# Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Iztacala

# El factor de transcripción MEOX2 modula el código de histonas en la región promotora del gen LncRNA SOX2-OT, afectando su expresión génica en células de cáncer pulmonar

TESIS

Para obtener el título de

## LICENCIADA EN BIOLOGÍA

## P R E S E N T A Ana Luisa Rivero Uribe

## DIRECTOR:

Dr. Federico Ávila Moreno

## **COMITÉ TUTOR:**

Dr. Luis Enrique Arias Romero Dr. Leonel Armas López Dra. Yolanda Irasema Chirino López Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés



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 al Grupo de Investigación y Financiamiento.

Agradezco al laboratorio 12 de Enfermedades Pulmonares y Epigenómica Funcional de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de FES-Iztacala, de la UNAM, por la disposición y enseñanzas científicas en el desarrollo del presente proyecto. Así mismo, el agradecimiento a la DGAPA de la UNAM, ya que el presente proyecto de investigación contó con financiamiento de investigación a través del proyecto PAPIIT: IN230623.

#### Dedicatorias

A mi abuelita Carmen Rangel por siempre estar conmigo, apoyarme y ser mi maestra de vida, por todos esos días donde me dio su amor incondicional y su cuidado.

A mis padres, por darme la vida y trabajar arduamente para sacarnos adelante a mí y a mis hermanos, por inspirarme con la mejor historia de superación personal y guiarme en cada paso dado. Sin ustedes no hubiera llegado tan lejos.

A mi hermano Santiago Rivero, por ser mi compañerito de risas y enseñarme el amor de hermano y la paciencia.

A mi perrita Malty, por ser mi más leal compañera y seguirme en cada aventura vivida, por motivarme a seguir en pie cuando no veo la salida.

A Angel León por ser mi soporte y paño de lágrimas, por abrirme las puertas de su casa cuando las cosas se ponían complicadas y crecer conmigo cada día, por ser mi equipo durante toda la carrera y espero, de toda la vida.

#### Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por ser mi segunda casa.

A todos los profesores que me encaminaron hacia el estudio de la biología, así como aquellos que me hicieron amarla durante mi preparación académica y profesional.

A todas las personas que me acompañaron durante este proceso tan complicado en mi vida, ya fuera con sus palabras de aliento o con una alícuota de etanol para continuar con mis experimentos.

A mis compañeros de laboratorio; Mariana, Brenda y Octavio por las pláticas amenas y las enseñanzas brindadas.

A mis amigos del 52; Fernanda, Jesús, Iván y Oswaldo por el tiempo juntos y los grandes momentos vividos.

Al Dr. Federico Ávila Moreno, por sus consejos, conocimientos, apoyo y paciencia brindada.

A mi comité tutor, Dr. Luis Enrique Arias Romero, Dr. Leonel Armas López, Dra. Yolanda Irasema Chirino López, Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés, por el tiempo dedicado a las revisiones y correcciones de este trabajo.

## Índice de Contenido

Glosario de Abreviatura	10
Resumen	14
Abstract	16
1. Introducción	18
1.1 El cáncer y sus implicaciones	18
1.2 Cáncer pulmonar	20
1.2.1 Factores de riesgo en cáncer pulmonar	22
1.2.2 Clasificación histopatológica del cáncer pulmonar	23
1.2.3 Clasificación molecular del cáncer pulmonar	25
1.3 Epigenética del cáncer pulmonar	28
1.3.1 Metilación del DNA	
1.3.2 Modificación postraduccional de las colas de histonas	29
1.3.3 Expresión aberrante de RNAs no codificantes (ncRNAs)	31
1.4 RNAs largos no codificantes (LncRNAs)	33
1.4.1 LncRNAs en cáncer pulmonar	34
1.5 Factores de Transcripción	35
2. Antecedentes	
2.1 MEOX2 y su creciente importancia en cáncer	
2.2 SOX2-OT en cáncer pulmonar	
3. Planteamiento del problema	
4. Pregunta de investigación	43
5. Hipótesis	43
6 Objetivos	44
6.1 General	
6.2 Particulares	
7. Síntesis de la estrategia experimental	45
8. Materiales y Métodos	46
8.1 Obtención y mantenimiento de cultivos celulares	
8.2 Ensayos de transfección y silenciamiento genético (shRNA)	
	5

	8.3 Aislamiento de RNA y RT-qPCR46
	8.4 Extracción de proteínas y Western Blot
	8.5 Fragmentación de la cromatina y purificación del DNA49
	8.6 Inmunoprecipitación de la cromatina asociada a PCR cuantitativa (ChIP-qPCR)50
9.	Resultados53
	9.1. El silenciamiento genético de MEOX2 provoca cambios en los niveles de expresión del transcrito de los genes SOX2-OT, CBP y EZH253
	9.2. El silenciamiento genético de MEOX2 promueve cambios en los niveles de proteína de CBP y EZH2 en células de cáncer pulmonar54
	9.3. Análisis epigenético de las regiones promotoras del gen LncRNA SOX2-OT55
	9.4. Análisis qPCR curva estándar56
	9.5. El silenciamiento genético de MEOX2 provoca cambios en el enriquecimiento de las proteínas CBP y EZH2, así como alteraciones en las marcas de histonas de activación vs represión H3K27Ac <i>vs</i> H3K27me3 sobre las secuencias promotoras proximal vs distal del gen LncRNA SOX2-OT
10	). Discusión65
1	1. Conclusiones70
12	2. Perspectivas71
1:	3. Literatura citada72
14	4. Figuras Suplementarias94

## Índice de Figuras

Figura 1. Hallmarks del cáncer: nuevos mecanismos asociados a la progresión oncológica18
Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer alrededor del mundo en el año 202021
Figura 3. Incidencia y mortalidad del cáncer en México en el año 202021
Figura 4. Mecanismos de regulación epigenética
Figura 5. Clasificación de los LncRNAs de acuerdo con su posición en el genoma33
Figura 6. Mecanismos de regulación transcripcional mediante los arquetipos funcionales de los
LncRNAs
Figura 7. Síntesis de la estrategia experimental45
Figura 8. Análisis de los niveles de expresión a nivel de transcrito de MEOX2, CBP, EZH2 y
SOX2-OT (Variantes 1 y 6) bajo condiciones de silenciamiento genético de MEOX2 en células de
cáncer pulmonar A54953
Figura 9. Análisis del nivel de detección relativa de las proteínas de CBP y EZH2 bajo condiciones
de transfección de shRNAs anti-MEOX2 en células de cáncer pulmonar A54955
Figura 10. Análisis in silico de las secuencias promotoras del gen LncRNA SOX2-OT56
Figura 11. Análisis de resultados obtenidos mediante ensayos de curva estándar por PCR en
tiempo real57
Figura 12. Análisis de resultados obtenidos mediante ensayos de qPCR mediante el uso de DNA
genómico diploide para la obtención de amplificación de curvas estándar61
Figura 13. Análisis del enriquecimiento de las proteínas escritoras del código de histonas tanto
CBP como EZH2, así como de las marcas de histonas asociadas a activación/represión H3K27Ac
vs H3K27me3 sobre las secuencias promotoras del gen SOX2-OT bajo condiciones de
silenciamiento genético de MEOX2 por shRNAs en células de cáncer pulmonar A54963
Figura 14. Análisis del enriquecimiento de las proteínas CBP y EZH2, así como de las marcas
de histonas asociadas con activación versus represión H3K27Ac vs H3K27me3 sobre las

secuencias	promotoras	del gen	SOX2-OT	bajo	condiciones	de	silenciamiento	de	MEOX2	en
células de c	áncer pulmo	nar A549	)							64

## Índice de Tablas

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos empleados en los ensayos RT-qPCR47
Tabla 2. Secuencias promotoras empleadas en los ensayos ChIP-qPCR
Tabla 3. Diseño de placa para los ensayos de curva estándar por qPCR. 58
Tabla 4. Preparación de reactivos y soluciones de trabajo para ensayos de curva estándar por
qPCR
Tabla 5. Material empleado para la realización de las diluciones seriales correspondientes59
Tabla 6. Diseño de placa para ensayos de ChIP-qPCR. 59
Tabla 7. Preparación de reactivos y soluciones de trabajo para ensayos ChIP-qPCR. 59
Tabla 8. Material utilizado para llevar a cabo las diluciones seriadas correspondientes60

#### Glosario de Abreviatura

5mC: 5-metilcitosina. 5hmC: 5-hidroximetilcitosina. A: Adenina. ACT-seq: Secuenciación de Tagmentación de Cromatina guiada por Anticuerpos ADC: Adenocarcinoma. ADP: Adenosín Difosfato. AIS: Adenocarcinoma in situ. **AKT:** Proteína Cinasa de Serina/Treonina. ALK: Receptor de Cinasa de Linfoma Anaplásico. **bHLH:** Hélice-Loop-Hélice básica. BRAF: Homólogo B del oncogén viral del sarcoma murino v-Raf. **bZIP:** Cremallera de Leucina básica. C: Citosina. **CBP:** Proteína de unión a CREB. **CDKN2A:** Inhibidor de Cinasa Dependiente de Ciclina 2A. cDNA: DNA complementario. C/EBPB: Proteína de unión al enhancer de CCAAT. ceRNA: RNA endógenos competidores. CGI: Islas CpG.

ChIP: Inmunoprecipitación de la cromatina. ChIP-qPCR: Inmunoprecipitación de la Cromatina Asociada con Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa. CK5: Citoqueratina 5. **CK6:** Citoqueratina 6. DBD: Dominio de unión al DNA. DEPC: Pirocarbonato de Dietilo. **DNA:** Ácido Desoxirribonucleico. DNA-IP: DNA Inmunoprecipitado. **DNMT:** DNA metiltransferasa. **DNMT1:** DNA metiltransferasa 1. DNMT3B: DNA metiltransferasa 3 Beta. EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético. EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico. **EML4:** Proteína tipo 4 Asociada a Microtúbulos de Equinodermo. EMT: Transición Epitelio-Mesénguima. ERK: MAPK Reguladora de la Señal Extracelular. EZH2: Enhancer de Zeste homólogo 2. FoxO1: Caja de Cabeza de Horquilla O1. G: Guanina.

**G2:** Fase de Crecimiento Celular 2. GAPDH: Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa. GAX: Homeobox Específico de Detención del Crecimiento. **GB**: Glioblastoma. GLI-1: Dedo de Zinc de la familia GLI 1. GTP: Trifosfato de Guanosina. GTPasa: Trifosfatasa de Guanosina. H3K27Ac: Acetilación de la Lisina 27 de la Histona 3. H3K27me3: Trimetilación de la Lisina 27 de la Histona 3. H3K4me3: Trimetilación de la Lisina 4 de la Histona 3. H3K9me3: Trimetilación de la Lisina 9 de la Histona 3. H4K20me3: Trimetilación de la Lisina 20 de la Histona 3. **HAT:** Histona Acetiltransferasa. HDAC: Histonas desacetilasa. HER2: Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano. HMG-box: Caja de Grupo de Alta Movilidad.

HOTAIR: RNA Antisentido de Transcripción de HOX. HOX: Genes relacionados con Homeobox. HOXA9: Homeobox A9. HOXB3: Homeobox B3. HPRT1: Hipoxantina Fosforribosiltransferasa 1. **IGV:** Integrative Genomics Viewer. JAK: Janus cinasa. JNK: c-Jun N-terminal cinasa. KRAS: Kristen Rat Sarcoma. LCC: Carcinoma de Células Grandes. LINC00519: RNA Largo Intergénico no codificante 519. LINE-1: Elemento Nuclear Largo Intercalado 1 LncRNA: RNA largo no codificante. M: Mitosis. MALAT1: Transcripción de 1 Adenocarcinoma de Pulmón Asociado a Metástasis. MAPK: Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos.

MAX: Factor X asociado a MYC.

**MEK:** Proteína Cinasa Cinasa Activada por Mitógeno.

MEOX2: Mesénquima Homeobox-2.

MET: Tirosina-Proteína Cinasa Met.

MIA: Adenocarcinoma Mínimamente Invasivo.

**mESC:** Células Troncales Embrionarias de ratón.

MIR22HG: Gen Huésped MIR22.

miRNA: micro RNA.

mRNA: RNA mensajero.

MYC: Protooncogén MYC.

NCI: Instituto Nacional del Cáncer.

ncRNA: RNAs no codificantes.

**NF-κB:** Factor Nuclear kappa B subunidad 1.

NHR: Receptor de Hormona Nuclear.

**NSCLC:** Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas.

**Oct4:** Factor de Transcripción de Unión a Octámero 4.

**ORF:** Marco de Lectura Abierto.

p16INK4A: Inhibidor 2A de CinasaDependiente de Ciclina.

**p21:** Inhibidor 1 de la Cinasa Dependiente de Ciclina.

p27KIP1: Inhibidor 1B de Cinasa Dependiente de Ciclina. p300: Proteína de Unión a E1A p300. p40: Subunidad Beta de la Interleucina 12. p53: Proteína Tumoral p53. p63: Proteína Tumoral p63. pb: Pares de bases. PBS: Solución Salina Tamponada con Fosfato. PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinasa. piRNA: RNA que interacciona con PIWI. PRC: Complejo Represivo Polycomb. PRC2: Complejo Represivo Polycomb 2. PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3fosfatasa. **PVDF:** Difluoruro de Polivinilideno. **RAF:** Protooncogén Raf-1, serina/treonina cinasa. **RAS:** Rat Sarcoma RB1: Retinoblastoma 1. RNA Pol II: RNA polimerasa II.

RNA: Ácido Ribonucleico.

RNP: Ribonucleoproteínas.

rRNA: RNA ribosomal.

RT-qPCR: Reacción en Cadena de la SWI/SNF: SWItch/Sacarosa No Polimerasa cuantitativa Fermentable. con Retrotranscripción. T: Timina. SCC: Carcinoma de Células Escamosas. **TBST:** Solución Salina Tamponada con Tris SCLC: Cáncer de Pulmón de Células v Polisorbato 20. Pequeñas. TE: Tris-EDTA. SCR: Scrambled. TET: Traslocación diez-once SE: Error Estándar. TF: Factor de transcripción. shRNA: RNA de horquilla corta. TKI: Inhibidores de Tirosina-Cinasa. siRNA: RNA de interferencia corto. TP53: Gen codificante de la Proteína SLUG: Represor Transcripcional 2 de la Tumoral p53. Familia Snail. tRNA: RNA de transferencia. SNC: Sistema Nervioso Central. TSS: Sitio de Inicio de la Transcripción. snoRNA: RNA pequeños nucleolares. TTF1: Factor de Transcripción Tiroideo 1. snRNA: RNA nucleares pequeños. TWIST1: Factor de Transcripción bHLH de la SOX2: SRY-box2 (Región determinante del Familia Twist 1. Sexo Y-box 2). **U1:** RNA spliceosomal U1. SOX2-OT: Transcripción Superpuesta de WGA: Amplificación del Genoma Completo. SOX2. Wnt: Sitio de integración relacionado con SOX4: SRY-box4 (Región determinante del Wingless. Sexo Y-box 4). YAP1: Regulador Transcripcional Asociado STAT: Transductor de Señal y Activador de a Yes1. la Transcripción. **ZEB1:** Homeobox de unión E-box de dedos STAT3: Transductor de Señal y Activador de de Zinc 1. la Transcripción 3. ZF: C2H2-Dedo de Zinc.

#### Resumen

Introducción: El cáncer pulmonar representa un grave problema de salud pública, ocupando el segundo y primer lugar en incidencia y mortalidad, respectivamente, relacionado a neoplasias malignas a nivel mundial. La regulación epigenética mediada por los complejos Trithorax y Polycomb juegan un papel importante en el entendimiento de los mecanismos de desregulación génica y la progresión tumoral en cáncer pulmonar, donde sus subunidades catalíticas CBP y EZH2, participan en la catalización de marcas de histonas asociadas con la activación o represión transcripcional H3K27Ac y H3K27me3, respectivamente. Se ha demostrado que la sobreexpresión de genes tipo Homeobox (HOX) como MEOX2, así como la sobreexpresión de RNAs largos no codificantes (LncRNAs), entre otros como SOX2-OT, relacionados a genes HMGbox (Caja de Grupo de Alta Movilidad), poseen la capacidad de participar en la progresión histopatológica del cáncer pulmonar. Así mismo, estudios previos han demostrado que el factor de transcripción MEOX2 es capaz de posicionarse sobre el genoma del cáncer pulmonar, ubicándose así, como un posible regulador transcripcional y epigenético en este tipo de neoplasia. No obstante, se desconoce si MEOX2 posee la capacidad de modular la expresión del LncRNA SOX2-OT en cáncer pulmonar. Metodología: A partir de la línea celular A549 bajo condiciones de silenciamiento genético de MEOX2 por RNA de horquilla corta (shRNA) se realizaron técnicas de RT-qPCR para dilucidar los cambios en la expresión de los genes MEOX2, SOX2-OT, CBP y EZH2, así como los niveles de proteína de MEOX2, CBP y EZH2 mediante ensayos Western Blot. Posteriormente, mediante ChIP-qPCR se analizaron los niveles de enriquecimiento de CBP, EZH2, H3K27Ac y H3K27me3 sobre las secuencias promotoras de SOX2-OT influenciados por la presencia/ausencia de MEOX2. Resultados: Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la disminución en la expresión de MEOX2 promueve un aumento en la expresión del LncRNA SOX2-OT, además de promover cambios en los niveles de expresión de CBP y EZH2 en células de cáncer pulmonar A549, señalando experimentalmente, que MEOX2 regula

14

negativamente la expresión del LncRNA SOX2-OT mediante los cambios en el enriquecimiento de los perfiles epigenéticos asociados al código de histonas H3K27Ac/H3K27me3 versus CBP/EZH2 sobre sus regiones promotoras. **Conclusión:** El factor de transcripción MEOX2 es capaz de regular negativamente la expresión génica del LncRNA SOX2-OT mediante la disminución en el enriquecimiento de la marca de histona H3K27Ac sobre su secuencia promotora proximal, en células de cáncer pulmonar A549.

#### Abstract

Introduction: Lung cancer represents a serious public health problem, ranking second and first in incidence and mortality, respectively, related to malignant neoplasms worldwide. The epigenetic regulation mediated by the Trithorax and Polycomb complexes play an important role in understanding the mechanisms of gene dysregulation and tumor progression in lung cancer, where their catalytic subunits CBP and EZH2 participate in the catalyzation of histone marks associated with the H3K27Ac and H3K27me3 transcriptional activation or repression, respectively. It has been shown that the overexpression of Homeobox-type genes (HOX) such as MEOX2, as well as the overexpression of long non-coding RNAs (LncRNAs) such as SOX2-OT, related to HMG-box genes (High Mobility Group Box), have the ability to participate in the histopathological progression of lung cancer. Likewise, previous studies have shown that the transcription factor MEOX2 is capable of positioning itself on the lung cancer genome, thus positioning itself as a possible transcriptional and epigenetic regulator in this type of neoplasm. However, it is unknown whether MEOX2 has the capacity to modulate the expression of LncRNA SOX2-OT in lung cancer. Methodology: From the A549 cell line under conditions of genetic silencing of MEOX2 by short hairpin RNA (shRNA), RT-qPCR techniques were performed to elucidate the changes in the expression of the MEOX2, SOX2-OT, CBP and EZH2 genes, as well as the protein levels of MEOX2, CBP and EZH2 by Western Blot assays. Subsequently, using ChIP-qPCR, the enrichment levels of CBP, EZH2, H3K27Ac and H3K27me3 on the promoter sequences of SOX2-OT influenced by the presence/absence of MEOX2 were analyzed. Results: The results obtained in the present work suggest that the decrease in the expression levels of MEOX2 promotes an increase in the expression of the LncRNA SOX2-OT, in addition to promoting changes in the expression levels of CBP and EZH2 in A549 lung cancer cells, indicating experimentally that MEOX2 negatively regulates the expression of LncRNA SOX2-OT through changes in the enrichment of the associated epigenetic profiles of the histone code 16 H3K27Ac/H3K27me3 versus CBP/EZH2 on their promoter regions. **Conclusion:** The transcription factor MEOX2 is capable of negatively regulating the gene expression of the LncRNA SOX2-OT by decreasing the enrichment of the histone mark H3K27Ac on its proximal promoter sequence, in A549 lung cancer cells.

