



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Abordajes ómicos para la caracterización funcional de la oncoproteína MAGE-A9

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de
Buenos Aires

en el área de Química Biológica

Licenciada Melisa del Valle Suberbordes

Director de Tesis: Dr. Martín Monte

Consejera de Estudios: Dra Edith Kordon

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN UBA-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 22 de abril del 2026

Abordajes ómicos para la caracterización funcional de la oncoproteína MAGE-A9

Resumen

En tejidos normales, la expresión de los genes de la familia MAGE tipo I (Melanoma Antigen Genes-I) está restringida a las células de testículo y placenta, pero se reactivan en diversos tumores causando la promoción de fenotipos pro-tumorales. Si bien en la actualidad han sido caracterizadas sólo algunas de las más de 20 proteínas la familia MAGE-I que se expresan en tejidos humanos, estas han sido principalmente asociadas con la represión de la vía de p53 o al aumento de la ubiquitinación, por asociación con diversas enzimas ubiquitina E3 ligasas y sustratos específicos.

Recientemente, la expresión del gen *MAGE-A9* ha sido clínicamente asociada al mal pronóstico y resistencia a quimioterápicos en distintos tipos de cáncer, aunque su mecanismo de acción no ha sido caracterizado.

En este trabajo de Tesis abordamos la caracterización funcional de la proteína MAGE-A9 con metodología de biología molecular y celular y con aproximaciones multi-ómicas, con el fin de obtener una visión amplia de los potenciales mecanismos asociados al mal pronóstico clínico. Para esto se generaron modelos celulares específicos para evaluar el impacto de la expresión de MAGE-A9 evaluando el transcriptoma, se determinó su interactoma, así como sus potenciales blancos modificados por ubiquitinación a nivel global: el ubiquitinoma.

Cada una de las aproximaciones ómicas fue analizada por separado. Luego, mediante un análisis multi-ómico integrador, combinamos datos del interactoma, del ubiquitinoma y del transcriptoma e identificamos ejes funcionales recurrentes alterados por la expresión de MAGE-A9 como: la regulación y actividad transcripcional de p53, la respuesta al daño al ADN y adaptación al estrés, alteraciones en el nodo que agrupa a matriz extracelular, el microambiente tumoral y la transición epitelio-mesenquimal, se observaron cambios en el nodo de la angiogénesis y en el metabolismo tumoral asociado a proteostasis la red de ubiquitinación.

Por primera vez, en esta tesis se evidencia que la expresión de una proteína MAGE no sólo puede aumentar la ubiquitinación de determinados sustratos, sino también disminuirla en otros, revelando un doble rol regulador sobre la maquinaria ubiquitina–proteasoma y proponiendo un mecanismo de ajuste fino mediante la proteostasis.

Además de la relación de MAGE-A9 con la vías de p53 y la regulación de la ubiquitinación, hemos detectado otras alteraciones relacionadas con el fenotipo tumoral por la expresión de MAGE-A9, como el aumento de la transcripción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y una interacción de gran interés con la vía oncogénica regulada por la quinasa de adhesión focal (FAK1). Esta modulación podría favorecer la activación de vías pro-supervivencia, la modulación de la vía de p53, y la inducción de programas de matriz extracelular, aumento de VEGF y migración celular, contribuyendo así a un fenotipo tumoral más agresivo y resistente al daño genotóxico.

En conjunto, esta tesis describe por primera vez las funciones de MAGE-A9 mediante la integración del interactoma, ubiquitinoma y transcriptoma, sentando las bases mecanísticas por las cuales MAGE-A9 conferiría resistencia, plasticidad, capacidad migratoria y metastásicas aumentadas a las células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello. Además, establece un precedente conceptual al demostrar que las proteínas MAGE pueden interactuar tanto con ubiquitina E3 ligasas como con de-ubiquitininasas (USP7) para modular la ubiquitinación en ambas direcciones, tanto incrementando como disminuyendo la marca ubiquitina en proteínas específicas, lo que redefine su papel como reguladores centrales de la proteostasis y la señalización pro-tumoral.

Si bien las aproximaciones multi-ómicas empleadas permiten identificar de manera integral redes y ejes funcionales asociados a la expresión de MAGE-A9, no implican la validación individual de todos los eventos moleculares detectados. En este trabajo se priorizó la confirmación experimental de nodos centrales, estableciendo un modelo mecanístico consistente que sienta las bases para estudios posteriores de mayor profundidad causal.

Omics Approaches for the Functional Characterization of the Oncoprotein MAGE-A9

Abstract

In normal tissues, the expression of type I MAGE (Melanoma Antigen Genes-I) family members is restricted to testis and placental cells; however, these genes are reactivated in a wide range of tumors, where they promote pro-tumoral phenotypes. Although more than 20 MAGE-I proteins are expressed in human tissues, only a subset has been functionally characterized to date. These proteins have been mainly associated with repression of the p53 pathway and with increased ubiquitination through their interaction with E3 ubiquitin ligases and specific substrates.

Recently, MAGE-A9 expression has been clinically associated with poor prognosis and resistance to chemotherapeutic agents in multiple cancer types; however, its mechanism of action remains largely uncharacterized.

In this thesis, we performed a functional characterization of MAGE-A9 using molecular and cellular biology approaches combined with multi-omics strategies, aiming to obtain a comprehensive view of the mechanisms underlying its association with adverse clinical outcomes. To this end, specific cellular models were generated to evaluate the impact of MAGE-A9 expression. We analyzed the transcriptome, determined the interactome, and identified globally ubiquitinated targets (the ubiquitinome).

Each omics layer was first analyzed independently. Subsequently, through an integrative multi-omics analysis, we combined transcriptomic, interactomic, and ubiquitinomic data and identified recurrent functional axes altered by MAGE-A9 expression. These included regulation of p53 transcriptional activity, DNA damage response and stress adaptation, alterations in extracellular matrix and tumor microenvironment-related pathways, epithelial–mesenchymal transition, angiogenesis, and tumor metabolism associated with proteostasis and the ubiquitin network.

For the first time, this thesis demonstrates that the expression of a MAGE protein can not only increase ubiquitination of certain substrates but also decrease it in

others, revealing a dual regulatory role over the ubiquitin–proteasome system and suggesting a fine-tuning mechanism through proteostasis.

Beyond its association with p53 signaling and ubiquitination regulation, we identified additional alterations linked to tumor phenotype driven by MAGE-A9 expression, including increased transcription of vascular endothelial growth factor (VEGF) and a notable interaction with the oncogenic signaling pathway regulated by focal adhesion kinase (FAK1). This modulation may promote pro-survival signaling, contribute to p53 pathway modulation, and induce programs related to extracellular matrix remodeling, VEGF expression, and cell migration, thereby supporting a more aggressive and genotoxic stress–resistant tumor phenotype.

Overall, this thesis provides the first comprehensive functional characterization of MAGE-A9 through the integration of transcriptomic, interactomic, and ubiquitinomic data, establishing mechanistic bases by which MAGE-A9 may confer resistance, plasticity, and enhanced migratory and metastatic capacities to head and neck squamous cell carcinoma cells. Furthermore, it introduces a conceptual advance by demonstrating that MAGE proteins can interact not only with E3 ubiquitin ligases but also with deubiquitinases (such as USP7), enabling bidirectional modulation of ubiquitination. This finding redefines their role as central regulators of proteostasis and pro-tumoral signaling.

Although the multi-omics approaches employed here enable a comprehensive identification of networks and functional axes associated with MAGE-A9 expression, they do not imply the individual validation of all detected molecular events. In this work, experimental validation was focused on key nodes, establishing a consistent mechanistic model that provides a foundation for future in-depth causal studies.

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de Tesis han sido dados a conocer previamente en las siguientes reuniones científicas

2025. REUNIÓN ANUAL DE SOCIEDADES DE BIOCIENCIAS SAIC-AAFE. MAGE-A9 as a Modulator of Aggressiveness in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Melisa Suberbordes 1, Micaela Escalada 1, Candela Vidal 1, Rocio Toppino 1, Ana Raimondi 2, Philippe Soubeyran 3, Martin Monte1

2024. REUNIÓN ANUAL DE SOCIEDADES DE BIOCIENCIAS SAIC-SAFIS · ALACF. The Expression of the tumor protein MAGE-A9 is associated with aggressive tumor characteristics such as angiogenesis and cell migration. Suberbordes M, Torralba-Agu V, Escalada M, Vidal C ,Raimondi A, Monte M.

2023. REUNIÓN ANUAL DE SOCIEDADES DE BIOCIENCIAS SAIC.SAB. AAFE. AACyTAL. MAGE-A9 Oncoprotein and the DNA damage repair and Wnt/ β -Catenin pathways. Suberbordes Melisa , Micaela Escalada, Candela Vidal, Franco Pascucci, Martin Monte

2022. REUNIÓN ANUAL DE SOCIEDADES DE BIOCIENCIAS SAIC-SAFIS.SAI.FAIC FUNCTIONAL STUDY OF MAGE-A9 AND ITS EFFECT ON P53. Suberbordes Melisa , Micaela Escalada, Candela Vidal, Franco Pascucci, Martin Monte.

2021. Reunión Conjunta SAIC. SAI. AAFE. NANOMED-AR virtual. Presentación E-Póster: MECHANISM OF P53 INHIBITION BY MAGEC2 TUMOR PROTEIN. Franco Andrés Pascucci , Maria Fátima Ladelfa , Micaela Escalada , Melisa Suberbordes , Martín Monte.

2020. Reunión Anual de Sociedades de Biociencias SAIC.SAI.SAFIS. Presentación E-póster. MageC2: a novel member of the Ras/B-Raf oncogenic pathway to counteract the p53 response in human melanoma. Franco Andrés Pascucci , Maria Fátima Ladelfa , Micaela Escalada , Melisa Suberbordes , Martín Monte.

Publicaciones relacionadas.

- Pascucci, F. A., Ladelfa, M. F., Toledo, M. F., Escalada, **M., Suberbordes**, M., & Monte, M. (2021). MageC2 protein is upregulated by oncogenic activation of MAPK pathway and causes impairment of the p53 transactivation function. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1868(3), 118918. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118918>
- Pascucci, F. A., Escalada, M. **C., Suberbordes**, M., Vidal, C., Ladelfa, M. F., & Monte, M. (2023). MAGE-I proteins and cancer-pathways: A bidirectional relationship. *Biochimie*, 208, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.11.005>
- Micaela Carolina Escalada, Melisa Suberbordes, Candela Vidal, Martín Monte, Franco Andrés Pascucci. Exploring MAGE Gene Expression in Cancer: *How Valuable are they in Cancer Prognosis?* Book: **Novel Research Aspects in Medicine and Medical Science Vol. 4, Page 99-107, 2023.**

AGRADECIMIENTOS

A Hernán, mi compañero de vida desde hace tantos años. Gracias por apoyarme, sostenerme y animarme a seguir. Gracias por ayudarme a reencontrar el foco cada vez que lo perdí y por amarme tanto. Te amo.

A mis hijos, por ser mi motor. Gracias por entender las ausencias, los apuros y los “hoy mamá no puede”. Gracias por su amor incondicional. Christopher, Sofi y Lauti, los amo.

A mi familia: a mi mamá, Norma Pinal, y a mi hermana, Mariela Suberbordes, por su apoyo incondicional de siempre.

Y a mi papá, Federico Suberbordes, quien, aunque hoy no está, me acompañó y apoyó en todo lo que estuvo a su alcance.

Gracias a todos ellos por creer en mí, por confiar siempre y por acompañarme, apoyarme y alentarme en cada paso.

A mi suegra, Norma Sosa, por su acompañamiento y apoyo a lo largo de todo este proceso. Gracias por la compañía, las charlas y los consejos.

A mi abuela, Sara Fernández, y a mi suegro, Oscar Palma, quienes ya no están entre nosotros, pero forman parte de este camino y de este logro.

Al Dr. Martín Monte, por abrirme las puertas de su laboratorio, enseñarme con paciencia y guiarme en el recorrido sinuoso que implica hacer un doctorado.

A la Dra. Edith Kordon, por haber sido mi docente y directora durante la licenciatura, por su acompañamiento a lo largo de mi formación y por haberme orientado hacia el laboratorio del Dr. Monte. Gracias también por su calidez y por seguir acompañándome como consejera de estudios.

A la Dra. Ana Raimondi, por la generosa donación de las líneas celulares, su excelente predisposición y su constante acompañamiento con tanto cariño.

A mis compañeras y, a esta altura, amigas del laboratorio —Mica, Cande V., Cande D. y Ro—, gracias por estar siempre, por las charlas y por el sostén en los momentos en que más lo necesité.

A mis amigos de toda la vida —Yesi, Denu, Jorge, Ana y Romi—, por acompañarme en cada paso desde que tenemos seis años, por confiar siempre en mí y por apoyarme y alentarme en todo momento.

A todos los laboratorios de QB, por el compañerismo y la generosidad. Todo es más fácil con ustedes siempre dispuestos a dar una mano. Bren, Guille, Lucho, Rodri y Sabri, ¡mil gracias!

A todos los docentes que tuve a lo largo de mi formación, tanto en la licenciatura como en el doctorado. Ha sido un privilegio haber sido alumna de cada uno de ustedes.

A la Universidad de Buenos Aires, por haberme formado primero como licenciada y luego como doctora, brindándome una educación pública de excelencia.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	14
1. Cáncer: conceptos actuales y marcas distintivas (hallmarks).....	14
1.2 Oncogenes y genes oncosupresores.....	16
2. Redes o vías de señalización celular en cáncer.....	17
2.1 Respuesta al daño del ADN (DDR) como barrera tumoral.....	19
2.2 p53 como integrador central de la respuesta al estrés.....	21
2.3 Vías oncogénicas asociadas a plasticidad tumoral y señalización pro-supervivencia.....	23
2.3.1 Vía MAPK.....	24
2.3.2 FAK1 y señales de adhesión celular.....	26
2.3.3 VEGF y angiogénesis.....	29
2.3.4 Eje PI3K–AKT–mTOR y señalización pro-supervivencia tumoral....	31
2.4 Regulación postraducciona l y control dinámico de proteínas en redes de señalización.....	34
2.4.1 Ubiquitinación como modulador de estabilidad proteica y señalización.....	35
2.4.2 Crosstalk entre fosforilación y ubiquitinación en redes de señalización.....	38
2.4.3 Proteostasis tumoral y remodelación dinámica del proteoma.....	41
3. Cancer testis antigen (CTA) y familia de proteínas MAGE.....	42
3.1 Antígenos cáncer-testículo: definición, regulación y relevancia tumoral..	43
3.2 Familia MAGE: organización estructural y clasificación funcional.....	44
3.3 Interacciones entre proteínas MAGE.....	47
3.3 Funciones moleculares de las proteínas MAGE en cáncer.....	48
3.3.1 Regulación de factores de transcripción.....	48
3.3.2 Regulación de la estabilidad proteica y proteostasis mediante asociación con ligasas E3.....	49
3.4 MAGE-A9: importancia clínica y vacíos en el conocimiento.....	52
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	56
RESULTADOS.....	58
PARTE 1.....	58
1. Regulación de la estabilidad de MAGE-A9 por la vía MAPK.....	58
PARTE 2.....	65
2. Generación y validación de modelos celulares para la caracterización funcional de MAGE-A9.....	65
2.1 Selección de modelos celulares.....	65

2.2 Generación de modelos celulares con expresión constitutiva e inducible de MAGE-A9.....	68
2.3 Localización subcelular de MAGE-A9.....	69
2.4 Estabilidad de MAGE-A9 frente al tratamiento con quimioterapéuticos..	71
PARTE 3.....	74
3. Análisis transcriptómico: impacto global de la expresión de MAGE-A9 sobre la expresión génica.....	74
3.1 Diseño experimental y análisis del RNA-seq.....	74
3.2 Genes diferencialmente expresados (DEGs) regulados por MAGE-A9...	76
3.3 Enriquecimiento funcional de los genes regulados por MAGE-A9.....	78
3.4 MAGE-A9 modula la respuesta al daño en el ADN y la viabilidad celular: validación Experimental.....	91
3.4.1 MAGE-A9 aumenta la viabilidad celular frente a estrés genotóxico.	92
3.4.2 La expresión de MAGE-A9 reduce la apoptosis inducida por estrés genotóxico.....	94
3.4.3 MAGE-A9 inhibe la actividad transcripcional de p53 sin afectar su estabilidad ni su estado de acetilación.....	96
3.5 Validación experimental: MAGE-A9 favorece rasgos asociados a comportamiento tumoral agresivo como la migración celular.....	99
3.5.1 MAGE-A9 promueve la migración celular.....	100
3.5.2 MAGE-A9 induce la expresión de genes pro-angiogénicos y de remodelación de matriz (VEGF y MMP2).....	102
PARTE 4.....	105
4. Análisis del interactoma de MAGE-A9.....	105
4.1. Análisis del interactoma de MAGE-A9 en células HN30.....	106
4.2 Enriquecimiento de vías y procesos biológicos asociados al interactoma de MAGE-A9 en HNSCC.....	107
4.3 Comparación del interactoma de MAGE-A9 en HNSCC con datasets proteómicos a gran escala en líneas celulares no-HNSCC (BioPlex).....	113
4.3.1 Núcleo de interactores conservados de MAGE-A9 entre HEK293T y HCT116.....	114
4.3.2 Núcleo conservado del interactoma de MAGE-A9 entre HEK293T, HCT116 y HN30.....	119
4.4 Interacciones de MAGE-A9 con otras proteínas de la familia MAGE en modelos HNSCC y no HNSCC.....	123
4.5 Validación de la interacción de MAGE-A9 con p62/SQSTM1.....	126
4.6 MAGE-A9 interactúa con FAK1 y aumenta pFAK en células HNSCC....	128
PARTE 5.....	131
5. Cambios globales en la ubiquitinación asociados a la expresión de MAGE-A9..	

5.1 Análisis funcional de las proteínas diferencialmente ubiquitinadas.....	133
5.2 Identificación de reguladores de ubiquitinación dentro del interactoma de MAGE-A9.....	137
5.3 Superposición entre el ubiquitinoma y el interactoma de MAGE-A9.....	138
MODELO INTEGRADOR PROPUESTO.....	141
DISCUSIÓN.....	144
CONCLUSIONES.....	151
MATERIALES Y MÉTODOS.....	154
1. Cultivo Celular.....	154
2. Criopreservación.....	157
3. Esterilización del material de cultivo.....	158
4. Calidad del agua y de reactivos.....	159
5. Descarte de residuos peligrosos.....	159
6. Clonados. Producción de los vectores CMV_10 3xFlagMAGE-A9, pcw573xFlagMAGE-A9.....	159
7. Transfecciones.....	163
8. Transducciones lentivirales.....	164
9. Análisis de proteínas.....	165
10. Evaluación de la actividad transcripcional.....	170
10.a. Ensayo de genes reporteros.....	170
10.b Evaluación de los niveles de mensajero por RT-qPCR.....	171
11. Ensayo de viabilidad celular (MTT) bajo estrés genotóxico con etopósido.....	175
12. Ensayo de apoptosis por citometría de flujo (Anexina V-FITC/PI).....	176
13. Ensayo de cicatrización de herida (migración celular).....	177
14. Descripción de los vectores utilizados.....	178
15. Transformación de bacterias.....	179
16. Obtención de ADN plasmídico.....	180
17. Análisis transcriptómico por RNA-seq.....	181
17.1 Diseño experimental y obtención de muestras.....	181
17.2 Control de calidad y preprocesamiento de lecturas.....	182
17.3 Cuantificación de la expresión génica mediante pseudoalineamiento.....	183
17.4 Importación y análisis exploratorio de datos en R.....	183
17.5 Filtrado y normalización de datos.....	184
17.6 Análisis de expresión diferencial.....	184
18. Desarrollo del ubiquitinoma.....	186
18.1 Lisis celular y purificación por afinidad Ni-NTA.....	186

18.2. Segunda purificación mediante inmunoprecipitación anti-FLAG.....	187
BIBLIOGRAFÍA.....	188

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer: conceptos actuales y marcas distintivas (hallmarks)

El cáncer constituye un conjunto heterogéneo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento celular descontrolado y la capacidad de las células transformadas para evadir los mecanismos fisiológicos que regulan la homeostasis tisular. Desde una perspectiva clásica, el cáncer fue definido como el resultado de una proliferación celular anómala originada por alteraciones genéticas que confieren ventajas selectivas a determinadas células dentro de un tejido (1). Sin embargo, esta definición ha evolucionado significativamente en las últimas décadas, incorporando una visión más compleja que considera al cáncer no sólo como una enfermedad genética, sino como un proceso dinámico y sistémico que involucra interacciones entre células tumorales, el microambiente y múltiples niveles de regulación molecular (2).

En la actualidad, el cáncer se concibe como una enfermedad de las redes de señalización celular, en la cual alteraciones acumulativas en genes clave conducen a la reprogramación de procesos fundamentales como la proliferación, la supervivencia, el metabolismo, la respuesta al daño del ADN y la interacción con el entorno tisular (3). Estas alteraciones no actúan de manera aislada, sino que se integran en circuitos regulatorios complejos que permiten a las células tumorales adquirir propiedades adaptativas frente a presiones selectivas, incluyendo hipoxia, estrés genotóxico y tratamientos terapéuticos.

Un marco conceptual ampliamente aceptado para describir estas propiedades distintivas del cáncer es el modelo de los *hallmarks of cancer*, propuesto inicialmente por Hanahan y Weinberg y posteriormente ampliado para reflejar los avances en el conocimiento del campo. Este modelo postula que las células tumorales adquieren un conjunto de capacidades funcionales que les permiten iniciar, sostener y progresar en el proceso tumoral. Entre los hallmarks clásicos se incluyen la autosuficiencia en señales proliferativas, la insensibilidad a señales anti-proliferativas, la evasión de la apoptosis, el potencial replicativo ilimitado, la inducción de angiogénesis y la activación de procesos de invasión y metástasis.

En su revisión actualizada, el modelo de los hallmarks incorporó nuevas capacidades emergentes y características facilitadoras, reconociendo la importancia de la inestabilidad genómica, la inflamación tumoral, la reprogramación metabólica y la evasión de la respuesta inmune como componentes centrales del fenotipo maligno(4) . Estas características reflejan la naturaleza adaptativa del cáncer y subrayan el papel de mecanismos regulatorios dinámicos que permiten a las células tumorales responder a cambios en su entorno y a insultos terapéuticos.

A nivel molecular, la adquisición de los hallmarks del cáncer está impulsada por alteraciones en dos grandes clases funcionales de genes: los oncogenes y los genes supresores de tumores. Los oncogenes derivan de la activación aberrante de proto-oncogenes normales y promueven la proliferación, la supervivencia y la progresión tumoral mediante la activación constitutiva de vías de señalización mitogénicas o antiapoptóticas (5). En contraste, los genes supresores de tumores actúan como barreras fisiológicas contra la transformación maligna, regulando procesos como el control del ciclo celular, la reparación del ADN, la senescencia y la apoptosis (6).

La inactivación funcional de genes supresores de tumores, ya sea por mutaciones, deleciones, silenciamiento epigenético o interferencia con su actividad, constituye un evento central en la tumorigénesis. Entre estos genes, TP53 ocupa un lugar destacado debido a su rol como integrador de múltiples señales de estrés celular y su capacidad para coordinar respuestas que incluyen arresto del ciclo celular, reparación del ADN y muerte celular programada (7). En consecuencia, la alteración directa o indirecta de la función de p53 representa uno de los mecanismos más frecuentes mediante los cuales las células tumorales adquieren resistencia al daño genotóxico y a tratamientos antineoplásicos (8).

El concepto moderno de cáncer enfatiza que la transformación maligna no resulta de un único evento genético, sino de la acumulación progresiva de alteraciones que reconfiguran redes de señalización, regulación transcripcional y control postraduccional. Esta visión integradora sienta las bases para el estudio de mecanismos moleculares complejos que contribuyen a la plasticidad tumoral y al mal pronóstico clínico, y justifica la necesidad de abordajes experimentales que

permitan analizar de manera global e integrada los distintos niveles de regulación celular implicados en el proceso tumoral.

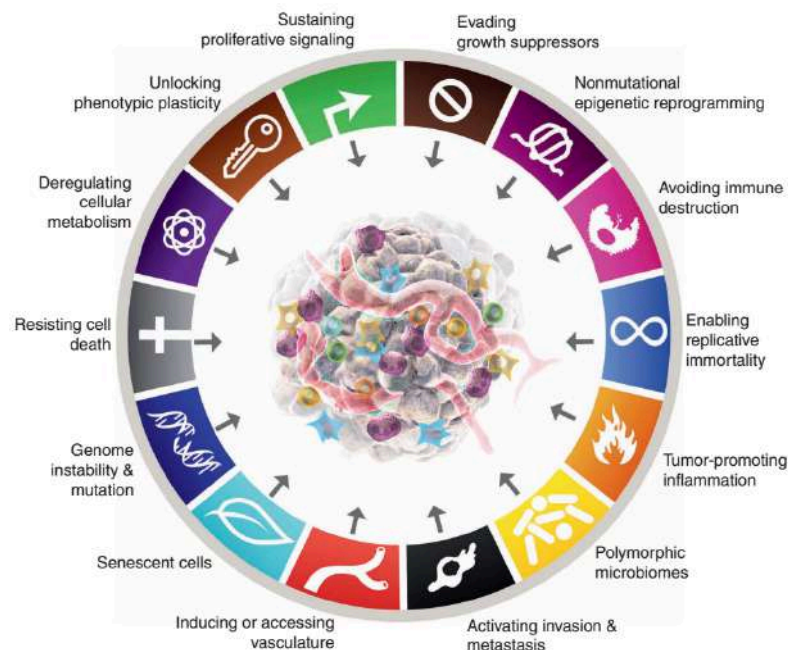


Figura 1. Esquema del modelo de Hallmarks of Cancer ampliado propuesto originalmente por Hanahan y Weinberg . Se muestran las características canónicas y las posibles nuevas incorporaciones a los “Hallmarks of Cancer” Tomado de Hanahan D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer discovery.

1.2 Oncogenes y genes oncosupresores

El desarrollo del cáncer se encuentra estrechamente ligado a alteraciones en genes que regulan procesos esenciales como la proliferación celular, la supervivencia y el mantenimiento de la estabilidad genómica. Estas alteraciones afectan principalmente a dos grandes categorías funcionales: los oncogenes y los genes supresores de tumores. Los oncogenes surgen a partir de la activación aberrante de proto-oncogenes normales mediante mutaciones puntuales, amplificaciones génicas o reordenamientos cromosómicos, lo que conduce a la activación constitutiva de vías de señalización que promueven crecimiento y supervivencia celular incluso en ausencia de estímulos fisiológicos (5).

En contraste, los genes supresores de tumores actúan como reguladores negativos del crecimiento celular y constituyen barreras fundamentales frente a la transformación maligna. Estos genes participan en el control del ciclo celular, la reparación del ADN, la apoptosis y la senescencia, y su pérdida de función puede producirse mediante mutaciones inactivantes, deleciones, silenciamiento epigenético o interferencia funcional por proteínas oncogénicas (6). A diferencia de los oncogenes, cuya activación suele requerir una única alteración genética dominante, la inactivación de genes supresores generalmente sigue el modelo de “doble golpe”, en el cual ambas copias del gen deben verse afectadas para comprometer su función (9).

Entre los genes supresores más relevantes se encuentra TP53, cuyo producto proteico p53 integra señales provenientes de múltiples vías de estrés celular y coordina respuestas destinadas a preservar la integridad genómica. La pérdida directa o indirecta de la función de p53 representa uno de los eventos más frecuentes en cáncer humano y constituye un mecanismo clave mediante el cual las células tumorales adquieren resistencia al daño genotóxico y a la muerte celular programada .

En este sentido, la interacción entre oncogenes activados y genes supresores inactivados configura el paisaje molecular que permite la adquisición progresiva de los hallmarks del cáncer.

2. Redes o vías de señalización celular en cáncer.

El comportamiento de las células tumorales no depende exclusivamente de alteraciones genéticas aisladas, sino de la reorganización funcional de redes de señalización que integran estímulos provenientes del microambiente, del estado metabólico y del daño genómico. Estas redes coordinan procesos fundamentales como la proliferación, la supervivencia, la migración celular y la adaptación al estrés, permitiendo que las células transformadas respondan dinámicamente a cambios en su entorno y adquieran ventajas selectivas durante la progresión tumoral (10). En este contexto, el cáncer puede entenderse como una enfermedad de la señalización celular, en la cual múltiples vías oncogénicas y mecanismos reguladores convergen

para modular programas transcripcionales y proteicos que sostienen el fenotipo maligno(11).

Las vías de señalización en cáncer operan como sistemas interconectados más que como cascadas lineales, estableciendo nodos regulatorios capaces de integrar señales proliferativas, mecánicas y metabólicas. Entre estos nodos se incluyen quinasas citoplasmáticas, factores de transcripción y complejos multiproteicos cuya actividad se encuentra finamente regulada por modificaciones postraduccionales y por interacciones dinámicas proteína–proteína (11) . La activación aberrante de estas redes puede promover la adquisición de rasgos asociados a los hallmarks del cáncer, tales como la evasión de la muerte celular, la reprogramación metabólica y la capacidad invasiva, reforzando la plasticidad tumoral frente a condiciones adversas (12).

Dentro de este panorama, distintas vías oncogénicas desempeñan roles complementarios en la regulación del destino celular. Algunas participan principalmente en la respuesta al daño del ADN y en la vigilancia genómica, mientras que otras modulan señales de crecimiento, adhesión celular o angiogénesis, contribuyendo a la adaptación tumoral y a la resistencia terapéutica. Aunque estas rutas suelen describirse de manera independiente, en la práctica forman redes altamente interconectadas que permiten una regulación coordinada de la expresión génica, la organización del citoesqueleto y la estabilidad proteica.

Un aspecto emergente en la comprensión de estas redes es el reconocimiento de que la regulación de la señalización no ocurre únicamente a nivel transcripcional, sino también mediante mecanismos postraduccionales que controlan la localización, la interacción y la degradación de proteínas clave. Estas capas adicionales de regulación confieren flexibilidad funcional a las células tumorales y permiten ajustes rápidos frente a estímulos ambientales o terapéuticos, destacando la importancia de estudiar las vías oncogénicas dentro de un marco integrador que contemple tanto la señalización clásica como los mecanismos dinámicos de control proteico (13).

En las subsecciones siguientes se describen las principales vías de señalización relevantes para este trabajo, incluyendo la respuesta al daño del ADN y el eje p53, así como cascadas oncogénicas asociadas a proliferación, adhesión celular,

angiogénesis y supervivencia tumoral, con el objetivo de establecer el marco conceptual necesario para comprender los mecanismos moleculares que se analizan en secciones posteriores.

2.1 Respuesta al daño del ADN (DDR) como barrera tumoral

La integridad del genoma es esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular y la prevención de la transformación maligna. Para enfrentar agresiones endógenas y exógenas que generan lesiones en el ADN, las células han desarrollado un sistema altamente conservado denominado respuesta al daño del ADN (*DNA Damage Response*, DDR), una red de señalización que detecta alteraciones estructurales en el genoma y coordina decisiones celulares destinadas a preservar la estabilidad genómica (14). Este sistema funciona como una verdadera barrera tumoral, ya que limita la proliferación de células que acumulan daño genético y evita la propagación de mutaciones potencialmente oncogénicas (15).

La DDR se organiza en módulos funcionales compuestos por sensores, transductores y efectores (**Figura 2**). Los sensores reconocen estructuras aberrantes del ADN, como roturas de doble hebra o regiones de ADN monocatenario, y desencadenan cascadas de señalización que activan quinasas centrales pertenecientes a la familia PIKK, entre las que destacan ATM (ataxia telangiectasia mutated) y ATR (ATM and Rad3-related) (16). Estas quinasas coordinan la activación de checkpoints del ciclo celular mediante la fosforilación de múltiples sustratos, incluyendo CHK1 y CHK2, promoviendo el arresto transitorio del ciclo celular y permitiendo la reparación del daño antes de la replicación o división celular (17).

La activación de ATM se asocia principalmente con roturas de doble hebra, mientras que ATR responde preferentemente a estrés replicativo y regiones de ADN monocatenario, lo que permite una respuesta diferencial frente a distintos tipos de agresiones genotóxicas. Entre los eventos tempranos de la DDR se encuentra la fosforilación de la histona H2AX, que actúa como plataforma de reclutamiento para

complejos de reparación y amplificación de la señal de daño, facilitando la toma de decisiones celulares entre supervivencia, reparación o muerte celular programada (18).

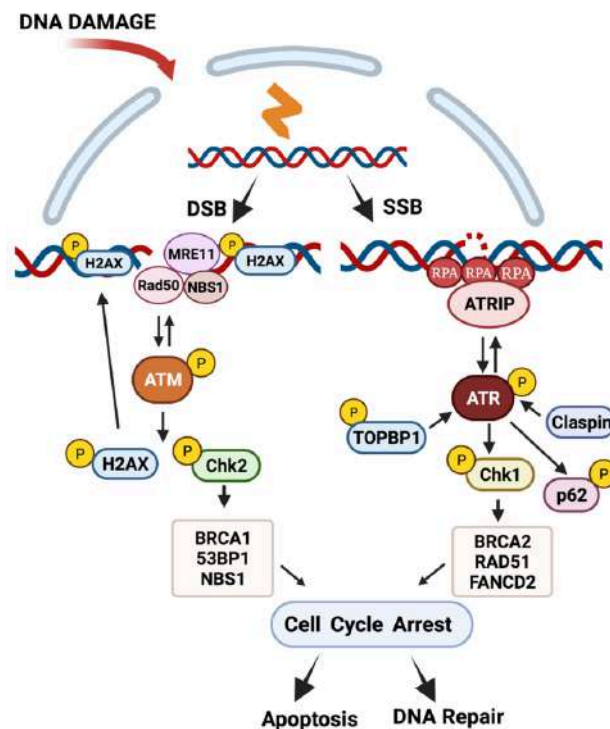


Figura 2. Vías de reparación del daño en el ADN. Las vías de reparación del daño en el ADN mediadas por ATM y ATR se activan en respuesta a rupturas de ADN bicatenario (dsDNA) o a ADN monocatenario (ssDNA)/horquillas de replicación detenidas, respectivamente. La ATM activada fosforila efectores como CHK2, lo que conduce al reclutamiento y la fosforilación de una serie de factores de reparación del ADN y a la detención del ciclo celular en puntos de control. De manera similar, la ATR activada fosforila la proteína efectora CHK1, promoviendo la activación de factores adicionales aguas abajo. Ambas vías median la reparación del ADN mediante recombinación homóloga o, alternativamente, eliminan la célula dañada a través de apoptosis o senescencia. (Creado con BioRender.com, 24 de junio de 2021). Imagen tomada de Gushe el al 2021(24)

Desde una perspectiva funcional, la DDR no sólo participa en la reparación del ADN, sino que también integra señales oncogénicas y metabólicas que determinan el destino celular. En respuesta a daño persistente o irreparable, la activación sostenida de la DDR puede inducir senescencia o apoptosis, actuando como un mecanismo supresor de tumores frente a la acumulación de inestabilidad genómica

(19). En este sentido, la pérdida o alteración de componentes clave de la DDR favorece la progresión tumoral y genera dependencia de rutas compensatorias, lo que ha motivado el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a estas vías en distintos tipos de cáncer. Un nodo central dentro de esta red es la proteína p53, cuya activación downstream de ATM/ATR permite traducir señales de daño en respuestas transcripcionales que regulan arresto del ciclo celular, reparación del ADN y apoptosis. La coordinación entre DDR y p53 constituye un eje fundamental para la vigilancia genómica, ya que p53 actúa como un integrador de múltiples señales de estrés que determinan el destino celular frente a insultos genotóxicos. En consecuencia, la DDR no sólo representa un sistema de reparación, sino también un mecanismo dinámico de señalización que modula la plasticidad celular y condiciona la respuesta a terapias antitumorales basadas en daño del ADN.

2.2 p53 como integrador central de la respuesta al estrés

La proteína p53 constituye uno de los nodos regulatorios más relevantes dentro de las redes de señalización celular asociadas a la vigilancia genómica y la supresión tumoral. Codificada por el gen *TP53*, p53 actúa principalmente como un factor de transcripción capaz de responder a múltiples tipos de estrés celular, incluyendo daño en el ADN, estrés replicativo, hipoxia, señales oncogénicas y alteraciones metabólicas, coordinando programas génicos que determinan el destino celular. Debido a esta capacidad integradora, p53 ha sido denominada el “guardián del genoma”, ya que su activación permite limitar la propagación de células con daño genético potencialmente oncogénico (20) .

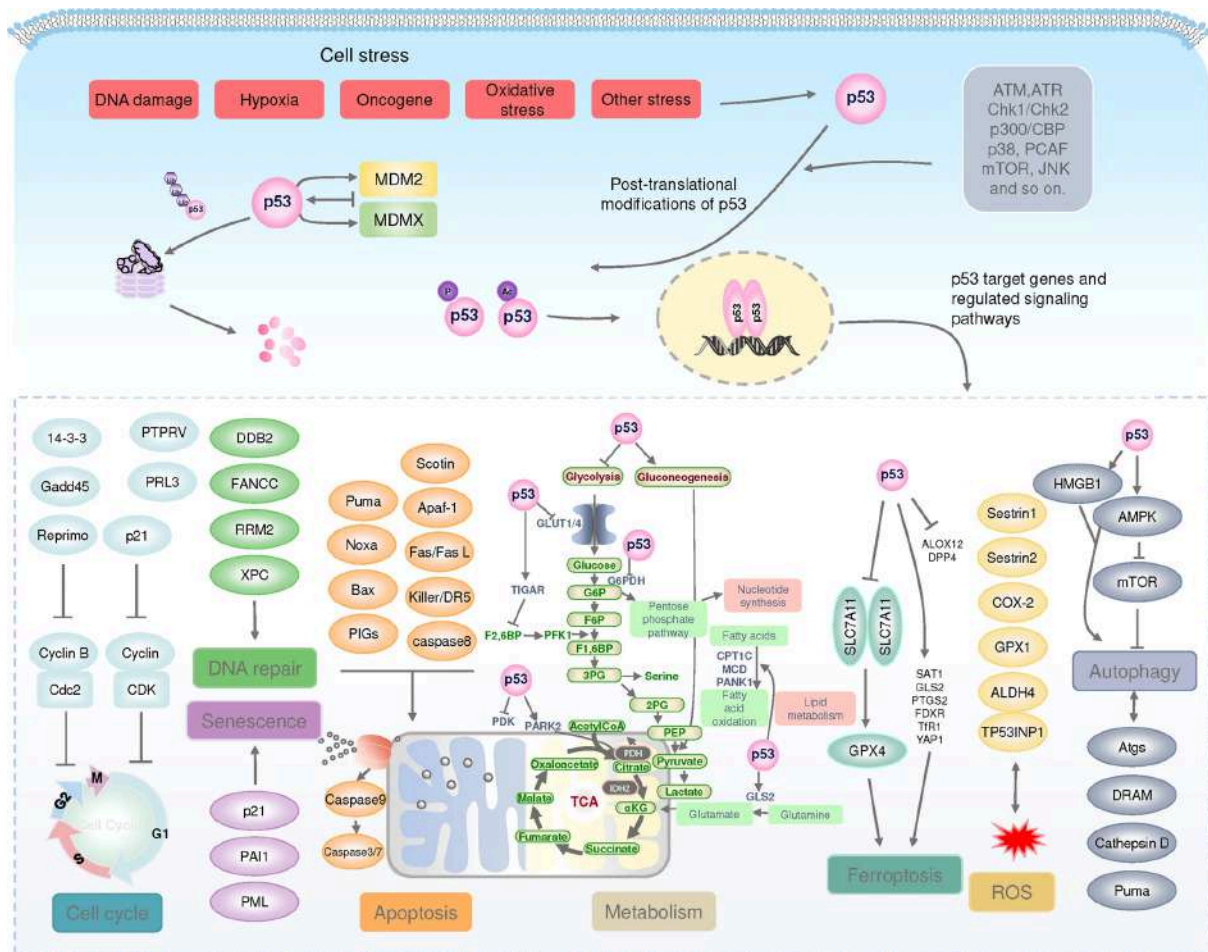
En condiciones basales, los niveles de p53 se mantienen bajos mediante mecanismos de regulación postraduccionales, particularmente a través de ubiquitinación mediada por ligasas E3 como MDM2, que promueven su degradación proteasomal. Frente a señales de estrés, la activación de quinasas downstream de la DDR, como ATM y ATR, induce la fosforilación de p53 y de sus reguladores, lo que estabiliza la proteína y favorece su acumulación nuclear, permitiendo la activación de programas transcripcionales específicos. Este control dinámico demuestra que la función de p53 no depende únicamente de su presencia o ausencia, sino de la integración de múltiples modificaciones postraduccionales que

regulan su actividad transcripcional, su localización subcelular y su interacción con complejos reguladores.

La salida funcional de p53 puede variar según la intensidad y el contexto del estímulo. En situaciones de daño moderado, p53 induce la expresión de genes involucrados en arresto del ciclo celular y reparación del ADN, como *CDKN1A/p21*, favoreciendo la recuperación celular. En contraste, frente a daño severo o persistente, p53 promueve la activación de programas proapoptóticos y de senescencia, contribuyendo a la eliminación de células potencialmente tumorales (21). Esta capacidad de modular diferentes programas transcripcionales posiciona a p53 como un integrador central de señales provenientes de múltiples vías oncogénicas y mecanismos de estrés celular (Figura 3).

La relevancia de p53 en cáncer se refleja en que alteraciones directas o indirectas de su función están presentes en una gran proporción de tumores humanos. Además de mutaciones en *TP53*, la inhibición funcional de p53 puede producirse mediante la acción de proteínas oncogénicas que interfieren con su actividad transcripcional o con su regulación postraducciona, alterando el equilibrio entre supervivencia y muerte celular. Estas estrategias permiten que las células tumorales mantengan proliferación activa incluso en presencia de daño genotóxico, favoreciendo la resistencia terapéutica y la progresión tumoral. p53 actúa como un nodo de convergencia entre la respuesta al daño del ADN y diversas vías de señalización oncogénica, integrando información proveniente del estado genómico, del microambiente y de la señalización intracelular. Esta función central explica por qué la modulación directa o indirecta de p53 representa un mecanismo recurrente en cáncer y establece el marco conceptual para comprender cómo proteínas reguladoras pueden influir sobre la respuesta transcripcional y la estabilidad proteica en contextos tumorales.

Figura 3. La vía de p53. En condiciones normales, los niveles de la proteína p53 están estrictamente regulados por MDM2/X, que en conjunto ubiquitinan a p53, promoviendo su degradación por el proteasoma. Bajo condiciones de estrés, p53 se activa y se estabiliza mediante modificaciones postraduccionales. La p53 estabilizada forma tetrámeros en el núcleo, se une al ADN blanco, regula la transcripción génica y controla numerosos procesos biológicos. Tomado de Wang, H et al 2023 (22).



2.3 Vías oncogénicas asociadas a plasticidad tumoral y señalización pro-supervivencia

Además de la vigilancia genómica mediada por la DDR y el eje p53, la progresión tumoral depende de la activación de vías oncogénicas que promueven supervivencia celular, adaptación metabólica y remodelación del microambiente. Estas rutas actúan como redes interconectadas capaces de integrar señales provenientes de factores de crecimiento, interacciones célula-matriz y estímulos mecánicos, favoreciendo la plasticidad tumoral y la resistencia terapéutica.

Entre las vías más relevantes se encuentran MAPK, PI3K–AKT–mTOR, las señales de adhesión mediadas por FAK1 y la señalización angiogénica dependiente de VEGF, todas ellas implicadas en la regulación coordinada de proliferación,

migración celular y reorganización del citoesqueleto. La actividad de estas rutas se encuentra modulada además por mecanismos postraduccionales que controlan la estabilidad y función de proteínas clave de señalización, destacando la importancia de analizarlas dentro de un marco integrador de control dinámico proteico (10).

En las subsecciones siguientes se describen estas vías de manera individual con el objetivo de establecer el contexto molecular necesario para comprender los mecanismos de señalización asociados a plasticidad tumoral y programas pro-supervivencia.

2.3.1 Vía MAPK

La vía MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) constituye una de las cascadas de señalización oncogénica mejor caracterizadas y más frecuentemente alteradas en cáncer. Este eje transmite señales proliferativas y adaptativas desde receptores de membrana hacia el núcleo celular mediante una organización jerárquica clásica compuesta por RAS, RAF, MEK y ERK, permitiendo la integración de estímulos extracelulares con respuestas transcripcionales y postraduccionales que regulan el destino celular (23).

La activación de esta vía suele iniciarse downstream de receptores tirosina-quinasa (RTKs) o de señales dependientes de adhesión celular, que inducen el intercambio de GDP por GTP en proteínas RAS. Una vez activada, RAS recluta y activa quinasas RAF en la membrana plasmática, las cuales fosforilan a MEK1/2, promoviendo posteriormente la activación de ERK1/2. Este módulo secuencial RAS–RAF–MEK–ERK funciona como un amplificador de señales mitogénicas, regulando procesos fundamentales como proliferación celular, diferenciación, supervivencia y adaptación al estrés (24).

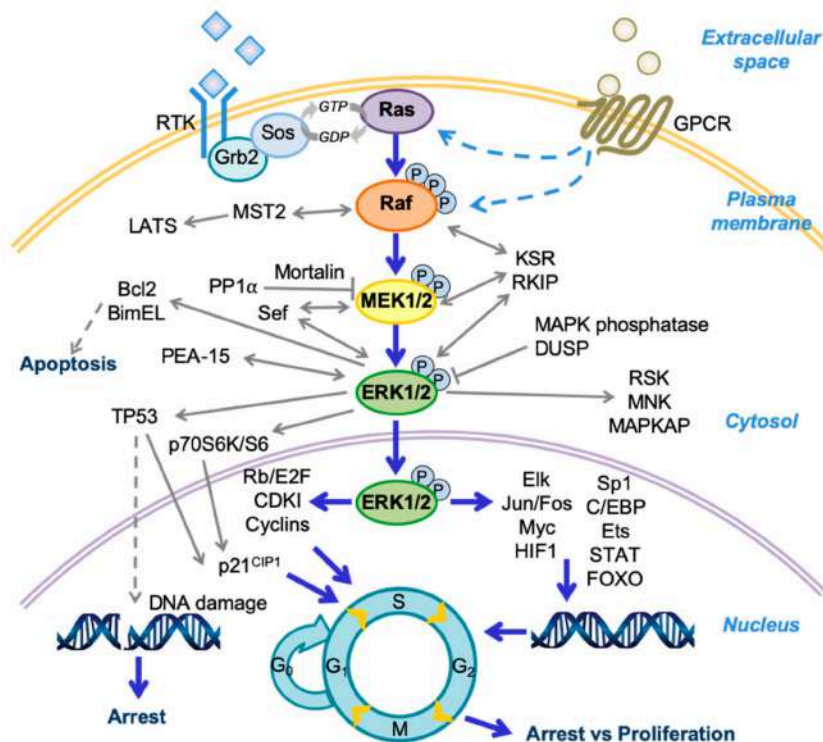


Figura 4. Esquema de la vía Raf/MEK/quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y sus reguladores y efectores. Proteína 2 asociada al receptor de factores de crecimiento (Grb2); *son of sevenless* (Sos); supresores tumorales grandes (LATS); fosfatasa de doble especificidad (DUSP); quinasa ribosomal S6 (RSK); proteína quinasa activada por MAPK (MAPKAP); inhibidor de quinasas dependientes de ciclina (CDKI); factor inducible por hipoxia 1 (HIF1); proteína de unión al potenciador CCAAT (C/EBP); transductor de señal y activador de la transcripción (STAT); proteína forkhead box O (FOXO); fosforilación proteica (P). Imagen tomada de Pui-Kei Wu1 2020,(25).

En condiciones fisiológicas, la activación de ERK es transitoria y depende estrictamente de estímulos extracelulares (Figura 4). Sin embargo, en contextos tumorales, mutaciones activadoras en RAS o RAF, así como la estimulación persistente de receptores de factores de crecimiento, generan una señalización ERK sostenida que promueve plasticidad tumoral y resistencia terapéutica. Esta activación aberrante favorece la expresión de genes asociados al ciclo celular, remodelación del citoesqueleto y adaptación metabólica, contribuyendo a la progresión tumoral. Una característica central de la vía MAPK es su capacidad de

modular tanto eventos citoplasmáticos como nucleares. ERK activado puede translocarse al núcleo y fosforilar factores de transcripción como ELK1, c-FOS y MYC, regulando programas génicos asociados a proliferación y supervivencia. Además, ERK controla múltiples procesos postraduccionales mediante la fosforilación de proteínas reguladoras del ciclo celular y componentes del citoesqueleto, integrando señales proliferativas con cambios estructurales y funcionales que favorecen la migración celular y la adaptación al microambiente tumoral (26). Más allá de su rol en proliferación, la vía RAS–RAF–MEK–ERK también participa en la regulación de la estabilidad proteica y en la reorganización dinámica de redes de señalización, actuando como un modulador clave de la plasticidad tumoral. La fosforilación mediada por ERK puede alterar la localización subcelular, la interacción proteína–proteína y la degradación de múltiples sustratos, destacando la importancia de esta vía como puente entre señalización oncogénica clásica y mecanismos de control postraduccionales (27).

2.3.2 FAK1 y señales de adhesión celular

La quinasa focal de adhesión 1 (FAK1, codificada por *PTK2*) es una tirosina-quinasa citoplasmática no receptora localizada principalmente en las adhesiones focales, estructuras dinámicas que conectan la matriz extracelular con el citoesqueleto de actina y permiten la transmisión bidireccional de señales mecánicas y bioquímicas entre la célula y su microambiente. A través de su doble función como enzima catalítica y proteína adaptadora, FAK1 actúa como un nodo central en la integración de señales provenientes de integrinas, receptores tirosina-quinasa y factores de crecimiento, coordinando procesos esenciales como migración celular, supervivencia, proliferación y reorganización del citoesqueleto (28).

La activación de FAK1 ocurre principalmente en respuesta a señales provenientes de integrinas y receptores tirosina-quinasa, así como frente a cambios en el microambiente celular o estrés genotóxico. Un evento inicial clave es la autofosforilación en el residuo Tyr397, que genera un sitio de alta afinidad para proteínas con dominios SH2, particularmente miembros de la familia SRC. La

formación del complejo FAK–SRC potencia la actividad catalítica de FAK mediante fosforilaciones adicionales en residuos tirosina dentro de su dominio quinasa, promoviendo la amplificación de señales downstream hacia rutas como MAPK y PI3K–AKT. En este contexto, la fosforilación de FAK (frecuentemente evaluada experimentalmente como pFAK) representa un marcador funcional de activación de la vía, ya que refleja la transición de FAK desde un estado basal hacia un complejo de señalización activo capaz de coordinar procesos de adhesión dinámica, reorganización del citoesqueleto y supervivencia celular (29).

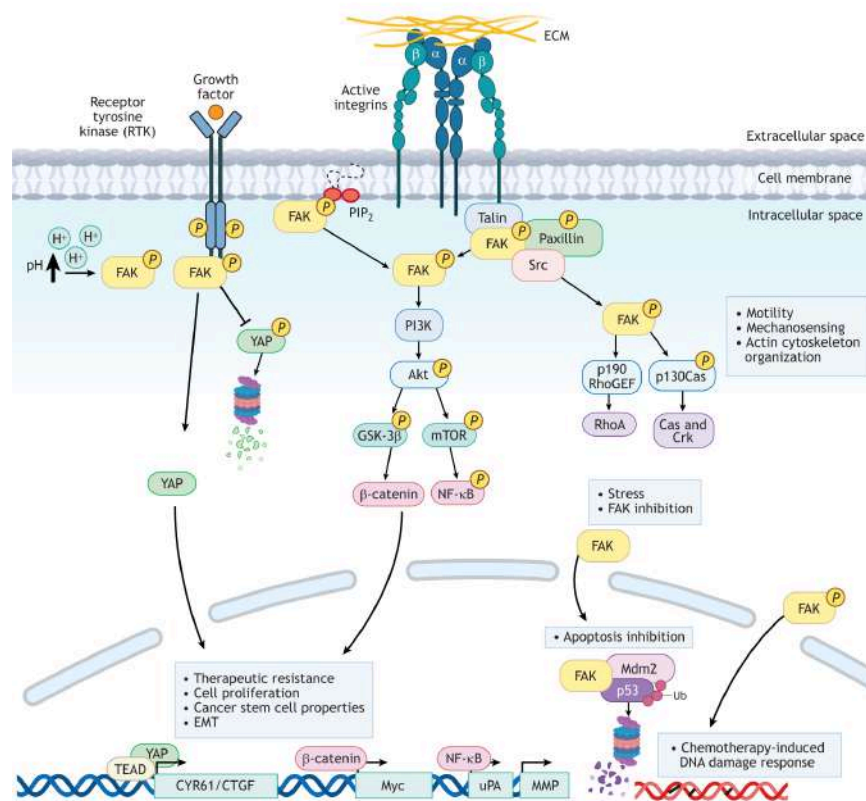


Figura 5. Señalización y funciones celulares de FAK. FAK puede activarse por múltiples estímulos, incluyendo la interacción de integrinas con la matriz extracelular (ECM), receptores tirosina-quinasa (RTK), cambios en el pH intracelular y estrés celular. La activación mediada por integrinas induce la autofosforilación de FAK en Y397, generando un sitio de unión para quinasas de la familia Src que amplifican la señalización. La fosforilación de Y925 promueve el reclutamiento de GRB2 y la activación de la vía RAS–ERK, mientras que ERK2 regula adicionalmente la interacción FAK–paxilina mediante fosforilación en S910. Además de su función catalítica, FAK actúa como proteína andamiaje organizando complejos proteicos citoplasmáticos y nucleares. A través de estas funciones, FAK regula procesos como organización del citoesqueleto, migración, proliferación, supervivencia celular y resistencia terapéutica, contribuyendo a la progresión tumoral. Asimismo, FAK puede modular la transcripción de p53, favoreciendo la supervivencia celular. Creado con

Además de su función catalítica, FAK1 puede actuar como proteína andamiaje, facilitando la formación de complejos multiproteicos tanto en el citoplasma como en el núcleo. Esta dualidad funcional permite que FAK integre señales mecánicas y bioquímicas derivadas de la interacción célula-matriz, regulando la motilidad celular, la mecanosensibilidad y la adaptación a estímulos externos. La activación sostenida de FAK, evidenciada por niveles elevados de pFAK, se ha asociado con incremento de migración e invasión tumoral, así como con la inducción de programas pro-supervivencia y resistencia terapéutica (29,32).

