



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**MUERTE CELULAR Y ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS TRANSCRIPTOMAS EN
LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA PULMONAR SIN MUTACIONES
EN EGFR EXPUESTAS AL CDDP**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. CHÁVEZ DOMÍNGUEZ RODOLFO LUIS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MAYRA FURLÁN MAGARIL
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DR. SANTIAGO ÁVILA RÍOS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA CD. MX., ABRIL 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**MUERTE CELULAR Y ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS TRANSCRIPTOMAS EN
LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA PULMONAR SIN MUTACIONES
EN EGFR EXPUESTAS AL CDDP**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. CHÁVEZ DOMÍNGUEZ RODOLFO LUIS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MAYRA FURLÁN MAGARIL

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DR. SANTIAGO ÁVILA RÍOS

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA CD. MX., ABRIL 2024

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD (FACULTAD DE MEDICINA)
OFICIO: CGEP/CPCB/FMED/0163/2024
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **27 de noviembre de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **CHÁVEZ DOMÍNGUEZ RODOLFO LUIS** con número de cuenta **306282827** con la tesis titulada **"MUERTE CELULAR Y ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS TRANSCRIPTOMAS EN LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA PULMONAR SIN MUTACIONES EN EGFR EXPUESTAS AL CDDP"**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. FELIPE VACA PANIAGUA
Vocal: DR. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS
Vocal: DRA. MAGALI ESPINOSA CASTILLA
Vocal: DRA. MARÍA CRISTINA NEGRETE GARCÍA
Secretario: DRA. MAYRA FURLAN MAGARIL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 07 de febrero de 2024

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA

c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/EARR/earr



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la formación académica, así como por el apoyo para la realización del presente trabajo.
- Al CONAHCyT por el apoyo económico otorgado a través de la beca de posgrado (CVU 631047)

- A los miembros del comité tutorial:

Dr. José Sullivan López González, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por el apoyo y la tutoría recibida durante la realización del presente proyecto. Agradezco por su continúa asesoría para formarme y capacitarme en las distintas áreas que se requirieron para analizar los datos del presente trabajo. Adicionalmente, por sus comentarios y sugerencias, los cuales permitieron establecer el modelo de estudio propuesto, así como para mejorar en diversos aspectos el presente trabajo.

Al Dr. Santiago Ávila Ríos por la confianza y el apoyo para la realización de los experimentos de secuenciación, así como por su disposición para colaborar y por todos los comentarios y sugerencias realizados para la mejora del presente trabajo.

A la Dra. Mayra Furlán Magaril por brindarme su apoyo, tiempo y asesoría para la realización del presente proyecto. Por sus comentarios y sugerencias que se enfocaron en los análisis bioinformáticos, los cuales fueron trascendentales para cumplir con los objetivos del presente trabajo.

Índice

Índice de tablas

Índice de figuras

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1. Quimioterapia	4
1.2. Compuestos platinados	5
1.3. Mecanismo de acción de los compuestos platinados	7
1.4. Resistencia a los compuestos platinados en cáncer	9
1.4.1. Disminución de la acumulación del fármaco dentro de la célula	9
1.4.2. Inactivación del fármaco	12
1.4.3. Alteración de los blancos moleculares	13
1.4.4. Evasión de la muerte celular	16
1.4.5. Activación de las vías que favorecen la sobrevivencia celular	18
2. Antecedentes	20
3. Hipótesis	24
4. Objetivos	24
5. Metodología	25
5.1. Líneas celulares	25
5.2. Preparación del compuesto	25
5.3. Análisis del estatus mutacional de las líneas celulares por secuenciación dirigida.....	25
5.4. Curvas dosis-respuesta y cálculo de la CL ₅₀ del CDDP	26
5.5. Cambios morfológicos asociados a la muerte celular e inducidos por el CDDP	27
5.6. Cuantificación del porcentaje de células apoptóticas y necróticas	27
5.7. Detección de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa	28
5.8. Cuantificación de la actividad de caspasa-3/7	28
5.9. Cuantificación de proteínas	29
5.10. Análisis del ciclo celular en células tolerantes-persistentes al CDDP	29
5.11. Extracción de RNA y preparación de las bibliotecas.....	30
5.12. Análisis bioinformático de los datos de secuenciación	30
5.13. Validación de los resultados de secuenciación	32

5.14.	Análisis de sobrevida	33
5.15.	Western Blot	33
5.16.	Localización celular de SOCS1 en células tolerantes-persistentes a CDDP	34
5.17.	Silenciamiento de SOCS1	34
5.18.	Análisis estadístico	35
6.	Resultados	36
6.1.	Curvas dosis-respuesta y cálculo de la CL ₅₀ del CDDP	36
6.2.	Cambios morfológicos asociados a la muerte celular inducidos por el CDDP	37
6.3.	Cuantificación del porcentaje de células apoptóticas y necróticas	38
6.4.	Liberación de la enzima LDH	39
6.5.	Actividad de la caspasa-3/7	39
6.6.	Análisis del estatus mutacional de las líneas celulares	42
6.7.	Alteraciones en las fases del ciclo celular inducidas por el CDDP en las células tolerantes-persistentes.....	43
6.8.	Análisis de los datos de secuenciación	44
6.9.	Validación de los resultados de RNA-seq	51
6.10.	Análisis de sobrevida de los genes hub	52
6.11.	Evaluación de la expresión de SOCS1 en las células tolerantes-persistentes al CDDP... ..	54
6.12.	Localización intracelular de SOCS1	55
6.13.	Contribución de SOCS1 en la resistencia intrínseca al CDDP	56
7.	Discusión	57
8.	Conclusiones	63
9.	Referencias bibliográficas	65
	Anexo (Artículo requisito para la obtención del grado)	80

Índice de tablas

Tabla 1. CL₅₀ del CDDP en cada una de las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar.....	36
Tabla 2. Resumen estadístico de los datos de secuenciación.....	44
Tabla 3. Resumen de los resultados del alineamiento.....	45
Tabla 4. Resultados del análisis de sobrevida de los genes centrales en la cohorte de pacientes de TCGA.....	52

Índice de figuras

Figura 1. Flujo de trabajo empleado para el análisis bioinformático de los datos de secuenciación de RNA (RNA-seq).....	31
Figura 2. Efecto citotóxico inducido por el CDDP en las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar.	40
Figura 3. Cambios morfológicos inducidos por el tratamiento con CDDP en las líneas de adenocarcinoma pulmonar.....	41
Figura 4. Estatus mutacional de las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón.....	42
Figura 5. Análisis de las alteraciones en el ciclo celular en células DTPs al CDDP.....	44
Figura 6. Análisis de la calidad de los datos de secuenciación.....	45
Figura 7. Anotación de las lecturas alineadas y mapeadas	47
Figura 8. Análisis de expresión diferencial en las células DTPs al CDDP	48
Figura 9. Anotación funcional de del transcriptoma de las células DTPs	49
Figura 10. Redes de interacción entre los genes diferencialmente expresados en las células DTPs al CDDP	50
Figura 11. Validación de los resultados del análisis bioinformático	52
Figura 12. Relevancia clínica de los genes hub.....	53
Figura 13. Niveles de expresión (mRNA) de los genes centrales previamente al tratamiento	54
Figura 14. Expresión de la proteína SOCS1 en células de adenocarcinoma pulmonar DTPs al CDDP	55
Figura 14. Localización de SOCS1 en las células DTPs a CDDP	56
Figura 15. Contribución de SOCS1 en la resistencia intrínseca al CDDP	57

Resumen

La resistencia al cisplatino es la principal causa de la falla del tratamiento en el adenocarcinoma pulmonar. Las células tolerantes-persistentes son responsables de la resistencia intrínseca, debido a que sobreviven de forma subsecuente a los primeros ciclos del tratamiento y representan un reservorio para la aparición de clonas mostrando resistencia adquirida. Aún cuando los mecanismos moleculares de las células tolerantes-persistentes han sido descritos, pocos estudios han investigado las alteraciones moleculares iniciales de estas células en la resistencia intrínseca al cisplatino. En el presente trabajo se reporta una firma transcripcional asociada a la aparición de las células tolerantes-persistentes al cisplatino en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar. Después de una única exposición al cisplatino, el transcriptoma de las células tolerantes-persistentes fue secuenciado para identificar genes diferencialmente expresados. La importancia clínica de los genes más relevantes, con respecto a la sobrevida total de los pacientes tratados con cisplatino, fue analizada empleando datos obtenidos de la base “*The Cancer Genome Atlas*”. La expresión de los genes candidatos y su correspondiente proteína fue validada en las líneas de adenocarcinoma pulmonar empleando RT-qPCR y Western Blot; la distribución celular de estas proteínas fue detectada por inmunofluorescencia. La contribución del gen *SOCS1* en la resistencia intrínseca al cisplatino fue evaluada mediante el silenciamiento con siRNA.

Los análisis bioinformáticos revelaron que las células tolerantes-persistentes a cisplatino desregulan vías de señalización asociadas al metabolismo y a la proliferación para sobrevivir al efecto citotóxico del compuesto. Los análisis de redes de interacción permitieron identificar tres módulos altamente conectados, en los cuales *SOCS1* mostró una participación importante al controlar la proliferación de las células tolerantes persistentes al cisplatino. Empleando siRNA para silenciar la expresión de *SOCS1*, demostramos que este gen contribuye a la resistencia intrínseca al cisplatino. Empleando información clínica de la base de datos TCGA, encontramos que la expresión de los genes más relevantes se asoció con la sobrevida total de los pacientes tratados con cisplatino. La asociación entre el nivel de expresión y la sobrevida de los pacientes indica que estos genes pudieran ser empleados como biomarcadores predictivos o potenciales blancos moleculares para incrementar la sobrevida de los pacientes con cáncer de pulmón.

Abstract

Resistance to cisplatin is the main cause of treatment failure in lung adenocarcinoma. Drug-tolerant-persister cells (DTPs) are responsible for intrinsic resistance, since they survive after initial cycles of treatment and represent a reservoir for the emergence of clones that display acquired resistance. Although the molecular mechanisms of DTPs cells have been described, few studies have investigated the earliest molecular alterations of DTPs in intrinsic resistance to cisplatin. In this work, we report a gene-expression signature associated with the emergence of cisplatin-DTPs in lung adenocarcinoma cell lines. After a single exposure to cisplatin, we sequenced the transcriptome of cisplatin-DTPs to identify differentially expressed genes. The clinical relevance of candidate genes, according to overall survival of cisplatin-treated patients from The Cancer Genome Atlas, was analyzed. Expression of candidate genes and their corresponding protein was validated in lung adenocarcinoma cell lines by RT-qPCR and Western Blot, and their cellular distribution was detected by immunofluorescence. The contribution of the candidate gene *SOCS1* to cisplatin intrinsic resistance was evaluated using siRNA-targeted knockdown. Bioinformatic analysis revealed that early cisplatin-DTPs deregulate metabolic and proliferative pathways to survive the drug insult. Interaction network analysis identified three highly connected sub-modules, in which *SOCS1* had an important participation in controlling proliferation of cisplatin-DTPs cells. Using siRNA-targeted knockdown of *SOCS1* in lung adenocarcinoma cell lines, we demonstrated that this gene contributes to the intrinsic resistance to cisplatin. Survival analysis showed that expression of hub genes was associated with overall survival of cisplatin-treated patients. The association between the level of expression and the survival of patients indicates that these genes could be employed as predictive biomarkers or potential targets to improve the survival of lung cancer patients.

1. Introducción

La alta tasa de crecimiento poblacional a nivel mundial, el incremento en la esperanza de vida, el avance en el desarrollo socioeconómico y los cambios asociados al estilo de vida han impactado en el incremento de la incidencia y prevalencia de distintas enfermedades, entre ellas el cáncer. Actualmente, el cáncer se ubica como una de las enfermedades de mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial. Para el año 2018 se estimó que el cáncer causó alrededor de 18.1 millones de casos nuevos, así como 9.6 millones de muertes (1). Los tumores con mayor incidencia y mortalidad son los cánceres de pulmón, mama, próstata, colon y estómago (1). A nivel mundial el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en ambos sexos (1). Una estimación similar se ha reportado en México, en donde el cáncer pulmonar es el tumor de mayor incidencia y la principal causa de muerte por cáncer (2).

De acuerdo a las características histológicas que presenta, el cáncer de pulmón se divide en dos grupos: el carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC por sus siglas en inglés) con un 15% de incidencia y el carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés) con un 85% de incidencia (3). Este último a su vez se clasifica en tres tipos histológicos: el carcinoma de células grandes, el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma, siendo este último el más frecuente (3).

El gran avance en la tecnología para el diagnóstico del cáncer, así como en los procedimientos moleculares ha permitido detectar el cáncer en etapas tempranas de su desarrollo y estratificar de forma robusta y exacta a los pacientes de acuerdo a las alteraciones genómicas presentes en los tumores pulmonares. Sin embargo, aún con estos avances, la mayoría de los pacientes con cáncer pulmonar son diagnosticados en estadios avanzados de la enfermedad, donde se presenta metástasis a otros órganos como cerebro, hígado y hueso. Adicionalmente, la sobrevida a 5 años es del 15% y para estadios avanzados menor del 5% (3,4).

Aproximadamente, entre el 50-75% de los pacientes con cáncer pulmonar presentan expectoración frecuente, hemoptisis, dolor de pecho y disnea (5) al tiempo del diagnóstico. Para confirmar el diagnóstico se requieren de estudios de laboratorio clínico, imagen, patología y moleculares (3). De acuerdo a los hallazgos de estos estudios, la resección quirúrgica del tumor por lobectomía es la opción de tratamiento y curación más adecuada para tumores localizados y en estadios tempranos de la enfermedad (I y II). Adicionalmente,

la quimioterapia neoadyuvante y adyuvante, empleando la combinación de compuestos platinados y taxanos, se encuentra indicada para pacientes cuyos tumores se encuentran en estadios tempranos (II-IIIa), son candidatos a resección quirúrgica y las lesiones metastásicas presentan tamaño reducido (4). Sin embargo, en aquellos pacientes diagnosticados en estadios avanzados de la enfermedad, en donde las lesiones metastásicas son de mayor tamaño, la administración sistémica de quimioterapia estándar, basada en compuestos platinados, se encuentra indicada como terapia paliativa.

1.1. Quimioterapia

La quimioterapia consiste en la administración sistémica de compuestos citotóxicos, los cuales tienen como mecanismo de acción interferir en la síntesis del ADN, causar estrés oxidante en la célula e inducir la eliminación de las células tumorales activando distintos mecanismos de muerte celular. Una diversidad de compuestos citotóxicos son empleados en el tratamiento de diferentes tipos de tumores y se clasifican en: antimetabolitos como el 5-fluorouracilo; antraciclinas; los compuestos análogos a los nucleótidos como la 2'-desoxi-5'-azacitidina y los agentes alquilantes como la ciclofosfamida y los compuestos platinados (6).

El reciente avance de las técnicas de secuenciación de nueva generación ha permitido identificar las alteraciones genéticas más frecuentes en los distintos tipos de NSCLC, pudiendo clasificar a los tumores con respecto a las mutaciones que presentan (7). Diversos estudios han reportado que los tumores de tipo adenocarcinoma presentan con alta frecuencia mutaciones en los genes de *EGFR*, *KRAS*, *PI3KCA*, *BRAF*, *MET*, *ROS*, entre otros (8). Específicamente, para los tumores de tipo adenocarcinoma pulmonar con mutaciones en el gen de *EGFR* existen terapias blanco conocidas como los inhibidores de las tirosina cinasas (TKI's), las cuales participan bloqueando el sitio activo del receptor con actividad de cinasa para residuos de tirosina (9). El empleo de estos fármacos en pacientes cuyos tumores presentan mutaciones en *EGFR* ha incrementado la sobrevida libre de progresión (10). Sin embargo, la sobrevida total de los pacientes no se incrementa con la administración de estos TKI's, debido a que los pacientes desarrollan resistencia adquirida a los fármacos. En este caso la administración subsecuente de la terapia estándar, basada en compuestos platinados, se encuentra indicada (11).

En los últimos 50 años, la administración de compuestos platinados se ha constituido como el pilar de los esquemas de tratamiento de tumores testiculares, próstata, ovario, vejiga, pulmón, colon, entre otros. Es por ello que desde el descubrimiento de su actividad biológica antitumoral se han realizado avances en la síntesis de una variedad de moléculas, algunas de las cuales han sido aprobadas para el tratamiento de primera línea de tumores pulmonares, de ovario, cerebro, colon, entre otros (12).

1.2. Compuestos platinados

Históricamente, a mediados del siglo XIX, el químico italiano Michele Peyrone sintetizó el compuesto de coordinación cis-diaminodicloro Platino (II) (CDDP) (13). Sin embargo, las propiedades biológicas antitumorales del CDDP fueron descubiertas un siglo después por Barnett Rosenberg (14). Este grupo realizó los primeros hallazgos en bacterias, encontrando que el CDDP afectó la división celular de estos microorganismos. Posteriormente, sus ensayos fueron ampliados a modelos animales de sarcoma y leucemia, demostrando que la administración del CDDP inhibió el crecimiento tumoral (14). Nueve años más tarde, la FDA aprobó el CDDP para su empleo en el tratamiento de diferentes tipos de cánceres (12). Con el transcurrir del tiempo, las principales limitaciones observadas tras la administración del CDDP fueron los efectos adversos, tales como la nefrotoxicidad, neurotoxicidad y mielosupresión (15). Para contrarrestar estos efectos tóxicos, un importante número de compuestos derivados del CDDP fueron sintetizados (15). Esto se ha realizado modificando los ligandos que se unen al átomo de Platino.

Dentro de los derivados platinados que se han sintetizado se encuentran el ormaplatino, nedaplatino, piriplatino, carboplatino y oxaliplatino (16). Aunque la mayoría de estos compuestos han mostrado ser efectivos en estudios pre-clínicos, solamente el cis-diamino (ciclobutano-1, 1-dicarboxilato) Platino (II) (carboplatino) y el ciclohexano-1, 2-diamino oxalato Platino (II) (oxaliplatino) han sido aprobados para su administración en el tratamiento de tumores de ovario, pulmón, colon, entre otros. Estas moléculas exhiben menor toxicidad y parámetros farmacocinéticos superiores, comparados con el CDDP (12,16). En los últimos 20 años se han sintetizado otros derivados platinados tales como el satraplatino, el picoplatino, o el tetraplatino. Actualmente el satraplatino y el picoplatino se encuentran en estudios clínicos de fase II y III, mostrando mejores parámetros de absorción y menor susceptibilidad a ser inactivados por enzimas detoxificantes (12). Además, el satraplatino ha sido empleado en la elaboración de formulaciones farmacéuticas enterales,

permitiendo su administración oral (17). En este sentido, también se han buscado y desarrollado nuevas presentaciones farmacéuticas para el CDDP, cuyo objetivo es optimizar su administración, disminuir la toxicidad e incrementar la liberación del compuesto de forma selectiva en el tumor. A este respecto, se encuentra en desarrollo el empleo de nanopartículas como sistemas de acarreamiento y liberación para el CDDP y otros compuestos platinados (15). En la elaboración de las nanopartículas han sido empleados diversos materiales de origen orgánico como micelas poliméricas, liposomas y dendrímeros; materiales de origen inorgánico elaborados de Hierro, Oro o sílica, así como la combinación de ambos materiales en la producción de nanotubos de Carbono (15). Dadas las características de las nanopartículas propuestas, se estudia la posibilidad de que el compuesto citotóxico se distribuya y concentre selectivamente en la masa tumoral. Lo anterior se logra debido al fenómeno de permeabilidad y retención incrementada, que es exclusiva de los vasos sanguíneos del tumor, los cuales exhiben arquitectura aberrante y la alta permeabilidad (18). Distintos estudios pre-clínicos reportaron que la administración de los compuestos platinados encapsulados en nanopartículas resultó en mayor distribución, liberación y efecto citotóxico de los fármacos en el tumor. Además, causaron menor toxicidad en comparación con la administración de CDDP de manera convencional (19–21).

Actualmente, algunas de las formulaciones en micelas o liposomas se encuentran en estudios clínicos de fase II y III (22,23). Los resultados clínicos indican menor nefrotoxicidad y neurotoxicidad tras la administración de las nanopartículas en pacientes, así como mayor distribución del fármaco en la masa tumoral. Sin embargo, el efecto terapéutico observado en los pacientes aún es similar al obtenido en la administración sistémica de los compuestos platinados. Una de las explicaciones a estos resultados es que el fármaco contenido en las nanopartículas no se libera completamente. Para resolver este problema, actualmente se investiga la incorporación de nuevos ligandos a los compuestos platinados los cuales permitirán su completa liberación de las nanopartículas (15).

