tumorales o células iniciadoras de tumores (CSC) y se han descrito como responsables del establecimiento y crecimiento tumoral (Capp, 2019). Además, se asocian con fenotipos agresivos, alta heterogeneidad y resistentes a terapia (Ayob, 2018). Durante los tratamientos de quimio y radioterapia, las células altamente proliferativas son eliminadas primero, mientras que las CSC (más resistentes) persisten (Shibata, 2019). Esta resistencia puede producir recaídas y generar la reaparición de la enfermedad (Desai, 2019).

Se cree que los tumores generados a partir de CSC siguen una jerarquía unidireccional, en la cual solo la población de CSC es capaz de iniciar el crecimiento tumoral (Afify, 2019). En el momento de la iniciación tumoral, se sugiere que las células madre tumorales se dividen de manera asimétrica para mantener el reservorio de CSC (Bu, 2013). Estas divisiones asimétricas generan células de amplificación transitoria, que se dividen simétricamente y, por lo tanto, poseen una alta capacidad proliferativa.

En contraste con el modelo de CSC, en el que solo una pequeña subpoblación de células es capaz de promover la iniciación y el crecimiento tumoral, el modelo de evolución clonal sostiene que células genéticamente inestables acumulan alteraciones genómicas con el tiempo, lo que provoca un aumento de la agresividad, la resistencia y la heterogeneidad tumoral (Rich, 2016). Ambos modelos no son mutuamente excluyentes. Esto puede explicarse por la plasticidad celular, que sugiere la interconversión entre los distintos estados celulares (Cabrera, 2015).

Dado que se ha demostrado que las CSC causan la iniciación y recaída de tumores, resulta fundamental la búsqueda y análisis de biomarcadores que las caractericen. De este modo, se podría predecir la evolución del paciente y seleccionar terapias acordes con la relevancia del componente *stem* del tumor o del microambiente tumoral.

La pluripotencia de las células madre embrionarias está regulada por una red central de factores de transcripción que incluye OCT-3/4, SOX2 y NANOG, KLF4 y c-MYC, así como vías de señalización como Jak/Stat, Wnt/  $\beta$ -Catenina y TGF- $\beta$  (Hadjimichael, 2015). La red de pluripotencia central, compuesta por NANOG, SOX2 y OCT-3/4, activa genes de autorrenovación y suprime genes implicados en la diferenciación. Estos factores se han propuesto como biomarcadores de CSC, por lo que serán utilizados en esta tesis como indicadores de su presencia.

### **Sistema Retinoide**

Los retinoides son una familia de moléculas que derivan de la vitamina A (retinol). El retinol es transportado intracelularmente por la proteína celular de unión a retinol (CRBP), quién lo expone a la retinol deshidrogenasa para su conversión en retinaldehído (Metzler, 2016). Posteriormente, el retinaldehído es convertido a ácido retinoico (AR) por tres retinaldehído deshidrogenasas: ALDH1A1, ALDH1A2 y ALDH1A3 (Cunningham, 2015). Esta conversión es irreversible, pero el ácido retinoico se degrada rápidamente por enzimas de la familia del citocromo P450, resultando en un tiempo de vida medio corto, cercano a 1 hora (Ross, 2011). Tanto la síntesis como el metabolismo de los metabolitos bioactivos del retinol pueden encontrarse alterados en las células tumorales en comparación con las células normales (Tang, 2011).

Una vez sintetizado, el AR se une a su transportador CRABP e ingresa al núcleo, donde funciona como factor de transcripción al unirse principalmente a los receptores retinoicos (RARs) y, en menor medida, a los receptores x retinoides (RXRs), los cuales forman un heterodímero que

reconoce al elemento de respuesta al ácido retinoico (RARE) dentro de los promotores de los genes blanco (Ghyselinck, 2019).

Los RARs interactúan con numerosos coactivadores y correpresores para regular la transcripción. En ausencia de ligando, el heterodímero RAR/RXR actúa como correpresor reclutando complejos de proteínas represoras de la transcripción, algunas de las cuales tienen función de deacetilasa de histonas (HDAC) (Perissi, 2010). La unión del ligando, principalmente AR, induce la liberación de correpresores y recluta coactivadores de la transcripción con actividad de acetil-transferasa (Petkovich, 2022).

El AR inhibe la progresión del ciclo celular de forma indirecta, modulando la expresión de ciclinas, CDKs e inhibidores del ciclo celular. Generalmente produce un arresto en la fase G1 del ciclo, reduciendo la proporción de células en la fase S (Lavudi 2023). Entre todos los receptores, RAR $\beta_2$  es el mediador en la inhibición de la proliferación de las células tumorales (Faria, 1999). Su expresión se pierde tempranamente durante la tumorigénesis en muchos tipos celulares. Si bien sus funciones supresoras tumorales no están completamente dilucidadas, estudios indican que los genes blanco de RAR $\beta_2$  incluyen genes que median la inhibición del crecimiento celular inducido por AR (Liu, 2019). Su pérdida o reducción en la expresión durante la carcinogénesis suele asociarse con la resistencia a los retinoides, lo que sugiere que RAR $\beta_2$  puede mediar los efectos del AR y actuar como supresor tumoral.

Aunque los distintos isotipos de RAR tienen funciones solapadas evidenciadas por su capacidad de modular la expresión de genes comunes, también se ha descrito la presencia de antagonismo entre ellos (Yamakawa, 2023). La activación específica de RAR $\alpha$  induce la expresión de RAR $\beta$ , que es requerido para la diferenciación de tejido normal y de CRBP1, clave para mantener el estado diferenciado en tejido epitelial (Napoli, 2017). En contraste, RAR $\gamma$  tiene actividad protumorigénica en modelos de cáncer de hígado (Yan, 2010), y promueve la proliferación de células tumorales de mama (Lu, 2010). Por este motivo, se lo ha descrito como

oncogén en múltiples tumores, incluidos leucemia mieloide aguda, el colangiocarcinoma, cáncer colorectal, de cabeza y cuello, pancreático, prostático y renal (Brown, 2025). Se han utilizado diversos enfoques para interferir con la actividad de los RAR, incluyendo antagonistas pan-RAR y selectivos de RAR $\gamma$ . Con estas herramientas, se ha demostrado que la inhibición de este receptor conlleva a una detención del crecimiento y un aumento de la muerte celular. Además, existen evidencias que respaldan la idea de que el antagonismo de RAR $\gamma$  es suficiente para eliminar las CSC, por lo que lo posiciona como un regulador importante para su mantenimiento.

La expresión de RAR $\beta$  se encuentra disminuida en la mayoría de los tumores de NSCLC y en el epitelio bronquial de fumadores. Esta disminución se debe principalmente a la metilación de su promotor (Li, 2014). No obstante, su expresión es detectable en tejido pulmonar normal, donde cumple un rol crítico en las vías de diferenciación y freno de la división celular en este tejido (Lavudi, 2023).

Dado que los retinoides se encuentran entre los pocos fármacos capaces de regular la diferenciación de células madre embrionarias normales (Kashyap, 2009), se han empleado modelos animales y humanos para inducir la diferenciación de células tumorales en diversos tipos de cáncer. Ejemplos incluyen la diferenciación de las células madre de células iniciadoras de leucemia (LIC) en la leucemia promielocítica aguda, donde la terapia con retinoides conduce a una diferenciación irreversible de las LIC a un fenotipo no maligno, y la diferenciación inducida por AR de las células madre de neuroblastoma humano (Lavudi, 2023).

En el contexto de resistencia mediada por el componente celular progenitor, forzar la diferenciación de estas células emerge como una estrategia terapéutica racional. El sistema del ácido retinoico es un potente regulador de la diferenciación celular en tejidos epiteliales, por lo que su activación podría ser beneficioso para diferenciar (y sensibilizar a la terapia) dicho componente celular.

## Modelos Murinos para el Estudio del Cáncer

El cáncer es el resultado de la acumulación de múltiples aberraciones genéticas que transforman las células y permiten su crecimiento y proliferación anormales y, eventualmente, desarrollo de metástasis. El análisis de estas mutaciones y la comprensión de como contribuyen a la fisiopatología del cáncer son esenciales para su entendimiento, diagnóstico y tratamiento. El uso de animales de laboratorio ha aportado significativamente al entendimiento y a la capacidad de estudio de la función genética *in vivo*, así como a la comprensión de los mecanismos moleculares de la patogénesis del cáncer (Cheon, 2011).

Los fármacos antitumorales evaluados *in vitro* no reproducen totalmente la respuesta observada en pacientes, en parte debido a la ausencia del microambiente tumoral (vascularización, sistema inmune, etc) (Shultz, 2014). Por ello, la fase preclínica de la investigación oncológica debe incluir modelos *in vivo* que repliquen, al menos parcialmente, la situación clínica humana (Yadav, 2024). Para el implante de células murinas, se requieren ratones singénicos, lo que evita el rechazo inmunológico y permite el crecimiento tumoral. Sin embargo, para el implante de células humanas en modelos murinos, es necesario emplear ratones genéticamente modificados que eviten este rechazo. Los avances en la manipulación genética han permitido la introducción de alteraciones definidas, controlables temporal y espacialmente, para reproducir aspectos clave de la fisiopatología tumoral humana.

La característica más relevante de los modelos murinos para investigación oncológica es la ausencia de timo (Pantelouris, 1973). La inmunidad mediada por linfocitos T es la responsable de la destrucción de células malignas y para la reacción huésped-injerto (Ruiz, 2013). La deficiencia de linfocitos T debilita profundamente la inmunidad adaptativa y permite el injerto, el crecimiento y, finalmente, las metástasis de las células tumorales humanas (Sun, 2014). El trasfondo genético detrás de esta deficiencia en los linfocitos T es una mutación en homocigosis en el locus del gen FoxN1 (Zhang, 2012), característica de los ratones “desnudos” o Nude.

El modelo de ratones Nude presenta ciertas limitaciones, ya que la inmunodeficiencia es grave, pero no absoluta. A pesar de que solo existen pocas células T en la periferia, mantienen la inmunidad innata y las células NK pueden limitar el injerto, el crecimiento y la capacidad metastásica de tumores sólidos, además de impedir el injerto de células hematopoyéticas malignas (Chen, 2022).

Independientemente de las células a utilizar y, en consiguiente, la cepa de ratón acorde, existen distintos ensayos que permiten evaluar distintas características y etapas de la progresión tumoral. En este trabajo utilizaremos dos enfoques distintos de experimentos *in vivo*:

- Ensayo de portación tumoral subcutáneo
- Ensayo de metástasis experimentales

Los tumores subcutáneos representan un entorno tridimensional más complejo que el bidimensional *in vitro* y permiten estudiar con facilidad el efecto de los fármacos sobre el crecimiento tumoral (Stribbling, 2022). Por ello, suele ser el primer modelo elegido para evaluar terapias novedosas.

El modelo más utilizado para evaluar la cascada metastásica es el de metástasis experimentales. Consiste en la inoculación de células tumorales directamente en el torrente sanguíneo. Dependiendo del sitio de inyección y del tropismo de las células tumorales, las mismas pueden (o no) generar metástasis en distintos órganos. El sitio más frecuente de inyección es la vena lateral de la cola, lo que genera principalmente en metástasis pulmonares (Thies, 2020).

## **Hipótesis y Objetivos**

En base a lo expuesto en la introducción, la hipótesis postulada es que los retinoides disminuyen la resistencia adquirida al cisplatino al reducir el componente precursor del tumor.

Para demostrar esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos generales:

### **Objetivo I**

Generar una nueva línea celular resistente a cisplatino a partir de la línea celular humana NCI-H125, derivada de un carcinoma de células escamosas (H125cpr).

### **Objetivo II**

Identificar y caracterizar el componente progenitor (CSC) de las líneas humanas tumorales de pulmón H125, A549, H125cpr y A549cpr.

### **Objetivo III**

Evaluar *in vitro* crecimiento y potencial metastásico de las células tumorales de pulmón en el contexto de resistencia a cisplatino, estudiando eventos relacionados con progresión tumoral y diseminación metastásica bajo el tratamiento con ácido retinoico, cisplatino o su combinación.

### **Objetivo IV**

Estudiar *in vivo* el efecto del tratamiento combinado de los retinoides y el cisplatino sobre el crecimiento tumoral en modelos murinos, así como sobre las metástasis experimentales, como primera parte de una validación preclínica.

### **Objetivo V**

Estudiar retrospectivamente en muestras de pacientes con NSCLC y SCLC obtenidas del biobanco de tejidos del Instituto de Oncología “Ángel H Roffo” la expresión de genes vinculados a las vías del ácido retinoico y genes relacionados con pluripotencialidad de modo de detectar correlaciones entre los mismos y aspectos clínicos: sobrevida general, sobrevida libre de enfermedad, comorbilidades, tipo y estadio tumoral.

### **Objetivo VI**

Estudiar en bases de datos de pacientes con NSCLC y SCLC *in silico* la expresión de genes vinculados a las vías del ácido retinoico y genes relacionados con pluripotencialidad de modo de detectar correlaciones entre los mismos y la sobrevida general.

En base a los objetivos mencionados, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Generar una nueva línea celular resistente a cisplatino a partir de la línea celular humana H125cpr evaluando su respuesta al cisplatino en:
  - a. Ensayos de viabilidad celular
  - b. Ensayos de proliferación celular
  - c. Ensayos de ciclo celular
  - d. Ensayos de apoptosis
2. Identificar y caracterizar las CSC de las líneas celulares utilizadas a través de la evaluación de:
  - a. Tamaño de oncoesferas en función del tiempo
  - b. Porcentaje de formación de oncoesferas
  - c. Clonogenicidad celular
  - d. Tamaño y complejidad celular
  - e. Morfología nuclear

- f. Expresión de marcadores de pluripotencialidad (NANOG y OCT4)
- 3. Evaluar *in vitro* crecimiento y potencial metastásico de las células tumorales de pulmón en el contexto de resistencia a cisplatino bajo efecto del tratamiento con ATRA y cisplatino a través de:
  - a. Ensayos de apoptosis
  - b. Ensayos de migración
  - c. Ensayos de invasión
  - d. Ensayos de adhesión
  - e. Ensayos de formación de oncoesferas
  - f. Ensayos de clonogenicidad
  - g. Tinciones para evidenciar morfología nuclear
  - h. Citometría de flujo para evidenciar tamaño y complejidad celular
- 4. Estudiar *in vivo* el efecto del tratamiento combinado de los retinoides y el cisplatino en los siguientes modelos:
  - a. Metástasis experimentales en ratones BALB/c utilizando oncoesferas derivadas de la línea celular singénica LP07, evaluando:
    - i. Formación de macrometástasis bajo lupa
    - ii. Formación de micrometástasis en cortes de tejido pulmonar
  - b. Portación tumoral en ratones BALB/c<sup>nu/nu</sup> utilizando la línea celular H125cpr y su control H125ct, evaluando:
    - i. Crecimiento tumoral en función del tiempo
    - ii. Formación de macrometástasis espontáneas
- 5. Estudiar retrospectivamente en muestras de pacientes con NSCLC y SCLC obtenidas del biobanco de tejidos del Instituto de Oncología “Ángel H Roffo” evaluando:
  - a. Expresión de receptores retinoides RARa, RARb y RARg
  - b. Expresión de genes pluripotenciales NANOG y OCT4

- c. Parámetros de las historias clínicas de los pacientes relacionados con la patología:
    - i. Antecedentes (comorbilidades, tabaquismo y otros tumores)
    - ii. Histología (tipo de cáncer de pulmón)
    - iii. Estadio
    - iv. Tipo de cirugía que recibieron
    - v. Uso de adyuvancia
    - vi. Sobrevida libre de enfermedad
    - vii. Sobrevida general
  - d. Correlación de la expresión de los genes nombrados en a y b y los parámetros clínicos listados en c
6. Estudiar en bases de datos de pacientes con NSCLC y SCLC *in silico* evaluando:
- a. Expresión de receptores retinoides RARa, RARb y RARg
  - b. Expresión de genes pluripotenciales NANOG, SOX2 y OCT4
  - c. Sobrevida general en relación con la expresión de los genes nombrados en a y b

# **Materiales y Métodos**

---

### **Líneas celulares y Condiciones de cultivo**

Se emplearon dos líneas celulares humanas derivadas de NSCLC: el carcinoma adenoescamoso NCI-H125 (CRL-5801) y el adenocarcinoma NIH-A549 (CCL-185). Además, para algunos estudios también se utilizó una línea murina de adenocarcinoma pulmonar LP07 (descrita originalmente en Bumashny et al 2004). La línea H125 fue cedida por el Laboratorio de Oncología Molecular de la Universidad Nacional de Quilmes, mientras que la línea A549 fue adquirida a la ATCC. La línea LP07 fue aislada de un tumor pulmonar espontáneo generado en el bioterio del Instituto de Oncología Ángel H. Roffo (Urtreger, 2001).

Para el cultivo en monocapa, las células H125 se mantuvieron en medio RPMI (Gibco™, 31800-014) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Internegocios S.A.) y 80 µg/ml de gentamicina (medio de cultivo completo). Las células A549 se cultivaron en medio DMEM alta glucosa (Gibco™, 12100-038) con la misma suplementación. Si bien esta línea se cultivaba originalmente en medio F-12K, fue progresivamente adaptada a DMEM alta glucosa mediante el aumento progresivo de dicho medio en reemplazo del F-12K. La línea LP07 se mantuvo en monocapa en medio MEM (Gibco™, 41500-067) suplementado con 10% de SFB.

Para los cultivos de oncoesferas, todas las líneas celulares fueron sembradas en baja densidad: 2.000 células/mL para A549, 5.000 células/mL para H125 y 20.000 células/mL para LP07. Los cultivos se realizaron en medio DMEM-F12 (Gibco™, 12400-016) en ausencia de SFB y suplementado con EGF 20 µg/ml (Promega™, G502A) y B27 2% (Gibco™, 17504-044). En el caso de las oncoesferas derivadas de A549, se agregó Carboximetilcelulosa (CMC) 0.7% para aumentar la densidad del medio de cultivo. Además, se generó un recubrimiento previo de agar 0.5% en DMEM-F12 a fin de evitar la adhesión celular y favorecer el crecimiento en suspensión. A los 7 días de cultivo se adicionó a cada pocillo conteniendo las oncoesferas en formación la mitad del volumen inicial de siembra de medio de cultivo suplementado. Los tratamientos se iniciaron cuando las oncoesferas alcanzaron un tamaño promedio de 50 µm, lo cual ocurre entre

los días 10 y 14 de cultivo. En el caso de las oncoesferas derivadas de H125 y LP07 no fue necesaria la adición de CMC. Dado que ambas líneas alcanzan un tamaño promedio de 50  $\mu\text{m}$  en menor tiempo (5-7 días), tampoco se requirió la suplementación adicional de medio a los 7 días post-siembra.

Todos los cultivos se cultivaron a 37°C en atmósfera humidificada y con 5% de CO<sub>2</sub> en el aire.

### **Generación de Líneas Resistentes a Cisplatino**

Las líneas celulares A549 y H125 se sometieron a tratamientos crónicos con Cisplatino (CDDP) con el fin de generar variantes resistentes al fármaco. En paralelo, se mantuvieron sus contrapartes no tratadas como control. En el caso de A549, las células se trataron con 4  $\mu\text{M}$  de CDDP durante 72 hs (IC<sub>50</sub> de la línea parental) una vez por semana, repitiendo el proceso durante 6 meses. Para H125, se aplicaron tratamientos semanales con 1  $\mu\text{M}$  de CDDP durante 72 hs (IC<sub>50</sub> de la línea parental) una vez por semana, repitiendo el proceso durante 3 meses. Una vez llegado ese punto, se escaló la dosis a 2  $\mu\text{M}$  de CDDP durante 72 hs (nueva IC<sub>50</sub> evaluada en ese período) continuando con este esquema durante 4 meses más. Todos los tratamientos fueron realizados en sus respectivos medios de cultivo, con 10% de SFB.

### **Determinación de la Viabilidad Celular**

#### **Ensayo de MTS**

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la viabilidad celular en monocapa, se sembraron 10.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos en condiciones estándar de cultivo. A las 24 hs de la siembra, las células se trataron con dosis crecientes del tratamiento, en presencia del medio usual de cultivo y 10% de SFB. Luego de 72 hs de tratamiento, el medio de cultivo es removido de la placa y las células se lavaron dos veces con buffer fosfato salino (PBS) durante 5 minutos para remover el remanente de SFB y del tratamiento. Posteriormente, se realizó una incubación a 37°C con una solución conteniendo de medio de cultivo:MTS:APS en relación

100:20:1. En cada placa se incluyeron cuatro pocillos sin células como blanco de la reacción. La lectura de absorbancia se realizó cada 20 minutos en un lector de placas (Biotek, Synergy LX multimode reader) a 492 nm, utilizando 620 nm de longitud de referencia.

#### Ensayo de APH

Para determinar la viabilidad celular en oncoesferas, se recolectaron en tubos cónicos de 15 mL. Para eliminar la Carboximetilcelulosa y los tratamientos, se realizaron 3 rondas de lavado con PBS seguidas de centrifugación a 300xg durante 10 minutos. Una vez descartado el último lavado, las oncoesferas se resuspendieron en buffer de APH conteniendo 2 mg/mL de *para-nitrofenol fosfato* (ETC international, 100878) en acetato de sodio 0.1 M pH 5,2 y tritón 0.1%. Se tomaron alícuotas de 100 µL y se colocaron en placas de 96 pocillos e incubaron en agitación dentro de una estufa a 37°C durante 3 a 4 hs en oscuridad. Una vez finalizada la incubación, se agregaron a cada pocillo 2 µL de NaOH 10 N para detener la reacción y desarrollar el color. Pequeñas alícuotas de los pocillos se revelaron a intervalos regulares para asegurarse de que la reacción no llegue a saturación y poder determinar el tiempo final óptimo de reacción. Para finalizar, las placas se agitaron durante 5 minutos más en oscuridad para homogenizar el contenido y las absorbancias se midieron a 405 nm en un lector de placas (Biotek, Synergy LX multimode reader).

#### Ensayo de Proliferación Celular

##### Monocapa

Para evaluar la proliferación celular en presencia de tratamiento, las células se sembraron en placas de 12 pocillos en presencia de medio completo, utilizando  $1,5 \times 10^5$  células A549 por pocillo o  $3,75 \times 10^5$  células H125 por pocillo. Luego de 24 hs el medio de cultivo fue reemplazado por medio completo suplementado con CDDP, ATRA o la combinación de ambos. El número de

células se evaluó luego de 24, 48 y 72 hs de tratamiento mediante recuento directo con cámara de Neubauer o por citometría de flujo.

#### Oncoesferas

Las oncoesferas fueron cultivadas según se describe en el apartado de *Líneas Celulares y Condiciones de Cultivo*. Cuando las oncoesferas alcanzaron un tamaño aproximado de 40  $\mu\text{m}$ , se tomaron fotos representativas de cada pocillo utilizando un microscopio invertido Axio Vert. A1 (Dehner SRL). El diámetro de las esferas se determinó mediante el software Image J, repitiéndose este procedimiento cada 48 hs a fin de evaluar su crecimiento en el tiempo.

#### Extracción de ARN

Para la extracción de ARN, las muestras (monocapa o oncoesferas) se lavaron con PBS y se lisaron con 0,5 o 1 mL de Tri Reagent® (Molecular Research Center, TR 118) según la cantidad de material. Los lisados se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Una vez recopiadas suficientes muestras, los homogenatos se centrifugaron a  $12.000\times g$  durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , recuperando el sobrenadante para eliminar restos celulares no disgregados o trazas de agar provenientes de las oncoesferas. Se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo por cada 1 mL de Tri Reagent®, se homogenizó durante 15 segundos y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a  $12.000\times g$  durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf, al cual se le agregaron 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol por cada 1 mL de Tri Reagent® utilizado inicialmente. Los tubos fueron mezclados por inversión, se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a  $12.000\times g$  durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante fue descartado y el pellet correspondiente al ARN, se lavó con 1 mL de etanol 75% frío, se resuspendió y se centrifugó a  $7.500\times g$  durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El pellet se dejó secar a temperatura ambiente o mediante una breve incubación a  $60^{\circ}\text{C}$ . El ARN se resuspendió en 10-30  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasas ( $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC) y se incubó durante 15 minutos a  $60^{\circ}\text{C}$ . La

concentración se determinó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) y su integridad se corroboró mediante una electroforesis en gel de agarosa 1%. Finalmente, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### **Transcripción Reversa**

Para la síntesis de ADNc, se empleó 1 µg de ARN total al que se agregaron 1 µL de buffer DNAsa 10X y 1 µL de DNAsa I (Productos Biológicos, EC09011601b). El volumen se completó hasta los 10 µL con agua libre de RNAsas (H<sub>2</sub>O-DEPC). Las muestras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la digestión de contaminantes de ADN. Luego se agregó 1 µL de EDTA 1 mM y se incubó 10 minutos a 65°C durante en un termociclador (Eppendorf, Mastercycler® personal) para inactivar la DNAsa. Luego, se le agregó 1 µL de hexámeros (Productos Biológicos, OA02012104), 2 µL de DNTPs 10 mM (Productos Biológicos, 1K010119022) y 1 µL de H<sub>2</sub>O DEPC. Las muestras se incubaron 5 minutos a 70°C y se agregó 1 µL de retrotranscriptasa MLV y 4 µL de Buffer 5X (Productos Biológicos, EC07012203). El programa de retrotranscripción consistió en 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 37°C y 5 minutos a 95°C. El ADNc resultante se almacenó a -20 °C.

### **Reacción en Cadena de Polimerasa en Tiempo Real (qPCR)**

Para realizar la qPCR se tomó una dilución 1/10 del ADNc en H<sub>2</sub>O DEPC y se utilizaron 2 µL por reacción, colocados en placas de PCR (Biorad, MLL9601). A cada pocillo se añadieron 8 µL de una mix conteniendo 5 µL de Buffer de reacción y enzima (TransStart® Green qPCR SuperMix), 0,8 µL de primers 10 µM y 2,6 µL de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas. Las placas se sellaron con film (Microseal® 'B' Seal, MSB1001), se centrifugaron brevemente y se colocaron en una termocicladora Biorad (CFX96™ Real Time PCR, BioRad™). El protocolo de amplificación consistió en:

1. 94°C durante 30 segundos
2. 94°C durante 5 segundos
3. 60°C durante 15 segundos
4. 72°C durante 10 segundos (lectura de fluorescencia)
5. Curva de Melting

Los pasos 2–4 se repitieron 40 ciclos.

La curva de melting consiste en un aumento gradual de la temperatura desde los 65°C hasta los 95°C a un ritmo de 0,5°C por cada 5 segundos, con lectura de fluorescencia en cada paso.

### Primers Utilizados

A continuación, detallo los primers utilizados en esta tesis para las PCR de tiempo real.

| Gen          | Forward                 | Reverse                   |
|--------------|-------------------------|---------------------------|
| YWHAZ        | AGCAGATGGCTCGAGAATACA   | CAAGAACTTTTCCAAAAGAGACAGT |
| NANOG        | ACCTATGCCTGTGATTTGTGGG  | GGGCTGTCCTGAATAAGCAGAT    |
| OCT4         | GAGAAGGAGAAGCTGGAGCAAAA | TATCCCAGGGTGATCCTCTTCT    |
| RAR $\alpha$ | GGTCGGCGATGGTGAGGGT     | TGGGCAAATACACTACGAACAACAG |
| RAR $\beta$  | GATTTCTACACTGCGAGTCCGTC | GTGGAGATGGGGGGCTTG        |
| RAR $\gamma$ | TCAAAGCTGCCTGCCTAGAT    | GTCGGAGAAGGTCATGGTGT      |

### Determinación de Ciclo Celular

Se sembraron 200.000 células A549 o 100.000 células H125 por placa de 60 mm en medio completo. Luego de 24 hs, el medio se reemplazó por medio fresco con los tratamientos correspondientes. Tras 48 hs de tratamiento, se recuperó y almacenó el medio condicionado. Las células se desprendieron utilizando Tripsina-EDTA (0,25% Tripsina, Sigma 1001277468; 0,075% EDTA), la cual fue inactivada utilizando el mismo medio condicionado.

Las células se centrifugaron a 300xg durante 5 minutos, se lavaron con 5 mL de PBS frío y se contaron con cámara de Neubauer, para finalmente repetir el proceso de centrifugación a 300xg

por 5 minutos. Luego de un segundo lavado y centrifugación, las células se resuspendieron en PBS a una concentración final de  $1 \times 10^6$  células/500  $\mu$ L. Finalmente, las células se fijaron adicionando 4,5 mL de etanol 70% frío agregado gota a gota en constante agitación para evitar la formación de aglomerados celulares. Estas suspensiones se mantuvieron 2 hs a 4°C para completar el proceso de fijación.

Posteriormente, las células se centrifugaron a 300xg por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavaron con 5 mL de PBS frío. Tras un nuevo ciclo de lavado y centrifugación, las células se resuspendieron en 500  $\mu$ L de una solución conteniendo 0,1% de Tritón® X-100, 50  $\mu$ g/mL de Ioduro de Propidio (IP, Santa Cruz, sc-3541) y 100  $\mu$ g/mL de ribonucleasa A (Productos Biológicos, EC08011801). Las muestras se incubaron durante 30 minutos en oscuridad. Como control de apoptosis se consideraron células tratadas con Etopósido 60  $\mu$ M, durante 48 hs. Como control técnico se utilizaron células controles, resuspendidas en una solución sin IP. Finalmente, las células se analizaron en un citómetro de flujo Accuri C6 plus (BD Biosciences) a baja velocidad para detectar la fluorescencia del IP intracelular.

### **Determinación de la Capacidad Clonogénica**

Se sembraron células en baja densidad en placas de 6 pocillos en presencia de medio completo (2.000 células por pocillo para H125 y 500 células por pocillo para A549 y LP07). A las 24 hs, el medio fue reemplazado por los respectivos tratamientos. Luego de 48 hs de incubación, las células se lavaron con PBS y se despegaron del sustrato utilizando 100  $\mu$ L de Tripsina-EDTA. Para inactivar y descartar la tripsina, se añadieron 0,9 mL de medio completo y se centrifugaron a 300xg durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 1 mL de medio completo para su recuento en cámara de Neubauer.

Posteriormente, las células se sembraron por duplicado en placas de 6 pocillos en una densidad de 250 células/mL, asegurando una distribución lo más homogénea posible. Luego de 7 días de

cultivo, se removió el medio, se realizó un lavado con PBS y las células se tiñeron con cristal violeta durante 10 minutos. El exceso de colorante se eliminó con agua y las placas se dejaron secar para proceder al recuento de colonias bajo el microscopio. Se consideró como colonia a los grupos de más de 10 células.

### **Ensayo de Migración Celular por Cierre de Herida**

Se generaron heridas de aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  de ancho con la punta de un tip de 200  $\mu\text{L}$  sobre monocapas confluentes, las cuales se fotografiaron bajo microscopio de contraste de fases antes y después de un tratamiento de 7 (H125) o 24 hs (A549) con CDDP, ATRA o su combinación.

El área de migración se cuantificó determinando el área libre de células en la herida original ( $T_0$ ) con relación al área libre de células luego del tratamiento ( $T_f$ ) para cada campo fotografiado. La capacidad migratoria porcentual se calculó como el cociente entre las áreas libres de células al tiempo inicial ( $T_0$ ) respecto al tiempo final ( $T_f$ ) x 100. Luego se relativizaron los valores a los respectivos controles.

### **Ensayo de Adhesión**

Monocapas subconfluentes fueron tratadas durante 48 hs con CDDP, ATRA o su combinación. Una vez finalizado el tratamiento, las células fueron desprendidas con Tripsina-EDTA, la cual se inactivó con medio suplementado con 10% SFB. Las suspensiones celulares se centrifugaron a 300xg durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en medio completo. Luego del recuento en cámara de Neubauer, se sembraron 200.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos, por triplicado.

Luego de 2 hs de adhesión, se realizó un lavado suave con PBS y se procedió a desprender las células adheridas con Tripsina-EDTA. La misma se volvió a inactivar con medio completo y se determinó el total de células en cámara de Neubauer.

### **Evaluación del tamaño y complejidad de las células por citometría de flujo**

Monocapas subconfluentes tratadas durante 48 hs con CDDP, ATRA o su combinación fueron desprendidas con Tripsina-EDTA e inactivadas con medio completo. Se realizó una centrifugación a 300xg durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en PBS. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Accuri C6 plus (BD Biosciences) a baja velocidad. Se graficó el SSC-A (complejidad interna) en función del FSC-A (tamaño celular) y se calculó la mediana poblacional para cada condición experimental.

### **Morfología nuclear y marcación de microfilamentos de actina**

Las células crecidas sobre cubreobjetos fueron tratadas por 48 hs con los distintos tratamientos, luego lavadas dos veces con PBS y se fijaron con PFA 4% por 10 minutos a temperatura ambiente. Se permeabilizaron con PBS-Tritón 0,1% y se bloquearon con PBS conteniendo 5% BSA durante 1 hs.

Para la marcación con faloidina-Alexa Fluor™ 546 (life technologies, A22283), se realizó una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con DAPI durante 10 minutos y los vidrios fueron montados sobre portaobjetos con líquido de montaje VectaShield® y sellados con esmalte. Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio invertido Axio Vert. A1 (Dehner SRL) y se procesaron usando el software ImageJ. La intensidad de señal nuclear fue medida tomando como área nuclear el solapamiento con DAPI. El área nuclear se determinó mediante un macro personalizado del ImageJ\*.

```

*
run("Open...");
do {
run("32-bit");
setAutoThreshold("Default dark");
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Fill Holes");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=1000-Infinity circularity=0.30-1.00 summarize add");
run("Revert");
waitForUser("Verifique que el ajuste sea correcto y presione OK para continuar.");
roiManager("Delete");
run("Open Next");
} while (1>0)

```

### Ensayo de Anexina V

Se sembraron 200.000 células A549 o 100.000 células H125 en placas de 60 mm en presencia de medio completo. A las 24 hs, el medio fue reemplazado por los respectivos tratamientos y las células se incubaron por 48 hs más. Finalizado el tratamiento, se recuperó el medio condicionado y se guardó adecuadamente. Las células fueron desprendidas con Tripsina-EDTA, la cual fue inactivada utilizando el mismo medio condicionado correspondiente a cada condición.

Las suspensiones celulares se centrifugaron a 300xg durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células se lavaron con 5 mL de PBS frío, se contaron en cámara de Neubauer y se realizó una segunda centrifugación. Una vez descartado el sobrenadante, los pellets se resuspendieron en Buffer Binding (51-66121E, BD pharmingen™) conteniendo 50 µg/mL de IP y una dilución 2,5/100 de Anexina V acoplada a FITC (51-65874X, BD pharmingen™), ajustando una concentración final de  $5 \times 10^5$  células/100 µL.

Las muestras se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se analizaron en un citómetro de flujo Accuri C6 plus (BD Biosciences) a baja velocidad. La fluorescencia intracelular del IP permitió identificar células con pérdida de integridad de membrana, mientras

que la fluorescencia de Anexina V-FITC permitió detectar la exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática, indicativa de apoptosis temprana.

### **Ensayo de gen reportero**

Células correspondientes a las distintas líneas se resuspendieron en medio de cultivo Opti-MEM™ (1105802, Gibco™) y se co-incubaron con los complejos de plásmidos preparados 15 minutos antes. Estos complejos constan de 25 µL de agente de transfección FuGENE® (Promega, E2311) 1 µg de plásmido RARE-Luc y 0,05 µg de plásmido Renilla-Luc en 100 µL de medio Opti-MEM™ por pocillo.

Una vez mezcladas las células con los complejos, se sembraron 50.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos. Tras 24 hs de incubación, se retiró el Opti-MEM™ y se comenzaron con los tratamientos con ATRA, CDDP o su combinación en el medio correspondiente en presencia de 10% SFB. Luego de 48 hs de tratamiento, se descartó el medio condicionado, se realizaron 2 lavados con PBS y las células se incubaron con 100 µL de Passive Lysis Buffer (E194A, Promega) en agitación por 15 minutos.

Para el análisis, se transfirieron 50 µL de Luciferase Assay Reagent II\* por pocillo en una placa de 96 pocillos y se añadieron 10 µL del lisado correspondiente. La bioluminiscencia se midió inmediatamente en un lector de placas (Biotek, Synergy LX multimode reader). Posteriormente, se añadieron 50 µL de Stop & Glo®\*\* por pocillo y realizó una segunda lectura para cuantificar la actividad de Renilla.

\*Luciferase Assay Reagent II: preparado a partir del sustrato Luciferase Assay Substrate (Promega, E151A) resuspendido en el buffer Luciferase Assay Buffer II (Promega, E195A).

\*\*Stop & Glo® Reagent: preparado a partir del sustrato Stop & Glo® Substrate (Promega, E64GA) diluido en Stop & Glo® Buffer (Promega, E641A).

**Western Blot**

Cultivos subconfluentes, correspondientes a las distintas líneas celulares, se trataron durante 48 hs con las distintas condiciones experimentales. Finalizado el tratamiento, las monocapas se lisaron en buffer RIPA en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa. Luego de la determinación de la concentración proteica mediante el método de Bradford, las muestras se separaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF.

Las membranas se bloquearon durante 1 hs con una solución conteniendo 5% de BSA en TBS-T (0,1% Tween-20) a fin de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos. Luego, las membranas se incubaron toda la noche con anticuerpos primarios anti-BAX (abcam, ab69643), anti-BCLxL (abcam, ab32370) y anti-Tubulina (Cell Signaling, 2146). Finalmente se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa anti-mouse IgG (R&D SystemS, código HAF007) y anti-rabbit IgG (R&D SystemS, código HAF008). La detección se realizó mediante quimioluminiscencia (ECL, Amersham) y las bandas se cuantificaron mediante el software Gel-Pro Analyzer.

**Análisis bioinformático**

Para el análisis bioinformático de muestras de pacientes se utilizó la base de datos de XENA (University of California). Se seleccionaron los tipos de cáncer: lung adenocarcinoma y lung squamous cell carcinoma provenientes de estudios de TCGA. Con los datos filtrados, evaluamos los niveles de expresión de los genes de interés y se construyeron curvas Kaplan-Meier basadas en la supervivencia global, dividiendo a los pacientes en dos cohortes según la mediana de expresión génica para cada tipo tumoral. Como comparación, también se realizó el mismo análisis utilizando muestras de pulmones no tumorales o de tejido pulmonar sano adyacente al tumor.

### **Muestras de pacientes**

Muestras de tejido derivadas de piezas removidas quirúrgicamente, de 21 pacientes con cáncer de pulmón fueron utilizadas para las determinaciones. Las mismas fueron cedidas por el Biobanco de Tumores del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”, Facultad de Medicina (FMED) de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Los pacientes incluidos en este protocolo fueron atendidos en la Unidad Funcional de Tumores Torácicos, que integra el Departamento de Oncología Clínica, Área Médica del mencionado centro monovalente; durante el período 2013-2021.

Las muestras se procesaron con se lisaron con 1 mL de Tri Reagent® (Molecular Research Center, TR 118) utilizando un homogenizador en hielo (Bio-Gen PRO200 Homogenizer, PRO Scientific Inc.). Una vez disgregado el material, el protocolo de extracción de ARN, retrotranscripción y RT-qPCR fue el mismo que el utilizado en las muestras provenientes de líneas celulares.

Los parámetros clínicos y anatomo-patológicos de la población estudiada se encuentran resumidos en la Tabla 2.

|                                                        |                                  | Md (rango) edad (años)  |           |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|-----------|
| Mujeres                                                |                                  | 64 (52-75)              |           |
| Hombres                                                |                                  | 64 (25-81)              |           |
| Promedio de tiempo de seguimiento: 48,6 (2-116) meses. |                                  |                         |           |
| Característica                                         |                                  | Número de Pacientes (%) |           |
| Sexo                                                   | Mujer                            | 12 (57,1)               |           |
|                                                        | Hombre                           | 9 (42,9)                |           |
| Grupo Etario (años)                                    | 25-60                            | 8 (38,1)                |           |
|                                                        | 61-90                            | 13 (61,9)               |           |
| Antecedentes Personales                                | Tabaquismo                       | Presencia               | Ausencia  |
|                                                        |                                  | 16 (76,2)               | 5 (23,8)  |
|                                                        | Comorbilidades                   | 15 (71,4)               | 6 (28,6)  |
|                                                        | Otros tumores malignos primarios | 7 (33,3)                | 14 (66,7) |
| Histología                                             | Ca. de células pequeñas.         | 5 (23,8)                |           |
|                                                        | Ca. de células no pequeñas.      | 13 (61,9)               |           |
|                                                        | Neuroendócrino.                  | 3 (14,3)                |           |
| Estadio                                                | I                                | 10 (47,6)               |           |
|                                                        | II                               | 8 (38,1)                |           |
|                                                        | III                              | 3 (14,3)                |           |
|                                                        | IV                               | 0                       |           |
| Tratamiento                                            |                                  |                         |           |
| Cirugía                                                | Lobectomía                       | 16 (76,2)               |           |
|                                                        | VATS                             | 5 (23,8)                |           |
| Adyuvancia                                             | Solo Quimio                      | 5 (23,8)                |           |
|                                                        | Solo Radio                       | 1 (4,8)                 |           |
|                                                        | Quimio + Radio                   | 5 (23,8)                |           |
|                                                        | No adyuvancia                    | 10 (47,6)               |           |
| Status de SLE                                          | Libre                            | 13 (61,9)               |           |
|                                                        | Recaído                          | 8 (38,1)                |           |
| Status de SG                                           | Vivo                             | 18 (85,7)               |           |
|                                                        | Fallecido                        | 3 (14,3)                |           |
| NANOG                                                  | Positivo                         | 11 (52,4)               |           |
|                                                        | Negativo                         | 10 (47,6)               |           |
| OCT4                                                   | Positivo                         | 11 (52,4)               |           |
|                                                        | Negativo                         | 10 (47,6)               |           |
| RARα                                                   | Positivo                         | 11 (52,4)               |           |
|                                                        | Negativo                         | 10 (47,6)               |           |
| RARβ                                                   | Positivo                         | 11 (52,4)               |           |
|                                                        | negativo                         | 10 (47,6)               |           |
| RARγ                                                   | Positivo                         | 11 (52,4)               |           |
|                                                        | Negativo                         | 10 (47,6)               |           |
| RARβ/ RARγ                                             | Positivo                         | 11 (52,4)               |           |
|                                                        | Negativo                         | 10 (47,6)               |           |

Tabla 2. Parámetros clínicos y anatomo-patológicos de la población de pacientes utilizada para el estudio.

La investigación se realizó de acuerdo con los principios expresados en la Declaración de Helsinki. El protocolo de trabajo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación (CEI) del Instituto Roffo.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Pacientes vírgenes de tratamiento al momento del depósito de la muestra en el Biobanco de tumores.
- Pacientes con cáncer de pulmón primario, incluyendo los distintos tipos histológicos.
- Pacientes mayores de 18 años.
- Pacientes de cualquier sexo y cualquier estadio tumoral.
- Disponibilidad de datos asociados a la muestra: clínicos, de anatomía-patológica, registro de tratamientos recibidos e información de seguimiento de los pacientes.

Se incluyeron 6/21 pacientes que padecieron otros tumores primarios, afectando órganos diferentes al pulmón, en un período previo (10-25 años) a la presentación del carcinoma pulmonar primario.

El tiempo promedio de seguimiento de esta población de pacientes con cáncer de pulmón fue de 48,6 (2-116) meses.

### **Historias Clínicas**

De la lectura de las historias clínicas se obtuvieron los diversos parámetros clínicos, de anatomía patológica, tratamientos indicados, respuesta a la terapia y evolución de los pacientes.

Los datos que se incorporaron a la base de datos fueron los siguientes: sexo, edad al diagnóstico del carcinoma pulmonar primario, hábito tabáquico, comorbilidades [metabolopatías (diabetes, obesidad), enfermedades endocrinológicas (hipotiroidismo), hipertensión arterial, afecciones

respiratorias en particular enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)], antecedentes de tumores malignos primarios previos, histología del tumor primario de pulmón, TNM (tamaño tumoral, número de ganglios linfáticos comprometidos por metástasis al momento de efectuarse la cirugía, metástasis a distancia al diagnóstico inicial), estos tres últimos datos se resumen en el estadio tumoral, tratamientos recibidos a causa del carcinoma pulmonar [(tipo de cirugía, terapias adyuvantes (radioterapia, quimioterapia ambas como monoterapias o combinaciones de las mismas)]. Se tuvo en consideración el estatus de la sobrevida libre de enfermedad (SLE) y el estatus de la sobrevida global (SG), en forma coincidente con el cierre del análisis efectuado.

