



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO *in silico* DE LA REPROGRAMACIÓN METABÓLICA DURANTE LA
TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
MEZTLI LUCIA MATADAMAS GUZMÁN

DIRECTOR DE TESIS:
DR. OSBALDO RESENDIS ANTONIO
FACULTAD DE MEDICINA

COMITE TUTORAL:
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DRA. CECILIA ZAZUETA MENDIZÁBAL
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO

ABRIL, 2021



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.

**Estudio *in silico* de la reprogramación metabólica durante la
transición epitelio-mesénquima**

por

Meztli Lucia Matadamas Guzmán

L.C.G., Centro de Ciencias Genómicas (2014)

Tesis presentada para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Biomédicas

en la

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Ciudad de México, México. Abril, 2021

*Recuerda siempre a los que
partieron,
trabaja duro, y sueña en grande,
nunca olvides que la vida se escapa.*
MEZ

Agradecimientos

A la UNAM, mi *alma mater*, por haberme dado una formación científica de alta calidad y experiencias de diferente índole que me han nutrido a nivel académico y personal. En especial, al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por permitirme seguir creciendo profesionalmente.

También al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme apoyado con la beca número 735736. Asimismo, agradezco el apoyo financiero otorgado por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para la asistencia al Curso Summer Course Systems Biology of Disease (2016), al Congreso Metabolomics 2018 (14th Annual Conference of the Metabolomics Society) y a la estancia de investigación en el Next Generation Scientist Program en Novartis (2019).

Este trabajo estuvo dividido en dos partes. La parte computacional fue realizada bajo la tutoría del Dr. Osbaldo Resendis Antonio en el Laboratorio de Biología de Sistemas en Humano, ubicado en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). La parte experimental fue realizada bajo la tutoría del Dr. Emilio Rojas del Castillo en el departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

De manera especial agradezco al Dr. Pablo Hernández Franco y a la Dra. Alexandra Rodríguez Sastre por su apoyo técnico para la realización de este proyecto, y por su incansable paciencia para ayudarme a dominar las diferentes técnicas. También, a la Dra. Mahara Valverde por todos los consejos y guía para superarme día con día.

A mis tutores Dr. Resendis, Dra. Zazueta y el Dr. Rojas del Castillo por su apoyo crítico y motivación para desarrollar este trabajo y hacerme un mejor científico.

A los miembros del jurado que revisaron mi trabajo y lo perfeccionaron.

A mis compañeros de laboratorio por el apoyo, las colaboraciones, las risas y la continua motivación. Erick y Ugo siempre contarán con mi apoyo incondicional académica y personalmente.

A mi familia que me dio continuamente su apoyo y amor para realizar lo que más me gusta. Lucio que me enseñaste a darlo todo siempre sin importar las circunstancias. Xochitl que me retas continuamente. Fer que me cuida y me inspira a ser mejor persona. Chole que me enseñó que todo se puede si se quiere.

A la M. en C. Karen Mojica que sin tu continuo apoyo en la escritura y tus siempre sabias palabras de aliento no hubiese podido alcanzar esta meta. Gracias Juan por alentarme a seguir sin miedo en este camino.

A Ulises por dejarme soñar muy alto sin perder el piso. Gracias por hacer este camino más ameno y ser mi mejor amigo.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Transición epitelio-mesénquima en cáncer	5
1.2. Reprogramación metabólica durante la EMT en cáncer	9
1.3. La biología de sistemas en el estudio del metabolismo en la EMT	12
2. Hipótesis y objetivo	14
3. Material y métodos	16
3.1. Datos	16
3.2. Estadística	16
3.3. Microarreglos y metaboloma	18
3.4. Enriquecimiento de vías metabólicas	18
3.5. Reconstrucción metabólica	18
3.6. Modelado computacional	19
3.7. Análisis de supervivencia	20
3.8. Generación de A549dKO estables	21
3.9. Cuantificación de la actividad de catalasa	21
3.10. Cuantificación del glutatión reducido	23
3.11. Cuantificación de mRNA	23
3.12. Inducción de la EMT	25
3.13. Ensayo de herida	26

4. Resultados	27
4.1. La EMT reprograma el metabolismo celular	28
4.2. La EMT afecta el metabolismo central	31
4.3. Reacciones alteradas en la EMT	32
4.4. Genes metabólicos diferencialmente expresados en la EMT	38
4.5. La vía del glutatión cambia en todas las líneas celulares	40
4.6. Genes metabólicos alteran la supervivencia de pacientes de cáncer de pulmón	43
4.7. Abatimiento de la barrera antioxidante en A549	46
4.7.1. Actividad de catalasa	46
4.7.2. Cuantificación de glutatión reducido	46
4.7.3. Nivel de mRNA de CAT y GCLC	48
4.8. La doble mutación en GCLC y CAT altera el fenotipo mesenquimal	49
4.8.1. A549dKO cambia su morfología después de la EMT	49
4.8.2. La doble mutación en GCLC y CAT promueve mayor invasión celular	51
5. Discusión y conclusiones	53
Bibliografía	60
A. Marcadores EMT	79
B. Enriquecimiento de vías metabólicas	81
C. Reconstrucción metabólica	89
D. Resultados de Dycone	95
E. Ensayo de Herida	96
Producción científica	96

Índice de figuras

1-1. Cambios celulares y metabólicos de la transición epitelio-mesenquima	8
3-1. Datos y estrategia de investigación	17
3-2. Secuencia de los oligos para el silenciamiento de los genes CAT y GCLC	22
3-3. Actividad de Catalasa	23
3-4. Concentración de glutatión	24
4-1. El metabolismo es diferente en cada línea celular	29
4-2. Concentración diferencial de metabolitos después de la EMT	30
4-3. Vías metabólicas enriquecidas compartidas	32
4-4. Reacciones metabólicas afectadas durante la EMT en HCC827	35
4-5. Reacciones metabólicas afectadas durante la EMT en A549	36
4-6. Reacciones metabólicas afectadas durante la EMT en NCI-H358	37
4-7. La expresión de los genes de la vía de glutamato está alterada	39
4-8. La expresión de los genes de la vía de glutatión está alterada	41
4-9. La vía de glutatión está afectada en todas las líneas celulares	42
4-10. GCLC y GPX1 afectan la sobrevivencia de pacientes con cáncer de pulmón	44
4-11. ANPEP, GLS, y GPXs afectan la sobrevivencia de pacientes con cáncer de pulmón	45
4-12. Actividad de la Catalasa	47
4-13. Concentración de glutatión	47
4-14. Cuantificación de RNA	48
4-15. Las células A549dKO muestran un cambio morfológico en presencia de TGF- β	50
4-16. Las células dKO muestran mayor capacidad invasora	52
C-1. Reconstrucción metabólica	94

E-2. Ensayo de Herida a 21 días de la inducción de la EMT 98

Índice de tablas

3-1. Secuencias de primers	25
4-1. Mutaciones de cada línea celular	28
4-2. Número de metabolitos con concentración diferencial después de la EMT	30
4-3. Vías metabólicas enriquecidas en todas las líneas celulares	32
B-1. Resultados del enriquecimiento de vías metabólicas de A549	81
B-2. Resultados del enriquecimiento de vías metabólicas de HCC827	85
B-3. Resultados del enriquecimiento de vías metabólicas de NCI-H358	87
C-1. Representación de la reconstrucción metabólica	89
E-1. Porcentaje cierre de herida a 8 días de inducir la EMT	96
E-2. Porcentaje cierre de herida a 21 días de inducir la EMT	96

Estudio *in silico* de la reprogramación metabólica durante la transición epitelio-mesénquima

por

Meztlí Lucia Matadamas Guzmán

Resumen

La transición epitelio-mesénquima (EMT) ocurre cuando las células epiteliales se transforman en células con características mesenquimales con propiedades migratorias e invasivas. En el cáncer, la EMT reduce la proliferación celular, genera resistencia a fármacos, y permite el desarrollo de la metástasis. Por ello es importante identificar biomarcadores de la EMT para mejorar la precisión del diagnóstico y tratamiento del cáncer. Las células que llevan a cabo la EMT requieren una reprogramación metabólica para adaptarse a las nuevas necesidades celulares. Sin embargo, las mutaciones genéticas de cada padecimiento de cáncer juegan un papel importante en este proceso. En este trabajo se utilizó un modelo computacional para identificar cambios metabólicos comunes entre tres líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas con mutaciones diferentes. La integración de datos metabolómicos y transcriptómicos mostraron la existencia de vías metabólicas comunes que se ven afectadas durante la EMT, como el metabolismo de glutatión. Además, el análisis de sobrevivencia evidenció que los cambios en genes como Glutamato-Cisteína Ligasa (GCLC), glutatión peroxidasa (GPXs), Glutatión reductasa (GSR) y Alanil Aminopeptidasa (ANPEP), afectan la sobrevivencia de pacientes masculinos con cáncer de pulmón. De manera complementaria, se consideró importante evaluar de manera experimental la importancia de la barrera antioxidante durante la EMT. Por ello, se generó un modelo experimental con la línea celular A549 donde se probaron algunas hipótesis. Se abatieron los genes GCLC y CAT en la línea celular A549, para reducir el nivel de glutatión y catalasa, y posteriormente inducir a la EMT con TGF- β . Como se esperaba, se observó una transformación morfológica dramática de las células A549WT, cambiando de una morfología compacta con uniones celulares a una morfología fibroblástica alargada y estrellada. Sin embargo, no hubo un cambio dramático en células mesenquimales A549dKO con respecto a las células mesenquimales A549WT. Asimismo, se observó una mayor capacidad invasiva de las células mesenquimales A549dKO en comparación con las células mesenquimales A549WT. En conclusión, proponemos al glutatión como un componente metabólico esencial en la reprogramación metabólica durante la EMT, con un potencial uso terapéutico en cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Estudio *in silico* de la reprogramación metabólica durante la transición epitelio-mesénquima

by

Meztli Lucia Matadamas Guzmán

Abstract

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) occurs when epithelial cells undergo a switch in differentiation generating mesenchymal-like cells with newly acquired migratory and invasive properties. In cancer, the EMT reduces proliferation, leads to drug resistance, and enhances metastasis. Hence, it is relevant to identify EMT biomarkers to improve the precision of cancer diagnostic and treatment. The cells that undergo EMT require metabolic rewiring to fulfill the new cell requirements. However, the genetic background of each cancer plays a relevant role in this process. Here, we used a computational model to identify common metabolic alterations between three different non-small cell lung cancer cell lines with diverse genetic backgrounds. The integration of metabolomics and transcriptomics data revealed prevalent affected metabolic pathways during EMT among the three cell lines, such as glutathione metabolism. Afterward, we showed that alterations on several genes of this pathway, such as Glutamate-cysteine ligase (GCLC), glutathione peroxidases (GPXs), glutathione reductase (GSR), and Alanyl-aminopeptidase (ANPEP) affected the survival of patients with lung cancer. As a complement, it was important to experimentally evaluate the importance of the antioxidant barrier during EMT. Hence, to elucidate the importance of the antioxidant barrier during EMT, we generated an experimental model using A549. We knocked down GCLC and CAT to reduce the levels of intracellular glutathione and catalase and further induce EMT with TGF- β . We observed a dramatic morphological transformation of the cells, changing from displaying a compact epithelial morphology with clear cell-cell contacts to a fibroblast-like morphology with scattered spindle shape. However, A549dKO was not as dramatic as A5649WT. Besides, we observed a more invasive phenotype in the mesenchymal A549dKO cells than in the mesenchymal A549WT cells. In conclusion, we propose glutathione as an essential metabolic component of metabolic rewiring during EMT with potential therapeutic use in patients.

Capítulo 1

Introducción

A nivel mundial se considera que el cáncer es una de las principales causas de muerte y una enfermedad que va en aumento significativo [OMS, 2021; National Cancer Institute, 2020; de Martel *et al.*, 2020; Wild *et al.*, 2020]. Debido a los cambios en el crecimiento poblacional y el envejecimiento, la OMS estima que para el 2030 los casos nuevos van a sobrepasar los 20 millones anuales [OMS, 2021; Wild *et al.*, 2020]. Además, de acuerdo con cálculos de organismos internacionales, los cánceres de mama, de próstata, cervicouterino, colorrectal y de pulmón son los más recurrentes en la población mundial [WHO, 2021; de Martel *et al.*, 2020; Wild *et al.*, 2020]. La magnitud de los efectos del cáncer en la salud en México no es muy diferente al panorama mundial, pues es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes [Sociedad Mexicana de Oncología A.C., 2016; INEGI, 2021].

El cáncer es un grupo de enfermedades causadas por el crecimiento anormal de las células debido a alteraciones génicas. Alteraciones que conducen a procesos moleculares permitiendo a las células cancerosas una proliferación exacerbada, la evasión del sistema inmune y la muerte celular, así como, la alteración de su metabolismo. Asimismo, las células cancerosas generan un microambiente que favorece la invasión de otros tejidos. El tejido que origina el cáncer es llamado sitio primario y le confiere características distintivas de aquellos tipos de cáncer que se originan en otros tejidos. En el tejido epitelial se generan aproximadamente el 85 % de los tipos de

cáncer y son llamados carcinomas [Pecorino, 2008]. Existen diferentes mecanismos moleculares involucrados en la carcinogénesis de cada tipo celular, así como en los patrones de propagación desde el sitio primario. El proceso por el cual las células cancerosas migran del sitio primario a otras partes del cuerpo es llamado metástasis, ésta es la principal causa de muerte en los pacientes con cáncer. La metástasis es la diferencia fundamental entre el crecimiento benigno y maligno. Los tumores malignos representan el principal problema clínico del cáncer. Un tumor primario puede ser removido quirúrgicamente de forma relativamente sencilla, mientras que los tumores metastásicos dispersos son prácticamente imposibles de remover. En México, la elevada tasa de letalidad del cáncer se atribuye a que el 60 % de los casos son detectados en etapas avanzadas [González Rivera *et al.*, 2015]. En estos casos las posibilidades de realizar tratamientos eficaces y lograr la curación han menguado considerablemente. Asimismo, entre enero y agosto de 2020 se registraron 683 823 defunciones, de las cuales 9 % se deben a tumores malignos (60 421) [INEGI, 2021]. Por todo lo anterior, es necesario estudiar aquellos procesos que se relacionan con la metástasis, para tener prognosis más acertadas o para generar estrategias terapéuticas más eficaces. Uno de los procesos más conocidos relacionados al desarrollo de la metástasis es la transición epitelio- mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés).

La transición epitelio-mesénquima es el proceso por el cual las células epiteliales adquieren características de células mesenquimales, dándoles propiedades móviles e invasivas [Nieto *et al.*, 2016; Sciacovelli *et al.*, 2016]. El tejido epitelial está compuesto de células altamente conectadas entre ellas y agrupadas en varias láminas avasculares pero inervadas [Alberts *et al.*, 2014]. Forman los límites entre diferentes ambientes dentro de un cuerpo y limitan el paso de las sustancias de un ambiente al otro. El epitelio se encarga de proteger otros tejidos, absorber sustancias, regular y excretar sustancias y hormonas del cuerpo, así como sensor el ambiente. Este tipo de tejido tiene láminas de células fuertemente unidas por uniones celulares. Existen diferentes tipos de uniones celulares, las cuales aportan diferentes funciones a los tejidos. Las uniones ocluyentes o estrechas forman puntos de adhesión entre las célula y célula, cruciales en mantener la diferencia de concentraciones de moléculas hidrófobas pequeñas a lo largo de las capas del epitelio, sellando las membranas plasmáticas de las células adyacentes para crear una

barrera impermeable o semipermeable entre las capas. También, actúan como barrera dentro de la misma bicapa lipídica, pues restringe la difusión libre tanto de lípidos como de proteínas de membrana. Esto aporta cierta polaridad a la célula epitelial, porque la parte apical es diferente a la parte basal en los componentes de la membrana. En cambio, las uniones de anclaje o adherentes sujetan mecánicamente a las células y sus citoesqueletos con las células vecinas. Estas estructuras se encuentran distribuidas en el tejido epitelial y ayuda a distribuir la resistencia y la fuerza ejercidas sobre él, ayudando a resistir la separación durante actividades contráctiles. Contienen una placa formada por una densa capa de glucoproteínas transmembrana (cadherina) y microfilamentos (o filamentos de actina) del citoesqueleto formando zonas extensas denominadas cinturones de adhesión. Por último, las células epiteliales en cultivo tienden a formar grupos fuertemente unidos. Se caracterizan también por contener citoqueratinas en el citoesqueleto, por lo que se utiliza como marcador para identificar tejido epitelial. Durante la EMT, las células epiteliales pierden estas características fundamentales para adquirir un fenotipo mesenquimal. Las células epiteliales cambian las proteínas de su superficie, pierden su polaridad apical-basal, modifican su citoesqueleto, pierden las uniones celulares y alteran su morfología. Las células mesenquimales tienen una forma alargada, estrellada y asimétrica, a diferencia de las células epiteliales que son muy simétricas [Horwitz *et al.*, 2006]. No necesariamente son consideradas células troncales a pesar de que usualmente no están totalmente diferenciadas. Esta dediferenciación les permite convertirse en diferentes tipos de tejido, aunque no todos. Además, las células mesenquimales poseen la capacidad de moverse entre el tejido utilizando uniones a la matriz extracelular ya que no tienen uniones celulares estrechas que las anclen al tejido.

La EMT ocurre de manera natural durante la embriogénesis, regeneración y cicatrización de distintos tejidos. Asimismo, existe el proceso reverso llamado, transición mesénquima-epitelio, ambos fenómenos contribuyen a una correcta morfogénesis durante la embriogénesis [Sato *et al.*, 2012]. La descripción clásica de la EMT cómo transformación de células epiteliales a mesenquimales da la percepción de que es un proceso binario únicamente con dos estados posibles. Sin embargo, se ha mostrado que existe una plasticidad y estados

transitorios que tienen gran flexibilidad, por lo que las células oscilan en un espectro de estados intermedios [Nieto *et al.*, 2016]. La investigación de la EMT se ha llevado a cabo en cultivos celulares, así como en células tumorales circulantes. La inducción de la EMT requiere de la presencia de señales pleiotrópicas como hipoxia, TGF- β , EGF, acumulación de fumarato, entre otras [Kasai *et al.*, 2005; Sciacovelli y Frezza, 2017; Tsubakihara y Moustakas, 2018; Kalluri y Weinberg, 2009; Zhang *et al.*, 2013]. Estas señales inducen la expresión de factores de transcripción específicos, como son SNAIL, SLUG, ZEB1, ZEB2 y TWIST, entre otros. La expresión de estos factores de transcripción desatan una reprogramación celular que altera la célula en distintos niveles de información desde la expresión hasta el metabolismo. En específico, estos factores de transcripción reprimen la expresión de proteínas de superficie como la E-cadherina, claudinas y desmosomas, facilitando la EMT. Las cadherinas son glicoproteínas transmembranales mediadoras de la adhesión célula-célula de forma homotípica (unión entre células con fenotipos similares) y dependiente del calcio. La familia de las cadherinas incluye más de 20 tipos diferentes; las más clásicas son la E-cadherina (epitelial), la N-cadherina (neural), la P-cadherina (placentaria) y la L-cadherina (hepática). La E-cadherina y la N-cadherina participan en las uniones intercelulares de tipo adherente. La integridad de las cadherinas como componentes intracitoplasmáticos es esencial para una correcta adhesión celular. A diferencia de lo que ocurre con otras moléculas de adhesión (lectinas por ejemplo), las cadherinas establecen uniones celulares estables en el tiempo, jugando así, un papel importante en la morfogénesis y mantenimiento de la estructura tisular tanto en la embriogénesis como en la vida adulta. Cuando ocurre la EMT las células epiteliales cambian la E-cadherina por N-cadherina, un proceso fundamental que caracteriza este proceso. Es por ello que estas glicoproteínas han sido ampliamente utilizadas en diferentes modelos para estudiar la EMT [Kalluri y Weinberg, 2009; Nieto *et al.*, 2016; Sciacovelli *et al.*, 2016]. Aunado a este proceso se ha caracterizado la expresión de la vimentina en las células inducidas a la EMT. La vimentina es una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular en particular de células embrionarias, ciertas células endoteliales, células sanguíneas y en general en células mesenquimales. Su función principal es la de proveer

un ancla para el soporte de los orgánulos intracelulares (por ejemplo, la mitocondria, retículo endoplasmático, etc). Junto con otros filamentos intermedios mantienen la integridad física de la célula y es utilizada como marcador de células que llevan a cabo la EMT. Si bien las cadherinas, la vimentina y los factores de transcripción han sido ampliamente utilizados, ahora existen evidencias de otro tipo de marcadores como son miRNAs y metabolitos (Tabla A-1). Estos marcadores nos permiten evaluar distintos tipos de EMT a otro nivel biológico que pueden ser utilizados en diferentes modelos. Se considera que existen principalmente tres tipos de EMT, tipo 1,2 y 3, los cuales dependen del contexto celular [Kalluri y Weinberg, 2009]. La EMT de tipo 1 está asociada a la implantación y gastrulación embrionica que da lugar al mesodermo y endodermo, así como a las células de la cresta neural móviles. En cambio, la EMT de tipo 2 está ligada a los procesos de inflamación y fibrosis. Este tipo de transición puede ser expresada en largos periodos de tiempo, lo que puede dañar y destruir órganos afectados si el estímulo inflamatorio no es removido o atenuado. Finalmente, el tipo 3 está asociado al epitelio cancerígeno, dando lugar a la invasión y metástasis. Si bien en principio estos tipos de transición conllevan mecanismos similares, existen algunas diferencias en la regulación y desarrollo de la EMT en cada uno de ellos [Kalluri y Weinberg, 2009; Brabletz *et al.*, 2018]. Por lo que es relevante estudiar la EMT en modelos específicos que reflejen de manera más cercana su naturaleza.

1.1. Transición epitelio-mesénquima en cáncer

La proliferación excesiva y angiogénesis son características fundamentales del inicio y crecimiento temprano de un carcinoma [Hanahan y Weinberg, 2011]. La adquisición subsecuente de capacidad invasora presagia el inicio del proceso de múltiples pasos que eventualmente conduce a la diseminación metastásica, con consecuencias potencialmente mortales. En varios estudios, la activación de la EMT ha sido propuesto como un mecanismo primordial para la adquisición del fenotipo maligno de las células epiteliales [Thiery *et al.*, 2009; Kalluri y Weinberg, 2009; Nieto *et al.*, 2016; Sciacovelli *et al.*, 2016]. Además, en cáncer,

la EMT ha sido relacionada con los procesos de invasión, migración, metástasis, así como resistencia a fármacos y adquisición de características de células troncales [Mani *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2014; Pirozzi *et al.*, 2011]. Las células mesenquimales derivadas de un carcinoma expresan marcadores típicos de la EMT, por lo que para poder modular sus efectos con fármacos específicos es imperativo entender los mecanismos subyacentes. Estas células mesenquimales provenientes de la EMT eventualmente entran en una serie de pasos de la cascada de invasión-metástasis, como intravasación, circulación por el torrente sanguíneo, extravasación, formación de micrometástasis y colonización o metástasis [Thiery, 2002]. Las células derivadas de la EMT establecen colonias secundarias en lugares distantes al tumor primario y una vez formadas no exhiben las características mesenquimales. Por lo tanto, las células deben realizar el proceso inverso llamado transición mesénquima-epitelio para formar el segundo tumor. A pesar de que la EMT ocurre en varios tipos de cáncer epiteliales, el contexto celular, el fondo genético y el microambiente son factores que determina cómo se lleva a cabo [Nieto *et al.*, 2016; Sciacovelli *et al.*, 2016; Kondaveeti *et al.*, 2015; Morandi *et al.*, 2017; Thiery, 2002]. Existen varias condiciones que inducen la EMT, como la exposición al factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), la hipoxia, el pH extracelular, la acumulación de fumarato, entre otras [Sciacovelli y Frezza, 2017; Janin *et al.*, 2016; Kasai *et al.*, 2005; Hussey *et al.*, 2012; O'Connor y Gomez, 2014; LeBleu *et al.*, 2014; Moustakas y Heldin, 2012; Riemann *et al.*, 2019]. Cada una de estas condiciones induce la EMT utilizando diferentes vías de señalización que dependen de varios factores de transcripción. El TGF- β es una citocina que regula múltiples respuestas biológicas importantes en la biología del cáncer, incluyendo proliferación, apoptosis, angiogénesis y respuesta inmune [Kasai *et al.*, 2005]. TGF- β es secretada por células estromales, su papel es paradójico y depende de la etapa del tumor, así como, del tejido donde se encuentre. En células normales TGF- β suprime la proliferación, mientras que en etapas avanzadas del cáncer estimula la proliferación y alienta la invasión celular [Sato *et al.*, 2012; Hao *et al.*, 2019; Thiery, 2002; Kasai *et al.*, 2005]. La capacidad del TGF- β para inducir la EMT depende del entrecruzamiento de señales, la regulación de la expresión de citocinas específicas y la remodelación progresiva de la matriz extracelular que

facilita la motilidad entre las membranas basales [Tsubakihara y Moustakas, 2018]. Principalmente se relacionan dos vías por las que el TGF- β induce el inicio de la EMT [Zeisberg y Neilson, 2009; Hao *et al.*, 2019; Naber *et al.*, 2013]. La primera involucra a las proteínas Smad, que median la acción del TGF- β a través del receptor ALK-5. Esta vía modula diferentes factores de transcripción asociados a la EMT e induce una producción autocrina de TGF- β , reforzando y amplificando la EMT. La segunda involucra además la acción de β -catenina y LEF. Algunas otras vías como p38 MAPK y RhoA median la inducción autocrina de la EMT por TGF- β [Kasai *et al.*, 2005]. Asimismo, la inducción de la EMT a través del TGF- β ha sido relacionada con cambios metabólicos necesarios para sustentar las nuevas necesidades celulares.

Diferentes líneas celulares de cáncer han sido utilizadas para estudiar tanto las vías de señalización como otros mecanismos subyacentes de la EMT. En el caso del cáncer de pulmón, se han utilizado líneas de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés), el tipo más común de cáncer pulmonar. Este tipo de cáncer crece y se disemina más lento, a diferencia del cáncer de pulmón de células pequeñas. En el cáncer de pulmón de células no pequeñas, la presencia de moléculas como (TGF- β) es suficiente para inducir la EMT [Kasai *et al.*, 2005]. Además, suele ser menos sensible a la quimioterapia a diferencia del cáncer de pulmón de células pequeñas. Existen tres formas comunes de cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP). Los Adenocarcinomas que a menudo se encuentran en una zona exterior del pulmón. Los Carcinomas escamocelulares que generalmente se encuentran en el centro del pulmón al lado de un conducto de aire (bronquio). Los Carcinomas de células grandes que pueden ocurrir en cualquier parte del pulmón. El tabaquismo causa la mayoría de los casos (alrededor del 90%) de cáncer pulmón de células no pequeñas. En México, el cáncer de pulmón representa un problema de salud pública. La mayor parte se diagnostica en etapas avanzadas para las que no existen tratamientos curativos. Existe un gran número de líneas celulares de este tipo de cáncer. La más utilizada es A549, un carcinoma epitelial derivado de un paciente masculino de 58 años conocido por tener mutaciones en KRAS [Gazdar *et al.*, 2010]. En especial, la línea celular A549 ha sido ampliamente utilizada para estudiar la EMT, especialmente inducida por TGF- β

[Kasai *et al.*, 2005; Hussey *et al.*, 2012; Camerlingo *et al.*, 2019; Pirozzi *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011]. En general, independientemente del mecanismo de inducción de la EMT se requiere una reprogramación metabólica, que implica el cambio en los flujos metabólicos para solventar las nuevas necesidades celulares. Ya que esta reprogramación es necesaria, es importante conocer los mecanismos que intervienen en estos procesos para así generar posibles estrategias que retrasen la aparición de la EMT.

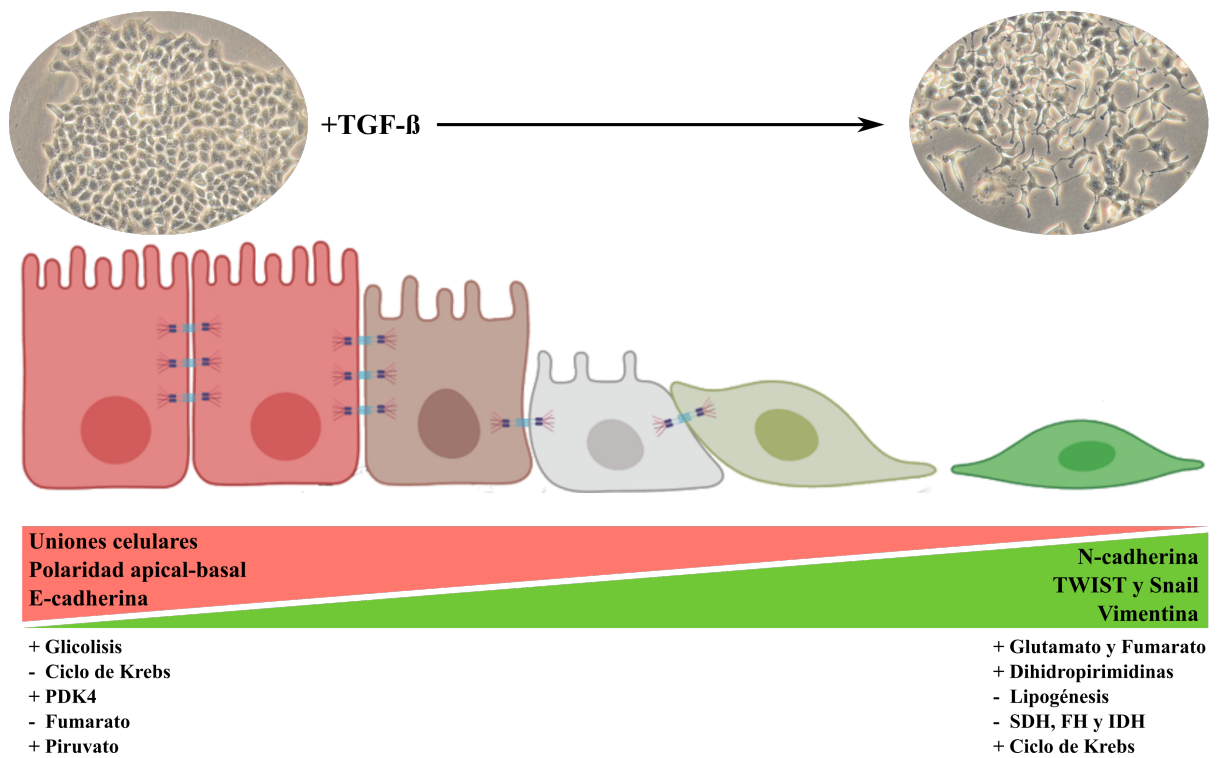


Figura 1-1: Cambios celulares y metabólicos de la transición epitelio-mesenquima

1.2. Reprogramación metabólica durante la EMT en cáncer

La reprogramación metabólica se considera una característica esencial durante el desarrollo del cáncer. Los fenotipos metabólicos pueden ser explotados para proveer una mejor prognosis, diagnóstico y tratamiento del cáncer. Por tanto, para comprender la patofisiología del cáncer y tomar mejores decisiones clínicas se requiere estudiar el metabolismo. En general, independientemente del mecanismo de inducción de la EMT se requiere una reprogramación metabólica, que implica el cambios metabólicos para solventar las nuevas necesidades celulares. Por un lado, las células que llevan a cabo la EMT intercambian poder proliferativo por capacidad migratoria [Cha *et al.*, 2015], es decir, su nueva prioridad es generar la energía necesaria para moverse entre los tejidos. Algunos de estos cambios involucran la reducción de la lipogénesis [Cha *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2015]; el incremento en la producción de energía en forma de ATP [Cha *et al.*, 2015; LeBleu *et al.*, 2014]; la acumulación de dihidropirimidinas [Shaul *et al.*, 2014]; inhibición de la succinato deshidrogenasa [Aspuria *et al.*, 2014] y el redireccionamiento de la glucosa hacia el ciclo de Krebs [Sun *et al.*, 2014], entre otros. Por otro lado, las células deben lidiar con el estrés que involucra perder las uniones celulares y desprenderse de la matriz extracelular, que es el primer paso en la metástasis [Kalluri y Weinberg, 2009]. Este proceso usualmente activa un tipo de muerte celular llamada anoikis sin embargo, las células que llevan a cabo la EMT son capaces de evadirla [Hua *et al.*, 2020]. A nivel metabólico para sobrevivir la anoikis, la EMT induce cambios en la glicolisis y la fosforilación oxidativa, entre otras [Hua *et al.*, 2020]. , en el cáncer de pulmón y mama, por ejemplo, la EMT suprime las vías requeridas para el crecimiento celular e induce el transporte de agentes reductores a la mitocondria para combatir las especies reactivas de oxígeno generadas por la anoikis [Jiang *et al.*, 2016b; Kamarajugadda *et al.*, 2012]. La modulación de enzimas como la isocitrato deshidrogenasa (IDH) y la piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK) son esenciales para lidiar con las consecuencias del nuevo estado desanclado de las células. La mayor parte de los cambios dependen del tipo de tejido, el microambiente y las mutaciones subyacentes del tejido tumoral.

La reprogramación metabólica de la EMT se encuentra orquestada por factores de transcripción específicos, sin embargo se desconoce si estos cambios metabólicos son causas o consecuencias de la inducción de la EMT. Como ejemplo tenemos la expresión de SNAI1, que reprime la enzima glicolítica fructuosa 1,6 bifosfato (FBP1), favoreciendo el consumo de glucosa. Particularmente, la pérdida de FBP1 daña la respiración y la actividad del complejo respiratorio 1 [Dong *et al.*, 2013]. La activación de la glicolisis en la EMT también fue observada en cáncer de mama y próstata, donde es requerido para la remodelación del citoesqueleto y dar mayor movilidad celular [Shiraishi *et al.*, 2015]. En líneas de cáncer de pulmón de células no pequeñas la glicolisis es activada en EMT, a través de ZEB1 que activa la expresión del transportador de glucosa 3 (GLUT3) [Masin *et al.*, 2014]. Por otro lado, el tratamiento de células de cáncer de pulmón de células no pequeñas con TGF- β induce un cambio de la glicolisis a la fosforilación oxidativa, llevando a un incremento de los aminoácidos, en particular glutamato, a través de un mayor flujo de carbonos por el ciclo de Krebs. Esta redirección hacia el ciclo de Krebs es llevada a cabo por la represión de la piruvato deshidrogenasa cinasa 4 (PDK4) durante la EMT [Sun *et al.*, 2014]. Finalmente, la inducción de la EMT por TGF- β en cáncer de colon lleva a una translocación al núcleo de la piruvato cinasa M2 (PKM2), por lo que su silenciamiento previene la inducción de la EMT [Hamabe *et al.*, 2014]. Los efectos de la expresión de estos genes depende del contexto celular donde se encuentren. Además se han identificado perfiles de genes metabólicos que están altamente expresados en líneas celulares de cáncer de grado alto, y que pueden ser sobreexpresados con la inducción de la EMT [Shaul *et al.*, 2014]. Estos perfiles están altamente correlacionados con marcadores mesenquimales y se sobreexpresan con la activación de la EMT por TWIST1.

La EMT requiere de la activación coordinada de múltiples procesos celulares. Cada uno de estos procesos es esencial para la completa activación de la EMT [Sciacovelli y Frezza, 2017]. Como consecuencia la inhibición de alguna de estas partes dificulta su activación. Por ejemplo, la inhibición de IDH o la activación de PKA pueden bloquear la EMT. También, la acumulación de los productos de DPYD es esencial, y en caso de inhibiciones de este gen una suplementación de dihidropirimidinas rescata la EMT [Shaul *et al.*, 2014]. Asimismo, la baja

expresión de FBP1 es crucial para que la EMT se lleve a cabo en cáncer de mama luminal y gástrico [Dong *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016]. Asimismo, la actividad de la aldolasa A (ALDOA), que convierte fructuosa-1,6-bisfosfato a gliceraldehido-3-fosfato e hidroxiacetona es necesaria para la EMT. Su silenciamiento afecta la movilidad celular, la tumorigénesis y reprime los marcadores mesenquimales en carcinoma escamoso de pulmón [Du *et al.*, 2014]. Además, la sobreexpresión del lactato deshidrogenasa (LDH), la enzima que convierte piruvato a lactato, incrementa la migración e invasión del cáncer de vejiga [Jiang *et al.*, 2016a]. También, la EMT no puede ser inducida por SNAI1 si no se encuentra expresada la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en cáncer de colon [Liu *et al.*, 2017b]. Además, la citrato sintasa (CS) ha sido relacionada con la EMT, el silenciamiento de la enzima que cataliza el primer paso del ciclo de Krebs promueve la metástasis en carcinoma cervical y ovárico [Lin *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014]. El mecanismo exacto se desconoce, pero se cree que la disfunción mitocondrial es la responsable, aunque también se ha observado que es una respuesta tejido específica. Las mutaciones en genes metabólicos mitocondriales, como fumarato hidratasa (FH), succinato deshidrogenasa (SDH) e isocitrato deshidrogenasa (IDH), inducen la EMT en diferentes tipos de cáncer [Sciacovelli *et al.*, 2016; Hao *et al.*, 2009; Colvin *et al.*, 2016], lo que da mayor evidencia de que el metabolismo participa de manera importante en este proceso. Finalmente, la mayor parte de los cambios metabólicos descritos son tejido específico o dependen de mutaciones que no siempre están presentes. Es por ello que es necesario encontrar similitudes y diferencias en la reprogramación metabólica durante la EMT, para un mejor diseño de terapias útiles en diversos contextos genéticos. Es innegable que la EMT genera resistencia a varios fármacos, aunque su relación con el metabolismo se ha descrito parcialmente [Nieto *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2014; Hua *et al.*, 2020]. Se ha reportado que las células de cáncer de mama que han realizado la EMT son las que potencialmente son responsables de una metástasis pulmonar recurrente después de las quimioterapias, incrementando enzimas como la aldehído deshidrogenasa (ALDHs), citocromo P450 y enzimas del metabolismo de glutatión [Fischer *et al.*, 2015]. Estos cambios metabólicos protegen a las células del estrés oxidativo que genera la terapia. Asimismo, la delección de

TWIST1 o SNAI1 en células de cáncer pancreático quimioresistentes incrementa la expresión de transportadores de nucleótidos, lo que las hace más sensibles a gemtabicina [Zheng *et al.*, 2015]. Se ha comprobado que la inducción de la EMT por TGF- β induce resistencia a erlotinib en células de cáncer de pulmón con mutaciones en EGFR [Sun *et al.*, 2014]. Sin embargo la sobreexpresión de PDK4 bloquea parcialmente la EMT en estas células, haciéndolas más sensibles.