Mientras se avanza en el desarrollo de las nuevas formulaciones farmacéuticas, en la práctica clínica se administran los compuestos platinados solos o en combinación con fármacos como gemcitabina, taxanos y camptotecinas (24). Dependiendo de las guías terapéuticas y el esquema de tratamiento para cada tipo de cáncer, la quimioterapia

combinada a base de compuestos platinados ha demostrado incrementar la sobrevida total de los pacientes en comparación con la monoterapia de los compuestos platinados.

1.3. Mecanismo de acción de los compuestos platinados

Los compuestos platinados se administran por vía intravenosa a los pacientes y en forma de infusión, con una duración de dos horas aproximadamente (25,26). En el torrente sanguíneo, los compuestos platinados se unen a proteínas plasmáticas tales como la albumina sérica, hemoglobina y transferrina (27). Los fármacos son distribuidos principalmente a riñones, hígado y próstata y en menor proporción a músculos, vejiga, páncreas y bazo. Estudios clínicos realizados en pacientes con cáncer pulmonar reportan que la distribución de los agentes antitumorales en el tumor se correlaciona con la disminución de la masa tumoral e incremento en la sobrevida total (28).

Una vez que los compuestos platinados son distribuidos al tejido tumoral, estos ingresan a las células mediante distintos mecanismos de transporte como la difusión pasiva y el transporte facilitado (29). Con respecto a la difusión pasiva, se ha demostrado que las características fisicoquímicas de los ligandos presentes en los compuestos platinados les confieren distinta hidrofobicidad, la cual repercute en la difusión a través de la membrana celular (30). Por otro lado, la difusión facilitada de estos compuestos es principalmente controlada por los transportadores de membrana como los transportadores de Cobre y distintos miembros de la familia de acarreadores de solutos, específicamente los transportadores de cationes orgánicos (31,32). La difusión por los transportadores de Cobre fue inicialmente descubierta en levaduras, en donde la inhibición de la expresión de estas proteínas de membrana disminuyó la acumulación de CDDP en las células. Por lo anterior, la expresión de estas proteínas de membrana es esencial en el transporte de compuestos platinados (33). Posteriormente, los genes ortólogos de estos transportadores fueron encontrados en mamíferos, en donde los transportadores CTR-1 y CTR-2 están implicados en el transporte de CDDP, carboplatino y oxaliplatino (34).

Una vez dentro de la célula, los compuestos platinados reaccionan de manera inmediata con las moléculas de agua, promoviéndose su activación. En este sentido y en el caso particular del CDDP los grupos cloruro son sustituidos por moléculas de agua (35). Respecto al carboplatino y al oxaliplatino, los grupos ciclobutanodicarboxilato y oxalato son sustituidos por dos moléculas de agua, respectivamente (35). La adición de moléculas de

agua a los compuestos platinados promueve la adquisición de características electrofílicas. De esta manera, reaccionan y forman enlaces covalentes con un considerable número de sustratos nucleofílicos en el citoplasma, tales como el glutatión (GSH), la metionina y el grupo sulfhidrilo presente en las proteínas (36) Este mecanismo, aún no completamente investigado, propone que el efecto citotóxico de los compuestos platinados pudiera estar asociado al daño causado por el estrés oxidante, ya que se consumen las reservas citoplasmáticas de estos antioxidantes endógenos.

Sin embargo, el mecanismo más comprendido y caracterizado por el cual los compuestos platinados inducen su efecto citotóxico involucra la formación de lesiones en el ADN. La forma activa de los compuestos platinados presenta gran reactividad ante los átomos de Nitrógeno de los ácidos nucleicos (37). Los compuestos platinados forman distintos tipos de aductos bifuncionales en el material genético, los cuales se producen por la unión covalente entre el Nitrógeno de la posición 7 en las purinas y el átomo de Platino. Por ejemplo, el CDDP y el carboplatino forman principalmente lesiones intracatenarias de tipo 1,2 entre dos guaninas adyacentes (1-2-d(GpG)) o entre adenina y guanina adyacentes (1, 2-d(ApG)), las cuales representan el 90% de las lesiones causadas (12). El mismo tipo de lesiones en el ADN son causadas por el oxaliplatino, pero en un porcentaje distinto. Además, la retención del grupo 1, 2-diaminociclohexano en el oxaliplatino incrementa el volumen estérico de las lesiones, lo cual se asocia con mayor eficiencia para bloquear la replicación del ADN y la reparación de las lesiones (38).

Las lesiones causadas en el ADN por los compuestos platinados son reconocidas por distintas proteínas, principalmente por la proteína relacionada a RAD3 y ATM (ATR) y la cinasa 1 de punto de control (CHK1) (39), las cuales estabilizan y activan al factor de transcripción p53, el cual controla la transcripción de genes que regulan el ciclo celular y la muerte por apoptosis (37). Adicionalmente, las proteínas ATR y CHK1 transmiten señales por medio de la activación de la vía de señalización de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), la reparación de ADN por escisión de nucleótidos (NER) y por el mal apareamiento de bases (MMR) (40). Estas vías de señalización favorecen el arresto del ciclo celular, principalmente en las fases S y G2-M, para promover la reparación de las lesiones causadas en el ADN, actuando como mecanismos citoprotectores (41). Sin embargo, si la cantidad de lesiones causadas supera la capacidad que tiene la célula para repararlas, entonces se induce la muerte por apoptosis en las células tumorales (39). Para

ello, las proteínas p53 y p73 favorecen la expresión de genes con actividad pro-apoptótica tales como Bax, Bak y PUMA (37,40,42). De esta manera, estas proteínas inducen la muerte de las células mediante la apoptosis intrínseca.

1.4. Resistencia a los compuestos platinados en cáncer

Como se mencionó previamente, hasta la fecha no existe algún tratamiento efectivo para curar el cáncer de pulmón en etapas avanzadas. El principal impedimento en el tratamiento del cáncer es el desarrollo de la resistencia, la cual se designa como la disminución en la efectividad de los tratamientos terapéuticos y en ella participan mecanismos celulares y no celulares (43,44). La resistencia se divide en intrínseca y extrínseca considerando el tiempo de aparición durante el tratamiento con los agentes antitumorales. La resistencia intrínseca se caracteriza por la ausencia de respuesta a los tratamientos y la rápida progresión de la enfermedad en etapas iniciales del tratamiento y es atribuida a que las células tumorales ya presentan mecanismos de resistencia de manera previa al tratamiento (45). Por otro lado, la resistencia adquirida se presenta en tumores que inicialmente se comportaron sensibles a las terapias; sin embargo, durante el curso del tratamiento los tumores se vuelven insensibles al efecto de las terapias debido a la adquisición de resistencia (45,46).

Con respecto a los compuestos platinados, hasta la fecha se han descrito distintos mecanismos moleculares de resistencia. La mayoría de estos estudios se han enfocado en el estudio de la resistencia adquirida. Es importante mencionar que algunos de estos mecanismos moleculares asociados a la resistencia se comparten entre los compuestos platinados. Lo anterior debido a las similitudes que presentan en su activación y al mecanismo de acción. Los mecanismos de resistencia a los compuestos platinados se han clasificado en: disminución de la acumulación del fármaco dentro de la célula, inactivación del fármaco, alteración de los blancos moleculares, evasión de la muerte celular y la activación de vías de señalización que promueven la sobrevivencia celular (46). A continuación, se revisará cada uno de estos mecanismos.

1.4.1. Disminución de la acumulación del fármaco dentro de la célula

La administración de los tratamientos antitumorales involucra una serie de procesos farmacocinéticos, los cuales favorecen la llegada y la acumulación de los fármacos en el tumor en concentraciones adecuadas para ejercer su actividad biológica. Sin embargo, la acumulación intracelular de los compuestos terapéuticos es afectada, principalmente por

distintas proteínas de membrana que controlan su transporte. Distintos transportadores de membrana que participan en el eflujo de agentes antitumorales han sido relacionados con los fenómenos de resistencia intrínseca y adquirida. Específicamente, la familia de transportadores del cassette de unión a ATP (ABC por sus siglas en inglés) controla el flujo de fármacos hidrofóbicos del interior al exterior de la célula mediante la hidrólisis de ATP (43,46). Dentro de esta familia de proteínas transportadoras, la proteína 1 de multi-resistencia a fármacos o glicoproteína-P (MDR1 o P-gp), la proteína 1 asociada a MDR y la proteína de resistencia en cáncer de mama, han sido las más estudiadas debido a su expresión en distintos tipos de tumores y a la diversidad de compuestos antitumorales que expulsan (46).

Por ejemplo, el transportador MDR1 se ha encontrado con expresión incrementada en tumores de mama, hígado, laringe, cérvix, entre otros. Además, la sobre-expresión de MDR1 en las células tumorales de manera previa al tratamiento, está asociada con un mal pronóstico de la enfermedad (47–49). Con respecto a los compuestos platinados, alteraciones genéticas en el gen MDR1 se han asociado con la efectividad del tratamiento por CDDP en tumores del tracto urinario (50). Adicionalmente, se reportó que las líneas celulares de cáncer de vejiga con resistencia adquirida al CDDP, expresan el transportador MDR1. Esta expresión es controlada por la activación y estabilización del factor inducible por hipoxia (HIF) (51).

Las proteínas que presentan mayor relevancia en el eflujo de los compuestos platinados y por lo tanto al fenómeno de resistencia, son los transportadores de eflujo de Cobre ATP7A y ATP7B (52). Empleando un modelo de resistencia adquirida a CDDP en líneas celulares de carcinoma oral escamoso, se reportó que las células resistentes al tratamiento incrementaron la expresión de la proteína ATP7B, la cual se relacionó con la activación de la proteína asociada a Yes (YAP) (53). Katano et al. reportó la sobre-expresión de ATP7B en líneas celulares de cáncer de ovario con la subsecuente disminución del 61% en la acumulación intracelular de CDDP y carboplatino (54). Estudios posteriores realizados por este mismo grupo de trabajo demostraron que, adicionalmente al eflujo de los compuestos platinados, los transportadores ATP7A y ATP7B secuestran a estos fármacos en compartimentos vesiculares, principalmente en endosomas tardíos, impidiendo su transporte al núcleo (55). Particularmente, el transportador ATP7B se encontró distribuido en vesículas periféricas y cercanas a la membrana, las cuales pueden fusionarse y expulsar

de la célula a estos fármacos (56). Investigaciones realizadas en pacientes con cáncer de ovario en tratamiento de carboplatino post quirúrgico, mostraron la asociación de polimorfismos en el gen ATP7A con resistencia al tratamiento (57).

Además del incremento en la expresión de transportadores de membrana que expulsan a los compuestos platinados, alteraciones en la expresión de los transportadores que introducen los fármacos a la célula han sido asociadas a la disminución en su acumulación intracelular. Como se mencionó previamente, los transportadores de Cobre CTR-1 y CTR-2 están involucrados en dicho proceso. En cáncer de ovario se ha asociado la presencia de polimorfismos en el gen CTR1 con la resistencia al oxaliplatino (57). Adicionalmente, investigaciones realizadas en líneas celulares de cáncer de pulmón con resistencia adquirida a CDDP, reportaron que la exposición prolongada a CDDP favoreció la sub-expresión del transportador CTR1 (58). Resultados similares han sido reportados en biopsias de pacientes con cáncer de pulmón, en donde la expresión disminuida de CTR1 se asoció con menor acumulación de CDDP en los tejidos y pobre respuesta al tratamiento (59).

Con el propósito de contrarrestar el efecto causado por los transportadores que expulsan los fármacos de las células, se han sintetizado inhibidores para bloquear su actividad. Aunque estos inhibidores han mostrado ser efectivos en modelos *in vitro*, estudios iniciales realizados en pacientes muestran resultados inconsistentes, ya que la administración combinada de estos inhibidores con taxanos no impactó significativamente en mejorar la respuesta clínica (46). A la fecha no se han realizado estudios que investiguen el efecto que tienen estos inhibidores en el tratamiento con compuestos platinados. El desarrollo de nuevos inhibidores debe de tomar en cuenta que la resistencia no es atribuida exclusivamente a un solo transportador de membrana. Por ello se requiere analizar la expresión de un mayor número de transportadores de membrana en las muestras provenientes de los pacientes. Además, desarrollar moléculas que bloqueen a distintos grupos de receptores o bien aplicar combinaciones de inhibidores que incrementen sustancialmente la sobrevida libre de progresión o la sobrevida total de los pacientes con cáncer.

1.4.2. Inactivación del fármaco

Durante el desarrollo de los tumores, el estado redox de las células se encuentra alterado, principalmente por la reprogramación metabólica, característica considerada como “hallmark” del cáncer (60). El metabolismo aberrante de las células tumorales, así como la activación de oncogenes, favorecen la producción de especies reactivas de Oxígeno y de Nitrógeno (RONs). El incremento de las especies reactivas causa estrés oxidante y daño a las biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Para contrarrestar el daño producido por las RONs, las células tumorales expresan los genes que controlan la respuesta antioxidante endógena (61). Uno de los principales productos formados por la activación de esta respuesta es el glutatión (GSH), tripéptido conformado por los residuos de glutamina, cisteína y glicina (62). Debido a la presencia del grupo tiol, el GSH neutraliza las RONs de forma dependiente e independiente de enzimas (62). Las enzimas GSH-peroxidasa y GSH-S-transferasa (GST) oxidan dos moléculas de GSH o conjugan una molécula de GSH para neutralizar las RONs, respectivamente.

Como se mencionó previamente, cuando los compuestos platinados ingresan a la célula reaccionan de manera inmediata con las moléculas de agua, adquiriendo alto potencial electrofílico y pro-oxidante (35). En este sentido, el GSH tiene la capacidad de neutralizar la forma activa de los compuestos platinados, impidiendo que éstos reaccionen con las proteínas o el ADN y así induzcan daño oxidante en la célula. Estudios iniciales realizados en líneas celulares de cáncer de ovario y de cáncer de pulmón reportaron un incremento en los niveles intracelulares de GSH en modelos de resistencia adquirida a diversos compuestos platinados, entre ellos el CDDP y el carboplatino (63,64). Estudios posteriores realizados en líneas celulares y en muestras de autopsias de pacientes con cáncer de pulmón, evidenciaron que la administración de compuestos platinados indujo la expresión de la enzima γ -glutamylcisteil sintetasa, la cual cataliza el paso limitante en la síntesis de GSH (65). Por lo anterior, el incremento en la expresión de esta enzima se ha asociado con resistencia al CDDP, carboplatino y oxaliplatino (61). Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios clínicos que muestren resultados concluyentes respecto a este tema.

Además de neutralizar las especies activas de los compuestos platinados, el GSH también favorece la expulsión de estos fármacos de la célula (62). Se ha descrito que la eliminación de los conjugados entre el GSH y CDDP, producidos por la enzima GST, es regulada por

el transportador dependiente de ATP, MRP2 (62). Estudios realizados en líneas celulares de osteosarcoma con resistencia adquirida al CDDP reportaron que las células resistentes sobre-expresan el ARN mensajero (mRNA) del gen de MRP2, así como el del gen de la subunidad γ de la enzima GST (66).

Además del GSH, la expresión de metalotioneínas está relacionada a la resistencia a compuestos platinados. Las metalotioneínas son un grupo de proteínas conformadas por alrededor de 60 residuos de aminoácidos, de los cuales 20 son residuos de cisteína y por lo tanto son proteínas abundantes en grupos tiol (67). Las metalotioneínas participan en diversos procesos celulares tales como la homeostasis y transporte de metales esenciales como Zinc y Cobre; la eliminación de metales tóxicos; la neutralización de RONS y en la regulación de la proliferación y la apoptosis celular (67). Estudios realizados en líneas celulares de osteosarcoma, mostraron que la expresión de las metalotioneínas se incrementó en las células resistentes al CDDP. Las metalotioneínas se encontraron principalmente localizadas en el núcleo, pudiendo participar en la neutralización de la forma activa del CDDP e impedir su unión al ADN (68). Asimismo, en las muestras de tumores de ovario, la expresión nuclear de las metalotioneínas se asoció con un mal pronóstico de la enfermedad (69). Hasta la fecha no se han realizado más estudios clínicos que permitan concluir la relevancia de estas proteínas en la resistencia a compuestos platinados, por lo que esta área queda abierta a la investigación.

1.4.3. Alteración de los blancos moleculares

Como se mencionó anteriormente, el principal blanco molecular y el más caracterizado de los compuestos platinados es el ADN. Estos compuestos dañan el ADN formando lesiones intra- e inter- catenarias, las cuales al acumularse y no ser debidamente reparadas favorecen la activación de diferentes vías que inducen arresto del ciclo celular y la muerte por apoptosis de las células tumorales (70). Para contrarrestar el daño causado en el ADN, las células activan distintos mecanismos de reparación del material genético. En este sentido, la principal vía que reconoce y repara las lesiones causadas por los compuestos platinados al ADN es el sistema de reparación de NER.

Brevemente, el sistema NER se activa cuando existe daño en el ADN causado por luz ultravioleta, mutágenos del medio ambiente y algunos fármacos antitumorales. Las principales proteínas que participan en la vía del NER, son la proteína del grupo C de

Xeroderma Pigmentoso; la proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1 (ERCC1) y las proteínas del grupo F y G de Xeroderma Pigmentoso (XPF y XPG). Estas proteínas tras reconocer las lesiones realizan el corte de la cadena dañada en ambos extremos (71). Dentro de estas proteínas, el heterodímero ERCC1-XPF lleva a cabo el paso limitante en la reparación del daño, al cortar el extremo 5' la cadena dañada. Finalmente, un complejo de ADN polimerasa se encarga de sintetizar una nueva cadena reparando el daño (71).

Estudios iniciales realizados en líneas celulares de cáncer de ovario demostraron que la sobre-activación del sistema de reparación de NER se asoció con la resistencia a compuestos platinados (72). Estudios clínicos posteriores en tumores de ovario, pulmón, colon y vejiga confirmaron los hallazgos previos (73–76). Estas investigaciones reportaron que la sobre-expresión, medida mediante mRNA, de ERCC1 se asoció a menor efecto de los compuestos platinados y por lo tanto a la resistencia al tratamiento. De manera contraria, aquellos pacientes que presentaron la expresión de ERCC1 disminuida se beneficiaron con la administración de la terapia a base de compuestos platinados (73–76). A pesar de que en estos estudios la capacidad de reparación del sistema NER no fue evaluada, la expresión de ERCC1 se constituye como un posible biomarcador para predecir la respuesta al tratamiento con los agentes platinados.

Con relación al sistema de reparación por mal apareamiento de bases (MMR), las lesiones causadas por los compuestos platinados son reconocidas, pero no reparadas (36). Este sistema participa principalmente en la reparación de inserciones, deleciones o mal apareamiento de bases nitrogenadas causadas durante los procesos de replicación y de recombinación del ADN (77). Respecto a los compuestos platinados, se ha propuesto que las proteínas del sistema MMR al reconocer, pero no reparar el daño en el ADN, tienen la capacidad de transmitir señales que inducen la muerte por apoptosis (78). Las proteínas homólogas a MutS 2 (MSH2) y MutL 1 (MLH1) son las responsables de detectar los aductos formados entre el átomo de Platino y las dos guaninas adyacentes (36). De esta manera, el sistema MMR constituye un elemento clave en el mecanismo de acción de los compuestos platinados.

El silenciamiento del gen MSH2 en líneas celulares de cáncer de vejiga causó incremento en la resistencia al tratamiento con CDDP, caracterizada por una menor expresión de las

proteínas con actividad pro-apoptótica y por lo tanto, una disminución en la muerte celular (79). Estudios realizados en tumores de esófago, de manera posterior al tratamiento con CDDP, reportaron que la disminución en la expresión de la proteína MLH1 se asoció con mal pronóstico de la enfermedad (80). Una de las posibles causas de la sub-expresión de MLH1 de manera posterior al tratamiento es la hipermetilación del promotor del gen, la cual fue reportada en muestras histológicas provenientes de pacientes con cáncer de ovario de manera posterior al tratamiento (81). La disminución en la expresión de las proteínas MSH2 y MLH1 está asociada con la resistencia intrínseca y adquirida al CDDP. Ya que el carboplatino induce el mismo tipo de lesiones en el ADN que el CDDP y, además, se ha modelado que son reconocidas por MSH2 y MLH1 (82), es posible especular que la pérdida en la expresión de estas proteínas se asocia con el fenómeno de resistencia adquirida al carboplatino. Sin embargo, se requieren de estudios que comprueben esta propuesta.

