



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

## ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE lncRNA SOX2-OT Y SU PROBABLE PARTICIPACIÓN EN LA EXPRESIÓN DEL EJE GLI-1/SOX2 EN LA RESISTENCIA AL TRATAMIENTO ONCOLÓGICO EN CÁNCER PULMONAR

**T E S I S**  
**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**Licenciada en Biología**

**PRESENTA:**

Nallely Hernández-Cigala

**DIRECTOR DE TESIS:**

Dr. Federico Ávila Moreno

**SINODALES DE TESIS:**

Dra. Irlanda Peralta Arrieta

Dra. Yolanda Irasema Chirino López

Dr. Luis Arias Romero

Dr. Leonel Armas López



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

A mi *alma mater*, la Universidad Nacional Autónoma de México “UNAM”, por abrirme las puertas de tan extraordinaria institución y otorgarme el beneficio de obtener grandes conocimientos durante mi trayectoria académica a nivel bachillerato y a nivel licenciatura.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, mi segundo hogar, en dónde a través del estudio de la grandiosa carrera de Biología, tuve la oportunidad de adquirir innumerables y excelentes conocimientos a través de una gran plantilla docente, quienes me acompañaron a lo largo de mi trayectoria como estudiante y con quienes compartí inolvidables experiencias, tanto profesionales como personales.

A la Unidad de Investigación en Biomedicina “UBIMED”, por permitirme hacer uso de sus instalaciones e integrarme en un laboratorio de investigación con la finalidad de obtener mayores conocimientos, brindándome el apoyo necesario para la realización del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por el financiamiento otorgado para la realización de dicho trabajo a través del proyecto FOSISS 2016-1, así como por el otorgamiento de la beca como Asistente de Proyecto de Nivel Licenciatura dentro del mismo proyecto CONACYT con clave de registro SALUD-2016-C01-272655.

Al Laboratorio 12, de “Enfermedades Pulmonares y Epigenómica del Cáncer” de la UBIMED, en FES-Iztacala, UNAM, el cual se encuentra bajo la dirección del Dr. Federico Ávila Moreno, por permitirme hacer uso de sus instalaciones con la finalidad de realizar mi Tesis de Licenciatura.

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

A mi director de tesis, el Dr. Federico Ávila Moreno, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, siempre bajo la consigna del compromiso, el sentido de responsabilidad, la dedicación, la ética profesional, la verdad y el poder de la palabra, preparándome no solo para la obtención de un grado académico, sino también para el resto de mi vida.

A la Dra. Irlanda Peralta Arrieta, quien fungió en un primer momento como mi directora del proyecto de "LICyT II", del cual derivó el presente trabajo, en donde participó en la codirección y realización, brindándome un excelente apoyo en el rubro técnico y experimental, así como en la asesoría y escritura del mismo. De igual manera hago extenso mi reconocimiento por ser una excelente profesionalista y una gran persona a quien considero también como mi madre académica. Gracias por su amistad, compañía, comprensión, apoyo, enseñanzas y grandes momentos que compartimos juntas.

A la Dra. Yolanda Irasema Chirino López, una de las mejores docentes de la carrera de Biología, y de quien no solamente obtuve grandes conocimientos durante la carrera y en la realización del presente trabajo, sino también, un excelente ejemplo de una gran dedicación y pasión como profesionalista.

A la Dra. Abril Marcela Herrera Solorio, de quien recibí una excelente preparación académica por sus enseñanzas en el rubro técnico y experimental, y quién siempre me dio un cálido y grato recibimiento y trato, como su alumna durante su estancia Posdoctoral. Externo mi enorme reconocimiento por ser una excelente profesionalista, maestra, compañera y amiga, lo cual me hace considerarle mi primera madre académica. Infinitas gracias.

Al Dr. Luis Enrique Arias Romero y al Dr. Leonel Armas López, por sus enseñanzas y por el tiempo que dedicaron a la revisión y realización del presente trabajo.

## INDICE TEMÁTICO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
1.1 DEFINICIÓN Y ETIOLOGÍA DEL CÁNCER .....	8
1.2 CÁNCER DE PULMÓN .....	10
1.2.1 EPIDEMIOLOGIA.....	10
1.2.2 ETIOLOGÍA .....	10
1.2.3 CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA .....	11
1.2.4 ALTERACIONES MOLECULARES .....	14
1.3 RNAs NO CODIFICANTES .....	16
1.3.1 RNAs PEQUEÑOS NO-CODIFICANTES (miRNAs).....	17
1.3.2 RNAs LARGOS NO-CODIFICANTES (lncRNAs) .....	18
1.4 lncRNAs EN CÁNCER DE PULMÓN .....	23
1.5 lncRNA SOX2-OT .....	25
1.6 RESPUESTA A LA TERAPIA EN CÁNCER DE PULMÓN .....	26
1.4 lncRNAs EN CÁNCER DE PULMÓN .....	23
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>29</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>29</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1 OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>30</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
CULTIVO CELULAR.....	31
EXTRACCIÓN DE RNA Y RT-qPCR.....	31
SILENCIAMIENTO CON RNA DE INTERFERENCIA.....	33
WESTERN BLOT .....	33
ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR (MTS).....	35
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	<b>49</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	<b>54</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>54</b>
<b>10. IMÁGENES SUPLEMENTARIAS</b> .....	<b>55</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>58</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> EXPRESIÓN DEL lncRNA SOX2-OT EN CÉLULAS DE CÁNCER PULMONAR NSCLC.....	<b>38</b>
<b>FIGURA 2.</b> EXPRESIÓN DEL mRNA DE LOS GENES GLI-1 Y SOX2 EN CÉLULAS DE CÁNCER PULMONAR NSCLC.....	<b>39</b>
<b>FIGURA 3.</b> ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA DE GLI-1, SOX2, AKT TOTAL Y ERK TOTAL EN CÉLULAS DE CÁNCER PULMONAR NSCLC .....	<b>40</b>
<b>FIGURA 4.</b> SILENCIAMIENTO POR siRNAs EN CONTRA DEL lncRNA SOX2-OT EN CÉLULAS DE CÁNCER PULMONAR A549 .....	<b>42</b>
<b>FIGURA 5.</b> ENSAYOS DE SILENCIAMIENTO DE SOX2-OT EN CÉLULAS DE CÁNCER PULMONAR A549 CONTRIBUYEN EN REDUCIR LA EXPRESIÓN DEL mRNA DE GLI-1 Y SOX2 .....	<b>43</b>
<b>FIGURA 6.</b> EL SILENCIAMIENTO DEL lncRNA SOX2-OT EN CÉLULAS DE CÁNCER PULMONAR A549 REDUCE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN RELATIVA DE LA PROTEÍNA GLI-1 Y SOX2.....	<b>45</b>
<b>FIGURA 7.</b> EL SILENCIAMIENTO DEL lncRNA SOX2-OT CÉLULAS DE CÁNCER PULMONAR A549, REDUCE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN RELATIVA DE LA PROTEÍNA AKT Y SU NIVEL DE ACTIVACIÓN POR FOSFORILACIÓN .....	<b>45</b>
<b>FIGURA 8.</b> LA DISMINUCIÓN DE SOX2-OT EN CÉLULAS A549 CONTRIBUYEN EN REDUCIR LOS NIVELES DE PROTEÍNA DE ERK E INCREMENTA SUS NIVELES DE ACTIVACIÓN POR FOSFORILACIÓN. ....	<b>46</b>
<b>FIGURA 9.</b> AUMENTO DE LA SENSIBILIDAD A CISPLATINO EN CÉLULAS A549 POSTERIOR AL SILENCIAMIENTO DEL lncRNA SOX2-OT. ....	<b>47</b>
<b>FIGURA 10.</b> AUMENTO DE LA SENSIBILIDAD A TKI-ERLOTINIB EN CÉLULAS A549 DE CÁNCER PULMONAR .....	<b>48</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

<b>FIGURA 1 SUPLEMENTARIA.</b> ANÁLISIS DE ALINEAMIENTO DEL siRNA OT1 SOBRE LA SECUENCIA GENÉTICA DEL TRANSCRITO lncRNA SOX2-OT .....	<b>56</b>
<b>FIGURA 2 SUPLEMENTARIA.</b> ANÁLISIS DE ALINEAMIENTO DEL siRNA OT1 SOBRE LA SECUENCIA GENÉTICA DEL TRANSCRITO lncRNA SOX2-OT .....	<b>56</b>
<b>FIGURA 3 SUPLEMENTARIA.</b> LA DISMINUCIÓN DE SOX2-OT EN LA LÍNEA CELULAR A549 AUMENTA LA PROTEÍNA DE MEOX2 .....	<b>57</b>
<b>FIGURA 4 SUPLEMENTARIA.</b> ENSAYO DE SENSIBILIDAD A ERLOTINIB EN LA LÍNEA CELULAR A549 DE NSCLC POSTERIOR AL SILENCIAMIENTO DEL lncRNA SOX2-OT. ....	<b>57</b>
<b>FIGURA 5 SUPLEMENTARIA.</b> ENSAYO DE SENSIBILIDAD A ERLOTINIB EN LA LÍNEA CELULAR A549 DE NSCLC POSTERIOR AL SILENCIAMIENTO DEL lncRNA SOX2-OT. ....	<b>58</b>

## RESUMEN

**Introducción:** El cáncer de pulmón ocupa el primer lugar en mortalidad por cáncer a nivel mundial, con una tasa de supervivencia no mayor a cinco años, en promedio menor al 15%, debido a su diagnóstico en etapas clínicas tardías. Al respecto, se reconoce que los pacientes con este tipo de neoplasias, responden inicialmente de manera favorable a la terapia, a pesar de ello, posteriormente adquieren resistencia tanto a fármacos oncológicos como de terapia dirigida, entre ellos EGFR-TKIs, contribuyendo a la baja eficacia terapéutica y pobre supervivencia en pacientes. En relación con lo anterior, estudios recientes han demostrado que los RNAs largos no-codificantes (lncRNAs) de acuerdo a su funcionalidad, se han propuesto como posibles blancos terapéuticos y biomarcadores implicados tanto a nivel pronóstico y de progresión como de respuesta al tratamiento en pacientes oncológicos. El lncRNA SOX2-OT se ha descrito como un oncogén, al igual que sus variantes genéticas, han sido demostrados como sobre-expresados en neoplasias pulmonares, indicando su participación en el desarrollo y progresión de esta enfermedad. Por su parte, el eje transcripcional GLI-1/SOX2 ha sido reportado sobre-expresado en tumores pulmonares, asociado con la capacidad de resistencia al tratamiento en pacientes con cáncer de pulmón de células no-pequeñas (NSCLC). Por lo que, basado en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar el nivel de expresión de SOX2-OT y su relación con el nivel de expresión de los genes SOX2 y GLI-1, además de su probable participación en la respuesta a fármacos oncológicos como Cisplatino y de terapia dirigida basados en Inhibidores de Tirocina Kinasa (TKIs) del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) como Erlotinib en células de NSCLC.

Para evaluar la posible regulación del eje transcripcional GLI-1/SOX2 a través del lncRNA SOX2-OT y su participación en la respuesta al tratamiento en cáncer pulmonar NSCLC, se realizaron ensayos de silenciamiento transitorio mediante siRNAs dirigidos en contra de las variantes 1 y 6 de SOX2-OT en células de cáncer pulmonar A549. Posterior a ello, a través de ensayos de qRT-PCR se midió la variabilidad de expresión del RNA mensajero (mRNA) de GLI-1 y SOX2, así como también, los niveles relativos de las proteínas del factor de transcripción GLI-1 y SOX2, mediante ensayos de Western Blot. De igual manera, para evidenciar la implicación de SOX2-OT en la actividad de la vía de señalización de EGFR, se midió la expresión de proteínas de AKT y ERK, así como su activación por su estado de fosforilación. Finalmente, con el objetivo de valorar el papel de SOX2-OT en la respuesta a Cisplatino y TKI-Erlotinib, se realizaron ensayos de MTT.

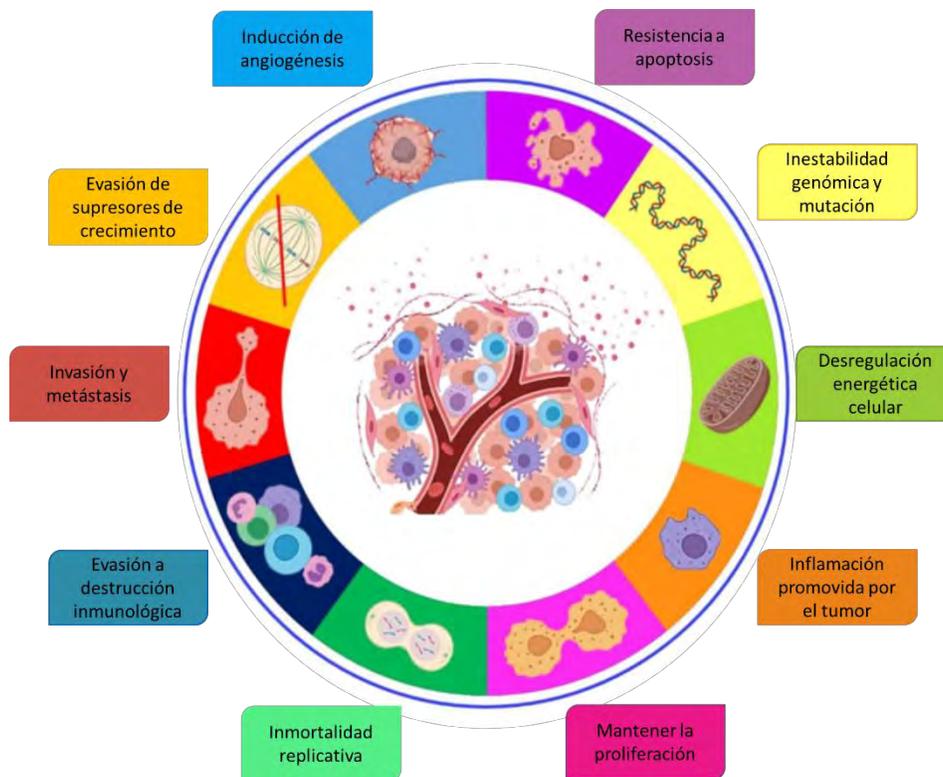
**Resultados:** Los niveles de expresión del mRNA de los genes GLI-1 y SOX2 disminuyeron como consecuencia del silenciamiento del lncRNA SOX2-OT. Además, se evidenció el papel funcional de SOX2-OT en la capacidad de regulación de la expresión y activación por fosforilación de los miembros de la vía de señalización de EGFR, evidenciando que el silenciamiento de SOX2-OT conlleva a la no activación de p-AKT, pero favorece la activación de p-ERK. Adicional a ello, es posible afirmar que el silenciamiento de SOX2-OT sensibiliza la respuesta al tratamiento oncológico basado en Cisplatino y el TKI-Erlotinib.

**Conclusión:** El lncRNA SOX2-OT participa en la mediación del eje GLI-1/SOX2, en la regulación de AKT y ERK, miembros de la vía de señalización de EGFR y en la respuesta a la terapia basada en Cisplatino y en el EGFR-TKIs Erlotinib, en NSCLC.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 DEFINICIÓN Y ETIOLOGÍA DEL CÁNCER

El cáncer se define como el conjunto de enfermedades caracterizadas por la división y proliferación celular autónoma, con capacidad de migrar e invadir tejidos teniendo como resultado un fenómeno denominado metástasis (National Cancer Institute (NCI)", 2019). De igual modo, en el genoma existen aberraciones moleculares presentes en cáncer, tales como, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la apoptosis, inmortalidad replicativa, mantenimiento de la proliferación, invasión y metástasis, por mencionar algunos (Hanahan y Weinberg, 2011).