Al margen de este contexto se están generando datos masivos, como microarreglos y datos de metaboloma [Sun *et al.*, 2014] que permiten explorar las alteraciones, en varias vías metabólicas y de señalización. En este sentido, la complejidad de la EMT presenta retos para la caracterización de sus procesos subyacentes, y la biología de sistemas constituye una alternativa para su estudio.

1.3. La biología de sistemas en el estudio del metabolismo en la EMT

La biología de sistemas utiliza esquemas computacionales que integran datos masivos y contribuyen a su interpretación biológica a nivel global [Palsson, 2006]. En este campo se utilizan modelos matemáticos, los cuales se han convertido en herramientas fundamentales para entender los procesos biológicos y sus aplicaciones en la medicina clínica [Rezola *et al.*, 2014; Somvanshi y Venkatesh, 2014; Resendis-Antonio *et al.*, 2010]. Especialmente, el desarrollo de este formalismo es idóneo para explorar de forma global la reprogramación metabólica que subyace en la transición epitelio-mesénquima. El modelado basado en restricciones, integra un conjunto de algoritmos que combinan modelado computacional de reconstrucciones metabólicas de escala genómica con datos ómicos para diferenciar y predecir alteraciones metabólicas en sistemas biológicos [Somvanshi y Venkatesh, 2014; Resendis-Antonio *et al.*, 2015]. Dentro de estas herramientas computacionales, el análisis de balance de flujos (FBA, por sus siglas en inglés) resulta una herramienta poderosa para explorar y diseñar fenotipos metabólicos que van desde el microbioma humano, hasta células de cáncer tejido específico [Orth *et al.*, 2010]. Pese a que esta herramienta funciona como guía

para entender y diseñar fenotipos metabólicos, el FBA no toma en cuenta las concentraciones de metabolitos asociados a los flujos metabólicos. Es decir, en un estado celular estable, el espacio nulo de la matriz estequiométrica utiliza los espacios de soluciones disponibles de los flujos metabólicos, dejando fuera las concentraciones de metabolitos asociados al estado fisiológico. Para sobrellevar esta limitación, se han sugerido una variedad de formalismos con la capacidad de moverse del estado celular estable y explorar la asociación entre las concentraciones de metabolitos en dos condiciones diferentes [Diener *et al.*, 2016; Resendis-Antonio, 2009; Rawls *et al.*, 2019; Kondaveeti *et al.*, 2015]. Dentro de estos formalismos, Dycone es una herramienta útil para inferir cambios relativos en la regulación enzimática entre dos condiciones fisiológicas. Este algoritmo utiliza una reconstrucción metabólica y las concentraciones de metabolitos en dos condiciones diferentes [Diener *et al.*, 2016; Resendis-Antonio, 2009]. A diferencia de otras estrategias, Dycone no asume parámetros cinéticos específicos, en realidad calcula el espacio de todas las constantes cinéticas posibles (llamados con k) que matemáticamente asegura que el estado estacionario de un modelado en ecuaciones diferenciales reproduce las concentraciones de metabolitos obtenidos experimentalmente. Por lo tanto, la comparación entre dos espacios cinéticos nos permite identificar reacciones metabólicas cuya actividad tiene el potencial de cambiar su actividad entre dos condiciones fisiológicas. Subsecuentemente, los resultados pueden ser conectados a otros datos ómicos, como el proteoma o transcriptoma.

Utilizando esta y otras herramientas computacionales, este trabajo consiste en representar e identificar la actividad metabólica y sus alteraciones antes y después de la EMT, con base en datos de microarreglos y metaboloma utilizando una plataforma computacional. Su desarrollo será crucial para formar un esquema conceptual que coadyuve en el planteamiento de nuevas hipótesis que permitan entender los mecanismos metabólicos que regulan la EMT. De manera complementaria, se consideró también importante generar un modelo experimental que nos ayude entender algunas de las hipótesis generadas por el modelo.

Capítulo 2

Hipótesis y objetivo

Hipótesis

Dado que el metabolismo durante la EMT cambia de diferente manera en cada línea celular, se espera encontrar elementos metabólicos esenciales que se compartan entre varias líneas de cáncer de pulmón de células no pequeñas con diferentes mutaciones genéticas. Así, estos elementos pueden ser utilizados como biomarcadores que caractericen una potencial mala prognosis de los pacientes.

Objetivo General

Identificar de manera computacional las alteraciones metabólicas claves para entender la reprogramación metabólica durante la EMT en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Objetivos particulares

- Generar un modelo del metabolismo central de las líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas.
- Hacer un análisis básico de los datos de transcriptoma y metaboloma de 3 líneas celulares

de cáncer de pulmón de células no pequeñas y compararlos para encontrar diferencias y similitudes

- Modelar el metabolismo de las líneas celulares para identificar los elementos más alterados en común entre todas las líneas celulares
- Integrar los resultados del modelo con el análisis de expresión diferencial de cada línea celular
- Complementar el estudio con un experimento que muestre el comportamiento de una de las hipótesis generadas

Capítulo 3

Material y métodos

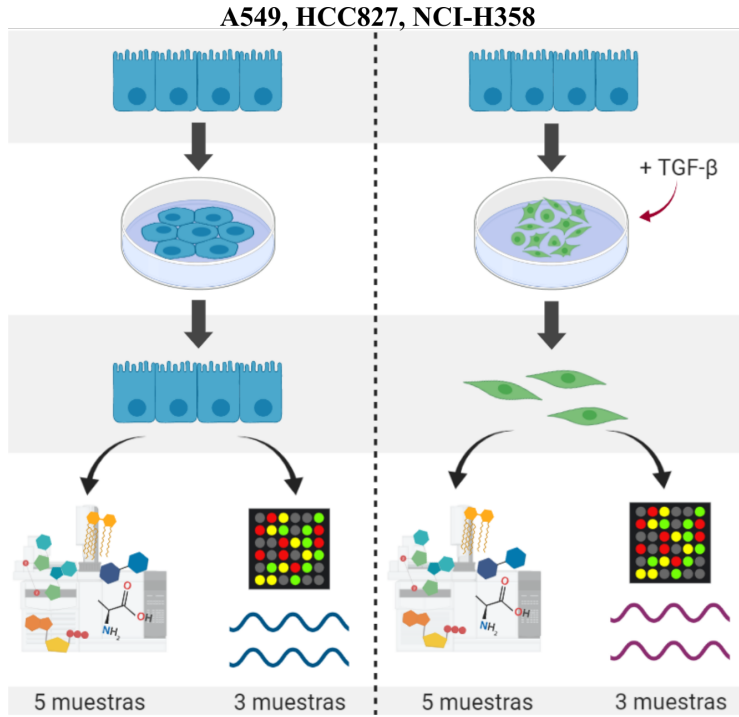
3.1. Datos

Para este trabajo se tomaron los datos de Sun *et al.* [2014] (Figura 3-1). Los microarreglos están bajo el identificador de GEO: GSE49644. Se realizaron tres muestras antes de la EMT y tres de células después de la EMT. Los datos de metaboloma se encuentra adjunto en la publicación original [Sun *et al.*, 2014]. Se realizaron cinco repeticiones antes y 5 después de la EMT. Ambos se analizaron los datos utilizando el lenguaje de programación R y pueden encontrar los códigos en <https://github.com/Meztlimg/ThesisAnalysis>

3.2. Estadística

A menos que se especifique otra cosa se considera que los datos son significativos si el valor de p era menor a 0.05. En el caso de los resultados de enriquecimiento se consideran significativas aquellas vías con valor de p y FDR menor a 0.05. En cada sección se describen las pruebas utilizadas para corroborar el valor de p .

Datos



Estrategia de investigación

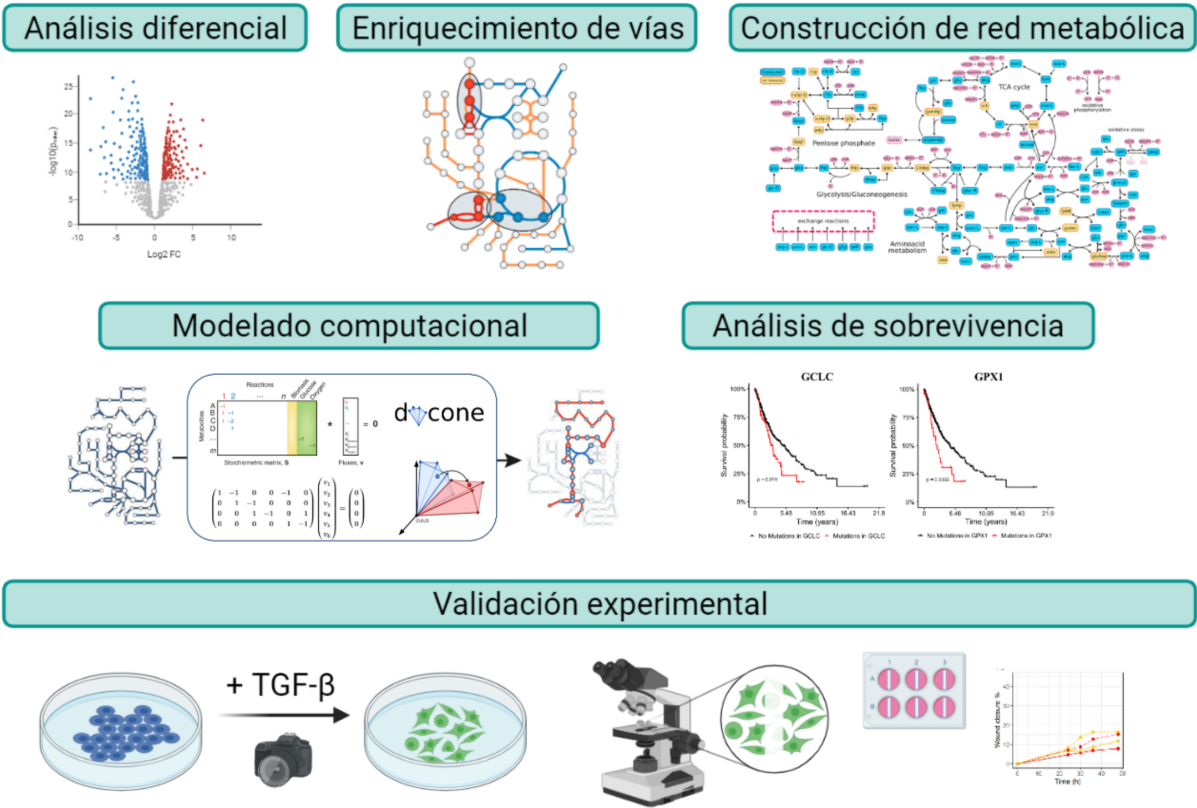


Figura 3-1: Diseño experimental de los datos utilizados y estrategia general de investigación

3.3. Microarreglos y metaboloma

Para la normalización de los microarreglos se utilizó el paquete fRMA de R de Bioconductor. Para el análisis de expresión diferencial de genes y cambios significativos en la concentración de metabolitos se usó el paquete de limma. Se consideraron diferencialmente expresados aquellos genes con $p\text{-value} < 0.05$ y $|lfc| < 1$. Para la comparación de concentraciones metabólicas se utilizó una prueba de t (t-test) y se corrigió el valor de p para prueba múltiples utilizando el algoritmo Benjamini and Hochberg (1995) ("BH" or its alias "fdr"). Este método controla el "False discovery rate" (FDR) o tasa de falsos descubrimientos, la proporción esperada de falsos positivos en las hipótesis rechazadas.

3.4. Enriquecimiento de vías metabólicas

En el enriquecimiento de vías se usó MSEA (Enrichment Analysis) de MetaboAnalyst 4.0 [Xia y Wishart, 2016; Chong *et al.*, 2019]. Se realizó el análisis para cada línea celular independientemente, utilizando la tabla de concentraciones de metabolitos identificados en el panel de "Análisis de Enriquecimiento". Los datos fueron normalizados por la media, transformados a escala logarítmica y escalados utilizando el algoritmo centrado en la media. Se comparó con la base de datos Pathway-associated metabolite (SMPDB). Los resultados de cada línea celular fueron comparados para encontrar las vías metabólicas enriquecidas en común.

3.5. Reconstrucción metabólica

Para representar e identificar los mecanismos metabólicos cambiantes durante la EMT se realizó una reconstrucción metabólica basada en reconstrucciones previas, datos de la literatura e implementación de criterios de inclusión. Particularmente, nos basamos en la reconstrucción de A549 que se encuentra en HMA (Human Metabolic Atlas) [Ghaffari *et al.*, 2015], asegurando así que las reacciones de interés estuvieran presentes en esta línea celular

(<http://www.metabolicatlas.org/downloads/cell>).

Sin embargo, con el objetivo de generar una red metabólica se siguió la estrategia "bottom-up", para lo cual desarrollamos un conjunto de criterios que permitieran elegir las reacciones y metabolitos adecuados. El proceso de reconstrucción se realizó seleccionando solo aquellas reacciones que cumplieran con los criterios:

1. Las reacciones deben pertenecer a rutas metabólicas obtenidas en el análisis de enriquecimiento de vías
2. Los productos o sustratos de cada reacción deben estar medidos en los datos de metaboloma
3. La reacción no debe estar aislada de las demás reacciones
4. La reacción puede ser incluida si ayuda a cerrar ciclos o conectar vías aisladas, aunque no se tengan las concentraciones de sus metabolitos
5. Las reacciones consecutivas de las cuales no se tengan medidas de sus metabolitos pueden ser colapsadas en una sola

3.6. Modelado computacional

El espacio de constantes cinéticas para cada fenotipo metabólico, lo obtuvimos utilizando el paquete `dycone` de R [Diener *et al.*, 2016]. Brevemente, el algoritmo asume que las reacciones metabólicas en la reconstrucción obedecen la ley de acción de masas, además de que el sistema ha llegado a un estado estable. Bajo estas restricciones, el espacio posible de los fenotipos metabólicos antes y después de la transición puede ser obtenido a través del espacio nulo de la siguiente ecuación:

$$S \cdot M \cdot k = 0$$

donde: S es la matriz estequiométrica, k un vector con los parámetros cinéticos asociados a cada reacción metabólica y M una matriz diagonal definida por:

$$M_i(x) = \prod_j x_j^{S_{ji}}$$

donde x_j es la concentración del metabolito j -ésimo.

Los datos de metaboloma sustituyeron las concentraciones en la matriz diagonal M , para después obtener el espacio nulo de la primera ecuación. Por último, la actividad diferencial metabólica en la EMT fue obtenida comparando los espacios nulos de cada condición. Este análisis fue desarrollado en R y se puede encontrar el reporte con el código, las imágenes adjuntas y los resultados en <https://github.com/Meztlimg/EMTanalysis>.

3.7. Análisis de sobrevivencia

Se usó el Genomic Data Commons Data Portal para el análisis de pacientes con mutaciones (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). En este portal se buscaron los datos de sobrevivencia de hombres con cáncer de pulmón y bronquios. Comparamos dos cohortes de pacientes con y sin mutaciones en los genes de interés. El tiempo de sobrevivencia acumulativo fue calculado con el método de Kaplan-Meier y analizado con una prueba log-rank. En el análisis de la supervivencia, el estimador de Kaplan-Meier es un estimador no paramétrico de la función de supervivencia. La característica distintiva del análisis con este método es que la proporción acumulada que sobrevive se calcula para el tiempo de supervivencia individual de cada paciente y no se agrupan los tiempos de supervivencia en intervalos. Por esta razón es especialmente útil para estudios que utilizan un número pequeño de pacientes. Para comparar si las diferencias observadas en dos curvas de supervivencia pueden ser explicadas o no por el azar, debemos realizar un test estadístico. La prueba de logaritmo del rango (“logrank”) compara en esencia el número de eventos (muertes, fracasos) en cada grupo con el número de fracasos que podría esperarse de las pérdidas en los grupos combinados [Bland y Altman, 2004]. La gráfica fue creada utilizando el lenguaje de programación R, con la ayuda del

paquete de ggplot2 y TCGAbiolinks.

El análisis de supervivencia de pacientes con expresión diferencial fue obtenido de Kaplan Meier plotter (<https://kmplot.com/analysis/>) [Nagy *et al.*, 2018]. Se utilizaron datos de mRNA de hombres con cáncer de pulmón. El tiempo acumulativo de supervivencia fue calculado con el método de Kaplan-Meier y analizado con una prueba Cox univariada. Se consideró significativo cuando el valor de p fue menor a 0.05.

3.8. Generación de A549dKO estables

Para complementar el estudio se generaron una serie de experimentos para evaluar el papel de la barrera antioxidante en la EMT. Con este objetivo se generó una línea celular derivada de A549 con un abatimiento de los genes GCLC y CAT, llamada A549dKO.

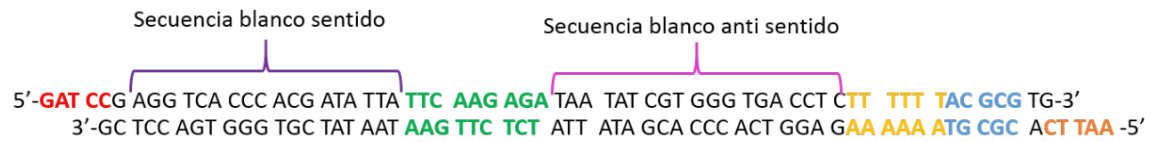
Las células A549 fueron sembradas en cajas petri de 60mm con medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos (0.1 mg/mL de penicilina y 0.1 mg/mL estreptomina). Se sembraron 100,000 células por pozo en una caja de 6 pozos y se mantuvieron por 4 días, tiempo suficiente para que alcanzaran una confluencia de aproximadamente 80%. Este cultivo se utilizó para transfectar con los plásmidos shCAT y shGSH (Figura 3-2).

Se agregó la solución de transfección, se dejaron incubar 24 hrs y se seleccionaron las células transfectadas mediante la adición de puromicina (2g/ml) durante 3 semanas. Se mantuvieron en cultivo por lo menos 3 semanas más para que llegaran a confluencia 90% aproximadamente. Se guardaron en tubos de 2ml para guardarlas. Las condiciones de almacenaje de las células estables son: -80°C o Nitrógeno líquido en un medio de congelación (DMEM sin suplementar y con 5% de DMSO) hasta que utilizaron para algún experimento.

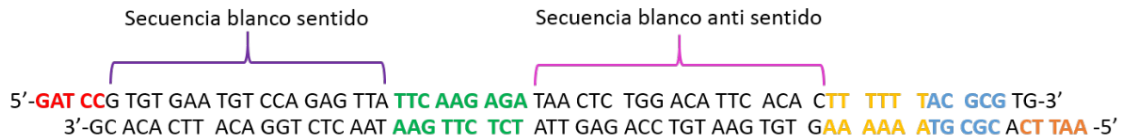
3.9. Cuantificación de la actividad de catalasa

La actividad de catalasa se midió de acuerdo al protocolo de Aebi, (1984) [Aebi, 1984]. De manera breve, se utilizaron 1×10^6 células, que fueron sonicadas por 10 ciclos de 10 segundos

shRNA1 CAT



shRNA1 GSH



Sitio de corte de EcoR1

Sitio de corte de BamHI

Hairpin loop

Terminador

Sitio de corte de MLU1

Figura 3-2: Secuencia de los oligos para el silenciamiento. Muestra la estructura y los elementos de los oligos a emplear tanto para CAT en la parte de arriba, como para GCLC en la parte de abajo.

a una amplitud de 20 MHz, posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante se utilizó para determinar la actividad de la catalasa y la concentración de la proteína. La actividad de la catalasa se determinó leyendo el decaimiento de la absorbancia a 240 nm a temperatura ambiente, ajustando a cero con Buffer de fosfatos 50mM. Se adicionaron 500µL de H₂O₂ 20 mM a 100 µL del sobrenadante y 400µL de Buffer de fosfatos, midiendo la absorbancia a 15 y 30 segundos. La actividad de la catalasa se determinó leyendo el decaimiento de la absorbancia a 240 nm a temperatura ambiente y comparándolas con el control. Se realizó una curva de cambio de fluorescencia entre 15 y 30 segundos con diferentes concentraciones de H₂O₂ como control de la actividad de la catalasa (Figura 3-3). Finalmente, se agregó H₂O₂ a las células procesadas para determinar la actividad de la catalasa.

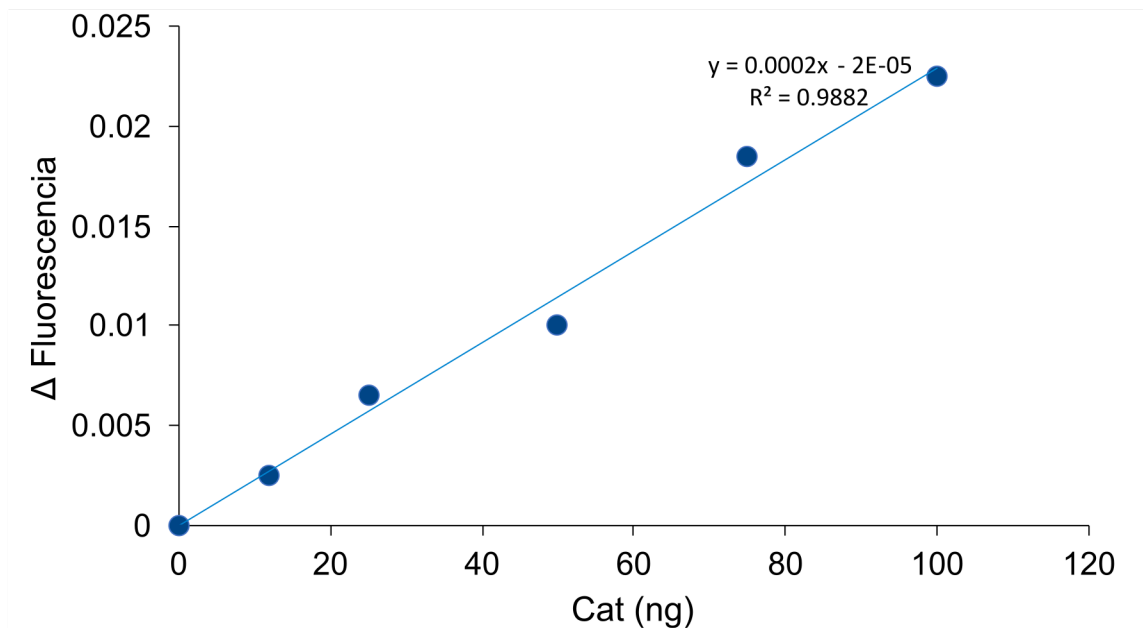


Figura 3-3: Curva control del cambio de fluorescencia a diferentes concentraciones de H_2O_2 .

3.10. Cuantificación del glutatión reducido

De las células cosechadas se toman 100 μL y se les agregaron 100 μL de la solución de precipitación de ácido meta fosfórico, se centrifugaron a 1000 g por 10 min. Al sobrenadante se le agregó 1 mL de buffer para GSH (0.1 mol NaH_2PO_4 y 0.005 mol EDTA) y 100 μL de OPT, se incubó por 15 min protegido de la luz y se leyeron las muestras a 420 nm. Los resultados se interpolan en una curva estándar de 5 μM a 1 mM de GSH en agua Figura 3-4. Los resultados se interpolan en una curva estándar de 5 μM a 1 mM de GSH en agua Figura 3-4.

3.11. Cuantificación de mRNA

La extracción del RNA total se realizó en 1×10^6 células. Las células se centrifugaron para eliminar el medio de cultivo y se mezclaron con 1 ml de Trizol. Se incubaron por 5 min a temperatura ambiente y se adicionaron 200 μl de cloroformo, la mezcla se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C con la finalidad de separar la fase acuosa y la fase orgánica.

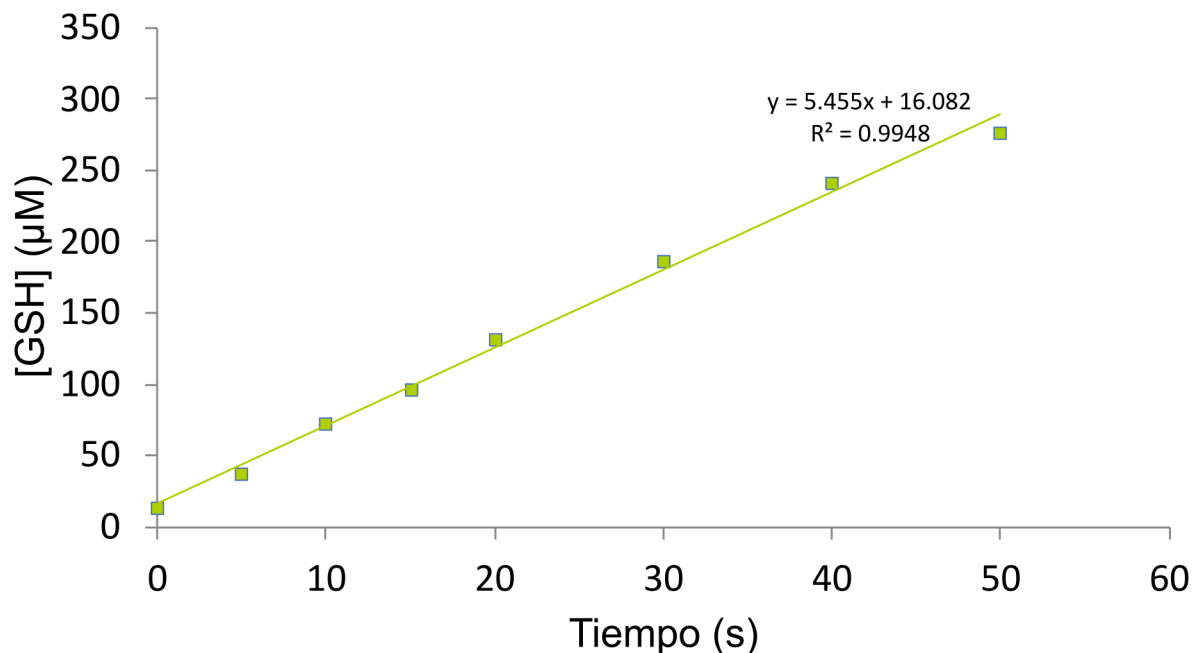


Figura 3-4: Curva de concentración de glutatión

La fase acuosa se pasó a un tubo nuevo y se le adicionaron 500 μl de isopropanol mezclando por inversión. Las muestras se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C. La pastilla obtenida se lavó con 1 ml de 75 % etanol/agua libre de RNAsas, después se centrifugó por 5 minutos a 15,000 rpm a 4°C, se eliminó todo el alcohol por decantación y se dejó secar la pastilla por aproximadamente 10 minutos. Para resuspender la pastilla se agregó un volumen de 50 μl de agua libre de RNAsas. La concentración de RNA fue cuantificada en un NanoDrop ®ND-1000 Spectrophotometer y se guardaron a -20°C. La calidad del RNA fue analizada con la relación de absorbancia $260/280 = 2.0 \pm 0.15$, las muestras con una pureza menor a la mencionada fueron descartadas.

Las reacciones de RT-PCR se hicieron con el kit comercial “Access RT-PCR Systems” (Promega). Se utilizó una concentración de 1 μg de RNA total para cada reacción, siguiendo el protocolo del fabricante se adicionaron 5 μl de 10X de buffer, 1 μl de MgCl_2 , 1 μl dNTP’s, 1 μl de 10 mM oligonucleótido sentido y 1 μl de 10mM oligonucleótido antisentido, 0.5 μl de la enzima reverso transcriptasa (RT), 0.5 μl de enzima polimerasa, en una reacción final de 25 μl .

Las muestras se incubaron a 42°C por 60 min para sintetizar el cDNA y a 95°C por 5 min para inactivar la retrotranscriptasa, después se deja el siguiente programa: precalentamiento de 20 seg a 94°C, 40 ciclos de (1 min a 95°C, 30s at 60°C y 1 min a 72°C) y una elongación final de 2 min a 72°C. En cada una de las reacciones se incluyó un gen que se expresa constitutivamente para que sirva de referencia, en nuestro caso: Glucosa fosfato isomerasa (GPI). Los oligonucleótidos utilizados para el RT-PCR fueron diseñados utilizando el Primer 3 software [Untergasser *et al.*, 2012] (NIH, v 0.4.0). Las secuencias se enumeran en la Tabla 3-1. Los productos de la reacción de RT-PCR fueron visualizados en un gel al 3% de agarosa teñido con bromuro de etidio. Para verificar el peso de cada fragmento amplificado se utilizó un marcador de DNA de pesos moleculares de 100 pares de bases.

Tabla 3-1: Secuencias de primers utilizados para el RT-PCR

Gen	Secuencia primer
CAT HUMAN F	agcttagcgttcatccgtgt
CAT HUMAN R	tccaatcatccgtcaaaaca
GCLC HUMAN F	agagaaggggaaaggacaa
GCLC HUMAN R	gtgaaccaggacagcctaa
GPI HUMAN F	cgccaaccaactctattgt
GPI HUMAN R	ggtagaagcgtcgtgagagg

3.12. Inducción de la EMT

Se utilizaron las células A549 trasnfectadas llamadas A549dKO, así como las células en su estado inicial (A549WT). Se trataron de la misma manera que en Sun *et al.* [2014] Las células se cultivaron en RPMI1640 (Gibco) suplementado con 2g/l de bicarbonato de sodio, 10% suero fetal bovino (FBS), 2mM P/S y 4 mM glutamina (Gibco). Para generar las células mesenquimales, se cultivaron con 2ng/ml TGF- β (Cell Signaling) por 3 semanas. El medio se cambió cada 4 días y se resembró cada 4 días solo si se tenía una confluencia de 80% de células.

3.13. Ensayo de herida

Las células se cosecharon a los 8, 16 y 21 días y se sembraron células con 1 % de FBS y sin TGF β . Se dejaron crecer durante 24h para llegar a una confluencia del 100 %. Utilizando una punta de pipeta se abrió la herida. Se fotografió de 3 a 6 campos de cada herida al comienzo, a las 24, 30, 36 y 48 h. Las cajas fueron marcadas para tener referencia del lugar donde se tomaron las fotografías.

Las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ utilizando el macro Wound Healing size tool (github.com/AlejandraArnedo/Wound-healing-size-tool/wiki) [Suarez-Arnedo *et al.*, 2020]. Posteriormente el porcentaje de cierre de la herida fue calculada utilizando el área de la herida en píxeles con la fórmula [Grada *et al.*, 2017]:

$$\text{Wound closure \%} = \frac{A_{t=0h} - A_{t=\Delta h}}{A_{t=0h}} * 100 \%$$

Donde:

$A_{t=0h}$ = Área de la herida al inicio del ensayo (t=0h)

$A_{t=h}$ = Área de la herida medida h horas después del inicio

Finalmente, los datos fueron graficados con el lenguaje de programación R. El código puede ser encontrado en el repositorio y pueden encontrar los códigos en el repositorio de Github ubicado en github.com/Meztlimg/ThesisAnalysis.

Capítulo 4

Resultados

Los análisis presentados se realizaron utilizando datos de metaboloma y transcriptoma previamente reportados en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas [Sun *et al.*, 2014]. De manera simplificada estos datos provienen de tres líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas que fueron inducidas a la transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés) utilizando TGF- β . Se obtuvo su transcriptoma y metaboloma antes y después de la inducción de la EMT. Es importante mencionar algunos aspectos relevantes de este diseño experimental. Primero, este conjunto de datos es invaluable ya que tanto el metaboloma como el transcriptoma provienen de las mismas muestras. Por otra parte, las tres líneas celulares, A549, HCC827 y NCI-H358, tienen mutaciones genéticas diferentes, lo que afecta la modulación de su metabolismo. A pesar de estas diferencias, todas las líneas tuvieron la capacidad de reprogramar su metabolismo para llevar a cabo la EMT. Es por ello que utilizamos este conjunto de datos para identificar los elementos metabólicos con un papel importante en la modulación de la EMT en diferentes escenarios oncológicos. A continuación se presentan una serie de análisis computacionales, donde se analizó tanto el metaboloma, como el transcriptoma antes y después de la EMT de líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas. Los datos de ambas tecnologías fueron integrados para dar mayor robustez a los resultados. Como resultado de estos análisis *in silico*, proponemos biomarcadores y posibles elementos de control metabólico, a nivel de genes y enzimas, de la

EMT en cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Tabla 4-1: Mutaciones de cada línea celular

Línea celular	A549	HCC827	NCI-H358
Mutación	KRAS ^{G12S}	EGFR ^{ΔE746-A750}	KRAS ^{G12S}

4.1. La EMT reprograma el metabolismo celular

Se estudiaron los cambios metabólicos ocurridos antes y después de la EMT. En adelante se le llamarán “parental” a las células antes de la EMT, y “mesenquimal” a las células después de la EMT. Para observar cómo se agrupaban los datos de metaboloma antes y después de la EMT, se utilizaron dos métodos independientes de reducción de dimensiones (Figura 4-1). Estos métodos permiten observar la distribución de los datos basados en un conjunto de características, en este caso las concentraciones de metabolitos. El primer estudio fue el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés), el cual no muestra una separación clara de los datos de metaboloma. Cuando se desea reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos, es decir, condensar la información contenida en muchas variables en solo unas pocas a la vez que se mantiene la “estructura” original de los datos, la técnica de Principal Component Analysis (PCA) es una uno de los estándares. A pesar de las muy buenas propiedades que tiene el PCA, sufre de algunas limitaciones, por ejemplo, solo tiene en cuenta combinaciones lineales de las variables originales. En determinados escenarios, el no poder considerar otro tipo de combinaciones supone perder mucha información. El segundo método, llamado incrustación de vecinos estocásticos distribuidos en t (tSNE), consigue superar esta limitación, ya que, es un algoritmo de aprendizaje automático no-lineal para visualización y agrupación de datos. El algoritmo de t-SNE calcula la probabilidad condicional de cada par de observaciones y trata de minimizar la suma de las diferencias entre las probabilidades de la dimensión superior e inferior. Este método mostró que las muestras de cada línea celular se apartaban una de la otra, pero que las muestras mesenquimales (después de la EMT) son diferentes de las epiteliales (antes de la EMT) (Figura 4-1). Esto coincide con

que cada línea celular tiene mutaciones que modulan su metabolismo de manera diferente [Arner *et al.*, 2019; Halbrook y Lyssiotis, 2017].

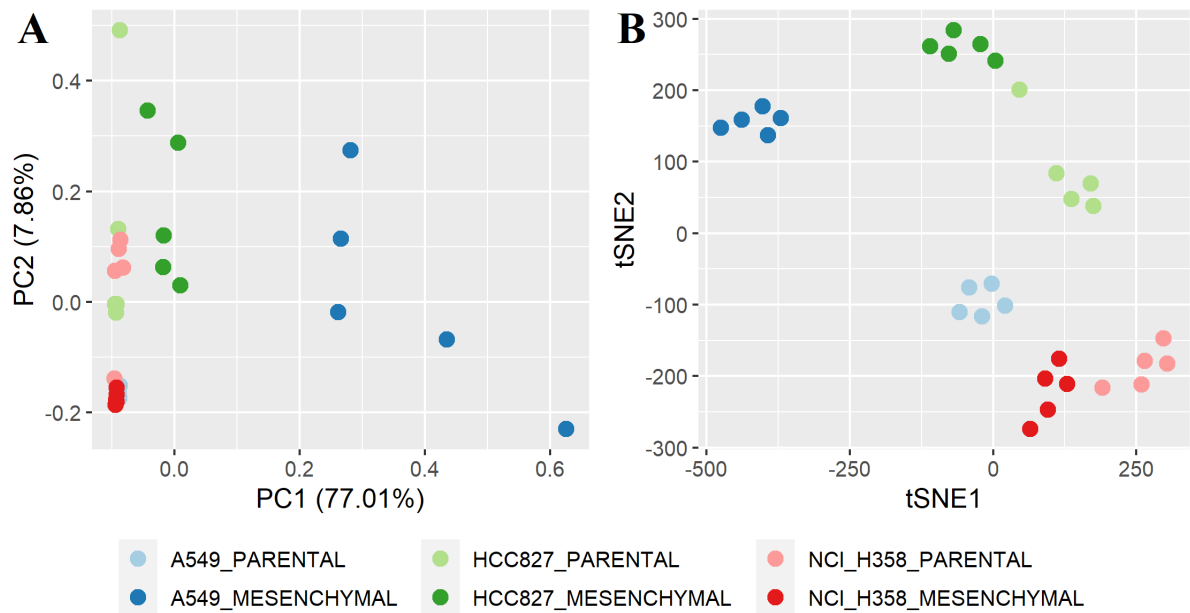


Figura 4-1: El metabolismo es diferente en cada línea celular. A. Análisis de componentes principales que no logra diferenciar entre líneas celulares ni estados celulares. B. Análisis de tSNE que agrupa las muestras por líneas celulares y por estado celular (epitelial y mesenquimal)

Para identificar los cambios metabólicos específicos se realizó un análisis diferencial de las concentraciones antes y después de la EMT. Las concentraciones de metabolitos de cada línea celular fueron analizadas independientemente (Figura 4-2). Cada línea celular presentó un número diferente de metabolitos alterados en el estado mesenquimal, indicando que, a pesar de que las tres realizan la EMT, la reprogramación metabólica surge de manera diferente en cada una de ellas (Tabla 4-2). La línea celular A549 presentó el mayor número de metabolitos con concentraciones diferentes antes y después de la EMT, mientras que NCI-H358 fue la que menos cambios tuvo en sus metabolitos. Con el propósito de encontrar metabolitos en común que cambien sus concentraciones en el estado mesenquimal en todas las líneas celulares, interceptamos los resultados de cada línea celular. Se encontraron seis metabolitos que cambian sus concentraciones en el estado mesenquimal de todas las líneas celulares

(Figura 4-2). Entre ellos se encuentran glicerol 3 fosfato, glicerofosforilcolina, gliciltirosina, N-acetil glucosamina 6-fosfato, nicotamina ribonucleótido y triptofano. Este número reducido de metabolitos compartidos concuerda con los resultados de agrupamiento vistos previamente (Figura 4-1). En conclusión, cada línea celular presenta cambios diferentes en su metaboloma, y muy pocos son compartidos entre sí. A pesar de esto, algunos metabolitos compartidos en dos de las tres líneas celulares pertenecían a vías metabólicas en común, por lo que se prosiguió con un análisis de enriquecimiento de vías.