Otro mecanismo de reparación del ADN que participa en la resistencia a los compuestos platinados es la síntesis a través de la lesión. Durante este proceso, la célula continúa con la replicación del ADN a pesar de la presencia de las lesiones, actuando como un mecanismo de tolerancia al daño. Para ello, un grupo de ADN polimerasas específicas tales como POLH, POLI, POLK, POLZ participan en este proceso (83). Adicionalmente, la POLH, así como la POLZ reconocen con alta afinidad los aductos 1-2-d(GpG) causados tanto por el CDDP como por el oxaliplatino (84). Estudios recientes realizados en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar y de cáncer de vejiga demostraron que la expresión incrementada de la POLH se relacionó con la resistencia al tratamiento por CDDP (85). Este trabajo demostró que modificaciones post-transcripcionales como la poli-adenilación alternativa del mRNA de la POLH produce tres isoformas de distinto tamaño. La isoforma del mRNA de menor tamaño participó principalmente en la resistencia al CDDP. Estos resultados muestran la relevancia que presentan las isoformas de un gen en el fenómeno de la resistencia intrínseca al CDDP. Resultados similares se han obtenido en modelos de resistencia adquirida, en donde las células resistentes al CDDP incrementaron la expresión del mRNA y de la proteína de la POLH en comparación con las células sensibles (86). Estos hallazgos se han replicado en estudios clínicos que reportan la expresión incrementada de POLH en muestras provenientes de cáncer de pulmón posterior al tratamiento. Estos resultados se asociaron con menor supervivencia de los pacientes (87).

De manera colectiva, los hallazgos antes mencionados remarcan la relevancia que tienen los sistemas de reparación del ADN como mecanismos de resistencia a los compuestos platinados. Las observaciones realizadas en estudios clínicos sugieren que el nivel de expresión de las proteínas que participan en estos procesos pudiera ser empleado como marcador predictivo de respuesta a los tratamientos. Actualmente, como estrategia para contrarrestar la reparación de las lesiones causadas al material genético, diversos compuestos derivados del Platino IV se encuentran en desarrollo. Este tipo de compuestos, por su estructura conformacional, tienen la capacidad de inhibir el sistema NER cuando se unen al ADN (88).

1.4.4. Evasión de la muerte celular

Las lesiones causadas al material genético y el daño por estrés oxidante inducido por los compuestos platinados activan distintas vías de señalización intracelular, las cuales provocan la muerte celular, principalmente por apoptosis. La muerte celular apoptótica es denominada como un tipo de muerte celular regulada, debido a que es controlada por la expresión de distintos genes cuyos productos favorecen el desmantelamiento de las células (89). La apoptosis participa en diferentes procesos fisiológicos como en el desarrollo embrionario y en el constante recambio celular de los tejidos. La apoptosis también es inducida por alteraciones del microambiente extracelular e intracelular que causan perturbaciones en la homeostasis (89). En este último caso, la vía intrínseca de la apoptosis se activa por la presencia de estrés intracelular como el daño causado por RONS, el estrés del retículo endoplásmico o daño en el ADN (89). En el cáncer, debido al proceso de transformación celular, se presentan alteraciones genéticas y epigenéticas en los genes que forman parte de la maquinaria apoptótica. Diversas evidencias implican que las alteraciones moleculares en la vía de la apoptosis están asociadas con la resistencia a compuestos platinados (36).

Como se mencionó previamente, el factor de transcripción p53 es estabilizado y activado por las proteínas que detectan el daño causado por los compuestos platinados en el ADN. Este factor de transcripción participa en la integración de señales causadas por daño en el material genético, principalmente controlando la transcripción de genes que regulan el ciclo celular y la muerte por apoptosis (90). El gen que codifica para p53, con actividad supresora de tumor, se encuentra alterado en más del 50% de los tumores humanos (91). Modelos *in*

in vitro en líneas celulares de cáncer de ovario, pulmón, testicular y osteosarcoma con el gen silvestre de p53, mostraron sensibilidad al efecto citotóxico de los compuestos platinados en comparación con líneas celulares que presentan mutaciones en este gen o expresión disminuida (92,93).

Estudios clínicos en pacientes con cáncer de ovario que presentan mutaciones en el gen p53 se asociaron con menor respuesta al tratamiento empleando oxaliplatino (94). En este sentido, las alteraciones en el gen de p53 pudieran ser empleadas como marcador pronóstico al tratamiento con compuestos platinados. Sin embargo, investigaciones realizadas recientemente empleando modelos *in vitro* demostraron que, bajo ciertas condiciones biológicas, la sobre-expresión del gen silvestre de p53 también se encuentra asociada con el fenómeno de resistencia. En este sentido, las líneas celulares pluripotenciales de cáncer de ovario mostraron que, posterior a la exposición de carboplatino, sobre-expresaron la proteína ARF que antagonizó la función de MDM2 e inhibió la degradación de p53, favoreciendo la formación de agregados de p53 en el núcleo celular. Los agregados de p53 se unen con distintas proteínas que participan en las vías de señalización asociadas con la progresión tumoral y el fenómeno de resistencia al tratamiento (95). Adicionalmente, se ha observado que las células tumorales tetraploides exhiben resistencia al tratamiento con CDDP y oxaliplatino. La eliminación de p53 en estas células tetraploides las sensibiliza al tratamiento con estos compuestos platinados (96). Estos hallazgos remarcan la importancia del contexto biológico sobre la función de p53, en donde bajo ciertos estadios de diferenciación o ploidía puede contribuir al fenómeno de resistencia en el tratamiento con agentes antitumorales.

Adicionalmente, diversas alteraciones moleculares en las proteínas que controlan la muerte apoptótica han sido asociadas al fenómeno de resistencia a compuestos platinados. Distintos estudios *in vitro* reportaron que alteraciones en las proteínas de la familia 2 del linfoma de células B (BCL-2) con actividad pro-apoptótica como BAX y BAK, y antiapoptótica como BCL-2, BCL-XL y MCL-1, impactan en la sensibilidad al CDDP (97–99). Asimismo, alteraciones en las enzimas que controlan la apoptosis como las caspasas y las calpaínas se encuentran asociadas al fenómeno de resistencia a los compuestos platinados en líneas celulares (100). A la fecha existen pocos estudios clínicos que investiguen la asociación entre la expresión de estas proteínas con el fenómeno de resistencia a compuestos platinados. Sin embargo y con base en estudios *in vitro*,

actualmente se encuentran en desarrollo moléculas análogas a los miembros proapoptóticos de la familia de BCL-2. Estas moléculas han sido diseñadas para interactuar con BCL-2, BCL-XL y MCL-1 causando la liberación de BAX y BAK e induciendo la apoptosis. Investigaciones recientes en líneas celulares de cáncer de pulmón reportan que la combinación de estas moléculas con CDDP incrementa la eliminación de las células tumorales (42,101).

1.4.5. Activación de las vías que favorecen la sobrevivencia celular

Como respuesta al daño causado por diversos agentes físicos, químicos o biológicos, las células activan mecanismos endógenos que estimulan su sobrevivencia (102). Estas vías son principalmente activadas por distintos receptores con actividad de cinasa para residuos de tirosina (RTKs). En el cáncer, estos receptores de superficie se encuentran constitutivamente activos debido a su sobre-expresión o a mutaciones presentes en el dominio intracelular tipo cinasa (103). En los tumores de mama, ovario y pulmón, el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) presenta distintas alteraciones moleculares, que promueven el crecimiento, la angiogénesis y la metástasis de los tumores (104). La constitutiva activación de estas vías, las cuales no participan directamente en el mecanismo de acción de los compuestos platinados, contrarrestan el daño producido por los agentes antitumorales.

Granados et al. reportó que las células de cáncer de ovario en exposición continua a CDDP, en concentraciones similares a las detectadas de manera sistémica en los pacientes, indujo la activación del EGFR (105). Las células con resistencia adquirida incrementaron la metilación en el ADN de manera dependiente a la activación de las enzimas con actividad de metilasas para el ADN, fenómeno regulado por el EGFR. Otro estudio realizado en líneas celulares de cáncer gástrico reportó que la exposición prolongada al oxaliplatino promovió la adquisición de resistencia al tratamiento, asociada a la sobre-expresión de la proteína 2 parecida a ataxina (ATXN2L) (106). Esta proteína regula la formación de gránulos de estrés, los cuales se forman en la célula para resguardar los complejos bloqueados de pre-iniciación de la transcripción, contrarrestando el daño causado por agentes antitumorales (107). Este trabajo demostró que la expresión de ATXN2L fue regulada por la activación del eje de EGFR/PI3K/AKT. En este sentido, el silenciamiento del gen EGFR sensibilizó a las células al tratamiento con oxaliplatino. Estudios en muestras histológicas provenientes de

pacientes con cáncer gástrico, reportaron que la sobre-expresión de ATXN2L se encuentra asociada a mal pronóstico de la enfermedad (106). De manera contrastante, otros estudios clínicos reportan una asociación débil entre la sobre-expresión de los receptores de la familia de EGFR y la resistencia a los compuestos platinados (108).

Estudios realizados en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar con resistencia adquirida al CDDP, reportaron que la vía PI3K/AKT/NF- κ B se encuentra sobre-activada (109). La activación de esta vía de señalización favoreció la sobrevivencia de las células mediante la inducción de la transición epitelial-mesenquimal y la expresión de moléculas antiapoptóticas (109). Adicionalmente, en este trabajo se reportó que la administración del flavonoide baicalina en las células resistentes inhibió la activación de la vía PI3K/AKT/NF κ B, promoviendo la sensibilidad de estas células al CDDP.

Otro mecanismo que se activa como respuesta a la diversidad de condiciones estresantes es la autofagia (110). La autofagia es una vía catabólica conservada a través de la evolución, en la cual organelos, moléculas y porciones del citoplasma son secuestradas dentro de estructuras de doble membrana, llamadas autofagosomas, para su posterior degradación lisosomal (111). La autofagia es activada en células tumorales por la disminución en la concentración de Oxígeno en el ambiente (hipoxia), la escasez de nutrientes o la presencia de daño en el ADN y actúa como un mecanismo de citoprotección (112,113). Líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar bajo condiciones de hipoxia inducen la autofagia favoreciendo la resistencia al CDDP. Asimismo, la exposición inicial a CDDP de estas líneas celulares estimuló la activación de la autofagia, fenómeno que se acentuó cuando las células se cultivaron en condiciones hipóxicas (114). En este sentido, la autofagia tiene la capacidad de degradar moléculas u organelos dañados a causa del estrés inducido por los compuestos platinados, impidiendo que se propague el daño en la célula (112). Estos hallazgos explican, en parte, el por qué las células presentes en zonas hipóxicas de un tumor son refractarias no solamente a la quimioterapia, basada en compuestos platinados, sino a otros agentes antitumorales. Además, remarcan el impacto que tiene el microambiente tumoral en la efectividad del tratamiento.

Pagotto et al. reportó en células pluripotenciales de cáncer de ovario la asociación entre la activación de la autofagia con la resistencia al carboplatino. En este estudio la inhibición farmacológica o genética de la autofagia, empleando cloroquina o mediante el

silenciamiento del gen ATG5, respectivamente, sensibilizó a las células a la exposición con carboplatino (115). En este sentido, la administración simultánea de la quimioterapia con moléculas inhibidoras de la autofagia parece ser una estrategia prometedora para eliminar la resistencia a moléculas platinadas. Sin embargo, resultados contrastantes se han obtenido en líneas celulares de cáncer de laringe. La administración simultánea de CDDP con moléculas análogas a la rapamicina estimula la autofagia con incremento en la proporción de células muertas (116). Debido a los resultados anteriores, se están realizando grandes esfuerzos que permitan diferenciar entre la actividad citoprotectora de la autofagia de la actividad relacionada a la muerte celular mediada por este mismo proceso.

2. Antecedentes

A pesar de la alta respuesta clínica que tiene la administración del CDDP en tumores testiculares, en el cáncer de pulmón se ha reportado que alrededor de un 20 – 25% de pacientes tratados con CDDP como monoterapia presentan una respuesta inicial favorable (117). Sin embargo, de manera eventual los pacientes experimentan progresión de la enfermedad caracterizada por el crecimiento del tumor, el cual se vuelve refractario al efecto de la quimioterapia. A este fenómeno de resistencia se le ha denominado como resistencia secundaria o adquirida.

Adicionalmente, se ha reportado que un grupo de pacientes tratados con CDDP no presentan de manera inicial una respuesta clínica favorable y por lo tanto no se benefician con la terapia. A este fenómeno se le ha denominado como resistencia intrínseca (118). A pesar que las causas biológicas de este fenómeno aún se desconocen, en años recientes se han realizado investigaciones en tumores distintos al cáncer pulmonar para explicar la resistencia intrínseca en una diversidad de compuestos antitumorales. Una de las principales causas de la resistencia intrínseca es la presencia de mutaciones en genes que codifican para proteínas que forman parte de los blancos moleculares del CDDP, o bien participan en las vías de señalización responsables del efecto citotóxico. Recientemente, Li et al., identificó que las mutaciones en el gen *GREB1* están asociadas a un mal pronóstico de la enfermedad en pacientes con adenocarcinoma pulmonar (119). Sin embargo, los mecanismos genéticos no son la única causa asociada a la resistencia intrínseca al CDDP. Adicionalmente, la heterogeneidad celular, representada por una vasta cantidad de poblaciones celulares, cada una exhibiendo características moleculares particulares, también contribuye de manera significativa al fenómeno de resistencia

intrínseca. Diversos estudios reportan que en biopsias de pacientes con cáncer pulmonar, existen zonas que muestran subclonas de células tumorales con distintas mutaciones así como en el grado de inestabilidad cromosómica (120). Además de los mecanismos genéticos asociados a la resistencia intrínseca al CDDP, recientemente se ha demostrado que existen distintas poblaciones celulares las cuales muestran diferencias “estocásticas”. Estas diferencias estocásticas repercuten en la expresión de moléculas, tales como mRNA o RNA no codificantes, que en conjunto confieren una ventaja selectiva de manera previa o posterior al tratamiento con diversos agentes antitumorales. Estudios iniciales en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar con mutaciones en el gen *EGFR* (121) demostraron que un grupo de células sobrevivió de manera posterior a una sola exposición a TKI's. Estas células, denominadas como células tolerantes persistentes a los fármacos (DTPs por sus siglas en inglés), muestran proliferación reducida mediada por la disminución de la replicación del DNA y el control del ciclo celular (122); remodelamiento de la cromatina controlado por demetilinasas de histonas (123); alteraciones en el metabolismo oxidante de ácidos grasos y glucosa (124,125); y la activación de DNA polimerasas con mayor margen de error (126). Las células DTPs muestran diversos grados de proliferación cuando se encuentran expuestas al fármaco. Estudios recientes reportan que las células DTPs derivadas de líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar en presencia de osimertinib muestran la capacidad de proliferar (127). Durante este fenómeno, esta clona de células DTPs que prolifera reprograma su metabolismo, activando genes que controlan la oxidación de ácidos grasos y la producción de moléculas antioxidantes. Sorprendentemente, las células DTPs que proliferan en presencia del fármaco se originan de una clona de células que muestra un programa metabólico y transcripcional completamente distinto al de las células DTPs que inhiben su proliferación.

Por el contrario, cuando las células DTPs son cultivadas en ausencia del fármaco, adquieren nuevamente la capacidad de proliferar mostrando características morfológicas y de sensibilidad al fármaco similares que el cultivo parental (121). Este estado transitorio de resistencia se encuentra gobernado por modificaciones epigenéticas que controlan la activación de las vías relacionadas con la proliferación, el metabolismo celular y la traducción de mRNA (128). Sin embargo, cuando estas células se cultivan durante mayor tiempo en presencia del fármaco, de manera eventual surgen clonas de células mostrando

mecanismos de resistencia más estables; por lo que a las células DTPs se les considera un reservorio de células que desarrollan resistencia adquirida a los fármacos (129).

Dada la importancia de las células DTPs, las investigaciones actuales están enfocadas en el estudio de biomarcadores expresados exclusivamente por estas células y que pudieran ser empleados como potenciales blancos moleculares. A este respecto se ha reportado que las células DTPs derivadas del tratamiento con TKIs son vulnerables a inhibidores de demetilinasas de histonas e inhibidores de enzimas que participan en el metabolismo del glutatión o en la oxidación de los ácidos grasos (123,127,130). De esta manera, la inhibición de las vías que favorecen la sobrevivencia de las células DTPs al CDDP pudiera representar una prometedora estrategia para eliminarlas.

A pesar del progreso obtenido en este campo, las investigaciones actuales se han enfocado en el empleo de modelos que evalúan los eventos moleculares de las células DTPs después de dos o más semanas de exposición a los fármacos antitumorales y no en etapas tempranas de su desarrollo, en donde pudieran ser más vulnerables. Con respecto al CDDP, solamente un trabajo ha reportado las alteraciones transcripcionales de las células DTPs de osteosarcoma, posterior a la exposición a este compuesto (131). Sin embargo, los mecanismos moleculares asociados al desarrollo de células DTPs en adenocarcinoma pulmonar de forma posterior a la exposición con CDDP aún son desconocidos.

Estudios *in vitro* realizados por nuestro grupo han demostrado que en líneas de adenocarcinoma pulmonar que llevan el gen silvestre para el *EGFR*, el efecto inducido por el CDDP es variable entre cada una de ellas. Con estos resultados iniciales nosotros esperamos que existan diferencias en el transcriptoma entre las células tratadas y las no tratadas, así como entre cada una de estas líneas celulares, de manera que algunas podrían presentar resistencia inicial al fármaco, fenómeno que explicaría la diferencia en la respuesta clínica al CDDP en los pacientes. El objetivo del presente trabajo es investigar en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar, que presentan el gen silvestre para *EGFR* u otras mutaciones asociadas a mal pronóstico, las alteraciones transcripcionales inducidas por la exposición al CDDP en etapas iniciales del desarrollo de las DTPs. Los hallazgos derivados de esta investigación contribuyen en la identificación de genes que en un futuro puedan ser empleados como marcadores moleculares que permitan predecir el

pronóstico y la respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer pulmonar, y por lo tanto mejorar la sobrevida total del paciente.

3. Hipótesis

Las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar con el gen silvestre del *EGFR* o mutaciones asociadas a mal pronóstico presentan resistencia intrínseca al CDDP, por lo que el estudio del transcriptoma en las células persistentes soslayará estos mecanismos e identificará biomarcadores asociados a mejor respuesta al tratamiento.

4. Objetivos

General

Analizar por secuenciación de mRNA el transcriptoma de líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar con el gen silvestre del *EGFR* o mutaciones asociadas a mal pronóstico, de manera previa y posterior a la exposición a CDDP, para identificar genes asociados con la resistencia intrínseca.

Particulares

- Estudiar el efecto citotóxico que induce la exposición al CDDP en las líneas celulares y conocer la CL_{50} .
- Obtener y secuenciar el mRNA total de las líneas celulares expuestas y no expuestas al CDDP.
- Realizar el análisis bioinformático del transcriptoma de las líneas celulares en las condiciones experimentales mencionadas.
- Identificar y seleccionar los posibles blancos moleculares en las células persistentes al tratamiento comparado con células no expuestas al CDDP.
- Validar la expresión y funcionalidad de los genes seleccionados.

5. Metodología

5.1. Líneas celulares

Las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar empleadas fueron las siguientes: A549, SKLU-1 (mutación en *KRAS*), H1299 (mutación en *NRAS*), H1437 y H1573 (mutación en *KRAS*) obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas VA); las líneas 1.3.11 (mutación en *PI3KCA*) y 3B1A (sin mutaciones detectadas) fueron derivadas a partir de derrame pleural de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar sin tratamiento (132–134).

Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Hyclone, Issaquah WA) (10% v/v) y antibióticos (Gibco, Waltham MA). Los cultivos celulares se mantuvieron en un ambiente humidificado a 37°C y 5% de CO₂. Los cultivos a confluencia fueron tratados con una disolución de tripsina-verseno (InVitro, Ciudad de México, México) y tratamiento mecánico para facilitar su desprendimiento.

Los ensayos fueron realizados en placas de 96 pozos y cajas de cultivo T₂₅ y T₁₇₅. Ya que las líneas celulares mostraron una específica rapidez de crecimiento, previamente a los experimentos se determinó la cantidad necesaria de células para que al iniciar los ensayos los cultivos tuvieran una sub-confluencia aproximada al 60 – 70% y el control sin tratamiento, al final del cultivo, llegara a una sub-confluencia aproximada del 90%.

5.2. Preparación del compuesto

El cis-diaminodichloroplatino (II) (CDDP) se obtuvo de Sigma (St. Louis MO) y se disolvió en disolución salina isotónica (SSI) para obtener un stock a concentración de 2 mM.