**Figura 1. Aberraciones moleculares presentes en cáncer.** Tomada de Hanahan y Weinberg, 2011. *Cell*. 144(5).

El cáncer puede originarse debido a una serie de mutaciones, es decir, a cambios en la secuencia del DNA que pueden resultar de errores en la copia del DNA durante la división celular, de la exposición a radiaciones ionizantes o a sustancias químicas denominadas mutágenos (“National Human Genome Research Institute”, 2019).

Las mutaciones pueden tener lugar en diversos genes, tales como, los protooncogenes y los genes supresores de tumor. Los protooncogenes son responsables de llevar a cabo la división y crecimiento celular, además de efectuar regulaciones a nivel transcripcional, traduccional y de proteínas, de modo que, cuando presentan alteraciones en su expresión o mutaciones, influyen en la sobre-expresión de genes y en el origen de oncogenes, estos últimos contribuyen al desarrollo de cáncer debido a los cambios en las funciones celulares. Por su parte, los genes supresores de tumor, como su nombre lo indica, son aquellos que impiden que las células se modifiquen y resulten en células cancerígenas, inhibiendo la proliferación celular descontrolada. Cuando los genes supresores de tumor se encuentran mutados o presentan una delección, la probabilidad de tumorigénesis aumenta debido a la pérdida de su función original (Alberts *et al.*, 2004).

## **1.2 CÁNCER DE PULMÓN**

### **1.2.1 EPIDEMIOLOGÍA**

En 2015 el cáncer se consideró como la principal causa de muerte a nivel mundial, atribuyéndosele 8.8 millones de decesos. Los cinco tipos de cáncer que causan mayor número de fallecimientos son: cáncer de mama, cáncer pulmonar, cáncer colorrectal, cáncer gástrico y cáncer hepático (OMS, 2017). El cáncer pulmonar presenta una tasa de supervivencia no mayor al 15% a cinco años debido a su detección en etapas clínicas tardías (Siegel *et al.*, 2015).

En México, de acuerdo con datos del INEGI, se estima que la principal causa de muerte en hombres es a causa del cáncer de próstata, seguido del cáncer de pulmón, cáncer de estómago y cáncer de hígado. Mientras que para mujeres la principal causa de muerte es por cáncer de mama, seguido del cáncer cervicouterino, cáncer de hígado y cáncer de estómago. (INEGI-INCAN, 2019).

### **1.2.2 ETIOLOGÍA**

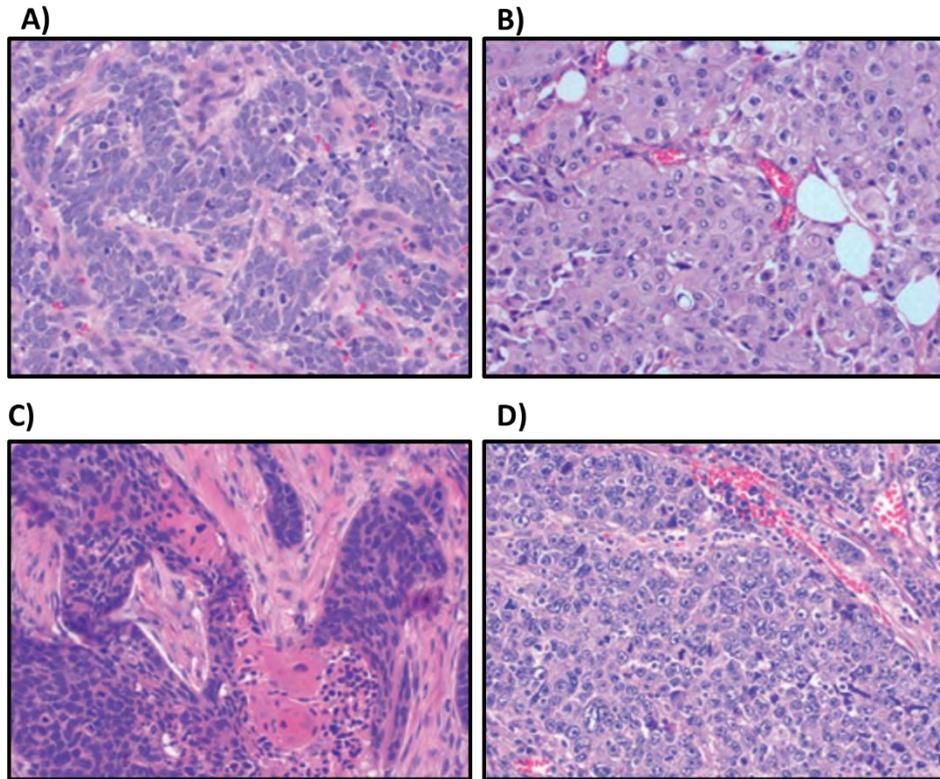
El cáncer de pulmón se asocia principalmente con el consumo de tabaco debido a su alto contenido de carcinógenos, principalmente, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y el 4- (metilnitrosamino)- 1-(3-piridil)-1-butanona (NNK). Dichos carcinógenos, promueven la formación de aductos en el DNA, la metilación de genes, alteraciones en la secuencia del DNA, amplificación o eliminación de segmentos de DNA y ganancias o pérdidas de cromosomas

completos (Barta *et al.*, 2019). Seguido de la exposición a radón, arsénico y humo de leña (De Groot *et al.*, 2018).

Las alteraciones epigenéticas participan también en la carcinogénesis del cáncer de pulmón, dichas modificaciones son heredables en el DNA, no implican cambios en la estructura primaria de la secuencia de nucleótidos, pero intervienen en la metilación del DNA, en la modificación de histonas y en la presencia de RNAs no codificantes (Allis *et al.*, 2015).

### **1.2.3 CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA**

El cáncer de pulmón, se divide en cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), el cual representa el 85% de los casos y se subdivide en: adenocarcinoma (AD), carcinoma de células escamosas (SCC) y carcinoma de células grandes (LCC); y en cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) el cual tiene una incidencia del 15% de los casos (Travis *et al.*, 2011).



**Figura 2. Histopatología de cáncer de pulmón.** A) Cáncer de pulmón de células pequeñas. B) Adenocarcinoma, C) Carcinoma de células escamosas. D) Carcinoma de células grandes. Tomada de Mollberg *et al.* 2011. *Adv Ther* 28,3.

En 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS) actualizó la clasificación histopatológica del cáncer de pulmón, con la finalidad de mejorar la precisión en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes, misma que se describe a continuación:

- **ADENOCARCINOMA**

Presenta estructura acinar, tubular o produce mucina. De acuerdo al grado de invasión, se divide en adenocarcinoma *in situ* (AIS), adenocarcinoma mínimamente invasivo (MIA) y adenocarcinoma invasivo.

El AIS posee un diámetro de  $\leq 3$  cm. El MIA tiene un diámetro de  $\leq 3$  cm y un tamaño de invasión de  $\leq 5$ mm.

El adenocarcinoma invasivo se clasifica de acuerdo a diferentes patrones, tales como, lepidico, papilar, acinar, micropapilar y sólido.

- **CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

Carcinoma con queratinización o presencia de puentes intercelulares. Se clasifican en carcinoma de células escamosas queratinizante, no queratinizante y basaloide.

- **TUMORES NEUROENDÓCRINOS**

Tumores invasivos que se clasifican en tres tipos: SCLC, carcinoma neuroendocrino de células grandes (LCNEC) y tumor carcinoide (típico y atípico). Los tumores neuroendocrinos de grado alto (HGNET), que incluyen SCLC y LCNEC, es el subtipo de mayor agresividad y es típico de pacientes con alto grado de tabaquismo.

El carcinoide típico es un tipo de tumor que presenta células semejantes entre sí, con citoplasma claro o granular eosinófilo, con núcleo vesiculoso y nucléolo visible. No presentan necrosis ni mitosis. Se considera que el 10% presentan metástasis en ganglios linfáticos regionales. El carcinoide atípico supone aproximadamente el 24% de los tumores neuroendocrinos. Suelen ser centrales o periféricos, este último se presenta en el 60% de los casos. Se encuentran bien delimitados macroscópicamente, presentan necrosis,

pleomorfismo marcado y actividad mitótica. Se encuentran separados por bandas fibrosas muy prominentes y empalizadas de manera periférica (Inamura, 2017).

#### **1.2.4 ALTERACIONES MOLECULARES**

Las principales alteraciones genéticas asociadas a cáncer de pulmón son mutaciones en el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), en el oncogén Kristen Rat Sarcoma (KRAS) y en la Cinasa de Linfoma Anaplásico (ALK). Recientemente, han sido incluidas las mutaciones en BRAF, HER2 y PIK3CA, así como las translocaciones en ROS1 y RET (Calvayrac *et al.*, 2017).

Las inserciones y deleciones en EGFR se presentan en el 15% de los AD de pulmón, teniendo mayor frecuencia en no fumadores. Además, participa en el pronóstico y respuesta a tratamiento, principalmente a TKIs (Dogan *et al.*, 2012). Por su parte, las mutaciones en KRAS se presentan en el 25% de los casos, siendo de mayor frecuencia en fumadores y conllevan a un mal pronóstico de la enfermedad, asimismo, se conoce que no responde de manera favorable a fármacos TKIs. Mientras que la mutación en ALK se presenta en el 5% de los pacientes con NSCLC, y se ha reportado que genera una sinergia con la proteína 4 asociada a Microtúbulo de Equinodermo (EML4), lo que conlleva a una mejor respuesta a tratamiento a partir de TKIs (Ou, 2013).

- **EGFR**

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; erbB-1; HER1), regula importantes procesos tumorigénicos, los cuales incluyen la proliferación, apoptosis, angiogénesis e invasión celular, y a menudo se encuentra sobre-expresado en el desarrollo y la progresión del NSCLC. EGFR es una glucoproteína transmembrana de 170 kDa, que presenta unión a ligandos extracelulares, activando vías de señalización involucradas en la resistencia a la apoptosis y proliferación celular, tales como PI3K/ AKT, RAS/ ERK y JAK/ STAT, entre otras (Huang y Fu, 2015). Las mutaciones ocurridas en EGFR están asociadas con la sensibilidad a los inhibidores de tirosina cinasa (TKI's) tales como Erlotinib y Gefitinib (Paez *et al.*, 2004). En NSCLC, las mutaciones en EGFR ocurren generalmente en los exones 18, 19, 20 y 21, mismos que conforman el dominio Tirosina Cinasa (Arrieta *et al.*, 2015).

La vía de señalización PI3K/AKT/mTOR, se presentan río abajo de EGFR y se activa en la carcinogénesis de cáncer pulmonar (West *et al.*, 2003). AKT se encuentra sobre-expresado y su inhibición puede reducir el proceso de carcinogénesis pulmonar, además de que un inhibidor de mTOR puede bloquear la progresión de células malignas, debido a que controla la tumorigénesis a través de macrófagos (Wislez *et al.*, 2005).

- **KRAS**

En NSCLC el oncogén Kristen Rat Sarcoma (KRAS) se encuentra mutado frecuentemente, dichas alteraciones se asocian con la resistencia a TKI's y

quimioterapia. Estas ocurren en el 30% de los adenocarcinomas y en el 5% de los carcinomas de células escamosas. Las mutaciones en KRAS ocurren en los codones 12 y 13, y se encuentran asociadas con el consumo de tabaco (Pao *et al.*, 2005).

HER-2 se encuentra sobre-expresado en el 20% de los pacientes con NSCLC, pero la mutación se presenta solo en el 2% de los casos. Esta mutación prevalece en mujeres y pacientes no fumadores con presencia de AD. Las mutaciones presentes en HER-2 se presentan como inserciones en el exón 20 (Pao *et al.*, 2011).

- **ALK**

La Cinasa del Linfoma Anaplásico (ALK), es una proteína transmembranal que actúa en función al Receptor de Tirosina Cinasa de la insulina, y se encuentra asociado a la mayoría de linfomas anaplásicos y de tipo no Hodking. En NSCLC, ALK lleva a cabo la translocación del brazo corto del cromosoma 2, en donde se unen los exones 1 a 13 de EML4 y los exones 20 a 29 de ALK (Rosell *et al.*, 2009).

Recientemente, ha destacado la participación de diferentes RNAs no-codificantes en cáncer, tal como en cáncer de pulmón, debido a que participan en la expresión genética, impresión del genoma, la epigenética, la regulación, proliferación, muerte, diferenciación, migración e invasión celular (Wang *et al.*, 2014).

### **1.3 RNAs NO-CODIFICANTES**

Los RNAs no codificantes representan el 90% del genoma, y se dividen en dos categorías de acuerdo a su tamaño: en RNAs pequeños (miRNAs) que integran una extensión  $\leq 200$  nucleótidos, mientras que los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) poseen una de extensión  $\geq 200$  nucleótidos (Kapranov *et al.*, 2007).

#### **1.3.1 RNAs PEQUEÑOS NO-CODIFICANTES (miRNAs)**

Los RNAs pequeños no-codificantes (miRNAs) posee entre 19 y 24 nucleótidos de longitud. La mayoría de ellos, son transcritos de secuencias de DNA en miRNAs primarios (pri-miRNAs) y procesados en miRNAs precursores (pre-miRNAs) y en miRNAs maduros (Ha y Kim, 2014).

Los miRNAs tienen un importante papel en la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional, ya que, pueden actuar degradando RNAs diana o a partir de la represión de la traducción de los mRNA (Mattick y Gagen, 2001).

Participan en diversos procesos celulares como la proliferación, diferenciación, migración, apoptosis, metabolismo y respuesta a estrés (Di Leva *et al.*, 2014), además de estar conservados evolutivamente y su localización se restringe a secuencias de intrones, exones y regiones no codificantes intergénicas, teniendo como función principal la regulación a la baja de la expresión génica (Gu *et al.*, 2009).

Los miRNAs también se han asociado con la regulación de vías de señalización, oncogenes y supresores de tumores importantes para la progresión en cáncer, en la angiogénesis, en la transición epitelio mesénquima (EMT), en metástasis y en la resistencia al tratamiento en cáncer (Raza *et al.*, 2014).

- **RNAs pequeños no-codificantes (miRNAs) en cáncer de pulmón**

miR-21 ha sido reportado como un regulador postranscripcional del supresor de tumor de la fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), debido a que a partir de la represión de PTEN promueve el crecimiento e invasión en NSCLC (Zhang *et al.*, 2010). Además, la sobre-expresión de miR-21 y la baja expresión de PTEN sugieren una deficiente respuesta a fármacos TKIs (Shen *et al.*, 2014).

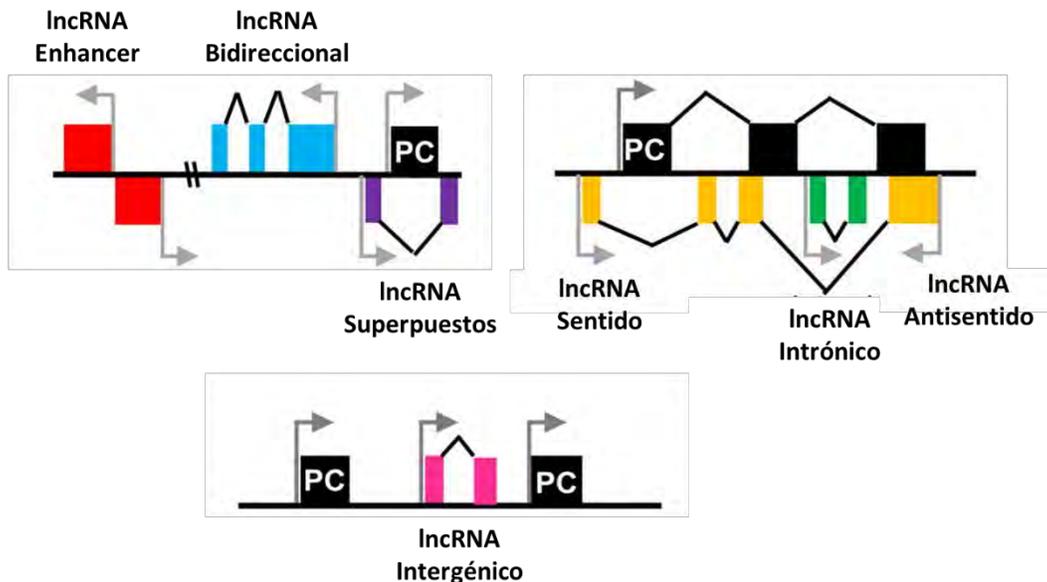
Por su parte, grupo de miR-17-92, es un transcrito policistrónico compuesto de los miRNAs 17, 18a, 19a, 20a, 19b-1 y 92a-1, localizado en el cromosoma 13q31 y se encuentra sobre-expresado en cáncer de pulmón (Zhang *et al.*, 2009).