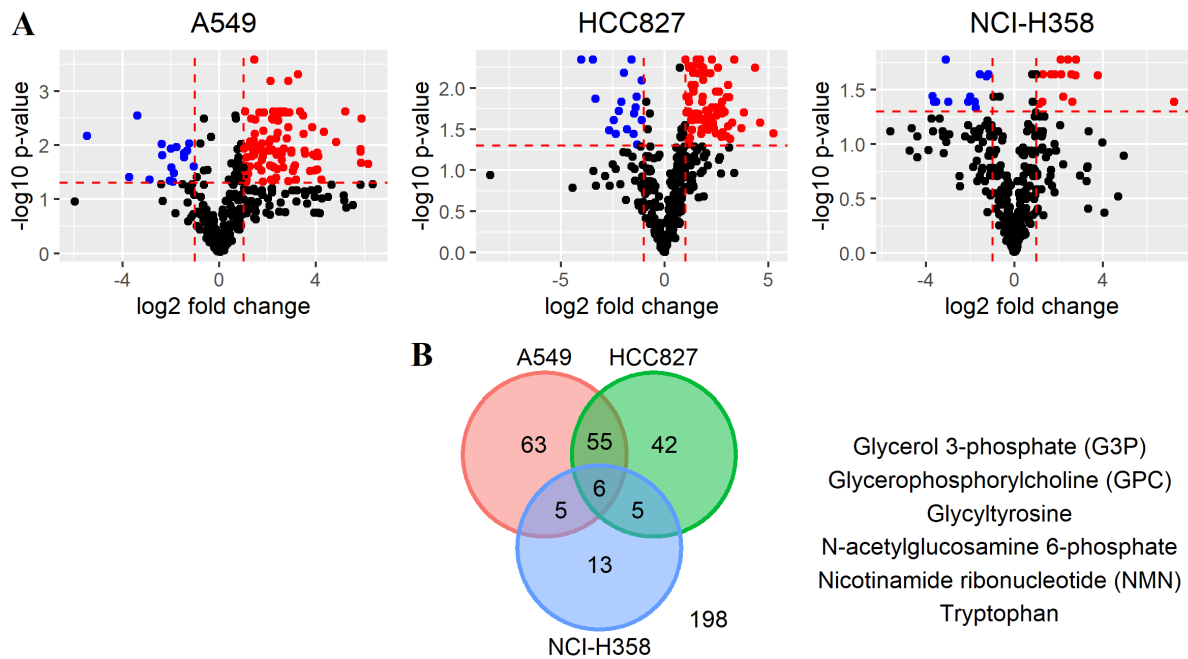


Figura 4-2: Concentración diferencial de metabolitos después de la EMT. A. Metabolitos en rojo aumentaron su concentración, y en azul los que disminuyeron su concentración. B. Número de metabolitos alterados compartidos entre las líneas celulares. A la derecha los nombres de los 6 metabolitos que cambian en todas las líneas celulares

Tabla 4-2: Número de metabolitos con concentración diferencial después de la EMT. Fold change menor a -1 o mayor a 1 y un valor de p menor a 0.05

Línea celular	Mayor concentración	Menor concentración	Total
A549	112	17	129
HCC827	90	18	108
NCI-H358	17	12	29

4.2. La EMT afecta el metabolismo central

Desde el punto de vista de flujos metabólicos, la concentración de un metabolito depende de su producción y su consumo. Por ello la información recabada de las concentraciones de metabolitos suele ser limitada. Además existen metabolitos con cambios de concentración sutiles que no pasan el umbral establecido para ser considerados estadísticamente verdaderos, sin embargo, estos cambios aún podrían tener una influencia sustancial a nivel de vías metabólicas completas. Es por ello que se realizó un análisis de enriquecimiento de vías metabólicas tomando en cuenta los cambios de todos los metabolitos en una vía, aunque estos sean sutiles. Los datos de cada línea celular fueron analizados independientemente (Apéndice B). La línea celular A549 presentó el mayor número de vías enriquecidas después de la EMT, las cuales se comparten en su mayoría con las enriquecidas en las otras dos líneas celulares. Pese a ello, encontramos que 21 vías metabólicas cambian en las tres líneas celulares (Figura 4-3). Dentro de estas vías se destacan el ciclo de Krebs, metabolismo de piruvato y varios aminoácidos, así como el metabolismo de glutatión (Tabla 4-3). En estas vías enriquecidas con cambios podemos observar vías que conforman el metabolismo central de una célula, coincidiendo con distintos estudios, en donde refieren que el metabolismo central cambia de manera radical para sustentar el nuevo fenotipo celular. En conclusión, fue posible observar que la EMT está acompañada por dos tipos de reprogramación metabólica. La primera definida por un conjunto central de transformaciones comunes en diferentes líneas celulares. Mientras que, la segunda está definida por cambios particulares de cada línea celular dependientes de su contexto celular.

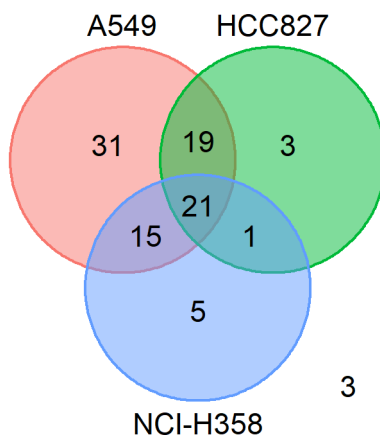


Figura 4-3: Se comparten vías metabólicas alteradas durante la EMT entre las líneas celulares

Tabla 4-3: Vías metabólicas enriquecidas en todas las líneas celulares. Valor de p menor a .01

Vías metabólicas enriquecidas en todas las líneas celulares	
Pyruvate Metabolism	Glycine and Serine Metabolism
Citric Acid Cycle	Valine, Leucine and Isoleucine Degradation
Beta-Alanine Metabolism	Lysine Degradation
Glutamate Metabolism	Fatty acid Metabolism
Glutathione Metabolism	Nicotinate and Nicotinamide Metabolism
Retinol Metabolism	Beta Oxidation of Very Long Chain Fatty Acids
Ethanol Degradation	Mitochondrial Beta-Oxidation of Medium Chain Saturated Fatty Acids
Phytanic Acid Peroxisomal Oxidation	Mitochondrial Beta-Oxidation of Short Chain Saturated Fatty Acids
Methionine Metabolism	Steroid Biosynthesis
Purine Metabolism	Folate Metabolism
Tryptophan Metabolism	

4.3. Reacciones alteradas en la EMT

Durante la EMT se reprograman diversas vías metabólicas que modifican las concentraciones de metabolitos, pero con esta información es difícil localizar los mecanismos que subyacen en esta reprogramación metabólica en la EMT. Además, la identificación de las alteraciones enzimáticas precisas es una tarea importante para encontrar biomarcadores útiles para la prognosis de pacientes. Con la finalidad de identificar alteraciones metabólicas en elementos precisos, el modelado basado en restricciones constituye un paradigma apropiado para encontrar blancos metabólicos contra la metástasis. Este tipo de modelado computacional nos permite predecir cuáles reacciones son las responsables de alterar las concentraciones de

los metabolitos experimentalmente observados. Uno de los primeros pasos para poder modelar el metabolismo celular es la reconstrucción de una red metabólica que fue usada como modelo de investigación.

Para identificar las reacciones principales que reprograman el metabolismo durante la EMT se utilizó una estrategia bottom-up. La cual implica que se comienza utilizando una red muy simple y se añaden nuevas reacciones utilizando diferentes criterios. Se diseñó un conjunto de reglas que permitían decidir cuáles reacciones se iban incluyendo de forma sistemática. En resumen, primero se consideró que las reacciones debían pertenecer a las vías metabólicas enriquecidas identificadas previamente. Posteriormente se seleccionaron aquellas reacciones de las cuáles se tenían datos de las concentraciones de sus sustratos o productos. Cada una de estas reacciones debía estar cercana a las elegidas previamente, y sobre todo conectadas al metabolismo central. Finalmente, dado que algunas de estas reacciones eran relevantes para la EMT, pero se encontraban aisladas, decidimos incluir reacciones que permitieran cerrar ciclos metabólicos en la red. En caso de existir una serie de reacciones sin sustratos o productos, se colapsaron en una sola reacción para simplificar el modelo. Como resultado, se reconstruyó una red metabólica de 112 reacciones y 74 metabolitos. La red incluye la vía de glicólisis, ciclo de Krebs, metabolismo de aminoácidos, pentosas fosfato, y metabolismo de glutatión (Figura C-1). La ausencia de datos de algunos metabolitos impidieron que agregáramos el resto de las vías metabólicas.

Esta reconstrucción fue utilizada para explorar las capacidades metabólicas que sostienen la EMT a través de Dycone, un método computacional de modelado basado en restricciones [Resendis-Antonio *et al.*, 2015]. Dycone es una estrategia computacional que identifica alteraciones en reacciones de una red metabólica comparando datos de metaboloma en dos condiciones diferentes [Diener *et al.*, 2016]. Utilizando esta herramienta, se identificaron diversas reacciones que cambiaron después de la EMT en cada línea celular (Figura 4-4, Figura 4-5, Figura 4-6). En general, podemos encontrar alteraciones en el transporte de glutamato y glutamina, dos aminoácidos sumamente importantes en el metabolismo del cáncer. El consumo de glutamina en determinados tumores es tal, que algunas células

tumorales acaban desarrollando adicción a la glutamina, un aspecto con importantes implicaciones terapéuticas. Además, la glutamina mantiene la producción de ATP, suministrando al ciclo de Krebs con oxoglutarato, y sirve para la síntesis de otros aminoácidos no esenciales, que requiere la célula tumoral para su crecimiento, tales como glutamato, prolina, arginina o alanina. El modelo predice que varias reacciones del ciclo de Krebs están siendo afectadas, como ya se esperaba de acuerdo a los resultados de enriquecimiento y la literatura [Sun *et al.*, 2014; Sciacovelli *et al.*, 2016; Hao *et al.*, 2009; Colvin *et al.*, 2016]. Asimismo, nuestro análisis concluye que las reacciones involucradas con la degradación de la arginina y producción de la urea se ven comprometidas durante la EMT. Finalmente, pero no menos importante observamos alteraciones en la reacción que involucra la reducción y oxidación del glutatión. La EMT incrementa la resistencia de las células cancerosas a especies reactivas de oxígeno creadas tanto por la anoikis como por distintos fármacos. Por lo que es entendible encontrar predicciones en la síntesis, uso y degradación del glutatión. No obstante, para adquirir mayor información acerca de este proceso utilizamos los datos de transcriptoma para complementar estas predicciones.

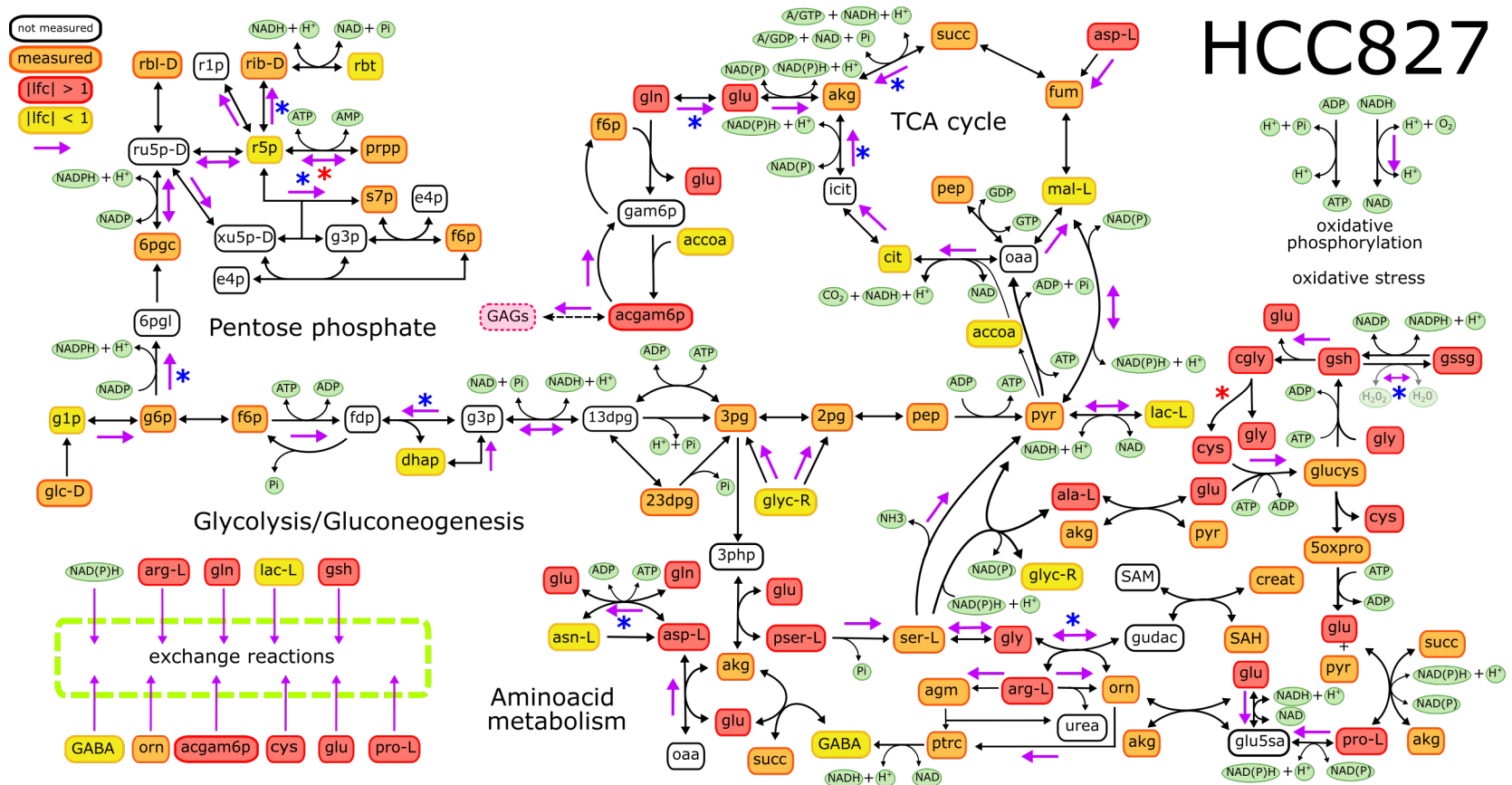


Figura 4-4: Reacciones metabólicas afectadas durante la EMT en HCC827. Flechas moradas son reacciones predichas por el modelo. Color de los metabolitos indican su concentración de menor (amarillo) a mayor (rojo). Asteriscos azules genes subexpresados y rojos sobreexpresados en el estado mesenquimal.

A549

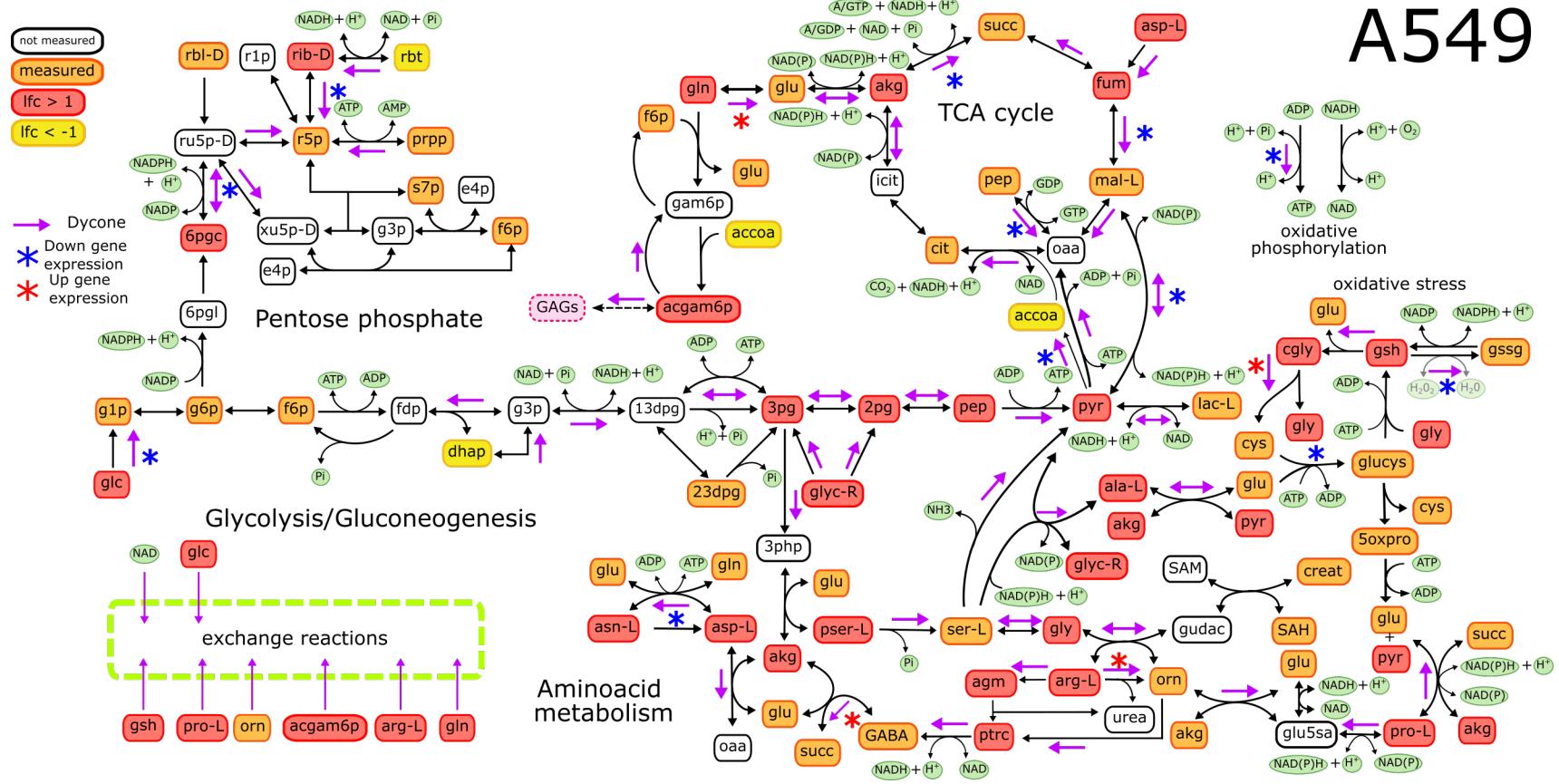
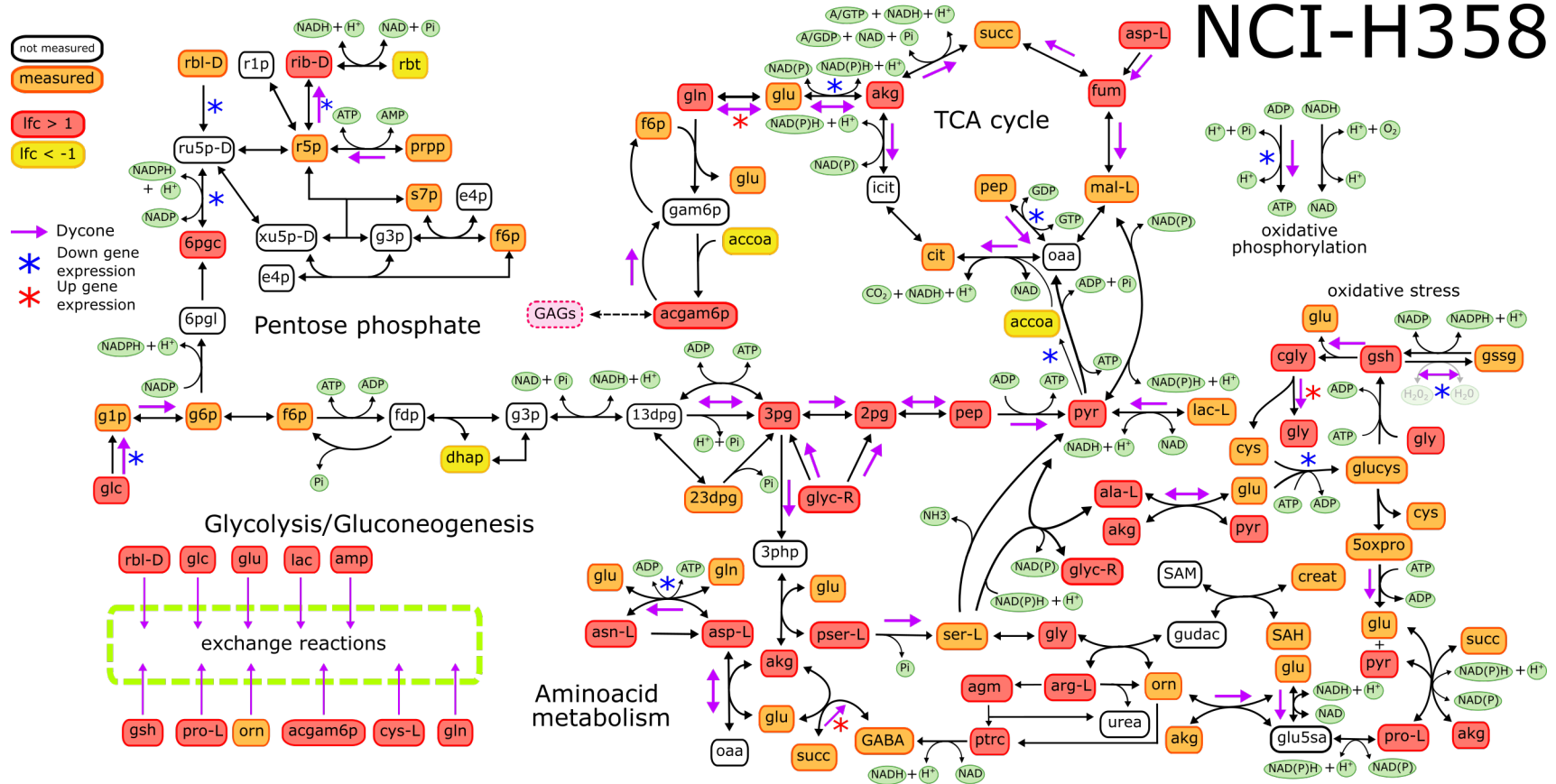


Figura 4-5: Reacciones metabólicas afectadas durante la EMT en A549. Flechas moradas son reacciones predichas por el modelo. Color de los metabolitos indican su concentración de menor (amarillo) a mayor (rojo). Asteriscos azules genes subexpresados y rojos sobreexpresados en el estado mesenquimal.

NCI-H358



37

Figura 4-6: Reacciones metabólicas afectadas durante la EMT en NCI-H358. Flechas moradas son reacciones predichas por el modelo. Color de los metabolitos indican su concentración de menor (amarillo) a mayor (rojo). Asteriscos azules genes subexpresados y rojos sobreexpresados en el estado mesenquimal.

4.4. Genes metabólicos diferencialmente expresados en la EMT

Para otorgar mayor robustez a nuestros resultados se exploró la expresión de los genes metabólicos que codifican las enzimas encargadas de las reacciones ya predichas. Estos análisis mostraron que existían varios genes que se expresaban de manera diferencial después de la EMT en cada línea celular Apéndice D. Además, varias de estas vías metabólicas estaban repetidos entre las líneas celulares y también se encontraban en algunas de las vías enriquecidas previamente identificadas. Con la finalidad de identificar un core metabólico que caracterice la EMT, se seleccionaron aquellas reacciones predichas en el modelo de todas las líneas celulares, y que además tuvieron cambios en la expresión de sus genes. Una de las reacciones importantes de estos resultados es la glutaminasa. En resumen, el modelo predijo que la reacción glutaminasa, que deamina la glutamina a glutamato, cambió en todas las líneas celulares. Además, se observó que el gen de la glutaminasa (GLS) incrementó su expresión en las células mesenquimales de las líneas celulares A549 y NCI-H358, mientras que tuvo un decremento en las células mesenquimales de HCC827 (Figura 4-7). Estos hallazgos concuerdan con lo reportado en otros estudios los cuales han hecho evidente que el cambio en la regulación de esta enzima a diferentes niveles es necesario para llevar a cabo la EMT en diferentes tipos de cáncer [Sun *et al.*, 2014; Ramirez-Peña *et al.*, 2019; Xiang *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2016]. Esto indica que los resultados alrededor de la glutaminasa y el gen GLS concuerdan con lo reportado en la literatura, por lo que se prosiguió a estudiar otras rutas metabólicas.

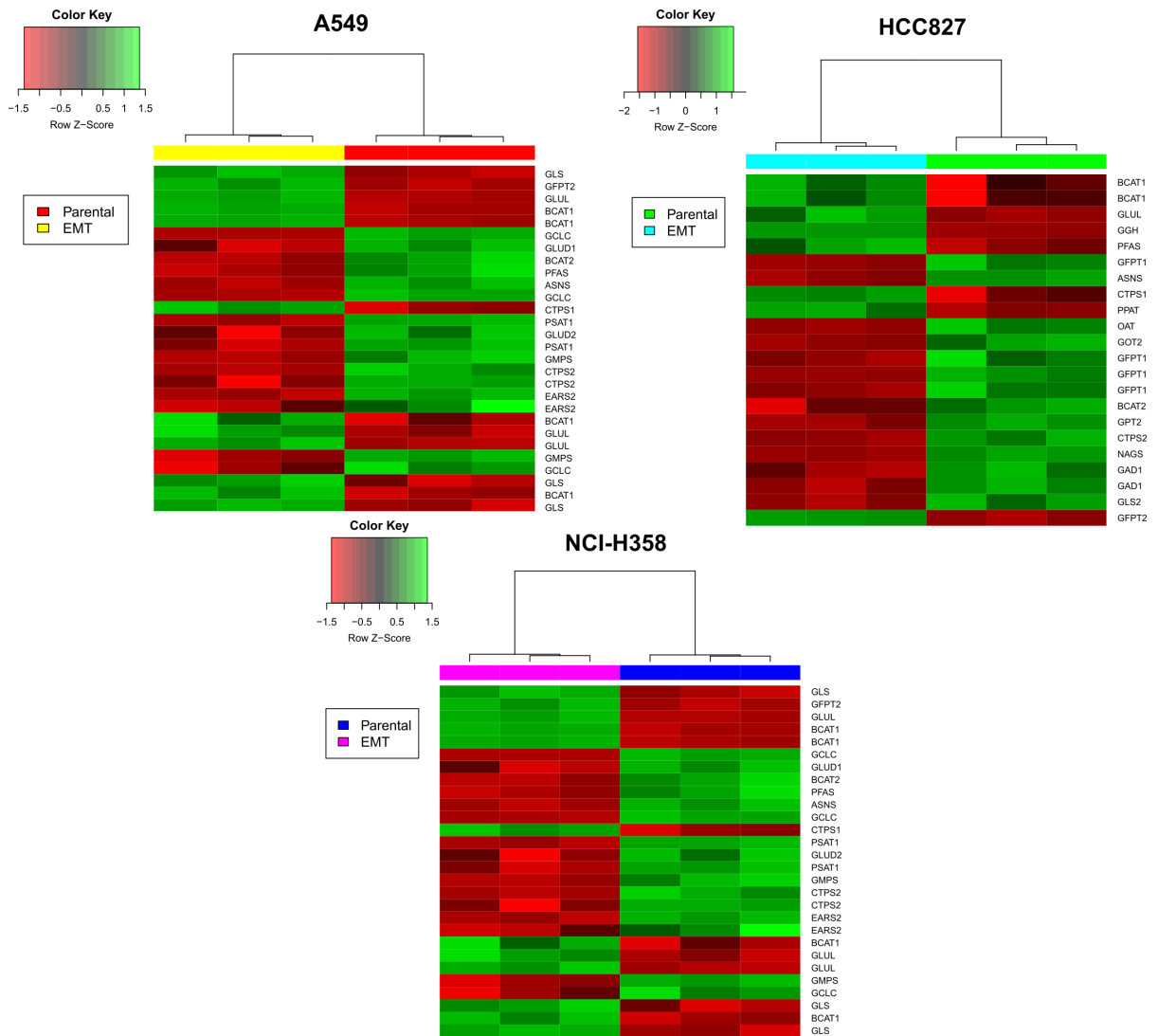


Figura 4-7: La expresión de los genes de la vía de glutamato está alterada. En cada panel la comparación entre el estado epitelial y mesenquimal de cada línea celular.

4.5. La vía del glutatión cambia en todas las líneas celulares

El metabolismo de glutatión es una vía que incluye la síntesis, la degradación y el uso del glutatión para desintoxicar la célula de especies reactivas de oxígeno. En los análisis, se observó que varios genes del metabolismo de glutatión se veían afectados. Entre ellos se encontraba los genes de glutatión reductasa (GSR), glutatión peroxidasa (GPXs) y Glutamato-Cisteína Ligasa Subunit Catalítica (GCLC) (Figura 4-8). GSR disminuyó su expresión en las tres líneas celulares después de la EMT, al igual que el gen GPX2. Tanto los GPXs como GSR están principalmente involucrados en el uso del glutatión para desintoxicar a las células de especies reactivas de oxígeno. Asimismo, GCLC disminuyó su expresión en A549, y NCI-H358. No obstante, esta reacción fue predicha por el modelo sólo en la línea celular HCC827. También se observó una sobreexpresión del gen Alanil Aminopeptidasa (ANPEP) en todas las líneas celulares. Este gen está encargado de la parte final de la degradación del glutatión. El modelo computacional sugiere un cambio durante la EMT en esta reacción en A549 y NCI-H358. Lo que posiblemente está relacionado con la mutación en KRAS de estas líneas celulares.

Es interesante que todos estos genes codifican enzimas que fueron predichas por nuestro modelo computacional en alguna línea celular (Figura 4-9). En resumen, la síntesis, oxidación, reducción y degradación del glutatión está alterada en las tres líneas celulares. Estos resultados concuerdan con otros estudios que reportan que diferentes enzimas del metabolismo de glutatión están involucradas de manera importante en la EMT en varios tipos de cáncer como melanoma, cáncer cervical, hepatocelular, gástrico y pancreático [Bhowmik *et al.*, 2015; Mougiakakos *et al.*, 2012; Qi *et al.*, 2014; Meng *et al.*, 2018; Cai *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019]. En conclusión, nuestro análisis *in silico* postula que el cambio en el metabolismo de glutatión es esencial en la reprogramación metabólica durante la EMT.

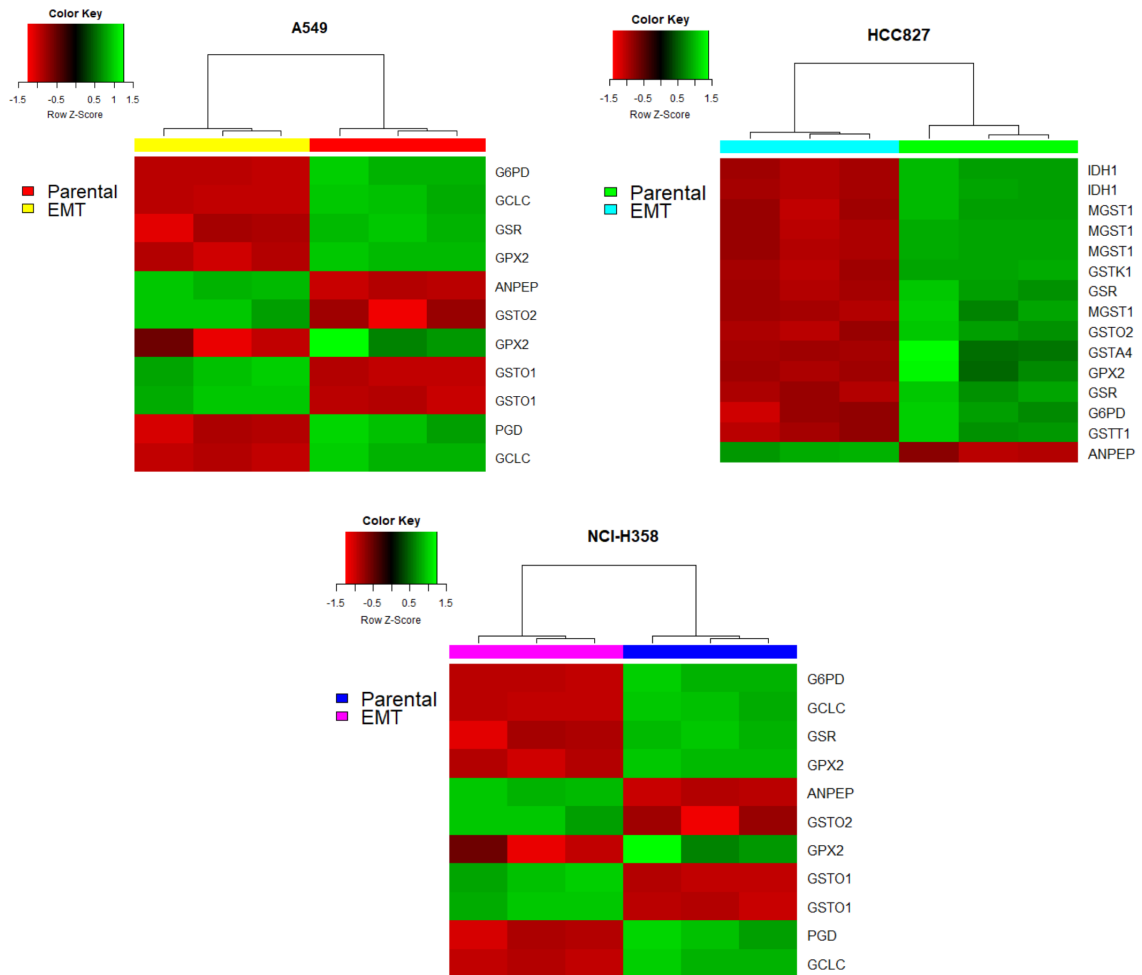


Figura 4-8: La expresión de los genes de la vía de glutatión está alterada. En cada panel la comparación entre el estado epitelial y mesenquimal de cada línea celular.

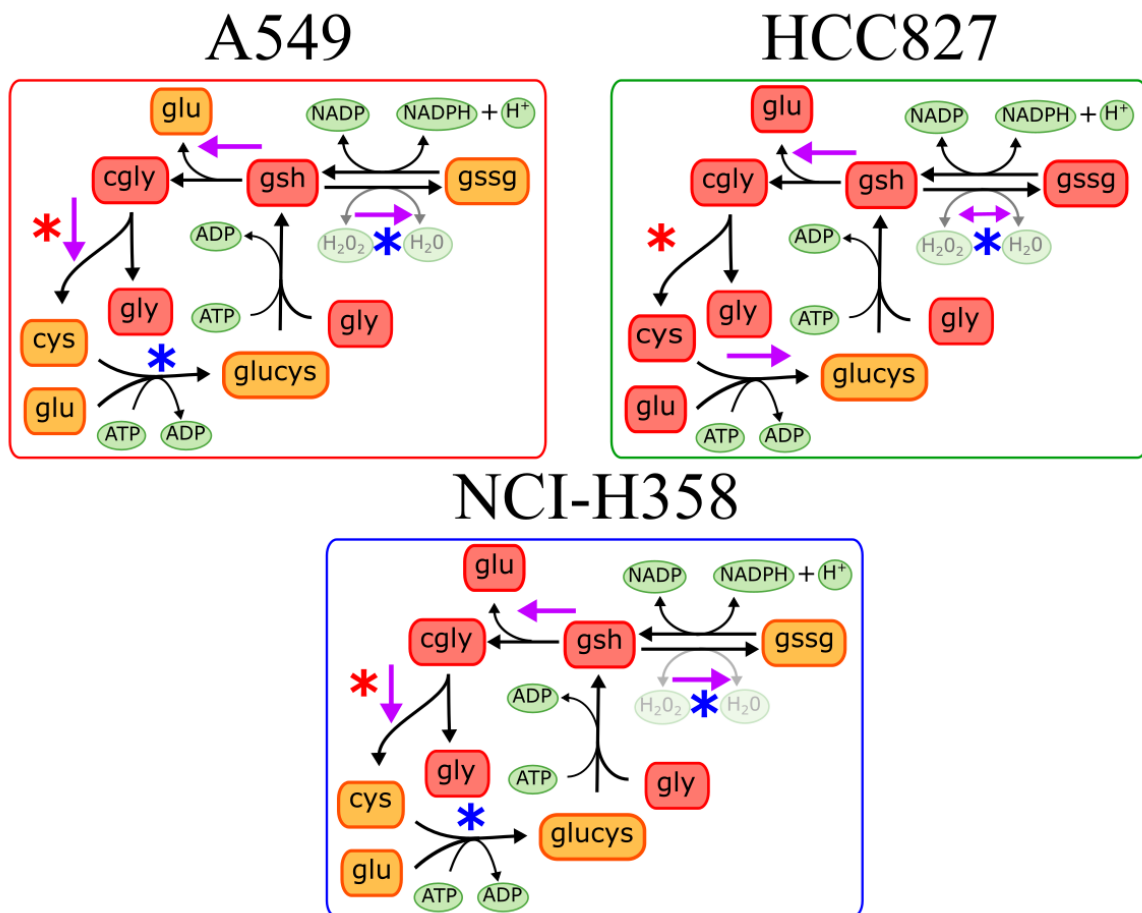


Figura 4-9: La vía de glutatión está afectada en todas las líneas celulares. Flechas moradas son reacciones predichas por el modelo. Color de los metabolitos indican su concentración de menor (amarillo) a mayor (rojo). Asteriscos azules genes subexpresados en el estado mesenquimal y rojos sobreexpresados.