Se consideró como SLE el tiempo transcurrido entre la ausencia de enfermedad posterior al diagnóstico del carcinoma pulmonar primario, determinada por imágenes y la reaparición de signos y/o síntomas, confirmados por el mismo método. La SG se determinó como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico del carcinoma primario de pulmón hasta la muerte del paciente, como consecuencia de la patología oncológica u otro motivo, o bien la última información registrada en la historia clínica.

Además, se recopilaron de las historias clínicas los resultados de todos los marcadores moleculares evaluados por el Servicio de Anatomía Patológica, mediante técnicas de inmunohistoquímica, PCR o FISH, según corresponda, en cada uno de los pacientes incluidos. Estos marcadores son: EGFR, Cromogranina A, Sinaptofisina, TIF1, PDL-1, ALK/EML4, Enolasa Neuronal Específica, GATA3, CD56, CKAE1/AE3, Ki67, CK7 y CK20. Sin embargo, no se incluyen las observaciones correspondientes en la tabla que enumera las características que definen a la población de pacientes estudiados (Tabla 2), debido a que cada marcador fue evaluado en menos del 50% del total de pacientes.

En el caso de los pacientes que sufrieron recaída o que progresaron, se incorporó el evento a la base de datos, constatando además: los tratamientos indicados, fecha de inicio y de culminación de cada uno de ellos, número de ciclos de quimioterapia y respuesta del paciente.

Todos los datos de los pacientes fueron inicialmente recogidos en una base de datos en Excel. Posteriormente los mismos fueron codificados. Esta base de datos codificada se importó al programa SPSS+ 21 para Windows, con el propósito de efectuar el análisis estadístico. Esto incluye el análisis de la correlación entre cada uno de los parámetros clínicos, de anatomía-patológica, tipo de cirugía y adyuvancia consignados en las historias clínicas, con el nivel transcripcional de NANOG, OCT4, RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$  y la relación RAR $\beta$ /RAR $\gamma$  medidos por RT-qPCR.

### **Análisis estadístico**

La relación de la expresión de NANOG, OCT4, RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$  y la relación RAR $\beta$ /RAR $\gamma$  a nivel ARNm con los distintos parámetros clínicos y anatomo-patológicos, se evaluó utilizando el test de Spearman's Rho. Diferencias de  $p < 0.05$  fueron interpretadas como estadísticamente significativas.

La SLE y la SG se analizaron empleando el método de Kaplan-Meier. En el análisis univariado se utilizó el Log-Rank Test para determinar el valor pronóstico de la expresión de cada uno de los genes evaluados. En el análisis multivariado de sobrevida se utilizó el Modelo de Regresión de Cox para evaluar el valor predictivo de cada una de las variables independientemente de las otras, considerándose como significativo un ( $p < 0,05$ ).

Para estos análisis se empleó el software SSPS+ (versión 10) para Windows.

## Experimentación *In vivo*

### Ratones

Para los ensayos *in vivo* con células LP07 se utilizaron ratones BALB/c machos y hembras, de 2 a 4 meses de edad, provenientes del Bioterio del Instituto “A. H. Roffo”. Para los ensayos *in vivo* con células H125 se utilizaron ratones BALB/c<sup>nu/nu</sup> machos, de 2 a 4 meses de edad, provenientes del Bioterio de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA). El agua y la comida fueron administrados *ad libitum*. Los animales fueron mantenidos de acuerdo con la “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” del NIH. Los protocolos aplicados cuentan con la aprobación del CICUAL institucional (protocolos N° 06/2023 y 06/2025).

### Preparación de pellets con ATRA

Para el tratamiento con ATRA *in vivo* se utilizó un pellet de liberación lenta implantado por vía subcutánea bajo anestesia general. Para la elaboración del pellet, se pesaron 80 mg de ATRA y se mezcló con FASTIX® hasta que quede una pasta homogénea. La mezcla se prensó entre dos vidrios para formar un cilindro de aproximadamente 1 mm de espesor, que se dejó secar. Una vez seco, se cortó en 8 fragmentos iguales, de forma de que cada uno de ellos contenga 10 mg de ATRA. Los pellets control se prepararon de la misma manera, pero sin el agregado de ATRA.

### Cirugía para colocación de los pellets con ATRA

Los animales se anestesian por vía intraperitoneal con Ketamina/Xilacina (120 mg/kg y 8 mg/kg respectivamente) con aguja 27G. Se realizó una pequeña incisión y divulsión del tejido subcutáneo para formar el bolsillo donde se colocan los pellets. Como medida de refinamiento se administró lidocaína en forma subcutánea en la zona de colocación de pellet (Lidocaína al 2% sin epinefrina, 0.01 mL, con aguja 27G y jeringa de 1 mL). Tras la implantación en la región dorsal, la herida se suturó. Para una mejor recuperación del plano anestésico, se utilizó una

cámara de recuperación a 28°C y se administró analgesia postoperatoria mediante 100 µL de tramadol (6,25 mg/mL) por vía subcutánea.

### **Ensayo de portación tumoral**

Se inocularon 200.000 células LP07 por vía subcutánea en el flanco izquierdo de ratones BALB/c en medio MEM sin SFB ni antibiótico con una aguja de 25G. Cuando el tumor resultó palpable (7 días luego de la inoculación) los ratones fueron aleatorizados y se realizó la cirugía para implantar el pellet de FASTIX® con o sin ATRA. Luego de 24 hs se comenzó con el tratamiento intraperitoneal (i.p.) con cisplatino (2 mg/kg), administrado 2 veces por semana durante todo el experimento. Con cada administración, se registró el volumen tumoral y el peso de los animales. El volumen tumoral es calculado con la siguiente formula:  $vol = 0,4 \times L \times l^2$ , donde L es la longitud mayor del tumor y l es la menor (Kisseleva, 2011). A los 24 días luego de la inoculación, se realizó la eutanasia de los animales por dislocación cervical y se extrajeron tumores y pulmones para análisis histológicos y recuento de metástasis espontáneas en pulmón. Los pulmones se fijaron en Bouin y se cuantificaron bajo lupa el número y tamaño de las macrometástasis. Los tumores se fijaron en formol neutro, deshidrataron y procesaron para inclusión en parafina.

Para evaluar si el efecto del tratamiento combinado resultó sinérgico, se evaluaron las fracciones de volúmenes tumorales (FVT), siendo la misma el cociente entre el volumen tumoral observado para un determinado grupo experimental y el volumen tumoral observado para el grupo control, para cada día evaluado. Para el caso del grupo de tratamiento combinado (ATRA + Cisplatino) se calculó la FVT observada y esperada, calculada como el producto de las FVT de los dos tratamientos simples. El producto de la FVT observada con la FVT esperada nos brinda un número que si es mayor a 1 implica que el efecto del tratamiento combinado es sinérgico, mientras que si es menor a 1 implica que el efecto del tratamiento combinado es menos que aditivo (Yokohama, 2000).

**Ensayo de metástasis experimentales con células derivadas de oncoesferas**

Los animales se aleatorizaron y se inició el protocolo para la implantación del pellet de ATRA. Tras 24 hs se comenzó con el tratamiento con cisplatino (2 mg/kg i.p., tres veces por semana). Luego de 48 hs de la primera dosis, se inocularon por vía intravenosa 7.500 células provenientes de oncoesferas de LP07 (11 días de cultivo) por la vena de la cola con una aguja de 25G.

A los 21 días, se realizó la eutanasia de los ratones y se extrajeron los pulmones para análisis histológicos y recuento de metástasis. Los pulmones se fijaron en Bouin y se cuantificó bajo lupa el número y tamaño de las macrometástasis. Luego los pulmones se procesaron para inclusión en parafina y tinción H&E, con el fin de evaluar micrometástasis.

**Ensayo de portación tumoral en ratones inmunodeficientes**

Se inocularon  $1 \times 10^6$  células H125 por vía subcutánea en el flanco izquierdo de ratones BALB/c<sup>nu/nu</sup> en medio RPMI sin SFB ni antibiótico con una aguja de 25G. A los 4 días, todos los animales presentaron un tumor palpable. Los ratones fueron aleatorizados y, 24 hs después, se comenzó con el tratamiento intraperitoneal con cisplatino (2 mg/kg, i.p., dos veces por semana). En cada aplicación se registraron el volumen tumoral y el peso corporal. El volumen tumoral se calculó mediante la fórmula mencionada previamente.

Luego de 24 días, los animales se eutanasiaron por dislocación cervical y se extrajeron tumores y pulmones para análisis histológicos y recuento de metástasis espontáneas. Los pulmones se fijaron en Bouin y se cuantificó bajo lupa el número y tamaño de las macrometástasis. Los tumores se disgregaron mecánica y enzimáticamente (pronasa-DNasa en medio DMEM F-12). Luego de 30 minutos en agitación, se cuantificaron las células en cámara de Neubauer. Se sembraron números decrecientes de células (de 400 a 6 células/pocillo) en placas de 96 pocillos recubiertas con agar en medio específico para oncoesferas (ver apartado “Líneas celulares y Condiciones de cultivo”). A los 7 días se registró la formación de oncoesferas y se estimó la

frecuencia de células madre tumorales mediante el software ELDA (<https://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>).

### **Análisis estadísticos**

Todos los experimentos *in vitro* fueron realizados por triplicado y repetidos al menos dos veces. La significancia estadística de los datos obtenidos fue evaluada usando Test-T pareado de dos colas en los casos de dos grupos y ANOVA de una vía con correcciones post-hoc para tres grupos o más. Para la experimentación *in vivo*, se utilizaron Test no paramétricos (Test Kruskal-Wallis) para el análisis de las metastasis y ANOVA de dos factores para evaluar diferencias en los volúmenes tumorales. Los valores con P por debajo de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Todas las imágenes presentadas son representativas de al menos dos experimentos independientes.

# Resultados



## **1. Caracterización de los modelos celulares de Cáncer de Pulmón en el contexto de quimioresistencia - Experimentación *in vitro* e *in vivo***

### **1.1. Generación de los modelos celulares**

#### **1.1.1. Características de la línea A549**

Para el desarrollo de esta tesis doctoral se utilizó la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas humana A549. Esta línea celular fue originalmente aislada a partir de tejido pulmonar de un hombre de 58 años diagnosticado con adenocarcinoma pulmonar (Figura 3).

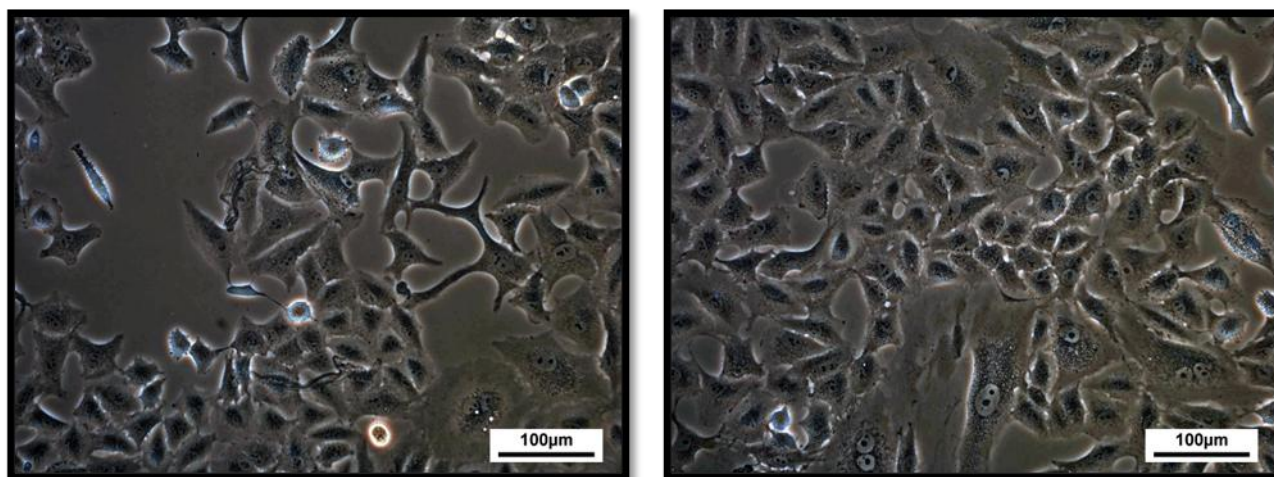


Figura 3. Fotos representativas de la línea A549 parental en condiciones de baja y alta confluencia. Aumento: 200X; barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

#### **Generación de la variante A549 resistente a CDDP**

A partir de la línea A549 parental se había generado en el laboratorio una variante resistente a CDDP (A549cpr) siguiendo un protocolo descrito en la bibliografía (Barr, 2013). Dicho protocolo consistió en la exposición de las células a pulsos semanales de 72 hs con 4  $\mu\text{M}$  de CDDP. Durante el desarrollo de esta tesis, se corroboró de manera periódica la  $\text{IC}_{50}$  con el fin de confirmar el mantenimiento de la resistencia adquirida. Asimismo, se sostuvo la presión de selección mediante los pulsos semanales de 72 hs con CDDP, tal como esquematiza la Figura 4A. Luego de seis meses de aplicar este procedimiento, se determinaron las  $\text{IC}_{50}$  tanto para la

línea control (A549ct), mantenida en cultivo en ausencia de CDDP, como de la línea resistente (A549cpr). Se observó que la  $IC_{50}$  de la variante resistente fue aproximadamente 2,5 veces mayor a la correspondiente a la línea control (Figura 4B), confirmando la estabilidad del fenotipo resistente. Adicionalmente, se tomaron registros fotográficos de cada una de las sublíneas en cultivo a fin de documentar la citoarquitectura de cada monocapa (Figura 4C).

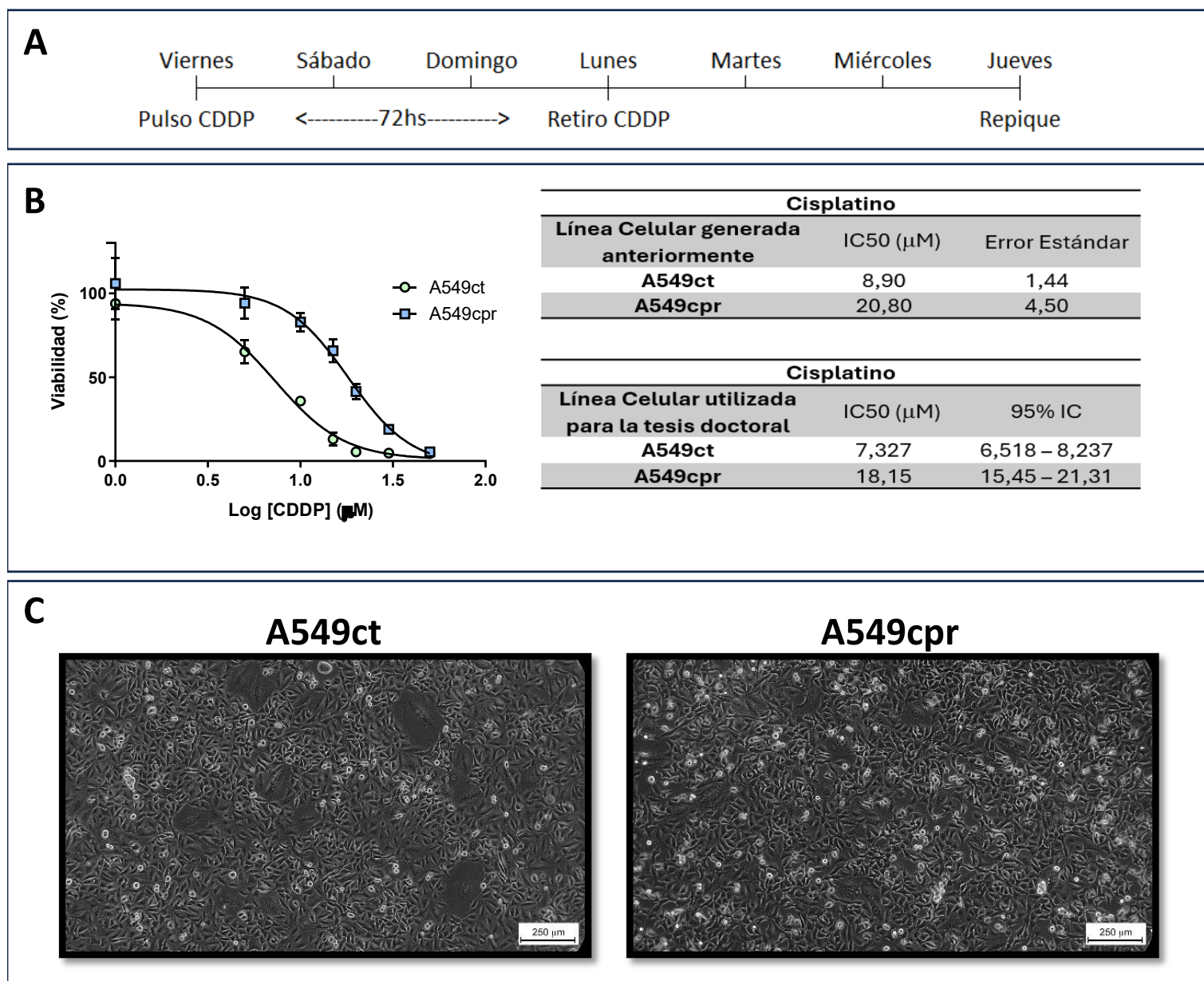


Figura 4. (A) Esquema de tratamiento con CDDP utilizado para el mantenimiento de la línea resistente. (B) Curva dosis-respuesta frente al cisplatino para las líneas celulares A549ct y A549cpr calculada a 72 hs y tabla de  $IC_{50}$  determinada al inicio de esta tesis doctoral utilizando

el software GraphPad Prism 8. N=4 (C) Fotografías representativas del cultivo en monocapa de células A549ct (izquierda) y A549cpr (derecha). Aumento: 400X; barra de escala: 250  $\mu\text{m}$ .

### 1.1.2. Características de la línea H125

Para el desarrollo de esta tesis doctoral también se utilizó la línea humana de cáncer de pulmón de células no pequeñas humana NCI-H125. Esta línea fue aislada de tejido pulmonar de un hombre de 61 años diagnosticado con un carcinoma adenoescamoso (Figura 5).

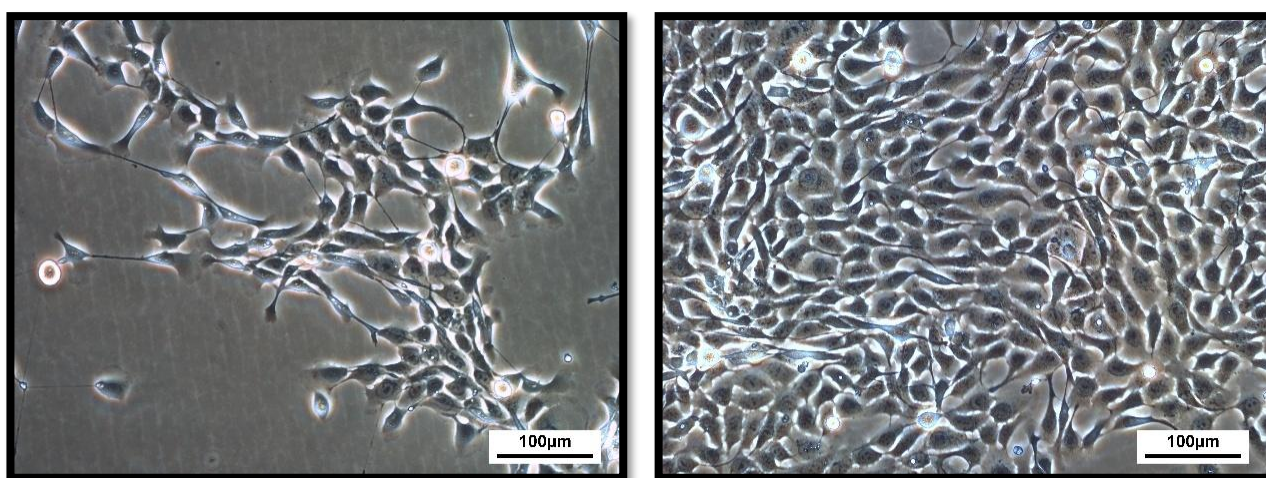


Figura 5. Fotos de la línea H125 parental en condiciones de baja y alta confluencia. Aumento: 200X; barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

### Generación de la variante H125 resistente a CDDP

A partir de la línea celular NCI-H125 parental se generó una variante resistente a CDDP siguiendo, en una primera etapa, el mismo protocolo empleado previamente para la línea A549. Durante este proceso se realizaron ensayos de MTS de forma periódica con el fin de determinar las  $\text{IC}_{50}$  y monitorear la adquisición del fenotipo resistente. Sin embargo, tras cinco meses de tratamiento con los pulsos semanales de 72 hs con 1  $\mu\text{M}$  de CDDP no se observaron diferencias significativas en la  $\text{IC}_{50}$  de la variante tratada respecto de la línea control. En función de estos resultados se decidió modificar el esquema y, en una segunda etapa, las células fueron

expuestas a pulsos semanales de 72 hs de 1  $\mu\text{M}$  de CDDP durante 3 meses, para luego escalar la dosis a 2  $\mu\text{M}$  de CDDP durante 4 meses más, con el objetivo de inducir una resistencia mayor con una diferencia significativa entre las  $\text{IC}_{50}$  parentales y las células resistentes (Figura 6A y B). Al finalizar este protocolo, la variante resistente a CDDP (H125cpr) presentó una  $\text{IC}_{50}$  de 7,649  $\mu\text{M}$  (IC 95%: 6,733-8,691  $\mu\text{M}$ ), mientras que la variante sensible (H125ct), cultivada en paralelo, mostró una  $\text{IC}_{50}$  de 1,296  $\mu\text{M}$  (IC 95%: 1,667-2,224  $\mu\text{M}$ ) (Figura 6C). De este modo, la  $\text{IC}_{50}$  de la variante resistente resultó aproximadamente cuatro veces mayor a la de la línea control. De forma análoga a lo realizado con A549, se tomaron registros fotográficos de las monocapas en cultivo como referencia morfológica (Figura 6D).

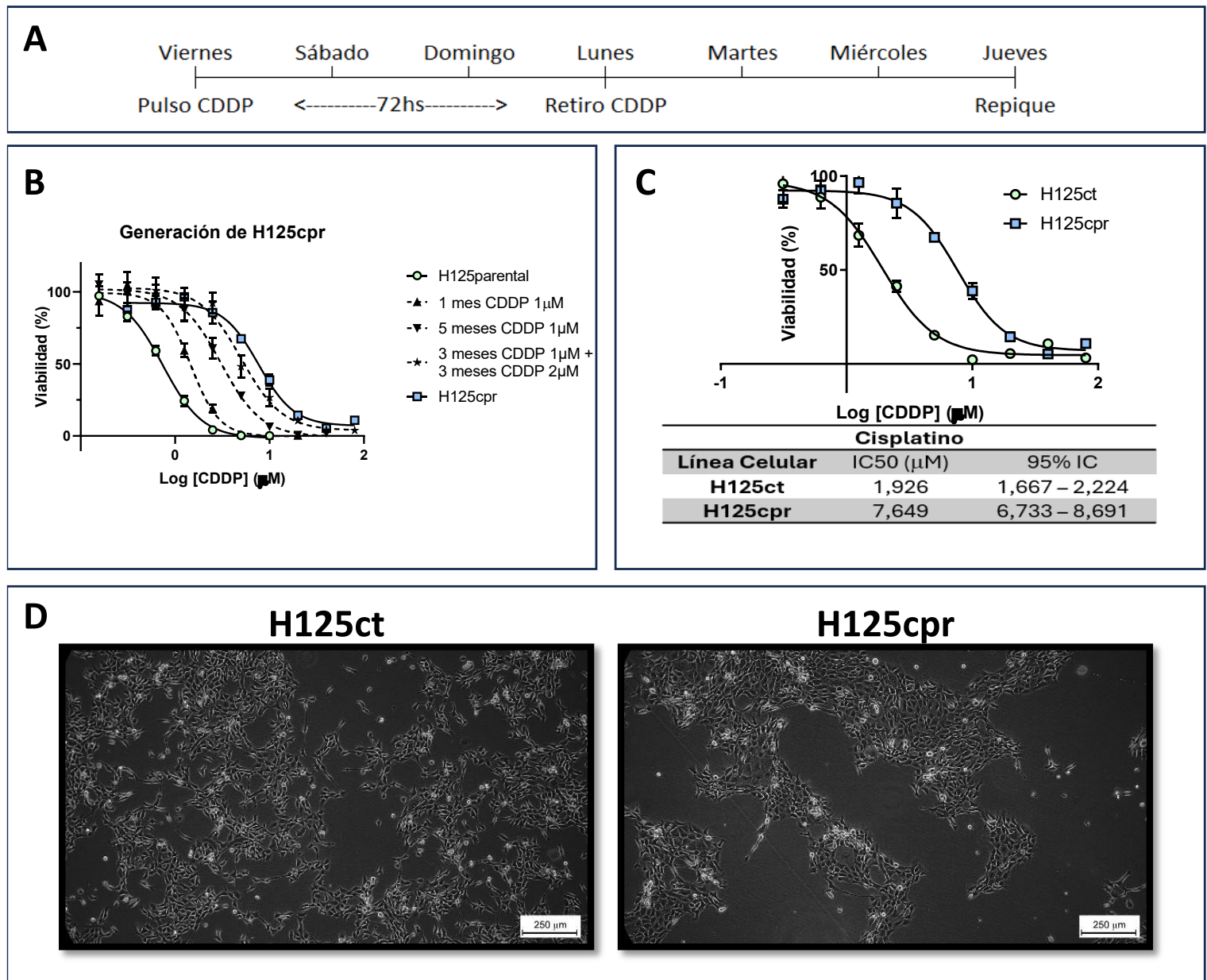


Figura 6. (A) Esquema de tratamiento con CDDP para el mantenimiento de la línea resistente. (B) Curva dosis-respuesta frente al cisplatino obtenidas durante la generación de la resistencia calculadas a 72 hs. (C) Tabla de IC<sub>50</sub> calculada para las líneas celulares H125ct y H125cpr utilizando el software GraphPad Prism 8. N=4 (D) Fotografías representativas del cultivo en monocapa de H125ct (izquierda) y H125cpr (derecha). Aumento: 400X; barra de escala: 250  $\mu\text{m}$ .

## **1.2. Comparación de las líneas parentales y sus variantes resistentes**

### **1.2.2. Evaluación de parámetros relacionados al crecimiento celular**

#### **Estudio de la proliferación celular**

Con el objetivo de evaluar el crecimiento de las líneas celulares resistentes a CDDP se realizaron ensayos de proliferación. Para ello, las células A549 fueron sembradas en baja densidad y se cuantificó el número de células viables a lo largo del tiempo (Figura 7). Observamos que la variante resistente A549cpr presenta una tasa de crecimiento menor que su variante sensible, con un tiempo de duplicación mayor (19,14 hs para A549cpr vs 15,93 hs para A549ct) (Figura 7A). El tratamiento con CDDP produjo un efecto significativamente menor sobre la proliferación de A549cpr, consistente su fenotipo resistente (Figura 7B).

Análogamente, en la variante resistente H125cpr, el tiempo de duplicación poblacional también fue ligeramente mayor que la línea control (17,42 hs para H125cpr vs 16,01 hs para H125ct) (Figura 7C). Sin embargo, en este caso, la dosis de CDDP testeada no produjo cambios significativos en la tasa proliferativa de H125cpr, mientras que indujo una disminución de la proliferación en la línea control H125ct (Figura 7D), lo que sugiere un mayor grado de resistencia al quimioterápico en esta sublínea.

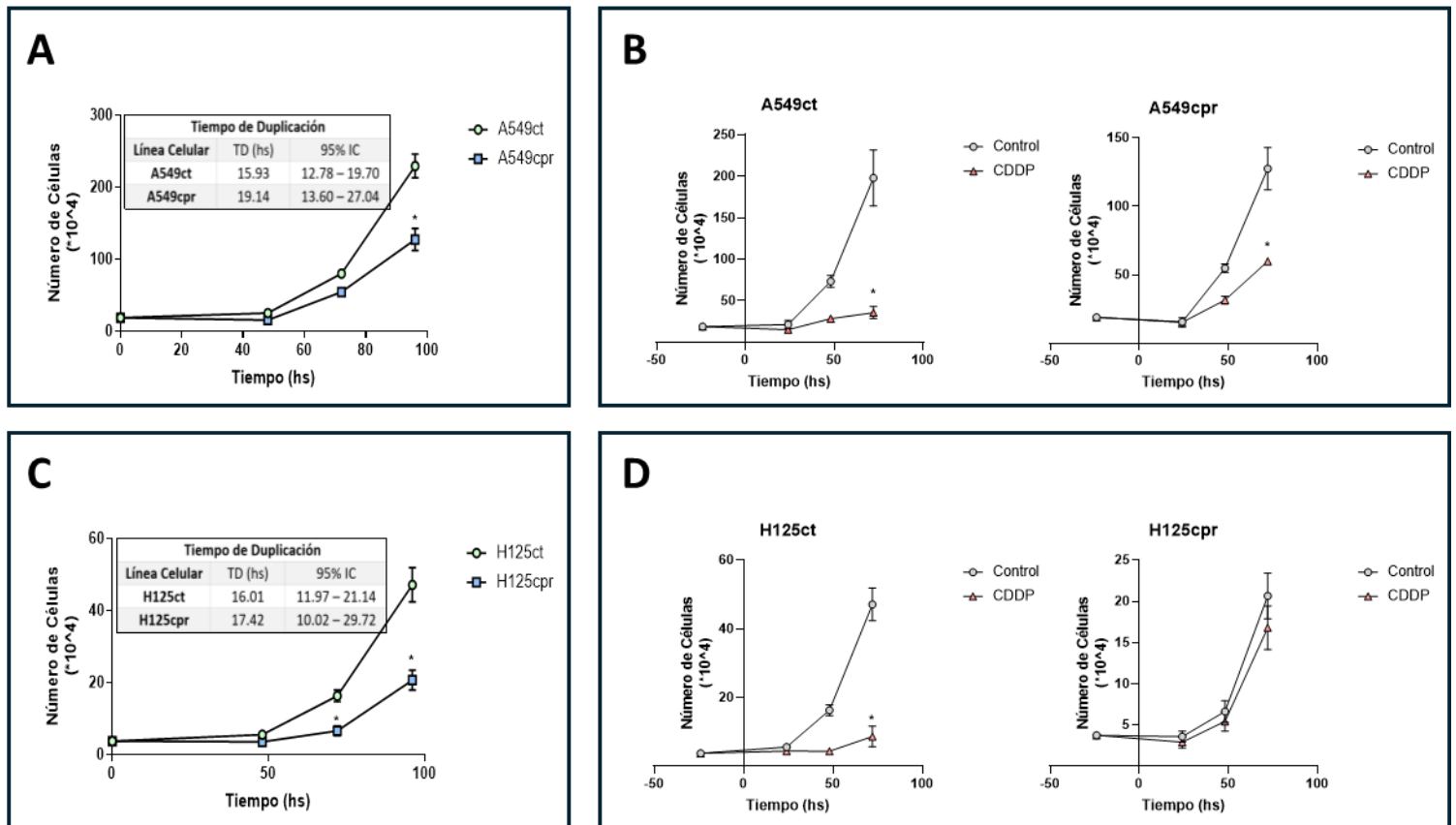


Figura 7. Curvas de proliferación en condiciones basales de cultivo para A549ct y A549cpr (A), en presencia o ausencia de 4  $\mu$ M de CDDP para A549ct y A549cpr (B), en condiciones basales de cultivo para H125ct y H125cpr (C) y en presencia o ausencia de 1  $\mu$ M de CDDP para H125ct y H125cpr (D). \* $p < 0,05$  con respecto al control. ANOVA de dos factores. N=3.

#### Estudio de la distribución del Ciclo Celular

En conjunto con el análisis de proliferación, se estudió la distribución poblacional del ciclo celular en las distintas líneas celulares. Para ello las células fueron fijadas con etanol 70%, teñidas con ioduro de propidio y analizadas por citometría de flujo (Figura 8). El análisis reveló que las líneas celulares resistentes a CDDP (A549cpr y H125cpr) no presentan diferencias significativas en la distribución de las fases del ciclo celular con respecto a sus variantes sensibles. Estos resultados indican que la disminución observada en la tasa proliferativa de las variantes resistentes no se asocia a un arresto en una fase específica del ciclo celular.

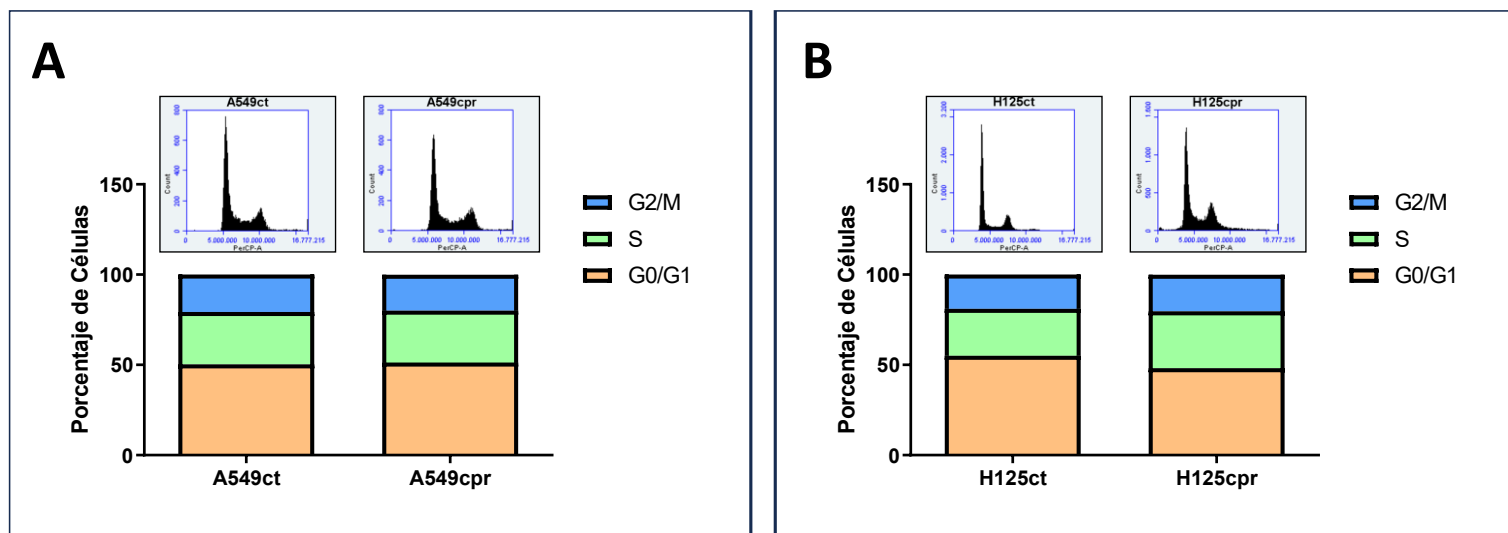


Figura 8. Distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular determinada por citometría de flujo mediante tinción con ioduro de propidio. Se muestran histogramas representativos para cada condición. (A) A549. (B) H125. ANOVA. N=4.

### 1.2.3. Evaluación de parámetros relacionados a la progresión tumoral

Para evaluar el efecto de la resistencia a CDDP sobre parámetros asociados a la progresión tumoral, se realizaron ensayos que nos permiten evaluar la capacidad migratoria, adhesiva y clonogénica de las líneas celulares sensibles o resistentes.

#### Estudio de la capacidad migratoria

La capacidad migratoria fue evaluada mediante un ensayo de cierre de herida, realizado sobre monocapas subconfluentes de las cuatro líneas celulares evaluadas. Observamos que la línea H125cpr presenta una capacidad migratoria menor que su variante sensible (Figura 9B), efecto que no llega a ser significativo en las sublíneas de A549 (Figura 9A). Cabe destacar que la línea A549ct no mostró capacidad de cierre de la herida dentro de las 18 hs de análisis, mientras que la línea H125ct mostró una elevada capacidad migratoria, logrando el cierre completo de la herida en aproximadamente 7 hs.

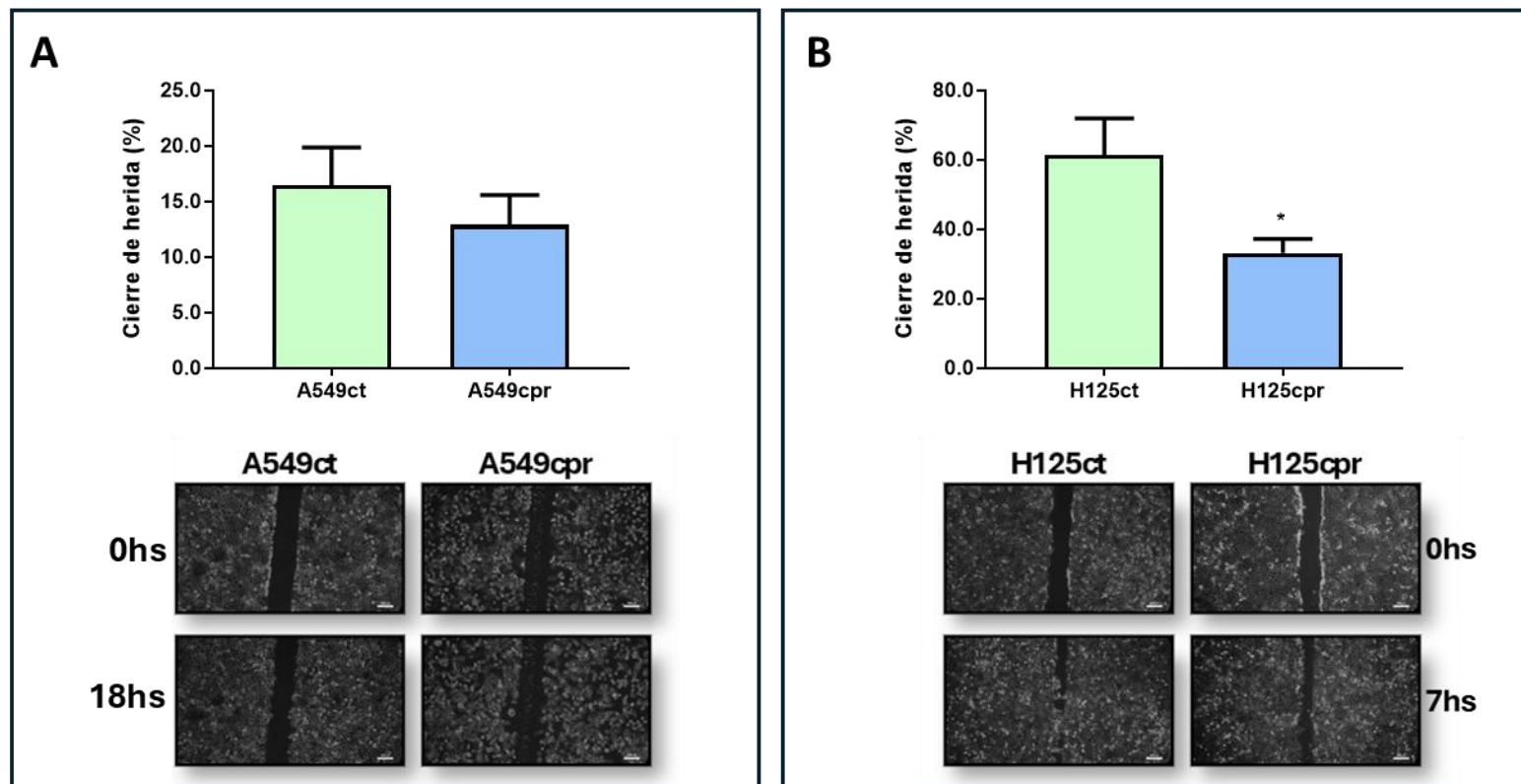


Figura 9. Área migrada evaluada por ensayo de cierre de herida para las líneas A549 (A) y H125 (B), expresada como porcentaje de cierre con respecto al tiempo inicial. El tiempo final del análisis fue de 18 hs para A549 y de 7 hs para H125. Debajo de cada histograma se incluyen fotos representativas del ensayo. Aumento: 200X; barra de escala: 250  $\mu$ m. \*p<0,05 con respecto al control. T Test. N=4.

#### Estudio de la capacidad adhesiva

La capacidad adhesiva se evaluó sembrando células en placas de 6 pocillos e incubándolas durante 2 hs en estufa gaseada. El porcentaje de adhesión se calculó a partir del recuento celular directo. Observamos que la línea A549cpr presenta una capacidad adhesiva significativamente menor que su variante sensible (Figura 10A). En contraste, las líneas H125 exhibieron una baja capacidad adhesiva basal sin observarse diferencias entre la variante sensible y la resistente (Figura 10B).

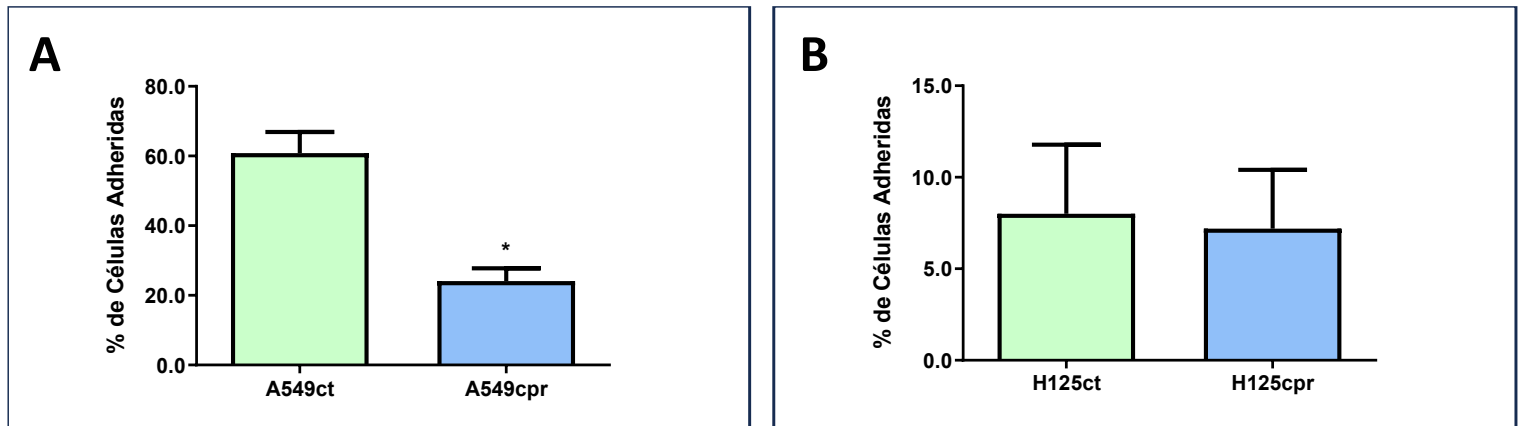


Figura 10. Capacidad adhesiva celular expresada como porcentaje (células adheridas/células sembradas) para A549 (A) y H125 (B). \* $p < 0.05$ , con respecto al control. T Test. N=4.

#### Estudio de la capacidad clonogénica

La capacidad clonogénica fue evaluada mediante ensayos de formación de colonias en baja densidad. Observamos que la línea A549cpr no fue capaz de formar colonias bajo las condiciones experimentales, a diferencia de su variante sensible (Figura 11A). Por el contrario, la línea H125cpr mostró una capacidad clonogénica significativamente mayor en comparación con H125ct (Figura 11B).