5.3. Análisis del estatus mutacional de las líneas celulares por secuenciación dirigida

Con la finalidad de identificar en las líneas celulares empleadas las mutaciones en genes *driver* de importancia clínica en tumores sólidos, se empleó la secuenciación dirigida utilizando el TruSight tumor 15 kit (Illumina, San Diego CA). Las células fueron cultivadas en cajas T₇₅ a una densidad de 5.5x10⁶ (A549, H1437, SKLU-1, H1299 y 1.3.11), 1.1x10⁷ (H1573) y 1.2x10⁷ (3B1A) células por caja. De los cultivos a confluencia se extrajo el DNA total utilizando el Pure link genomic DNA mini kit (Thermo Fisher, Waltham MA). La pureza del DNA excedió el valor de 1.8 con respecto a la relación de la absorbancia a 260/280 nm. Las librerías de DNA se prepararon empleando las instrucciones del kit y fueron

secuenciadas en el equipo MiSeq (Illumina, San Diego CA) para detectar la presencia de mutaciones en 15 genes *driver* del cáncer (*AKT1*, *BRAF*, *EGFR*, *ERBB2*, *FOXL2*, *GNA11*, *GNAQ*, *KIT*, *KRAS*, *MET*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *RET* y *TP53*).

5.4. Curvas dosis-respuesta y cálculo de la CL₅₀ del CDDP

Las células se cultivaron en placas de 96 pozos a una densidad de 1.2x10⁴ células (A549, SKLU-1 y H1299), 2x10⁴ células (1.3.11, H1437 y A427) y 5x10⁴ células (3B1A y H1573) por pozo durante 24 h para permitir su adhesión a la superficie. Para estudiar el efecto que induce el CDDP, se retiró el sobrenadante de los cultivos y se adicionaron 100 µL de diluciones seriadas desde 5 µM hasta 160 µM hasta cumplir 24 h. En este rango de concentraciones se incluyó la concentración plasmática de CDDP detectada en pacientes, la cual es de 10 a 20 µM (135,136). Como control, se emplearon células en presencia de medio de cultivo sin CDDP. Al finalizar el tiempo de incubación, se cuantificó la citotoxicidad inducida por el CDDP empleando el kit TACS MTT Cell proliferation assays (Trevigen, Gaithersburg MD). Se adicionaron 10 µL del reactivo MTT a cada pozo y la placa se incubó durante 4 h, a 37°C y en la oscuridad. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y adicionaron 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada pozo y la placa se agitó durante 90 min a temperatura ambiente (T.A). Finalmente, se cuantificó la absorbancia del producto colorido (formazán) a 560 nm de longitud de onda empleando el lector de placas Multiskan Ascent (Thermo, Waltham MA).

El porcentaje de viabilidad de cada pozo se calculó considerando los pozos sin tratamiento como el porcentaje de máxima viabilidad. Con los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de citotoxicidad inducida por el CDDP y se obtuvieron las curvas dosis – respuesta para cada línea celular. Con base en las curvas obtenidas, los datos se linearizaron empleando los modelos de Linweaver-Burke (comportamiento hiperbólico) o de Schild (comportamiento sigmoideo) y se obtuvo la CL₅₀.

Para los experimentos subsecuentes, las líneas celulares fueron tratadas con CDDP a una concentración que indujera el máximo efecto citotóxico. Las concentraciones de CDDP empleadas fueron de 40 µM para las líneas A549 y H1437; 60 µM en las líneas 1.3.11 y 3B1A; 80 µM para la línea H1299 y 100 µM para las líneas celulares H1573 y SKLU-1. Los cultivos celulares fueron expuestos al CDDP por 24 h.

5.5. Cambios morfológicos asociados a la muerte celular e inducidos por el CDDP

Con el fin de detectar los cambios morfológicos inducidos por la exposición a CDDP, las líneas celulares fueron cultivadas en placas de 96 pozos empleando las condiciones experimentales mencionadas previamente. Los cambios morfológicos evaluados fueron: la disminución del tamaño celular, el *blebbing* de la membrana, la presencia de cuerpos apoptóticos y el incremento en el volumen celular. Los cultivos celulares fueron observados a lo largo del tratamiento para detectar el tiempo en el cual se presentan estos cambios y se obtuvieron micrografías a diferentes aumentos empleando el microscopio de campo claro EVOS FL (Thermo, Waltham MA).

5.6. Cuantificación del porcentaje de células apoptóticas y necróticas

Con la finalidad de cuantificar las células viables, apoptóticas y necróticas tras el tratamiento con CDDP, las células se cultivaron en cajas T₂₅ a 7×10^5 (A549, SKLU-1, y H1299) y 3×10^6 (1.3.11, H1573 y 3B1A) y fueron tratadas bajo las condiciones experimentales previamente mencionadas. El porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas se cuantificó empleando el ensayo de FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, Franklin Lakes NJ). Ya que el proceso de muerte celular es un evento dependiente del tiempo, se realizó una cinética del tratamiento a lo largo del experimento. En breve, al finalizar los tiempos de cultivo, las células fueron recuperadas y la suspensión de células fue dividida en dos fracciones: la primera se empleó para realizar la cuantificación de células viables, apoptóticas y necróticas y la segunda para cuantificar la actividad de las enzimas caspasa-3/7. De la primera fracción, las células se lavaron con una disolución de PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ y se contaron para tomar un volumen conteniendo 1×10^6 células. Las suspensiones se centrifugaron a 1600 rpm por 7 min a T.A y el botón de células se resuspendió en Binding Buffer. Posteriormente, se transfirieron de $2 - 3 \times 10^5$ células a un tubo y se tiñeron con FITC-Anexina V y yoduro de propidio (PI) y se incubaron 15 min a T.A en la oscuridad. Finalizado el tiempo de incubación, se adquirieron por lo menos 15, 000 eventos empleando el citómetro de flujo FACS CANTO II (BD, Franklin Lakes NJ). Los porcentajes de células apoptóticas y necróticas se analizaron empleando el programa FlowJo V10 (Ashland OR).

5.7. Detección de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa

Con el propósito de estudiar el efecto citotóxico inducido por el CDDP, se cuantificó la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos celulares empleando el Cytotoxicity Detection Kit LDH (Roche, Indianapolis IN). Brevemente, las líneas celulares fueron cultivadas en placas de 96 pozos y tratadas con el CDDP bajo las condiciones experimentales previamente mencionadas. Adicionalmente, algunas células fueron expuestas a una disolución de Tritón X-100 al 2%(v/v) (control positivo de liberación máxima de LDH) o a medio de cultivo sin CDDP (control negativo). Al finalizar el tratamiento, los sobrenadantes de los cultivos celulares fueron recolectados y centrifugados a 2000 xg por 5 min a T.A. Posteriormente, se transfirieron 50 μ L de los sobrenadantes a una placa de 96 pozos y mezclaron con 150 μ L de la mezcla de reacción. La placa se incubó en la oscuridad por 30 min e inmediatamente se midió la absorbancia a 492 nm en el lector de placas Multiskan Ascent (Thermo, Waltham MA). El porcentaje de liberación de la LDH fue calculado empleando la siguiente ecuación (137):

$$\% \text{ Liberación de la LDH} = \frac{DO_{\text{problema}} - DO_{\text{control negativo}}}{DO_{\text{control positivo}} - DO_{\text{control negativo}}} \times 100$$

5.8. Cuantificación de la actividad de caspasa-3/7

Con el objetivo de estudiar si la muerte celular detectada fue mediada por las caspasas 3/7, la actividad de las enzimas se cuantificó en la fracción restante del ensayo anterior. Las células se lavaron con disolución salina isotónica, el botón se resuspendió en 80 μ L de amortiguador de lisis y se incubó durante 10 min en hielo. Posteriormente, los extractos celulares se centrifugaron a 10,000 xg durante un min y del sobrenadante se transfirieron 50 μ L a una placa oscura de 96 pozos, el resto fue almacenado a -80°C para cuantificar proteínas. A cada pozo de la placa oscura se adicionó 50 μ L de 2X Reaction Buffer y 5 μ L de sustrato DEVD-AFC del kit Caspase-3 Fluorometric Assay (R&D Systems, Minneapolis MN). Como control de células en apoptosis se tomaron los sobrenadantes de los cultivos que contienen preferentemente células apoptóticas y como control negativo se emplearon células en medio de cultivo sin CDDP. La placa se incubó durante 2 h en la oscuridad a 37°C. Finalmente, la fluorescencia fue medida en el lector de placas Fluoroskan Ascent (Thermo, Waltham MA) empleando los filtros de excitación y emisión 390 nm y 485 nm, respectivamente.

5.9. Cuantificación de proteínas

De los extractos celulares obtenidos se cuantificaron las proteínas utilizando el ensayo Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL). Los extractos celulares provenientes del ensayo de caspasa-3/7 se diluyeron 1:50 con agua desionizada. Se adicionaron 150 μ L de las diluciones de los extractos celulares en una placa de 96 pozos y se adicionaron 150 μ L de la solución de BCA. Se realizó la curva estándar de calibración empleando diluciones del estándar de albúmina. La placa se incubó durante 2 h a 37°C en la oscuridad y las lecturas de la absorbancia de cada pozo se obtuvieron en el lector de placas Multiskan Ascent (Thermo, Waltham MA) a 562 nm de longitud de onda. Los valores de la absorbancia de las muestras problema se interpolaron en la curva de calibración y el valor de la concentración obtenida se multiplicó por el factor de dilución.

5.10. Análisis del ciclo celular en células tolerantes-persistentes al CDDP

Para estudiar las alteraciones en el ciclo celular inducidas por el CDDP, las células fueron cultivadas en cajas T₂₅ bajo las mismas condiciones experimentales previamente mencionadas. Al finalizar el cultivo, se recuperaron las células adherentes (viables) y las células del sobrenadante (muertas), se lavaron con PBS, se fijaron con etanol frío al 70% (v/v) y se almacenaron a -20°C por al menos 24 h. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con una disolución de PBS conteniendo Tritón X-100 al 0.1% (v/v) y RNAasa A (30 μ g/mL) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) para evitar la tinción inespecífica del RNA. Finalmente, el DNA fue teñido con PI (Invitrogen, Waltham, MA) y las células se incubaron en la oscuridad a T.A por 30 min. Finalizada la incubación, el contenido de DNA se midió utilizando el citómetro FACS CANTO II (BD, Franklin Lakes NJ).

Para el análisis de los resultados, primero se seleccionaron los eventos individuales empleando una gráfica de puntos FSC-A/FSC-H. Posteriormente, a partir de esta región, una nueva región para las células DTPs al CDDP se estableció y se obtuvo una gráfica de puntos PI-A/FSC-A. Finalmente, se elaboraron los histogramas para cuantificar el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular utilizando el programa FlowJo V10. Para este análisis, un total de 10,000 eventos se adquirieron de la región de células DTPs al CDDP.

5.11. Extracción de RNA y preparación de las bibliotecas

Las células fueron cultivadas en cajas T₁₇₅ bajo las mismas condiciones experimentales previamente mencionadas. Para aislar las células viables o DTPs al CDDP, finalizado el tiempo de cultivo, los sobrenadantes conteniendo células muertas se descartaron y las células adherentes se lavaron con medio RPMI hasta no observar células muertas. Posteriormente, las células adherentes se tripsinizaron y preservaron en RNAlater (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) a -30°C.

El RNA total se extrajo empleando el RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Alemania). La concentración del RNA se midió utilizando el Qubit RNA HS Assay Kit y empleando el flurómetro Qubit 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA).

A partir de 2 µg de RNA total se construyeron las bibliotecas empleando el TruSeq RNA Sample Prep kit v2 (Illumina, San Diego, CA) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. En breve, el RNA poliadenilado se purificó empleando perlas magnéticas acopladas al oligonucleótido poly-dT. El polyA-RNA purificado se fragmentó y la primera cadena de cDNA se sintetizó utilizando hexámeros de primers aleatorios y a la transcriptasa reversa SuperScript II. Subsecuentemente, la segunda cadena de cDNA se sintetizó. Las cadenas de cDNA fueron adeniladas en los extremos 3' y se ligaron con el set A de adaptadores TruSeq RNA Single Indexes. Las cadenas de cDNA ligadas a los adaptadores, fueron purificadas empleando perlas magnéticas acopladas a secuencias complementarias de los adaptadores. Posteriormente, las cadenas de cDNA purificadas se amplificaron por PCR y la calidad de los productos amplificados se analizó empleando el 2100 expert High Sensitivity DNA kit en el equipo 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent, Santa Clara, CA). Posteriormente, se realizó la formación de los clusters de las secuencias empleando el NextSeq 500/500 Mid Output Reagent Cartridge v2 (Illumina, San Diego, CA). Finalmente, las librerías fueron secuenciadas en el Illumina NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA) generando lecturas pareadas (Paired End) y con una longitud de 75 pb cada una y a una profundidad de aproximadamente 30 millones de lecturas por muestra.

5.12. Análisis bioinformático de los datos de secuenciación

El análisis bioinformático de las lecturas obtenidas por secuenciación se realizó siguiendo el flujo de trabajo representado en la figura 1 y empleando programas validados y reportados en diversas publicaciones en revistas de impacto (138).



Figura 1. Flujo de trabajo empleado para el análisis bioinformático de los datos de secuenciación de RNA (RNA-seq)

La calidad de lecturas fue evaluada empleando el software FastQC v0.11.8 (139) y MultiQC v1.6 (140) y el cálculo del porcentaje del Q30 se realizó con BBTools v38.69. Posteriormente, las lecturas fueron filtradas para seleccionar aquellas que tuvieran una calidad igual o mayor a 25 (escala de phred +33) y eliminando aquellas con la posible presencia de los adaptadores, empleando los softwares Trimmomatic v0.38 y Cutadapt v2.1-0, respectivamente (141,142). Para identificar los adaptadores, se emplearon las secuencias AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA para la lectura 1 (*forward*) y AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT para la lectura 2 (*reverse*). La calidad de los datos generados por el procesamiento anterior fue nuevamente analizada. Una vez filtradas las lecturas, se realizó el alineamiento y el mapeo con respecto al ensamble más reciente del genoma humano vGRCh38/hg38 y empleando el software STAR v2.7.0f-0 (143). El conteo de las lecturas alineadas se realizó empleando el programa RSEM v1.3.1-1 (144), el cual permite estimar la abundancia de las lecturas alineadas a nivel de isoforma o de gen. Posteriormente, las matrices de cuentas crudas fueron exportadas al lenguaje de programación R v4.0.4 y el análisis de expresión diferencial se realizó con la librería edgeR v3.32.1 (145). Los genes mostrando un valor de p ajustada (FDR) < 0.01 y el logaritmo base 2 de las veces de cambio $\geq |1|$ fueron considerados con expresión diferencial significativa (DEG).

Adicionalmente, la anotación de los transcriptomas se realizó por medio del análisis de enriquecimiento por set de genes (GSEA) empleando el programa de fGSEA v4.1. El análisis se efectuó empleando 10,000 permutaciones por set de datos y utilizando las bases de datos de KEGG, Reactome y Gene Ontology Biological Processes.

A partir de las listas de DEG, se obtuvieron aquellos que fueran comunes entre las células DTPs de las líneas celulares analizadas y anotados como codificantes. A partir de esta lista de genes se construyó una red de interacción proteína – proteína (PPI por sus siglas en inglés), descargando la información de las interacciones de la base de datos de STRING. La red obtenida se curó utilizando la librería de igraph v1.2.6, removiendo nodos que mostraran múltiples conexiones redundantes. Posteriormente, para cada gen se obtuvieron los valores de cuatro métricas asociadas a la centralidad de la red: la intermediación (betweenness), el grado de conexión (degree), la cercanía (closeness) y los valores eigen. La selección del parámetro de centralidad más preponderante se realizó por medio de un análisis de componentes principales, seleccionando aquel que explicara el mayor porcentaje de variación en la red. Los genes con mayor centralidad de la red se extrajeron tomando en cuenta el valor logarítmico del parámetro de centralidad más relevante y seleccionando aquellos ubicados en el percentil 75. Finalmente, para detectar las comunidades de genes más importantes de la red, se realizó un análisis de detección de comunidades basado en la intermediación de las conexiones. La anotación funcional de las comunidades detectadas se efectuó empleando la librería de clusterProfiler v4.0.5 (146) mediante el análisis de enriquecimiento por sobre-representación (ORA por sus siglas en inglés) con respecto a las vías la base de datos de Gene Ontology Biological Processes.

5.13. Validación de los resultados de secuenciación

Las líneas celulares fueron cultivadas en cajas T₂₅ y tratadas bajo las mismas condiciones experimentales previamente mencionadas. Al finalizar el cultivo, las células se centrifugaron y se lavaron con SSI estéril. El botón de células se dividió en dos fracciones: en una se extrajo el RNA total para cuantificar la expresión de los genes centrales por RT-qPCR y la segunda se empleó para extraer las proteínas totales y medir la expresión por Western Blot.

La extracción de RNA se realizó empleando el Purelink RNA Mini Kit (Ambion, Austin TX) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se sintetizó el cDNA utilizando el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Ambion, Austin Tx). La qPCR se realizó

en el termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City CA) empleando sondas Taqman para cada gen.

5.14. Análisis de sobrevida

A partir de la lista de los genes con mayor centralidad de la red, se procedió a realizar el análisis de sobrevida empleando los datos del proyecto Lung Adenocarcinoma (LUAD) de la base de datos pública GDC-TCGA. Los datos clínicos y de expresión se descargaron empleando las librerías RTCGA v1.22.0 y TCGAbiolinks v2.20.0, respectivamente. Los datos fueron curados eliminando muestras duplicadas y seleccionando aquellas procedentes de tumores primarios de pacientes tratados con CDDP y con datos existentes de sobrevida. Posteriormente, las muestras fueron categorizadas en dos grupos de acuerdo al nivel de expresión de los genes seleccionados y empleando el método de estadísticos de máximo rango seleccionado (147). El análisis de sobrevida se realizó mediante la regresión de cox univariada, utilizando el paquete de survival v3.2 y calculando el valor log-rank p . Valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos. Adicionalmente, se comparó la expresión de los genes detectados con mayor centralidad de la red, a nivel de mRNA, entre el tejido normal adyacente y el tumoral utilizando los datos de la cohorte del TCGA. Para cada gen se analizó la distribución de los datos empleando la prueba de Shapiro y la diferencia en la expresión se comparó mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

5.15. Western Blot

La extracción de proteínas de membrana y citoplasma se realizó empleando buffer de lisis preparado con NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM y Tritón X-100 al 1%. A partir de los extractos, se tomó una alícuota para cuantificar las proteínas empleando el Micro BCA Protein Assay Kit y siguiendo la metodología previamente mencionada. Un total de 20 μ g de proteínas fueron separadas en un gel al 15% de SDS-PAGE y posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Después de bloquear las uniones inespecíficas durante 1 h con una disolución de albumina al 2% en PBS, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios en contra SOCS1 (Abcam, RU) o β -actina (Sigma, Burlington, MA) (1:300) a 4° C durante toda la noche. Después de lavar, las membranas fueron incubadas con anticuerpos biotinilados (1:300) en contra de conejo o ratón (Dako, Santa Clara CA) durante 1 h a temperatura ambiente. Las bandas de las proteínas fueron visualizadas

empleando el Vectastain Elite ABC peroxidase kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y diaminobenzidina-H₂O₂ (Sigma, Burlington, MA)

5.16. Localización celular de SOCS1 en células tolerantes-persistentes a CDDP

Con el propósito de estudiar la localización celular de la proteína SOCS1 en las células DTPs a CDDP, las células se cultivaron en “chamber slides” de 4 pozos y expusieron al CDDP empleando las condiciones experimentales previamente mencionadas. Al finalizar el tratamiento, las células se lavaron con PBS y se fijaron con etanol absoluto. Las células se rehidrataron y permeabilizaron con una disolución de SDS al 1% en PBS. Posteriormente, las células se lavaron e incubaron por 30 min a TA con una disolución de suero de cerdo al 2% en PBS para bloquear las uniones inespecíficas. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo anti-SOCS1 (Abcam, RU) toda la noche a 4°C. Al día siguiente las células se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa Fluor 488 (Thermo Scientific, Waltham, MA USA) por 1h a TA. Después del lavado, las células se incubaron con DAPI durante 15 min a T.A. Finalmente, las laminillas se montaron y sellaron con VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame CA) y fueron observadas en el microscopio de epifluorescencia Leica DMLB 1005 (Leica, Wetzlar). Como control de tinción, se incluyó una laminilla en donde se omitió la adición del anticuerpo primario o secundario.