4.6. Genes metabólicos alteran la supervivencia de pacientes de cáncer de pulmón

La EMT ha sido relacionada con fenotipos altamente invasivos y una pobre prognosis, por lo que se evaluó el impacto de mutaciones en genes metabólicos en pacientes masculinos con cáncer de pulmón utilizando el Genomics Data Commons (GDC) Data Portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). GDC es una plataforma que contiene datos genómicos y clínicos de programas de investigación de cáncer, promoviendo la medicina de precisión. Este portal tiene algunos de los conjuntos de información genómicos más grandes, incluyendo el The Cancer Genome Atlas (TCGA) y Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Therapies (TARGET). Todos los datos han sido procesados bajo los mismos parámetros computacionales, por lo que son directamente comparables. Los genes de interés para esta sección fueron GLS, GSR, GCLC y GPXs, que fueron previamente identificados por el modelo computacional. Se seleccionaron cohortes de pacientes masculinos con cáncer en bronquios y pulmones y se clasificaron dependiendo de la presencia o ausencia de mutaciones en los genes de interés. Se comparó el tiempo de supervivencia de los pacientes para ver cómo mutaciones en estos genes afecta a los pacientes (Figura 4-10). Estos análisis mostraron que los pacientes masculinos con mutaciones en los genes GCLC y GPX1, sobrevivieron menos tiempo que aquellos sin mutaciones en estos genes ($p=0.0183$ y 0.0066 , respectivamente). Aunque, y a pesar de que, los pacientes con mutaciones en GPX2 mostraron menor tiempo de supervivencia, la diferencia no fue significativa. Los pacientes con mutaciones en los genes GLS y GSR no mostraron diferencias en su supervivencia (datos no mostrados). Esto sugiere que GCLC y GPX1 pueden ser utilizados como biomarcadores para señalar una mala prognosis en personas con cáncer de pulmón, aún con fondos genéticos diferentes.

En gran número de ocasiones las alteraciones en las células tumorales no se reflejan únicamente a nivel genético, existen ocasiones que ocurre un cambio en los niveles de transcripción. Es por ello que se analizaron datos de supervivencia de pacientes con alteraciones en los niveles de expresión en algunos genes de interés (Figura 4-11). En resumen,

los pacientes con alta expresión de GPX2 sobreviven menos tiempo que aquellos con baja expresión ($p = 6.2e-07$). Mientras que los pacientes con baja expresión de ANPEP, GPX3 y GLS sobrevivieron menos tiempo que aquellos con alta expresión de estos genes ($p = 0.0012, 0.035, 9.8e-07$, respectivamente). Estos resultados sugieren que las alteraciones en estos genes propician fenotipos más severos, empeorando la prognosis de los pacientes. En consecuencia podemos concluir que el metabolismo de glutatión es muy importante para desarrollar el fenotipo invasivo y podría ser utilizado como un posible blanco terapéutico en pacientes con cáncer de pulmón.

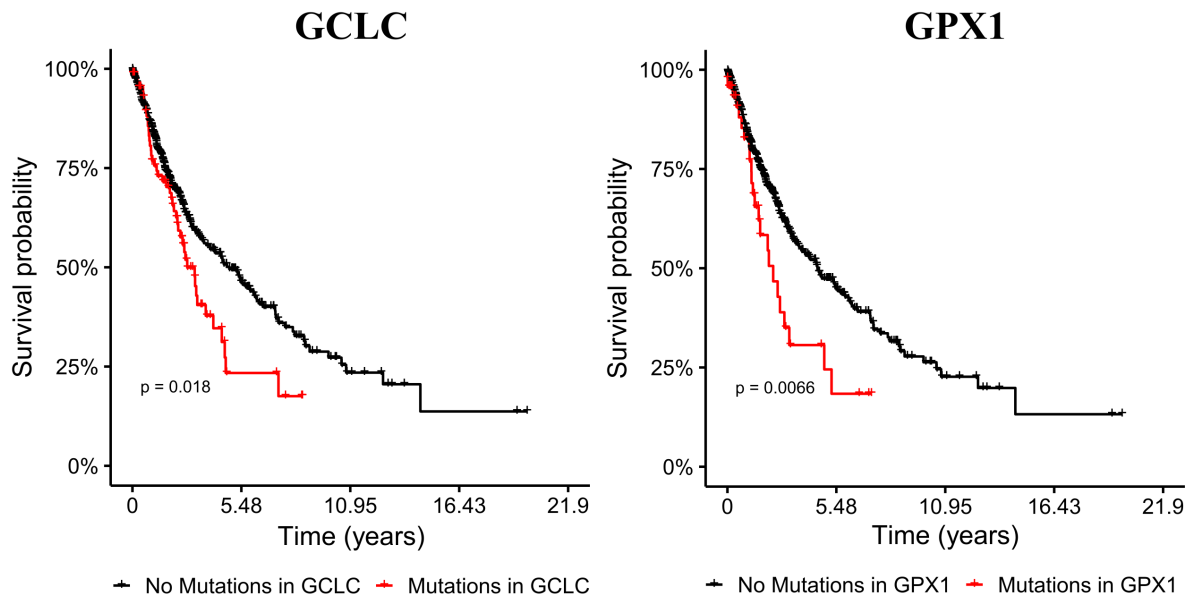


Figura 4-10: Mutaciones en los genes GCLC y GPX1 afectan la sobrevivencia de pacientes con cáncer de pulmón. Las líneas rojas pertenecen a la cohorte con mutaciones en los genes, mientras que las negras pertenecen a la cohorte sin mutaciones en los genes de interés.

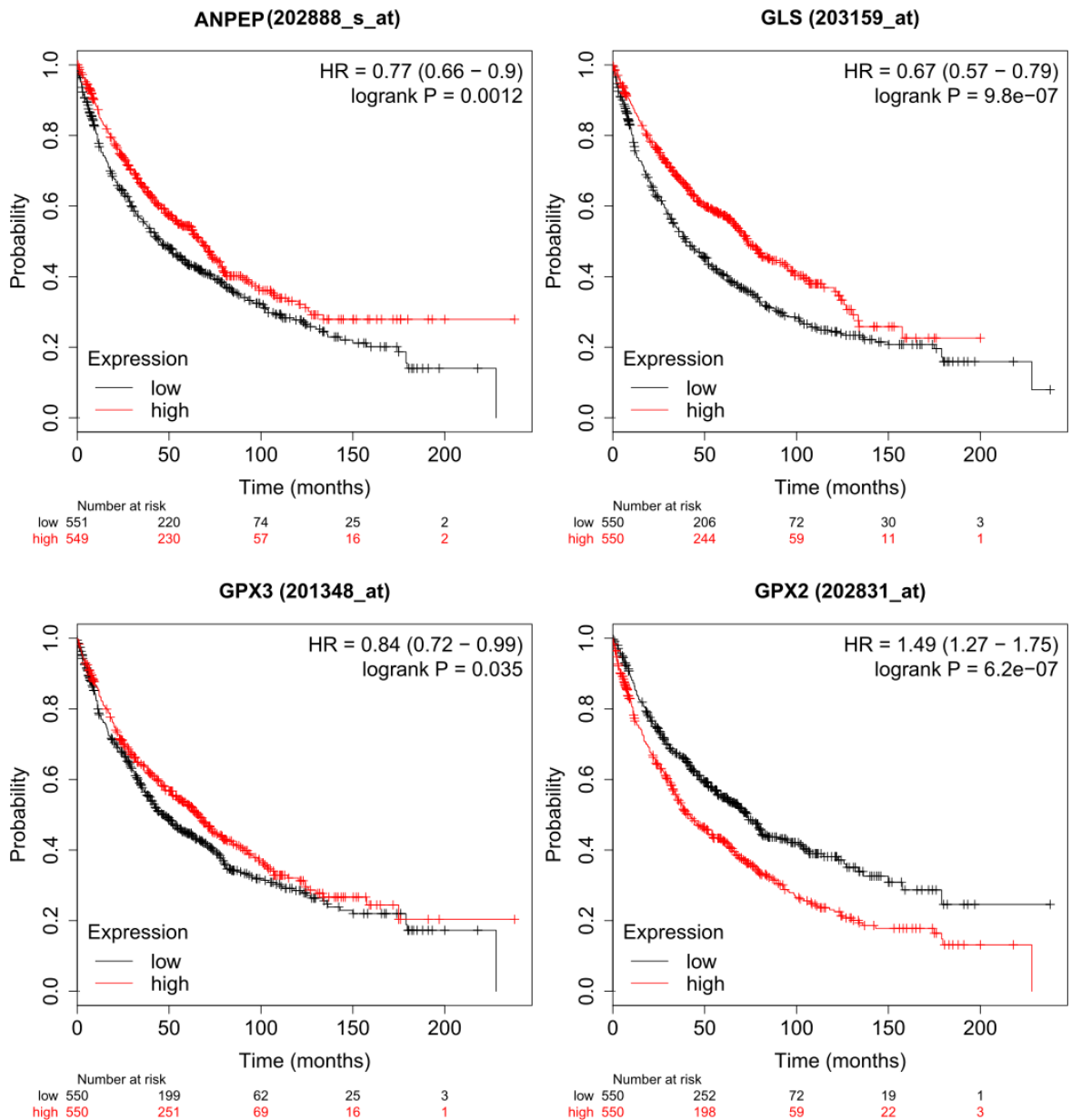


Figura 4-11: Expresión diferencial de ANPEP, GLS, GPX3 y GPX2 afecta la supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón. Las líneas rojas pertenecen a la cohorte con alta expresión de los genes, mientras que las negras pertenecen a la cohorte con baja expresión de los genes de interés.

4.7. Abatimiento de la barrera antioxidante en A549

El metabolismo de glutamina y glutatión juega un papel importante regulando la resistencia al estrés oxidativo en células de cáncer inducidas a la EMT [Kang *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2017; Xiang *et al.*, 2013; Matadamas-Guzman *et al.*, 2020]. Dado que los resultados anteriores concuerdan con ello nos preguntamos cuál sería el efecto en la EMT al abatir algunos componentes de la barrera antioxidante. Por ello, se generaron líneas celulares A549 con knockdown estables para GCLC y CAT utilizando una transfección de shRNA (Figura 3-2). Para optimizar el proceso de abatimiento, se utilizaron diferentes concentraciones de la solución de transfección para crear 5 diferentes clonas. Para seleccionar las células con los plásmidos se agregó puromicina al medio y se cosecharon las células. Las clonas que crecieron fueron la 2 y la 4, las cuales se hicieron ensayos de validación para verificar que tuvieran el fenotipo de interés.

4.7.1. Actividad de catalasa

Para validar que nuestro modelo tuviera un knockdown del gen CAT se procedió a medir la actividad de catalasa de las clonas 2 y 4. La actividad de la catalasa se determinó leyendo el decaimiento de la absorbancia a 240 nm a temperatura ambiente y comparándolas con el control. Se realizó una curva de cambio de fluorescencia entre 15 y 30 segundos con diferentes concentraciones de H₂O₂ como control de la actividad de la catalasa (Figura 3-3). Posteriormente se agregó H₂O₂ a las células procesadas para determinar la actividad de la catalasa. Las clonas 2 y 4 tuvieron menor actividad en catalasa comparada con el control (Figura 4-12).

4.7.2. Cuantificación de glutatión reducido

De manera paralela, se cuantificaron los niveles de glutatión reducido en las células. Los resultados se interpolaron en una curva estándar de 5 μ M a 1 mM de GSH en agua Figura 3-4. El nivel de glutatión está abatido en la clona 2 únicamente, la cual fue la clona utilizada en posteriores estudios (Figura 4-13).

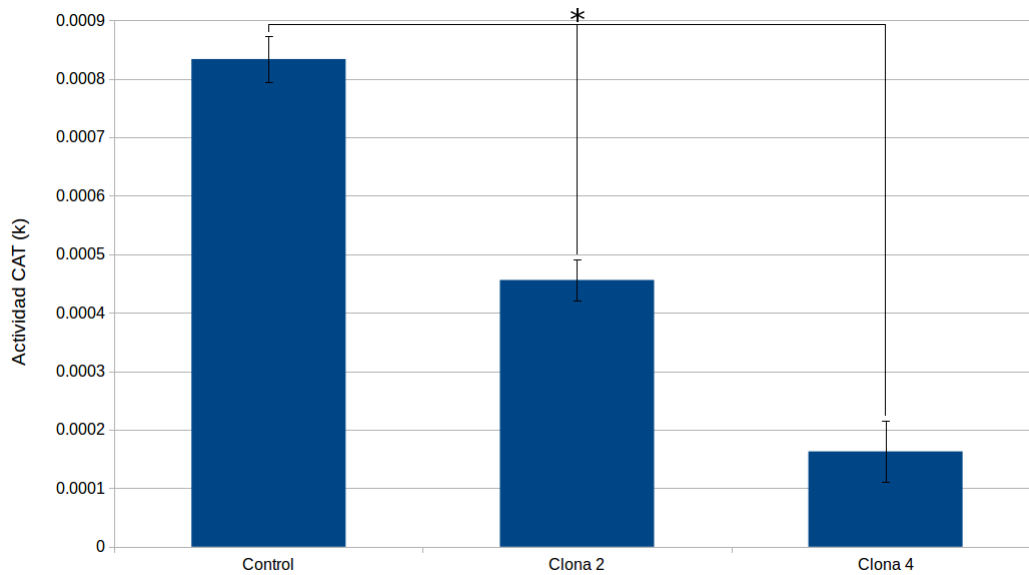


Figura 4-12: Actividad de la enzima Catalasa en cada clona. Es comparada contra el control. (* p -value<0.01)

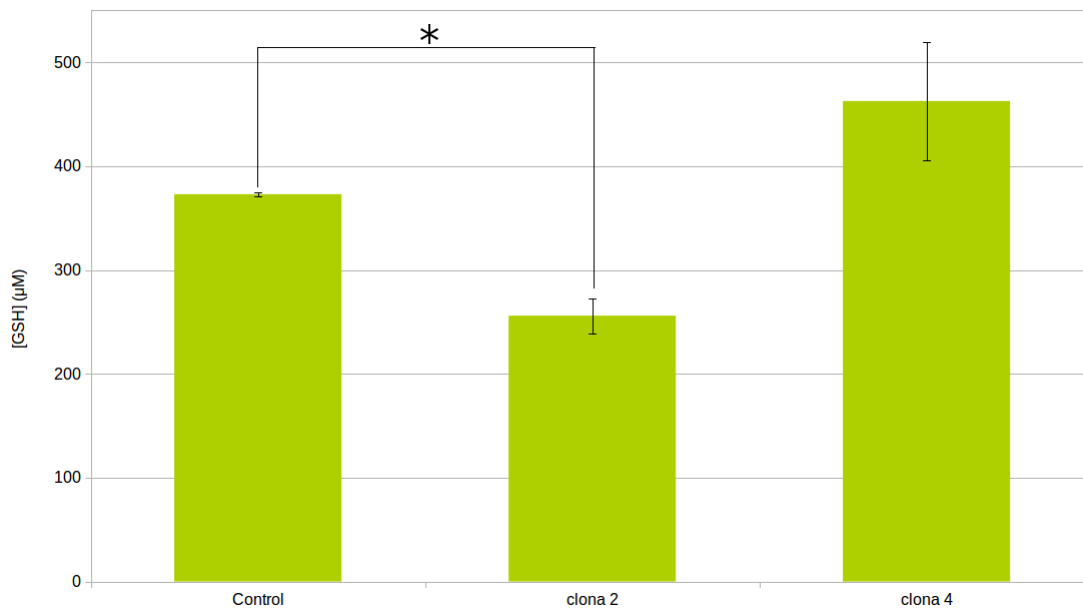


Figura 4-13: Concentración de glutatión en cada clona. (* p -value<0.01)

4.7.3. Nivel de mRNA de CAT y GCLC

Por último se observaron los niveles de RNA de los genes CAT y GCLC, tanto en las células control como en cada una de las clonas. Observamos un abatimiento de un 80 % de GCLC y un 20 % de CAT en la clona 2 (Figura 4-14). Es por ello que elegiremos esta clona para inducir la EMT y observar los efectos.

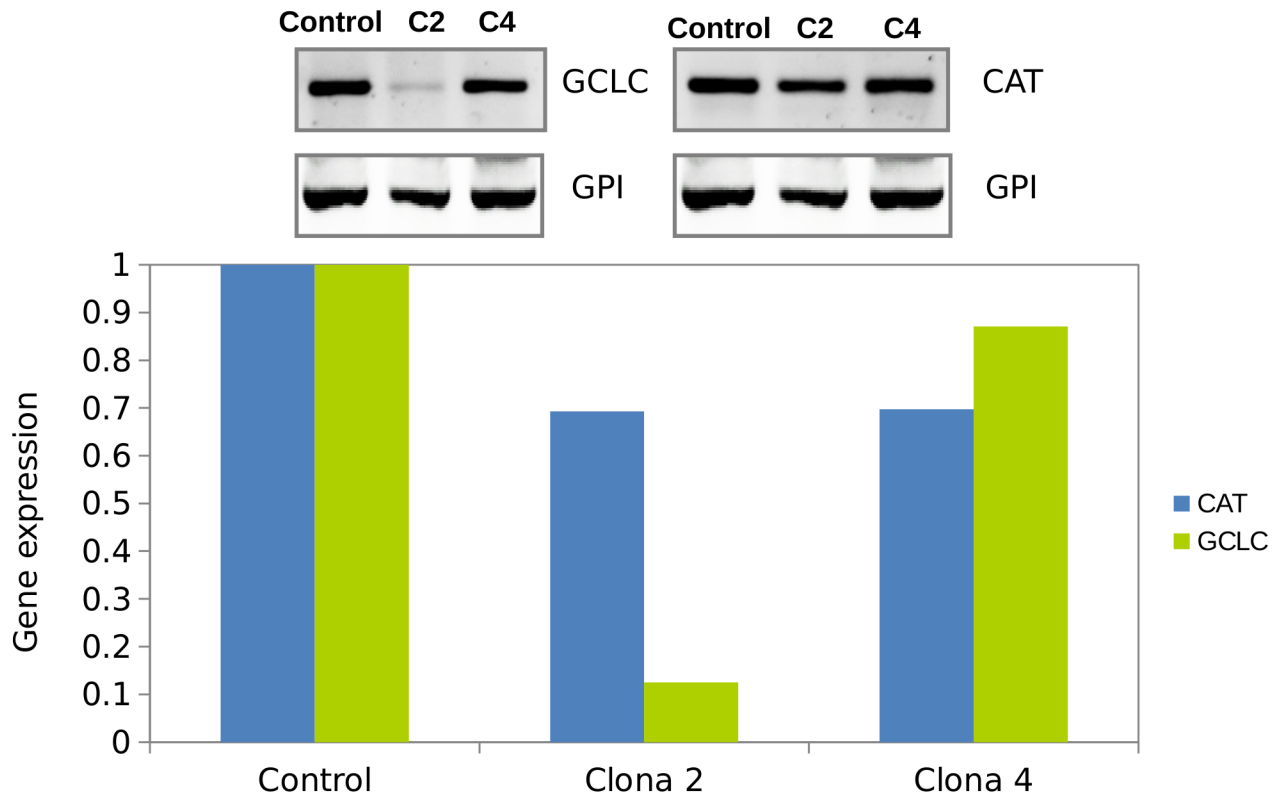


Figura 4-14: Gel con niveles de RNA de GCLC y CAT respectivamente. Gráfica normalizada al control de los niveles de RNA de cada gen en las clonas 2 y 4.

4.8. La doble mutación en GCLC y CAT altera el fenotipo mesenquimal

Para observar los efectos del knockdown de los genes GCLC y CAT (A549dKO) durante la EMT, se trataron células con TGF- β durante tres semanas. Durante este tiempo se hizo un seguimiento de la transformación morfológica de las células y de la capacidad migratoria, como se muestra a continuación.

4.8.1. A549dKO cambia su morfología después de la EMT

Las células A549 presentan una morfología regular y medianamente circular. Además presentan una fuerte cohesión entre las células (Figura 4-15, panel superior derecho) [Sun *et al.*, 2014]. Cuando son inducidas a la EMT, las células presentan una morfología alargada, estrellada y asimétrica. En el caso de A549 podemos observar este cambio desde los cuatro días de cultivo con TGF- β (Figura 4-15, panel superior derecho). En contraste, las células A549 doble mutantes (A549dKO) expuestas al TGF- β muestran una morfología asimétrica y alargada conforme pasa el tiempo, comenzando con un ligero cambio a los 4 días y finalizando con un fenotipo mesenquimal más evidente. Sin embargo este fenotipo no es tan notorio como en las células A549 sin mutaciones. Además, el crecimiento de las células mesenquimales se redujo casi a la mitad, tal como se reporta anteriormente [Sun *et al.*, 2014]. Estos resultados sugieren que tanto las células control como la mutante llevaron a cabo la transición epitelio-mesénquima, aunque las células doble mutantes no muestran un fenotipo tan radical como las A549WT.

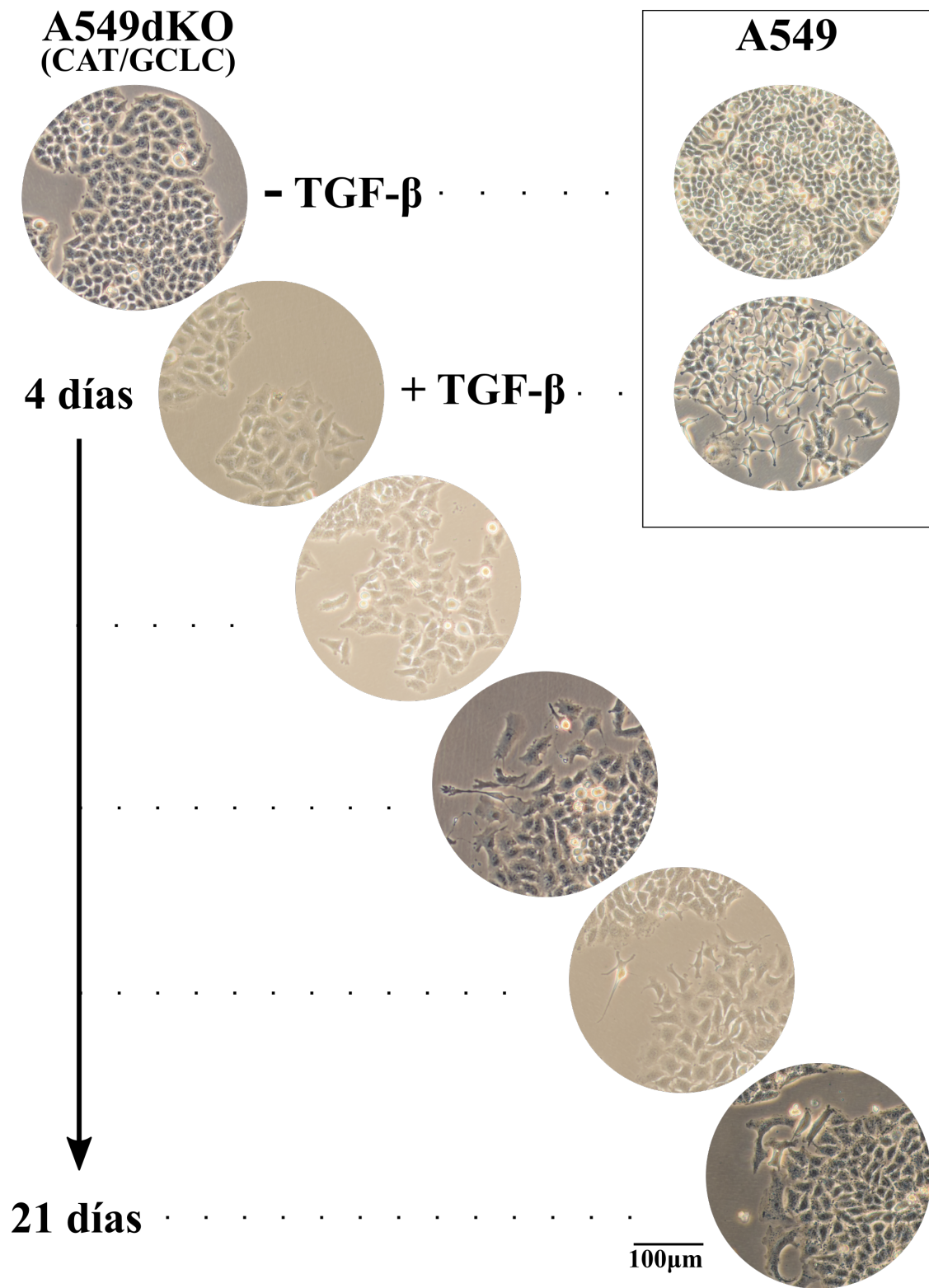


Figura 4-15: Las células A549dKO muestran un cambio morfológico en presencia de TGF-β. Estos cambios pueden ser observados hasta después de aproximadamente 8 días en presencia del estímulo, contrario al caso de las células A549WT que puede ser observado desde los cuatro días de cultivo con el estímulo

4.8.2. La doble mutación en GCLC y CAT promueve mayor invasión celular

Una de las características primordiales que adquieren las células después de la EMT es la capacidad migratoria. Por esta razón realizamos ensayos de herida que comparan la capacidad de invasión de las células. Para este ensayo se abre una herida a un cultivo al cien por ciento de confluencia, y se fotografía la herida a las 0, 24, 30, 36 y 48h (Figura 4-16). Se utilizó un programa de análisis de imágenes para cuantificar el área de la herida y calcular el porcentaje de cierre de herida (Tabla E-1, Tabla E-2). Como se observó que las células cambian conforme al tiempo, nos preguntamos si también habría una diferencia en la capacidad de invasión celular conforme al tiempo. Por un lado, los resultados del ensayo de herida a los 8 días de inducción de la EMT muestran que las células mesenquimales A549dKO tienen mayor capacidad migratoria que las células mesenquimales A549WT entre las 30 y las 36 h después de iniciado el cultivo, aunque a las 48h el porcentaje de herida cerrada era parecido entre ambas (Figura 4-16A). Cabe resaltar que en ambos casos las células mesenquimales mostraron mayor capacidad invasora que las células parentales, tal y como se esperaba. Por otro lado, los resultados del ensayo de herida a los 21 días de inducción de la EMT también muestran que las células mesenquimales A549dKO tienen mayor capacidad migratoria que las células mesenquimales A549WT, aunque la diferencia es más notoria y se mantiene desde las 24 hasta las 48h (Figura 4-16B). En este caso, las células epiteliales de ambas cepas también muestran una diferencia, siendo la A549dKO la que cierra en mayor medida la herida. No obstante, al comparar el porcentaje de cierre de herida entre los dos tiempos podemos observar que en general el cierre de la herida fue mayor, inclusive en las células parentales. Esto puede ser explicado ya que se sabe que las células A549 producen TGF- β naturalmente y autoinduce la EMT sin un estímulo externo [Li *et al.*, 2011]. A pesar de haber cambiado el medio de cultivo cada 4 días probablemente pudo haber afectado a las células sin el estímulo de TGF- β , sin embargo podemos observar mayor capacidad invasora en las células que sí tenían el estímulo presente. En conclusión, los resultados sugieren que la baja capacidad para sintetizar glutatión y catalasa inducen una mayor capacidad migratoria en la línea celular A549.

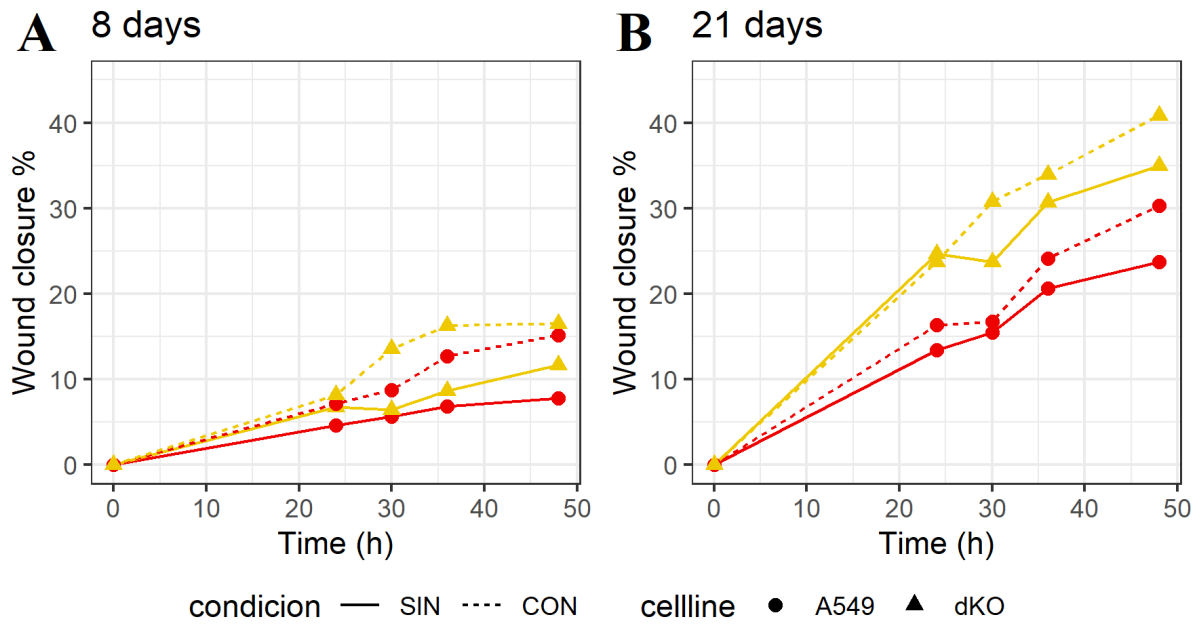


Figura 4-16: Las células dKO muestran mayor capacidad invasora. Las líneas azules con triángulos señalan las células A549dKO, mientras que las naranjas y amarillas con círculos las A549WT.

Capítulo 5

Discusión y conclusiones

La transición epitelio-mesénquima (EMT) que ocurre durante el cáncer es uno de los primeros pasos para llevar a cabo la metástasis, así como para producir resistencia a fármacos. La inducción de este proceso depende de varios factores, sin embargo se ha visto que en todas las ocasiones genera una reprogramación metabólica en las células que lo llevan a cabo [Sciacovelli y Frezza, 2017; Kalluri y Weinberg, 2009; Georgakopoulos-Soares *et al.*, 2020; Morandi *et al.*, 2017]. Se han identificado algunos metabolitos y enzimas que son esenciales para que la EMT se lleve a cabo, tales como la acumulación de fumarato, cambios en la succinato deshidrogenasa y los altos niveles intracelulares de ROS, entre otras [Kondaveeti *et al.*, 2015; Bhowmik *et al.*, 2015]. Estos cambios dependen de las mutaciones inherentes de las células. Para identificar mecanismos comunes entre diferentes líneas celulares con mutaciones diferentes, este trabajo utilizó datos de metaboloma y transcriptoma de líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas previamente publicados [Sun *et al.*, 2014]. Tales líneas celulares son A549, HCC827 y NCI-H358, las cuales fueron inducidas a la EMT utilizando TGF- β . Estas líneas celulares tienen fondos genéticos diferentes, por un lado, A549 y NCI-H358 tienen mutaciones en KRAS, mientras que HCC827 tiene mutaciones en EGFR. No obstante, todas llevaron a cabo la EMT, cambiando su morfología celular, sus marcadores de superficie y la expresión de genes característicos de la EMT [Sun *et al.*, 2014]. Este conjunto de datos dio a conocer que el metabolismo de la glucosa era redirigido a través

del cambio en la regulación de PDK4, no obstante existe mucha información inexplorada del resto de vías metabólicas en estas células. Por ello se analizó este conjunto de experimentos pareados de metaboloma y transcriptoma para identificar otras reacciones que en conjunto son relevantes y cambian durante la EMT en estas células. Encontrar mecanismos comunes durante la EMT en células con fondos genéticos diferentes podría llevar a la identificación de blancos potencialmente terapéuticos que puedan ser de utilidad en pacientes con mutaciones diferentes. A pesar de que el TGF- β no es la única molécula que puede inducir la EMT, nuestro modelo computacional y los análisis representan un esquema valioso para entender mecanismos metabólicos subyacentes de la EMT. Además, permite generar hipótesis que pueden ser posteriormente probadas, así como diseñar estrategias fiables para estudiar este proceso bajo diferentes estímulos.

Se han descrito firmas metabólicas que caracterizan la EMT en diferentes líneas celulares de cáncer [Shaul *et al.*, 2014]. Sin embargo, los resultados muestran que cada línea celular tiene cambios únicos en su metaboloma, a pesar de ser el mismo tipo de cáncer. En nuestro estudio hemos encontrado que la población de metabolitos que cambian sus concentraciones en las tres líneas celulares es muy pequeña, mostrando únicamente seis metabolitos en común. Este resultado tiene sentido, ya que las mutaciones inherentes de cada línea celular modifican su metabolismo desde antes de inducir la EMT [Yuneva *et al.*, 2012]. Las mutaciones en KRAS, por ejemplo, pueden promover incrementos en el consumo de glucosa, glutamina y ácidos grasos en diferentes tipos de cáncer [Kerr y Martins, 2018; Kimmelman, 2015; Toda *et al.*, 2016; Pupo *et al.*, 2019]. Asimismo, EGFR es fundamental en la inducción de la EMT regulando la translocación de la isoenzima piruvato cinasa M2 (PKM2) en cáncer hepatocelular, y teniendo una relación directa con la sintasa de ácidos grasos (FASN) en cáncer gástrico y de mama [Sun *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2014]. Por tanto las mutaciones tanto en KRAS como en EGFR afectan la reprogramación celular dada durante la EMT, y lo hacen de manera particular en diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, las mismas mutaciones en KRAS mostraron efectos inversos sobre el uso de aminoácidos ramificados. Por un lado, en cáncer de pulmón de células no pequeñas se incrementó su uso, mientras que en

adenocarcinoma pancreático ductal disminuyó [Mayers *et al.*, 2016]. En general, los perfiles metabólicos tumorales suelen depender del genotipo y el tipo de tejido, teniendo implicaciones en el diseño de las terapias que actúan contra el metabolismo tumoral [Yuneva *et al.*, 2012].

A pesar de las diferencias en los perfiles metabólicos entre las tres líneas celulares, encontramos vías metabólicas que cambian reiteradamente después de la EMT. Las líneas celulares compartieron cambios generales en 21 vías metabólicas. Entre ellas podemos encontrar vías relacionadas con el metabolismo central de una célula tumoral, definido por las vías principalmente afectadas en el cáncer, como el ciclo de Krebs, y el metabolismo de piruvato, glutamato y nucleótidos [Vazquez *et al.*, 2016]. Estas vías ya se han visto afectadas en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas cuando se induce la EMT con diferentes estímulos [Morandi *et al.*, 2017; Ulanet *et al.*, 2014]. Con estos resultados podemos concluir que las alteraciones metabólicas durante la EMT pueden ser divididas en dos categorías. Por un lado, un conjunto central de vías metabólicas alteradas consistentemente en las tres líneas celulares. La caracterización de este conjunto de vías contiene información potencial para la generación de tratamientos contra el cáncer que puedan ser eficientes en diferentes pacientes sin importar el fondo genético. Por otro lado, un conjunto de vías metabólicas cuyas alteraciones son específicas para cada línea celular, dependiendo de sus mutaciones inherentes. observar y caracterizar este conjunto de vías puede llevarnos a identificar posibles tratamientos personalizados con base en el fondo genético de cada paciente. Entender ambos conjuntos de vías resulta importante para la generación de posibles nuevos tratamientos que ayuden a los pacientes de cáncer. Para estudiar detalladamente estas diferencias, implementamos un modelaje matemático del metabolismo antes y después de la EMT alrededor de algunas vías metabólicas.

Durante la identificación de los cambios en la regulación enzimática después de la EMT se utilizaron las vías metabólicas enriquecidas como referencia para reconstruir un modelo que representara las capacidades metabólicas de estas células. Existen muchas estrategias automatizadas para reconstruir redes metabólicas, sin embargo usualmente son utilizadas para generar redes de escala genómica [Barabási y Oltvai, 2004; Hyduke *et al.*, 2013; Somvanshi y

Venkatesh, 2014; Edelman *et al.*, 2009]. Dada la cantidad limitada de información contenida en el metaboloma y que no todos los metabolitos fueron identificados experimentalmente, optamos por una estrategia diferente. A partir de la glicolisis, se agregaron diferentes reacciones dependiendo de la información disponible. La red base contenía únicamente Glucolisis, ciclo de Krebs y Pentosas Fosfato integrando un total de 112 reacciones y 74 metabolitos. Las reglas desarrolladas para incluir reacciones se basaron principalmente en los metabolitos contenidos en los datos. Es importante generar este tipo de estrategias de reconstrucción para fomentar el uso de algoritmos computacionales y generar hipótesis.

Es importante mencionar que las hipótesis generadas con el modelo computacional han sido validadas cualitativamente con la literatura actual. Este hecho, permite utilizar nuestro modelo computacional como una plataforma para generar hipótesis experimentalmente verificables a posteriori. Para comenzar, varios de los cambios asociados a la línea celular HCC827 pueden ser comparados con los datos de fluxóma generados en el artículo original. Entre ellos destaca la glutaminasa (GLS) que muestra una desregulación en la conversión de glutamina a glutamato, lo cual fue cuantificado utilizando isótopos radioactivos. Además, otros estudios han mostrado que la desregulación de GLS es crucial durante el desarrollo de la EMT en las líneas celulares A549 y NCI-H358 [Ulanet *et al.*, 2014]. Por si fuera poco, el cambio en la actividad de GLS también se considera relevante para inducir la EMT en cáncer de mama, y esencial para que las células adquieran propiedades migratorias en cáncer colorectal [Morandi *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016]. En general, se sabe que las células mesenquimales derivadas de la EMT tienen una capacidad reducida para la fosforilación oxidativa y una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo, lo que las hace incapaces de lidiar con perturbaciones en GLS [Ulanet *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016]. Esto corrobora que nuestro modelo tiene una gran capacidad para identificar reacciones metabólicas fundamentales para llevar a cabo la EMT. Sin embargo, el modelo tiene limitaciones, pues no posee la capacidad de predecir si la reacción aumenta o disminuye su flujo. La extensión del modelo para incluir estas capacidades en las alteraciones de los flujos es una cuestión fundamental para las perspectivas de este trabajo.