### **1.3.2 RNAs LARGOS NO-CODIFICANTES (lncRNAs)**

Tras la realización del proyecto ENCODE, se confirmó que el 80% del genoma humano se transcribe y que la mayoría de estas transcripciones no codifican a proteína, manifestando así, la importancia biológica de los lncRNAs (Legoff *et al.*, 2019). Los lncRNAs generalmente se clasifican de la siguiente manera:

<b>Tabla 1. Clasificación de los lncRNAs</b>	
<b>lncRNA</b>	<b>Descripción</b>
<b>Superpuestos</b>	El gen que codifica para proteína se encuentra en el intrón de un lncRNA.
<b>Bidireccionales</b>	El lncRNA y el gen cercano que codifica se transcriben en cadenas opuestas.
<b>Intrónicos</b>	La secuencia completa del lncRNA está dentro del intrón del gen.
<b>Intergénicos</b>	La secuencia del lncRNA se encuentra entre dos genes como una unidad diferente.
<b>Sentido o antisentido</b>	El lncRNA se encuentra localizado entre uno o más exones de otra transcripción en la misma cadena o en sentido opuesto.
<b>Enhancer</b>	Se transcriben en una o dos direcciones, unidireccional (1D-eRNA) o en dos direcciones (2D-eRNA) en enhancers transcripcionales cerca de los genes.

Tomado de Spurlock *et al* 2016. *J Immunol.* 197, 12.



**Figura 3. Clasificación de los lncRNAs.** Las flechas grises indican la dirección de la transcripción del gen. PC= gen codificador de proteínas. Tomado de Tomado de Spurlock *et al* 2016. *J Immunol.* 197,12.

- **ARQUETIPOS DE LOS lncRNAs**

Hasta el momento, han sido descritos cinco arquetipos relacionados con diferentes mecanismos moleculares entorno del funcionamiento de los lncRNAs en células eucariotas, como a continuación se indican:

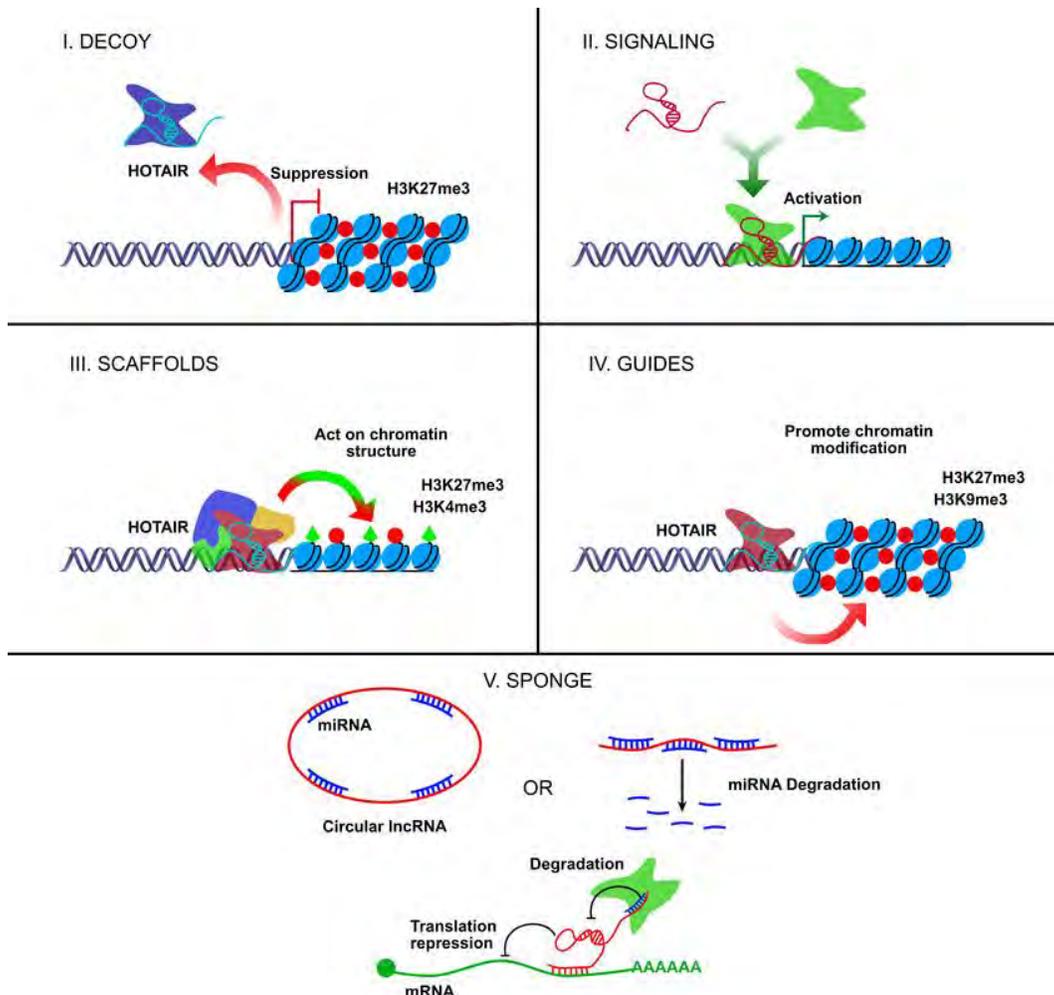
1.- Los lncRNAs señuelo (Decoy): Son aquellos que pueden unirse a factores de transcripción, modificadores de la cromatina o reguladores externos de la estructura de la cromatina, algunos de los cuales se ha determinado logran posicionarse en subdominios del núcleo, modulando de manera activa que estos realicen su función efectora, actuando de manera negativa como reguladores de la transcripción (Goff y Rinn, 2015).

2.- Los lncRNAs de señalización (Signaling): Generan señales que a nivel molecular les permiten conducirse en combinación con factores de transcripción, así como algunos miembros de vías de señalización, modulando la capacidad de promover patrones de expresión génica, es por ello, que bajo este contexto, se ha propuesto como potenciales marcadores biológicos controlando la fisiología celular (Wang y Chang, 2011).

3.- Los lncRNAs tipo andamio (Scaffolds): Desarrollan acciones que les permite actuar como plataformas moleculares, promoviendo el ensamble de diversas proteínas conformando entre otros, complejos ribonucleoproteicos (RNPs) a nivel nuclear, los cuales funcionan estructuralmente estabilizando a otros complejos y controlando actividades transcripcionales, tanto de activación, como represión o bien modificación post-traducciona sobre algunas marcas de histonas (Martin y Chang, 2012).

4.- Los lncRNA guías (Guides): Descritos como reclutadores de proteínas como enzimas remodeladoras que en su conjunto modifican la estructura de la cromatina, con la finalidad de conducir a nivel epigenético, el momento transcripcional hacia segmentos genéticos específicos cerca del sitio inicio de transcripción del mismo lncRNA y/o regiones genéticas adyacentes (*Cis*) o bien sobre regiones genéticas distantes (*Trans*) como son segmentos genéticos - blanco de la cromatina (Wang y Chang, 2011).

5.- Los lncRNAs tipo CERNAs (Competidores Endógenos de RNA) con actividad esponja: Son aquellos que por complementariedad de bases interfieren en la promoción o capacidad represora que ejerce la expresión de las secuencias pequeñas no codificantes del RNA, como son los microRNAs controlándose así, la biodisponibilidad funcional de los miRNAs frente al papel de los lncRNAs, propiciándose desbalance en las funciones post-transcripcionales que ejercer los miRNAs a nivel celular (Yang *et al.*, 2014).



**Figura 4. Arquetipos funcionales de los lncRNAs.** Tomado de Tomado de Herrera *et al* 2017. *Clinical Epigenetics*. 9,1.

## 1.4 lncRNAs EN CÁNCER DE PULMÓN

Durante los últimos 10 años, se han propuesto a los lncRNA como un blanco de estudio en cáncer pulmonar del grupo NSCLC, debido a que podrían ser un nuevo tipo de biomarcadores además de proporcionar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de cáncer de pulmón (Tong *et al.*, 2018).

Entre los lncRNAs que han sido blanco de estudio en cáncer pulmonar se encuentran:

- **TRANSCRIPCIÓN DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN ASOCIADO A METÁSTASIS 1 (MALAT1)**

El lncRNA MALAT1 se evaluó en pacientes con NSCLC, identificándose como posible biomarcador de diagnóstico, debido a su alta especificidad, estabilidad y baja invasividad (Weber *et al.*, 2013). Así mismo, se ha reportado que la sobre-expresión de MALAT1 se encuentra asociada a metástasis y mal pronóstico en tumores de NSCLC (Zhu *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha demostrado que los niveles de metilación de MALA1 son bajos en células y tejidos sólidos de cáncer de pulmón, cuyo fenómeno contribuye a la sobre-expresión de MALAT1, puede ser revertido a partir del tratamiento con S-adenosil metionina (SAM), como agente proveedor de grupos metilos y por tanto considerado un agente metilante (Guo *et al.*, 2015).

- **TRANSCRIPCIÓN DE RNA ANTISENTIDO HOX (HOTAIR)**

La sobre-expresión del lncRNA HOTAIR en cáncer de pulmón se asocia a mal pronóstico en pacientes, invasión y metástasis en células de cáncer de pulmón de tipo AD (Tsai *et al.*, 2010) así como en la resistencia al tratamiento basado en el fármaco Cisplatino en células del tipo AD (Liu *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que el silenciamiento de HOTAIR contribuye a la disminución de la expresión de miR-326, el cual se encarga de la regulación del gen Homeobox 2A (Phox2a), inhibiendo la proliferación y migración celular en tumores de cáncer de pulmón (Wang *et al.*, 2016)

- **ARRESTO DE CRECIMIENTO ESPECÍFICO 5 (GAS5)**

La expresión del lncRNA GAS5 en tumores de pulmón de tipo AD y células con mutación en EGFR de cáncer de pulmón se asocia con la capacidad de resistencia a tratamiento basada en el TKI-Gefitinib. De igual manera, la sobre-expresión de GAS5 en presencia de tratamiento con Gefitinib, reduce el crecimiento tumoral y participa en cascadas de señalización a partir de la activación por fosforilación de EGFR, AKT y ERK (Dong *et al.*, 2015).

- **CARCINOMA UROTELIAL ASOCIADO 1 (UCA1)**

La sobre-expresión del lncRNA UCA1 se presenta en células y en tumores de pacientes con cáncer de pulmón con resistencia adquirida posterior al tratamiento basado en TKI-Gefitinib, asociado a pobre supervivencia libre de progresión en pacientes. Por su parte, la disminución del nivel de expresión de UCA1 promueve sensibilidad al TKI-Gefitinib en células de cáncer de pulmón, aumento de

apoptosis y menor tamaño del tumor. De igual manera, la baja expresión de UCA1 genera aumento en la expresión de la proteína del marcador epitelial E-Cadherina y disminución de la expresión de marcadores genéticos mesenquimatosos N-Cadherina, Snail y Vimentina (Cheng *et al.*, 2015).

- **TRANSCRIPCIÓN SUPERPUESTA SOX2 (SOX2-OT)**

El lncRNA SOX2-OT se encuentra sobre-expresado en tumores de pacientes con cáncer de pulmón, por lo que se ha relacionado con una pobre tasa de supervivencia y aumento en la proliferación celular en cáncer de pulmón (Hou *et al.*, 2014).

### **1.5 lncRNA SOX2-OT**

SOX2-OT se localiza en el brazo corto del cromosoma 3 en la región 26.33, posee una secuencia de DNA altamente conservada evolutivamente con 88% de identidad de nucleótidos entre el cDNA de humano y ratón (Shahryari, A., *et al.*, 2014). Hasta el momento, han sido identificadas seis variantes de transcripción (National Center for Biotechnology Information “NCBI”, 2020).

La sobre-expresión de la variante 1 de SOX2-OT se encontró asociada con la tasa de supervivencia global en pacientes del grupo de NSCLC, del tipo AD y ha sido indicado como un posible regulador transcripcional del gen SOX2 (Hou *et al.*, 2014).

Por otro lado, mediante ensayos *in vitro* en células A549 del grupo NSCLC, a partir del silenciamiento del lncRNA SOX2-OT, se demostró la correlación

positiva entre la expresión del lncRNA SOX2-OT y el mRNA SOX2. Así mismo, la atenuada expresión de SOX2-OT ha sido relacionada con menor formación de colonias, es decir, menor capacidad de proliferación celular *in vitro* (Saghaeian *et al.*, 2016).

Análisis adicionales realizados en células A549, bajo tratamiento con Cisplatino y el TKI-Erlotinib, a 12h, 48h y 120 h, han sugerido la inducción de la expresión de la variante 6 de SOX2-OT dependiente del tiempo a 48h en presencia de Cisplatino y TKI-Erlotinib (Herrera *et al.*, 2020, en proceso).

Con base en lo anterior, recientemente, se ha manifestado la posibilidad de posicionar a SOX2-OT como un posible biomarcador en la detección de SCC y LCC en plasma sanguíneo (Yun *et al.*, 2019).

## **1.6 RESPUESTA A LA TERAPIA EN CÁNCER DE PULMÓN**

Los tratamientos oncológicos comúnmente empleados, se encargan de inducir daño en el DNA, o bien bloquear algunas vías de señalización celular de manera específica (PI3K y MAPK). Pese a ello, dichos protocolos de terapia, no han logrado ser específicos para cierto tipo de tejido con cáncer o de manera genética (Molina *et al.*, 2008).

El desarrollo de terapias dirigidas a EGFR y ALK en cáncer de pulmón incluyen los inhibidores de la angiogénesis, frente a los cuales las células tumorales desarrollan resistencia y presentan con frecuencia efectos secundarios, representando un desafío clínico, no solo en la determinación del tipo de terapia

para cada paciente, sino también para la optimización del tratamiento fármaco-oncológico (Hassan *et al.*, 2015).

Por su parte, los TKI's, dirigidos también a EGFR, compiten por el sitio de unión de ATP dentro del dominio tirosina cinasa. Estos tratamientos han sido empleados en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), incluyendo algunos que presentan algún tipo de mutación en el gen EGFR, tales como, la delección del exón 19, la mutación en la posición L858R, y T790M. Dentro de las principales problemáticas que se presentan en los esquemas de tratamiento, destaca el desarrollo de resistencia al fármaco en un periodo no mayor a 15 meses (Chi *et al.*, 2013), debido a la reducción de la eficacia en la respuesta al tratamiento, afectando la sobre-vida libre de progresión y la sobre-vida global en pacientes tratados, ya que induce a la activación de las vías de señalización de PI3K y MAPK, las cuales se encuentran reguladas a partir de EGFR (Sequist *et al.*, 2006).

Uno de los hallazgos principalmente relacionados con la respuesta a tratamiento con TKIs, ha demostrado que la expresión genética del gen SOX2, se encuentra regulada por el factor de transcripción GLI-1. GLI-1 interviene en la regulación de la vía de señalización de Sonic Hedgehog y modula la expresión de EGFR. Además, se dio a conocer que el tratamiento con inhibidores de EGFR promueve el potencial de evitar la inducción de SOX2 por el ligando de EGFR, en modelos *in vitro* de NSCLC (Bora-Singhal *et al.*, 2015).