#### 1. Introducción

#### 1.1 El cáncer y sus implicaciones

El cáncer es un conjunto de enfermedades genéticas en donde algunas células del cuerpo presentan una desregulación en el control de su ciclo celular causando un aumento en su proliferación. Muchas veces, esta proliferación descontrolada permite que las células puedan diseminarse a otras partes del cuerpo causando lo que se conoce comúnmente como metástasis (NCI, 2022). En este sentido, se ha propuesto que el cáncer tiene una serie de características atribuibles las cuales denominaron como "hallmarks" que están involucrados en los procesos de mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de supresores de crecimiento, resistencia a la apoptosis, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis, activar la invasión y metástasis, reprogramación del metabolismo celular, evasión de la destrucción inmunitaria, inflamación promotora de tumores, inestabilidad genómica y mutaciones, desbloqueo de la plasticidad fenotípica, reprogramación epigenética no mutacional, microbiomas polimórficos y células senescentes (Hanahan, 2022).



**Figura 1. Hallmarks del cáncer: nuevos mecanismos asociados a la progresión oncológica.** (Tomado y modificado de Hanahan, 2022).

Estas alteraciones pueden estar relacionadas con factores físicos, químicos y biológicos debido a que pueden causar daños o modificaciones en la estructura del DNA. Entre las alteraciones genómicas más comunes encontramos a las sustituciones, inserciones o eliminaciones de secuencias genómicas largas o cortas, variaciones en el número de copias, amplificación genómica y reordenamientos. Además de los eventos genómicos, también encontramos modificaciones epigenéticas que participan en la adquisición de "hallmarks" así como en la progresión tumoral. Dichas modificaciones no alteran directamente la secuencia primaria del DNA, sino que comprenden a los cambios en la metilación del DNA, modificaciones de histonas, remodelamiento de nucleosomas y la expresión de RNAs no codificantes (ncRNAs) (Chakravarthi et al., 2016).

Estos procesos normalmente involucran la ganancia o pérdida de función de genes maestros conocidos como protooncogenes y genes supresores de tumor que participan en la progresión del ciclo celular o en la reparación del daño al DNA. Los protooncogenes, son genes que promueven la tumorigénesis debido a que pueden funcionar como factores de crecimiento, transductores de señales celulares y factores de transcripción nuclear. Mientras que los genes supresores de tumor regulan el funcionamiento adecuado del ciclo celular mediante la activación de puntos de control (checkpoints) que son necesarios para evitar el desarrollo del cáncer ya que evitan la progresión del ciclo celular si se encuentran daños en las secuencias genéticas y activan la apoptosis si estás no son reparadas (Bashyam et al., 2019; Kontomanolis et al., 2020).

Entre los oncogenes se encuentran factores de transcripción como MYC que se encuentran frecuentemente desregulados en más del 70% de los cánceres humanos, cuya participación está asociada con la transcripción de genes que promueven la activación de diferentes vías de señalización que permiten la transformación maligna y la progresión tumoral. Uno de los primeros factores de transcripción que se ha descrito interactúa con MYC, fue el factor

19

de transcripción MAX, en dónde ambos forman un complejo de interacción con el DNA que promueven la proliferación celular y la unión de complejos remodeladores de la cromatina que permiten la activación o represión de otros genes (Lourenco et al., 2021; Madden et al., 2021).

Por otro lado, uno de los supresores de tumor más relevantes en cáncer es el gen *TP53*, que es conocido como "el guardián del genoma" debido a su importancia en la progresión del ciclo celular y la apoptosis. Se ha reportado que la mutación o inactivación de TP53, está asociada con la ganancia o pérdida de función que puede llevar a la desregulación de las vías involucradas en los procesos del ciclo celular, apoptosis y reparación del DNA (funciones canónicas), así como con la autofagia, angiogénesis, metabolismo celular y control de micro RNAs (miRNAs) (funciones no canónicas), en diferentes tipos de cáncer (Tanaka et al., 2018). Un ejemplo de esto, es la facilitación de la transición epitelio mesénquima (EMT) modulada por la unión directa de su proteína codificada p53 con el promotor de miR-130b en cáncer de endometrio (P. Dong et al., 2013).

#### 1.2 Cáncer pulmonar

En 2020 el cáncer se ubicó como una de las principales causas de muerte a nivel mundial, atribuyéndole alrededor de 10 millones de defunciones, siendo el cáncer de pulmón el segundo tipo de cáncer más incidente y la primera causa de muerte con 2.21 millones de nuevos casos y 1.8 millones de decesos respectivamente (Sung et al., 2021).



**Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer alrededor del mundo en el año 2020.** Se muestran la incidencia y mortalidad del cáncer alrededor del mundo para todas las edades, en ambos sexos, en el año 2020. (Tomado y modificado de GLOBOCAN). Disponible en: <u>https://gco.iarc.fr/today</u>.

En México, el cáncer de pulmón ocupa el séptimo y cuarto lugar en incidencia y mortalidad con 7 588 nuevos casos y 7 100 muertes, respectivamente (Ferlay et al, 2020).



**Figura 3. Incidencia y mortalidad del cáncer en México en el año 2020.** Se muestran la incidencia y mortalidad del cáncer en México para todas las edades, en ambos sexos, en el año 2020. (Tomado y modificado de GLOBOCAN). Disponible en: <u>https://gco.iarc.fr/today</u>.

#### 1.2.1 Factores de riesgo en cáncer pulmonar

Si bien, la aparición del cáncer pulmonar sigue siendo atribuida al tabaquismo, existen otros factores de riesgo como la exposición a contaminantes ambientales, así como ocupacionales, la dieta, la predisposición genética y los factores epigenéticos que contribuyen al desarrollo y progresión de esta neoplasia maligna (Barta et al., 2019; Malhotra et al., 2016).

El humo de cigarro contiene múltiples carcinógenos y partículas que se depositan sustancialmente en los pulmones, donde sus mecanismos de carcinogénesis influyen en la formación de aductos del DNA, sus metabolitos y el daño causado por la formación de radicales libres. Si bien, el consumo de tabaco con el paso de los años se ha venido modificando, el tabaquismo sigue siendo la principal causa de cáncer pulmonar (Bade y Dela Cruz, 2020). Adicionalmente, la exposición al humo de cigarro de segunda mano, así como el uso de cigarros electrónicos se ha visto relacionado con el riesgo de cáncer pulmonar (Kim et al., 2015; Park et al., 2014).

Por otra parte, se ha encontrado que el cáncer pulmonar asociado a la exposición a contaminantes ocupacionales representa el 15% del total de casos de cáncer pulmonar y el 50% de los cánceres ocupacionales, donde para esta último es la causa más frecuente de muerte (Markowitz y Dickens, 2020). En 2015, un estudio reportó que aproximadamente 525 000 muertes fueron causadas por cáncer pulmonar asociada a la exposición a contaminantes ocupacionales como el asbesto, arsénico, berilio, cromo, sílice, hidrocarburos aromáticos policíclicos y níquel (GBD 2015 Risk Factors Collaborators, 2016).

Adicionalmente, se ha determinado que el consumo de frutas, verduras, cereales y fibra está asociado con un menor riesgo de padecer cáncer pulmonar, mientras que, de manera contraria, el consumo de carnes rojas y procesadas está asociado con un mayor riesgo (Sun et al., 2016; Wei et al., 2021).

22

#### 1.2.2 Clasificación histopatológica del cáncer pulmonar

De acuerdo con el tipo histopatológico, el cáncer pulmonar se clasifica en 2 categorías: *i)* el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), el cual representa cerca del 15% del total de casos, y *ii)* el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), representando cerca del 85% de casos restantes (Thai et al., 2021).

El SCLC es un carcinoma neuroendocrino de alto grado cuya incidencia ocurre en pacientes predominantemente fumadores, tiene un pronóstico malo y se caracteriza por formar una masa tumoral conformada por células pequeñas de forma redondeada a fusiforme, con poco citoplasma, cromatina nuclear finamente granular y con ausencia de nucleolos, que se ubicada en el centro del pulmón, frecuentemente está asociada con ganglios linfáticos voluminosos, metástasis a distancia en el momento de su diagnóstico y con la expresión del factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1). Si bien, el SCLC suele ser una neoplasia homogénea de acuerdo con sus características histopatológicas, actualmente se reconocen dos subtipos histológicos: el SCLC puro que representa el 80% de los casos y el SCLC con componentes de NSCLC o combinado, que representa el 20% restante. Las mutaciones mayormente presentes en este tipo de neoplasia surgen en los genes supresores de tumor *TP53* y retinoblastoma 1 (*RB1*) (Basumallik y Agarwal, 2023; Rudin et al., 2021).

Por otra parte, el NSCLC presenta características histopatológicas heterogéneas por lo que, de acuerdo a la OMS, actualmente puede subdividirse a su vez en 3 subtipos patológicos principales: adenocarcinoma de pulmón (ADC), carcinoma de células escamosas (SCC) y carcinoma de células grandes (LCC) (Duma et al., 2019).

El adenocarcinoma (ADC) es el subtipo más común en cáncer pulmonar y su incidencia ha ido en aumento en los últimos años, representando aproximadamente más de un 40% del total de casos y el 60% del NSCLC. Se caracteriza por ser una neoplasia epitelial maligna con diferenciación glandular o producción de mucina, además de formar una masa periférica con fibrosis central y arrugas pleurales. Comúnmente las células de adenocarcinoma suelen expresar marcadores neumocíticos como napsina A o TTF1 (Yatabe et al., 2019). El ADC, se puede subdividir a su vez en adenocarcinoma in situ (AIS), adenocarcinoma mínimamente invasivo (MIA) y adenocarcinoma invasivo. El AIS se define como una proliferación pequeña ≤3cm de neumocitos atípicos con un patrón lepídico puro, en su gran mayoría no son mucinosos, sin embargo, cuando lo son presentan células caliciformes columnares altas que tienen abundante mucina apical. El MIA consiste en adenocarcinomas predominantemente lepídicos aproximadamente de ≤3cm con un área de invasión de ≤0.5cm, la mayoría de estos no son mucinosos (Barrionuevo y Dueñas, 2019; Travis, 2020). El adenocarcinoma invasivo se define como un tumor de >3cm de tamaño total con invasión linfática, vascular o pleural de >5mm. Este puede estar situado en la periferia del pulmón en donde suelen ser pequeños y subpleurales, pero también pueden ser grandes y centrales. Si bien la mayoría de los adenocarcinomas invasivos muestran una subtipificación lepídica, se pueden presentar patrones de tipo acinar, papilar, micropapilar, cribiforme y sólido, así como presentar o no mucina (Lambe et al., 2020; Nicholson et al., 2022).

El SCC constituye aproximadamente el 20% de los cánceres de pulmón y su incidencia ha disminuido debido al cambio en el hábito de fumar. Comúnmente aparece en la porción central del pulmón a lo largo de las principales vías respiratorias y puede formar cavidades cuando alcanza un gran tamaño. Las células tumorales exhiben un crecimiento anidado sólido y núcleos hipercromáticos, queratinización, puentes intercelulares y formación de perlas de queratina, además de carecer de estructuras glandulares o mucina. Cuando hay una pobre diferenciación tumoral se utilizan marcadores como p40, CK5/6 y p63 para demostrar la diferenciación escamosa. El SCC se subdivide en queratinizante, no queratinizante y basaloide (Inamura, 2017).

El LCC representa menos del 3% del total de casos de cáncer pulmonar y es la minoría de casos de NSCLC. Generalmente se ubica en la periferia y presenta un aspecto voluminoso y necrótico. Las células tumorales son alargadas, de forma poligonal con núcleos pleomórficos o vesiculares y forman nidos o láminas sólidas sin patrones. Este subtipo se suele diagnosticar cuando se descartan los otros subtipos histológicos (M. Zheng, 2016).

#### 1.2.3 Clasificación molecular del cáncer pulmonar

Así como la clasificación histopatológica ha servido para el buen diagnóstico de la enfermedad, se han identificado alteraciones genéticas que fungen un papel como biomarcadores que podrían ser de suma importancia en la elección del tratamiento clínico para esta neoplasia, siendo las mutaciones en el protooncogén Kristen Rat Sarcoma (*KRAS*), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), el receptor de Cinasa de Linfoma Anaplásico (*ALK*), el protooncogén *MET*, el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*HER2*) y el protooncogén *BRAF*, las más frecuentes (Thai et al., 2021).

El oncogén *KRAS* es la mutación conductora más común en el NSCLC debido a que está presente en el 30% de los casos, siendo el ADC pulmonar el más frecuente. *KRAS* codifica para una trifosfatasa de guanosina unida a la membrana (GTPasa) que en su forma activa (unida al trifosfato de guanosina; GTP) participa en la regulación de las vías de señalización involucradas con los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Reck et al., 2021). Se ha encontrado que la mayoría de mutaciones asociadas a este gen representan una desregulación en el estado unido a GTP que le confiere actividad asociada con la formación y progresión tumoral, detectándose que las principales mutaciones están presentes en el codón 12, que se correlaciona con el humo de tabaco, seguidas por las mutaciones en los codones 13 y 61 (Aran y Omerovic, 2019; Taus et al., 2021). Las variaciones más frecuentes en el codón 12

son la sustitución de glicina por cisteína (G12C), la sustitución de glicina por valina (G12V) y la sustitución de glicina por ácido aspártico (G12D); mientras que las variaciones más frecuentes para los codones 13 y 61 son la sustitución de glicina por ácido aspártico (G13D) y la sustitución de glutamina por histidina (Q61H), respectivamente (Ricciuti et al., 2022).

Las mutaciones en EGFR están presentes en el 17% de los casos de NSCLC y alrededor del 15% de los casos de ADC pulmonar en personas no fumadoras o que fuman con poca frecuencia, además, se ha visto que las mutaciones en EGFR presentan sensibilidad a la terapia dirigida con inhibidores de tirosina-cinasa (TKIs). Las mutaciones de EGFR se pueden encontrar entre los exones 18 y 21, siendo la deleción en el exón 19 y la mutación puntual L858R del exón 21 las más comunes, sin embargo, existen mutaciones poco frecuentes que le confieren resistencia primaria a los TKIs como erlotinib, afatinib y poziotinib (Cha et al., 2012; Elamin et al., 2019; Estrada-Bernal et al., 2018). Las mutaciones en este gen están asociadas a la activación de la vía de señalización de EGFR promoviendo las señales de supervivencia y evasión a la apoptosis como PI3K/AKT y MAPK/ERK (Baraibar et al., 2020).

Las mutaciones en ALK ocurren alrededor del 2-7% de los casos de NSCLC y comúnmente se presentan como reordenamientos cromosómicos, siendo el reordenamiento de EML4-ALK el más frecuente en jóvenes con un consumo de tabaco nulo o leve. Estos reordenamientos cromosómicos dan lugar a proteínas de fusión oncogénicas con efectos superiores de actividad de la tirosina cinasa. Se ha visto que los tumores con presencia de reordenamiento en ALK son sensibles a lorlatinib, un TKI de tercera generación. Sin embargo, hay mutaciones secundarias como L1196M y G1269A que le confieren resistencia (Gainor et al., 2016; Suster y Mino-Kenudson, 2020).

El oncogén *MET* codifica para un receptor con actividad de tirosina cinasa que participa en la activación de las vías de señalización involucradas en la proliferación, supervivencia y

26

crecimiento celular, así como desempeñando un papel en el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas y la regeneración de tejidos. Las mutaciones, amplificaciones y la sobreexpresión de proteínas pueden provocar la activación oncogénica de la señalización mediada por MET, siendo la deleción del exón 14 la más frecuente, sin embargo, se ha encontrado que su amplificación y aumento en el número de copias confiere un mecanismo de resistencia a los TKIs de primera generación como crizotinib en NSCLC (Fujino et al., 2019). Las mutaciones en el protooncogén *MET* se observan en aproximadamente el 3-4% de los casos totales de NSCLC y generalmente ocurre en ausencia de otro tipo de mutaciones conductora (Socinski et al., 2021).

*HER2* desempeña un papel importante en el crecimiento, proliferación, diferenciación, migración y resistencia a la apoptosis. Se ha informado que las mutaciones y amplificaciones de *HER2* representan aproximadamente el 5% de los casos en NSCLC y una mayor incidencia en pacientes no fumadores con ADC lepídico. La mayoría de las mutaciones (80-90%) se presentan en el exón 20 y se caracterizan por una duplicación/inserción de 12 pares de bases (pb) en la secuencia de aminoácidos YVMA dando como resultado un aumento en la actividad de la cinasa HER2 provocando una mejor señalización de las vías río abajo, causando una mayor supervivencia, invasividad y tumorigenicidad (Fois et al., 2021; Rodriguez-Canales et al., 2016).

El oncogén *BRAF* está involucrado en las vías de señalización RAS/RAF/MEK/ERK, pues cuando está activado por mutaciones oncogénicas fosforila a MEK promoviendo la proliferación, crecimiento y supervivencia celular. Las mutaciones en *BRAF* están presentes entre el 1-3% de los casos en NSCLC siendo el ADC el más incidente. A diferencia de las mutaciones en *ALK* y *EGFR*, las mutaciones en *BRAF*, son más comunes en fumadores o exfumadores (Villalobos y Wistuba, 2017).

#### 1.3 Epigenética del cáncer pulmonar

A la fecha, un nuevo enfoque desde el análisis masivo de los mecanismos de regulación epigenética en cáncer de pulmón se ha consolidado con el estudio del epigenoma del cáncer pulmonar, cuyo entendimiento en la oncología actual juega un papel importante en la comprensión de los mecanismos de regulación de oncogenes versus genes supresores de tumor, así como genes involucrados en mecanismos de reparación, replicación y mantenimiento del DNA. Aunque las alteraciones genéticas somáticas desempeñan un papel importante en la progresión y desarrollo del cáncer pulmonar, se ha encontrado que las alteraciones epigenéticas, como los cambios en la metilación del DNA, la remodelación de la cromatina mediante la modificación postraduccional de las colas de histonas y la expresión aberrante de genes no codificantes, son más frecuentes en este tipo de neoplasia (Langevin et al., 2015).

#### 1.3.1 Metilación del DNA

Los cambios en la metilación del DNA son una desregulación epigenética que se caracteriza por la adición o disminución de un grupo metilo en la posición del carbono 5 en una base de citosina (5mC). Los procesos de adición covalente de un grupo metilo están mediados por enzimas DNA metiltransferasa (DNMT), mientras que la disminución de estos, está asociada a un proceso de hidroximetilación en 5mC (5hmC) mediado por enzimas de traslocación diezonce (TET) dioxigenasas (Shi et al., 2021). Estas modificaciones ocurren preferentemente en regiones genómicas enriquecidas con dinucleótidos CpG, las cuales son llamadas comúnmente como islas CpG (CGI), sin embargo, pueden ocurrir en los límites exón/intrón y regiones intergénicas. Las CGI están ubicadas cerca o dentro de regiones promotoras de genes, por lo que el cambio en el estado de metilación puede provocar la activación de protooncogenes, así como el silenciamiento de genes supresores de tumor, además de aumentar la inestabilidad 28

genómica y la expresión de segmentos móviles de material genético o elementos transponibles, como lo son los transposones y/o retrotransposones. Si bien, la pérdida de metilación o hipometilación genética se asocia comúnmente con la activación génica de oncogenes y elementos retrotansposones, se ha identificado que las células cancerosas presentan una ganancia de metilación o hipermetilación específica en el promotor de los genes supresores de tumor causando su inactivación (Hoang y Landi, 2022; Hong y Kim, 2020).