En cáncer, la sobreexpresión o hiperactivación de FAK1 se ha asociado con aumento de migración celular, invasión tumoral y formación de metástasis, reflejando su papel clave en la remodelación de adhesiones focales y en la dinámica del citoesqueleto. Además, FAK1 contribuye a la resistencia a la muerte celular al modular señales antiapoptóticas y favorecer la supervivencia en condiciones de estrés, incluyendo hipoxia o daño genotóxico (32,33). Estas funciones posicionan a FAK1 como un integrador funcional entre señalización oncogénica clásica y procesos dependientes del microambiente tumoral, tales como angiogénesis y remodelación de la matriz extracelular.

Un aspecto relevante es que la actividad de FAK1 se encuentra finamente regulada por modificaciones postraduccionales y por interacciones con complejos proteicos que controlan su localización y estabilidad. La fosforilación en múltiples residuos tirosina modula su capacidad de reclutar adaptadores de señalización, mientras que procesos como ubiquitinación o desfosforilación contribuyen a ajustar la intensidad y duración de la señal. Esta regulación dinámica permite que FAK1 actúe como un nodo adaptable dentro de redes de señalización que conectan adhesión celular, migración y supervivencia tumoral (45).

FAK1 constituye un punto de convergencia entre señales mecánicas y bioquímicas que favorecen la plasticidad tumoral, integrando estímulos del microambiente con rutas oncogénicas asociadas a proliferación y resistencia terapéutica. En este

contexto, actúa tanto como quinasa como proteína adaptadora, coordinando procesos clave como la adhesión célula-matriz, la reorganización del citoesqueleto, la migración, la proliferación y la supervivencia celular, así como la dinámica de ensamblaje y desensamblaje de las adhesiones focales. Su capacidad para modular la organización del citoesqueleto y activar señales pro-supervivencia resalta el papel central de las vías dependientes de adhesión en la progresión tumoral y en la regulación dinámica de redes de señalización celular. (28,34) (Figura 5).

2.3.3 VEGF y angiogénesis

La angiogénesis constituye un proceso esencial para la progresión tumoral, ya que permite el suministro sostenido de oxígeno y nutrientes a masas celulares en expansión, facilitando además la eliminación de productos metabólicos y la diseminación metastásica. Entre los múltiples reguladores de este proceso, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) emerge como el principal mediador proangiogénico, actuando directamente sobre células endoteliales para inducir proliferación, migración, permeabilidad vascular y formación de nuevos vasos sanguíneos (35). La familia VEGF incluye varios ligandos, como VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D, que interactúan con receptores tirosina-quinasa específicos, siendo VEGFR-2 el principal efector de la señalización angiogénica en cáncer (36).

La activación de la vía VEGF se inicia con la unión del ligando a VEGFR-2, lo que promueve la dimerización del receptor y su autofosforilación en residuos tirosina intracelulares. Este evento desencadena cascadas downstream que incluyen las rutas MAPK, PI3K–AKT y PLCγ, responsables de coordinar respuestas celulares asociadas a proliferación endotelial, supervivencia y reorganización del citoesqueleto (Figura 6). Desde una perspectiva molecular, esta señalización representa un nodo central de integración entre estímulos ambientales como hipoxia y programas transcripcionales adaptativos, dado que factores como HIF-1α inducen la expresión de VEGF en células tumorales sometidas a estrés metabólico (50). En el contexto tumoral, la sobreexpresión de VEGF no sólo promueve la neovascularización, sino que también contribuye a la remodelación del microambiente, modulando la interacción entre células tumorales, estroma y sistema

inmune. Se ha demostrado que VEGF influye en procesos como la transición epitelio-mesénquima, la regulación metabólica y la evasión inmune, reforzando su papel como regulador multifuncional más allá de la angiogénesis clásica (51). Además, la señalización VEGF puede actuar en circuitos autocrinos y paracrinos que amplifican la plasticidad tumoral, favoreciendo fenotipos invasivos y resistencia terapéutica(35,37).

Desde el punto de vista clínico, el eje VEGF/VEGFR constituye una de las vías más ampliamente explotadas en terapias antitumorales dirigidas, reflejando su relevancia funcional en el mantenimiento del fenotipo maligno. La inhibición farmacológica de esta vía reduce la formación de nuevos vasos y limita el crecimiento tumoral en diversos modelos, subrayando la dependencia de muchos tumores sólidos de la angiogénesis mediada por VEGF (38). Sin embargo, la complejidad de la señalización angiogénica y su interacción con otras rutas oncogénicas como MAPK, PI3K-AKT y señales de adhesión resalta la necesidad de abordajes integrativos que permitan comprender cómo estas redes convergen para sostener la progresión tumoral.

En conjunto, la vía VEGF representa un eje central dentro de las redes oncogénicas asociadas a plasticidad tumoral, integrando señales derivadas de hipoxia, metabolismo y remodelación del microambiente para promover angiogénesis, supervivencia celular e invasión tumoral.(Figura 7)

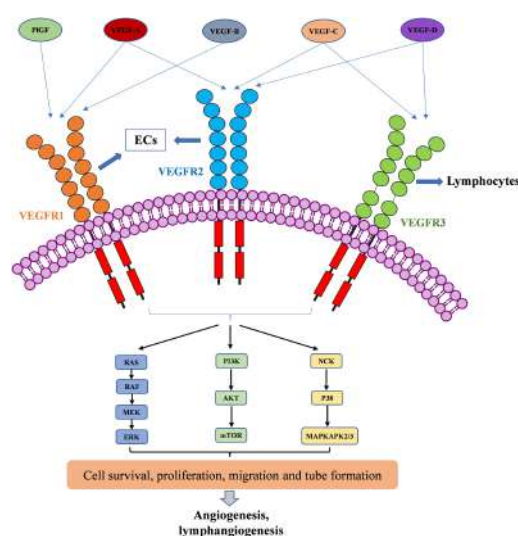


Figura 6. Esquema de la activación de la vía de VEGF. Activación de VEGFR por la familia de factores de crecimiento VEGF y las vías de señalización downstream resultantes que conducen a la angiogénesis y linfangiogénesis. Esquema tomado de Wang X et al 2020 (54).

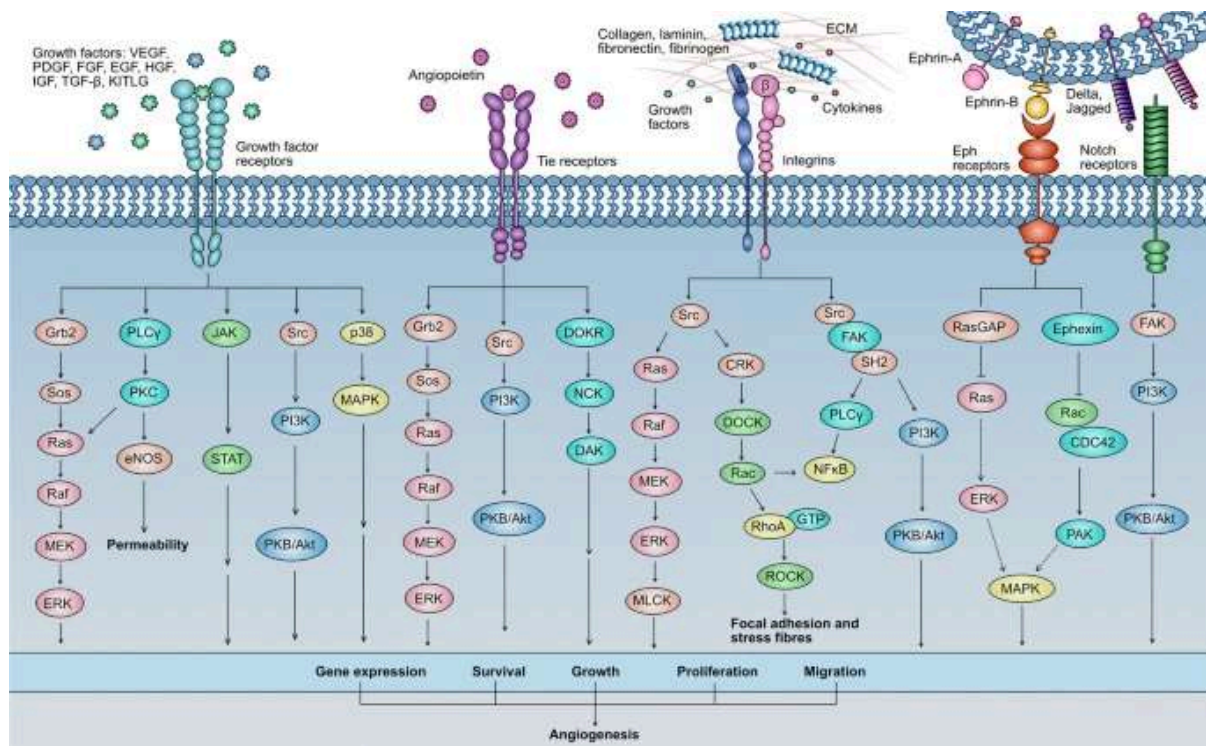


Figura 7. Diagrama esquemático que muestra el *crosstalk* entre múltiples vías de señalización durante la angiogénesis tumoral. Las flechas con punta indican activación, mientras que las flechas planas indican inhibición. Tomado de Liu, ZL et al 2023.

2.3.4 Eje PI3K-AKT-mTOR y señalización pro-supervivencia tumoral

El eje PI3K–AKT–mTOR constituye una de las principales rutas de señalización asociadas a supervivencia celular, crecimiento tumoral y adaptación metabólica. Esta vía se activa downstream de receptores tirosina-quinasa, integrinas y señales oncogénicas mediadas por RAS, promoviendo la producción de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) a través de la actividad de

fosfoinosítido-3-quinasa (PI3K). La acumulación de PIP3 en la membrana plasmática facilita el reclutamiento y activación de AKT, una serina/treonina quinasa central que regula múltiples procesos celulares asociados a proliferación y supervivencia (55). La activación completa de AKT requiere fosforilaciones en residuos clave, incluyendo Thr308 y Ser473, esta última mediada principalmente por el complejo mTORC2. A diferencia de mTORC1, que regula principalmente la síntesis proteica y el metabolismo celular, mTORC2 participa en la organización del citoesqueleto, la señalización dependiente de adhesión y la adaptación a estímulos externos, integrando señales provenientes del microambiente tumoral con programas pro-supervivencia (39,40). Este control jerárquico posiciona a mTORC2 como un regulador esencial de la plasticidad celular y de la respuesta adaptativa frente a estrés metabólico o terapéutico.

En contextos tumorales, la activación aberrante del eje PI3K–AKT–mTOR puede originarse por mutaciones en PI3K, pérdida de PTEN o estimulación persistente de receptores de factores de crecimiento, favoreciendo la resistencia a la apoptosis y la reprogramación metabólica. La señalización AKT modula además la actividad de factores de transcripción y proteínas reguladoras del ciclo celular, promoviendo la supervivencia incluso en condiciones adversas como hipoxia o daño genotóxico. Un aspecto relevante es la interconexión funcional entre la vía PI3K–AKT–mTOR y otras rutas oncogénicas descritas previamente, incluyendo MAPK y señalización mediada por FAK1. Esta convergencia permite coordinar la regulación del citoesqueleto, la migración celular y la adaptación metabólica dentro de redes dinámicas que favorecen la plasticidad tumoral. Asimismo, la actividad de esta vía se encuentra sujeta a regulación postraducciona mediante fosforilación y ubiquitinación de múltiples componentes, lo que contribuye a ajustar la intensidad y duración de la señal en función del contexto celular. En conjunto, el eje PI3K–AKT–mTOR representa un nodo central de integración entre señales proliferativas, metabólicas y mecánicas, desempeñando un papel clave en la promoción de fenotipos pro-supervivencia y en la adaptación tumoral frente a presiones ambientales o terapéuticas(39–43).

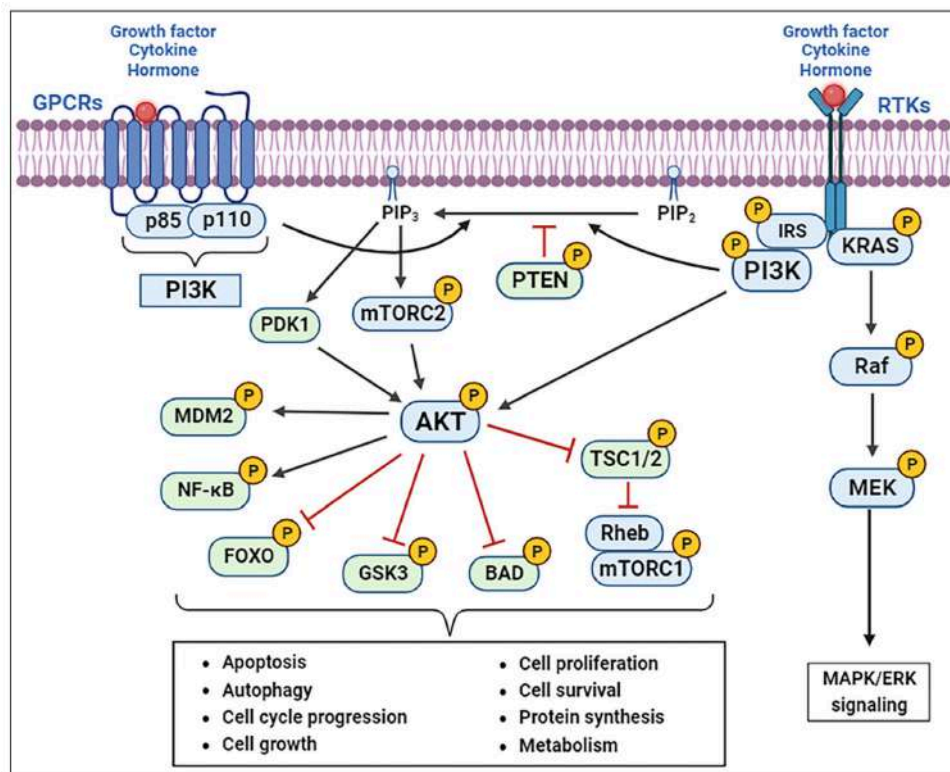


Figura 8. Esquema de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR. Akt, proteína quinasa B; BAD, agonista de muerte celular asociado a Bcl2; CRC, cáncer colorrectal; ERK, quinasa regulada por señales extracelulares; FOXO, forkhead box O; GSK3, glucógeno sintasa quinasa-3; KRAS, virus del sarcoma de rata Kirsten; MAPK, proteína quinasa activada por mitógenos; MEK, quinasa de MAPK; MDM2, homólogo murino double minute 2; mTOR, diana de rapamicina en mamíferos; mTORC1, complejo 1 de mTOR; mTORC2, complejo 2 de mTOR; NF-κB, factor nuclear kappa B; PDK1, quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa; PTEN, homólogo de fosfatasa y tensina; RAF, fibrosarcoma rápidamente acelerado; TSC1/2, proteínas de esclerosis tuberosa 1/2. Tomado de Premila D. Leiphrakpam et al 2024 (42).

2.4 Regulación postraducciona l y control dinámico de proteínas en redes de señalización

La señalización celular en cáncer no depende exclusivamente de cambios genéticos o transcripcionales, sino también de mecanismos dinámicos que regulan la actividad, estabilidad y localización de las proteínas en escalas temporales rápidas. Entre estos mecanismos, las modificaciones postraduccionales (PTMs) emergen como reguladores centrales capaces de modular la intensidad y duración de las señales oncogénicas, integrando estímulos provenientes del microambiente tumoral con respuestas adaptativas a nivel molecular (44). Diversas evidencias indican que alteraciones en PTMs contribuyen directamente a la adquisición de los hallmarks del cáncer, ya que influyen sobre procesos como proliferación, respuesta al daño del ADN, remodelación del citoesqueleto, angiogénesis y adaptación metabólica.

Las PTMs incluyen modificaciones químicas o proteicas que se incorporan de manera reversible sobre residuos específicos de aminoácidos, tales como fosforilación, acetilación, metilación y ubiquitinación. Estas modificaciones no sólo alteran la actividad catalítica de las proteínas, sino que también regulan su estabilidad, interacción con otros componentes celulares y distribución subcelular, incrementando la complejidad funcional del proteoma más allá de la información codificada a nivel génico (45,46). En redes de señalización oncogénica, como MAPK, PI3K–AKT–mTOR o rutas dependientes de adhesión mediadas por FAK, las PTMs funcionan como interruptores moleculares que permiten respuestas rápidas frente a cambios en el entorno celular o a estímulos terapéuticos.

Un aspecto clave de la regulación postraducciona l es su carácter altamente dinámico y contextual. Proteínas centrales en la señalización tumoral pueden experimentar múltiples modificaciones simultáneas que cooperan o compiten entre sí, generando patrones complejos de regulación conocidos como “crosstalk” entre PTMs. Este nivel de control permite ajustar finamente la intensidad de las señales y contribuye a la plasticidad celular característica de los sistemas tumorales, favoreciendo la adaptación frente a estrés genotóxico, hipoxia o cambios metabólicos. Estudios recientes destacan que la integración de análisis proteómicos y enfoques multi-ómicos ha permitido mapear redes completas de PTMs, revelando

su relevancia como determinantes funcionales de la progresión tumoral y como potenciales blancos terapéuticos (44–46).

En conjunto, la regulación postraducciona representa un mecanismo fundamental para el control dinámico de las redes de señalización celular en cáncer, permitiendo coordinar procesos proliferativos, metabólicos y de supervivencia en respuesta a señales internas y externas. Comprender cómo estas modificaciones modulan la función proteica resulta esencial para interpretar la complejidad de las redes oncogénicas y sienta las bases conceptuales para analizar mecanismos específicos de control de estabilidad proteica y proteostasis tumoral que serán abordados en las secciones siguientes.

2.4.1 Ubiquitinación como modulador de estabilidad proteica y señalización

La ubiquitinación constituye una de las modificaciones postraduccionales más relevantes en la regulación dinámica del proteoma celular y desempeña un papel central en el control de la estabilidad proteica y la organización de redes de señalización oncogénica. Este proceso implica la unión covalente de ubiquitina (una pequeña proteína altamente conservada) a residuos lisina de proteínas blanco mediante una cascada enzimática coordinada que involucra enzimas activadoras (E1), conjugadoras (E2) y ligasas E3, las cuales determinan en gran medida la especificidad del reconocimiento de sustratos. A diferencia de una visión clásica centrada exclusivamente en la degradación proteica, actualmente se reconoce que la ubiquitinación cumple funciones regulatorias más amplias, modulando la actividad, localización subcelular y ensamblaje de complejos multiproteicos(47).

El destino funcional de una proteína ubiquitinada depende en gran medida del tipo de cadena de ubiquitina formada. Las cadenas enlazadas a través de lisina-48 (K48) suelen dirigir a las proteínas hacia degradación proteasomal, mientras que otras topologías, como las cadenas K63 o mono-ubiquitinación, participan en procesos no degradativos asociados a señalización intracelular, reparación del ADN y dinámica

del citoesqueleto . Este código estructural permite que la ubiquitinación actúe como un modulador versátil capaz de integrar múltiples señales celulares y ajustar la intensidad de respuestas biológicas en contextos fisiológicos y patológicos (Figura 9).

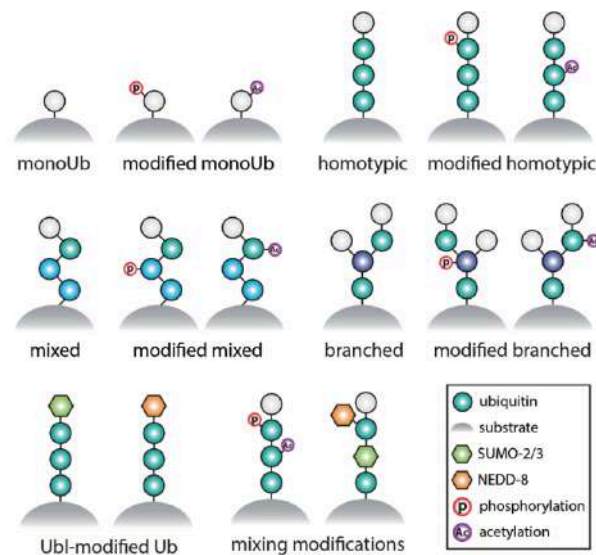


Figura 9. Esquema representativo de la complejidad en el código de la ubiquitina. (A) Representación conceptual de algunas de las posibles modificaciones de la ubiquitina, Ubl (NEDD8, SUMO2/3) y modificaciones químicas de la ubiquitina. (B) La ubiquitina libre y las cadenas de ubiquitina no ancladas, con o sin modificaciones, pueden funcionar como segundos mensajeros en las células. Tomado de Kirby N Swatek y David Komander 2016 (47)

En redes de señalización oncogénica, la ubiquitinación regula la estabilidad y actividad de componentes clave de vías como MAPK, PI3K–AKT–mTOR y rutas dependientes de adhesión celular. Por ejemplo, diversos nodos regulatorios pueden experimentar ubiquitinación degradativa o no degradativa en respuesta a estímulos de estrés o señales proliferativas, permitiendo una reorganización rápida de complejos de señalización y contribuyendo a la plasticidad tumoral (67) (Figura 10).

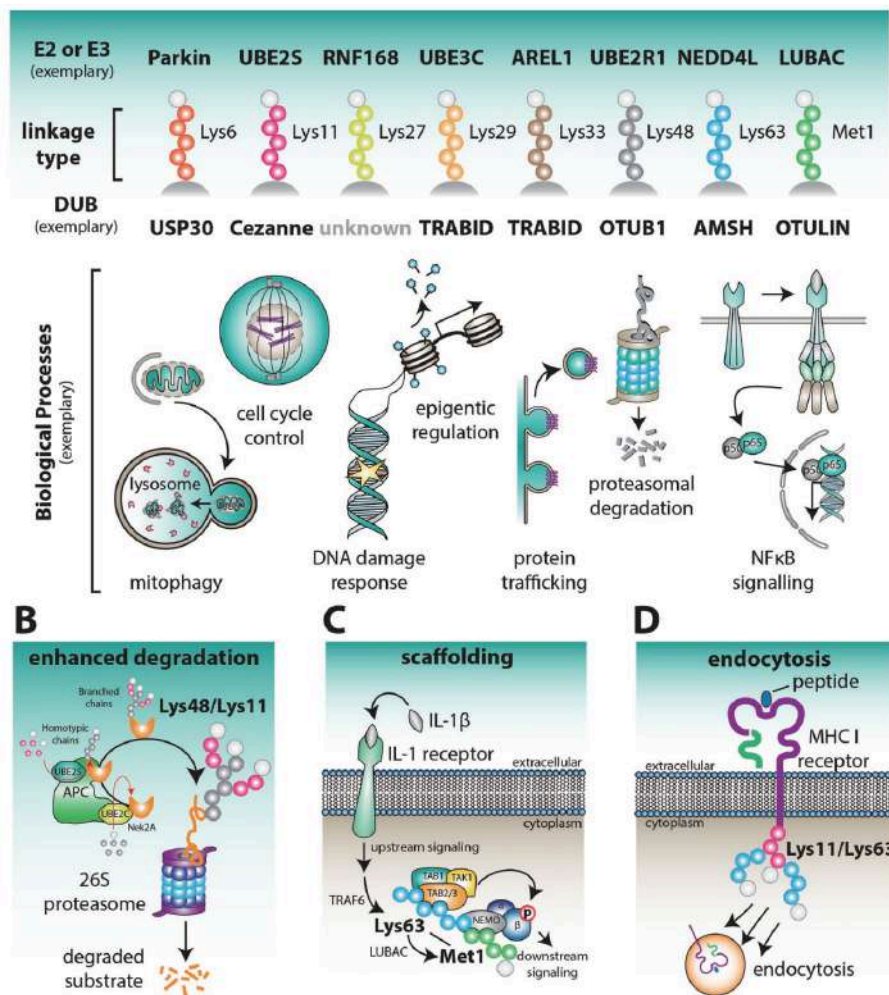


Figura 10. Roles fisiológicos asociados a tipos individuales de cadenas de ubiquitina.(A) Se indica una pequeña selección de enzimas E2 o E3 que ensamblan, y de DUBs que desensamblan, cadenas de ubiquitina con preferencias específicas de enlace. Debajo, esquemas ilustran algunos de los (nuevos) procesos biológicos asociados a determinados tipos de enlace, tal como se discute en el texto. (B) El complejo APC/C está activo durante la mitosis temprana y modifica reguladores del ciclo celular como Nek2A mediante poliubiquitinación ramificada enlazada por Lys48/Lys11. En este proceso, UBE2C ensambla primero cadenas cortas sobre los sustratos, que luego se elongarán en cada ubiquitina mediante polímeros enlazados por Lys11. Las cadenas ramificadas Lys48/Lys11 potencian la degradación proteasomal. (C) Las cadenas mixtas o ramificadas enlazadas por Lys63/Met1 funcionan como andamios proteicos en receptores inmunitarios, como los receptores de IL-1, promoviendo la señalización de NF-κB.(D) Una ligasa E3 viral inicia la internalización endocítica del receptor MHC clase I mediante la adición de cadenas de ubiquitina mixtas o ramificadas enlazadas por Lys11/Lys63. Tomado de Kirby N Swatek y David Komander 2016 (47)

Además, la interacción entre ubiquitinación y otras modificaciones postraduccionales, como la fosforilación, genera mecanismos de control combinatorios que determinan la duración y especificidad de las señales intracelulares.

En el contexto del cáncer, la desregulación de la maquinaria ubiquitina-dependiente se ha asociado con alteraciones en la respuesta al daño del ADN, evasión de la apoptosis y resistencia terapéutica. Cambios en la actividad de ligasas E3 o de enzimas desubiquitinantes pueden modificar profundamente el equilibrio proteostático de la célula, favoreciendo la estabilización de proteínas oncogénicas o la pérdida funcional de supresores tumorales. En consecuencia, la ubiquitinación no sólo participa en la degradación proteica clásica, sino que actúa como un sistema de regulación dinámica que permite remodelar redes de señalización completas en respuesta a cambios del microambiente tumoral (48,49).

En conjunto, la ubiquitinación emerge como un mecanismo central para el control de la estabilidad y funcionalidad de proteínas involucradas en procesos clave de la tumorigénesis, posicionándose como un regulador esencial de la plasticidad celular y de la adaptación tumoral frente a presiones ambientales o terapéuticas.

2.4.2 Crosstalk entre fosforilación y ubiquitinación en redes de señalización

Las modificaciones postraduccionales no actúan de manera aislada, sino que conforman redes interdependientes que regulan de forma coordinada la estabilidad, actividad y localización subcelular de proteínas clave en la señalización oncogénica. Entre estas interacciones, el crosstalk entre fosforilación y ubiquitinación emerge como un mecanismo central para el control dinámico de rutas celulares asociadas a proliferación, supervivencia y respuesta al estrés (50) . La fosforilación puede generar motivos estructurales específicos ,conocidos como *phosphodegrons*, que facilitan el reconocimiento de proteínas blanco por ligasas E3, promoviendo su ubiquitinación y modulando su destino funcional dentro de la célula. Diversos estudios han demostrado que la fosforilación puede regular directamente la actividad de ligasas E3, modificando su estabilidad, su localización subcelular o su

capacidad catalítica (50–52). En algunos casos, quinasas activadas por señales proliferativas o estrés celular inducen cambios conformacionales en las E3 que favorecen la interacción con sus sustratos, estableciendo un mecanismo mediante el cual las vías de señalización oncogénica controlan de forma directa la maquinaria ubiquitina-dependiente. Este tipo de regulación ha sido descrito para múltiples ligasas, incluyendo Mdm2, cuya actividad hacia p53 puede potenciarse tras fosforilación mediada por AKT, evidenciando cómo la señalización upstream influye sobre el destino proteico downstream. Este mecanismo resulta particularmente relevante en nodos regulatorios de vías como MAPK, PI3K–AKT–mTOR y señalización dependiente de adhesión mediada por FAK1. La fosforilación inducida por quinasas activadas downstream de receptores de crecimiento o estímulos mecánicos puede desencadenar cambios conformacionales que favorecen la interacción con complejos ubiquitina-dependientes, regulando tanto la degradación proteasomal como funciones no degradativas asociadas a ensamblaje de plataformas de señalización (51).

Un ejemplo paradigmático de este fenómeno corresponde a la regulación de la β -catenina, cuya fosforilación secuencial por quinasas específicas genera un phosphodegron reconocido por complejos E3 de tipo SCF, promoviendo su ubiquitinación y posterior degradación proteasomal. Este modelo ilustra cómo la fosforilación actúa como señal previa necesaria para la selección del sustrato, integrando eventos de señalización con el control de estabilidad proteica y modulando rutas asociadas a proliferación tumoral (51).

Además de regular la selección de sustratos, la fosforilación puede controlar la ubiquitinación mediante cambios en la localización subcelular de las proteínas. La modificación fosforilativa puede inducir la translocación de proteínas entre núcleo y citoplasma, exponiéndolas o protegiéndolas frente a ligasas E3 específicas. Este mecanismo ha sido descrito para diversos reguladores del ciclo celular y de la respuesta al daño del ADN, evidenciando que el contexto espacial constituye un determinante crítico del destino ubiquitina-dependiente.

En cáncer, la integración entre fosforilación y ubiquitinación permite ajustar finamente la duración de respuestas adaptativas frente a estrés genotóxico o terapéutico. Proteínas centrales en la respuesta al daño del ADN y en el control del

ciclo celular pueden experimentar modificaciones combinadas que determinan su estabilidad o actividad transcripcional, contribuyendo a la plasticidad tumoral y a la resistencia a tratamientos antineoplásicos. Asimismo, el crosstalk entre estas PTMs influye en la dinámica del citoesqueleto y en la regulación de adhesiones focales, procesos esenciales para la migración celular y la invasión tumoral (51,53).

De manera recíproca, la ubiquitinación también regula directamente la actividad de múltiples quinasas, ya sea promoviendo su degradación o modulando su capacidad señalizadora. Por ejemplo, cadenas de ubiquitina tipo K63 pueden facilitar el ensamblaje de complejos activadores en quinasas como TAK1, mientras que otras E3 ligasas inducen ubiquitinación degradativa de receptores tirosina-quinasa o de componentes de la vía MAPK para limitar la duración de la señal. Asimismo, se ha descrito que quinasas asociadas a adhesiones focales, incluyendo FAK, pueden ser reguladas por ubiquitinación, lo que impacta en su estabilidad y en la reorganización dinámica de complejos de señalización dependientes del citoesqueleto.

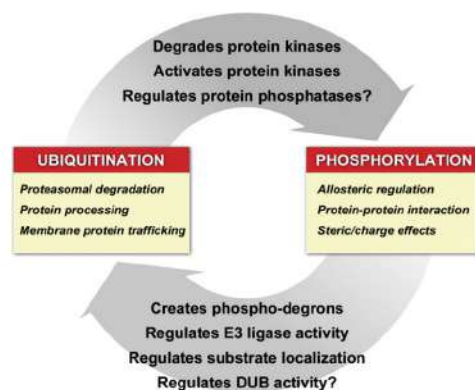


Figura 11. Crosstalk entre fosforilación y ubiquitinación. Esquema tomado de Hunter et al 2007 (54)

Estudios recientes basados en proteómica y enfoques multi-ómicos han revelado que las redes de señalización oncogénica presentan patrones complejos de modificaciones postraduccionales interconectadas, donde la fosforilación puede

modular la accesibilidad de sitios de ubiquitinación y viceversa, generando circuitos regulatorios altamente dinámicos (Figura 11). Esta interacción bidireccional constituye un mecanismo clave para la adaptación celular frente a cambios en el microambiente tumoral y destaca la importancia de analizar las PTMs como sistemas integrados más que como eventos independientes. El crosstalk entre fosforilación y ubiquitinación representa un nivel adicional de regulación que permite coordinar la estabilidad proteica con la activación de cascadas de señalización, contribuyendo a la reorganización funcional de redes oncogénicas en cáncer.

2.4.3 Proteostasis tumoral y remodelación dinámica del proteoma

La proteostasis celular constituye un eje central en la regulación de redes de señalización oncogénicas, ya que determina la estabilidad, localización y actividad funcional de múltiples proteínas involucradas en proliferación, supervivencia y respuesta al estrés. En células tumorales, la homeostasis proteica se encuentra frecuentemente reprogramada mediante mecanismos coordinados que integran ubiquitinación, autofagia y degradación proteasomal, permitiendo una rápida adaptación frente a cambios ambientales y presiones terapéuticas (55,56).

La ubiquitinación no sólo regula la degradación proteica clásica dependiente del proteasoma, sino que también participa en la organización de complejos multiproteicos, la modulación de rutas de señalización y el direccionamiento selectivo de proteínas hacia vías autofágicas. Estudios recientes han demostrado que el eje ubiquitinación–autofagia actúa como un nodo integrador capaz de remodelar dinámicamente el proteoma tumoral, favoreciendo la plasticidad celular y contribuyendo a fenómenos como resistencia a quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia (Figura 12) . En este contexto, diferentes E3 ligasas, deubiquitinasas y adaptadores autofágicos coordinan la estabilidad de oncogenes y supresores tumorales, modulando rutas clave como PI3K/AKT/mTOR, DDR y señalización inflamatoria (57).

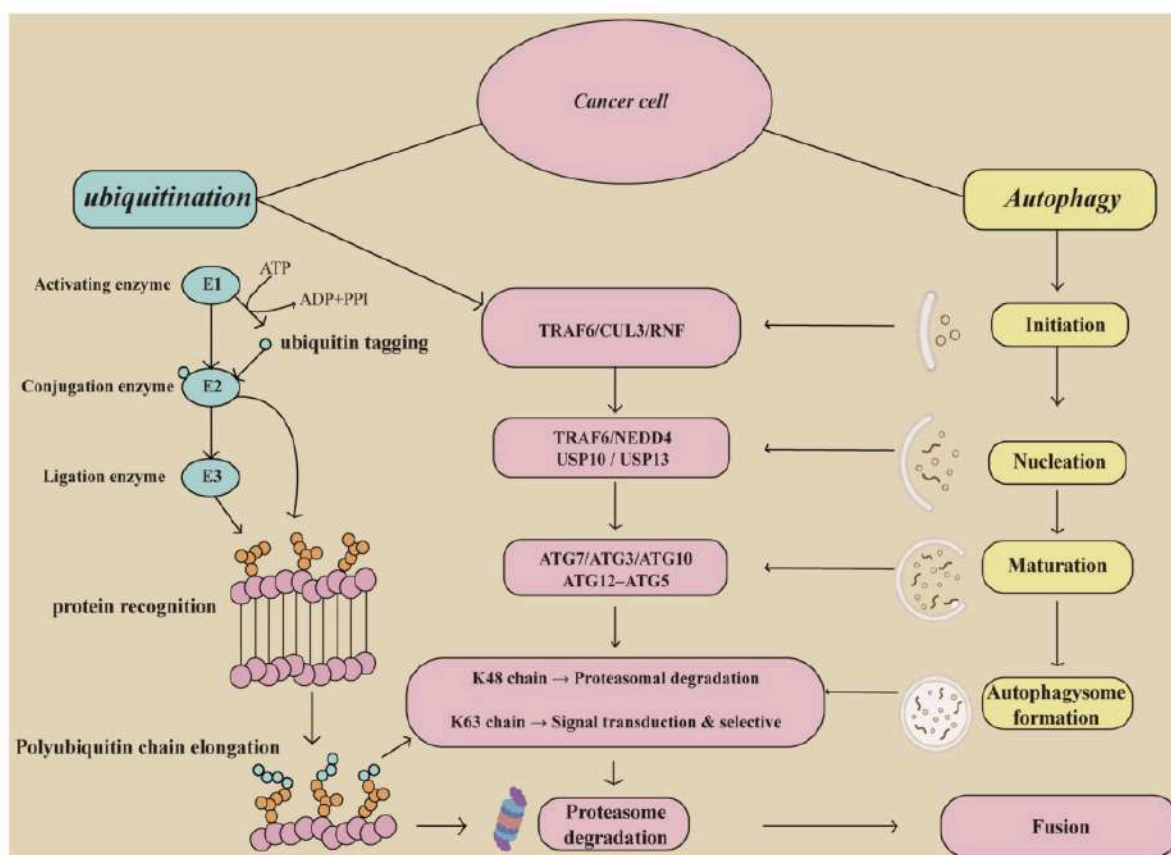


Figura 12. Esquema general de la interacción molecular entre ubiquitinación y autofagia en células cancerosas. Este esquema ilustra el *crosstalk* entre las vías de ubiquitinación y autofagia en el contexto de la regulación de células tumorales. La ubiquitinación se inicia mediante E1 (enzima activadora), E2 (enzima conjugadora) y E3 (ligasa), lo que conduce a la elongación de cadenas de poliubiquitina y al marcado de proteínas. El tipo de enlace de ubiquitina determina el destino de los sustratos; por ejemplo, las cadenas enlazadas por K48 señalan degradación proteasomal, mientras que las cadenas enlazadas por K63 facilitan la transducción de señales y la autofagia selectiva. La autofagia progresa a través de etapas definidas —inicio, nucleación, formación del autofagosoma y fusión con lisosomas— culminando en la degradación. Reguladores clave de la autofagia son modulados por ubiquitinación, conectando ambos procesos mediante rutas de autofagia selectiva. Este diagrama resume la integración funcional entre la señalización por ubiquitina y el flujo autofágico, un eje crítico en la progresión tumoral y la resistencia terapéutica. TRAF6, factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral; CUL3, Cullin 3; RNF, proteína Ring Finger; NEDD4, ligasa E3 tipo NEDD4; USP, peptidasa específica de ubiquitina; ATG, proteína relacionada con autofagia 7. Tomado de Hengrui Zhang et al 2026.(56)

3. Cancer testis antigen (CTA) y familia de proteínas MAGE

La reprogramación de redes de señalización y de mecanismos de control postraduccionales constituye un rasgo recurrente en la biología tumoral, favoreciendo la adaptación celular frente a presiones ambientales y terapéuticas. En este contexto, diversos tumores sólidos reactivan programas génicos normalmente restringidos a tejidos inmunoprivilegiados, entre ellos los denominados antígenos cáncer-testículo (CTA, *cancer-testis antigens*), un grupo de proteínas cuya expresión fisiológica se limita principalmente a células germinales y que reaparecen de manera aberrante en múltiples neoplasias humanas. Más allá de su relevancia como marcadores inmunológicos, estudios recientes han demostrado que varios CTA participan activamente en la regulación de procesos celulares fundamentales, incluyendo control transcripcional, estabilidad proteica y reorganización de redes de señalización oncogénica. Dentro de este grupo, la familia MAGE tipo I ha emergido como un conjunto funcionalmente diverso de proteínas capaces de modular la ubiquitinación y la proteostasis celular mediante su asociación con complejos E3 ligasa, posicionándose como posibles nodos reguladores de la plasticidad tumoral. La comprensión de la biología molecular de los antígenos cáncer-testículo y, en particular, de las proteínas MAGE, resulta por lo tanto esencial para contextualizar su contribución potencial a la progresión tumoral y a los mecanismos de adaptación que serán analizados a lo largo de esta tesis.

3.1 Antígenos cáncer-testículo: definición, regulación y relevancia tumoral

Los antígenos cáncer-testículo (CTA, *cancer-testis antigens*) constituyen una categoría de genes/proteínas definida por un patrón de expresión característico: en condiciones fisiológicas, su expresión se restringe predominantemente a células germinales del testículo (y en varios casos también a placenta/trofoblasto), mientras que en tejidos somáticos adultos es mínima o indetectable; sin embargo, numerosos tumores sólidos y hematológicos reactivan su expresión de manera aberrante. Esta combinación de expresión restringida en tejidos inmunoprivilegiados y expresión tumoral confiere a los CTA un doble interés: como marcadores tumor-asociados e inmunogénicos y, en ciertos casos, como moduladores funcionales de fenotipos pro-tumorales (58). Se clasifican según la ubicación de sus genes en CTA-X: son aquellos ubicados en el cromosoma X e incluyen múltiples familias (por ejemplo, la

familia mage tipo I , GAGE, SSX), y los CTA no-X, distribuidos en otros cromosomas(58). Esta organización refleja, en parte, la expansión evolutiva y la arquitectura genómica en clústeres típica de varias familias CTA-X, y explica la elevada homología intrafamiliar que complica su discriminación experimental a nivel proteico . Para ordenar esta heterogeneidad, se han propuesto esfuerzos de estandarización y recursos curados como CTdatabase (59), que integran evidencia de expresión y anotaciones funcionales, facilitando el análisis comparativo de CTA entre tipos tumorales y contextos experimentales. En términos mecanísticos, la reexpresión tumoral de CTA se vincula fuertemente con desregulación epigenética. Un componente recurrente es la hipometilación del ADN (particularmente en regiones promotoras), junto con cambios en marcas de histonas y remodelación de cromatina, que permiten la reactivación de programas transcripcionales normalmente silenciados en tejidos somáticos. Esta desrepresión epigenética no solo aumenta la inmunogenicidad tumoral al exponer antígenos normalmente ocultos al sistema inmune, sino que también puede integrarse con estados celulares de plasticidad y estrés tumoral (60). En línea con esto, estudios recientes a nivel de célula única muestran que la inducción epigenética de CTA puede correlacionar con mayor reconocimiento inmune en contextos tumorales específicos, subrayando el rol del control epigenético como determinante de la inmunogenicidad tumoral .

Más allá de su uso como blancos inmunoterapéuticos, evidencia acumulada indica que varios CTA poseen funciones celulares activas, contribuyendo a procesos como proliferación, supervivencia, remodelación de señalización y resistencia terapéutica. Revisiones contemporáneas enfatizan que, en múltiples tumores, la expresión de CTA se asocia con estados transcripcionales y proteostáticos adaptativos, lo que justifica abordarlos no sólo como marcadores, sino como potenciales reguladores de redes celulares relevantes para progresión tumoral .

3.2 Familia MAGE: organización estructural y clasificación funcional

La familia MAGE (*Melanoma Antigen Genes*) comprende un amplio conjunto de proteínas caracterizadas por la presencia de un dominio estructural conservado denominado MAGE Homology Domain (MHD), responsable de mediar interacciones

proteína-proteína y de conferir propiedades funcionales específicas dentro de complejos multiproteicos (82). Sobre la base de patrones de expresión y organización genética, las proteínas MAGE se clasifican en dos grandes subfamilias: MAGE tipo I y MAGE tipo II. Las proteínas MAGE tipo I incluyen principalmente a las familias MAGE-A, MAGE-B y MAGE-C, localizadas mayoritariamente en el cromosoma X dentro de regiones genómicas organizadas en clústeres repetitivos (Figura 13). Estas proteínas presentan un patrón de expresión restringido a tejidos inmunoprivilegiados, como testículo y placenta, pero son reexpresadas en múltiples tumores sólidos y hematológicos, motivo por el cual se las clasifica dentro del grupo de los antígenos cáncer-testículo (CTA) (61,62). La expansión génica y la elevada homología de secuencia entre miembros de estas familias reflejan eventos evolutivos de duplicación que han generado proteínas altamente similares a nivel estructural, lo que explica las dificultades experimentales para distinguir isoformas individuales a nivel proteico (84). En contraste, las proteínas MAGE tipo II muestran una expresión más ubicua en tejidos normales y participan en procesos fisiológicos diversos, incluyendo desarrollo neuronal, regulación del ciclo celular y respuesta al estrés. A diferencia de las tipo I, las MAGE tipo II no se consideran CTA, ya que carecen del patrón característico de expresión restringida a testículo y tumor. No obstante, ambas subfamilias comparten el dominio MHD, sugiriendo que ciertos mecanismos moleculares podrían estar conservados, particularmente aquellos asociados a la regulación de complejos proteicos y señalización celular.

Desde una perspectiva estructural, el dominio MHD constituye el núcleo funcional de las proteínas MAGE, formando una plataforma que facilita la interacción con múltiples socios proteicos. Estudios estructurales y funcionales clásicos demostraron que las proteínas MAGE pueden asociarse a complejos ubiquitina-dependientes y modular la actividad de ligasas E3, posicionándolas como reguladores emergentes de la estabilidad proteica y de la señalización oncogénica. Esta propiedad funcional ha llevado a proponer que algunas proteínas MAGE actúan como adaptadores o cofactores que reprograman la especificidad de complejos ubiquitina-dependientes, influyendo sobre la degradación o regulación no degradativa de proteínas clave en cáncer.

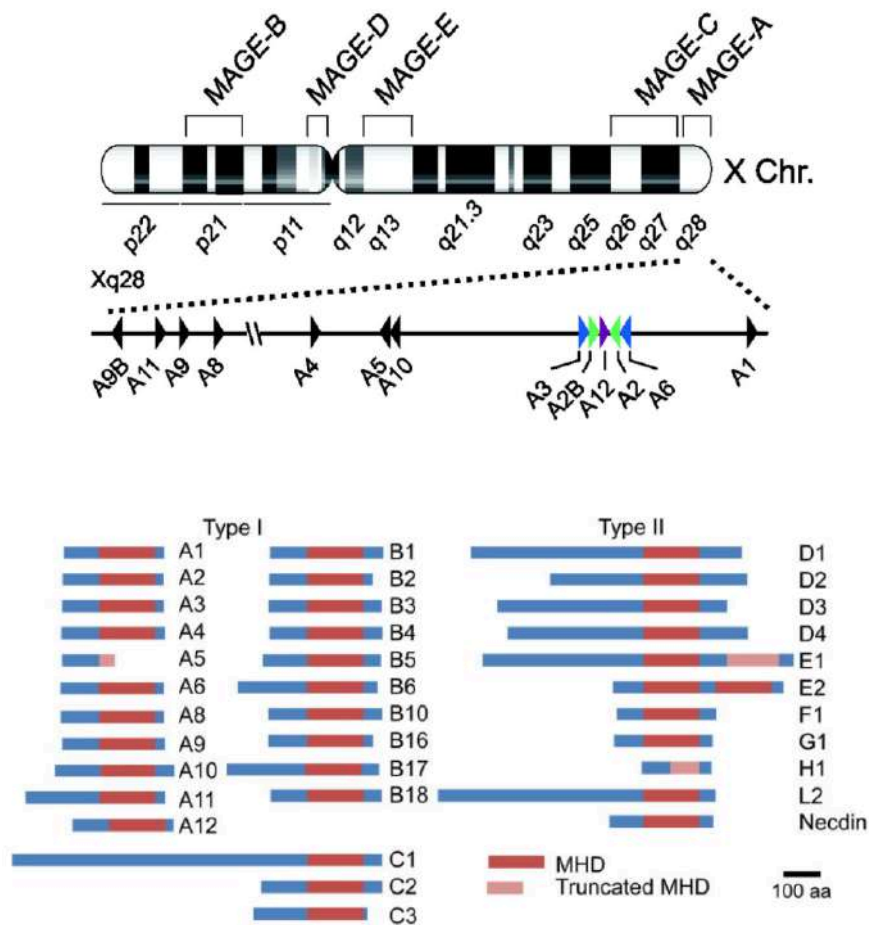


Figura 13: Esquema de proteínas MAGE. Panel superior. Localización cromosómica de las subfamilias MAGE en el cromosoma X. Los genes MAGE-A se encuentran agrupados en la región q28 del cromosoma X. Los triángulos indican la orientación génica. Los triángulos coloreados representan la disposición palindrómica de los genes MAGE-A. Esquema comparativo de la conservación de los dominios MHD entre proteínas MAGE-I y MAGE-II. Figura tomada de Anna K. Lee 2017 **Panel inferior.** Lista de proteínas MAGE humanas y su dominio común conocido, el dominio de homología MAGE (MHD). Nótese que algunas proteínas MAGE presentan dominios MHD truncados. Las MAGE que probablemente correspondan a pseudogenes no se incluyen. Figura tomada de Jenny L Weon et al 2015 (61)

La organización genómica, la conservación estructural del dominio MHD y las diferencias en patrones de expresión entre las subfamilias tipo I y tipo II sugieren

que la familia MAGE ha evolucionado hacia funciones especializadas dentro de contextos fisiológicos y patológicos. En particular, la reactivación aberrante de proteínas MAGE tipo I en tumores ha impulsado el interés en comprender sus roles moleculares más allá de su inmunogenicidad, destacando su participación en procesos regulatorios asociados a control transcripcional, estabilidad proteica y adaptación tumoral. Estas funciones serán desarrolladas en la siguiente sección, donde se abordará el rol de las proteínas MAGE en la modulación de redes oncogénicas y mecanismos de señalización celular.

3.3 Interacciones entre proteínas MAGE

La familia de proteínas MAGE (Melanoma Antigen Genes) comprende un grupo amplio y estructuralmente relacionado de proteínas, caracterizadas por la presencia de un dominio MAGE homólogo (MHD), que constituye la principal región de homología entre los distintos miembros de la familia y actúa como una plataforma para interacciones proteína–proteína. La elevada conservación del MHD, particularmente dentro de la subfamilia MAGE-A, sugiere que este dominio podría favorecer no solo interacciones con proteínas no relacionadas, sino también asociaciones intrafamiliares entre distintas proteínas MAGE.

Si bien numerosos estudios han abordado funciones individuales de proteínas MAGE principalmente en relación con la regulación de p53, la ubiquitinación y la adaptación tumoral al estrés, el potencial de interacción funcional entre distintos miembros de la familia MAGE ha sido escasamente explorado, en particular en contextos tumorales epiteliales como el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC). La coexpresión de múltiples proteínas MAGE en un mismo contexto celular, fenómeno frecuente en células tumorales, plantea la posibilidad de interacciones físicas directas, formación de complejos multiproteicos o cooperación funcional, capaces de amplificar o modular sus efectos biológicos.

En este marco conceptual, y a partir de antecedentes de nuestro laboratorio que demuestran que el MHD puede mediar interacciones MAGE–MAGE funcionalmente relevantes, como el caso previamente descrito de la interacción entre MAGE-A6 y MAGE-A11, nos propusimos investigar si MAGE-A9 establece interacciones específicas con otros miembros de la familia MAGE. En particular, buscamos

determinar si dichas interacciones se observan tanto en modelos celulares de HNSCC como en modelos no derivados de HNSCC, y si dependen del contexto celular, del estado tumoral o de la identidad tisular.

3.3 Funciones moleculares de las proteínas MAGE en cáncer

Las proteínas de la familia MAGE tipo I fueron inicialmente identificadas como antígenos tumorales reconocidos por linfocitos T citotóxicos (63), sin embargo, estudios posteriores demostraron que varios miembros de esta familia se encuentran asociados con progresión tumoral, peor pronóstico clínico y menor supervivencia en múltiples tipos de cáncer. La reexpresión aberrante de proteínas MAGE-I ha sido vinculada con aumento de proliferación celular, evasión de mecanismos supresores y resistencia a terapias antineoplásicas, lo que sugiere que estas proteínas no sólo constituyen marcadores inmunológicos, sino también reguladores funcionales de la biología tumoral. En este contexto, investigaciones funcionales han vinculado a las proteínas MAGE con la modulación de redes transcripcionales, el control de estabilidad proteica y la reorganización de circuitos de señalización dependientes de ubiquitinación, ampliando su papel más allá de la inmunogenicidad tumoral.

3.3.1 Regulación de factores de transcripción

Diversos miembros de la familia MAGE tipo I han sido vinculados con la regulación directa o indirecta de factores de transcripción implicados en proliferación celular, diferenciación y respuesta al estrés. Estudios pioneros demostraron que proteínas MAGE pueden modular la actividad transcripcional mediante su asociación con complejos nucleares y cofactores epigenéticos, alterando la expresión génica a través de mecanismos dependientes de remodelación cromatínica y modificaciones postraduccionales de proteínas reguladoras(64,65).

Uno de los ejemplos mejor caracterizados corresponde a MAGE-A2, cuya interacción con complejos que contienen histona desacetilasas fue asociada con la represión funcional de p53. En este contexto, MAGE-A2 puede favorecer el

reclutamiento de HDACs a promotores regulados por p53, modulando la transcripción de genes involucrados en arresto del ciclo celular y apoptosis (64). Este mecanismo proporcionó una de las primeras evidencias funcionales de que proteínas MAGE pueden influir directamente sobre la actividad de factores de transcripción centrales en la respuesta al daño del ADN.

Otro modelo ampliamente estudiado involucra a MAGE-A11, que actúa como coactivador del receptor de andrógenos (AR), potenciando la actividad transcripcional dependiente de este factor nuclear. MAGE-A11 interactúa con dominios regulatorios del AR y favorece la estabilización de complejos transcripcionales activos, contribuyendo a la regulación de genes asociados a proliferación celular en cáncer de próstata (66,67). De manera similar, MAGE-A6 ha sido implicada en la modulación de señalización dependiente de AR y en la regulación de programas transcripcionales vinculados a supervivencia celular, reforzando la idea de que diferentes miembros de la familia MAGE pueden actuar como moduladores contextuales de factores nucleares.

En conjunto, estos ejemplos ilustran que proteínas MAGE pueden influir sobre la actividad de factores de transcripción mediante mecanismos diversos que incluyen reclutamiento de cofactores epigenéticos, estabilización de complejos nucleares y regulación indirecta de la estabilidad proteica. Estas funciones han sido descritas en distintos tipos tumorales y constituyen un marco conceptual para comprender cómo la reexpresión aberrante de genes MAGE puede contribuir a la reorganización de programas transcripcionales en cáncer.

3.3.2 Regulación de la estabilidad proteica y proteostasis mediante asociación con ligasas E3

Diversos miembros de la familia MAGE tipo I han sido asociados con la regulación de la ubiquitinación a través de su interacción con E3 ligasas (Figura 14). El descubrimiento de los complejos MAGE-RING ligase (MRL) mostró que proteínas MAGE pueden asociarse con proteínas tipo RING y modificar la actividad ubiquitina-dependiente hacia distintos sustratos celulares. El dominio MAGE

Homology Domain (MHD) constituye la principal región estructural implicada en estas interacciones.

Se han descrito múltiples ejemplos de esta regulación. MAGE-A3 y MAGE-A6 forman complejos con la ligasa E3 TRIM28/KAP1, promoviendo la ubiquitinación de AMPK α 1 y modulando procesos metabólicos celulares(68). MAGE-C2 también interactúa con TRIM28 y ha sido vinculada con regulación de estabilidad proteica en contextos de proliferación tumoral y respuesta al daño del ADN . En otro modelo, MAGE-A11 fue reportada como interactora de la ligasa E3 HUWE1, sugiriendo un rol en la regulación de proteínas nucleares y señalización dependiente de ubiquitinación (69). Asimismo, estudios funcionales mostraron que MAGE-A2 puede influir sobre el eje p53 mediante la modulación de complejos asociados a MDM2 y MDM4, afectando indirectamente la ubiquitinación de reguladores del supresor tumoral (70).