Por su parte, la sobre-expresión del lncRNA GLI1-AS, en ausencia de la expresión del lncRNA GAS5, podrían participar de manera importante frente a la resistencia a TKIs en cáncer de pulmón (Villegas *et al.*, 2014).

Los tratamientos basados en derivados del platino también han sido utilizados en cáncer pulmonar, sin embargo, su eficacia se ha visto limitada debido al desarrollo de hematotoxicidades y toxicidades neurológicas. El Cisplatino (CDDP; cis-diaminodicloroplatino II) es uno de los fármacos antitumorales de mayor utilidad en diversos tumores sólidos. Su mecanismo de acción citotóxico consiste en la formación de aductos en el DNA, favoreciendo la activación de algunas vías de señalización (ATR, TP53, P73 y MAPK) teniendo como resultado la inducción de apoptosis (Siddik, 2003). Pese a ello, la capacidad de resistencia a tratamiento basado en Cisplatino, conlleva a la identificación de mecanismos y blancos de estudio para aminorar dicha respuesta a tratamiento en cáncer (Yang *et al.*, 2013).

Un estudio realizado sobre el lncRNA ROR, dio a conocer que la inhibición de su expresión en células del grupo NSCLC resistentes a Cisplatino (A549/DDP), se relaciona con la disminución en los niveles de proteínas implicadas en la vía PI3K /AKT/ mTOR y Bcl-2 (Shi *et al.*, 2017), no obstante, se desconoce el mecanismo de acción por el cual el lncRNA ROR interviene en dicho fenómeno en cáncer de pulmón.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Estudios previos han dado a conocer que el gen SOX2 es un regulador transcripcional de la expresión de GLI-1, implicado en el desarrollo embrionario, además de estar asociado con la capacidad de resistencia a tratamiento, basado tanto en Cisplatino como en EGFR-TKIs en cáncer de pulmón, pese a ello, se desconoce si el lncRNA SOX2-OT, el cual es un potencial regulador transcripcional de SOX2, desarrolla algún mecanismo adicional sobre la expresión de GLI-1, y la activación de miembros de la vía de EGFR como AKT-ERK frente a la respuesta a tratamiento oncológico. Por lo que su estudio en modelos celulares de cáncer de pulmón, permitirán confirmar su implicación en los mecanismos de respuesta a la terapia oncológica basada en Cisplatino y EGFR-TKIs, así como también, en la regulación del eje GLI-1/SOX2 en cáncer de pulmón.

## **3. HIPÓTESIS**

La inhibición de la expresión del lncRNA SOX2-OT en células de cáncer de pulmón A549 regula a nivel transcripcional y/o postraducciona la expresión del eje GLI-1/SOX2, así como miembros de las vías de señalización PI3K-AKT-mTOR y MAPK-ERK, sensibilizando la respuesta a tratamiento oncológico en cáncer de pulmón.

## **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el papel del lncRNA SOX2-OT en la regulación de la expresión del eje GLI-1/SOX2, y su participación en la respuesta al tratamiento oncológico en cáncer pulmonar.

### **4.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

1.-Evaluar el nivel de expresión del lncRNA SOX2-OT, así como mRNA de los genes SOX2 y GLI-1 en diferentes modelos celulares de cáncer de pulmón del grupo NSCLC.

2.-Determinar los niveles de expresión de las proteínas GLI-1, SOX2, AKT y ERK en las líneas celulares A549, NH2347, H1975 y HCC827 del grupo NSCLC.

3.- Analizar el efecto del silenciamiento (siRNAs) de SOX2-OT sobre los niveles de expresión del eje GLI-1/SOX2, así como en miembros de la vía de EGFR, AKT y ERK, y su nivel de activación por fosforilación en células A549 del grupo NSCLC.

4.- Evaluar la sensibilidad al tratamiento oncológico basado en Cisplatino y TKI-Erlotinib en presencia de silenciamiento (siRNAs) del lncRNA SOX2-OT, en células A549 del grupo NSCLC.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

- **Cultivo celular**

Modelos celulares A549, NCI-H2347 (EGFR wild-type; mutación G12C en KRAS), NCI-H1975 (mutación L858R y T790M de EGFR) y HCC827 (delección E746-A750 en el exón 19 de EGFR) de adenocarcinoma de cáncer de pulmón humano fueron obtenidos del American Type Culture Collection) ATCC. Los cultivos celulares se mantuvieron medio RPMI 1640 (Biowest), suplementado con suero fetal bovino (Biowest) al 10% y penicilina estreptomycinina al 1% (Gibco), empleando incubadora de cultivos celulares a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, en una confluencia del 80%.

- **Extracción de RNA y RT-qPCR**

La extracción del RNA total se realizó mediante el método de TRIzol (Invitrogen). La síntesis de cDNA se realizó mediante kit (Thermo Scientific) a partir de 1 µg de RNA total. Para la reacción de qPCR se utilizaron 20ng de cDNA. La detección de la expresión de los mRNAs y lncRNA se realizó mediante Syber Green (RealQ Plus Master Mix) en un volumen final de reacción de 15 µl. La qPCR se realizó en el equipo LightCycler 480 Real-TIME PCR (Roche, Alemania).

<b>Condiciones de qRT-PCR Syber Green</b>			
<b>Etapas</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (h:m:s)</b>
<b>Pre-incubación</b>	<b>1</b>	<b>40</b>	<b>00:10:00</b>
<b>Amplificación</b>	<b>45</b>	<b>95</b>	<b>00:00:30</b>
		<b>60</b>	<b>00:00:30</b>
		<b>72</b>	<b>00:00:30</b>
<b>Curva Melt</b>	<b>1</b>	<b>95</b>	<b>00:00:05</b>
		<b>65</b>	<b>00:01:00</b>
		<b>97</b>	<b>Continuo</b>
<b>Enfriamiento</b>	<b>1</b>	<b>40</b>	<b>00:10:00</b>

Los niveles de expresión del mRNA se normalizaron mediante la detección del gen endógeno GAPDH, mientras que el lncRNA se normalizó con el gen endógeno U1. Se empleó el RNA total de cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón del grupo NSCLC (A549, NH2347, H1975, HCC827) como grupo control nombrado "MIX-CTRL". El análisis de expresión se realizó utilizando el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta T}$ .

Las secuencias utilizadas para llevar a cabo la detección de la expresión de los mRNAs y lncRNAs, fueron diseñadas empleando un porcentaje aproximado de GC del 40% y temperatura de alineamiento entre 55 y 60 °C, las cuales se indican a continuación:

<b>mRNA</b>	<b>Secuencia Oligonucleótido</b>
GLI-1	5'-TCTGCTCCTCCTGTTTCGAC-3' 3'-CCTAAACCAGCGTAACCCG-5'
SOX2	5'-AACCCCAAGATGCACAACACTC-3' 3'-CTAATATTTATGGCCGGGGC-5'
GAPDH	5'-CCAGGAATTTGACTCCCAAG-3' 3'-GACTCCGGGAAGTTTCGG-5'

<b>lncRNA</b>	<b>Secuencia Oligonucleótido</b>
*SOX2-OT (Variante 1)	5'-GCTCGTGGCTTAGGAGATTG-3' 3'-CTGGCAAAGCATGAGGAACT-5'
SOX2-OT (Variante 6)	5'-CCTCTTCTCAGGTGTAGATCACCTAT-3' 3'-AACAGAGCTGTCTTGTAAGTGAGG-5'
U1	5'-CCCTGCTCCAGTCGCTATC-3' 3'-CCACGTCCGTCTGATTCC-5'

\*Tomado de Hou *et al.*, 2014. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology* 53:380-388

- **Silenciamiento con RNA de interferencia**

Fueron desarrollados ensayos de silenciamiento del lncRNA SOX2-OT, para ello se sintetizaron 2 siRNAs tomando en consideración el trabajo de investigación de Hou y colaboradores (2014), así como, el uso de su combinación nombrado “siMIX”. Para ello, fueron sembradas 290, 000 células en cajas multi-pozos de 6, incubadas toda la noche permitiendo su adherencia. Posterior a ello, se transfectaron con 50 nM por cada siRNA y 25nM de cada siRNA para la preparación de la mezcla del “siMIX”, para ello se empleó el método de lipofectamina (Invitrogen). Seguido de esto, 48 horas post-transfección las células se cosecharon para ensayos posteriores de qRT-PCR y Western Blot. Las secuencias de cada siRNA para SOX2-OT se indican a continuación: siOT1, 5'-CAAUCAACUCUGAGAUCCAtt-3' y siOT2, 5'-CAAAAUAGGUCAUAGCAAAtt-3' (Hou, Z., *et al.*, 2014). De igual manera, fue empleado un control de secuencia (SCR) de marca comercial Santa Cruz (#cat: sc-37007). El análisis de alineamiento de siRNAs sobre el transcrito de SOX2-OT mostro que el

interferente siOT1 está dirigido en contra de la variante 1; mientras que el interferente siTO2 se encuentra dirigido en contra de ambas variantes 1 y 6 (Figura suplementaria 1 y 2).

- **Western Blot**

Las proteínas totales, se extrajeron con buffer RIPA suplementado con inhibidor de proteasas a partir de  $1 \times 10^6$  células y se cuantificaron mediante el método de Lowry utilizando el Kit de Bio-Rad a una longitud de onda de 750 nm en el equipo EPOCH. Se utilizaron 30  $\mu$ g de proteína total y se migraron en geles de poliacrilamida al 12% durante 2 h. La transferencia se realizó en una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (BioRad) en un tiempo de 2 h, posteriormente la membrana fue teñida con Rojo de Ponsseau, y lavada con agua bidestilada a tres tiempos de 10 min cada uno. Seguido de esto el bloqueo se realizó con leche (BioRad) al 5% durante 2 h. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó toda la noche a una temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$  con movimiento constante en las siguientes diluciones: GLI-1:1:500 (abcam), SOX2:1:2000 (GeneTex), AKT-T:1:500 (Cell Signalling), ERK-T:1:500 (Cell Signalling) y MEOX2 1:500 (Santa Cruz) y GAPDH 1:3000 (Santa Cruz). Al siguiente día se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TBS al 1x, con Tween al 0.01%. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario por 2 h a una dilución 1:10,000 (anti-Rabbit o anti-Mouse). Al término de este tiempo se realizaron 3 lavados de 10 min

cada uno con TBS al 1x, con Tween al 0.01%. Finalmente, las proteínas de interés se revelaron con el kit de detección quimio-luminiscente ECL (BioRad) en una mezcla v/v de 750  $\mu$ l, en un tiempo de detección de 15 min, en placas radiográficas.

Para la detección de las proteínas fosforiladas p-AKT y p-ERK se utilizaron 50  $\mu$ g de proteína total y migraron en geles de poliacrilamida al 12% durante 2 h. La transferencia se realizó en una membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (BioRad) durante 2 h, posteriormente la membrana fue teñida con Rojo de Ponsseau, y lavada con agua bidestilada a tres tiempos de 10 min cada uno. Seguido de esto el bloqueo se realizó con leche (BioRad) al 5% durante 2 h. La incubación de los anticuerpos primarios se realizó durante toda la noche a -4°C con movimiento constante en las siguientes diluciones: p-AKT 1:500 (Cell Signalling), p-ERK 1:500 (Cell Signalling) y GAPDH 1:3000 (Santa Cruz). Al siguiente día se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TBS al 1x, con Tween al 0.01%. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario por 2 h empleando una dilución 1:10,000 (anti-Rabbit o anti-Mouse). Concluido este tiempo de incubación del anticuerpo secundario, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno empleando TBS al 1x, con Tween al 0.01%. Finalmente, las marcas se revelaron con el kit de detección quimio-luminiscente ECL (BioRad) en una mezcla v/v de 750  $\mu$ l en un tiempo de detección de 15 min, en placas radiográficas.

- **Ensayos de viabilidad celular (MTS)**

Los cultivos celulares fueron sembrados en placas de 96 pozos a una densidad de 3, 000 células A549. Los cultivos celulares se incubaron toda la noche favoreciendo la adherencia celular. Se preparó un stock a 10 mM del fármaco inhibidor de tirosina cinasa-TKI Erlotinib (Sigma Aldrich) con DMSO y se prepararon las siguientes diluciones: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000, 20, 40, 80 y 200  $\mu$ M, manteniendo un porcentaje de DMSO no mayor al 1%. Para el caso de cisplatino (Sigma Aldrich) se preparó un stock a 5 mM a partir de 5 mg en su forma de sal, la cual se disolvió en NaCl al 0.9%, se prepararon las siguientes diluciones: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000, 30, 50 y 80  $\mu$ M. La incubación con el fármaco se realizó por 72h para Erlotinib, mientras que para Cisplatino fueron 48 h. Pasado el tiempo, se agregaron 20  $\mu$ L del reactivo de MTS CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), incubando por 2 h. La reacción se inactivo con SDS 10% y empleó una longitud de onda de 490nm y 690 nm para el background. La viabilidad fue calculada como el porcentaje del control (células con 0.2% de DMSO para el caso de Erlotinib o bien células no tratadas para cisplatino) después de restar la absorbancia de fondo. La determinación de la IC: 50, IC: 25 e IC: 10 se calculó mediante el programa GraphPad Prism 6. Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes por cuadruplicado.

- **Análisis estadístico**

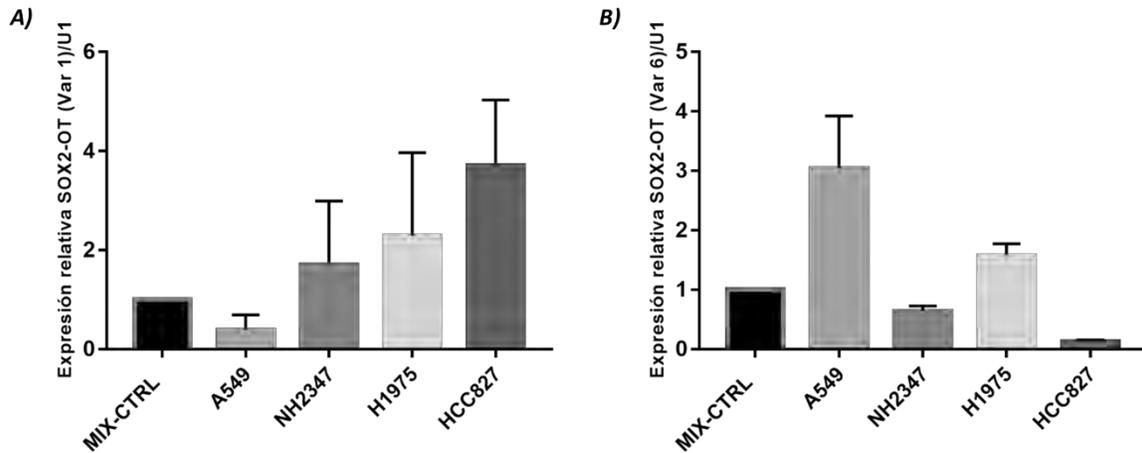
Se realizó la prueba estadística de T de student, para llevar a cabo un análisis comparativo entre líneas celulares de cáncer de pulmón A549, NH2347, H1975 y HCC827, ellos mediante el uso de los programas GraphPad Prism 6 y Sigma Plot 10.0. Los valores de  $p$  menores a 0.05 (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*  $p \leq 0.0001$ ) fueron considerados significativos estadísticamente, entre los grupos experimentales.