5.17. Silenciamiento de SOCS1

Debido a que la línea celular 3B1A mostró menor sensibilidad al tratamiento con CDDP y presentó mayor expresión de SOCS1 previamente al tratamiento, se estudió el impacto que tiene el silenciamiento de SOCS1 en la sensibilidad al CDDP en estas células. Las células fueron cultivadas en placas de 48 pozos a una densidad de 1x10⁵ células por pozo durante 24 h para permitir la adhesión al plástico. Posteriormente, las células se lavaron con medio RPMI libre de suero fetal bovino y se mantuvieron en este medio por 4 h. El silenciamiento de *SOCS1* se efectuó empleando el TriFECTa RNA kit (IDT, San Diego, CA) diluido en medio OptiMEM (Thermo Fisher, Waltham, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron con lipofectamina 3000 (Invitrogen, Carlsband, CA) conteniendo diferentes RNA de interferencia (DsiRNA) dirigidos en contra de los genes *SOCS1* y *HPRT1* a una concentración de 10 nM por 48 h. Los controles empleados para el ensayo fueron células tratadas con solamente lipofectamina (Mock), el control negativo conteniendo de

una secuencia no presente en el genoma humano y un control positivo de transfección consistiendo de lipofectamina y el fluorocromo TYE 563.

La eficiencia del silenciamiento se evaluó por medio de RT-qPCR. Después de 24 h de exposición, las células fueron expuestas a CDDP y la viabilidad celular se cuantificó mediante el ensayo del MTT, como se describió previamente. La expresión de SOCS1 se detectó por medio de inmunofluorescencia.

5.18. Análisis estadístico

Los resultados, obtenidos de experimentos independientes realizados por triplicado, se muestran como la media \pm SEM. Se empleó la prueba de t de Student para comparar la diferencia entre dos grupos, utilizando el software Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla CA). Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

6. Resultados

6.1. Curvas dosis-respuesta y cálculo de la CL₅₀ del CDDP

Con el propósito de estudiar el efecto inducido por el CDDP y determinar la CL₅₀ en las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar estudiadas, los cultivos celulares fueron expuestos a concentraciones seriadas del compuesto durante 24 h. En la Figura 2A se muestran las curvas dosis – respuesta del CDDP en las distintas líneas celulares. Se observó que en la mayoría de las líneas celulares el CDDP indujo un efecto citotóxico tras 24 h de exposición, el cual incrementó conforme a la concentración del compuesto. La citotoxicidad máxima alcanzada en la mayoría de las líneas celulares fue entre 60 – 90%. Sin embargo, las líneas celulares 3B1A y SKLU-1 mostraron resistencia al tratamiento con CDDP. En la línea celular 3B1A, concentraciones menores a 80 μ M indujeron un efecto citotóxico cercano al 40% y en la concentración de 160 μ M se mantuvo este efecto sin llegar al 50%. En el caso de la línea celular SKLU-1, en el rango de concentraciones evaluadas, la citotoxicidad se mantuvo entre 10 – 20% y sin alcanzar el 50% de efecto en la concentración máxima evaluada.

En la Tabla 1, se muestran los valores de la CL₅₀ del CDDP en cada una de las líneas celulares estudiadas.

Tabla 1. CL₅₀ del CDDP en cada una de las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar.

Línea celular	CL₅₀ CDDP (μM)
A549	25 \pm 6.0
H1437	30 \pm 2.0
1.3.11	39 \pm 3.0
H1299	77 \pm 7.0
H1573	100 \pm 15.0
3B1A	NA
SKLU-1	NA

NA: No aplica

6.2. Cambios morfológicos asociados a la muerte celular inducidos por el CDDP

Ya establecidas las condiciones experimentales y las concentraciones de CDDP a emplear en cada línea celular, se procedió a estudiar si la exposición al compuesto induce cambios morfológicos asociados a la muerte celular. En las observaciones microscópicas se evaluaron cambios en la morfología celular asociados a la apoptosis tales como la disminución en el tamaño celular, la formación de *blebbing* y la producción de cuerpos apoptóticos; a la necrosis como la presencia de células de mayor tamaño y a la autofagia como la aparición de vacuolas en el citoplasma.

La línea celular A549, a las 9-12 h de exposición a CDDP, presentó disminución del tamaño celular y *blebbing* en aproximadamente 30 – 40% de las células (Figura 3). A las 24 h de tratamiento, se observó un incremento en la cantidad de cuerpos apoptóticos y de células necróticas.

Cuando los cultivos de la línea celular H1437 fueron expuestos al CDDP, los primeros cambios morfológicos asociados a la apoptosis se observaron a las 2 h de tratamiento. Conforme transcurrió el tiempo de exposición al compuesto, la proporción de células apoptóticas observadas incrementó a 40% aproximadamente. A las 24 h de tratamiento se observó la presencia de una mayor proporción de cuerpos apoptóticos y de células necróticas, en aproximadamente 80% de las células (Figura 3).

Con respecto a la línea celular 1.3.11, se observó la aparición de cambios morfológicos alrededor de las 8 – 12 h de exposición al CDDP sugiriendo muerte por apoptosis. Al transcurrir el tiempo de exposición al compuesto, entre las 18 – 24 h, se detectó un incremento en la cantidad de células con morfología necrótica en aproximadamente 80% de las células (Figura 3).

Por otro lado, en la línea celular H1299 durante las primeras 8 h de tratamiento con CDDP no se observaron células con alteraciones morfológicas asociadas a la muerte. Sin embargo, alrededor de las 12 – 15 h de tratamiento se detectó incremento en la cantidad de células con *blebbing*, cuerpos apoptóticos y células muertas (Figura 3). A las 24 h de tratamiento, se visualizó que la proporción de células con morfología apoptótica se mantuvo respecto a los tiempos previos e incrementó la proporción de células necróticas en aproximadamente 50 – 60%.

De manera similar en la línea celular H1573, durante las primeras 10 horas de exposición a CDDP, no se observaron cambios morfológicos en la mayoría de las células y de manera

aislada se detectaron algunas células con morfología apoptótica. Sin embargo, entre las 15 y 24 h de tratamiento, el 60 – 70% de las células se observaron con signos de apoptosis y de necrosis.

Con relación a la línea celular 3B1A, se observó que durante las primeras 24 h de tratamiento con CDDP no se indujeron alteraciones morfológicas asociadas a la muerte y de manera esporádica se observaron células con *blebbing* o morfología necrótica. Adicionalmente, en los cultivos se observó una menor cantidad de células adherentes (viables) con respecto al control, lo cual pudiera estar asociado a un efecto de arresto en la proliferación.

Finalmente, en la línea celular SKLU-1, el tratamiento con CDDP no indujo la aparición de cambios morfológicos asociados a algún tipo de muerte celular tras 24 h de tratamiento. De manera esporádica se lograron observar células con morfología apoptótica y otras con morfología necrótica (Figura 3).

6.3. Cuantificación del porcentaje de células apoptóticas y necróticas

Ya que el CDDP indujo muerte en los cultivos celulares y por observaciones microscópicas iniciales se visualizaron células en apoptosis y necrosis, se cuantificó el porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas mediante el ensayo de Anexina-V/PI. En la línea celular A549 tras 15 h de exposición al CDDP, el porcentaje de células viables disminuyó a 33% y la proporción de células apoptóticas incrementó significativamente 10 veces al igual que las células necróticas ($p < 0.0001$) (Figura 2C). A las 24 h de tratamiento, el porcentaje de células viables se mantuvo similar al detectado en la condición anterior, la proporción de células apoptóticas disminuyó a 21% y las células necróticas incrementaron a 49% ($p < 0.0001$).

Con respecto a la línea celular 1.3.11, a las 20 h de exposición al CDDP se detectó un incremento significativo de 28 veces en la proporción de células apoptóticas y de 45 veces la proporción de células necróticas ($p < 0.005$).

En relación con la línea celular H1299, a las 15 h de tratamiento las células apoptóticas incrementaron de manera no significativa mientras que la proporción de células necróticas se mantuvo sin cambios. Sin embargo, a las 24 h de exposición al CDDP las células viables disminuyeron a 60%, el porcentaje de células apoptóticas incrementó significativamente 8 veces respecto a la condición control y las células necróticas incrementaron 2.5 veces ($p <$

0.005). Un resultado similar se obtuvo después de 24 h de exposición a CDDP en la línea celular H1573 (Figura 2C).

Con respecto a la línea celular 3B1A, después de 24 h de exposición al CDDP se encontró un incremento significativo de 3 veces en los porcentajes de células apoptóticas y necróticas ($p < 0.05$) respecto a los cultivos de células no tratadas.

Finalmente, en la línea celular SKLU-1 el tratamiento con CDDP indujo un incremento significativo de 2 veces ($p < 0.05$) en las proporciones de células apoptóticas y necróticas después de 24 h de exposición (Figura 2C).

6.4. Liberación de la enzima LDH

Con el propósito de confirmar el efecto citotóxico observado en los cultivos celulares tras la exposición al CDDP, se cuantificó la liberación de la enzima LDH al medio extracelular. Las líneas celulares en las cuales se obtuvo mayor efecto del CDDP por medio del ensayo del MTT (A549, H1437 y 1.3.11) liberaron de forma significativa ($p < 0.001$) de 40 – 80% la LDH, confirmando el efecto citotóxico inducido por el compuesto. Por otro lado, las líneas celulares que mostraron mediana sensibilidad al CDDP (H1299 y H1573) liberaron de forma significativa ($p < 0.01$) un menor porcentaje de entre 15 – 20% de la LDH. Finalmente, las líneas celulares mostrando mayor resistencia al CDDP (3B1A y SKLU-1) marginalmente liberaron la enzima LDH (Figura 2C). Estos resultados sugieren que las líneas celulares presentan sensibilidad específica al tratamiento con CDDP, algunas comportándose como susceptibles y otras como resistentes.

6.5. Actividad de la caspasa-3/7

Debido a que el CDDP indujo muerte en las líneas celulares, se estudió si este fenómeno fue mediado por la activación de las caspasas-3/7. En la línea celular A549, el CDDP indujo un incremento significativo de la actividad de la enzima en aproximadamente 20 veces ($p < 0.005$) con respecto al control de células no tratadas. Un fenómeno similar se obtuvo en las líneas celulares H1437 y 1.3.11, en donde las células tratadas con CDDP incrementaron 18 y 24 veces ($p < 0.005$) la actividad de la caspasa-3/7, respectivamente. Por otro lado, las líneas celulares H1299, H1573 y 3B1A incrementaron significativamente entre 9 y 6 veces ($p < 0.05$) la actividad de la caspasa-3/7 en comparación con sus respectivos controles de células no tratadas. La línea celular SKLU-1 mostró la menor actividad de la enzima ya que

solamente incrementó 2 veces la actividad de la caspasa 3, corroborando que esta línea celular muestra resistencia al efecto citotóxico inducido por el CDDP (Figura 2D).

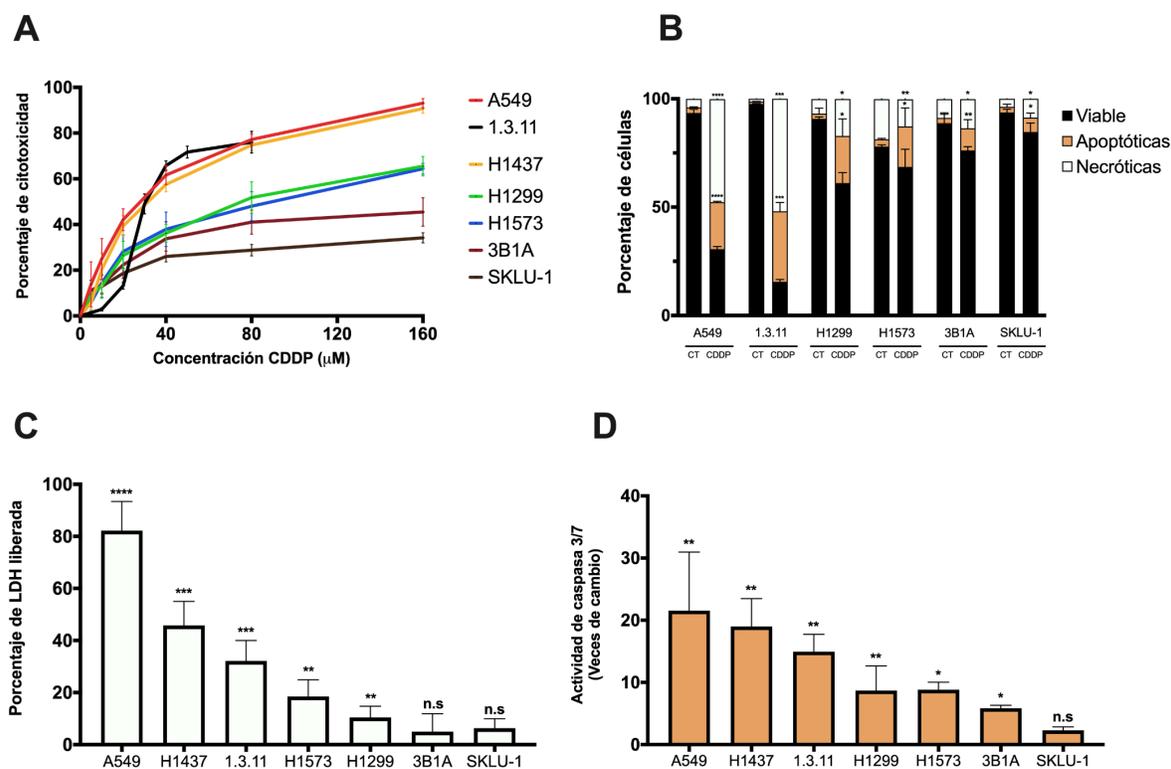


Figura 2. Efecto citotóxico inducido por el CDDP en las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar. (A) Curvas dosis-respuesta del CDDP en las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar. Se muestra el porcentaje de citotoxicidad con respecto al cultivo control (células sin tratamiento). (B) Cuantificación de la muerte celular causada por la exposición al CDDP en las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar. Las gráficas de barras muestran los porcentajes de las poblaciones de células viables, apoptóticas y necróticas en cada línea celular a las 24 h de exposición. (C) Porcentaje de liberación, con respecto al control positivo (células tratadas con TritónX-100 al 2%), de la enzima LDH en los cultivos celulares tras 24 h de exposición a CDDP. (D) Activación de la caspasa-3 causada por el CDDP. Se muestra la actividad de la caspasa-3 a las 24 h de tratamiento. Los valores se expresan como las veces de cambio de las unidades relativas de fluorescencia (RFU) de las células expuestas a CDDP comparadas con su respectivo control sin tratamiento en cada línea celular. En cada gráfica, se muestran resultados de tres experimentos independientes por triplicado y se indica la media \pm SEM. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, n.s no significativo.

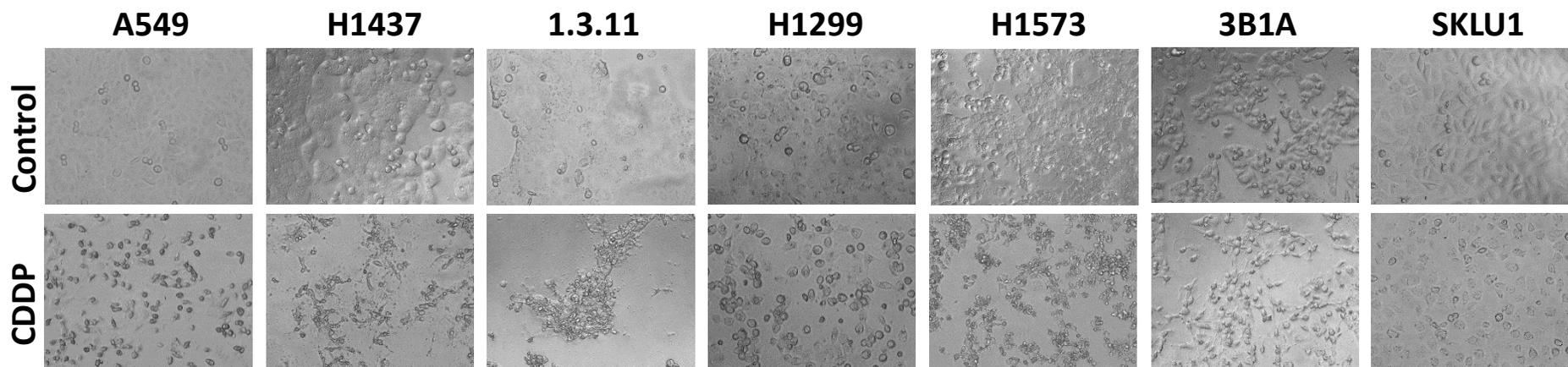


Figura 3. Cambios morfológicos inducidos por el tratamiento con CDDP en las líneas de adenocarcinoma pulmonar. Se muestran imágenes representativas de los cultivos observados en el microscopio de campo claro a las 24 h de tratamiento. Como control se emplearon células sin tratamiento. Micrografías a un aumento total de 200X.

6.6. Análisis del estatus mutacional de las líneas celulares

Ya que cada línea celular mostró sensibilidad específica al CDDP y por reportes previos en la literatura se ha sugerido que este fenómeno pudiera atribuirse a la presencia de mutaciones en diferentes genes *driver* (148), se analizó la presencia de mutaciones por secuenciación dirigida en 15 genes *driver* asociados a tumores sólidos. Los resultados obtenidos de este análisis corroboraron la ausencia de mutaciones en el gen del *EGFR* en todas las líneas celulares. Interesantemente, la mayoría de las líneas celulares mostraron mutaciones en el gen de *TP53* sin relacionarse con la sensibilidad al CDDP detectada en los experimentos previos. Otras mutaciones de importancia clínica fueron detectadas en los genes de *KRAS* y *NRAS* en la mayoría de las líneas celulares. Sorprendentemente, la línea celular 3B1A no presentó mutaciones en los 15 genes *driver* estudiados (Figura 4)

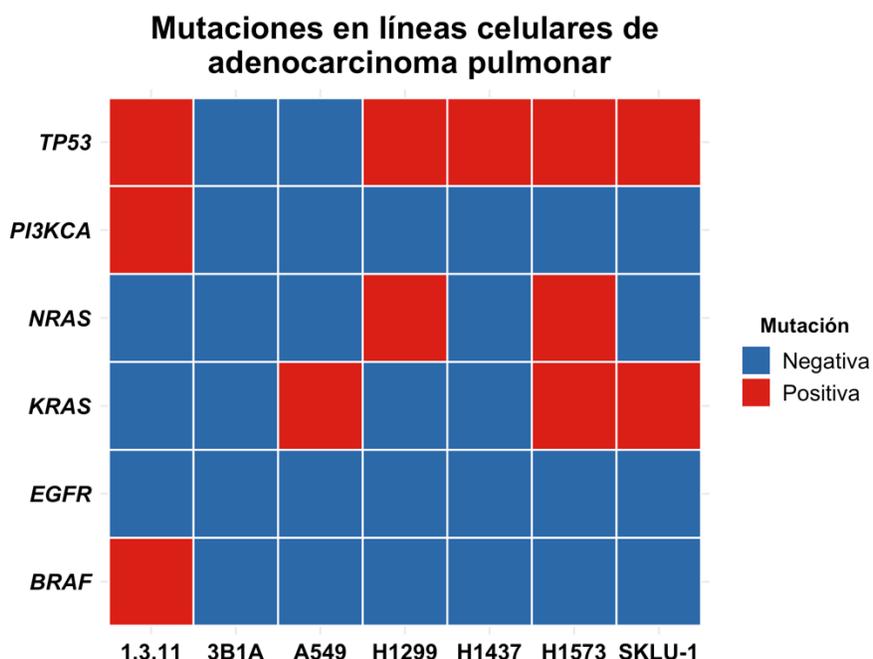


Figura 4. Estatus mutacional de las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón. El mapa de calor muestra la presencia o ausencia de mutaciones clínicamente relevantes en las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar empleando el TruSight 15. Se muestran resultados de dos experimentos independientes.

En resumen, el CDDP indujo un efecto citotóxico mediado por la apoptosis, el cual fue diferente en las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar estudiadas y no depende de las mutaciones que presentan en diferentes genes *driver*. Es importante resaltar que tras la exposición al CDDP se observó una fracción de células viables las cuales pudieran estar relacionadas con las células DTPs.

6.7. Alteraciones en las fases del ciclo celular inducidas por el CDDP en las células tolerantes-persistentes

Reportes previos indican que las células residuales o DTPs muestran proliferación reducida debido a la inducción de dormancia (149,150). Por esta razón, se evaluaron las alteraciones en las fases del ciclo celular en las células DTPs al CDDP de adenocarcinoma pulmonar. En la línea celular A549, el tratamiento con CDDP indujo una disminución significativa de células en las fases S y G₂/M y un incremento significativo de 1.4 veces ($p < 0.0001$) en la proporción de células en las fases G₀/G₁ (Figura 5C). Respecto a la línea celular H1299, el CDDP redujo el número de células en las fases G₀/G₁ y G₂/M. Interesantemente, el tratamiento con CDDP indujo un incremento significativo ($p < 0.001$) en 3.5 veces en el porcentaje de células en la fase S. En la línea celular H1573, la exposición a CDDP causó un ligero incremento en el porcentaje de células en las fases S y G₂/M y una simultánea disminución de células en las fases G₀/G₁. En la línea celular 3B1A, el CDDP indujo una acumulación significativa ($p < 0.005$) de dos veces en la proporción de las células en las fases G₂/M. Estos resultados sugieren que las células DTPs a CDDP muestran alteraciones en el ciclo celular las cuales limitan su proliferación.