Asimismo, el modelo identificó que varias reacciones del metabolismo del glutatión

cambiaban en las tres líneas celulares. Adicionalmente, los genes metabólicos involucrados en esta vía también muestran una expresión claramente alterada en el estado mesenquimal. La oxidación y reducción del glutatión usualmente se catalizan por las peroxidasas y reductasas de glutatión (GPXs y GSR respectivamente). A nivel transcripcional, la EMT disminuyó la expresión de GPX2 y GSR en las células mesenquimales, respecto a las epiteliales, en las tres líneas celulares. Tanto GSR, como GPX son genes esenciales para detener la inducción de la EMT en melanoma, cáncer cervical, carcinoma hepatocelular, así como en cáncer gástrico, pancreático, de mama y de colon [Qi *et al.*, 2014; Meng *et al.*, 2018; Cai *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Emmink *et al.*, 2014; Khatib *et al.*, 2020]. Algunos estudios reportan que los niveles de glutatión y ROS son factores críticos para la inducción de la EMT en cáncer de pulmón, células epiteliales oculares, y fibrogenesis inducida con TGF- β [Hu *et al.*, 2013; Mougiakakos *et al.*, 2012; Liu y Gaston Pravia, 2010; Wei *et al.*, 2017]. Por esta razón, debe ser importante la regulación de la síntesis y degradación del glutatión en el desarrollo de la EMT. ANPEP, un gen implicado en la degradación de glutatión, mostró menos expresión en el estado mesenquimal que en el epitelial de todas las líneas celulares. Igualmente, esta reacción fue identificada por el modelo en A549 y NCI-H358. ANPEP ha sido correlacionado positivamente con la presencia de marcadores de la EMT a nivel proteómico en adenocarcinoma ductal pancreático [Kim *et al.*, 2014]. ANPEP ha sido considerado como marcador mesenquimal en líneas celulares murinas de carcinoma mamario inducidas con TGF- β [Asiedu *et al.*, 2011]. Finalmente, encontramos la síntesis de glutatión, llevada a cabo en varios pasos y nos enfocamos en la ligasa glutamil-cisteina (GCL) que es el paso limitante de esta vía. El modelo identificó un cambio en la regulación enzimática de esta vía en HCC827. Asimismo, los datos de expresión mostraron subregulación de la subunidad catalítica (GCLC) en células mesenquimales de A549 y NCI-H358. Los resultados muestran que los pacientes con cáncer de pulmón que tienen mutaciones en GCLC sobreviven menos tiempo que aquellos sin estas. En pacientes con melanoma, la sobreexpresión de GCLC mejora la prognosis y limita los fenotipos malignos [Mougiakakos *et al.*, 2012]. También, la activación de GCLC está asociada con resistencia a varios fármacos en cáncer de mama, pulmón, hígado, y cabeza y cuello [Lin

et al., 2018; Liu *et al.*, 2017a; Fiorillo *et al.*, 2017; Hiyama *et al.*, 2018]. En conclusión se propone que GLS, GPXs, GCLC y ANPEP tienen un rol importante durante la EMT en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas, afectando la sobrevivencia de los pacientes. Aunque, se requieren más estudios para descifrar los mecanismos subyacentes en la reprogramación metabólica, recalamos que el metabolismo de glutatión puede ser utilizado como blanco terapéutico o biomarcador para mejorar la prognosis de pacientes en un futuro.

Para comprobar la hipótesis de que la barrera antioxidante tiene un papel fundamental en la EMT, desarrollamos un modelo experimental donde se abatieron la producción tanto de glutatión como de catalasa. En este modelo se utilizó la línea celular A549 para abatir la síntesis de glutatión y catalasa. Para ello se abatieron los genes GCLC (paso limitante de la síntesis de glutatión) y CAT, creando la línea celular A549dKO. Tanto A549dKO, como A549WT fueron inducidas a la EMT utilizando TGF- β por tres semanas. Observamos un cambio en la morfología en ambas líneas celulares como se esperaba de acuerdo a la literatura [Sun *et al.*, 2014]. No obstante, la A549dKO tardó más tiempo en presentar la morfología mesenquimal que la A549WT. Este resultado sugiere que el abatimiento de catalasa y glutatión posiblemente reducen la velocidad con la que se induce el cambio en la morfología causado por la EMT. Sin embargo, observamos que A549dKO tiene mayor capacidad de invasión de A549WT desde los 8 días, que es mucho más evidente a los 21 días. No obstante, existe la posibilidad de que las células al carecer de un sistema óptimo de desintoxicación dan preferencia a la invasión celular que al cambio en la morfología. Como ya se mencionó, tanto GSR, como GPX son genes esenciales para detener la inducción de la EMT en melanoma, cáncer cervical, carcinoma hepatocelular, así como en cáncer gástrico, pancreático, de mama y de colon [Qi *et al.*, 2014; Meng *et al.*, 2018; Cai *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Emmink *et al.*, 2014; Khatib *et al.*, 2020]. Aunque estas proteínas se encuentren presentes en la célula, dependen del glutatión para llevar a cabo su función. Además, interesantemente a los 21 días la línea celular epitelial A549dKO cerró un 10% más la herida que sus contrapartes A549WT. Esto concuerda con reportes previos que muestran que los bajos niveles de glutatión inducen por sí mismos la EMT [Whitson *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2017].

A pesar de que esta línea celular no muestra un cambio morfológico radical, posiblemente adquiere la capacidad de invadir. Hasta donde sabemos no existe un precedente de este resultado, ya que no se ha estudiado el papel del glutatión en la EMT inducida con TGF- β . Por otro lado, se observó una gran sensibilidad de las células A549dKO a la falta del suero fetal bovino en los ensayos de herida. Estas células no sobrevivían más allá de las 48h, sugiriendo una hipersensibilidad a la falta de nutrientes en el ambiente. Esto indica que el mantenimiento del fenotipo mesenquimal requiere de mucha energía, lo que no es sostenible en un ambiente con bajos nutrientes. Sin embargo, debemos recordar que el glutatión tiene diferentes funciones a parte de su rol como regulador de los radicales libres. Algunas de sus funciones radican en la señalización redox, la desintoxicación de xenobióticos, la neurotransmisión, la modificación de la matriz extracelular, así como, la regulación de la proliferación, la apoptosis y la fibrogénesis [Rahman y MacNee, 2000; Janáky *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 2005; Dalle-Donne *et al.*, 2009; Lu, 2013; Li *et al.*, 2021]. Es por ello que su participación en la EMT no puede ser relacionada únicamente con la pérdida de regulación de la barrera antioxidante. Asimismo, los genes relacionados a la síntesis de glutatión tienen otras funciones inherentes. Por ejemplo, GCLC tiene un rol no canónico e independiente del glutatión que protege a la célula contra la ferroptosis manteniendo la homeostasis de glutamato en inanición de cisteína [Kang *et al.*, 2021]. La activación de la ferroptosis ha sido utilizada para atacar células tumorales y hacerlas más sensibles a las quimioterapias [Stockwell *et al.*, 2017]. Estas evidencias han destacado la importancia de la ferroptosis en la terapia contra el cáncer. Por tanto la inhibición de GCLC podría mejorar la capacidad de inducir la ferroptosis en células tumorales. Asimismo, la inhibición irreversible de GCL por la Butionina sulfoximina (BSO) es frecuentemente utilizada para sinergizar con otras quimioterapias [Wang *et al.*, 2021]. Estos estudios podrían complementar la idea de que las células A549dKO tienen un mayor fenotipo invasivo pero posiblemente son más sensibles a algunas quimioterapias. Es por ello que las funciones del glutatión y los elementos involucrados en su síntesis deben ser estudiadas con mayor detalle para entender su relación con el cáncer, la EMT y la resistencia a medicamentos. Finalmente, como perspectiva quedaría medir los

niveles de expresión de genes marcadores característicos de la EMT, como son las caderinas E y N, así como los factores de transcripción SNAI y TWIST. Además sería ideal repetir los ensayos de herida para dar mayor robustez a los resultados.

Este trabajo presenta una estrategia de biología de sistemas que integra modelado computacional y diferentes datos ómicos; con la finalidad de predecir e identificar reacciones importantes en la reprogramación metabólica durante la EMT en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas. Estas predicciones son potencialmente útiles para diseñar blancos terapéuticos que sean más efectivos en diferentes pacientes, ya que interceptamos información de líneas celulares con fondos genéticos y perfiles metabólicos diferentes. Encontrar similitudes y diferencias entre estas líneas celulares ayuda a entender posibles mecanismos implicados en la reprogramación metabólica durante la EMT. Este pipeline bien puede ser implementado en datos similares provenientes de diferentes modelos celulares para así también entender las particularidades que existen entre varios tipos de cáncer. Como corolario de este trabajo, se resalta que las estrategias aquí planteadas pueden bien ser aplicadas a conjuntos de datos de diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, entendemos que en el estudio del metaboloma y transcriptoma existe una amplia gama de información que se omite dados los diferentes niveles biológicos que existen. Por ello, ahora se explora la posibilidad de analizar estos datos con otros tipos de estrategias que evidencien posibles cambios en la regulación de factores de transcripción, utilizando algoritmos que se han publicado recientemente. Asimismo, se considera la complementación de la validación experimental utilizando nuevas metodologías que nos informen de manera más refinada la distribución de los metabolitos en la EMT, utilizando ensayos con isótopos radiactivos y siguiendo los átomos provenientes de la glucosa y la glutamina, entre otros metabolitos.

Bibliografía

- AEBI, H. (1984). Oxygen Radicals in Biological Systems. *Methods in Enzymology* **105**(1947):121–126
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., MORGAN, D., RAFF, M., ROBERTS, K., Y WALTER, P. (editores). *Molecular Biology of the Cell*. 6^a edición. Garland Science, New York and Abingdon, UK (2014)
- ARNER, E.N., DU, W., Y BREKKEN, R.A. (2019). Behind the Wheel of Epithelial Plasticity in KRAS-Driven Cancers. *Frontiers in Oncology* **9**:1049
- ASIEDU, M.K., INGLE, J.N., BEHRENS, M.D., RADISKY, D.C., Y KNUTSON, K.L. (2011). TGF β /TNF α -mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype. *Cancer Research*
- ASPURIA, P.J.P., LUNT, S.Y., VÄREMO, L., VERGNES, L., GOZO, M., BEACH, J.A., SALUMBIDES, B., REUE, K., WIEDEMAYER, W.R., NIELSEN, J., KARLAN, B.Y., Y ORSULIC, S. (2014). Succinate dehydrogenase inhibition leads to epithelial-mesenchymal transition and reprogrammed carbon metabolism. *Cancer & Metabolism* **2**(1):21
- BARABÁSI, A.L. Y OLTVAI, Z.N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature reviews. Genetics* **5**(2):101–13
- BHOWMIK, S.K., RAMIREZ-PEÑA, E., ARNOLD, J.M., PUTLURI, V., SPHYRIS, N., MICHAILIDIS, G., PUTLURI, N., AMBS, S., SREEKUMAR, A., Y MANI, S.A. (2015). EMT-induced metabolite signature identifies poor clinical outcome. *Oncotarget* **6**(40):42651–42660

- BLAND, J.M. Y ALTMAN, D.G. (2004). The logrank test. *BMJ* **328**(7447)
- BRABLETZ, T., KALLURI, R., NIETO, M.A., Y WEINBERG, R.A. (2018). EMT in cancer. *Nature Reviews Cancer* **18**(2):128–134
- CAI, M., SIKONG, Y., WANG, Q., ZHU, S., PANG, F., Y CUI, X. (2019). Gpx3 prevents migration and invasion in gastric cancer by targeting NF κ B/Wnt5a/JNK signaling. *International journal of clinical and experimental pathology* **12**(4):1194–1203
- CAMERLINGO, R., MICELI, R., MARRA, L., REA, G., D'AGNANO, I., NARDELLA, M., MONTELLA, R., MORABITO, A., NORMANNO, N., TIRINO, V., Y ROCCO, G. (2019). Conditioned medium of primary lung cancer cells induces EMT in A549 lung cancer cell line by TGF- β 1 and miRNA21 cooperation. *PLOS ONE* **14**(7):e0219597
- CHA, Y.H., YOON, J.I., KIM, H.S., Y KIM, N.H. (2015). Catabolic metabolism during cancer EMT. *Archives of pharmacal research* **38**(3):313–20
- CHEN, L., LIU, T., ZHOU, J., WANG, Y., WANG, X., DI, W., Y ZHANG, S. (2014). Citrate synthase expression affects tumor phenotype and drug resistance in human ovarian carcinoma. *PLoS ONE*
- CHONG, J., WISHART, D.S., Y XIA, J. (2019). Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics* **68**(1)
- COLVIN, H., NISHIDA, N., KONNO, M., HARAGUCHI, N., TAKAHASHI, H., NISHIMURA, J., HATA, T., KAWAMOTO, K., ASAI, A., TSUNEKUNI, K., KOSEKI, J., MIZUSHIMA, T., SATOH, T., DOKI, Y., MORI, M., Y ISHII, H. (2016). Oncometabolite D-2-Hydroxyglurate Directly Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and is Associated with Distant Metastasis in Colorectal Cancer. *Scientific Reports* **6**(1):1–11
- DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., COLOMBO, G., GIUSTARINI, D., Y MILZANI, A. (2009). Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends in Biochemical Sciences* **34**(2):85–96

- DE MARTEL, C., GEORGES, D., BRAY, F., FERLAY, J., Y CLIFFORD, G.M. (2020). Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet Global Health* **8**(2):e180–e190
- DIENER, C., MUNOZ-GONZALEZ, F., ENCARNACION, S., Y RESENDIS-ANTONIO, O. (2016). The space of enzyme regulation in HeLa cells can be inferred from its intracellular metabolome. *Scientific reports* **6**:28415
- DONG, C., YUAN, T., WU, Y., WANG, Y., FAN, T.W.W., MIRIYALA, S., LIN, Y., YAO, J., SHI, J., KANG, T., LORKIEWICZ, P., ST CLAIR, D., HUNG, M.C.C., EVERS, B.M.M., ZHOU, B.P.P., ST CLAIR, D., HUNG, M.C.C., EVERS, B.M.M., Y ZHOU, B.P.P. (2013). Loss of FBP1 by snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer. *Cancer Cell* **23**(3):316–331
- DU, S., GUAN, Z., HAO, L., SONG, Y., WANG, L., GONG, L., LIU, L., QI, X., HOU, Z., Y SHAO, S. (2014). Fructose-Bisphosphate Aldolase A Is a Potential Metastasis-Associated Marker of Lung Squamous Cell Carcinoma and Promotes Lung Cell Tumorigenesis and Migration. *PLoS ONE* **9**(1):e85804
- EDELMAN, L.B., EDDY, J.A., Y PRICE, N.D. (2009). In silico models of cancer. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* **2**(4):438–59
- EMMINK, B.L., LAOUKILI, J., KIPP, A.P., KOSTER, J., GOVAERT, K.M., FATRAI, S., VERHEEM, A., STELLER, E.J.A., BRIGELIUS-FLOHE, R., JIMENEZ, C.R., BOREL RINKES, I.H.M., Y KRANENBURG, O. (2014). GPx2 Suppression of H₂O₂ Stress Links the Formation of Differentiated Tumor Mass to Metastatic Capacity in Colorectal Cancer. *Cancer Research* **74**(22):6717–6730
- FAN, F.T., SHEN, C.S., TAO, L., TIAN, C., LIU, Z.G., ZHU, Z.J., LIU, Y.P., PEI, C.S., WU, H.Y., ZHANG, L., WANG, A.Y., ZHENG, S.Z., HUANG, S.L., Y LU, Y. (2014). PKM2 regulates hepatocellular Carcinoma cell epithelial-mesenchymal transition and migration upon EGFR activation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **15**(5):1961–1970

- FIORILLO, M., SOTGIA, F., SISCI, D., CAPPELLO, A.R., Y LISANTI, M.P. (2017). Mitochondrial "power"drives tamoxifen resistance: NQO1 and GCLC are new therapeutic targets in breast cancer. *Oncotarget*
- FISCHER, K.R., DURRANS, A., LEE, S., SHENG, J., LI, F., WONG, S.T.C., CHOI, H., EL RAYES, T., RYU, S., TROEGER, J., SCHWABE, R.F., VAHDAT, L.T., ALTORKI, N.K., MITTAL, V., Y GAO, D. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* **527**(7579):472–476
- GAZDAR, A.F., GIRARD, L., LOCKWOOD, W.W., LAM, W.L., Y MINNA, J.D. (2010). Lung Cancer Cell Lines as Tools for Biomedical Discovery and Research. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **102**(17):1310–1321
- GEORGAKOPOULOS-SOARES, I., CHARTOUMPEKIS, D.V., KYRIAZOPOULOU, V., Y ZARAVINOS, A. (2020). EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer. *Frontiers in Oncology* **10**:499
- GHAFFARI, P., MARDINOGLU, A., ASPLUND, A., SHOAIE, S., KAMPF, C., UHLEN, M., Y NIELSEN, J. (2015). Identifying anti-growth factors for human cancer cell lines through genome-scale metabolic modeling. *Scientific Reports* **5**(1):8183
- GONZÁLEZ RIVERA, A., RIZO RÍOS, P., SÁNCHEZ CERVANTES, F., Y MURGUÍA MARTÍNEZ, P. (2015). Tendencia de la mortalidad por cáncer en México: 1990-2012. *Evidencia Médica e Investigación en Salud* **8**(1):5–15
- GRADA, A., OTERO-VINAS, M., PRIETO-CASTRILLO, F., OBAGI, Z., Y FALANGA, V. (2017). Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *Journal of Investigative Dermatology* **137**(2):e11–e16
- HALBROOK, C.J. Y LYSSIOTIS, C.A. (2017). Employing Metabolism to Improve the Diagnosis and Treatment of Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* **31**(1):5–19

- HAMABE, A., KONNO, M., TANUMA, N., SHIMA, H., TSUNEKUNI, K., KAWAMOTO, K., NISHIDA, N., KOSEKI, J., MIMORI, K., GOTOH, N., YAMAMOTO, H., DOKI, Y., MORI, M., Y ISHII, H. (2014). Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**(43):15526–15531
- HANAHAN, D. Y WEINBERG, R.R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**(5):646–674
- HAO, H.X., KHALIMONCHUK, O., SCHRADERS, M., DEPHOURE, N., BAYLEY, J.P., KUNST, H., DEVILLEE, P., CREMERS, C.W., SCHIFFMAN, J.D., BENTZ, B.G., GYGI, S.P., WINGE, D.R., KREMER, H., Y RUTTER, J. (2009). SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science* **325**(5944):1139–1142
- HAO, Y., BAKER, D., Y TEN DIJKE, P. (2019). TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences* **20**(11):2767
- HAYES, J.D., FLANAGAN, J.U., Y JOWSEY, I.R. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **45**(1):51–88
- HIYAMA, N., ANDO, T., MAEMURA, K., SAKATANI, T., AMANO, Y., WATANABE, K., KAGE, H., YATOMI, Y., NAGASE, T., NAKAJIMA, J., Y TAKAI, D. (2018). Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit is associated with cisplatin resistance in lung adenocarcinoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology*
- HORWITZ, E.M., ANDREEF, M., Y FRASSONI, F. (2006). Mesenchymal stromal cells. *Current opinion in hematology* **13**(6):419–25
- HU, Y., HE, K., WANG, D., YUAN, X., LIU, Y., JI, H., Y SONG, J. (2013). TMEPAI regulates EMT in lung cancer cells by modulating the ROS and IRS-1 signaling pathways. *Carcinogenesis* **34**(8):1764–1772

- HUA, W., TEN DIJKE, P., KOSTIDIS, S., GIERA, M., Y HORNSVELD, M. (2020). TGF β -induced metabolic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* **77**(11):2103–2123
- HUSSEY, G.S., LINK, L.A., BROWN, A.S., HOWLEY, B.V., CHAUDHURY, A., Y HOWE, P.H. (2012). Establishment of a TGF β -Induced Post-Transcriptional EMT Gene Signature. *PLoS ONE* **7**(12):e52624
- HYDUKE, D.R., LEWIS, N.E., Y PALSSON, B.O. (2013). Analysis of omics data with genome-scale models of metabolism. *Molecular bioSystems* **9**(2):167–74
- INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial del cáncer (4 febrero). Comunicado de Prensa Num. 105/21 (2021), Accedido en 01-03-2021 https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf
- JANÁKY, R., OGITA, K., PASQUALOTTO, B.A., BAINS, J.S., OJA, S.S., YONEDA, Y., Y SHAW, C.A. (2001). Glutathione and Signal Transduction in the Mammalian CNS. *Journal of Neurochemistry* **73**(3):889–902
- JANIN, M., ESTELLER, M., ROWAN, A., BARCLAY, E., JAEGER, E., KELSELL, D., LEIGH, I., GORMAN, P., LAMLUM, H., RAHMAN, S., CONSORTIUM, M.L., Y AL., E. (2016). Oncometabolite Accumulation and Epithelial-to-Mesenchymal Transition: The Turn of Fumarate. *Cell Metabolism* **24**(4):529–530
- JIANG, F., MA, S., XUE, Y., HOU, J., Y ZHANG, Y. (2016a). LDH-A promotes malignant progression via activation of epithelial-to-mesenchymal transition and conferring stemness in muscle-invasive bladder cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **469**(4):985–992
- JIANG, L., XIAO, L., SUGIURA, H., HUANG, X., ALI, A., KURO-O, M., DEBERARDINIS, R.J., Y BOOTHMAN, D.A. (2015). Metabolic reprogramming during TGF β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene* **34**(30):3908–16

- JIANG, L., SHESTOV, A.A., SWAIN, P., YANG, C., PARKER, S.J., WANG, Q.A., TERADA, L.S., ADAMS, N.D., MCCABE, M.T., PIETRAK, B., SCHMIDT, S., METALLO, C.M., DRANKA, B.P., SCHWARTZ, B., Y DEBERARDINIS, R.J. (2016b). Reductive carboxylation supports redox homeostasis during anchorage-independent growth. *Nature* **532**(7598):255–258
- KALLURI, R. Y WEINBERG, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* **119**(6):1420–8
- KAMARAJUGADDA, S., STEMBOROSKI, L., CAI, Q., SIMPSON, N.E., NAYAK, S., TAN, M., Y LU, J. (2012). Glucose Oxidation Modulates Anoikis and Tumor Metastasis. *Molecular and Cellular Biology* **32**(10):1893–1907
- KANG, H., KIM, H., LEE, S., YOUN, H., Y YOUN, B. (2019). Role of Metabolic Reprogramming in Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT). *International Journal of Molecular Sciences* **20**(8):2042
- KANG, Y.P., MOCKABEE-MACIAS, A., JIANG, C., FALZONE, A., PRIETO-FARIGUA, N., STONE, E., HARRIS, I.S., Y DENICOLA, G.M. (2021). Non-canonical Glutamate-Cysteine Ligase Activity Protects against Ferroptosis. *Cell Metabolism* **33**(1):174–189
- KASAI, H., ALLEN, J.T., MASON, R.M., KAMIMURA, T., Y ZHANG, Z. (2005). TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respiratory Research* **6**(1):56
- KERR, E.M. Y MARTINS, C.P. (2018). Metabolic rewiring in mutant Kras lung cancer. *FEBS Journal* **285**(1):28–41
- KHATIB, A., SOLAIMUTHU, B., BEN YOSEF, M., ABU RMAILEH, A., TANNA, M., OREN, G., SCHLESINGER FRISCH, M., AXELROD, J.H., LICHTENSTEIN, M., Y SHAUL, Y.D. (2020). The glutathione peroxidase 8 (GPX8)/IL-6/STAT3 axis is essential in maintaining an aggressive breast cancer phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **117**(35):21420–21431

- KIM, N.H., CHA, Y.H., LEE, J., LEE, S.H., YANG, J.H., YUN, J.S., CHO, E.S., ZHANG, X., NAM, M., KIM, N., YUK, Y.S., CHA, S.Y., LEE, Y., RYU, J.K., PARK, S., CHEONG, J.H., KANG, S.W., KIM, S.Y., HWANG, G.S., YOON, J.I., Y KIM, H.S. (2017). Snail reprograms glucose metabolism by repressing phosphofructokinase PFKP allowing cancer cell survival under metabolic stress. *Nature Communications* **8**(1):1–12
- KIM, Y.Y., HAN, D., MIN, H., JIN, J., YI, E.C., Y KIM, Y.Y. (2014). Comparative proteomic profiling of pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines. *Molecules and Cells* **37**(12):888–898
- KIMMELMAN, A.C. (2015). Metabolic dependencies in RAS-driven cancers. *Clinical Cancer Research* **21**(8):1828–1834
- KONDAVEETI, Y., GUTTILLA REED, I.K., Y WHITE, B.A. (2015). Epithelial-mesenchymal transition induces similar metabolic alterations in two independent breast cancer cell lines. *Cancer letters* **364**(1):44–58
- LEBLEU, V.S., O’CONNELL, J.T., GONZALEZ HERRERA, K.N., WIKMAN, H., PANTEL, K., HAIGIS, M.C., DE CARVALHO, F.M., DAMASCENA, A., DOMINGOS CHINEN, L.T., ROCHA, R.M., ASARA, J.M., KALLURI, R., O’CONNELL, J.T., GONZALEZ HERRERA, K.N., WIKMAN, H., PANTEL, K., HAIGIS, M.C., DE CARVALHO, F.M., DAMASCENA, A., DOMINGOS CHINEN, L.T., ROCHA, R.M., ASARA, J.M., Y KALLURI, R. (2014). PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nature cell biology* **16**(10):992–1003
- LEE, S.Y., JEON, H.M., JU, M.K., JEONG, E.K., KIM, C.H., PARK, H.G., HAN, S.I., Y KANG, H.S. (2016). Dlx-2 and glutaminase upregulate epithelial-mesenchymal transition and glycolytic switch. *Oncotarget* **7**(7):7925–7939
- LI, F., DAI, L., Y NIU, J. (2020). GPX2 silencing relieves epithelial–mesenchymal transition, invasion, and metastasis in pancreatic cancer by downregulating Wnt pathway. *Journal of Cellular Physiology* **235**(11):7780–7790

- LI, J., WANG, Y., LI, Q.G., XUE, J.J., WANG, Z., YUAN, X., TONG, J.D., Y XU, L.C. (2016). Downregulation of FBP1 Promotes Tumor Metastasis and Indicates Poor Prognosis in Gastric Cancer via Regulating Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLOS ONE* **11**(12):e0167857
- LI, L.P., LU, C.H., CHEN, Z.P., GE, F., WANG, T., WANG, W., XIAO, C.L., YIN, X.F., LIU, L., HE, J.X., Y HE, Q.Y. (2011). Subcellular proteomics revealed the epithelial-mesenchymal transition phenotype in lung cancer. *Proteomics* **11**(3):429–39
- LI, R., HUANG, C., HO, J.C.H., LEUNG, C.C.T., KONG, R.Y.C., LI, Y., LIANG, X., LAI, K.P., Y TSE, W.K.F. (2021). The use of glutathione to reduce oxidative stress status and its potential for modifying the extracellular matrix organization in cleft lip. *Free Radical Biology and Medicine* **164**:130–138
- LIANG, S.Q., MARTI, T.M., DORN, P., FROMENT, L., HALL, S.R.R., BEREZOWSKA, S., KOCHER, G., SCHMID, R.A., Y PENG, R.W. (2015). Blocking the epithelial-to-mesenchymal transition pathway abrogates resistance to anti-folate chemotherapy in lung cancer. *Cell Death and Disease* **6**(7):e1824
- LIN, C.C., CHENG, T.L., TSAI, W.H., TSAI, H.J., HU, K.H., CHANG, H.C., YEH, C.W., CHEN, Y.C., LIAO, C.C., Y CHANG, W.T. (2012). Loss of the respiratory enzyme citrate synthase directly links the Warburg effect to tumor malignancy. *Scientific Reports* **2**(1):785
- LIN, L.C., CHEN, C.F., HO, C.T., LIU, J.J., LIU, T.Z., Y CHERN, C.L. (2018). γ -Glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) as a target for overcoming chemo- and radio-resistance of human hepatocellular carcinoma cells. *Life Sciences*
- LIU, C.W., HUA, K.T., LI, K.C., KAO, H.F., HONG, R.L., KO, J.Y., HSIAO, M., KUO, M.L., Y TAN, C.T. (2017a). Histone methyltransferase G9a drives chemotherapy resistance by regulating the glutamate–cysteine ligase catalytic subunit in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*

- LIU, K., TANG, Z., HUANG, A., CHEN, P., LIU, P., YANG, J., LU, W., LIAO, J., SUN, Y., WEN, S., HU, Y., Y HUANG, P. (2017b). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes cancer growth and metastasis through upregulation of SNAIL expression. *International Journal of Oncology* **50**(1)
- LIU, R.M. Y GASTON PRAVIA, K. (2010). Oxidative stress and glutathione in TGF- β -mediated fibrogenesis. *Free Radical Biology and Medicine* **48**(1):1–15
- LU, S.C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1830**(5):3143–3153
- MANI, S.A., GUO, W., LIAO, M.J., EATON, E.N., AYYANAN, A., ZHOU, A.Y., BROOKS, M., REINHARD, F., ZHANG, C.C., SHIPITSIN, M., CAMPBELL, L.L., POLYAK, K., BRISKEN, C., YANG, J., Y WEINBERG, R.A. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* **133**(4):704–715
- MASIN, M., VAZQUEZ, J., ROSSI, S., GROENEVELD, S., SAMSON, N., SCHWALIE, P.C., DEPLANCKE, B., FRAWLEY, L.E., GOUTTENOIRE, J., MORADPOUR, D., OLIVER, T.G., Y MEYLAN, E. (2014). GLUT3 is induced during epithelial-mesenchymal transition and promotes tumor cell proliferation in non-small cell lung cancer. *Cancer & Metabolism* **2**(1):11
- MATADAMAS-GUZMAN, M., ZAZUETA, C., ROJAS, E., Y RESENDIS-ANTONIO, O. (2020). Analysis of Epithelial-Mesenchymal Transition Metabolism Identifies Possible Cancer Biomarkers Useful in Diverse Genetic Backgrounds. *Frontiers in Oncology* **10**:1309
- MAYERS, J.R., TORRENCE, M.E., DANAI, L.V., PAPAGIANNAKOPOULOS, T., DAVIDSON, S.M., BAUER, M.R., LAU, A.N., JI, B.W., DIXIT, P.D., HOSIOS, A.M., MUIR, A., CHIN, C.R., FREINKMAN, E., JACKS, T., WOLPIN, B.M., VITKUP, D., Y VANDER HEIDEN, M.G. (2016). Tissue of origin dictates branched-chain amino acid metabolism in mutant Kras-driven cancers. *Science* **353**(6304):1161–1165
- MENG, Q., SHI, S., LIANG, C., LIANG, D., HUA, J., ZHANG, B., XU, J., Y YU, X. (2018).

- Abrogation of glutathione peroxidase-1 drives EMT and chemoresistance in pancreatic cancer by activating ROS-mediated Akt/GSK3 β /Snail signaling. *Oncogene* **37**(44):5843–5857
- MORANDI, A., TADDEI, M.L., CHIARUGI, P., Y GIANNONI, E. (2017). Targeting the Metabolic Reprogramming That Controls Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Aggressive Tumors. *Frontiers in oncology* **7**:40
- MOUGIAKAKOS, D., OKITA, R., ANDO, T., DÜRR, C., GADIOT, J., ICHIKAWA, J., ZEISER, R., BLANK, C., JOHANSSON, C.C., Y KIESSLING, R. (2012). High expression of GCLC is associated with malignant melanoma of low oxidative phenotype and predicts a better prognosis. *Journal of Molecular Medicine* **90**(8):935–944
- MOUSTAKAS, A. Y HELDIN, C.H. (2012). Induction of epithelial–mesenchymal transition by transforming growth factor β . *Seminars in Cancer Biology* **22**(5-6):446–454
- NABER, H.P., DRABSCH, Y., SNAAR-JAGALSKA, B.E., TEN DIJKE, P., Y VAN LAAR, T. (2013). Snail and Slug, key regulators of TGF- β -induced EMT, are sufficient for the induction of single-cell invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **435**(1):58–63
- NAGY, A., LÁNCZKY, A., MENYHÁRT, O., Y GYÓRFFY, B. (2018). Validation of miRNA prognostic power in hepatocellular carcinoma using expression data of independent datasets. *Scientific Reports* **8**(1):9227
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. Cancer Statistics (2020), Accedido en 1-03-2021 <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>
- NIETO, M.A., HUANG, R.Y.J., JACKSON, R.A., Y THIERY, J.P. (2016). EMT: 2016. *Cell* **166**(1):21–45
- OMS. Cáncer (2021), Accedido en 1-03-2021 <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- ORTH, J., THIELE, I., Y PALSSON, B.O. (2010). What is flux balance analysis? *Nature biotechnology*

- O'CONNOR, J.W. Y GOMEZ, E.W. (2014). Biomechanics of TGF β -induced epithelial-mesenchymal transition: implications for fibrosis and cancer. *Clinical and Translational Medicine* **3**(1):23
- PALSSON, B.O. *Systems Biology: Properties of Reconstructed Networks*, tomo 9. Cambridge University Press (2006)
- PECORINO, L. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets and Therapeutics*. 2^a edición. Oxford University Press, New York (2008)
- PIROZZI, G., TIRINO, V., CAMERLINGO, R., FRANCO, R., LA ROCCA, A., LIGUORI, E., MARTUCCI, N., PAINO, F., NORMANNO, N., Y ROCCO, G. (2011). Epithelial to mesenchymal transition by TGF β -1 induction increases stemness characteristics in primary non small cell lung cancer cell line. *PloS one* **6**(6):e21548
- PUPO, E., AVANZATO, D., MIDDONTI, E., BUSSOLINO, F., Y LANZETTI, L. (2019). KRAS-driven metabolic rewiring reveals novel actionable targets in cancer. *Frontiers in Oncology* **9**(AUG):848
- QI, X., NG, K.T.P., LIAN, Q.Z., LIU, X.B., LI, C.X., GENG, W., LING, C.C., MA, Y.Y., YEUNG, W.H., TU, W.W., FAN, S.T., LO, C.M., Y MAN, K. (2014). Clinical significance and therapeutic value of glutathione peroxidase 3 (GPx3) in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **5**(22):11103–11120
- RAHMAN, I. Y MACNEE, W. (2000). Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *The European respiratory journal* **16**(3):534–554
- RAMIREZ-PEÑA, E., ARNOLD, J., SHIVAKUMAR, V., JOSEPH, R., VIDHYA VIJAY, G., DEN HOLLANDER, P., BHANGRE, N., ALLEGAKOEN, P., PRASAD, R., CONLEY, Z., MATÉS, J.M., MÁRQUEZ, J., CHANG, J.T., VASAIKAR, S., SOUNDARARAJAN, R., SREEKUMAR, A., Y MANI, S.A. (2019). The Epithelial to Mesenchymal Transition Promotes Glutamine Independence by Suppressing GLS2 Expression. *Cancers* **11**(10):1610

- RAWLS, K.D., DOUGHERTY, B.V., BLAIS, E.M., STANCLIFFE, E., KOLLING, G.L., VINNAKOTA, K., PANNALA, V.R., WALLQVIST, A., Y PAPIN, J.A. (2019). A simplified metabolic network reconstruction to promote understanding and development of flux balance analysis tools. *Computers in Biology and Medicine* **105**:64–71
- RESENDIS-ANTONIO, O. (2009). Filling kinetic gaps: dynamic modeling of metabolism where detailed kinetic information is lacking. *PloS one* **4**(3):e4967
- RESENDIS-ANTONIO, O., CHECA, A., Y ENCARNACIÓN, S. (2010). Modeling core metabolism in cancer cells: surveying the topology underlying the Warburg effect. *PloS one* **5**(8):e12383
- RESENDIS-ANTONIO, O., GONZÁLEZ-TORRES, C., JAIME-MUÑOZ, G., HERNANDEZ-PATIÑO, C.E., Y SALGADO-MUÑOZ, C.F. (2015). Modeling metabolism: a window toward a comprehensive interpretation of networks in cancer. *Seminars in cancer biology* **30**:79–87
- REZOLA, A., PEY, J., RUBIO, A., Y PLANES, F.J. (2014). In-Silico Prediction of Key Metabolic Differences between Two Non-Small Cell Lung Cancer Subtypes. *PLoS ONE* **9**(8):e103998
- RIEMANN, A., RAUSCHNER, M., GIESELMANN, M., REIME, S., HAUPT, V., Y THEWS, O. (2019). Extracellular Acidosis Modulates the Expression of Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Markers and Adhesion of Epithelial and Tumor Cells. *Neoplasia (United States)* **21**(5):450–458
- SATO, M., SHAMES, D.S., Y HASEGAWA, Y. (2012). Emerging evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in lung carcinogenesis. *Respirology (Carlton, Vic.)* **17**(7):1048–59
- SCANLON, C.S., VAN TUBERGEN, E.A., INGLEHART, R.C., Y D’SILVA, N.J. (2013). Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *Journal of dental research* **92**(2):114–21
- SCIACOVELLI, M. Y FREZZA, C. (2017). Metabolic reprogramming and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *The FEBS Journal* **284**(19):3132–3144