## **6. RESULTADOS**

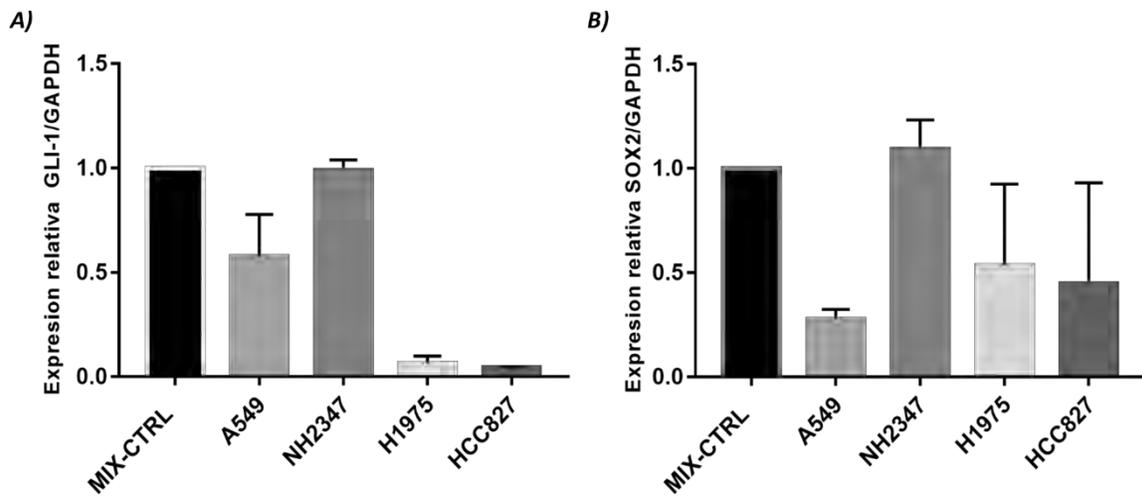
### **Expresión de SOX2-OT, SOX2 y GLI-1 en líneas celulares de cáncer de pulmón NSCLC**

Debido a que previamente ha sido reportada la expresión de SOX2-OT en cáncer de pulmón, en el presente trabajo se evaluó la expresión del transcrito canónico (variante 1), así como la variante 6 de este lncRNA en cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC): A549, NH2347, H1975 y HCC827 (Figura 1). Igualmente se midió el nivel de expresión del mRNA de SOX2 y GLI-1 (Figura 2).

En la Figura 1A y 1B se puede observar que las cuatro líneas celulares analizadas muestran una expresión variable de SOX2-OT. Así mismo, la variación de SOX2 y GLI-1 en las líneas celulares estudiadas se muestra en la Figura 2A y 2B.



**Figura 1. Expresión del lncRNA SOX2-OT en células de cáncer pulmonar NSCLC.** A) Expresión de SOX2-OT variante 1, B) Expresión de SOX2-OT variante 6. Los niveles de expresión de SOX2-OT fueron analizados mediante RT-qPCR (Syber Green) y normalizados con respecto al gen endógeno U1. Los niveles de expresión fueron comparados con respecto al grupo control MIX-CTRL. Los resultados se muestran como los valores de la media  $\pm$  D.E., de 3 réplicas biológicas.



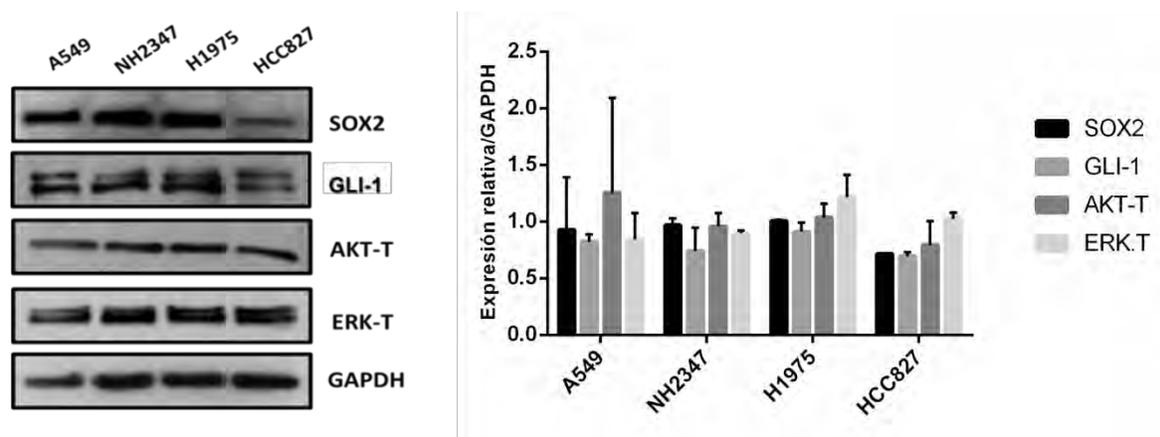
**Figura 2. Expresión del mRNA de los genes GLI-1 y SOX2 en células de cáncer pulmonar NSCLC.** A) Expresión de GLI-1, B) Expresión de SOX2. El nivel de expresión de ambos mRNAs fue analizado mediante RT-qPCR (Syber Green) y normalizado con respecto al gen endógeno GAPDH. Los niveles de expresión fueron comparados con respecto al grupo control MIX-CTRL. El resultado se presenta como la media  $\pm$  D.E., de 3 réplicas biológicas.

Los resultados obtenidos, permitieron evidenciar que SOX2-OT se presenta en líneas celulares de NSCLC y que la expresión de las mismas es variable. Sin embargo, se puede observar que la línea celular HCC827 presenta mayor nivel de expresión de SOX2-OT variante 1, mientras que la línea celular A549 presenta mayor nivel de expresión de SOX2-OT variante 6. De igual manera, SOX2 y GLI-1 se expresan de manera variable en líneas celulares de NSCLC. Pese a ello, se muestra que las células de cáncer pulmonar que presentan mayor nivel de expresión del mRNA SOX2 y GLI-1 son las NH2347.

El análisis realizado, previamente para la variante 6 respecto a la expresión de SOX2-OT en diferentes líneas celulares de NSCLC, ha mostrado previamente, que las células de cáncer pulmonar con mayor expresión del transcrito fueron las células A549, razón por la cual, al inicio del presente trabajo se determinó llevar a cabo ensayos de expresión sobre esta línea celular para cumplir con el objetivo general. Posteriormente, tras llevar a cabo un reanálisis de secuencias del genoma y con base en datos de la literatura, se decidió incluir el análisis de la forma canónica de SOX2-OT (variante 1). Si bien, el resultado mostrado en la figura 1B, refiere que la línea celular de cáncer pulmonar A549 presenta niveles bajos de expresión del transcrito antes mencionado, los estudios que han descrito el papel de SOX2-OT en NSCLC han sido escasos, por lo tanto, fue seleccionado como el modelo de estudio del presente trabajo. En este sentido, nuestro grupo de investigación, identifico previamente que la variante 6 en el modelo celular A549 bajo tratamiento por Cisplatino y TKIs incrementó su nivel de expresión (Herrera *et al.*, 2020 en proceso).

## Análisis de los niveles de proteína de GLI-1, SOX2, AKT y ERK en células de cáncer pulmonar “NSCLC”

Con la finalidad de determinar el nivel de proteína de GLI-1, SOX2, AKT y ERK en cuatro modelos celulares de cáncer pulmonar previamente mencionadas, se llevaron a cabo ensayos de Western Blot. En la Figura 3, se muestra que en los cuatro modelos celulares aquí estudiados, se identifica la expresión variable de las proteínas antes mencionadas. Este resultado permitió mostrar que las proteínas GLI-1, SOX2, AKT y ERK son detectadas en niveles moderados y heterogéneos en células de cáncer pulmonar del grupo NSCLC. Sin embargo, es posible apreciar que GLI-1 presenta mayores niveles de expresión en células H1975; así como SOX2 en células A549, NH2347 y H1975, mientras que mayores y homogéneos niveles de expresión de AKT y ERK en los cuatro modelos celulares de cáncer pulmonar aquí estudiados.



**Figura 3. Análisis de los niveles de proteína de GLI-1, SOX2, AKT y ERK total en células de cáncer pulmonar NSCLC.** Los niveles de expresión relativa de proteína fueron analizados mediante Western Blot y normalizado con respecto a la proteína endógena GAPDH. Los

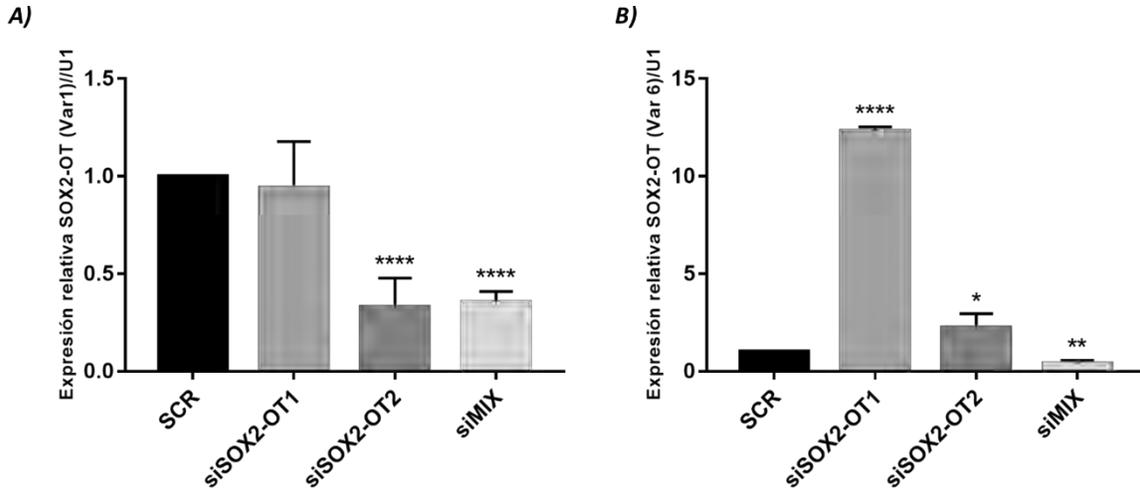
resultados se encuentran expresados como el valor de la media  $\pm$  D.E., de un total de 2 réplicas biológicas.

Lo anterior, permitió analizar y comparar el perfil de los transcritos de los genes SOX2-OT, SOX2 y GLI-1 con la expresión relativa de las proteínas de la vía de señalización de EGFR en diferentes modelos celulares de cáncer de pulmón, así como definir el modelo celular que permitiera describir la participación de SOX2-OT en la regulación del eje GLI-1/SOX2 con su posible papel en la respuesta a la terapia basada en Cisplatino y TKI-Erlotinib.

### **La disminución de la expresión de SOX2-OT mediante siRNAs, reduce la expresión relativa del mRNA de los genes GLI-1 y SOX2**

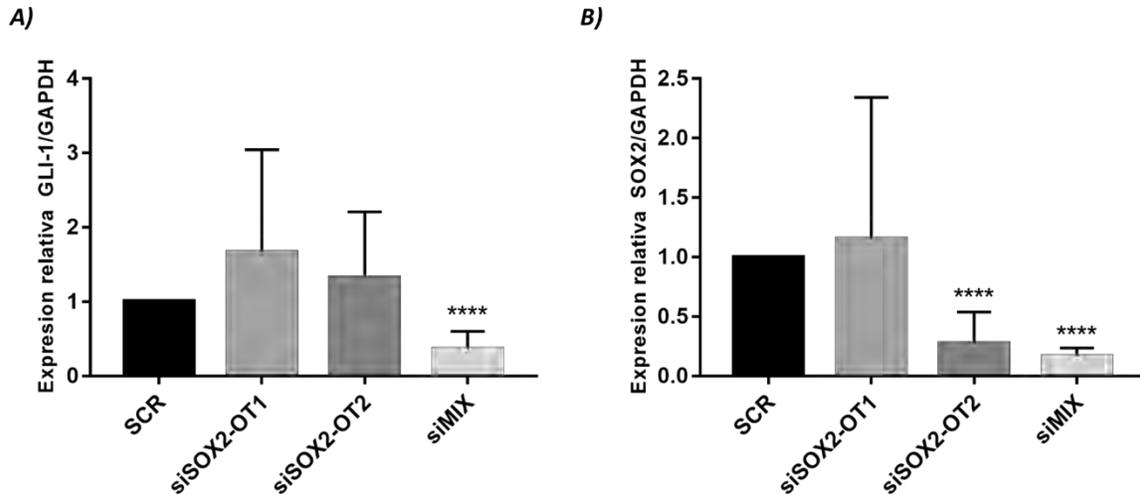
Con el objeto de analizar el papel de SOX2-OT en la regulación del eje transcripcional GLI-1/SOX2 se llevaron a cabo ensayos de transfección transitoria en células de cáncer pulmonar A549. La eficacia de la inhibición en la expresión

de SOX2-OT fue evaluada mediante ensayos de RT-qPCR. Con ello, fue posible confirmar la eficacia de los siRNAs empleados llamados OT1 y OT2, dirigidos en contra de SOX2-OT (variante 1 y variante 6, respectivamente), cabe mencionar que para potenciar el efecto del silenciamiento fue empleada la mezcla de ambos siRNAs para SOX2-OT ( $P < 0.05$ ) (Figura 4A y 4B).



**Figura 4. Silenciamiento por siRNAs en contra del lncRNA SOX2-OT en células de cáncer pulmonar A549.** A) Expresión de SOX2-OT variante 1. B) Expresión de SOX2-OT variante 6. El nivel de eficiencia del silenciamiento por siRNAs fue analizado mediante ensayos de RT-qPCR (Syber Green) y normalizado con respecto al gen endógeno U1. Los niveles de expresión fueron comparados con respecto del grupo control “SCR”. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  D.E., de 5 réplicas biológicas. El análisis estadístico aplicado fue mediante la prueba de T de Student. Los valores de  $p < 0.05$  corresponden a: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.00001$ .

A partir del análisis anterior, se realizó el análisis del efecto de la disminución de SOX2-OT en la expresión del mRNA de SOX2 y GLI-1. La figura 5A muestra que la disminución de la expresión de SOX2-OT variante 1 disminuye la expresión de SOX2, de igual manera este efecto se ve reflejado al utilizar el MIX de siRNAs (siMIX). Mientras que, el mRNA GLI-1 disminuyó solamente al reducir la expresión de SOX2-OT a partir de la utilización del siMIX (Figura 5B).



**Figura 5. Ensayos de silenciamiento de SOX2-OT en células de cáncer pulmonar A549, contribuyen en reducir la expresión del mRNA de GLI-1 y SOX2.** A) Expresión del mRNA de SOX2, B) Expresión del mRNA de GLI-1. Los niveles de expresión de ambos mRNAs en consecuencia del silenciamiento genético por siRNAs de SOX2-OT fue analizado mediante el método RT-qPCR (Syber Green y normalizada con respecto al gen endógeno GAPDH). Los niveles de expresión se analizaron en comparación con el grupo control "SCR". Los resultados son expresados como la media  $\pm$  D.E., de 5 réplicas biológicas. El análisis se realizó mediante la prueba de T de Student. Los valores de  $p < 0.05$  corresponden a \*\*\*\* $p < 0.00001$ .

Los resultados obtenidos indican que SOX2-OT regula la expresión del eje GLI-1/SOX2, además, permitieron analizar la participación de SOX2-OT en la regulación de las proteínas GLI-1 y SOX2, así como también en las proteínas de la vía de señalización de EGFR y su activación por fosforilación.