En este sentido, se ha visto que el gen elemento nuclear largo intercalado 1 (*LINE-1*), asociado a la metilación de las islas CpG, se encuentra hipometilado en cáncer pulmonar asociándose con un estadio avanzado de la enfermedad (IIa-IV) e invasión tumoral, así como con un mal pronóstico en adenocarcinoma pulmonar (Kitahara et al., 2020), mientras que la hipermetilación del gen supresor de tumor *CDKN2A/p16INK4A* se asociado con una supervivencia global pobre y se encuentra más frecuentemente en lesiones precursoras de NSCLC (Xing et al., 2013). Por otro lado, se ha reportado que la sobreexpresión de DNMTs es frecuente en cáncer pulmonar y juegan un papel importante en la transformación maligna, además de estar asociado con un mal pronóstico y progresión de la enfermedad. Se ha encontrado que el agotamiento de DNMT1 y DNMT3B provoca la detención del crecimiento, la apoptosis y la reactivación de genes supresores de tumor en células de cáncer pulmonar A549 y CALU-6 (Kassis et al., 2006).

#### 1.3.2 Modificación postraduccional de las colas de histonas

Además de los mecanismos epigenéticos de metilación aberrante del DNA, existen modificaciones epigenéticas postraduccionales de las colas de las histonas que también participan de manera activa durante los procesos de la carcinogénesis, progresión y malignidad del cáncer pulmonar. Dichas modificaciones alteran dinámicamente el estado de la cromatina 29 interfiriendo en los procesos transcripcionales (silenciamiento o activación génica) y en la estabilidad genómica. Estas modificaciones se producen a través de los cambios del dominio N-terminal por acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, ADP-ribosilación y desaminación de las colas de histonas (Peralta-Arrieta et al., 2019). Existen numerosas proteínas y complejos moleculares involucrados en la remodelación de la cromatina como las desacetilasas de histonas (HDAC) que participan en el proceso activo de desacetilación de histonas, acetiltransferasas de histonas (HAT) que participan en la acetilación de los residuos de lisina de las histonas, el complejo SWItch/Sacarosa no fermentable (SWI/SNF) que puede alterar los patrones de la expresión génica mediante el uso de ATP para reposicionar la participación de los nucleosomas y remodelar la cromatina y el complejo represivo Polycomb (PRC) involucrado en mecanismos de represión epigenética de la expresión génica mediante la modificación de histonas patronas o por la compactación directa de la cromatina (Quintanal-Villalonga y Molina-Pinelo, 2019).

En este sentido, se ha demostrado que la proteína con actividad HAT como es CBP (proteína de unión a CREB) es capaz de funcionar como andamio para el ensamblaje de complejos multiprotéicos y de interactuar con otros factores transcripcionales involucrados en la transcripción génica, además de encontrarse desreguladas en diferentes tipos de cáncer. Se ha observado que su expresión en cáncer pulmonar está asociada a distintos procesos de activación génica, además de ser uno de los genes mutados con más frecuencia (Quintanal-Villalonga y Molina-Pinelo, 2019; S. Zheng et al., 2021). Adicionalmente, se ha demostrado que la sobreexpresión de CBP en cáncer pulmonar favorece a la proliferación y migración celular mediante la regulación de las vías de señalización C-RAF/MEK/ERK, y citocromo C/caspasa (Tang et al., 2016; B. Zhang et al., 2020).

30

Por otra parte, la enzima EZH2 (Enhancer de Zeste homólogo 2), componente catalítico del complejo PRC2, es la encargada de catalizar la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) participando en el silenciamiento de una amplia gama de genes implicados en la diferenciación celular. Además, se ha encontrado que en cáncer pulmonar existe una alta expresión de EZH2 y está relacionada con un aumento en la gravedad de las lesiones preneoplásicas y favorece la carcinogénesis pulmonar (Behrens et al., 2013). Así mismo, se ha identificado que la marca de histona H4K20me3 disminuye durante los procesos de carcinogénesis pulmonar, y se asocian con mal pronóstico clínico (Van Den Broeck et al., 2008).

#### 1.3.3 Expresión aberrante de RNAs no codificantes (ncRNAs)

En los últimos años se ha identificado que la expresión aberrante de ncRNAs juegan un papel importante en la progresión neoplásica del cáncer pulmonar ya que están involucrados en el control del ciclo celular participando en los mecanismos de expresión génica, la regulación epigenética, la diferenciación, proliferación, migración y/o invasión celular, la apoptosis, la regulación postranscripcional del RNA mensajero (mRNA) y en el desarrollo embrionario, además de catalogarse como posibles biomarcadores pronóstico del cáncer pulmonar (Ghafouri-Fard et al., 2020; Hombach y Kretz, 2016). Los ncRNAs, se dividen en dos subclases de acuerdo a la función que realicen: Los ncRNA *"Housekeeping"* que incluyen a los RNAs de transferencia (tRNA) y ribosomal (rRNA), así como los RNA nucleares pequeños (snRNA) y pequeños RNA nucleolares (snoRNA), que desempeñan funciones primordiales en la biosíntesis de proteínas y los ncRNA "reguladores" que se subdividen en dos grupos por su tamaño; *i)* los ncRNA cortos (<200nt) que agrupan a los microRNA (miRNA), *ii)* RNA de interferencia cortos (siRNA) y *iii)* RNA que interactúan con la proteína PIWI (piRNA), así como *iv)* los ncRNA largos (LncRNAs) (>200 nt) (P. Zhang et al., 2019).

Se ha demostrado que los miRNAs son capaces de regular negativamente la expresión génica a nivel postranscripcional mediante la supresión de la traducción causada por la degradación de los mRNA mediante la unión en su extremo 3'-UTR, (Saw et al., 2021; Yan y Bu, 2021). En este sentido, miR-196a ha sido reportado como un posible estimulador de la proliferación y migración celular al dirigirse directamente a FoxO1, p27 y HOXA9 en cáncer pulmonar (Guerriero et al., 2017), mientras que miR-148a-3p es capaz de inhibir la proliferación celular, así como el fenómeno de la EMT mediante la modulación de la señalización RAS/MAPK/ERK en tumores pulmonares del grupo NSCLC (Xie et al., 2019).



**Figura 4. Mecanismos de regulación epigenética.** Se muestran los distintos mecanismos de regulación epigenética asociados a la regulación transcripcional. (Creada en BioRender).

#### 1.4 RNAs largos no codificantes (LncRNAs)

Como se mencionó anteriormente, los LncRNA son un tipo de RNA cuya extensión es superior a 200 nucleótidos de longitud, transcritos en su mayoría por acción de la RNA polimerasa II (RNA Pol II). Estos no presentan un marco de lectura abierto (ORF) y su nivel de expresión es relativamente bajo. Los LncRNAs a su vez, se pueden dividir en cinco categorías de acuerdo con su posición en el genoma: *i*) sentido o antisentido, *ii*) superpuestos, *iii*) bidireccionales, *iv*) intrónicos, *v*) intergénicos y *vi*) *enhancer* (Jarroux et al., 2017; Policarpo et al., 2021).



Figura 5. Clasificación de los LncRNAs de acuerdo con su posición en el genoma. (Tomado y Modificado de Policarpo, 2021).

Su ubicación sugiere diferentes funciones, pues se sabe participan en diversos procesos biológicos como la diferenciación celular, el desarrollo embrionario, la progresión tumoral, los mecanismos de regulación génica, así como en los mecanismos epigenéticos dentro de los cuales se encuentran la remodelación de la cromatina y los procesamientos postranscripcionales (Huang et al., 2021). A este respecto, se conoce que los LncRNAs pueden regular los 33 mecanismos de la transcripción mediante su arquetipo de señalización participando como señales moleculares exhibiendo mecanismos combinatorios entre factores de transcripción y vías de señalización bajo condiciones de estímulos externos participando como indicadores espaciotemporales de la regulación génica; actuando como señuelos a través de su unión a factores de transcripción, remodeladores de la cromatina u otros factores reguladores fuera de sus secuencias blanco impidiéndoles llevar a cabo su función; operando como guías reclutando proteínas de unión a RNA (RBP), enzimas remodeladores o modificadores de la cromatina a sus genes blanco ya sea en *cis* o *trans;* funcionando como andamios que estabilizan el ensamblaje de complejos remodeladores de la cromatina mediante la formación de complejos de ribonucleoproteínas (RNP) participando como plataformas moleculares; actuando como RNAs endógenos competidores (ceRNAs) mediante el mecanismo de esponjas de miRNAs evitándoles llevar a cabo su función represora (Herrera-Solorio et al., 2017).



Figura 6. Mecanismos de regulación transcripcional mediante los arquetipos funcionales de los LncRNAs. Tomado y modificado de Cheng, 2019.

#### 1.4.1 LncRNAs en cáncer pulmonar

En los últimos años, diversos estudios han demostrado que los LncRNAs se expresan de forma aberrante en diferentes tipos de neoplasias incluyendo el cáncer pulmonar. Se ha identificado que su transcripción puede facilitar la metilación de la marca de histona H3K4, y a su vez, ejercer su función a través del arquetipo funcional de andamiaje reclutando al complejo represivo Polycomb 2 (PRC2) provocando la escritura de la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3), sobre secuencias promotoras de genes supresores de tumor, así como genes tipo Homeobox, regulando su expresión génica. Además de poder actuar como oncogenes, o bien supresores de tumor, por sí solos como *HOTAIR* y *MIR22HG*, respectivamente (Jiang et al., 2021; Rinn et al., 2007; Yingchao Wang et al., 2016).

En este sentido, se ha descrito que la expresión del LncRNA LINC00519 es regulada mediante la marca de histona de activación H3K27Ac dependiente de CBP/P300 en cáncer pulmonar, influyendo en la progresión maligna de la enfermedad mediante la regulación del eje transcripcional LINC00519/miR-450b-5p-miR-515-5p/YAP1 (Ye et al., 2020). Así mismo, el LncRNA MALAT1 ha sido ampliamente estudiado en el contexto del cáncer pulmonar debido a que su sobreexpresión se asocia con mayor proliferación, migración e invasión celular (Jen et al., 2017), así como en la EMT y metástasis mediante la regulación del eje transcripcional MALAT1/miR-204/SLUG en tumores pulmonares tipo adenocarcinoma (J. Li et al., 2016), además de favorecer la progresión maligna del grupo NSCLC mediante el eje transcripcional MALAT1/miR-124/STAT3 (S. Li et al., 2018).

#### 1.5 Factores de Transcripción

Los factores de transcripción (TFs) son proteínas capaces de unirse mediante su dominio de unión al DNA (DBD) a secuencias cortas específicas de 6 a 12 pb denominados sitios motivo o elementos reguladores para estimular o inhibir la expresión génica, así como la síntesis de proteínas. Estos elementos reguladores pueden dividirse en 2: *i*) elementos cis-reguladores, ubicados río arriba, intrones o río abajo de los genes blanco, comprendiendo a los promotores,
*enhancer* y *silencers*, y *ii*) elementos trans-reguladores, ubicados en secuencias genómicas distantes de la secuencia primaria que regulan la expresión mediante su unión a los elementos cis-reguladores (Mitsis et al., 2020). Los TFs pueden reclutar directamente a la RNA polimerasa o a cofactores que participan en los cambios del entorno de la cromatina e iniciar con los mecanismos de transcripción. De igual forma, algunos TFs son capaces de unirse al DNA nucleosomal e iniciar el cambio o desplazamiento de nucleosomas mediante el reclutamiento de remodeladores de la cromatina como los complejos PRC y SWI/SNF (Lambert et al., 2018).

Los TFs se pueden agrupar en diferentes familias dependiendo del DBD que presenten. Algunas de estas familias son más representativas en los eucariotas debido a que contienen un mayor número de miembros. Un ejemplo de estas familias son las familias C2H2-dedo de zinc (ZF), homeodominio, hélice-loop-hélice básica (bHLH), cremallera de leucina básica (bZIP), receptor de hormona nuclear (NHR), grupos de alta movilidad (HMG) y caja de cabeza de horquilla (FOX) (Soto et al., 2022). Se conoce que los TFs se expresan de forma espacial y temporal durante los procesos de desarrollo, diferenciación o renovación celular, así como en la respuesta estimulante, por lo que cualquier cambio en su expresión conlleva a la desregulación de los procesos encargados de mantener la homeostasis celular, asociándose con diferentes patologías, incluyendo al cáncer (Vaquerizas et al., 2009).

En este sentido, se ha encontrado que la sobreexpresión de los TFs Kaiso y C/EBPβ en cáncer de mama triple negativo está correlacionada con estadios avanzados, así como con la EMT y los procesos de autofagia mediante la regulación de la expresión de ZEB1 y LC3A/B, y la regulación de la vía de señalización JAK/STAT, respectivamente (Bassey-Archibong et al., 2016; Singhal et al., 2021; S. Wang et al., 2021). Por otra parte, en el año 2014, Wang y colaboradores reportaron que el TF FOXM1 acelera el crecimiento tumoral e induce la activación de las vías de señalización NF-κB y JNK mediado por *KRAS* (G12D) en tumores pulmonares (I.-C. Wang et al.,

2014). Adicionalmente, se ha identificado que el TF SOX4 promueve la progresión tumoral en cáncer gástrico mediante la adquisición del fenotipo troncal y la expresión de factores asociados a la EMT como TWIST1 y Oct4 (Peng et al., 2017).

Uno de los TFs mayormente descritos en el contexto del cáncer, han sido los TFs pertenecientes a la familia homeodominio (genes Homeobox). Estos genes se caracterizan por la presencia de un homeodominio de unión al DNA hélice-vuelta-hélice altamente conservado de 60 aminoácidos y funcionan como factores de transcripción que pueden activar o reprimir la expresión de genes río abajo (Samuel y Naora, 2005). Los genes *HOX* están dispuestos en 4 grupos (A, B, C, D) conteniendo de 9 a 11 genes localizados en los cromosomas 7, 17, 12 y 2, respectivamente (Pai y Sukumar, 2020; Yu et al., 2020). Estos genes han sido ampliamente descritos debido a su participación en el desarrollo embrionario y la formación del eje anteroposterior, sin embargo, en la actualidad, se ha descrito que los genes Homeobox participan en varios procesos celulares como la proliferación, migración, diferenciación y apoptosis, además de estar presentes en la edad adulta desempeñando papeles en la renovación y mantenimiento celular, por lo que, han sido ampliamente relacionados con los procesos involucrados en la tumorigénesis, así como expresados de manera aberrante en diferentes tipos de neoplasias (Brotto et al., 2020).

A este respecto, se ha demostrado que la alta expresión de *HOXB3* promueve la proliferación e invasión celular en glioblastoma (GB) (Xu et al., 2018). Por otra parte, la expresión de *HOXA13* está asociada con un mal pronóstico en diferentes tipos de cáncer como GB, cáncer de próstata y cáncer gástrico, donde su expresión está asociada con un aumento en la proliferación, migración e invasión celular, resistencia a la apoptosis, así como con la activación de la vía de señalización Wnt/  $\beta$ -catenina (Y. Dong et al., 2017; Duan et al., 2015; Qu et al., 2017).

Si bien, los factores de transcripción pertenecientes a la subclase HOX han sido ampliamente descritos en los procesos neoplásicos, incluyendo al cáncer pulmonar, existen otros factores de transcripción tipo homeodominio como lo es MEOX2 que siguen sin estar bien caracterizados en este tipo de neoplasia.

#### 2. Antecedentes

#### 2.1 MEOX2 y su creciente importancia en cáncer

Mesénquima Homeobox-2 (MEOX2), también conocido como GAX (Homeobox Específico de Detención del Crecimiento) por su participación en la detención del ciclo celular, es un factor de transcripción ubicado en la posición 21.2 del brazo corto del cromosoma 7 (Ch7 p21.2) que se ha encontrado juega un papel importante en los procesos de carcinogénesis en diferentes tipos de neoplasias. En estudios anteriores, se ha catalogado a MEOX2 como un posible supresor de tumor debido a que su expresión se relaciona con la inhibición de la transición de células endoteliales a un fenotipo angiogénico, así como un inhibidor parcial de la EMT (Chen, Banda, et al., 2010; Chen y Gorski, 2008; Gorski y Leal, 2003; Valcourt et al., 2007). Además, se ha encontrado que MEOX2 es capaz de regular al alza la expresión de p16, p21 e INK4a (Chen et al., 2007; Douville et al., 2011; Irelan et al., 2009) y provocar la disminución de la actividad NF- κB (Chen, Rabson, et al., 2010; Patel et al., 2005).

Sin embargo, en 2008, un grupo de investigadores encontró que MEOX2 exhibía niveles de expresión más altos en muestras tumorales obtenidas de una cohorte de 20 pacientes con diagnóstico del grupo NSCLC, en comparación con muestras de tejido no-neoplásico obtenidas de 5 donantes histológicamente sanos, así como con un patrón de metilación más alto sobre su región 5'UTR, sugiriendo así una expresión alterada en tumores pulmonares (Cortese et al.,

2008). En este sentido, nuestro grupo de investigación ha descrito que la sobreexpresión de MEOX2 está mediada por la disminución de la marca de histona H3K27me3, acompañada del aumento de las marcas de histonas de activación H3K27Ac/H3K4me3 en sus secuencias promotoras, correlacionándose con pobre pronóstico clínico y pobre tasa de sobrevida, además de participar en mecanismos de quimio-resistencia a fármacos oncológicos, como cisplatino en células tumorales del grupo NSCLC (Ávila-Moreno et al., 2014).

Adicional a lo anterior, se ha descrito que MEOX2 es capaz de modular la expresión del gen *GLI-1* mediante el enriquecimiento de las marcas de histonas asociadas con activación de la expresión génica H3K4me3 y H3K27Ac sobre sus secuencias promotoras, influyendo en la capacidad de proliferación y migración celular, así como con la resistencia a la quimioterapia basada en cisplatino y pobre sobrevida global en pacientes del grupo NSCLC (Armas-López et al., 2017).

Adicionalmente, en el año 2022, se determinó que la sobreexpresión de MEOX2/GLI-1 se encuentra involucrada en la progresión tumoral y resistencia al tratamiento oncológico basado en EGFR-TKIs en células de cáncer pulmonar A549, además de contribuir a la progresión tumoral de cáncer pulmonar *in vivo*. En este sentido, la sobreexpresión de MEOX2/GLI-1 ha sido relacionada con la modulación epigenéticamente del gen *EGFR* mediante la reducción en el posicionamiento de EZH2, así como disminución de la histona H3K27me3, en contraste del aumento de las histonas H3K27Ac/H3K4me3 sobre las secuencias promotoras del gen *EGFR* (Peralta-Arrieta et al., 2022).

Por otra parte, Schönrock y colaboradores en 2022, identificaron que en GB existe una ganancia en el cromosoma 7 que está asociada con una alta expresión de MEOX2, donde su expresión se asocia a su vez con la fosforilación de ERK (elemento río abajo de la vía de señalización de las MAPK), así como con el crecimiento tumoral en modelos *in vivo*.

Adicionalmente, determinaron que la sobreexpresión de MEOX2 coopera con la pérdida de supresores tumorales canónicos en GB (PTEN y p53) para impulsar el crecimiento de modelos organoides cerebrales humanos. En este sentido, mediante análisis de secuenciación de tagmentación de cromatina guiada por anticuerpos (ACT-seq) seguido de análisis bioinformáticos, encontraron que el factor de transcripción MEOX2 puede posicionarse sobre oncogenes conocidos, así como en RNAs largos no codificantes (Schönrock et al., 2022).

#### 2.2 SOX2-OT en cáncer pulmonar

La expresión del transcrito del LncRNA SOX-OT, codificado en la cadena de polaridad positiva del gen SRY-box2 (*SOX2*), se encuentra ubicada en la banda 26.33 del brazo largo del cromosoma 3 (Ch3 q26.33), la cual consta de 10 exones y más de 2 sitios de inicio de la transcripción (TSS), además que esta puede generar al menos 8 variantes transcripcionales (Wang et al., 2020). Gracias a la presencia de un CAP 5' de 7-metilguanosina y la poliadenilación en su extremo 3', se sabe que es un LncRNA transcrito por la enzima RNA Pol II (Shahryari et al., 2015), como ocurre de manera común para los LncRNAs.