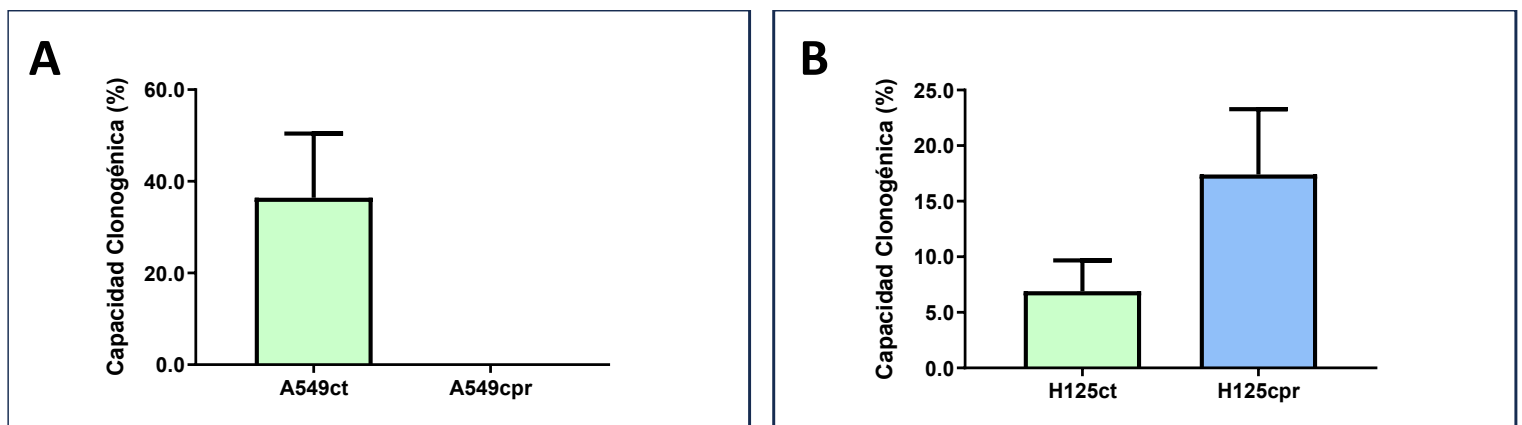


Figura 11. Capacidad clonogénica expresada como porcentaje (colonias formadas/número de células sembradas) para A549 (A) y H125 (B). T Test. N=4.

#### 1.2.4. Estudio del tamaño y complejidad celular

##### Morfología celular

Con el objeto de profundizar en la caracterización morfológica de las líneas celulares, se analizaron parámetros asociados a la morfología de las células creciendo en monocapa.

En primer lugar, evaluamos el tamaño y complejidad celular mediante el análisis de los parámetros de dispersión frontal (FSC-A) y lateral (SSC-A) obtenidos por citometría de flujo (Figura 12). No se observaron diferencias en las líneas A549 en ninguno de los dos parámetros (Figura 12A). Sin embargo, la línea H125cpr presenta mayor complejidad celular con respecto a H125ct, evidenciada por un aumento en la mediana poblacional del parámetro SSC-A, sin modificaciones en el tamaño celular (Figura 12B).

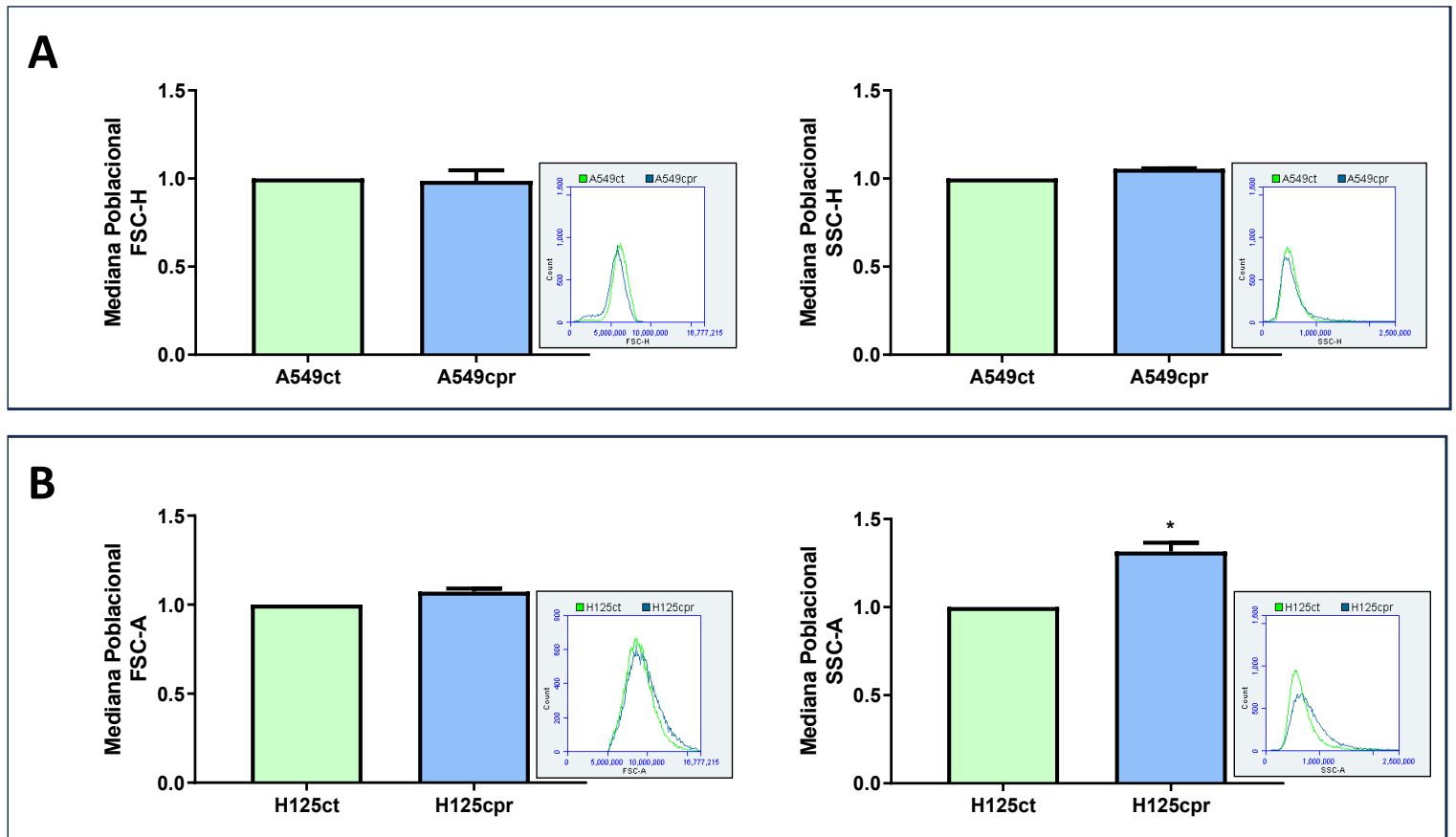


Figura 12. Tamaño y complejidad celular evaluados como la mediana poblacional de FSC-H y SSC-A respectivamente. Los datos se expresan como veces de la línea celular sensible. A la derecha de cada gráfico se muestran histogramas representativos del número de células en función del parámetro evaluado (FSC-H o SSC-A) para cada línea celular estudiada. \* $p < 0,05$  con respecto al control. A549 (A) y H125 (B). T Test. N=2.

#### Estudio del tamaño nuclear y de fragmentos citoplasmáticos de la cromatina

Se evaluaron el tamaño nuclear y la presencia de fragmentos citoplasmáticos de la cromatina (CCF) en cada una de las líneas celulares. Para ello, las células se cultivaron sobre pequeños vidrios positizados, fijadas y teñidas con DAPI para ser evaluadas bajo microscopia de epifluorescencia, tomando registros fotográficos bajo luz ultravioleta.

El área nuclear de cada célula presente en el campo fue determinada mediante el análisis de las microfotografías utilizando el software Image J. Adicionalmente, se cuantificó el porcentaje de células que presentaban CCF (Figura 13).

Observamos que H125cpr presenta un tamaño nuclear mayor que su variante sensible, efecto que no se observa en los núcleos de las A549 (Figura 13A y B). Al analizar el porcentaje de células con cariomegalia, se observó que en el modelo A549, la variante resistente a CDDP presenta tres veces menos células con esta característica que su línea sensible. Por el contrario, en el modelo H125, la variante resistente presenta hasta seis veces más células con cariomegalia respecto de su control (Figura 13A y B). Además, las líneas resistentes a CDDP presentan un mayor número de células con CCF respecto a sus variantes sensibles. Esta característica es consistente en ambos modelos celulares.

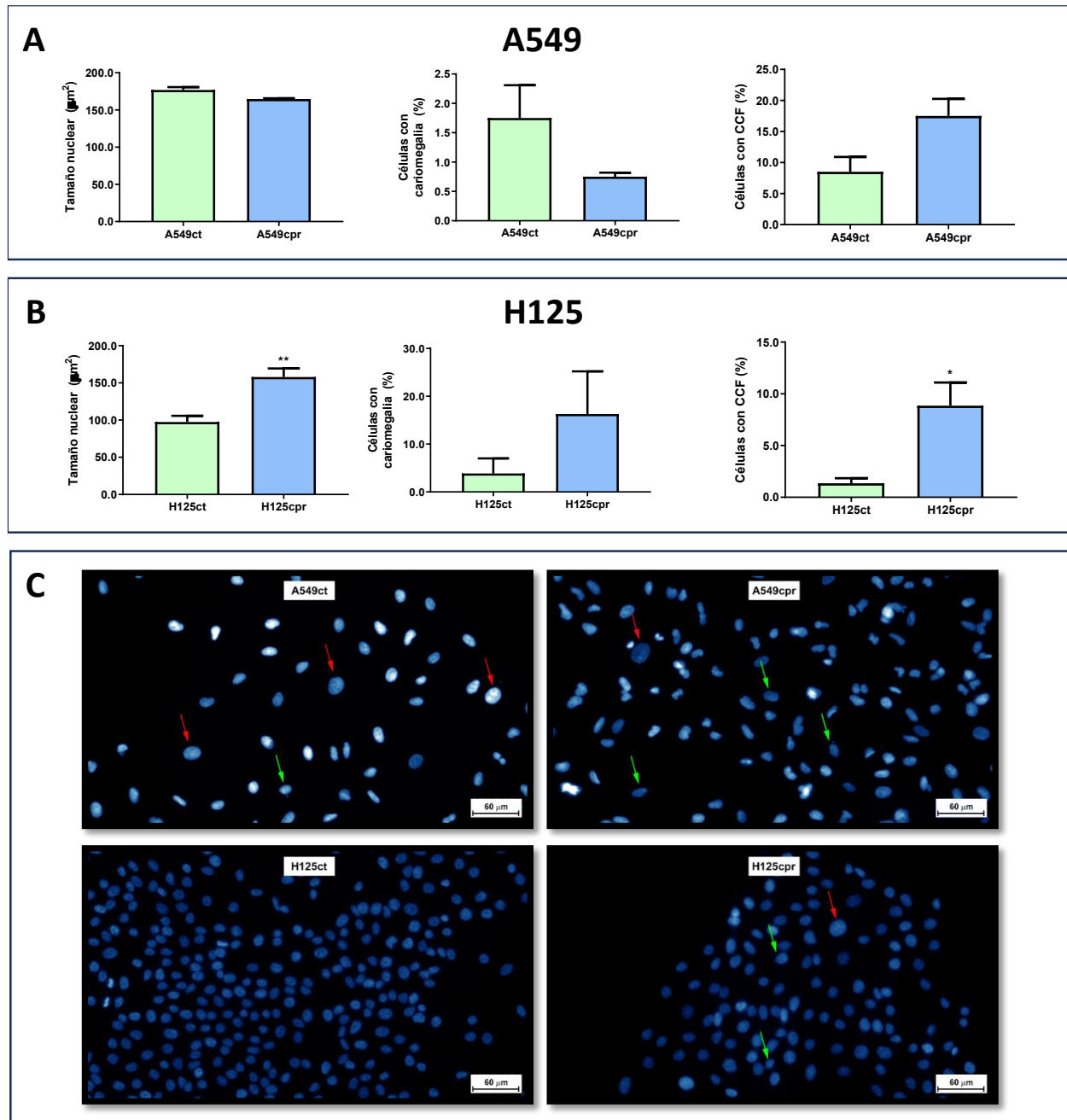


Figura 13. Tamaño nuclear y fragmentos citoplasmáticos de la cromatina. Morfología nuclear evaluada por tinción con DAPI para A549 (A) y H125 (B). En (C) se muestran imágenes representativas indicando células con cariomegalia (flechas rojas) y células con fragmentos citoplasmáticos de la cromatina (flechas verdes). Aumento: 400X; barra de escala: 60 µm. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  con respecto al control. T Test. N=2 para A549 y N=4 para H125.

### Estudio del citoesqueleto de Actina

Como parte de la caracterización morfológica, se analizó la organización del citoesqueleto de actina en las líneas celulares estudiadas. Para ello, las células fueron cultivadas sobre vidrios positivizados y luego incubados con Faloidina acoplada a Alexa Fluor™ 546. El análisis se realizó mediante microscopía de epifluorescencia tomando registros fotográficos representativos (Figura 14). La línea A549ct presenta la actina organizada tanto corticalmente como en fibras de estrés, mientras que A549cpr mostró una menor abundancia de estas fibras (Figura 14A). En contraste, las líneas H125 exhibieron un patrón inverso: mientras en H125ct predominan las células con actina organizada de forma cortical y con pocas fibras de estrés, en H125cpr hay mayor porcentaje de células con fibras de estrés. También se evidenció una mayor superficie de contacto célula-célula en H125cpr en comparación con su variante sensible (Figura 14B).

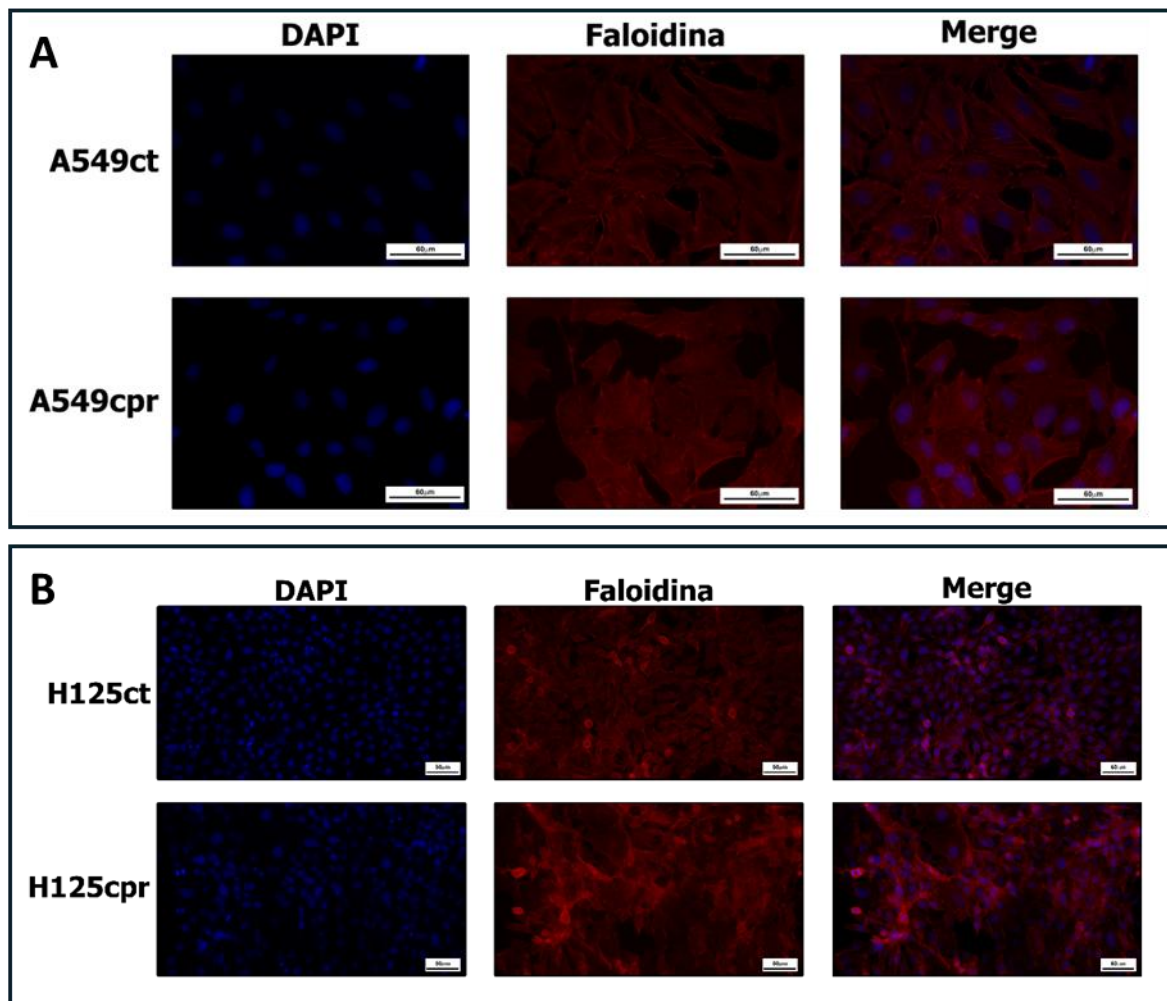


Figura 14. Imágenes representativas de A549 (A) y H125 (B) teñidas con DAPI para visualizar los núcleos y faloidina conjugada a Alexa Fluor™ 546 para la detección de microfilamentos de actina. Aumento: 600X para A549 y 400X para H125; barra de escala: 60  $\mu$ m.

#### 1.2.5. Estudio de la presencia de Células Madre Tumorales (CSC)

##### Expresión de genes asociados a pluripotencialidad en monocapa

Con el objetivo de profundizar el análisis de los modelos celulares en el contexto de la quimioresistencia, se evaluó por RT-qPCR la expresión de genes asociados a pluripotencialidad NANOG y OCT4 de las variantes de las líneas A549 y H125 (Figura 15). Observamos que en ambos modelos celulares resistentes a CDDP se observa una disminución de NANOG en comparación con los respectivos controles (no significativa en H125). En cuanto a OCT4, los niveles de

expresión mostraron un comportamiento dependiente de la línea celular. No se observaron cambios en las monocapas de A549, mientras que H125cpr presentó un nivel mayor de expresión de este gen, sin alcanzar significancia estadística.

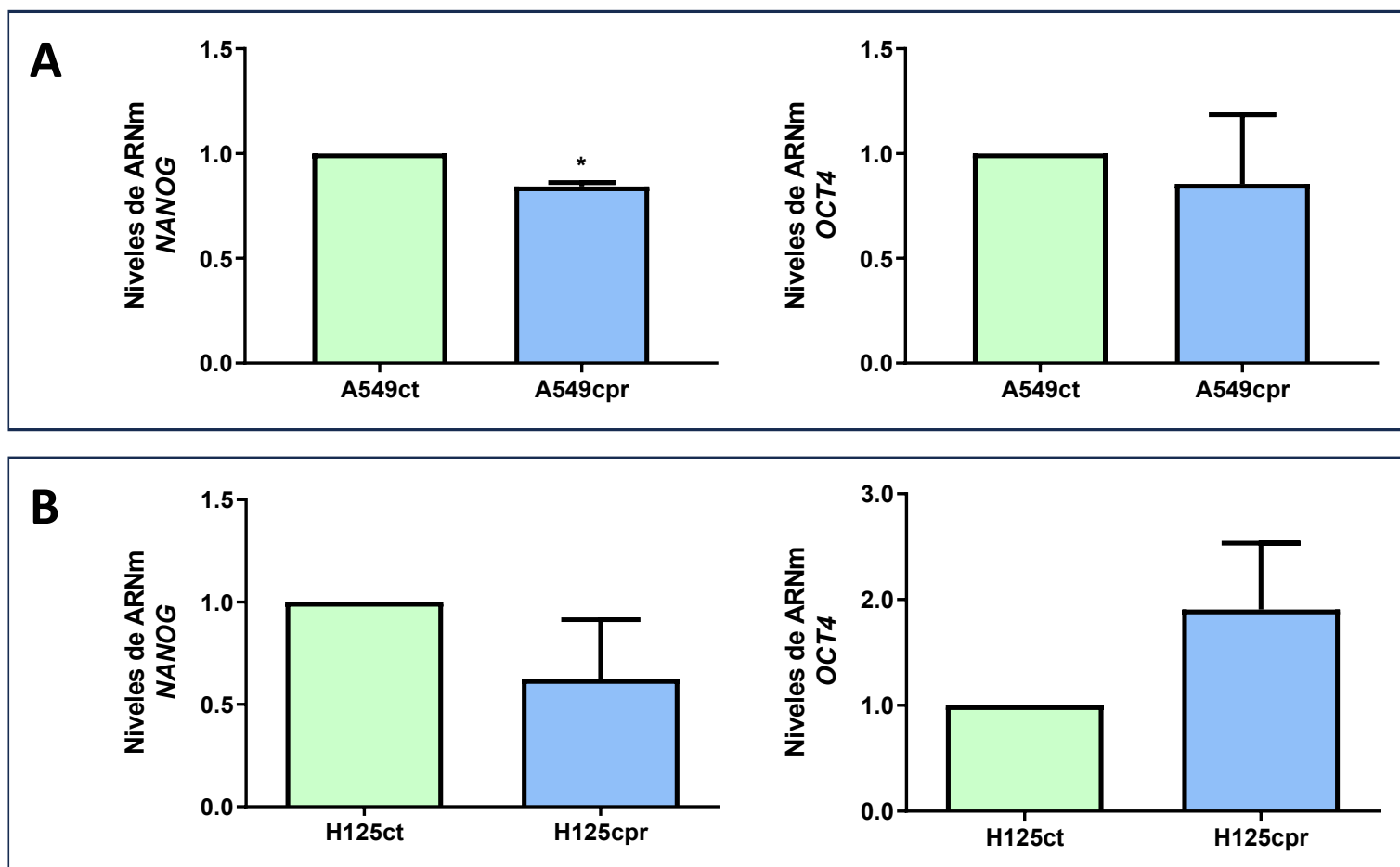


Figura 15. Expresión de genes asociados a pluripotencialidad (NANOG y OCT4) evaluada por RT-qPCR en monocapas de células A549 (A) y H125 (B). \* $p < 0,05$  con respecto al control. T Test. N=4.

#### Evaluación del crecimiento de las CSC

Dado que las células madre tumorales se asocian con la resistencia a los tratamientos convencionales, la recurrencia tumoral y la capacidad metastásica, decidimos evaluar la presencia de este componente en cada una de las variantes de los modelos A549 y H125. Para ello realizamos un cultivo de formación de oncoesferas, que permite el enriquecimiento en células poco diferenciadas.

Todas las líneas celulares fueron capaces de formar oncoesferas. Sin embargo, si bien las variantes resistentes a CDDP mostraron una menor capacidad de formación de oncoesferas, éstas presentan una velocidad de crecimiento mayor que sus contrapartes sensibles (Figura 16A y B), tomando como parámetro de crecimiento la medición del diámetro de estas formaciones 3D a lo largo del tiempo.

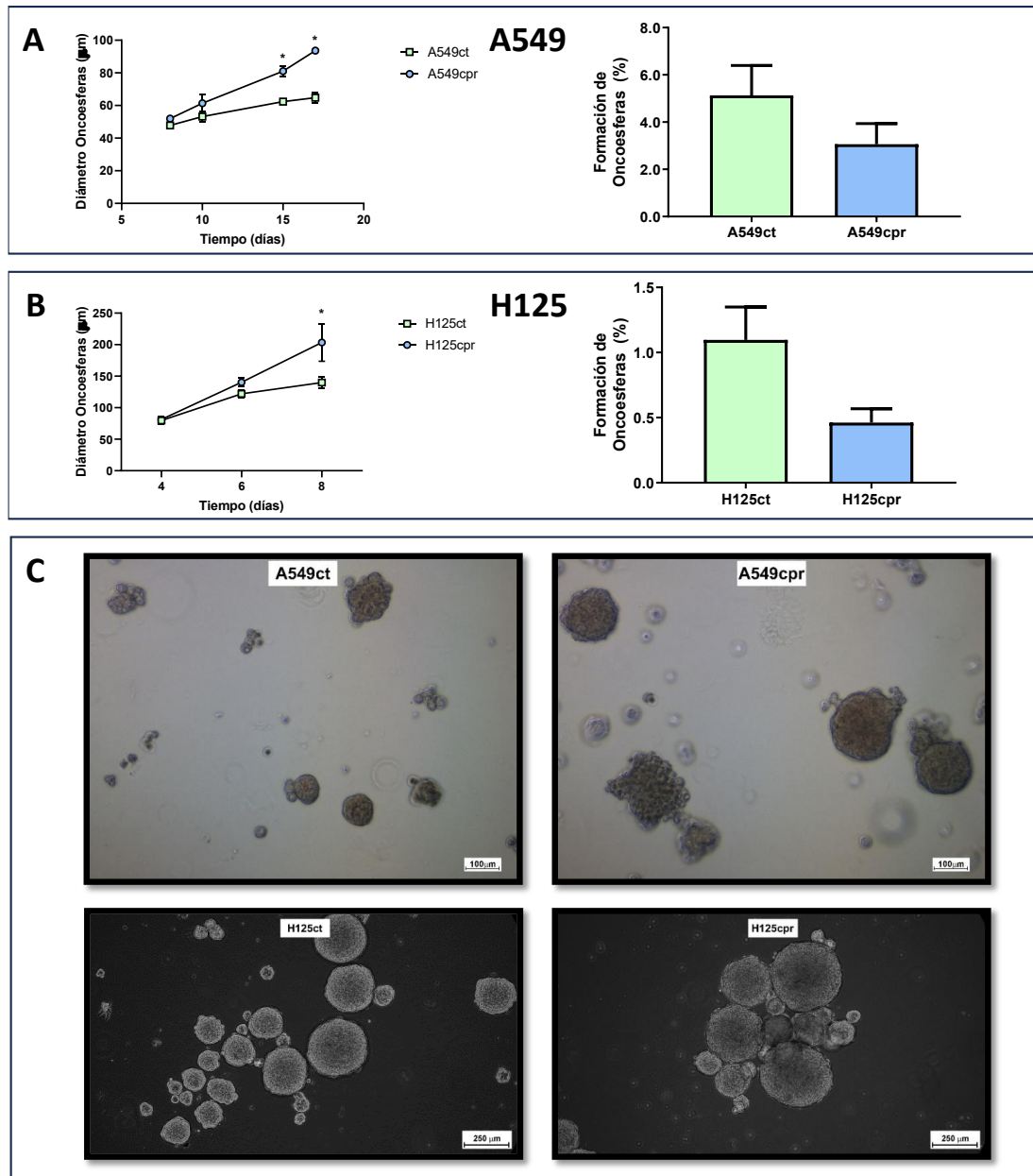


Figura 16. Crecimiento de Oncosferas. Curva de crecimiento de oncosferas en función del tiempo y porcentaje de formación de oncosferas a partir de monocapas subconfluentes para A549 (A) y H125 (B), expresado como el número de oncosferas en relación al número de células sembradas. En (C) se muestran imágenes representativas de oncosferas de ambos modelos celulares sensibles y resistentes. Aumento: 600X para A549 y 400X para H125; barra de escala: 100  $\mu\text{m}$  para A549 y 250  $\mu\text{m}$  para H125. \* $p < 0,05$  con respecto al control. ANOVA de dos factores y T Test. N=4.

### Cuantificación de genes pluripotenciales en las oncoesferas

Si bien el modelo de cultivo de oncoesferas se encuentra ampliamente descripto como un sistema de enriquecimiento de células con características pluripotentes, decidimos validar los cultivos mediante la cuantificación de la expresión de los genes pluripotenciales NANOG y OCT4 por RT-qPCR (Figura 17). Pudimos corroborar que los cultivos de presentan niveles de expresión significativamente mayores de ambos genes en comparación con sus monocapas correspondientes, confirmando el enriquecimiento en poblaciones con características asociadas a pluripotencialidad.

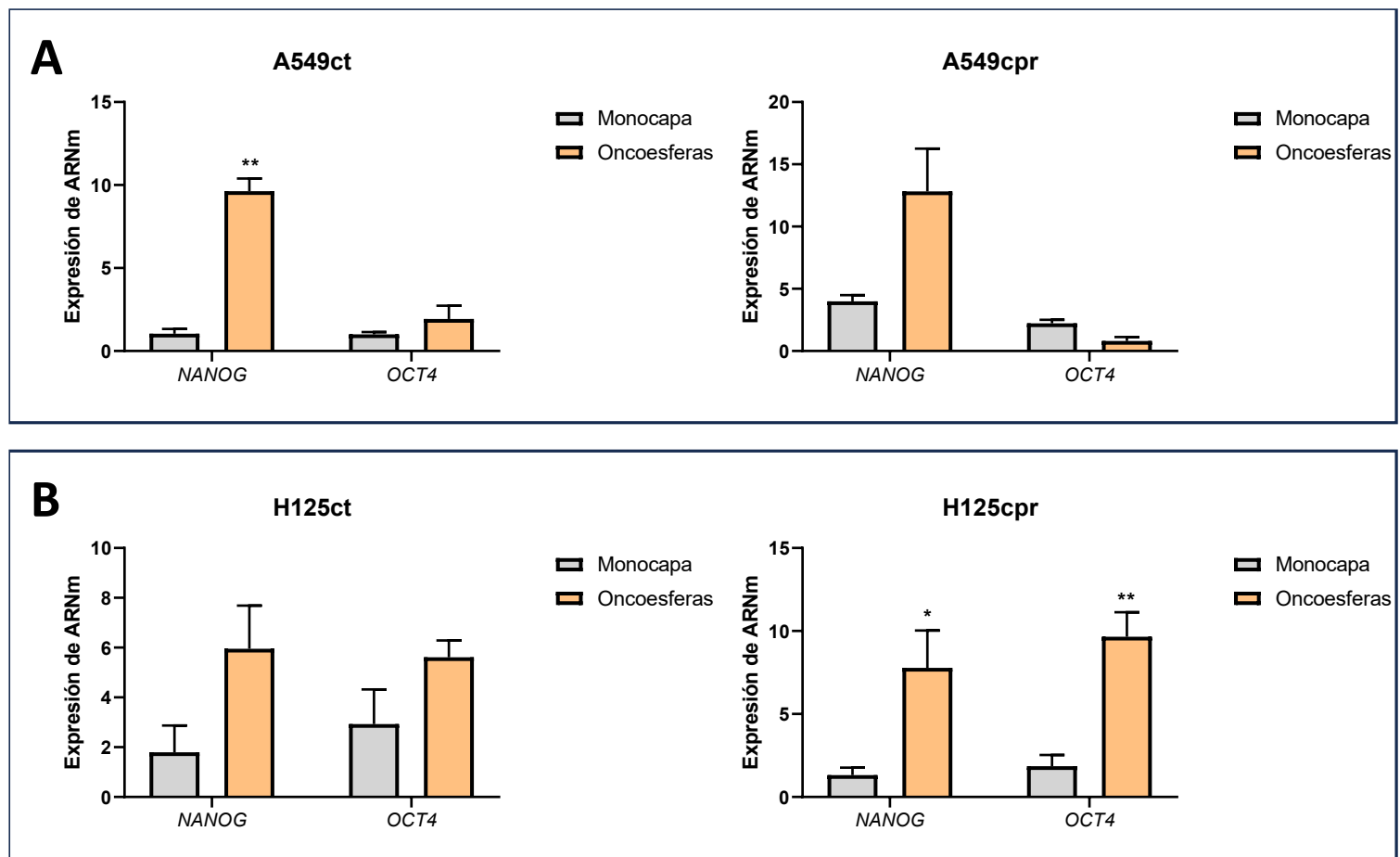


Figura 17. Niveles de expresión de genes pluripotenciales NANOG y OCT4 para A549 (A) y H125 (B) expresado como veces de cambio con respecto a la monocapa correspondiente, determinados por qPCR. \*\* $p < 0,01$  con respecto al control. T Test. N=2 para A549 y N=4 para H125.

A continuación, se comparó la expresión de los genes pluripotenciales entre oncoesferas provenientes de líneas controles y resistentes a CDDP. En el modelo A549, no se observaron diferencias significativas en la expresión de NANOG ni de OCT4 entre las oncoesferas generadas a partir de A549ct y A549cpr, aunque se evidenció una tendencia a la disminución de OCT4 en las oncoesferas provenientes de la variante resistente (Figura 18A). En el modelo H125, en cambio, se observa un aumento en los niveles de OCT4 en las oncoesferas derivadas de H125cpr con respecto a H125ct, mientras que no se detectaron diferencias en la expresión de NANOG (Figura 18B).

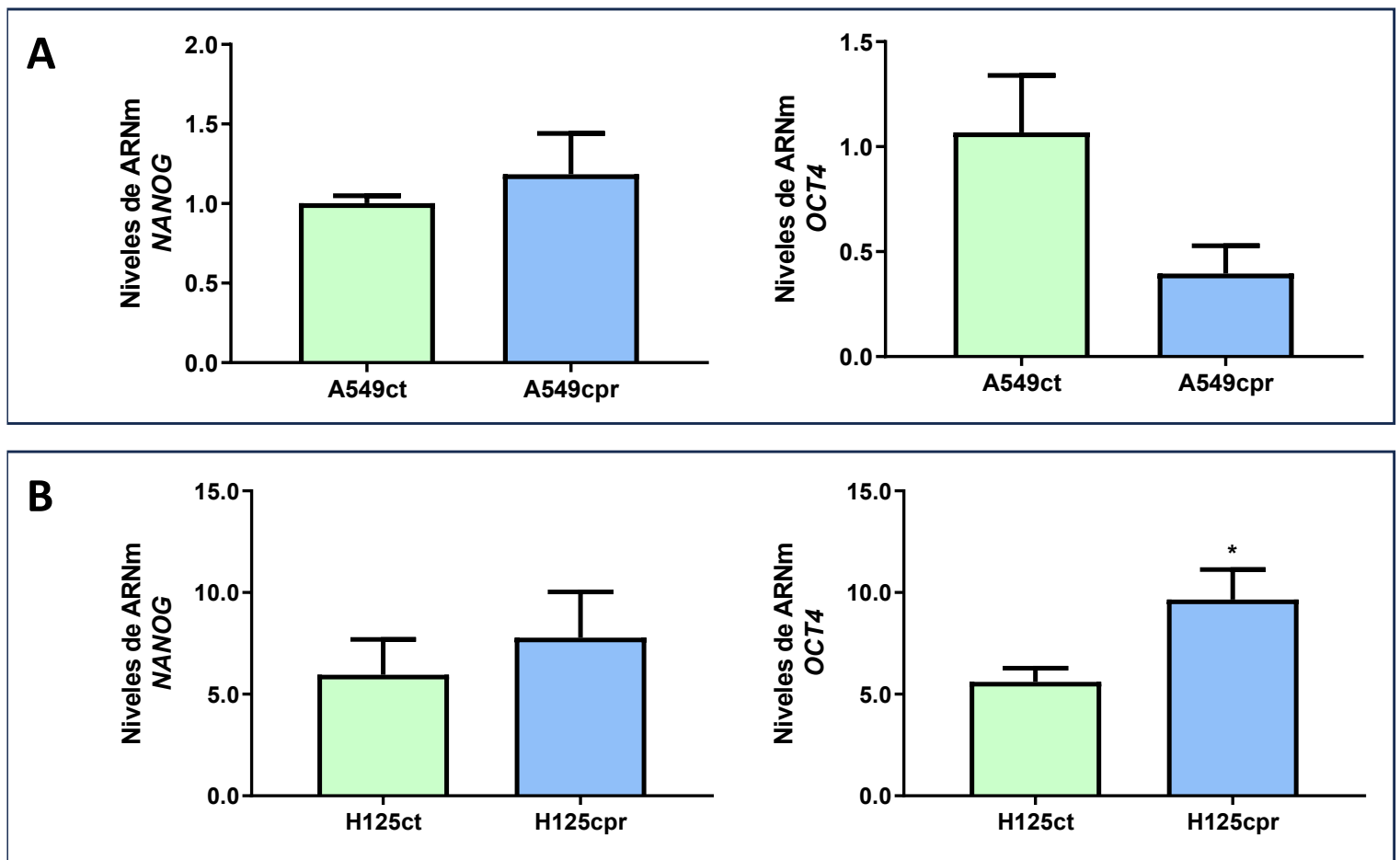


Figura 18. Niveles de expresión de los genes pluripotenciales NANOG y OCT4 para las oncoesferas de A549 (A) y H125 (B) expresado como veces de cambio con respecto a la línea celular sensible al CDDP. \* $p < 0,05$  con respecto al control. T Test. N=2 para A549 y N=4 para H125.

### 1.2.6. Comportamiento del modelo H125 *in vivo*

#### Evaluación del crecimiento tumoral *in vivo*

Para evaluar el crecimiento de las células H125 en un modelo *in vivo*, inoculamos  $1 \times 10^6$  células en el subcutáneo del flanco izquierdo de ratones BALB/c<sup>nu/nu</sup>.

La tasa de toma tumoral fue del 100% para ambos grupos de experimentales, ya sean los inoculados con H125ct o H125cpr. Además, la latencia resultó de 4 días, período en el cual se detectó la presencia de tumores palpables en el sitio de inoculación.

Un día después de la detección del tumor, los animales se aleatorizaron en dos grupos para cada línea celular. La mitad recibió tratamiento con CDDP (2 mg/kg, vía intraperitoneal, dos veces por semana), mientras que los restantes recibieron solución fisiológica como control. Los ratones portadores del tumor H125cpr tratados con solución fisiológica crecieron a una velocidad menor en comparación con los tumores derivados de H125ct (Figura 19A).

Además, los animales portadores de tumores H125ct tratados con CDDP mostraron un crecimiento tumoral menor en comparación con los H125ct tratados con solución fisiológica. En contraste, el tratamiento con CDDP no produjo modificaciones significativas en el crecimiento de los tumores derivados de H125cpr respecto de sus respectivos controles, corroborando el carácter resistente de este modelo frente al quimioterápico (Figura 19A).

Cabe resaltar que el peso de los ratones no se modificó significativamente en ninguno de los casos hasta el final del ensayo, lo que sugiere la ausencia de toxicidad sistémica asociada al tratamiento (Figura 19B). Adicionalmente, se obtuvieron registros fotográficos representativos de los tumores al momento de la eutanasia.

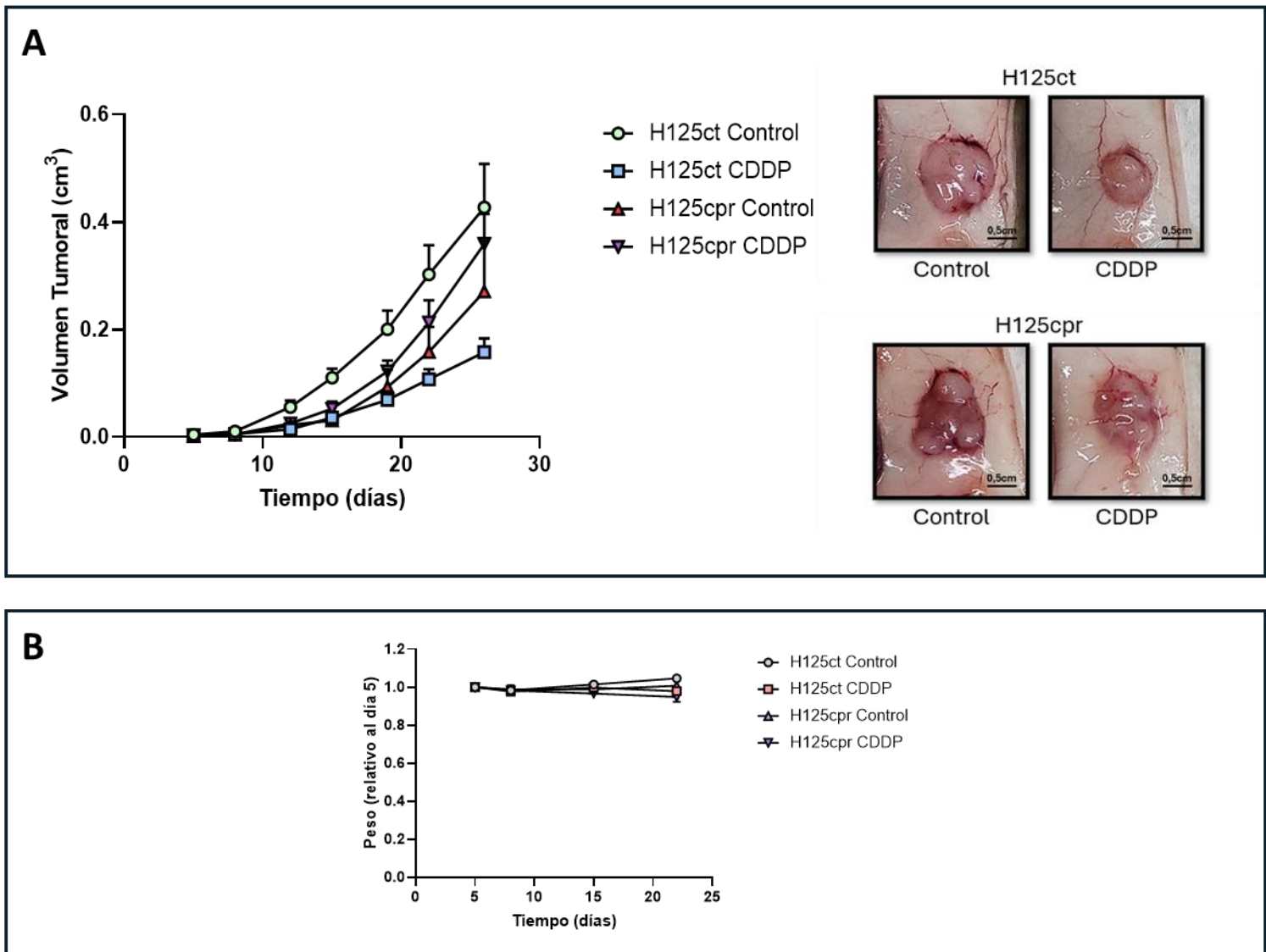


Figura 19. Evaluación del crecimiento tumoral *in vivo* del modelo H125. (A) Volumen tumoral en función del tiempo para los 4 grupos experimentales. (B) Peso corporal de los animales a lo largo del ensayo, expresado en relación a su peso inicial. Se muestran además imágenes representativas de tumores luego de la eutanasia. Barra de escala: 0,5 cm. ANOVA de dos factores. N=4.

#### Evaluación de la frecuencia de células madre tumorales *ex vivo*

Una vez finalizado el experimento, y con el objetivo de evaluar la presencia de células progenitoras tumorales, la mitad de los tumores fueron disgregados enzimática y mecánicamente para realizar un ensayo de frecuencias *in vitro* analizado por el software ELDA.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las frecuencias de CSC encontradas para los 4 grupos evaluados. Sin embargo, se observó que el grupo H125ct tratado con solución fisiológica presentó la menor frecuencia estimada de CSC, mientras que el grupo H125cpr tratado con CDDP exhibió la mayor frecuencia estimada (Tabla 3).

|                 | Células/pocillo |      |      |      |      |      | Frecuencia CSC        |
|-----------------|-----------------|------|------|------|------|------|-----------------------|
|                 | 400             | 200  | 100  | 50   | 25   | 12   | Estimada (95% IC)     |
| H125ct Control  | 6/10            | 3/10 | 4/10 | 3/10 | 0/10 | 0/10 | 1/365 (1/608 - 1/219) |
| H125ct CDDP     | 6/7             | 3/8  | 3/10 | 1/10 | 0/10 | 1/15 | 1/311 (1/529 - 1/183) |
| H125cpr Control | 6/10            | 3/10 | 1/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 1/308 (1/569 - 1/167) |
| H125cpr CDDP    | 6/10            | 4/10 | 1/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 1/275 (1/494 - 1/153) |

| Pruebas pareadas para detectar diferencias en las frecuencias de CSC |              |          |    |            |
|----------------------------------------------------------------------|--------------|----------|----|------------|
| Grupo 1                                                              | Grupo 2      | Chisq    | DF | Pr(>Chisq) |
| H125ct Ctrl                                                          | H125ct CDDP  | 0,179    | 1  | 0,672      |
| H125ct Ctrl                                                          | H125cpr Ctrl | 0,169    | 1  | 0,681      |
| H125ct Ctrl                                                          | H125cpr CDDP | 0,503    | 1  | 0,478      |
| H125ct CDDP                                                          | H125cpr Ctrl | 0,000568 | 1  | 0,981      |
| H125ct CDDP                                                          | H125cpr CDDP | 0,0925   | 1  | 0,761      |
| H125cpr Ctrl                                                         | H125cpr CDDP | 0,0683   | 1  | 0,794      |

Tabla 3: Análisis de las Frecuencias para CSC. (A) Tabla de frecuencias obtenidas luego de sembrar 400, 200, 100, 50, 25 o 12 células/pocillo de p96 bajo condiciones de formación de oncoesferas. Se considera un pocillo positivo como aquel donde se formó al menos una oncoesfera luego de 5 días de cultivo. (B) Tabla de pruebas para detectar diferencias significativas en las frecuencias de CSC calculadas por el software de ELDA.