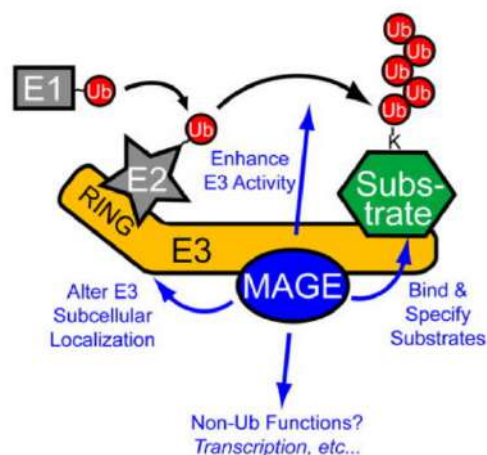


Figura 14: Esquema de proteínas MAGE asociada a E3 ligasa. Posibles funciones de las proteínas MAGE en complejos con proteínas E3 ligasas. Figura tomada de Jenny L Weon et al 2015 (61)

Un campo más reciente de investigación en la función de las proteínas MAGE ha demostrado que pueden actuar como moduladores de la ubiquitinación a través de su asociación con E3 ligasas. Recientemente se describió la interacción de MAGE-A11 con la E3 ligasa HUWE1 posicionando a estas proteínas como

reguladores clave de la estabilidad proteica en contextos tumorales. El dominio de homología MAGE (MHD, por sus siglas en inglés, MAGE Homology Domain) constituye la principal interfaz estructural responsable de estas interacciones, permitiendo que distintas proteínas MAGE se asocien a complejos ubiquitina-dependientes y modulen su actividad catalítica. En la mayoría de los sistemas estudiados hasta el momento, la expresión de proteínas MAGE se asocia con un incremento en los niveles de ubiquitinación de proteínas blanco, ya sea potenciando la ubiquitinación de sustratos clásicos de E3 ligasas o facilitando la incorporación de nuevos sustratos a dichos complejos. (61,71)

Se ha propuesto que algunas proteínas MAGE-A pueden modular la ubiquitinación de proteínas celulares clave a través de su asociación con E3 ligasas, conformando complejos MAGE-RING que actúan como reguladores de la degradación proteica (13,14). En este sentido, distintos miembros de la familia MAGE-A, como MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6 y MAGE-C2, han demostrado capacidad para interactuar con E3 ligasas como TRIM28/KAP1, modificando la ubiquitinación y estabilidad de proteínas involucradas en vías críticas como p53, metabolismo y señalización del estrés (14,15). Asimismo, se ha reportado que MAGE-A2 puede modular la actividad de MDM2, alterando la ubiquitinación del regulador de p53, MDM4, mientras que estudios estructurales recientes sobre MAGE-A11 respaldan la noción de que las proteínas MAGE actúan como adaptadores de sustrato capaces de redirigir la actividad de las E3 ligasas hacia nuevos blancos celulares (69). El trabajo de Pineda et al. (2015) mostró que MAGE-A3 y MAGE-A6 se asocia con la E3 ligasa TRIM28 para promover la ubiquitinación y degradación de AMPK α 1, favoreciendo una reprogramación metabólica tumoral hacia estados más anabólicos y resistentes al estrés energético. Mas recientemente se ha descrito que MAGE-A10 modula la estabilidad de las acetiltransferasas KAT2A/KAT2B mediante mecanismos dependientes de p62/SQSTM1, interfiriendo con señales de ubiquitinación tipo K63 asociadas a autofagia selectiva y afectando indirectamente la acetilación de histonas (72). Estos hallazgos sugieren que las proteínas MAGE podrían actuar como nodos de integración entre ubiquitinación, control de estabilidad proteica y regulación cromatínica.

Este antecedente refuerza la idea de que las proteínas MAGE actúan como adaptadores funcionales capaces de modular redes metabólicas centrales mediante mecanismos dependientes de ubiquitinación.

3.4 MAGE-A9: importancia clínica y vacíos en el conocimiento

Dentro de la familia MAGE tipo I, MAGE-A9 ha sido asociada de manera consistente con mal pronóstico clínico, menor supervivencia y resistencia a tratamientos antineoplásicos en diversos tipos tumorales. Estudios clínicos en carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC) mostraron que niveles elevados de MAGE-A9 se correlaciona con menor supervivencia global y mayor recurrencia tumoral, evaluados mediante análisis inmunohistoquímicos y correlaciones clínico-patológicas en cohortes de pacientes (73,74). Resultados similares fueron reportados en cáncer de pulmón, donde la sobreexpresión de MAGE-A9 se asoció con estadios avanzados y peor pronóstico (75,76), así como en carcinoma hepatocelular, donde su expresión elevada se vinculó con progresión tumoral y menor supervivencia libre de enfermedad (75). En cáncer de ovario y carcinoma esofágico, análisis clínicos indicaron que tumores con alta expresión de MAGE-A9 presentan mayor invasividad y menor respuesta a quimioterapia, mientras que en cáncer de mama se describió una asociación entre la expresión de MAGE-A9 y fenotipos tumorales más agresivos, incluyendo metástasis linfática y peor evolución clínica (77).

Desde el punto de vista genético, el locus MAGE-A9 se encuentra dentro del clúster MAGE-A localizado en la región Xq28 del cromosoma X. La familia MAGE-A se expandió por duplicaciones en tándem durante la evolución de mamíferos. En este contexto se han descrito dos genes estrechamente relacionados, MAGEA9 (MAGEA9A) y MAGEA9B. MAGEA9B es una copia duplicada reciente de MAGEA9. Ambas variantes comparten una elevada identidad de secuencia nucleotídica y codifican proteínas con alta homología estructural, especialmente dentro del dominio MAGE Homology Domain (MHD). Estas similitudes explican que numerosos estudios funcionales utilicen el término general “MAGE-A9” sin distinguir entre ambas variantes. Las diferencias entre MAGE-A9A y MAGE-A9B se observan

principalmente a nivel genómico y regulatorio, ya que ambos genes presentan regiones promotoras independientes y patrones potencialmente distintos de regulación epigenética, mientras que a nivel proteico las secuencias muestran variaciones menores fuera del dominio MHD conservado. Debido a esta elevada similitud, técnicas basadas en anticuerpos o análisis proteómicos suelen detectar conjuntamente ambas variantes.

Como mencionamos en la Introducción (Sección 3), la subfamilia de proteínas MAGE-A ha sido ampliamente estudiada por su reexpresión aberrante en tumores y su asociación con fenotipos clínicamente agresivos. Dentro de esta familia, MAGE-A9 ha cobrado particular interés debido a su elevada frecuencia de expresión en carcinomas escamosos de cabeza y cuello (HNSCC) y a su asociación con un pronóstico clínico desfavorable. Estudios clínicos basados en inmunohistoquímica, análisis de ARNm por RT-qPCR y correlaciones clínico-patológicas en cohortes de pacientes han mostrado que los tumores con alta expresión de MAGE-A9 presentan menor supervivencia global y libre de enfermedad, tanto en HNSCC como en otros tumores epiteliales, incluyendo pulmón, hígado, ovario, esófago y mama (76,78–81). Hasta el momento, la literatura disponible indica que niveles elevados de MAGE-A9 se asocian con estadios avanzados, metástasis linfática y menor respuesta a quimioterapia o radioterapia, consolidando su valor como biomarcador de mal pronóstico (Ver el resumen en Tabla 1).

Tipo de tumor	Frecuencia de expresión	Asociaciones clínico-patológicas	Valor pronóstico	Referencia
Carcinoma escamoso de laringe (LSCC)	56,9% (70/123)	Mayor grado histológico; metástasis ganglionares	Factor pronóstico independiente (peor sobrevida)	Han et al., 2014
Carcinoma hepatocelular (HCC)	55% tumor vs 18% normal	Grado, invasión portal, metástasis, TNM	Factor independiente para DFS y OS	Gu et al., 2014
Cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC)	Expresión tumoral y estromal	Asociación con sobrevida	Predictor independiente a 5 años	Zhang et al., 2015
Adenocarcinoma de pulmón	42,8% tumor vs 22,3% normal	Diferenciación, tamaño tumoral	Asociado a peor sobrevida	Zhai et al., 2016
Cáncer epitelial de ovario (EOC)	Sobreexpresión tumoral	No detallado en abstract	Muy mala sobrevida global	Xu et al., 2015
Cáncer colorrectal (CRC)	Sobreexpresión tumoral	Correlaciones clínico-patológicas	Marcador de mal pronóstico	Zhan et al., 2016
Carcinoma escamoso de esófago (ESCC)	Aumentado en tumor	Grado, tamaño, metástasis ganglionar	Factor pronóstico independiente	Qi et al., 2017
Cáncer de cabeza y cuello (HNSCC)	Alta expresión	Asociado a radioresistencia	Peor sobrevida global	Meyer et al., 2018
Cáncer de mama	Sobreexpresión tumoral	No detallado	Predictor de mal pronóstico	Xu et al., 2014
Cáncer de vejiga	Frecuente	Alto grado, CIS, metástasis	Asociado a progresión/recurrencia	Bergeron et al., 2009; Picard et al., 2007

Tabla 1: Resumen de características clínico patológicas de tumores MAGE-A9 positivos.

A nivel molecular, se ha propuesto que algunas proteínas MAGE, predominantemente de la subfamilia MAGE-A, pueden modular la ubiquitinación de proteínas celulares clave mediante su asociación con E3 ligasas, formando complejos MAGE-RING que regulan la estabilidad de proteínas involucradas en procesos críticos. En este sentido, distintos miembros de la familia, como MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6 y MAGE-C2, han demostrado capacidad para interactuar con TRIM28/KAP1, alterando la ubiquitinación de proteínas involucradas en vías como p53, metabolismo y señalización de estrés. Más allá de estos efectos sobre la ubiquitinación, múltiples miembros de la familia MAGE-I han sido implicados en la regulación de programas transcripcionales y epigenéticos asociados a p53, senescencia, apoptosis y diferenciación celular.

Estos antecedentes establecen un marco conceptual en el cual las proteínas MAGE-I pueden actuar como moduladores globales del paisaje transcriptómico tumoral; sin embargo, para MAGE-A9 los mecanismos moleculares por los cuales se asocia a un peor pronóstico no han sido caracterizados, por lo que su función molecular específica permanece poco estudiada.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo: dada la fuerte correlación entre la expresión del gen *MAGE-A9* con el mal pronóstico clínico en pacientes oncológicos (ver Tabla 1 de Introducción) y el conocimiento de las funciones de otras proteínas de la familia *MAGE-I*, la hipótesis central de trabajo es que la expresión de la proteína *MAGE-A9* podría favorecer el fenotipo tumoral mediante la alteración de procesos celulares específicos relacionados con el cáncer.

Objetivo general: evidenciar las alteraciones en nodos funcionales principales que genera la expresión de *MAGE-A9* mediante una integración de técnicas de biología molecular y celular combinadas con aproximaciones multi-ómicas, utilizando como modelo el cáncer de cabeza y cuello. En este sentido, haremos foco en cambios en vías que podrían explicar parte del fenotipo clínico de tumores *MAGE-A9* positivos, así como en vías nuevas sin contraparte clínica aún.

Objetivos específicos: Para llevar adelante este estudio, nos hemos planteado el desarrollo de las siguiente Partes:

- **Parte 1:** Estudio de la respuesta diferencial de *MAGE-A9* a la vía MAPK
- **Parte 2:** Generación y validación de modelos celulares para la caracterización funcional de *MAGE-A9*
- **Parte 3:** Identificación de las alteraciones globales en la transcripción por la expresión de *MAGE-A9*: análisis del transcriptoma
- **Parte 4:** Identificación de interactores de *MAGE-A9*: análisis del interactoma
- **Parte 5:** Detección de los cambios globales en el patrón de ubiquitinación por la expresión de *MAGE-A9*: análisis de ubiquitinoma.

El modelo de cáncer de cabeza y cuello: la elección del modelo de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC) en esta Tesis no implica que este tipo tumoral sea el más representativo o el más afectado por la expresión de MAGE-A9 en la clínica. De hecho, parte de la relevancia de la propuesta caracterización de MAGE-A9, es la diversidad de tumores humanos que se ven afectados por su expresión. La elección se fundamenta en la combinación entre la evidencia clínica y la accesibilidad a modelos celulares humanos bien caracterizados, como las líneas HN30, HN12 y HN13, que presentan distintas características moleculares y orígenes histológicos. Estos modelos constituyen herramientas adecuadas para el estudio de mecanismos de oncología molecular básica. En este contexto, si bien los resultados obtenidos pueden interpretarse como contribuciones al entendimiento de funciones celulares de MAGE-A9 en HNSCC, tienen potencial relevancia y extrapolación a distintos tipos de tumores humanos.

RESULTADOS

PARTE 1

1. Regulación de la estabilidad de MAGE-A9 por la vía MAPK

En nuestro laboratorio investigamos la familia de proteínas MAGE de tipo I desde hace más de dos décadas, lo que nos ha permitido establecer a varios de sus miembros como reguladores de procesos celulares relevantes en cáncer. Históricamente, la incorporación de proteínas MAGE al foco de estudio del grupo se basó en su identificación en distintos abordajes experimentales, como cribados proteómicos, estudios de interacción o análisis funcionales, que revelaron su participación en vías oncogénicas específicas.

En contraste con esta estrategia, la selección de MAGE-A9 respondió a un criterio diferente. En este caso, la proteína fue elegida a partir de evidencia clínica y bibliográfica que indicaba una fuerte asociación entre su expresión tumoral y un mal pronóstico en múltiples tipos de cáncer, en particular en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello. Esta convergencia de datos sugirió que MAGE-A9 podría desempeñar un papel funcional relevante en la progresión tumoral.

Dado que el estudio de MAGE-A9 era novedoso para el laboratorio, fue necesario desarrollar previamente las herramientas moleculares y celulares requeridas para su análisis. Para ello, generamos plásmidos de expresión de MAGE-A9 etiquetados con Flag en el extremo N-terminal (ver Materiales y Métodos, Sección 6), que permitieron la detección específica y cuantitativa de la proteína exógena. Estos constructos fueron utilizados inicialmente en sistemas de sobreexpresión transitoria mediante transfección en células HEK293T y U2OS, dos líneas celulares ampliamente empleadas en estudios de señalización y regulación proteica, cuyas vías MAPK se encuentran bien caracterizadas y no presentan mutaciones oncogénicas constitutivas. Este enfoque nos permitió analizar directamente la

estabilidad de MAGE-A9 bajo distintas condiciones de activación o inactivación de la vía MAPK en un contexto experimental controlado.

En trabajos recientes de nuestro grupo, de los cuales formé parte (Pascucci et al., 2021; Pascucci et al., 2023)(67,82), describimos por primera vez a las proteínas MAGE como blancos funcionales de oncogenes. En particular, demostramos que la proteína MAGE-C2 es estabilizada por la activación de la vía mitogénica RAS–RAF–MEK–ERK, perteneciente a la familia de las mitogen-activated protein kinases (MAPK), una de las principales cascadas de señalización alteradas en células tumorales (Figura 1).

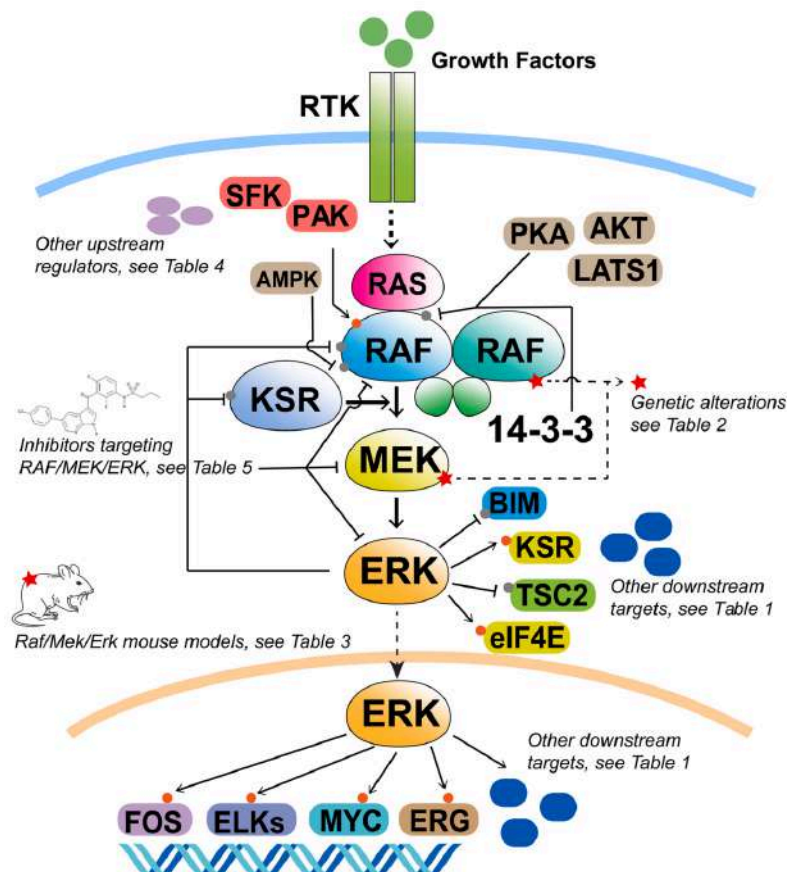


Figura 1. Diagrama simplificado de la vía RAS/RAF/MEK/ERK. Las flechas representan regulación positiva y las barras sin punta representan regulación negativa de proteínas blanco. Adaptado de Ullah, Yin, Snell y Wan et al 2022.

La vía RAS–RAF–MEK–ERK integra señales provenientes de factores de crecimiento presentes en el suero y controla procesos fundamentales como proliferación, supervivencia y metabolismo celular, regulando, entre otros mecanismos, la estabilidad de múltiples proteínas (1,2,4). En condiciones experimentales, la privación de suero constituye una estrategia ampliamente utilizada para inactivar esta cascada, ya que la ausencia de factores de crecimiento impide la fosforilación de ERK y otros componentes de la vía, conduciendo a la activación de programas catabólicos asociados con estrés celular y degradación proteica (3,4). En este contexto, observamos que la inactivación de la señalización MAPK por privación de suero conduce a una marcada desestabilización de MAGE-C2, revelando que su estabilidad se encuentra funcionalmente acoplada a la actividad de esta vía (Figura 2).

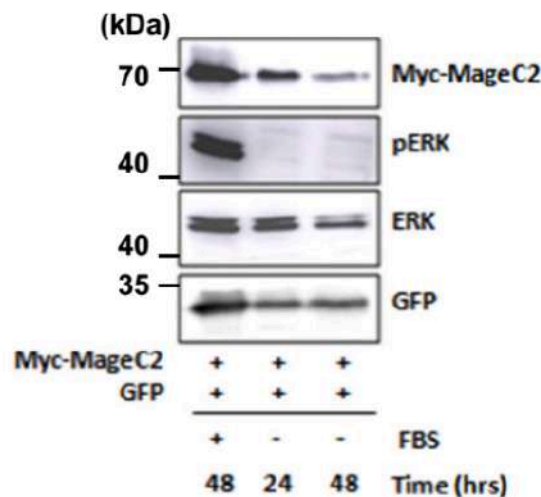


Figura 2: La inactivación de la vía de las MAPK RAS/RAF/MEK/ERK por ausencia de factores de crecimiento externos disminuye la estabilidad de MAGE-C2. Western Blot de células HEK 293T transfectadas con 600ng de Myc-MageC2 y privadas de SFB durante 24 y 48 hs. Se midieron los niveles de Myc-MageC2 con anticuerpo anti-Myc (9E10). Se midieron pERK con anti-pERK y ERK con anti-ERK como controles de actividad de la vía. Se midió la expresión de GFP como control de transfección.

A partir de esto, nos propusimos evaluar si MAGE-A9, otro miembro de la familia MAGE-I fuertemente asociado a un mal pronóstico en una gran variedad de tumores de diferentes orígenes histológicos, entre ellos el carcinoma escamoso de cabeza y cuello, presentaba un comportamiento regulatorio similar o diferencial frente a la

modulación de la vía MAPK. Para ello, empleamos sistemas de sobreexpresión en líneas celulares con vías MAPK bien caracterizadas y sin mutaciones oncogénicas constitutivas en esta cascada, como células U2OS (osteosarcoma humano) y HEK293T (riñón embrionario humano).

En primer lugar, se analizaron los niveles de MAGE-A9 por Western blot en células U2OS transfectadas con cantidades crecientes del vector y crecidas en presencia o ausencia de suero durante 24 y 48 horas. La privación de suero se utilizó como estrategia para inactivar la vía RAS/RAF/MEK/ERK como en el ensayo de MAGE-C2. De este modo, se buscó determinar si MAGE-A9, al igual que MAGE-C2, depende de la señalización mitogénica para mantener su estabilidad.

En nuestras condiciones experimentales, los niveles de MAGE-A9 se mantuvieron estables tanto en presencia como en ausencia de suero (Figura 3), lo que indica que esta proteína no se desestabiliza frente a la inactivación de la vía MAPK ni frente al estrés trófico inducido por la privación de suero, en marcado contraste con el comportamiento observado para MAGE-C2 .

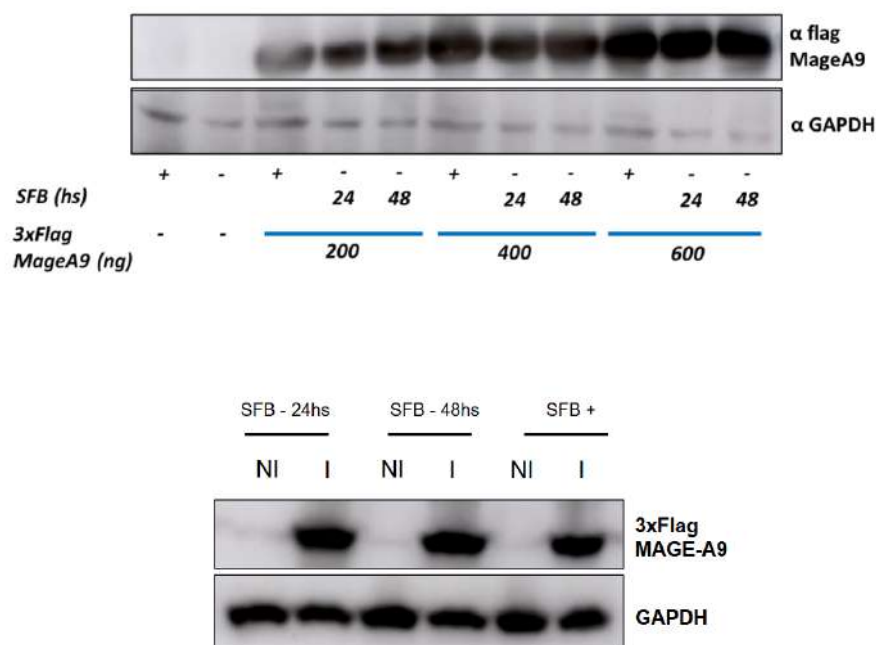


Figura 3. La inactivación de la vía RAS/RAF/MEK/ERK por ausencia de factores de crecimiento externos no afecta la estabilidad de la proteína MAGE-A9. Panel superior:

Western Blot de lisados celulares totales. Se transfectaron células U2OS con cantidades crecientes de 3xFlagMAGE-A9 (200ng, 400ng y 600ng) . Se las creció en presencia y ausencia de 10 % de SFB durante 24 y 48 hs. Panel inferior: Western Blot de células hek293T con expresión inducible de 3xFlagMAGE-A9. NI: células no inducidas; I : Células inducidas durante 48 hs con doxíciclina 2ug/ml. Se reveló GAPDH como control de carga.

Para complementar el análisis basado en la inactivación de la vía MAPK por privación de suero, se evaluó el efecto de su activación constitutiva sobre la estabilidad de MAGE-A9 y MAGE-C2. Para ello, se co-transfectaron células U2OS y HEK293T con los constructos que codifican MAGE-A9 o MAGE-C2 junto con una forma oncogénica de RAS (RasV12). Esta presenta una mutación puntual (G12V) que bloquea la actividad GTPasa de RAS, manteniéndolo en un estado permanentemente activo unido a GTP, lo que conduce a una activación sostenida de sus efectores downstream, en particular de la cascada RAF/MEK/ERK, independientemente de la presencia de factores de crecimiento o de señales provenientes de receptores tirosina-quinasa.

En células tumorales, mutaciones activantes de RAS constituyen uno de los mecanismos más frecuentes de activación aberrante de la vía MAPK y son suficientes para impulsar proliferación, supervivencia y reprogramación metabólica aún en condiciones de estrés trófico. En este contexto, RasV12 representa un modelo experimental de señalización mitogénica constitutiva que permite evaluar si la estabilidad de una proteína depende directamente de la actividad oncogénica de la vía MAPK.

Tal como se había observado previamente (Pascucci et al., 2021; 2023), la expresión de RasV12 produjo un aumento marcado en los niveles de MAGE-C2, confirmando que la activación sostenida de la vía MAPK promueve la estabilización de esta proteína (Figura 4). En contraste, los niveles de MAGE-A9 no se modificaron de manera significativa frente a la activación constitutiva de la vía MAPK por RasV12 (Figura 5), manteniéndose comparables a los observados en ausencia de este oncogén, lo que indica que esta proteína es resistente a los cambios en estabilidad inducidos por señales proliferativas aberrantes mediadas por Ras–MAPK.

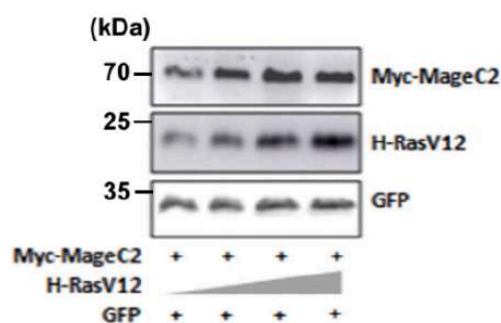


Figura 4: La activación constitutiva de la vía RAS/MEK/ERK mediante RAS constitutivamente activo promueve la estabilización de MAGE-C2. Western Blot de lisados totales de células HEK293T transfectadas con 500 ng de Myc-MAGE-C2 y co-transfectadas con cantidades crecientes de RASV12 (0, 50, 100 y 150 ng). Se reveló Myc-MageC2 con anti-Myc (9E10), RASV12 con anti-panRas y GFP con anti GFP como control de transfección.

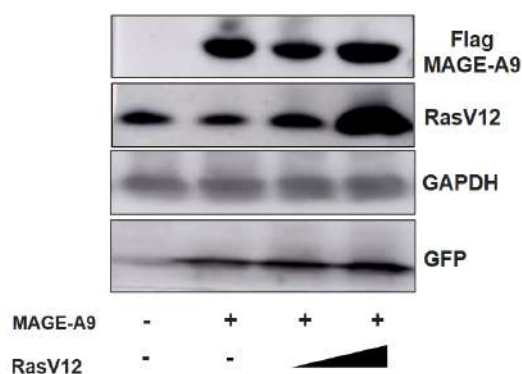


Figura 5: La activación constitutiva de la vía RAS/MEK/ERK con RASv12 no afecta la estabilidad de MAGE-A9. Western Blot de lisados celulares totales. Se transfectaron células HEK 293T con cantidades crecientes de H-RasV12 (100ng y 1000ng) co-tranfectado con 50 ng de MAGE-A9 y GFP como control de transfección. Se analizaron los lisados celulares mediante Western Blot. Se reveló con anticuerpo anti3xFlag y pan RAS. Se reveló GAPDH como control de carga.

En conjunto, los resultados presentados en esta sección demuestran que la estabilidad de las proteínas de la familia MAGE frente a la modulación de la vía MAPK es diferencial y específica de cada miembro. Mientras que MAGE-C2 se comporta como una proteína mitogénicamente regulada, cuya estabilidad depende del estado de activación de la cascada RAS/MEK/ERK,

disminuyendo marcadamente cuando esta vía se inactiva por privación de suero y aumentando frente a su activación constitutiva por RASV12 (), MAGE-A9 exhibe un comportamiento notablemente distinto. En nuestras condiciones experimentales, MAGE-A9 mantuvo niveles estables tanto bajo condiciones de inactivación de la vía MAPK como frente a su activación oncogénica, indicando que su estabilidad es independiente del control mitogénico mediado por esta cascada.

Este perfil contrasta no solo con MAGE-C2, sino también con otros miembros de la familia MAGE-I previamente caracterizados en nuestro laboratorio, como MAGE-A2 y MAGE-A6, cuya estabilidad también aumenta en respuesta a la activación de la vía MAPK por RasV12. En este sentido, MAGE-A9 se distingue como una proteína refractaria a la regulación por señales mitogénicas y oncogénicas que controlan la estabilidad de otros MAGE, lo que sugiere que se encuentra desacoplada de uno de los principales ejes de control de crecimiento celular.

Esta propiedad singular de MAGE-A9 podría conferir una ventaja funcional en contextos tumorales caracterizados por estrés trófico, inactivación de señales de crecimiento o tratamientos que afectan la vía MAPK, permitiendo la persistencia de la proteína aun cuando otros miembros de la familia MAGE serían desestabilizados.

Dados estos hallazgos y en otros estudios comparando distintas proteínas MAGE-I, desde hace años sostenemos la importancia de comprender las similitudes y diferencias en los efectos que causa la expresión de las diferentes proteínas MAGE-I en cáncer

Por tal motivo, en las siguientes partes de la Tesis, iniciamos estudios multiómicos para establecer las principales consecuencias moleculares que conlleva la expresión de MAGE-A9.

PARTE 2

2. Generación y validación de modelos celulares para la caracterización funcional de MAGE-A9

Si bien los ensayos de sobreexpresión transitoria y de expresión constitutiva nos permitieron establecer propiedades bioquímicas y regulatorias de MAGE-A9, como su independencia de la vía MAPK (Parte 1), el estudio de sus funciones celulares requiere sistemas experimentales en los que su expresión pueda ser controlada de manera precisa y homogénea. En particular, la transfección transiente no es un proceso 100 % eficiente, por lo que en una misma población coexisten células que expresan MAGE-A9 y células que no lo hacen, lo que puede atenuar, solapar o incluso ocultar los efectos biológicos atribuibles a la proteína cuando se analizan fenotipos a nivel poblacional. Asimismo, la expresión constitutiva estable puede conducir a procesos de adaptación celular y selección clonal, favoreciendo la supervivencia de subpoblaciones que toleran la expresión de MAGE-A9 e introduciendo sesgos adicionales en la interpretación de los resultados.

Por este motivo, desarrollamos modelos celulares con expresión inducible de MAGE-A9, que nos permiten comparar de manera directa poblaciones celulares genéticamente idénticas que difieren únicamente en la presencia o ausencia de la proteína, controlada temporalmente mediante la adición de doxiciclina. Este enfoque resulta particularmente adecuado para evaluar de forma causal el impacto de MAGE-A9 sobre distintos procesos biológicos relevantes para la progresión tumoral.

2.1 Selección de modelos celulares

Como sistema modelo seleccionamos líneas de carcinoma escamoso de cavidad oral de la serie WSU-HN, provenientes de la Wayne State University y gentilmente cedidas por la Dra. Ana Raimondi. Esta elección se basó no sólo en consideraciones técnicas, sino también en la relevancia biológica de MAGE-A9 en el contexto del carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC), un tipo tumoral en

el que diversos cancer-testis antigens, incluidos miembros de la subfamilia MAGE-A, se expresan de forma aberrante y se asocian con progresión tumoral, invasividad y mal pronóstico clínico. En particular, se ha reportado que niveles elevados de MAGE-A9 en tumores de HNSCC se correlacionan con menor supervivencia global y mayor agresividad tumoral(83,84).

Adicionalmente, estas líneas presentan dos características experimentales clave para nuestro estudio: (i) la ausencia de expresión detectable de MAGE-A9 endógeno (Figura 6, panel superior), lo que nos permite analizar los efectos de la proteína exógena sin interferencia del fondo basal, y (ii) la presencia de distintos estados funcionales de p53 (Figura 6, panel inferior). Esto resulta particularmente relevante dado que otros miembros de la familia MAGE-I, como MAGE-A2 y MAGE-C2, han sido descritos como inhibidores de la actividad transcripcional de p53. También utilizamos la línea HEK293T como modelo celular de origen no tumoral.

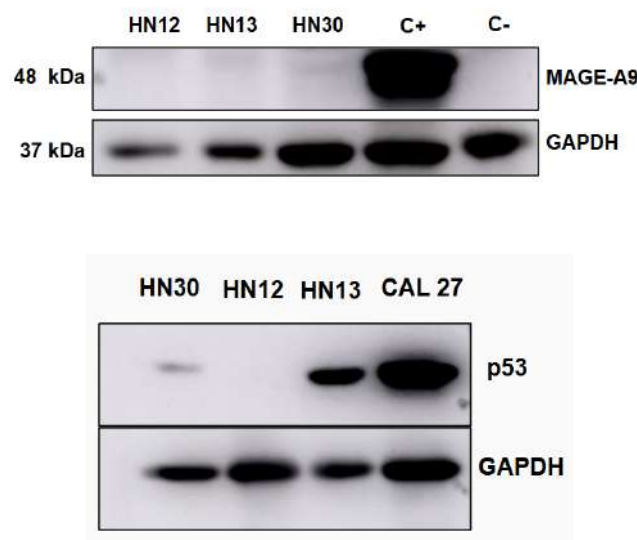


Figura 6. Control del grado de expresión de MAGE-A9 en las líneas celulares seleccionadas. panel superior: Las líneas HN12, HN13 y HN30 no expresan MAGE-A9 endógeno. Western Blot de lisados totales revelados con anticuerpo anti-MAGE-A9 endógeno. Se usaron HEK 293T transfectadas con 1000ng de 3xflag-MAGE-A9 como control positivo y sin transfectar como control negativo. Se reveló GAPDH como control de carga. Panel inferior: Grados de expresión de p53 en distintas líneas de carcinoma de cáncer de cabeza y cuello. Se analizaron los lisados de las líneas HN12, HN13, HN30 y Cal27 mediante Western Blot. Se reveló con anticuerpo primario anti-p53 (DO1). Se utilizó GAPDH como control de carga.

Utilizamos las siguientes líneas celulares:

- HN30: derivada de un carcinoma invasivo de faringe, que expresa p53 funcional (p53 wt).
- HN13: derivada de un carcinoma primario de lengua poco invasivo, que expresa p53 mutado (p.Val173Leu), una mutación caracterizada como mutaciones con ganancia de función oncogénica descritas para TP53 .
- HN12: derivada de una metástasis ganglionar, que porta una mutación en TP53 que da lugar a una proteína truncada y se considera funcionalmente p53-null.
- HEK293T: células embrionarias de riñón humano modificadas con el adenovirus 5 (HEK293) y el antígeno T grande del SV40 (HEK293T), utilizadas como línea epitelial de alta eficiencia de transfección para la generación de modelos con expresión constitutiva e inducible.

En conjunto, la selección de las líneas WSU-HN permitió establecer un sistema experimental particularmente informativo para el estudio de MAGE-A9 en cáncer de cabeza y cuello. La ausencia de expresión endógena de MAGE-A9, combinada con la presencia de distintos estados funcionales de p53 —incluyendo contextos p53 silvestre, mutado y nulo— proporciona un marco idóneo para analizar de manera controlada el impacto de MAGE-A9 sobre la respuesta al daño genotóxico y otros procesos celulares relevantes para la progresión tumoral. De este modo, los modelos elegidos constituyen una base sólida para las aproximaciones funcionales y ómicas que se desarrollan en las secciones siguientes.

2.2 Generación de modelos celulares con expresión constitutiva e inducible de MAGE-A9

Para la generación de los modelos inducibles utilizamos un sistema lentiviral Tet-On de tercera generación basado en el vector pcw57-GFP-2A-MCS (ver Materiales y Métodos sección 14), en el cual eliminamos el cassette de GFP y clonamos la secuencia 3×Flag-MAGE-A9. Con este sistema realizamos la transducción lentiviral de las líneas HN30, HN12 y HN13 y HEK293T generando así líneas celulares con expresión inducible de MAGE-A9 en respuesta a doxiciclina que se denominaron con las siglas MS-A9. Por ejemplo, las células HN30 estables e inducibles para Flag-MAGE-A9 se denominaron “HN30MS-A9”.

En paralelo, generamos un modelo con expresión constitutiva de MAGE-A9 en células HEK293T con el vector CMV 3xFlag-MAGE-A9 (ver materiales y métodos sección 14) mediante transfección con PEI y posterior aislamiento de clones estables por selección clonal.

En todos los casos corroboramos la expresión de MAGE-A9 por Western blot utilizando un anticuerpo anti-Flag (Figura 7).

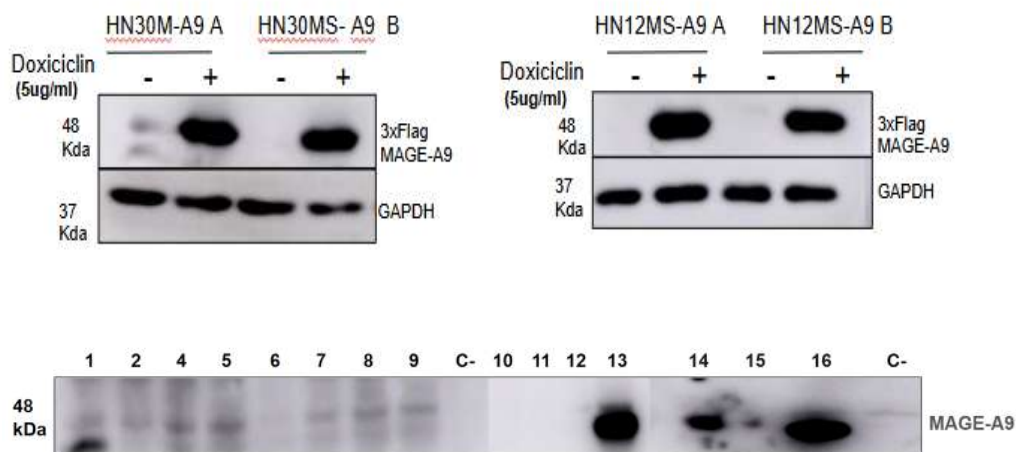


Figura 7. Expresión de MAGE-A9 en los modelos celulares generados. Panel superior: Expresión de MAGE-A9 en las líneas inducibles HN12MS-A9 y HN30MS-A9 en presencia y ausencia del inductor, doxiciclina. Las células se trataron con doxiciclina a 2 µg/ml durante 24 h. Las sublíneas A y B (HN12MS-A9 A, HN12MS-A9 B, HN30MS-A9 A y HN30MS-A9 B) corresponden a las réplicas en el proceso de transducción lentiviral. Panel inferior: Expresión constitutiva de MAGE-A9 en los distintos clones generados por selección clonal en células HEK293T.

Los modelos celulares desarrollados en este trabajo (HN30MS-A9 y HN12MS-A9 con expresión inducible y HEK293T con expresión estable de MAGE-A9) constituyen la base experimental sobre la cual se estructuró el resto del estudio. Estos sistemas nos permitieron modular de manera controlada la expresión de MAGE-A9 y analizar su impacto sobre procesos relevantes para la progresión tumoral, incluyendo la respuesta al daño genotóxico, la viabilidad y apoptosis celular, la migración y los cambios transcriptómicos y proteicos asociados.

Cabe mencionar que, junto a la estudiante Rocío Toppino, generamos también las líneas HN13MS-A9 y HEK293TMS-A9 con expresión inducible de MAGE-A9. Estas líneas no se incluyen en los análisis presentados en esta tesis y están siendo utilizadas en el marco del proyecto de la tesina de grado de Rocío, bajo mi co-dirección.

2.3 Localización subcelular de MAGE-A9

Los miembros de la subfamilia MAGE de tipo I presentan una notable heterogeneidad en su localización subcelular, lo que se asocia estrechamente con sus funciones moleculares. Mientras que algunas proteínas MAGE se localizan predominantemente en el núcleo, como MAGE-C2 y MAGE-A2 (6,7), otras muestran enriquecimiento en nucléolos, como MAGE-B2 y MAGE-B3 (8), y otras exhiben una distribución mixta entre núcleo y citoplasma, como MAGE-A4 (9). Dado que la localización subcelular puede condicionar tanto la interacción con complejos reguladores como los procesos biológicos en los que participa una proteína, nos propusimos determinar la localización de MAGE-A9 en los modelos celulares inducibles generados.

Para ello, realizamos ensayos de inmunofluorescencia en las líneas HN30 y HN12 con expresión inducible de MAGE-A9. Las células se sembraron sobre cubreobjetos, indujimos la expresión de la proteína mediante doxiciclina y, tras la fijación, incubamos las muestras con un anticuerpo primario anti-FLAG (M2), seguido de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor® 568. Los núcleos se

tiñeron con DAPI. Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus IX81/Fluoview FV1000 y se procesaron con el programa ImageJ (NIH).

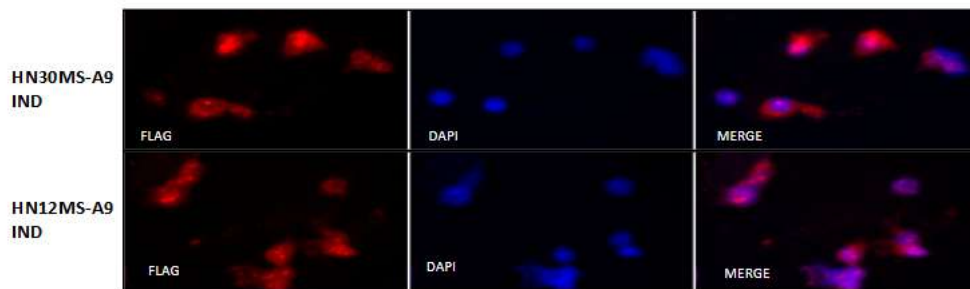


Figura 8: MAGE-A9 se localiza tanto en citoplasma como en núcleo. Inmunofluorescencia en células HN12MS-A9 y HN30MS-A9 inducidas con doxicilina. Se sembraron las células sobre cubreobjeto en placas P30, se las tiñó con anticuerpo primario anti Flag (M2) seguido de la incubación con anticuerpos secundarios acoplados a Alexa Fluor® 568. Tinción: Flag (rojo), núcleos con Dapi (Azul). Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus IX81/FluoviewFV 1000 y se procesaron con el programa ImageJ(NIH). Los núcleos celulares se tiñeron con Dapi (azul) y la proteína MAGE-A9 con verde. , con aumento 60X y aceite de inmersión y se procesaron con el programa ImageJ (NIH). El ensayo se repitió al menos tres veces.

El análisis por microscopía de fluorescencia mostró que MAGE-A9 se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células inducidas (Figura 8), sin evidencias de acumulación preferencial en nucléolos. Esta distribución núcleo-citoplasmática sugiere que MAGE-A9 podría participar en procesos reguladores en ambos compartimentos, incluyendo potencialmente la regulación transcripcional y de cromatina en el núcleo, así como eventos de señalización, adhesión y dinámica del citoesqueleto en el citoplasma y la periferia celular, aspectos que se exploran en capítulos posteriores de esta tesis.

Estos resultados indican que MAGE-A9 presenta una distribución nucleo-citoplasmática en los modelos celulares inducibles de carcinoma

escamoso de cabeza y cuello, sin enriquecimiento evidente en nucléolos. Esta localización mixta la distingue de otros miembros de la familia MAGE de tipo I que se concentran predominantemente en compartimentos nucleares específicos y sugiere que MAGE-A9 podría participar simultáneamente en procesos reguladores nucleares y citoplasmáticos. En particular, su presencia en el núcleo es compatible con funciones asociadas a la regulación transcripcional y de cromatina, mientras que su localización citoplasmática y periférica podría vincularse con eventos de señalización y dinámica celular, hipótesis que se investigan en las secciones posteriores de esta tesis.

2.4 Estabilidad de MAGE-A9 frente al tratamiento con quimioterapéuticos

Diversos estudios clínicos y preclínicos han reportado que MAGE-A9, como miembro de la familia de los cancer-testis antigens tipo I, se asocia con resistencia a tratamientos antitumorales, incluyendo quimioterapia y radioterapia, en distintos tipos de cáncer. En particular, en pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC), Meyer et al. (2018) demostraron que una alta expresión tumoral de MAGE-A9 se correlaciona con una reducción significativa de la supervivencia global, con tasas de sobrevida del 47 % en tumores MAGE-A9-altos frente al 73 % en aquellos con baja expresión. De manera concordante, en adenocarcinoma de pulmón, Zhai et al. reportaron que niveles elevados de MAGE-A9 se asocian con peor pronóstico y resistencia a quimioterapia (85), mientras que Hartmann et al. demostraron que la expresión agrupada de genes MAGE-A predice una menor eficacia de tratamientos antineoplásicos en HNSCC.

Sobre la base de estos antecedentes, analizamos experimentalmente si el daño genotóxico inducido por quimioterapéuticos afecta la estabilidad de MAGE-A9 en nuestros modelos celulares. Para ello, tratamos células HN30 (p53 salvaje) con expresión inducible de MAGE-A9 (HN30MS-A9) con concentraciones crecientes de cisplatino o etopósido, y evaluamos los niveles de la proteína mediante Western blot (Figura 9).

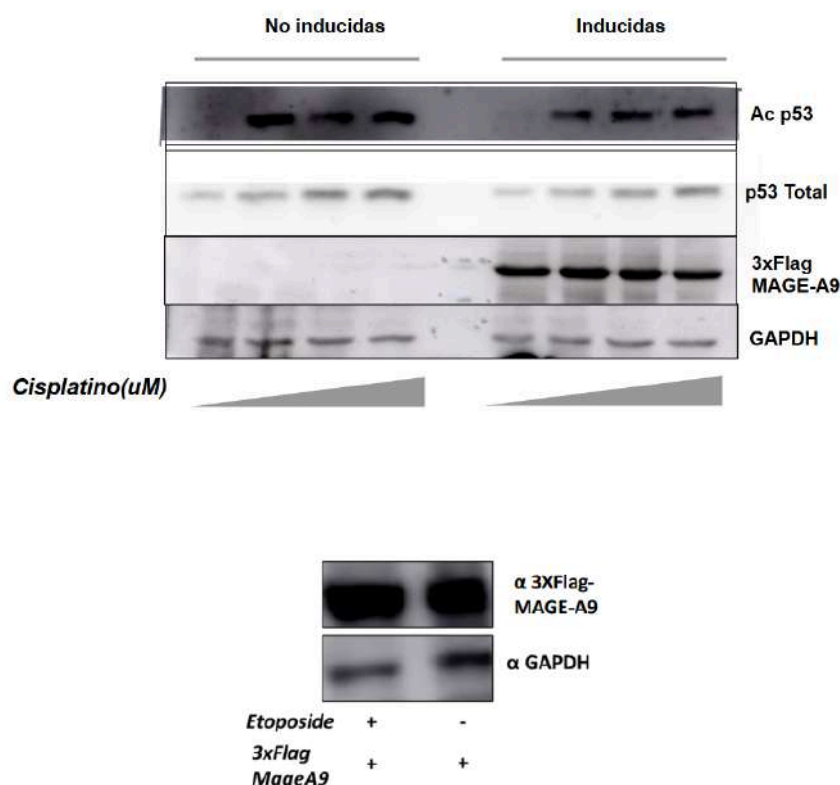


Figura 9. El tratamiento con quimioterapéuticos como Cisplatino y Etopósido no altera la estabilidad de MAGE-A9. Panel superior: Western Blot de células HN30MS-A9 expuestas a concentraciones crecientes de Cisplatino (0, 2.5, 5, 10 μ g/ml).Inducidas con doxiciclina 2 μ g/ml durante 48 hs Se reveló con anticuerpo 3xFlag. Se reveló GAPDH como control de carga. Se reveló p53 y Ac p53 como control de daño. Panel inferior: Se transfectaron células U2OS con 1000ng de 3xflagMAGEA9 y se las trató con 5 μ M Etoposide o DMSO (control) durante 24hs. Se analizaron los lisados celulares mediante Western Blot. Se reveló GAPDH como control de carga.

En nuestras condiciones experimentales, la exposición a ambos fármacos no modificó de manera apreciable la abundancia de MAGE-A9, que se mantuvo estable en todas las condiciones ensayadas. En los experimentos con cisplatino analizamos además marcadores de daño y respuesta, incluyendo p53 total y p53 acetilado, cuyos resultados se discuten en detalle en capítulos posteriores (sección 3.4.3). En esta sección nos centramos exclusivamente en MAGE-A9 y su comportamiento frente al daño genotóxico, destacando que la quimioterapia basada en cisplatino y

etopósido no afecta significativamente su estabilidad proteica, aún en condiciones de activación de la respuesta al daño al ADN.

En conjunto, estos resultados indican que MAGE-A9, además de ser refractaria a la modulación por la vía MAPK (Parte 1), también presenta una notable estabilidad frente a insultos genotóxicos clínicamente relevantes, como cisplatino y etopósido. Esta resistencia a la desestabilización proteica bajo condiciones de daño al ADN sugiere que MAGE-A9 puede persistir en células tumorales sometidas a presión terapéutica, una propiedad que podría contribuir a su asociación con resistencia al tratamiento y mal pronóstico en cáncer.

La generación y caracterización de modelos celulares con expresión inducible y constitutiva de MAGE-A9 nos permitió establecer una plataforma experimental robusta para el análisis de esta oncoproteína en un contexto tumoral relevante. Mediante la selección de líneas de carcinoma escamoso de cabeza y cuello con distintos estados funcionales de p53, la construcción de sistemas de expresión regulada y su validación molecular, obtuvimos herramientas que permiten evaluar de manera controlada el impacto de MAGE-A9 sobre distintos procesos celulares.

La caracterización inicial de estos modelos reveló que MAGE-A9 presenta una localización nucleo-citoplasmática y una estabilidad notable frente tanto a la modulación de la vía MAPK como al daño genotóxico inducido por quimioterapéuticos. Estas propiedades distinguen a MAGE-A9 de otros miembros de la familia MAGE y sugieren que su persistencia en contextos de estrés celular podría conferirle ventajas funcionales en la progresión tumoral.

Sobre esta base, en la Parte 3 abordamos el análisis transcriptómico global de estos modelos mediante RNA-seq, con el objetivo de identificar los programas génicos y las vías de señalización reguladas por MAGE-A9 y de inferir los mecanismos moleculares a través de los cuales esta oncoproteína contribuye al fenotipo tumoral.

PARTE 3

3. Análisis transcriptómico: impacto global de la expresión de MAGE-A9 sobre la expresión génica

Como mencionamos en la introducción (sección 3.4) hasta el momento, la literatura disponible indica que niveles elevados de MAGE-A9 se asocian con estadios avanzados, metástasis linfática y menor respuesta a quimioterapia o radioterapia tanto en HNSCC como en otros tumores epiteliales, incluyendo pulmón, hígado, ovario, esófago y mama (76,78–81).

Con base en estas observaciones, nos propusimos caracterizar el impacto global de la expresión de MAGE-A9 sobre el transcriptoma de células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello.

3.1 Diseño experimental y análisis del RNA-seq

Con el objetivo de caracterizar los programas génicos modulados por MAGE-A9 y evaluar su posible influencia **sobre la respuesta celular al daño genotóxico**, realizamos un análisis de secuenciación de RNA (RNA-seq) en el modelo HN30MS-A9. Este enfoque permite cuantificar de manera global los niveles de ARNm de miles de genes en una muestra celular, proporcionando una visión integral del estado transcripcional de las células. Para este análisis global, elegimos las células HN30MS-A9 ya que contienen wt-p53 y el análisis de esta vía es de interés para este proyecto.

El diseño experimental incluyó células no inducidas e inducidas con doxíciclina 2ug/ml por 48 hs. Realizamos la comparación entre células HN30MS-A9 inducidas y no inducidas. Cada condición se ensayó por triplicado,

A partir de cada condición extrajimos RNA total, el cual fue enviado a la compañía MacroGen Inc. y sometido a controles de calidad para asegurar su integridad y pureza antes de la construcción de las bibliotecas de secuenciación. Estas

bibliotecas fueron luego secuenciadas, generándose archivos en formato FASTQ, que contienen las lecturas crudas (reads) obtenidas para cada muestra.

El análisis bioinformático del RNA-seq lo realizamos siguiendo un flujo de trabajo estándar, que incluyó las siguientes etapas principales:

1. Control de calidad y filtrado de lecturas

Se evaluó la calidad de las lecturas (por ejemplo, presencia de errores de secuenciación, adaptadores o regiones de baja calidad) y se eliminaron aquellas que no cumplían los criterios establecidos, asegurando que los análisis posteriores se basaran en datos confiables.

2. Cuantificación de la expresión génica

Las lecturas filtradas se cuantifican contra el transcriptoma humano de referencia utilizando Kallisto, un algoritmo que estima de forma rápida y precisa cuántas lecturas corresponden a cada gen o transcripto, generando una matriz de niveles de expresión para cada muestra.

3. Normalización de los datos

Los valores de expresión fueron normalizados para corregir diferencias en la profundidad de secuenciación y permitir comparaciones válidas entre muestras.

4. Exploración global del dataset

Se realizó el análisis no supervisado, Análisis de Componentes Principales (PCA por su nombre en inglés *Principal Component Analysis*), que permite visualizar si las muestras se agrupan según la expresión de MAGE-A9. En nuestro dataset el PCA mostró una separación clara entre las condiciones $\pm$ MAGE-A9.

5. Identificación de genes diferencialmente expresados (DEGs)

Se utilizó el paquete limma voom (R/Bioconductor) para identificar los genes diferencialmente expresados (DEGs) entre condiciones,

6. Análisis funcional de los cambios de expresión

Con el fin de interpretar biológicamente los cambios observados, se aplicaron dos estrategias complementarias de análisis de enriquecimiento funcional: Over-Representation Analysis (ORA) y Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).

Este diseño experimental y el flujo de trabajo analítico (Figura 10) nos permitieron evaluar de manera sistemática cómo la expresión de MAGE-A9 reconfigura el paisaje transcriptómico de células HN30 .

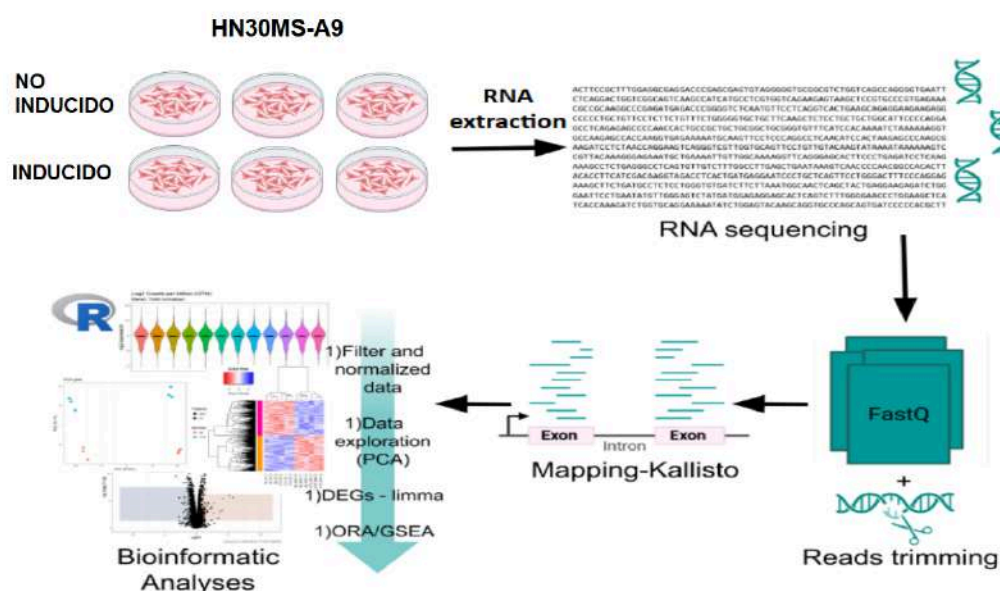


Figura 10: Esquema del diseño experimental y flujo de trabajo.