La expresión de SOX2-OT se encuentra relacionada con los procesos de regulación en la diferenciación celular, como de células madre embrionarias, y del sistema nervioso central "SNC" (Amaral et al., 2009), por lo que, la expresión en su conjunto con el oncogén *SOX2* localizado superpuesto con LncRNA SOX2-OT, participa en la progresión de diferentes enfermedades incluyendo el cáncer (Y. Li et al., 2020; Saghaeian Jazi et al., 2016a; W. Zhou et al., 2017).

Las evidencias acumuladas, indican que la expresión de SOX2-OT podría ser un biomarcador diagnóstico en cáncer debido a que su expresión se encuentra relaciona con los procesos de proliferación, invasión, migración y crecimiento de las células tumorales, así como con el fenómeno de la EMT y mecanismos de supresión de la apoptosis (P. Y. Li et al., 2020; Y. Li et al., 2020; Ying Wang et al., 2020).

En este sentido, en el año 2010 se reportó que la expresión de ambos, SOX2-OT y SOX2, en tumores del subtipo SCC de pulmón estaba asociada con amplificaciones o ganancias en la región citogenética 3q26.3, en contraste con muestras obtenidas de tejido no-tumoral, sugiriendo así un posible mecanismo de co-regulación génica, así como con la iniciación tumoral (Hussenet et al., 2010). Aunado a ello, en el año 2017, un grupo de investigadores mediante el análisis de anotación funcional de datos de micro-matrices de tumores del grupo NSCLC identificó que la expresión de SOX2-OT fue mayor en tumores del tipo histológico ADC y SCC (D. Zhou et al., 2017).

Por otro lado, se ha encontrado que la inhibición de la expresión del LncRNA SOX2-OT conduce a la disminución de la tasa de proliferación celular y la reducción del crecimiento de colonias celulares mediante el aumento de las células en la fase G2/M dependiente de la expresión de EZH2, así como con la pérdida de movilidad celular en muestras del grupo tumoral NSCLC (Hou et al., 2014; Saghaeian Jazi et al., 2016b).

Aunado a lo anterior, en 2021, se determinó que SOX2-OT modula la expresión del eje SOX2-OT/SOX2/GLI-1 a través de la modulación o enriquecimiento de las marcas de histonas de activación H3K4me3 y H3K27Ac, así como la disminución del código de histonas de represión H3K9me3 y H3K27me3 participando en la resistencia al inhibidor de tirosina cinasa (TKI) de EGFR, como es erlotinib, al igual que al tratamiento basado en cisplatino. Además, promovió la activación de la vía EGFR/AKT/ERK, resultando importante la reducción en la expresión del LncRNA SOX2-OT en cáncer pulmonar (Herrera-Solorio et al., 2021).

Adicionalmente, en el año 2022 Sulewska y colaboradores propusieron una firma de 14 LncRNAs diagnóstico para confirmar la detección de tumores pulmonares del grupo NSCLC, siendo el LncRNA SOX2-OT componente de dicha firma molecular (Sulewska et al., 2022).

#### 3. Planteamiento del problema

El cáncer pulmonar representa un problema grave de salud a nivel mundial, ocupando el segundo y primer lugar en incidencia y mortalidad, respectivamente, relacionado a neoplasias malignas en humanos. A este respecto, se ha documentado que la expresión de genes tipo Homeobox "HOX" como *MEOX2* y LncRNAs relacionados con genes HMG-Box como lo es *SOX2-OT*, poseen la capacidad de participar en los procesos moleculares de la progresión histopatológica en diferentes tipos de neoplasias malignas, incluyendo al cáncer pulmonar. Estudios previos han demostrado que el factor de transcripción MEOX2 es capaz de posicionarse sobre el genoma del cáncer pulmonar, ubicándolo así, como un posible regulador transcripcional y epigenético en este tipo de neoplasia. No obstante, se desconoce si MEOX2 posee la capacidad de regular la expresión del LncRNA SOX2-OT en cáncer pulmonar.

## 4. Pregunta de investigación

¿MEOX2 es capaz de modificar el entorno epigenético asociado a CBP y EZH2 sobre las secuencias promotoras del gen LncRNA *SOX2-OT* afectando su expresión génica en células de cáncer pulmonar?

## 5. Hipótesis

El factor de transcripción MEOX2 modula negativamente la expresión génica del LncRNA SOX2-OT mediante los cambios en el enriquecimiento de las enzimas CBP, EZH2 y las marcas de histonas asociadas H3K27Ac versus H3K27me3, sobre las secuencias promotoras del gen *SOX2-OT* en células de cáncer pulmonar.

## 6 Objetivos

## 6.1 General

Determinar si el factor de transcripción MEOX2 regula la expresión génica y/o cambios en el patrón epigenético de histonas del LncRNA SOX2-OT en células de cáncer pulmonar.

## 6.2 Particulares

- 1. Validar mediante ensayos RT-qPCR y Western Blot el silenciamiento genético mediante transfección estable por shRNA de MEOX2 en células de cáncer pulmonar A549.
- Determinar los efectos del silenciamiento genético de MEOX2 sobre la expresión génica de SOX2-OT en células de cáncer pulmonar A549.
- Evaluar la relación entre MEOX2 sobre los niveles de expresión del mRNA y proteína de CBP y EZH2 en células de cáncer pulmonar A549.
- 4. Analizar los cambios en el enriquecimiento de CBP y EZH2, así como las marcas de histonas de activación/represión H3K27Ac/H3K27me3, sobre las secuencias promotoras del gen SOX2-OT en presencia y/o ausencia del silenciamiento genético de MEOX2 en células de cáncer pulmonar A549.

#### 7. Síntesis de la estrategia experimental



**Figura 7. Síntesis de la estrategia experimental.** Flujo de trabajo donde se presentan los pasos seguidos a partir del silenciamiento genético mediante transfección estable por RNA de horquilla corta (shRNA) dirigidos contra del mRNA MEOX2 en la línea celular A549. La validación del silenciamiento genético de MEOX2 se realizó mediante RT-qPCR y Western Blot. El análisis de los niveles de expresión del LncRNA SOX2-OT, así como del mRNA de CBP y EZH2 se realizaron mediante RT-qPCR, y los niveles de proteína de CBP y EZH2 se evaluaron mediante Western Blot. El enriquecimiento de CBP, EZH2, así como de sus marcas de histonas asociadas H3K27Ac/H3K27me3 se evaluaron mediante ChIP-qPCR.

#### 8. Materiales y Métodos

#### 8.1 Obtención y mantenimiento de cultivos celulares

Las líneas celulares pulmonares A549 se obtuvieron de la American Type Culture Collection y se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% y ampicilina/estreptomicina al 1% (Biowest), a una temperatura de 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 8.2 Ensayos de transfección y silenciamiento genético (shRNA)

Para el silenciamiento genético de MEOX2 serán empleadas secuencias de DNA que codifican para RNA de horquilla corta (shRNA) dirigidos contra del mRNA MEOX2, así como una secuencia scrambled (SCR) como control negativo de transfección (Santa Cruz Biotechnology). Se realizaron cultivos celulares con densidad de 3x10<sup>5</sup> células en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 3% libre de antibiótico en placas de 6 pozos durante 12h. Posteriormente se evaluó el silenciamiento genético 48 horas después de la transfección.

#### 8.3 Aislamiento de RNA y RT-qPCR

Se aisló RNA total de la línea celular A549 mediante el método TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA se evaluó mediante el uso de un espectrofotómetro Implen NanoPhotometer™ NP80 UV/VIS. La síntesis de cDNA se realizó a partir de 5 µg de RNA total utilizando el kit de síntesis de cDNA RevertAid H Minus First Strand (Thermo Scientific) mediante el uso de hexámeros aleatorios. Los perfiles de expresión de

LncRNA y mRNA se determinaron mediante RT-qPCR utilizando 25 ng de cDNA y SYBR Green (RealQ Plus Master Mix; AMPLIQON) en un volumen final de 15 µL por reacción. La RT-qPCR se llevó a cabo utilizando el equipo de PCR LightCycler 480 System Real-Time (Roche, Alemania). Los niveles de expresión para mRNA y LncRNA se normalizaron con los genes endógenos *GAPDH*, *HPRT1*, *ACTB* y *U1* respectivamente. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las secuencias utilizadas para llevar a cabo la detección de expresión de mRNA y LncRNA se realizaron considerando un porcentaje de GC del 40% aproximadamente y una temperatura de alineamiento entre 55° y 60° C. Las secuencias de oligonucleótidos se indican en la tabla 1.

Gen	Secuencia genética	Producto esperado
GAPDH	Sentido 5'-CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC-3' Antisentido 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	119 pb
HPRT1	Sentido 5'-AAGGACCCCACGAAGTGTTG-3' Antisentido 5'-GGCTTTGTATTTTGCTTTTCCA-3'	157 pb
ACTB	Sentido 5'-GCGGGAAATCGTGCGTGACATT-3' Antisentido 5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3'	232 pb
U1	Sentido 5'-CCCTGCTCCAGTCGCTATC-3' Antisentido 5'-CCACGTCCGTCTGATTCC-3'	91 pb

 Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos empleados en los ensayos RT-qPCR.

Gen	Secuencia genética	Producto esperado
MEOX2	Sentido 5'-TCTGGGACCACCTTCTTTG-3' Antisentido 5'-CCACCACCCTCTGTCACTTT-3'	219 pb
CBP	Sentido 5'-AAAGCCTGCCAAGCCATCCT-3' Antisentido 5'-CCCTGTGCCAACAGAACCAA-3'	72 pb
EZH2	Sentido 5'-GTACACGGGGATAGAGAATGTGG-3' Antisentido 5'-GGTGGGCGGCTTTCTTTATCA-3'	176 pb
SOX2-OT (variante 1)	Sentido 5'-GCTCGTGGCTTAGGAGATTG-3' Antisentido 5'-CTGGCAAAGCATGAGGAACT-3'	116 pb
SOX2-OT (variante 6)	Sentido 5'-CCTCTTCTCAGGTGTAGATCACCTAT-3' Antisentido 5'-AACAGAGCTGTCTTGTAAGTGAGG-3'	114 pb

#### 8.4 Extracción de proteínas y Western Blot

La extracción de proteínas totales se realizó empleando buffer RIPA suplementado con inhibidores de proteasas (Mini complete, Roche, Indianapolis, IN, EE. UU.). La concentración de proteínas se determinó mediante el kit DC Protein Assay (Bio-Rad) con un espectrofotómetro de pocillos múltiples a 750 nm (EPOCH, BioTek Instruments, Winooski, VT, EE. UU.). Para el análisis Western Blot, se utilizaron 30 µg de proteína total, así como el marcador de peso molecular Trident Prestained Protein Ladder High Range (GTX50875) (GeneTex, Irvine, California, EE. UU.) para la electroforesis en geles al 8% y 10% de poliacrilamida a 120 V durante 90 minutos, posteriormente se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad)

a 300 mA durante 120 minutos. Para identificar la presencia de proteínas en las membranas de PVDF se tiñeron con Rojo de Ponceau y posteriormente se realizó un lavado con agua bidestilada durante 10 minutos. El bloqueo se realizó a temperatura ambiente durante 2h con TBS 1x-Tween 20 al 0.1% (TBST) con leche descremada al 5% (Blotting-Grade Blocker; Bio-Rad). La incubación del anticuerpo primario se realizó en leche descremada al 2% a 4°C durante toda la noche en las siguientes concentraciones: GAPDH 1:3000 (sc-47724) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EE. UU.), CBP 1:500 (GTX56255), EZH2 1:1000 (GTX82503) y MEOX2 1:3000 (GTX55157) (GeneTex, Irvine, California, EE. UU.). Posteriormente, se realizaron 3 lavados con TBST con una duración de 10 minutos cada uno y se incubaron en leche al 2% con anticuerpo secundario anti-conejo (GTX213110-01) o anti-ratón (GTX213111-01) (GeneTex, Irvine, California, EE. UU.) a una concentración 1:10000. Al término, se lavaron las membranas 3 veces con TBST y 1 vez con agua bidestilada con una duración de 10 minutos cada lavado. Finalmente, las proteínas se visualizaron utilizando un reactivo de detección de quimioluminiscencia mejorado (Clarity™ Western ECL Substrate; Bio-Rad) en placas radiográficas. La intensidad de los niveles de proteína se analizó con el software ImageJ.

#### 8.5 Fragmentación de la cromatina y purificación del DNA

Las células shA549 (shMEOX2 y SCR) se entrecruzaron con formaldehído al 1% durante 10 min y se neutralizaron con glicina 0.125 M durante 10 minutos. Las células resultantes se lavaron 2 veces con PBS 1x frío, posteriormente se trataron con 5 mL de PBS suplementado con inhibidores de proteasas (Mini complete; Roche, Indianapolis, IN, EE. UU.) y se rasparon las células adherentes, después se transfirieron a tubos de 15 mL y centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4°C. Al finalizar, se resuspendió la pastilla celular en 500 µL de buffer de lisis celular suplementado con 5 µL de inhibidores de proteasas (kit EZ-Magna ChIP G 49 #17-409; Sigma-Aldrich), y se incubaron en hielo por 15 minutos con intervalos de 5 minutos en donde se agitaban las muestras. Posteriormente se centrifugó a 8000 rpm por 5 minutos a 4°C y se resuspendió la pastilla celular en 500 µL de buffer de lisis nuclear suplementado con 5 µL de inhibidores de proteasas, posteriormente se incubaron en hielo por 15 minutos en intervalos de 5 minutos en donde se agitaban las muestras. Se tomaron 50 µL de cada una de las muestras y el restante se sonicó (Amplitud 60, Watts 95-100, por 10 pulsos de 20 segundos), se tomaron alícuotas de 50 µL. Por último, las muestras no sonicadas y sonicadas se purificaron con 5 µL de proteinasa K (#19131; Qiagen) a 65°C por 1 hora y se agregó un volumen de fenol:cloroformo a cada una de las muestras en donde se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm por 5 minutos a 4° C. Se tomó el sobrenadante y se le agregaron dos volúmenes de isopropanol frío dejando precipitar el DNA toda la noche a -80 °C. Al término de la precipitación, se centrifugó a 13000 rpm por 45 minutos a 4°C y se resuspendió la pastilla de DNA con 300 µL de etanol al 70% y se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C repitiendo el proceso hasta alcanzar un total de 3 veces. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 50 µL de agua tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC) para su posterior cuantificación mediante el uso de un espectrofotómetro Implen NanoPhotometer™ NP80 UV/VIS. La pastilla resuspendida sin anticuerpos se utilizó como Input de ChIP-qPCR.

## 8.6 Inmunoprecipitación de la cromatina asociada a PCR cuantitativa (ChIP-qPCR)

Para realizar las inmunoprecipitaciones deseadas se agregó 1 µg de los siguientes anticuerpos: EZH2 (#ab186006), CBP (#ab253202), H3K27me3 (#ab195477) y H3K27Ac (#ab4729) (Abcam, Cambridge Science Park, Cambridge, R.U.), 20 µL de perlas magnéticas acopladas a proteína G (#16-662) (Sigma-Aldrich) y 20 µg de cromatina fragmentada disuelta en

Buffer ChIP dilución alcanzando un volumen final de 500 µL y se incubó toda la noche a 4°C en un mezclador DYNAL a 20 rpm, posteriormente se realizaron lavados con 250 µL de los siguientes buffers a 4°C cada 5 minutos en el siguiente orden: Buffer bajo en sales, Buffer alto en sales, Buffer cloruro de litio (LiCl) y Buffer Tris-EDTA (TE). Una vez terminados los lavados, se agregaron 100 µL de Buffer ChIP elución más 10 µL de Proteinasa K y se incubó durante 2 horas a 65°C en movimiento constante a 800 rpm, posteriormente se incubó durante 10 minutos a 95°C para la desactivación de la Proteinasa K y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se separaron las perlas magnéticas, transfiriendo el sobrenadante a tubos nuevos, se añadieron 500 µL de Buffer de unión y posteriormente se transfirió cada una de las muestras a columnas con tubo colector. Se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto y se desechó el sobrenadante. A continuación, se añadieron 500 µL de Buffer de lavado y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto desechando el sobrenadante al término, este paso se realizó 2 veces más, posteriormente se agregaron 26 µL de agua DEPC y se centrifugó nuevamente a 13000 rpm durante 1 minuto conservándose el sobrenadante. El DNA inmunoprecipitado se amplificó mediante el Kit Complete Whole Genome Amplification GenomePlex Kit (#WGA2) (Sigma-Aldrich) utilizando 20 ng de cada DNA-IP para su posterior cuantificación usando el espectrofotómetro Implen NanoPhotometer<sup>™</sup> NP80 UV/VIS, y se realizó la ChIP-qPCR.

Las DNA-IPs se analizaron mediante cuantificación absoluta utilizando 20 ng de DNA-IP y SYBR Green (RealQ Plus Master Mix; AMPLIQON) en un volumen final de 15 µL por reacción. Se llevó a cabo utilizando el equipo de PCR LightCycler 480 System Real-Time (Roche, Alemania) así como oligonucleótidos diseñados para las secuencias promotoras del gen LncRNA SOX2-OT. Además, se realizaron curvas de comparación a través de diluciones seriadas de DNA control derivado de sangre periférica mononuclear de donadores sanos (100 ng, 10 ng, 1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng y 0.001 ng). Las secuencias de oligonucleótidos se indican a continuación.

Gen	Secuencia genética	Región en el genoma	Producto esperado
SOX2-OT (Distal)	Sentido 5'-CTGCCTAATCATCCCACTCC-3' Antisentido 5'-GAATGCCAGAGGAAAATCCA-3'	-2752 a -2597 pb	179 pb
SOX2-OT (Proximal)	Sentido 5'-GTGTGCCATGCCTACACAAT-3' Antisentido 5'-GGCTTTTCAAAAAGGCTGAA-3'	-348 a -193 pb	155 pb

 Tabla 2. Secuencias promotoras empleadas en los ensayos ChIP-qPCR.

#### 9. Resultados

## 9.1. El silenciamiento genético de MEOX2 provoca cambios en los niveles de expresión de los genes SOX2-OT, CBP y EZH2

Nuestro análisis obtenido a partir de ensayos de RT-qPCR nos permitieron identificar que las muestras transfectadas mediante el shRNA-antiMEOX2 presentan disminución en la expresión del transcrito de MEOX2 en alrededor de 60%, lo cual se correlaciona con una tendencia a la disminución en la expresión del mRNA de CBP, así como ausencia de cambios en la expresión del mRNA de EZH2 (Figura 8A).

Por otra parte, en la figura 8B, podemos observar que el silenciamiento de MEOX2 promueve aumento en la expresión del LncRNA SOX2-OT, tanto para la variante 1, como para la variante 6, señalando una posible correlación negativa de MEOX2 sobre SOX2-OT en células de cáncer pulmonar A549.



Figura 8. Análisis de los niveles de expresión a nivel de transcrito de MEOX2, CBP, EZH2 y SOX2-OT (Variantes 1 y 6) bajo condiciones de silenciamiento genético de MEOX2 en células de cáncer pulmonar A549. Los niveles de expresión del mRNA de MEOX2, CBP y EZH2 (A), así como niveles de expresión del LncRNA SOX2-OT variantes 1 y 6 (B), bajo condiciones de silenciamiento genético de MEOX2, fueron analizados mediante ensayos RT-qPCR y normalizados con respecto al gen endógeno HPRT1 y U1, respectivamente. Los valores se presentan como la media  $\pm$  S.E. de 2 réplicas experimentales de 1 ensayo biológico para mRNA, así como la media  $\pm$  S.E., de 5 réplicas experimentales de 2 ensayos biológicos para LncRNA, (n=1/pase 8; n=2/pase 8, respectivamente).