## **2. Efecto de los tratamientos con ATRA y CDDP sobre las líneas parentales y sus variantes resistentes a CDDP**

Una vez caracterizadas las líneas resistentes a CDDP generadas en nuestro laboratorio, se evaluó el efecto de los tratamientos con ATRA, CDDP y la combinación de ambos sobre las líneas celulares sensibles y resistentes a CDDP. El objetivo de estos ensayos fue determinar si la terapia combinada con un agente diferenciador como el ATRA podía potenciar o modular la respuesta al tratamiento con platinos.

## **2.1. Determinación de la dosis de tratamiento óptima. Evaluación sobre la viabilidad celular**

### Dosis de CDDP

Para establecer la dosis de CDDP a utilizar durante los distintos ensayos biológicos, se realizó una curva acotada de concentración de CDDP y se evaluó el efecto del quimioterápico sobre el ciclo celular luego de 48 hs (Figura 20). En la línea A549ct se observó un arresto significativo en la fase G2/M del ciclo celular en todas las concentraciones evaluadas (4-7  $\mu$ M). La variante resistente A549cpr mostró una tendencia al arresto en G2/M considerablemente menor y sólo alcanza significancia estadística a la concentración más alta ensayada (7  $\mu$ M). En base a estos resultados, se seleccionó la concentración de 4  $\mu$ M para los ensayos subsiguientes, correspondiente a la dosis de mantenimiento de resistencia en A549cpr, dado que representa la condición con menor impacto sobre la línea resistente sin perder significancia en la línea sensible (Figura 20A).

En el caso del modelo H125 se evaluaron dos concentraciones distintas de CDDP (1 y 2  $\mu$ M). Ambas dosis fueron suficientes para inducir un arresto significativo en la fase G2/M del ciclo celular en H125ct, mientras que ninguna de ellas produjo alteraciones detectables en la distribución del ciclo celular de H125cpr. Siguiendo el mismo criterio aplicado para el modelo A549, se seleccionó la concentración de 1  $\mu$ M, dosis de mantenimiento de la resistencia en H125cpr, para los ensayos subsiguientes (Figura 20B).

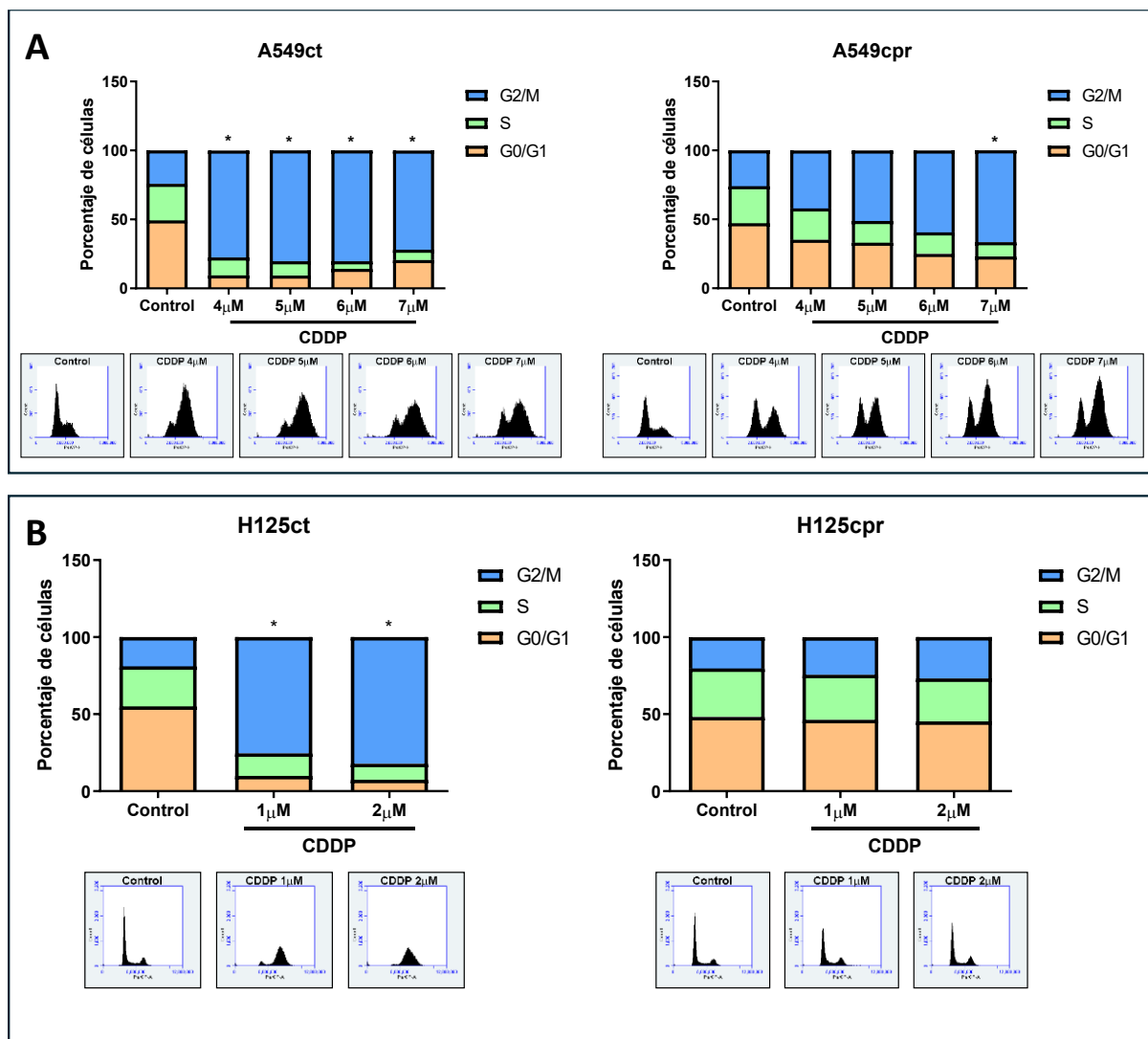


Figura 20. Estudio del ciclo celular. Distribución relativa de las células en las distintas fases del ciclo celular luego de 48 hs de tratamiento con distintas dosis de CDDP en los modelos A549 (A) y H125 (B). Se muestran los valores promedio de tres experimentos independientes. Debajo de cada gráfico se presenta un histograma representativo del número de células en función del contenido de IP intracelular, evidenciando las principales fases del ciclo celular. \* $p < 0,05$  con respecto al control. ANOVA.  $N=3$ .

#### Dosis de ATRA

El CDDP continúa siendo una de las terapias estándar para el tratamiento de pacientes con NSCLC. Sin embargo, como se comentó en la introducción, la presencia de células madre tumorales resistentes al tratamiento contribuye a la recaída de la enfermedad. En este contexto,

nos propusimos evaluar si el tratamiento diferenciador con ATRA podía potenciar la respuesta al CDDP, utilizando como modelo las líneas resistentes generadas en este trabajo.

Como primera aproximación, evaluamos el efecto del tratamiento por 72 hs con ATRA sobre la viabilidad de las líneas H125 y A549, junto con sus respectivas variantes resistentes a CDDP, utilizando el método de MTS. Se observó una tendencia general a disminuir la viabilidad celular en todas las líneas a excepción de A549ct, en la cual ninguna dosis produjo un efecto detectable. No obstante, en ningún caso las variaciones observadas llegaron a ser estadísticamente significativas en las dosis ensayadas. (Figura 21A y B). Estos resultados se corroboraron además mediante recuento celular directo (datos no mostrados).

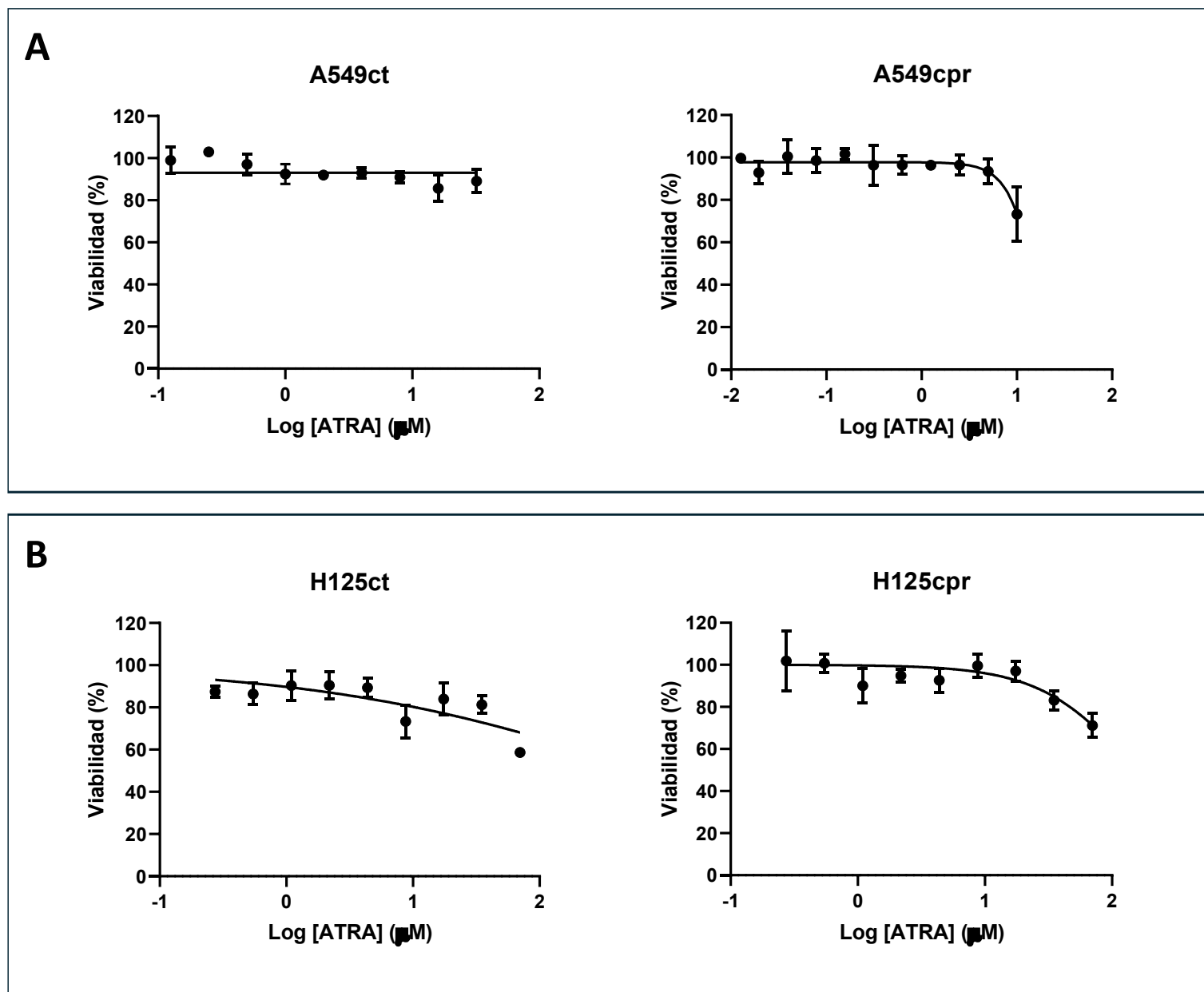


Figura 21. Curvas dosis-respuesta frente al tratamiento con ATRA. Porcentaje de viabilidad a 72 hs evaluado por MTS en los modelos A549 (A) y H125 (B). Las curvas se ajustaron a regresiones no lineales logarítmicas con el software GraphPad Prism 8. N=3.

#### Evaluación de la expresión y funcionalidad de genes asociados al sistema del Ácido Retinoico

Ante la ausencia de un efecto significativo del ATRA sobre la viabilidad celular, se planteó la posibilidad de que existieran alteraciones en la expresión o funcionalidad del Sistema Retinoide en los modelos estudiados. Para explorar esta hipótesis, se evaluó la expresión de los ARNm

correspondientes a los tres receptores retinoicos clásicos ( $RAR\alpha$ ,  $RAR\beta$  y  $RAR\gamma$ ) mediante RT-qPCR. Todas las líneas celulares presentaron niveles de expresión detectables de los tres receptores (Figura 22A y B). Adicionalmente, se calculó la relación  $RAR\beta/RAR\gamma$ , considerada un indicador del estado de diferenciación celular. Resulta relevante destacar que las variantes resistentes a CDDP presentan una mayor proporción relativa del receptor  $RAR\gamma$  (receptor asociado al mantenimiento del fenotipo stem), respecto a las variantes sensibles al quimioterápico (Figura 22A y B).

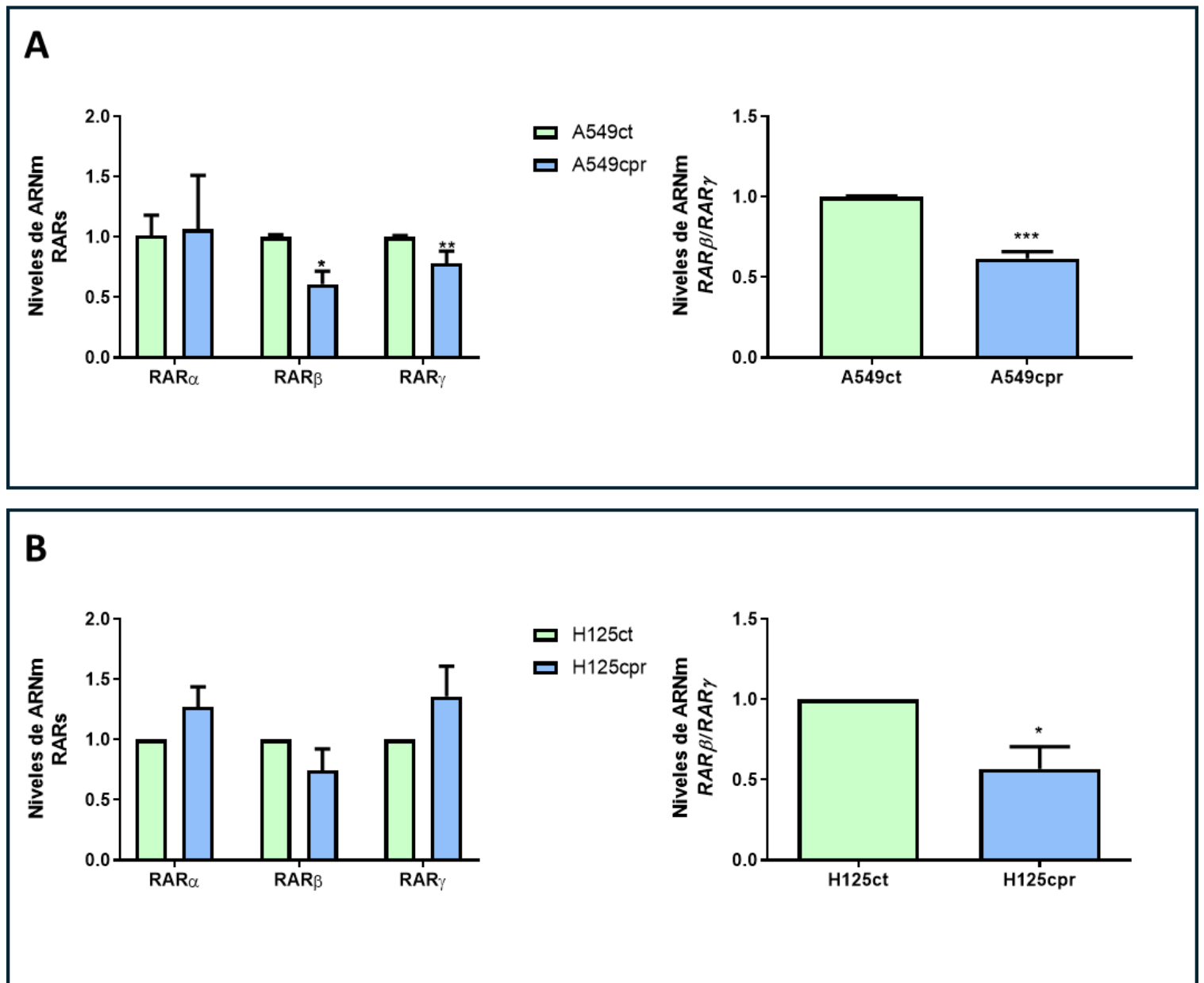


Figura 22. Expresión de receptores retinoides (RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  y RAR $\gamma$ ). Expresión relativa a la respectiva línea sensible, determinada por RT-qPCR en los modelos A549 (A) y H125 (B). La relación RAR $\beta$ /RAR $\gamma$  fue calculada a partir de los valores de expresión obtenidos para cada receptor. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$  con respecto al control. T Test. N=4.

Confirmada la expresión de los receptores retinoides, procedimos a evaluar la funcionalidad del sistema mediante un ensayo de genes reporteros en presencia de ATRA. Para ello, se realizó una transfección transiente con un plásmido conteniendo un promotor con un elemento de respuesta al Ácido Retinoico (RARE) río arriba del gen reportero de luciferasa. El tratamiento con

ATRA produjo un aumento en la actividad de la luciferasa en ambos modelos (Figura 23), indicando que los receptores RARs se encuentran funcionalmente activos y son capaces de regular la transcripción a través del sitio RARE del constructo exógeno.

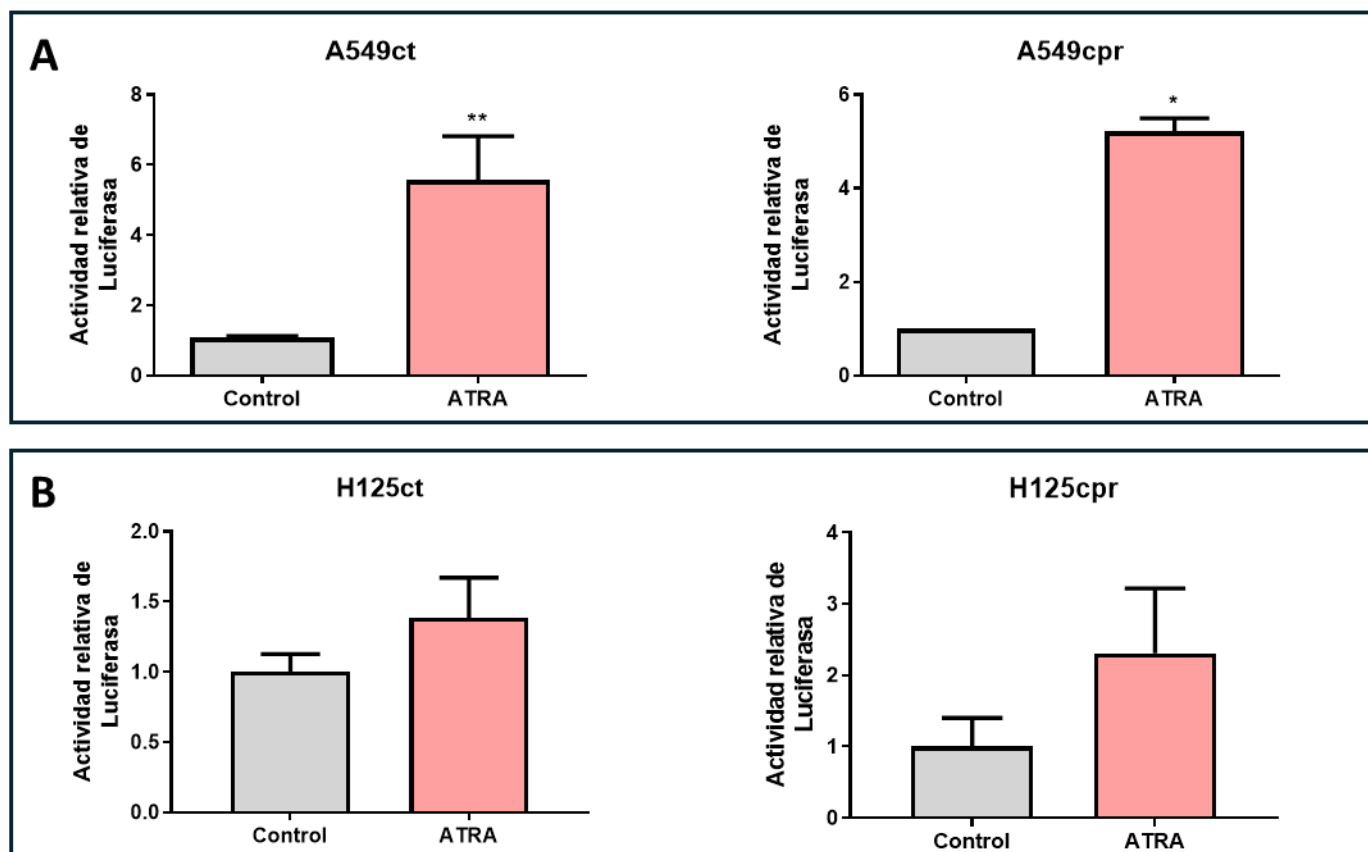


Figura 23. Ensayo de gen reportero. Actividad relativa de la luciferasa expresada a partir del vector RARE-Luc en los modelos A549 (A) y H125 (B). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  con respecto al control. T Test. N=2.

## **2.2. Evaluación del efecto del tratamiento con ATRA y CDDP sobre la viabilidad celular en los modelos A549 y H125**

Una vez establecidas las dosis de trabajo para ambos compuestos y confirmada la funcionalidad del sistema retinoide, se evaluó el efecto de estas terapias individuales y combinadas sobre la viabilidad celular. El tratamiento con CDDP produjo una disminución significativa de la viabilidad en todas las líneas celulares sensibles, siendo más leve el efecto sobre A549cpr y

completamente ausente en H125cpr (Figura 24A y B). El tratamiento con ATRA, tanto solo como en combinación con CDDP, no modificó significativamente la respuesta al quimioterápico. También se realizaron curvas dosis-respuesta con distintas combinaciones de ambos compuestos y se evaluó la viabilidad celular por MTS luego de 72 hs. En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas entre el efecto del CDDP administrado solo y aquel observado en combinación con ATRA (datos no mostrados).

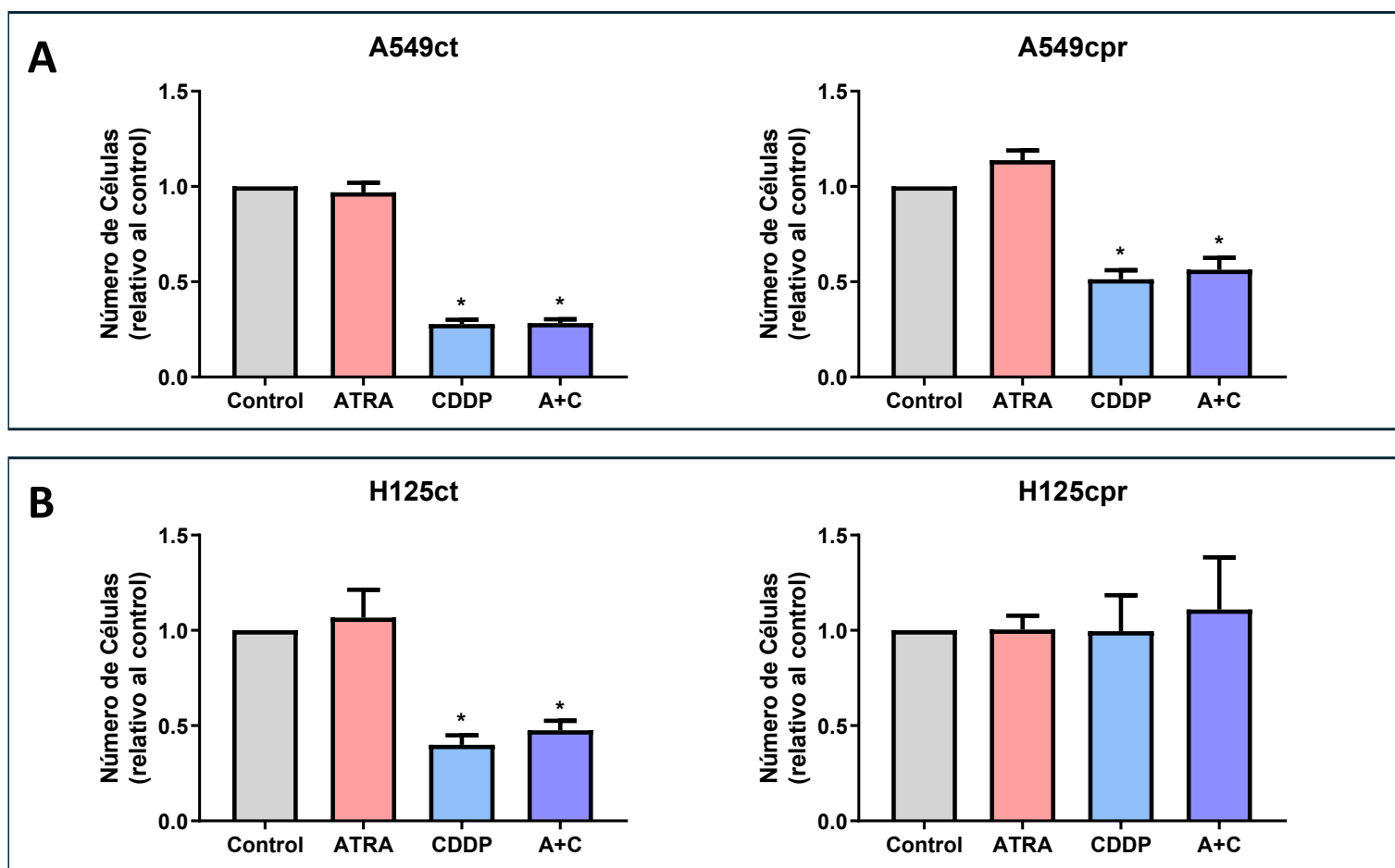


Figura 24. Ensayo de viabilidad celular. Recuento celular luego de 48 hs de tratamiento con ATRA (1  $\mu$ M), CDDP (4  $\mu$ M para A549 y 1  $\mu$ M para H125) y su combinación en los modelos A549 (A) y H125 (B). Valores expresados de forma relativa al control correspondiente. \* $p < 0,05$  con respecto al control. ANOVA. N=4.

### 2.3. Efecto de los tratamientos con ATRA y CDDP sobre el sistema del Ácido Retinoico

#### 2.3.1. Evaluación de la funcionalidad del sistema del Ácido Retinoico

Para evaluar si los tratamientos con ATRA y CDDP modulan la funcionalidad del sistema del ácido retinoico, se realizó un ensayo de gen reportero. Las células A549 fueron transfectadas de manera transiente con un plásmido conteniendo un elemento de respuesta al ácido retinoico (RARE) río arriba del gen reportero de la luciferasa. Al analizar la actividad del reportero, se observó que el tratamiento con ATRA produjo un aumento en la expresión de la luciferasa independientemente del tratamiento con CDDP (Figura 25). Estos resultados indican que el sistema del ácido retinoico se encuentra funcionalmente activo en las células y que el tratamiento con CDDP no interfiere con la capacidad de los receptores retinoides de activar la transcripción mediada por RARE.

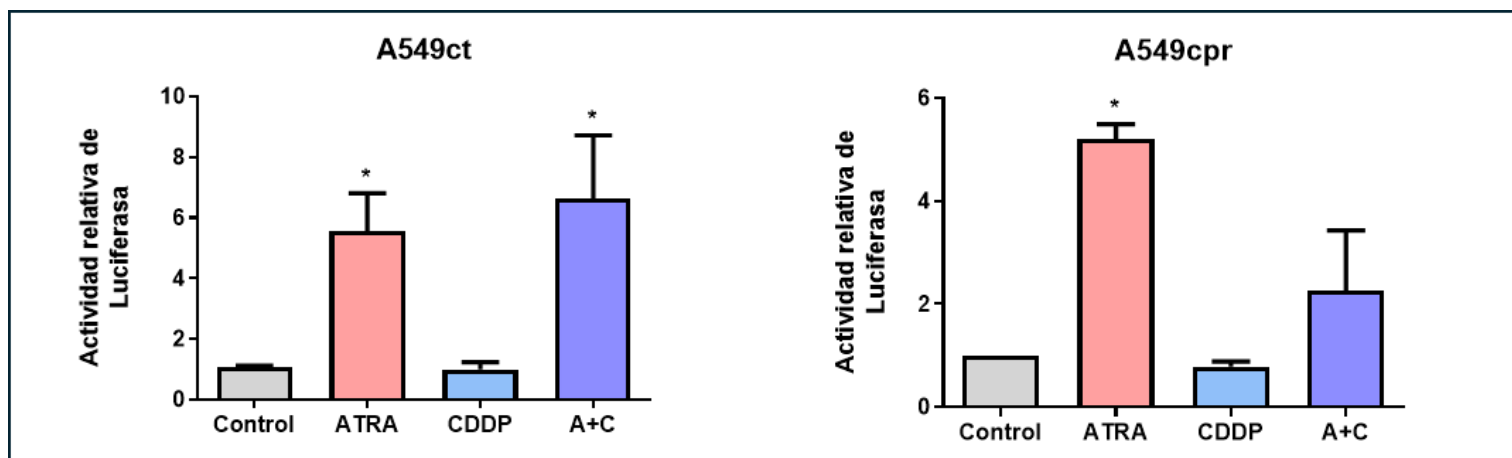


Figura 25. Ensayo de gen reportero para el sistema retinoideo. Actividad relativa de la luciferasa expresada a partir del vector RARE-Luc para A549ct y A549cpr. \* $p < 0,05$  con respecto al control. ANOVA. N=2.

### 2.3.2. Evaluación de la modulación de genes relacionados al sistema diferenciador del Ácido Retinoico bajo los distintos tratamientos

Con el objetivo de profundizar el análisis del efecto de los tratamientos combinados sobre el sistema del ácido retinoico, se evaluó la expresión de los receptores retinoides por RT-qPCR, enfocándonos el análisis en la relación  $RAR\beta/RAR\gamma$  como indicador indirecto del grado de diferenciación celular (Figura 26).

Se observó que todos los tratamientos con ATRA tienden a aumentar la relación  $RAR\beta/RAR\gamma$  en forma similar en ambos modelos, efecto que resultó aún más marcado cuando el ATRA está combinado con CDDP (Figura 26A y B). Es importante notar que las líneas sensibles presentaron una mayor respuesta a los tratamientos, tanto individuales como combinados, en comparación con sus respectivas variantes resistentes.

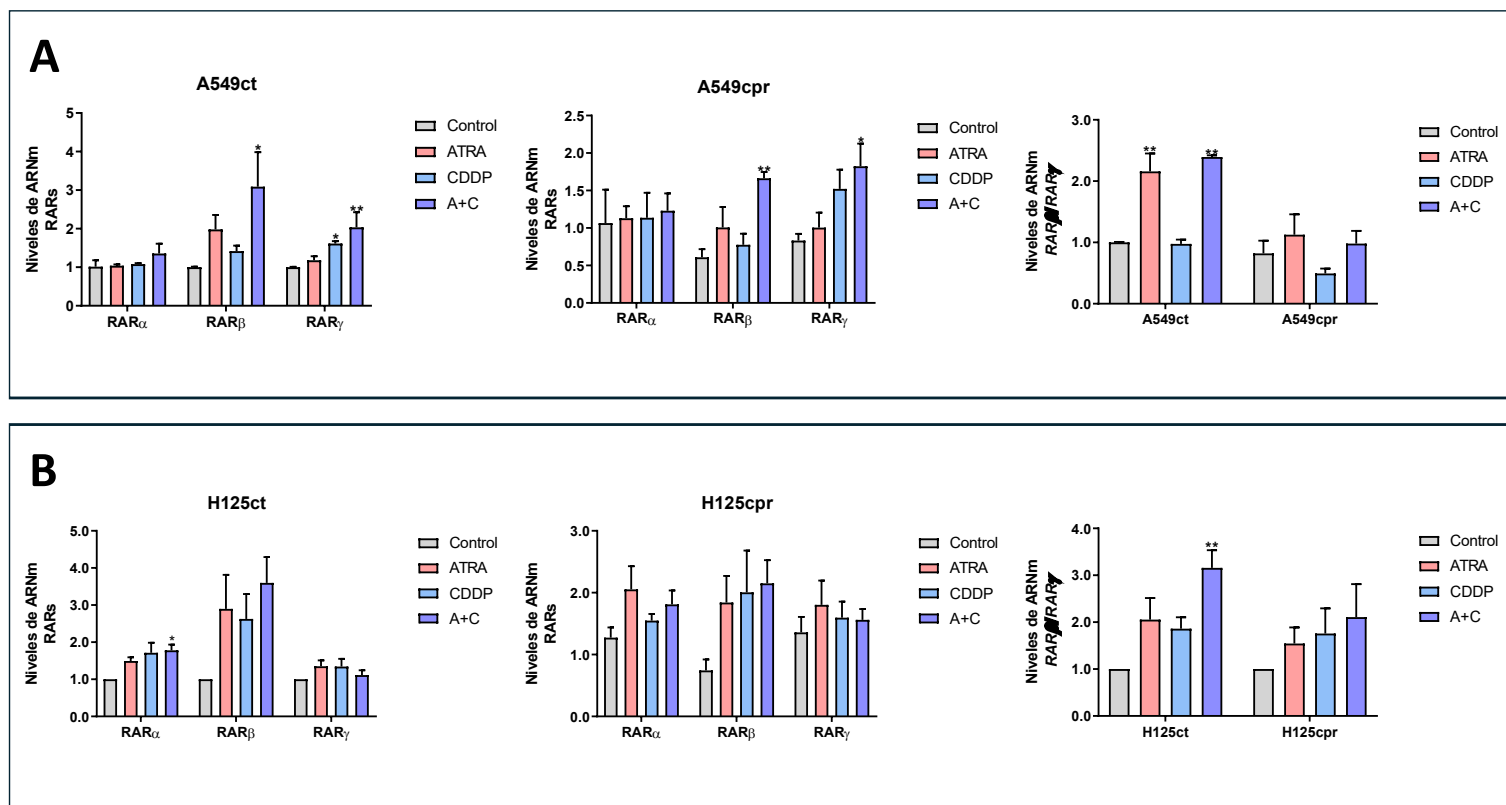


Figura 26. Expresión de los receptores retinoides medidos por RT-qPCR. Se grafica la expresión relativa de cada receptor respecto a la línea sensible en los modelos A549 (A) y para H125 (B).

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  con respecto al control. ANOVA. N=4.

## 2.4. Efecto de los tratamientos con ATRA y CDDP sobre parámetros relacionados con la progresión tumoral

### 2.4.1. Estudio de la distribución del ciclo celular bajo los tratamientos con CDDP y ATRA

Es sabido que el tratamiento con CDDP produce un arresto en la fase G2 del ciclo celular. En este contexto, se evaluó la distribución dentro del ciclo celular en todas nuestras líneas celulares, luego de 48 hs de tratamiento con CDDP, ATRA o su combinación (Figura 27). Se observó que el efecto del CDDP estuvo presente exclusivamente en las variantes sensibles tanto de A549 (Figura 27A) como de H125 (Figura 27B). En las líneas resistentes no se detectaron cambios significativos en la distribución del ciclo celular. El tratamiento con ATRA no modificó el efecto del CDDP en ninguno de los modelos evaluados.

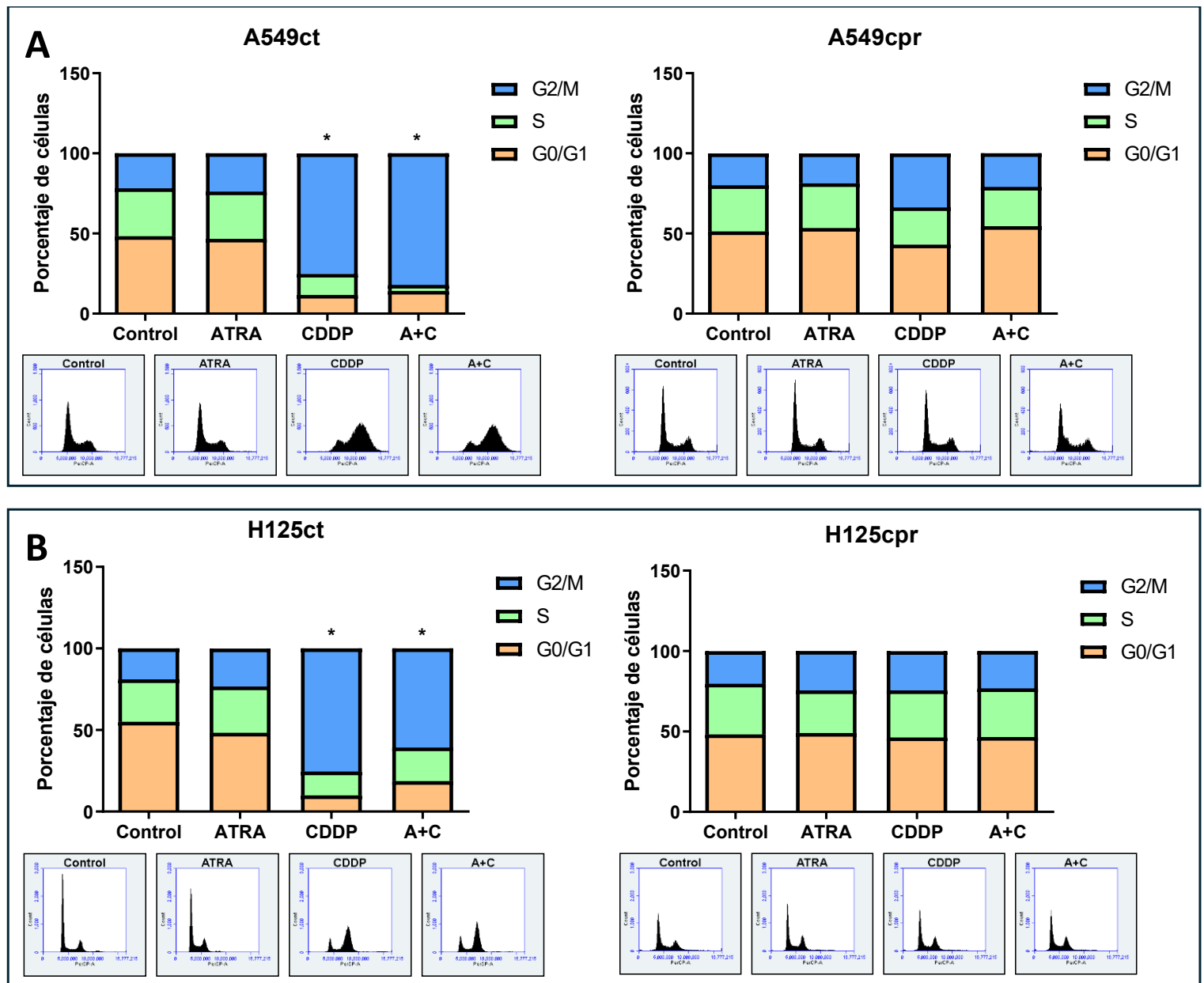


Figura 27. Estudio del ciclo celular. Distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular luego de 48 hs de tratamientos con ATRA y CDDP en los modelos A549 (A) y H125 (B). Se muestran los valores promedio de tres experimentos independientes. Debajo de cada gráfico se muestra un histograma representativo del número de células en función del contenido de IP intracelular, evidenciando la presencia de las 3 fases más evidentes del ciclo celular. ANOVA de dos factores. \* $p < 0,05$  con respecto al control.  $N=3$ .

#### 2.4.2. Estudio de la tasa de proliferación celular bajo los tratamientos con CDDP y ATRA

Considerando la reducción de la viabilidad y el arresto del ciclo celular observada luego del tratamiento con CDDP, se evaluó el efecto del CDDP, ATRA y su combinación sobre la proliferación celular en los modelos A549 y H125.

El tratamiento con CDDP, tanto solo o combinado con ATRA, produjo una marcada disminución en la proliferación celular con respecto al control en A549ct y H125ct (Figura 28). Este efecto también fue detectable, aunque en menor magnitud, en A549cpr (Figura 28A), mientras que no se observaron cambios en la proliferación de H125cpr (Figura 28B).

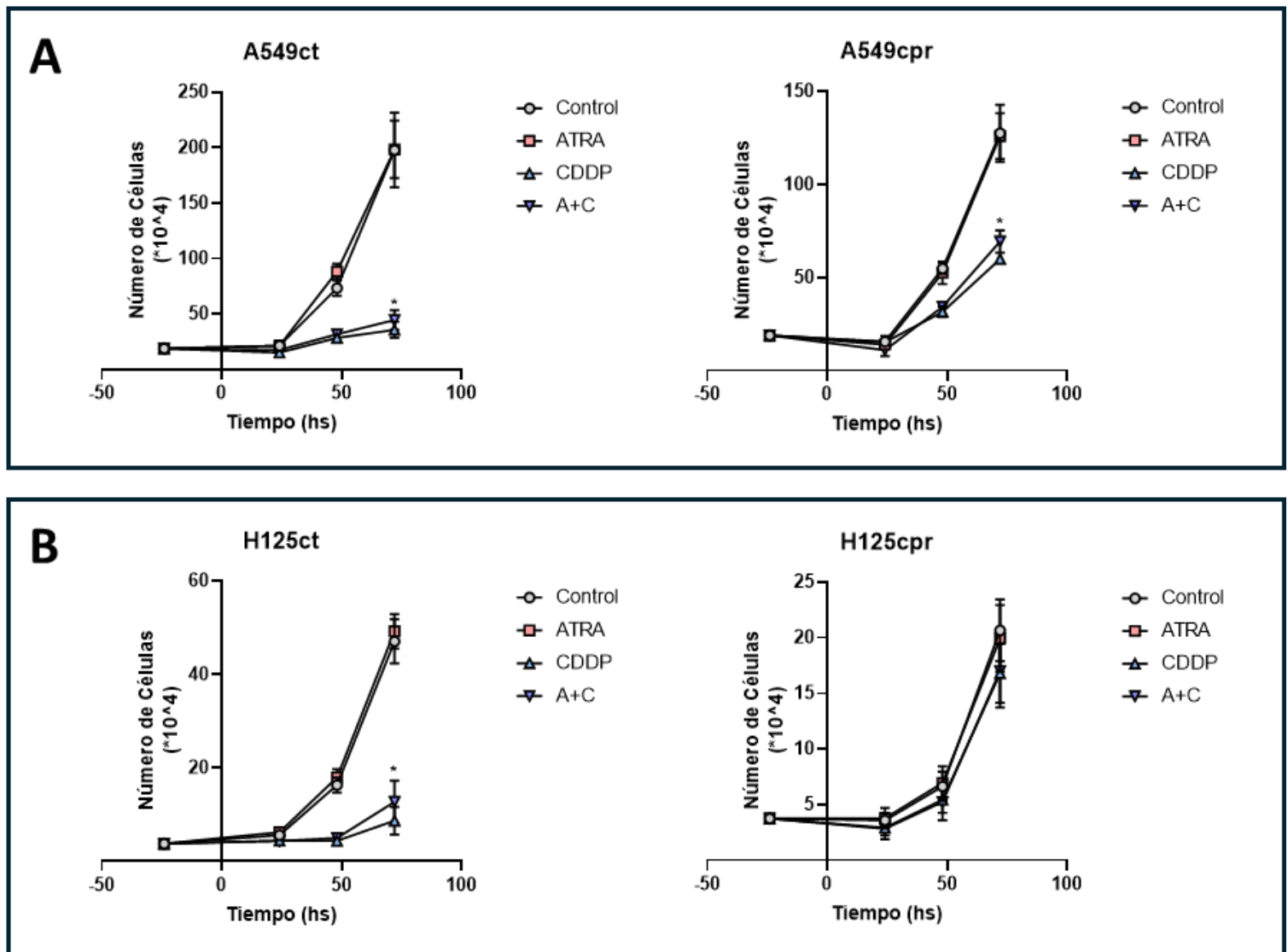


Figura 28. Estudio de la proliferación celular. Curvas de proliferación después de 72 hs de tratamiento con ATRA y CDDP en los modelos A549 (A) y H125 (B), determinadas por recuento celular en citómetro de flujo. \* $p < 0,05$  con respecto al control. ANOVA de dos factores. N=4.

#### 2.4.3. Estudio de la capacidad migratoria bajo los tratamientos con CDDP y ATRA

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la migración celular, se realizó un ensayo de cierre de herida sobre monocapas subconfluentes. Luego de sucesivos lavados con PBS para eliminar restos de células desprendidas, las monocapas se incubaron con los tratamientos en ausencia de SFB durante 7 hs para las células H125 y 18 hs para las A549. El análisis del cierre de la herida al tiempo final indicó que ninguno de los tratamientos evaluados tiene efecto sobre

la migración celular, independientemente de si se trata de las líneas resistentes a CDDP o sus contrapartes sensibles (Figura 29A y B).