3.2 Genes diferencialmente expresados (DEGs) regulados por MAGE-A9

Para identificar los genes cuya expresión se ve modificada en las células HN30MS-A9 por la presencia de MAGE-A9, realizamos comparaciones entre las condiciones inducidas y no inducidas. Se consideraron genes diferencialmente

expresados (DEGs) aquellos que presentaron un p valor ≤ 0.05 y un FDR (False Discovery Rate) > 0 .

La inducción de MAGE-A9 alteró significativamente la expresión de 1469 genes en las células HN30. De estos, 675 genes se encuentran regulados positivamente (de ahora en más, up-regulados) y 794 genes regulados en forma negativa (de ahora en más, down-regulados), indicando que MAGE-A9 ejerce un impacto sustancial sobre el programa transcriptómico.

El volcano plot correspondiente (Figura 11) muestra una distribución amplia de genes diferencialmente expresados, con cambios de magnitud elevada tanto en dirección positiva como negativa. Entre los genes más fuertemente inducidos por MAGE-A9 se destacan *MAGE-A9* y *MAGEA9B* (genes que representan una duplicación genómica contigua con secuencias de mRNA 99% idénticas y regiones codificantes idénticas), confirmando la correcta activación del sistema inducible.

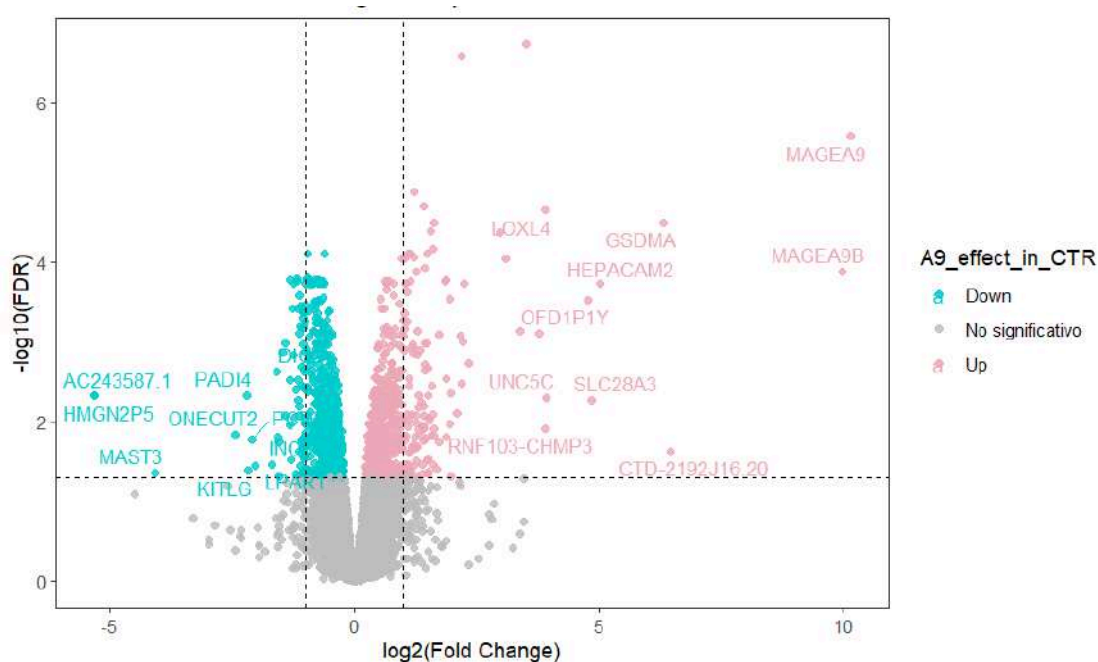


Figura 11. La expresión de MAGE-A9 reprograma el transcriptoma en células HN30MS-A9. Volcano plot de los genes diferencialmente expresados en células HN30MS-A9 ($\pm$ doxiciclina). El eje x representa el $\log_2(\text{Fold Change})$ y el eje y el $-\log_{10}(\text{FDR})$ ajustado por el método de Benjamini–Hochberg. Las líneas punteadas indican los umbrales de significancia ($|\log_2\text{FC}| \geq 1$ y $\text{FDR} \leq 0,05$). Los puntos coloreados corresponden a genes significativamente up-regulados o down-regulados en presencia de MAGE-A9, y se rotulan aquellos 10 con mayor magnitud de cambio. Los datos corresponden a réplicas biológicas independientes por condición.

Estos resultados evidencian que la expresión de MAGE-A9 tiene un impacto sustancial sobre el transcriptoma de las células HN30. La identificación de 1469 genes diferencialmente expresados, con cambios tanto positivos como negativos, sugiere la existencia de un estado transcripcional asociado a la expresión de MAGE-A9 que es intrínseco a este modelo celular y detectable aun en ausencia de tratamientos adicionales.

3.3 Enriquecimiento funcional de los genes regulados por MAGE-A9

Para interpretar biológicamente los cambios inducidos por MAGE-A9, abordamos el análisis de enriquecimiento funcional mediante dos estrategias complementarias: Over-Representation Analysis (ORA), aplicado a los genes diferencialmente expresados, y Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), basado en el ranking completo del transcriptoma. Mientras que ORA permite identificar procesos sobrerrepresentados entre los genes que presentan cambios significativos de expresión, GSEA detecta programas transcripcionales coordinados considerando la totalidad de los genes, incluso cuando los cambios individuales son modestos.

La combinación de ORA y GSEA proporciona una visión robusta y complementaria de los procesos celulares y rutas de señalización moduladas por la expresión de MAGE-A9.

Es importante destacar que, en los análisis de enriquecimiento basados en colecciones de firmas transcripcionales (como MSigDB C6 y Reactome), los nombres de las vías o firmas no representan necesariamente la activación o inhibición directa de dichas rutas en nuestro modelo experimental. En cambio, estos conjuntos corresponden a programas génicos definidos en otros sistemas, por lo que su enriquecimiento indica similitud entre estados transcripcionales, y no una relación causal directa con la actividad de una vía específica.

En primer lugar, realizamos el análisis de enriquecimiento funcional de los genes con expresión disminuída (down regulados) en presencia de MAGE-A9, con el objetivo de identificar los programas celulares reprimidos. Para ello, llevamos a

cabo un análisis de sobre-representación funcional (ORA) utilizando dos enfoques complementarios: (i) un ORA basado en ontologías funcionales mediante la plataforma g:Profiler y (ii) un ORA basado en firmas oncogénicas de la colección C6 (Cancer Signatures) empleando el paquete *clusterProfiler*.

Representamos los resultados en gráficos tipo bubble plot (Figura 12 y Figura 13), donde el eje y indica las vías o funciones biológicas enriquecidas, mientras que el eje x representa el *gene ratio*, definido como la proporción de genes del conjunto analizado asociados a cada término (*intersection size / query size*). El tamaño de las burbujas refleja el *gene count*, es decir, el número absoluto de genes que contribuyen al enriquecimiento de cada vía. El color de las burbujas indica la significancia estadística del enriquecimiento, expresada como $-\log_{10}(p\text{-value})$, donde valores más altos (colores más intensos) corresponden a mayor significancia.

Dado el gran número de vías alteradas por la expresión de MAGE-A9 que hemos obtenido mediante estas aproximaciones, solo hemos focalizado en los nodos más significativos en cuanto a los análisis cuantitativos (top 1) y los más significativos desde el punto de vista de la potencial asociación con el fenotipo clínico de los tumores MAGE-A9 positivos.

En el análisis basado en ontologías funcionales mediante g:Profiler (Figura 12, panel superior) las dos vías con mayor enriquecimiento entre los genes cuya expresión disminuye en presencia de MAGE-A9 corresponden a *cell cycle* y *DNA repair*. Estos resultados indican que la expresión de MAGE-A9 se asocia con una menor expresión de genes involucrados en el control del ciclo celular y en el mantenimiento de la integridad genómica. En concordancia con este resultado, en posiciones posteriores del análisis observamos las categorías *cell cycle checkpoint signaling* y *DNA integrity checkpoint signaling*, que agrupan genes implicados en los mecanismos de vigilancia del ciclo celular frente a daño en el ADN. La capacidad de proteínas de la familia MAGE de modular programas asociados al ciclo celular ha sido descrita previamente como es el caso de MAGE-A11 que regula a la ciclina A y promueve el ciclo celular (Feng et al.2011)(86).

Además identificamos múltiples términos relacionados con la regulación de la vía del oncosupresor p53, incluyendo *Transcriptional Regulation by TP53*, *Regulation of*

TP53 Activity y *p53 signaling pathway*. La disminución de genes asociados a esta vía resulta consistente con lo descrito para otras proteínas de la familia MAGE. En particular, nuestro grupo ha demostrado previamente que MAGE-A2 puede inhibir la actividad transcripcional de p53, modulando la expresión de genes dependientes de este oncosupresor (Monte et al. 2026)(64). En este contexto, la reducción de genes vinculados a la respuesta al daño en el ADN y a programas regulados por p53 observada en presencia de MAGE-A9 constituye un hallazgo esperado. Dado que la inhibición de la actividad de p53 se asocia frecuentemente con resistencia al daño genotóxico y a la quimioterapia, este hallazgo sugiere la primera relación entre la expresión de MAGE-A9 y el mal pronóstico clínico en cuanto a la resistencia a fármacos.

Asimismo, este análisis reveló una represión de procesos relacionados con adhesión célula–célula e identidad epitelial, incluyendo términos como *homophilic cell adhesion via plasma membrane* y *calcium-dependent cell–cell adhesion*, en los que participan genes como CD44 y SDC1, lo que sugiere una disminución de la cohesión epitelial y de la arquitectura tisular. Este patrón es consistente con la pérdida de rasgos epiteliales y con procesos de dediferenciación celular. En distintos tipos tumorales, la expresión elevada de MAGE-A9 se ha asociado con tumores pobremente diferenciados y con la presencia de metástasis (75), fenotipos compatibles con una disminución de la cohesión celular y con la adquisición de estados celulares más plásticos e invasivos.

De manera llamativa, identificamos el término *epithelial to mesenchymal transition*. En Reactome, este proceso no corresponde a una única cascada lineal, sino a un programa biológico complejo que agrupa múltiples eventos moleculares. Este hallazgo debe interpretarse en el contexto de otros análisis de enriquecimiento, en los que observamos una disminución de programas asociados a adhesión célula–célula y mantenimiento de características epiteliales. Aunque estos resultados podrían parecer opuestos, en conjunto podrían sugerir que la expresión de MAGE-A9 se asocia con una modulación no canónica de procesos de identidad celular, más que con la activación de un programa EMT completo (cita).

Finalmente, observamos enriquecimiento de términos relacionados con la regulación de la ubiquitinación, incluyendo *regulation of ubiquitin protein ligase activity* y *regulation of ubiquitin-protein transferase activity*. Estos términos agrupan genes involucrados en la regulación de la actividad de E3 ligasas y en la modulación de la transferencia de ubiquitina hacia proteínas sustrato, procesos centrales en el control de la ubiquitinación dependiente de E3. La asociación de proteínas de la familia MAGE con la modulación de la ubiquitinación ha sido ampliamente descrita en la bibliografía. En la mayoría de los sistemas estudiados, estas proteínas actúan como cofactores de E3 ligasas, favoreciendo la ubiquitinación de sustratos canónicos o promoviendo la incorporación de nuevos sustratos a estos complejos (86-88).

En el análisis basado en firmas oncogénicas de la colección C6 (Figura 12, panel inferior) identificamos enriquecimiento de múltiples firmas génicas. En primer lugar observamos *RB_P107_DN.V1_UP* (genes cuya expresión aumenta cuando se reduce o inhibe p107/RBL1). Esta firma corresponde a componentes de la vía del oncosupresor pRB (proteína del retinoblastoma), un eje central en el control de la proliferación celular. Alteraciones que conducen a la pérdida de control proliferativo mediado por la vía pRb/E2F son frecuentes en cáncer y constituyen blancos de múltiples oncogenes. Esta vía tampoco es ajena a proteínas de la familia MAGE-I. Nuestro grupo ha demostrado previamente que la expresión de MAGE-B2 induce la actividad de E2F1 mediante el secuestro de HDAC1 del complejo represor pRB/HDAC1 asociado a E2F (Pêche et al., 2015). Asimismo, se ha reportado que MAGE-A11 puede activar la vía de E2F. Llamativamente, en nuestro análisis esta firma aparece enriquecida entre los genes down-regulados en presencia de MAGE-A9. Dado que esta firma corresponde a genes inducidos tras la pérdida de p107, su disminución en presencia de MAGE-A9 resulta compatible con una menor activación de programas proliferativos dependientes de E2F y, por lo tanto, con una mayor actividad funcional del eje RB. En concordancia con esta observación, también detectamos las firmas *E2F1_UP.V1_UP* (*genes inducidos por el factor de transcripción E2F1*) y *E2F3_UP.V1_UP* (*genes inducidos por el factor de transcripción E2F3*) entre los conjuntos génicos cuya expresión disminuye en presencia de MAGE-A9. Este resultado contrasta con lo esperado en células que expresan proteínas de la familia MAGE, generalmente asociadas a fenotipos

pro-proliferativos. Sin embargo, en nuestros ensayos experimentales preliminares no observamos diferencias significativas en la proliferación celular en presencia o ausencia de MAGE-A9, evaluada mediante ensayos de viabilidad celular por MTT (datos no mostrados).

En segundo lugar identificamos significativamente alterada la firma *CSR_LATE_UP.V1_UP*, compuesta por genes inducidos en la respuesta a suero en fibroblastos. Esta firma proviene de un estudio transcriptómico clásico en el que se analizaron genes inducidos en fibroblastos humanos tras reestimulación con suero, denominándose *CSR_LATE* (Core Serum Response tardío). En fibroblastos normales estos genes se asocian con procesos de remodelación de matriz extracelular, adhesión celular, migración, interacción con el estroma y secreción de factores parácrinos, reflejando un programa de activación fibroblástica o reparación tisular. Estos programas pueden activarse en respuesta a estímulos proliferativos sostenidos, que en contextos tumorales suelen asociarse con estrés oncogénico, una condición generada por la activación persistente de señales proliferativas. Debido a que estos procesos también se encuentran frecuentemente activados en tumores, esta firma fue incorporada posteriormente a la colección C6 oncogenic signatures de MSigDB. En nuestro análisis, esta firma aparece enriquecida entre los genes reprimidos en presencia de MAGE-A9, lo que sugiere una menor activación de este programa transcripcional. Este resultado podría interpretarse de dos maneras. En primer lugar, la expresión de MAGE-A9 podría asociarse con una menor activación del programa de respuesta al estrés oncogénico, reduciendo la inducción de genes involucrados en estos procesos. Alternativamente, las células podrían seguir experimentando estímulos proliferativos o condiciones de estrés, pero MAGE-A9 permitiría tolerar ese estrés sin activar completamente el programa adaptativo tardío, amortiguando la necesidad de inducir estos genes. Este tipo de comportamiento ha sido descrito para distintos oncogenes, donde la señal de estrés persiste pero las respuestas transcripcionales asociadas se encuentran parcialmente atenuadas, favoreciendo la supervivencia celular.

Una de las firmas que llamó nuestra atención fue *VEGF_A_UP.V1_DN* compuesta por genes down regulados en células endoteliales en respuesta al tratamiento con VEGF-A (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular A). Esto sugiere una

modulación de programas transcripcionales asociados a señalización angiogénica y remodelación del microambiente tumoral.

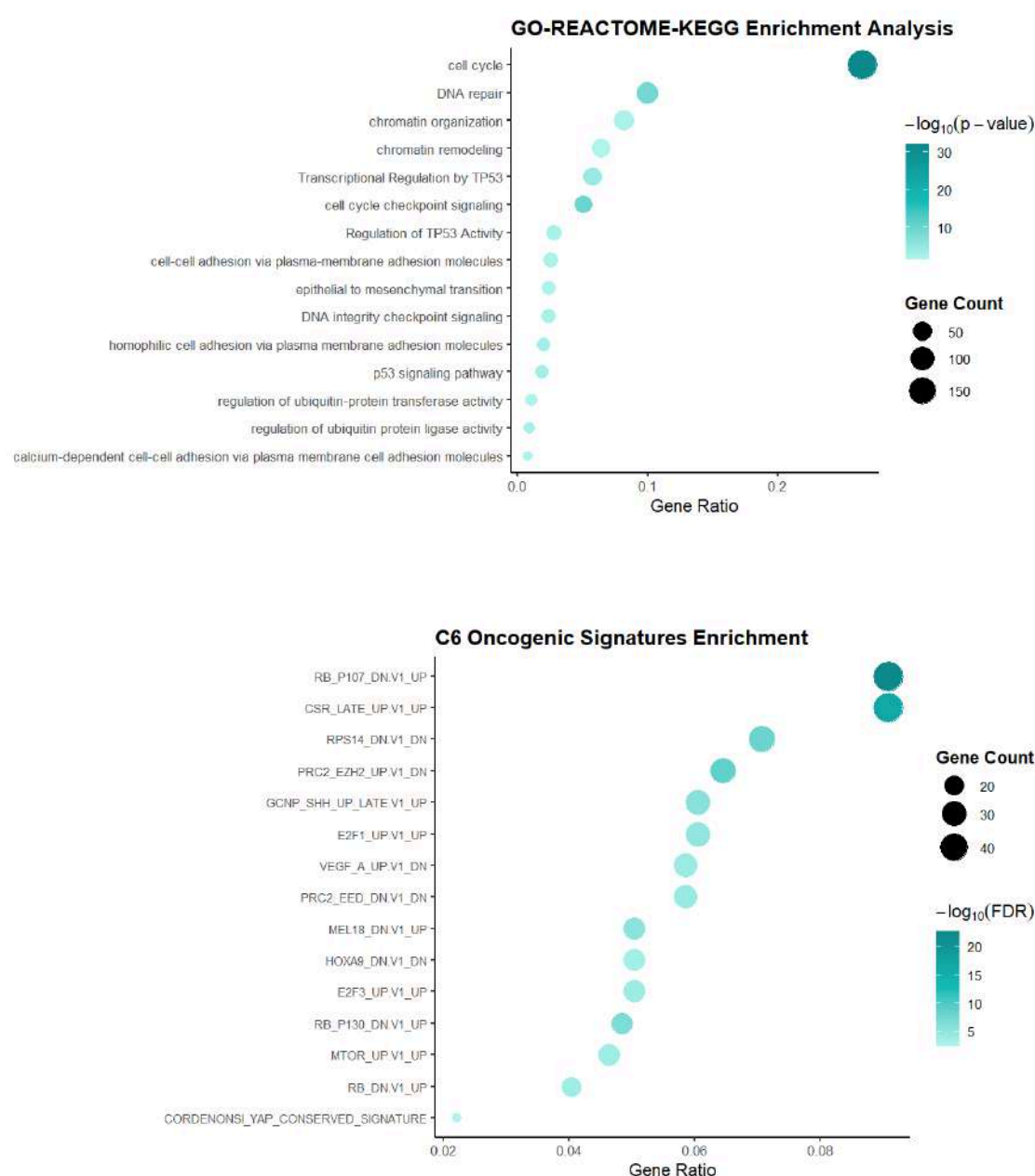


Figura 12. Enriquecimiento funcional de los genes down-regulados en presencia de MAGE-A9. Panel superior: Análisis de sobre-representación funcional (ORA) realizado mediante la plataforma *g:Profiler* sobre los genes con menor expresión en células HN30 con MAGE-A9 inducida respecto del control, utilizando distintas bases de datos, como GO:BP, REACTOME, CORUM. **Panel inferior.** Análisis de sobre-representación funcional (ORA) realizado mediante el paquete *clusterProfiler* utilizando la colección C6 (Cancer Signatures) de MSigDB sobre el mismo conjunto de genes. El eje y indica las vías o funciones biológicas enriquecidas, mientras que el eje x representa el gene ratio, definido como la

proporción de proteínas del interactoma asociadas a cada término (intersection size / query size). El tamaño de las burbujas refleja el gene count, es decir, el número absoluto de proteínas que contribuyen al enriquecimiento de cada vía. El color de las burbujas indica la significancia estadística del enriquecimiento, expresada como $-\log_{10}(p\text{-value})$, donde valores más altos (colores más intensos) corresponden a mayor significancia. La corrección por múltiples comparaciones se realizó mediante el método de Benjamini–Hochberg para estimar el FDR (False Discovery Rate). Las referencias correspondientes a cada vía se indican en la figura.

Posteriormente, analizamos el enriquecimiento funcional de los genes cuya expresión se encuentra aumentada (**up-regulados**) en presencia de MAGE-A9.

Comenzamos haciendo un análisis basado en ontologías funcionales mediante g:Profiler utilizando los repositorios Gene Ontology y Reactome (Figura 13, panel superior). El término más enriquecido identificado en este análisis es *response to stimulus*, que presenta el mayor gene ratio. Esta categoría, definida en Gene Ontology (Biological Process) como cualquier proceso en el que una célula modifica su estado o actividad en respuesta a un estímulo, constituye un término amplio que refleja una reprogramación global de la respuesta celular. En este contexto, los términos restantes corresponden a categorías más específicas, principalmente vinculadas a procesos inmunológicos, incluyendo *immune response*, *innate immune response* e *Interferon Signaling*, que describen distintos niveles de activación de la respuesta inmune, en particular de la inmunidad innata y de la señalización mediada por interferones.

Este hallazgo resulta particularmente interesante en el contexto de la familia MAGE. Las proteínas MAGE-A fueron originalmente identificadas como antígenos tumorales capaces de ser presentados en la superficie de células tumorales en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) y reconocidos por linfocitos T citotóxicos. Debido a su expresión restringida en tejidos inmunoprivilegiados y su re-expresión en tumores, estos antígenos fueron ampliamente explorados como blancos de inmunoterapia. En este sentido, distintos miembros de la familia, como MAGE-A3 y MAGE-A4, han sido evaluados en ensayos clínicos en humanos mediante estrategias de vacunación y transferencia adoptiva de linfocitos T con TCR específicos, con resultados variables en términos

de eficacia y seguridad (van der Bruggen et al., 1991; Dreno et al., 2018; D'Angelo et al., 2024).

Sin embargo, estos estudios se han centrado en la inmunogenicidad de los antígenos MAGE y no en su función biológica en la modulación de la respuesta inmune. Hasta donde se ha reportado, no existen estudios que evalúen directamente el rol de proteínas MAGE en procesos de evasión inmune, ni evidencia que vincule específicamente a MAGE-A9 con la regulación de la respuesta inmune. En este contexto, nuestros resultados sugieren una posible asociación entre la expresión de MAGE-A9 y programas transcripcionales vinculados a inmunidad innata y señalización por interferón, constituyendo, hasta donde sabemos, la primera evidencia que relaciona la expresión de MAGE-A9 con la activación de respuestas inmunes a nivel transcriptómico.

En segundo lugar, realizamos el análisis de enriquecimiento utilizando la base de datos C6 – Cancer Signatures mediante clusterProfiler (Figura 13, panel inferior). La firma con mayor gene ratio es *LTE2_UP.V1_DN*, que corresponde a una firma transcripcional derivada de un modelo experimental y no a una vía biológica definida. Esta firma incluye genes que se encuentran reprimidos en células MCF-7 adaptadas a crecimiento independiente de estrógeno, un modelo asociado a procesos de adaptación tumoral frente a la pérdida de señales proliferativas.

El enriquecimiento de esta firma entre los genes inducidos por MAGE-A9 indica que dichos genes se solapan con aquellos que se encuentran disminuidos en ese modelo. Sin embargo, dado que nuestro sistema corresponde a cáncer de cabeza y cuello, esta asociación no debe interpretarse en términos de señalización hormonal, sino como la coincidencia parcial con un programa transcripcional previamente descrito en otro contexto biológico. En este sentido, la composición de los genes inducidos por MAGE-A9, enriquecida en genes clásicos de respuesta a interferón e inmunidad innata, incluyendo IRF7, IRF9, OAS1, OAS2, IFIT1, IFIT3, IFIT5, DDX60 y HERC5, sugiere que este enriquecimiento refleja principalmente la activación de programas de inmunidad innata, más que procesos asociados a dependencia hormonal, como vimos en la Figura 14 panel superior.

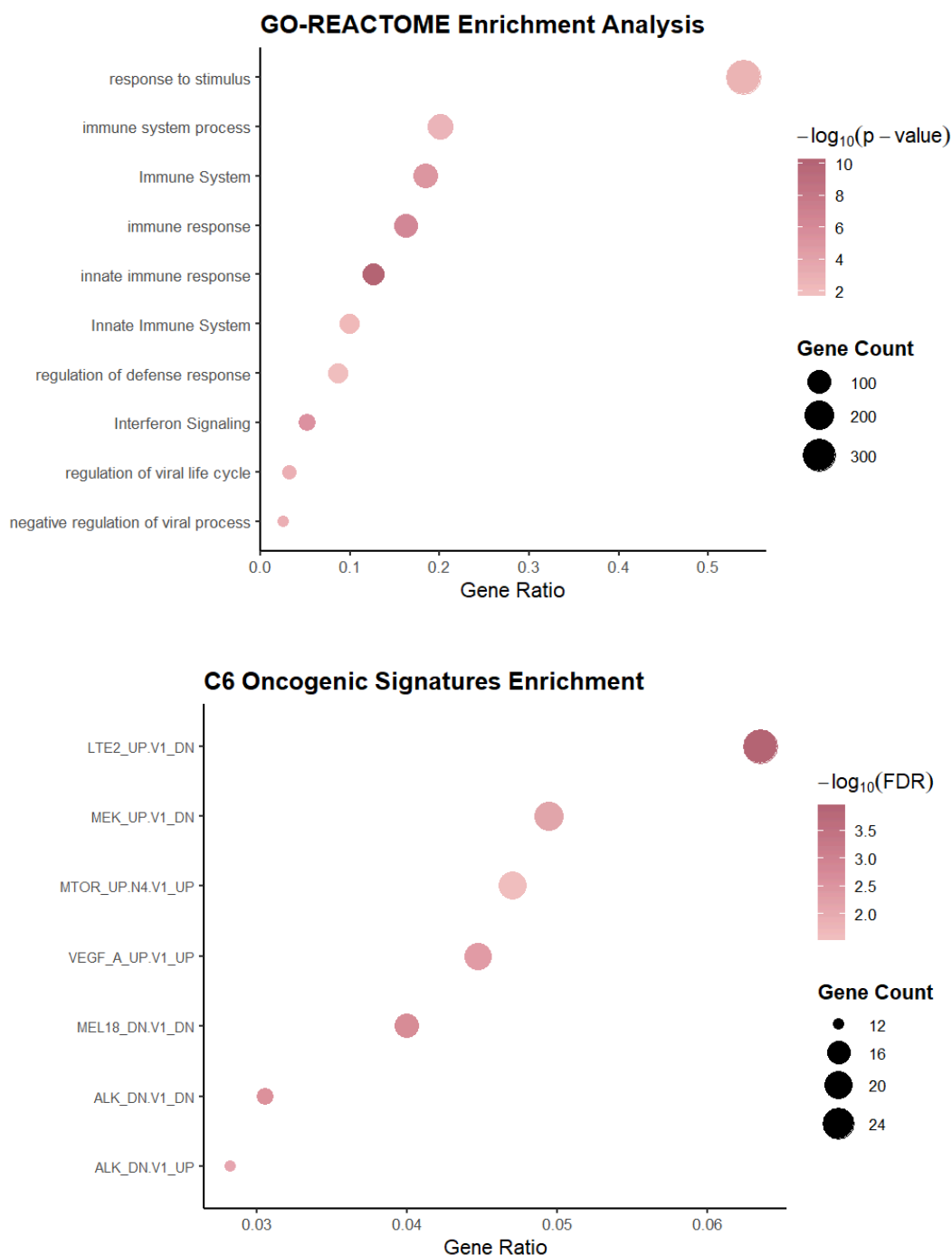


Figura 13. Enriquecimiento funcional de los genes up-regulados en presencia de MAGE-A9. Panel superior: Bubble plot del Análisis de sobre-representación funcional (ORA) realizado mediante la plataforma g:Profiler sobre los genes con mayor expresión en células HN30 con MAGE-A9 inducida respecto del control, utilizando rutas de la base de datos Reactome. Panel inferior: Bubble plot del Análisis de sobre-representación funcional (ORA) realizado mediante el paquete *clusterProfiler* utilizando la colección C6 (Cancer Signatures) de MSigDB sobre el mismo conjunto de genes. El eje y indica las vías o funciones biológicas enriquecidas, mientras que el eje x representa el gene ratio, definido como la proporción de proteínas del interactoma asociadas a cada término (intersection size / query

size). El tamaño de las burbujas refleja el gene count, es decir, el número absoluto de proteínas que contribuyen al enriquecimiento de cada vía. El color de las burbujas indica la significancia estadística del enriquecimiento, expresada como $-\log_{10}(p\text{-value})$, donde valores más altos (colores más intensos) corresponden a mayor significancia. La corrección por múltiples comparaciones se realizó mediante el método de Benjamini–Hochberg para estimar el FDR. Las referencias correspondientes a cada vía se indican en la figura. Los nombres de las vías o funciones biológicas y su significado pueden encontrarse en la base de datos MSigDB (Molecular Signatures Database, Broad Institute).

En la parte superior de la Figura 13 se muestra que la expresión de MAGE-A9 se asocia a una regulación positiva significativa de genes enriquecidos en categorías funcionales vinculadas al sistema inmune y la respuesta inmune. Este patrón sugiere que MAGE-A9 podría modular programas transcripcionales relacionados con la interacción célula–microambiente y con procesos de señalización inflamatoria o inmunológica

Entre las firmas enriquecidas, además de la firma con mayor gene ratio previamente analizada, nos enfocamos en aquellas que despertaron nuestro interés por su relevancia biológica, como *VEGF_A_UP.V1_UP*, que agrupa genes inducidos por VEGF-A en células endoteliales, incluyendo SERPINA3, IRF9, HERC5 y STAT1. El enriquecimiento de esta firma sugiere similitud con programas asociados a angiogénesis y remodelación del microambiente tumoral. Cabe destacar que varios de estos genes, como IRF9 y STAT1, son también blancos clásicos de señalización por interferón, lo que indica la coexistencia de componentes inflamatorios dentro de este programa, en concordancia con lo observado en el análisis (Figura 13 panel superior).

Asimismo, observamos el enriquecimiento de la firma *MTOR_UP.N4.V1_UP*, definida como genes inducidos en contextos de activación de mTOR. En nuestro análisis, esta firma incluye genes asociados a estrés celular y adaptación metabólica, lo que sugiere la activación de programas de reprogramación metabólica y respuesta a estrés.

En forma complementaria, realizamos un análisis global mediante GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). A diferencia de los enfoques basados en umbrales (ORA), GSEA considera la totalidad del transcriptoma, permitiendo detectar cambios

coordinados incluso cuando las variaciones individuales son moderadas. El principal resultado de este análisis es el *Normalized Enrichment Score* (NES), que refleja la magnitud y dirección del enriquecimiento, mientras que su significancia se evalúa mediante el *false discovery rate* (FDR). Para este análisis utilizamos las colecciones CP/Reactome y C6 oncogenic signatures (Figura 14).

Este análisis confirmó y extendió las observaciones obtenidas mediante ORA, mostrando una convergencia consistente entre firmas derivadas de bases de datos independientes. En particular, observamos que los genes up-regulados en presencia de MAGE-A9 se asocian principalmente con la activación de programas de inmunidad innata y señalización por interferón, evidenciada por el enriquecimiento positivo de vías como *REACTOME_INTERFERON_ALPHA_BETA_SIGNALING*, *REACTOME_INTERFERON_SIGNALING* y *REACTOME_DDX58_IFIH1_MEDIATED_INDUCITION_OF_INTERFERON_ALPHA_BETA* (Figura 14, panel superior). Estas firmas estuvieron impulsadas por la sobreexpresión de genes clave como STAT2, IRF9, IRF7 y RIPK1.

De manera complementaria, detectamos el enriquecimiento de vías asociadas a angiogénesis y remodelación del microambiente tumoral, incluyendo *REACTOME_VEGFR2_MEDIATED_VASCULAR_PERMEABILITY*, cuyo *leading edge* incluyó genes como VEGFA, CDH5, NOS3, VAV1, CTNNB1 y RICTOR (Figura 14, panel superior). En concordancia, la colección C6 mostró enriquecimiento positivo de la firma *VEGF_A_UP.V1_UP*, así como de *MTOR_UP.N4.V1_UP*, indicando la activación de programas vinculados a señalización proangiogénica, crecimiento celular y adaptación metabólica (Figura 14 panel inferior).

Por otro lado, los genes down-regulados se asociaron con la represión de programas vinculados a control del ciclo celular, vigilancia genómica y respuesta al daño en el ADN, evidenciada por el enriquecimiento negativo de vías como *REACTOME_TRANSCRIPTIONAL_REGULATION_BY_TP53*, *REACTOME_CELL_CYCLE_MITOTIC* y *REACTOME_CELL_CYCLE_CHECKPOINTS* (Figura 14, panel superior). Estas firmas estuvieron impulsadas por la disminución de genes centrales como CCNB1, CDK1, CCNA2 y MCM2. De manera concordante, observamos enriquecimiento

positivo de la firma *P53_DN.V2_UP* en la colección C6, consistente con la atenuación funcional de la actividad de p53 (Figura 14 panel inferior).

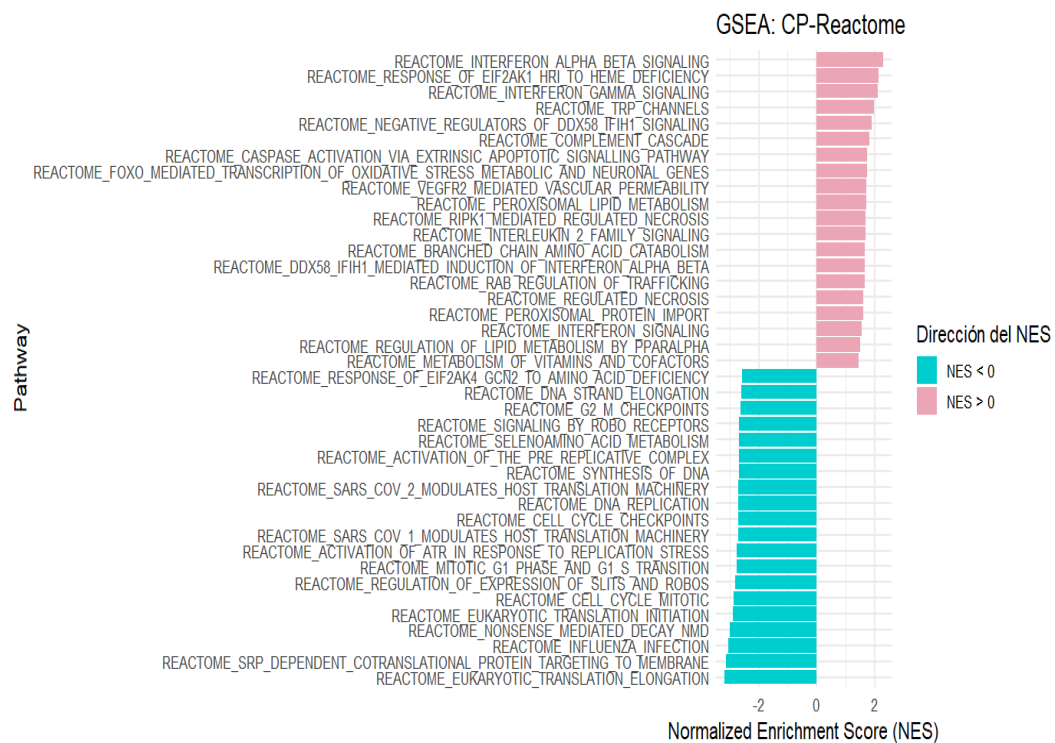
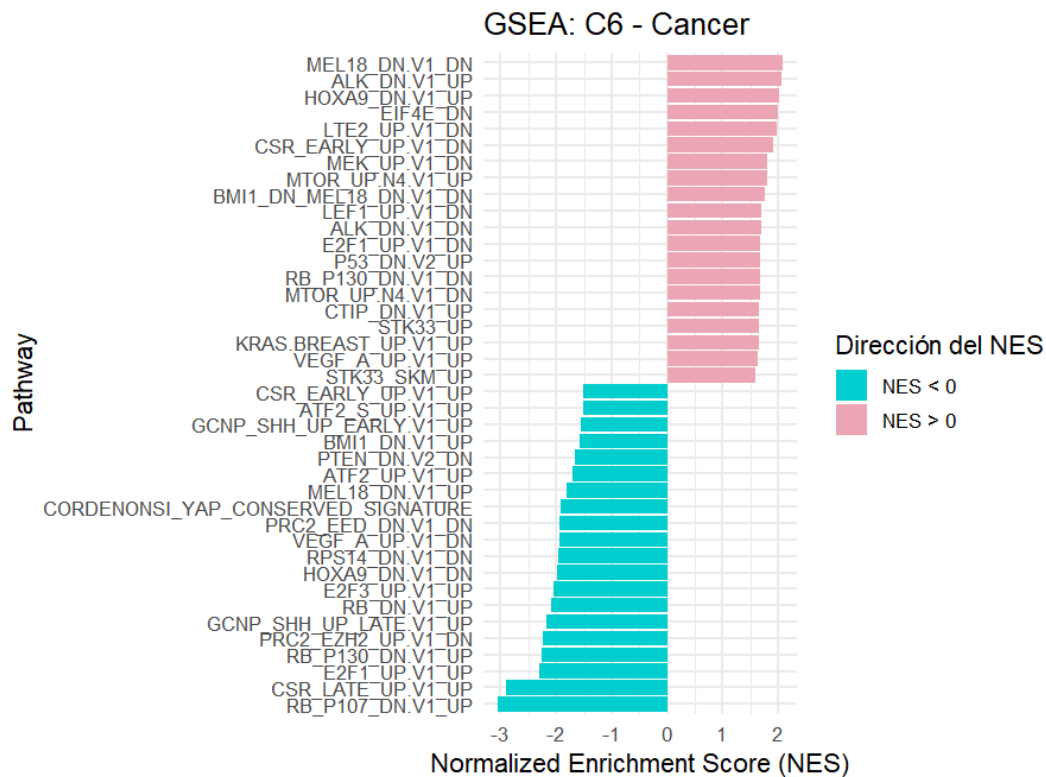


Figura 14. Análisis integrado del enriquecimiento de vías y firmas funcionales y oncogénicas en HNSCC. Panel superior: GSEA utilizando la colección CP/Reactome, mostrando las principales vías funcionales enriquecidas en la comparación A9 vs control. Panel inferior: GSEA utilizando la colección C6 (oncogenic signatures), mostrando firmas transcripcionales asociadas a programas oncogénicos. En ambos casos, el eje X representa el Normalized Enrichment Score (NES), que refleja el grado de enriquecimiento normalizado de cada vía en función de la posición relativa de sus genes dentro del ranking transcriptómico completo. Las barras rosadas indican vías con NES positivo (enriquecidas en genes up-regulados), mientras que las barras turquesa indican vías con NES negativo (enriquecidas en genes down-regulados). Las vías se encuentran ordenadas según el valor del NES.

Asimismo, detectamos un enriquecimiento negativo de vías relacionadas con la organización estructural y la interacción célula-matriz, incluyendo *REACTOME_EXTRACELLULAR_MATRIX_ORGANIZATION* y *REACTOME_INTEGRIN_CELL_SURFACE_INTERACTIONS*, impulsadas por la disminución de genes como *TGFB2* y *FBN2*. En conjunto, estos resultados indican que la expresión de *MAGE-A9* se asocia con la activación de programas de respuesta inmune y adaptación celular, acompañada de una disminución de procesos proliferativos y de organización tisular (Figura 14, panel superior).

En este análisis integrador de las vías enriquecidas, focalizamos en aquellas que despertaron nuestro interés, ya sea por su relación con otros miembros de la familia *MAGE-I* o por su relación con el fenotipo tumoral maligno que caracteriza a *MAGE-A9*.

En conjunto, los análisis realizados mediante ORA y GSEA en distintas bases de datos muestran de manera consistente que la expresión de *MAGE-A9* se asocia con la represión de programas vinculados a la actividad de p53, el control del ciclo celular y la respuesta al daño en el ADN, así como de procesos relacionados con la adhesión célula-célula, la interacción célula-matriz y el mantenimiento de la identidad epitelial.

En paralelo, la expresión de MAGE-A9 se asocia con la activación de programas vinculados a angiogénesis, señalización por VEGF-A, permeabilidad vascular y remodelación del microambiente tumoral, junto con la activación de programas de respuesta inmune innata y señalización por interferón.

Este perfil transcripcional resulta consistente con los fenotipos clínico-patológicos previamente asociados a la expresión de MAGE-A9 en distintos tumores sólidos, incluyendo alto grado histológico, mayor capacidad invasiva y metastásica, estadios clínicos avanzados y menor supervivencia, así como resistencia a terapias basadas en daño genotóxico (Xu et al., 2014; Gu et al., 2014; Zhai et al., 2015; Zhang et al., 2015; Zhan et al., 2016; Meyer et al., 2018).

En la sección siguiente abordamos la validación experimental de algunos de los ejes biológicos identificados mediante los análisis transcriptómicos.

3.4 MAGE-A9 modula la respuesta al daño en el ADN y la viabilidad celular: validación Experimental

Nuestro análisis transcriptómico mostró una represión coordinada de rutas dependientes de p53, checkpoints del ciclo celular, mecanismos de reparación del ADN y redes de vigilancia genómica, junto con la activación de programas adaptativos vinculados a plasticidad celular, angiogénesis y remodelación del microambiente tumoral y matriz extracelular.

Dentro de este marco, p53 emerge como un nodo central potencialmente modulado por MAGE-A9. Este hecho no resulta sorprendente dado que se ha reportado que otras proteínas MAGE (MAGE-A2, MAGE-C2, MAGE-A6/A3) tienen la capacidad de inhibir la actividad transcripcional de p53. Este oncosupresor constituye el principal integrador de señales de daño en el ADN, coordinando decisiones celulares críticas como arresto del ciclo, reparación genómica, senescencia o apoptosis. La pérdida funcional de esta vía, ya sea por mutación directa o por mecanismos regulatorios indirectos (como la presencia de proteínas

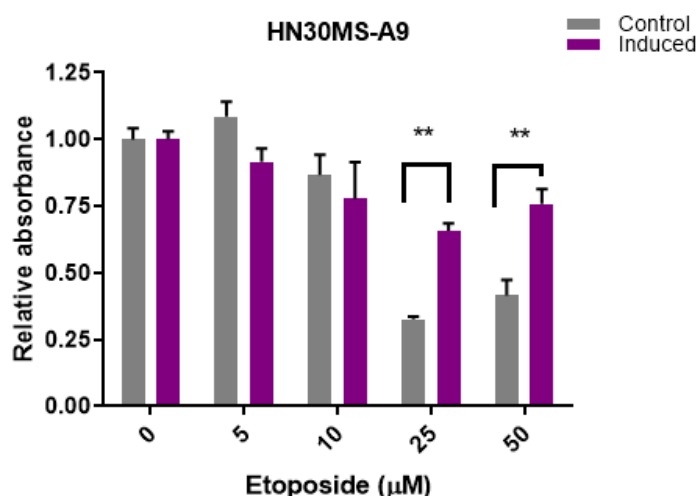
virales), representa un determinante clave en la adquisición de resistencia a quimioterapia y en la progresión tumoral.

Por tal motivo, validamos experimentalmente algunas de las observaciones derivadas del análisis transcriptómico. Analizamos el impacto de la expresión de MAGE-A9 sobre la viabilidad celular, la inducción de apoptosis bajo condiciones de estrés genotóxico (quimioterapia) y la actividad funcional de p53 .

3.4.1 MAGE-A9 aumenta la viabilidad celular frente a estrés genotóxico

En esta subsección analizamos el impacto de la expresión de MAGE-A9 sobre la supervivencia celular bajo condiciones de estrés genotóxico inducido por etopósido, un agente quimioterapéutico que genera roturas de doble cadena mediante la inhibición de la topoisomerasa II.

Para ello utilizamos los modelos celulares desarrollados por nosotros HN30MS-A9 (expresión de MAGE-A9 inducible y p53 wt) y HN12-A9 (expresión de MAGE-A9 inducible y p53 null). Expusimos a dichas líneas celulares, inducidas y no inducidas a tratamiento con cantidades crecientes del quimioterapéutico Etoposido y medimos viabilidad celular mediante ensayo de MTT (Figura 15)



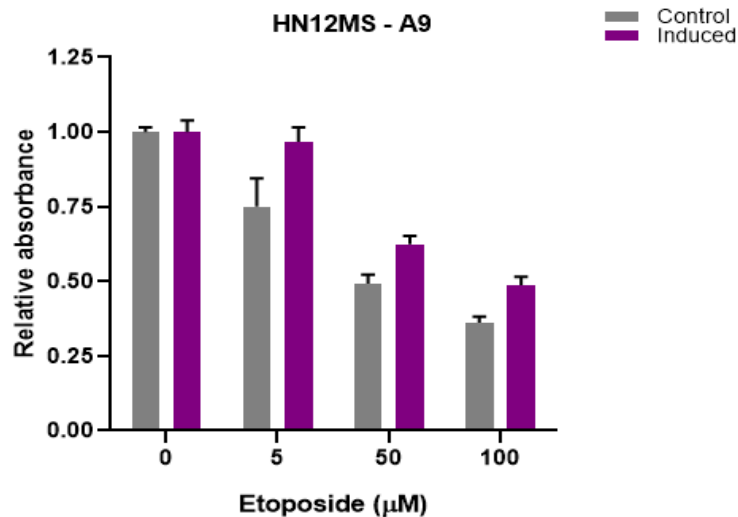


Figura 15. MAGE-A9 incrementa la viabilidad celular frente a etopósido en HN30, pero no altera la respuesta en HN12.. Las células HN30MS-A9 (p53 wt) fueron inducidas con doxyciclina (5 µg/mL) durante 48 h y posteriormente tratadas durante 24 h con concentraciones crecientes de etopósido (0, 5, 10, 25 y 50 µM) (panel izquierdo). Las células HN12MS-A9 fueron inducidas con doxyciclina (5 µg/mL) durante 48 h y luego tratadas durante 48 h con etopósido (0, 5, 50 y 100 µM) (panel derecho). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT. El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism 6.01 mediante ANOVA de uno o dos factores, según correspondiera. Los datos representan el promedio $\pm$ ESM de un experimento realizado por triplicado. ** $p \leq 0.01$; ns: no significativo, en comparación con las células no inducidas.

En la línea HN30MS-A9, la inducción de MAGE-A9 produjo un incremento significativo de la viabilidad celular frente al tratamiento con etopósido, a concentraciones intermedias (25 µM) y altas (50 µM) del fármaco. Las curvas de dosis-respuesta mostraron un desplazamiento compatible con una disminución de la sensibilidad al etopósido en presencia de MAGE-A9, indicando que la expresión de esta proteína confiere una ventaja funcional frente al daño genotóxico en este contexto celular.

En contraste, en la línea HN12MS-A9, que carece de p53 funcional, la expresión de MAGE-A9 no modificó de manera apreciable la respuesta al etopósido, ya que las curvas de viabilidad resultaron prácticamente superponibles entre las condiciones inducidas y no inducidas a lo largo de todo el rango de concentraciones evaluado.

Estos resultados funcionales coinciden con lo observado en el análisis transcriptómico global,

En conjunto, estos resultados demuestran que MAGE-A9 promueve la supervivencia celular frente al etopósido de manera dependiente del contexto celular, siendo su efecto evidente en HN30 (p53 competente) pero no en HN12 (p53 deficiente). Este comportamiento es consistente con la hipótesis de que, al menos en parte, el efecto pro-supervivencia de MAGE-A9 podría estar mediado por la modulación de vías en las que p53 desempeña un rol central.

Desde el punto de vista clínico, la radioterapia y las quimioterapias basadas en daño genotóxico constituyen pilares terapéuticos fundamentales en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC) y en numerosos tumores sólidos, ya que buscan inducir daño en el ADN y promover la eliminación de células tumorales. Sin embargo, la activación de programas celulares asociados a respuesta al daño genómico, supervivencia y adaptación al estrés químico representa uno de los principales mecanismos de resistencia terapéutica descritos en estos contextos. En HNSCC, la radioresistencia y la menor sensibilidad a tratamientos citotóxicos se asocian clínicamente con mayor recurrencia local, progresión tumoral y reducción de la supervivencia global de los pacientes (3,4). De manera consistente, en cáncer de pulmón, mama y tumores colorrectales, la activación de rutas vinculadas a adaptación al daño genómico se correlaciona con peor pronóstico y persistencia tumoral bajo presión terapéutica (2,5,6). En este marco, el aumento de viabilidad celular observado frente al etopósido en presencia de MAGE-A9 resulta coherente con programas funcionales enriquecidos en nuestros análisis de RNA-seq relacionados con respuesta al daño y adaptación al estrés.

3.4.2 La expresión de MAGE-A9 reduce la apoptosis inducida por estrés genotóxico

Con el objetivo de evaluar si el aumento de viabilidad observado frente al tratamiento con etopósido se asocia con una disminución de la apoptosis, se analizó

la muerte celular programada en la línea HN30MS-A9 mediante citometría de flujo utilizando tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio (PI). Las células inducidas o no inducidas con doxíciclina se trataron con 50 μ M de etopósido durante 24 h y posteriormente se clasificaron en poblaciones viables (anexina V⁻/PI⁻), apoptóticas tempranas (anexina V⁺/PI⁻) y apoptóticas tardías/necrosadas (anexina V⁺/PI⁺).

El análisis por citometría reveló que la expresión de MAGE-A9 redujo de manera significativa el porcentaje de células anexina V positivas en comparación con la condición no inducida (Figura 16) . En concordancia, se observó un aumento de la proporción de células viables en las muestras que expresaban MAGE-A9, indicando una disminución global de la muerte celular programada inducida por etopósido.

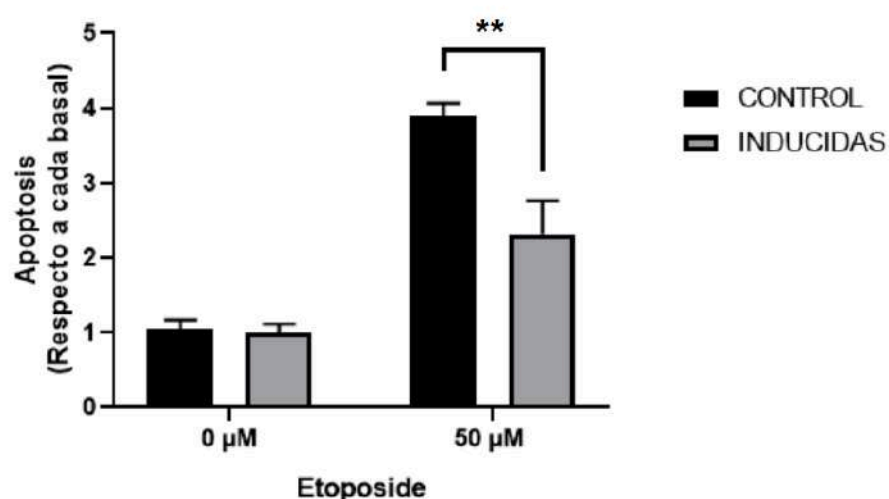


Figura 16. La expresión de MAGE-A9 reduce la apoptosis inducida por etopósido en células HN30. Las células HN30MS-A9 fueron inducidas con doxíciclina (5 μ g/mL) durante 24 h y posteriormente tratadas con 50 μ M de etopósido durante 24 h. La apoptosis se evaluó mediante citometría de flujo utilizando tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio (PI). El análisis se realizó en el Servicio de Citometría de Flujo de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 6.0 utilizando ANOVA de dos factores. ** $p \leq 0.01$ en comparación con la condición no inducida. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar (DE) de tres réplicas biológicas independientes.

Este resultado es consistente con las observaciones derivadas del análisis transcriptómico que indicó una atenuación de programas asociados a respuesta al daño en el ADN, activación de p53 y ejecución de apoptosis en presencia de MAGE-A9. En conjunto, los datos sugieren que MAGE-A9 no solo incrementa la viabilidad celular frente al estrés genotóxico, sino que lo hace a través de la inhibición de la apoptosis. Dado que la línea HN30 expresa p53 funcional, es posible que esta protección antiapoptótica esté mediada, al menos en parte, por una modulación directa o indirecta de la vía de p53.

La evasión de la apoptosis constituye un rasgo central asociado a resistencia terapéutica en múltiples tumores humanos. En HNSCC, la disminución de la muerte celular inducida por tratamientos genotóxicos se ha vinculado con falla terapéutica y peor evolución clínica, particularmente en tumores que mantienen capacidad proliferativa tras la exposición a radio/quimioterapia (3,4). Este fenómeno también ha sido ampliamente descrito en cáncer de mama, pulmón y colon, donde la reducción de la fracción apoptótica favorece la supervivencia de clones resistentes y contribuye a la progresión tumoral (2,5,7). En concordancia con estos antecedentes, la disminución de células anexina V positivas observada en nuestros modelos que expresan MAGE-A9 sugiere la adquisición de un estado celular compatible con evasión de muerte inducida por estrés genotóxico, fenómeno frecuentemente asociado en la clínica con menor respuesta terapéutica (2–4,7).

3.4.3 MAGE-A9 inhibe la actividad transcripcional de p53 sin afectar su estabilidad ni su estado de acetilación

Con el objetivo de evaluar directamente el impacto de MAGE-A9 sobre la actividad transcripcional de p53, realizamos ensayos de gen reportero con el sistema de luciferasa utilizando el reportero pG13-luc, que contiene múltiples sitios de unión consenso para p53. Estos experimentos se llevaron a cabo en dos modelos celulares complementarios: células humanas U2OS (p53 wt) y fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en p53 MEF (doble knockout p53^{-/-}; mdm2^{-/-}), que fueron reconstituidos con p53 humano. Las MEF p53^{-/-} constituyen un sistema

experimental particularmente útil para este tipo de ensayos, ya que permiten evaluar la función de p53 en ausencia total de p53 endógeno, eliminando interferencias por regulación basal de la vía.