- SCIACOVELLI, M., GONÇALVES, E., JOHNSON, T.I., ZECCHINI, V.R., DA COSTA, A.S.H., GAUDE, E., DRUBBEL, A.V., THEOBALD, S.J., ABBO, S.R., TRAN, M.G.B., RAJEEVE, V., CARDACI, S., FOSTER, S., YUN, H., CUTILLAS, P., WARREN, A., GNANAPRAGASAM, V., GOTTLIEB, E., FRANZE, K., HUNTLY, B., MAHER, E.R., MAXWELL, P.H., SAEZ-RODRIGUEZ, J., Y FREZZA, C. (2016). Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature* **537**(7621):544–547
- SHAUL, Y., FREINKMAN, E., COMB, W., CANTOR, J., TAM, W., THIRU, P., KIM, D., KANAREK, N., PACOLD, M., CHEN, W., BIERIE, B., POSSEMATO, R., REINHARDT, F., WEINBERG, R., YAFFE, M., Y SABATINI, D. (2014). Dihydropyrimidine Accumulation Is Required for the Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cell* **158**(5):1094–1109
- SHIRAIISHI, T., VERDONE, J.E., HUANG, J., KAHLERT, U.D., HERNANDEZ, J.R., TORGA, G., ZARIF, J.C., EPSTEIN, T., GATENBY, R., MCCARTNEY, A., ELISSEEFF, J.H., MOONEY, S.M., AN, S.S., Y PIENTA, K.J. (2015). Glycolysis is the primary bioenergetic pathway for cell motility and cytoskeletal remodeling in human prostate and breast cancer cells. *Oncotarget* **6**(1):130–143
- SOCIEDAD MEXICANA DE ONCOLOGÍA A.C. Prevención y diagnóstico oportuno en cáncer (2016), Accedido en 01-03-2021 https://www.smeo.org.mx/descargables/COPREDOC_GUIA.pdf
- SOMVANSHI, P.R. Y VENKATESH, K.V. (2014). A conceptual review on systems biology in health and diseases: from biological networks to modern therapeutics. *Systems and synthetic biology* **8**(1):99–116
- SPANO, D., HECK, C., DE ANTONELLIS, P., CHRISTOFORI, G., Y ZOLLO, M. (2012). Molecular networks that regulate cancer metastasis. *Seminars in cancer biology* **22**(3):234–49
- STOCKWELL, B.R., FRIEDMANN ANGELI, J.P., BAYIR, H., BUSH, A.I., CONRAD, M., DIXON, S.J., FULDA, S., GASCÓN, S., HATZIOS, S.K., KAGAN, V.E., NOEL, K., JIANG, X., LINKERMANN, A., MURPHY, M.E., OVERHOLTZER, M., OYAGI, A., PAGNUSSAT, G.C.,

- PARK, J., RAN, Q., ROSENFELD, C.S., SALNIKOW, K., TANG, D., TORTI, F.M., TORTI, S.V., TOYOKUNI, S., WOERPEL, K., Y ZHANG, D.D. (2017). Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell* **171**(2):273–285
- SUAREZ-ARNEDO, A., FIGUEROA, F.T., CLAVIJO, C., ARBELÁEZ, P., CRUZ, J.C., Y MUÑOZ-CAMARGO, C. (2020). An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS ONE* **15**(7 July):e0232565
- SUN, L., YAO, Y., PAN, G., ZHAN, S., SHI, W., LU, T., YUAN, J., TIAN, K., JIANG, L., SONG, S., ZHU, X., Y HE, S. (2018). Small interfering RNA-mediated knockdown of fatty acid synthase attenuates the proliferation and metastasis of human gastric cancer cells via the mTOR/GLI1 signaling pathway. *Oncology Letters* **16**(1):594–602
- SUN, Y., DAEMEN, A., HATZIVASSILIOU, G., ARNOTT, D., WILSON, C., ZHUANG, G., GAO, M., LIU, P., BOUDREAU, A., JOHNSON, L., Y SETTLEMAN, J. (2014). Metabolic and transcriptional profiling reveals pyruvate dehydrogenase kinase 4 as a mediator of epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in tumor cells. *Cancer & metabolism* **2**(1):20
- TAUBE, J.H., HERSCHKOWITZ, J.I., KOMUROV, K., ZHOU, A.Y., GUPTA, S., YANG, J., HARTWELL, K., ONDER, T.T., GUPTA, P.B., EVANS, K.W., HOLLIER, B.G., RAM, P.T., LANDER, E.S., ROSEN, J.M., WEINBERG, R.A., Y MANI, S.A. (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(35):15449–54
- THIERY, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nature Reviews Cancer* **2**(6):442–454
- THIERY, J.P., ACLOQUE, H., HUANG, R.Y., Y NIETO, M.A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* **139**(5):871–890
- TODA, K., KAWADA, K., IWAMOTO, M., INAMOTO, S., SASAZUKI, T., SHIRASAWA, S., HASEGAWA, S., Y SAKAI, Y. (2016). Metabolic Alterations Caused by KRAS Mutations

- in Colorectal Cancer Contribute to Cell Adaptation to Glutamine Depletion by Upregulation of Asparagine Synthetase. *Neoplasia (United States)* **18**(11):654–665
- TSUBAKIHARA, Y. Y MOUSTAKAS, A. (2018). Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis under the Control of Transforming Growth Factor β . *International Journal of Molecular Sciences* **19**(11):3672
- ULANET, D.B., COUTO, K., JHA, A., CHOE, S., WANG, A., WOO, H.K., STEADMAN, M., DELABARRE, B., GROSS, S., DRIGGERS, E., DORSCH, M., Y HUROV, J.B. (2014). Mesenchymal Phenotype Predisposes Lung Cancer Cells to Impaired Proliferation and Redox Stress in Response to Glutaminase Inhibition. *PLoS ONE* **9**(12):e115144
- UNTERGASSER, A., CUTCUTACHE, I., KORESSAAR, T., YE, J., FAIRCLOTH, B.C., REMM, M., Y ROZEN, S.G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* **40**(15):e115–e115
- VAZQUEZ, A., KAMPHORST, J.J., MARKERT, E.K., SCHUG, Z.T., TARDITO, S., Y GOTTLIEB, E. (2016). Cancer metabolism at a glance. *Journal of Cell Science* **129**(18):3367–3373
- VENKOV, C.D., LINK, A.J., JENNINGS, J.L., PLIETH, D., INOUE, T., NAGAI, K., XU, C., DIMITROVA, Y.N., RAUSCHER, F.J., Y NEILSON, E.G. (2007). A proximal activator of transcription in epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* **117**(2):482–91
- WANG, Y., QI, H., LIU, Y., DUAN, C., LIU, X., XIA, T., CHEN, D., PIAO, H.L., Y LIU, H.X. (2021). The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy. *Theranostics* **11**(10):4839–4857
- WANG, Y., CAO, P., ALSHWMI, M., JIANG, N., XIAO, Z., JIANG, F., GU, J., WANG, X., SUN, X., Y LI, S. (2019). GPX2 suppression of H₂O₂ stress regulates cervical cancer metastasis and apoptosis via activation of the β -catenin-WNT pathway. *OncoTargets and Therapy* **Volume 12**:6639–6651

- WEI, Z., CATY, J., WHITSON, J., ZHANG, A.D., SRINIVASAGAN, R., KAVANAGH, T.J., YAN, H., Y FAN, X. (2017). Reduced Glutathione Level Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Lens Epithelial Cells via a Wnt/ β -Catenin-Mediated Pathway: Relevance for Cataract Therapy. *American Journal of Pathology* **187**(11):2399–2412
- WHITSON, J.A., WILMARTH, P.A., KLIMEK, J., MONNIER, V.M., DAVID, L., Y FAN, X. (2017). Proteomic analysis of the glutathione-deficient LEGSKO mouse lens reveals activation of EMT signaling, loss of lens specific markers, and changes in stress response proteins. *Free Radical Biology and Medicine* **113**:84–96
- WHO. Cancer (2021), Accedido en 1-03-2021 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- WILD, C.P., WEIDERPASS, E., Y STEWART, B.W. *Cancer research for cancer prevention World Cancer Report*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France (2020)
- XIA, J. Y WISHART, D.S. (2016). Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics* **55**(1):1–14
- XIANG, L., XIE, G., LIU, C., ZHOU, J., CHEN, J., YU, S., LI, J., PANG, X., SHI, H., Y LIANG, H. (2013). Knock-down of glutaminase 2 expression decreases glutathione, NADH, and sensitizes cervical cancer to ionizing radiation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1833**(12):2996–3005
- XIANG, L., MOU, J., SHAO, B., WEI, Y., LIANG, H., TAKANO, N., SEMENZA, G.L., Y XIE, G. (2019). Glutaminase 1 expression in colorectal cancer cells is induced by hypoxia and required for tumor growth, invasion, and metastatic colonization. *Cell Death and Disease* **10**(2)
- YUNEVA, M.O., FAN, T.W., ALLEN, T.D., HIGASHI, R.M., FERRARIS, D.V., TSUKAMOTO, T., MATÉS, J.M., ALONSO, F.J., WANG, C., SEO, Y., CHEN, X., Y BISHOP, J.M. (2012). The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metabolism* **15**(2):157–170

- ZEISBERG, M. Y NEILSON, E.G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of clinical investigation* **119**(6):1429–37
- ZHANG, L., HUANG, G., LI, X., ZHANG, Y., JIANG, Y., SHEN, J., LIU, J., WANG, Q., ZHU, J., FENG, X., DONG, J., Y QIAN, C. (2013). Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of SNAI1 by hypoxia-inducible factor -1 α in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* **13**:108
- ZHENG, X., CARSTENS, J.L., KIM, J., SCHEIBLE, M., KAYE, J., SUGIMOTO, H., WU, C.C., LEBLEU, V.S., Y KALLURI, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*
- ZHOU, C., NITSCHKE, A.M., XIONG, W., ZHANG, Q., TANG, Y., BLOCH, M., ELLIOTT, S., ZHU, Y., BAZZONE, L., YU, D., WELDON, C.B., SCHIFF, R., MCLACHLAN, J.A., BECKMAN, B.S., WIESE, T.E., NEPHEW, K.P., SHAN, B., BUROW, M.E., Y WANG, G. (2008). Proteomic analysis of tumor necrosis factor- α resistant human breast cancer cells reveals a MEK5/Erk5-mediated epithelial-mesenchymal transition phenotype. *Breast Cancer Research* **10**(6):R105

Apéndice A

Marcadores EMT

Nombre del Gen	Símbolo	Categoría	Referencia
Cadherin 12, type 2 (N-cadherin 2)	CDH12	cell-surface	[Hussey <i>et al.</i> , 2012]
Cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	CDH11	cell-surface	[Zeisberg y Neilson, 2009]
Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	ITGA5	cell-surface	[Zhou <i>et al.</i> , 2008]
Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	ITGB1	cell-surface	[Spano <i>et al.</i> , 2012]
Integrin, alpha V	ITGAV	cell-surface	[Kalluri y Weinberg, 2009]
syndecan 1	SDC1	cell-surface	[Kalluri y Weinberg, 2009]
Cadherin 1, type 1	CDH1	cell-surface	[Hussey <i>et al.</i> , 2012]
discoidin domain receptor tyrosine kinase 2	DDR2	cell-surface	[Scanlon <i>et al.</i> , 2013]
Tight junction protein 1	TJP1	cell-surface	[Venkov <i>et al.</i> , 2007]
S100 calcium binding protein A4	S100A4	cytoskeletal	[Scanlon <i>et al.</i> , 2013]
Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	ACTA2	cytoskeletal	[Hussey <i>et al.</i> , 2012]
Vimentin	VIM	cytoskeletal	[Kalluri y Weinberg, 2009]
Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	CTNNB1	cytoskeletal	[Hussey <i>et al.</i> , 2012]
Keratin 5, type II	KRT5	cytoskeletal	[Zeisberg y Neilson, 2009]
Keratin 14, type I	KRT14	cytoskeletal	[Zeisberg y Neilson, 2009]
Collagen, type I, alpha 1	COL1A1	ECM	[Scanlon <i>et al.</i> , 2013]
Collagen, type III, alpha 1	COL3A1	ECM	[Scanlon <i>et al.</i> , 2013]

Collagen, type IV, alpha 1	COL4A1	ECM	[Scanlon <i>et al.</i> , 2013]
Laminin, alpha 3	LAMA3	ECM	[Zeisberg y Neilson, 2009]
Laminin, beta 3	LAMB3	ECM	[Zeisberg y Neilson, 2009]
Laminin, gamma 2	LAMC2	ECM	[Zeisberg y Neilson, 2009]
Snail family zinc finger 1	SNAI1	TF	[Taube <i>et al.</i> , 2010]
Snail family zinc finger 2	SNAI2	TF	[Taube <i>et al.</i> , 2010]
Zinc finger E-box binding homeobox 1	ZEB1	TF	[Zeisberg y Neilson, 2009]
Zinc finger E-box binding homeobox 2	ZEB2	TF	[Zeisberg y Neilson, 2009]
Nuclear transcription factor Y, alpha	NFYA	TF	[Scanlon <i>et al.</i> , 2013]
Nuclear transcription factor Y, beta	NFYB	TF	[Scanlon <i>et al.</i> , 2013]
Twist family bHLH transcription factor 2	TWIST2	TF	[Kalluri y Weinberg, 2009]
Twist family bHLH transcription factor 1	TWIST1	TF	[Kalluri y Weinberg, 2009]
Lymphoid enhancer-binding factor 1	LEF1	TF	[Kalluri y Weinberg, 2009]
Forkhead box C2	FOXC2	TF	[Kalluri y Weinberg, 2009]
Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (bHLH transcription factor)	HIF1A	TF	[Kalluri y Weinberg, 2009]
Prostate transmembrane protein, androgen induced 1	PMEPA1	metabolism	
Dihydropyrimidinase	DPYS	metabolism	[Shaul <i>et al.</i> , 2014]
Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	SDHA	metabolism	[Aspuria <i>et al.</i> , 2014]
Succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (Ip)	SDHB	metabolism	[Aspuria <i>et al.</i> , 2014]
Succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane protein, 15kDa	SDHC	metabolism	[Aspuria <i>et al.</i> , 2014]
Succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein	SDHD	metabolism	[Aspuria <i>et al.</i> , 2014]
Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	PDK4	metabolism	[Sun <i>et al.</i> , 2014]
Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	ALDH1A3	metabolism	[Liang <i>et al.</i> , 2015]
Fructose-1,6-bisphosphatase 1	FBP1	metabolism	[Sun <i>et al.</i> , 2014]

Apéndice B

Enriquecimiento de vías metabólicas

A continuación, las vías metabólicas enriquecidas para cada línea celular. Consideradas únicamente si el valor de p ajustado era menor a 0.01.

Tabla B-1: Resultados del enriquecimiento de vías metabólicas de A549

Metabolic pathways	Total Cmpd	Hits	Statistic Q	Raw p	Holm p	FDR
Glycerolipid Metabolism	25	14	88.622	2.17E-09	2.12E-07	2.12E-07
Valine, Leucine and Isoleucine	60	15	83.296	1.40E-08	1.36E-06	4.80E-07
Degradation						
Phospholipid Biosynthesis	29	9	90.896	1.81E-08	1.73E-06	4.80E-07
Cardiolipin Biosynthesis	11	8	88.981	2.07E-08	1.97E-06	4.80E-07
Plasmalogen Synthesis	26	9	85.158	2.91E-08	2.74E-06	4.80E-07
Amino Sugar Metabolism	33	16	72.036	2.94E-08	2.74E-06	4.80E-07
Porphyrin Metabolism	40	6	69.006	4.19E-08	3.85E-06	5.17E-07
De Novo Triacylglycerol	9	6	93.609	4.39E-08	3.99E-06	5.17E-07
Biosynthesis						
Caffeine Metabolism	24	5	86.815	4.93E-08	4.43E-06	5.17E-07
Pentose Phosphate Pathway	29	11	73.238	5.73E-08	5.10E-06	5.17E-07
Pantothenate and CoA	21	9	79.376	6.31E-08	5.55E-06	5.17E-07
Biosynthesis						
Threonine and 2-Oxobutanoate	20	6	86.657	6.33E-08	5.55E-06	5.17E-07
Degradation						

Table B-1 continued from previous page

Metabolic pathways	Total Cmpd	Hits	Statistic Q	Raw p	Holm p	FDR
Oxidation of Branched Chain Fatty Acids	26	8	63.35	9.26E-08	7.96E-06	6.20E-07
Pyrimidine Metabolism	59	18	53.73	9.52E-08	8.09E-06	6.20E-07
Glycine and Serine Metabolism	59	27	82.76	9.73E-08	8.17E-06	6.20E-07
Ketone Body Metabolism	13	5	82.67	1.01E-07	8.40E-06	6.20E-07
Mitochondrial Electron Transport Chain	19	9	89.879	1.18E-07	9.66E-06	6.64E-07
Glycerol Phosphate Shuttle	11	5	92.779	1.22E-07	9.88E-06	6.64E-07
Citric Acid Cycle	32	13	75.83	1.58E-07	1.26E-05	7.60E-07
Beta-Alanine Metabolism	34	13	70.969	1.69E-07	1.33E-05	7.60E-07
Betaine Metabolism	21	11	68.464	1.70E-07	1.33E-05	7.60E-07
Starch and Sucrose Metabolism	31	14	67.672	1.71E-07	1.33E-05	7.60E-07
Glutamate Metabolism	49	23	64.692	1.88E-07	1.43E-05	7.72E-07
Lysine Degradation	30	10	72.933	1.89E-07	1.43E-05	7.72E-07
Tryptophan Metabolism	60	14	64.056	2.28E-07	1.69E-05	8.95E-07
Retinol Metabolism	37	6	73.314	2.46E-07	1.80E-05	9.28E-07
Ethanol Degradation	19	7	73.588	2.78E-07	2.00E-05	1.01E-06
Pyruvate Metabolism	48	16	77.099	2.93E-07	2.08E-05	1.03E-06
Bile Acid Biosynthesis	65	13	58.768	3.05E-07	2.14E-05	1.03E-06
Nicotinate and Nicotinamide Metabolism	37	15	73.832	3.67E-07	2.53E-05	1.20E-06
Mitochondrial Beta-Oxidation of Long Chain Saturated Fatty Acids	28	9	78.648	3.94E-07	2.68E-05	1.23E-06
Fatty Acid Biosynthesis	35	8	82.464	4.11E-07	2.75E-05	1.23E-06
Fatty acid Metabolism	43	8	81.157	4.41E-07	2.91E-05	1.23E-06
Butyrate Metabolism	19	8	79.469	4.56E-07	2.96E-05	1.23E-06
Beta Oxidation of Very Long Chain Fatty Acids	17	8	82.222	4.58E-07	2.96E-05	1.23E-06
Mitochondrial Beta-Oxidation of Medium Chain Saturated Fatty Acids	27	8	81.409	4.62E-07	2.96E-05	1.23E-06

Table B-1 continued from previous page

Metabolic pathways	Total Cmpd	Hits	Statistic Q	Raw p	Holm p	FDR
Mitochondrial Beta-Oxidation of Short Chain Saturated Fatty Acids	27	9	80.18	4.63E-07	2.96E-05	1.23E-06
Fatty Acid Elongation In Mitochondria	35	6	69.757	5.21E-07	3.18E-05	1.31E-06
Ammonia Recycling	32	15	75.355	5.25E-07	3.18E-05	1.31E-06
Propanoate Metabolism	42	12	80.225	5.40E-07	3.18E-05	1.31E-06
Warburg Effect	58	27	76.565	5.62E-07	3.26E-05	1.31E-06
Galactose Metabolism	38	17	53.492	5.72E-07	3.26E-05	1.31E-06
Estrone Metabolism	24	6	52.955	5.73E-07	3.26E-05	1.31E-06
Urea Cycle	29	15	72.732	6.09E-07	3.35E-05	1.31E-06
Cysteine Metabolism	26	9	72.214	6.12E-07	3.35E-05	1.31E-06
Transfer of Acetyl Groups into Mitochondria	22	11	62.449	6.15E-07	3.35E-05	1.31E-06
Steroid Biosynthesis	48	11	53.546	7.36E-07	3.83E-05	1.53E-06
Selenoamino Acid Metabolism	28	6	79.209	1.15E-06	5.84E-05	2.34E-06
Arginine and Proline Metabolism	53	19	63.128	1.21E-06	6.04E-05	2.42E-06
Glycolysis	25	13	80.396	1.24E-06	6.08E-05	2.43E-06
Gluconeogenesis	35	15	79.722	1.33E-06	6.39E-05	2.56E-06
Phytanic Acid Peroxisomal Oxidation	26	9	58.578	1.38E-06	6.49E-05	2.60E-06
Biotin Metabolism	8	2	60.991	1.43E-06	6.59E-05	2.65E-06
Methionine Metabolism	43	19	74.284	1.53E-06	6.86E-05	2.77E-06
Histidine Metabolism	43	12	69.769	1.63E-06	7.19E-05	2.91E-06
Carnitine Synthesis	22	8	74.067	1.73E-06	7.42E-05	3.02E-06
Pyruvaldehyde Degradation	10	3	43.489	1.94E-06	8.14E-05	3.33E-06
Fructose and Mannose Degradation	32	12	72.074	2.07E-06	8.49E-05	3.50E-06
Androgen and Estrogen Metabolism	33	5	52.474	2.52E-06	1.01E-04	4.12E-06
Androstenedione Metabolism	24	5	52.474	2.52E-06	1.01E-04	4.12E-06

Table B-1 continued from previous page

Metabolic pathways	Total Cmpd	Hits	Statistic Q	Raw p	Holm p	FDR
Purine Metabolism	74	22	63.773	3.35E-06	1.27E-04	5.38E-06
Catecholamine Biosynthesis	20	3	70.116	6.17E-06	2.28E-04	9.75E-06
Glutathione Metabolism	21	10	36.68	6.67E-06	2.40E-04	1.04E-05
Thyroid hormone synthesis	13	2	85.313	8.68E-06	3.04E-04	1.33E-05
Phenylacetate Metabolism	9	4	82.095	1.36E-05	4.62E-04	2.04E-05
Folate Metabolism	29	8	61.01	1.38E-05	4.62E-04	2.04E-05
D-Arginine and D-Ornithine Metabolism	11	2	83.531	1.71E-05	5.47E-04	2.50E-05
Phosphatidylethanolamine Biosynthesis	12	5	62.784	1.99E-05	6.16E-04	2.86E-05
Spermidine and Spermine Biosynthesis	18	6	51.845	2.08E-05	6.25E-04	2.96E-05
Phenylalanine and Tyrosine Metabolism	28	8	76.676	2.38E-05	6.90E-04	3.33E-05
Glucose-Alanine Cycle	13	8	51.651	2.48E-05	6.94E-04	3.42E-05
Phosphatidylcholine Biosynthesis	14	6	62.952	2.68E-05	7.23E-04	3.64E-05
Malate-Aspartate Shuttle	10	5	75.635	3.30E-05	8.58E-04	4.43E-05
Alanine Metabolism	17	9	73.182	3.45E-05	8.62E-04	4.56E-05
Phosphatidylinositol Phosphate Metabolism	17	4	81.272	4.17E-05	1.00E-03	5.45E-05
Tyrosine Metabolism	72	10	59.673	4.59E-05	1.06E-03	5.92E-05
Riboflavin Metabolism	20	6	76.689	6.40E-05	1.41E-03	8.15E-05
Thiamine Metabolism	9	3	86.167	7.37E-05	1.55E-03	9.26E-05
Aspartate Metabolism	35	14	69.524	7.81E-05	1.56E-03	9.68E-05
Methylhistidine Metabolism	4	2	81.381	9.06E-05	1.72E-03	1.11E-04
Inositol Metabolism	33	7	55.427	2.02E-04	3.64E-03	2.42E-04
Inositol Phosphate Metabolism	26	6	64.996	2.03E-04	3.64E-03	2.42E-04
Steroidogenesis	43	4	55.667	4.81E-04	7.70E-03	5.68E-04
Pterine Biosynthesis	29	3	55.729	5.98E-04	8.97E-03	6.97E-04
Nucleotide Sugars Metabolism	20	10	51.443	6.33E-04	8.97E-03	7.30E-04

Table B-1 continued from previous page

Metabolic pathways	Total Cmpd	Hits	Statistic Q	Raw p	Holm p	FDR
Vitamin B6 Metabolism	20	2	72.733	6.60E-04	8.97E-03	7.52E-04

Tabla B-2: Resultados del enriquecimiento de vías metabólicas de HCC827

Metabolic pathways	Total Cmpd	Hits	Statistic Q	Raw p	Holm p	FDR
Betaine Metabolism	21	12	73.433	2.51E-07	2.46E-05	2.46E-05
Arachidonic Acid Metabolism	69	7	68.78	8.11E-07	7.86E-05	2.79E-05
Glutamate Metabolism	49	25	69.222	1.19E-06	1.14E-04	2.79E-05
Folate Metabolism	29	9	77.388	1.34E-06	1.27E-04	2.79E-05
Methionine Metabolism	43	20	68.758	1.42E-06	1.34E-04	2.79E-05
Pyruvate Metabolism	48	18	65.702	1.82E-06	1.70E-04	2.98E-05
Nicotinate and Nicotinamide Metabolism	37	16	77.035	2.97E-06	2.73E-04	4.16E-05
Spermidine and Spermine Biosynthesis	18	7	61.372	3.83E-06	3.48E-04	4.69E-05
Ubiquinone Biosynthesis	20	3	66.61	5.77E-06	5.19E-04	6.28E-05
Retinol Metabolism	37	6	73.848	7.27E-06	6.47E-04	6.96E-05
Tryptophan Metabolism	60	15	63.821	7.81E-06	6.87E-04	6.96E-05
Vitamin K Metabolism	14	2	84.325	1.04E-05	9.06E-04	8.50E-05
Lysine Degradation	30	10	61.955	1.73E-05	1.49E-03	1.31E-04
Purine Metabolism	74	24	61.08	2.04E-05	1.73E-03	1.35E-04
Tyrosine Metabolism	72	10	63.395	2.16E-05	1.82E-03	1.35E-04
Steroid Biosynthesis	48	13	61.725	2.20E-05	1.83E-03	1.35E-04
Fatty Acid Elongation In Mitochondria	35	6	71.024	2.57E-05	2.11E-03	1.42E-04
Caffeine Metabolism	24	5	68.272	2.61E-05	2.11E-03	1.42E-04
Glutathione Metabolism	21	12	67.49	3.24E-05	2.59E-03	1.67E-04
Ketone Body Metabolism	13	5	68.323	3.73E-05	2.95E-03	1.83E-04
Degradation of Superoxides	11	1	88.76	4.58E-05	3.57E-03	2.14E-04
Threonine and 2-Oxobutanoate Degradation	20	7	65.2	5.41E-05	4.17E-03	2.26E-04
Carnitine Synthesis	22	8	61.561	5.72E-05	4.35E-03	2.26E-04

Table B-2 continued from previous page

Metabolic pathways	Total Cmpd	Hits	Statistic Q	Raw p	Holm p	FDR
Valine, Leucine and Isoleucine Degradation	60	16	56.976	5.81E-05	4.36E-03	2.26E-04
Biotin Metabolism	8	3	60.027	6.03E-05	4.46E-03	2.26E-04
Pterine Biosynthesis	29	3	81.656	6.21E-05	4.54E-03	2.26E-04
Steroidogenesis	43	4	81.029	6.24E-05	4.54E-03	2.26E-04
Bile Acid Biosynthesis	65	14	59.914	6.96E-05	4.94E-03	2.44E-04
Methylhistidine Metabolism	4	2	80.725	7.95E-05	5.56E-03	2.69E-04
Histidine Metabolism	43	13	67.282	1.03E-04	7.12E-03	3.19E-04
Phytanic Acid Peroxisomal Oxidation	26	10	58.711	1.07E-04	7.29E-03	3.19E-04
Vitamin B6 Metabolism	20	2	77.234	1.09E-04	7.29E-03	3.19E-04
Beta Oxidation of Very Long Chain Fatty Acids	17	9	57.097	1.11E-04	7.31E-03	3.19E-04
Ethanol Degradation	19	8	67.583	1.11E-04	7.31E-03	3.19E-04
Arginine and Proline Metabolism	53	20	60.316	1.16E-04	7.45E-03	3.26E-04
Glycine and Serine Metabolism	59	28	60.035	1.28E-04	8.06E-03	3.48E-04
Citric Acid Cycle	32	14	59.904	1.34E-04	8.32E-03	3.55E-04
Mitochondrial Beta-Oxidation of Short Chain Saturated Fatty Acids	27	10	58.609	1.39E-04	8.45E-03	3.57E-04
Phosphatidylcholine Biosynthesis	14	7	40.957	1.49E-04	8.92E-03	3.68E-04
Mitochondrial Beta-Oxidation of Medium Chain Saturated Fatty Acids	27	9	65.538	1.50E-04	8.92E-03	3.68E-04
Thyroid hormone synthesis	13	2	76.457	1.64E-04	9.49E-03	3.91E-04
Fatty acid Metabolism	43	9	65.628	1.71E-04	9.74E-03	3.97E-04
Beta-Alanine Metabolism	34	13	61.541	1.77E-04	9.93E-03	3.97E-04
Butyrate Metabolism	19	9	65.709	1.78E-04	9.93E-03	3.97E-04

Tabla B-3: Resultados del enriquecimiento de vías metabólicas de NCI-H358

Metabolic pathway	Total Cmpd	Hits	Statistic Q	Raw p	Holm p	FDR
Tryptophan Metabolism	60	15	63.761	5.61E-09	5.50E-07	5.50E-07
Nucleotide Sugars Metabolism	20	11	70.138	4.04E-08	3.92E-06	1.98E-06
Lactose Synthesis	20	10	85.216	1.37E-07	1.32E-05	4.48E-06
Starch and Sucrose Metabolism	31	15	71.141	3.04E-07	2.89E-05	6.48E-06
Galactose Metabolism	38	18	73.148	3.31E-07	3.11E-05	6.48E-06
Amino Sugar Metabolism	33	17	76.146	6.30E-07	5.86E-05	1.03E-05
Retinol Metabolism	37	6	62.52	1.12E-06	1.03E-04	1.57E-05
Pyrimidine Metabolism	59	18	72.461	1.42E-06	1.29E-04	1.74E-05
Pantothenate and CoA Biosynthesis	21	10	70.419	4.64E-06	4.18E-04	5.05E-05
Methionine Metabolism	43	20	43.789	6.60E-06	5.88E-04	6.44E-05
Lactose Degradation	9	4	85.449	7.23E-06	6.36E-04	6.44E-05
Beta Oxidation of Very Long Chain Fatty Acids	17	9	66.431	8.33E-06	7.25E-04	6.81E-05
Purine Metabolism	74	25	47.724	9.69E-06	8.33E-04	7.30E-05
Glycerolipid Metabolism	25	15	63.56	1.18E-05	1.00E-03	7.76E-05
Transfer of Acetyl Groups into Mitochondria	22	12	72.329	1.19E-05	1.00E-03	7.76E-05
Nicotinate and Nicotinamide Metabolism	37	16	56.915	1.55E-05	1.29E-03	9.52E-05
Arachidonic Acid Metabolism	69	7	80.68	2.23E-05	1.83E-03	1.29E-04
Pyruvate Metabolism	48	18	63.596	3.04E-05	2.46E-03	1.65E-04
Beta-Alanine Metabolism	34	13	53.185	3.52E-05	2.82E-03	1.72E-04
Sphingolipid Metabolism	40	11	74.626	3.59E-05	2.84E-03	1.72E-04
Lysine Degradation	30	10	54.408	3.69E-05	2.87E-03	1.72E-04
Glycine and Serine Metabolism	59	28	64.813	4.27E-05	3.29E-03	1.90E-04
Glutathione Metabolism	21	12	64.464	4.61E-05	3.50E-03	1.96E-04
Glutamate Metabolism	49	26	47.194	5.48E-05	4.11E-03	2.24E-04
Glucose-Alanine Cycle	13	8	69.626	5.98E-05	4.42E-03	2.26E-04
Oxidation of Branched Chain Fatty Acids	26	9	61.919	5.99E-05	4.42E-03	2.26E-04

Table B-3 continued from previous page

Metabolic pathway	Total Cmpd	Hits	Statistic Q	Raw p	Holm p	FDR
Valine, Leucine and Isoleucine Degradation	60	15	59.185	8.44E-05	6.08E-03	2.95E-04
Aspartate Metabolism	35	15	53.913	8.57E-05	6.08E-03	2.95E-04
Fatty Acid Biosynthesis	35	8	57.71	8.99E-05	6.29E-03	2.95E-04
Folate Metabolism	29	9	65.465	9.03E-05	6.29E-03	2.95E-04
Mitochondrial Beta-Oxidation of Long Chain Saturated Fatty Acids	28	10	50.009	1.01E-04	6.86E-03	3.19E-04
Phytanic Acid Peroxisomal Oxidation	26	10	57.636	1.06E-04	7.11E-03	3.25E-04
Alpha Linolenic Acid and Linoleic Acid Metabolism	19	8	73.476	1.23E-04	8.15E-03	3.61E-04
Steroid Biosynthesis	48	13	65.512	1.33E-04	8.62E-03	3.61E-04
Citric Acid Cycle	32	14	57.161	1.41E-04	9.00E-03	3.61E-04
Sulfate/Sulfite Metabolism	22	4	70.053	1.42E-04	9.00E-03	3.61E-04
Mitochondrial Beta-Oxidation of Medium Chain Saturated Fatty Acids	27	9	52.519	1.44E-04	9.00E-03	3.61E-04
Urea Cycle	29	16	61.743	1.45E-04	9.00E-03	3.61E-04
Propanoate Metabolism	42	13	57.584	1.47E-04	9.00E-03	3.61E-04
Fatty acid Metabolism	43	9	53.065	1.47E-04	9.00E-03	3.61E-04
Ethanol Degradation	19	8	52.659	1.70E-04	9.85E-03	4.01E-04
Mitochondrial Beta-Oxidation of Short Chain Saturated Fatty Acids	27	10	49.48	1.72E-04	9.85E-03	4.01E-04

Apéndice C

Reconstrucción metabólica

Tabla C-1: Representación de la reconstrucción metabólica

Reaction	abbreviation	pathway	KEGG_reaction	KEGG_enzyme
13dpg \rightleftharpoons 23dpg	BPGM	Glycolysis	R01662	5.4.2.4
23dpg \rightarrow 3pg + pi	BPGM	Glycolysis	R01516	3.1.3.13
2pg \rightleftharpoons pep	ENO	Glycolysis	R00658	4.2.1.11
fdp \rightleftharpoons dhap + g3p	FBA	Glycolysis	R01068	4.1.2.13
g3p + nad + pi \rightleftharpoons 13dpg + nadh	GAPDH	Glycolysis	R01061	1.2.1.12
atp + f6p \rightarrow adp + fdp	PFK	Glycolysis	R00756	2.7.1.11
g6p \rightleftharpoons f6p	PGI	Glycolysis	R00771	5.3.1.9
13dpg \rightarrow pi + 3pg	ACYP	Glycolysis	R01515	3.6.1.7
3pg + atp \rightleftharpoons 13dpg + adp	PGK	Glycolysis	R01512	2.7.2.3
2pg \rightleftharpoons 3pg	PGM	Glycolysis	R01518	5.4.2.11
g1p \rightleftharpoons g6p	PGMT	Glycolysis	R08639	5.4.2.2
adp + pep \rightarrow atp + pyr	PYK	Glycolysis	R00200	2.7.1.40
dhap \rightleftharpoons g3p	TPI	Glycolysis	R01015	5.3.1.1
nad + lac-L \rightleftharpoons nadh + pyr	LDH	Glycolysis	R00703	1.1.1.27
g6p + nadp \rightleftharpoons 6pgl + nadph	G6PD	Pentose phosphate	R00835	1.1.1.49

Table C-1 continued from previous page

Reaction	Name	pathway	KEGG_reaction	KEGG_enzyme
nadp + 6pgc <=>nadph + ru5p-D	PGD	Pentose phosphate	R01528	1.1.1.44
6pgl ->6pgc	PGL	Pentose phosphate	R02035	3.1.1.31
r1p <=>r5p	PPM	Pentose phosphate	R01057	5.4.2.2
atp + r5p <=>amp + prpp	PRPS	Pentose phosphate	R01049	2.7.6.1
ru5p-D <=>xu5p-D	RPE	Pentose phosphate	R01529	5.1.3.1
r5p <=>ru5p-D	RPI	Pentose phosphate	R01056	5.3.1.6
g3p + s7p <=>f6p + e4p	TALDO	Pentose phosphate	R08575	2.2.1.2
r5p + xu5p-D <=>g3p + s7p	TKT	Pentose phosphate	R01641	2.2.1.1
xu5p-D + e4p <=>f6p + g3p	TKT	Pentose phosphate	R01067	2.2.1.1
cit <=>icit	ACO	TCA cycle	R01324	4.2.1.3
oaa + accoa ->cit	Csm	TCA cycle	R00351	2.3.3.1
fum <=>mal-L	FH	TCA cycle	R01082	4.2.1.2
nad + icit <=>nadh + akc	ICDH3	TCA cycle	R00709	1.1.1.41
icit + nadp <=>akc + nadph	ICDH1	TCA cycle	R00267	1.1.1.42
nad + mal-L <=>nadh + oaa	MDH	TCA cycle	R00342	1.1.1.37
succ <=>fum	SDH	TCA cycle	R02164	1.3.5.1
succ + atp + nadh <=>akc + nad + adp + pi	SUCL +OGDH	TCA cycle	R00405	6.2.1.4
succ + gtp + nadh <=>akc + nad + gdp + pi	SUCL +OGDH	TCA cycle	R00432	6.2.1.5
mal-L + nad <=>pyr + nadh	ME1	TCA cycle	R00214	1.1.1.38
mal-L + nadp <=>pyr + nadph	ME2	TCA cycle	R00216	1.1.1.40
oaa + gtp <=>pep + gdp	PCK	TCA cycle	R00431	4.1.1.32
pyr + atp ->oaa + adp + pi	PC	TCA cycle	R00344	6.4.1.1
glu + nad <=>akc + nadh	GLUDx	TCA cycle	R00243	1.4.1.3

Table C-1 continued from previous page

Reaction	Name	pathway	KEGG_reaction	KEGG_enzyme
glu + nadp <=>akg + nadph	GLUDy	TCA cycle	R00248	1.4.1.3
pi + adp ->atp	HA	Oxidative Phosphorylation	R00086	3.6.3.14
nadh ->nad	ND	Oxidative Phosphorylation	R02163	1.6.5.3
2*gthrd ->gthox	GPX	Gluthatione metabolism	R00274	1.11.1.9
gthox + nadph ->2*gthrd + nadp	GTHO	Gluthatione metabolism	R00115	1.8.1.7
->g1p	EX_g1p	Exchange		
<=>gln	EX_gln	Exchange		
<=>nadp	EX_nadp	Exchange		
<=>nadph	EX_nadph	Exchange		
->adp	EX_adp	Exchange		
<=>amp	EX_amp	Exchange		
nad ->	EX_nad	Exchange		
->nadh	EX_nadh	Exchange		
<=>pi	EX_pi	Exchange		
<=>gdp	EX_gdp	Exchange		
<=>gtp	EX_gtp	Exchange		
<=>gthrd	EX_gthrd	Exchange		
atp ->	EX_atp	Exchange		
lac-L <=>	EX_lac	Exchange		
<=>glc-D	EX_glc	Exchange		
<=>arg-L	EX_arg-L	Exchange		
<=>rbl-D	EX_rbl-D	Exchange		
<=>urea	EX_urea	Exchange		
<=>creat	EX_creat	Exchange		
<=>pro-L	EX_pro-L	Exchange		
<=>orn	EX_orn	Exchange		
<=>4abut	EX_4abut	Exchange		
<=>cys-L	EX_cys-L	Exchange		
<=>acgam6p	EX_acgam6p	Exchange		
<=>glu	EX_glu	Exchange		