Adicionalmente, con el objetivo de corroborar la correlación en la expresión del mRNA de los genes *MEOX2*, *CBP*, *EZH2* y LncRNA SOX2-OT, se realizaron ensayos adicionales de RTqPCR bajo condiciones de silenciamiento genético de MEOX2 en diferente pasaje celular (pasaje 8). No obstante, a pesar de que los resultados obtenidos fueron analizados y normalizados mediante el empleo de 3 genes endógenos de referencia, detectamos aumento en la expresión del transcrito de MEOX2. De igual forma, nuestro análisis de expresión para los transcritos de los genes *CBP* y *EZH2* mostraron una tendencia a la disminución, lo cual sugiere inconsistencia en el comportamiento Biológico de las células de cáncer pulmonar A549 transfectadas en pasaje celular 8 (Figura S. 1).

## 9.2. El silenciamiento genético de MEOX2 promueve cambios en los niveles de proteína de CBP y EZH2 en células de cáncer pulmonar

A partir de los resultados experimentales arriba mencionados, se decidió llevar a cabo ensayos de Western Blot para detectar posibles variaciones en los niveles de proteína en condiciones de silenciamiento de MEOX2. Así mismo, con el objetivo de profundizar en la relación entre MEOX2, con miembros del grupo TRX "CBP" y PRC2 "EZH2" a nivel de proteína. En figura 9A, logramos detectar que las muestras bajo silenciamiento de MEOX2 muestran tendencia al aumento para la proteína CBP, mientras que, en la figura 9B se muestra tendencia a la disminución de la proteína EZH2, sin embargo, no fue posible obtener una banda específica para el anticuerpo de MEOX2; no obstante, en el grupo de investigación ha sido posible su detección de manera rutinaria, y confirmar que los ensayos de silenciamiento genético basado en shRNAs, logra reducir la proteína relativa de MEOX2.



**Figura 9.** Análisis del nivel de detección relativa de las proteínas de CBP y EZH2 bajo condiciones de transfección de shRNAs anti-MEOX2 en células de cáncer pulmonar A549. Los niveles de expresión a nivel de proteína de CBP (A) y EZH2 (B) bajo condiciones de silenciamiento genético de MEOX2 fueron analizados mediante ensayos Western Blot; normalizados con respecto al gen endógeno GAPDH, y comparados con respecto del grupo control de transfección estable (SCR). Los valores se presentan como la media ± S.E. de 3 y 6 réplicas experimentales de 1 ensayo biológico respectivamente (n=1/pase 9).

#### 9.3. Análisis epigenético de las regiones promotoras del gen LncRNA SOX2-OT

Con el objetivo de analizar los sitios de enriquecimiento de las marcas de histonas asociadas con activación *versus* represión epigenética basado en ambas H3K27Ac *vs* H3K27me3, ubicadas en las regiones promotoras donde se encuentran diseñadas nuestras secuencias de oligonucleótidos para el segmento del promotor "Distal" así como "Proximal" (Posición genómica: chr3: 180772336-180772514 y chr3: 180774105-180774259, respectivamente), se llevó a cabo nuestro análisis *in silico* mediante el uso del programa y visualizador IGV donde fueron seleccionados las marcas de histonas de interés en la línea celular de cáncer pulmonar A549 (Datos bioinformáticos depositados en la plataforma del proyecto ENCODE).

Nuestros análisis de datos visualizados bio-informáticamente muestran una región genómica que comprende -3500 pb río arriba (upstream) y 500 pb río abajo (downstream) a partir del sitio de inicio de la transcripción (TSS) del gen LncRNA SOX2-OT (chr3: 180770968-180774968). Al respecto podemos observar el enriquecimiento de las marcas de histonas de

activación H3K27Ac (verde) versus represión H3K27me3 (rojo), así como la marca de histona de activación asociada con secuencias promotoras activas H3K4me3 (morado), se muestran pobremente enriquecidas sobre la región promotora distal (chr3: 180772336-180772514), mientras que, para la región promotora proximal (chr3: 180774105-180774259), se detecta mayor enriquecimiento de estas (Figura 10).





#### 9.4. Análisis qPCR curva estándar

Una vez identificada la posible correlación negativa entre MEOX2 y SOX2-OT, tal como los cambios en la expresión de CBP y EZH2 bajo condiciones de silenciamiento de MEOX2, se decidió analizar cambios en el enriquecimiento de CBP y EZH2, así como de sus marcas de histonas asociadas de activación versus represión (H3K27Ac versus H3K27me3) sobre las regiones promotoras del gen LncRNA SOX2-OT mediante ensayos de ChIP-qPCR. Con el objetivo de esclarecer el posible mecanismo de regulación genética, en figura 11 se muestran la

curva estándar para la detección de la secuencia distal del promotor, así como proximal del promotor del gen SOX2-OT, en donde se realizaron diluciones seriadas 1:10, partiendo de una concentración de 100 ng de DNA genómico hasta llegar a 0.001 ng de DNA genómico. Adicional a lo anterior, las condiciones experimentales para llevar a cabo, tanto ensayos de normalización de curva estándar, como ensayos de ChIP-qPCR, se estandarizaron mediante ensayos de PCR por gradiente de temperatura y variaciones en la concentración para cada uno de nuestro diseño de oligonucleótidos para las secuencias genéticas del promotor del gen SOX2-OT (distal y proximal) (Figura S.2).

En figura 11 se muestran las curvas de amplificación representativas para el promotor Distal y Proximal de SOX2-OT, donde los gráficos superiores indican las curvas de amplificación correspondientes al uso de diluciones seriadas 1:10, partiendo de 100 ng hasta 0.001 ng de DNA genómico, mientras que los gráficos inferiores señalan la pendiente de amplificación, así como el análisis obtenido de la curva estándar. Con base en lo anterior, es posible determinar que el rango de eficiencia obtenida para cada uno de los ensayos mediante el uso de curva estándar corresponde a un 76.3% y 84.66%, respectivamente, señalándonos una eficiencia menor a óptima para este tipo de ensayos (≥90%), lo cual es importante resaltar a la vista de la interpretación final del fenómeno biológico que aborda la presente tesis experimental.



# Figura 11. Análisis de resultados obtenidos mediante ensayos de curva estándar por PCR en tiempo real. Curvas de amplificación representativas para la detección de las secuencias promotoras tanto distal como proximal del gen SOX2-OT, en donde los conjuntos de amplicones corresponden a cada una de las

diluciones realizadas y los valores mostrados corresponden a los análisis obtenidos de la curva estándar. Se realizaron diluciones seriadas 1:10, partiendo de 100 ng de DNA hasta llegar a 0.001 ng de DNA. Los resultados obtenidos pertenecen a 3 réplicas experimentales.

Como se mencionó anteriormente, la eficiencia óptima para este tipo de ensayos debe ocurrir mayor a 90% (Svec et al., 2015), por lo que, con base a resultados anteriores, se propuso realizar nuevamente los ensayos de curva estándar cuyo diseño experimental se describe a continuación en las siguientes tablas.

	1	2	3	4	5	6
Α	100	100	100	100	100	100
В	10	10	10	10	10	10
С	1	1	1	1	1	1
D	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
E	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
F	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
G	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC

Tabla 3. Diseño de placa para los ensayos de curva estándar por qPCR.

**Nota.** El diseño experimental consistió en la realización de diluciones seriadas 1:10, partiendo de 100 ng de DNA hasta 0.001 ng, donde cada una de las diluciones se realizó por triplicado e integró un control negativo con ausencia de DNA (NTC). Las tablas de color morado indican la curva realizada para el promotor distal de SOX2-OT, mientras que en color azul representa la curva a realizada para el promotor proximal.

Tabla 4. Preparación de reactivos y soluciones de trabajo para ensayos de curva estándar por qPCR.

Curva				
Reactivo	STOCK	Final	1 rxn/μL	21 + 3 rxn/μL
SybrGreen	2x	1x	7.5	180
Primer D	10μΜ	0.3μΜ	0.45	10.8
DNA	-	1μL	1	-
H₂O			6.05	145.2
Vol. Final	-	-	15	360
Curva				
Reactivo	STOCK	Final	1 rxn/μL	21+ 3 rxn/μL
SybrGreen	2x	1x	7.5	180
Primer P	10μΜ	0.3μΜ	0.45	10.8
DNA	-	1μL	1	-
H₂O			6.05	145.2

**Nota.** En cada una de las tablas se indica la cantidad en µL requerida de cada uno de los reactivos para ensayo de curva estándar, contemplando 21 reacciones experimentales con 3 reacciones adicionales. La tabla morada corresponde a los reactivos empleados para la curva estándar del promotor distal de SOX2-OT, mientras que la azul indica los reactivos empleados para la curva estándar del promotor proximal.

Muestra	ng	μL	H₂O	vf		
	1952.003	1	18.975	20		
	2000	1.025	-	-		
<b>DNA Sangre</b>	Dilución					
	2000	20	-	-		
	100	1	9	10		

Tabla 5. Material empleado para la realización de las diluciones seriales correspondientes.

*Nota.* En tabla se indica la concentración de DNA por cada 1 µL de muestra, así como la dilución realizada hasta lograr una concentración de 2000 ng por cada 20 µL.

Tabla 6. Diseño de placa para ensayos de ChIP-qPCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SCR-Input	SCR-Input	SCR-Input	SCR-Input	SCR-Input	SCR-Input	shMX2-Input	shMX2-Input	shMX2-Input	shMX2-Input	shMX2-Input	shMX2-Input
В	D-H3K27ac	D-H3K27ac	D-H3K27ac	P-H3K27ac	P-H3K27ac	P-H3K27ac	D-H3K27ac	D-H3K27ac	D-H3K27ac	P-H3K27ac	P-H3K27ac	P-H3K27ac
С	D-H3K27me3	D-H3K27me3	D-H3K27me3	P-H3K27me3	P-H3K27me3	P-H3K27me3	D-H3K27me3	D-H3K27me3	D-H3K27me3	P-H3K27me3	P-H3K27me3	P-H3K27me3
D	SCR-Input2	SCR-Input2	SCR-Input2	SCR-Input2	SCR-Input2	SCR-Input2	shMX2-Input2	shMX2-Input2	shMX2-Input2	shMX2-Input2	shMX2-Input2	shMX2-Input2
E	D-EZH2	D-EZH2	D-EZH2	P-EZH2	P-EZH2	P-EZH2	D-EZH2	D-EZH2	D-EZH2	P-EZH2	P-EZH2	P-EZH2
F	D-CBP	D-CBP	D-CBP	P-CBP	P-CBP	P-CBP	D-CBP	D-CBP	D-CBP	P-CBP	P-CBP	P-CBP
G	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC						
н	Curva	Curva	Curva	Curva	Curva	Curva						

**Nota.** El diseño experimental constó de 4 ensayos de inmunoprecipitación (IPs) correspondientes a las marcas de histonas H3K27Ac y H3K27me3, así como de las proteínas involucradas en la escritura del código de histonas como EZH2 y CBP, en presencia o ausencia del silenciamiento genético de MEOX2. Se emplearon 20 ng de cada una de las inmunoprecipitaciones realizadas y cada una de las muestras se cargó por triplicado, e integró un control negativo, es decir en ausencia de DNA al cual se le denominó "NTC". Los recuadros de color morado indican aquellas muestras empleadas para el promotor distal de SOX2-OT, mientras que en color azul se representan a las muestras empleadas para la detección de la secuencia promotora proximal.

Tabla 7. Preparación de reactivos y soluciones de trabajo para ensayos ChIP-qPCR.

Distal				
Reactivo	STOCK	Final	1 rxn/μL	42 + 3 rxn/μL
SybrGreen	2x	1x	7.5	337.5
Primer	10μΜ	0.3µM	0.45	20.25
DNA	20 ng	4μL	4	-
H₂O			3.05	137.25
Vol. Final	-	-	15	675

Proximal				
Reactivo	STOCK	Final	1 rxn/μL	42 + 3 rxn/μ
SybrGreen	2x	1x	7.5	337.5
Primer	10μΜ	0.3µM	0.45	20.25
DNA	20 ng	4μL	4	-
H₂O			3.05	137.25
Vol. Final	-	-	15	675

**Nota.** Se indica la cantidad en µL requerida de cada reactivo para realizar 1 ensayo de curva estándar contemplando 42 reacciones experimentales, incluyendo 3 reacciones adicionales como respaldo. La tabla en color morado corresponde a los reactivos empleados para el análisis del promotor distal del gen SOX2-OT, mientras que la azul indica los reactivos empleados para el análisis de las secuencias promotoras proximales.

SCR	ng	μι	6 rxn +2 ext (ng)	μι	vf en µL	ng totales	# ensayos
Input	303.6	1	160	0.527	13	3946.8	24.668
H3K27ac	1179.9	1	160	0.136	18	21238.2	132.739
H3K27me3	871.15	1	160	0.184	18	15680.7	98.004
Input 2	192.2	1	160	0.832	13	2498.6	15.616
CBP	919.25	1	160	0.174	18	16546.5	103.416
EZH2	903.7	1	160	0.177	18	16266.6	101.666
shMx2	ng	μL	6 rxn +2 ext (ng)	μL	vf en μL	ng totales	# ensayos
shMx2 Input	<b>ng</b> 457.45	μL 1	6 rxn +2 ext (ng) 160	μL 0.350	<b>vf en μL</b> 13	ng totales 5946.85	# ensayos 37.168
shMx2 Input H3K27ac	ng 457.45 868.1	μL 1 1	6 rxn +2 ext (ng) 160 160	μL 0.350 0.184	<b>vf en μL</b> 13 18	ng totales 5946.85 15625.8	# ensayos 37.168 97.661
shMx2 Input H3K27ac H3K27me3	ng 457.45 868.1 1199.6	μL 1 1 1	6 rxn +2 ext (ng) 160 160 160	μL 0.350 0.184 0.133	<b>vf en μL</b> 13 18 18	ng totales 5946.85 15625.8 21592.8	# ensayos 37.168 97.661 134.955
shMx2 Input H3K27ac H3K27me3 Input 2	ng 457.45 868.1 1199.6 173.25	μL 1 1 1 1	6 rxn +2 ext (ng) 160 160 160 160	μL 0.350 0.184 0.133 0.924	vf en μL 13 18 18 18 13	ng totales 5946.85 15625.8 21592.8 2252.25	# ensayos 37.168 97.661 134.955 14.077
shMx2 Input H3K27ac H3K27me3 Input 2 CBP	ng 457.45 868.1 1199.6 173.25 912.7	μL 1 1 1 1 1 1	6 rxn +2 ext (ng) 160 160 160 160 160	μL 0.350 0.184 0.133 0.924 0.175	vf en μL 13 18 18 18 13 18	ng totales 5946.85 15625.8 21592.8 2252.25 16428.6	# ensayos 37.168 97.661 134.955 14.077 102.679

 Tabla 8. Material utilizado para llevar a cabo las diluciones seriadas correspondientes.

**Nota.** En tabla se indica la concentración que se tiene de cada una de las inmunoprecipitaciones (IPs) correspondientes a las marcas de histonas H3K27Ac y H3K27me3, y de las proteínas involucradas en su escritura EZH2 y CBP, así como de muestra sin inmunoprecipitación (Input) en presencia o ausencia del silenciamiento genético de MEOX2, en cada 1  $\mu$ L de muestra. Con base en lo anterior, en la última columna se indica el número de ensayos estimados de acuerdo con la cantidad de material de cromatina disponible.

Con base en lo anterior, se realizaron nuevos ensayos de curvas estándar con el fin de alcanzar la eficiencia de reacción óptima (≥90%) para su análisis de correlación lineal en la cuantificación del DNA amplificado mediante ensayos de ChIP-qPCR. En figura 12, se muestran las curvas de amplificación representativas que muestran los resultados de amplificación empleando las secuencias de oligonucleótidos diseñados para las secuencias promotoras tanto distal como proximal del gen SOX2-OT (Posición genómica: chr3: 180772336-180772514 y chr3: 180774105-180774259, respectivamente), donde los gráficos superiores indican las curvas estándar de amplificación correspondientes, donde se indican el empleo de diluciones seriadas 1:10, partiendo de 100 ng hasta una dilución de 0.001 ng de DNA genómico, mientras que los gráficos inferiores señalan la pendiente de amplificación, así como el análisis obtenido de la curva estándar. Debido a que, la eficiencia de reacción obtenida fue superior al >90%, se decidió utilizar dichas curvas estándar para llevar a cabo el análisis de los ensayos de ChIP-qPCR como se indican a continuación en figura 13 y figura 14.



Figura 12. Análisis de resultados obtenidos mediante ensayos de qPCR mediante el uso de DNA genómico diploide para la obtención de amplificación de curvas estándar. Curvas de amplificación representativas para la amplificación de la secuencia promotora distal y proximal del gen SOX2-OT, en donde el conjunto de amplicones, corresponden a cada una de las diluciones seriadas realizadas, mientras que, los valores mostrados corresponden al análisis obtenido de la curva estándar. Se realizaron diluciones seriadas 1:10, partiendo de una concentración inicial de 100 ng de DNA genómico hasta llegar a concentración de 0.001 ng de DNA genómico. Los resultados obtenidos pertenecen a 3 réplicas experimentales.

9.5. El silenciamiento genético de MEOX2 provoca cambios en el enriquecimiento de las proteínas CBP, EZH2, y marcas de histonas de activación vs represión (H3K27Ac *vs* H3K27me3) sobre las secuencias promotoras del gen LncRNA SOX2-OT

Una vez establecida la posible correlación negativa entre MEOX2 y SOX2-OT, asimismo,

después de identificar cambios en los niveles relativos de las proteínas EZH2 y CBP, bajo

condición de silenciamiento genético de MEOX2, llevamos a cabo el análisis de posibles cambios 61

en el enriquecimiento (ocupación) de las proteínas CBP y EZH2 sobre las secuencias promotoras tanto distal como proximal del gen SOX2-OT, así como enriquecimiento de las marcas de histonas asociadas de activación versus represión (H3K27Ac vs H3K27me3) sobre las regiones promotoras antes mencionadas del gen LncRNA SOX2-OT bajo condiciones de shRNA de control negativo shSCR como shRNA-MEOX2, a través de ensayos ChIP-qPCR con el objetivo de esclarecer el posible mecanismo de regulación génica sobre la expresión del LncRNA antes mencionado. Con los resultados obtenidos, se realizaron dos tipos de análisis gráficos para una mejor representación e interpretación del cambio en el enriquecimiento de las proteínas CBP versus EZH2 a nivel genético, así como las marcas epigenéticas de histonas. Al respecto, en figura 13, se muestran los resultados en forma de diagrama de puntos, mientras que en figura 14, se muestran los valores representados en gráficas de barras.

Basado en lo anterior en su conjunto fue posible detectar cómo el posicionamiento de la proteína CBP en condiciones control del cultivo celular (control SCR), se encuentra enriquecida mayoritariamente en la región génica promotora distal (chr3: 180772336-180772514), mientras que, la marca de activación asociada H3K27Ac posee mayor enriquecimiento en la región promotora proximal (chr3: 180774105-180774259) (Figura 13A). Adicionalmente, el silenciamiento de MEOX2 provocó aumento del enriquecimiento de la proteína CBP sobre ambas regiones genéticas promotoras, donde CBP se encuentra mayoritariamente enriquecida en la región promotora distal en contraste de la región proximal. Sin embargo, es importante mencionar que sólo fue detectado aumento en el enriquecimiento de la marca de activación H3K27Ac sobre la región promotora proximal (chr3: 180774105-180774259) (Figura 13A). Por otra parte, el posicionamiento de la proteína EZH2 en la condición control SCR no muestra un mayor enriquecimiento para una región promotora en específico, sin embargo, su marca de represión asociada H3K27me3 fue detectada mayoritariamente enriquecida sobre la región distal (chr3: 180772336-18077236-180772514). Adicionalmente, fue posible detectar que el silenciamiento genético de

MEOX2 promueve aumento en el enriquecimiento de ambas marcas epigenéticas asociadas con represión tanto EZH2 como H3K27me3, siendo mayor en la región distal (chr3: 180772336-180772514) (Figura 13B).