En ambos modelos, la expresión de MAGE-A9 produjo una disminución significativa de la actividad luciferasa del reportero PG13, indicando una inhibición directa de la capacidad transcripcional de p53 (Figura 17). Estos resultados fueron consistentes tanto en células humanas como en células murinas, sugiriendo que el efecto de MAGE-A9 sobre p53 no depende de un contexto celular específico y es independiente de la expresión de Mdm2.

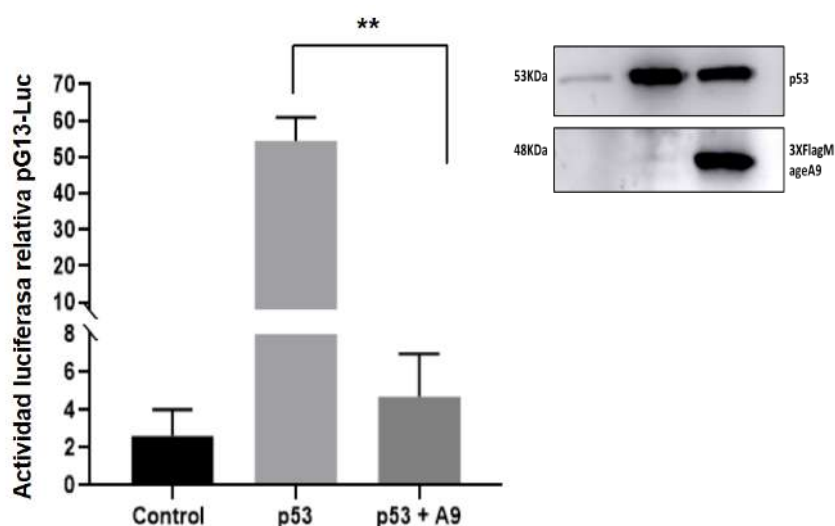


Figura 17. MAGE-A9 inhibe la actividad transcripcional de p53 en un ensayo de gen reportero. *Panel izquierdo:* Ensayo de luciferasa utilizando el reportero PG13-Luc. Células U2OS (p53 wt) fueron transfectadas con p53 solo o en combinación con MAGE-A9, junto con el plásmido reportero PG13-Luc y el control interno de normalización Renilla (RTK-RLuc). Los valores de actividad luciferasa se expresan relativos a la señal de Renilla. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a la condición p53 sola (* $p \leq 0,05$), analizadas mediante ANOVA de una vía. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar (DE) de tres réplicas biológicas independientes. ** $p < 0.01$. *Panel derecho:* Western blot de los lisados correspondientes al ensayo de luciferasa, revelados con anticuerpos anti-p53 y anti-Flag para verificar la expresión de las proteínas transfectadas. Las muestras fueron cargadas en el mismo orden que en el gráfico de barras.

Dado que la inhibición de la actividad transcripcional de p53 podría explicarse por una disminución en sus niveles proteicos, evaluamos si la expresión de MAGE-A9

afectaba la estabilidad de p53. Para ello, transfectamos cantidades crecientes de MAGE-A9 en células U2OS (p53 wt) y en células MEF doble knockout (p53^{-/-}/mdm2^{-/-}) reconstituidas con p53 humano. En ninguno de los dos sistemas se observaron cambios significativos en los niveles de p53, indicando que la inhibición funcional de p53 no se debe a un aumento de su degradación proteica (Figura 18).

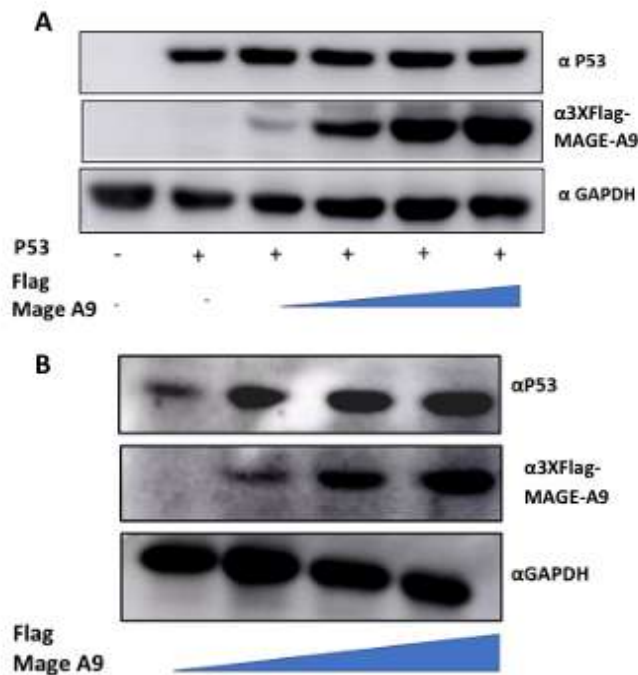


Figura 18. La expresión de MAGE-A9 no altera los niveles proteicos de p53 en sistemas de sobreexpresión. *Panel superior:* Western blot mostrando los niveles de p53 humano co-transfectado con cantidades crecientes de 3×Flag-MAGE-A9 (0, 50, 100, 200 y 400 ng) durante 24 h en células MEF doble knockout (p53^{-/-}; mdm2^{-/-}). *Panel inferior:* Western blot mostrando los niveles de p53 endógeno en células U2OS (p53 wt) transfectadas con 3×Flag-MAGE-A9 (0, 100, 200 y 400 ng) durante 24 h. GAPDH se utilizó como control de carga. El experimento se repitió al menos tres veces de manera independiente.

La actividad de p53 también se encuentra regulada por modificaciones postraduccionales, en particular por su estado de acetilación, que es crítico para su capacidad transactivadora. Para evaluar si MAGE-A9 afectaba este aspecto, analizamos la acetilación de p53 en células HN30 inducibles tratadas con

concentraciones crecientes de cisplatino, en presencia o ausencia de MAGE-A9. Tal como se mostró previamente en la Parte 2 figura 9 panel superior, no se detectaron diferencias evidentes en los niveles de p53 total ni en su acetilación en ninguna de las condiciones ensayadas, lo que refuerza la idea de que MAGE-A9 no modula la función de p53 a través de cambios en su estabilidad ni en su activación canónica.

En conjunto, los resultados presentados en esta sección demuestran que MAGE-A9 inhibe la actividad transcripcional de p53 sin afectar de manera apreciable sus niveles proteicos ni su estado de acetilación. Esta inhibición funcional es consistente con los patrones observados en el RNA-seq, que indican una represión de programas dependientes de p53 y una atenuación global de la respuesta al daño genotóxico en presencia de MAGE-A9.

En distintos contextos tumorales, el estado funcional de p53 constituye uno de los determinantes más relevantes de la respuesta a terapias basadas en daño genotóxico. En carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC), múltiples estudios clínicos han demostrado que tumores con alteraciones en la vía de p53 presentan mayor radioresistencia, menor respuesta a quimioterapia basada en platinos y una reducción significativa en la supervivencia global y libre de enfermedad. La presencia de p53 funcional se asocia con una mayor capacidad de inducir arresto del ciclo celular y muerte tumoral tras la exposición a radiación o agentes citotóxicos, mientras que su desregulación favorece la persistencia celular bajo estrés terapéutico y contribuye a la progresión tumoral. A nivel transcriptómico, la alteración de programas regulados por p53 se asocia con la activación de rutas de adaptación al estrés, remodelación del microambiente tumoral y aumento de señales pro-supervivencia, fenómenos ampliamente descritos en tumores radioresistentes.

3.5 Validación experimental: MAGE-A9 favorece rasgos asociados a comportamiento tumoral agresivo como la migración celular

En nuestro análisis transcriptómico, observamos una activación sostenida de firmas relacionadas con angiogénesis, respuesta a hipoxia, migración celular, interacción célula-matriz y señalización de VEGF en presencia de MAGE-A9.

En esta sección evaluamos experimentalmente si la expresión de MAGE-A9 se asoció con la adquisición de rasgos funcionales vinculados a un comportamiento tumoral más agresivo. En particular, analizamos el impacto de MAGE-A9 sobre la migración celular y sobre la expresión de genes pro-angiogénicos y de remodelación de matriz, como VEGF y MMP2, integrando ensayos funcionales y análisis de expresión génica.

3.5.1 MAGE-A9 promueve la migración celular

Como mencionamos anteriormente, nuestros análisis transcriptómicos evidenciaron enriquecimiento de rutas relacionadas con motilidad celular, pérdida de identidad epitelial, señalización de VEGF y regulación de la matriz extracelular.

Con el objetivo de validar experimentalmente estas observaciones, evaluamos el efecto de MAGE-A9 sobre la migración celular mediante un ensayo de *wound healing* en células HN12 con expresión inducible de MAGE-A9. Las monocapas confluyentes fueron raspadas para generar una herida mecánica y luego cultivadas en presencia o ausencia de doxiciclina. El cierre de la herida se monitoreó durante 6 hs y 12 hs, tiempo mucho menor al de duplicación celular, en medio sin suero fetal bovino, registrándose imágenes en intervalos regulares.

Las células que expresaban MAGE-A9 mostraron un aumento marcado en la velocidad de cierre de la herida, alcanzando una reducción del área descubierta aproximadamente dos veces más rápida que las células no inducidas (Figura 19). Este resultado indicó que MAGE-A9 potencia significativamente la capacidad migratoria de las células HN12 y que este efecto es independiente de la presencia de p53 dado que esta línea celular es p53 null.

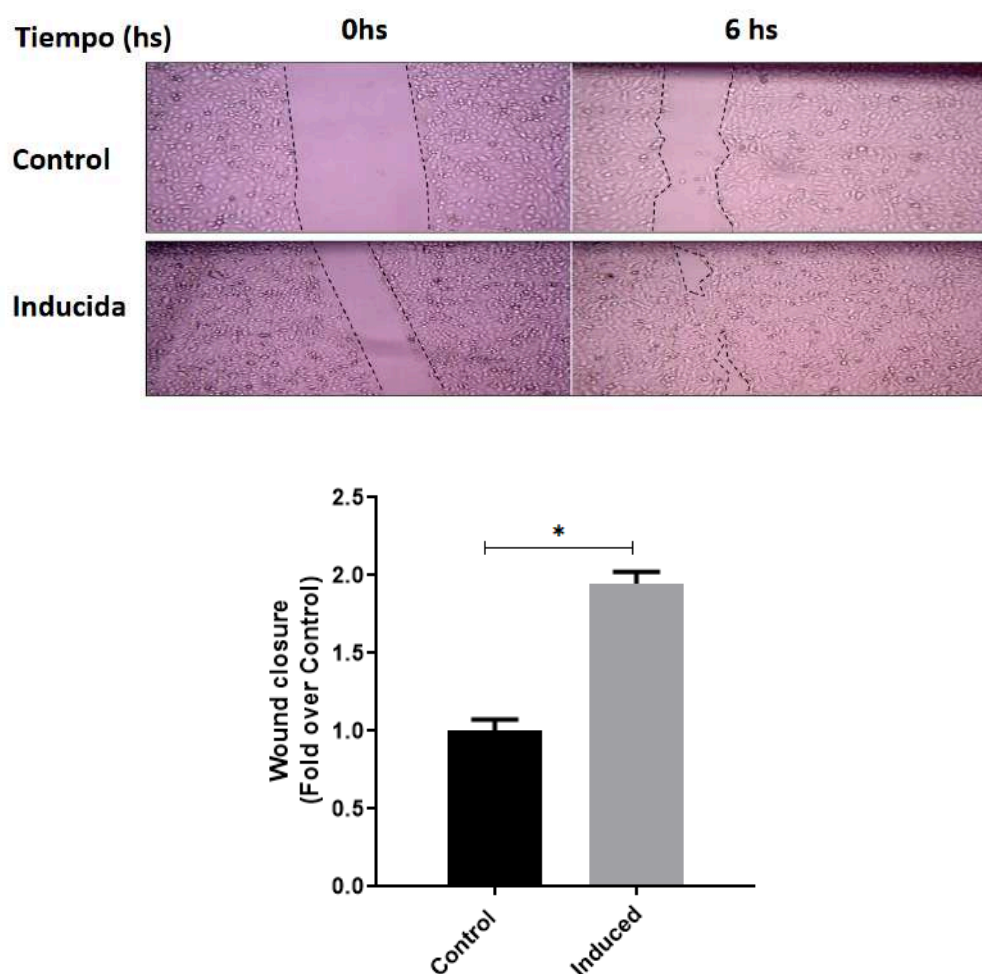


Figura 19. La expresión de MAGE-A9 aumenta la capacidad migratoria en células HN12MS-A9. Panel superior: Imágenes representativas del ensayo de herida (*wound healing*). Las fotografías se tomaron con un microscopio Zeiz invertido de campo claro a las 0h y 8 h, utilizando un objetivo 5×. Se sembraron 5×10^4 células por pocillo en placas multiwell de 24 pocillos, se realizó la herida con una punta de p200 y las células se incubaron en medio sin suero durante 6 h. Panel inferior: Cuantificación del área de la herida. El área descubierta se cuantificó utilizando el programa ImageJ. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a la condición no inducida ($*p \leq 0,05$), analizadas mediante ANOVA de una vía. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar (DE) de tres réplicas biológicas independientes. $*p < 0.05$.

Desde una perspectiva clínica, el aumento de la capacidad migratoria constituye uno de los rasgos funcionales más estrechamente asociados con progresión tumoral, invasión local y diseminación metastásica en carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC). Diversos estudios han demostrado que la activación de programas celulares vinculados a remodelación del citoesqueleto, interacción célula-matriz y motilidad celular se correlaciona con estadios tumorales avanzados, mayor recurrencia y menor supervivencia global en pacientes. En particular, tumores con fenotipos altamente migratorios presentan con mayor frecuencia resistencia terapéutica y capacidad de adaptación al microambiente tumoral, contribuyendo a la progresión clínica de la enfermedad.

3.5.2 MAGE-A9 induce la expresión de genes pro-angiogénicos y de remodelación de matriz (VEGF y MMP2)

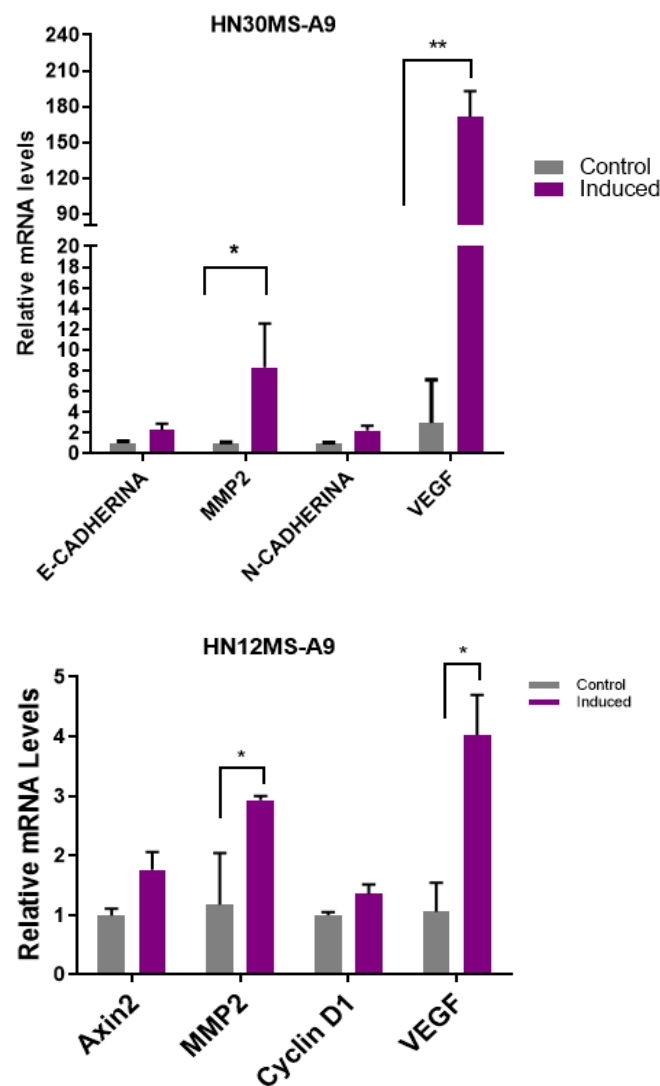
En el análisis transcriptómico, observamos que la expresión de MAGE-A9 se asoció con un enriquecimiento positivo de firmas relacionadas con señalización de VEGF, respuesta a hipoxia y regulación de la matriz extracelular, sugiriendo que MAGE-A9 podría promover un estado pro-angiogénico y pro-invasivo.

Con el objetivo de validar experimentalmente estas observaciones, evaluamos la expresión de genes representativos de estos procesos mediante qPCR, cuantificando los niveles de mRNA de E- Cadherina, N-cadherina (indicadores de transición epitelio mesenquimal) , VEGF y MMP2 en líneas celulares HN12 y HN30 con expresión inducible de MAGE-A9, y de VEGF en células HEK293T con expresión estable de MAGE-A9 nombradas por nosotros como clon13. La cuantificación se realizó mediante el método $\Delta\Delta C_t$, normalizando contra genes de referencia (GAPDH) y expresando los resultados como *fold change* respecto de la condición control (no inducida o vector vacío).

En las tres líneas celulares evaluadas, la expresión de MAGE-A9 incrementó significativamente los niveles de mRNA de VEGF y MMP2 (Figura 20). En HN12 y HN30, la inducción de MAGE-A9 produjo un aumento sostenido de VEGF y MMP2 consistente con la activación de un programa pro-angiogénico, así como un incremento de MMP2, compatible con una mayor capacidad de remodelación de la

matriz extracelular. En la línea HEK293T con expresión estable para MAGE-A9 se observó el mismo patrón de sobreexpresión de VEGF respecto del control isogénico, indicando que este efecto no es exclusivo del contexto de carcinoma de cabeza y cuello.

Cabe destacar que el aumento en la expresión de VEGF y MMP2 se observó en líneas celulares con distinto estatus de p53: HN12 (p53 nulo), HN30 (p53 wt) y HEK293 (p53 funcionalmente inactivado por la expresión de la proteína viral SV40 Large T), lo que sugiere que la inducción de estos genes por MAGE-A9 es independiente del estado de p53.



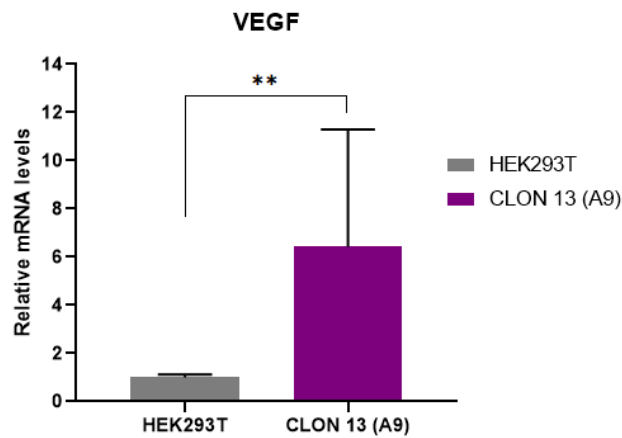


Figura 20. La expresión de MAGE-A9 incrementa la expresión de VEGF y MMP2 en distintos modelos celulares. Determinación de los niveles de mRNA de VEGF y MMP2 mediante RT-qPCR en células con expresión de MAGE-A9. Panel superior: células HN30MS-A9 inducidas respecto de la condición no inducida. Panel intermedio: células HN12MS-A9 inducidas respecto de la condición no inducida. Panel inferior: clon HEK293 con expresión estable de MAGE-A9 respecto del control isogénico. Los valores se expresan como fold change (veces de cambio) calculado mediante el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, utilizando GAPDH como gen de referencia. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 8 mediante ANOVA de dos factores seguido de post-test de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar (DE) de tres réplicas biológicas independientes. ** $p < 0.01$.

PARTE 4

4. Análisis del interactoma de MAGE-A9

Luego del estudio del desbalance a nivel transcripcional que causa la expresión de MAGE-A9, continuamos su caracterización funcional mediante otra aproximación ómica que puede aportar otra capa de información asociada a sus funciones: el interactoma. El análisis del interactoma de MAGE-A9 permitió identificar las proteínas con las que esta oncoproteína interactúa y generar hipótesis sobre los procesos celulares potencialmente modulados por su expresión.

Para identificar el interactoma de MAGE-A9 se utilizó una estrategia basada en inmunoprecipitación seguida de espectrometría de masas (IP-MS/MS) utilizando nuestro modelo celular HN30MS-A9. El estudio lo realizamos en colaboración con el Dr. Philippe Soubeyran del CRCM-INSERM (Marsella, Francia). Las IPs se realizaron con el anticuerpo anti-FLAG en células HN30MS-A9 (expresan Flag-MAGE-A9) inducidas con doxiciclina (2µg/ml durante 48 hs) y se comparó contra la misma IP en las mismas células, pero no inducidas con doxiciclina. Las eluciones se realizaron con péptido FLAG y las proteínas obtenidas se procesaron para la identificación proteómica por espectrometría de masas. Cada condición fue realizada por triplicado a fin de poder llevar a cabo un análisis estadístico. Consideramos significativas aquellas interacciones con un p valor ajustado (pAdj) < 0.05.

Adicionalmente, analizamos el interactoma de MAGE-A9 reportado en el marco del proyecto BioPlex, un esfuerzo sistemático de mapeo del interactoma humano basado en IP-MS/MS (91,92)(91,92) en dos líneas celulares humanas, las HCT116 (carcinoma colorrectal) y las HEK293T (riñón fetal humano). Estas líneas representan contextos celulares ampliamente utilizados como referencia en estudios de interacción proteína-proteína y permiten establecer un marco comparativo para evaluar la conservación y la especificidad contextual de las interacciones observadas en el modelo HN30.

4.1. Análisis del interactoma de MAGE-A9 en células HN30

Luego de realizada la parte experimental de la aproximación IP/MS, generamos las dos listas de interactores por triplicado (de células HN30MS-A9 inducidas y de no inducidas), eliminamos las proteínas inmunoprecipitadas en forma inespecífica y así obtuvimos las proteínas específicamente y significativamente enriquecidas por la presencia de MAGE-A9. Se consideraron significativas aquellas interacciones con un valor de p ajustado (p_{Adj}) < 0.05.

Visualizamos las proteínas diferencialmente asociadas a MAGE-A9 según su magnitud de cambio y significancia estadística en un gráfico tipo volcano plot (Figura 21). A partir de este análisis se identificaron 325 proteínas estadísticamente significativas enriquecidas en la condición inducida. Este conjunto define el interactoma de MAGE-A9 en el modelo celular HN30MS-A9.

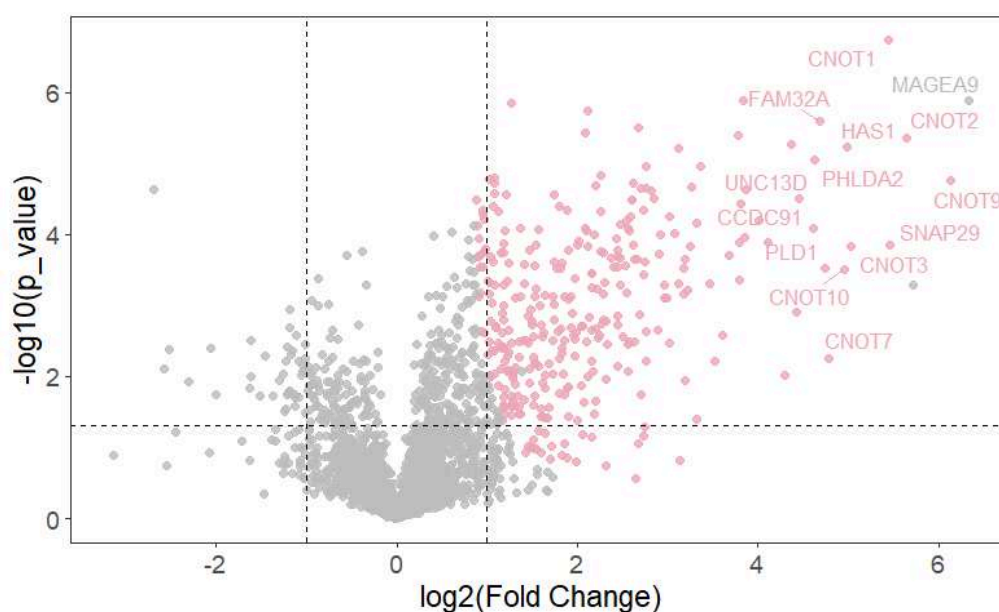


Figura 21. Análisis del interactoma de MAGE-A9 mediante volcano plot en células HN30. Volcano plot que representa las proteínas identificadas por inmunoprecipitación seguida de espectrometría de masas (IP-MS), comparando la condición inducida para MAGE-A9 con la condición control no inducida. El eje x muestra el **log₂ del fold change**,

que indica el grado de enriquecimiento de cada proteína en la condición inducida respecto del control (valores positivos indican mayor asociación con MAGE-A9). El eje y representa el **$-\log_{10}$ del valor de p** , reflejando la significancia estadística de la diferencia observada. Las líneas punteadas indican los umbrales de significancia y enriquecimiento utilizados para definir los interactores de alta confianza. Los puntos en color rosado corresponden a proteínas significativamente enriquecidas, consideradas potenciales interactores de MAGE-A9, mientras que los puntos en gris representan proteínas no significativas. Se destacan algunos interactores relevantes seleccionados por su alto nivel de enriquecimiento y significancia.

Nos llamó la atención la identificación de un número tan elevado de interactores significativos de MAGE-A9. Esto se puede asociar a la interacción de MAGE-A9 con grandes complejos proteicos o estructuras celulares. Este número alto de interactores de MAGE-A9 también fue observado en dos experimentos independientes de IP/MS realizados por la plataforma Bioplex en células HCT116 y HEK293T utilizando el anticuerpo anti-HA y (91,92).

4.2 Enriquecimiento de vías y procesos biológicos asociados al interactoma de MAGE-A9 en HNSCC

Para analizar la organización funcional del interactoma de MAGE-A9 realizamos un análisis de enriquecimiento utilizando las proteínas diferencialmente enriquecidas en células HN30 inducidas. El análisis se realizó mediante STRING y el entorno R empleando las bases Reactome, KEGG y GO:BP (Sección 3). Un bubble plot del análisis de enriquecimiento funcional reveló las principales vías y procesos biológicos asociados al interactoma de MAGE-A9 en células HN30 (Figura 22).

Primeramente, lo que se observa en la Figura 22, es que el análisis de los procesos involucrados en el interactoma de MAGE-A9 recapitula, en parte, lo observado en el análisis del transcriptoma. Así, encontramos procesos asociados al ciclo celular, a la regulación de la vía de p53, a la respuesta al estrés y a la

regulación de proteínas por el sistema ubiquitina-proteasoma. También, se pueden observar como interactores de MAGE-A9, proteínas que tal vez no tienen su contraparte reflejada en la transcripción. Este es el caso de la presentación y procesamiento de antígenos mediados por MHC class-I, que tiene mucho sentido ya que las proteínas MAGE son antígenos tumorales que se procesan y son presentados junto a este complejo de histocompatibilidad (Rock et al, Nature Immunology 2016).

Seguidamente, analizamos los nodos que podrían estar asociados a las características clínicas de los tumores MAGE-A9 positivos y a los que se muestran con fuerte impacto en la Figura 22.

En cuanto a la vía de p53, observamos un enriquecimiento robusto de vías vinculadas a la regulación de TP53, destacándose términos como *Transcriptional Regulation by TP53*, *Regulation of TP53 Activity* y *Regulation of TP53 Activity through Phosphorylation*. Estas categorías incluyen proteínas presentes en nuestro conjunto de interactores tales como RAD50 y USP7, así como subunidades de complejos transcripcionales TAF.

Consistentemente, detectamos también enriquecimiento de categorías vinculadas al ciclo celular, incluyendo *Cell Cycle*, *Cell Cycle*, *Mitotic* y *TP53 Regulates Transcription of Cell Cycle Genes*, con representación de proteínas del conjunto tales como PPP2CA, múltiples subunidades del proteasoma (PSMA1, PSMA3, PSMA5, PSMA6; PSMB2, PSMB3, PSMB4, PSMB8, PSMB9, PSMB10; PSMC1–6; PSMD1, PSMD2, PSMD11, PSMD12 y PSMD13) y proteínas vinculadas a organización mitótica incluidas en las intersecciones de estas firmas, como NUMA1.

En cuanto a muerte celular programada, observamos enriquecimiento de vías como *Regulation of Apoptosis*, *Programmed Cell Death* y *Apoptosis*, representadas por proteínas tales como CASP6, PTK2, SDCBP, OGT, C1QBP y múltiples subunidades del proteasoma, que aparecen reiteradamente en las intersecciones de estas categorías.

Otro conjunto de vías enriquecidas correspondió a procesos vinculados a adaptación metabólica y respuesta celular al estrés hipóxico, incluyendo *Cellular response to hypoxia*, *Oxygen-dependent proline hydroxylation of hypoxia-inducible*

factor, *Response to cellular stress*, *Cellular metabolic process*, *Cellular response to chemical stress* y *SLC-mediated transmembrane transport*. Estas vías estuvieron representadas por proteínas tales como HIF1AN, SP1, SQSTM1 (p62), diversos transportadores SLC y múltiples subunidades del proteasoma.

En concordancia con estos hallazgos, también se observó enriquecimiento de firmas vinculadas a la interacción con el microambiente tumoral y la remodelación de la matriz extracelular, como *Cell–extracellular matrix interactions*, nuevamente representadas por proteínas como PTK2/FAK-1, reforzando la asociación del interactoma de MAGE-A9 con procesos de adhesión celular y comunicación célula-microambiente.

Detectamos un enriquecimiento principal en procesos asociados a regulación de la expresión génica, incluyendo *RNA Polymerase II Transcription*, *Regulation of transcription by RNA polymerase II* y *Deadenylation of mRNA*. Estas vías estuvieron representadas por proteínas tales como TRIM28, SIN3A, SETDB1, MED4, múltiples subunidades TAF y componentes del complejo CCR4-NOT (CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT6, CNOT8, CNOT9, CNOT10 y CNOT11). En la misma línea, observamos enriquecimiento de procesos asociados a regulación epigenética y organización de la cromatina, incluyendo firmas como *Histone acetylation*, *Regulation of heterochromatin assembly* y *Chromatin modifying enzymes*.

Finalmente, observamos un enriquecimiento particularmente marcado de procesos relacionados con la proteostasis y la degradación proteica dependiente del sistema ubiquitina-proteasoma, incluyendo *Proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process*, *Ubiquitin-dependent protein catabolic process*, *Proteasomal protein catabolic process*, *Protein ubiquitination* y *Regulation of proteasomal protein catabolic process*. Estas vías estuvieron caracterizadas por la presencia coordinada de múltiples subunidades del proteasoma 26S, así como de proteínas accesorias presentes en el interactoma tales como ADRM1, HUWE1, HERC2, FBXO2, DNAJB2 y HSPBP1.

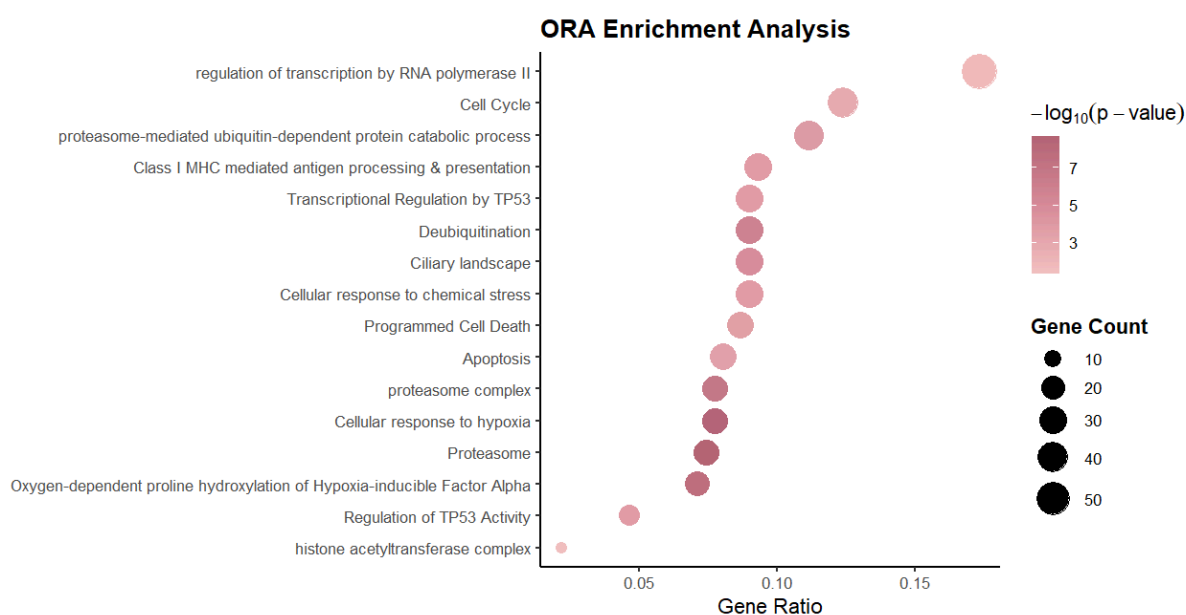


Figura 22. Análisis de enriquecimiento funcional del interactoma de MAGE-A9. Bubble plot que muestra las vías de señalización y procesos biológicos significativamente enriquecidos en el conjunto de proteínas interactoras de MAGE-A9. El eje y indica las vías o funciones biológicas enriquecidas, mientras que el eje x representa el gene ratio, definido como la proporción de proteínas del interactoma asociadas a cada término (intersection size / query size). El tamaño de las burbujas refleja el gene count, es decir, el número absoluto de proteínas que contribuyen al enriquecimiento de cada vía. El color de las burbujas indica la significancia estadística del enriquecimiento, expresada como $-\log_{10}(p\text{-value})$, donde valores más altos (colores más intensos) corresponden a mayor significancia. La corrección por múltiples comparaciones se realizó mediante el método de Benjamini–Hochberg para estimar el FDR. Las referencias correspondientes a cada vía se indican en la figura.

En conjunto, el análisis de enriquecimiento funcional del interactoma de MAGE-A9 en células de HNSCC pone de manifiesto su asociación con múltiples procesos celulares centrales, incluyendo la regulación de la respuesta al daño en el ADN, el control del ciclo celular y la apoptosis, la adaptación a condiciones de hipoxia, la interacción con el microambiente tumoral, la regulación epigenética de la expresión génica y los mecanismos de proteostasis. El análisis del interactoma muestra una marcada correspondencia entre los procesos biológicos identificados mediante RNA-seq y las redes proteicas físicamente asociadas a MAGE-A9.

Para explorar las relaciones funcionales entre las proteínas interactoras de MAGE-A9, realizamos un análisis de agrupamiento de la red de interacciones proteína–proteína (conocido como análisis de clustering) de los interactores de alta confianza. La red se construyó utilizando interacciones reportadas en STRING, se visualizó en Cytoscape y posteriormente se aplicó el algoritmo MCL (Markov Cluster Algorithm), para identificar grupos de proteínas altamente interconectadas, permitiendo reconocer módulos o nodos funcionales dentro del interactoma de MAGE-A9 (Figura 23).

Entre los módulos identificados, se destacó un cluster fuertemente enriquecido en componentes del proteasoma 26S, incluyendo subunidades del regulador 19S, del núcleo catalítico 20S y proteínas accesorias como ADRM1. La composición de este módulo resulta consistente con procesos de proteostasis y control de calidad proteico, en concordancia con el enriquecimiento global de firmas asociadas a degradación proteica y homeostasis celular.

Otro módulo relevante estuvo constituido por chaperonas y co-chaperonas, junto con múltiples subunidades del complejo CCR4–NOT, integrando proteínas involucradas en plegamiento proteico, estabilidad de mRNAs y regulación post-transcripcional. Este cluster refuerza la asociación del interactoma de MAGE-A9 con redes de control de la expresión génica a distintos niveles regulatorios.

En concordancia con los resultados transcriptómicos obtenidos, identificamos un cluster compuesto por proteínas vinculadas a replicación y respuesta al daño en el ADN, incluyendo subunidades del complejo RFC y RAD50. La presencia de este módulo sugiere la asociación física de MAGE-A9 con complejos implicados en el mantenimiento de la integridad genómica y la respuesta al estrés replicativo.

Un cluster particularmente integrador estuvo conformado por proteínas asociadas a señalización, adhesión celular, microambiente tumoral y regulación epigenética, incluyendo PTK2 (FAK1), PXN, RAF1, RICTOR, TGFB1, junto con reguladores de cromatina como SETDB1, SIN3A, KDM1A y SMARCA5, así como nodos de proteostasis y señalización como SQSTM1 (p62). La composición de este módulo

sugiere una convergencia funcional entre señalización dependiente de adhesión, plasticidad celular y control epigenético de la expresión génica.

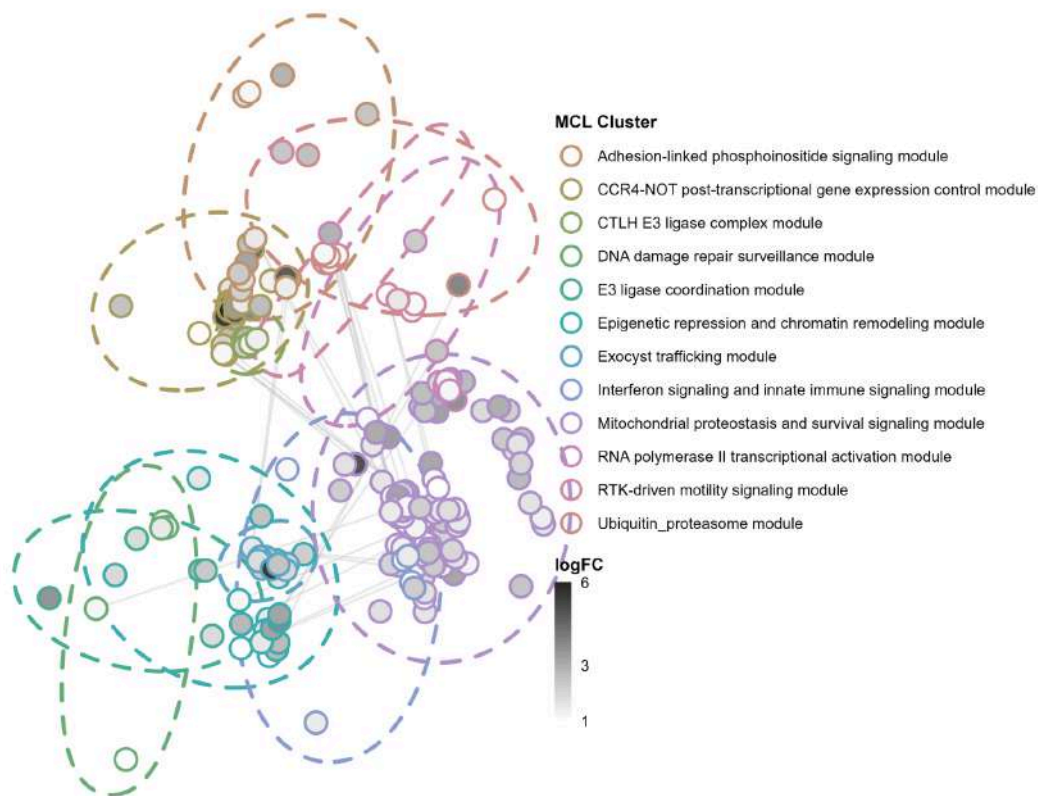


Figura 23. Identificación de clusters funcionales en el interactoma de MAGE-A9. Red de interacciones proteína-proteína construida a partir de los interactores de alta confianza de MAGE-A9 en células HN30, visualizada y analizada mediante Cytoscape. Los clusters o módulos funcionales corresponden a conjuntos de proteínas altamente interconectadas, identificados sobre la red e integrados con interacciones reportadas en la base de datos STRING. Para cada cluster se indican las principales funciones biológicas asociadas, inferidas a partir del enriquecimiento funcional del conjunto de proteínas que lo componen. La figura muestra la organización modular del interactoma de MAGE-A9.

Asimismo, se identificó un módulo que integra componentes del citoesqueleto, enzimas de metabolismo de fosfolípidos de membrana (PLD1, PLD2) y mediadores de señalización inmune innata como STAT2 e IKBKE. Este cluster resulta consistente con la modulación de firmas inflamatorias e inmunes observadas a nivel transcriptómico.

Otros clusters identificados incluyeron módulos asociados a regulación transcripcional (complejo TFIID/TAFs y factores asociados), elongación transcripcional (complejo Elongator), procesamiento de RNA (spliceosoma y factores de empalme), tráfico vesicular y organización del Golgi (complejos COG y exocyst), así como módulos vinculados a metabolismo mitocondrial, biogénesis de clusters Fe–S y metabolismo lipídico/peroxisomal. Si bien estos clusters aportan información sobre la diversidad funcional del interactoma de MAGE-A9, su relación con los ejes principales identificados previamente se presenta aquí de manera descriptiva.

En conjunto, el análisis por clusters funcionales revela que el interactoma de MAGE-A9 se organiza en módulos coherentes que, en parte, recapitulan los principales ejes funcionales observados a nivel transcriptómico

A la luz de estos resultados, nos planteamos si este patrón de interacción se conservaría en otros contextos celulares. Entonces evaluamos si MAGE-A9 presenta un núcleo de interactores conservado entre distintos tipos celulares o si, por el contrario, su red de interacciones depende fuertemente del contexto celular. Para abordar esta pregunta, extendimos el análisis mediante la integración de datasets de proteómica de afinidad a gran escala obtenidos en líneas celulares distintas a HNSCC, particularmente los estudios del consorcio BioPlex (91,92)(91,92) realizados en células HEK293T y HCT116, cuyo análisis comparativo se desarrolla en la sección siguiente (Sección 4.3).

4.3 Comparación del interactoma de MAGE-A9 en HNSCC con datasets proteómicos a gran escala en líneas celulares no-HNSCC (BioPlex)

Los resultados obtenidos en células HN30 plantearon la interrogante de si el patrón de interacciones proteicas observado para MAGE-A9 se conserva en otros contextos celulares. Para abordar esta cuestión, extendimos el análisis del interactoma mediante la integración de datasets de proteómica de afinidad a gran escala generados por el consorcio BioPlex, los cuales permiten evaluar de manera

sistemática redes de interacción proteína–proteína utilizando aproximaciones de inmunoprecipitación seguida de espectrometría de masas (IP–MS).

El consorcio BioPlex ha generado uno de los mapas de interacciones proteína–proteína a mayor escala disponibles hasta la fecha, basado en estrategias sistemáticas de purificación por afinidad acopladas a espectrometría de masas. En estos estudios, miles de proteínas humanas fueron analizadas individualmente como proteínas “bait”, expresadas mediante vectores lentivirales que permitían su inmunoprecipitación y la posterior identificación de proteínas endógenas asociadas (“prey”) mediante espectrometría de masas.

El análisis del interactoma de MAGE-A9 dentro del marco de BioPlex se encuentra disponible en dos líneas celulares: HEK293T, ampliamente utilizada como sistema de referencia en estudios de interacción proteína–proteína, y HCT116, una línea tumoral derivada de carcinoma colorrectal. A partir de estos datasets analizamos los interactores de MAGE-A9 identificados en ambos contextos celulares, con el objetivo de evaluar la conservación de sus redes de interacción y comparar posteriormente estos resultados con el interactoma obtenido experimentalmente en células HN30. Este enfoque comparativo permitió explorar la existencia de un núcleo de interacciones potencialmente conservado, así como componentes dependientes del contexto celular específico.

4.3.1 Núcleo de interactores conservados de MAGE-A9 entre HEK293T y HCT116

En el análisis del interactoma de MAGE-A9 basado en los datasets del consorcio BioPlex, identificamos 201 proteínas interactoras en la línea celular HEK293T y 103 proteínas interactoras en la línea celular HCT116, evidenciando que MAGE-A9 establece redes de interacción proteica extensas en ambos sistemas celulares. Este número elevado de interactores resulta consistente con lo observado previamente en el análisis experimental del interactoma de MAGE-A9 en células HN30, donde también detectamos una red de interacción proteica de gran complejidad, lo que

sugiere que la capacidad de MAGE-A9 de integrarse en múltiples complejos proteicos constituye una característica conservada de esta proteína. La comparación entre ambos conjuntos de interactores reveló la presencia de 34 proteínas exclusivas de HCT116 (14%), 132 exclusivas de HEK293T (56%) de 69 proteínas compartidas entre las líneas celulares HEK293T y HCT116, las cuales representan un núcleo de interactores potencialmente conservados entre ambas líneas celulares. (Figura 24). Dado el tamaño considerable de este subconjunto de proteínas comunes, realizamos un análisis de enriquecimiento funcional con el objetivo de identificar los procesos biológicos predominantes representados en este conjunto (Figura 25).

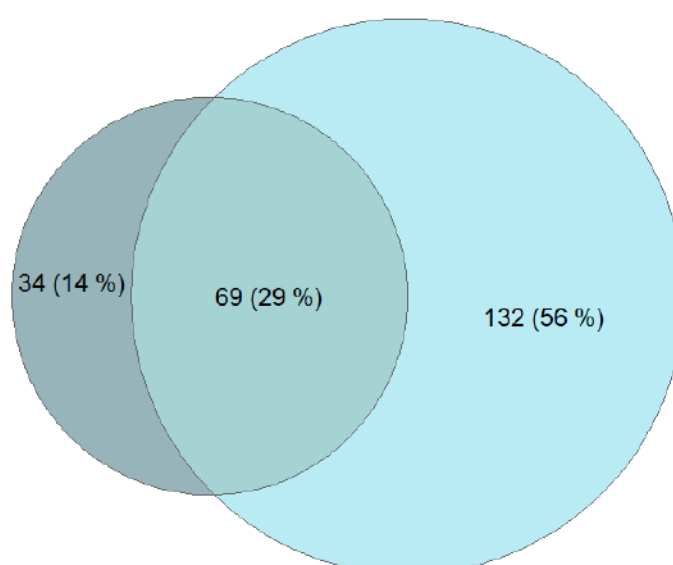


Figura 24. Interactores de MAGE-A9 en células HEK293T y HCT116 identificados en los datasets BioPlex. Diagrama de Venn generado en el software R, que muestra la distribución de las proteínas interactoras de MAGE-A9 identificadas en las líneas celulares HCT116 (azul) y HEK293T (turquesa). Se indican entre paréntesis el número de interactores exclusivos de cada línea celular: 132 proteínas exclusivas de en HEK293T y 34 proteínas en HCT116 y el conjunto de interactores compartidos (69 proteínas).

El análisis de enriquecimiento funcional reveló la asociación del conjunto de interactores compartidos con múltiples procesos biológicos centrales. En primer lugar, observamos un enriquecimiento significativo de términos relacionados con la

regulación de TP53, incluyendo *“Transcriptional Regulation by TP53”*, *“Regulation of TP53 Activity”* y *“Regulation of TP53 Activity through Phosphorylation”*. Este enriquecimiento estuvo sustentado principalmente por la presencia de proteínas del conjunto compartido tales como BRCA2, XRCC4, RAD17, SMC1A, TRIM28, TRIM33, KAT2A y TAF1, entre otras, proteínas conocidas por participar en la regulación de la estabilidad genómica, la modulación de la actividad transcripcional dependiente de p53 y la respuesta celular al daño en el ADN, lo que sugiere que MAGE-A9 podría participar en la modulación de redes transcripcionales dependientes de p53.

En la misma línea, identificamos enriquecimiento de procesos vinculados a la respuesta al daño en el ADN (DDR), incluyendo *“DNA damage response”*, *“DNA repair”*, *“DNA replication checkpoint signaling”*, *“DNA IR double strand breaks and cellular response via ATM”* y *“DNA IR damage and cellular response via ATR”*. Este enriquecimiento estuvo impulsado principalmente por proteínas tales como BRCA2, XRCC4, RAD17, SMC1A, MCM10, HJURP, STIL, CCP110, KIF14 y KIF2C, proteínas asociadas al mantenimiento de la estabilidad genómica, activación de checkpoints y progresión del ciclo celular.

También observamos enriquecimiento de términos relacionados con el control del ciclo celular, incluyendo *“TP53 regulates transcription of cell cycle genes”* y *“cell cycle phase transition”*, así como de procesos asociados a apoptosis inducida por daño genómico, incluyendo *“intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator”*, sugiriendo la participación de MAGE-A9 en la regulación de la supervivencia celular frente a estrés genotóxico.

Asimismo, identificamos enriquecimiento de procesos vinculados a adhesiones focales, adhesión célula-sustrato y organización del citoesqueleto, reflejados en términos como *“regulation of cell-substrate junction organization”* y en complejos proteicos definidos en CORUM tales como *“CTTN-FER-PTK2 complex”*, *“FAK-p130Cas-MT1 complex”* y *“FAK-beta5 integrin complex, VEGF induced”*. Este eje funcional estuvo principalmente representado por la proteína PTK2 (FAK1), junto con proteínas asociadas a señalización de membrana y dinámica lipídica como PLD2, PI4K2B y PLCD3, indicando que MAGE-A9 se encuentra asociada a procesos de señalización dependientes del microambiente tumoral y remodelación

de la membrana plasmática. En este mismo eje estructural observamos además enriquecimiento del término *“Ciliary landscape”*, impulsado por proteínas tales como MCM10, CNOT1, CNOT9, CNOT10, TNKS1BP1, EXOC3 e IQGAP2, lo que sugiere la participación de MAGE-A9 en procesos asociados a la organización de estructuras celulares especializadas y plataformas de señalización dependientes de la arquitectura celular.

Detectamos también un marcado enriquecimiento de procesos relacionados con la regulación transcripcional y organización de la cromatina, incluyendo términos como *“transcription by RNA polymerase II”*, *“transcription coregulator activity”*, *“histone acetyltransferase complex”*, *“protein acetyltransferase complex”*, *“chromatin”*, *“chromatin binding”* y *“DNA-binding transcription factor binding”*. Este enriquecimiento estuvo sustentado por múltiples componentes de la maquinaria basal de transcripción, incluyendo TAF1, TAF2, TAF3, TAF4, TAF5, TAF6, TAF7, TAF9, TAF9B, TAF10 y TAF12, así como por reguladores epigenéticos y transcripcionales tales como KAT2A, TRIM24, TRIM28, TRIM33 y YY1AP1, indicando que MAGE-A9 se encuentra asociada a complejos reguladores de la expresión génica y la organización cromatínica.

Adicionalmente, el enriquecimiento funcional evidenció la participación de procesos asociados a la regulación post-transcripcional y estabilidad del ARN, representados por términos como *“regulation of RNA stability”* y *“post-transcriptional regulation of gene expression”*, impulsados principalmente por la presencia coordinada de múltiples subunidades del complejo CCR4-NOT, incluyendo CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT6, CNOT8, CNOT9, CNOT10 y CNOT11.

Finalmente, identificamos términos asociados a proteostasis y regulación de la ubiquitinación proteica, incluyendo *“ubiquitin-protein transferase activity”*, sustentados por la presencia de proteínas con actividad E3 ligasa o reguladores asociados tales como TRIM24, TRIM28, TRIM33 y UBR3, lo que indica que MAGE-A9 se asocia a procesos de control de la estabilidad proteica y ubiquitinación

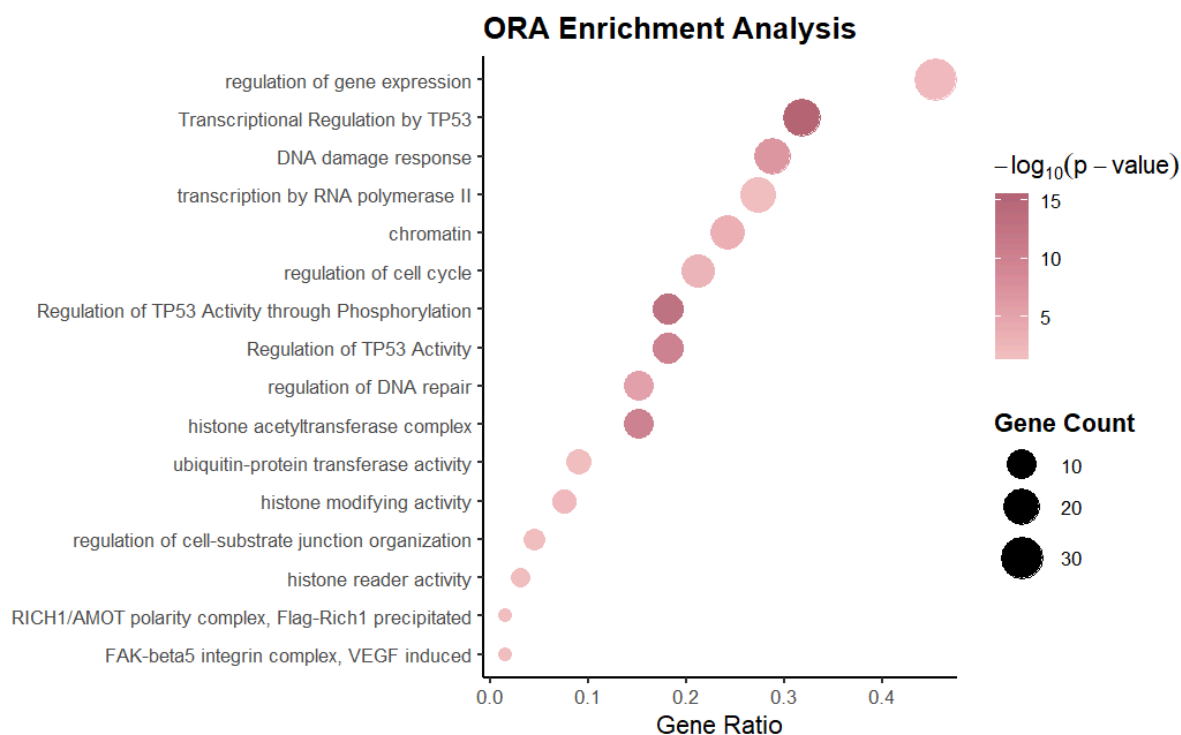


Figura 25. Enriquecimiento funcional de los interactores de MAGE-A9 compartidos entre HEK293T y HCT116. Bubble plot que muestra los términos significativamente enriquecidos a partir del conjunto de genes o proteínas analizadas. El eje y indica las vías de señalización o procesos biológicos enriquecidos, mientras que el eje x representa el gene ratio, definido como la proporción de proteínas de la lista analizada asociados a cada término (intersection size / query size). El tamaño de las burbujas refleja el gene count, es decir, el número absoluto de proteínas que contribuyen al enriquecimiento de cada término. El color indica la significancia estadística del enriquecimiento, expresada como $-\log_{10}(p\text{-value})$, donde valores más altos corresponden a mayor significancia. Los valores de p fueron ajustados por múltiples comparaciones utilizando el método de Benjamini–Hochberg para estimar el FDR. Las referencias correspondientes a cada vía se indican en la figura.