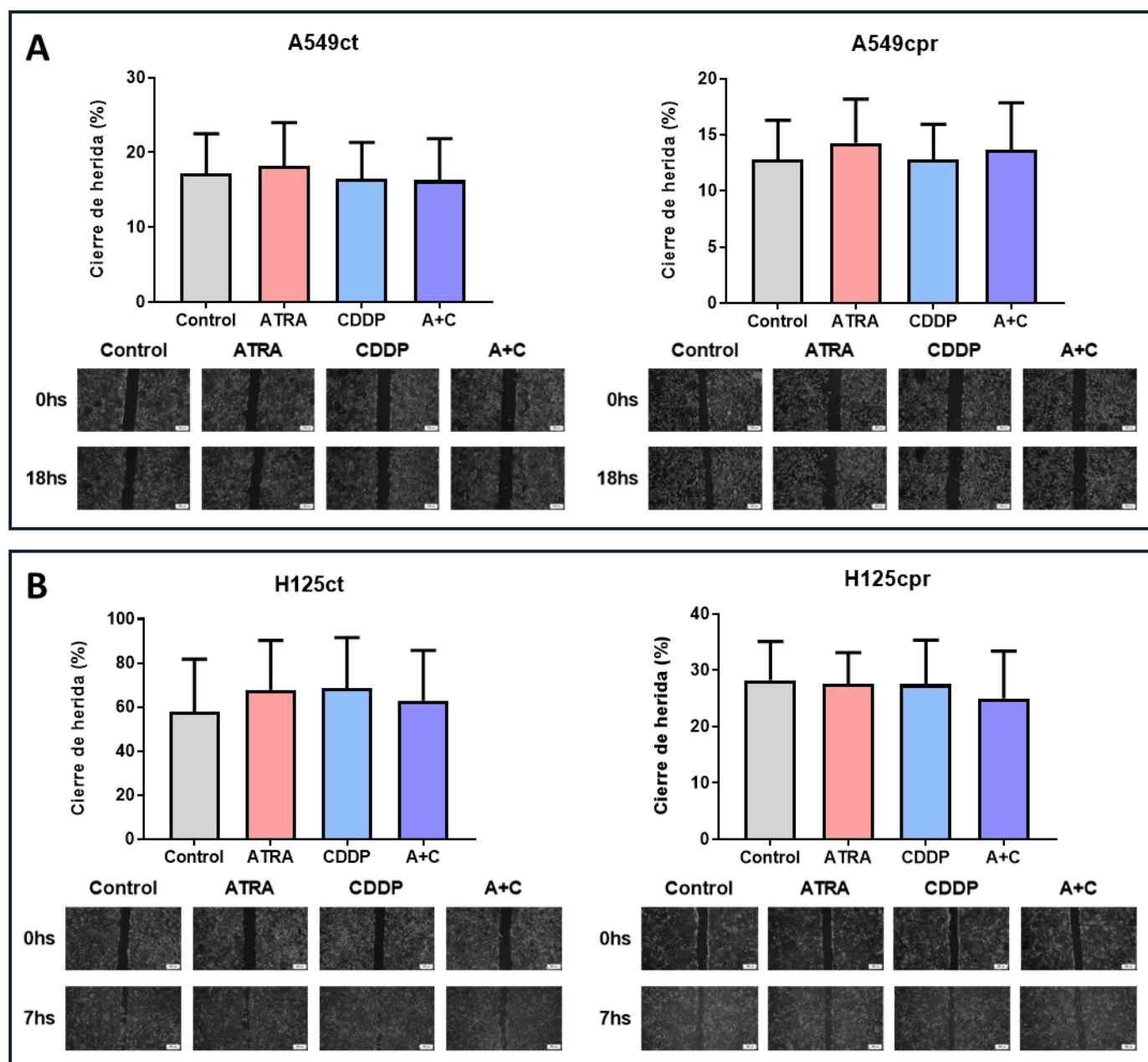


Figura 29. Ensayo de migración por cierre de herida. Porcentaje de migración relativo tiempo inicial luego de 18 hs de tratamiento para A549 (A) o 7 hs para H125 (B). Debajo de cada histograma se incluyen imágenes representativas del ensayo. Aumento: 200X; barra de escala: 250  $\mu$ m. ANOVA. N=4.

#### 2.4.4. Estudio de la capacidad adhesiva bajo los tratamientos con CDDP y ATRA

La capacidad adhesiva fue evaluada sembrando células pretratadas por 48 hs con CDDP, ATRA o su combinación, seguido de una incubación de 2 hs en placas de 6 pocillos. Posteriormente, se cuantificó el número de células adheridas al plástico. En el modelo A549, no se observaron cambios en la capacidad adhesiva de A549ct bajo ninguna de las condiciones evaluadas. En contraste, A549cpr mostró un aumento de aproximadamente un 50% en la adhesión tras el tratamiento combinando ATRA y CDDP (Figura 30A). Cabe destacar que esta variante presenta basalmente una menor capacidad adhesiva en comparación con A549ct, por lo que el aumento producido gracias al tratamiento combinado podría estar produciendo una regresión a un fenotipo menos resistente.

Por otro lado, en el modelo H125, el tratamiento con CDDP (solo o en combinación con ATRA) produjo una disminución de la capacidad adhesiva en ambas variantes, sensible y resistente (Figura 30B).

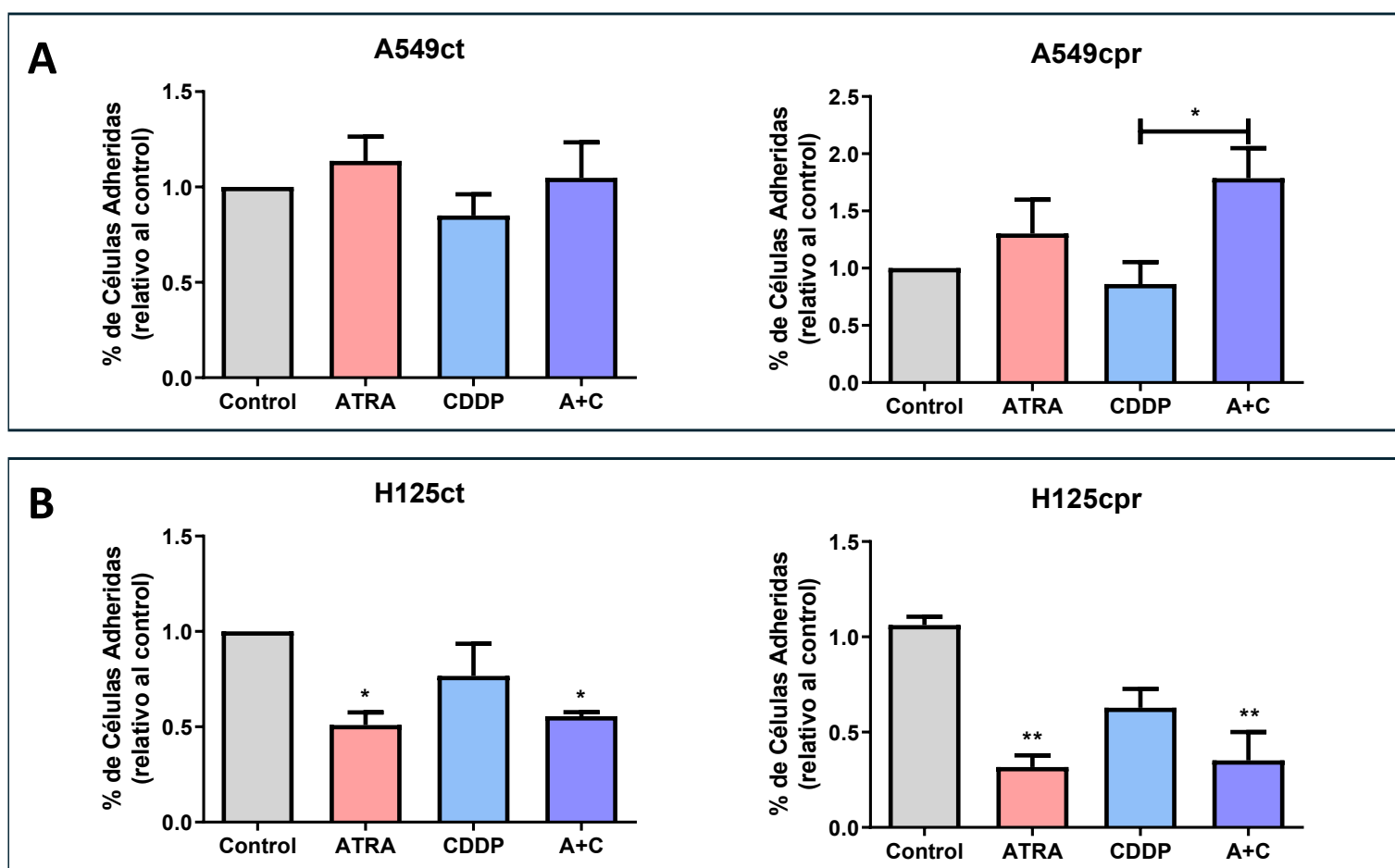


Figura 30. Capacidad adhesiva celular. Porcentaje de células adheridas relativo al control, luego de 48 hs de tratamiento en los modelos A549 (A) y H125 (B). \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  con respecto al control. ANOVA. N=5.

#### 2.4.5. Estudio de la capacidad clonogénica bajo los tratamientos con CDDP y ATRA

Finalmente, se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la clonogenicidad celular. Monocapas subconfluentes de H125 y A549ct (A549cpr no son capaces de formar colonias) fueron tratadas por 48 hs con ATRA, CDDP o su combinación. Posteriormente, estas células fueron sembradas en baja densidad y después de 8 días, las colonias formadas fueron fijadas y teñidas con cristal violeta para su cuantificación bajo microscopio. En todos los casos los tratamientos con CDDP (solo o combinado con ATRA) produjo una disminución de la capacidad clonogénica (Figura 31). En el modelo H125, este efecto fue menos pronunciado en la variante resistente en comparación con la línea sensible (Figura 31B).

En el caso de A549ct, se pudieron identificar dos tipos morfológicos de colonias: unas más compactas (meroclones), asociadas a células con fenotipo más *stem*, y otras más dispersas (paraclones) (Figura 31A). El análisis de la proporción entre estos dos tipos de colonias reveló que los tratamientos con CDDP y ATRA disminuyen la proporción de meroclones con relación a los paraclones. Por último, se confirmó que las células A549cpr no adquieren capacidad clonogénica bajo ninguna de las condiciones de tratamiento evaluadas.

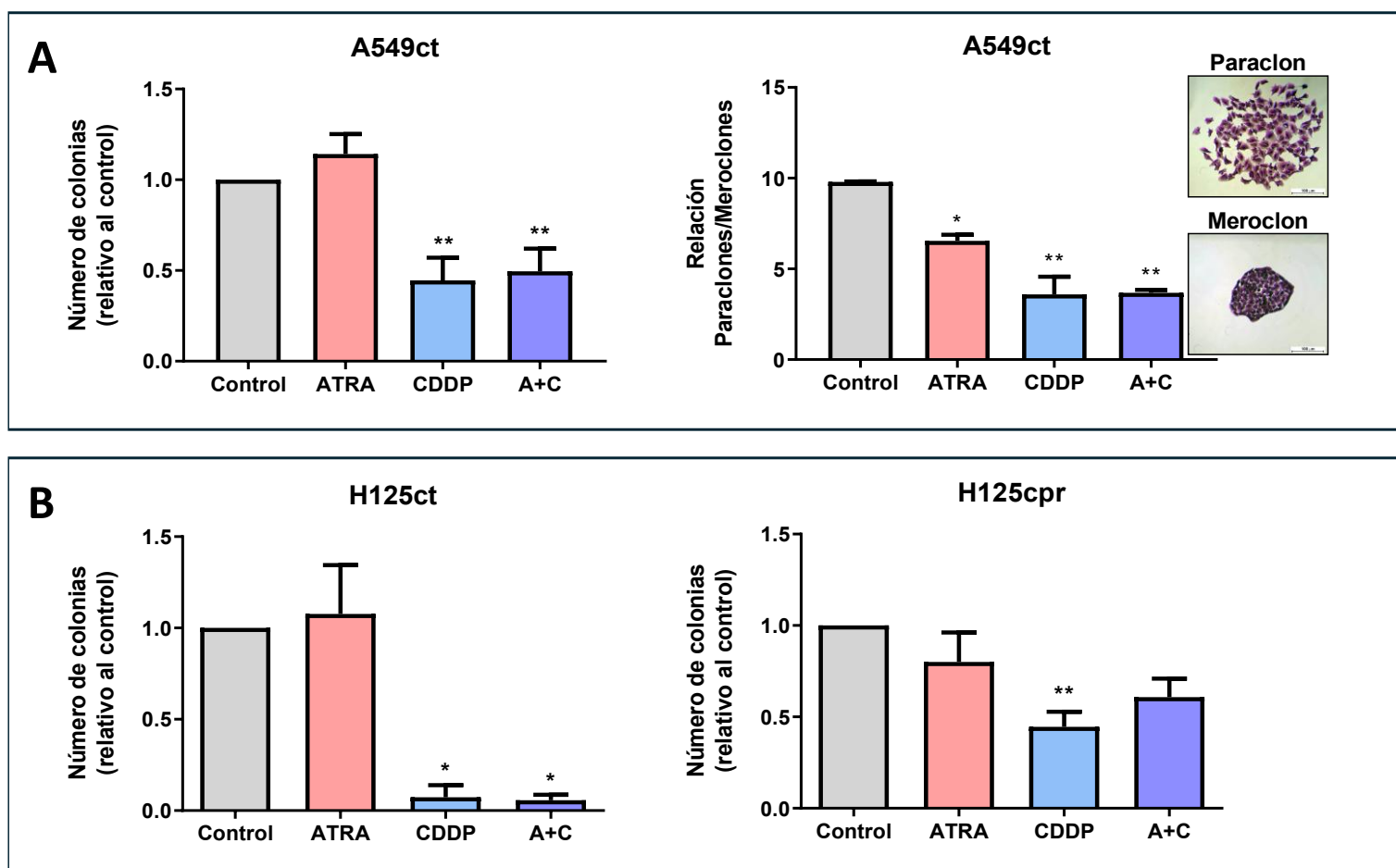


Figura 31. Ensayo de clonogenicidad. Número de colonias relativo al control luego de 48 hs de tratamiento en A549ct (A) y H125 (B). \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  con respecto al control. ANOVA. N=4.

## **2.5. Efecto de los tratamientos con ATRA y CDDP sobre parámetros morfológicos celulares en cultivo**

Análogamente a la comparación realizada entre las líneas controles y sus variantes resistentes a CDDP, se evaluó el efecto de los tratamientos con ATRA, CDDP y su combinación sobre la morfología celular. Para ello, se analizó el tamaño y complejidad celular mediante citometría de flujo, utilizando células vivas luego de 48 hs de tratamiento (Figura 32). En la línea A549, tanto en la variante sensible como la resistente a CDDP, se observa una tendencia a aumentar la complejidad celular (SSC-A) luego del tratamiento con CDDP (solo o en combinación con ATRA) (Figura 32A y B). En la línea H125, esta tendencia resultó estadísticamente significativa en H125ct, observándose además un aumento del tamaño celular (FSC-A) luego del tratamiento con CDDP (solo o en combinación con ATRA) (Figura 32C y D).

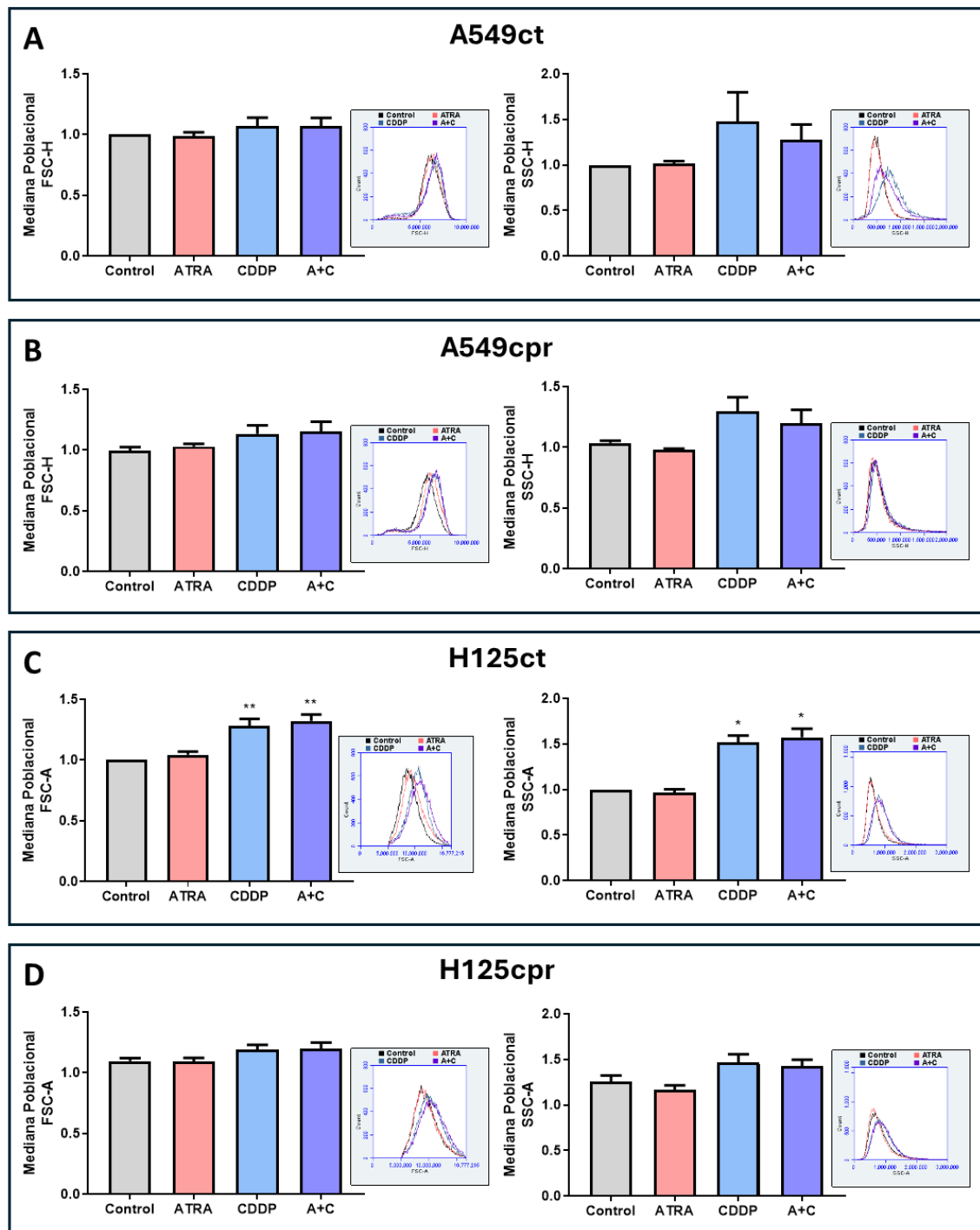


Figura 32. Morfología celular evaluada por citometría de flujo. Tamaño y complejidad celular expresados como la mediana poblacional de FSC-A y SSC-A respectivamente, relativas a la línea celular control, para A549ct (A), A549cpr (B), H125ct (C) y H125cpr (D). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  con respecto al control. ANOVA. N=3.

Con el fin de completar el análisis morfológico, se evaluó el tamaño nuclear mediante tinción con DAPI luego de 48 hs de tratamiento (Figura 33). El tratamiento con CDDP tiende a aumentar el tamaño nuclear de las líneas sensibles, así como en A549cpr. En contraste, H125cpr presenta basalmente un tamaño nuclear significativamente mayor que H125ct, sin evidenciarse modificaciones adicionales luego de los tratamientos.

Por otro lado, se analizó la presencia de células con fragmentos citoplasmáticos de cromatina (CCF). En ambas líneas sensibles, el tratamiento con CDDP indujo un aumento en el porcentaje de células con CCF. En cambio, las líneas resistentes a CDDP muestran valores basalmente elevados, que no se vieron modificados por ninguno de los tratamientos efectuados.

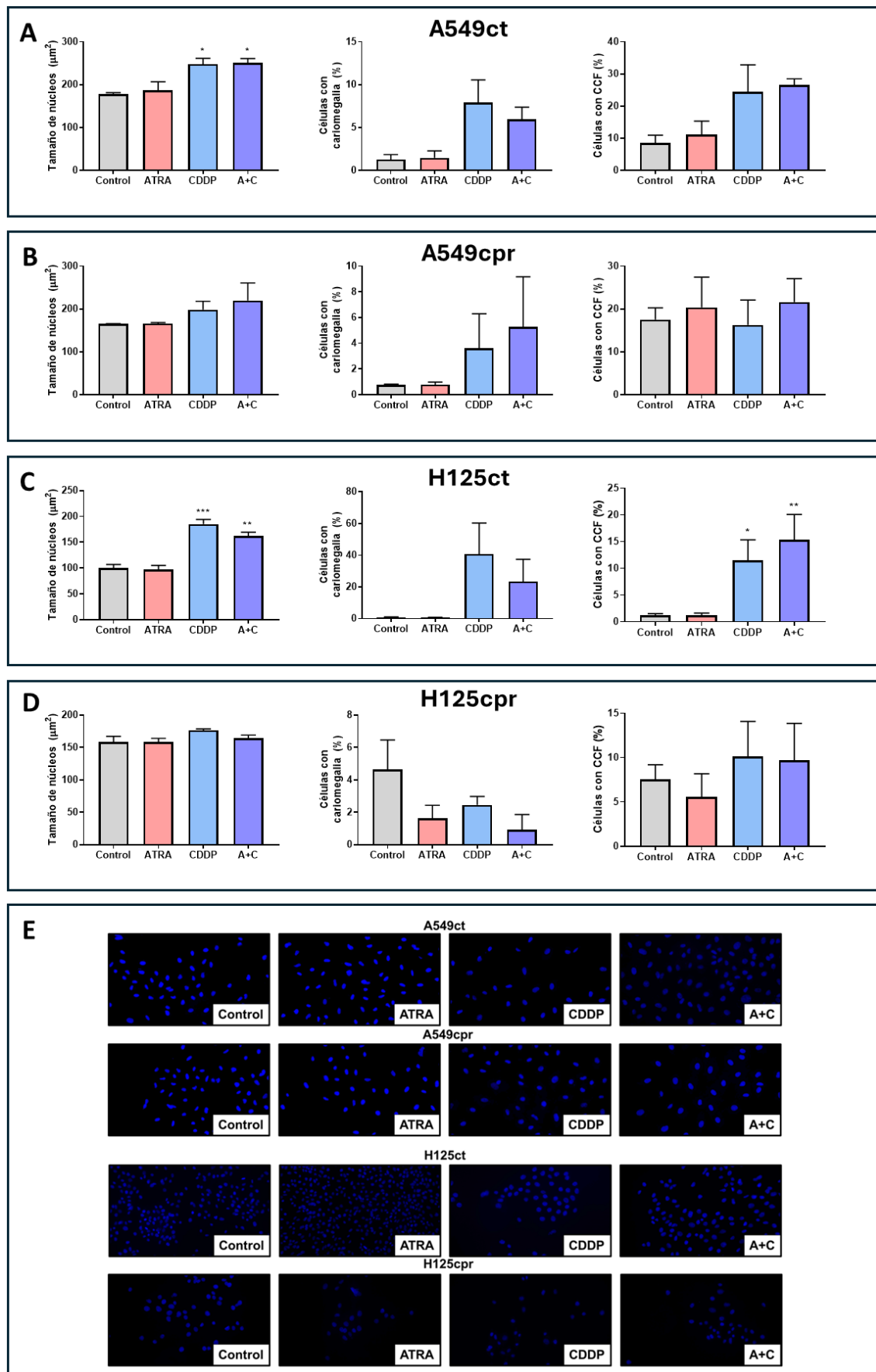


Figura 33. Morfología nuclear. Superficie nuclear evaluada por tinción con DAPI, porcentaje de células con cariomegalia y porcentaje de células con fragmentos citoplasmáticos de la cromatina (CCF) para A549ct (A), A549cpr (B), H125ct (C) y H125cpr (B) luego de 48 hs de tratamiento con ATRA y CDDP. Se muestran imágenes representativas de los núcleos teñidos con DAPI para cada línea celular y condición experimental (E). Aumento 600X. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  con respecto al control. ANOVA. N=3.

## **2.6. Efecto de los tratamientos con ATRA y CDDP sobre procesos de muerte celular**

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre los mecanismos de muerte celular, se realizó un ensayo de marcación con Anexina V e ioduro de propidio (IP). Las células fueron tratadas por 48 hs, despegadas e incubadas con ambos marcadores para su posterior análisis por citometría de flujo. Observamos que, en las líneas sensibles, el tratamiento con CDDP solo o en combinación con ATRA produce una tendencia al aumento la proporción de células apoptóticas (Figura 34). En contraste, en las líneas resistentes a CDDP no se observaron cambios en la fracción apoptótica luego de los tratamientos. El porcentaje de células necróticas detectado fue mínimo y se las excluyó del análisis en todas las condiciones experimentales.

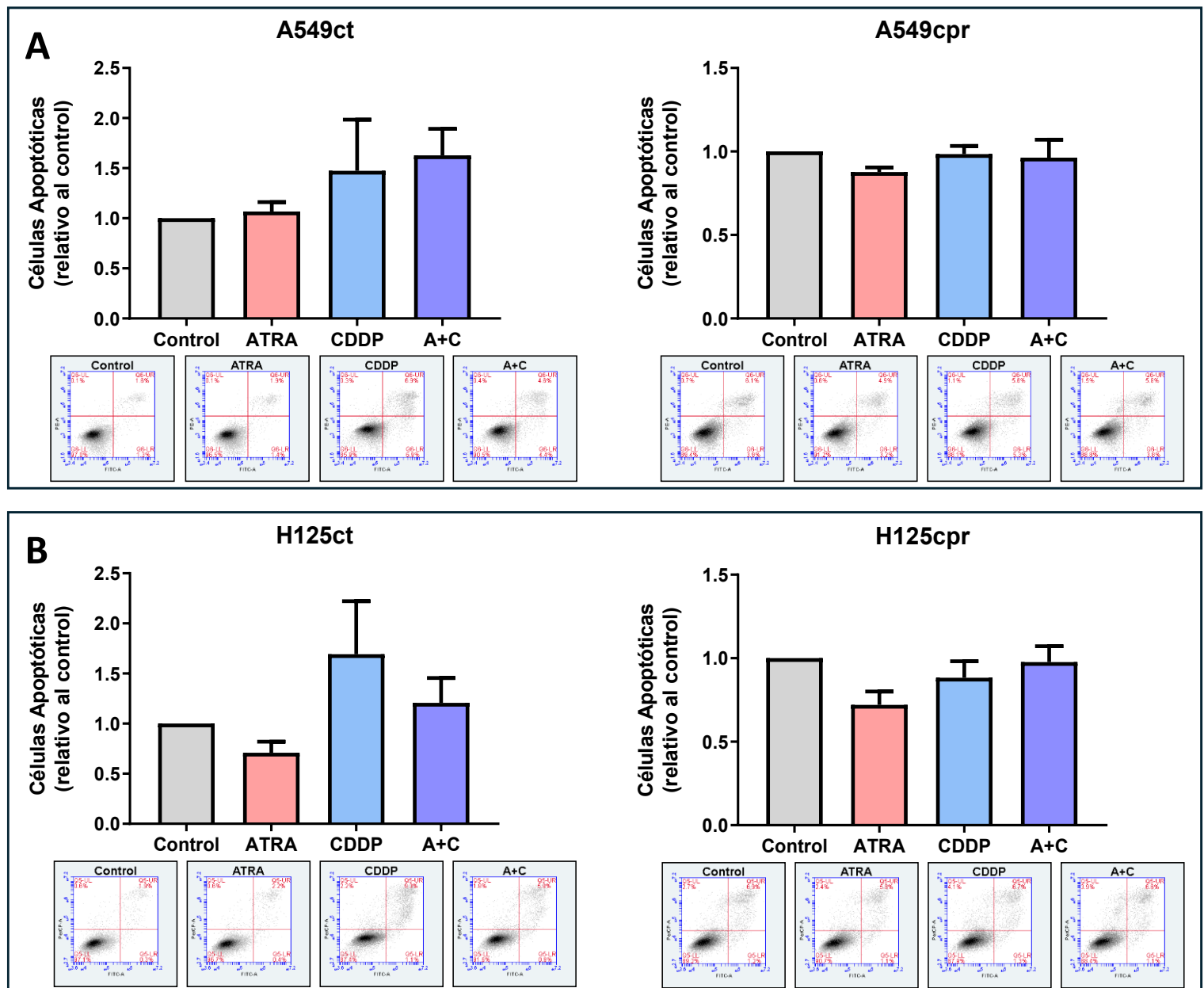


Figura 34. Análisis de apoptosis por tinción con Anexina V e Ioduro de Propidio. Porcentaje de células apoptóticas para A549(A) y H125 (B) luego de 48 hs de tratamiento con ATRA, CDDP y su combinación, expresado en forma relativa al control. Debajo de cada histograma se muestran los gráficos de puntos representativos de IP en función de Anexina V para cada condición experimental. ANOVA. N=3.

En concordancia con resultados obtenidos por citometría de flujo, se evaluó la expresión de proteínas clave de la vía intrínseca de la apoptosis en lisados proteicos totales de H125 luego de 48 hs de tratamiento con ATRA, CDDP o su combinación. Evaluamos en particular la expresión

de la proteína proapoptótica BAX y de la proteína antiapoptótica BCLX-L. Con el fin de estimar el balance apoptótico global, se representó la relación entre ambas proteínas (Figura 35). El tratamiento con CDDP tendió a aumentar el balance proapoptótico en H125ct, efecto que no se observó en la variante resistente H125cpr, reproduciendo el patrón detectado en los ensayos de apoptosis por citometría de flujo.

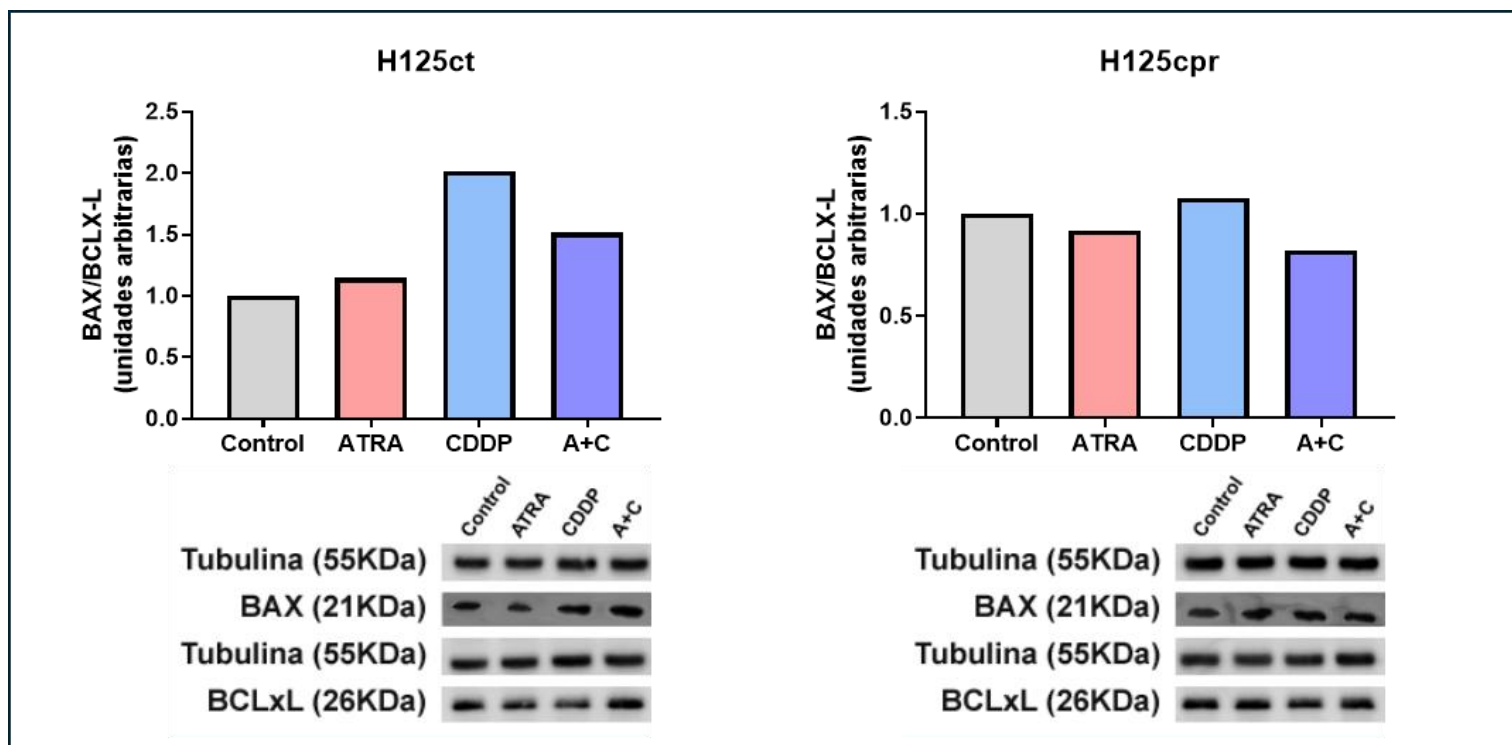


Figura 35. Análisis de la vía intrínseca de la apoptosis. Cuantificación de la expresión de la proteína proapoptótica BAX relativa a la expresión de la proteína antiapoptótica BCLX-L. Gráfico representativo de 1 ensayo.

## 2.7. Efecto de los tratamientos con ATRA y CDDP sobre el componente progenitor

### 2.7.1. Evaluación de la expresión de genes relacionados a pluripotencialidad

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre el componente progenitor, se evaluó por RT-qPCR la expresión de los marcadores de pluripotencialidad NANOG y OCT4. En A549cpr todos los tratamientos ensayados indujeron un aumento significativo en la expresión de NANOG. Por

su parte, tanto en la variante sensible como la resistente de H125 mostraron una tendencia a aumentar ambos genes pluripotenciales en presencia de ATRA, sugiriendo una modulación del componente progenitor asociada principalmente a este tratamiento (Figura 36).

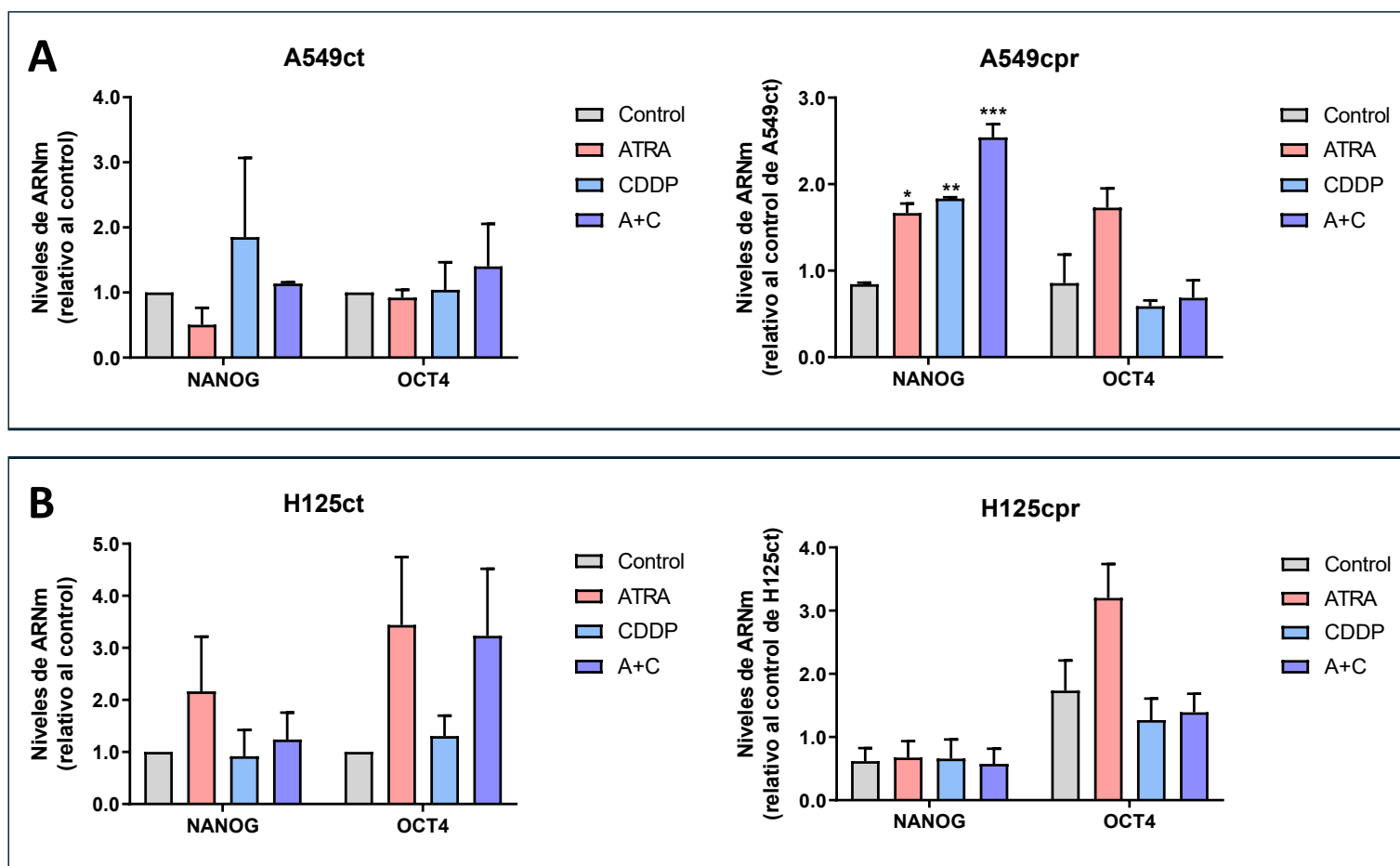


Figura 36. Expresión de los genes pluripotenciales. Niveles de ARNm de NANOG y OCT4 medidos por RT-qPCR en A549 (A) y H125 (B). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 con respecto al control. ANOVA. N=3.

### 2.7.2. Evaluación de la formación y el crecimiento de oncoesferas

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la población con características “stem”, se realizaron cultivos de oncoesferas partiendo de células pre-tratadas durante 48 hs con CDDP, ATRA o su combinación. Ninguno de los tratamientos evaluados produjo modificaciones significativas en el tamaño de las oncoesferas en las líneas evaluadas (Figura 37). No obstante,

se observaron cambios en la capacidad de formación de oncoesferas. El tratamiento con CDDP generó una disminución en el porcentaje de oncoesferas formadas en la línea H125ct, tendencia que se repitió en A549ct y A549cpr (Figura 37).

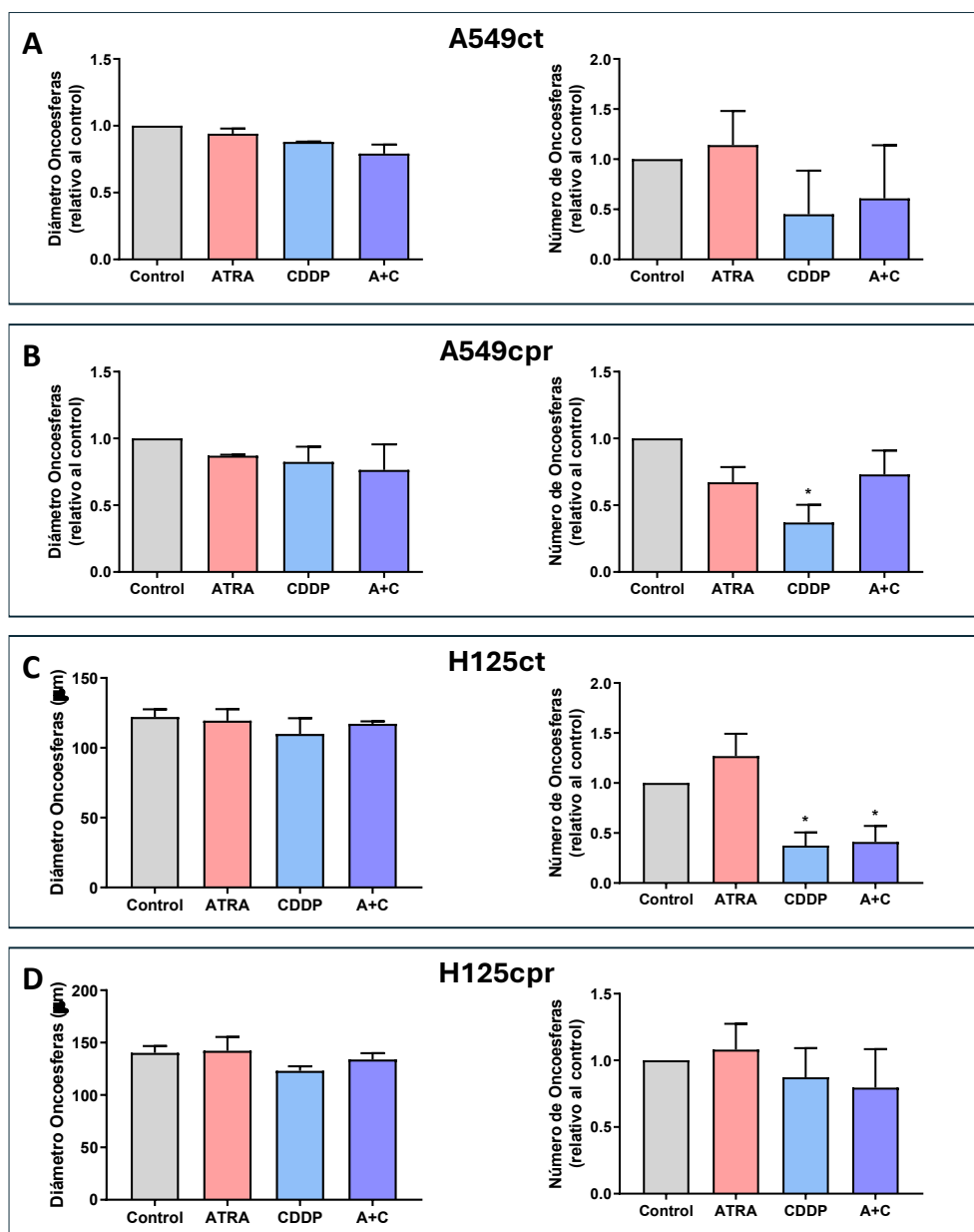


Figura 37. Tamaño y número de oncoesferas. Diámetro y número de oncoesferas derivadas de células pretratadas durante 48 hs con ATRA, CDDP y su combinación en A549ct (A), A549cpr (B), H125ct (C) y H125cpr (D), luego de 17 u 8 días de cultivo para A549 y H125 respectivamente.

\* $p < 0,05$  con respecto al control. ANOVA. N=3.

## 2.8. Evaluación del tratamiento de ATRA y CDDP sobre la expresión génica en oncoesferas

Con el fin de profundizar en el análisis del componente progenitor en nuestros modelos, se evaluó el efecto directo del tratamiento con ATRA y CDDP sobre oncoesferas, analizando la expresión de genes relacionados con los objetivos planteados previamente. Para definir la dosis de CDDP a utilizar, se realizó una curva dosis-respuesta en oncoesferas A549ct de aproximadamente 70  $\mu\text{m}$ . Luego de 72 hs de tratamiento, se determinó la viabilidad celular mediante APH y se calculó la  $\text{IC}_{50}$  que fue de 35  $\mu\text{M}$ , la cual se utilizó para los ensayos subsiguientes (Figura 38).

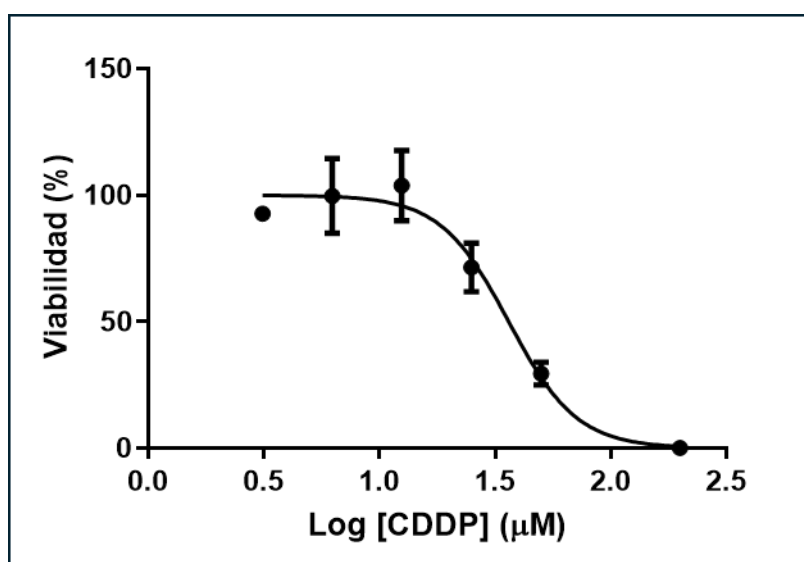


Figura 38. Curva dosis-respuesta frente al cisplatino para las oncoesferas de A549ct, determinada a las 72 hs.