Figura 13. Análisis del enriquecimiento de las proteínas escritoras del código de histonas tanto CBP como EZH2, así como de las marcas de histonas asociadas a activación/represión H3K27Ac vs H3K27me3 sobre las secuencias promotoras del gen SOX2-OT bajo condiciones de silenciamiento genético de MEOX2 por shRNAs en células de cáncer pulmonar A549. Posicionamiento y enriquecimiento de las marcas epigenéticas asociadas con activación CBP y H3K27Ac (A), así como de las marcas epigenéticas asociadas a represión EZH2 y H3K27me3 (B), sobre las secuencias promotoras del gen LncRNA SOX2-OT en las regiones genéticas distal y proximal. Los niveles de enriquecimiento fueron analizados mediante ensayos ChIP-qPCR y normalizados con respecto al control DNA-Input. Los niveles de enriquecimiento fueron comparados entre el grupo control negativo de transfección estable (SCR) con el grupo con silenciamiento genético anti-MEOX2 (shMX2). Los valores se presentan como la media ± S.E., de 3 réplicas experimentales para cada uno de los ensayos biológicos (n=1/pase 8 y 9).

En este sentido, en figura 14, se puede observar el balance anteriormente mencionado, donde el silenciamiento de MEOX2 promueve aumento de la marca de histona de activación H3K27Ac sobre la región promotora proximal del gen SOX2-OT (chr3: 180774105-180774259), correlacionándose a su vez, con disminución del enriquecimiento de la marca de histona de represión H3K27me3. Sin embargo, dicho acontecimiento pereciera ser independiente al enriquecimiento de la proteína CBP catalizadora de dicha marca de histona de activación. A pesar de esto, los resultados obtenidos nos sugieren un mecanismo de regulación donde el factor de transcripción MEOX2 es capaz de modular la expresión génica del LncRNA SOX2-OT mediante el cambio en el enriquecimiento de las marcas asociadas con activación vs represión H3K27Ac/H3K27me3 sobre la región promotora proximal (chr3: 180774105-180774259).



Figura 14. Análisis del enriquecimiento de las proteínas CBP y EZH2, así como de las marcas de histonas asociadas con activación versus represión H3K27Ac vs H3K27me3 sobre las secuencias promotoras del gen SOX2-OT bajo condiciones de silenciamiento de MEOX2 en células de cáncer pulmonar A549. Posicionamiento y enriquecimiento de las marcas epigenéticas asociadas con activación CBP y H3K27Ac (A), así como de las marcas epigenéticas asociadas con represión EZH2 y H3K27me3 (B), sobre las secuencias promotoras del gen LncRNA SOX2-OT en las regiones genéticas distal y proximal. Los niveles de enriquecimiento fueron analizados mediante ensayos ChIP-qPCR y normalizados con respecto al control DNA-Input. Los niveles de enriquecimiento fueron comparados entre el grupo control negativo de transfección estable (SCR) con el grupo con silenciamiento genético anti-MEOX2 (shMX2). Los valores se presentan como la media ± S.E., de 3 réplicas experimentales para cada uno de los ensayos biológicos (pase celular 8 y 9).

#### 10. Discusión

Anteriormente, se ha descrito ampliamente el papel que juegan los factores de transcripción en la progresión y desarrollo de distintos tipos de neoplasias sólidas en humanos (Belluti et al., 2020; Bradner et al., 2017). Los mecanismos de desregulación en la expresión de diferentes factores de transcripción tipo Homeobox, se han identificado como impulsores de procesos tumorigénicos por su estrecha relación con los procesos embrionarios, así como su relación en la regulación de blancos génicos río abajo de múltiples vías de señalización intracelular (Feng et al., 2021; Islam et al., 2021). Al respecto se ha descrito que los factores de transcripción tipo Homeobox son capaces de participar en las modificaciones epigenéticas mediante la regulación de la expresión de las enzimas metiltransferasas de histonas (Bi et al., 2018), responsables de las modificaciones postraduccionales de la cromatina funcionando como potenciadores de la actividad de complejos remodeladores de la cromatina (Boudadi et al., 2013) e incluso favoreciendo la expresión génica de LncRNA (Jen et al., 2017). Adicionalmente, es importante mencionar que nuestro grupo de investigación ha descrito que la expresión del factor de transcripción Mesénquima Homeobox-2 "MEOX2" juega un papel importante en la quimioresistencia, progresión tumoral y pronóstico clínico en pacientes con cáncer pulmonar, donde diferentes mecanismos de regulación epigenética tienen lugar afectando la expresión génica de diferentes blancos tumorales en carcinomas del grupo NSCLC (Armas-López et al., 2017; Ávila-Moreno et al., 2014; Peralta-Arrieta et al., 2022).

Adicionalmente, en los últimos años, el estudio de los LncRNAs ha venido en aumento debido a que desempeñan un papel determinante en los numerosos procesos celulares (Heydarnezhad Asl et al., 2022). Además, su desregulación en la expresión se ha demostrado asociada con la progresión tumoral, así como con la adquisición o modulación de todas las características o marcas moleculares de las células tumorales, por lo que se han clasificado como

potenciales marcadores biológicos de diagnóstico precoz y más certero (Cheng et al., 2019; Qian et al., 2020). Estudios recientes han descrito que la expresión de LncRNAs cobra funciones clave en los mecanismos de regulación génica mediante la modulación activa de la transcripción, las modificaciones de mecanismos epigenéticos, la estabilidad entre complejos proteína/RNA, la traducción y las modificaciones post-traduccionales (Bridges et al., 2021; Statello et al., 2021). En este aspecto, SOX2-OT es un LncRNA propuesto como oncogén en diferentes tipos de neoplasias, donde su participación se ve involucrada en la progresión tumoral y la regulación de distintos blancos génicos en NSCLC (Herrera-Solorio et al., 2021; Hou et al., 2014).

A pesar de la creciente evidencia de MEOX2 como regulador transcripcional y epigenético en cáncer pulmonar, poco se ha estudiado acerca de su participación en la regulación epigenética de LncRNAs conocidos en los procesos oncogénicos, por lo que, este trabajo tuvo como objetivo dilucidar la relación epigenética entre el factor de transcripción MEOX2 con la expresión del LncRNA SOX2-OT.

En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el silenciamiento genético en un 60% del factor de transcripción MEOX2 se asocia con incremento en la expresión del LncRNA SOX2-OT para la variante 1 y 6 en células de cáncer pulmonar A549, sugiriendo así una posible *"correlación negativa"* entre ambos. Estos resultados experimentales resultan la primera evidencia donde se expone la capacidad del factor de transcripción MEOX2 para regular la expresión de un LncRNA en células de cáncer pulmonar. Adicionalmente, nuestros resultados concuerdan con lo anteriormente reportado en su trabajo de tesis por Hernández-Cigala en 2020, donde el silenciamiento de SOX2-OT conduce a un aumento en la expresión de MEOX2 a nivel de proteína en células A549 de cáncer pulmonar (Hernández-Cigala, 2020).

Los resultados obtenidos respecto de la abundancia relativa de las proteínas CBP y EZH2 a nivel de mRNA bajo condiciones de silenciamiento genético de MEOX2 muestran una tendencia

a la disminución en la expresión de CBP, mientras que no se pudo identificar cambios aparentes para los niveles de expresión de EZH2. Sin embargo, estos resultados concuerdan con lo reportado por Peralta-Arrieta en 2022, donde se menciona la relación entre el silenciamiento de MEOX2 con cambios en la expresión a nivel de mRNA y proteína tanto de SMARCB1 como EZH2, siendo SMARCB1 miembro del complejo Trithorax (Peralta-Arrieta et al., 2022). Es importante recordar que ambos son subunidades pertenecientes a los principales complejos remodeladores de la cromatina los cuales funcionan de manera antagónica entre sí, y que la subunidad SMARCB1, anteriormente ha sido reportada como la encargada del reclutamiento directo de CBP/p300 para catalizar la marca de histona asociada con activación H3K27Ac (Alver et al., 2017; Schuettengruber et al., 2017).

Aunado a todo lo anterior, para el presente trabajo de investigación resulta necesario realizar nuevos ensayos Western Blot que nos permitan profundizar en la relación entre la expresión del factor de transcripción MEOX2, con la detección de las proteínas EZH2 y CBP, pues, a pesar de los esfuerzos realizados, no fue posible identificar una banda específica para el anticuerpo de MEOX2 que nos sirviera para corroborar su silenciamiento a nivel de proteína en la línea celular A549, no obstante fue detectado a nivel de mRNA. Además, nuestros resultados mostrados en figura 2 indican resultados preliminares, contrarios a los previamente obtenidos por nuestro grupo de investigación a nivel del mRNA.

Por otro lado, a partir de nuestro análisis bioinformático *in silico* mediante la herramienta IGV logramos identificar el posicionamiento de las marcas epigenéticas asociadas con activación/represión sobre las secuencias promotoras del LncRNA SOX2-OT, así mismo ubicar las regiones genéticas donde se fueron diseñadas nuestras secuencias de oligonucleótidos diseñados para nuestros análisis de ChIP-qPCR. Los resultados obtenidos mostraron que la región donde se ubicaba nuestro diseño de oligonucleótidos "proximal" presenta un

enriquecimiento de las marcas de histonas asociadas con activación H3K4me3 y H3K27Ac. Así mismo, es posible detectar que a lo largo de la región genética donde se realizó nuestro análisis experimental se encontró un enriquecimiento general de la marca de represión H3K27me3 en conjunto con la marca de activación H3K4me3, sugiriendo la posibilidad de presentar un estado de cromatina bivalente (Wu et al., 2010).

Con base en lo anterior, mediante ensayos de ChIP-qPCR se analizaron cambios en el enriquecimiento de las marcas asociadas con activación/represión por efecto del silenciamiento genético de MEOX2 en las regiones promotoras de SOX2-OT. Los resultados obtenidos indican que la disminución de MEOX2 promueve un incremento general de las marcas inmunoprecipitadas, para uno o ambas regiones genéticas del promotor con respecto a la condición basal "SCR", sugiriendo la capacidad del factor de transcripción Mesénquima Homeobox-2 de participar en el reposicionamiento de marcas epigenéticas sobre las secuencias genéticas promotoras de SOX2-OT. Aunado a lo anterior, fue posible observar que bajo condiciones de silenciamiento de MEOX2 hubo un mayor enriquecimiento de la marca de histona asociada con activación H3K27Ac sobre la región promotora proximal (chr3: 180774105-180774259) versus el enriquecimiento de la proteína EZH2 y su marca de histona asociada de represión H3K27me3 sobre la región promotora distal (chr3: 180772336-180772514). Si bien, el antagonismo entre las marcas asociadas con activación/represión sobre las secuencias promotoras de SOX2-OT se muestra sutilmente representado en nuestras gráficas, estos resultados sugieren que dicho cambio en el enriquecimiento de la marca de histona H3K27Ac bajo condiciones de silenciamiento de MEOX2 está asociado con incremento en la expresión de SOX2-OT en células de cáncer pulmonar A549. En este sentido, nuestro resultado muestra una concordancia con lo reportado anteriormente por Herrera-Solorio y colaboradores en 2021, donde nuestro grupo de investigación evidenció como SOX2-OT es capaz de modificar el enriquecimiento de la marca de represión H3K27me3 sobre sus secuencias promotoras, sin 68 cambios significativos para la marca de activación H3K27Ac (Herrera-Solorio et al., 2021), y con estudios previos donde se ha demostrado que SOX2-OT se correlaciona positivamente con EZH2 en diferentes tipos de neoplasias (Hou et al., 2014; Tai et al., 2019), mientras que MEOX2 se correlaciona negativamente con los niveles relativos de proteína EZH2 (Peralta-Arrieta et al., 2022).

Por otra parte, los resultados obtenidos sobre el cambio en el enriquecimiento de la proteína CBP quien imprime código epigenético de activación, no muestra relación aparentemente con el cambio en el enriquecimiento de su marca histónica asociada H3K27Ac, por lo que, nuestro resultado nos estaría evidenciando algunas limitaciones con respecto al rol de CBP en cáncer pulmonar. Sin embargo, es importante mencionar que CBP no es la única proteína encargada de la acetilación del residuo de la lisina 27 en la histona H3, sino que existen otras histonas acetiltransferasas (HAT) capaces de llevar a cabo esta función. En este sentido, Martire y colaboradores en 2020 encontraron que el silenciamiento de p300 se correlaciona con disminución global de la marca H3K27Ac sobre el genoma de células mESC, en contraste de la condición del silenciamiento de CBP. Además, dichos autores evidenciaron que p300 es capaz de reposicionarse sobre regiones seleccionadas para favorecer la transcripción de genes específicos cuando existe una disminución de este, así como, la acetilación de secuencias promotoras mediada por p300 se encuentra mayoritariamente relacionada con favorecer la transcripción, más que el enriquecimiento de la marca H3K27Ac sobre elementos genéticos enhancer. Si bien, nuestros resultados sugieren la posible regulación epigenética entre el factor de transcripción MEOX2 y el LncRNA SOX2-OT, es necesario realizar ensayos complementarios para confirmar la existencia funcional de dicho eje epigenético-transcripcional en cáncer pulmonar (Martire et al., 2020).

#### 11. Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que el silenciamiento genético mediado por shRNA conduce a una disminución del 60% de mRNA del factor de transcripción MEOX2. Asimismo, se identificó que MEOX2 regula negativamente los niveles de expresión del LncRNA SOX2-OT, y positivamente los niveles de expresión de CBP. El aumento en la expresión de SOX2-OT se asoció con un aumento en el enriquecimiento de la marca de histona de activación H3K27Ac sobre la región promotora proximal en ausencia de MEOX2, sugiriendo así un mecanismo de co-regulación génica en la línea celular de cáncer pulmonar A549.

## 12. Perspectivas

- Determinar los sitios de unión del factor de transcripción MEOX2 sobre las regiones promotoras de SOX2-OT mediante análisis *in silico* bioinformático, así como determinar si es capaz de posicionarse sobre sus regiones promotoras mediante ensayos ChIPqPCR.
- Analizar si MEOX2 es capaz de regular la expresión a nivel de mRNA y proteína p300, así como determinar su impacto en el enriquecimiento de p300 sobre las secuencias promotoras del gen SOX2-OT mediante ensayos ChIP-qPCR.
- Analizar la posible co-regulación epigenética entre SOX2-OT y el factor de transcripción MEOX2 en células de cáncer pulmonar A549, probablemente involucrado en la resistencia al tratamiento o progresión de malignidad en cáncer pulmonar.
## 13. Literatura citada

- Alver, B. H., Kim, K. H., Lu, P., Wang, X., Manchester, H. E., Wang, W., Haswell, J. R., Park, P. J., y Roberts, C. W. (2017). The SWI/SNF chromatin remodelling complex is required for maintenance of lineage specific enhancers. *Nature communications, 8*, 14648. <u>https://doi.org/10.1038/ncomms14648</u>
- Amaral, P. P., Neyt, C., Wilkins, S. J., Askarian-Amiri, M. E., Sunkin, S. M., Perkins, A. C., y Mattick, J. S. (2009). Complex architecture and regulated expression of the Sox2ot locus during vertebrate development. *RNA (New York, N.Y.), 15*(11), 2013–2027. <u>https://doi.org/10.1261/rna.1705309</u>
- Aran, V., y Omerovic, J. (2019). Current Approaches in NSCLC Targeting K-RAS and EGFR. International journal of molecular sciences, 20(22), 5701. <u>https://doi.org/10.3390/ijms20225701</u>
- 4. Armas-López, L., Piña-Sánchez, P., Arrieta, O., de Alba, E. G., Ortiz-Quintero, B., Santillán-Doherty, P., Christiani, D. C., Zúñiga, J., y Ávila-Moreno, F. (2017). Epigenomic study identifies a novel mesenchyme homeobox 2-GLI1 transcription axis involved in cancer drug resistance, overall survival and therapy prognosis in lung cancer patients. *Oncotarget*, 8(40), 67056–67081. https://doi.org/10.18632/oncotarget.17715
- 5. Ávila-Moreno, F., Armas-López, L., Álvarez-Moran, A. M., López-Bujanda, Z., Ortiz-Quintero, B., Hidalgo-Miranda, A., Urrea-Ramírez, F., Rivera-Rosales, R. M., Vázquez-Manríquez, E., Peña-Mirabal, E., Morales-Gómez, J., Vázquez-Minero, J. C., Téllez-Becerra, J. L., Ramírez-Mendoza, R., Ávalos-Bracho, A., de Alba, E. G., Vázquez-Santillán, K., Maldonado-Lagunas, V., Santillán-Doherty, P., Piña-Sánchez, P., ... Zúñiga-Ramos, J. (2014). Overexpression of MEOX2 and TWIST1 is associated with H3K27me3 levels and determines lung cancer chemoresistance and prognosis. *PloS one, 9*(12),

e114104. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114104

- Bade, B. C., y Dela Cruz, C. S. (2020). Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in chest medicine, 41*(1), 1–24. <u>https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001</u>
- Baraibar, I., Mezquita, L., Gil-Bazo, I., y Planchard, D. (2020). Novel drugs targeting EGFR and HER2 exon 20 mutations in metastatic NSCLC. *Critical reviews in* oncology/hematology, 148, 102906. <u>https://doi.org/10.1016/j.critre\_vonc.2020.102906</u>
- Barrionuevo-Cornejo, C., y Dueñas-Hancco, D. (2019). Clasificación actual del carcinoma de pulmón. Consideraciones histológicas, inmunofenotípicas, moleculares y clínicas. *Horizonte Médico (Lima), 19*(4), 74-83. https://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2019.v19n4.11
- Barta, J. A., Powell, C. A., y Wisnivesky, J. P. (2019). Global Epidemiology of Lung Cancer. Annals of global health, 85(1), 8. <u>https://doi.org/10.5334/aogh.2419</u>
- Bashyam, M. D., Animireddy, S., Bala, P., Naz, A., y George, S. A. (2019). The Yin and Yang of cancer genes. *Gene, 704*, 121–133. <u>https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.04.025</u>
- 11. Bassey-Archibong, B. I., Kwiecien, J. M., Milosavljevic, S. B., Hallett, R. M., Rayner, L. G., Erb, M. J., Crawford-Brown, C. J., Stephenson, K. B., Bédard, P. A., Hassell, J. A., y Daniel, J. M. (2016). Kaiso depletion attenuates transforming growth factor-β signaling and metastatic activity of triple-negative breast cancer cells. *Oncogenesis, 5*(3), e208. https://doi.org/10.1038/oncsis.2016.17
- Basumallik, N., y Agarwal, M. (2022). Small Cell Lung Cancer. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- 13. Behrens, C., Solis, L. M., Lin, H., Yuan, P., Tang, X., Kadara, H., Riquelme, E., Galindo,H., Moran, C. A., Kalhor, N., Swisher, S. G., Simon, G. R., Stewart, D. J., Lee, J. J., y

Wistuba, I. I. (2013). EZH2 protein expression associates with the early pathogenesis, tumor progression, and prognosis of non-small cell lung carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 19*(23), 6556–6565. <u>https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3946</u>

- 14. Belluti, S., Rigillo, G., y Imbriano, C. (2020). Transcription Factors in Cancer: When Alternative Splicing Determines Opposite Cell Fates. *Cells*, 9(3), 760. <u>https://doi.org/10.3390/cells9030760</u>
- 15. Bi, L., Zhou, B., Li, H., He, L., Wang, C., Wang, Z., Zhu, L., Chen, M., y Gao, S. (2018). A novel miR-375-HOXB3-CDCA3/DNMT3B regulatory circuitrv contributes to leukemogenesis myeloid leukemia. BMC 18(1), in acute cancer, 182. https://doi.org/10.1186/s12885-018-4097-z
- 16. Boudadi, E., Stower, H., Halsall, J. A., Rutledge, C. E., Leeb, M., Wutz, A., O'Neill, L. P., Nightingale, K. P., y Turner, B. M. (2013). The histone deacetylase inhibitor sodium valproate causes limited transcriptional change in mouse embryonic stem cells but selectively overrides Polycomb-mediated Hoxb silencing. *Epigenetics & chromatin, 6*(1), 11. https://doi.org/10.1186/1756-8935-6-11
- Bradner, J. E., Hnisz, D., y Young, R. A. (2017). Transcriptional Addiction in Cancer. *Cell,* 168(4), 629–643. <u>https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.013</u>
- 18. Bridges, M. C., Daulagala, A. C., y Kourtidis, A. (2021). LNCcation: IncRNA localization and function. *The Journal of cell biology, 220*(2), e202009045. https://doi.org/10.1083/jcb.202009045
- Brotto, D. B., Siena, Á., de Barros, I. I., Carvalho, S., Muys, B. R., Goedert, L., Cardoso,
   C., Plaça, J. R., Ramão, A., Squire, J. A., Araujo, L. F., y Silva, W., Jr (2020). Contributions

of HOX genes to cancer hallmarks: Enrichment pathway analysis and review. *Tumour* biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 42(5), 1010428320918050. <u>https://doi.org/10.1177/1010428320918050</u>