En conjunto, estos resultados muestran que las proteínas interactoras de MAGE-A9 compartidas entre HEK293T y HCT116 se organizan en módulos funcionales asociados principalmente a regulación de p53 y respuesta al daño en el ADN, control del ciclo celular y apoptosis, señalización de adhesiones focales y organización de la arquitectura celular, regulación transcripcional y epigenética,

procesamiento post-transcripcional del ARN y proteostasis, evidenciando la recurrencia de ejes funcionales centrales asociados a MAGE-A9 en ambas líneas celulares analizadas.

4.3.2 Núcleo conservado del interactoma de MAGE-A9 entre HEK293T, HCT116 y HN30

Luego de caracterizar los interactores de MAGE-A9 compartidos entre las líneas celulares HEK293T y HCT116, analizamos a continuación en qué medida estas interacciones se conservan también en el modelo tumoral de HNSCC, HN30MS-A9. Para ello, identificamos el conjunto de proteínas comunes a las tres líneas celulares estudiadas (Figura 27). La proteína MAGE-A9 interactúa significativamente con 325 proteínas en la línea celular HN30, con 201 proteínas en la línea celular HEK293T y con 103 proteínas en la línea celular HCT116, un número muy elevado de proteínas interactoras, como discutimos en la sección previa (4.3.1). Identificamos 34 interactores estadísticamente significativos, comunes a las tres líneas celulares.

Realizamos un análisis de enriquecimiento funcional con el objetivo de definir el núcleo conservado del interactoma de MAGE-A9 y los procesos biológicos predominantes asociados a este subconjunto de interactores compartidos (Figura 27).

Luego de identificar los interactores de MAGE-A9 compartidos entre pares de líneas celulares, analizamos a continuación el subconjunto de proteínas comunes a los tres modelos celulares estudiados (HN30, HEK293T y HCT116), con el objetivo de definir el núcleo conservado del interactoma de MAGE-A9 y de identificar proteínas conservadas para futuros estudios. La intersección de los tres datasets reveló un conjunto de 34 proteínas compartidas, las cuales representan interactores detectados de manera consistente en contextos celulares independientes y, por lo tanto, constituyen candidatos a integrar módulos funcionales centrales asociados a la biología de MAGE-A9.

Interactores de MAGE-A9 en HCT116, HEK293 y HN30

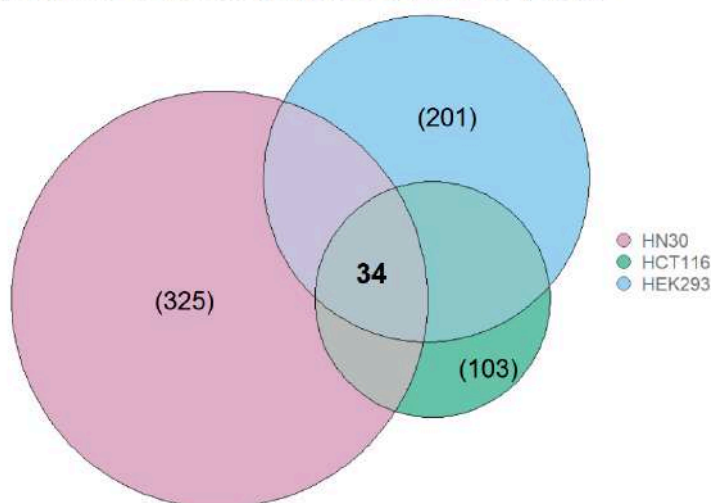


Figura 26: Interactores comunes de MAGE-A9 en células HEK293T , HCT116 y HN30. Diagrama de Venn generado en el software R, que muestra la distribución de las proteínas interactoras de MAGE-A9 identificadas en las líneas celulares HCT116 (azul) , HEK293T (turquesa) y HN30 (rosado). Se indican entre paréntesis el número de interactores exclusivos de cada línea celular: 132 proteínas exclusivas de en HEK293T y 34 proteínas en HCT116 y el conjunto de interactores compartidos (34 proteínas).

Con el objetivo de contextualizar funcionalmente los interactores identificados, realizamos un análisis de interacciones proteína–proteína entre los candidatos utilizando STRING como herramienta de referencia. Este enfoque permitió visualizar relaciones conocidas o predichas dentro del conjunto de proteínas recuperadas. En paralelo, y con apoyo de anotaciones de Reactome, complementamos esta etapa mediante una curación manual orientada a describir las principales funciones biológicas representadas en el conjunto de interactores, priorizando ejes funcionales reportados en la literatura para proteínas recurrentes.

Este análisis reveló la presencia de un conjunto de proteínas asociadas a la regulación del ciclo celular, la respuesta al daño en el ADN y el control de la estabilidad genómica. Entre ellas se identificaron reguladores bien establecidos de la **vía de p53** y de la **respuesta al daño en el ADN**, como TRIM28, TRIM33, TNKS1BP1 y FAM32A. Entre estos, TRIM28 (KAP1) es un interactor reconocido de diferentes proteínas MAGE-I, involucrado en la regulación negativa de p53 así como en la formación de complejos MAGE/KAP1 con actividad ubiquitina E3 ligasa (87).

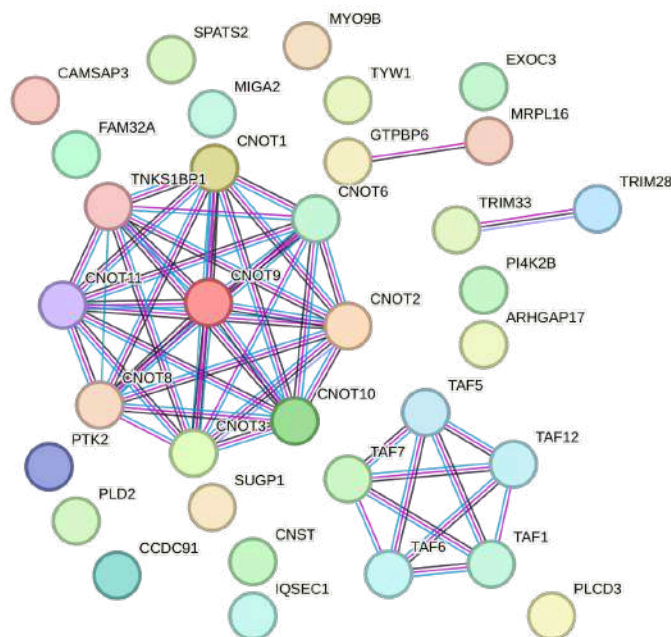


Figura 27. Red de interacciones proteína-proteína del núcleo conservado del interactoma de MAGE-A9 entre HN30, HEK293T y HCT116. Red de interacciones proteína-proteína construida a partir del conjunto de proteínas interactoras de MAGE-A9 identificadas como comunes a las tres líneas celulares analizadas. Las interacciones fueron obtenidas utilizando la base de datos STRING bajo parámetros restrictivos que consideran exclusivamente interacciones físicas con evidencia experimental. Cada nodo representa una proteína y cada recta una interacción proteína-proteína validada experimentalmente. La representación de la red permite visualizar la organización del núcleo conservado del interactoma y la distribución de módulos funcionales asociados a procesos como regulación

Además, se observó de manera consistente la presencia de múltiples subunidades del **complejo basal de transcripción** TFIID, incluyendo TAF1, TAF5, TAF6, TAF7 y TAF12. Estas proteínas forman parte del núcleo estructural y regulador de TFIID, un complejo esencial para la iniciación (PIC) de la transcripción dependiente de la ARN polimerasa II. En este contexto, la detección simultánea de varias subunidades de TFIID sugiere una asociación de MAGE-A9 con el aparato basal de transcripción más que con factores transcripcionales individuales .

Asimismo, el interactoma incluyó numerosos componentes del complejo CCR4-NOT, tales como CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT6, CNOT8, CNOT9, CNOT10 y CNOT11. Este complejo constituye un regulador central de la expresión

génica post-transcripcional, controlando la estabilidad y degradación de mRNA, el acoplamiento entre transcripción y traducción y la adaptación celular a distintas formas de estrés, incluida la respuesta al daño en el ADN de manera indirecta.

Por otra parte, se identificaron proteínas involucradas en señalización, dinámica del citoesqueleto, migración celular y adhesión, procesos estrechamente vinculados al control proliferativo y a la respuesta celular al estrés. En este grupo se destacan PTK2 (FAK), ARHGAP17, IQSEC1, MYO9B, PLD2, PLCD3, PI4K2B, EXOC3, CNST y CAMSAP3. PTK2/FAK constituye un nodo central de señalización que integra señales de adhesión, supervivencia y migración, con conexiones funcionales con la vía de p53 y con respuestas adaptativas a hipoxia y daño genotóxico. ARHGAP17 regula la actividad de Cdc42 en invadopodios, mientras que IQSEC1 y MYO9B modulan la señalización de pequeñas GTPasas asociadas a la reorganización del citoesqueleto y a la migración celular. A su vez, PLD2, PLCD3 y PI4K2B participan en rutas de señalización dependientes de fosfoinosítidos que controlan proliferación y supervivencia celular y EXOC3, CNST y CAMSAP3 contribuyen al tráfico vesicular, la polaridad celular y la organización del citoesqueleto.

La presencia recurrente de proteínas asociadas a regulación transcripcional, señalización, dinámica del citoesqueleto y respuesta al daño en el ADN sugiere que MAGE-A9 se integra en redes multiproteicas que coordinan estos procesos. Este patrón se observa de manera consistente en las tres líneas celulares analizadas y resulta concordante con los análisis del interactoma en HN30, los datasets de BioPlex y los cambios transcripcionales identificados por RNA-seq, apoyando la coherencia global del modelo funcional propuesto y la relación con el fenotipo maligno asociado a la expresión de MAGE-A9 en tumores de distinto origen.

Seguidamente, verificaremos las interacciones de MAGE-A9 con proteínas de interés en este trabajo como: otras proteínas MAGE-I, p62/SQSTM1 y FAK1 (PTK2).

4.4 Interacciones de MAGE-A9 con otras proteínas de la familia MAGE en modelos HNSCC y no HNSCC

A partir de antecedentes de nuestro laboratorio que demuestran que el MHD puede mediar interacciones MAGE–MAGE funcionalmente relevantes, como el caso previamente descrito de la interacción entre MAGE-A6 y MAGE-A11 para la activación de AR en células de cáncer de próstata (93)(93), nos propusimos investigar si MAGE-A9 establece interacciones con otros miembros de la familia MAGE. En particular, buscamos determinar si dichas interacciones se observan tanto en modelos celulares de HNSCC como en modelos no derivados de HNSCC, y si dependen del contexto celular, del estado tumoral o de la identidad tisular.

En estos análisis observamos que MAGE-A9, cuando fue utilizada como carnada (bait), no co-inmunoprecipitó con otras proteínas de la familia MAGE en ninguna de las líneas celulares analizadas. Sin embargo, cuando otras proteínas MAGE fueron utilizadas como carnada, MAGE-A9 endógena fue detectada asociándose con MAGE-A1, MAGE-A4 y MAGE-A10 en células HEK293T, y con MAGE-A1 y MAGE-A4 en células HCT116, identificándose así un subconjunto de interacciones conservadas entre ambas líneas celulares (Tabla 3).

Tabla 3. Proteínas MAGE interactoras de MAGE-A9 en modelos HNSCC y no HNSCC observadas por IP/MS		
Línea celular	Enfoque	Proteínas MAGE asociadas
HN30	este trabajo	MAGE-A10, MAGE-C2
HEK293T	BioPlex	MAGE-A1, MAGE-A4, MAGE-A10
HCT116	BioPlex	MAGE-A1, MAGE-A4
HEK293T + HCT116	BioPlex	MAGE-A1, MAGE-A4

Tabla 3. Interacciones MAGE–MAGE asociadas a MAGE-A9 en modelos HNSCC y no HNSCC. La tabla resume las interacciones entre MAGE-A9 y otros miembros de la familia MAGE identificadas en distintos modelos celulares. Se incluyen datos provenientes del análisis de inmunoprecipitaciones seguidas de espectrometría de masas (IP-MS) generados

en este trabajo en células HN30 (modelo HNSCC), así como interacciones reportadas en estudios de interactoma de gran escala del consorcio BioPlex en células HEK293T y HCT116 (modelos no HNSCC). Se indican las proteínas MAGE asociadas a MAGE-A9 en cada línea celular, así como las interacciones compartidas entre distintos contextos celulares.

Por otro lado, en el estudio del interactoma de MAGE-A9 en la línea HN30 de HNSCC, generado en este trabajo, observamos que MAGE-A9 interactúa con MAGE-A10 y MAGE-C2, sugiriendo la existencia de interacciones MAGE–MAGE específicas del contexto tumoral de cabeza y cuello.

Con el objetivo de evaluar experimentalmente estas asociaciones y validar de manera directa las interacciones MAGE–MAGE detectadas a nivel proteómico, realizamos ensayos de inmunoprecipitación seguidos de Western blot .

En primer lugar, llevamos a cabo inmunoprecipitaciones de MAGE-A9 en células HN30MS-A9, revelando las membranas con un anticuerpo anti-pan-MAGE-A (clon 6C1). Este anticuerpo reconoce múltiples miembros de la subfamilia MAGE-A. En estas condiciones, observamos una señal positiva en las fracciones inmunoprecipitadas, indicando que MAGE-A9 co-inmunoprecipita con proteínas pertenecientes a la subfamilia MAGE-A (Figura 28).

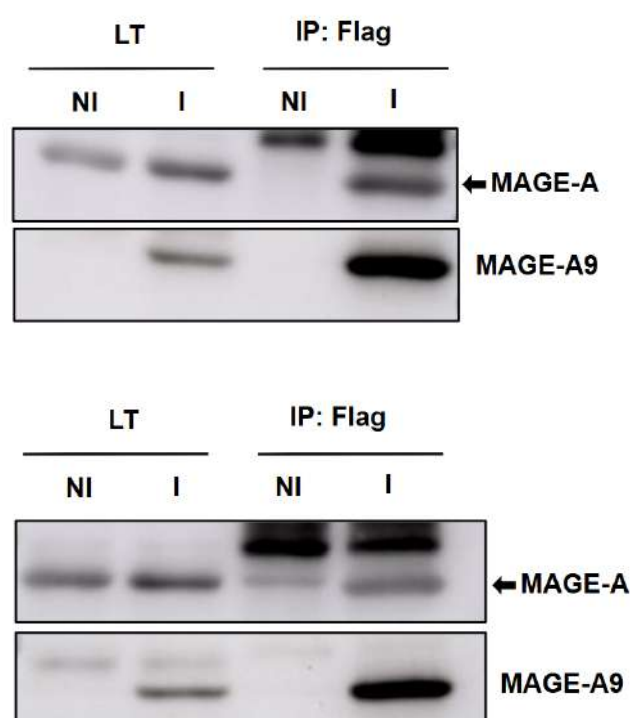


Figura 28. Inmunoprecipitación de MAGE-A9 revelada con anticuerpo anti-pan MAGE-A. Ensayos de inmunoprecipitación (IP) de Flag-MAGE-A9 realizados en células HN30MS-A9, seguidos de Western blot revelado con un anticuerpo anti-panMAGE-A (clon 6C1). **Panel superior:** células HN30MS-A9 cultivadas en ausencia de suero (0% SBF). **Panel inferior:** células HN30MS-A9 cultivadas en presencia de suero (10% SBF). En ambas condiciones se detectan proteínas de la subfamilia MAGE-A co-inmunoprecipitadas con MAGE-A9, evidenciando interacciones intrafamiliares. NI e I indican “No Inducido” e “Inducido” con doxiciclina, respectivamente.

El experimento se realizó tanto en presencia como en ausencia de suero. Considerando (i) las proteínas MAGE-A reconocidas por el anticuerpo 6C1, (ii) las proteínas MAGE expresadas en nuestra línea HN30 según los análisis previos, y (iii) los pesos moleculares observados en el Western blot, las bandas detectadas podrían corresponder a MAGE-A2, MAGE-A4, MAGE-A3/A6 y MAGE-A1. No obstante, dado que se ha descrito que MAGE-A2 y MAGE-A6 se desestabilizan en condiciones de ausencia de suero, y considerando que la señal se mantiene en dichas condiciones, nuestros resultados sugieren que los interactores detectados podrían corresponder principalmente a MAGE-A1 y/o MAGE-A4. Sin embargo, debido al carácter pan-específico del anticuerpo empleado, no es posible asignar inequívocamente la identidad de cada proteína en este ensayo.

Con el objetivo de validar de manera dirigida una de las interacciones sugeridas por los análisis de interactoma y por los ensayos con anticuerpo pan-MAGE-A, realizamos un experimento adicional en células HEK293T co-transfectadas con los vectores de expresión de HA-MAGE-A1 y 3xFlag MAGE-A9 (Figura 29). En estas condiciones, la inmunoprecipitación de MAGE-A9 seguida de detección específica confirmó la interacción entre MAGE-A9 y MAGE-A1, proporcionando evidencia directa de una asociación intrafamiliar MAGE–MAGE.

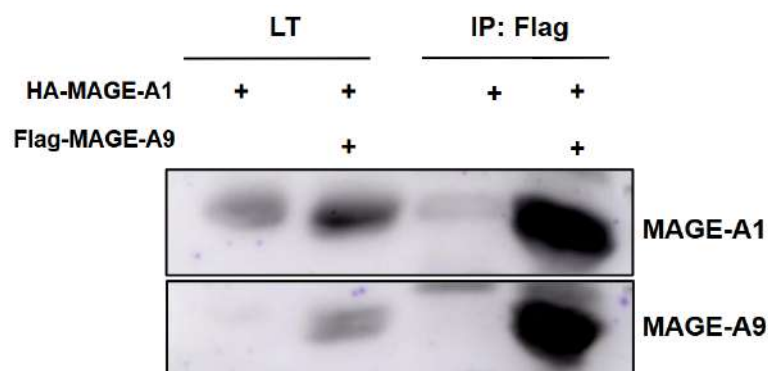


Figura 29. Validación experimental de la interacción entre MAGE-A9 y MAGE-A1 mediante co-inmunoprecipitación en células HEK293T. Células HEK293T co-transfectadas con vectores de expresión para 3xFLAG-MAGE-A9 y HA-MAGE-A1 . Se inmunoprecipitó con anti-FLAG. Las muestras inmunoprecipitadas fueron analizadas por Western blot y reveladas con anticuerpo anti tag HA y anti MAGE-A9. Las fracciones inmunoprecipitadas se analizaron por Western blot revelado con anticuerpos anti-HA y anti-MAGE-A9, ambos utilizados a una dilución 1:1000 e incubados overnight.

Estos resultados sugieren que la función de MAGE-A9 podría estar modulada por su participación en complejos MAGE–MAGE, cuya composición variaría según el contexto celular y las condiciones ambientales, como la disponibilidad de suero. En este marco, la interacción entre proteínas MAGE mediada por dominios conservados como el MHD emerge como un posible mecanismo adicional de regulación funcional.

4.5 Validación de la interacción de MAGE-A9 con p62/SQSTM1

Entre los interactores identificados en el análisis proteómico del interactoma en células HN30, p62/SQSTM1 emergió como un candidato de interés. p62 es un adaptador central de autofagia selectiva que reconoce proteínas ubiquitinadas, frecuentemente mediante cadenas tipo K63, y las dirige hacia degradación lisosomal mediante su interacción con LC3. El trabajo de Pineda et al. (2015) mostró que MAGE-A3 y MAGE-A6 se asocia con la E3 ligasa TRIM28 para promover la ubiquitinación y degradación de AMPK α 1, llevando a la pérdida de autofagia e

hiperactivación de mTORC1 favoreciendo una reprogramación metabólica tumoral hacia estados más anabólicos y resistentes al estrés energético (87)

Estudios previos mostraron que MAGE-A10 puede modular la interacción entre p62 y sus sustratos, regulando la ubiquitinación tipo K63 y la estabilidad de acetiltransferasas como KAT2A/KAT2B (Fu et al.,2025). Este antecedente resulta relevante en nuestro modelo, ya que identificamos a KAT2A como interactor de MAGE-A9 en células HN30 y observamos su asociación con MAGE-A9 y MAGE-A10 en datasets del consorcio BioPlex. Además, MAGE-A10 también fue detectada entre los interactores de MAGE-A9 en HN30.

Para evaluar directamente esta interacción, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación en células HN30MS-A9. En la inmunoprecipitación de Flag-MAGE-A9 mediante anti-FLAG se detectó p62 en el complejo recuperado, confirmando la interacción física entre MAGE-A9 y p62 en nuestro sistema experimental (Figura 30).

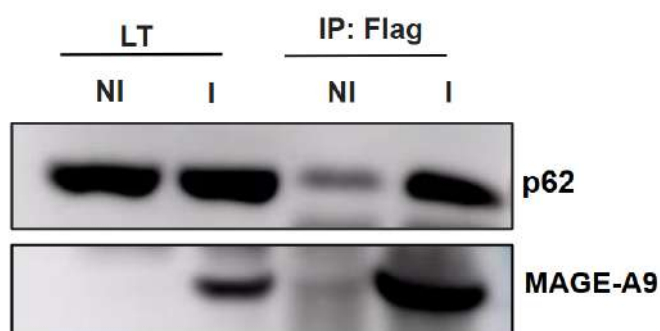


Figura 30. Validación experimental de la interacción entre MAGE-A9 y p62 mediante co-inmunoprecipitación en células HN30. Ensayo de co-inmunoprecipitación (IP) realizado a partir de células HN30 con expresión inducible de MAGE-A9, inducidas durante 48 h con doxíciclina (2 $\mu\text{g/mL}$). Se inmunoprecipitó con anti-FLAG. Las muestras inmunoprecipitadas fueron analizadas por Western blot y reveladas con anticuerpo anti-p62 (CellSignaling), seguido de detección de MAGE-A9 (Abcam), ambos utilizados a una dilución 1:1000 e incubados overnight.

Este resultado confirma la formación de un complejo entre MAGE-A9 y p62/SQSTM1 en células HN30. La identificación y validación de este interactor sugiere que MAGE-A9 podría asociarse a complejos proteicos vinculados a

ubiquitinación y autofagia selectiva, procesos que podrían contribuir a la regulación de la proteostasis en células tumorales.

4.6 MAGE-A9 interactúa con FAK1 y aumenta pFAK en células HNSCC

Entre los interactores identificados en nuestros análisis proteómicos, **PTK2/FAK1** (quinasa focal de adhesión 1) una tirosina-quinasa citoplasmática no receptora (ver introducción sección 2.3.2), emergió como un candidato de particular interés, ya que fue detectado de manera consistente como interactor de MAGE-A9 en las tres líneas celulares analizadas. Esta observación adquiere relevancia adicional porque FAK1 actúa como un nodo central que conecta la señalización dependiente de adhesión con múltiples procesos celulares que coinciden con los fenotipos asociados a la expresión de MAGE-A9 observados en este trabajo, incluyendo supervivencia celular bajo estrés genotóxico, migración e invasión tumoral, regulación de la actividad transcripcional de **p53** y procesos angiogénicos asociados a **VEGF**. En conjunto, estas funciones, que además se encuentran representadas entre las categorías enriquecidas en nuestros análisis multi-ómicos, sugieren que la interacción entre MAGE-A9 y FAK1 podría contribuir a integrar señales del microambiente tumoral con programas de supervivencia celular, plasticidad tumoral y adaptación al estrés.

Por otra parte, la relación FAK1/MAGE-A9 resulta de sumo interés, ya que por la actividad oncogénica de FAK1, se han desarrollado fármacos inhibidores de su actividad kinasa. Si parte de la acción de MAGE-A9 es a través de FAK1, su inhibidor, que ya ha sido aprobado por la FDA en terapia combinada - avutometinib (RAF/MEK inhibidor) + defactinib (FAK inhibidor), se podría evaluar su utilización en tumores MAGE-A9 positivos.

Con el fin de validar experimentalmente la asociación entre MAGE-A9 y la vía de señalización de FAK1, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación de MAGE-A9 utilizando anticuerpo anti-FLAG en células HN30MS-A9 (Figura 33). Estos experimentos se hicieron en colaboración con la Dra Marina Flamini del laboratorio

de Biología Tumoral , IMBECU, Mendoza y permitieron corroborar la interacción de MAGE-A9 con FAK1 fosforilada en Tyr397 (pFAK-Y397), marcador ampliamente utilizado de activación temprana de la quinasa, apoyando la presencia de complejos que contienen ambas proteínas en nuestro modelo experimental. (Figura 31). También corroboramos la interacción de MAGE-A9 con FAK-1 total (imagen no mostrada).

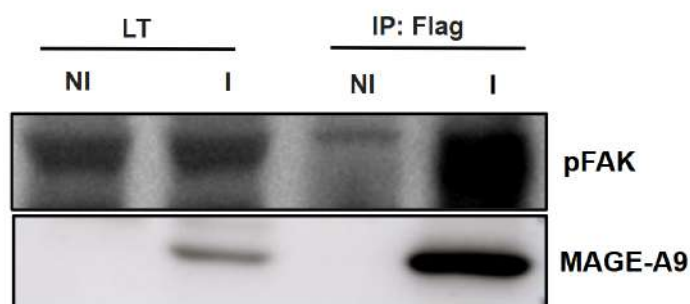


Figura 31: MAGE-A9 interactúa con FAK1 fosforilada en Tyr397. Ensayo de co-inmunoprecipitación (IP) realizado a partir de células HN30 con expresión inducible de MAGE-A9, inducidas durante 48 h con doxíciclina (2 µg/mL). La inmunoprecipitación se llevó a cabo utilizando anticuerpo anti-FLAG y las muestras fueron analizadas por Western blot y reveladas con anticuerpo anti-pFAK1 (Tyr397) y anti-MAGE-A9 incubadas over night usando una dilucion 1:1000 de cada uno.

Una vez corroborada la interacción entre MAGE-A9 y la forma fosforilada de FAK1, nos propusimos evaluar si la presencia de MAGE-A9 se asociaba con cambios en el estado de fosforilación de la quinasa. Para evaluar el efecto de MAGE-A9 sobre la activación de FAK1, analizamos lisados totales de células HN30 inducidas durante 48 h y 72 h bajo condiciones de privación de suero, lo que permite reducir la activación basal dependiente de factores de crecimiento. En estas condiciones observamos que las células que expresan MAGE-A9 presentan un aumento en los niveles de pFAK1 (Tyr397) en comparación con el control no inducido (Figura 32), indicando que la presencia de MAGE-A9 favorece la activación basal de FAK1 incluso en ausencia de estímulos externos.

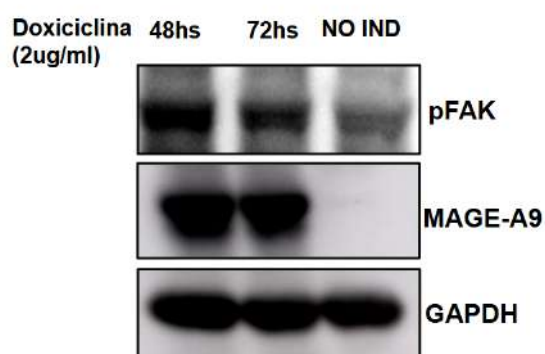


Figura 32. La expresión de MAGE-A9 se asocia con un aumento en los niveles proteicos de FAK1 fosforilada en Tyr397. Lisados totales provenientes de células HN30 inducidas con doxiciclina (2 µg/mL) durante 48 h y 72 h en condiciones de privación de suero fueron analizados por Western blot. Las membranas fueron reveladas con anticuerpo anti-pFAK1 (Tyr397) para detectar la forma fosforilada de FAK1 y con anticuerpo anti-MAGE-A9. GAPDH se utilizó como control de carga.

Dado que las proteínas MAGE carecen de actividad quinasa intrínseca, es poco probable que MAGE-A9 fosforile directamente a FAK1. Una explicación compatible con nuestros resultados es que MAGE-A9 actúe como modulador estructural o proteína adaptadora que favorezca la formación o estabilidad de complejos asociados a FAK1, promoviendo su autofosforilación en Tyr397. Nuestros ensayos no permiten discriminar entre un aumento en la tasa de autofosforilación o una estabilización de la forma fosforilada de la quinasa.

El aumento de pFAK1 observado en presencia de MAGE-A9 resulta particularmente relevante desde el punto de vista biológico, ya que la activación de FAK ha sido ampliamente asociada con fenotipos malignos en tumores sólidos. En particular, niveles elevados de pFAK se han correlacionado con mayor migración e invasión tumoral, resistencia a apoptosis y peor pronóstico clínico en diversos tipos de cáncer (Sulzmaier et al., 2014). En este contexto, nuestros resultados sugieren que la expresión de MAGE-A9 podría favorecer estados de señalización dependientes de FAK asociados a progresión tumoral.

Como indicamos anteriormente, la potencialidad de un eje MAGE-A9/FAK1 y la existencia de inhibidores de FAK1 es un proyecto que continuaremos por su proyección en investigación pre-clínica.

PARTE 5

5. Cambios globales en la ubiquitinación asociados a la expresión de MAGE-A9

Diversos estudios han demostrado que las proteínas de la familia MAGE pueden modular procesos de ubiquitinación mediante su asociación con E3 ligasas, actuando como adaptadores (86). Estas interacciones suelen estar mediadas por el MAGE Homology Domain (MHD) y han sido descritas para varios miembros de la familia MAGE-A, incluyendo MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10 y MAGE-A11, que regulan la estabilidad de proteínas involucradas en procesos clave como señalización de p53, metabolismo celular y respuesta al estrés (87). En general, la expresión de proteínas MAGE se asocia con cambios en los niveles de ubiquitinación de proteínas celulares, ya sea potenciando la actividad de E3 ligasas o facilitando el reclutamiento de nuevos sustratos hacia estos complejos ubiquitina-dependientes. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado aproximaciones proteómicas globales destinadas a identificar de manera sistemática los cambios en ubiquitinación asociados a miembros específicos de esta familia.

Con el objetivo de abordar este aspecto, analizamos los cambios globales en ubiquitinación proteica asociados a la expresión de MAGE-A9 mediante un análisis de ubiquitinoma, hecho en colaboración con el Dr. Philippe Soubeyran (Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Inserm). Realizamos este experimento en nuestro modelo celular HN30MS-A9 mediante un esquema de purificación en tándem seguido de espectrometría de masas. Para ello, transdujimos las células con un vector que expresa ubiquitina marcada con etiquetas 6-His-FLAG (6-His-FLAG-Ub), lo que nos permitió la purificación selectiva de proteínas ubiquitinadas. Utilizamos un vector de GFP como control.

Enriquecimos las proteínas ubiquitinadas mediante una purificación secuencial. En primer lugar, sometimos los lisados celulares a pulldown en columnas de afinidad a níquel, aprovechando el tag 6-His. Posteriormente, realizamos una segunda purificación mediante inmunoprecipitación con beads anti-FLAG, aumentando la

especificidad del enriquecimiento. Finalmente, eluimos las proteínas con péptidos FLAG y las procesamos para su análisis por espectrometría de masas.

Este procedimiento nos permitió detectar el conjunto de proteínas diferencialmente ubiquitinadas por la expresión de MAGE-A9 en células HN30MS-A9. El análisis cuantitativo identificó 37 proteínas con niveles aumentados de ubiquitinación y 540 proteínas con niveles reducidos en presencia de MAGE-A9 respecto del control.

Para visualizar la distribución global de estas proteínas diferencialmente ubiquitinadas, representamos los resultados mediante un gráfico tipo volcano plot (Figura 33), donde el eje x corresponde al cambio relativo en ubiquitinación ($\log_2$ fold change) y el eje y a la significancia estadística ($-\log_{10}$ p-value). Este análisis reveló una distribución asimétrica, con un claro predominio de proteínas que presentan disminución de ubiquitinación en presencia de MAGE-A9.

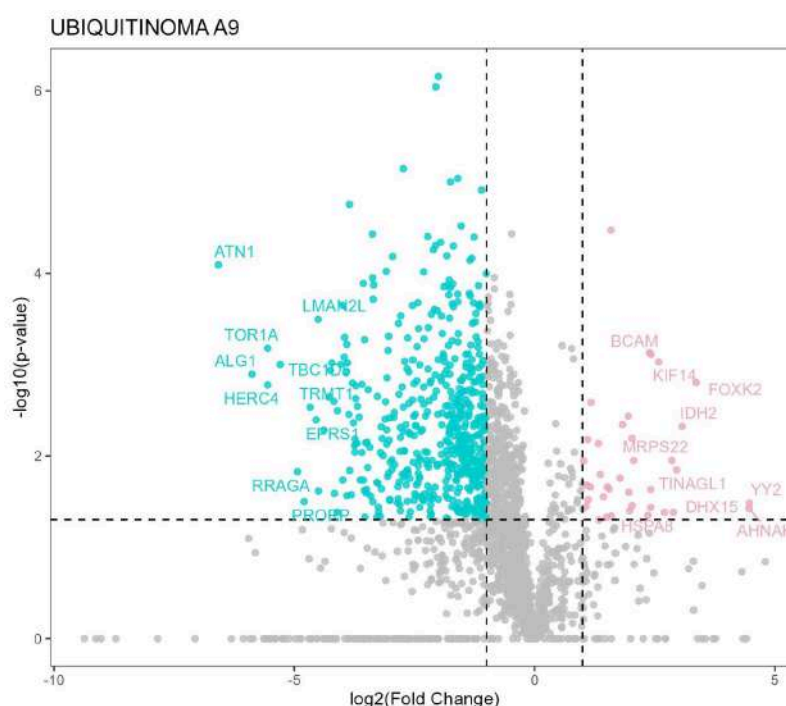


Figura 33: Análisis global de proteínas diferencialmente ubiquitinadas por la expresión de MAGE-A9 en células HN30. Gráfico tipo volcano plot que muestra los cambios en los niveles relativos de ubiquitinación proteica obtenidos mediante espectrometría de masas en células HN30MS-A9 con expresión inducida de MAGE-A9 respecto del control, no inducido. Cada punto representa una proteína identificada en el análisis. El eje X indica el $\log_2$ fold change en ubiquitinación, mientras que el eje Y corresponde al $-\log_{10}$ (p valor) asociado a la significancia estadística. Las proteínas coloreadas en rosa presentan niveles aumentados de ubiquitinación en presencia de

MAGE-A9, las turquesa muestran una disminución relativa. Las proteínas más diferencialmente ubiquitinadas (top 10) se indican sobre el gráfico.

Cabe señalar que el enfoque experimental utilizado no permite discriminar entre distintos tipos de modificaciones de ubiquitina (por ejemplo, cadenas K48 o K63) ni entre eventos de mono- y poliubiquitinación. En consecuencia, las variaciones observadas en los niveles de ubiquitinación no deben interpretarse exclusivamente como indicadores de cambios en degradación proteica, sino que podrían reflejar alteraciones en procesos de señalización dependientes de ubiquitina, en la estabilidad de complejos proteicos o en mecanismos de proteostasis

5.1 Análisis funcional de las proteínas diferencialmente ubiquitinadas

Con el objetivo de contextualizar biológicamente los cambios observados en el ubiquitinoma asociado a la expresión de MAGE-A9, analizamos la red de interacciones proteína–proteína del conjunto de proteínas con ubiquitinación disminuida y aumentada , aplicando un análisis de agrupamiento siguiendo el mismo enfoque utilizado previamente en la sección 4.2.

- **Análisis de las proteínas menos ubiquitinadas en presencia de MAGE-A9**

El análisis de agrupamiento de las proteínas con ubiquitinación disminuida en presencia de MAGE-A9 reveló múltiples módulos funcionales dentro de la red de interacciones (Figura 34).

Un primer eje corresponde a señalización asociada a adhesión celular, centrado en FAK-1, representado por el nodo funcional *MAPK and adhesion signaling module*, compuesto por 49 proteínas. Este módulo agrupa componentes vinculados a señalización MAPK, reorganización del citoesqueleto y migración celular, y se asocia con señalización dependiente de adhesión y respuestas celulares a estrés.

La organización de este cluster resulta consistente con los ejes funcionales previamente identificados en el interactoma y en los análisis transcriptómicos, particularmente aquellos relacionados con adhesión celular, migración e inducción de programas pro-angiogénicos.

Un segundo eje funcional corresponde a organización de membranas y tráfico vesicular, representado por los nodos *Endocytic trafficking and recycling machinery* y *Golgi-ER retrograde transport module*, junto con módulos asociados a reprogramación metabólica y redox (*Metabolic and redox reprogramming module*) y remodelación de membranas fosfolipídicas (*Phospholipid metabolism and membrane remodeling module*). Estos módulos reflejan procesos relacionados con dinámica de membranas, reciclaje de receptores y organización de la superficie celular.

Un tercer eje agrupa módulos nucleares de regulación epigenética y control transcripcional, incluyendo nodos asociados a acetilación de histonas y regulación transcripcional (*Chromatin acetylation and transcriptional regulation module*), metilación H3K4 y activación transcripcional (*H3K4 methylation and transcriptional activation module*) y organización de la envoltura nuclear y arquitectura cromatínica (*Nuclear envelope and chromatin organization module*). Este eje también incluye un nodo asociado a procesamiento de ARN y biogénesis ribosomal (*Ribosome biogenesis / RNA processing module*), consistente con procesos de organización nuclear y regulación transcriptómica.

Un cuarto eje corresponde a proteostasis y señalización dependiente de ubiquitina, representado por un nodo centrado en SQSTM1/p62 (*Selective autophagy and ubiquitin signaling module*), relacionado con autofagia selectiva y mecanismos de control de calidad proteico

Finalmente, se identificó un quinto eje asociado a estabilidad genómica y reparación del ADN, representado por el nodo *Mismatch repair and genome stability module*, que agrupa proteínas involucradas en vigilancia genómica y mantenimiento de la integridad del ADN. Este módulo conecta los cambios observados en el ubiquitinoma con mecanismos de respuesta al daño en el ADN, en concordancia

con el eje p53/DDR previamente identificado en el análisis transcriptómico (resultados parte 3) y proteómico (resultados parte 4).

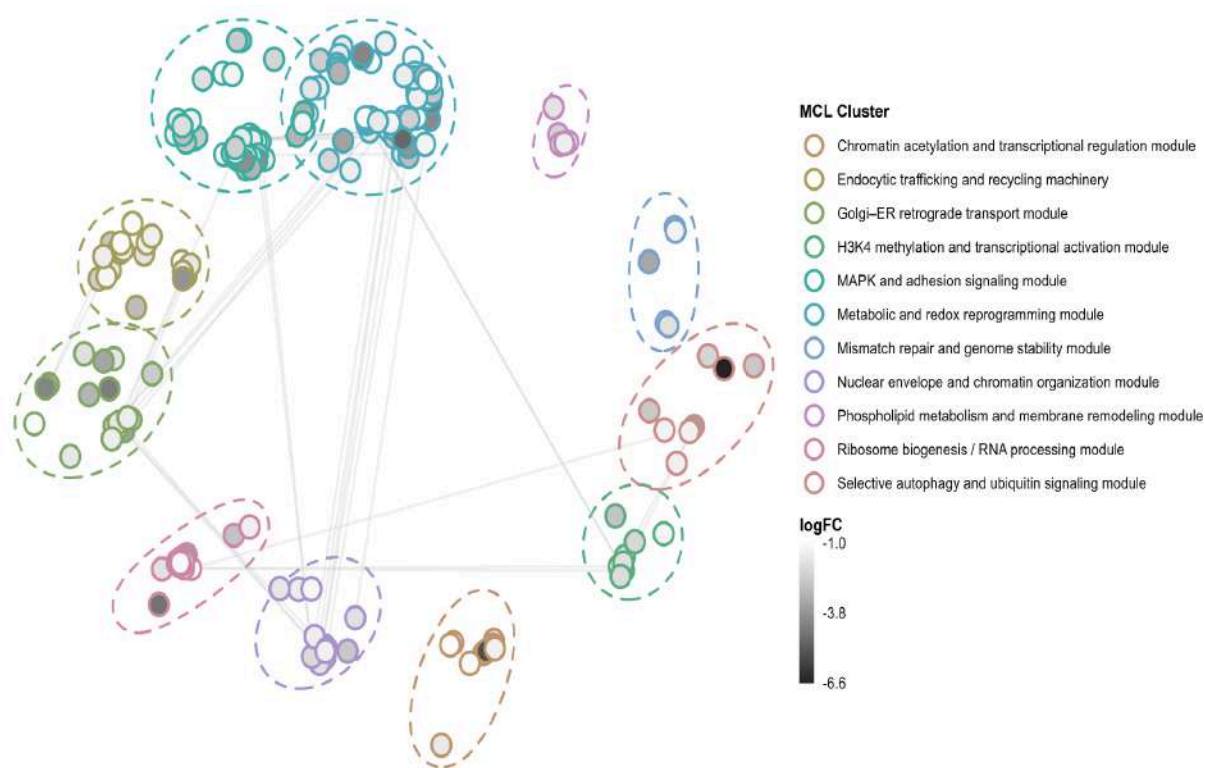


Figura 34. Identificación de clusters funcionales entre las proteínas hipoubiquitinadas en presencia de MAGE-A9. Red de interacciones proteína-proteína construida a partir de proteínas hipoubiquitinadas en presencia de MAGE-A9 en células HN30, visualizada y analizada mediante Cytoscape. Los clusters o módulos funcionales corresponden a conjuntos de proteínas altamente interconectadas, identificados sobre la red e integrados con interacciones reportadas en la base de datos STRING. Para cada cluster se indican las principales funciones biológicas asociadas, inferidas a partir del enriquecimiento funcional del conjunto de proteínas que lo componen. La figura muestra la organización modular del ubiquitinoma menos ubiquitinado en presencia de MAGE-A9.

• **Análisis de las proteínas más ubiquitinadas en presencia de MAGE-A9**

A diferencia del patrón observado para las proteínas con ubiquitinación disminuida, el análisis de agrupamiento mediante STRING seguido del algoritmo MCL del subconjunto de proteínas con ubiquitinación aumentada reveló la presencia de módulos más pequeños y funcionalmente acotados (Figura 35).

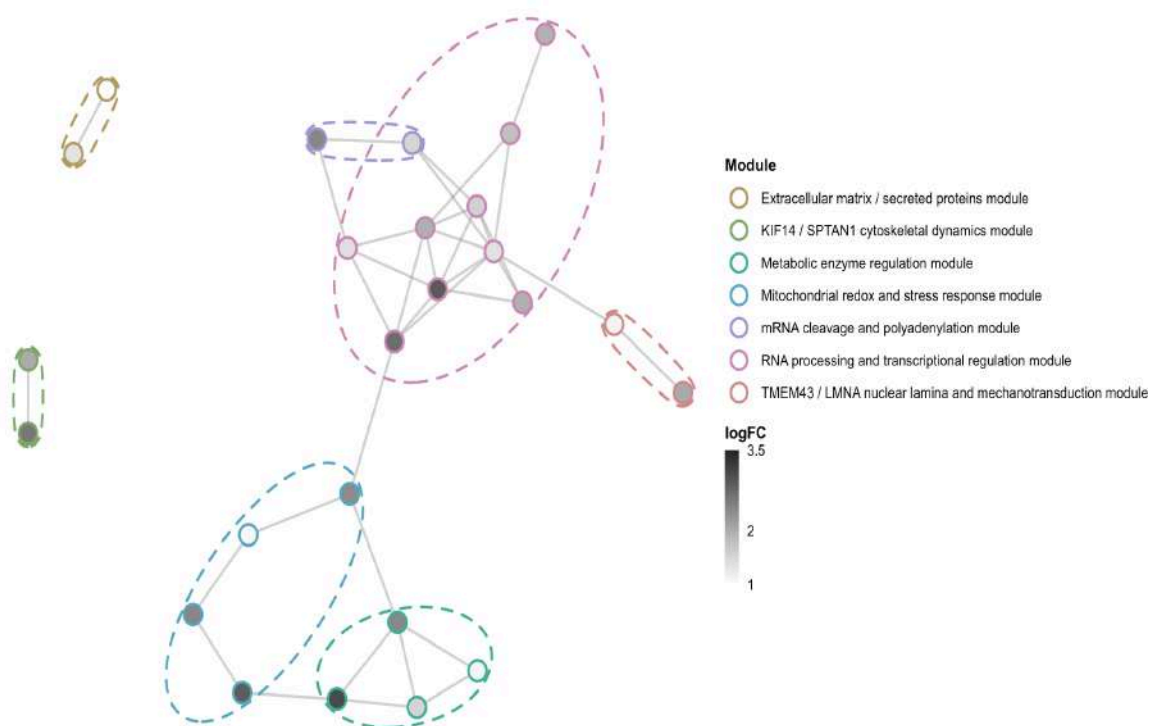


Figura 35: Identificación de clusters funcionales entre las proteínas más ubiquitinadas en presencia de MAGE-A9. Red de interacciones proteína–proteína construida a partir de proteínas up-ubiquitinadas en presencia de MAGE-A9 en células HN30, visualizada y analizada mediante Cytoscape. Los clusters o módulos funcionales corresponden a conjuntos de proteínas altamente interconectadas, identificados sobre la red e integrados con interacciones reportadas en la base de datos STRING. Para cada cluster se indican las principales funciones biológicas asociadas, inferidas a partir del enriquecimiento funcional del conjunto de proteínas que lo componen. La figura muestra la organización modular del ubiquitinoma más ubiquitinado en presencia de MAGE-A9 en.

Un primer eje funcional corresponde a procesamiento de ARN y regulación post-transcripcional, representado por los nodos *RNA processing and post-transcriptional regulation module* y *mRNA cleavage and polyadenylation module*, que agrupan componentes asociados al procesamiento, maduración y regulación del ARN mensajero.

Un segundo eje corresponde a metabolismo mitocondrial y homeostasis redox, representado por los nodos *mitochondrial redox and metabolic regulation modules*,

que agrupan proteínas vinculadas a metabolismo mitocondrial y regulación del estado redox celular.

Finalmente, identificamos un tercer eje asociado a componentes extracelulares y remodelación del microambiente, que agrupa proteínas secretadas o asociadas al espacio extracelular, representado por un pequeño módulo funcional dentro de la red de interacciones.

5.2 Identificación de reguladores de ubiquitinación dentro del interactoma de MAGE-A9

Con el objetivo de explorar posibles mecanismos que contribuyan a los patrones observados en el ubiquitinoma, analizamos dentro del interactoma de MAGE-A9 la presencia de proteínas vinculadas al sistema ubiquitina–proteasoma.

Este análisis reveló la presencia de múltiples reguladores de ubiquitinación, incluyendo varias E3 ligasas y proteínas asociadas a complejos E3, entre las que se encuentran TRIM28, HUWE1 y HERC2. Asimismo, identificamos la deubiquitinasa USP7, un regulador ampliamente asociado al control dinámico de ubiquitinación de factores nucleares.

Además, el interactoma incluye numerosas subunidades del proteasoma, incluyendo componentes del núcleo catalítico 20S (por ejemplo PSMA y PSMB) y de la partícula reguladora 19S (por ejemplo PSMD y PSMC), lo que indica que componentes de la maquinaria proteasomal también forman parte de los complejos de interacción asociados a MAGE-A9.

En conjunto, estos resultados muestran que MAGE-A9 interactúa con múltiples componentes de la maquinaria celular de ubiquitinación, incluyendo E3 ligasas, deubiquitinastas y subunidades del proteasoma.

A partir de estos resultados, integramos el análisis del ubiquitinoma con la composición del interactoma de MAGE-A9 con el objetivo de identificar proteínas compartidas entre ambos enfoques que pudieran representar nodos funcionales relevantes. Para ello, analizamos la intersección entre las proteínas diferencialmente ubiquitinadas y los interactores de MAGE-A9.

5.3 Superposición entre el ubiquitinoma y el interactoma de MAGE-A9

Con el objetivo de integrar los cambios globales observados en el ubiquitinoma con las asociaciones proteína–proteína previamente identificadas en el interactoma de MAGE-A9 en células HN30 (resultados sección 4.2), realizamos un análisis de superposición entre ambos conjuntos de datos. Mientras que el ubiquitinoma describe modificaciones postraduccionales a nivel global, el interactoma define el entorno molecular asociado a MAGE-A9. La comparación entre ambos análisis mostró que, de un total de 325 interactores identificados por IP/MS y 540 proteínas con menor ubiquitinación relativa, existe un subconjunto de 35 proteínas compartidas (Figura 36, Tabla 4).

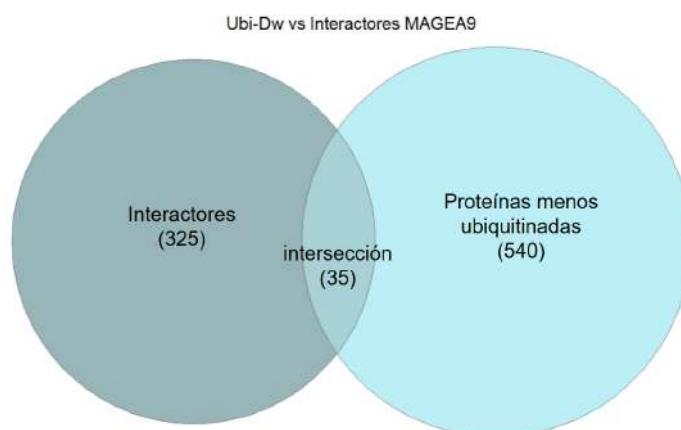


Figura 36. Superposición entre proteínas menos ubiquitinadas y el interactoma de MAGE-A9 en células HN30.

Diagrama de Venn generado en R que muestra la intersección entre las proteínas que interactúan significativamente con MAGE-A9 identificadas por IP/MS (conjunto azul) y las proteínas que presentan una disminución en sus niveles de ubiquitinación en presencia de MAGE-A9 (conjunto celeste). Los números dentro de cada área indican el recuento de proteínas correspondiente a cada conjunto y a su intersección.

Tabla 4. Interactores de MAGE-A9 con ubiquitinación reducida en células HN30.				
Proteínas comunes entre el ubiquitinoma y el interactoma.				
ABR	CIAO1	FAK1	PLCD3	SLC16A1
AGPAT2	CNOT1	FBXO2	PSMC6	SLC25A13
AIFM1	CTSC	HUWE1	PSMD13	SQOR
ALDOC	DNAJC10	MMS19	PTK2	SQSTM1
ARMC8	DPM1	MRPS17	RANBP9	TNFAIP2
CAMK2G	EEF1A2	NPM3	RICTOR	WDR26
CAPZA2	EXOC2	PALS1	RIOK3	ZNF281

Tabla 4. Listado de proteínas interactoras de MAGE-A9 que presentan ubiquitinación reducida.

Llamó nuestra atención que entre las proteínas interactoras de MAGE-A9 menos ubiquitinadas se encuentran FAK1/PTK2 y p62/SQSTM1. Ambas proteínas fueron estudiadas en la sección anterior (sección 4.4 y 4.5). Se ha descrito que la ubiquitinación de FAK regula su recambio en adhesiones focales y modula la intensidad y duración de las señales downstream asociadas a supervivencia celular, migración e invasión tumoral. De manera análoga, p62 utiliza cadenas de ubiquitina como señales moleculares que permiten el ensamblaje de plataformas de señalización y la selección de sustratos para degradación autofágica, posicionándose como un nodo integrador entre proteostasis y rutas de señalización oncogénicas.

Estudios recientes han demostrado que la señalización mediada por integrinas y FAK puede acoplarse funcionalmente a mecanismos de autofagia selectiva y control de calidad proteico a través de p62, permitiendo a las células tumorales reorganizar complejos de señalización frente a cambios en la adhesión celular o en la disponibilidad de nutrientes (95,96).

La disminución relativa en la ubiquitinación de estos factores podría reflejar alteraciones en su dinámica de señalización dependiente de ubiquitina o una estabilización funcional de complejos de señalización dependientes de adhesión y

estrés celular, favoreciendo la persistencia de señales pro-supervivencia en el contexto tumoral.

La estabilización de FAK en su estado activo se asocia con la activación sostenida de programas de señalización dependientes de adhesión, promoviendo un fenotipo tumoral caracterizado por aumento de la proliferación, resistencia a la muerte por apoptosis y anoikis (apoptosis causada por pérdida de adhesión), incremento de la migración e invasión celular, inducción de angiogénesis y adaptación al microambiente tumoral.

Por otro lado, a lo largo de la tesis, demostramos que MAGE-A9 se asocia con FAK, incrementa los niveles de FAK fosforilado (activo) e inhibe tanto la apoptosis como la actividad transcripcional de p53. Asimismo, la expresión de MAGE-A9 se asocia con un aumento en la expresión de VEGF y MMP2 (RT-qPCR), genes clave en angiogénesis y remodelación de la matriz extracelular, así como con un incremento de la motilidad celular evaluada mediante ensayo de herida.

Estos resultados muestran que múltiples funciones asociadas a MAGE-A9 se corresponden con fenotipos típicamente vinculados a la hiperactivación de FAK, incluyendo aumento de la supervivencia celular, migración, invasión, angiogénesis y adaptación al microambiente tumoral. La convergencia entre los fenotipos observados en nuestro sistema y aquellos ampliamente descritos para la hiperactivación de FAK adquiere particular relevancia al considerar la evidencia clínica disponible. Diversos estudios han demostrado que la sobreexpresión de FAK en tumores sólidos se asocia con mayor agresividad tumoral, incremento de la capacidad invasiva y metastásica, mayor angiogénesis y peor pronóstico clínico. De manera semejante, la expresión de MAGE-A9 ha sido asociada en distintos tipos tumorales con características clínico-patológicas adversas, incluyendo mayor grado tumoral, menor diferenciación, mayor capacidad invasiva y reducción en la supervivencia global de los pacientes.

MODELO INTEGRADOR PROPUESTO

A lo largo de esta tesis demostramos que MAGE-A9 interactúa con FAK1 y p62/SQSTM1, así como con otras proteínas de la familia MAGE (incluyendo MAGE-A1, MAGE-A4, MAGE-A10 y MAGE-C2 en distintos modelos celulares, sugiriendo la posible formación de complejos MAGE multiproteicos. En este contexto, FAK1 y p62/SQSTM1 presentan una disminución relativa de ubiquitinación, lo que sugiere una modulación selectiva de nodos de señalización y proteostasis más que un cambio global del sistema. La interacción con FAK1 se asocia con un aumento de su forma activa ($\uparrow$ pFAK1), promoviendo programas de supervivencia, migración, invasión y angiogénesis, mientras que p62 conecta estos procesos con la autofagia selectiva y el control de calidad proteico.