### 2.8.1. Efecto del tratamiento de ATRA y CDDP sobre la expresión de receptores retinoides en oncoesferas A549

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre el sistema del ácido retinoico en oncoesferas A549, se analizó la expresión de los receptores retinoides, enfocándonos en la relación entre  $\text{RAR}\beta/\text{RAR}\gamma$ , como indicador indirecto del grado de diferenciación celular (Figura 39). Todos los tratamientos que incluyeron ATRA tendieron a aumentar la relación  $\text{RAR}\beta/\text{RAR}\gamma$  tanto en la línea

sensible como resistente a CDDP, en concordancia con lo observado en monocapas. Este patrón sugiere la adquisición de un fenotipo más diferenciado en comparación con la condición control.

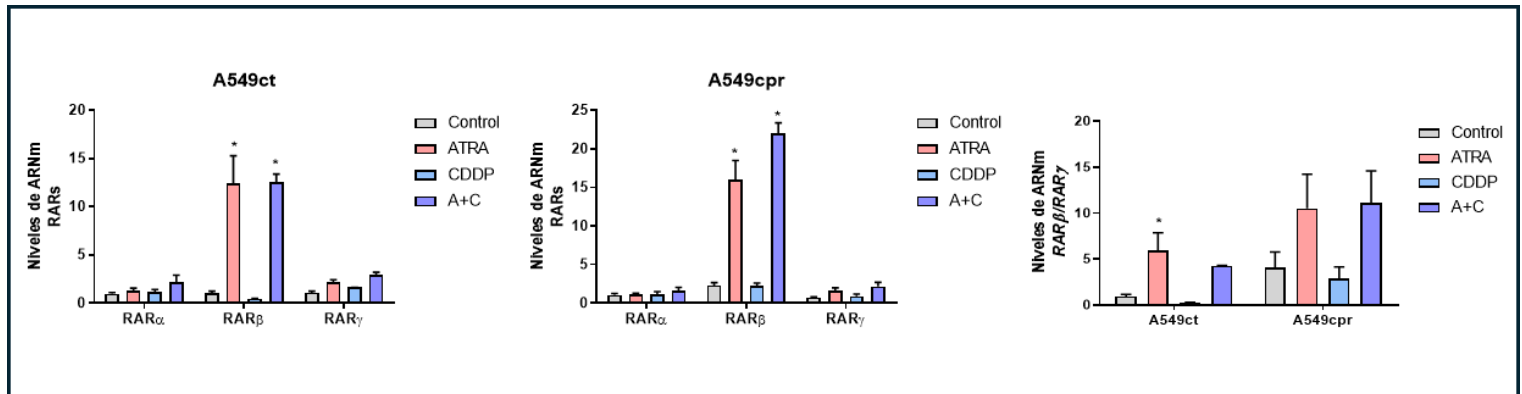


Figura 39. Expresión de los receptores retinoides medidos por RT-qPCR en oncoesferas de A549.

\* $p < 0,05$  con respecto al control. ANOVA. N=2.

### 2.8.2. Efecto del tratamiento de ATRA y CDDP sobre la expresión de genes pluripotenciales en oncoesferas A549

Por otro lado, evaluamos el efecto de los tratamientos sobre la expresión de genes pluripotenciales en oncoesferas de A549 tratadas. En la línea A549ct, el tratamiento con ATRA mostró una tendencia a disminuir la expresión de NANOG y OCT4. En cambio, en A549cpr se observó una tendencia opuesta, con un incremento en la expresión de estos marcadores (Figura 40).

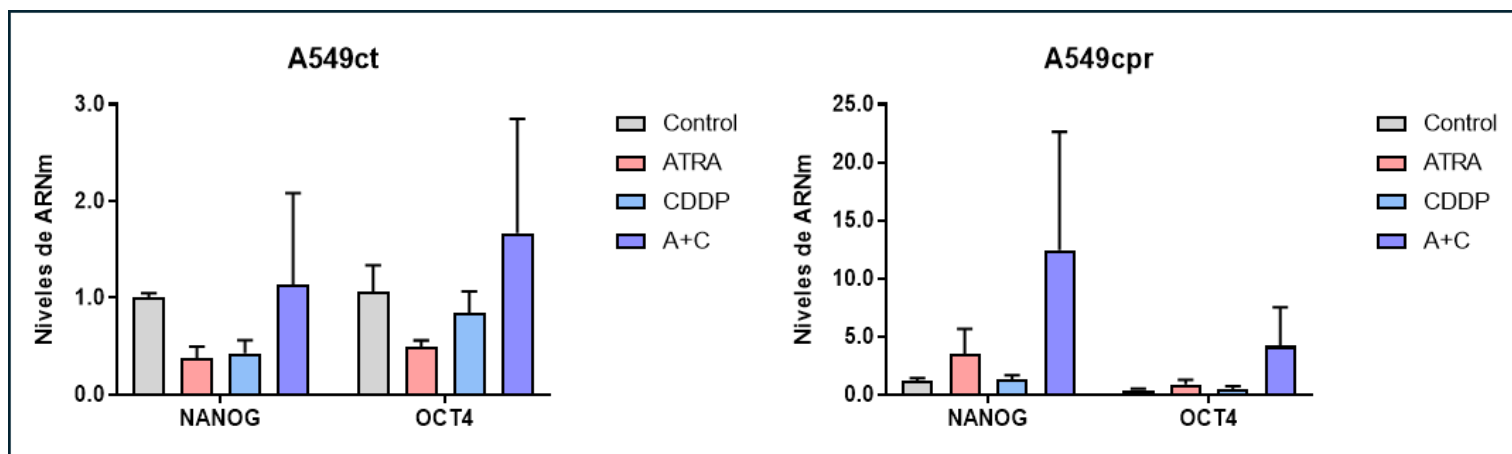


Figura 40. Expresión de los genes pluripotenciales NANOG y OCT4 medidos por RT-qPCR para las oncoesferas de A549. ANOVA. N=2.

### 2.8.3. Efecto del tratamiento de ATRA y CDDP sobre la expresión de receptores retinoides en oncoesferas H125

En el caso de las oncoesferas H125, se adoptó un enfoque alternativo donde las monocapas se trataron con los compuestos y posteriormente se generaron las oncoesferas a partir de dichas células para evaluar la expresión de los receptores retinoides (Figura 41). La expresión de RAR $\beta$  resultó no detectable en todas las condiciones analizadas. Por otro lado, en H125ct el tratamiento con CDDP tendió a aumentar la expresión de RAR $\alpha$  y RAR $\gamma$ , mientras que en H125cpr el ATRA mostró una tendencia a incrementar la expresión de RAR $\gamma$ .

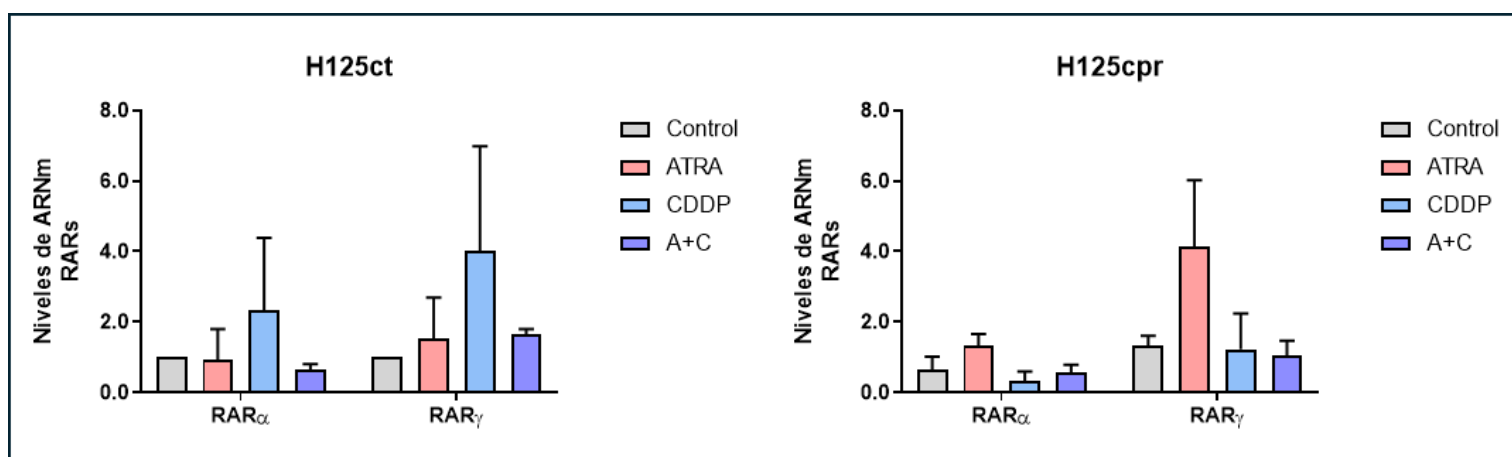


Figura 41. Expresión de los receptores retinoides medidos por RT-qPCR en oncoesferas de H125.

ANOVA. N=2.

#### 2.8.4. Efecto del tratamiento con ATRA y CDDP sobre la expresión de genes pluripotenciales en oncoesferas H125

Finalmente, se evaluó el efecto de los pretratamientos sobre genes pluripotenciales en oncoesferas H125. En ambas líneas celulares, los tratamientos tendieron a aumentar la expresión relativa de NANOG y OCT4 en comparación con sus respectivos controles (Figura 42).

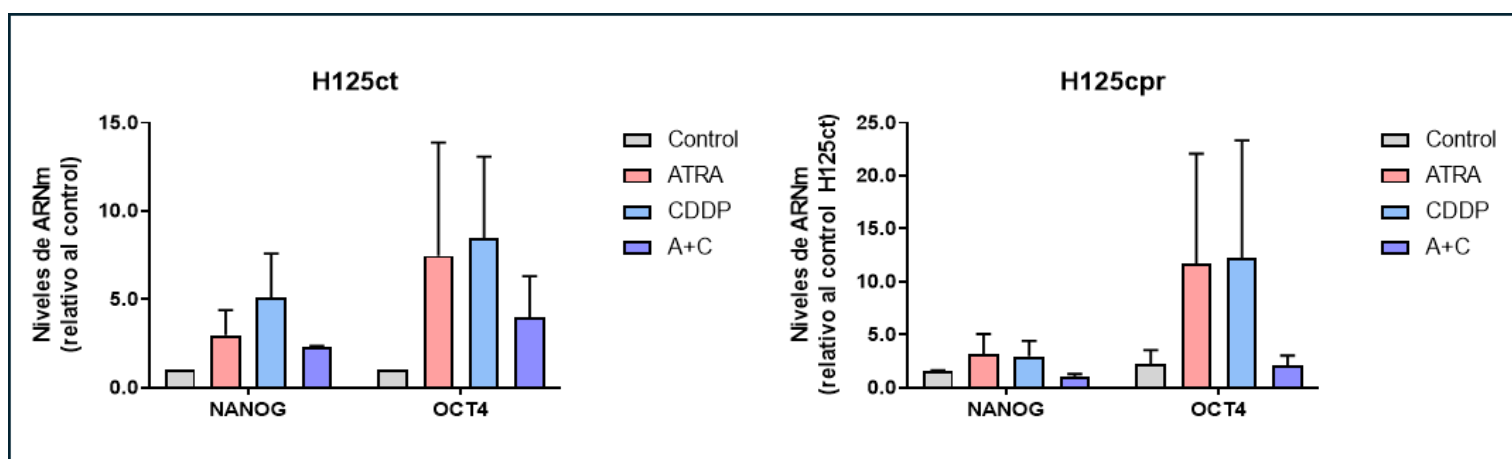


Figura 42. Expresión de los genes pluripotenciales NANOG y OCT4 medidos por RT-qPCR para las oncoesferas de H125. ANOVA. N=2.

### **3. Validación de los resultados en modelos experimentales**

Para realizar una primera evaluación en estudios *in vivo* decidimos utilizar el modelo de cáncer de pulmón LP07 singénico en ratones BALB/c. Tal como se describió previamente en la sección de Materiales y Métodos, esta línea de tumor murino de pulmón fue desarrollada y caracterizada desde el Área de Investigación del IOAHR (Urtreger, 2001).

#### **3.1. Evaluación del efecto del CDDP sobre la proliferación celular en LP07**

Como primera medida decidimos evaluar la  $IC_{50}$  de CDDP para esta línea celular luego de 72 hs de tratamiento (Figura 43). Observamos que esta línea celular murina presenta una  $IC_{50}$  de 3,220  $\mu$ M (con un intervalo de confianza del 95% de 2,729 a 3,932  $\mu$ M). Esto enmarca a este modelo celular con una sensibilidad a Cisplatino intermedia comparada con el modelo más resistente caracterizado en este trabajo de Tesis: las H125 (de aproximadamente 1 y 7  $\mu$ M, control vs resistente).

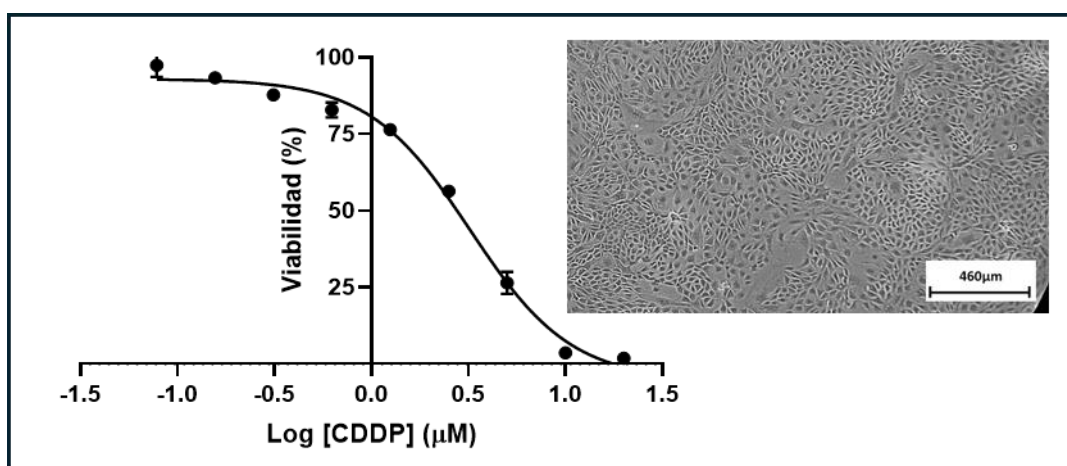


Figura 43. Curva dosis respuesta representativa para LP07 luego de 72 hs de tratamiento con Cisplatino. Foto representativa de la monocapa de LP07. Aumento 200X. Barra de escala = 460  $\mu$ m N=2.

### **3.2. Evaluación del efecto del tratamiento con ATRA y CDDP sobre la clonogenicidad celular en LP07**

Por otro lado, para evaluar en forma indirecta la presencia de células pluripotentes decidimos realizar un ensayo clonogénico luego de pretratar las células LP07 con ATRA 1  $\mu$ M, CDDP 3  $\mu$ M o su combinación. Observamos que, de forma muy similar a lo ocurrido en A549ct, el tratamiento con CDDP impide la formación de colonias en las condiciones evaluadas, mientras que el ATRA no produce ningún efecto significativo (Figura 44).

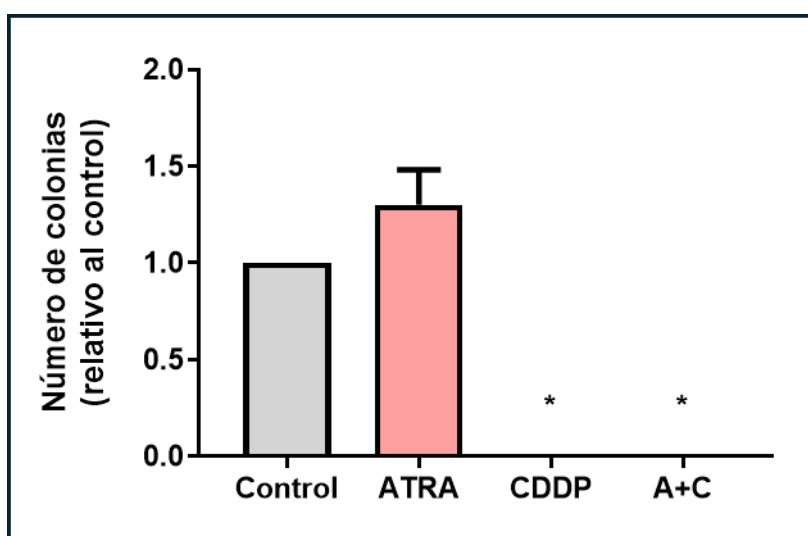


Figura 44. Ensayo clonogénico. Se grafica el número de colonias relativo al control luego de 48 hs de tratamiento para LP07. \* $p < 0,05$  con respecto al control. ANOVA. N=4.

A pesar de la inhibición de la clonogenicidad ejercida por el CDDP, esta línea fue capaz de formar oncoesferas de 90  $\mu$ m de diámetro promedio luego de 7 días de cultivo (1% de formación de oncoesferas), por lo que procedimos a realizar los ensayos *in vivo* en ratones BALB/c.

### **3.3. Evaluación del tratamiento de ATRA y CDDP sobre la progresión tumoral *in vivo* en LP07**

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento tumoral *in vivo* inoculamos células LP07 en forma subcutánea en ratones BALB/c. Una vez detectado el tumor en forma

palpable, 7 días después de la inoculación, realizamos una cirugía bajo anestesia para introducir en forma subcutánea un pellet de liberación lenta de nanoarcilla con 10 mg de ATRA o solo como control. Veinticuatro horas luego de la cirugía se comenzó el tratamiento i.p con CDDP 2 mg/kg dos veces por semana hasta un total de 5 dosis. El tamaño tumoral fue registrado a lo largo de los 21 días de tratamiento (Figura 45A), así como el peso de los ratones (datos no mostrados). Luego de 21 días de palpado el tumor, observamos que solo el tratamiento combinado con ATRA y CDDP produce una disminución en el crecimiento tumoral. Además, puede observarse en las fotos que el tumor correspondiente al tratamiento combinado presenta una angiogénesis reducida.

Para evaluar si el efecto observado en el tratamiento combinado es un efecto aditivo o sinérgico, realizamos un cálculo de fracción del volumen tumoral (FVT) relativa al grupo control (Figura 45B). Observamos que en los tres tiempos evaluados (22, 25 y 28 días después de la inoculación de las células en el subcutáneo de los ratones) la relación FVT esperada/FVT observada es mayor a 1, indicando que el efecto del tratamiento combinado es mayor al esperado por la suma de los tratamientos simples, indicando que el efecto es sinérgico.

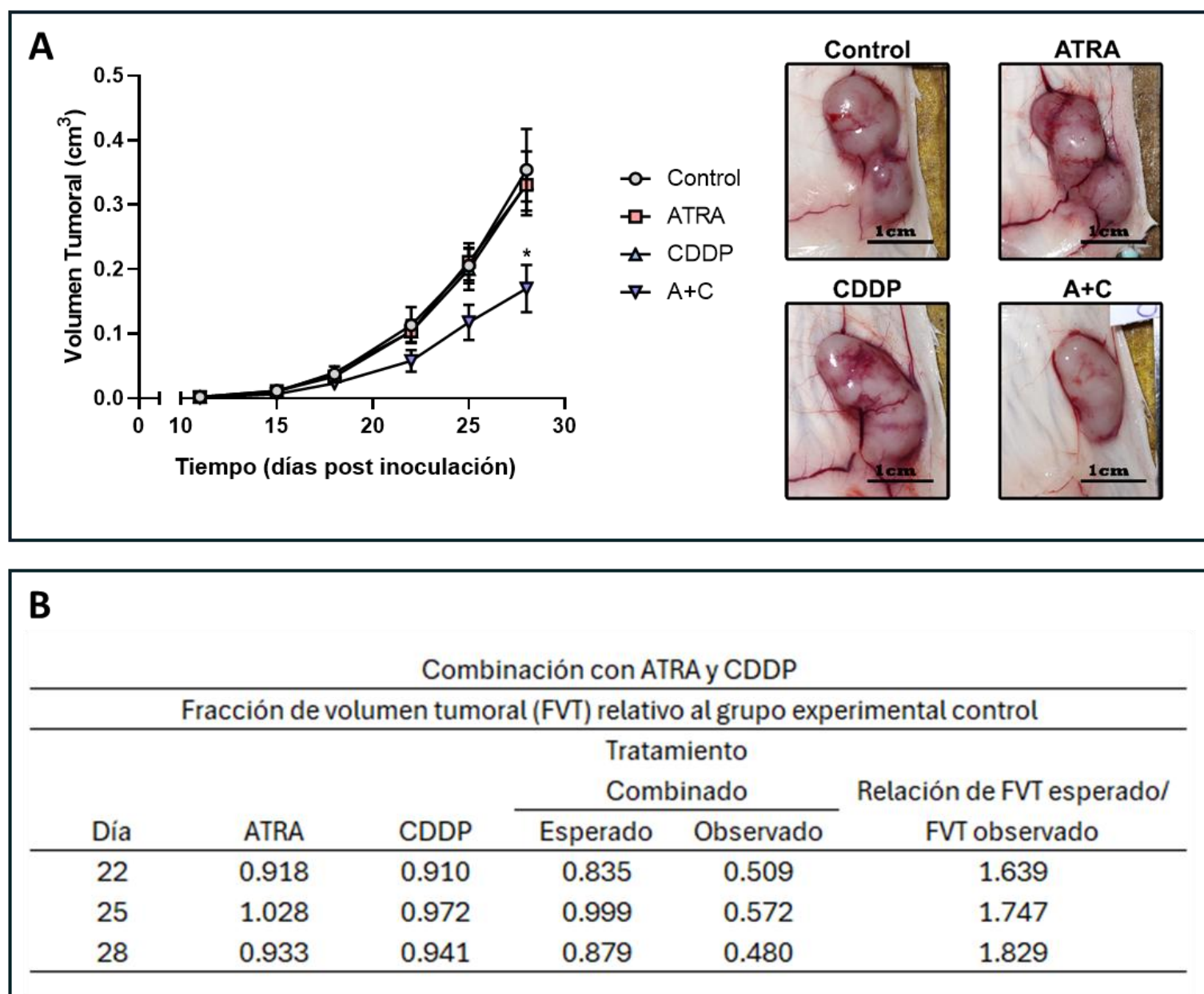


Figura 45. (A) Volumen tumoral en función del tiempo expresado en días posteriores a la inoculación de las células LP07. Se muestran registros fotográficos representativos de un tumor de cada grupo. (B) Tabla de fracciones de volumen tumoral para los tratamientos simples y el tratamiento combinado, tanto esperado como observado. Se muestra la relación de FVT esperado/FVT observado como indicador de efecto sinérgico ( $>1$ ) o efecto menor al aditivo ( $<1$ ). Barra de escala = 1 cm. \* $p < 0,05$ , con respecto al control. ANOVA de dos factores. N=8.

Por otro lado, luego de la necropsia, fijamos los pulmones con Bouin para analizar la presencia de macrometástasis bajo lupa (Figura 46). Luego del recuento final de metástasis en todos los

lóbulo pulmonares observamos que el grupo que recibió el tratamiento combinado con ATRA y CDDP sólo mostro un nódulo metastásico en un ratón.

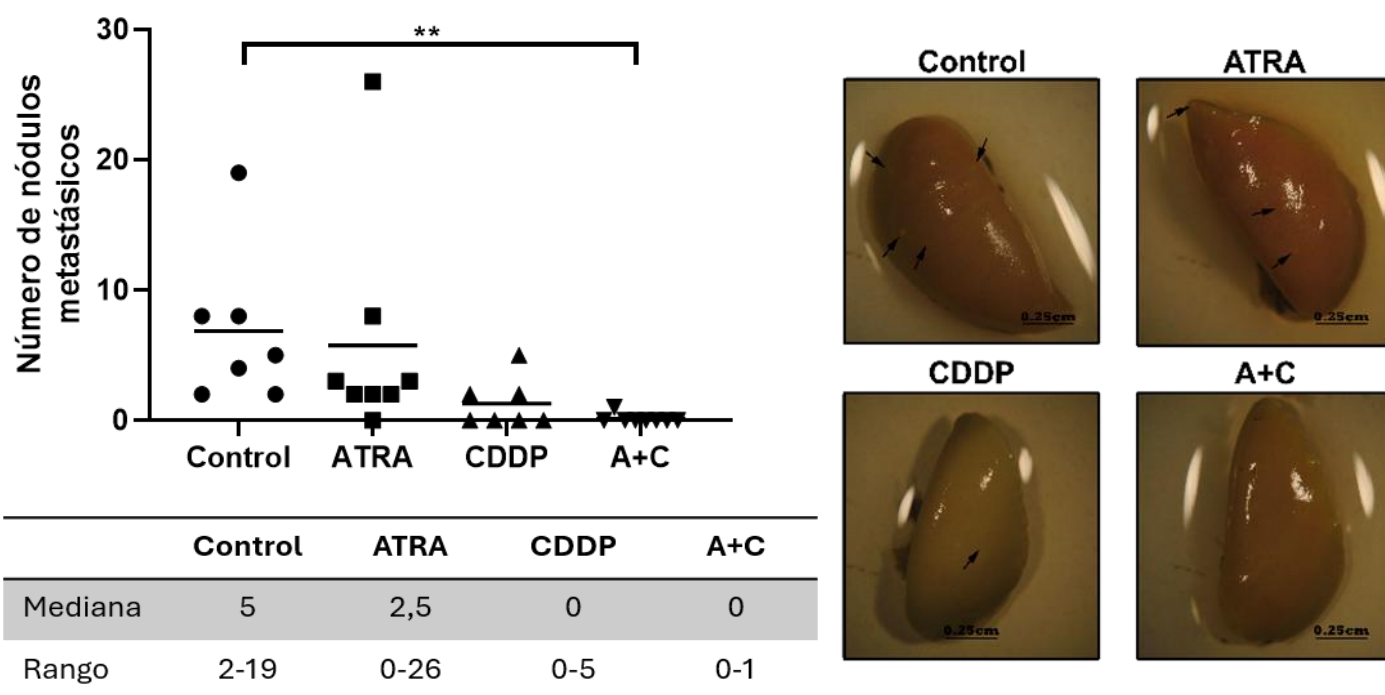


Figura 46. Número de macrometástasis observadas bajo lupa luego de la necropsia. Se muestran registros fotográficos de un nódulo representativo de los pulmones de cada grupo experimental. \*\* $p < 0,01$ , con respecto al control. Barra de escala = 0,25 cm. Kruskal-Wallis. N=8.

### **3.4. Evaluación del tratamiento de ATRA y CDDP sobre la capacidad metastásica de células provenientes de oncoesferas LP07 en un modelo de metástasis experimentales *in vivo***

Para profundizar en las últimas etapas de la cascada metastasica, decidimos realizar un ensayo de metástasis experimentales inoculando 7.500 células derivadas de oncoesferas LP07 por vía intravenosa en ratones BALB/c. Dichos ratones habían sido operados para introducir de manera subcutánea el pellet de liberación lenta de ATRA (o vehículo) 72 hs antes. Del mismo modo, 24

Después de la cirugía comenzaron a recibir la primera dosis de CDDP o su vehículo de forma intraperitoneal, repitiéndola 2 veces por semana. 21 días luego de la inoculación de las células evaluamos la presencia de macro y micrometástasis en los pulmones (Figura 47). Las macrometástasis fueron evaluadas bajo lupa y las micrometástasis fueron evaluadas por microscopio óptico en cortes histológicos realizados como se describió en el apartado Materiales y Métodos. Observamos que todos los ratones controles evidenciaron macrometástasis y que solo el tratamiento combinado generó una tendencia a disminuir la presencia de micrometástasis observadas al microscopio.

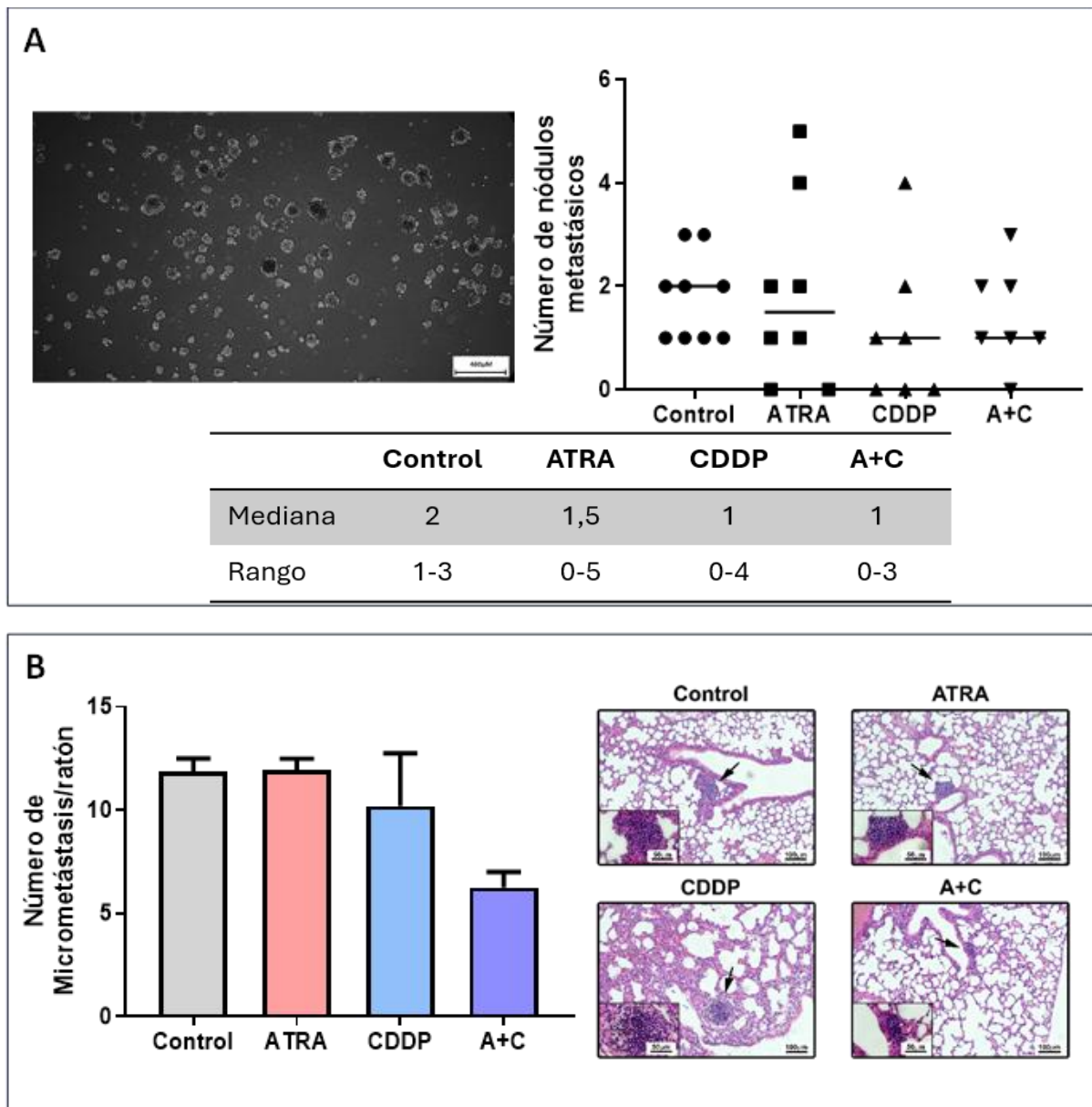


Figura 47. Ensayo de metástasis experimentales a partir de células provenientes de oncoesferas LP07. Foto de oncoesferas formadas por LP07 previo a su disgregación e inoculación por vía endovenosa en ratones BALB/c junto al número de macrometástasis encontradas por pulmón (A) y cantidad de micrometástasis encontradas luego de realizar cortes histológicos (B). Se muestran registros fotográficos de los cortes histológicos teñidos con Hematoxilina y Eosina, señalando las micrometástasis encontradas. Dentro de cada foto hay una magnificación de la misma. Barras de escala = 100 y 50  $\mu$ m. Aumento = 400X y 1000X. Kruskal-Wallis. N=8.

#### **4. Evaluación de muestras de pacientes del biobanco de tejidos del IOAR**

Se evaluó mediante RT-qPCR el nivel de expresión de ARNm de los genes NANOG, OCT4, RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$  y la relación entre los dos últimos RAR $\beta$ /RAR $\gamma$ , en muestras de tejido tumoral de 21 pacientes con carcinoma pulmonar.

Como consecuencia de la falta de muestras correspondientes a parénquima pulmonar normal, peritumoral o de patología no tumoral que pudieran emplearse como “control” se decidió emplear el valor de la mediana (Md) con el propósito de establecer un valor de corte. Así, se denominan valores elevados o positivos de NANOG, OCT4, RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$  y la relación RAR $\beta$ /RAR $\gamma$  cuando la misma equipara o supera el valor de la Md en cada uno de los casos. Es por ello que para la relativización de los niveles de expresión obtenidos por RT-qPCR se utilizaron tres tumores con clasificación de neuroendocrinos como controles. En la Tabla 4 se muestran los valores de la Md para cada uno de los genes estudiados, relativos a estas tres muestras.

| <b>Gen o relación entre genes</b> | <b>Md</b>   |
|-----------------------------------|-------------|
| NANOG                             | 0,093969301 |
| OCT4                              | 0,726986259 |
| RAR $\alpha$                      | 0,628274286 |
| RAR $\beta$                       | 1,952546384 |
| RAR $\gamma$                      | 1,680320962 |
| RAR $\beta$ /RAR $\gamma$         | 1,135057149 |

Tabla 4. Valores de la mediana de la expresión de los ARNm evaluados. Se utilizaron las muestras de los tres tumores con características neuroendocrinas como controles al momento de relativizar.

Si hubiéramos contado con un grupo “control” hubiéramos aplicado la curva ROC [(del inglés Receiver Operating Characteristic), Característica Operativa del Receptor], con el propósito de determinar el punto de corte más adecuado. De esta manera, el mismo hubiera correspondido al valor que permitiera la mejor discriminación entre los dos grupos de pacientes o conjuntos de muestras tisulares: carcinoma pulmonar vs tejido pulmonar normal o grupo control.

La expresión de ARNm de los genes NANOG, OCT4, RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$  y la relación entre los dos últimos RAR $\beta$ /RAR $\gamma$ , no mostró correlación con la mayoría de los parámetros clínicos y de anatomía patológica analizados: sexo, edad al diagnóstico del carcinoma pulmonar primario, hábito tabáquico, comorbilidades [metabolopatías (diabetes, obesidad), enfermedades endocrinológicas (hipotiroidismo), hipertensión arterial, afecciones respiratorias (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, EPOC), antecedentes de tumores malignos primarios previos, histología del tumor primario de pulmón, TNM (tamaño tumoral, número de ganglios linfáticos comprometidos por metástasis al momento de efectuarse la cirugía, metástasis a distancia al diagnóstico inicial), estos tres últimos datos se resumen en el estadio tumoral, tratamientos recibidos a causa del carcinoma pulmonar (tipo de cirugía, terapias adyuvantes (radioterapia, quimioterapia ambas como monoterapias o combinaciones de las mismas) (Test de Spearman's Rho p=NS). Para estos cálculos primero realizamos el análisis de categorizar, dentro de los pacientes positivos para cada marcador, cuantos de ellos son los que poseen estas características anatomo-patológicas (Tabla 5).

| Características           |                            | N° Pacientes Positivos / N° Total Pacientes (%) |                    |                    |                    |                    |                           |
|---------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------------|
|                           |                            | NANOG                                           | OCT4               | RAR $\alpha$       | RAR $\beta$        | RAR $\gamma$       | RAR $\beta$ /RAR $\gamma$ |
| Sexo                      | Mujer                      | 7/21 (33,3)                                     | 7/21 (33,3)        | 6/21 (28,6)        | 8/21 (38,1)        | <b>9/21 (42,9)</b> | 6/21 (28,6)               |
|                           | Hombre                     | 4/21 (19,1)                                     | 4/21 (19,1)        | 5/21 (23,8)        | 3/21 (14,3)        | <b>2/21 (9,5)</b>  | 5/21 (23,8)               |
| Grupo Etario              | 25-60                      | 3/21 (14,3)                                     | 3/21 (14,3)        | 5/21 (23,8)        | 5/21 (23,8)        | 5/21 (23,8)        | 4/21 (19,1)               |
|                           | 61-90                      | 8/21 (38,1)                                     | 8/21 (38,1)        | 6/21 (28,6)        | 6/21 (28,6)        | 6/21 (28,6)        | 7/11 (33,3)               |
| Antecedentes Personales   |                            |                                                 |                    |                    |                    |                    |                           |
| Tabaquismo                | Presencia                  | <b>6/21 (28,6)</b>                              | 7/21 (33,3)        | <b>6/21 (28,6)</b> | 10/21 (47,6)       | 10/21 (47,6)       | 10/21 (47,6)              |
|                           | Ausencia                   | <b>5/21 (23,8)</b>                              | 4/21 (19,1)        | <b>5/21 (23,8)</b> | 1/21 (4,8)         | 1/21 (4,8)         | 1/21 (4,8)                |
| Comorbilidades            | Presencia                  | 6/21 (28,6)                                     | 7/21 (33,3)        | 9/21 (42,9)        | 7/21 (33,3)        | 8/21 (38,1)        | 9/21 (42,9)               |
|                           | Ausencia                   | 5/21 (23,8)                                     | 4/21 (19,1)        | 2/21 (9,5)         | 4/21 (19,1)        | 3/21 (14,3)        | 2/21 (9,5)                |
| Otros Tumores primarios   | Presencia                  | 3/21 (14,3)                                     | 2/21 (9,5)         | 3/21 (14,3)        | 5/21 (23,8)        | <b>6/21 (28,6)</b> | 5/21 (23,8)               |
|                           | Ausencia                   | 8/21 (38,1)                                     | 9/21 (42,9)        | 8/21 (38,1)        | 6/21 (28,6)        | <b>5/21 (23,8)</b> | 6/21 (28,6)               |
| Histología                | Ca. de células Pequeñas    | 1/21 (4,8)                                      | 3/21 (14,3)        | 3/21 (14,3)        | 3/21 (14,3)        | 3/21 (14,3)        | 3/21 (14,3)               |
|                           | Ca. de células no pequeñas | 7/21 (33,3)                                     | 6/21 (28,6)        | 6/21 (28,6)        | 8/21 (38,1)        | 7/21 (33,3)        | 7/11 (33,3)               |
|                           | Neuroendocrino             | 3/21 (14,3)                                     | 2/21 (9,5)         | 2/21 (9,5)         | ---                | ---                | 1/21 (4,8)                |
| Estadio                   | I                          | 6/21 (28,6)                                     | 7/21 (33,4)        | 5/21 (23,8)        | 5/21 (23,8)        | 6/21 (28,6)        | 5/21 (23,8)               |
|                           | II                         | 3/21 (14,3)                                     | 2/21 (9,5)         | 4/21 (19,1)        | 3/21 (14,3)        | 3/21 (14,3)        | 4/21 (19,1)               |
|                           | III                        | 2/21 (9,5)                                      | 2/21 (9,5)         | 2/21 (9,5)         | 3/21 (14,3)        | 2/21 (9,5)         | 2/21 (9,5)                |
| Cirugía                   | Lobectomía                 | 9/21 (42,9)                                     | 9/21 (42,9)        | 8/21 (38,1)        | 9/21 (42,9)        | 9/21 (42,9)        | 8/21 (38,1)               |
|                           | VATS                       | 2/21 (9,5)                                      | 2/21 (9,5)         | 3/21 (14,3)        | 2/21 (9,5)         | 2/21 (9,5)         | 3/21 (14,3)               |
| Adyuvancia                | Quimio                     | 2/21 (9,5)                                      | 1/21 (4,8)         | 3/21 (14,3)        | 2/21 (9,5)         | 1/21 (4,8)         | 2/21 (9,5)                |
|                           | Radio                      | ---                                             | ---                | 1/21 (4,8)         | ---                | 1/21 (4,8)         | ---                       |
|                           | Quimio + RT                | 4/21 (19,1)                                     | 4/21 (19)          | 3/21 (14,3)        | 4/21 (19,1)        | 3/21 (14,3)        | 3/21 (14,3)               |
|                           | No adyuvancia              | 5/21 (23,8)                                     | 6/21 (28,6)        | 4/21 (19)          | 5/21 (23,8)        | 6/21 (28,6)        | 6/21 (28,6)               |
| Status de SLE             | Libre                      | 6/21 (28,6)                                     | 6/21 (28,6)        | 8/21 (38,1)        | 6/21 (28,6)        | 6/21 (28,6)        | 6/21 (28,6)               |
|                           | Recaída                    | 5/21 (23,8)                                     | 5/21 (23,8)        | 3/21 (14,3)        | 5/21 (23,8)        | 5/21 (23,8)        | 5/21 (23,8)               |
| Status de SG              | Vivo                       | 10/21 (47,6)                                    | 10/21 (47,6)       | 11/21 (52,4)       | 9/21 (42,9)        | 9/21 (42,9)        | 9/21 (42,9)               |
|                           | Fallecido                  | 1/21 (4,8)                                      | 1/21 (4,8)         | ---                | 2/21 (9,5)         | 2/21 (9,5)         | 2/21 (9,5)                |
| NANOG                     | Positivo                   | ---                                             | <b>9/21 (42,9)</b> | 6/21 (28,6)        | 6/21 (28,6)        | 5/21 (23,8)        | 5/21 (23,8)               |
|                           | Negativo                   | ---                                             | <b>2/21 (9,5)</b>  | 5/21 (23,8)        | 5/21 (23,8)        | 6/21 (28,6)        | 6/21 (28,6)               |
| OCT4                      | Positivo                   | <b>9/21 (42,9)</b>                              | ---                | 5/21 (23,8)        | 6/21 (28,6)        | 5/21 (23,8)        | 6/21 (28,6)               |
|                           | Negativo                   | <b>2/21 (9,5)</b>                               | ---                | 6/21 (28,6)        | 5/21 (23,8)        | 6/21 (28,6)        | 5/21 (23,8)               |
| RAR $\alpha$              | Positivo                   | 6/21 (28,6)                                     | 5/21 (23,8)        | ---                | 5/21 (23,8)        | 5/21 (23,8)        | 5/21 (23,8)               |
|                           | Negativo                   | 5/21 (23,8)                                     | 6/21 (28,6)        | ---                | 6/21 (28,6)        | 6/21 (28,6)        | 6/21 (28,6)               |
| RAR $\beta$               | Positivo                   | 6/21 (28,6)                                     | 6/21 (28,6)        | 5/21 (23,8)        | ---                | 9/21 (42,9)        | <b>9/21 (42,9)</b>        |
|                           | Negativo                   | 5/21 (23,8)                                     | 5/21 (23,8)        | 6/21 (28,6)        | ---                | 2/21 (9,5)         | <b>2/21 (9,5)</b>         |
| RAR $\gamma$              | Positivo                   | 5/21 (23,8)                                     | 5/21 (23,8)        | 5/21 (23,8)        | <b>9/21 (42,9)</b> | ---                | 7/21 (33,3)               |
|                           | Negativo                   | 6/21 (28,6)                                     | 6/21 (28,6)        | 6/21 (28,6)        | <b>2/21 (9,5)</b>  | ---                | 4/21 (19,1)               |
| RAR $\beta$ /RAR $\gamma$ | Positivo                   | 5/21 (23,8)                                     | 6/21 (28,6)        | 5/21 (23,8)        | <b>9/21 (42,9)</b> | 7 (33,3)           | ---                       |
|                           | Negativo                   | 6/21 (28,6)                                     | 5/21 (23,8)        | 6/21 (28,6)        | <b>2/21 (9,5)</b>  | 4 (19,1)           | ---                       |

Tabla 5. Frecuencias dentro de cada característica anatómo-patológica para las muestras positivas de cada gen evaluado. En negrita y con fondo celeste se encuentran las correlaciones que dieron significativo al realizar el Test de Spearman's Rho. \*p<0,05.