- 20. Cha, M. Y., Lee, K. O., Kim, M., Song, J. Y., Lee, K. H., Park, J., Chae, Y. J., Kim, Y. H., Suh, K. H., Lee, G. S., Park, S. B., y Kim, M. S. (2012). Antitumor activity of HM781-36B, a highly effective pan-HER inhibitor in erlotinib-resistant NSCLC and other EGFRdependent cancer models. *International journal of cancer, 130*(10), 2445–2454. <u>https://doi.org/10.1002/ijc.26276</u>
- 21. Chakravarthi, B. V., Nepal, S., y Varambally, S. (2016). Genomic and Epigenomic Alterations in Cancer. The American journal of pathology, 186(7), 1724–1735. <u>https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.02.023</u>
- 22. Chen, Y., Banda, M., Speyer, C. L., Smith, J. S., Rabson, A. B., y Gorski, D. H. (2010). Regulation of the expression and activity of the antiangiogenic homeobox gene GAX/MEOX2 by ZEB2 and microRNA-221. *Molecular and cellular biology, 30*(15), 3902– 3913. <u>https://doi.org/10.1128/MCB.01237-09</u>
- 23. Chen, Y., Leal, A. D., Patel, S., y Gorski, D. H. (2007). The homeobox gene GAX activates p21WAF1/CIP1 expression in vascular endothelial cells through direct interaction with upstream AT-rich sequences. *The Journal of biological chemistry*, 282(1), 507–517. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M606604200</u>
- 24. Chen, Y., Rabson, A. B., y Gorski, D. H. (2010). MEOX2 regulates nuclear factor-kappaB activity in vascular endothelial cells through interactions with p65 and IkappaBbeta. *Cardiovascular research*, 87(4), 723–731. <u>https://doi.org/10.1093/cvr/cvq117</u>
- Chen, Y., y Gorski, D. H. (2008). Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood, 111*(3), 1217–1226. <u>https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-104133</u>

- Cheng, J. T., Wang, L., Wang, H., Tang, F. R., Cai, W. Q., Sethi, G., Xin, H. W., y Ma, Z. (2019). Insights into Biological Role of LncRNAs in Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cells, 8*(10), 1178. <u>https://doi.org/10.3390/cells8101178</u>
- 27. Cortese, R., Hartmann, O., Berlin, K., y Eckhardt, F. (2008). Correlative gene expression and DNA methylation profiling in lung development nominate new biomarkers in lung cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology, 40*(8), 1494–1508. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.11.018
- 28. Dong, P., Karaayvaz, M., Jia, N., Kaneuchi, M., Hamada, J., Watari, H., Sudo, S., Ju, J., y Sakuragi, N. (2013). Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis. *Oncogene, 32*(27), 3286–3295. <u>https://doi.org/10.1038/onc.2012.334</u>
- 29. Dong, Y., Cai, Y., Liu, B., Jiao, X., Li, Z. T., Guo, D. Y., Li, X. W., Wang, Y. J., y Yang, D. K. (2017). HOXA13 is associated with unfavorable survival and acts as a novel oncogene in prostate carcinoma. *Future oncology (London, England), 13*(17), 1505–1516. https://doi.org/10.2217/fon-2016-0522
- 30. Douville, J. M., Cheung, D. Y., Herbert, K. L., Moffatt, T., y Wigle, J. T. (2011). Mechanisms of MEOX1 and MEOX2 regulation of the cyclin dependent kinase inhibitors p21 and p16 in vascular endothelial cells. *PloS one, 6*(12), e29099. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029099</u>

31. Duan, R., Han, L., Wang, Q., Wei, J., Chen, L., Zhang, J., Kang, C., y Wang, L. (2015).
HOXA13 is a potential GBM diagnostic marker and promotes glioma invasion by activating the Wnt and TGF-β pathways. *Oncotarget, 6*(29), 27778–27793.
<a href="https://doi.org/10.18632/oncotarget.4813">https://doi.org/10.18632/oncotarget.4813</a>

32. Duma, N., Santana-Davila, R., y Molina, J. R. (2019). Non-Small Cell Lung Cancer:

Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic proceedings, 94*(8), 1623–1640. <u>https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.013</u>

- 33. Elamin, Y., Robichaux, J., Carter, B., Altan, M., Gibbons, D., Fossella, F., Simon, G., Lam, V., Blumenschein, G., Tsao, A., Kurie, J., Mott, F., Negrao, M., Hu, L., He, J., Nilsson, M., Roeck, B., Yang, Z., Papadimitrakopoulou, V., y Heymach, J. (2019). MA09.03 Identification of Mechanisms of Acquired Resistance to Poziotinib in EGFR Exon 20 Mutant Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Journal of Thoracic Oncology, 14*(10), S282–S283. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.08.567
- 34. Estrada-Bernal, A., Doak, A. E., Le, A. T., Zhu, H., Chen, N., Silva, S., Smaill, J. B., Patterson, A. V., y Doebele, R. C. (2018). Abstract A157: Antitumor activity of tarloxotinib, a hypoxia-activated EGFR TKI, in patient-derived lung cancer cell lines harboring EGFR exon 20 insertions. *Molecular Cancer Therapeutics, 17*(1\_Supplement). <u>https://doi.org/10.1158/1535-7163.targ-17-a157</u>
- 35. Feng, Y., Zhang, T., Wang, Y., Xie, M., Ji, X., Luo, X., Huang, W., y Xia, L. (2021).
   Homeobox Genes in Cancers: From Carcinogenesis to Recent Therapeutic Intervention.
   *Frontiers in oncology, 11*, 770428. <u>https://doi.org/10.3389/fonc.2021.770428</u>
- 36. Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., y Bray, F. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Recuperado el 6 de agosto, 2022. Disponible en: <u>https://gco.iarc.fr/today</u>.
- 37. Fois, S. S., Paliogiannis, P., Zinellu, A., Fois, A. G., Cossu, A., y Palmieri, G. (2021).
   Molecular Epidemiology of the Main Druggable Genetic Alterations in Non-Small Cell
   Lung Cancer. International journal of molecular sciences, 22(2), 612.
   <a href="https://doi.org/10.3390/ijms22020612">https://doi.org/10.3390/ijms22020612</a>

- Fujino, T., Kobayashi, Y., Suda, K., Koga, T., Nishino, M., Ohara, S., Chiba, M., Shimoji, M., Tomizawa, K., Takemoto, T., y Mitsudomi, T. (2019). Sensitivity and Resistance of MET Exon 14 Mutations in Lung Cancer to Eight MET Tyrosine Kinase Inhibitors In Vitro. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer, 14*(10), 1753–1765. <u>https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.06.023</u>
- Gainor, J. F., Dardaei, L., Yoda, S., Friboulet, L., Leshchiner, I., Katayama, R., Dagogo-Jack, I., Gadgeel, S., Schultz, K., Singh, M., Chin, E., Parks, M., Lee, D., DiCecca, R. H., Lockerman, E., Huynh, T., Logan, J., Ritterhouse, L. L., Le, L. P., Muniappan, A., ... Shaw, A. T. (2016). Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer discovery, 6*(10), 1118–1133. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0596
- 40. GBD 2015 Risk Factors Collaborators (2016). Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet (London, England), 388*(10053), 1659–1724. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8
- 41. Ghafouri-Fard, S., Shoorei, H., Branicki, W., y Taheri, M. (2020). Non-coding RNA profile in lung cancer. *Experimental and molecular pathology, 114*, 104411. https://doi.org/10.1016/j.vexmp.2020.104411
- 42. Gorski, D. H., y Leal, A. J. (2003). Inhibition of endothelial cell activation by the homeobox gene Gax. *The Journal of surgical research*, *111*(1), 91–99. <u>https://doi.org/10.1016/s0022-4804(03)00042-8</u>
- 43. Guerriero, I., D'Angelo, D., Pallante, P., Santos, M., Scrima, M., Malanga, D., De Marco,
  C., Ravo, M., Weisz, A., Laudanna, C., Ceccarelli, M., Falco, G., Rizzuto, A., yguerreiro
  Viglietto, G. (2017). Analysis of miRNA profiles identified miR-196a as a crucial mediator
  78

of aberrant PI3K/AKT signaling in lung cancer cells. *Oncotarget, 8*(12), 19172–19191. https://doi.org/10.18632/oncotarget.13432

- 44. Hanahan, Douglas. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* 12(1):31-46. <u>https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059</u>
- 45. Hernández-Cigala, N. (2020). Análisis de la expresión de InicholsonncRNA SOX2-OT y su probable participación en la expresión del eje GLI-1/SOX2 en la resistencia al tratamiento oncológico en cáncer pulmonar. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 46. Herrera-Solorio, A. M., Armas-López, L., Arrieta, O., Zúñiga, J., Piña-Sánchez, P., y Ávila-Moreno, F. (2017). Histone code and long non-coding RNAs (IncRNAs) aberrations in lung cancer: implications in the therapy response. *Clinical epigenetics*, *9*, 98. https://doi.org/10.1186/s13148-017-0398-3
- 47. Herrera-Solorio, A. M., Peralta-Arrieta, I., Armas López, L., Hernández-Cigala, N., Mendoza Milla, C., Ortiz Quintero, B., Catalán Cárdenas, R., Pineda Villegas, P., Rodríguez Villanueva, E., Trejo Iriarte, C. G., Zúñiga, J., Arrieta, O., y Ávila-Moreno, F. (2021). LncRNA SOX2-OT regulates AKT/ERK and SOX2/GLI-1 expression, hinders therapy, and worsens clinical prognosis in malignant lung diseases. *Molecular oncology, 15*(4), 1110–1129. https://doi.org/10.1002/1878-0261.12875
- 48. Heydarnezhad Asl, M., Pasban Khelejani, F., Bahojb Mahdavi, S. Z., Emrahi, L., Jebelli, A., y Mokhtarzadeh, A. (2022). The various regulatory functions of long noncoding RNAs in apoptosis, cell cycle, and cellular senescence. *Journal of cellular biochemistry*, *123*(6), 995–1024. <u>https://doi.org/10.1002/jcb.30221</u>

- 49. Hoang, P. H., y Landi, M. T. (2022). DNA Methylation in Lung Cancer: Mechanisms and Associations with Histological Subtypes, Molecular Alterations, and Major Epidemiological Factors. *Cancers*, 14(4), 961. https://doi.org/10.3390/cancers14040961
- 50. Hombach, S., y Kretz, M. (2016). Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. Advances in experimental medicine and biology, 937, 3–17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42059-2\_1
- **51.** Hong, Y., y Kim, W. J. (2021). DNA Methylation Markers in Lung Cancer. *Current genomics*, 22(2), 79–87. <u>https://doi.org/10.2174/1389202921999201013164110</u>
- 52. 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 Sox2ot regulates lung cancer cell proliferation and is a prognostic indicator of poor survival. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 53, 380–388. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.06.004
- 53. Huang, P., Zhu, S., Liang, X., Zhang, Q., Liu, C., y Song, L. (2021). Revisiting Lung Cancer Metastasis: Insight From the Functions of Long Non-coding RNAs. *Technology in cancer research & treatment, 20*, 15330338211038488. https://doi.org/10.1177/15330338211038488
- 54. Hussenet, T., Dali, S., Exinger, J., Monga, B., Jost, B., Dembelé, D., Martinet, N., Thibault, C., Huelsken, J., Brambilla, E., y du Manoir, S. (2010). SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas. *PloS one, 5*(1), e8960. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008960
- 55. Inamura, K. (2017). Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015
   WHO Classification. *Frontiers in oncology*, 7, 193.
   <a href="https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00193">https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00193</a>
- **56.** Irelan, J. T., Gutierrez Del Arroyo, A., Gutierrez, A., Peters, G., Quon, K. C., Miraglia, L., y Chanda, S. K. (2009). A functional screen for regulators of CKDN2A reveals MEOX2 as

a transcriptional activator of INK4a. *PloS one, 4*(4), e5067. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005067

- 57. Islam, Z., Ali, A. M., Naik, A., Eldaw, M., Decock, J., y Kolatkar, P. R. (2021). Transcription Factors: The Fulcrum Between Cell Development and Carcinogenesis. *Frontiers in oncology*, *11*, 681377. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.681377
- 58. Jarroux, J., Morillon, A., y Pinskaya, M. (2017). History, Discovery, and Classification of IncRNAs. Advances in experimental medicine and biology, 1008, 1–46. <u>https://doi.org/10.1007/978-981-10-5203-3\_1</u>
- 59. Jen, J., Tang, Y. A., Lu, Y. H., Lin, C. C., Lai, W. W., y Wang, Y. C. (2017). Oct4 transcriptionally regulates the expression of long non-coding RNAs NEAT1 and MALAT1 to promote lung cancer progression. *Molecular cancer, 16*(1), 104. https://doi.org/10.1186/s12943-017-0674-z
- 60. Jiang, J., Lu, Y., Zhang, F., Huang, J., Ren, X. L., y Zhang, R. (2021). The Emerging Roles of Long Noncoding RNAs as Hallmarks of Lung Cancer. *Frontiers in oncology*, *11*, 761582. <u>https://doi.org/10.3389/fonc.2021.761582</u>
- 61. Kassis, E. S., Zhao, M., Hong, J. A., Chen, G. A., Nguyen, D. M., y Schrump, D. S. (2006). Depletion of DNA methyltransferase 1 and/or DNA methyltransferase 3b mediates growth arrest and apoptosis in lung and esophageal cancer and malignant pleural mesothelioma cells. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, *131*(2), 298–306. https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2005.05.022
- **62.** Kim, C. H., Lee, Y. C., Hung, R. J., Boffetta, P., Xie, D., Wampfler, J. A., Cote, M. L., Chang, S. C., Ugolini, D., Neri, M., Le Marchand, L., Schwartz, A. G., Morgenstern, H., Christiani, D. C., Yang, P., y Zhang, Z. F. (2015). Secondhand Tobacco Smoke Exposure and Lung Adenocarcinoma In Situ/Minimally Invasive Adenocarcinoma (AIS/MIA). *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for*

Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 24(12), 1902–1906. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0436

- 63. Kitahara, H., Okamoto, T., Shimamatsu, S., Kohno, M., Morodomi, Y., Tagawa, T., Kitao, H., Okano, S., Oda, Y., Maehara, Y., y Mori, M. (2020). LINE-1 Hypomethylation Is Associated With Malignant Traits and Cell Proliferation in Lung Adenocarcinoma. *Anticancer research*, *40*(10), 5659–5666. <u>https://doi.org/10.21873/anticanres.14579</u>
- 64. Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., Pagkalos, A., Ntounis, T., y Fasoulakis, Z. (2020). Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer research, 40*(11), 6009–6015. <u>https://doi.org/10.21873/anticanres.14622</u>
- 65. Lambe, G., Durand, M., Buckley, A., Nicholson, S., y McDermott, R. (2020).
  Adenocarcinoma of the lung: from BAC to the future. *Insights into imaging*, *11*(1), 69.
  <a href="https://doi.org/10.1186/s13244-020-00875-6">https://doi.org/10.1186/s13244-020-00875-6</a>
- 66. Lambert, S. A., Jolma, A., Campitelli, L. F., Das, P. K., Yin, Y., Albu, M., Chen, X., Taipale, J., Hughes, T. R., y Weirauch, M. T. (2018). The Human Transcription Factors. *Cell*, *172*(4), 650–665. <u>https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.029</u>
- 67. Langevin, S. M., Kratzke, R. A., y Kelsey, K. T. (2015). Epigenetics of lung cancer. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine, 165*(1), 74–90. <u>https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.03.001</u>
- 68. Li, J., Wang, J., Chen, Y., Li, S., Jin, M., Wang, H., Chen, Z., y Yu, W. (2016). LncRNA MALAT1 exerts oncogenic functions in lung adenocarcinoma by targeting miR-204. *American journal of cancer research, 6(*5), 1099–1107.
- 69. Li, P. Y., Wang, P., Gao, S. G., y Dong, D. Y. (2020). Long Noncoding RNA SOX2-OT: Regulations, Functions, and Roles on Mental Illnesses, Cancers, and Diabetic

Complications. *BioMed* research international, 2020, 2901589. https://doi.org/10.1155/2020/2901589

- 70. Li, S., Mei, Z., Hu, H. B., y Zhang, X. (2018). The IncRNA MALAT1 contributes to nonsmall cell lung cancer development via modulating miR-124/STAT3 axis. *Journal of cellular physiology*, 233(9), 6679–6688. <u>https://doi.org/10.1002/jcp.26325</u>
- 71. Li, Y., Du, M., Wang, S., Zha, J., Lei, P., Wang, X., Wu, D., Zhang, J., Chen, D., Huang, D., Lu, J., Li, H., y Sun, M. (2020). Clinicopathological Implication of Long Non-Coding RNAs SOX2 Overlapping Transcript and Its Potential Target Gene Network in Various Cancers. *Frontiers in genetics, 10*, 1375. <u>https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01375</u>
- 72. Lourenco, C., Resetca, D., Redel, C., Lin, P., MacDonald, A. S., Ciaccio, R., Kenney, T., Wei, Y., Andrews, D. W., Sunnerhagen, M., Arrowsmith, C. H., Raught, B., y Penn, L. Z. (2021). MYC protein interactors in gene transcription and cancer. *Nature reviews. Cancer, 21*(9), 579–591. <u>https://doi.org/10.1038/s41568-021-00367-9</u>
- 73. Madden, S. K., de Araujo, A. D., Gerhardt, M., Fairlie, D. P., y Mason, J. M. (2021). Taking the Myc out of cancer: toward therapeutic strategies to directly inhibit c-Myc. *Molecular cancer, 20*(1), 3. <u>https://doi.org/10.1186/s12943-020-01291-6</u>
- 74. Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C., y Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *The European respiratory journal, 48*(3), 889–902. <a href="https://doi.org/10.1183/13993003.00359-2016">https://doi.org/10.1183/13993003.00359-2016</a>
- 75. Markowitz, S. B., y Dickens, B. (2020). Screening for Occupational Lung Cancer: An Unprecedented Opportunity. Clinics in chest medicine, 41(4), 723–737. <u>https://doi.org/10.1016/j.ccm.2020.08.016</u>
- 76. Martire, S., Nguyen, J., Sundaresan, A., y Banaszynski, L. A. (2020). Differential contribution of p300 and CBP to regulatory element acetylation in mESCs. *BMC molecular and cell biology*, 21(1), 55. <u>https://doi.org/10.1186/s12860-020-00296-9</u>