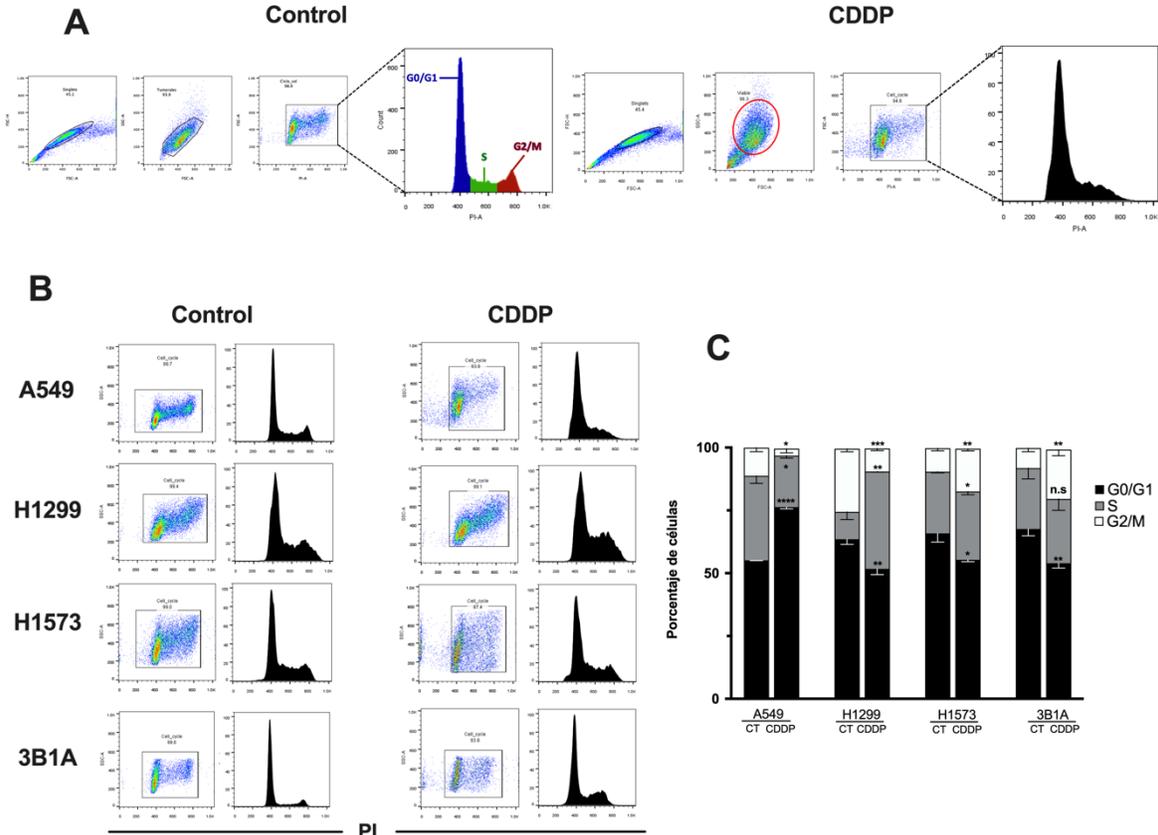


Figura 5. Análisis de las alteraciones en el ciclo celular en células DTPs al CDDP. (A) Estrategia del análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo en células sin tratamiento (control) o expuestas al CDDP. (B) Gráficas de puntos e histogramas mostrando la distribución de las células control o expuestas a CDDP en cada una de las fases del ciclo celular. (C) Cambios en el porcentaje de células en las fases G₀/G₁, S y G₂/M en las células control (CT) o DTPs al CDDP (CDDP). Se muestran los resultados de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los datos se muestran como la media ± SD. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001, n.s no significativo.

6.8. Análisis de los datos de secuenciación

Con el objetivo de estudiar las alteraciones transcripcionales que participan en la resistencia primaria al CDDP en las células DTPs, se procedió a realizar la secuenciación del transcriptoma por medio de la técnica del RNA-seq en los cultivos celulares. Después de haber obtenido los datos de secuenciación, se analizó su calidad calculando el número de lecturas en cada muestra (profundidad de secuenciación) y el porcentaje de lecturas con calidad igual o mayor a 30 (escala phred +33). El promedio de dichos parámetros se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen estadístico de los datos de secuenciación.

Parámetro	Valor
Lecturas totales	6.3 x 10 ⁷
Lecturas limpias	6.1 x 10 ⁷
Profundidad (lecturas)	3.1 x 10 ⁷
% lecturas ≥Q30	82.92

Este análisis de calidad de los datos crudos mostró que, en las lecturas de todas las muestras, la asignación de bases fue adecuada. Como ha sido previamente reportado, la calidad de las lecturas disminuyó en el extremo 3' (Figura 6A). Por esta razón, las lecturas fueron filtradas para seleccionar específicamente aquellas que tuvieran una calidad igual o mayor a 25, con longitud mínima de 70 nucleótidos y sin la presencia de secuencias de los adaptadores empleados en la construcción de las bibliotecas. La calidad de las lecturas filtradas mejoró (Figura 6B) y sin la pérdida de lecturas de manera considerable (tabla 2).

Adicionalmente, se corroboró que las librerías estuviesen libres de secuencias contaminantes (Figura 6C).

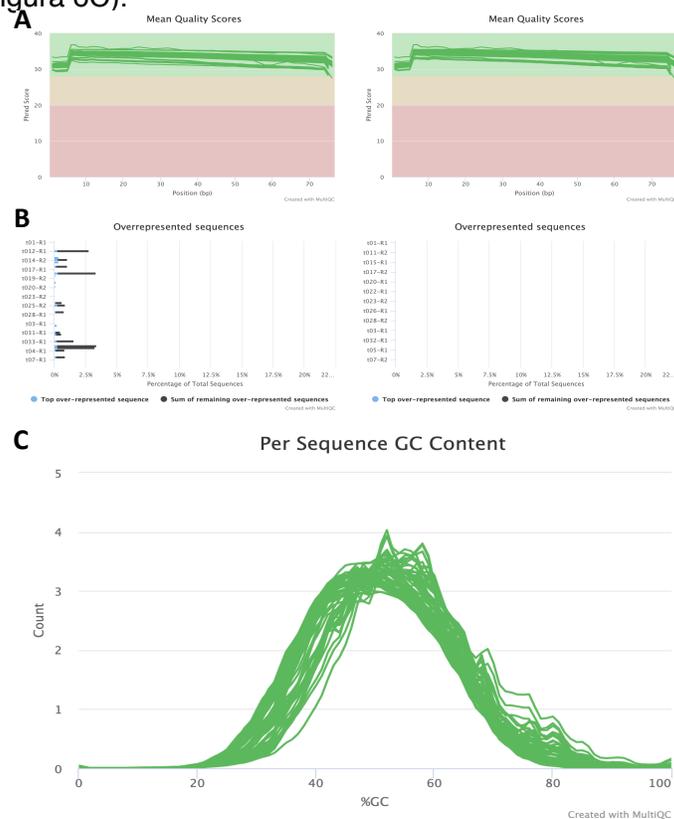


Figura 6. Análisis de la calidad de los datos de secuenciación. (A) Calidad de las lecturas crudas (columna izquierda) y procesadas (columna derecha) con Trimmomatic y Cutadapt. La calidad de las lecturas se analizó empleando los software FastQC y MultiQC y se encuentra expresada en la escala Phred +33. (B) Porcentaje de secuencias sobre-representadas y asociadas a los adaptadores empleados en la preparación de las bibliotecas en las lecturas crudas (columna izquierda) y procesadas (columna derecha). (C) Distribución del porcentaje de guanina y citocina en las librerías secuenciadas.

Posteriormente, se realizó el alineamiento de las lecturas filtradas con respecto al genoma humano vGRCh38/hg38. En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos del alineamiento de las secuencias.

Tabla 3. Resumen de los resultados del alineamiento

Parámetro	Valor
Número de lecturas	$3.1 \times 10^7 \pm 1.1 \times 10^7$
Lecturas alineadas a un gen	$78.78 \pm 0.15\%$

Lecturas alineadas a varios genes $17.95 \pm 0.14\%$

Con el propósito de conocer la anotación de las lecturas alineadas, se calculó el porcentaje de alineamiento a una categoría o biotipo en cada uno de los archivos .bam obtenidos en el alineamiento. Aproximadamente el 75% de las lecturas fueron alineadas a regiones anotadas como exones, el 22% a regiones de RNA largos no codificantes y el resto (<3%) se distribuyeron en regiones de RNA no codificantes tales como micro RNA, RNA pequeños nucleares y RNA pequeños nucleolares (Figura 7A – B).

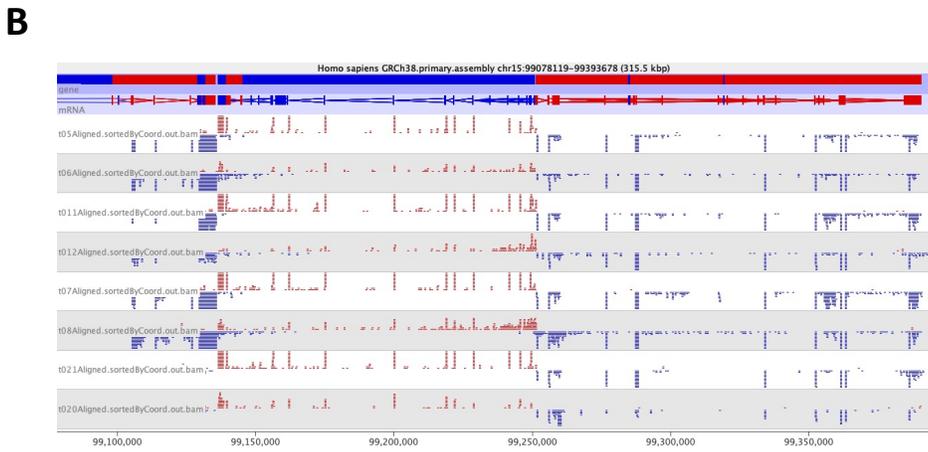
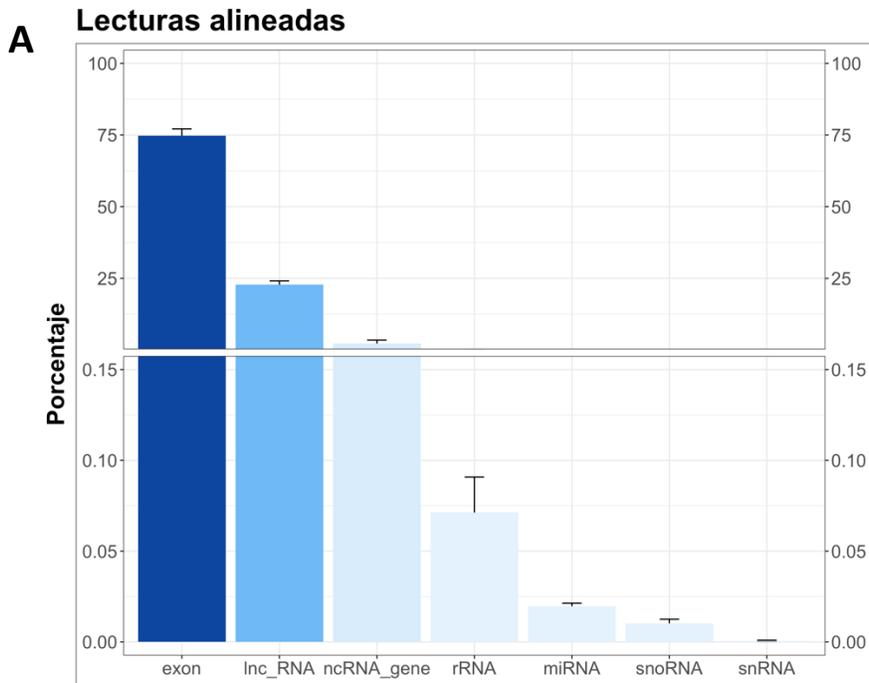


Figura 7. Anotación de las lecturas alineadas y mapeadas. (A) Se muestra el porcentaje de lecturas (media \pm desviación estándar) que alinearon a las categorías de exón, RNA largo no codificante (lnc_RNA), RNA no codificante (ncRNA_gene), micro RNA (miRNA), RNA pequeño nuclear (snRNA), RNA pequeño nucleolar (snoRNA) y RNA ribosomal (rRNA). (B) Mapa del alineamiento local de las lecturas en una región del cromosoma 15. Las lecturas *forward* se muestran en color rojo y las lecturas *reverse* en color azul.

Ya cuantificadas las lecturas alineadas, se realizó el análisis de expresión diferencial comparando los coeficientes de los genes en las células DTPs al CDDP con respecto a las células sin tratamiento. En las células DTPs de la línea celular A549 2661 genes mostraron expresión diferencial (1022 sobre-expresados y 1639 sub-expresados); en la línea celular H1299, las células DTPs al CDDP presentaron 2570 genes con expresión diferencial (1324 sobre-expresados y 1246 sub-expresados); en la línea celular H1573 hubo 2467 genes con expresión diferencial (1351 sobre-expresados y 1116 sub-expresados) y en la línea celular 3B1A, las células DTPs al CDDP mostraron 4055 genes con expresión diferencial (1866 sobre-expresados y 2189 sub-expresados). Los resultados se muestran en las gráficas de volcán de la Figura 8A .

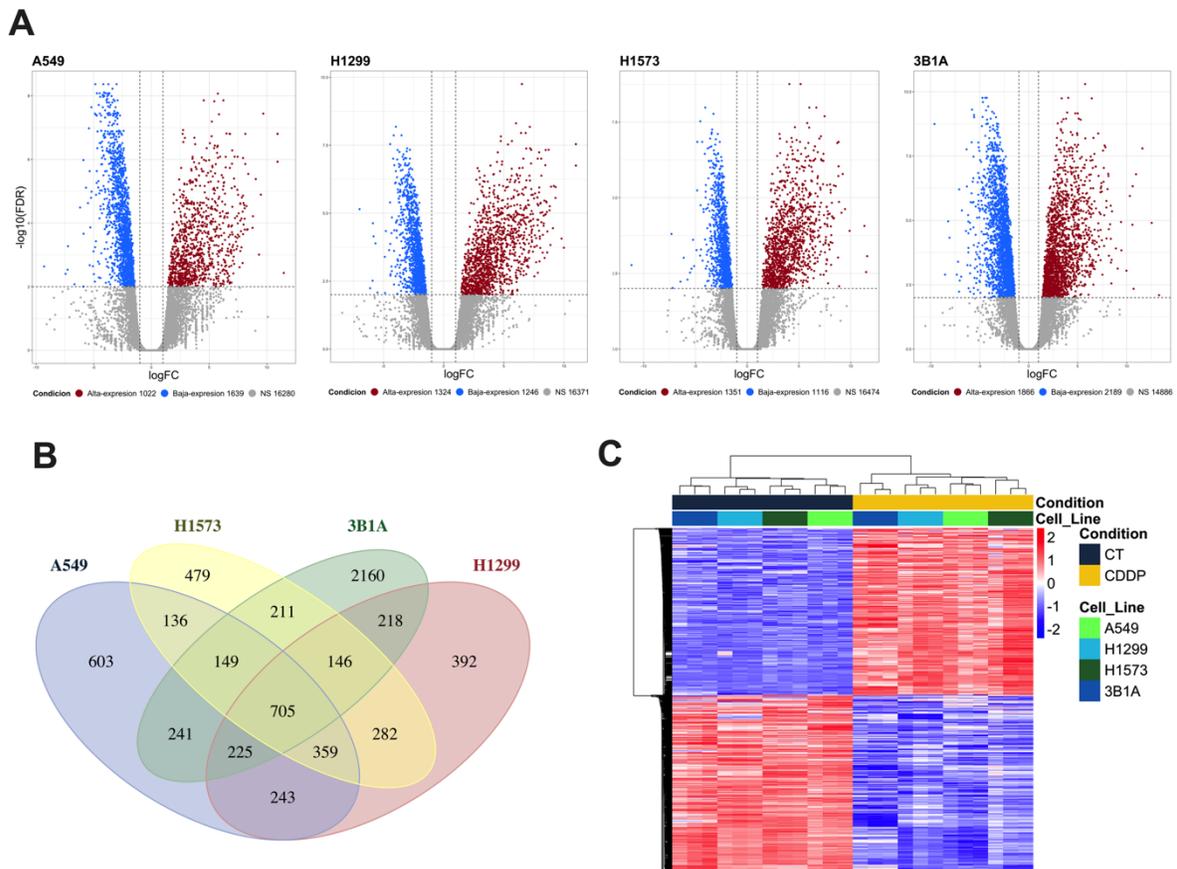


Figura 8. Análisis de expresión diferencial en las células DTPs al CDDP. (A) En las gráficas de volcán cada punto representa un gen diferencialmente expresado. En el eje “x” se expresa el logaritmo base 2 de las veces de cambio y en el eje “y” el logaritmo negativo base 10 del valor p ajustado (FDR). Los puntos azules indican los genes sub-expresados (veces de cambio < 0.5 y con valor de FDR menor a 0.01) y los puntos rojos representan genes sobre-expresados (veces de cambio > 2 y con valor de FDR menor a 0.01). (B) En el diagrama de Venn se muestra el número de genes diferencialmente expresados y exclusivos de las células DTPs de cada línea celular, así como de los genes que compartieron las cuatro líneas celulares. En (C) se representa en un mapa de calor la expresión (cuentas normalizadas por TMM) de los 705 genes compartidos en las células DTPs de cada línea celular. El análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado de los datos se realizó mediante el cálculo de la mínima distancia euclídeana entre los puntos.

Posteriormente, se obtuvo la lista de genes con expresión diferencial significativa compartidos entre las células DTPs al CDDP de las líneas celulares. El diagrama de Venn de la figura 7B muestra que las células DTPs compartieron un total de 705 genes diferencialmente expresados, de los cuales 343 se sobre-expresaron y 362 sub-expresaron. El análisis de agrupamiento no supervisado, tomando en cuenta la expresión normalizada de estos genes, mostró que las líneas celulares se agruparon con respecto al tratamiento así como a la sensibilidad al CDDP tanto en las células DTPs como en los controles (Figura 7C).

Adicionalmente, la anotación del transcriptoma de las células DTPs se realizó mediante el análisis de enriquecimiento de set de genes (GSEA). En este análisis se obtuvo que las vías asociadas al metabolismo oxidante, la activación de enzimas del citocromo P450, el metabolismo de fármacos, el proteasoma, entre otras, se enriquecieron de forma positiva en las células DTPs al CDDP. Por otro lado, las vías de WNT y señalización del TGF- β , la apoptosis y el ciclo celular se encontraron enriquecidas de forma negativa en las células DTPs (Figura 9A – C). El análisis de extremo líder resultó en la detección de 27 genes los cuales contribuyeron en el enriquecimiento de las vías con mayor significancia (Figura 9C).

células al CDDP. Los puntos rojos representan a los genes sobre-expresados y los puntos azules a los genes sub-expresados. Para mayor claridad, se muestra la fracción de genes mostrando alta centralidad. (B) Análisis topológico de la red de los genes asociados a las células DTPs al CDDP. En el eje “y” se grafica el $-\log_{10}$ del valor de la centralidad para cada gen. Para mayor claridad, se muestran los genes mostrando alta centralidad. (C) Análisis funcional de los genes pertenecientes a las comunidades detectadas. Se muestran los procesos biológicos más significativos ($p < 0.05$) detectados por el análisis de sobre-representación con respecto a la base de datos de Gene Ontology.

6.9. Validación de los resultados de RNA-seq

Los resultados del análisis bioinformático se validaron por medio de PCR en tiempo real (RT-qPCR). Para ello, se seleccionaron los genes que mostraron mayor centralidad en la red. Respecto a *GADD45A*, *SOCS1*, *HEXIM1* y *HBEGF* las células DTPs a CDDP incrementaron significativamente la expresión con respecto a los controles. Con relación a los genes *BUB1B*, *KIF18A*, *ERCC6L* y *NR2F2* su expresión disminuyó de forma significativa en las células DTPs a CDDP en comparación con las células no expuestas al fármaco (Figura 11). Estos resultados son congruentes con los análisis bioinformáticos, ya que los valores de las veces de cambio (valor \log_2) del $\Delta\Delta CT$ calculado por RT-qPCR de genes sobre-expresados y sub-expresados mostraron una correlación positiva y significativa con los obtenidos por RNA-seq (Figura 11).