Dentro de todas las correlaciones posibles analizadas, las siguientes son las que resultaron positivas estadísticamente:

La expresión de NANOG mostró asociación con el hábito tabáquico (Test de Spearman's Rho p=0,013) y con la histología del carcinoma pulmonar (Test de Spearman's Rho p=0,03).

La expresión de OCT4 mostró asociación con el nivel transcripcional de NANOG (Test de Spearman's Rho  $p=0,003$ ).

La expresión de RAR $\alpha$  mostró correlación con el hábito tabáquico (Test de Spearman's Rho  $p=0,013$ ).

La expresión de RAR $\beta$  mostró asociación con la expresión de RAR $\gamma$  (Test de Spearman's Rho  $p=0,003$ ) y con la relación de las expresiones RAR $\beta$ /RAR $\gamma$  (Test de Spearman's Rho  $p=0,003$ ).

La expresión de RAR $\gamma$  mostró asociación con el sexo de los pacientes (Test de Spearman's Rho  $p=0,015$ ), el padecimiento de otros tumores primarios en forma previa a la presentación del carcinoma pulmonar (Test de Spearman's Rho  $p=0,031$ ) y el nivel de ARNm de RAR $\beta$  (Test de Spearman's Rho  $p=0,03$ ).

Finalmente, la relación de las expresiones de ARNm RAR $\beta$ /RAR $\gamma$  mostró asociación con la expresión de RAR $\beta$  (Test de Spearman's Rho  $p=0,003$ ).

Se realizó el análisis de supervivencia mediante el Método de Kaplan-Meier. Se estudiaron la sobrevida libre de enfermedad (SLE) y la sobrevida general (SG). El tiempo promedio de seguimiento de esta población de pacientes fue de 48,6 (2-116) meses.

En la Tabla 6 se muestra el número de pacientes con valores positivos o elevados de expresión del ARNm de cada uno de los genes analizados.

| Gen                       | Valores positivos/Total de pacientes (% del total) |
|---------------------------|----------------------------------------------------|
| NANOG                     | 11/21 (52,4)                                       |
| OCT4                      | 11/21 (52,4)                                       |
| RAR $\alpha$              | 10/21 (47,6)                                       |
| RAR $\beta$               | 11/21 (52,4)                                       |
| RAR $\gamma$              | 10/21 (47,6)                                       |
| RAR $\beta$ /RAR $\gamma$ | 11/21 (52,4)                                       |

Tabla 6. Número de pacientes que presentaron elevada expresión de cada ARNm evaluado, considerando la mediana de expresión como punto de corte.

La expresión elevada (positiva) del ARNm de RAR $\alpha$ , determinada en el tejido tumoral, al momento del diagnóstico del carcinoma pulmonar primario presentó correlación con la SG de los pacientes estudiados. Los pacientes que presentaron mayores niveles de expresión de RAR $\alpha$  tuvieron una SG más prolongada [Log Rank Test (Mantle-Cox)  $p = 0,047$ ]. Ninguno de los otros genes evaluados presentó correlación con la SG de los pacientes estudiados.

La significancia estadística se mantuvo cuando se realizó el análisis multivariado aplicando la Regresión de Cox respecto de la incorporación de la histología del tumor como covariable predictiva ( $p = 0,02$ ). Pero la misma se perdió tras la incorporación de los otros parámetros clínicos o de anatomía-patológica como covariables en el análisis de la SG: hábito tabáquico, comorbilidades, otros primarios, grupo etario, sexo, cirugía, tratamiento adyuvante, estadio tumoral, expresión de los otros genes analizados ( $p=NS$ ).

La expresión de ninguno de los genes a nivel ARNm mostró correlación con la SLE de los pacientes con carcinoma de pulmón [Log Rank Test (Mantle-Cox)  $p = NS$ ]. De manera similar, la expresión de ARNm de los genes evaluados, así como la relación RAR $\beta$ /RAR $\gamma$ , no mostraron asociación con la SG de los pacientes [Log Rank Test (Mantle-Cox)  $p = NS$ ], excepto por RAR $\alpha$  tal como se indicara en el párrafo anterior (Figura 48). El único gen que demostró una tendencia no significativa a correlacionar con la SG es NANOG, donde una alta expresión de este gen está relacionado a una mayor SG.

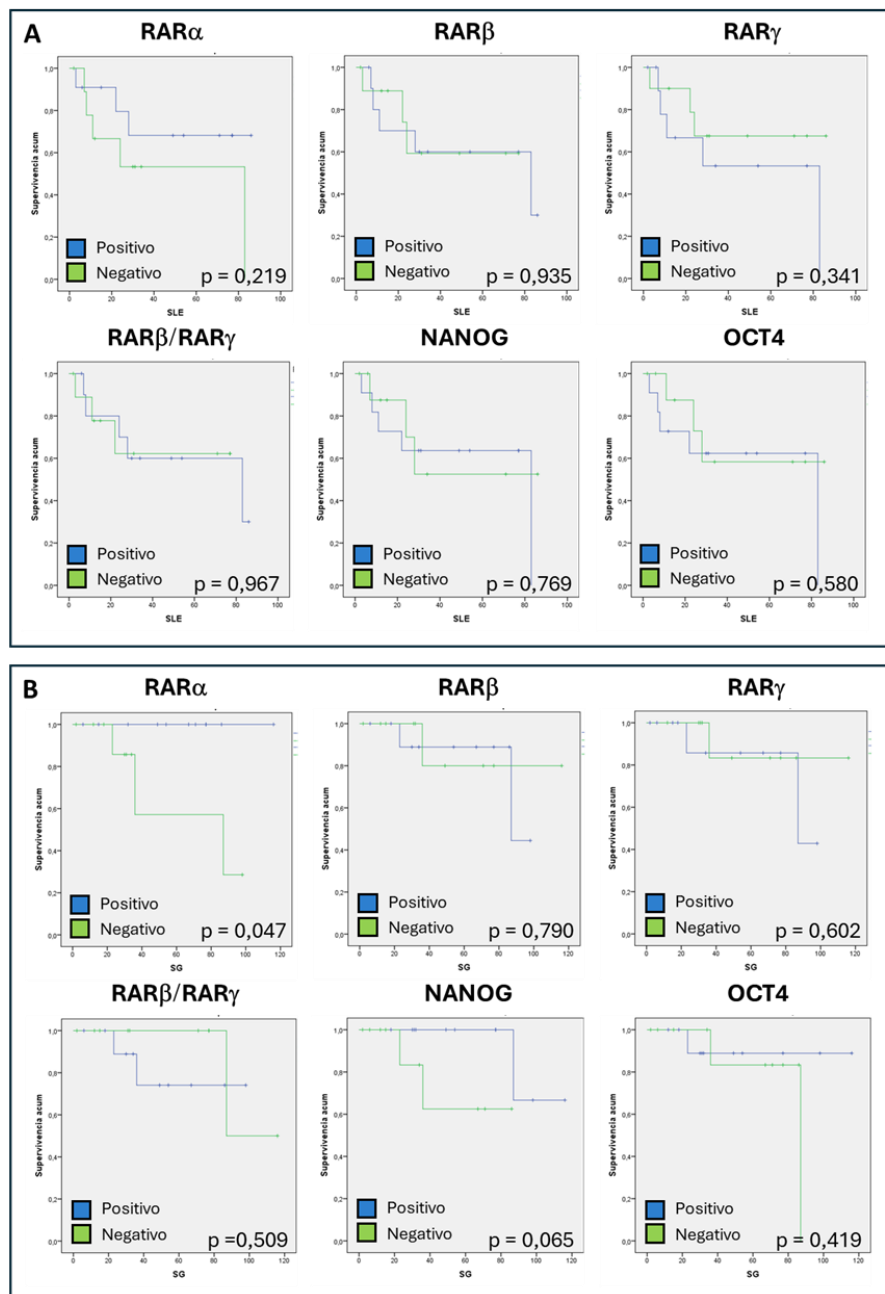


Figura 48. Gráficos de sobrevida libre de enfermedad (SLE) y global (SG) asociada a los ARNm evaluados. Gráficos de Kaplan-Meier asociando la SLE (A) y SG (B) para cada uno de los genes evaluados. Las muestras con un nivel de expresión mayor a la mediana son consideradas como positivas, mientras que las que poseen un nivel de expresión menor a la mediana son consideradas como negativas. El p en las esquinas inferior derecha de cada gráfico indican el Log Rank Test (Mantle-Cox). N = 21.

De los 21 pacientes con cáncer de pulmón incorporados al protocolo, 8 recayeron (38,1%). En la Tabla 7 se muestra el número de pacientes recaídos que presentaron valores positivos de cada uno de los genes analizados.

| <b>Gen</b>                | <b>n casos recaídos con valores positivos/n total de pacientes recaídos (%)</b> |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| NANOG                     | 5/8 (62,5)                                                                      |
| OCT4                      | 5/8 (62,5)                                                                      |
| RAR $\alpha$              | 3/8 (37,5)                                                                      |
| RAR $\beta$               | 5/8 (62,5)                                                                      |
| RAR $\gamma$              | 5/8 (62,5)                                                                      |
| RAR $\beta$ /RAR $\gamma$ | 5/8 (62,5)                                                                      |

Tabla 7. Número de pacientes positivos para los ARNm evaluados que recayeron, relativo a la cantidad de pacientes totales que recayeron.

De los 8 pacientes que sufrieron una recaída, 3 (37,5%) fallecieron como consecuencia de la enfermedad oncológica. Estos tres pacientes fallecidos presentaron valores positivos o elevados de los genes que se muestran en la Tabla 8.

| <b>Gen</b>                | <b>n casos fallecidos con valores positivos/n total de pacientes fallecidos (%)</b> |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| NANOG                     | 1/3 (33,3)                                                                          |
| OCT4                      | 1/3 (33,3)                                                                          |
| RAR $\alpha$              | 0/3 (0)                                                                             |
| RAR $\beta$               | 2/3 (66,7)                                                                          |
| RAR $\gamma$              | 2/3 (66,7)                                                                          |
| RAR $\beta$ /RAR $\gamma$ | 2/3 (66,7)                                                                          |

Tabla 8. Número de pacientes positivos para los ARNm evaluados que fallecieron, relativo a la cantidad de pacientes totales fallecidos.

## **5. Evaluación del sistema del Ácido Retinoico y los genes pluripotenciales como potenciales marcadores *in silico***

### **5.1. Evaluación de la relevancia de los genes del sistema del Ácido Retinoico en la clínica**

Para comenzar con el estudio del ácido retinoico en nuestra patología de interés realizamos un análisis bioinformático en bases de datos públicas en XENA y evaluamos como se encuentran

expresados los receptores retinoides tanto en adenocarcinomas como en carcinoma de células escamosas (CCE) de pulmón, con respecto al tejido lindante (no tumoral) o al tejido pulmonar sano.

Observamos que tanto las muestras provenientes de adenocarcinomas como las provenientes de CCE (en mayor medida) presentan una disminución de la expresión de  $RAR\alpha$  (Figura 49). Del mismo modo, se observó una disminución en la expresión de  $RAR\beta$  en las muestras de adenocarcinomas. En paralelo, se observó un aumento en la expresión de  $RAR\gamma$  en las muestras provenientes de los CCE. Además, en conjunto, se puede observar cómo ambos tipos tumorales presentan, entonces, una disminución en la relación  $RAR\beta/RAR\gamma$  con respecto a los tejidos no tumorales, indicando un fenotipo menos diferenciado.

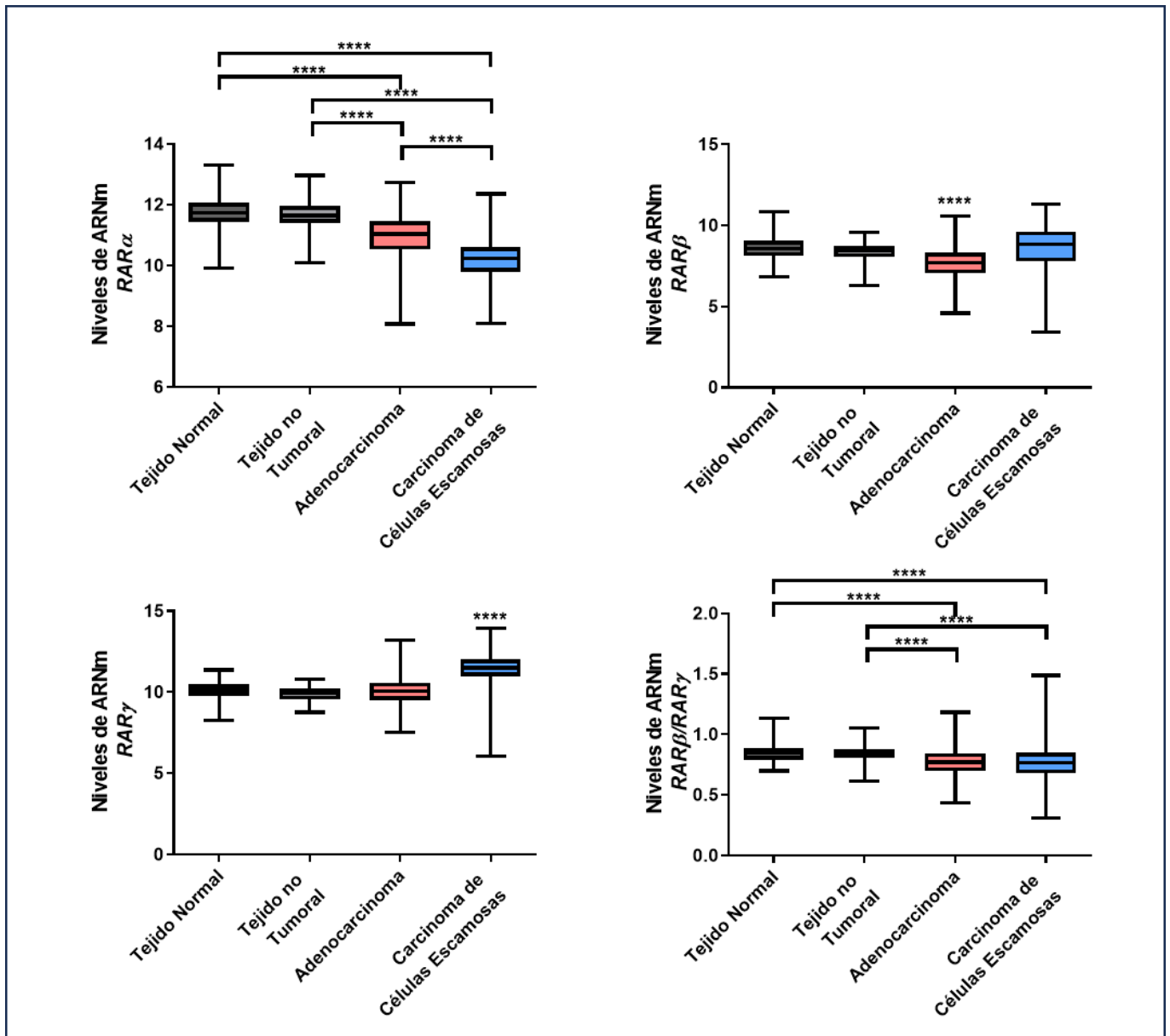


Figura 49. Expresión de receptores retinoides (RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  y RAR $\gamma$ ) y relación RAR $\beta$ /RAR $\gamma$  obtenidos de la base de datos de TCGA con XENA. Kruskal-Wallis. \*\*\*\*p<0,001. N=287 para tejido normal, N=109 para tejido no tumoral, N=513 para adenocarcinomas y N=498 para carcinoma de células escamosas.

Para evaluar la importancia clínica de estos receptores retinoides, se realizó en la misma plataforma la evaluación de la supervivencia para cada uno de los pacientes con esta patología, agrupándolos en dos grupos: uno con baja expresión y otro con alta expresión del receptor evaluado. El sitio de corte para separar ambas poblaciones fue el valor de la mediana de

expresión para cada uno de ellos. En este aspecto, observamos que en ambos subtipos tumorales la alta expresión de RAR $\gamma$  está asociada con peor pronóstico, del mismo modo que la alta expresión de RAR $\alpha$  en adenocarcinomas (Figura 50).

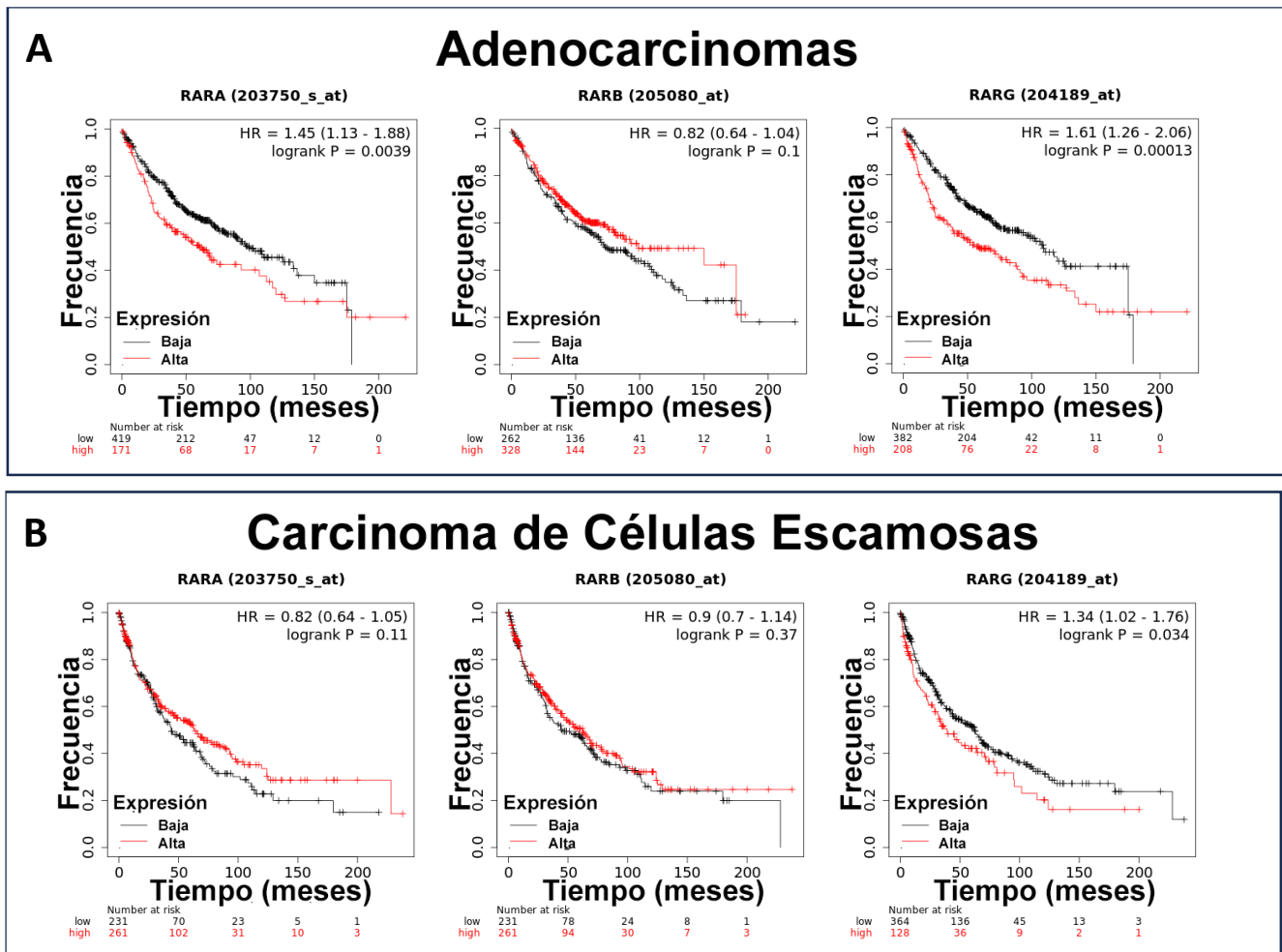


Figura 50. Gráficos de Kaplan-Meier para los receptores retinoicos, separando su expresión en dos percentiles tomando el valor de la mediana de expresión como valor de corte. De izquierda a derecha: RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  y RAR $\gamma$ , analizados para Adenocarcinomas (A) y para Carcinoma de Células Escamosas (B). Las líneas rojas muestran la supervivencia de los pacientes con alta expresión del receptor, mientras que las negras muestran la supervivencia de los pacientes con baja expresión. En la esquina superior derecha de cada gráfico se puede observar el p valor de la prueba. Debajo de cada gráfico se pueden observar el número de pacientes involucrado en cada cohorte a lo largo del tiempo.

## 5.2. Evaluación de la relevancia de los genes pluripotenciales NANOG, SOX2 y OCT4 en NSCLC

Del mismo modo que se realizó con los receptores retinoides y con las mismas muestras a disposición en la plataforma XENA, decidimos analizar cómo se distribuye la expresión de los genes pluripotenciales SOX2, NANOG y OCT4 dentro de los 4 grupos analizados bioinformáticamente: tejido sano, tejido no tumoral (proveniente de un paciente oncológico), adenocarcinomas y CCE.

Observamos que en ambos tipos tumorales la expresión de SOX2 es mayor que en el tejido normal (Figura 51). Por el contrario, tanto OCT4 como NANOG parecen mostrar el perfil opuesto, siendo el tejido normal el de mayor expresión de estos marcadores.

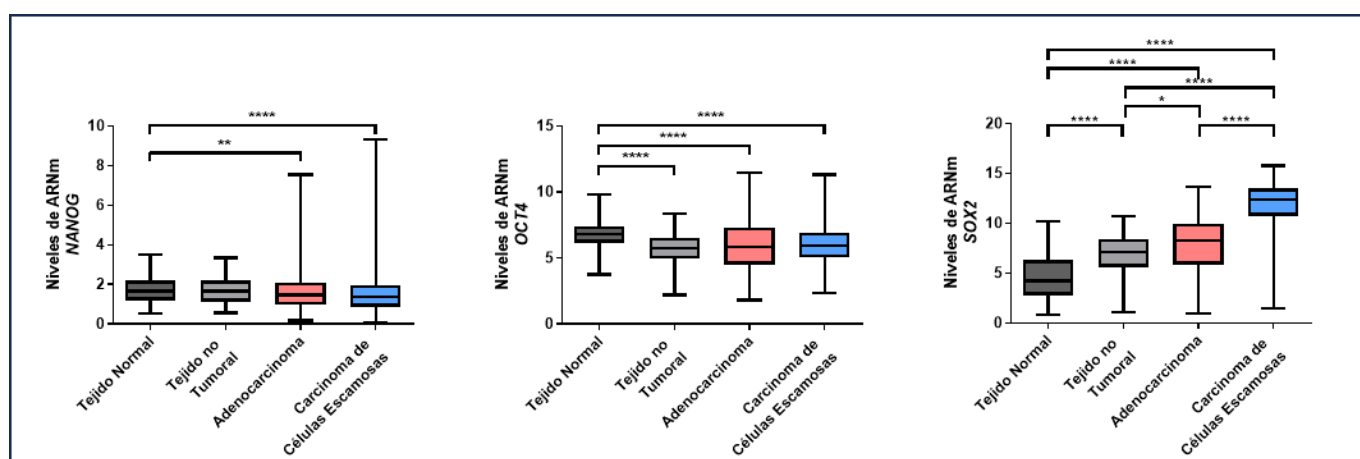


Figura 51. Expresión de genes pluripotenciales (SOX2, NANOG y OCT4) obtenidos de la base de datos de TCGA con XENA. Kruskal-Wallis. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,001$ . N=287 para tejido normal, N=109 para tejido no tumoral, N=513 para adenocarcinomas y N=498 para carcinoma de células escamosas.

Además, realizando el análisis de la supervivencia de los pacientes y su vinculación con la expresión de los genes pluripotenciales, observamos que solo la expresión de NANOG parece tener

incidencia en cuanto a la supervivencia de los pacientes con adenocarcinomas, en los cuales una alta expresión del marcador resulta en mayor supervivencia (Figura 52).

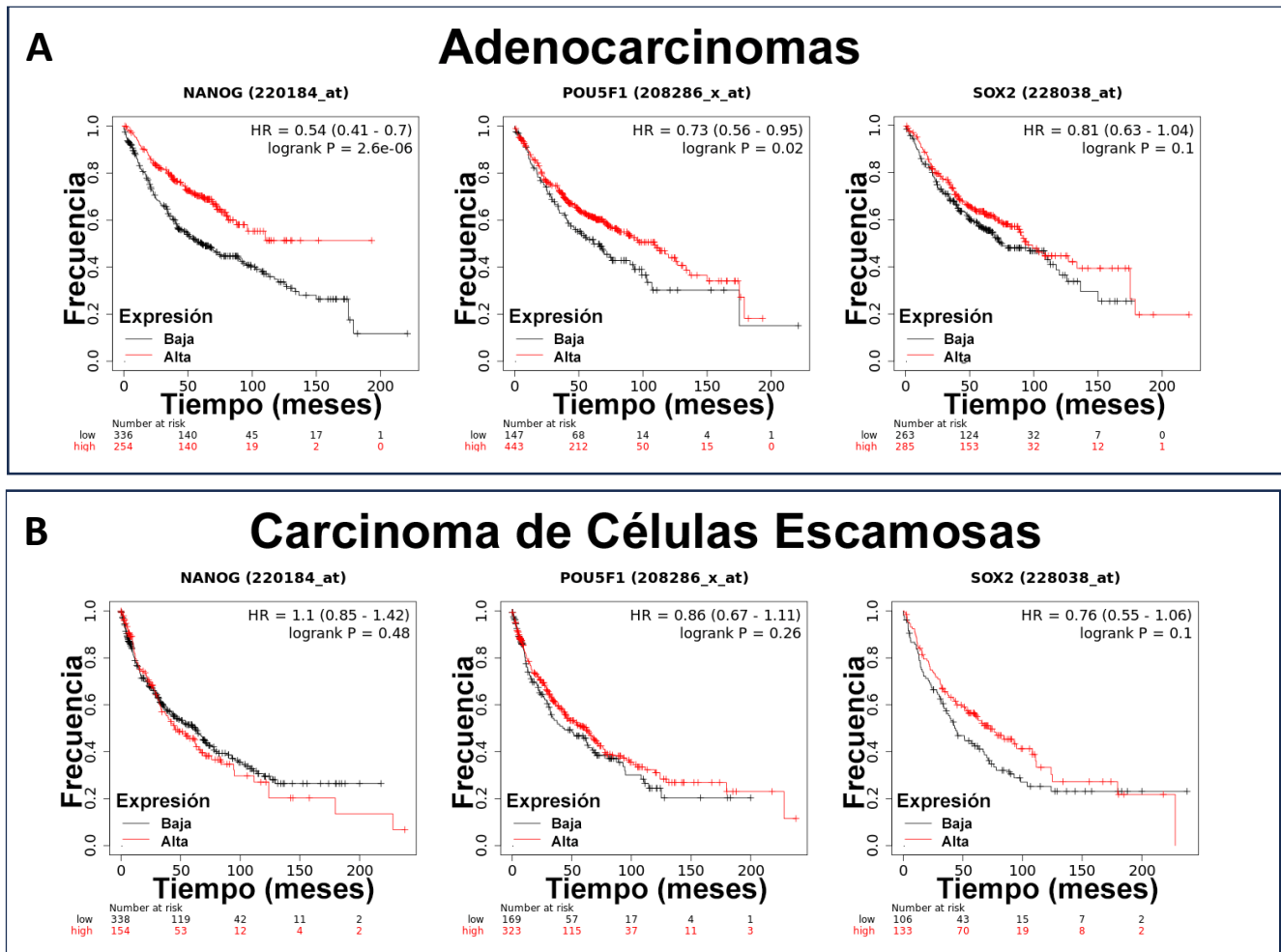


Figura 52. Gráficos de Kaplan-Meier para los marcadores pluripotenciales, separando su expresión en dos percentiles tomando el valor de la mediana de expresión como valor de corte. De izquierda a derecha: NANOG, OCT4 (POU5F1) y SOX2, analizados para Adenocarcinomas (A) y para Carcinoma de Células Escamosas (B). Las líneas rojas muestran la supervivencia de los pacientes con alta expresión del marcador, mientras que las negras muestran la supervivencia de los pacientes con baja expresión. En la esquina superior derecha de cada gráfico se puede observar el p valor de la prueba. Debajo de cada gráfico se pueden observar el número de pacientes involucrado en cada cohorte a lo largo del tiempo.

# Discusión

---

El cáncer de pulmón es un importante problema de salud, tanto a nivel mundial como dentro de Argentina. Según el Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria (IECS), el cáncer de pulmón ocasiona aproximadamente 10000 muertes por año en Argentina (IECS, 2024), además de ser el que más recursos del estado consume, sumando el coste de las consultas, estudios diagnósticos, cirugías, radioterapia, medicamento, hospitalizaciones, seguimiento y manejo de los efectos adversos. Si bien en los últimos años han surgido diversas terapias dirigidas para los distintos subtipos de este cáncer, además de las inmunoterapias dirigidas a los inhibidores de puntos de control, la quimioterapia con cisplatino sigue siendo uno de los tratamientos más frecuentes para el cáncer de pulmón. Sin embargo, el tratamiento con cisplatino (CDDP) dista mucho de ser una solución definitiva de la enfermedad, siendo frecuente la adquisición de resistencia a la terapia y la consiguiente recaída del paciente. En este contexto, es de vital importancia el trabajo de la ciencia básica en cuanto a la búsqueda del entendimiento de los mecanismos de esta resistencia, así como en cuanto a la generación de modelos para dicho estudio.

En este trabajo de tesis generamos una línea celular resistente a CDDP a partir de la línea humana de cáncer de pulmón de células no pequeñas NCI-H125 (H125cpr). Nuestro grupo de trabajo ya había generado una línea celular resistente a CDDP a partir de otra línea celular humana de NSCLC, las NHI-A549 (A549cpr). Estas líneas celulares las utilizamos para evaluar el tratamiento de ATRA como potencial terapia de combinación con CDDP. Además, realizamos la caracterización de ambos modelos.

La línea celular H125cpr resultó tener una  $IC_{50}$  frente al tratamiento con CDDP durante 72 hs de aproximadamente 7,5  $\mu M$ , contrastando con el 2  $\mu M$  de la línea control H125ct. Del mismo modo, A549cpr presentó una  $IC_{50}$  cercana a 18  $\mu M$ , mientras que su contraparte A549ct resultó cercana a 7  $\mu M$ . Estas dosis resultaron similares a las encontradas en bibliografía en otros modelos tumorales (Calderón-Montaña, 2021).

Al momento de analizar su comportamiento en cultivo, observamos que las variantes resistentes a CDDP presentaron una tasa de proliferación menor, así como una menor capacidad migratoria. Además, A549cpr presentó menor capacidad adhesiva que A549ct. H125cpr se comportó *in vivo* igual que en monocapa, con una tasa de proliferación menor que H125ct y manteniendo la resistencia al tratamiento con CDDP, lo que nos asegura poder usarla como modelo de resistencia no solo para ensayos *in vitro*, sino también en esta clase de modelos más fisiológicos. Todos estos parámetros modificados con respecto a sus variantes sensibles relacionan a las líneas celulares resistentes a CDDP con unas células con un fenotipo menos epitelial que sus respectivas variantes control.

En un sentido amplio, la transición epitelio-mesenquimal (TEM) es un tipo de plasticidad epitelial que conduce a cambios morfológicos acompañados de cambios moleculares drásticos que persisten en el tiempo, derivando en un fenotipo más mesenquimal/fibroblastóide (Gonzalez, 2014). Dentro del cáncer, la TEM es un proceso que ocurre naturalmente y que está asociada con la iniciación tumoral, invasión, metástasis y resistencia a terapias (Pastushenko, 2019). Cuanto más avanzada es dicha transición, mayor agresividad presenta el tumor y peor pronóstico asociado. Una de las características que conducen a un fenotipo de peor pronóstico es la presencia de una mayor proporción de células madre tumorales, así como de una mayor *stemness* general del tumor. En nuestros modelos, hay evidencias que sugieren un aumento en este parámetro, como lo son el aumento de la tasa de proliferación de las oncoesferas, la tendencia a tener un mayor número de células capaces de formar colonias en baja densidad y la menor relación de expresión de los receptores retinoides RAR $\beta$ /RAR $\gamma$ .

El cultivo de oncoesferas es un cultivo restrictivo desarrollado para enriquecer el mismo en células con cierto grado de pluripotencialidad. El cultivo se realiza en baja densidad celular, en condiciones de no-adhesión y en ausencia de SFB, pero con factores de crecimiento apropiados para que estas células pluripotentes sean capaces de sobrevivir y proliferar. En nuestros

modelos resistentes a CDDP, la cantidad de células capaces de sobrevivir en estas condiciones y terminar formando oncoesferas es menor que en las líneas celulares sensibles. Esto implica que el proceso de selección producido por el CDDP al momento de generar las líneas resistentes al fármaco produjo una disminución en la cantidad de estas células presentes en la población. Sin embargo, en estos cultivos también se evidencia que las oncoesferas formadas por las líneas resistentes a CDDP, si bien son menos que sus contrapartes sensibles, crecen en tamaño de forma más acelerada. Esto implica que las células pluripotentes presentes en el cultivo resistente a CDDP poseen una tasa de autorrenovación mayor, permitiéndoles formar una masa tridimensional más rápido que las células que no atravesaron la selección por CDDP. Este es un punto importante, dado su paralelismo a lo que podría estar ocurriendo en la clínica, al abordar una terapia con CDDP que condujera a un estadio quimiorresistente.

Analizando las células provenientes de tumores generados en el subcutáneo de ratones BALB/c<sup>nu/nu</sup> a través del ensayo de frecuencias analizadas por ELDA, encontramos que las extraídas de los tumores H125cpr presentan una tendencia a tener mayor frecuencia de células formadoras de oncoesferas que las extraídas de tumores H125ct. Además, cada grupo tratado con CDDP presenta una tendencia a tener mayor proporción de células formadoras de oncoesferas que las provenientes de los grupos sin tratamiento. Esto apoya la teoría de que el CDDP estaría actuando sobre las poblaciones celulares con mayor grado de diferenciación, seleccionando las células con un estado de pluripotencialidad mayor, que son las que son capaces de formar oncoesferas *in vitro*.

Por otro lado, en la introducción hemos hablado de los roles de los distintos receptores retinoides. Así como ocurre en múltiples vías de señalización intracelular, un mismo estímulo puede generar respuestas sobre distintos genes blanco, aún con acciones contrapuestas. En el caso del sistema retinoide, el retinol ingresa a la célula transformándose en Acido Retinoico e interacciona con los receptores retinoides, lo que posibilita que se dirijan al núcleo y activen la

transcripción de genes blanco. El RAR $\beta$  está involucrado en procesos relacionados con la diferenciación celular, mientras que el RAR $\gamma$  suele estar relacionado a procesos relacionados con el mantenimiento del fenotipo *stem*. En condiciones normales de cultivo, ambos receptores están presentes y formando dímeros RAR/RXR activando sus respectivos genes blanco. Por esta razón es importante calcular como la relación entre la expresión de ambos (RAR $\beta$ /RAR $\gamma$ ) puede verse modificada en las distintas condiciones a estudiar (Berardi, 2021). Entonces, cuando observamos que esta relación es menor en las líneas resistentes a CDDP que en sus variantes sensibles, significa que es mayor el impacto del RAR $\gamma$  en estos modelos (o menor el impacto del RAR $\beta$ ). Es decir, estamos en presencia de un fenotipo con una mayor preponderancia hacia el mantenimiento del nicho *stem*, relacionado con la mayor capacidad de autorrenovación observada en los cultivos de oncoesferas.

El ensayo de clonogenicidad celular permite analizar la capacidad de crecer y proliferar en condiciones de baja densidad, donde casi no existe condicionamiento entre ellas. Sólo aquellas células tumorales con alta plasticidad, y con alta potencialidad de división son capaces de crecer y multiplicarse en estas condiciones de cultivo. Muchas veces a estas células tumorales se las suele relacionar con las CSC, ya que una célula tumoral con baja pluripotencialidad no suele ser capaz de sobrevivir y dividirse sin entrar en contacto con una célula aledaña. Justamente hemos observado que H125cpr tiene una mayor capacidad clonogénica que H125ct lo que permitiría inferir un aumento de este tipo celular.

Tomando todo en conjunto, encontramos que a nivel poblacional las líneas resistentes a CDDP parecerían tener un fenotipo más mesenquimal, así como también parecen desarrollar un componente *stem* con una capacidad de autorenovación mayor. Esta elevada tasa de autorenovación podría ser una de las explicaciones del motivo de su resistencia al tratamiento con CDDP, así como ha sido demostrado en otros modelos (Toledo-Guzmán, 2018).

Más allá de la caracterización fenotípica de los nuevos modelos celulares, los hallazgos de esta tesis revelan una reconfiguración en la población celular del tumor tras la exposición crónica al CDDP. La generación de las líneas resistentes a CDDP no solo representan un aumento en la  $IC_{50}$ , sino la formación de un fenotipo con mayor plasticidad celular. La paradoja observada (una menor tasa de proliferación global en las células resistentes, pero una capacidad de autorrenovación acelerada en condiciones de oncoesferas) sugiere que la resistencia al CDDP induce un estado de agresividad latente. En este estado, las células sacrifican la velocidad de división en monocapa a favor de una mayor eficiencia en la formación de nichos tridimensionales, emulando el comportamiento de las CSC que sobreviven a la quimioterapia en el paciente.

Las diferencias observadas en la respuesta entre las líneas A549 (adenocarcinoma, mutación KRAS) y H125 (carcinoma adenoescamoso) subrayan la importancia del fondo genético en la quimioresistencia. Mientras que A549 muestra una resistencia más vinculada a la transición epitelio-mesenquimal (EMT), H125 parece exhibir un fenotipo más quiescente y con mayor capacidad de autorrenovación en oncoesferas. Esta heterogeneidad refleja la realidad clínica del NSCLC, donde las mutaciones de p53 y el estado de KRAS dictan la susceptibilidad a la terapia con platinos (Mogi, 2011).

Cuando evaluamos el efecto que tiene el CDDP sobre las líneas sensibles o resistentes al quimioterápico, encontramos diferencias claves en cuanto a su efecto sobre la distribución del ciclo celular y la apoptosis. El tratamiento con CDDP produce un arresto casi total en la fase G2/M en las células sensibles, efecto que no se evidencia en las resistentes. Del mismo modo, dicho tratamiento genera un aumento de la apoptosis en las células sensibles. Es decir que ambos mecanismos estarían involucrados en la generación de la resistencia. Estudios previos demuestran que las células resistentes a CDDP, a pesar de tener igual cantidad de quimioterápico intracelular, responden de forma diferencial al tratamiento debido a procesos

moleculares involucrados tanto en la reparación del daño del ADN producido por el CDDP (Rocha, 2018), así como la modificación de moléculas pro-apoptóticas y antiproliferativas como las vinculadas con la vía de p21 y p53 (Sarin, 2017).

Las CSC poseen una resistencia intrínseca a los tratamientos debido a múltiples factores que les permiten evadir la terapia. Uno de ellos es la presencia de proteínas transportadoras de drogas, que expulsan las drogas antitumorales hacia el componente extracelular. Dichas proteínas pertenecen a una familia conocida como transportadores de casete de unión a ATP. Estas proteínas utilizan bombas de eflujo de fármacos dependientes de ATP para la eliminación del fármaco, y se ha observado su sobreexpresión en las CSC mediante ensayos de población lateral (Begicevic, 2017).

Otro mecanismo de acción de las CSC para evitar la respuesta del CDDP es la activación de vías específicas de reparación del ADN (Griso, 2022). La vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER) es responsable de reparar los aductos de platino-ADN intercatenarios, que es el principal tipo de daño al ADN causado por el CDDP (Marteijn, 2014)

Uno de los principales mecanismos del desarrollo de la resistencia a la terapia es la presencia de subpoblaciones fenotípicamente distintas de células tumorales, lo que se conoce como heterogeneidad intratumoral (Shibue, 2017). Esta heterogeneidad puede ser impulsada por la presencia de clones que portan diferentes eventos mutacionales, que podrían responder de manera diferente a los tratamientos, o por células que contienen las mismas mutaciones, que son fenotípicamente distintas debido a la reprogramación metabólica o epigenética. Dentro de este último, se ha demostrado que las células madre tumorales (CSC) son impulsoras clave de la resistencia a la terapia al sobrevivir a los tratamientos y generar las recaídas tumorales (Zhou, 2021).

Al comparar las dos líneas resistentes a CDDP utilizadas en este trabajo encontramos sutiles diferencias en cuanto a su comportamiento, morfología y efecto de los tratamientos. Las principales diferencias las encontramos al analizar los núcleos de las células sin tratamiento. Mientras que A549cpr parecería sufrir pocas modificaciones nucleares, evidenciadas solo en una tendencia a aumentar los fragmentos citoplasmáticos de la cromatina (FCC) y una tendencia a disminuir la cantidad de células con cariomegalia, las H125cpr presentan mayores alteraciones: superficie nuclear promedio elevada, aumento significativo en el porcentaje de células con FCC y tendencia a aumentar el porcentaje de células con cariomegalia.

Estos cambios nucleares no se ven reflejados al momento de analizar la distribución dentro del ciclo celular por citometría de flujo. Al analizar la cantidad de IP en las muestras no se evidencia cambio en la cantidad relativa de células en las distintas fases del ciclo ni en cuanto a la cantidad absoluta de IP incorporado por las células. Este resultado da a entender que el aumento en la superficie nuclear y en la cantidad de células con cariomegalia no se debe a un aumento de la cantidad de ADN, sino que se deba probablemente a la disminución de la condensación de la cromatina. Esto coincide con lo observado al fotografiar los núcleos teñidos con DAPI, ya que las células con cariomegalia evidencian núcleos con una tinción más tenue que las vecinas.

Por otro lado, la aparición de FCC suele estar asociada a diversos mecanismos celulares relacionados con estrés celular. El ADN citoplasmático puede tener origen en micronúcleos que surgen de errores de segregación cromosómica (Harding, 2017; Mackenzie, 2017; Terradas, 2010; Zhang, 2015), ADN mitocondrial liberado de mitocondrias estresadas (West, 2017) o ADNc producido por reactivación y altos niveles de transcripción del elemento intercalado largo (LINE-1) (De Cecco, 2019; Simon, 2019). Estos FCC, generados a través de un proceso de *blebbing* nuclear-citoplasmático, impulsan el fenotipo secretor asociado a la senescencia (Dou, 2015).

La senescencia celular, una detención estable del ciclo celular, se considera un sello distintivo del envejecimiento y contribuye a las enfermedades asociadas al mismo (Herranz, 2018). Si bien esa detención en la replicación celular es la característica distintiva de la senescencia, existen muchas otras alteraciones fenotípicas necesarias para comprender las funciones fisiopatológicas de este tipo de células. Por ejemplo, las células senescentes experimentan cambios morfológicos, remodelación de la cromatina y reprogramación metabólica, y secretan una mezcla compleja de factores principalmente proinflamatorios que suelen denominarse como fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). En nuestros estudios observamos varios indicios que podrían indicar que las células resistentes a CDDP generadas en el laboratorio presentan varias de estas características. Las remodelaciones de la cromatina ya fueron discutidas previamente, pero también encontramos un aumento en la complejidad celular en H125cpr, evidenciando la presencia de vesículas citoplasmáticas, que podrían tener relación con SASP. Hay evidencias que demuestran que el tratamiento con CDDP en líneas celulares de melanoma produce el SASP propio de una célula senescente (Sun, 2018). El modelo H125cpr, entonces, podría estar manteniendo este fenotipo como consecuencia del tratamiento crónico con CDDP, lo que lo diferencia del modelo A549cpr, que parece haber sobrellevado la resistencia con otros mecanismos.

Observamos que H125cpr presenta mayores cambios morfológicos con respecto a H125ct que lo que ocurre entre A549cpr y A549ct. Obviamente la sensibilidad a la terapia con CDDP resulta menor en ambos modelos resistentes, pero H125cpr parece estar manifestando la resistencia al fármaco de forma más traumática, pudiendo resistir las dosis bajas de CDDP de mantenimiento, pero con alteraciones en su morfología.