- 77. Mitsis, T., Efthimiadou, A., Bacopoulou, F., Vlachakis, D., Chrousos, G.P., y Eliopoulos, E. (2020). Transcription factors and evolution: An integral part of gene expression (Review). World Academy of Sciences Journal, 2, 3-8. <u>https://doi.org/10.3892/wasj.2020.32</u>
- **78.** NCI. (2022). *What Is Cancer?* National Cancer Institute. Recuperado 31 de enero de 2022, de https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer
- 79. Nicholson, A. G., Tsao, M. S., Beasley, M. B., Borczuk, A. C., Brambilla, E., Cooper, W. A., Dacic, S., Jain, D., Kerr, K. M., Lantuejoul, S., Noguchi, M., Papotti, M., Rekhtman, N., Scagliotti, G., van Schil, P., Sholl, L., Yatabe, Y., Yoshida, A., y Travis, W. D. (2022). The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer, 17*(3), 362–387. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.11.003
- 80. Pai, P., y Sukumar, S. (2020). HOX genes and the NF-κB pathway: A convergence of developmental biology, inflammation and cancer biology. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer, 1874*(2), 188450. <u>https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188450</u>
- Park, S. J., Walser, T. C., Perdomo, C., Wang, T., Pagano, P. C., Liclican, E. L., Krysan, K., Larsen, J. E., Minna, J. D., Lenburg, M. E., Spira, A., y Dubinett, S. M. (2014). The effect of e-cigarette exposure on airway epithelial cell gene expression and transformation. *Clinical Cancer Research, 20*(2\_Supplement), B16–B16. <u>https://doi.org/10.1158/1078-0432.14AACRIASLC-B16</u>
- 82. Patel, S., Leal, A. D., y Gorski, D. H. (2005). The homeobox gene Gax inhibits angiogenesis through inhibition of nuclear factor-kappaB-dependent endothelial cell gene expression. *Cancer research*, 65(4), 1414–1424. <u>https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3431</u>
- **83.** Peng, X., Liu, G., Peng, H., Chen, A., Zha, L., y Wang, Z. (2017). SOX4 contributes to TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition and stem cell characteristics of gastric 84

cancer cells. Genes & diseases, 5(1), 49-61. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.12.005

- 84. Peralta-Arrieta, I., Trejo-Villegas, O. A., Armas-López, L., Ceja-Rangel, H. A., Ordóñez-Luna, M., Pineda-Villegas, P., González-López, M. A., Ortiz-Quintero, B., Mendoza-Milla, C., Zatarain-Barrón, Z. L., Arrieta, O., Zúñiga, J., y Ávila-Moreno, F. (2022). Failure to EGFR-TKI-based therapy and tumoural progression are promoted by MEOX2/GLI1-mediated epigenetic regulation of EGFR in the human lung cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990), 160,* 189–205. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.10.032
- 85. Peralta-Arrieta, Irlanda, Armas-López, Leonel, Zúñiga, Joaquín, y Ávila-Moreno, Federico.
  (2019). Epigenetics in non-small cell lung carcinomas. Salud Pública de México, 61(3), 318-328. Epub 03 de marzo de 2020. <u>https://doi.org/10.21149/10089</u>
- 86. Policarpo, R., Sierksma, A., De Strooper, B., y d'Ydewalle, C. (2021). From Junk to Function: LncRNAs in CNS Health and Disease. *Frontiers in molecular neuroscience, 14*, 714768. <u>https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.714768</u>
- 87. Qian, Y., Shi, L., y Luo, Z. (2020). Long Non-coding RNAs in Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Therapy. *Frontiers in medicine*, 7, 612393. https://doi.org/10.3389/fmed.2020.612393
- 88. Qu, L. P., Zhong, Y. M., Zheng, Z., y Zhao, R. X. (2017). CDH17 is a downstream effector of HOXA13 in modulating the Wnt/β-catenin signaling pathway in gastric cancer. *European review for medical and pharmacological sciences*, 21(6), 1234–1241.
- 89. Quintanal-Villalonga, Á., y Molina-Pinelo, S. (2019). Epigenetics of lung cancer: a translational perspective. *Cellular oncology (Dordrecht), 42*(6), 739–756. https://doi.org/10.1007/s13402-019-00465-9
- **90.** Reck, M., Carbone, D. P., Garassino, M., y Barlesi, F. (2021). Targeting KRAS in nonsmall-cell lung cancer: recent progress and new approaches. *Annals of oncology : official*

journal of the European Society for Medical Oncology, 32(9), 1101–1110. https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.06.001

- 91. Ricciuti, B., Mira, A., Andrini, E., Scaparone, P., Michelina, S. V., Pecci, F., Cantini, L., De Giglio, A., Lamberti, G., Ambrogio, C., y Metro, G. (2022). How to manage KRAS G12C-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *Drugs in context, 11*, 2022-7-4. https://doi.org/10.7573/dic.2022-7-4
- 92. Rinn, J. L., Kertesz, M., Wang, J. K., Squazzo, S. L., Xu, X., Brugmann, S. A., Goodnough,
  L. H., Helms, J. A., Farnham, P. J., Segal, E., y Chang, H. Y. (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*, *129*(7), 1311–1323. <u>https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.022</u>
- 93. Rodriguez-Canales, J., Parra-Cuentas, E., y Wistuba, I. I. (2016). Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. *Cancer treatment and research*, 170, 25–46. <a href="https://doi.org/10.1007/978-3-319-40389-2\_2">https://doi.org/10.1007/978-3-319-40389-2\_2</a>
- **94.** Rudin, C. M., Brambilla, E., Faivre-Finn, C., y Sage, J. (2021). Small-cell lung cancer. *Nature reviews. Disease primers, 7*(1), 3. <u>https://doi.org/10.1038/s41572-020-00235-0</u>
- 95. Saghaeian Jazi, M., Samaei, N. M., Ghanei, M., Shadmehr, M. B., y Mowla, S. J. (2016). Identification of new SOX2OT transcript variants highly expressed in human cancer cell lines and down regulated in stem cell differentiation. *Molecular biology reports, 43*(2), 65– 72. https://doi.org/10.1007/s11033-015-3939-x
- 96. Saghaeian Jazi, M., Samaei, N. M., Ghanei, M., Shadmehr, M. B., y Mowla, S. J. (2016). Overexpression of the non-coding SOX2OT variants 4 and 7 in lung tumors suggests an oncogenic role in lung cancer. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 37*(8), 10329–10338. <u>https://doi.org/10.1007/s13277-016-4901-9</u>

- 97. Samuel, S., y Naora, H. (2005). Homeobox gene expression in cancer: insights from developmental regulation and deregulation. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990), 41*(16), 2428–2437. <u>https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.08.014</u>
- 98. Saw, P. E., Xu, X., Chen, J., y Song, E. W. (2021). Non-coding RNAs: the new central dogma of cancer biology. *Science China. Life sciences*, 64(1), 22–50. <u>https://doi.org/10.1007/s11427-020-1700-9</u>
- 99. Schönrock, A., Heinzelmann, E., Steffl, B., Demirdizen, E., Narayanan, A., Krunic, D., Bähr, M., Park, J. W., Schmidt, C., Özduman, K., Pamir, M. N., Wick, W., Bestvater, F., Weichenhan, D., Plass, C., Taranda, J., Mall, M., y Turcan, Ş. (2022). MEOX2 homeobox gene promotes growth of malignant gliomas. *Neuro-oncology, 24*(11), 1911–1924. https://doi.org/10.1093/neuonc/noac110
- Schuettengruber, B., Bourbon, H. M., Di Croce, L., y Cavalli, G. (2017). Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell*, *171*(1), 34–57. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.002
- 101. Shahryari, A., Jazi, M. S., Samaei, N. M., y Mowla, S. J. (2015). Long non-coding RNA SOX2OT: expression signature, splicing patterns, and emerging roles in pluripotency and tumorigenesis. *Frontiers in genetics*, 6, 196. <u>https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00196</u>
- 102. Shi, J., Xu, J., Chen, Y. E., Li, J. S., Cui, Y., Shen, L., Li, J. J., y Li, W. (2021). The concurrence of DNA methylation and demethylation is associated with transcription regulation. *Nature communications*, *12*(1), 5285. <u>https://doi.org/10.1038/s41467-021-25521-7</u>
- Singhal, S. K., Byun, J. S., Park, S., Yan, T., Yancey, R., Caban, A., Hernandez,
   S. G., Hewitt, S. M., Boisvert, H., Hennek, S., Bobrow, M., Ahmed, M. S. U., White, J.,
   Yates, C., Aukerman, A., Vanguri, R., Bareja, R., Lenci, R., Farré, P. L., De Siervi, A., ...

Gardner, K. (2021). Kaiso (ZBTB33) subcellular partitioning functionally links LC3A/B, the tumor microenvironment, and breast cancer survival. *Communications biology, 4*(1), 150. https://doi.org/10.1038/s42003-021-01651-y

- Socinski, M. A., Pennell, N. A., y Davies, K. D. (2021). MET Exon 14 Skipping Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer: An Overview of Biology, Clinical Outcomes, and Testing Considerations. *JCO precision oncology*, *5*, PO.20.00516. <u>https://doi.org/10.1200/PO.20.00516</u>
- Soto, L. F., Li, Z., Santoso, C. S., Berenson, A., Ho, I., Shen, V. X., Yuan, S., y
   Fuxman Bass, J. I. (2022). Compendium of human transcription factor effector domains.
   *Molecular cell*, 82(3), 514–526. <u>https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.11.007</u>
- Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L., y Huarte, M. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nature reviews. Molecular cell biology,* 22(2), 96–118. <u>https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9</u>
- 107. Sulewska, A., Niklinski, J., Charkiewicz, R., Karabowicz, P., Biecek, P., Baniecki, H., Kowalczuk, O., Kozlowski, M., Modzelewska, P., Majewski, P., Tryniszewska, E., Reszec, J., Dzieciol-Anikiej, Z., Piwkowski, C., Gryczka, R., y Ramlau, R. (2022). A Signature of 14 Long Non-Coding RNAs (IncRNAs) as a Step towards Precision Diagnosis for NSCLC. *Cancers*, *14*(2), 439. https://doi.org/10.3390/cancers14020439
- Sun, Y., Li, Z., Li, J., Li, Z., y Han, J. (2016). A Healthy Dietary Pattern Reduces
   Lung Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients, 8*(3), 134.
   <a href="https://doi.org/10.3390/nu8030134">https://doi.org/10.3390/nu8030134</a>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., y
   Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and
   Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*,

71(3), 209-249. https://doi.org/10.3322/caac.21660

- Suster, D. I., y Mino-Kenudson, M. (2020). Molecular Pathology of Primary Non-small Cell Lung Cancer. Archives of medical research, 51(8), 784–798.
   <a href="https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.08.004">https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.08.004</a>
- 111. Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., y Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular detection and quantification, 3*, 9–16. <u>https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005</u>
- 112. Tai, Y., Ji, Y., Liu, F., Zang, Y., Xu, D., Ma, S., Qin, L., y Ma, J. (2019). Long noncoding RNA SOX2-OT facilitates laryngeal squamous cell carcinoma development by epigenetically inhibiting PTEN via methyltransferase EZH2. *IUBMB life, 71*(9), 1230–1239. https://doi.org/10.1002/iub.2026
- 113. Tanaka, T., Watanabe, M., y Yamashita, K. (2018). Potential therapeutic targets of TP53 gene in the context of its classically canonical functions and its latest non-canonical functions in human cancer. Oncotarget, 9(22), 16234–16247. <u>https://doi.org/10.18632/oncotarget.24611</u>
- Tang, Z., Yu, W., Zhang, C., Zhao, S., Yu, Z., Xiao, X., Tang, R., Xuan, Y., Yang, W., Hao, J., Xu, T., Zhang, Q., Huang, W., Deng, W., y Guo, W. (2016). CREB-binding protein regulates lung cancer growth by targeting MAPK and CPSF4 signaling pathway. *Molecular oncology*, *10*(2), 317–329. <u>https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.10.015</u>
- 115. Taus, Á., Camacho, L., Rocha, P., Hernández, A., Longarón, R., Clavé, S., Fernández-Ibarrondo, L., Salido, M., Hardy-Werbin, M., Fernández-Rodríguez, C., Albanell, J., Bellosillo, B., y Arriola, E. (2021). Plasmatic KRAS Kinetics for the Prediction of Treatment Response and Progression in Patients With KRAS-mutant Lung Adenocarcinoma. *Archivos de bronconeumologia*, *57*(5), 323–329. 89

https://doi.org/10.1016/j.arbres.2020.01.023

- **116.** Thai, A. A., Solomon, B. J., Sequist, L. V., Gainor, J. F., y Heist, R. S. (2021). Lung cancer. *The Lancet, 398*(10299), 535–554. <u>https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00312-</u>
  - <u>3</u>
- Travis W. D. (2020). Lung Cancer Pathology: Current Concepts. Clinics in chest medicine, 41(1), 67–85. <u>https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.11.001</u>
- 118. Valcourt, U., Thuault, S., Pardali, K., Heldin, C. H., y Moustakas, A. (2007).
   Functional role of Meox2 during the epithelial cytostatic response to TGF-beta. *Molecular oncology*, *1*(1), 55–71. <u>https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.02.002</u>
- 119. Van Den Broeck, A., Brambilla, E., Moro-Sibilot, D., Lantuejoul, S., Brambilla, C., Eymin, B., y Gazzeri, S. (2008). Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 14*(22), 7237–7245. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0869
- Vaquerizas, J. M., Kummerfeld, S. K., Teichmann, S. A., y Luscombe, N. M. (2009).
   A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nature reviews. Genetics*, *10*(4), 252–263. https://doi.org/10.1038/nrg2538
- 121. Villalobos, P., y Wistuba, I. I. (2017). Lung Cancer Biomarkers. Hematology/oncology clinics of North America, 31(1), 13–29. https://doi.org/10.1016/j.hoc.2016.08.006
- Wang, I. C., Ustiyan, V., Zhang, Y., Cai, Y., Kalin, T. V., y Kalinichenko, V. V. (2014). Foxm1 transcription factor is required for the initiation of lung tumorigenesis by oncogenic Kras(G12D.). *Oncogene, 33*(46), 5391–5396. <a href="https://doi.org/10.1038/onc.2013.475">https://doi.org/10.1038/onc.2013.475</a>
- **123.** Wang, S., Xia, D., Wang, X., Cao, H., Wu, C., Sun, Z., Zhang, D., y Liu, H. (2021). 90

C/EBPβ regulates the JAK/STAT signaling pathway in triple-negative breast cancer. *FEBS* open bio, 11(4), 1250–1258. <u>https://doi.org/10.1002/2211-5463.13138</u>

- Wang, Y., Dang, Y., Liu, J., y Ouyang, X. (2016). The function of homeobox genes and IncRNAs in cancer. *Oncology letters*, *12*(3), 1635–1641. https://doi.org/10.3892/ol.2016.4901
- Wang, Y., Wu, N., Luo, X., Zhang, X., Liao, Q., y Wang, J. (2020). SOX2OT, a novel tumor-related long non-coding RNA. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *123*, 109725. <u>https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109725</u>
- 126. Wei, X., Zhu, C., Ji, M., Fan, J., Xie, J., Huang, Y., Jiang, X., Xu, J., Yin, R., Du, L., Wang, Y., Dai, J., Jin, G., Xu, L., Hu, Z., Shen, H., Zhu, M., y Ma, H. (2021). Diet and Risk of Incident Lung Cancer: A Large Prospective Cohort Study in UK Biobank. *The American journal of clinical nutrition*, *114*(6), 2043–2051. https://doi.org/10.1093/ajcn/ngab298
- 127. Wu, S. C., Kallin, E. M., y Zhang, Y. (2010). Role of H3K27 methylation in the regulation of IncRNA expression. Cell research, 20(10), 1109–1116. <u>https://doi.org/10.1038/cr.2010.114</u>
- 128. Xie, Q., Yu, Z., Lu, Y., Fan, J., Ni, Y., y Ma, L. (2019). microRNA-148a-3p inhibited the proliferation and epithelial-mesenchymal transition progression of non-small-cell lung cancer via modulating Ras/MAPK/Erk signaling. *Journal of cellular physiology, 234*(8), 12786–12799. <u>https://doi.org/10.1002/jcp.27899</u>
- Xing, X. B., Cai, W. B., Luo, L., Liu, L. S., Shi, H. J., y Chen, M. H. (2013). The Prognostic Value of p16 Hypermethylation in Cancer: A Meta-Analysis. *PloS one, 8*(6), e66587. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066587
- 130. Xu, K., Qiu, C., Pei, H., Mehmood, M. A., Wang, H., Li, L., y Xia, Q. (2018).Homeobox B3 promotes tumor cell proliferation and invasion in glioblastoma. *Oncology*

letters, 15(3), 3712–3718. https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3892/ol.2018.7750

- 131. Yan, H., y Bu, P. (2021). Non-coding RNA in cancer. *Essays in biochemistry*, 65(4),
  625–639. <u>https://doi.org/10.1042/EBC20200032</u>
- Ye, P., Lv, X., Aizemaiti, R., Cheng, J., Xia, P., y Di, M. (2020). H3K27ac-activated LINC00519 promotes lung squamous cell carcinoma progression by targeting miR-450b-5p/miR-515-5p/YAP1 axis. *Cell proliferation, 53*(5), e12797. <a href="https://doi.org/10.1111/cpr.12797">https://doi.org/10.1111/cpr.12797</a>
- Yu, M., Zhan, J., y Zhang, H. (2020). HOX family transcription factors: Related signaling pathways and post-translational modifications in cancer. *Cellular signalling, 66*, 109469. <u>https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109469</u>
- 134. Zhang, B., Chen, D., Liu, B., Dekker, F. J., y Quax, W. J. (2020). A novel histone acetyltransferase inhibitor A485 improves sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cells to TRAIL. *Biochemical pharmacology*, 175, 113914. <a href="https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113914">https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113914</a>
- 135. Zhang, P., Wu, W., Chen, Q., y Chen, M. (2019). Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. *Journal of integrative bioinformatics*, *16*(3), 20190027. https://doi.org/10.1515/jib-2019-0027
- **136.** Zheng M. (2016). Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surgical oncology clinics of North America, 25*(3), 447–468. <u>https://doi.org/10.1016/j.soc.2016.02.003</u>
- 137. Zheng, S., Wang, X., Fu, Y., Li, B., Xu, J., Wang, H., Huang, Z., Xu, H., Qiu, Y., Shi, Y., y Li, K. (2021). Targeted next-generation sequencing for cancer-associated gene mutation and copy number detection in 206 patients with non-small-cell lung cancer. *Bioengineered*, 12(1), 791–802. <u>https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1890382</u>
- **138.** Zhou, D., Xie, M., He, B., Gao, Y., Yu, Q., He, B., y Chen, Q. (2017). Microarray data re-annotation reveals specific lncRNAs and their potential functions in non-small cell 92

lung cancer subtypes. *Molecular medicine reports, 16*(4), 5129–5136. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7244

139. Zhou, W., Zhao, Z., Wang, R., Han, Y., Wang, C., Yang, F., Han, Y., Liang, H., Qi, L., Wang, C., Guo, Z., y Gu, Y. (2017). Identification of driver copy number alterations in diverse cancer types and application in drug repositioning. *Molecular oncology, 11*(10), 1459–1474. <u>https://doi.org/10.1002/1878-0261.12112</u>

## 14. Figuras Suplementarias



**Figura Suplementaria 1. Análisis de los niveles de expresión a nivel de transcrito de MEOX2, CBP y EZH2 bajo condiciones de silenciamiento de MEOX2 en células de cáncer pulmonar A549, pasaje celular 8.** Expresión a nivel de mRNA de CBP y EZH2 en células A549 post silenciamiento genético de MEOX2. Los niveles de expresión fueron analizados mediante ensayos RT-qPCR y normalizados con respecto a 3 genes endógenos GAPDH, HPRT1 y ACTB, respectivamente para mRNA. Los niveles de expresión fueron comparados con respecto a un grupo de control negativo de transfección estable (SCR). Los valores se presentan como la media ± S.E., de 3 réplicas experimentales de un ensayo biológico (n=1/pase 8).

## **Promotor Distal**



**Figura Suplementaria 2. Ensayos de gradiente de concentración y temperatura por PCR de punto final.** Electroforesis en geles de agarosa (3%), los resultados fueron obtenidos a partir del gradiente de temperatura y concentración empleando los oligonucleótidos diseñados para alinear con la secuencia del promotor distal versus proximal del gen SOX2-OT. Las bandas obtenidas para los transcritos específicos están ubicados según su producto esperado en pb para cada una de las secuencias. Las temperaturas y concentraciones empleadas fueron las siguientes: 53, 55, 58, 60, 62 y 65 °C; 0, 20 y 30 ng.