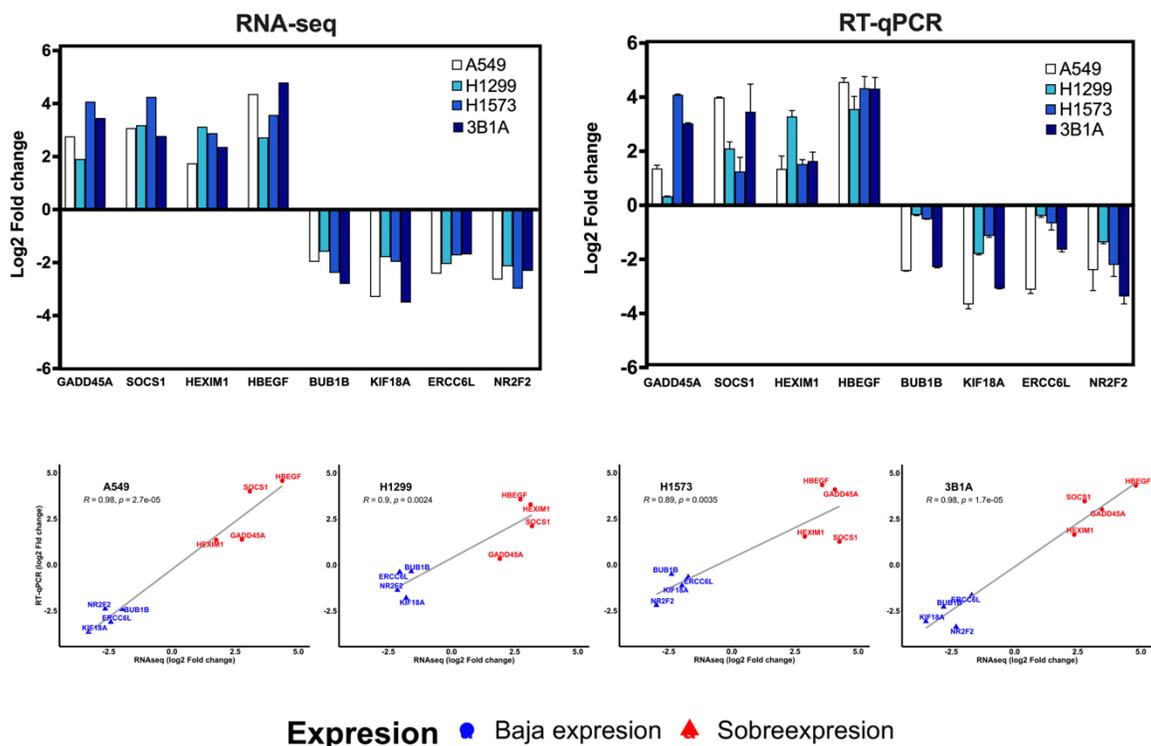


Figura 11. Validación de los resultados del análisis bioinformático. Veces de cambio en la expresión de los genes hub por RNA-seq o RT-qPCR calculados por el método de $\Delta\Delta CT$ en las células DTPs a CDDP. En cada gráfica, se muestran resultados de tres experimentos independientes y se indica la media \pm SEM. En el panel inferior se muestran las gráficas de correlación entre los resultados obtenidos por RNA-seq y RT-qPCR de los genes hub. La correlación se calculó por el método de Pearson.

6.10. Análisis de sobrevida de los genes hub

Con el propósito de estudiar el impacto clínico de los genes detectados con mayor centralidad, se realizó un análisis de sobrevida empleando datos del GDC-TCGA para el adenocarcinoma pulmonar. De los 99 genes con mayor centralidad, 9 mostraron valores de p significativos ($p < 0.05$) (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados del análisis de sobrevida de los genes centrales en la cohorte de pacientes de TCGA

Gen	Valor de p	Comunidad	HR
TAF4	0.022	6	5.47394739
JARID2	0.013	6	4.05519997
TET3	0.022	6	3.66929667
MLLT3	0.022	6	3.32011692
NR2F2	0.023	6	3.32011692
IGF1R	0.038	3	3.00416602
NCOA3	0.033	6	3.00416602
PPP2R5E	0.04	3	2.71828183
SOCS1	0.021	3	0.30119421

HR: Coeficiente de riesgo (Hazard ratio)

Este análisis indicó que la expresión incrementada del gen *SOCS1* correlaciona con una menor sobrevida total a cinco años en la cohorte de pacientes tratados con CDDP. Por otro lado, la sub-expresión de los genes *JARID2*, *MLLT3*, *NR2F2*, *TET3*, *TAF4* y *NCOA3* se asoció a una menor sobrevida a 5 años en la cohorte de pacientes analizada (Figura 12).

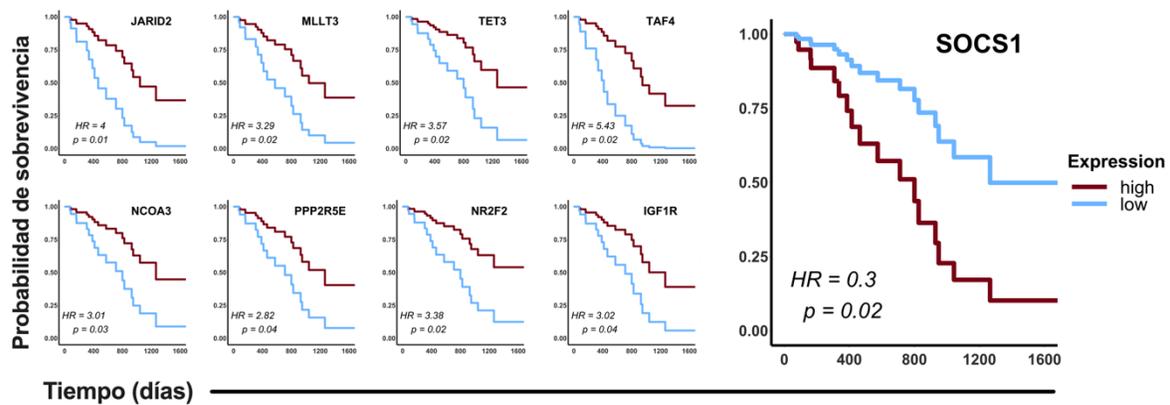


Figura 12. Relevancia clínica de los genes hub. Se realizó un análisis de supervivencia total a 5 años empleando la regresión de Cox. En las gráficas de Kaplan-Meier las curvas en color rojo muestran el grupo de pacientes mostrando mayor expresión del gen y las curvas en color azul el grupo de pacientes con menor expresión.

Adicionalmente, se analizó la expresión de estos genes a nivel de mRNA entre las células tumorales y el tejido normal adyacente en la cohorte de pacientes tratados con CDDP. La expresión del gen *GADD45A* se encontró significativamente incrementada en el tejido tumoral, lo cual se asocia con los valores de sobre-expresión detectados en las células DTPs al CDDP por RNA-seq o RT-qPCR (Figura 11). En contraste, la expresión de los genes *EPS15*, *GLI3*, *NR2F2*, *RCOR1* y *SOCS1* fue menor en el tumor en comparación con el tejido normal adyacente (Figura 13).

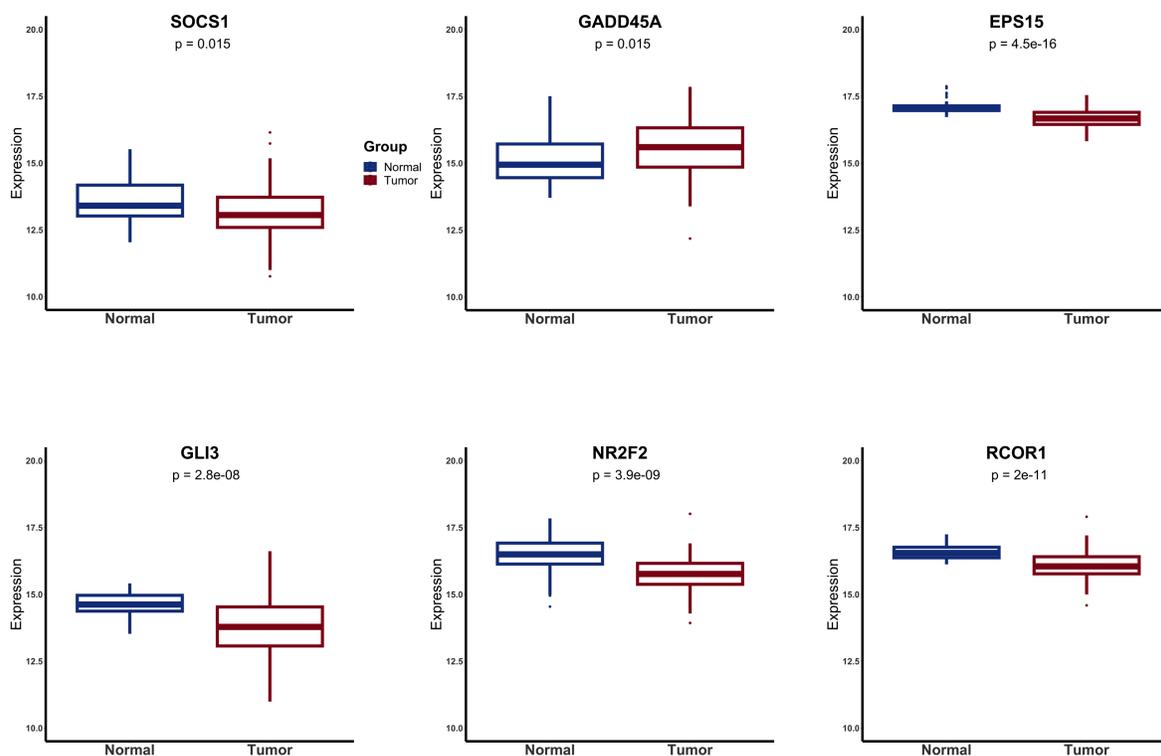


Figura 13. Niveles de expresión (mRNA) de los genes centrales previamente al tratamiento. La expresión de los genes centrales se muestra entre el tejido normal adyacente (azul) y el tumor (rojo) de la cohorte de pacientes tratados con CDDP.

En resumen, estos resultados sugieren que la expresión basal de los genes *GADD45A*, *SOCS1*, *EPS15*, *GLI3*, *NR2F2*, y *RCOR1* está alterada en los tumores previamente al tratamiento y estos genes pueden ser empleados como potenciales biomarcadores predictivos al tratamiento con CDDP en pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

6.11. Evaluación de la expresión de SOCS1 en las células tolerantes-persistentes al CDDP

Ya que el gen SOCS1 mostró expresión incrementada en las células DTPs a CDDP (Figura 14A) y además se asoció a una menor sobrevida en pacientes con adenocarcinoma pulmonar y tratados con CDDP (Figura 12), se evaluó su expresión a nivel de proteína. La expresión de la proteína SOCS1 incrementó en las células DTPs a CDDP después de 24 h de exposición al CDDP. En las líneas celulares H1299 y H1573, las células DTPs al CDDP incrementaron significativamente entre 2.5 y 3 veces ($p < 0.05$) la expresión de la proteína SOCS1 (Figura 14B). Sorprendentemente, en la línea celular 3B1A las células DTPs al

CDDP mantuvieron la expresión basal de SOCS1 sin que hubiera cambios significativos. En resumen, estos resultados sugieren que en las células DTPs al CDDP, la proteína SOCS1 pudiera participar en el fenómeno de resistencia al compuesto. Además, la expresión de SOCS1 pudiera estar asociada a la sensibilidad específica de cada línea celular.

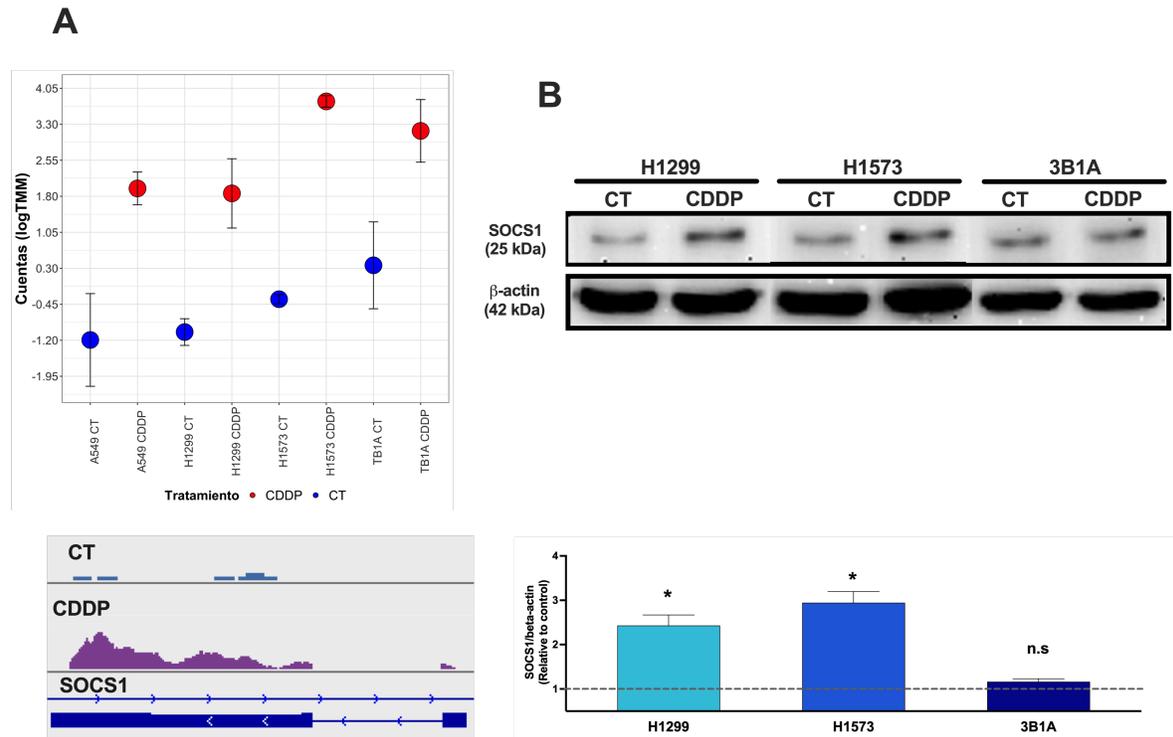


Figura 14. Expresión de la proteína SOCS1 en células de adenocarcinoma pulmonar DTPs al CDDP. (A) Gráfica de puntos mostrando la expresión (logaritmo de las cuentas normalizadas por TMM) del gen *SOCS1* en las células sin tratamiento (CT) o DTPs (CDDP). En el panel inferior se representan la diferencias a nivel de lecturas alineadas al gen *SOCS1* en células control o DTPs al CDDP. Se muestran los resultados representativos de la línea celular H1573. (B) Se muestran las bandas correspondientes a la proteína SOCS1 detectadas alrededor de 20 kDa de los extractos celulares totales. La β -actina (45 kDa) fue empleada como un control de expresión constitutiva. En el panel inferior se muestran los resultados del análisis por densitometría. Los resultados se expresan como las veces de cambio de la relación SOCS1/ β -actina entre las células DTPs al CDDP y el control. * $p < 0.05$, n.s no significativo.

6.12. Localización intracelular de SOCS1

Debido a que SOCS1 mostró expresión diferencial a nivel de gen y proteína en las células DTPs al CDDP, se evaluó su localización intracelular en las células de adenocarcinoma pulmonar tras la exposición al compuesto. En las líneas celulares H1299 y H1573 las células sin tratamiento mostraron una tinción muy débil de SOCS1 a nivel de citoplasma y de

núcleo. Sin embargo, las células DTPs a CDDP incrementaron la señal en citoplasma. Interesantemente, las células 3B1A no modificaron la localización ni la señal de SOCS1 de forma posterior a la exposición a CDDP (Figura 14). Estas observaciones son congruentes con la expresión de SOCS1 detectada por Western Blot.

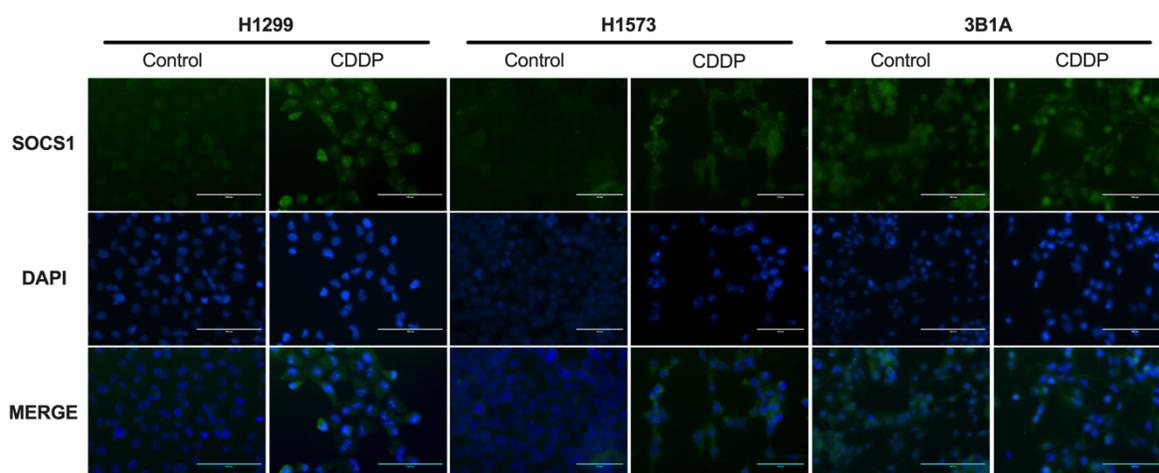


Figura 14. Localización de SOCS1 en las células DTPs a CDDP. Se muestran micrografías representativas de los cultivos celulares a un aumento total 400X (H1299 y 3B1A) o 600X (H1573). Tinción en azul DAPI, tinción en verde SOCS1.

6.13. Contribución de SOCS1 en la resistencia intrínseca al CDDP

Para estudiar el impacto que tiene SOCS1 en la resistencia intrínseca al CDDP, se procedió a realizar el silenciamiento de este gen en la línea celular 3B1A, la cual mostró resistencia al tratamiento con CDDP. Aproximadamente, un 80% de las células cultivadas se transfectaron de forma correcta (Figura 15A) y por medio de RT-qPCR se detectó que el gen *SOCS1* disminuyó su expresión hasta 50% después de 48 h de transfección (Figura 15B). De manera similar, la expresión de la proteína SOCS1 disminuyó en las células transfectadas (Figura 15D). Con respecto a la viabilidad celular, el silenciamiento de *SOCS1* causó una disminución significativa ($p < 0.05$) del 30 y 40% de la viabilidad de las células 3B1A expuestas a 20 y 40 μM de CDDP, respectivamente, en comparación con las células tratadas solamente con lipofectamina (Figura 15C).

En resumen, estos resultados indican que SOCS1 contribuye de manera importante al fenómeno de resistencia intrínseca al CDDP en el adenocarcinoma pulmonar.

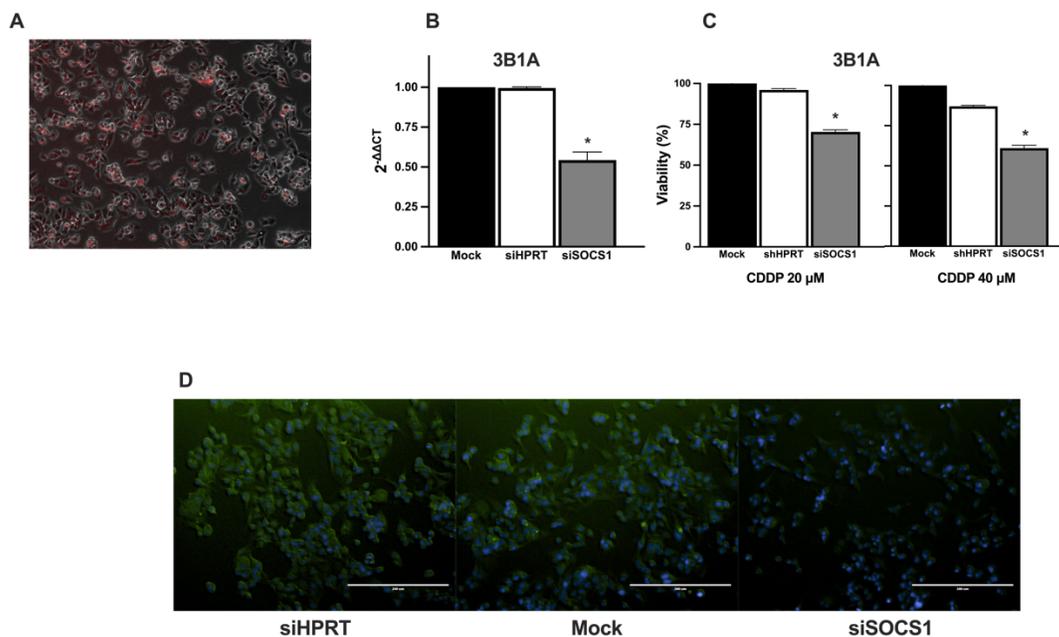


Figura 15. Contribución de SOCS1 en la resistencia intrínseca al CDDP. (A) Micrografía representativa mostrando la eficiencia de la transfección de las células 3B1A con el control positivo (lipofectamina y el fluorocromo TYE 563). Aumento total 200X. (B) Disminución de la expresión de *SOCS1* en las células 3B1A transfectadas. La expresión de *SOCS1* evaluó por RT-qPCR y se calculó por el método de $\Delta\Delta CT$. (C) Contribución de SOCS1 en la sensibilidad al CDDP en la línea celular 3B1A. Las gráficas de barras muestran el porcentaje de viabilidad con respecto al control sin tratamiento de células expuestas a 20 μM o 40 μM de CDDP en las distintas condiciones de transfección. (D) Expresión de SOCS1 tras la transfección. Se muestran micrografías representativas de los cultivos celulares de la línea celular 3B1A en las distintas condiciones. Aumento total 200X. Células no transfectadas (mock), transfectadas en contra del gen *HPRT* (siHPRT) y *SOCS1* (siSOCS1). En las gráficas de barras se muestran los resultados de tres experimentos independientes y se indica la media \pm SEM. * $p < 0.05$.