Table C-1 continued from previous page

Reaction	Name	pathway	KEGG_reaction	KEGG_enzyme
atp + glc-D ->adp + g6p	HEX1	Glycolysis	R00299	2.7.1.1
nad + pyr ->nadh + accoa	PDH	Glycolysis	R00209	1.2.4.1
g6p ->glc-D + pi	G6PPer	Glycolysis	R00303	3.1.3.9
atp + rbl-D ->adp + ru5p-D	RBK_D	Pentose phosphate		2.7.1.47
atp + rib-D <=>adp + r5p	RBK	Pentose phosphate	R01051	2.7.1.15
rib-D + nadh <=>rbt + nad	RBT	Pentose phosphate		
atp + glyc-R ->2pg + adp	GLYCK2	Glycolysis	R08572	2.7.1.31
atp + glyc-R ->3pg + adp	GLYPT	Aminoacid Metabolism	R01514	2.7.1.31
3pg + nad <=>3php + nadh	PGCD	Aminoacid Metabolism	R01513	1.1.1.95
3php + glu ->akg + pser-L	PSERT	Aminoacid Metabolism	R04173	2.6.1.52
pser-L ->pi + ser-L	PSP_L	Aminoacid Metabolism	R00582	3.1.3.3
ser-L <=>gly	GHMT2r	Aminoacid Metabolism	R00945	2.1.2.1
ser-L ->pyr	SERD_L	Aminoacid Metabolism	R00220	4.3.1.17
pyr + ser-L + nadph ->ala-L + glyc-R + nadp	SPTix +HPYRRy	Aminoacid Metabolism	R00585	2.6.1.51
arg-L + gly <=>gudac + orn	GLYAMDTRc	Aminoacid Metabolism	R00565	2.1.4.1
amet + gudac <=>ahcys + creat	GACMTRc	Aminoacid Metabolism	R01883	2.1.1.2
arg-L ->orn + urea	ARGN	Aminoacid Metabolism	R00551	3.5.3.1
akg + ala-L <=>glu + pyr	ALATA_L	Aminoacid Metabolism	R00258	2.6.1.2
akg + orn <=>glu + glu5sa	ORNTArm	Aminoacid Metabolism	R00667	2.6.1.13
nadh + glu <=>glu5sa + nad	G5SAor	Aminoacid Metabolism	R00245	1.5.1.12
nadph + atp + glu ->glu5sa + adp + nadp	GLU5Km +G5SDm	Aminoacid Metabolism	R03313	1.2.1.41
glu5sa + nadh ->pro-L + nad	P5CR	Aminoacid Metabolism	R01251	1.5.1.12
glu5sa + nadph ->pro-L + nadp	P5CRx	Aminoacid Metabolism	R01251	1.5.1.12

Table C-1 continued from previous page

Reaction	Name	pathway	KEGG_reaction	KEGG_enzyme
nad + pro-L ->glu5sa + nadh	PRO1x	Aminoacid Metabolism	R01248	1.5.1.2
arg-L ->agm	ARGDCm	Aminoacid Metabolism	R00566	4.1.1.19
orn ->ptrc	ORNDC	Aminoacid Metabolism	R00670	4.1.1.17
agm ->ptrc + urea	AGMTm	Aminoacid Metabolism	R01157	3.5.3.11
ptrc + nad ->4abut + nadh	PTRCOX1 +ABUTD	Aminoacid Metabolism	R01992	1.2.1.19
4abut + akglu <=>glu + succ	ABTArm	Aminoacid Metabolism		2.6.1.19
pro-L + nad + nadp + 2*akglu ->succ + glu + pyr + nadh + nadph	POX +OTHER	Aminoacid Metabolism	R01252	
akglu + asp-L <=>glu + oaa	ASPTA	Aminoacid Metabolism	R00355	2.6.1.1
asp-L ->fum	ASPFUM	Aminoacid Metabolism		4.3.1.1
atp + glu ->adp + gln + pi	GLNS	Aminoacid Metabolism	R00253	6.3.1.2
gln ->glu	GLUNm	Aminoacid Metabolism	R00256	3.5.1.2
asp-L + atp + gln ->amp + asn-L + glu + ppi	ASNS1	Aminoacid Metabolism	R00578	6.3.5.4
5oxpro + atp ->adp + glu + pi	OPAHir	Gluthatione metabolism	R00251	3.5.2.9
atp + cys-L + glu ->adp + glucys + pi	GLUCYS	Gluthatione metabolism	R00894	6.3.2.2
atp + glucys + gly ->adp + gthrd + pi	GTHS	Gluthatione metabolism	R00497	6.3.2.3
glucys ->5oxpro + cys-L	GLC5C	Gluthatione metabolism	R02743	2.3.2.4
gthrd ->cgly + glu	DESGTH	Gluthatione metabolism	R00494	2.3.2.2
cgly ->cys-L + gly	AMPTASECG	Gluthatione metabolism	R00899	3.4.11.1
gln + f6p ->glu + gam6p	GF6PTA	Aminosugar metabolism	R00820	2.6.1.16
gam6p ->f6p	G6PDA	Aminosugar metabolism	R00765	3.5.99.6
accoa + gam6p ->acgam6p	ACGAM6PSi	Aminosugar metabolism		2.3.1.4
acgam6p ->gam6p	AGDC	Aminosugar metabolism	R02059	3.5.1.25

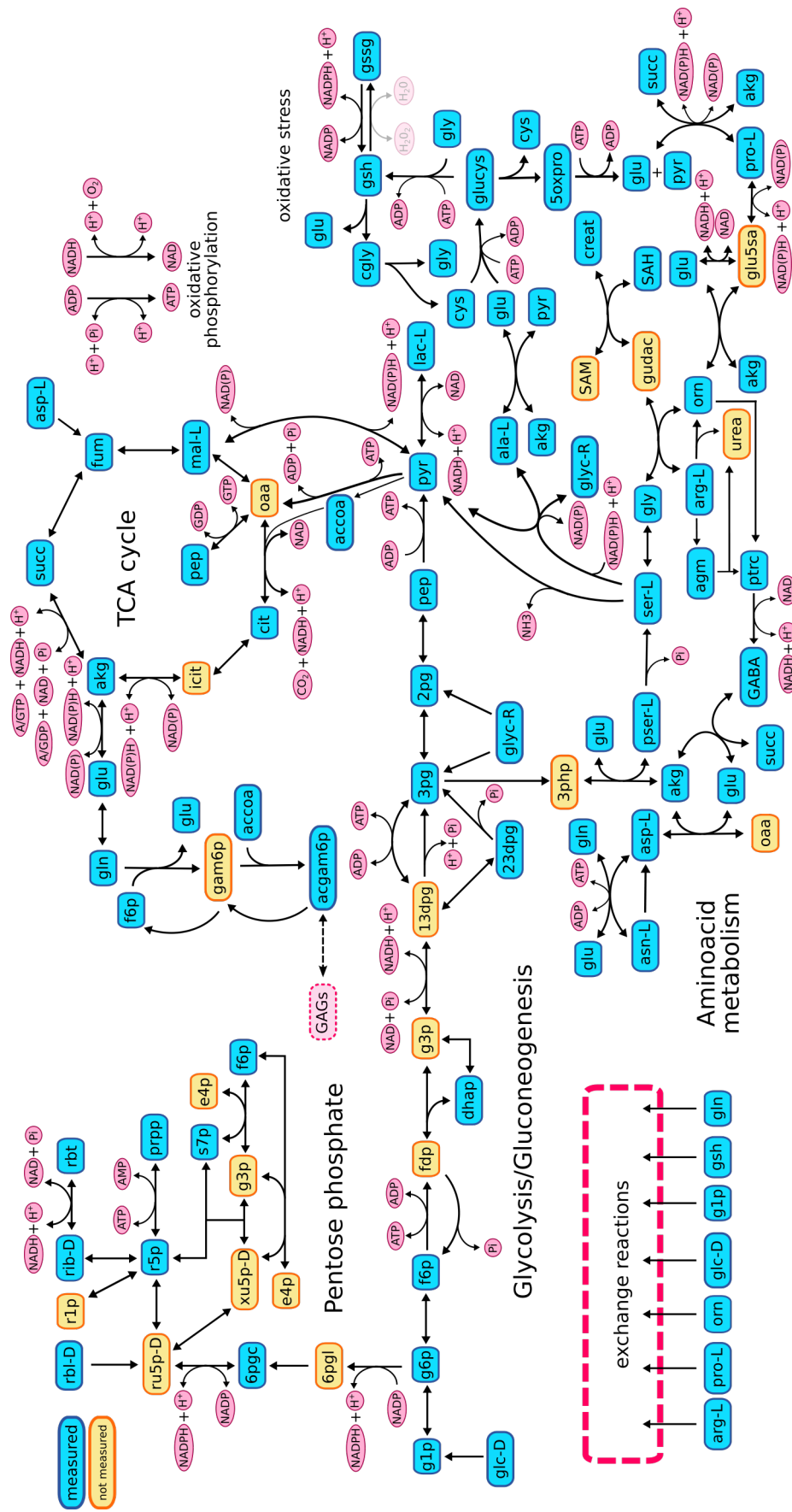


Figura C-1: Reconstrucción metabólica

Apéndice D

Resultados de Dycone

Las tablas completas con los resultados de Dycone pueden ser encontradas en el material suplementario del artículo donde se publicaron los resultados [Matadamas-Guzman *et al.*, 2020], así como en el repositorio del código github.com/Meztlimg/EMTanalysis.

Podrán encontrar una copia del artículo en la parte de producción científica al final de la tesis o accedando a <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01309>

Apéndice E

Ensayo de Herida

Tabla E-1: Porcentaje cierre de herida a 8 días de inducir la EMT

Time	A549_SIN	A549_CON	dKO_SIN	dKO_CON
0	0	0	0	0
24	4.615278179	7.182155008	6.721573574	8.168226998
30	5.647219798	8.718022561	6.429009526	13.54549286
36	6.845587288	12.72339746	8.622941799	16.2333615
48	7.802285127	15.1668696	11.65663043	16.49741628

Tabla E-2: Porcentaje cierre de herida a 21 días de inducir la EMT

Time	A549_SIN	A549_CON	dKO_SIN	dKO_CON
0	0	0	0	0
24	13.42964736	16.35277543	22.3237142	23.68070759
30	15.45166288	16.74769126	23.69329743	30.79527954
36	20.64779563	24.11930344	30.68776908	33.92260613
48	23.69184475	30.27374603	34.96639988	40.8297155

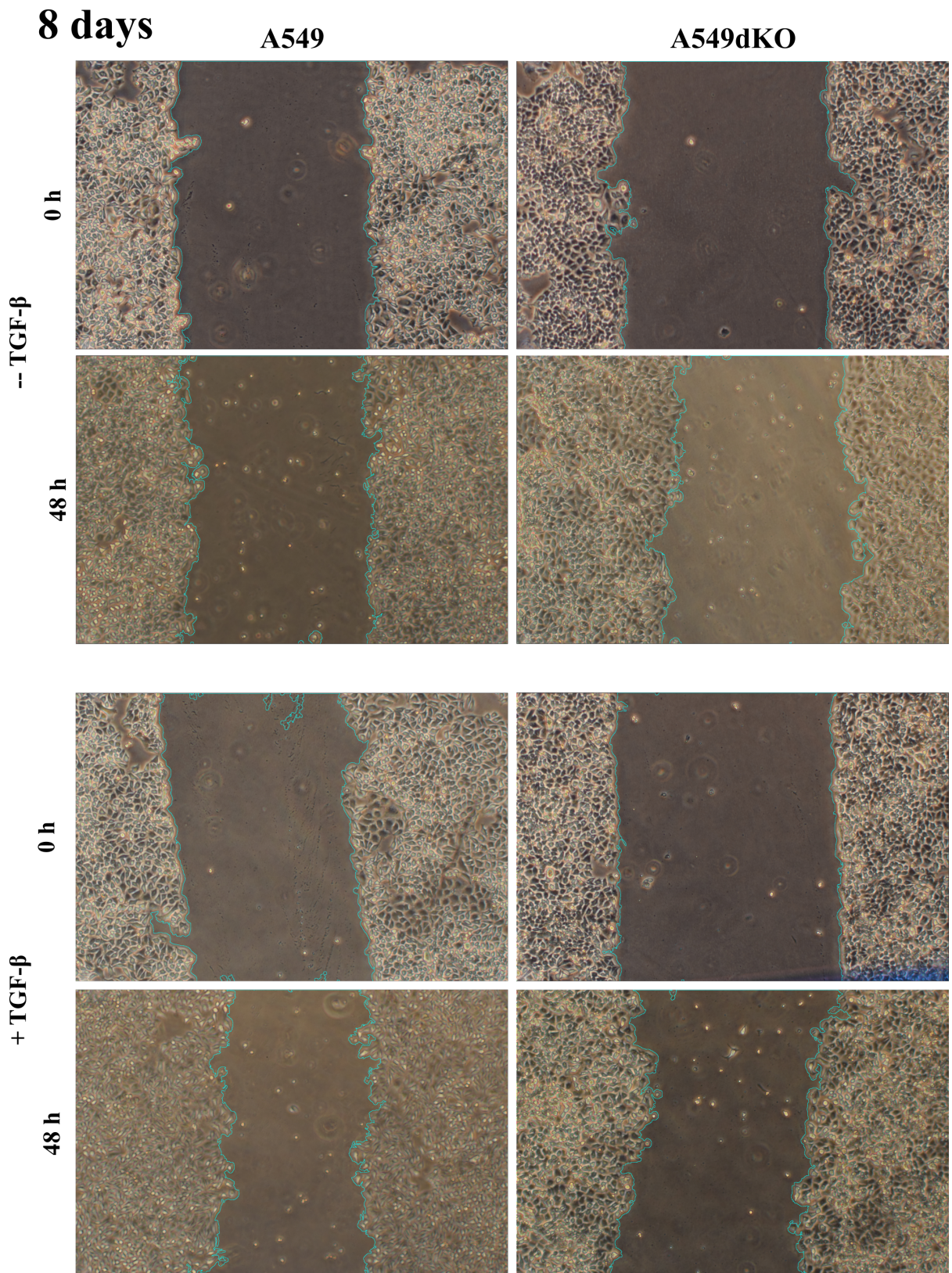


Figura E-1: Ensayo de Herida a 8 días de la inducción de la EMT

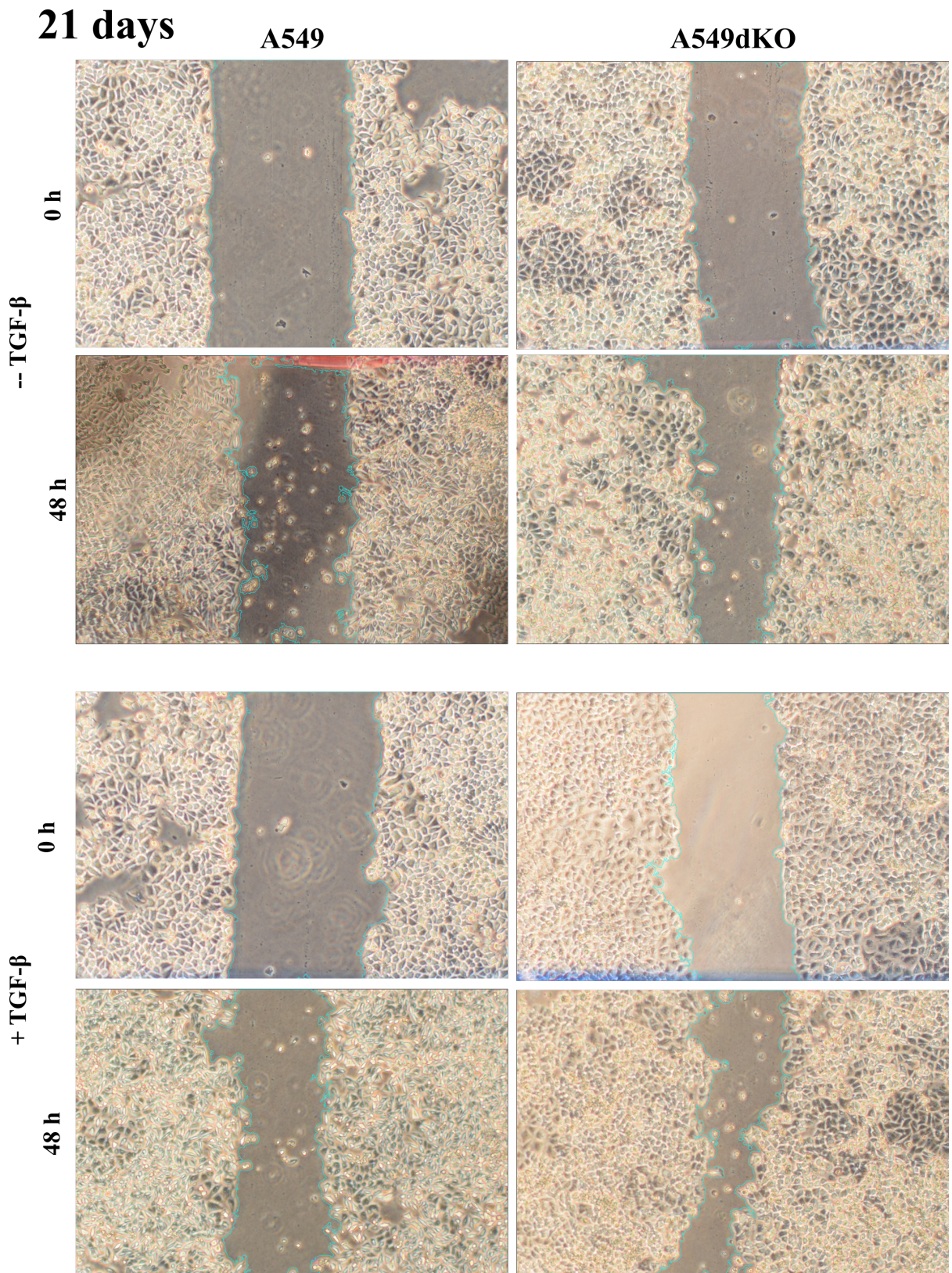


Figura E-2: Ensayo de Herida a 21 días de la inducción de la EMT

Producción científica



Analysis of Epithelial-Mesenchymal Transition Metabolism Identifies Possible Cancer Biomarkers Useful in Diverse Genetic Backgrounds

Meztlí Matadamas-Guzman^{1,2}, Cecilia Zazueta³, Emilio Rojas⁴ and Osbaldo Resendis-Antonio^{2,5*}

¹ Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, Mexico City, Mexico, ² Human Systems Biology Lab, National Institute of Genomic Medicine, Mexico City, Mexico, ³ Departamento de Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología-Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico, ⁴ Department of Genomic Medicine and Environmental Toxicology, Institute of Biomedical Research, UNAM, Mexico City, Mexico, ⁵ Coordinación de la Investigación Científica—Red de Apoyo a la Investigación, UNAM, Mexico City, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Lorena Pochini,
University of Calabria, Italy

Reviewed by:

Jun Yan,
University of Louisville, United States
Marco Sciacovelli,
University of Cambridge,
United Kingdom

*Correspondence:

Osbaldo Resendis-Antonio
oresendis@inmegen.gob.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Cellular Oncology,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 23 April 2020

Accepted: 23 June 2020

Published: 30 July 2020

Citation:

Matadamas-Guzman M, Zazueta C,
Rojas E and Resendis-Antonio O
(2020) Analysis of
Epithelial-Mesenchymal Transition
Metabolism Identifies Possible Cancer
Biomarkers Useful in Diverse Genetic
Backgrounds. *Front. Oncol.* 10:1309.
doi: 10.3389/fonc.2020.01309

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) relates to many molecular and cellular alterations that occur when epithelial cells undergo a switch in differentiation generating mesenchymal-like cells with newly acquired migratory and invasive properties. In cancer cells, EMT leads to drug resistance and metastasis. Moreover, differences in genetic backgrounds, even between patients with the same type of cancer, also determine resistance to some treatments. Metabolic rewiring is essential to induce EMT, hence it is important to identify key metabolic elements for this process, which can be later used to treat cancer cells with different genetic backgrounds. Here we used a mathematical modeling approach to determine which are the metabolic reactions altered after induction of EMT, based on metabolomic and transcriptional data of three non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines. The model suggested that the most affected pathways were the Krebs cycle, amino acid metabolism, and glutathione metabolism. However, glutathione metabolism had many alterations either on the metabolic reactions or at the transcriptional level in the three cell lines. We identified Glutamate-cysteine ligase (GCL), a key enzyme of glutathione synthesis, as an important common feature that is dysregulated after EMT. Analyzing survival data of men with lung cancer, we observed that patients with mutations in GCL catalytic subunit (GCLC) or Glutathione peroxidase 1 (GPX1) genes survived less time than people without mutations on these genes. Besides, patients with low expression of ANPEP, GPX3 and GLS genes also survived less time than those with high expression. Hence, we propose that glutathione metabolism and glutathione itself could be good targets to delay or potentially prevent EMT induction in NSCLC cell lines.

Keywords: metabolism, EMT, glutathione, mathematical model, biomarker

INTRODUCTION

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a natural cellular phenomenon that converts epithelial cells to mesenchymal-like, giving them motile, and invasive properties (1). This process induces changes at different cellular levels, such as morphology (loss of apical-basal polarity), surface markers (cadherins), cytoskeleton (production of vimentin), transcriptional factors (Twist, Snail), miRNAs (miR-200), and metabolic pathways, among others (2, 3). EMT is a natural phenomenon that occurs in embryogenesis, wound healing, and some diseases like fibrosis and cancer. In cancer, EMT contributes to tumor cell survival, migration, invasion, and therapy resistance. Although EMT is a general phenomenon among many cancers, the cellular context and genetic background determine how this process is carried out (4). Furthermore, metabolic rewiring is essential for the induction of EMT (1, 5, 6). However, only specific enzymes and metabolites have been recognized as necessary for EMT induction (3, 5, 6), and most of them in specific genetic backgrounds and conditions.

Constraint-based modeling integrates a set of algorithms that combine computational modeling of genome-scale metabolic reconstruction with omic data to differentiate and predict metabolic alterations in biological systems (5). Among these computational tools, flux balance analysis (FBA) has been proven to be a powerful approach to explore and design metabolic phenotypes that range from the human microbiome to tissue-specific cancer cells (7, 8). Despite this approach has served as a guide to understand and design metabolic phenotypes, FBA does not correlate metabolites concentrations with metabolic fluxes. More specifically, under the steady-state situation, the null space of the stoichiometric matrix supplies with the available space of metabolic fluxes, leaving outside the metabolome profiles associated with a physiological state. To overcome this limitation, there have been suggested a variety of formalisms with capacities to move from the steady-state condition and explore the association between the concentration of metabolites and the phenotype state of the network. Among these formalisms, Dycone is a useful tool to infer relative changes in the enzyme regulation between two physiological conditions. It begins with a metabolic reconstruction and the concentrations of the metabolites in two conditions (9, 10). Unlike other approaches, Dycone does not assume specific kinetic parameters but calculates the space of all feasible kinetic constants (called k-cone) that mathematically ensure the measured concentrations of metabolites. Thus, the comparison between two kinetic spaces allows us to identify metabolic reactions whose activity potentially differentiates between conditions. Subsequently, the results could be connected to other omic data, such as genome or proteome.

In this paper, we analyzed the metabolic alterations in metabolism that follow EMT induction. Our study used Dycone to predict alterations in enzyme activity during EMT in three non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines (A549, HCC827, NCI-H358), using available metabolome data (11). These cell lines have different genetic backgrounds, hence we aimed to

identify the metabolic similarities among them. Glutathione metabolism was one of the most affected pathways in all of the cell lines, according to the model. Furthermore, using microarray data we identified an alteration in the expression of genes involved in glutathione metabolism. These results suggested that glutathione metabolism plays an important role during EMT, thus we looked for survival data of lung cancer patients to observe the significance of these genes. Survival data from male patients with lung cancer showed that mutations in GCLC, and GPX2, key genes in glutathione metabolism, contribute to a bad prognosis. Additionally, the high expression of GPX2 and the low expression of ANPEP, and GPX3 also reduced the survival time of men with lung cancer. Based on these findings, we proposed GCLC, glutathione peroxidases, and glutathione as possible targets to regulate EMT in non-small cell lung cancer.

MATERIALS AND METHODS

Microarray and metabolome data was obtained from Sun et al. (11). All code used for analysis is available upon request. All data was significant when *p*-value was lower than 0.05 and log fold change > 1, unless otherwise indicated.

Microarray and Metabolome Data Analysis

Metabolome and microarray data was analyzed with R 3.5.3. Metabolites concentrations were converted to log scale and compared using a *t*-test.

Microarray data was normalized using the R package *fRMA* from Bioconductor and analyzed with the R *limma* package, unless otherwise indicated data was considered significant with a *p*-value lower than 0.05 and absolute fold change higher than 1. Code is available upon request.

Enrichment Analysis

Enrichment analysis for metabolome data was done in MSEA web platform with the concentration table of each of the cell lines (A549, HCC827 and NCI-H358) (12, 13). The data was normalized by the median, log transformed, and scaled by mean-centered algorithm. We used “Enrichment analysis” to find enriched pathways, using Pathway-associated metabolite sets (SMPDB). We considered only the pathways with Holm *P* value below 0.05 and FDR below 0.05. We intersected the results of the three cell lines and identified those that were enriched in the three pathways.

Network Reconstruction

To investigate the metabolic reprogramming before and after EMT in a system-level approach, we have constructed a medium-size but essential metabolic network (**Supplementary Figure 2**), which includes 74 metabolites and 112 reactions that represent our cell lines. The metabolic reactions were selected according to the following criteria:

1. Reactions had to be included in enriched metabolic pathways.
2. Reactions which had concentrations measured for substrates, products, or both.

- Reactions that connected the network and are not isolated from others.
- Reactions important to complete gaps even though substrates or products are not in data.
- Finally, adjacent reactions where intermediates did not have measured concentrations were joined in a single reaction.

Computational Modeling of k -cone Space

In order to identify the set of reactions that potentially change their metabolic activity in EMT, we analyzed metabolic data as in Diener et al. (10), using the R package Dycone (<https://github.com/cdiener/dycone>) (9, 10). Briefly, the algorithm assumes that all the metabolic reactions in reconstruction obey the law-mass action, and the system has reached a steady-state condition. Under these constraints, the feasible space of metabolic phenotypes before and after the EMT can be obtained through the null-space if the equation

$$S \cdot M \cdot k = 0 \quad (1)$$

where S indicates the stoichiometric matrix and M is a diagonal matrix whose entries are defined by

$$M_i(x) = \prod_j x_j^{S_{ji}} \quad (2)$$

Here, x_j denotes the j -esime metabolite concentrations as k represents a vector containing all the kinetic parameter associated with each metabolic reaction. Taking into account the set of metabolites obtained before and after the EMT, we substitute these metabolome profiles separately on equation 2 for then obtain the null-space of equation 1 by independently. After this step, differential metabolic activity in EMT was obtained by comparing the null-spaces associated with before and after the EMT as described in (10). This analysis was performed with R version 3.5.3 as in the original paper with dycone package. All code used for analysis is available at <https://github.com/Meztlimg/EMTanalysis>.

Survival Analysis

Genomic Data Commons Data Portal was used for the survival analysis of patients with mutations (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). We used the portal to search survival data from male patients with bronchus and lung cancer as a primary site. We compared two cohorts of patients, the first patients with mutations in genes of interest and the second patients without mutations on these genes. Cumulative survival time was calculated by the Kaplan–Meier method and analyzed by log-rank testing. Survival analysis of patients with different expression levels was obtained from Kaplan Meier plotter (14). We used only male lung cancer patients. Cumulative survival time was calculated by the Kaplan–Meier method and analyzed by Cox univariate analysis. All analyses were performed at a significance level of 95% ($p < 0.05$).

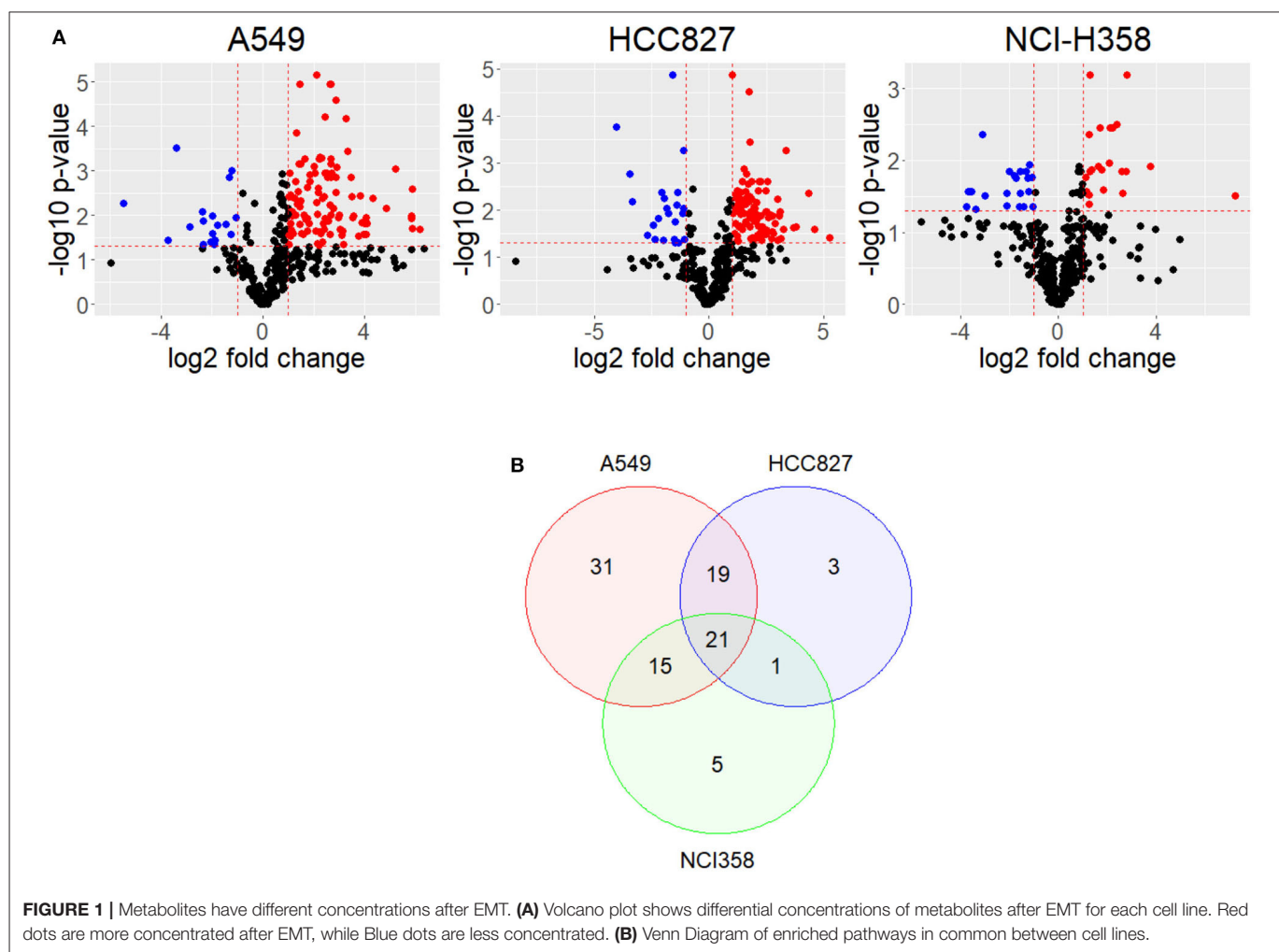
RESULTS

Different NSCLC Cell Lines Have Similarities in Metabolic Rewiring After EMT

Upon EMT activation, cellular metabolism rewires to fulfill the new requirements of the cell (15–17). Alterations in the metabolome profile reflect how metabolism changes after a cellular process; therefore, we compared metabolomic public data of cell lines before and after EMT induction (11). This data comprises metabolome profiles from three different non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines (A549, HCC827, and NCI-H358) with different genetic backgrounds. A549 and NCI-H358 have mutations in KRAS, HCC827 has mutations in EGFR. To find key EMT features, we compared the three cell lines data and found their similarities. First, we calculated the log-fold change and identified the metabolites that significantly changed their concentration before and after EMT induction, for each cell line (**Figure 1A**). The metabolic profile associated with EMT does not present common patterns between cell lines. The analysis showed only six metabolites altered after EMT among the cell lines (**Supplementary Figure 1**). Despite EMT being experimentally triggered with TGF- β in all the cell lines, we found a lot of differences in metabolic concentration profiles. Presumably, these differences can emerge as a consequence of the variations in the genetic background of each cell line. Hence, we looked for a core of pathways that changed the three NSCLC cell lines. We performed an enrichment analysis of each of the cell lines before and after EMT using metabolomic data, and then compared the results. In summary, our study allowed us to conclude that 21 pathways had similar differences in all three cell lines after induction of EMT (**Figure 1B** and **Supplementary Tables 1–3**). We identified some pathways related to amino acids metabolism, such as alanine, glycine, serine, and glutamate, among others, according to other studies (11, 15, 17, 18). Furthermore, we discovered that additional pathways such as Fatty Acid metabolism, Citric Acid Cycle, and glutathione metabolism also changed after EMT (**Supplementary Table 13**). We noticed that A549 is the cell line with the highest number of altered pathways characterizing the EMT respect to other cell lines, and simultaneously it contains most of the metabolic pathways enriched in NCI-H358 and HCC827 (**Figure 1B**). We concluded that EMT is accompanied by two types of metabolic rewiring, the first defined by a core of metabolic transformations common for different cell lines, and others characterizing cell type and its particular genetic context.

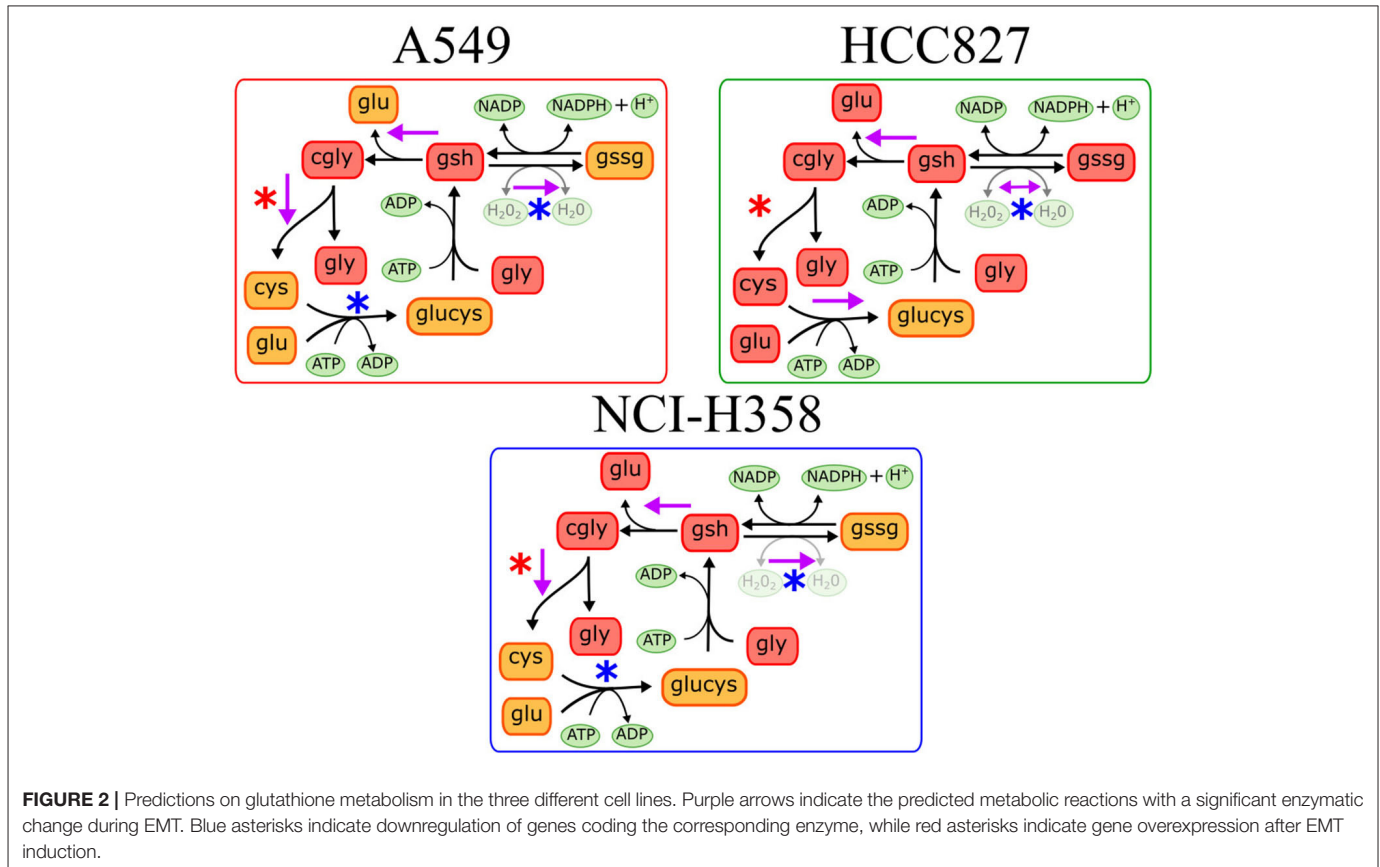
Metabolic Reconstruction Identified Specific Reactions Altered After EMT

We found different metabolic pathways enriched with alterations on metabolite concentrations, however, it is difficult to locate which reactions or mechanisms are underlying the metabolic rewiring in EMT. Identifying these enzymatic alterations and control reactions during EMT is a valuable task given their implication in targeted drug design against metastasis. To this



end, constraint-based modeling has shown to be a proper paradigm in systems biology to find metabolic targets in cancer (5, 9, 19). In order to identify the critical reactions changing the concentrations of metabolites during EMT, we reconstructed a network to represent the main reactions affected in the three cell lines, based on the enrichment analysis. During the reconstruction, we only consider those reactions that had metabolites measured in the metabolomic data, and those which were connected to the rest of the network (Materials and Methods). Overall, our reconstruction had 112 reactions and 74 metabolites that included glycolysis, TCA cycle, amino acid metabolism, pentose phosphate, and glutathione metabolism (**Supplementary Figure 2**). The absence of some metabolites concentrations impeded the addition of the rest of the enriched pathways. Mathematical representation of this reconstruction was our cornerstone to explore the metabolic capacities that support the phenotype underlying EMT, through a myriad of computational methods included in constraint-based modeling (8, 20). Among this set of available methods, Dycone is a computational approach that allowed us to identify enzymatic alterations in metabolic networks between two physiological conditions starting from their respective metabolomic profiles

(10). Briefly, combining a metabolic reconstruction with the profiles of metabolites in two different conditions, Dycone allowed us to identify and postulate the changes on the metabolic activity before EMT and after EMT (**Supplementary Figure 3**). The model predicted that diverse reactions changed after EMT in each cell line, however, we focused on those sets of reactions that changed in the three NSCLC cell lines (**Supplementary Tables 6–8**). For example, the model predicted that glutaminase (GLS) reaction, which catalyzes the conversion of the amino acid glutamine to glutamate, changed in all the cell lines. In agreement, other studies have reported this enzyme as an essential metabolic feature of EMT in breast and lung cancer (11, 21). Furthermore, our model also predicted the alteration of glutathione metabolism in all of the three cell lines. Specifically, glutathione oxidation, reduction, and degradation changed in all the cell lines, whereas glutathione synthesis only in HCC827 (**Figure 2**). These results agree with other studies reporting glutathione peroxidases and other enzymes related to glutathione metabolism as critical players during EMT in different types of cancer, such as melanoma, cervical, hepatocellular, gastric and pancreatic cancer (18, 22–26).