Asimismo, el interactoma reveló la asociación de MAGE-A9 con múltiples componentes del sistema ubiquitina–proteasoma, incluyendo E3 ligasas (TRIM28, HUWE1, HERC2), la deubiquitinasa USP7 y subunidades del proteasoma 20S y 19S, indicando su participación en la regulación dinámica de la ubiquitinación.

Recapitulando lo observado en nuestros ensayos de transcriptómica, proteómica (interactoma y ubiquitinoma), ensayos funcionales y validaciones experimentales desarrollados a lo largo de esta tesis, postulamos que MAGE-A9 no actuaría como un modulador catalítico directo, sino como un organizador capaz de influir en la dinámica de la regulación postraducciona de nodos centrales de señalización. Por ello proponemos un modelo en el cual MAGE-A9 actúa como un organizador de complejos multiproteicos, a través de su interacción con otras proteínas MAGE-I, p62 y FAK-1 y de la estabilización en su estado activo de FAK-1, contribuye la reorganización de redes de ubiquitinación, proteostasis y señalización dependiente de adhesión, lo que contribuye a un estado celular caracterizado por mayor supervivencia, menor apoptosis, aumento de la expresión de VEGF y MMPs y resistencia a quimioterapia. (Figura 37).

Las “nuevas funciones identificadas” en parte superior del modelo propuesto (Figura 38), no representan funciones ajenas a la biología tumoral; por el contrario,

corresponden a mecanismos ampliamente vinculados al cáncer, como la proteostasis, la regulación de la ubiquitinación, la autofagia selectiva, el control post-transcripcional del RNA y la respuesta inmune. La razón por la cual se los distingue de los ejes clínicamente compatibles es que, en el contexto de MAGE-A9, actualmente se interpretan como mecanismos subyacentes o de soporte capaces de modular y sostener fenotipos tumorales más directamente observables, como resistencia al daño genotóxico, migración y angiogénesis

En este contexto, el hecho de que FAK1 constituya un blanco farmacológico con inhibidores actualmente en uso clínico adquiere particular relevancia. Dado que MAGE-A9 no posee actividad catalítica ni dominios fácilmente “drogables”, la identificación de FAK1 como efector central de los fenotipos asociados a su expresión posiciona a los inhibidores de FAK como una estrategia terapéutica indirecta para contrarrestar los programas pro-tumorales inducidos por MAGE-A9. De este modo, la inhibición farmacológica de FAK1 podría revertir parcialmente los efectos sobre supervivencia, migración, angiogénesis y resistencia a tratamientos, aportando una posible vía de intervención clínica en tumores que expresan MAGE-A9.

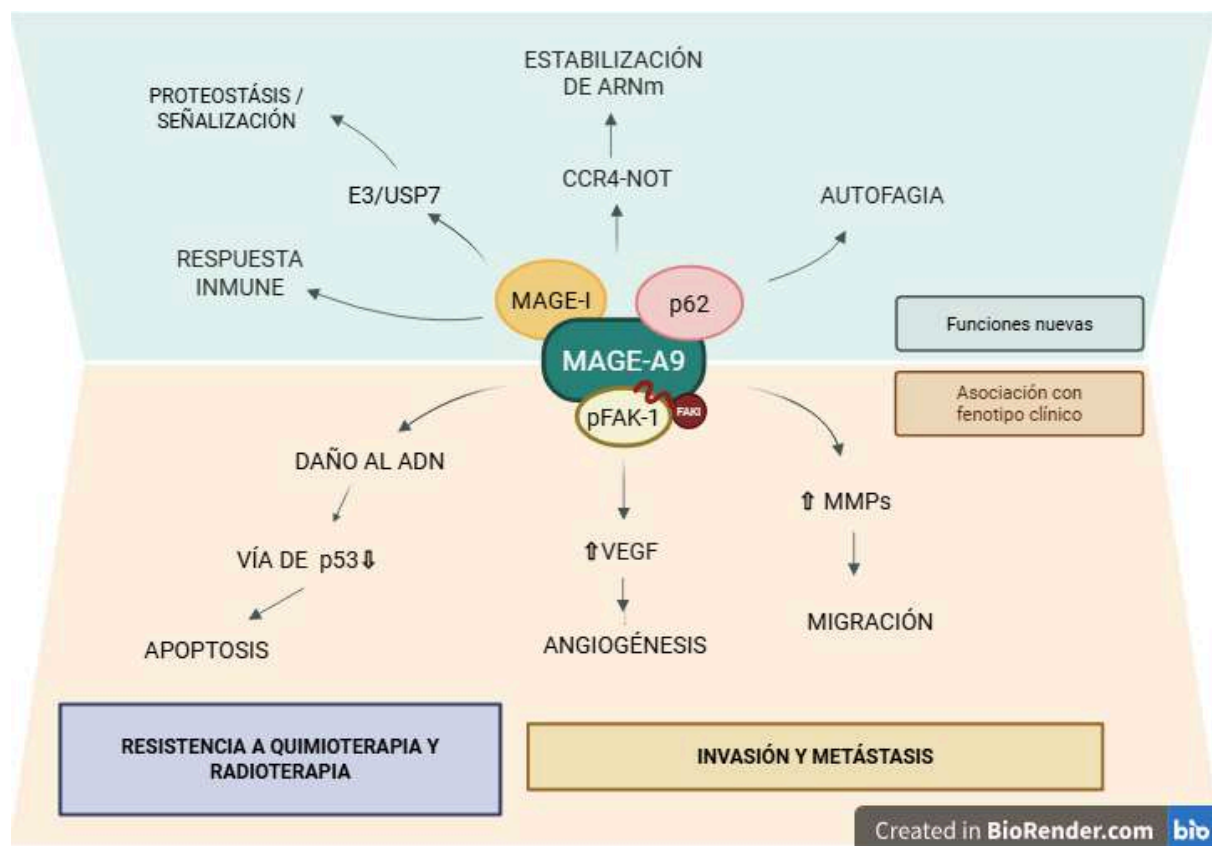


Figura 37. Modelo funcional integrador de MAGE-A9. Proponemos un esquema basado en la integración de datos transcriptómicos, interactómicos y de ubiquitinación que posiciona a MAGE-A9 como un modulador de redes de señalización asociadas a la plasticidad tumoral. Se distinguen ejes funcionales compatibles con los **fenotipos clínicos reportados (abajo)**, incluyendo la regulación de la vía de p53, la respuesta al daño del ADN, la angiogénesis y la migración celular, así como procesos adicionales que proponen **funciones nuevas (arriba)** fruto de los hallazgos de este trabajo. Sin embargo, estas nuevas funciones también se pueden integrar con los mecanismos asociados al fenotipo clínico. Este esquema representa un marco conceptual derivado de los datos obtenidos y orienta futuras validaciones funcionales. Esquema creado con BioRender. Created in <https://BioRender.com>

DISCUSIÓN

La familia de antígenos MAGE de tipo I constituye un grupo de proteínas cuya expresión se encuentra restringida en tejidos normales a compartimentos inmunológicamente privilegiados, principalmente testículo y placenta, pero que se reactivan en diversos tumores humanos (Simpson et al., 2005; Caballero y Chen, 2009). Esta característica ha despertado gran interés tanto desde el punto de vista biológico como clínico, ya que su expresión aberrante se ha asociado con fenotipos tumorales agresivos, resistencia terapéutica y mal pronóstico en múltiples tipos de cáncer (Weon y Potts, 2015; Barker y Salehi, 2019).

Entre los distintos miembros de esta familia, la proteína MAGE-A9 ha emergido en los últimos años como un marcador clínico relevante. Diversos estudios han reportado que su expresión se correlaciona con mayor agresividad tumoral, progresión de la enfermedad y menor supervivencia de los pacientes en varios tipos tumorales, incluyendo cáncer de pulmón, gástrico, hepatocelular y de cabeza y cuello (74-76). Sin embargo, a pesar de esta fuerte asociación clínica, los mecanismos moleculares a través de los cuales MAGE-A9 contribuye al fenotipo tumoral permanecían poco caracterizados.

El objetivo central de esta tesis fue avanzar en la caracterización funcional de MAGE-A9, con el propósito de comprender cómo su expresión puede contribuir a procesos celulares asociados al mal pronóstico tumoral.

La primera aproximación se centra en la respuesta de MAGE-A9 a la expresión de RAS-V12. Observamos que MAGE-A9 no responde a RAS-V12 como sí publicamos que lo hacen otros miembros de la familia MAGE-I, como MAGE-C2. Esto hace que MAGE-A9 pierda la conexión con la activación con vías oncogénicas como la de RAS/MAPK, con la ventaja que no se estabiliza por la acción de esta vía, pero también hace que también sea refractario a la inhibición de RAS/MAPK.

Luego, para abordar la caracterización funcional de MAGE-A9 y generar un panorama molecular amplio del significado de su expresión en cáncer de cabeza y cuello, se adoptó una estrategia basada en aproximaciones multi-ómicas integradas,

combinando la generación de modelos de trabajo, el análisis transcriptómico, estudios del interactoma y la caracterización del ubiquitinoma.

Este tipo de abordaje integrativo resulta particularmente adecuado para el estudio de proteínas reguladoras de señalización, ya que permite detectar simultáneamente distintos niveles de regulación celular y reconstruir redes funcionales complejas (98).

En el RNAseq develamos por primera vez, cómo la expresión de MAGE-A9 afecta múltiples vías y procesos biológicos. Entre ellos: la regulación de la actividad de p53 y la respuesta al daño celular, mecanismos de adhesión celular, expresión de factores angiogénicos y de remodelación de matriz extracelular (VEGFA y MMP2 respectivamente).

➤ **MAGE-A9 y la evasión de la respuesta al daño genotóxico**

Uno de los hallazgos más relevantes de este trabajo fue la identificación de un vínculo funcional entre la expresión de MAGE-A9 y la modulación de la respuesta celular frente al daño en el ADN. Esta observación resulta particularmente significativa si se considera que la capacidad de tolerar daño genómico constituye uno de los mecanismos fundamentales mediante los cuales las células tumorales adquieren resistencia a tratamientos antineoplásicos (Jackson y Bartek, 2009).

Los experimentos realizados en esta tesis demostraron que la expresión de MAGE-A9 incrementa la viabilidad celular frente a estrés genotóxico inducido por etopósido y reduce la apoptosis en estas condiciones. Este efecto fue particularmente evidente en células que conservan p53 funcional, lo que sugiere que MAGE-A9 podría interferir con mecanismos dependientes de esta proteína.

La proteína p53 constituye uno de los principales integradores de señales de estrés celular, coordinando respuestas que incluyen arresto del ciclo celular, reparación del ADN y apoptosis (7). En este contexto, la inhibición funcional de p53 representa uno de los mecanismos más frecuentes mediante los cuales las células tumorales adquieren resistencia a daño genómico y a terapias basadas en agentes genotóxicos.

Los ensayos realizados en esta tesis sugieren que MAGE-A9 inhibe la actividad transcripcional de p53 sin alterar sus niveles proteicos, lo que sugiere un mecanismo de regulación funcional más que degradativo. Este tipo de regulación de p53 por una proteína MAGE fue originalmente descrito por este grupo de investigación (Monte et al, 2006) mostrando que algunas proteínas MAGE pueden modular la actividad de factores de transcripción mediante interacciones con complejos reguladores (61).

Desde una perspectiva tumoral, la capacidad de interferir con la función de p53 podría proporcionar una ventaja adaptativa significativa, permitiendo a las células proliferar en presencia de daño genómico y contribuyendo a la resistencia terapéutica.

Estos efectos de la expresión de MAGE-A9 sobre la actividad transcripcional de p53, la respuesta al daño y la apoptosis también los vimos en nuestros ensayos ómicos, tanto en el RNAseq como en el interactoma, donde el análisis de interactores reveló múltiples proteínas relacionadas a estos procesos.

➤ Reprogramación del microambiente tumoral y programas pro-angiogénicos

Los análisis transcriptómicos realizados en esta tesis revelaron la regulación de genes asociados a remodelación del microambiente tumoral, incluyendo factores involucrados en angiogénesis y remodelación de la matriz extracelular.

Entre ellos destaca el aumento en la expresión de VEGF, uno de los principales reguladores de la angiogénesis tumoral (35). La angiogénesis constituye un proceso esencial para la progresión tumoral, ya que permite el suministro de oxígeno y nutrientes a tumores en expansión y facilita procesos de diseminación metastásica (97).

La inducción de programas pro-angiogénicos observada en este trabajo sugiere que MAGE-A9 podría contribuir a la creación de un microambiente tumoral favorable para el crecimiento tumoral. Además, la regulación de genes asociados a

remodelación de matriz extracelular y migración celular indica que esta proteína podría participar en procesos de reorganización del entorno tumoral.

En concordancia con estos resultados transcriptómicos, los ensayos funcionales demostraron que la expresión de MAGE-A9 promueve la migración celular, lo que constituye un rasgo característico de células tumorales con potencial invasivo (Friedl y Alexander, 2011).

➤ **FAK1 como nodo de señalización asociado a MAGE-A9**

El análisis del interactoma permitió identificar múltiples proteínas asociadas a redes de señalización tumoral, entre las cuales destaca FAK1 (PTK2).

FAK es una quinasa no receptora localizada en adhesiones focales que actúa como un nodo central en la integración de señales provenientes de integrinas y receptores tirosina quinasa (Schaller, 2010). Su activación regula procesos como migración celular, reorganización del citoesqueleto y supervivencia celular.

La activación aberrante de FAK se ha asociado con invasión tumoral, metástasis y resistencia terapéutica en diversos tipos de cáncer (Sulzmaier et al., 2014). Por lo tanto, la interacción entre MAGE-A9 y FAK1 sugiere un posible mecanismo mediante el cual MAGE-A9 podría modular señales dependientes de adhesión celular. Además, nuestros resultados indican que la expresión de MAGE-A9 correlaciona con la activación de FAK1, más aún, MAGE-A9 interactúa con pFAK1 y los datos del ubiquitinoma proponen su desubiquitinación asociada a la expresión de MAGE-A9.

Estos hallazgos nos permiten proponer una de las hipótesis más importantes de este trabajo que sugiere la existencia de un eje MAGE-A9-FAK1, y que esta kinasa oncogénica podría actuar como disparador de las principales respuestas de MAGE-A9, que incluyen la represión de la actividad de p53, así como la expresión de VEGF y MMPs, modulando la organización de redes de señalización que conectan la célula tumoral con su microambiente.

Nuestros próximos proyectos apuntan a comprender si los inhibidores de FAK1, aceptados en el uso clínico, pueden desactivar el programa tumoral disparado por MAGE-A9.

Asimismo, existe una correlación entre la activación de FAK1 y la fosforilación de SQSTM1/p62, otro interactor validado de MAGE-A9. SQSTM1/p62 es un actor principal en el proceso de autofagia, capaz de conectar proteínas ubiquitinadas con cadenas tipo K63 con el autofagosoma mediante la interacción p62 con LC3. No sabemos aún si MAGE-A9 se relaciona con el proceso de autofagia en células tumorales. Sin embargo, otras proteínas MAGE, como MAGE-A3 y MAGE-D2 funcionan como inhibidores del proceso de autofagia (Pineda et al, 2015; Nasrah et al, 2023), un efecto pro-tumoral en etapas tempranas de la oncogénesis.

➤ **Interacción de MAGE-A9 con otras proteínas MAGE-I**

La frecuente co-expresión de genes de la familia MAGE en tumores plantea la necesidad de comprender no sólo sus funciones individuales, sino también las posibles interacciones entre estas proteínas. Si bien cada miembro de la familia puede contribuir de manera independiente a procesos oncogénicos, la evidencia acumulada sugiere un nivel adicional de complejidad dado por su interacción física y funcional.

En este campo particular, nosotros demostramos por primera vez la interacción entre dos proteínas MAGE, MAGE-A6 y MAGE-A11, con consecuencias sobre la capacidad de MAGE-A11 de promover la transcripción mediada por el receptor de andrógenos (AR) en cáncer de próstata (Laiseca et al, 2017). La unión A6/A11 estabiliza a MAGE-A11 ya que MAGE-A6 lo protege de su ubiquitinación en las lisinas 240 y 245 y de su degradación por el proteasoma. De esta manera, la cooperación MAGE-A6/MAGE-A11 causa un aumento en la actividad de AR. Desde el punto de vista estructural, la interacción entre dos proteínas MAGE-I podría ocurrir por la interacción entre dos estructuras consecutivas en el MHD, llamadas WH1 y WH2 (Newman et al, 2016). En el caso de MAGE-A9, en este trabajo pudimos identificar y validar interacciones con otras proteínas MAGE. Es un

proyecto interesante que planeamos desarrollar, sobre la base de trabajos previos nuestros donde encontramos un significado biológico importante de la interacción.

➤ **Regulación de redes de ubiquitinación**

Las proteínas de la familia MAGE han sido previamente asociadas con la regulación de ligasas E3 de ubiquitina, actuando como moduladores de la ubiquitinación de sustratos específicos (Doyle et al., 2010; Weon y Potts, 2015).

Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren un panorama más complejo. El análisis del ubiquitinoma reveló que la expresión de MAGE-A9 puede aumentar la ubiquitinación de ciertos sustratos y disminuirla en otros, lo que indica un rol más amplio en la regulación de la proteostasis celular.

Este hallazgo se ve reforzado por la identificación de interacciones con proteínas involucradas en redes de ubiquitinación y de-ubiquitinación, incluyendo la deubiquitinasa **USP7**. USP7 constituye un regulador clave de múltiples proteínas implicadas en control del ciclo celular y estabilidad de p53 (Nicholson y Suresh Kumar, 2011).

La capacidad de modular dinámicamente procesos de ubiquitinación podría permitir a MAGE-A9 ajustar la estabilidad y actividad de proteínas regulatorias dentro de redes de señalización tumoral.

Limitaciones del estudio

Si bien las aproximaciones multi-ómicas empleadas en esta tesis permitieron identificar de manera global redes funcionales asociadas a la expresión de MAGE-A9, es importante considerar algunas limitaciones inherentes a este tipo de estrategias experimentales.

Los análisis transcriptómicos y proteómicos permiten identificar asociaciones funcionales y cambios globales en redes de regulación celular, pero no necesariamente establecen relaciones causales directas entre MAGE-A9 y cada uno

de los eventos moleculares detectados. En este contexto, la identificación de ejes funcionales recurrentes debe interpretarse como una base para estudios posteriores orientados a validar mecanismos específicos.

A pesar de estas limitaciones, la integración de distintos niveles de análisis molecular permitió identificar nodos regulatorios consistentes y establecer un modelo conceptual coherente que posiciona a MAGE-A9 como un modulador relevante de procesos asociados a plasticidad tumoral.

CONCLUSIONES

En esta tesis abordamos la caracterización funcional de MAGE-A9 mediante un enfoque integrador basado en aproximaciones multi-ómicas y validaciones experimentales en modelos celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello. La combinación del análisis del interactoma, transcriptoma y ubiquitinoma permitió posicionar a MAGE-A9 como un modulador capaz de reorganizar simultáneamente distintos niveles de regulación celular, integrando señales nucleares, citoplasmáticas y derivadas del microambiente tumoral.

Nuestros resultados muestran que la expresión de MAGE-A9 se asocia con una modulación funcional del eje p53–DDR sin alterar sus niveles proteicos totales ni su acetilación global, sugiriendo mecanismos regulatorios mediados por complejos nucleares y remodelación cromatínica. Esta reorganización se correlaciona con una mayor adaptación al daño genotóxico y con cambios fenotípicos compatibles con resistencia relativa a quimioterapia en células con p53 funcional. En paralelo, la integración de los análisis transcriptómicos y de enriquecimiento funcional evidenció la activación de programas vinculados a angiogénesis, respuesta a hipoxia y remodelación del microambiente tumoral, validados experimentalmente mediante el aumento de la expresión de VEGF y MMP2.

El estudio del interactoma y del ubiquitinoma reveló además la inserción de MAGE-A9 en redes multiproteicas asociadas a señalización dependiente de adhesión, proteostasis y regulación epigenética. En particular, la identificación de FAK1 como interactor reproducible, junto con cambios en su estado de ubiquitinación y fosforilación, posiciona a este eje como un nodo central que conecta señales de adhesión, migración y adaptación celular. De manera complementaria, la coexistencia de ligasas E3, deubiquitininasas y componentes del proteasoma sugiere que MAGE-A9 contribuye a modular selectivamente circuitos de control de calidad proteico más que a inducir cambios globales en el sistema ubiquitina–proteasoma.

El enfoque adoptado en esta tesis privilegió una caracterización global e integrada del impacto de MAGE-A9 sobre redes regulatorias complejas. Como es inherente a las aproximaciones multi-ómicas, la identificación de cambios transcriptómicos, interactómicos y en el ubiquitinoma no implica por sí misma la validación

mecanística individual de cada evento detectado. En consecuencia, se estableció una estrategia de priorización orientada a validar experimentalmente aquellos nodos funcionales que emergieron de manera consistente en los distintos niveles de análisis, particularmente la modulación de la actividad transcripcional de p53, la regulación bidireccional de la ubiquitinación y las vías que involucran a p62 y FAK1.

La amplitud de los cambios identificados supera necesariamente el alcance experimental exhaustivo. Sin embargo, los resultados obtenidos permiten sostener con solidez un modelo mecanístico coherente y reproducible, delimitando claramente cuáles conclusiones derivan de evidencia directa y cuáles constituyen hipótesis de trabajo fundamentadas. En este sentido, el estudio no pretende agotar la caracterización molecular de cada sustrato identificado, sino establecer un marco conceptual robusto que ordena y jerarquiza los hallazgos, proporcionando bases sólidas para investigaciones futuras.

En conjunto, esta tesis establece que la expresión de MAGE-A9 se asocia a una reorganización integrada de redes de señalización, regulación epigenética y control postraducciona que contribuyen a la adaptación celular frente al estrés tumoral. La implementación de un enfoque multi-ómico permitió vincular observaciones clínicas previamente descriptivas con mecanismos moleculares concretos, aportando una comprensión más profunda del rol funcional de MAGE-A9 en carcinoma escamoso de cabeza y cuello y en otros contextos tumorales. Si bien los resultados obtenidos no implican aplicaciones terapéuticas directas, definen nodos regulatorios y plataformas multiproteicas que podrían constituir, a futuro, puntos vulnerables para el desarrollo de estrategias dirigidas, destacando el valor de la investigación en ciencia básica como base para avanzar hacia aproximaciones traslacionales más precisas en oncología.

Perspectivas futuras

Como fuimos mencionando a lo largo de la discusión, orientaremos futuras líneas de investigación a profundizar en los mecanismos moleculares mediante los cuales MAGE-A9 modula nodos funcionales independientes de p53, particularmente aquellos relacionados con FAK1. Uno de nuestros próximos proyectos consiste en

comprender si los inhibidores de FAK1, aceptados en el uso clínico como el **Defactinib**, pueden desactivar el programa tumoral disparado por MAGE-A9.

Asimismo, será relevante profundizar en los mecanismos de regulación postraduccionales identificados en esta tesis, en particular en la modulación del estado de ubiquitinación de FAK1 y p62/SQSTM1. En este contexto, futuros estudios deberán evaluar la naturaleza de estas modificaciones, distinguiendo entre distintos tipos de ubiquitinación y su impacto sobre la estabilidad y función de estos nodos de señalización.

Por último, la interacción funcional entre FAK1 y p62 sugiere la posible participación de MAGE-A9 en la regulación de procesos de autofagia selectiva, lo cual constituye otra línea de investigación a desarrollar, especialmente en relación con la adaptación tumoral al estrés celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo Celular

1.a Cultivo Celular Mantenimiento y pasaje de líneas celulares

Todas las líneas celulares con las que trabajamos en el laboratorio, fueron cultivadas en un cuarto de cultivo para líneas celulares eucariotas y mantenidas en una estufa a 37°C, en atmósfera saturada de vapor de agua y CO₂ al 5%.

Todas las líneas celulares con las que trabajamos en el laboratorio, fueron cultivadas en un cuarto de cultivo para líneas celulares eucariotas y mantenidas en una estufa a 37°C, en atmósfera saturada de vapor de agua y CO₂ al 5%. Las células Hek293T (obtenidas de ATCC), HN12, HN30, HN13 y Cal27 (provenientes de la Wayne State University), fueron crecidas en botellas T75 con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium con glucosa, Invitrogen) suplementado con 3,7 gr/L NaHCO₃, 10% de SFB y antibióticos como en el caso anterior. Los cultivos fueron mantenidos a una densidad de 1,5 x 10⁵ células/ml en estufa y el pasaje se realizó cada 2-3 días. Para ello, se lavaron las células con PBS 1x (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM; Na₂HPO₄ 10 mM) y fueron incubadas con Tripcina 1x (Gibco, 0.05% Tripcina-EDTA) por 5 minutos a 37°C; luego se agrega medio de cultivo completo y las células se centrifugaron a 1000 rpm por 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende en medio de cultivo completo. La inactivación de la tripsina se debe a la presencia de suero en el medio de cultivo completo. Completamos la disgregación de forma mecánica con pipeta para evitar que queden agregados de células. Se toma una fracción del total correspondiente al pasaje de la línea y se completa la botella T75 con hasta 15ml de medio completo.

I.b) Viabilidad y recuento celular La viabilidad celular fue determinada mediante la prueba de exclusión de colorante supravital, en una dilución de la suspensión celular 1:2 con azul Tripán 2 g/l en PBS. El recuento de células en esta suspensión fue realizado en microscopio óptico con aumento de 1010x, utilizando una cámara de Neubauer (McAteer & Davis, 1994). Para determinar la cantidad de células viables, tomamos 10 µl de suspensión de células y los mezclamos con un volumen igual de solución 4% de Azul de Tripán. Tomamos 10 µl de dicha dilución, los colocamos en la cámara de Neubauer y contamos las células no coloreadas en los cuatro campos

de la cámara. En caso de tener un número muy elevado de células para realizar el recuento, realizamos diluciones de la mezcla de células con el colorante utilizando PBS. Se cuentan cuatro cuadrantes y se calcula el número de células viables por mililitro por la siguiente:

$$\# \text{ células viables/ml} = \text{promedio de 4 campos} \times 10.000$$

1.b. Viabilidad y recuento celular

La viabilidad celular fue determinada mediante la prueba de exclusión de colorante supravital, en una dilución de la suspensión celular 1:2 con azul Tripán 2 g/l en PBS. El recuento de células en esta suspensión fue realizado en microscopio óptico con aumento de 10×10x, utilizando una cámara de Neubauer (McAteer & Davis, 1994). Para determinar la cantidad de células viables, tomamos 10 µl de suspensión de células y los mezclamos con un volumen igual de solución 4% de Azul de Tripán. Tomamos 10 µl de dicha dilución, los colocamos en la cámara de Neubauer y contamos las células no coloreadas en los cuatro campos de la cámara. En caso de tener un número muy elevado de células para realizar el recuento, realizamos diluciones de la mezcla de células con el colorante utilizando PBS. Se cuentan cuatro cuadrantes y se calcula el número de células viables por mililitro

1.c. Líneas celulares utilizadas

Se utilizaron las siguientes líneas celulares

- HEK293T: Células de riñón embrionario humano (Human Embryonic Kidney 293T cells), transformadas mediante la expresión del antígeno T grande del virus SV40. Se utilizaron como sistema heterólogo para la expresión constitutiva de MAGE-A9 y para experimentos de transfección y producción lentiviral.
- HEK293T (CLON13): Células HEK293T con expresión constitutiva de 3xFlagMAGE-A9 generadas por nosotros mediante transfección con PEI, seguida de selección con antibiótico y aislamiento de clones individuales
- HEK293TMS-A9: Células HEK293T con expresión inducible de 3xFlagMAGE-A9 generadas por nosotros mediante transducción lentiviral (ver sección 8 materiales y métodos)

- U2OS: Línea celular derivada de un osteosarcoma humano (human osteosarcoma), que expresa p53 de tipo salvaje (p53^{WT}). Se empleó para los ensayos de actividad transcripcional de p53 con el reportero PG13-luc.
- MEF DKO: Fibroblastos embrionarios de ratón doble knockout (mouse embryonic fibroblasts double knockout), deficientes en p53 y MDM2 (p53^{-/-}; mdm2^{-/-}). Se utilizaron como modelo para reconstitución de p53 y análisis de la actividad transcripcional dependiente de MAGE-A9.
- HN30: Línea celular derivada de un carcinoma escamoso de cavidad oral, perteneciente a la familia de líneas WSU-HN (Wayne State University). Presenta p53 de tipo salvaje (p53^{WT}) y fue utilizada como modelo de carcinoma escamoso con p53 funcional.
- HN30MS-A9: Células HN30 con expresión inducible de 3xFlagMAGE-A9, generadas por nosotros mediante transducción lentiviral (ver sección 8 materiales y métodos)
- HN12: Línea celular derivada de una metástasis ganglionar del mismo paciente del que se originó HN30. Presenta una mutación en TP53 que genera una proteína truncada, por lo que se considera p53-nula (p53^{null}). Representa un modelo metastásico con pérdida de la función de p53.
- HN12MS-A9: Células HN12 con expresión inducible de 3xFlagMAGE-A9, generadas por nosotros mediante transducción lentiviral (ver sección 8 materiales y métodos)
- HN13: Línea celular derivada de un carcinoma escamoso de cabeza y cuello con mutación activante en EGFR (His773Tyr) y p53 mutado/no funcional. Se utilizó como modelo complementario para el estudio de la expresión de MAGE-A9 en un contexto con activación constitutiva de señales proliferativas mediadas por EGFR.
- HN13MS-A9: Línea celular HN13 con expresión inducible de 3xFlagMAGE-A9, generadas por nosotros mediante transducción lentiviral(ver sección 8 materiales y métodos).

1.d Plaqueo de líneas celulares

Para la realización de los experimentos de expresión transiente, las células fueron crecidas con el medio correspondiente en placas multiwell de 24, 12 o 6, y p30, p60 o p100 dependiendo del experimento. Para el plaqueo, se toma una fracción del pasaje de la botella equivalente a 2.106 células/ml y llevamos hasta un volumen final de 15 ml con medio completo. Se siembran 0.5 ml, 1ml, 2ml, 2ml, 5ml o 10ml, respectivamente).

2. Criopreservación

2.a. Congelamiento de líneas eucariotas

Para preservar las células por un período de tiempo prolongado se requieren temperaturas extremadamente bajas y un medio apropiado que evite la lisis celular. Estas temperaturas hacen que el metabolismo disminuya significativamente, manteniendo viva a la célula. Para evitar la formación de cristales, utilizamos dimetil sulfóxido al 10% (DMSO) ya que permite que la temperatura intracelular descienda de manera gradual.

Las células se levantan con 1ml/T75 de tripsina, se incuban por 5 minutos, se disgregan las células, se agrega 4-6ml de medio de cultivo completo y se centrifugan a 1000 g durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y se hace un recuento de las células. Se calcula para congelar una cantidad de células de 1-2.106 células/ml de suero fetal bovino con 10% DMSO. La suspensión celular se homogeiniza rápidamente y se trasvasa a un criotubo, el cual se envuelve en papel para evitar el congelamiento inmediato, logrando un enfriamiento gradual. Las células

se llevan rápidamente a un freezer de -80 °C. Luego de pasadas 24-48hs, los criotubos se pasan al tanque de nitrógeno líquido a -174°C.

2.b. Descongelamiento de líneas eucariotas

Para descongelar las células almacenadas en el tanque de nitrógeno o en el freezer de - 80°C, tomamos un criotubo y lo calentamos rápidamente a 37°C hasta lograr el descongelamiento de la suspensión celular. Para remover el DMSO, que resulta tóxico para las células, pasamos rápidamente el contenido a un tubo cónico de 15 ml con 4-6 ml de medio de

cultivo y lo centrifugamos a 1000 g por 5 minutos. Luego, se remueve el sobrenadante y se resuspende el pellet de células en el volumen adecuado de medio de cultivo fresco y se las plaquea en la superficie deseada (generalmente una T25 o T75, dependiendo de la línea celular).

3. Esterilización del material de cultivo

3.a Autoclave

Todo el material de vidrio, sin partes plásticas, fue esterilizado por calor seco (160-170°C, 120 min) en estufa. Todo el material plástico y de vidrio con partes plásticas, así como soluciones que así lo requirieran (y que no fueran termolábiles), por calor húmedo en autoclave (121°C, 1 atm, 20-30 min). El material plástico utilizado en cultivo celular (placas multiwell, cónicos de 15 o 50ml, placas de Petri p100 y p150, etc) fue comprado estéril o esterilizado por radiación gamma (servicio prestado por la empresa IONICS S.A. para la esterilización por ionización Gamma).

3.b Filtración de soluciones

Las soluciones termolábiles fueron esterilizadas por pasaje a través de membrana de ésteres de nitrato y acetato de celulosa, con poros de 0,22 µm (Millipore), utilizando bomba de vacío en flujo laminar para volúmenes grandes mayores a 100 ml (como el medio de cultivo para células eucariotas) o por jeringa, para los volúmenes más chicos (como los antibióticos).

4. Calidad del agua y de reactivos

Las soluciones, reactivos y medios de cultivo fueron preparados con agua desionizada por doble ósmosis inversa. Todas las sales, ácidos y solventes utilizados fueron de calidad analítica.

5. Descarte de residuos peligrosos

Todos los geles de agarosa, que contienen bromuro de etidio, así como los geles de poliacrilamida, guantes y material plástico, fueron descartados en bolsa negra y caja de cartón rotulada como residuos peligrosos, a través del Servicio de Higiene y Seguridad de la F.C.E.yN.

Todos los solventes, así como los buffers con bromuro de etidio, fueron almacenados en bidones debidamente rotulados y descartados luego, a través del Servicio de Higiene y Seguridad de la F.C.E.yN.

El material de cultivo para reutilizar, así como los sobrenadantes celulares y medios de cultivo utilizados, fueron decontaminados previamente, mediante el agregado de hipoclorito de sodio 5% por 24 hs. Posteriormente, se procedió a su lavado.

6. Clonados. Produccion de los vectores CMV_10 3xFlagMAGE-A9, pcw573xFlagMAGE-A9

Para realizar las construcciones de los vectores CMV_10 3xFlagMAGE-A9, pcw573xFlagMAGE-A9 - Primero levantamos la secuencia correspondiente a MAGEA9 con primers específicos del vector pIncy que posee la secuencia completa de MAGE A9 . Estos primers poseen en su extremo 5', sitios de corte para enzimas de restricción HindIII y XbaI.

Primer forward:HINDIII_MageA9_FW: 5'

CGCAAGCTTTCTCTCGAGCAGAGGAGTCCG 3'
Primer Reverse : MageA9_XbaI_REV: 5'AGCTCTAGATCAGACTCCCTCTTGCTCC 3'

Luego de clonar la secuencia de MAGE-A9 en el vector CMV_10 3xFlag, se usó el vector clonado CMV_10 3xFlagMAGE-A9 como molde para levantar la secuencia 3xflagMAGE-A9 (MAGE-A9 con tag flag en su extremo 5') con primers específicos con secuencias para enzimas de restricción en su extremo 5'

Primer forward:EcoRI_MageA9_FW: 5' CGCAAGCTTTCTCTCGAGCAGAGGAGTCCG 3'
Primer Reverse : MageA9_BamHI_REV: 5'AGCTCTAGATCAGACTCCCTCTTGCTCC 3'

La reacción de PCR fue llevada a cabo utilizando la ADN polimerasa Taq (Invitrogen). Las reacciones fueron llevadas a cabo en el equipo termociclador (BioRad). Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl conteniendo: 10 ng de ADN plasmídico, Buffer de la enzima Taq ADN polimerasa 10X, Cl₂Mg 50mM, dNTPs 10 mM (concentración final), primers Forward/Reverse 10 µM, DMSO y 1 unidad de la enzima Taq.

Utilizamos el siguiente esquema de ciclos de amplificación:

Segmento	Cantidad de Ciclos	Temperatura	Tiempo
Iniciación	1	94°C	5 minutos
2	30	94°C 60°C 72°C	1 minuto 1 minuto 1 minuto
3	1	72°C	10 minutos

- Análisis de los productos de amplificación

Analizamos el producto de amplificación mediante electroforesis en un gel de agarosa 2% con bromuro de etidio para poder visualizar las bandas de ADN a luz UV. Se corre por 10-15 minutos a 60 V. Las bandas se corresponden con fragmentos de aproximadamente 600 pb.

Purificación del producto de PCR por gel : Kit ADN Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

La totalidad del producto de PCR se corre en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Se cortan las bandas por observación en el transiluminador de las señales emitidas por el bromuro de etidio intercalado en el ADN y se pesan los trocitos de agarosa. Es importante exponer el gel a la luz UV el menor tiempo posible para evitar daños al ADN. Se agrega igual volumen que gramos de gel cortado de solution binding membrane (SBM; 1ml SN/1mg gel). Se mezcla por vortex y se calienta a 65°C hasta su total disolución. Se traslada a una columnita del kit de purificación y se centrifuga a 16.000g por 1 minuto. Se descarta el sobrenadante y se agregan 700 µl de solución de lavado (washing solution de kit Promega para MIDI-prep). Se centrifuga a 16.000g por 1 minuto y se descarta el sobrenadante. Se vuelve a lavar con 500 µl de solución de lavado, se centrifuga a 16.000g por 5 minutos y se descarta el sobrenadante. Se realiza una centrifugación final a 16.000g por 1 minuto para eliminar los restos de la solución de lavado. Se coloca la columna en un tubo eppendorf limpio y se agregan 30 µl de agua, se deja incubar 1 minuto y luego se centrifuga a 16.000g por 1 minuto. La elución se guarda a -20°C.

- Purificación del producto de PCR por gel : Kit ADN Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

La totalidad del producto de PCR se corre en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Se cortan las bandas por observación en el transiluminador de las señales emitidas por el bromuro de etidio intercalado en el ADN y se pesan los trocitos de agarosa. Es importante exponer el gel a la luz UV el menor tiempo posible para evitar daños al ADN. Se agrega igual volumen que gramos de gel cortado de solution binding membrane (SBM; 1ml SN/1mg gel). Se mezcla por vortex y se

calienta a 65°C hasta su total disolución. Se traslada a una columnita del kit de purificación y se centrifuga a 16.000g por 1 minuto. Se descarta el sobrenadante y se agregan 700 µl de solución de lavado (washing solution de kit Promega para MIDI-prep). Se centrifuga a 16.000g por 1 minuto y se descarta el sobrenadante. Se vuelve a lavar con 500 µl de solución de lavado, se centrifuga a 16.000g por 5 minutos y se descarta el sobrenadante. Se realiza una centrifugación final a 16.000g por 1 minuto para eliminar los restos de la solución de lavado. Se coloca la columna en un tubo eppendorf limpio y se agregan 30 µl de agua, se deja incubar 1 minuto y luego se centrifuga a 16.000g por 1 minuto. La elución se guarda a -20°C.

- **Reacción de digestión**

Se realizó una doble digestión, colocando en una misma reacción, ambas enzimas en un buffer compatible con ambas al mismo tiempo. Para cada clonado, se realizan dos cortes: uno para el inserto (que es el producto de PCR) y otro para el vector . Se incubaba a 37°C por 90 minutos. Luego se vuelven a purificar por gel de agarosa, de la misma forma que antes. Se cuantifica los productos de digestión purificados, en espectrofotómetro.

Realizamos las reacciones según la siguiente tabla:

Reacción para el inserto	Reacción para el vector
Producto de PCR purificado 30 µl	2 µg de Vector
4µl Buffer para ER	2µl Buffer para ER
4µl BSA 10x	2µl BSA 10x
1µl ER1	1µl ER1
1µl ER2	1µl ER2
H ₂ O csp 40µl	H ₂ O csp 20µl

Enzimas Eco y BamHI: Buffer H

Enzimas HindIII XbaI Buffer E

- **Reacción de Ligación**

Una vez obtenidos los vectores y los insertos digeridos, purificados y cuantificados, realizamos la reacción de ligación con la enzima Ligasa de ADN T4 (Promega), según:

Inserto	Relaciones: 0 - 3:1 - 5:1
Vector	50 ng
Buffer de ligación 10x	1 µl
Ligasa de ADN T4	1 µl
Volumen final con H ₂ O	10 µl

La cantidad de Inserto depende de la relación que se quiera entre inserto:vector y del tamaño y cantidad de vector que se utilice. Esta relación está dada por:

$$\text{[Inserto]} = \frac{50 \text{ ng. Vector digerido} \times \text{Tamaño de Inserto (pb)} \times \text{relación inserto:vector}}{\text{Tamaño de Vector (pb)}}$$

Así es que por cada clonado realizamos 2 o 3 reacciones de ligación: una como control negativo en la cual no se agrega el inserto (podemos obtener colonias por vector religado y/o nodigerido) y una o dos ligaciones con las relaciones inserto:vector 3:1 o 5:1 respectivamente. Se incubó a 16°C en termobloque toda la noche. Al día siguiente se transforman bacterias ultracompetentes con todo el volumen de la reacción de ligación. De las colonias obtenidas, tomamos una muestra de cada una, y corrimos una coloni-PCR (una PCR del inserto con una muestra de bacteria como templado). Además, realizamos los stocks de glicerol correspondientes (1:1 de caldo con bacterias crecidas ON a 37°C y glicerol al 70%, estéril). Purificamos los vectores y realizamos una reacción de digestión con ER para liberar el fragmento insertado como control. Obtuvimos de esta manera, los clonados CMV_10 3xFlagMAGE-A9, pcw573xFlagMAGE-A9.

7. Transfecciones

7.a. Polietilenimida (PEI)

El PEI es un polímero con unidades repetidas de grupo aminos. Este método se basa en que el PEI condensa ADN en partículas de carga positiva capaces de unirse a los residuos aniónicos de la superficie celular, y de esta manera ser introducidos en la célula por endocitosis. Una vez dentro de la célula, se libera el complejo ADN-polímero en el citoplasma y el ADN difunde hacia el núcleo.

Efectuamos la transfección utilizando una relación 1 µg DNA/ 7,5 µl de PEI (concentración final 1mg/ml), según la superficie a transfectar. Para cada muestra, preparamos los complejos de la siguiente tabla:

	mw24	mw12	mw6 – p30 mm	P60 mm	P100 mm	P150 mm
OPTIMEM (µl)	17	34	50	100	300	400
ADN total (µg)	0,7	1,5	2	4	12	16
PEI (µl)	5	10	15	30	90	110

Se mezcla el/los vectores con OPTIMEM sin suero ni antibióticos ya que las proteínas interfieren con la formación de las vesículas con ADN. Se agrega el PEI y se incuba por 8-10min a temperatura ambiente. A la placa a transfectar se le retira la mitad del medio de cultivo y se agrega la mezcla de transfección. Se incuban de 4-6 horas en estufa de cultivo celular a 37°C con 5% CO₂. Se lavan las células con PBS 1x y se agrega medio nuevo completo.

8. Transducciones lentivirales

Para la obtención de las líneas estables HN12-pcw57-GFP, HN12-pcw57 3xFLAGMAGE-A9, HN30-pcw57-GFP, HN30-pcw57-3xFLAGMAGE-A9, produjimos partículas retrovirales en una línea empaquetadora e infectamos luego las células LNCaP wt. Las células infectadas se seleccionaron con el antibiótico puromicina.

Las partículas lentivirales se produjeron mediante la transfección de células empaquetadoras HEK 293T con un sistema de tres plásmidos: Gag/pol (codifica la cápside y la transcriptasa reversa), vsv-G retro (codifica para la envoltura) y el pcw57-GFP, HN30-pcw57-3xFLAGMAGE-A9 (que es el que lleva la información que se desea transducir).

Las células empaquetadoras Hek293T se sembraron placas p100 en una densidad de 3,8 millones. Al día siguiente se transfectaron con los plásmidos correspondientes utilizando PEI. Las líneas celulares a ser infectadas (HN12 y HN30) también se siembran en placas de p100 el mismo día de la transfección de la línea empaquetadora. A las 24 y 48hs se colectan los sobrenadantes de las Hek293T y se los filtra utilizando filtros de 0.22 μm low binding (Millipore). Se retira el medio de la línea a infectar (que debe poseer una confluencia de aproximadamente un 85%) y se reemplaza en dos días consecutivos por el medio con las partículas virales. En cada ronda de infección, se agrega polibrene en una concentración final de 5 $\mu\text{g/ml}$ para favorecer la adsorción de las partículas virales. Luego de 24 horas se cambia por medio fresco Puromicina, en una concentración final de uso 10 $\mu\text{g/ml}$. Este último punto se repite a medida que van muriendo las células no infectadas y van quedando los clones que poseen insertado el plásmido deseado. Una vez que se van formando colonias con los clones infectados, se disgregan las células con tripsina y se agrega medio de cultivo, para que continúen con su crecimiento. Evaluamos la expresión de MageA9 por medio de un westernblot (WB).

9. Análisis de proteínas

9.a Western Blot

- SDS-PAGE

Por medio de este método podemos separar proteínas por su peso molecular, para lo cual corremos los extractos celulares en un gel de poliacrilamida:bisacrilamida (relación 29:1) con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), empleando el sistema discontinuo. Para ello se usó una cuba electroforética (Miniprotean III, BioRad) y una

fuente de poder (EPS 600, Pharmacia). En esta técnica, la movilidad electroforética de las proteínas se basa en diferencias entre sus tamaños moleculares, dado que el tratamiento con SDS equipara la densidad de carga superficial de las mismas, otorgándoles a todas una carga negativa.

Se utiliza un buffer de corrida al 12,5-15% de poliacrilamida:bisacrilamida y un gel concentrador al 4,5%. Como catalizador de la polimerización se empleó N,N,N',N'-tetraetilmetiletilendiamina (TEMED $\delta=0,77\pm0,02$ g/l) 0,3 ml/l y persulfato de amonio (APS 0,37 g/l) como iniciador. Se determinó la concentración de proteínas por Bradford en espectrofotómetro a 595nm. Antes de efectuar la siembra, las muestras en placas se levantan con buffer de siembra (SDS-loading buffer 2x) para proteínas y se calientan a 95°C por 5 minutos. Como alternativa, y una vez estandarizado el protocolo, se siembran 20µl de la muestra en buffer de siembra por calle (para una p30, se agregan 200µl de buffer 1x; para muestras en solución, se agrega igual volumen de buffer de siembra 2x).

Se siembra un marcador de peso molecular por gel (Page Ruler, de Thermo Scientific), el cual va de 15 KDa a 130 KDa). La electroforesis se desarrolla a corriente constante, primero a 80 V durante la entrada de las mmuestras en el gel concentrador (gel de siembra) y luego a 110 V en el gel separador (gel de corrida) todo sumergido en el buffer de corrida (SDS running Buffer 1x: Glicina Tris -SDS). Una vez que se observa una separación adecuada del marker, se procede a realizar la transferencia a una membrana de nitrocelulosa.

Gel de Corrida (Running-Gel) Vf: 50ml	12,5 %	15 %
Acrilamida:bisacrilamida (29:1)	21,5 ml	25,9 ml
Tris-HCl pH8,7 1M	18,7 ml	18,7 ml
SDS 10%	500 µl	500 µl
H₂O bidest	9,3 ml	5,1 ml

Gel de Siembra (Stacking-Gel) Vf: 50ml	4,5 %
Acrilamida:bisacrilamida (29:1)	6,6 ml
Tris-HCl pH6,9 1M	6,25 ml
SDS 10%	500 µl
H₂O bidest	32 ml

- SDS loading buffer 2x para proteínas: Tris-HCl 0,5M pH 6,8; SDS 10% (p/v); 2- mercaptoetanol 5% (v/v); glicerol 10% (v/v); azul de bromofenol 0,01 g/l).
- SDS running Buffer 1x : Glicina 19 mM; Tris 2,5 mM; SDS 0,1%

- Electrotrotransferencia

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (NC) (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech). Para ello, se colocan 3 papeles de filtro 3 MM Whatman y por encima de este, se coloca la membrana de Nitrocelulosa, seguida del gel de Poliacrilamida y se vuelven a colocar por encima otros 3 papeles de filtro, todos previamente

hidratados en el buffer de transferencia (Semidry Blotting Buffer). Se coloca en un equipo de transferencia semi-húmeda (Mini Trans-Blot cell, BioRad) y se corre a corriente constante de 400 mA y 15 V, durante 60 min. Luego de finalizada la transferencia se procede al bloqueo de las membranas.

Semidry Blotting Buffer: Tris 25 mM; Glicina 195 mM; SDS 0,05%, pH 8,3; metanol 20%, v/v

- Bloqueo e Inmunoblotting

Los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con blocking buffer durante una hora.

Luego, las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo anti- proteína de interés en la dilución correspondiente en blocking buffer (1:1000 para los anticuerpos comerciales y 1:500, 1:1000 y 1:2000 para algunos sueros de conejos realizados en el laboratorio .

Luego de la incubación ON con el anticuerpo primario, se realizan dos lavados de 5 minutos cada uno en agitación con TBS-Tween. Se incuban las membranas durante 1 hora en presencia de anticuerpo secundario correspondiente, según el primario utilizado (anti-IgG de ratón o conejo, conjugado con la enzima peroxidasa de rabanito HRPO (de Amersham Pharmacia Biotech), diluido 1:5000 con TBS-Tween con Leche 5%.

Se lavaron dos veces las membranas con TBS-Tween y se dejaron finalmente en PBS 1x hasta el momento del revelado.

Buffer TBS-Tween: Tris 25 mM; NaCl 137 mM; KCl 3 mM pH 7,4; Tween 20 0,1%

Blocking Buffer: BSA 0,5g/L; Tween 20 0,4%; EDTA 1mM; Azida sódica 0,02%; Tris-HCl pH 7,5 0,01M; NaCl 0,1M

Las bandas fueron reveladas por el método de quimioluminiscencia (ECL casero), utilizando un equipo G-Box (equipo departamental). En la reacción enzimática ocurre la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂, agua oxigenada) por acción de la enzima peroxidasa, obteniéndose un compuesto excitado que emite luz. La solución reveladora posee fenoles para aumentar la luz emitida aproximadamente 1000 veces, además de extender el tiempo de emisión de la misma. Las bandas se visualizaron mediante el uso del programa Image Reader LAS-1000.

ECL-home made Solución A

Tris-HCl pH8,7 100mM	50 ml
Peróxido de hidrógeno 100 volúmenes	1 µl

ECL-home made Solución B

Tris-HCl pH8,7 100mM	50 ml
Luminol 250 mM	500 µl
Ácido p-Cumárico 90 mM	225 µl

● Anticuerpos Primarios:

Proteína o Tag detectado	especie	Nombre del anticuerpo y Fabricante
MageA	Ratón	6C1 monoclonal Santa Cruz
GFP	Conejo	producido en nuestro laboratorio
HA	Ratón	12CA5 monoclonal de Roche
Flag	Ratón	M2 monoclonal de Sigma-Aldrich
gapdh	Ratón	13E5 monoclonal de Cell Signaling Technology

MAGEA9	conejo	abcam
smc1	raton	Cell Signaling Technology

Anticuerpos Secundarios:

Especie detectada	Molécula acoplada	Nombre del anticuerpo y Fabricante
Ratón	HRPO	Pierce Antibody Goat anti-mousse IgG HRPO de Thermo Scientific
Conejo	HRPO	Pierce Antibody Goat anti-rabbit IgG HRPO de Thermo Scientific

9.b Análisis de Interacción entre Proteínas por Inmunoprecipitación (IP)

La IP de proteínas es una técnica que consiste en precipitar el antígeno deseado de una solución que posee más de una proteína (en nuestro caso, extractos celulares) utilizando un anticuerpo específico capaz de reconocer a la proteína en cuestión. Para analizar la interacción entre distintas proteínas MAGE, hicimos experimentos de Inmunoprecipitación (IP), utilizando un

anticuerpo específico anti-proteína de interés y revelando contra la proteína coinmunoprecipitada.

Se plaquean células Hek293T en placas p100 y se transfectan con PEI, con hasta 12µg de los vectores. Para la IP entre MageA9 y HDACs, MDM2, TRIM28,, se usan 6 µg de cada vector.

Al día siguiente se lavan las células 2 veces con PBS 1x y se lisan con 500 µl de Buffer de Lisis IP NP-40 (Tris HCl pH8 50mM; NaCl 150mM; NP-40 1%; 2 µg/ml de Inhibidor de proteasas de ROCHE; PMSF 1 mM; Na3VO4 1 mM; NaF 0,1 mM; EDTA 5mM; DTT 2mM). Luego de 10 min de incubación en hielo se levanta la muestra rastrillando toda la superficie. Se pasa todo el volumen a un tubo eppendorf con jeringa 20 veces, para romper aún más las células. Luego el material insoluble se remueve por centrifugación a 14000 g durante 10 min a 4°C. Se trasvasa el sobrenadante a un tubo limpio y se toma una alícuota de 50 µl como muestra de

Lisados totales a la cual se le agrega igual volumen de Buffer de siembra 2x y se calienta a 95°C por 5 minutos.

Al resto del volumen de la muestra se le agrega 2 µg del Anticuerpo anti la proteína de interés (que será inmunoprecipitada) y además se agregan 30 µl de Proteína A-Sepharosa (Amersham Pharmacia Biotech). Se incuba en rotación constante por 3-4 horas a 4°C.

Finalizado el tiempo de incubación se lava por centrifugando la muestra por 3 minutos a 5000 rpm. Se descarta el sobrenadante y se resuspende en 1 ml de buffer de IP NP-40. Se pone a rotar nuevamente durante 5 min a 4°C, y repetimos el procedimiento de lavado 2 veces más. Por último se resuspende todo en 20-50 µl de Buffer de siembra 1x para proteínas y se calienta la muestra a 95°C durante 5 minutos. Se procede a la detección de las muestras mediante la realización del Western Blot.

9.c Curvas de estabilización

En este ensayo, analizamos la estabilidad de una proteína, en función del agregado de otra, en cantidades crecientes. Utilizamos células Hek293T en placac MW6.

Para los ensayos de estabilidad de MageA9, se cotransfectaron con PEI, iguales cantidades del vector pCMV5-Flag-MageA9 y del control pEGFP-N1 (50 ng/well 6) y concentraciones crecientes del vector RasV12.

A las 24 horas post-transfección las células se levantaron con 200µl de buffer de siembra, se calentaron por 5 minutos a 95°C y se corrieron en un Western Blot.