Estas diferencias observadas entre los dos modelos resistentes a CDDP utilizados en esta tesis da cuenta de la importancia de la utilización de más de un modelo para el estudio de estas patologías. Los mecanismos de resistencia son variados y multifactoriales. Simplificar este

problema en un único modelo estaría desarrollando un sesgo peligroso. Además, desde un punto de vista práctico, algunos tipos celulares pueden resultar más convenientes para el estudio de ciertas características moleculares o celulares. Por ejemplo, en nuestros modelos, la línea celular H125 resulta un modelo más adecuado para el estudio de células madre tumorales ya que el cultivo de oncoesferas presenta un abordaje mejor que en A549. Las células A549 demoran cerca de 14 días en formar oncoesferas, necesitando además el agregado de carboximetilcelulosa 1% para espesar el medio de cultivo y así evitar que las células formen agregados. En cambio, las H125 forman oncoesferas compactas antes de los 5 días de cultivo, permitiendo trabajar con ellas con una velocidad y simplicidad mayor. Esta característica en el comportamiento celular ante el desarrollo de oncoesferas podría, además, relacionarse con la mayor agresividad o tumorigenicidad manifestada en el modelo H125, sobre todo para la sublínea resistente.

Por otro lado, sería interesante la utilización de modelos resistentes a CDDP con células de origen murino, lo que permitiría su estudio *in vivo* en ratones BALB/c o C57BL/6, de mayor accesibilidad y menor requerimiento de cuidados que los BALB/c<sup>nu/nu</sup> necesarios para trabajar con las células de origen humano. Y dada la importancia de estudiar la progresión tumoral *in vivo* ante el desafío del sistema inmune del huésped, es que sumamos un modelo de sensibilidad intermedia al CDDP, el LP07, cuyos resultados discutiremos más adelante en este capítulo.

Con la idea de sumar o proponer nuevas terapéuticas en el abordaje de los tumores de pulmón (NSCLC) resistentes a los platinos, es que exploramos los efectos de una terapia diferenciadora sobre la progresión tumoral en nuestros modelos.

El ácido trans-retinoico (ATRA) es un derivado de la vitamina A que es utilizado para el tratamiento de otros tipos tumorales. La administración oral de ATRA es el tratamiento de primera elección en la leucemia promielocítica aguda en adultos y el neuroblastoma en niños (Giuli, 2020). Además, varios investigadores han demostrado el efecto quimioterapéutico y

quimiopreventivo de los derivados de retinoides en numerosos tipos de células tumorales, como en carcinomas hepatocelulares y carcinomas renales (Chen, 2022). Además, nuestro grupo de trabajo ha demostrado el efecto antitumoral del ATRA en cáncer de mama (Berardi, 2021).

En nuestros modelos de resistencia a CDDP observamos que el ATRA no afecta la viabilidad celular. Sin embargo, encontramos que los receptores retinoides están presentes en todas las líneas celulares evaluadas al medir su expresión por qPCR. No solo ello, sino que además la expresión de los mismos se ve modificada con el tratamiento con ATRA, así como también se observa un aumento en la expresión de luciferasa en los ensayos de gen reportero con RARE-Luc, indicando que además estos receptores están activos. El sitio RARE (elemento de respuesta al ácido retinoico) es la secuencia de ADN a la que se unen los receptores retinoides luego de interactuar con el ATRA para gatillar la transcripción de los genes blanco (Afornali, 2013). Estos cambios en cuanto a la expresión de los receptores retinoides, aumentando la relación  $RAR\beta/RAR\gamma$  en las células tratadas con ATRA apuntan a que el tratamiento podría estar generando un cambio molecular que derive en un fenotipo más diferenciado y con características menos pluripotenciales. Puede que el tiempo de tratamiento con ATRA implementado por nosotros para este plan de tesis, haya sido insuficiente para que estos cambios moleculares terminen generando modificaciones de índole más celular, afectando alguno de los parámetros que medimos luego de 48 o 72 hs de tratamiento. Esta modificación en el perfil de diferenciación celular muchas veces no se ve reflejado en la expresión de los genes pluripotenciales en nuestros modelos luego de los tratamientos con CDDP. Esto puede deberse a la selección propia producida por el quimioterápico, que justamente al tener acción sobre las células con mayor grado de diferenciación, genera un aumento o enriquecimiento en la cantidad de células pluripotentes. Como los genes pluripotenciales suelen estar expresados en esta pequeña población celular, no solo es más difícil su detección, sino que, a nivel poblacional, la diferenciación de unas pocas células pluripotentes (y la consecuente disminución de la expresión de genes pluripotenciales) termina teniendo menos relevancia que la muerte y arresto

de un gran número de células más diferenciadas. Todas estas células presentan expresión de los receptores retinoides, es por esto que las modificaciones producidas por el ATRA se ven reflejadas de forma directa cuando realizamos la medición en la población celular completa.

Nuestros resultados confirman que el sistema de receptores retinoides es funcional en los modelos NSCLC estudiados. Sin embargo, a pesar de que el ATRA modula la expresión de los RARs, no se observó un efecto sinérgico directo sobre la viabilidad celular *in vitro* al combinarse con CDDP. Esta falta de sensibilización biológica, pese a la funcionalidad del receptor, ha sido descrita previamente en otros tumores sólidos. Se ha sugerido que la eficacia del ATRA puede estar limitada por la presencia de co-represores nucleares como NCoR o SMRT, que mantienen la cromatina en un estado condensado incluso en presencia del ligando (Bushue, 2010). Asimismo, el *crosstalk* con la vía de PI3K/Akt, frecuentemente hiperactivada en NSCLC, podría estar contrarrestando las señales pro-apoptóticas inducidas por los retinoides (Siddik, 2003).

A diferencia de lo observado en nuestros modelos *in vitro* en monocapa, la literatura científica proporciona evidencia sólida sobre la capacidad del ATRA para sensibilizar células tumorales al CDDP. En modelos de NSCLC, se ha demostrado que la combinación de ATRA con platino no solo mejora los parámetros clínicos en pacientes (Arrieta, 2010), sino que actúa específicamente reduciendo la subpoblación de células madre tumorales CD133+ que normalmente sobreviven al tratamiento con CDDP (Moro, 2015). El mecanismo de esta sinergia podría estar vinculado a un aumento en la formación de aductos de platino en el ADN, como se reportó previamente (Li, 2018), sugiriendo que el ATRA interfiere con la capacidad de reparación celular ante el daño quimioterápico. La ausencia de este efecto en nuestros modelos celulares de NSCLC podría sugerir que la modulación mediada por retinoides requiere, además, de factores presentes en el microambiente tumoral *in vivo*, o que la diferenciación alcanzada no fue suficiente para alterar los niveles de proteínas pro-apoptóticas.

Es interesante remarcar que, si bien el ATRA no parecería prometedor en cuanto a su rol como terapia antitumoral en nuestros modelos *in vitro* en los tiempos evaluados, si observamos efecto positivo al evaluar el tratamiento *in vivo*.

Utilizando el modelo de tumor de pulmón murino LP07, inoculado subcutáneo en BALB/c encontramos que el tratamiento combinado con ATRA y CDDP generó una disminución del crecimiento tumoral con respecto al control o a los tratamientos simples. Este efecto, que tampoco se observa *in vitro* en el modelo LP07, podría deberse justamente al tipo de tratamiento con pellet subcutáneo de liberación lenta, que genera que las células tumorales reciban una dosis constante de ATRA durante todo el experimento (21 días de tratamiento continuo), permitiendo que los cambios transcripcionales se traduzcan en cambios más radicales en el tumor. Además, en un contexto *in vivo*, no habría que desestimar el potencial efecto del ATRA sobre el sistema inmune y la reprogramación del microambiente tumoral del ratón.

Diversos estudios demuestran el efecto del ATRA sobre el sistema inmunitario. No es casualidad que su utilización a nivel clínico sea predominante en leucemia aguda promielocítica. Sin embargo, en tumores sólidos también se ha observado potencial. Por ejemplo, el ATRA reduce significativamente la presencia de células mieloides inmaduras y mejora la capacidad de las células mononucleares para estimular linfocitos T en pacientes con carcinoma renal (Tobin, 2018). También se ha observado que el ATRA diferencia a las células mieloides inmaduras en células dendríticas maduras, macrófagos y granulocitos, mejorando la respuesta inmunitaria tumoral específica mediada por linfocitos CD4+ y CD8+ en varios tipos tumorales evaluados *in vivo* (Li, 2021). Más aun, el ATRA promueve la supervivencia de los linfocitos T CD8+ específicos del tumor, aumentando también la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad en las células tumorales, permitiendo su reconocimiento por el sistema inmune (Bi, 2023).

En cuanto a la evaluación del potencial del ATRA sobre pacientes con cáncer de pulmón, podemos ver en las bases de datos, que los receptores retinoides están diferencialmente expresados no solo al comparar los adenocarcinomas con los carcinomas de células escamosas, sino también al comparar estos grupos con el tejido sano. El  $RAR\alpha$  presentó menor expresión en las muestras tumorales y a su vez, las muestras de carcinomas de células escamosas presentaron aún menos expresión de este receptor que las muestras de adenocarcinomas. Además, las muestras tumorales presentaron una menor relación  $RAR\beta/RAR\gamma$ , hablando de la menor diferenciación que presenta el tejido tumoral con respecto al tejido sano. Por otro lado, para evidenciar la importancia del rol del sistema del ácido retinoico en esta patología, observamos que la alta expresión de  $RAR\gamma$  en ambos tipos tumorales presenta una sobrevida global menor, evidenciada en los gráficos de Kaplan-Meier, seguramente influenciado por el rol que tiene este receptor en el mantenimiento de las CSC.

Por su parte, al igual que ocurre en nuestros estudios *in vitro*, la expresión de los genes pluripotenciales NANOG, OCT4 y SOX2 no sigue la misma tendencia en los 3 casos. Solo SOX2 se encuentra aumentado en los tejidos tumorales, siendo en mayor medida su expresión en los carcinomas de células escamosas. Además, tanto NANOG como OCT4 se encuentran disminuidos en los tejidos tumorales, aunque la diferencia con el tejido normal parecería ser menor a la evidenciada en SOX2. La diferencia entre los marcadores podría deberse a la poca estratificación de los grupos evaluados. Al no separar los tipos tumorales en los distintos estadios, pueden encontrarse evaluados pacientes en estadios tempranos, como tardíos de la enfermedad. Es interesante observar que solo los pacientes con adenocarcinoma con alta expresión de NANOG mostraron un diferencial en cuanto a la sobrevida general, mostrando una mayor sobrevida que los pacientes con baja expresión del marcador. Si bien estos marcadores moleculares están asociados a la presencia de CSC en cáncer de pulmón, estarían vinculados también a la resistencia a terapias (Hu, 2020). En este sentido, SOX2 parece ser el marcador molecular más prometedor en esta patología. SOX2 es el único de estos marcadores en ser

regulado río debajo del factor de crecimiento EGFR, frecuentemente mutado en NSCLC (Karachaliou, 2013). Además, su ARNm es el único en encontrarse elevado en sangre completa en pacientes de SCLC (Sodja, 2016). Todo esto, sumado a la elevada expresión encontrada en la base de datos, nos confirma que su presencia podría usarse como marcador diagnóstico. Sin embargo, al no verse modificada la sobrevida general de los pacientes evaluados, su valor pronóstico no sería adecuado.

Por otra parte, al evaluar las muestras de pacientes obtenidas del biobanco del Instituto “Ángel H. Roffo” observamos que el único receptor que mostraría relevancia al momento de evaluar la sobrevida general es RAR $\alpha$ . Pacientes con elevado RAR $\alpha$  presentan una sobrevida general significativamente mayor que aquellos que tienen baja expresión de este receptor. Si volvemos a observar el resultado obtenido de las bases de datos públicas, vemos que los dos tipos tumorales analizados presentaban menor cantidad de RAR $\alpha$  que las muestras de tejido sano. Tomándolo en conjunto, podríamos pensar que una alta expresión de RAR $\alpha$  puede estar asociado a un mejor pronóstico en pacientes, siendo beneficioso para la sobrevida general. Otros estudios han demostrado que el RAR $\alpha$  es uno de los receptores que se encuentra elevado en el tejido tumoral de pacientes con NSCLC, mientras que la expresión de RAR $\beta$  va disminuyendo con la progresión tumoral (Muñiz-Hernández, 2016). Esto puede influir en la carcinogénesis pulmonar y coloca al RAR $\alpha$  como potencial blanco terapéutico (Gangwar, 2022). Para un estudio más profundo del potencial uso predictivo de los receptores retinoides dentro de las muestras de pacientes de nuestro instituto necesitamos una toma de muestra más elevada, ya que, al poseer pacientes con tanta heterogeneidad, se dificulta su análisis y su correcta segregación en grupos discretos.

Para finalizar, si bien el efecto del ATRA sobre los modelos resistentes a CDDP en NSCLC en nuestro laboratorio no resultaron del todo concluyentes, el desarrollo de estos modelos nos permite analizar el efecto de distintas drogas ya utilizadas en la clínica sobre parámetros

celulares *in vitro* e *in vivo*. El desarrollo de estos modelos, con características de resistencia diferentes, son importantes para el estudio y validaciones de drogas o combinaciones de ellas, capaces de sensibilizar a las células resistentes frente al tratamiento con CDDP, o con la capacidad de generar un efecto citotóxico igual (o mayor) en las células resistentes a CDDP que en las células sensibles. Una posibilidad para decidir que droga utilizar en futuros ensayos es el análisis ómico de las dos líneas celulares resistentes. Evaluar qué vías de señalización están modificadas con respecto a las líneas celulares sensibles a la terapia nos permitiría tomar una molécula con potencial terapéutico que interactúe con dicha vía de señalización. Encontrar un factor común entre ambas líneas celulares (y demás modelos resistentes a CDDP en este tipo tumoral) nos permitiría elegir una terapia que pueda utilizarse ampliamente en todos los casos de resistencia a CDDP en NSCLC.

# Conclusiones

---

A partir de los resultados obtenidos y la posterior discusión en el presente trabajo de tesis doctoral, se logró establecer con éxito una nueva línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) resistente a cisplatino, denominada H125cpr. El análisis fenotípico de esta variante demostró que, en estrecha concordancia con lo observado en el modelo A549cpr, la adquisición de quimiorresistencia se encuentra inherentemente asociada a una pérdida de características epiteliales y a la transición hacia un estado celular de menor diferenciación.

Por otro lado, la evaluación clínica de la enfermedad reveló que, si bien el análisis global de la expresión de receptores retinoides y genes de pluripotencialidad no arrojó resultados determinantes para su implementación como un panel predictivo o pronóstico universal, el estudio molecular detallado permitió identificar biomarcadores de alto valor. Específicamente, se postula al receptor retinoide RAR $\alpha$ , así como a los genes pluripotenciales NANOG y OCT4, como potenciales marcadores de buen pronóstico. Los resultados indicaron que niveles elevados de expresión de estas moléculas se asocian a una mejora significativa en la supervivencia global (SG) de los pacientes, reflejando además un perfil transcripcional más cercano al del tejido pulmonar no tumoral.

Finalmente, la evaluación terapéutica del ácido trans-retinoico (ATRA) como agente potenciador del cisplatino evidenció una eficacia fuertemente dependiente de la complejidad del modelo biológico. Aunque la administración de ATRA no resultó prometedora para sensibilizar de forma directa a las células resistentes *in vitro*, la terapia combinada demostró resultados sinérgicos y altamente beneficiosos al ser evaluada *in vivo*. Esta marcada divergencia experimental sugiere que el éxito terapéutico del ATRA frente a la quimiorresistencia no recae únicamente en la citotoxicidad celular autónoma, sino que se encuentra fundamentalmente vinculado a su capacidad para modular el microambiente tumoral tridimensional y reprogramar el sistema inmunológico del huésped.



Lic. Andrés Bechis  
Doctorando



Dra. Laura B. Todaro  
Directora



Dr. Alejandro J. Urtreger  
Director Adjunto

# Bibliografía

---

Afornali A, Vecchi Rd, Stuart RM, Dieamant G, Oliveira LL, Brohem CA, Feferman IH, Fabrício LH, Lorencini M. Triple nanoemulsion potentiates the effects of topical treatments with microencapsulated retinol and modulates biological processes related to skin aging. *An Bras Dermatol*. 2013 Nov-Dec;88(6):930-6. doi: 10.1590/abd1806-4841.20132208. PMID: 24474102; PMCID: PMC3900344.

Afify, S. M., & Seno, M. (2019). Conversion of Stem Cells to Cancer Stem Cells: Undercurrent of Cancer Initiation. *Cancers*, 11(3), 345. <https://doi.org/10.3390/cancers11030345>.

American Cancer Society, 2025. <https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>.

Arrieta O, González-De la Rosa CH, Aréchaga-Ocampo E, Villanueva-Rodríguez G, Cerón-Lizárraga TL, Martínez-Barrera L, Vázquez-Manríquez ME, Ríos-Trejo MA, Alvarez-Avitia MA, Hernández-Pedro N, Rojas-Marín C, De la Garza J. Randomized phase II trial of All-trans-retinoic acid with chemotherapy based on paclitaxel and cisplatin as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 20;28(21):3463-71. doi: 10.1200/JCO.2009.26.6452. Epub 2010 Jun 14. PMID: 20547984.

Ayob, A. Z., & Ramasamy, T. S. (2018). Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *Journal of biomedical science*, 25(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0426-4>.

Begicevic RR, Falasca M. ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance. *Int J Mol Sci*. 2017 Nov 8;18(11):2362. doi: 10.3390/ijms18112362. PMID: 29117122; PMCID: PMC5713331.

Berardi DE, Ariza Bareño L, Amigo N, Cañonero L, Pelagatti MLN, Motter AN, Taruselli MA, Díaz Bessone MI, Cirigliano SM, Edelstein A, Peters MG, Diamant M, Urtreger AJ, Todaro LB. All-trans

retinoic acid and protein kinase C  $\alpha/\beta$ 1 inhibitor combined treatment targets cancer stem cells and impairs breast tumor progression. *Sci Rep.* 2021 Mar 15;11(1):6044. doi: 10.1038/s41598-021-85344-w. PMID: 33723318; PMCID: PMC7961031.

Bhat GR, Sethi I, Sadida HQ, Rah B, Mir R, Algehainy N, Albalawi IA, Masoodi T, Subbaraj GK, Jamal F, Singh M, Kumar R, Macha MA, Uddin S, Akil ASA, Haris M, Bhat AA. Cancer cell plasticity: from cellular, molecular, and genetic mechanisms to tumor heterogeneity and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 2024 Mar;43(1):197-228. doi: 10.1007/s10555-024-10172-z. Epub 2024 Feb 8. PMID: 38329598; PMCID: PMC11016008.

Bi, G., Liang, J., Bian, Y., Shan, G., Besskaya, V., Wang, Q., & Zhan, C. (2023). The immunomodulatory role of all-trans retinoic acid in tumor microenvironment. *Clinical and experimental medicine*, 23(3), 591–606. <https://doi.org/10.1007/s10238-022-00860-x>.

Brown G. The Emerging Oncogenic Role of RAR $\gamma$ : From Stem Cell Regulation to a Potential Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2025 May 3;26(9):4357. doi: 10.3390/ijms26094357. PMID: 40362593; PMCID: PMC12072783.

Bu, P., Chen, K. Y., Lipkin, S. M., & Shen, X. (2013). Asymmetric division: a marker for cancer stem cells in early stage tumors? *Oncotarget*, 4(7), 950–951. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1029>.

Bumaschny, V., Urtreger, A., Diamant, M., Krasnapolski, M., Fiszman, G., Klein, S., & Joffé, E. B. (2004). Malignant myoepithelial cells are associated with the differentiated papillary structure and metastatic ability of a syngeneic murine mammary adenocarcinoma model. *Breast cancer research: BCR*, 6(2), R116–R129. <https://doi.org/10.1186/bcr757>.

Bushue N, Wan YJ. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010 Oct 30;62(13):1285-98. doi: 10.1016/j.addr.2010.07.003. Epub 2010 Aug 3. PMID: 20654663; PMCID: PMC2991380.

Cabrera, M. C., Hollingsworth, R. E., & Hurt, E. M. (2015). Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World journal of stem cells*, 7(1), 27–36. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i1.27>.

Calderón-Montaña, J. M., Martínez-Sánchez, S. M., Jiménez-González, V., Burgos-Morón, E., Guillén-Mancina, E., Jiménez-Alonso, J. J., Díaz-Ortega, P., García, F., Aparicio, A., & López-Lázaro, M. (2021). Screening for Selective Anticancer Activity of 65 Extracts of Plants Collected in Western Andalusia, Spain. *Plants* (Basel, Switzerland), 10(10), 2193. <https://doi.org/10.3390/plants10102193>.

Capp J. P. (2019). Cancer Stem Cells: From Historical Roots to a New Perspective. *Journal of oncology*, 2019, 5189232. <https://doi.org/10.1155/2019/5189232>.

Chen, J., Liao, S., Xiao, Z., Pan, Q., Wang, X., Shen, K., Wang, S., Yang, L., Guo, F., Liu, H. F., & Pan, Q. (2022). The development and improvement of immunodeficient mice and humanized immune system mouse models. *Frontiers in immunology*, 13, 1007579. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1007579>.

Chen S, Hu Q, Tao X, Xia J, Wu T, Cheng B, Wang J. Retinoids in cancer chemoprevention and therapy: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Front Genet.* 2022 Nov 9;13:1065320. doi: 10.3389/fgene.2022.1065320. PMID: 36437918; PMCID: PMC9681997.

Chen, W., Shen, L., Jiang, J., Zhang, L., Zhang, Z., Pan, J., Ni, C., & Chen, Z. (2021). Antiangiogenic therapy reverses the immunosuppressive breast cancer microenvironment. *Biomarker research*, 9(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s40364-021-00312-wCDDP>.

Cheon, D. J., & Orsulic, S. (2011). Mouse models of cancer. *Annual review of pathology*, 6, 95–119. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.3.121806.154244>.

Cunningham, T. J., & Duester, G. (2015). Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 16(2), 110–123. <https://doi.org/10.1038/nrm3932>.

De Cecco, M., Ito, T., Petrashen, A. P., Elias, A. E., Skvir, N. J., Criscione, S. W., Caligiana, A., Broccoli, G., Adney, E. M., Boeke, J. D., Le, O., Beauséjour, C., Ambati, J., Ambati, K., Simon, M., Seluanov, A., Gorbunova, V., Slagboom, P. E., Helfand, S. L., Neretti, N., ... Sedivy, J. M. (2019). L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature*, 566(7742), 73–78. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0784-9>.

Desai, A., Yan, Y., & Gerson, S. L. (2019). Concise Reviews: Cancer Stem Cell Targeted Therapies: Toward Clinical Success. *Stem cells translational medicine*, 8(1), 75–81. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0123>.

Dou, Z., Xu, C., Donahue, G., Shimi, T., Pan, J. A., Zhu, J., Ivanov, A., Capell, B. C., Drake, A. M., Shah, P. P., Catanzaro, J. M., Ricketts, M. D., Lamark, T., Adam, S. A., Marmorstein, R., Zong, W. X., Johansen, T., Goldman, R. D., Adams, P. D., & Berger, S. L. (2015). Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature*, 527(7576), 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature15548>.

Faria, T. N., Mendelsohn, C., Chambon, P., & Gudas, L. J. (1999). The targeted disruption of both alleles of RARbeta(2) in F9 cells results in the loss of retinoic acid-associated growth arrest. *The Journal of biological chemistry*, 274(38), 26783–26788. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.38.26783>.

Florea AM, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)*. 2011 Mar 15;3(1):1351-71. doi: 10.3390/cancers3011351. PMID: 24212665; PMCID: PMC3756417.

Gangwar SK, Kumar A, Yap KC, Jose S, Parama D, Sethi G, Kumar AP, Kunnumakkara AB. Targeting Nuclear Receptors in Lung Cancer-Novel Therapeutic Prospects. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 May 18;15(5):624. doi: 10.3390/ph15050624. PMID: 35631448; PMCID: PMC9145966.

Gershman, E., Guthrie, R., Swiatek, K., & Shojaee, S. (2019). Management of hemoptysis in patients with lung cancer. *Annals of translational medicine*, 7(15), 358. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.04.91>.

Ghyselinck NB, Duester G. Retinoic acid signaling pathways. *Development*. 2019 Jul 4;146(13):dev167502. doi: 10.1242/dev.167502. PMID: 31273085; PMCID: PMC6633611.

Giuli MV, Hanieh PN, Giuliani E, Rinaldi F, Marianecchi C, Screpanti I, Checquolo S, Carafa M. Current Trends in ATRA Delivery for Cancer Therapy. *Pharmaceutics*. 2020 Jul 28;12(8):707. doi: 10.3390/pharmaceutics12080707. PMID: 32731612; PMCID: PMC7465813.

Global Cancer Observatory, 2022. <https://gco.iarc.fr/>.

Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*. 2014 Sep 23;7(344):re8. doi: 10.1126/scisignal.2005189. PMID: 25249658; PMCID: PMC4372086.

Griso, A. B., Acero-Riaguas, L., Castelo, B., Cebrián-Carretero, J. L., & Sastre-Perona, A. (2022). Mechanisms of Cisplatin Resistance in HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cells*, 11(3), 561. <https://doi.org/10.3390/cells11030561>.

Guo, Q., Liu, L., Chen, Z., Fan, Y., Zhou, Y., Yuan, Z., & Zhang, W. (2022). Current treatments for non-small cell lung cancer. *Frontiers in oncology*, 12, 945102. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.945102>.

Hadjimichael, C., Chanoumidou, K., Papadopoulou, N., Arampatzi, P., Papamatheakis, J., & Kretsovali, A. (2015). Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. *World journal of stem cells*, 7(9), 1150–1184. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i9.1150>.

Hanna, N. H., Robinson, A. G., Temin, S., Baker, S., Jr, Brahmer, J. R., Ellis, P. M., Gaspar, L. E., Haddad, R. Y., Hesketh, P. J., Jain, D., Jaiyesimi, I., Johnson, D. H., Leighl, N. B., Moffitt, P. R., Phillips, T., Riely, G. J., Rosell, R., Schiller, J. H., Schneider, B. J., Singh, N., ... Masters, G. (2021). Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer With Driver Alterations: ASCO and OH (CCO) Joint Guideline Update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 39(9), 1040–1091. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.03570>.

Harding, S. M., Benci, J. L., Irianto, J., Discher, D. E., Minn, A. J., & Greenberg, R. A. (2017). Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature*, 548(7668), 466–470. <https://doi.org/10.1038/nature23470>.

Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *The Journal of clinical investigation*, 128(4), 1238–1246. <https://doi.org/10.1172/JCI95148>.

Hu F, Li C, Zheng X, Zhang H, Shen Y, Zhou L, Yang X, Han B, Zhang X. Lung adenocarcinoma resistance to therapy with EGFR-tyrosine kinase inhibitors is related to increased expression of cancer stem cell markers SOX2, OCT4 and NANOG. *Oncol Rep*. 2020 Feb;43(2):727-735. doi: 10.3892/or.2019.7454. Epub 2020 Jan 2. PMID: 31894290.

IECS, 2024. <https://iecs.org.ar/el-cancer-de-pulmon-causa-10-000-muertes-por-ano-en-argentina-y-tiene-un-fuerte-impacto-en-los-hogares-y-en-el-sistema-de-salud/>.

Jayson, G. C., Kerbel, R., Ellis, L. M., & Harris, A. L. (2016). Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet (London, England)*, 388(10043), 518–529. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01088-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01088-0).

Karachaliou N, Rosell R, Viteri S. The role of SOX2 in small cell lung cancer, lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Transl Lung Cancer Res*. 2013 Jun;2(3):172-9. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2013.01.01. PMID: 25806230; PMCID: PMC4367598.

Kashyap, V., Rezende, N. C., Scotland, K. B., Shaffer, S. M., Persson, J. L., Gudas, L. J., & Mongan, N. P. (2009). Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem cells and development*, 18(7), 1093–1108. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0113>.

Kim E. S. (2016). Chemotherapy Resistance in Lung Cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 893, 189–209. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1_10).

Kim ES, Tang X, Peterson DR, Kilari D, Chow CW, Fujimoto J, Kalhor N, Swisher SG, Stewart DJ, Wistuba II, Siddik ZH. Copper transporter CTR1 expression and tissue platinum concentration in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2014 Jul;85(1):88-93. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.04.005. Epub 2014 Apr 22. PMID: 24792335; PMCID: PMC4090351.

Kisseleva EP, Krylov AV, Stepanova OI, Lioudyno VI. Transplantable subcutaneous hepatoma 22a affects functional activity of resident tissue macrophages in periphery. *Int J Cell Biol*. 2011;2011:793034. doi: 10.1155/2011/793034. Epub 2011 Jul 3. PMID: 21760797; PMCID: PMC3132540.

Lapeyre-Prost A, Terme M, Pernot S, Pointet AL, Voron T, Tartour E, Taieb J. Immunomodulatory Activity of VEGF in Cancer. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2017;330:295-342. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.09.007. Epub 2016 Dec 26. PMID: 28215534.

Lavudi K, Nuguri SM, Olverson Z, Dhanabalan AK, Patnaik S, Kokkanti RR. Targeting the retinoic acid signaling pathway as a modern precision therapy against cancers. *Front Cell Dev Biol.* 2023 Aug 11;11:1254612. doi: 10.3389/fcell.2023.1254612. PMID: 37645246; PMCID: PMC10461636.

Li R, Salehi-Rad R, Crosson W, Momcilovic M, Lim RJ, Ong SL, Huang ZL, Zhang T, Abascal J, Dumitras C, Jing Z, Park SJ, Krysan K, Shackelford DB, Tran LM, Liu B, Dubinett SM. Inhibition of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Overcomes Resistance to Immune Checkpoint Inhibition in LKB1-Deficient Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* 2021 Jun 15;81(12):3295-3308. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-3564. Epub 2021 Apr 14. PMID: 33853830; PMCID: PMC8776246.

Li, W., Deng, J., Wang, S. S., Ma, L., Pei, J., Zeng, X. X., & Tang, J. X. (2014). Association of methylation of the RAR- $\beta$  gene with cigarette smoking in non-small cell lung cancer with Southern-Central Chinese population. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 15(24), 10937–10941. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.24.10937>.

Li XQ, Ren J, Chen P, Chen YJ, Wu M, Wu Y, Chen K, Li J. Co-inhibition of Pol  $\eta$  and ATR sensitizes cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cells to cisplatin by impeding DNA damage repair. *Acta Pharmacol Sin.* 2018 Aug;39(8):1359-1372. doi: 10.1038/aps.2017.187. Epub 2018 May 31. PMID: 29849128; PMCID: PMC6289395.

Liu, H. J., Lam, H. C., Baglini, C. V., Nijmeh, J., Cottrill, A. A., Chan, S. Y., & Henske, E. P. (2019). Rapamycin-upregulated miR-29b promotes mTORC1-hyperactive cell growth in TSC2-deficient cells by downregulating tumor suppressor retinoic acid receptor  $\beta$  (RAR $\beta$ ). *Oncogene*, 38(49), 7367–7383. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0957-5>.

Lu, Y., Bertran, S., Samuels, T. A., Mira-y-Lopez, R., & Farias, E. F. (2010). Mechanism of inhibition of MMTV-neu and MMTV-wnt1 induced mammary oncogenesis by RARalpha agonist AM580. *Oncogene*, 29(25), 3665–3676. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.119>.

Mackenzie, K. J., Carroll, P., Martin, C. A., Murina, O., Fluteau, A., Simpson, D. J., Olova, N., Sutcliffe, H., Rainger, J. K., Leitch, A., Osborn, R. T., Wheeler, A. P., Nowotny, M., Gilbert, N., Chandra, T., Reijns, M. A. M., & Jackson, A. P. (2017). cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature*, 548(7668), 461–465. <https://doi.org/10.1038/nature23449>.

Marteijn, J. A., Lans, H., Vermeulen, W., & Hoeijmakers, J. H. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(7), 465–481. <https://doi.org/10.1038/nrm3822>.

Metzler, M. A., & Sandell, L. L. (2016). Enzymatic Metabolism of Vitamin A in Developing Vertebrate Embryos. *Nutrients*, 8(12), 812. <https://doi.org/10.3390/nu8120812>.

Mielgo-Rubio, X., Uribealarea, E. A., Cortés, L. Q., & Moyano, M. S. (2021). Immunotherapy in non-small cell lung cancer: Update and new insights. *Journal of clinical and translational research*, 7(1), 1–21.

Miyasaka, Y., Sato, H., Okano, N., Kubo, N., Kawamura, H., & Ohno, T. (2021). A Promising Treatment Strategy for Lung Cancer: A Combination of Radiotherapy and Immunotherapy. *Cancers*, 14(1), 203. <https://doi.org/10.3390/cancers14010203>.

Mogi A, Kuwano H. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011: 583929. doi: 10.1155/2011/583929. Epub 2011 Jan 18. PMID: 21331359; PMCID: PMC3035360.

Mogi, A., & Kuwano, H. (2011). TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 583929. <https://doi.org/10.1155/2011/583929>.

Moro M, Bertolini G, Pastorino U, Roz L, Sozzi G. Combination Treatment with All-Trans Retinoic Acid Prevents Cisplatin-Induced Enrichment of CD133+ Tumor-Initiating Cells and Reveals Heterogeneity of Cancer Stem Cell Compartment in Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2015 Jul;10(7):1027-36. doi: 10.1097/JTO.0000000000000563. PMID: 26020124; PMCID: PMC4467987.

Muñiz-Hernández S, Huerta-Yepez S, Hernández-Pedro N, Ramírez-Tirado LA, Aviles-Salas A, Maldonado A, Hernández-Cueto D, Baay-Guzmán G, Arrieta O. Association between nuclear expression of retinoic acid receptor alpha and beta and clinicopathological features and prognosis of advanced non-small cell lung cancer. *Int J Clin Oncol*. 2016 Dec;21(6):1051-1061. doi: 10.1007/s10147-016-1002-0. Epub 2016 Jun 15. PMID: 27306217.

Napoli JL. Cellular retinoid binding-proteins, CRBP, CRABP, FABP5: Effects on retinoid metabolism, function and related diseases. *Pharmacol Ther*. 2017 May;173:19-33. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.01.004. Epub 2017 Jan 27. PMID: 28132904; PMCID: PMC5408321.

Nasser, N. J., Gorenberg, M., & Agbarya, A. (2020). First line Immunotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 13(11), 373. <https://doi.org/10.3390/ph13110373>.

Pastushenko, I., & Blanpain, C. (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in cell biology*, 29(3), 212–226. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001>.

Perissi, V., Jepsen, K., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2010). Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nature reviews. Genetics*, 11(2), 109–123. <https://doi.org/10.1038/nrg2736>.

Petkovich M, Chambon P. Retinoic acid receptors at 35 years. *J Mol Endocrinol*. 2022 Oct 11;69(4):T13-T24. doi: 10.1530/JME-22-0097. PMID: 36149754.

Rich J. N. (2016). Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity. *Medicine*, 95(1 Suppl 1), S2–S7. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000004764>.

Rocha, C. R. R., Silva, M. M., Quinet, A., Cabral-Neto, J. B., & Menck, C. F. M. (2018). DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 73(suppl 1), e478s. <https://doi.org/10.6061/clinics/2018/e478s>.

Roller, J. F., Veeramachaneni, N. K., & Zhang, J. (2022). Exploring the Evolving Scope of Neoadjuvant Immunotherapy in NSCLC. *Cancers*, 14(3), 741. <https://doi.org/10.3390/cancers14030741>.

Ross AC, Zolfaghari R. Cytochrome P450s in the regulation of cellular retinoic acid metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2011 Aug 21;31:65-87. doi: 10.1146/annurev-nutr-072610-145127. PMID: 21529158; PMCID: PMC3789243.

Rudin, C. M., Brambilla, E., Faivre-Finn, C., & Sage, J. (2021). Small-cell lung cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 7(1), 3. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00235-0>.

Ruiz, P., Maldonado, P., Hidalgo, Y., Gleisner, A., Sauma, D., Silva, C., Saez, J. J., Nuñez, S., Roseblatt, M., & Bono, M. R. (2013). Transplant tolerance: new insights and strategies for long-term allograft acceptance. *Clinical & developmental immunology*, 2013, 210506. <https://doi.org/10.1155/2013/210506>.

Sarin N, Engel F, Kalayda GV, Mannewitz M, Cinatl J Jr, Rothweiler F, Michaelis M, Saafan H, Ritter CA, Jaehde U, Frötschl R. Cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is associated with an abrogation of cisplatin-induced G2/M cell cycle arrest. *PLoS One*. 2017 Jul

26;12(7):e0181081. doi: 10.1371/journal.pone.0181081. PMID: 28746345; PMCID: PMC5528889.

Schabath, MB & Cote ML. (2019). Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019 Oct;28(10):1563-1579. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-19-0221.

Shibata, M., & Hoque, M. O. (2019). Targeting Cancer Stem Cells: A Strategy for Effective Eradication of Cancer. *Cancers*, 11(5), 732. <https://doi.org/10.3390/cancers11050732>.

Shultz, L. D., Goodwin, N., Ishikawa, F., Hosur, V., Lyons, B. L., & Greiner, D. L. (2014). Human cancer growth and therapy in immunodeficient mouse models. *Cold Spring Harbor protocols*, 2014(7), 694–708. <https://doi.org/10.1101/pdb.top073585>.

Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003 Oct 20;22(47):7265-79. doi: 10.1038/sj.onc.1206933. PMID: 14576837.

Tobin RP, Jordan KR, Robinson WA, Davis D, Borges VF, Gonzalez R, Lewis KD, McCarter MD. Targeting myeloid-derived suppressor cells using all-trans retinoic acid in melanoma patients treated with Ipilimumab. *Int Immunopharmacol*. 2018 Oct;63:282-291. doi: 10.1016/j.intimp.2018.08.007. Epub 2018 Aug 16. PMID: 30121453; PMCID: PMC6134177.

Simon, M., Van Meter, M., Ablaeva, J., Ke, Z., Gonzalez, R. S., Taguchi, T., De Cecco, M., Leonova, K. I., Kogan, V., Helfand, S. L., Neretti, N., Roichman, A., Cohen, H. Y., Meer, M. V., Gladyshev, V. N., Antoch, M. P., Gudkov, A. V., Sedivy, J. M., Seluanov, A., & Gorbunova, V. (2019). LINE1 Derepression in Aged Wild-Type and SIRT6-Deficient Mice Drives Inflammation. *Cell metabolism*, 29(4), 871–885.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.02.014>.

Sodja E, Rijavec M, Koren A, Sadikov A, Korošec P, Cufer T. The prognostic value of whole blood SOX2, NANOG and OCT4 mRNA expression in advanced small-cell lung cancer. *Radiol Oncol*.

2016 Apr 23;50(2):188-96. doi: 10.1515/raon-2015-0027. PMID: 27247551; PMCID: PMC4852967.

Stribbling, S. M., & Ryan, A. J. (2022). The cell-line-derived subcutaneous tumor model in preclinical cancer research. *Nature protocols*, 17(9), 2108–2128. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00709-3>.

Sun X, Shi B, Zheng H, Min L, Yang J, Li X, Liao X, Huang W, Zhang M, Xu S, Zhu Z, Cui H, Liu X. Senescence-associated secretory factors induced by cisplatin in melanoma cells promote non-senescent melanoma cell growth through activation of the ERK1/2-RSK1 pathway. *Cell Death Dis.* 2018 Feb 15;9(3):260. doi: 10.1038/s41419-018-0303-9. PMID: 29449532; PMCID: PMC5833767.

Sun, L., Li, H., Luo, H., & Zhao, Y. (2014). Thymic epithelial cell development and its dysfunction in human diseases. *BioMed research international*, 2014, 206929. <https://doi.org/10.1155/2014/206929>.

Tai Q, Zhang L, Hu X. Clinical characteristics and treatments of large cell lung carcinoma: a retrospective study using SEER data. *Transl Cancer Res.* 2020 Mar;9(3):1455-1464. doi: 10.21037/tcr.2020.01.40. PMID: 35117493; PMCID: PMC8799166.

Tan, A. C., & Tan, D. S. W. (2022). Targeted Therapies for Lung Cancer Patients With Oncogenic Driver Molecular Alterations. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 40(6), 611–625. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.01626>.

Tang, X. H., & Gudas, L. J. (2011). Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annual review of pathology*, 6, 345–364. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130303>.

Terradas, M., Martín, M., Tusell, L., & Genescà, A. (2010). Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutation research*, 705(1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.03.004>.

Thies KA, Steck S, Knoblaugh SE, Sizemore ST. Pathological Analysis of Lung Metastasis Following Lateral Tail-Vein Injection of Tumor Cells. *J Vis Exp*. 2020 May 20;(159). doi: 10.3791/61270. Erratum in: *J Vis Exp*. 2020 Dec 2;(166). doi: 10.3791/6452. PMID: 32510518.

Toledo-Guzmán ME, Bigoni-Ordóñez GD, Ibáñez Hernández M, Ortiz-Sánchez E. Cancer stem cell impact on clinical oncology. *World J Stem Cells*. 2018 Dec 26;10(12):183-195. doi: 10.4252/wjsc.v10.i12.183. PMID: 30613312; PMCID: PMC6306557.

Urtreger AJ, Diamant MJ, Ranuncolo SM, Del C Vidal M, Puricelli LI, Klein SM, De Kier Joffe ED. New murine cell line derived from a spontaneous lung tumor induces paraneoplastic syndromes. *Int J Oncol*. 2001 Mar;18(3):639-47. doi: 10.3892/ijo.18.3.639. PMID: 11179499.

West, A. P., & Shadel, G. S. (2017). Mitochondrial DNA in innate immune responses and inflammatory pathology. *Nature reviews. Immunology*, 17(6), 363–375. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.21>.

Yadav, R., Mahajan, S., Singh, H., Mehra, N. K., Madan, J., Doijad, N., Singh, P. K., & Guru, S. K. (2024). Emerging In Vitro and In Vivo Models: Hope for the Better Understanding of Cancer Progression and Treatment. *Advanced biology*, 8(6), e2300487. <https://doi.org/10.1002/adbi.202300487>.

Yamakawa K, Koyanagi-Aoi M, Machinaga A, Kakiuchi N, Hirano T, Kodama Y, Aoi T. Blockage of retinoic acid signaling via RAR $\gamma$  suppressed the proliferation of pancreatic cancer cells by arresting the cell cycle progression of the G1-S phase. *Cancer Cell Int*. 2023 May 17;23(1):94. doi: 10.1186/s12935-023-02928-4. PMID: 37198667; PMCID: PMC10189913.

Yan, T. D., Wu, H., Zhang, H. P., Lu, N., Ye, P., Yu, F. H., Zhou, H., Li, W. G., Cao, X., Lin, Y. Y., He, J. Y., Gao, W. W., Zhao, Y., Xie, L., Chen, J. B., Zhang, X. K., & Zeng, J. Z. (2010). Oncogenic potential of retinoic acid receptor-gamma in hepatocellular carcinoma. *Cancer research*, 70(6), 2285–2295. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2968>.

Yokoyama Y, Dhanabal M, Griffioen AW, Sukhatme VP, Ramakrishnan S. Synergy between angiostatin and endostatin: inhibition of ovarian cancer growth. *Cancer Res*. 2000 Apr 15;60(8):2190-6. PMID: 10786683.

Zattoni IF, Delabio LC, Dutra JP, Kita DH, Scheiffer G, Hemberger M, Pereira GDS, Moure VR, Valdameri G. Targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Functional inhibitors and expression modulators. *Eur J Med Chem*. 2022 Jul 5;237:114346. doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114346. Epub 2022 Apr 6. PMID: 35483322.

Zhang, C. Z., Spektor, A., Cornils, H., Francis, J. M., Jackson, E. K., Liu, S., Meyerson, M., & Pellman, D. (2015). Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature*, 522(7555), 179–184. <https://doi.org/10.1038/nature14493>.

Zhang Z, Burnley P, Coder B, Su DM. Insights on FoxN1 biological significance and usages of the "nude" mouse in studies of T-lymphopoiesis. *Int J Biol Sci*. 2012;8(8):1156-67. doi: 10.7150/ijbs.5033. Epub 2012 Sep 24. PMID: 23091413; PMCID: PMC3477685.

Zhou HM, Zhang JG, Zhang X, Li Q. Targeting cancer stem cells for reversing therapy resistance: mechanism, signaling, and prospective agents. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Feb 15;6(1):62. doi: 10.1038/s41392-020-00430-1. PMID: 33589595; PMCID: PMC7884707.

Zhou J, Kang Y, Chen L, Wang H, Liu J, Zeng S, Yu L. The Drug-Resistance Mechanisms of Five Platinum-Based Antitumor Agents. *Front Pharmacol*. 2020 Mar 20;11:343. doi: 10.3389/fphar.2020.00343. PMID: 32265714; PMCID: PMC7100275.