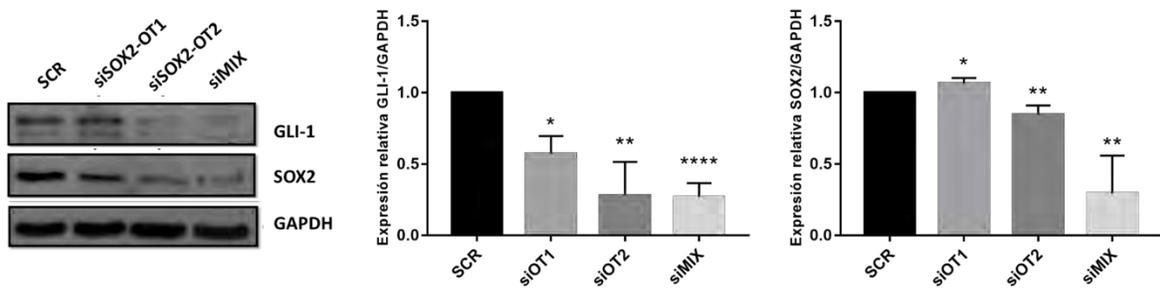
## **El silenciamiento de SOX2-OT disminuye el nivel de proteína del eje GLI-1/SOX2, así como AKT, p-AKT y ERK en células de cáncer pulmonar A549**

Con base en todos los resultados anteriores, donde la disminución del lncRNA SOX2-OT promueve la reducción del mRNA de SOX2 y GLI-1, fue posible identificar su reducción a nivel de proteína total, mediante ensayos de Western Blot. En ello, se llevaron a cabo ensayos de silenciamiento de SOX2-OT a partir de los cuales se recuperó la proteína total a 48h post-transfección con siRNAs (OT1, OT2 y siMIX). En la Figura 6 se identifica que el silenciamiento de SOX2-OT en sus variantes 1 y 6, contribuyen en la disminución de la proteína total de SOX2 y GLI-1. Dichos resultados, en conjunto con evidencias descritas en la Figura 5, indican que el lncRNA SOX2-OT podría regular transcripcionalmente el eje GLI-1/SOX2 en células de cáncer pulmonar A549.

De igual manera, se evaluó si la disminución de la expresión del eje GLI-1 y SOX2, modulado por el lncRNA SOX2-OT, contribuye a cambios en los niveles de activación de las moléculas efectoras de la vía de EGFR, como AKT y ERK. Para resolverlo, posterior al silenciamiento de SOX2-OT en células A549, se detectaron cambios en los niveles de proteína total de AKT y ERK, así como activación por fosforilación de p-AKT.

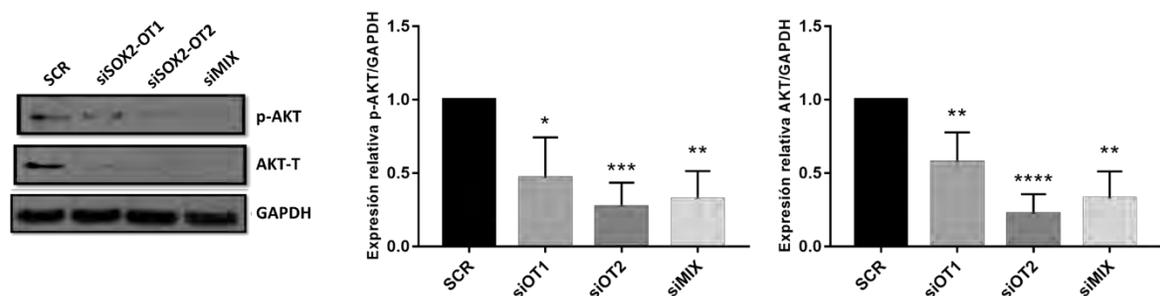
Con base en lo anterior, se detectó que el silenciamiento del lncRNA SOX2-OT en sus variantes 1 y 6 disminuyen tanto la fosforilación como la proteína total de AKT (Figura 7), mientras que, se observó un aumento significativo en la fosforilación de ERK y una disminución de la proteína total del

mismo (Figura 8). Por lo tanto, los resultados señalan que SOX2-OT regula positivamente a AKT-T e inactiva su fosforilación, pese a ello, potencializa la activación de p-ERK, lo cual, sugiere la regulación de SOX2-OT sobre el eje GLI-1/SOX2. Así mismo, se puede deducir la regulación de algunas vías de señalización por SOX2 y GLI-1 a partir del lncRNA SOX2-OT en cáncer de pulmón.

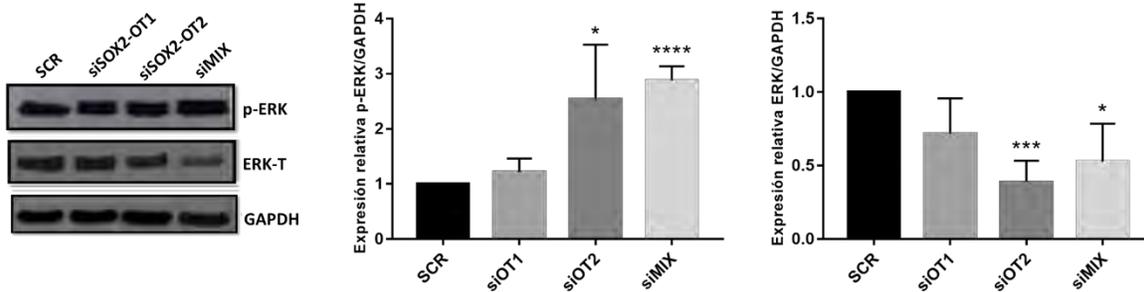


**Figura 6. El silenciamiento del lncRNA SOX2-OT en células de cáncer pulmonar A549, A549 reduce los niveles de expresión relativa de la proteína GLI-1 y SOX2.** Imágen representativa y análisis de la expresión de la proteína de GLI1 y SOX2 posterior al silenciamiento de SOX2-OT. Los niveles de expresión fueron normalizados respecto a la proteína endógena GAPDH, como control de carga. El resultado se obtuvo en comparación con el grupo control SCR. Los resultados se encuentran analizados como la media  $\pm$  D.E., de 5 réplicas biológicas. El análisis se realizó mediante T de Student. Los valores de  $p < 0.05$  corresponden a: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.00001$ .

**Figura 7. El silenciamiento del lncRNA SOX2-OT en células de cáncer pulmonar A549,**



**reduce los niveles de expresión relativa de la proteína AKT y su nivel de activación por fosforilación.** Imágen representativa y análisis de la expresión de la proteína de GLI1 y SOX2 posterior al silenciamiento de SOX2-OT. Los niveles de expresión fueron normalizados respecto a la proteína endógena GAPDH, como control de carga. El resultado se obtuvo en comparación con el grupo control SCR. Los resultados se encuentran analizados como la media  $\pm$  D.E., de 5 réplicas biológicas. El análisis se realizó mediante T de Student. Los valores de  $p < 0.05$  corresponden a: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\*\* $p < 0.00001$ .



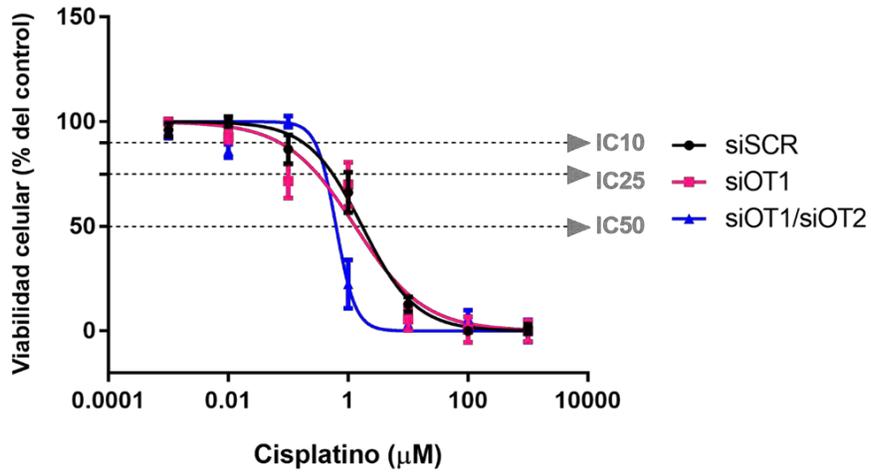
**Figura 8. La disminución de SOX2-OT en células A549 contribuyen en reducir los niveles de proteína ERK e incrementa sus niveles de activación por fosforilación.** Imágen representativa y análisis de la expresión de la proteína de GLI1 y SOX2 posterior al silenciamiento de SOX2-OT. Los niveles de expresión fueron normalizados respecto a la proteína endógena GAPDH, como control de carga. El resultado se obtuvo en comparación con el grupo control SCR. Los resultados se encuentran analizados como la media  $\pm$  D.E., de 5 réplicas biológicas. El análisis se realizó mediante T de Student. Los valores de  $p < 0.05$  corresponden a: \* $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*\* $p < 0.00001$ .

### La inhibición de SOX2-OT incrementa la sensibilidad a Cisplatino y al TKI-Erlotinib en la línea celular A549

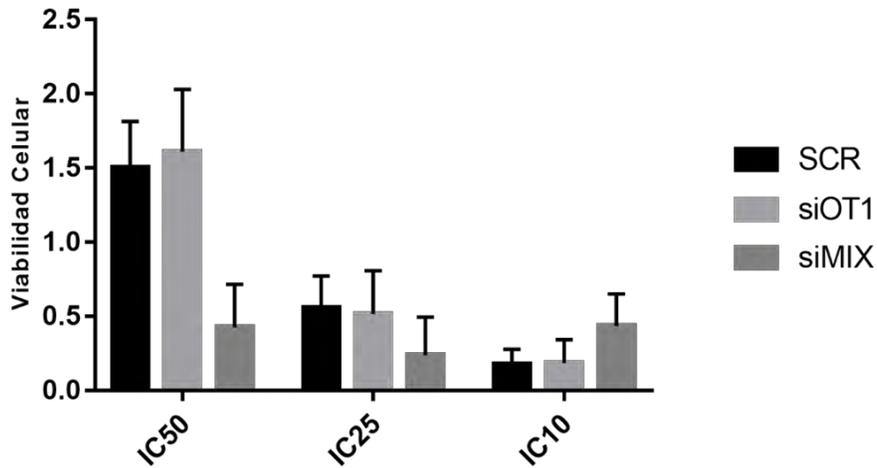
Reportes previos, señalan el papel de los lncRNAs en la respuesta al tratamiento contra el cáncer, ejemplo de ello es UCA1 (Cheng *et al.*, 2015) y GAS5 (Dong *et al.*, 2015) los cuales se encuentran sobre-expresados en cáncer pulmonar del grupo NSCLC, los cuales presentan resistencia a TKI-Gefitinib. En este sentido, con el propósito de conocer la influencia del lncRNA SOX2-OT en la respuesta a fármacos oncológicos en células A549 de cáncer pulmonar, se realizaron ensayos de transfección mediante (siRNAs) OT1 y OT2 en contra de SOX2-OT, para su posterior análisis de viabilidad celular (MTT) en presencia de Cisplatino o TKI-Erlotinib.

En la Figura 9 se muestra que la disminución de la expresión de SOX2-OT sensibiliza la respuesta frente a Cisplatino en células A549 (SCR: IC50: 1.723  $\mu$ M; siOT1: 1.31  $\mu$ M; siMIX: 0.63  $\mu$ M). De igual manera, la sensibilidad a TKI-Erlotinib, mostro aumento en la sensibilidad con un valor en IC50 de 48.77  $\mu$ M para siOT1, 70.27  $\mu$ M para siOT2 y 73.08  $\mu$ M para siMIX en comparación con el valor del SCR (90.2  $\mu$ M) (Figura 10).

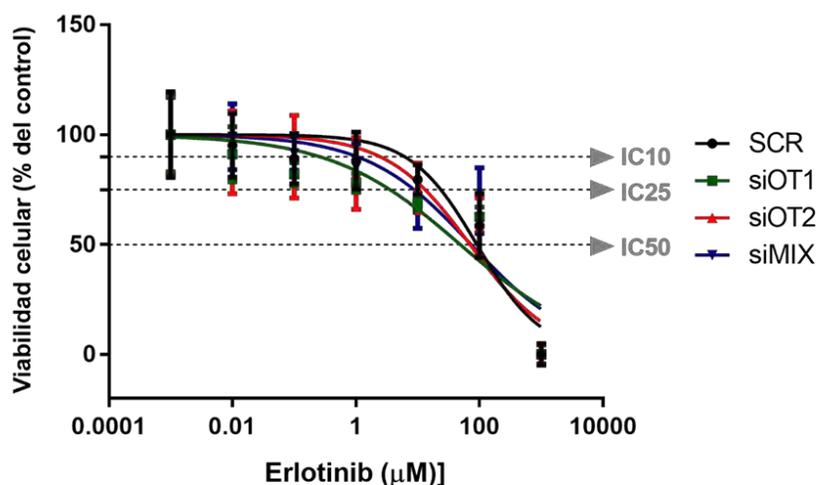
Hasta el momento, no existe reporte en la literatura que indique la participación de SOX2-OT asociada al tratamiento oncológico, por lo que, los resultados obtenidos, permitirían indicar por primera ocasión el papel de este lncRNA en la respuesta a fármacos oncológicos tanto en Cisplatino, como de terapia dirigida (TKI) en células de cáncer pulmonar A549, así como su posible empleo asociado con la progresión clínica y probable sobrevida en pacientes con cáncer de pulmón que presenten sobre-expresión de SOX2-OT. Pese a ello, se requieren de ensayos adicionales para validar la significancia y el alcance de estos resultados en la práctica preclínica y clínica oncológica pulmonar.



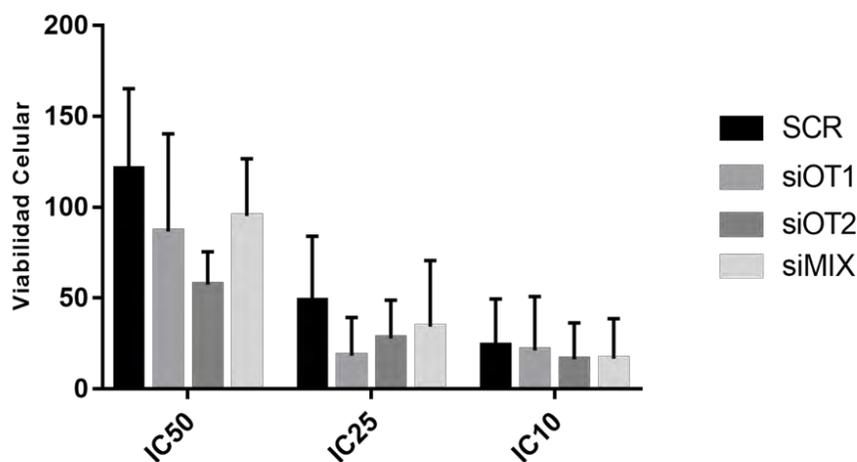
Línea celular	Cisplatino				Réplicas experimentales
	LogIC50 (Media±D.E)	IC50 (µM) (Media±D.E)	IC25 (µM) (Media±D.E)	IC10 (µM) (Media±D.E)	
A549					
siSCR	0.23±0.05	1.72±0.44	0.55±0.22	0.17±0.01	1
siOT1	0.12±0.12	1.31±0.60	0.31±0.41	0.07±0.22	1
siOT1/siOT2	-0.20±0.27	0.63±0.41	0.42±0.36	0.27±0.31	1



**Figura 9. Aumento de la sensibilidad a Cisplatino en células A549 de NSCLC posterior al silenciamiento del lncRNA SOX2-OT.** Los niveles de expresión fueron comparados con respecto al grupo control transfectado con un vector SCR. El resultado es expresado como la media ± E.E., de 1 ensayo biológico independiente (n=1) por triplicado.



Erlotinib					
Línea celular A549	LogIC50 (Media±D.E)	IC50 (μM) (Media±D.E)	IC25 (μM) (Media±D.E)	IC10 (μM) (Media±D.E)	Replicas experimentales
SCR	1.958±0.0888	90.2±62.2242	23.53±50.2260	6.104±36.0552	3
siOT1	1.688±0.1653	48.77±75.8824	3.537±56.3431	0.257±41.9120	3
siOT2	1.847±0.1328	70.27±25.8057	13.10±29.6941	2.443±28.0905	3
siMIX	1.864±0.1611	73.08±44.4793	8.705±51.3410	1.037±31.3080	3



**Figura 10. Aumento de la sensibilidad a TKI-Erlotinib en células A549 de cáncer pulmonar.** Los niveles de expresión fueron comparados con respecto al grupo control transfectado con un vector SCR. El resultado es expresado como la media ± E.E., de 3 ensayo biológicos independientes por triplicado.