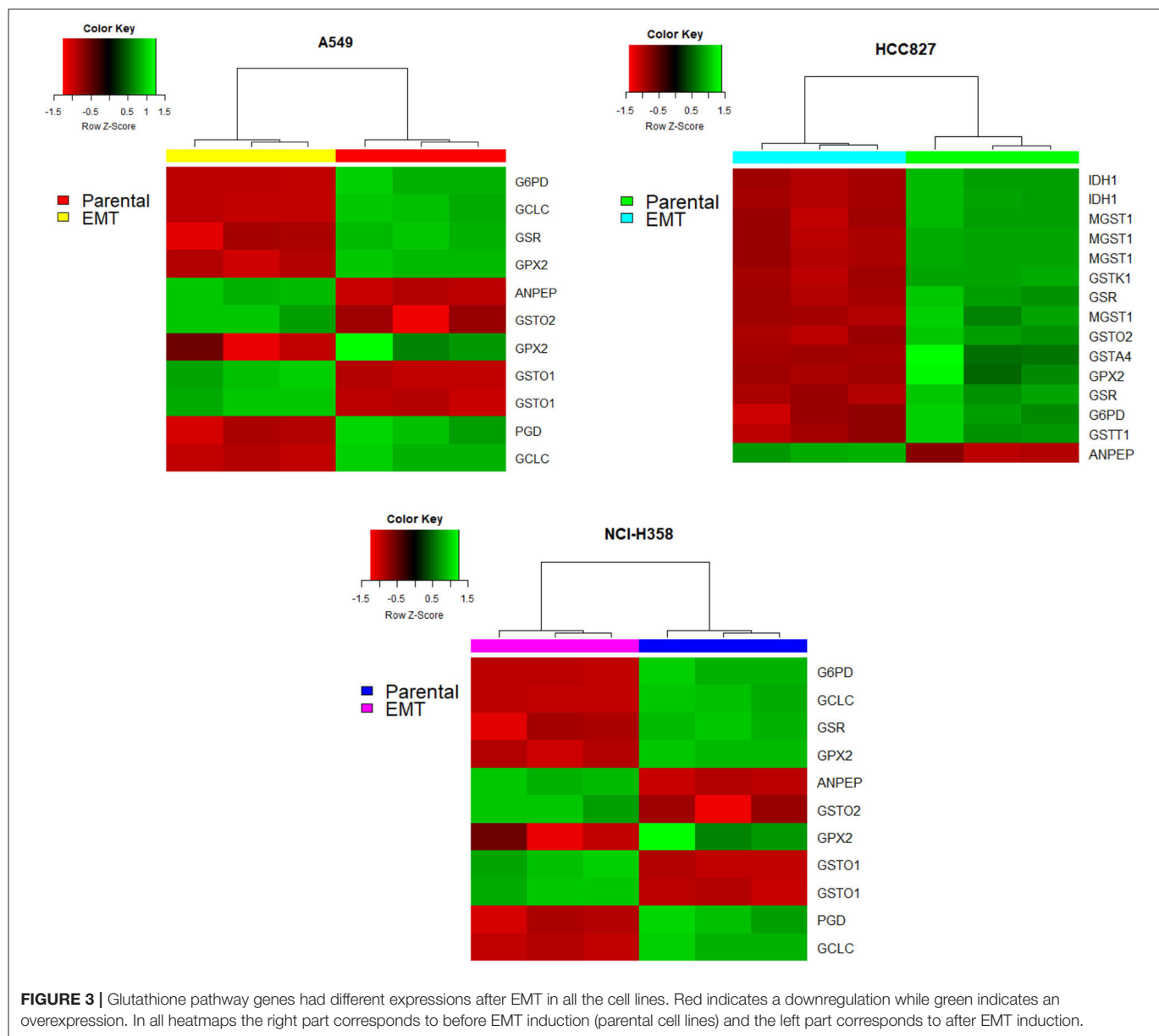


EMT Alters the Expression of Metabolic Genes in the Three Cell Lines

Integrating transcriptional data with our model may lead us to a better understanding of the metabolic mechanisms involved in EMT. To get an insight into the role of glutaminase and glutathione metabolism in the EMT, we analyzed the expression of genes that code enzymes involved in these reactions. This data came from the same study as the metabolomic data, letting us relate easily the model predictions with the expression analysis. Glutaminase, the rate-limiting enzyme of glutamine to glutamate, is coded by *GLS* and *GLS2* genes in humans. *GLS* was upregulated after EMT in A549 and NCI-H358, while *GLS2* was downregulated after EMT in HCC827 (**Supplementary Figure 4**). These differences could be because the cell lines have different genetic backgrounds that could affect the basal expression and regulation of these genes. As we know, each genetic background determines how each EMT-TF promotes distinct metabolic alterations (18). Nonetheless, EMT suppresses the *GLS2* gene in breast cancer, promoting glutamine independence, less mitochondrial activity, high metastasis, and low survival to patients (21). This could also explain the accumulation of glutamine in all the cell lines after EMT. However, the expression of *GLS* is necessary for the induction of EMT in breast and colorectal cell lines (27, 28). Hence, both changes in expression in the

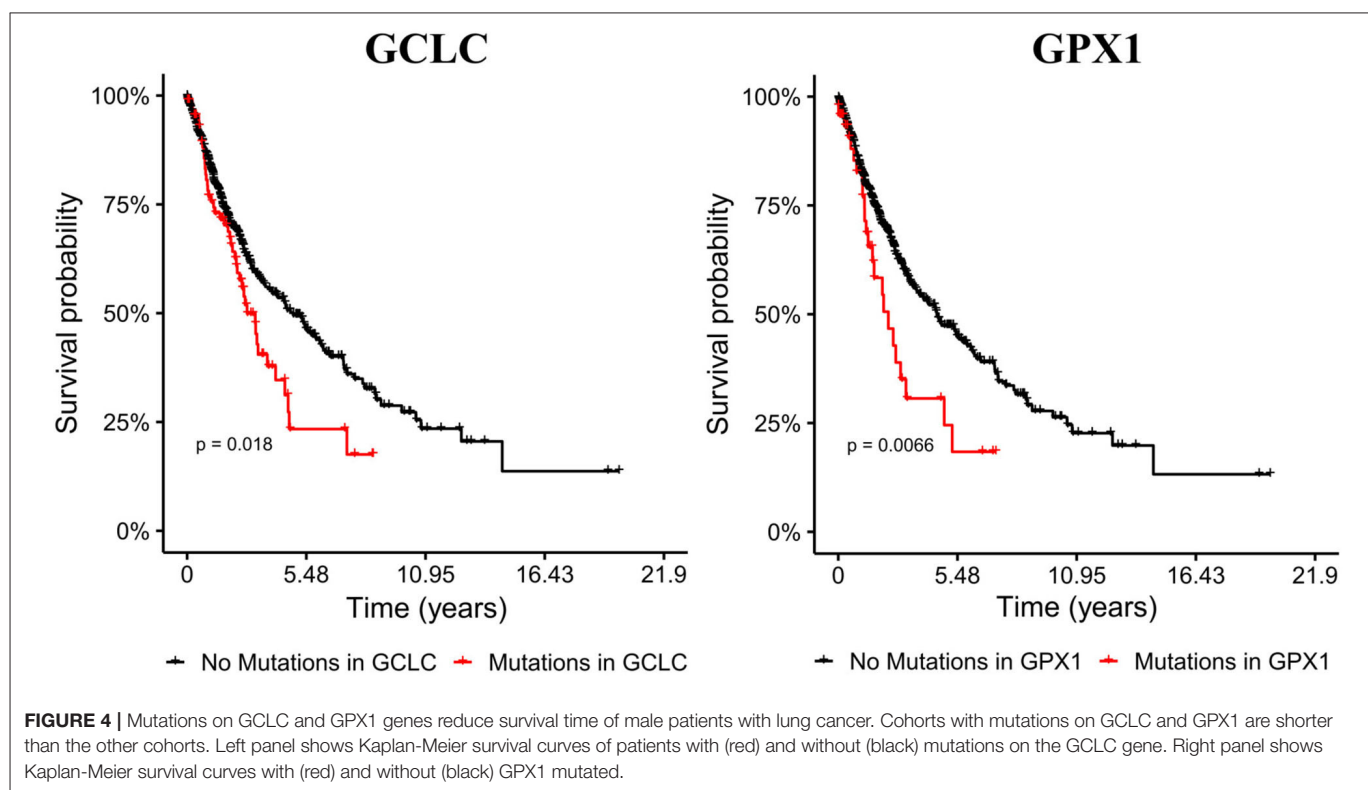
different cell lines are logical, as we were observing the effects after the EMT, and we could not decipher the order of the events with this data. Besides, NSCLC cell lines have been reported as sensitive to *GLS* inhibitors after EMT, confirming the importance of this reaction in this phenomenon (29). In conclusion, as either our model and gene expression analysis matched identifying an alteration in this reaction, we propose that the regulation of glutaminase reaction is highly important in EMT.

On the other hand, glutathione metabolism has three stages, synthesis, degradation, and glutathione oxidation/reduction to process ROS. Our model predicted that this pathway changed in different ways among the three NSCLC cell lines. The predictions indicated that EMT affects glutathione degradation in all of the cell lines, while glutathione synthesis changed only in A549. Consequently, we analyzed the expression of genes belonging to this pathway in the three NSCLC cell lines. We found a downregulation of Glutathione peroxidase 2 (*GPX2*) and Glutathione reductase (*GSR*), plus an upregulation of Alanyl Aminopeptidase (*ANPEP*) after EMT in the three cell lines (**Figure 3**). *GPX* and *GSR* detoxify the cells using glutathione to metabolize hydrogen peroxide, whereas, *ANPEP* catalyzes the last step of degradation of glutathione. Several studies have described that *GPX* genes are critical for EMT, either preventing or enhancing it (23–25). Specifically, *GPX2*



downregulation is contrasting because it has been reported as a regulator of EMT markers, enhancing invasion, and metastasis targeting the Wnt pathway in cervical and pancreatic cancer (26, 30). Nevertheless, NSCLC cells usually have an aberrant Wnt pathway, explaining why this could be different in these cells (31). Moreover, glutathione reduction has also been reported as a key player in the induction of EMT lowering oxidative stress and enhancing metastasis in murine melanoma cells (32), although our cells showed a downregulation of GSR gene. This could be specific for murine animals, or because in our case, TGF- β induced EMT and elicits other specific mechanisms to regulate oxidative stress. Moreover, glutathione biosynthesis is also important on glutathione metabolism, and it has been described as a critical process during EMT induction in different epithelial cell lines (33–36). Glutamate-cysteine

ligase (GCL) is the first rate-limiting enzyme of glutathione synthesis. GCL has two subunits, the catalytic and the modifier subunits, coded by GCLC and GCLM, respectively. Based on the metabolomic data, the model predicted that EMT altered GCL reaction on HCC827, however, the transcriptional data showed downregulation of GCLC on A549 and NCI-H358. This result and previous studies in other epithelial cell lines suggest that GCL needs to be reduced to lower glutathione levels for EMT induction, playing an important role in metabolic rewiring (22, 33, 34, 37). In conclusion, integrating the model predictions and expression data gave us enough information to find useful targets important for EMT development on NSCLC cells, suggesting downregulation of glutathione metabolism, specifically GPX, GSR, and GCL, which could be key features in the metabolic rewiring during EMT.



Mutations on Glutathione Metabolism Genes Affect Prognosis

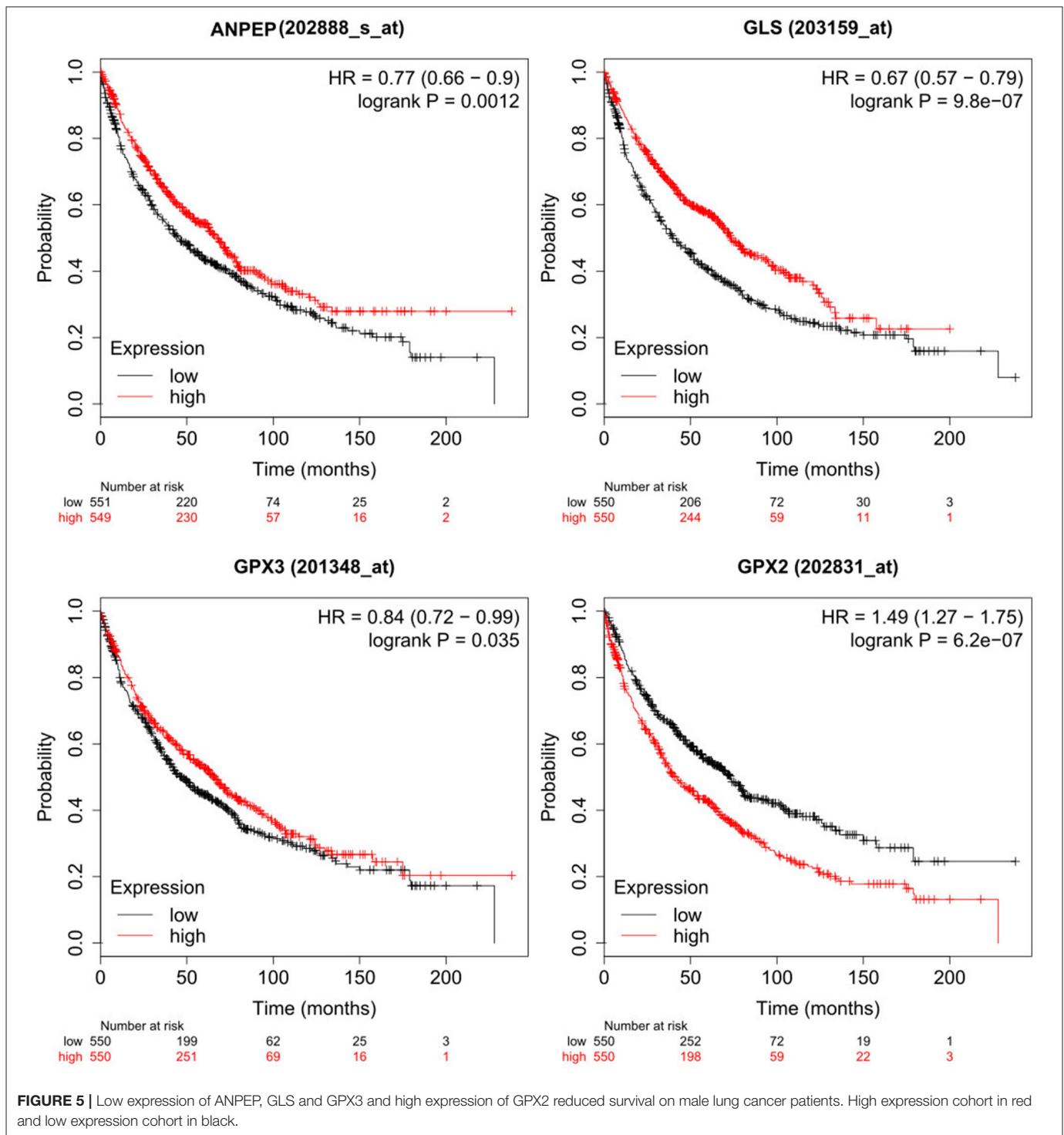
EMT has been related to high metastasis and poor prognosis, thus we evaluated the impact of mutations in metabolic genes in the survival of male patients with bronchus and lung cancer. Our target genes were primarily GLS, GSR, GCLC, and GPX genes, which our model and transcriptional data predicted as key players in EMT induction for all the NSCLC cell lines. We selected cohorts of patients with bronchus and lung cancer from the TCGA database (38), and compared the survival time to see if mutations on genes affect prognosis. This analysis showed that male bronchus and lung cancer patients with mutations on the GCLC gene survived less time than those without this gene mutated (p -value 0.0183) (Figure 4). Besides, patients with mutations on GPX2 showed a little less survival but were not significant. Nevertheless, humans have seven GPX genes coded in their DNA, from all of them, we noted that only patients with mutations on the GPX1 gene showed less survival rate than those without mutations on this gene (Figure 4). This suggested that GCLC and GPX1 genes may be used as biomarkers of bad prognosis in people with lung cancer, even with different genetic backgrounds. Patients with mutations either on GLS or GSR had similar survival time compared with patients without these mutations (data not shown).

However, sometimes patients lack mutations on these genes, but transcription levels are altered, leading to a differential metabolism on these patients. Hence, we also analyzed survival data of patients with differential expression of genes of interest

(14). In summary, patients with high expression of GPX2 survive less time than those with low expression of these genes ($p = 6.2e-07$), while patients with low expression of ANPEP, GPX3 and GLS survive less time than those with high expression ($p = 0.0012, 0.035, 9.8e-07$, respectively) (Figure 5). Overall, these findings suggested that glutathione metabolism is a key player in cancer prognosis and could be used as a biomarker for poor survival in men with lung cancer. More studies need to be done to understand the role of glutathione metabolism genes and the associated mechanisms in cancer and EMT. As a result of these observations, we postulate that GCLC, GPX1 genes and glutathione metabolism are possible targets to delay EMT or potentially prevent the EMT in lung cancer. This last hypothesis will be a future perspective of this work.

DISCUSSION

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) in cancer is one of the first steps for metastasis and drug resistance. EMT induction rewires metabolism, and some metabolites and enzymes have been identified as essential features for this process, such as the accumulation of fumarate, changes of succinate dehydrogenase and high levels of ROS in the cell, among others (3, 5, 6, 11, 16). However, differences in genetic background promote distinct metabolic alterations; hence it is essential to find common metabolic alterations between cancer cell lines that can be used as possible biomarkers of therapeutic targets (5, 18). This paper fundamentally used the metabolome and transcriptome data



previously reported for the EMT triggered by TGF- β in three NSCLC (11). Consequently, this experimental condition shaped most of our conclusions. As a central contribution of this paper, we show how these paired technologies supplied us with a valuable scheme to calibrate and assess the predictions coming from our computational model. Although TGF- β is not the only signal to induce EMT, our computational framework and analysis

is a valuable scheme to understand the underlying metabolic mechanisms of EMT induction, generate testable hypotheses, and design strategies to study the process under another stimulus. Despite a metabolic signature that characterizes EMT in different cell lines has been described (18), metabolite concentrations before and after the transition showed very different profiles for each of the cell lines analyzed. Based on a metabolic enrichment

analysis, we conclude that metabolic alterations during EMT can be split into two classifications. First, a core of metabolic pathways commonly altered in the three cell lines. Second, a set of metabolic pathways whose enrichment is cell-type-specific whose metabolic profile depends on factors such as the genetic background of the cell. For example, KRAS is known to affect metabolism when mutated on different types of cancers (39–41). Overall, our metabolic enrichment analysis indicated specific pathways altered in all the three NSCLC cell lines (**Supplementary Tables 1–3**). Among those pathways, we found Glycolysis, Krebs cycle, Amino acids metabolism, and glutathione metabolism. These results agree with other studies reporting alterations on these pathways on breast cancer, among others (5, 21). To identify the enzymatic activity that accompanied the EMT, these pathways were used to accomplish a metabolic reconstruction to explain the differences in metabolites concentrations after EMT induction (9, 10). As a result, our *in silico* approach predicted that some set of reactions changed in all three cell lines. One of these reactions was glutaminase (GLS), which we expected as the original paper showed impairment in the conversion of glutamine to glutamate (11). Notably, we also observed an alteration on the expression of GLS in all of the cell lines. In agreement, GLS has already been reported as a critical enzyme for EMT induction in breast cancer and essential for migration properties in colorectal cancer (6, 11, 27).

On the other hand, the model predicted that reactions involved in glutathione metabolism changed in the three cell lines, paired with an alteration of the expression of genes encoding enzymes involved in this pathway. Glutathione oxidation and reduction are usually carried out by glutathione peroxidases (GPXs) and glutathione reductase (GSR). At the transcriptional level, EMT downregulated the expression of GPX2 and GSR in A549, HCC827, and NCI-H358 cell lines. Furthermore, GSR and GPX genes have already been reported as essential features to block EMT in melanoma cells, cervical cancer, hepatocellular carcinoma, gastric, pancreatic, breast, and colon cancers (23–26, 30, 42, 43). Hence, these findings supply evidence that the downregulation of GPX2 and GSR may be necessary for EMT induction on NSCLC cell lines. In concordance, survival analysis displayed that mutations, or low expression of GPX genes predict a poor prognosis for male lung cancer patients, showing the possible importance of these genes in cancer development, possibly making this disease more malignant.

Some studies report that glutathione and ROS levels are critical factors for EMT induction in lung cancer, lens epithelial cells, and TGF- β induced fibrogenesis (22, 34, 36, 44). Therefore, glutathione synthesis and degradation must be critical during EMT development. ANPEP, a gene responsible for the last steps of degradation of glutathione, showed downregulation in the three cell lines, a finding that corresponded with our *in silico* metabolic analysis of A549 and NCI-H358. ANPEP has been correlated with EMT markers at the proteome level, finding higher amounts of this protein when EMT markers are highly produced, however, this study is comparing two different cell lines with different genetic backgrounds, and they do not induce

EMT in any form (45). Nevertheless, this indicates that somehow this protein participates in EMT. Also, ANPEP is part of the mesenchymal markers of Mouse mammary carcinoma cell line induced to EMT with TGF- β (46). In conclusion, we propose that ANPEP has an essential role during EMT in NSCLC cell lines, but more studies need to be done to understand the mechanisms involved.

Following, as the model indicated that glutathione synthesis was also a key feature of EMT, we investigated the behavior of Glutamyl-cysteine ligase (GCL). GCL catalyzes the first and rate-limiting step in the production of the cellular antioxidant glutathione. Our computational modeling predicted that GCL had changes in HCC827. Furthermore, GCLC, the gene that encodes the catalytic subunit of this enzyme, was downregulated in A549 and NCI-H358. From a clinical point of view, there is evidence that the high expression of GCLC predicts a better prognosis for melanoma patients (22). We also observed that patients of lung cancer with mutations on GCLC survive less time than those without mutations on this gene. Besides, GCLC has also been reported as a biomarker of poor survival in melanoma patients, and malignant phenotypes were more prominent in melanoma cells with lower GCLC expression (22). As well, GCLC has been found to overexpress in liver metastases of colorectal cancer and promotes cancer cell survival (47). Also, GCLC activation is associated with anti-tumor drug resistance in breast, lung, liver, head, and neck cancer (37, 48–50). Based on our *in silico* results and previous studies, we propose that both ANPEP and GCL have key roles in EMT development, however prognostic significance, as well as its potential as a pharmacological target, requires further in-depth investigations.

In conclusion, we presented a systems biology approach that integrates computational modeling, metabolome, and microarrays and can serve as a quantitative framework to predict and identify important reactions in EMT of NSCLC cell lines. These predictions are potentially useful in the design of therapeutic targets, as we compared NSCLC cell lines with different genetic backgrounds, hence having differences in their metabolism. Thus, finding similarities and differences between these cell lines help us understand the underlying mechanisms of the metabolic rewiring during EMT. Notably, the proposed genes depicted in this work have already been reported in other cancer as essential features for EMT induction. Overall, we highlight that our model can serve as a quantitative framework to predict and identify important reactions in EMT of NSCLC cell lines. Specifically, we highlight the role that glutathione metabolism has into EMT, a pathway that can be used to improve the outcome of patients in the future.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Publicly available datasets were analyzed in this study. This data can be found here: Sun et al., (11) **Supplementary Material** (<https://cancerandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/2049-3002-2-20>). All code used for analysis is available at <https://github.com/Meztlim/EMTanalysis>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MM-G and OR-A developed the methods and MM-G performed the analysis. MM-G and OR-A wrote the paper. CZ and ER helped with the manuscript revision and writing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

The authors thank the financial support from an internal grant of the National Institute of Genomic Medicine and PAPIIT-IA202720/UNAM.

REFERENCES

- Nieto MA, Huang RY-J, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell*. (2016) 166:21–45. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.028
- Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. (2009) 139:871–90. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007
- Sciacovelli M, Gonçalves E, Johnson TI, Zecchini VR, da Costa ASH, Gaude E, et al. Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature*. (2016) 537:544–7. doi: 10.1038/nature19353
- Arner EN, Du W, Brekken RA. Behind the wheel of epithelial plasticity in KRAS-driven cancers. *Front Oncol*. (2019) 9:1049. doi: 10.3389/fonc.2019.01049
- Kondaveeti Y, Guttilla Reed IK, White BA. Epithelial-mesenchymal transition induces similar metabolic alterations in two independent breast cancer cell lines. *Cancer Lett*. (2015) 364:44–58. doi: 10.1016/j.canlet.2015.04.025
- Morandi A, Taddei ML, Chiarugi P, Giannoni E. Targeting the metabolic reprogramming that controls epithelial-to-mesenchymal transition in aggressive tumors. *Front Oncol*. (2017) 7:40. doi: 10.3389/fonc.2017.00040
- Nielsen J, Jewett MC. The role of metabolomics in systems biology. *Top Curr Genet*. (2007) 2:0050. doi: 10.1007/4735_2007_0228
- Orth JD, Thiele I, Palsson BØ. What is flux balance analysis? *Nat Biotechnol*. (2010) 28:245–8. doi: 10.1038/nbt.1614
- Resendis-Antonio O. Filling kinetic gaps: dynamic modeling of metabolism where detailed kinetic information is lacking. *PLoS ONE*. (2009) 4:e4967. doi: 10.1371/journal.pone.0004967
- Diener C, Muñoz-Gonzalez F, Encarnación S, Resendis-Antonio O. The space of enzyme regulation in HeLa cells can be inferred from its intracellular metabolome. *Sci Rep*. (2016) 6:28415. doi: 10.1038/srep28415
- Sun Y, Daemen A, Hatzivassiliou G, Arnott D, Wilson C, Zhuang G, et al. Metabolic and transcriptional profiling reveals pyruvate dehydrogenase kinase 4 as a mediator of epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in tumor cells. *Cancer Metab*. (2014) 2:20. doi: 10.1186/2049-3002-2-20
- Xia J, Wishart DS. MSEA: a web-based tool to identify biologically meaningful patterns in quantitative metabolomic data. *Nucleic Acids Res*. (2010) 38:W71–7. doi: 10.1093/nar/gkq329
- Chong J, Wishart DS, Xia J. Using metaboanalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. *Curr Protoc Bioinform*. (2019) 68:e86. doi: 10.1002/cpbi.86
- Gyorffy B, Suroviak P, Budczies J, Lánckzy A. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. *PLoS ONE*. (2013) 8:e82241. doi: 10.1371/journal.pone.0082241
- Jiang L, Xiao L, Sugiura H, Huang X, Ali A, Kuro-o M, et al. Metabolic reprogramming during TGFβ1-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene*. (2015) 34:3908–16. doi: 10.1038/onc.2014.321
- Sciacovelli M, Frezza C. Metabolic reprogramming and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *FEBS J*. (2017) 284:3132–44. doi: 10.1111/febs.14090

ACKNOWLEDGMENTS

MM-G is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received CONACyT fellowship 735736.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.01309/full#supplementary-material>

- Hua W, ten Dijke P, Kostidis S, Giera M, Hornsvedt M. TGFβ-induced metabolic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Cell Mol Life Sci*. (2019) 77:2103–23. doi: 10.1007/s00018-019-03398-6
- Bhowmik SK, Ramirez-Peña E, Arnold JM, Putluri V, Sphyrin N, Michailidis G, et al. EMT-induced metabolite signature identifies poor clinical outcome. *Oncotarget*. (2015) 6:42651–60. doi: 10.18632/oncotarget.4765
- Choudhary KS, Rohatgi N, Halldorsson S, Briem E, Gudjonsson T, Gudmundsson S, et al. EGFR signal-network reconstruction demonstrates metabolic crosstalk in EMT. *PLoS Comput Biol*. (2016) 12:e1004924. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004924
- Resendis-Antonio O. Constraint-based Modeling. In: Dubitzky W, Wolkenhauer O, Cho KH, Yokota H, editors. *Encyclopedia of Systems Biology*. New York, NY: Springer (2013).
- Ramirez-Peña E, Arnold J, Shivakumar V, Joseph R, Vidhya Vijay G, den Hollander P, et al. The epithelial to mesenchymal transition promotes glutamine independence by suppressing expression. *Cancers*. (2019) 11:160. doi: 10.3390/cancers11101610
- Mougiakakos D, Okita R, Ando T, Dürr C, Gadiot J, Ichikawa J, et al. High expression of GCLC is associated with malignant melanoma of low oxidative phenotype and predicts a better prognosis. *J Mol Med*. (2012) 90:935–44. doi: 10.1007/s00109-012-0857-4
- Qi X, Ng KTP, Lian QZ, Liu XB, Li CX, Geng W, et al. Clinical significance and therapeutic value of glutathione peroxidase 3 (GPx3) in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. (2014) 5:11103–20. doi: 10.18632/oncotarget.2549
- Meng Q, Shi S, Liang C, Liang D, Hua J, Zhang B, et al. Abrogation of glutathione peroxidase-1 drives EMT and chemoresistance in pancreatic cancer by activating ROS-mediated Akt/GSK3β/Snail signaling. *Oncogene*. (2018) 37:5843–57. doi: 10.1038/s41388-018-0392-z
- Cai M, Sikong Y, Wang Q, Zhu S, Pang F, Cui X. Gpx3 prevents migration and invasion in gastric cancer by targeting NFκB/Wnt5a/JNK signaling. *Int J Clin Exp Pathol*. (2019) 12:1194–203.
- Wang Y, Cao P, Alshwmi M, Jiang N, Xiao Z, Jiang F, et al. GPX2 suppression of H₂O₂ stress regulates cervical cancer metastasis and apoptosis via activation of the β-catenin-WNT pathway. *OncoTargets Therapy*. (2019) 12:6639–51. doi: 10.2147/OTT.S208781
- Lee SY, Jeon HM, Ju MK, Jeong EK, Kim CH, Park HG, et al. Dlx-2 and glutaminase upregulate epithelial-mesenchymal transition and glycolytic switch. *Oncotarget*. (2016) 7:7925–39. doi: 10.18632/oncotarget.6879
- Xiang L, Mou J, Shao B, Wei Y, Liang H, Takano N, et al. Glutaminase 1 expression in colorectal cancer cells is induced by hypoxia and required for tumor growth, invasion, and metastatic colonization. *Cell Death Dis*. (2019) 10:40. doi: 10.1038/s41419-018-1291-5
- Ulanet D, Jha A, Couto K, Choe S, Wang A, Woo H-K, et al. Mesenchymal phenotype predisposes lung cancer cells to impaired proliferation and redox stress in response to glutaminase inhibition. *Cancer Metabol*. (2014) 2:P78. doi: 10.1186/2049-3002-2-S1-P78
- Li F, Dai L, Niu J. GPX2 silencing relieves epithelial-mesenchymal transition, invasion, and metastasis in pancreatic cancer by downregulating Wnt pathway. *J Cell Physiol*. (2019) 1:277–95. doi: 10.1002/jcp.29391
- Song Z, Wang H, Zhang S. Negative regulators of Wnt signaling in non-small cell lung cancer: theoretical basis and therapeutic potency.

- Biomed Pharmacother.* (2019) 118:109336. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109336
32. Li X, Wu J, Zhang X, Chen W. Glutathione reductase-mediated thiol oxidative stress suppresses metastasis of murine melanoma cells. *Free Radic Biol Med.* (2018) 129:256–67. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.025
 33. Franklin CC, Rosenfeld-Franklin ME, White C, Kavanagh TJ, Fausto N. TGF β 1-induced suppression of glutathione antioxidant defenses in hepatocytes: caspase-dependent post-translational and caspase-independent transcriptional regulatory mechanisms. *FASEB J.* (2003) 17:1535–7. doi: 10.1096/fj.02-0867fje
 34. Liu R-M, Gaston Pravia KA. Oxidative stress and glutathione in TGF β -mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med.* (2010) 48:1–15. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.026
 35. Ryoo I-G, Ha H, Kwak M-K. Inhibitory role of the KEAP1-NRF2 pathway in TGF β 1-stimulated renal epithelial transition to fibroblastic cells: a modulatory effect on SMAD signaling. *PLoS ONE.* (2014) 9:e93265. doi: 10.1371/journal.pone.0093265
 36. Wei Z, Caty J, Whitson J, Zhang AD, Srinivasagan R, Kavanagh TJ, et al. Reduced glutathione level promotes epithelial-mesenchymal transition in lens epithelial cells via a Wnt/ β -catenin-mediated pathway: relevance for cataract therapy. *Am J Pathol.* (2017) 187:2399–412. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.07.018
 37. Lin L-C, Chen C-F, Ho C-T, Liu J-J, Liu T-Z, Chern C-L. γ -Glutamylcysteine synthetase. (γ -GCS) as a target for overcoming chemo- and radio-resistance of human hepatocellular carcinoma cells. *Life Sci.* (2018) 198:25–31. doi: 10.1016/j.lfs.2018.02.015
 38. Tomczak K, Czerwinska P, Wiznerowicz M. The cancer genome atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp Oncol.* (2015) 19:A68–77. doi: 10.5114/wo.2014.47136
 39. Charitou T, Srihari S, Lynn MA, Jarbou M-A, FASTERIUS E, Moldovan M, et al. Transcriptional and metabolic rewiring of colorectal cancer cells expressing the oncogenic KRASG13D mutation. *Br J Cancer.* (2019) 121:37–50. doi: 10.1038/s41416-019-0477-7
 40. Myte R, Gylling B, Haggström J, Haggström C, Zingmark C, Burström AL, et al. Metabolic factors and the risk of colorectal cancer by KRAS and BRAF mutation status. *Int J Cancer.* (2019) 145:327–37. doi: 10.1002/ijc.32104
 41. Pupo E, Avanzato D, Middonti E, Bussolino F, Lanzetti L. KRAS-driven metabolic rewiring reveals novel actionable targets in cancer. *Front Oncol.* (2019) 9:848. doi: 10.3389/fonc.2019.00848
 42. Emmink BL, Laoukili J, Kipp AP, Koster J, Govaert KM, Fatrai S, et al. GPx2 suppression of H₂O₂ stress links the formation of differentiated tumor mass to metastatic capacity in colorectal cancer. *Cancer Res.* (2014) 74:6717–30. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1645
 43. Khatib A, Balakrishnan S, Ben-Yosef M, Oren G, Rmaileh AA, Schlesinger M, et al. Glutathione peroxidase 8. (GPX8)-IL6 axis is essential in maintaining breast cancer mesenchymal stem-like state and aggressive phenotype. *bioRxiv.* (2019) 818245. doi: 10.1101/818245
 44. Hu Y, He K, Wang D, Yuan X, Liu Y, Ji H, et al. TMEPAI regulates EMT in lung cancer cells by modulating the ROS and IRS-1 signaling pathways. *Carcinogenesis.* (2013) 34:1764–72. doi: 10.1093/carcin/bgt132
 45. Kim Y, Han D, Min H, Jin J, Yi EC, Kim Y. Comparative proteomic profiling of pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines. *Mol Cells.* (2014) 37:888–98. doi: 10.14348/molcells.2014.0207
 46. Asiedu MK, Ingle JN, Behrens MD, Radisky DC, Knutson KL. TGF β /TNF α -mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype. *Cancer Res.* (2011) 71:4707–19. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4554
 47. Nguyen A, Loo JM, Mital R, Weinberg EM, Man FY, Zeng Z, et al. PKLR promotes colorectal cancer liver colonization through induction of glutathione synthesis. *J Clin Invest.* (2016) 126:681–94. doi: 10.1172/JCI83587
 48. Fiorillo M, Sotgia F, Sisci D, Cappello AR, Lisanti MP. Mitochondrial “power” drives tamoxifen resistance: NQO1 and GCLC are new therapeutic targets in breast cancer. *Oncotarget.* (2017) 8:20309–27. doi: 10.18632/oncotarget.15852
 49. Liu C-W, Hua K-T, Li K-C, Kao H-F, Hong R-L, Ko J-Y, et al. Histone methyltransferase G9a drives chemotherapy resistance by regulating the glutamate-cysteine ligase catalytic subunit in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer Ther.* (2017) 16:1421–34. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0567-T
 50. Hiyama N, Ando T, Maemura K, Sakatani T, Amano Y, Watanabe K, et al. Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit is associated with cisplatin resistance in lung adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* (2018) 48:303–7. doi: 10.1093/jjco/hyy013

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Matadamas-Guzman, Zazueta, Rojas and Resendis-Antonio. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.