10.Evaluación de la actividad transcripcional

10.a. Ensayo de genes reporteros

Las células fueron transfectadas con los plásmidos reporteros: pG13-Luc (para medir actividad de p53) y CMV-Rluc (con expresión constitutiva de luciferasa de Renilla, utilizado como control interno), y los plásmidos para ensayar cada

condición. células U2OS y MEF DKO sembradas en placas Mw de 12 pocillos se transfectaron con 500 ng de pG13-Luc y 50 ng de CMV-Rluc en todos los casos. Se transfectó 50 ng de p53 en presencia y ausencia de 150 o 300 ng de 3xflagMAGEA9. 5-6 h post-transfección, se descartó el medio y se reemplazó por medio DMEM fresco, y se incubó a 37 °C durante 24 h. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS y lisadas en “buffer de lisis de Luciferasa” (Tritón X-100 0,2 %; K₂HPO₄ 100 mM pH 7,8; DTT 1 mM), usando un ciclo de congelado y descongelado. Una vez descongeladas, las muestras fueron sembradas en una placa Mw de 96 pocillos blanca especial para luminómetro de placa (Glomax Multi Detection System, Promega ®) por duplicado, ya que uno de esos duplicados se utiliza para la lectura de la actividad Luciferasa Firefly y el otro para la de Luciferasa Renilla que se expresa bajo un promotor CMV constitutivo para poder relativizar cada una de las muestras. El volumen restante de ambos duplicados de las muestras se recolectaron juntos y se agregó el volumen de buffer de siembra 2x adecuado. Se calentó 5 min a 95 °C para el posterior análisis por WB. Como se mencionó previamente, a uno de los duplicados se agregó el sustrato de la luciferasa Renilla: la coelenterazina-h (Promega ®) a una concentración 5 µM final y se dejó incubar durante 20 min a TA, y al otro duplicado se agregó el sustrato de la luciferasa Firefly. En el último caso, se preparó el sustrato: luciferina (Promega ®) al momento de ser utilizado (Glicinglicina 25 mM; MgSO₄ 15 mM; EGTA 4 mM; Tritón X-100 0,27 %; K₂HPO₄ 15 mM; ATP 0,2 mM; DTT 1 mM y luciferina 0,1 mM). Se incubó por 10 min a TA y se midió la actividad de la enzima luciferasa durante 3 s por pocillo. La actividad transcripcional fue estandarizada como el cociente entre la actividad luciferasa de Firefly y la actividad luciferasa de Renilla. Para cada punto de datos, se analizaron al menos por triplicado.

10.b Evaluación de los niveles de mensajero por RT-qPCR

- Extracción y cuantificación de ARN

Se realiza la extracción de ARN total utilizando RNazol (RNazol®RT, MRCgene, #cat: RN 190). El reactivo de RNazol está compuesto por una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y otros compuestos que facilitan el aislamiento

de los diversos tipos de ARN. Para la extracción del ARN, primero se descarta el medio de cultivo de la placa que contiene las células y se lava 2 veces con PBS 1x. Se agregan 0,5 ml de RNazol por placa p60 y se levantan las células utilizando un rastrillo de goma. Se incuba por 5 minutos a temperatura ambiente, se levanta la muestra con un tip estéril y se pasa a un tubo eppendorf. En este punto, las muestras pueden congelarse a -20°C .

Seguidamente, para la precipitación del ADN nuclear y las proteínas, se agregan 0,2ml de H₂O mQ estéril. Se incuba 5-15 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifuga por 8 minutos a 12.000 g. El sobrenadante se para a un nuevo tubo limpio y estéril y se agregan 0,2 ml de etanol 75% para precipitar el ARN. Se mezcla suavemente por inversión, se incuba 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga 8 minutos a 12.000 g. Se descarta el sobrenadante y el pellet, se lava con 0,4 ml de etanol 75%. Se centrifuga nuevamente 3 minutos a 12.000g y se repite el lavado con etanol otras dos veces. El pellet así obtenido, se seca en termobloque a 50°C por 15 minutos, chequeando que no se seque demasiado. Luego se resuspende el RNA en 30 μl de H₂O mQ estéril, libre de RNAsas. Las muestras se guardan a -80°C .

Antes de realizar la retrotranscripción del ARN, se cuantifican las muestras en espectrofotómetro por la medición de la absorbancia a 260 nm. El equipo también evalúa la absorbancia a 280 nm, longitud de onda a la que absorben también las proteínas debido a sus residuos aromáticos, y se calcula la relación 260/280, que debe ser superior a 1.8 para ser considerada de una pureza aceptable.

- Retrotranscripción

Para la síntesis del cDNA, se utiliza la enzima transcriptasa reversa RT-Pol, (Kit Promega). Esta enzima utiliza como molde ARN o ADN simple cadena en presencia de un primer para sintetizar la hebra de cDNA. Para todas las reacciones, partimos de 1 μg de ARN para una masa representativa y homogénea del cultivo celular. Se realiza la reacción en dos pasos: primero, se alicuota en un tubo el ARN (1 μg) con los primers correspondientes (Oligo dt primers 1 μl) y agua hasta un volumen final de 5 μl . Incubamos a 70°C por 5 minutos en un termociclador (Bio-Rad) para desnaturalizar el ARN y romper las posibles estructuras secundarias que pudieran

haberse formado. Luego, agregamos 15 µl de la mezcla de retrotranscripción, compuesta por los siguientes reactivos (cantidades para una sola muestra):

Buffer 5x 4 µl
MgCl ₂ (4mM, Cf) 3,2 µl
dNTP 10 mM 1 µl
RT-Pol 1 µl
RNAsin 2 µl 20 Unidades 0,5 µl de la madre 40 U/µl
H ₂ OmQ 3,8 µl

Incubamos según el ciclo: 25°C por 5 minutos, 42°C por 30 minutos, 37°C por 30 minutos (tiempo en el cual la enzima cataliza la síntesis del ADNc), 70°C por 15 minutos (para inactivar la enzima). Realizamos finalmente una PCR a punto final con primers para GAPDH para verificar que la retrotranscripción fuera exitosa.

- PCR cuantitativa en tiempo real

Se utiliza la técnica de RT-qPCR para evaluar los niveles de expresión de los ARNm de los genes en estudio o los genes blanco de los mismos. Llevamos a cabo la amplificación del cDNA retrotranscripto, por Real Time qPCR con primers específicos. Utilizamos un equipo de Real Time Stratagene Mx3000, para la corrida de las muestras, con el siguiente protocolo:

Segmento	Cantidad de Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	10 minutos
2	40	95°C	15 segundos
		63°C	20 segundos
		72°C	25 segundos
3	1	95°C	1 minuto
		55°C	30 segundos
		95°C	30 segundos

Previo a la reacción, se realiza una dilución 1:5 del cDNA en H₂O mQ. Se realiza una mix distinta para cada juego de primers utilizados. La reacción se calcula como:

SYBR mix	6,25 µl
Primer Fw 25 µM	0,5 µl
Primer Rv 25 µM	0,5 µl
H ₂ O mQ (Vf: 10,5 µl)	3,25 µl

Se siembra la mezcla (10,2 µl) en strips o placa especial para este equipo y se agregan 2 µl de las muestras de cDNA diluidas 1:5. Se realiza la corrida según la tabla y posteriormente, los datos se analizan con el programa MxPro para Stratagene (Ver “Tratamiento de datos” en esta sección)

Primers utilizados

MageA9	Primer FW: 5'-GGA GAC TCA GTT CCG CAG AG-3' Primer RV: TGG GAC CAC TGT AGT TGT GG-3'
GAPDH	Primer FW: 5'-ACA GCC TCA AGA TCA TCA G-3' Primer RV: 5'-GAG TCC TTC CAC GAT ACC-3'
VEGF	Primer FW : 5'- TCACAGGTACAGGGATGAGGACAC 3' Primer R : 5'- CAAAGCACAGCAATGTCCTGAAG 3'
MMP2	Primer FW: 5'-CTTCCAAGTCTGGAGCGATGT 3' T _m =54.36 Primer RV: 5'-TACCGTCAAAGGGGTATCCAT 3' T _m = 52.40
E-cadherin	Primer FW: 5'-ATTCTGATTCTGCTGCTCTTG-3' Primer RV: 5'-AGTCCTGGTCCTCTTCTCC-3'
N-cadherin	Primer FW: 5' ATGGTGTATGCCGTGAGAAG 3' Primer RV: 5' TGTGCTTACTGAATTGTCTTGG 3'

- Precauciones para mantener la calidad de los procedimientos

Todos los procedimientos previamente descritos para las técnicas de RT-PCR y Real Time PCR fueron realizados en gabinete de seguridad

biológica tipo II empleando guantes descartables, sin talco, con el objeto de evitar la introducción de ARNasas foráneas. El material plástico descartable utilizado para la extracción de ARN así como para las reacciones de RT-PCR, fue adquirido libre de enzimas que degradan ADN (ADNasas) y ARN (ARNasas). Y además, todo el material plástico fue esterilizado por autoclave.

- **Análisis de los datos**

Analizamos los datos crudos utilizando el programa MxPro . La expresión génica fue normalizada a la del gen de la Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La cuantificación de la expresión génica relativa fue calculada usando el método $\Delta\Delta C_t$ (Methods and Applications Guide Introduction to Quantitative PCR Introduction to Quantitative PCR Methods and Applications Guide, n.d.). Realizamos al menos dos duplicados de al menos dos muestras independientes para cada experimento y un blanco sin cDNA. En cada ensayo de amplificación fue incluido un control negativo sin cDNA. El objetivo de este control fue comprobar que los diferentes reactivos empleados no se hubieran contaminado con ADN externo o que hubiera contaminación con ADN genómico por una extracción ineficiente.

11. Ensayo de viabilidad celular (MTT) bajo estrés genotóxico con etopósido

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo colorimétrico de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro; Sigma-Aldrich), que permite estimar la actividad metabólica mitocondrial como indicador indirecto de supervivencia celular.

Las células HN30MS-A9 (p53 wild-type) y HN12MS-A9 (p53 null), con expresión inducible de MAGE-A9, se sembraron en placas multipocillo de 24 pozos a una densidad de aproximadamente 5×10^4 células/pozo en medio DMEM suplementado con 10% SFB y antibióticos. Tras un período de adhesión de 24 h, las células fueron tratadas con doxiciclina (1 $\mu\text{g/ml}$) o vehículo durante 48 h para inducir la expresión de MAGE-A9.

Posteriormente, se expusieron a concentraciones crecientes del agente genotóxico etopósido (Sigma-Aldrich) durante 24 h. Las concentraciones utilizadas fueron:

- **HN30MS-A9:** 0, 5, 10, 25 y 50 μ M
- **HN12MS-A9:** 0, 5, 50 y 100 μ M

Finalizado el tratamiento, se adicionó MTT (0.5 mg/ml en medio de cultivo) y se incubó durante 3–4 h a 37°C. Los cristales de formazán generados fueron solubilizados con DMSO y la absorbancia se midió a 570 nm en un lector de microplacas (BioTek Synergy HTX).

Los valores de absorbancia se normalizaron respecto de las condiciones control (sin etopósido) y se expresaron como porcentaje de viabilidad relativa. Cada condición experimental se analizó en triplicado técnico y en tres réplicas biológicas independientes.

Los resultados se representaron como media $\pm$ DE y las diferencias estadísticas entre condiciones inducidas y no inducidas se evaluaron mediante ANOVA de dos vías, considerando el efecto de la inducción de MAGE-A9 y la concentración de etopósido.

12. Ensayo de apoptosis por citometría de flujo (Anexina V-FITC/PI)

La apoptosis inducida por estrés genotóxico se evaluó mediante tinción con Anexina V-FITC y Yoduro de Propidio (PI) seguida de análisis por citometría de flujo.

Las células HN30MS-A9, con expresión inducible de MAGE-A9, se sembraron en placas de 6 pozos y se cultivaron hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente 70 %. Posteriormente, se indujo la expresión de MAGE-A9 mediante tratamiento con doxiciclina (1 μ g/ml) o vehículo durante 48 h.

Tras la inducción, las células se trataron con etopósido 50 μ M durante 24 h a 37 °C en medio completo. Finalizado el tratamiento, las células adherentes y flotantes se recolectaron, se lavaron dos veces con PBS frío y se resuspendieron en buffer de unión (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4).

La tinción se realizó incubando las suspensiones celulares con Anexina V-FITC (1 µg/ml) y PI (1 µg/ml) durante 15 min en oscuridad a temperatura ambiente, siguiendo las recomendaciones del kit comercial (BD Pharmingen). Las muestras se analizaron inmediatamente en un citómetro de flujo BD FACSCanto II, adquiriendo al menos 10 000 eventos por muestra.

El análisis de datos se realizó con FlowJo v10, utilizando un diagrama de dispersión (FITC/PI) para discriminar las poblaciones de:

- células viables (Anexina V⁻/PI⁻),
- apoptóticas tempranas (Anexina V⁺/PI⁻),
- apoptóticas tardías o necróticas (Anexina V⁺/PI⁺).

Los resultados se expresaron como porcentaje de células en cada población, y las comparaciones entre condiciones inducidas y no inducidas se evaluaron mediante t-test pareado o ANOVA de una vía, según correspondiera. Cada experimento se repitió en al menos tres réplicas biológicas independientes.

13. Ensayo de cicatrización de herida (migración celular)

Las células de HNSCC HN12 con expresión inducible de MAGE-A9 fueron cultivadas en placa multiwell de 24 pocillos.

Para llevar adelante este ensayo primero se realizó una curva de densidades y se escogió la densidad adecuada. Se plaquearon 50.000 cel /well. Al día siguiente se indujeron con doxíciclina o vehículo según correspondiera durante 48 hs. La línea celular utilizada tiene un tiempo de duplicación de entre 28 y 30 hs. Se realizó la herida con un tip de p 200 estéril en ángulo de 45 ° respecto de la superficie, con un movimiento firme y continuo vertical de arriba hacia abajo en el centro de la placa. Se lavó 3 veces con PBS1x para eliminar las células despegadas y se reemplazó el pbs por medio DMEM sin suero. Se tomaron microfotografías correspondientes al tiempo (t0), a las 8 hs y a las 24 hs post herida. Este último tiempo fue muy largo para la línea celular y no se utilizó para cuantificar. Las imágenes fueron analizadas usando ImageJ® y el área migrada se calculó como se describe en (65) utilizando la siguiente ecuación.

$$\% \text{cierre} = [(At0 - Atf) / At0] * 100$$

Figura 2 Mat y Met: Vector lentiviral all-in-one con expresión inducible por doxíciclina para la expresión de un gen en combinación con turboGFP, utilizando el péptido auto-escindible P2A.

c. pG13-Luc:

Plásmido reportero que posee la secuencia codificante de la enzima Luciferasa firefly rio abajo de un promotor artificial hecho de una repetición en tándem de un fragmento del promotor p21.

d. Renilla Luc pCMV-Renilla Luciferasa

Plásmido reportero conteniendo el gen de la luciferasa Renilla, bajo el promotor del citomegalovirus. Este plásmido fue utilizado para normalizar los datos de unidades arbitrarias obtenidas en la medición de la actividad luciferasa

15. Transformación de bacterias

a. Preparación de bacterias ultracompetentes

Tanto las bacterias *Escherichia coli* DH5 α como las BL21 fueron tratadas químicamente para su posterior transformación. Para ello, se pica una única colonia de la cepa bacteriana correspondiente, obtenida a partir de un cultivo en placa, crecida ON a 37°C (0,5% Extracto de levadura, 1% Triptona, 0,5% NaCl, 1,2% agar). Se incuba en 25 ml de medio líquido SOB (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, NaCl 8,6 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM) a 37 °C en agitación por 6 horas. Luego se diluye el inóculo bacteriano 1:50 en 250 ml finales de medio LB (0,5% Extracto de levadura, 1% Triptona, 0,5% NaCl) y se incuba a 22°C en agitación hasta que la densidad óptica a 600nm alcance un valor de 0,55. El cultivo bacteriano se enfría en hielo durante 10 minutos y se centrifuga a 4.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.

El pellet obtenido se resuspende en 80 ml de solución de transformación fría (MnCl₂ 55 mM, CaCl₂ 55 mM, KCl 250 mM, PIPES 10 mM pH 6,7) y se centrifuga otros 10 minutos a 4.000 rpm a 4 °C. Luego el pellet se resuspende en 20 ml de solución de transformación fría, al que se adicionaron 1,5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) y se

deja enfriar nuevamente en hielo por 10 minutos. Finalmente se fracciona, se congela rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenan esas alícuotas a -80 °C hasta el momento de su utilización.

b. Transformación

Se toman 100 µl de bacterias ultracompetentes para ser transformadas con todo el volumen de la reacción de ligación o con 30 ng de vector circularizado, según correspondiera. Luego de incubar 20 minutos en hielo, se realiza un shock térmico incubando las bacterias a 42°C durante 90 segundos e inmediatamente se trasvasa a hielo y se incuba por 5 minutos.

Posteriormente se agregan 500 µl de medio SOC (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, NaCl 8,6 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, glucosa 20 mM) y se incuba a 37 °C en agitación durante 1 hora con el objeto de permitir la recuperación de las bacterias y la expresión de la resistencia. Terminada la incubación se centrifuga a 5000 rpm por 60 segundos, se descartan 500 µl sobrenadante y con el remanente se resuspende el pellet de bacterias y se siembra en la placa previamente plaqueada con medio LB agar en presencia del antibiótico de selección (ampicilina o kanamicina). Se incuba durante toda la noche a 37°C.

c. Stocks de glicerol

Se realiza un stock de glicerol de cada bacteria transformada. Para esto, se toman 500 µl de las bacterias frescas crecidas de la noche anterior y se les agrega 500 µl de Glicerol 60% estéril. Se guarda la mezcla a -80°C hasta el momento de usar.

16. Obtención de ADN plasmídico

Preparación de ADN plasmídico a mediana escala (Midiprep)

Este protocolo se realiza para la obtención de ADN plasmídico. Todos los plásmidos que utilizamos para la transfección de las líneas celulares, así como para la realización de los clonados, fueron obtenidos con este protocolo. Utilizamos el kit de extracción de ADN plasmídico de Promega (Wizard® Genomic DNA Purification Kit # TM050).

Se toman unos 5 µl del stock de glicerol de las bacterias transformadas con el plásmido deseado y se crecen en 100 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente, incubando ON a 37 °C en agitación. Al día siguiente se centrifuga todo el volumen 10 minutos a 6.000 rpm. Se descarta el sobrenadante y el pellet bacteriano obtenido se resuspende en 3 ml de buffer de resuspensión (P1), vortéjase y pipeteando vigorosamente hasta obtener una solución homogénea. Se agregan 3 ml de buffer de lisis (P2), se mezcla suavemente por inversión y se deja actuar por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregan 3 ml de buffer de neutralización (P3) y se mezcla suavemente por inversión. Se deja actuar 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 10.000 rpm por 25 minutos a 4 °C. Se transvasa el sobrenadante a un tubo limpio y se agregan 10 ml de resina que une al ADN, mezclando suavemente por pipeteo y se trasvasa a la columna provista por el kit. Esta columna tiene un filtro en el cual se retiene la resina unida al ADN. Mediante una bomba de vacío se elimina el líquido y se lava dos veces con 15 ml de solución de lavado.. Para la elución del ADN de la resina, primero se centrifuga la columna a máxima velocidad por un minuto para eliminar el exceso de líquido remanente y finalmente se eluye el ADN plasmídico con 300 µl de agua milli-Q precalentada a 60°C centrifugando un minuto. Se cuantifica el ADN mediante espectrofotómetro y, se corre en un gel de agarosa al 1% en Buffer TAE 1x con bromuro de etidio, por 15 minutos a 60V (esto permite chequear tanto la correcta purificación del plásmido como la integridad del mismo). Se guarda a -20 °C hasta su utilización.

17. Análisis transcriptómico por RNA-seq

17.1 Diseño experimental y obtención de muestras

Se realizó un análisis transcriptómico mediante RNA-seq en células HN30 con expresión inducible de MAGE-A9, con el objetivo de evaluar el impacto de esta oncoproteína sobre el paisaje transcripcional.

El diseño experimental consistió en células inducidas y no inducidas con doxiciclina 2 µg/ml durante 48 hs. Cada condición experimental fue analizada en triplicado biológico.

El RNA total fue extraído a partir de cada condición y enviado a MacroGen Inc. (Corea del Sur) para la preparación de bibliotecas y secuenciación. La compañía realizó controles de calidad previos a la construcción de bibliotecas para asegurar la integridad del RNA. La secuenciación generó archivos FASTQ conteniendo las lecturas crudas de cada muestra.

El RNeasy Micro Kit (Qiagen) se utilizó para el aislamiento de ARN total a partir de células WSU-HN30 de carcinoma escamoso oral humano (Human Oral Squamous Cell Carcinoma), con expresión de MAGEA9 inducible por doxiciclina. A partir de este ARN se purificaron las moléculas de ARNm que contienen cola poli(A). La amplificación del ARN y la síntesis de ADNc de doble cadena se realizaron siguiendo las pautas del protocolo TruSeq RNA Sample Prep (Illumina). Las muestras multiplexadas se secuenciaron a una longitud de lectura de 151 pb mediante tecnología Illumina. Se obtuvieron tres réplicas biológicas independientes para cada grupo (MAGEA9 inducido vs MAGEA9 no inducido).

17.2 Control de calidad y preprocesamiento de lecturas

La calidad de las lecturas crudas fue evaluada mediante FastQC (*Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>*), inspeccionando métricas estándar como calidad por base, distribución de scores Phred, contenido GC y presencia de adaptadores.

Las lecturas fueron posteriormente recortadas utilizando Trimmomatic (*Anthony M. Bolger, Marc Lohse, Bjoern Usadel, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, Bioinformatics, Volume 30, Issue 15, 1 August 2014, Pages 2114–2120, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>*) en modo paired-end. Se removieron adaptadores y regiones sobrerrepresentadas así como regiones de baja calidad (parámetros: ILLUMINACLIP:combined_adapters.fa:2:30:10:2:true

\HEADCROP:12 \ SLIDINGWINDOW:4:20 \MINLEN:75, el archivo combines_adapters.fa contiene las secuencias de los adaptadores TruSeq3 de Illumina utilizados y una secuencia de PolyG que estaba sobrerrepresentada en las lecturas). Tras el trimming, se realizó un segundo control de calidad con FastQC para verificar la mejora en el perfil global de las lecturas.

17.3 Cuantificación de la expresión génica mediante pseudoalineamiento

Las lecturas paired-end de cada muestra se alinearon contra el genoma humano GRCh38, cDNA completo, utilizando Kallisto (versión 0.51.1, Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). *Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification*. **Nature Biotechnology**, 34(5), 525–527. <https://doi.org/10.1038/nbt.3519>). Este enfoque permite estimar abundancias transcriptómicas a partir de coincidencias de k-mers sin requerir alineamiento completo al genoma, reduciendo sesgos computacionales y manteniendo alta precisión en la estimación de niveles de expresión.

El porcentaje promedio de lecturas pseudoalineadas es del 90.8%, con valores consistentes entre las muestras (rango: 90.2–91.6%), indicando una adecuada correspondencia entre las lecturas y el transcriptoma de referencia. Los resultados fueron exportados para su análisis downstream en el entorno R.

17.4 Importación y análisis exploratorio de datos en R

La cuantificación y normalización de los datos se efectuó en R (versión 4.5.0) mediante el método limma-voom.

El análisis bioinformático se realizó en R (versión 4.5.0) utilizando paquetes de Bioconductor (v 3.21).

Se llevaron a cabo análisis exploratorios no supervisados para evaluar la estructura global del dataset. En particular, se aplicó un Análisis de Componentes Principales (PCA) sobre los datos transformados, permitiendo identificar las principales fuentes de variación biológica.

17.5 Filtrado y normalización de datos

Previo al análisis diferencial, se eliminaron genes de baja expresión utilizando un criterio de filtrado basado en CPM (Counts Per Million), reteniendo aquellos con $CPM > 1$ en al menos seis muestras.

Posteriormente, las lecturas fueron normalizadas para corregir diferencias en profundidad de secuenciación y composición entre muestras (paquete edgeR (Bioconductor, Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). *edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data*. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>, método Trimmed Mean of M-values (TMM))), permitiendo comparaciones cuantitativas robustas.

17.6 Análisis de expresión diferencial

La identificación de genes diferencialmente expresados (DEGs) se realizó utilizando el paquete limma-voom (Bioconductor).

El método voom modeló la relación media-varianza característica de los datos de RNA-seq, permitiendo aplicar posteriormente estadística empírica bayesiana mediante limma. Para cada gen se obtuvieron valores de log2 fold change, estadísticos moderados y valores de significancia ajustados por múltiples comparaciones (criterio padj/FDR < 0,05, y logFC es > 0).

17.7 Análisis funcional y enriquecimiento de vías

Con el fin de interpretar biológicamente los cambios transcriptómicos asociados a la expresión de MAGE-A9, se aplicaron dos estrategias complementarias:

- Over-Representation Analysis (ORA), basado en subconjuntos de genes diferencialmente expresados, utilizando distintos recursos de anotación funcional en el entorno R mediante paquetes de Bioconductor.

El enriquecimiento de Gene Ontology (GO) se realizó utilizando la función `enrichGO` del paquete `clusterProfiler`, considerando la ontología de procesos biológicos (Biological Process), función molecular (MF) y componentes celulares (CC). Asimismo, el enriquecimiento de vías metabólicas se evaluó mediante `enrichKEGG`, también implementado en `clusterProfiler`, utilizando la base de datos KEGG.

El análisis de enriquecimiento de rutas biológicas adicionales se llevó a cabo mediante el paquete `ReactomePA`, utilizando la función `enrichPathway`, basada en la base de datos Reactome.

Además, se evaluó el enriquecimiento de conjuntos génicos previamente curados utilizando la colección C6 (oncogenic signatures) y la colección Hallmark de la base de datos MSigDB, mediante funciones de enriquecimiento implementadas en `clusterProfiler`.

Complementariamente, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional utilizando el paquete `gprofiler2`, que integra múltiples fuentes de anotación funcional, incluyendo Gene Ontology, KEGG y Reactome.

En todos los casos, la significancia estadística del enriquecimiento se evaluó mediante pruebas hipergeométricas y los valores de p se ajustaron por corrección por múltiples comparaciones utilizando el método de Benjamini–Hochberg (FDR). Se consideraron significativamente enriquecidos aquellos términos con $FDR < 0.05$.

- Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), utilizando rankings globales de genes para detectar cambios coordinados en vías biológicas. (GSEA) utilizando la función `fgseaMultilevel` del paquete `fgsea` (versión 1.34.0). Se emplearon conjuntos de genes de la base de datos MSigDB:

-C6: *Curated Oncogenic Signatures*

-C2: Canonical Pathways — subconjunto Reactome, KEGG

-C5: Gene Ontology Biological Process (GO BP), Molecular Function (MF), Cellular component (CC).

-H: Hallmark

El conjunto de genes se ordenó (*pre-ranking*) a partir del estadístico t. Se incluyeron únicamente vías con un tamaño comprendido entre 15 y 500 genes. La corrección por comparaciones múltiples se realizó mediante el método de Benjamini–Hochberg (BH), y se consideraron significativamente enriquecidas aquellas vías con un valor de p ajustado < 0.05 .

Estos análisis permitieron identificar procesos moleculares y redes de señalización moduladas por MAGE-A9.

18. Desarrollo del ubiquitinoma

Con el objetivo de identificar proteínas diferencialmente ubiquitinadas asociadas a la expresión de MAGE-A9, se realizó un análisis de ubiquitinoma en colaboración con el Dr. Philippe Soubeyran (Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Inserm). El ensayo se llevó a cabo en células HN30MS-A9 mediante un esquema de purificación en tándem seguido de análisis por espectrometría de masas (LC-MS/MS).

Las células fueron transducidas con dos construcciones independientes: un vector control GFP y un vector que expresa ubiquitina marcada con etiquetas 6-His-FLAG (6-His-FLAG-Ub), lo que permitió el enriquecimiento selectivo de proteínas ubiquitinadas. Tras la obtención de líneas celulares estables, las células fueron inducidas con 2 μ g/ml de doxíciclina durante 48 h para promover la expresión de MAGE-A9 y posteriormente procesadas bajo condiciones desnaturizantes con el fin de preservar las modificaciones covalentes dependientes de ubiquitina.

18.1 Lisis celular y purificación por afinidad Ni-NTA

Aproximadamente diez placas de 15 cm por condición experimental (equivalentes a 50–100 mg de proteína total) fueron lisadas en buffer desnaturizante (buffer 1: 6 M guanidinio-HCl, 0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 8,0, 0,5 % Triton X-100), utilizando 2 ml por placa. Los lisados se sonicaron tres veces durante 30 s con intervalos de 1 min en hielo y posteriormente se centrifugaron a 15.000 g durante 15 min para eliminar restos insolubles. El sobrenadante fue filtrado a través de filtros de 40 µm y la concentración proteica se determinó mediante ensayo colorimétrico (Bio-Rad).

Para el enriquecimiento inicial de proteínas ubiquitinadas, se adicionaron perlas Ni²⁺-NTA (Qiagen®) en una proporción de 2 µl por mg de proteína total y se incubaron durante 2 h 30 min a temperatura ambiente bajo rotación. Tras la incubación, las perlas se recuperaron por centrifugación a 500 g durante 5 min y se realizaron lavados secuenciales: una vez con buffer 1 y dos veces con buffer 2 (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 1 % Tween-20, 5 % glicerol, 10 mM imidazol, pH 8,0) en frío, con el objetivo de reducir interacciones inespecíficas.

18.2. Segunda purificación mediante inmunoprecipitación anti-FLAG

Las proteínas retenidas en las perlas Ni-NTA se eluyeron durante 2 h en 600 µl de buffer 2 suplementado con 250 mM imidazol a 4 °C. El eluido resultante fue sometido a una segunda etapa de purificación mediante incubación con 50 µl de perlas anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich®) durante 2 h 30 min a 4 °C bajo agitación suave, incrementando la especificidad del enriquecimiento de proteínas conjugadas a ubiquitina marcada.

Las perlas se lavaron dos veces con buffer 2 y dos veces con buffer 3 (100 mM NH₄HCO₃, pH 8,0). La elución final se realizó durante 1 h 30 min a 4 °C utilizando buffer 3 conteniendo péptido FLAG (0,1 µg/µl). Un 10 % del eluido se analizó por SDS-PAGE seguido de tinción con plata para evaluar pureza y rendimiento de la purificación, mientras que el resto de las muestras se almacenó a –80 °C hasta su procesamiento por espectrometría de masas (LC-MS/MS).

BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* enero de 2022;12(1):31-46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059 PubMed PMID: 35022204.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 4 de marzo de 2011;144(5):646-74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 PubMed PMID: 21376230.
3. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 12 de enero de 2016;23(1):27-47. doi:10.1016/j.cmet.2015.12.006 PubMed PMID: 26771115; PubMed Central PMCID: PMC4715268.
4. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell.* 9 de febrero de 2017;168(4):613-28. doi:10.1016/j.cell.2017.01.018 PubMed PMID: 28187284.
5. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med.* 31 de enero de 2008;358(5):502-11. doi:10.1056/NEJMra072367 PubMed PMID: 18234754.
6. Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell.* 23 de enero de 2004;116(2):235-46. doi:10.1016/s0092-8674(03)01075-4 PubMed PMID: 14744434.
7. Levine AJ. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nat Rev Cancer.* agosto de 2020;20(8):471-80. doi:10.1038/s41568-020-0262-1 PubMed PMID: 32404993.
8. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell.* 1 de mayo de 2009;137(3):413-31. doi:10.1016/j.cell.2009.04.037 PubMed PMID: 19410540.
9. Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1996;122(3):135-40. doi:10.1007/BF01366952 PubMed PMID: 8601560; PubMed Central PMCID: PMC12201814.
10. Sever R, Brugge JS. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1 de abril de 2015;5(4):a006098. doi:10.1101/cshperspect.a006098 PubMed PMID: 25833940; PubMed Central PMCID: PMC4382731.
11. Hunter T. The genesis of tyrosine phosphorylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 de mayo de 2014;6(5):a020644. doi:10.1101/cshperspect.a020644 PubMed PMID: 24789824; PubMed Central PMCID: PMC3996475.
12. Laubenbacher R, Hower V, Jarrah A, Torti SV, Shulaev V, Mendes P, et al. A Systems Biology View of Cancer. *Biochim Biophys Acta.* diciembre de 2009;1796(2):129-39. doi:10.1016/j.bbcan.2009.06.001 PubMed PMID: 19505535; PubMed Central PMCID: PMC2782452.

13. Swatek KN, Komander D. Ubiquitin modifications. *Cell Res.* abril de 2016;26(4):399-422. doi:10.1038/cr.2016.39 PubMed PMID: 27012465; PubMed Central PMCID: PMC4822133.
14. Vega-Muñoz I, Herrera-Estrella A, Martínez-de la Vega O, Heil M. ATM and ATR, two central players of the DNA damage response, are involved in the induction of systemic acquired resistance by extracellular DNA, but not the plant wound response. *Front Immunol.* 2023;14:1175786. doi:10.3389/fimmu.2023.1175786 PubMed PMID: 37256140; PubMed Central PMCID: PMC10225592.
15. p53 at the crossroad of DNA replication and ribosome biogenesis stress pathways | *Cell Death & Differentiation* [Internet]. [citado 24 de febrero de 2026]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41418-022-00999-w>
16. Maréchal A, Zou L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 de septiembre de 2013;5(9):a012716. doi:10.1101/cshperspect.a012716 PubMed PMID: 24003211; PubMed Central PMCID: PMC3753707.
17. Wagh V, Joshi P, Jariyal H, Chauhan N. ATM and ATR checkpoint kinase pathways: A concise review. *Adv Hum Biol.* 2020;10(2):51. doi:10.4103/AIHB.AIHB_78_19
18. Prabhu KS, Kuttikrishnan S, Ahmad N, Habeeba U, Mariyam Z, Suleman M, et al. H2AX: A key player in DNA damage response and a promising target for cancer therapy. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* junio de 2024;175:116663. doi:10.1016/j.biopha.2024.116663 PubMed PMID: 38688170.
19. Wu X, Zhou X, Wang S, Mao G. DNA damage response(DDR): a link between cellular senescence and human cytomegalovirus. *Virology J.* 1 de noviembre de 2023;20(1):250. doi:10.1186/s12985-023-02203-y PubMed PMID: 37915066; PubMed Central PMCID: PMC10621139.
20. Zhang H, Xu J, Long Y, Maimaitijiang A, Su Z, Li W, et al. Unraveling the Guardian: p53's Multifaceted Role in the DNA Damage Response and Tumor Treatment Strategies. *Int J Mol Sci.* 1 de diciembre de 2024;25(23):12928. doi:10.3390/ijms252312928 PubMed PMID: 39684639; PubMed Central PMCID: PMC11641486.
21. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* enero de 2018;25(1):104-13. doi:10.1038/cdd.2017.169 PubMed PMID: 29149101; PubMed Central PMCID: PMC5729529.
22. Wang H, Guo M, Wei H, Chen Y. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 1 de marzo de 2023;8(1):92. doi:10.1038/s41392-023-01347-1
23. Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med.* marzo de 2020;19(3):1997-2007.

doi:10.3892/etm.2020.8454 PubMed PMID: 32104259; PubMed Central PMCID: PMC7027163.

24. Yuan J, Dong X, Yap J, Hu J. The MAPK and AMPK signalings: interplay and implication in targeted cancer therapy. *J Hematol Oncol*. 17 de agosto de 2020;13:113. doi:10.1186/s13045-020-00949-4 PubMed PMID: 32807225; PubMed Central PMCID: PMC7433213.
25. Ullah R, Yin Q, Snell AH, Wan L. RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment. *Semin Cancer Biol*. 1 de octubre de 2022;Targeting Cellular Signaling Pathways85:123-54. doi:10.1016/j.semcancer.2021.05.010
26. Samson SC, Khan AM, Mendoza MC. ERK signaling for cell migration and invasion. *Front Mol Biosci*. 3 de octubre de 2022;9. doi:10.3389/fmolb.2022.998475
27. Lavoie H, Therrien M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mayo de 2015;16(5):281-98. doi:10.1038/nrm3979 PubMed PMID: 25907612.
28. Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer*. septiembre de 2014;14(9):598-610. doi:10.1038/nrc3792 PubMed PMID: 25098269; PubMed Central PMCID: PMC4365862.
29. Kamranvar SA, Gupta DK, Huang Y, Gupta RK, Johansson S. Integrin signaling via FAK-Src controls cytokinetic abscission by decelerating PLK1 degradation and subsequent recruitment of CEP55 at the midbody. *Oncotarget*. 26 de abril de 2016;7(21):30820-30. doi:10.18632/oncotarget.9003 PubMed PMID: 27127172; PubMed Central PMCID: PMC5058720.
30. Kanteti R, Batra SK, Lennon FE, Salgia R. FAK and paxillin, two potential targets in pancreatic cancer. *Oncotarget*. 13 de marzo de 2016;7(21):31586-601. doi:10.18632/oncotarget.8040
31. Schlaepfer DD, Ojalill M, Stupack DG. Focal adhesion kinase signaling - tumor vulnerabilities and clinical opportunities. *J Cell Sci*. 15 de julio de 2024;137(14):jcs261723. doi:10.1242/jcs.261723 PubMed PMID: 39034922; PubMed Central PMCID: PMC11298715.
32. Zhao X, Guan JL. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 18 de julio de 2011;63(8):610-5. doi:10.1016/j.addr.2010.11.001 PubMed PMID: 21118706; PubMed Central PMCID: PMC3132829.
33. Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer*. septiembre de 2014;14(9):598-610. doi:10.1038/nrc3792 PubMed PMID: 25098269; PubMed Central PMCID: PMC4365862.

34. (PDF) Recycling machinery of integrin coupled with focal adhesion turnover via RAB11-UNC13D-FAK axis for migration of pancreatic cancer cells. ResearchGate. doi:10.1186/s12967-024-05630-9
35. Lee C, Kim MJ, Kumar A, Lee HW, Yang Y, Kim Y. Vascular endothelial growth factor signaling in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic perspectives. *Signal Transduct Target Ther*. 19 de mayo de 2025;10:170. doi:10.1038/s41392-025-02249-0 PubMed PMID: 40383803; PubMed Central PMCID: PMC12086256.
36. Liu ZL, Chen HH, Zheng LL, Sun LP, Shi L. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 11 de mayo de 2023;8:198. doi:10.1038/s41392-023-01460-1 PubMed PMID: 37169756; PubMed Central PMCID: PMC10175505.
37. Wang X, Bove AM, Simone G, Ma B. Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:599281. doi:10.3389/fcell.2020.599281 PubMed PMID: 33304904; PubMed Central PMCID: PMC7701214.
38. Wang L, Liu WQ, Broussy S, Han B, Fang H. Recent advances of anti-angiogenic inhibitors targeting VEGF/VEGFR axis. *Front Pharmacol*. 4 de enero de 2024;14:1307860. doi:10.3389/fphar.2023.1307860 PubMed PMID: 38239196; PubMed Central PMCID: PMC10794590.
39. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 9 de marzo de 2017;168(6):960-76. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004 PubMed PMID: 28283069; PubMed Central PMCID: PMC5394987.
40. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*. 10 de agosto de 2017;170(4):605-35. doi:10.1016/j.cell.2017.07.029 PubMed PMID: 28802037; PubMed Central PMCID: PMC5726441.
41. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol*. 14 de abril de 2014;4:64. doi:10.3389/fonc.2014.00064 PubMed PMID: 24782981; PubMed Central PMCID: PMC3995050.
42. Leiphrakpam PD, Are C. PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway as a Target for Colorectal Cancer Treatment. *Int J Mol Sci*. 8 de marzo de 2024;25(6). doi:10.3390/ijms25063178
43. (PDF) The Effect and Treatment of PIK3CA Mutations in Breast Cancer: Current Understanding and Future Directions. ResearchGate. 10 de octubre de 2025. doi:10.3390/medicina61030518
44. Srivastava S, Tripathi A, Trivedi AK. Editorial: The role of post-translational modifications in cancer biology. *Front Oncol*. 28 de agosto de 2024;14:1470173. doi:10.3389/fonc.2024.1470173 PubMed PMID: 39263188; PubMed Central PMCID: PMC11387157.

45. Bruno PS, Arshad A, Gogu MR, Waterman N, Flack R, Dunn K, et al. Post-Translational Modifications of Proteins Orchestrate All Hallmarks of Cancer. *Life*. 18 de enero de 2025;15(1):126. doi:10.3390/life15010126 PubMed PMID: 39860065; PubMed Central PMCID: PMC11766951.
46. Li X, Yang P, Hou X, Ji S. Post-Translational Modification of PTEN Protein: Quantity and Activity. *Oncol Rev*. 31 de julio de 2024;18:1430237. doi:10.3389/or.2024.1430237 PubMed PMID: 39144161; PubMed Central PMCID: PMC11321960.
47. Swatek KN, Komander D. Ubiquitin modifications. *Cell Res*. abril de 2016;26(4):399-422. doi:10.1038/cr.2016.39 PubMed PMID: 27012465; PubMed Central PMCID: PMC4822133.
48. Popovic D, Vucic D, Dikic I. Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nat Med*. noviembre de 2014;20(11):1242-53. doi:10.1038/nm.3739 PubMed PMID: 25375928.
49. Frontiers | Integrating multi-omics and experimental techniques to decode ubiquitinated protein modifications in hepatocellular carcinoma [Internet]. [citado 24 de febrero de 2026]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2025.1545472/full>
50. Hunter T. The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell*. 14 de diciembre de 2007;28(5):730-8. doi:10.1016/j.molcel.2007.11.019 PubMed PMID: 18082598.
51. Mittal L, Verma N, Singh D, Pandey S, Sinha AK. Crosstalk Between Phosphorylation and Ubiquitination Controls the Fate and Function of Strigolactone Signal Transducers [Internet]. *bioRxiv*; 2025 [citado 24 de febrero de 2026]. p. 2025.08.27.672522. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2025.08.27.672522v1> doi:10.1101/2025.08.27.672522
52. Feng J, Tamaskovic R, Yang Z, Brazil DP, Merlo A, Hess D, et al. Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. *J Biol Chem*. 20 de agosto de 2004;279(34):35510-7. doi:10.1074/jbc.M404936200 PubMed PMID: 15169778.
53. Frontiers | Integrating multi-omics and experimental techniques to decode ubiquitinated protein modifications in hepatocellular carcinoma [Internet]. [citado 24 de febrero de 2026]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2025.1545472/full>
54. Hunter T. The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell*. 14 de diciembre de 2007;28(5):730-8. doi:10.1016/j.molcel.2007.11.019 PubMed PMID: 18082598.

55. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* junio de 2018;19(6):349-64. doi:10.1038/s41580-018-0003-4 PubMed PMID: 29618831.
56. The ubiquitination–autophagy axis in cancer therapy resistance: mechanistic insights and therapeutic opportunities - PMC [Internet]. [citado 24 de febrero de 2026]. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12868213/>
57. D S, J Q, Za R. Ubiquitin ligases in oncogenic transformation and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* febrero de 2018;18(2). doi:10.1038/nrc.2017.105 PubMed PMID: 29242641.
58. Nin DS, Deng LW. Biology of Cancer-Testis Antigens and Their Therapeutic Implications in Cancer. *Cells.* 17 de marzo de 2023;12(6):926. doi:10.3390/cells12060926 PubMed PMID: 36980267; PubMed Central PMCID: PMC10047177.
59. Almeida LG, Sakabe NJ, deOliveira AR, Silva MCC, Mundstein AS, Cohen T, et al. CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens. *Nucleic Acids Res.* enero de 2009;37(Database issue):D816-819. doi:10.1093/nar/gkn673 PubMed PMID: 18838390; PubMed Central PMCID: PMC2686577.
60. Lai TJ, Sun L, Li K, Prins TJ, Treger J, Li T, et al. Epigenetic Induction of Cancer-Testis Antigens and Endogenous Retroviruses at Single-Cell Level Enhances Immune Recognition and Response in Glioma. *Cancer Res Commun.* 1 de julio de 2024;4(7):1834-49. doi:10.1158/2767-9764.CRC-23-0566 PubMed PMID: 38856710; PubMed Central PMCID: PMC11275559.
61. Lee AK, Potts PR. A comprehensive guide to the MAGE family of ubiquitin ligases. *J Mol Biol.* 21 de abril de 2017;429(8):1114-42. doi:10.1016/j.jmb.2017.03.005 PubMed PMID: 28300603; PubMed Central PMCID: PMC5421567.
62. Weon JL, Potts PR. The MAGE protein family and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* diciembre de 2015;37:1-8. doi:10.1016/j.ceb.2015.08.002 PubMed PMID: 26342994; PubMed Central PMCID: PMC4688208.
63. Verma S, Swain D, Kushwaha PP, Brahmbhatt S, Gupta K, Sundi D, et al. Melanoma Antigen Family A (MAGE A) as Promising Biomarkers and Therapeutic Targets in Bladder Cancer. *Cancers.* 4 de enero de 2024;16(2). doi:10.3390/cancers16020246
64. Monte M, Simonatto M, Peche LY, Bublik DR, Gobessi S, Pierotti MA, et al. MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25 de julio de 2006;103(30):11160-5. doi:10.1073/pnas.0510834103 PubMed PMID: 16847267; PubMed Central PMCID: PMC1544058.

65. Ladelfa MF, Peche LY, Toledo MF, Laiseca JE, Schneider C, Monte M. Tumor-specific MAGE proteins as regulators of p53 function. *Cancer Lett.* 1 de diciembre de 2012;325(1):11-7. doi:10.1016/j.canlet.2012.05.031 PubMed PMID: 22664239.
66. Bai S, He B, Wilson EM. Melanoma Antigen Gene Protein MAGE-11 Regulates Androgen Receptor Function by Modulating the Interdomain Interaction. *Mol Cell Biol.* febrero de 2005;25(4):1238-57. doi:10.1128/MCB.25.4.1238-1257.2005 PubMed PMID: 15684378; PubMed Central PMCID: PMC548016.
67. Functional interaction between co-expressed MAGE-A proteins | PLOS One [Internet]. [citado 25 de febrero de 2026]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0178370>
68. Knockdown of MAGE-A6 enhanced the irradiation sensitivity of non-small cell lung cancer cells by activating the AMPK pathway - PubMed [Internet]. [citado 25 de febrero de 2026]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35285568/>
69. Yang SW, Li L, Connelly JP, Porter SN, Kodali K, Gan H, et al. A Cancer-Specific Ubiquitin Ligase Drives mRNA Alternative Polyadenylation by Ubiquitinating the mRNA 3' End Processing Complex. *Mol Cell.* 19 de marzo de 2020;77(6):1206-1221.e7. doi:10.1016/j.molcel.2019.12.022 PubMed PMID: 31980388.
70. Marcar L, Ihrig B, Hourihan J, Bray SE, Quinlan PR, Jordan LB, et al. MAGE-A Cancer/Testis Antigens Inhibit MDM2 Ubiquitylation Function and Promote Increased Levels of MDM4. *PloS One.* 2015;10(5):e0127713. doi:10.1371/journal.pone.0127713 PubMed PMID: 26001071; PubMed Central PMCID: PMC4441487.
71. Structural basis for substrate recognition and chemical inhibition of oncogenic MAGE ubiquitin ligases | Nature Communications [Internet]. [citado 25 de febrero de 2026]. Disponible en: https://www.nature.com/articles/s41467-020-18708-x?utm_source=chatgpt.com
72. Fu X, Yang X, Huang J, Huang Y, Potts PR, Liang C. A cancer-specific antigen drives histone acetylation by stabilizing the acetyltransferases. *Cell Rep.* 28 de octubre de 2025;44(10):116408. doi:10.1016/j.celrep.2025.116408 PubMed PMID: 41060806.
73. Meyer TJ, Hartmann S, Wohlleben G, Brisam M, Seher A, Kübler AC, et al. MAGE-A9 in head and neck cancer: Prognostic value and preclinical findings in the context of irradiation. *Mol Clin Oncol.* marzo de 2018;8(3):513-9. doi:10.3892/mco.2018.1558 PubMed PMID: 29556384; PubMed Central PMCID: PMC5844004.
74. Han L, Jiang B, Wu H, Zhang S, Lu X. Expression and prognostic value of MAGE-A9 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(10):6734-42. PubMed PMID: 25400753; PubMed Central PMCID: PMC4230163.

75. Gu X, Fu M, Ge Z, Zhan F, Ding Y, Ni H, et al. High expression of MAGE-A9 correlates with unfavorable survival in hepatocellular carcinoma. *Sci Rep.* 15 de octubre de 2014;4:6625. doi:10.1038/srep06625 PubMed PMID: 25315972; PubMed Central PMCID: PMC4197415.
76. Xu X, Tang X, Lu M, Tang Q, Zhang H, Zhu H, et al. Overexpression of MAGE-A9 predicts unfavorable outcome in breast cancer. *Exp Mol Pathol.* diciembre de 2014;97(3):579-84. doi:10.1016/j.yexmp.2014.11.001 PubMed PMID: 25445503.
77. Xu Y, Wang C, Zhang Y, Jia L, Huang J. Overexpression of MAGE-A9 Is Predictive of Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. *Sci Rep.* 15 de julio de 2015;5:12104. doi:10.1038/srep12104 PubMed PMID: 26175056; PubMed Central PMCID: PMC4502509.
78. Hou SY, Sang MX, Geng CZ, Liu WH, Lü WH, Xu YY, et al. Expressions of MAGE-A9 and MAGE-A11 in breast cancer and their expression mechanism. *Arch Med Res.* enero de 2014;45(1):44-51. doi:10.1016/j.arcmed.2013.10.005 PubMed PMID: 24316396.
79. High expression of MAGE-A9 correlates with unfavorable survival in hepatocellular carcinoma | Scientific Reports [Internet]. [citado 25 de febrero de 2026]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep06625>
80. Picard V, Bergeron A, Larue H, Fradet Y. MAGE-A9 mRNA and protein expression in bladder cancer. *Int J Cancer.* 15 de mayo de 2007;120(10):2170-7. doi:10.1002/ijc.22282 PubMed PMID: 17290406.
81. Zhan W, Zhang Z, Zhang Y, Ma J, Wu T, Gu Y, et al. Prognostic value of MAGE-A9 expression in patients with colorectal cancer. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* abril de 2016;40(2):239-45. doi:10.1016/j.clinre.2015.08.005 PubMed PMID: 26516058.
82. Pascucci FA, Ladelfa MF, Toledo MF, Escalada M, Suberbordes M, Monte M. MageC2 protein is upregulated by oncogenic activation of MAPK pathway and causes impairment of the p53 transactivation function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* marzo de 2021;1868(3):118918. doi:10.1016/j.bbamcr.2020.118918 PubMed PMID: 33279609.
83. Bergeron A, Picard V, LaRue H, Harel F, Hovington H, Lacombe L, et al. High frequency of MAGE-A4 and MAGE-A9 expression in high-risk bladder cancer. *Int J Cancer.* 15 de septiembre de 2009;125(6):1365-71. doi:10.1002/ijc.24503 PubMed PMID: 19533752.
84. High expression of MAGE-A9 is associated with unfavorable survival in esophageal squamous cell carcinoma - PubMed [Internet]. [citado 25 de febrero de 2026]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28927095/>
85. Zhang S, Zhai X, Wang G, Feng J, Zhu H, Xu L, et al. High expression of MAGE-A9 in tumor and stromal cells of non-small cell lung cancer was correlated

- with patient poor survival. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(1):541-50. PubMed PMID: 25755744; PubMed Central PMCID: PMC4348844.
86. Feng Y, Gao J, Yang M. When MAGE meets RING: insights into biological functions of MAGE proteins. *Protein Cell*. enero de 2011;2(1):7-12. doi:10.1007/s13238-011-1002-9 PubMed PMID: 21337005; PubMed Central PMCID: PMC4875283.
 87. Pineda CT, Ramanathan S, Fon Tacer K, Weon JL, Potts MB, Ou YH, et al. Degradation of AMPK by a cancer-specific ubiquitin ligase. *Cell*. 12 de febrero de 2015;160(4):715-28. doi:10.1016/j.cell.2015.01.034 PubMed PMID: 25679763; PubMed Central PMCID: PMC5629913.
 88. Yang SW, Huang X, Lin W, Min J, Miller DJ, Mayasundari A, et al. Structural basis for substrate recognition and chemical inhibition of oncogenic MAGE ubiquitin ligases. *Nat Commun*. 1 de octubre de 2020;11(1):4931. doi:10.1038/s41467-020-18708-x
 89. Jolly MK, Ware KE, Gilja S, Somarelli JA, Levine H. EMT and MET: necessary or permissive for metastasis? *Mol Oncol*. julio de 2017;11(7):755-69. doi:10.1002/1878-0261.12083 PubMed PMID: 28548345; PubMed Central PMCID: PMC5496498.
 90. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. junio de 2009;119(6):1420-8. doi:10.1172/JCI39104 PubMed PMID: 19487818; PubMed Central PMCID: PMC2689101.
 91. Huttlin EL, Bruckner RJ, Navarrete-Perea J, Cannon JR, Baltier K, Gebreab F, et al. Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome. *Cell*. 27 de mayo de 2021;184(11):3022-3040.e28. doi:10.1016/j.cell.2021.04.011 PubMed PMID: 33961781; PubMed Central PMCID: PMC8165030.
 92. Huttlin EL, Ting L, Bruckner RJ, Gebreab F, Gygi MP, Szpyt J, et al. The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome. *Cell*. 16 de julio de 2015;162(2):425-40. doi:10.1016/j.cell.2015.06.043 PubMed PMID: 26186194; PubMed Central PMCID: PMC4617211.
 93. Laiseca JE, Ladelfa MF, Cotignola J, Peche LY, Pascucci FA, Castaño BA, et al. Functional interaction between co-expressed MAGE-A proteins. *PloS One*. 2017;12(5):e0178370. doi:10.1371/journal.pone.0178370 PubMed PMID: 28542476; PubMed Central PMCID: PMC5443569.
 94. Research C for DE and. FDA grants accelerated approval to the combination of avutometinib and defactinib for KRAS-mutated recurrent low-grade serous ovarian cancer. FDA [Internet]. 5 de agosto de 2025 [citado 5 de marzo de 2026]. Disponible en: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-combination-avutometinib-and-defactinib-kras-mutated-recurrent-low>

95. Cheng, Zhaokang et al. "Focal Adhesion Kinase-mediated Phosphorylation of Beclin1 Protein Suppresses Cardiomyocyte Autophagy and Initiates Hypertrophic Growth." *The Journal of biological chemistry* vol. 292,6 (2017): 2065-2079. doi:10.1074/jbc.M116.758268
96. Sharifi MN, Mowers EE, Drake LE, Collier C, Chen H, Zamora M, Mui S, Macleod KF. Autophagy Promotes Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility of Metastatic Tumor Cells through the Direct Interaction of Paxillin with LC3. *Cell Rep.* 2016 May 24;15(8):1660-72. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.065. Epub 2016 May 12. PMID: 27184837; PMCID: PMC4880529.
97. Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Jun;10(6):417-27. doi: 10.1038/nrd3455. PMID: 21629292.
98. Hasin Y, Seldin M, Lusis A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol.* 2017 May 5;18(1):83. doi: 10.1186/s13059-017-1215-1. PMID: 28476144; PMCID: PMC5418815.
99. Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2005 Aug;5(8):615-25. doi: 10.1038/nrc1669. PMID: 16034368.