## 7. DISCUSIÓN

Los lncRNAs han tenido gran importancia en la investigación básica, biomédica y médica en diversos tipos de cáncer, debido a que poseen un importante y amplio espectro de función en el control de la expresión genética, ya que logran estar involucrados en los mecanismos de la transcripción, traducción y regulación post-transcripcional, por lo que, su desregulación contribuye al desarrollo de la enfermedad (Nagano *et al.*, 2011).

Estudios recientes, han dado a conocer la relación que existe entre los lncRNAs con mecanismos de la proliferación, migración, e invasión celular, metástasis y mal pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón (Wang *et al.*, 2014).

El lncRNA SOX2-OT ha sido propuesto como un oncogén de progresión en cáncer de pulmón (Hou *et al.*, 2014), sin embargo pocos estudios han probado su participación en la regulación de la expresión de genes que participan en la regulación de efectores de vías de señalización importantes para la progresión tumoral, tales como EGFR/Hedgehog/GLI-1 o SOX2, las cuales están sobre-reguladas en NSCLC.

La función de SOX2 y GLI-1 ha sido descrita en diferentes tipos de cáncer como factores de transcripción que afectan distintas características propias de células cancerosas, además de promover la tumorigénesis y progresión (Novak *et al.*, 2019) en NSCLC (Niki *et al.*, 2013) en donde las proteínas de SOX2 y GLI-1 se encuentran sobre-expresadas. Por esta razón, los resultados sugirieron

también un importante papel de SOX2-OT en el desarrollo y progresión de NSCLC, a partir de la regulación de la expresión de dos factores de transcripción involucrados en el desarrollo y progresión de cáncer de pulmón. GLI-1 es un factor de transcripción y efector final de la vía de Hedgehog, la cual ha sido descrita como sobre-activada en cáncer de pulmón, no obstante, la regulación de la expresión de GLI-1 ha sido poco estudiada. Al respecto, se sugiere que el lncRNA SOX2-OT podría funcionar como un regulador de GLI-1 a través del eje GLI-1/SOX2. Por otra parte, la vía de Hedgehog y EGFR convergen y su activación se relaciona con la progresión de cáncer de pulmón (Jiang *et al.*, 2015).

Igualmente, se ha confirmado la participación de lncRNAs en la resistencia a la terapia oncológica, a pesar de ello, la posible función de SOX2-OT en la respuesta a tratamiento en cáncer no ha sido descrita. El presente estudio, tuvo como objetivo analizar el papel del lncRNA SOX2-OT en la regulación de la expresión del eje GLI-1/SOX2 y su participación en la respuesta al tratamiento oncológico en cáncer pulmonar, utilizando como modelo de estudio la línea celular A549 de NSCLC.

Los resultados del presente trabajo, permitieron demostrar que las líneas celulares de NSCLC: A549, NH2347, H1975 y HCC827 expresan SOX2-OT, tal como previamente había sido reportado por Kewei *et al.* y Hou *et al.* al menos para A549 y HCC827. Igualmente se demostró que las líneas celulares utilizadas expresan también a los factores de transcripción GLI-1 y SOX2, lo que permitió generar la hipótesis de que la regulación transcripcional de dichas proteínas, podría estarse llevando a cabo por SOX2-OT.

Previamente se reportó la correlación positiva entre la expresión de SOX2-OT y SOX2 (Hou *et al.*, 2014), así como también, la regulación transcripcional de SOX2 sobre GLI-1 (Bora-Singhal *et al.* 2015), indicando que probablemente la regulación de GLI-1 y SOX2 se lleva a cabo a través de SOX2-OT a manera de feedback en la línea celular A549. Pese a ello, se requiere de ensayos complementarios para confirmar la participación de este lncRNA, tal como, inmunoprecipitación de la cromatina con la finalidad de conocer si existen cambios en el re-arreglo de la cromatina del promotor de GLI-1 y SOX2, respectivamente, en ausencia de SOX2-OT.

De igual manera, se evidencio la posible regulación e inactivación de la fosforilación de AKT, además del favorecimiento de la activación de la fosforilación de ERK a consecuencia de la regulación de SOX2-OT sobre el eje GLI-1/SOX2, debido a que, tal como lo reporto Jiang *et al.*, GLI-1 es un efector de la vía de señalización de Hedgehog, misma que converge con la vía de EGFR, razón por la cual, SOX2-OT podría intervenir en la regulación de vías de señalización y en la modulación de la progresión de cáncer de pulmón, sin embargo, se requiere de estudios adicionales que permitan verificar la función reguladora de SOX2-OT en efectores de la vía de señalización de EGFR.

Estudios previos, indican que la sobre-expresión de los lncRNAs influyen en la respuesta al tratamiento oncológico (Cheng *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2015), sin embargo, hasta el momento se desconoce si el lncRNA SOX2-OT influye en la respuesta a la terapia oncológica, por lo que, la inhibición de su expresión podría estar relacionada con la respuesta a fármacos utilizados en cáncer de pulmón,

como Cisplatino y TKI-Erlotinib. Pese a ello, se requiere de ensayos complementarios para confirmar dicho resultado.

## **8. CONCLUSIONES**

1.- EL RNA largo no-codificante SOX2-OT y sus variantes 1 y 6, además del mRNA de los genes GLI-1 y SOX2 se encuentran expresados en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

2.- SOX2-OT regula de manera positiva la expresión del eje transcripcional GLI-1/SOX2 en células de cáncer pulmonar A549, interviniendo de manera probable en la regulación de la activación de algunas vías de señalización importantes en el desarrollo de cáncer pulmonar.

3.- La vía de señalización PI3K-AKT y MAPK-ERK en células A549 de cáncer pulmonar pueden estar reguladas por el eje GLI-1/SOX2 a partir del RNA largo no-codificante SOX2-OT.

4.- SOX2-OT contribuye de manera positiva en la resistencia al tratamiento frente a Cisplatino e Inhibidores de Tirosina Kinasa (TKIs) en células de cáncer pulmonar A549.

## **9. PRESPECTIVAS**

A partir de los estudios realizados en esta Tesis de Licenciatura, se considera que la aportación del eje SOX2-OT/SOX2/GLI-1 debe ser autenticada en pacientes mexicanos con cáncer de pulmón, en un contexto fisiológico *in vivo* en modelos

murinos, así como en relación a la respuesta a tratamiento oncológico. De igual manera, la posibilidad de la identificación de un mecanismo asociado a la regulación postraduccional de MEOX2.

## 10. IMÁGENES SUPLEMENTARIAS

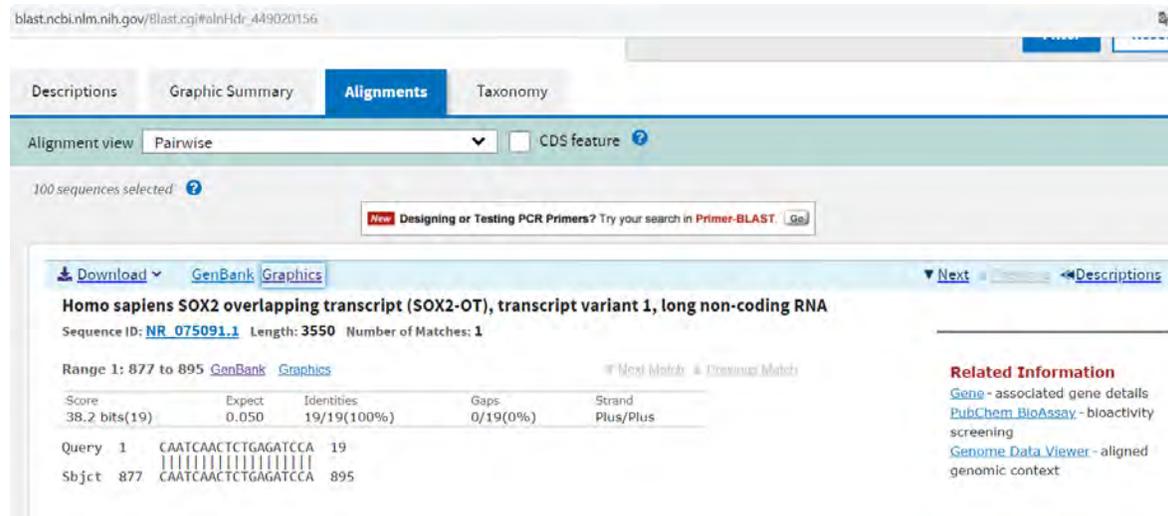
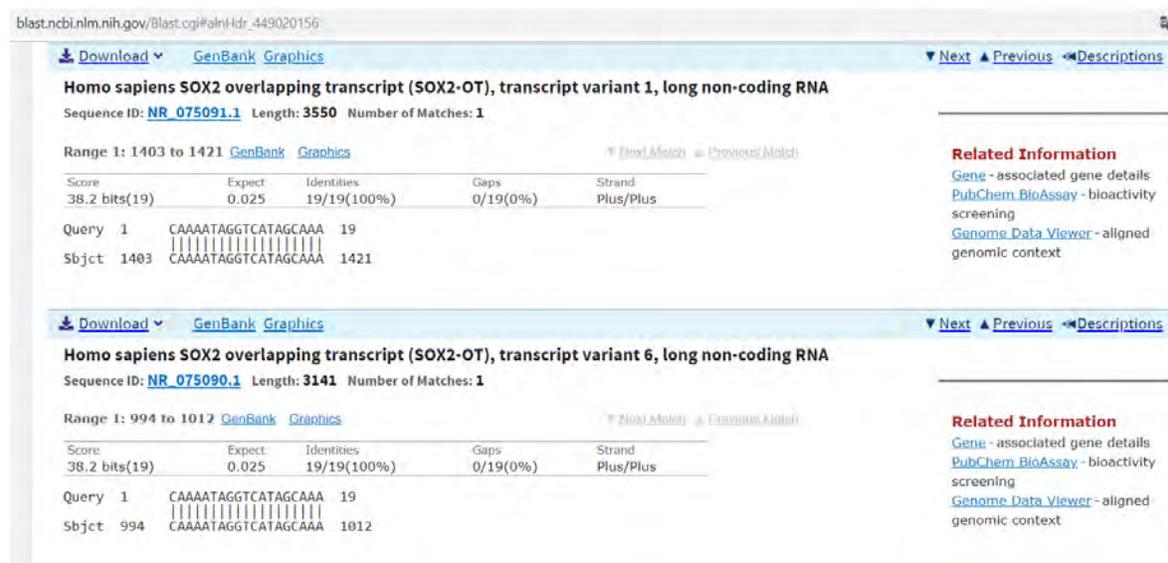
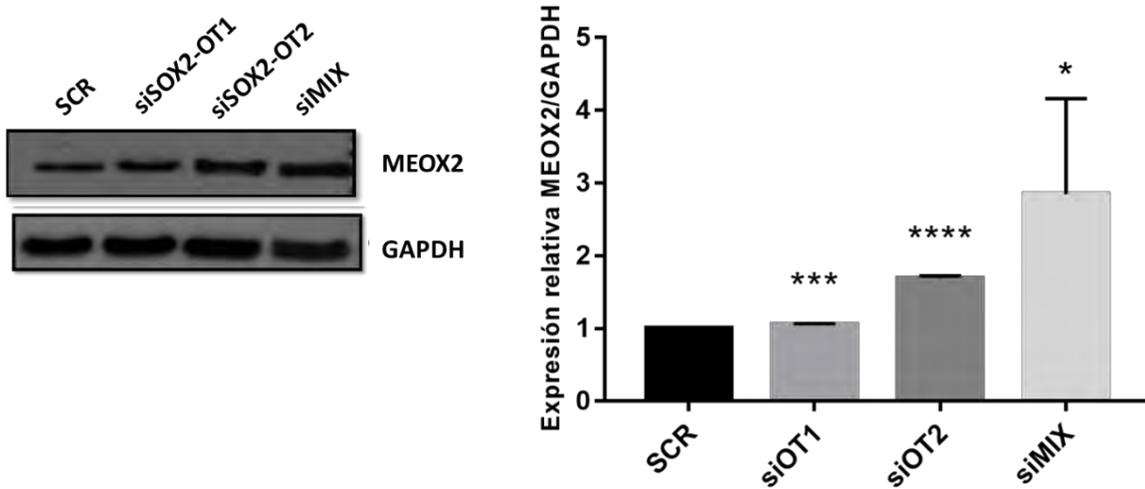


Figura suplementaria 1. Análisis de alineamiento del siRNA OT1 sobre la secuencia genética del transcrito lncRNA SOX2-OT. Porcentaje de alineamiento del 100% del siRNA OT1 sobre el transcrito de la variante 1 del transcrito lncRNA SOX2-OT.

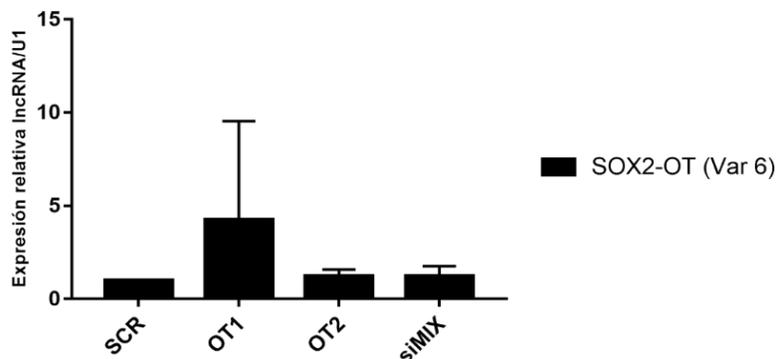


**Figura suplementaria 2. Análisis de alineamiento del siRNA OT2 sobre la secuencia genética del transcrito lncRNA SOX2-OT. Porcentaje de alineamiento del 100% del siRNA OT2 sobre el transcrito de las variantes 1 y 6 del transcrito lncRNA SOX2-OT.**



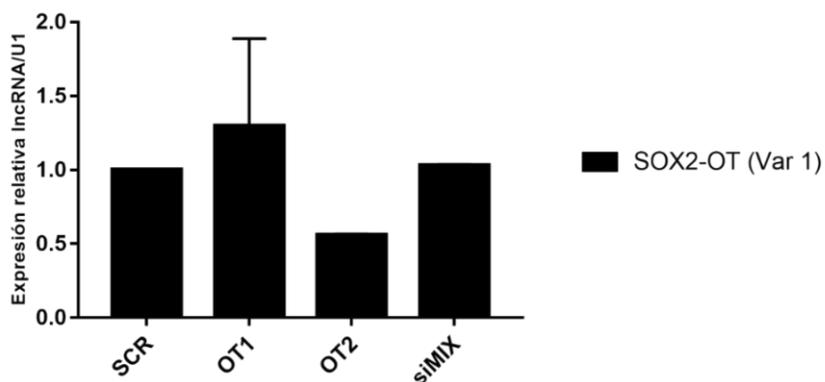
**Figura suplementaria 3. La disminución de SOX2-OT en la línea celular A549 aumenta la proteína de MEOX2.** Imagen representativa y análisis de la proteína MEOX2 posterior al silenciamiento de SOX2-OT. Los niveles de expresión fueron normalizados respecto a la proteína endógena GAPDH como control de carga. El resultado se encuentran analizados como la media±D.E., de 5 réplicas biológicas. El análisis se realizó mediante T de Student. Los valores de  $p < 0.05$  corresponden a: \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p > 0.0001$ , \*\*\*\* $p > 0.00001$ .

**Niveles de expresión del lncRNA SOX2 en la línea celular A549**



**Figura suplementaria 4. Silenciamiento por siRNAs del lncRNA SOX2-OT en la línea celular A549.** El nivel de eficiencia del silenciamiento por siRNAs fue analizado mediante ensayos de RT-qPCR (Syber Green) y normalizado con respecto al gen endógeno U1. Los niveles de expresión fueron comparados con respecto del grupo control SCR. El resultado se presenta como la media  $\pm$  D.E., de 1 réplicas biológicas.

**Niveles de expresión del lncRNA SOX2 en la línea celular A549**



**Figura suplementaria 5. Silenciamiento por siRNAs del lncRNA SOX2-OT en la línea celular A549.** El nivel de eficiencia del silenciamiento por siRNAs fue analizado mediante ensayos de RT-qPCR (Syber Green) y normalizado con respecto al gen endógeno U1. Los niveles de expresión fueron comparados con respecto del grupo control SCR. El resultado se presenta como la media  $\pm$  D.E., de 1 réplicas biológicas.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. - Alberts, B., Watson, D. J., Lewis, J. Bray, D., Raff, M. y Roberts, K. 2004. *Biología molecular de la célula*. Ed. Omega.
- 2.- Allis, D., Caparros, M., Jenuwein, T. y Reinberg, D. 2015. *Epigenetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 3.- Arrieta, O., Cardona, A. F. y Bramulgia, G. F. 2011. Genotyping non-small cell lung cáncer (NSCLC) in Latin Amerina. *J Thorac Oncol*. 6: 1955-1959.
4. - Barta, A. J., Powell, A. C. y Wisnivesky, P. J. 2019. Global Epidemiology of Lung Cancer. *Ann Glob Health*. 85 (1): 8.
5. - Bora-Singhal, M., Deepak, P., Nguyen, J. y Chellappan. 2015. GLI1-Mediated Regulation of SOX2 Facilitates Self-Renewal of StemLike Cells and Confers Resistance to EGFR Inhibitors in Non–Small Cell Lung Cancer. *Neoplasia* 17(7):538-51.
6. -Calvayrac, O., Pradines, A., Pons, E., Mazières, J. y Guibert, N. 2017. Molecular biomarkers for lung adenocarcinoma. *Eu Respir J*. 49: 1601734.
- 7.- Cheng, N., Weijing, C., Shengxiang, R., Xuefei, L., Wang, Q., Pan, H., Zhao, M., Li, J., Zhang, Y., Zhao, C., Chen, X., Fei, K., Zhou, C. y Hirsch, F. 2015. Long non-coding RNA UCA1 induces non-T790M acquired resistance to EGFR-TKIs by activating the AKT/Mtor pathway in EGFR-mutant non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 6 (27).

8. -Chi, A., Remick, S. y Tse, W. 2013. EGFR inhibition in non-small cell lung cancer: current evidence and future directions. *Biomark Res.1 (1):2*.
- 9.- De Groot, M. P., Wu, C. C., Carter, W. B. y Munden, F. R. 2018. The epidemiology of lung cancer. *Transl Lung Cancer Res. 7(3): 220-233*.
- 10.- Di Leva, G., Garofalo, M. y Croce, C.M. 2014. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol. 9:287–314*.
11. - Dogan, S., Shen, R. y Ang, D.C. 2017. Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: Higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clin Cancer Res. 18(22): 6169–6177*.
12. - Dong, S., Qu, X., Li, W., Zhong, X., Li, P., Yang, S., Chen, X., Shao, M. y Zhang, L. 2015. The long non-coding RNA, GAS5, enhances gefitinib-induced cell death in innate EGFR tyrosine kinase inhibitor-resistant lung adenocarcinoma cells with wide-type EGFR via downregulation of the IGF-1R expression. *J Hematol Oncol. 8:43*.
13. - Goff, L. A. y Rinn, J. L. 2015. Linking RNA biology to lncRNAs. *Genome research. 25: 1456-1465*.
- 14.- Gu, T.J., Yi X., Zhao, X.W., Zhao Y., y Yin, J.Q. 2009. Alu-directed transcriptional regulation of some novel miRNAs. *BMC Genomics. 10:563*.
- 15.- Guo, F., Guo, L., Li, Y., Zhou, Q. y Li, Z. 2015. MALAT1 is an oncogenic long non-coding RNA associated with tumor invasion in non-small cell lung

- cancer regulated by DNA methylation. *Int J Clin Exp Pathol.* 8:15903–15910.
16. - Ha, M. y Kim, V. N. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15:509-24.
- 17.-Hanahan, D. y Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 144(5):646-74.
- 18.-Hassan, L. A., Omer, U. I. H., Yi-Wei, Y. y Buchanan, P. 2015. Lung cancer: Biology and treatment options. *BBA* 189-210.
- 19.-Herrera, S.A.M., Armas, L.L, Arrieta, O., Zúñiga, J., Piña, S. P. y Ávila, M.F. 2017. Histone code and long non-coding RNAs (lncRNAs) aberrations in lung cancer: implications in the therapy response. *Clinical Epigenetics* 9:98.
- 20.-Hou, Z., Zhao, W., Zhou, J., Shen, L., Zhan, P., Xu, C., Chang, C., Bi, H., Zou, J., Yao, X., Huang, R., Yu, L. y Yan. J. 2014. A long noncoding RNA SOX2-OT regulates lung cancer cell proliferation and is a prognostic indicator of poor survival. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 53: 380–388.
- 21.-Huang, L. y Fu, L. 2015. Mechanism of Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Act. P S.* 5(5):390-401.
- 22.-Inamura, K. 2017. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Clasification. *Front Oncol.* 7: 193.

- 23.-Jiang, W. G., Ye, L., Ruge, F., Sun, P., Sanders, A. J. 2015. Expression of Sonic Hedhehog (SHH) in Human Lung Cancer and the Impact on SHH-mediated Biological Function of Lung Cancer Cells and Tumor Growth. *Anticancer Research* 35: 1321-1332.
- 24.-Kapranov, P, Cheng, J., Dike, S., Nix, D.A., Dutttagupta, R., Willingham, A.T., Stadler, P.F., Hertel, J., Hackermuller, J. Hofacker, I.L., et al. 2007. RNAm reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* 316, 1484–1488.
- 25.-Kewei, Z., Yang, L., Limei, Q., Xiaobo, M., Hongguang, Z. y Ying, T. 2018. Long noncoding RNA Sox2 overlapping transcript (SOX2OT) promotes non-small-cell lung cancer migration and invasion via sponging microRNA 132 (miR-132). *Plos One* 11: 5269–5278.
- 26.-Legoff, L., Shereen, C. D. C., Sergei, T. y Smagulova, F. 2019. *Transgenerational Epigenetics*. Academic Press. 2da Ed.
- 27.-Liu, Z., Sun, M., Lu, K., Liu, J., Zhang, M., Wu, W., De, W., Wang, Z. y Wang, R. The long noncoding RNA HOTAIR contributes to cisplatin resistance of human lung adenocarcinoma cells via downregualtion of p21 (WAF1/CIP1) expression. *PLoS One*. 8.
- 28.-Martin, L. y Chang, H. Y. 2012. Uncovering the role of genomic “dark matter” in human disease. *J Clin Invest*. 122:1589-1595.

- 29.-Mattick, J.S. y Gagen, M.J. 2001. The evolution of controlled multitasked gene networks: The role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms. *Mol Biol Evol.* 18:1611–1630.
- 30.-Meyerson, M., Haber, A.D., Johnson, E.B. y Lynch, J.T. 2006. Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Testing in the Care of Lung Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.*, 12 pp. 4403s-4408s.
- 31.-Molina, J.R., Yang, P., Cassivi, S.D., Schild, S.E. y Adjei, A. A. 2008. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factor, treatment, and survivorship. *Clin Proc.* 83: 584–594.
- 32.-Mollberg, M., Surati, M., Demchuk, C., Fathi, R., Salama, A. K., Husain, A. N., Hensing, T. y Salgia, R. 2011. Mind-Mapping for Lung Cancer: Towards a Personalized Therapeutics Approach. *Adv Ther* 28(3).
33. - Nagano, T.; Fraser, P. 2011. No-nonsense functions for long noncoding RNAs. *Cell* 145, 178–181.
- 34.-National Cancer Institute. Retomado de <http://www.nih.gov/about-nih/what-we-do/nih-almanac/national-cancer-institute-nci> el día 20 de enero de 2019.
- 35.-National Center for Biotechnology Information. Retomado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=347689> el día 26 de enero de 2020.
- 36.-Nat Genet. 45:977–983. Cáncer pulmonar: sección educativa. Retomado de <http://cancerdepulmon.com.mx/seccion-educativa> GLOBOCAN-INCAN 2013. El día 20 de mayo de 2017

- 37.-National Human Genome Research Institute. Retomado de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Mutacion> el día 20 de enero de 2019.
- 38.- Nikki, K., Rossel, R. y Viteri, S. 2013. The role of SOX2 in small cell lung cancer, lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Transl Lung Cancer Res. 2 (3): 172-179.*
- 39.- Novak, D., Hüser, L., Elton, J. J., Umansky, V., Altevogt, P. y Utikal, J. 2019. SOX2 in Development and Cancer Biology. *Seminars in Cancer Biology.*
- 40.-Organización Mundial de la Salud. Cáncer. Retomado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> el día 12 de abril de 2019.
- 41.-Ou, S.H. 2013. Lung cancer in never-smokers. Does smoking history matter in the era of molecular diagnostics and targeted therapy? *Journal of Clinical Pathology. 66(10).*
- 42.-Pao, W., Wang, T. y Riely, G.J. 2005. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *Plos Med. 2:e17-e17.*
- 43.-Pao, W. y Girard, N. 2011. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol. 12: 175-80.*
- 44.-Raza, U., Zhang, J.D. y Sahin, O. 2014. MicroRNAs: reguladores maestros de la resistencia a los medicamentos, la potencia y la metástasis. *J Mol Med (Berl) 92: 321–336.*

- 45.-Rosell, R., Moran, T. y Queralt, C.2009. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med.* 361: 958-67.
- 46.-Saghaeian, J. M., Samaei, M. N., Ghanei, M., Shadmehr, B. M., y Mowla, J. S. 2016. Overexpression of the non-coding SOX2-OT variants 4 and 7 in lung tumors suggests an oncogenic role in lung cancer. *Tumor Biol.* 37:10329–10338.
- 47.-Sequist, L.V., Joshi, V.A., Jäne, P.A., Bell, W.D., Fidias, P., Lindeman, N.I., Lous, D.N., Lee, J.C., Mark, J.E., Longtine, J., Verlander, P., Kucherlapati, R.,
- 48.-Shen, H., Zhu, F., Liu, J., Xu, T., Pei, D., Wang, R., Quian, Y., Li, Q., Wang, L., Shi, Z., Chen, Q., Jiang, B. y Shu, Y. 2014. Alteration in miR-21/PTEN expression gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. *PLoS One.* 9 (7).
- 49.-Shi, H., Pu, J., Zhou, X.L., Ning, Y.Y. y Bai, C. 2017. Silencing long non-coding RNA ROR improves sensitivity of non-small-cell lung cancer to cisplatin resistance by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 39(5).
- 50.-Siddik, Z.H. 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogen.* 22: 7265–7279.
- 51.-Siegel, R.L, Miller, K. D. y Jemal, A. 2015. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 65(1):5-29.

- 52.-SOX2-OT SOX2 overlapping transcript Homo sapiens (human). National Center of Biotechnology Information. Retomado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Sox2-OT> el día 16 de agosto de 2017.
- 53.-Spurlock, C. F., Crooke, P. S. y Thomas, A. M. 2016. Biogenesis and transcriptional regulation of long non-coding RNAs in the human immune system. *J Immunol.* 197 (12): 4509-4517.
- 54.-Tong, L., Wang, Y., Chen, D., Liu, J. y Jiao, W. 2018. Potencial clinical application of lncRNAs in non-small cell lung cancer. *Onco Targets Ther.* 11: 8045-8052.
- 55.-Travis, D.W., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, G. A., Geisinger, R. K., et al. 2011. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 6(2): 244–285
- 56.- Tsai, M.C., Manor, O., Wan, Y., Mosammamparast, N., Wang, J.K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E. y Chang, H.Y. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science.* 329:689–693.
- 57.-Unidad Funcional de Oncología Torácica y Laboratorio de Medicina Personalizada. Instituto Nacional de Cancerología. Retomado de <http://cancerdepulmon.com.mx/seccion-educativa> el día 16 de enero de 2019.

- 58.-Villegas, V. E., Rahman, M. F., Fernández-Barrena, M. G., Diao, Y., Liapi, E., Sonkoly, E., Stahle, M., Pivarcsi, A., Annaratone, L., Sapino, A., Ramírez, C. S., Bürglin, T. R., Shimokawa, T., Ramachandran, S., Kapranov, P., Fernández-Zapico, M. E., y Zaphiropoulos, P. G. 2014. Identification of novel non-coding RNA-based negative feedback regulating the expression of the oncogenic transcription factor GLI1. *Mol. Oncol.* 8(5): 912-26.
- 59.-Wang, K.C. y Chang, H. Y. 2011. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell.* 43(6):904-914.
60. - Wang, R., Chen, X., Xu, T., Xia, R., Han, L., Chen, W., De, W. y Shu, Y. 2016. miR-326 regulates cell proliferation and migration in lung cancer by targeting phox2a and is regulated by HOTAIR. *Am J Cancer Res.* 6:173–186.
61. - Weber, D.G., Johnen, G., Casjens, S., Bryk, O, Pesch, B., Jöckel, K.H., Kollmeier, J. y Brüning, T. 2013. Evaluation of long noncoding RNA MALAT1 as a candidate blood-based biomarker for the diagnosis of non-small cell lung cancer. *BMC Res Notes.* 3 (6):518.
- 62.-West, K. A., Brognard, J., Clark, A.S., Linnoila, I. R., Yang, X., Swain, S. M., Harris, C., Belinsky, S. y Dennis, P. A. 2003. Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J Clin Invest.* 111:81-90.
- 63.-Wislez, M., Spencer, M. L., Izzo, J. G., Juroske, D. M., Balhara, K., Cody, D. D., Pric, R. E., Hittelman, W. N., Wistuba, I. I. y Kuriel, J. M. 2005. Inhibition

- of mammalian target of rapamycin reverses alveolar epithelial neoplasia induced by oncogenic K-ras. *Cancer Res.* 65:3226-3235.
- 64.-Yang, Y., Li, H., Hou, S., Hu, B., Liu, J. y Wang, J. 2013. The noncoding RNA expression profile and the effect of lncRNA AK126698 on cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer cell. *PLoS One.* 8.
- 65.-Yang, G., Lu, X. y Yuan, L. 2014. LncRNA: a link between RNA and cancer. *Biochim Biophys.* 1839:1097–1109.
- 66.-Yang, L., Wen, Y., Guoqing, L., Yuntao, L., Tang, J., Lu, J., Zhang, M., Liu, W. y Sun, X. 2017.  $\alpha$ -Lipoic acid inhibits human lung cancer cell proliferation through Grb2-mediated EGFR downregulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 494: 325-331.
- 67.-Yun, T., Hui, K. y Yang C. 2019. Identification of an Exosomal Long Noncoding RNA SOX2-OT in plasma as a promising biomarker for lung squamous cell carcinoma. *Genetic testing and molecular biomarkers.* 23:235-240.
- 68.-Zhang, Z.W., An, Y. y Teng, C.B. 2010. The roles of miR-17-92 cluster in mammal development and tumorigenesis. *Yi Chuan.* 31:1094–1100.
- 69.-Zheng, Z., Chen, T., Li, X., Haura, E., Sharma, A. y Bepler, G. 2009. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 356:800-808.
- 70.-Zhu, L., Liu, J., Ma, S. y Zhang, S. 2015. Long noncoding RNA MALAT-1 can predict metastasis and a poor prognosis: a meta-analysis. *Pathol Oncol Res.* 21:1259–1264.