7. Discusión

En años recientes, los avances en las tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación han permitido conocer las alteraciones genéticas de mayor frecuencia en los tumores de tipo adenocarcinoma pulmonar. Una de las implicaciones de este conocimiento ha sido la identificación de mutaciones en genes conductores del cáncer, las cuales han sido empleadas como blancos terapéuticos propiciando el desarrollo de fármacos dirigidos en contra de alteraciones moleculares (151). En este sentido, las guías internacionales para tratar el cáncer de pulmón especifican que aquellos pacientes cuyos tumores muestran

mutaciones en genes como *EGFR*, *ALK*, *cMET*, *ROS*, entre otros deberán de ser tratados con fármacos conocidos como los inhibidores de las tirosinas cinasas (11). Por el contrario, los pacientes cuyos tumores lleven el gen silvestre para dichos genes o muestren mutaciones en genes como *KRAS*, *PI3KCA*, *BRAF*, entre otros deberán de ser tratados con quimioterapia estándar a base de compuestos platinados (11).

El cisplatino (CDDP), es el pilar del tratamiento estándar del adenocarcinoma pulmonar, que en combinación con otros fármacos como los taxanos, la vinorelbina, la doxorubicina, la gemcitabina o el pemetrexed incrementan la supervivencia de los pacientes (40,117). Por ejemplo, en el cáncer testicular alrededor del 85 – 90% de los pacientes tratados con CDDP en combinación con etoposido o bleomicina presentan remisión completa del tumor (152). Sin embargo, en el cáncer de pulmón la respuesta es considerablemente menor ya que alrededor de un 60% de los pacientes administrados con CDDP no muestran una respuesta favorable (117,153). Una de las principales causas asociadas a esta escasa respuesta es la resistencia al fármaco, la cual puede ser adquirida o intrínseca. La resistencia adquirida es aquella que se desarrolla en pacientes cuyos tumores inicialmente son sensibles a la terapia y a lo largo del tratamiento desarrollan resistencia debido a la aparición de mutaciones o la activación de vías que favorecen la supervivencia celular (46). En el caso del CDDP, los mecanismos asociados a la resistencia adquirida han sido ampliamente investigados en diversos tipos de tumores y dentro de estos mecanismos se encuentran: la expulsión del fármaco fuera de la célula, la neutralización del fármaco por agentes antioxidantes endógenos, la activación de vías que reparan lesiones en material genético, la evasión de la muerte celular y la activación de vías de señalización que favorecen la supervivencia de la célula (39). Sin embargo, las causas biológicas asociadas a la resistencia intrínseca al CDDP aún no han sido esclarecidas completamente. El objetivo del presente trabajo es estudiar los mecanismos moleculares de la resistencia intrínseca al CDDP en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar por medio de secuenciación del transcriptoma en un modelo de células DTPs.

Uno de los objetivos particulares de la presente investigación fue evaluar el efecto citotóxico que induce el CDDP en las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar estudiadas. Como se mencionó anteriormente, el CDDP es un compuesto citotóxico que pertenece a la familia de agentes alquilantes ya que causa la formación de lesiones inter- e intra-catenarias entre guaninas y citocinas adyacentes en el DNA, las cuales al acumularse causan la

muerte de las células por apoptosis intrínseca (40). En el presente estudio encontramos que el CDDP indujo en las líneas celulares estudiadas muerte por apoptosis mediada por la activación de la caspasa-3 y liberación de la enzima LDH, procesos que dependen del tiempo de exposición al fármaco (154,155). Sorprendentemente, los porcentajes de células muertas inducidos en las líneas celulares fueron distintos entre ellas, sugiriéndonos que las células mostraron diferente sensibilidad al CDDP. Estos resultados corroboran los hallazgos reportados previamente en donde la línea celular A549 se comporta como sensible ya que hubo un 70% de efecto a la concentración de 40 μM (156); la línea celular H1299 se comportó como medianamente sensible al haber 40% de muerte a la concentración de 80 μM (157) y en la línea celular SKLU-1 como resistente al inducirse un 20% de muerte a la concentración de 100 μM (158). Una posible explicación a este fenómeno pudiera ser la presencia de mutaciones en genes *driver* en las distintas líneas celulares, las cuales favorecen el fenómeno de resistencia intrínseca al CDDP. A este respecto se ha reportado que mutaciones en el gen *GREB1* están asociadas con resistencia al CDDP debido a la activación de vías que expulsan el fármaco de la célula (119). Adicionalmente, las mutaciones en el gen *TP53* están asociadas con el fenómeno de resistencia intrínseca (159). En este sentido, se ha reportado en líneas celulares de cáncer de mama que las mutaciones en *TP53* favorecen la activación del factor de transcripción nuclear Nrf2, el cual induce la expresión de genes involucrados en la respuesta antioxidante endógena y que finalmente neutralizan al CDDP (160). Adicionalmente, las mutaciones en *TP53* se asocian con un mal pronóstico y escasa respuesta al tratamiento con CDDP en pacientes con adenocarcinoma pulmonar (161,162). Sin embargo, los hallazgos del presente trabajo difieren de investigaciones anteriores ya que las líneas celulares con mutaciones en *TP53* como la H1437 y la 1.3.11 se comportan como sensibles al CDDP, mientras que la línea celular 3B1A fue resistente al tratamiento. Estos resultados pueden ser explicados por la presencia de mecanismos no genéticos tales como alteraciones epigenéticas, metabolómicas o transcriptómicas los cuales contribuyen al fenómeno de resistencia intrínseca (39).

En años recientes, las investigaciones de mecanismos no genéticos asociados a la resistencia intrínseca a diversos agentes antitumorales se han enfocado en el estudio de una población de células conocida como tolerantes-peristentes. Las células DTPs se establecen después de un periodo de exposición a los fármacos el cual tiene una duración

de hasta 6 semanas (130,163,164). En nuestro estudio encontramos que después de 24 h de exposición a CDDP, las células DTPs mostraron alteraciones en el transcriptoma, las cuales pudieran permitirles adaptarse para sobrevivir al efecto citotóxico del fármaco. Los hallazgos de este estudio indican que después de 24 h de exposición al CDDP, las células DTPs incrementan la expresión de genes relacionados con el metabolismo oxidante de la célula, así como en la degradación de xenobióticos y fármacos por enzimas del citocromo P450. La activación de vías que favorecen el metabolismo oxidante de la célula favorece la producción de metabolitos como el aspartato, los cuales son necesarios para la proliferación de las células (165). Estudios recientes realizados en muestras provenientes de pacientes con cáncer de mama triple negativo demuestran que la expresión incrementada de genes asociados a la fosforilación oxidativa, previamente al tratamiento, se asocia con un peor pronóstico de la enfermedad (166). Adicionalmente, el incremento en la expresión de genes que favorece el metabolismo oxidante de la célula, se asocia con la inducción de una respuesta pro-inflamatoria debido a la producción de citocinas como IL-6 o IL-8, las cuales estimulan la expresión de las proteínas de membrana que expulsan al CDDP de la célula (167). Nuestros resultados aportan nueva información a los hallazgos realizados en investigaciones previas en donde se encontró que las células DTPs, desarrolladas por la exposición a TKIs, reprograman su metabolismo antioxidante y de lípidos para sobrevivir el efecto citotóxico de los agentes antitumorales (125,130).

Otro hallazgo importante de la presente investigación fue que las células DTPs a CDDP disminuyen la expresión de los genes implicados en las vías de señalización del TGF- β , WNT y ciclo celular. Como se ha mencionado previamente, las células DTPs en etapas avanzadas de su desarrollo disminuyen su proliferación de manera que entran en un estado de quiescencia celular (129). Reportes previos indican que, en células tumorales de cáncer de ovario, la sobre-expresión de genes involucrados en el control del ciclo celular se encuentra asociada con la resistencia a CDDP (168). En estas células, el arresto en el ciclo celular causa una disminución en la acumulación del CDDP dentro de la célula (169). Por el contrario, la sobre-expresión de marcadores asociados con proliferación, como Ki-67, en pacientes con cáncer cervical se relaciona con una mejor respuesta al tratamiento con CDDP (170). Adicionalmente, reportes indican que después de 15 días de exposición a TKIs, las células DTPs entran en un estado de arresto celular caracterizado por la expresión de marcadores asociados a la fase G₀ del ciclo celular, así como de senescencia (171). Los resultados de nuestro estudio son consistentes con las investigaciones recientes

realizadas en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar y osteosarcoma las cuales indican que las células residuales o DTPs al CDDP se encuentran retrasadas en el ciclo celular (164,172). Durante este proceso, las células DTPs al CDDP tienen la capacidad de activar genes involucrados en la vía de reparación del daño causado en el DNA por recombinación homóloga y de esta manera sobreviven al efecto citotóxico causado por el compuesto. En este sentido, nuestros resultados sugieren que las células DTPs a CDDP en etapas tempranas de su desarrollo disminuyen su tasa de proliferación y de manera simultánea activan las vías que permiten la detoxificación del fármaco.

Uno de los principales objetivos del presente estudio fue la identificación de posibles blancos moleculares asociados al fenómeno de resistencia intrínseca a CDDP en las líneas celulares de cáncer de pulmón empleando el modelo de células DTPs en etapas tempranas de su desarrollo. En nuestros resultados encontramos que las células DTPs a CDDP compartieron un total de 705 genes diferencialmente expresados. Dentro de estos genes asociados a la resistencia intrínseca a CDDP, 99 mostraron una alta relevancia biológica con respecto a las interacciones que se han reportado entre las proteínas codificadas por estos genes. Estos genes centrales mostraron una alta asociación con programas celulares relacionados a las vías MAPK, PI3K, reprogramación epigenética y proliferación. Nuestros resultados son congruentes con hallazgos reportados previamente en distintos modelos de células DTPs y empleando fármacos diferentes al CDDP. Los grupos de investigación de Liao y Vinogradova han reportado que las células DTPs incrementan la expresión de las demetilinasas de histonas KDM5 y KDM6 como una estrategia para sobrevivir al tratamiento (123,173). Adicionalmente, en líneas celulares de glioblastoma, las células DTPs además de sobre-expresar las desmetilasas de histonas, disminuyen la expresión de genes que controlan el ciclo celular (173).

Con respecto al CDDP, este compuesto tiene como principal blanco molecular el material genético causando lesiones las cuales pueden modificar las marcas epigenéticas a nivel de DNA o de histonas (174). Nuestros hallazgos son los primeros en reportar que la activación de vías participando en la modificación de marcas epigenéticas es un evento que se presenta desde etapas tempranas del desarrollo de las células DTPs.

La relevancia clínica del conjunto de genes centrales asociados al fenómeno de resistencia intrínseca al CDDP fue evaluada en la base de datos pública del proyecto de adenocarcinoma pulmonar del atlas del genoma del cáncer (TCGA por sus siglas en inglés)

en una cohorte de pacientes tratados con CDDP. De este análisis encontramos que el nivel de expresión de 9 genes impactó significativamente con la supervivencia total de los pacientes con cáncer de pulmón tratados con CDDP y además mostraron congruencia con la expresión obtenida en las células DTPs. Dentro de estos genes, destaca SOCS1, cuya sobre-expresión se asoció con un peor pronóstico en los pacientes. SOCS1, pertenece a una familia de ocho genes que codifican para proteínas intracelulares, las cuales regulan la señalización inducida por citocinas pro-inflamatorias mediante las vías de JAK/STAT, TLR y NF- κ B (175). En el contexto del cáncer, se ha discutido de manera amplia su papel dual como gen supresor de tumores o proto-oncogen, funciones que dependen del estadio del desarrollo tumoral (176). Con respecto al papel que juega en la resistencia a la quimioterapia aún se desconoce su participación. Nuestros resultados indican que en las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar después de las 24 h de exposición a CDDP, la expresión de SOCS1 incrementa a nivel de mRNA como de proteína. Un hallazgo interesante fue la incrementada expresión basal de la proteína SOCS1 en la línea celular 3B1A, la cual mostró resistencia al tratamiento con CDDP. Estos resultados pudieran indicar que, en esta línea celular, de manera previa al tratamiento, las células se comportan como DTPs, lo cual apoya resultados previamente reportados en melanoma y en cáncer de colón (177,178). En la línea celular 3B1A y en las células DTPs de las otras líneas, SOCS1 se localizó principalmente en el citoplasma. Este resultado puede ser explicado por las interacciones que establece SOCS1 con proteínas como STAT1, STAT3 o p53. Reportes indican que SOCS1 bloquea la interacción entre STAT3 y STAT1, inhibiendo la formación del heterodímero el cual exhibe propiedades pro-apoptóticas y antitumorales (179). Adicionalmente, se ha reportado que SOCS1 al re-localizarse en núcleo interactúa con p53, promoviendo la reparación del DNA y por lo tanto aliviando el daño genotóxico causado por el CDDP (180). El presente trabajo es el primero en reportar la posible participación de SOCS1 en el fenómeno de resistencia al CDDP, específicamente en el surgimiento de células DTPs. Uno de los resultados más importantes fue el impacto que tuvo el silenciamiento de SOCS1 en la resistencia intrínseca al CDDP. Estos hallazgos sugieren que SOCS1 pudiera ser empleado como un potencial blanco terapéutico, de manera que el bloqueo de su expresión previamente al tratamiento incrementaría la sensibilidad al CDDP. Sin embargo, se requieren estudios adicionales que evalúen la participación de SOCS1 en este fenómeno, profundizando en los efectos a nivel celular que tiene su silenciamiento, las vías que se alteran y los mecanismos que emplearía la célula

para compensar su inactivación.

Los análisis del presente trabajo se enfocan en las alteraciones transcripcionales de las células DTPs al CDDP de adenocarcinoma pulmonar después de 24 h de exposición al fármaco. A pesar de los resultados prometedores encontrados en esta investigación, se desconocen si los cambios transcripcionales detectados se mantienen o modifican a mayores tiempos de exposición al fármaco. Adicionalmente, debido a que en la clínica el tratamiento de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar se basa en la combinación de compuestos platinados con otros fármacos (principalmente vinorelbina, taxanos y gemcitabina), el presente estudio no contempla el efecto de estos compuestos en la resistencia intrínseca al CDDP. Por estas razones, se requieren más estudios que evalúen el impacto en estos aspectos. De esta manera se podría tener un conocimiento más completo en el fenómeno de resistencia intrínseca, el cual de ser posible se trasladaría a pruebas pre-clínicas y de ser exitosas trasladarse a estudios clínicos.

8. Conclusiones

En conclusión, en este trabajo hemos identificado, por medio de RNA-seq, una firma transcripcional de genes asociados a la resistencia intrínseca al CDDP en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar sin mutaciones en *EGFR* y empleando un modelo de células DTPs. Mientras que la mayoría de los modelos de células tolerantes persistentes se enfocan en estudiar las características moleculares a partir de 2 semanas de exposición a distintos compuestos antitumorales, nosotros estudiamos los eventos moleculares más tempranos en células DTPs al CDDP. En nuestros resultados encontramos que, después de 24 h de exposición, las células tolerantes persistentes a CDDP alteran la expresión de genes que participan e interactúan en vías como el metabolismo oxidante, la reprogramación epigenética y la proliferación. El presente estudio ilustra la identificación de una firma molecular, basada en la expresión de estos genes, la cual se asocia con el pronóstico de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar y tratados con CDDP. Dentro de esta firma molecular, *SOCS1* destaca por su expresión, asociación con la supervivencia e impacto en el fenómeno de resistencia intrínseca al CDDP en adenocarcinoma pulmonar. Los hallazgos de este estudio sugieren que el bloqueo o la inhibición de *SOCS1* pudiera representar una excelente estrategia terapéutica para eliminar a las células tumorales mostrando resistencia intrínseca al CDDP. Sin embargo, se requiere realizar más investigación para conocer la participación que tiene *SOCS1* en la resistencia intrínseca al

CDDP en estudios pre-clínicos y clínicos, lo cual generaría conocimiento que permita mejorar el pronóstico y la sobrevida de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

9. Referencias bibliográficas

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* (2018) 68:394–424. doi: 10.3322/caac.21492
2. Arrieta O, Zatarain-Barrón ZL, Aldaco F, Barrón F, Báez-Saldaña R, Campos-Gómez S, Trejo R, De la Garza J. Lung Cancer in Mexico. *Journal of Thoracic Oncology* (2019) 14:1695–1700. doi: 10.1016/j.jtho.2019.05.018
3. Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, Guarize J, Karachaliou N, Mok T, Petrella F, Spaggiari L, Rosell R. Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers* (2015) 1:15009. doi: 10.1038/nrdp.2015.9
4. Cetin K, Ettinger DS, Hei, O'Malley C. Survival by histologic subtype in stage IV nonsmall cell lung cancer based on data from the Surveillance, Epidemiology and End Results Program. *CLEP* (2011)139. doi: 10.2147/CLEP.S17191
5. Kocher F, Hilbe W, Seeber A, Pircher A, Schmid T, Greil R, Auberger J, Nevinny-Stickel M, Sterlacci W, Tzankov A, et al. Longitudinal analysis of 2293 NSCLC patients: A comprehensive study from the TYROL registry. *Lung Cancer* (2015) 87:193–200. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.12.006
6. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* (2008) 8:59–73. doi: 10.1038/nri2216
7. Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, Sougnez C, Greulich H, Muzny DM, Morgan MB, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* (2008) 455:1069–1075. doi: 10.1038/nature07423
8. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* (2014) 511:543–550. doi: 10.1038/nature13385
9. Park JH, Liu Y, Lemmon MA, Radhakrishnan R. Erlotinib binds both inactive and active conformations of the EGFR tyrosine kinase domain. *Biochemical Journal* (2012) 448:417–423. doi: 10.1042/BJ20121513
10. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Palmero R, Garcia-Gomez R, Pallares C, Sanchez JM, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology* (2012) 13:239–246. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70393-X
11. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, Bharat A, Bruno DS, Chang JY, Chirieac LR, D'Amico TA, et al. NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 2.2021: Featured Updates to the NCCN Guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* (2021) 19:254–266. doi: 10.6004/jnccn.2021.0013
12. Trudu F, Amato F, Vaňhara P, Pivetta T, Peña-Méndez EM, Havel J. Coordination compounds in cancer: Past, present and perspectives. *J Appl Biomed* (2015) 13:79–103. doi:

10.1016/j.jab.2015.03.003

13. Johnstone TC, Park GY, Lippard SJ. Understanding and improving platinum anticancer drugs--phenanthriplatin. *Anticancer Res* (2014) 34:471–476.
14. Rosenberg B, Vancamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature* (1969) 222:385–386. doi: 10.1038/222385a0
15. Duan X, He C, Kron SJ, Lin W. Nanoparticle formulations of cisplatin for cancer therapy. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* (2016) 8:776–791. doi: 10.1002/wnan.1390
16. Burger H, Loos WJ, Eechoute K, Verweij J, Mathijssen RHJ, Wiemer EAC. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug Resistance Updates* (2011) 14:22–34. doi: 10.1016/j.drug.2010.12.002
17. Sternberg CN, Petrylak DP, Sartor O, Witjes JA, Demkow T, Ferrero J-M, Eymard J-C, Falcon S, Calabrò F, James N, et al. Multinational, Double-Blind, Phase III Study of Prednisone and Either Satraplatin or Placebo in Patients With Castrate-Refractory Prostate Cancer Progressing After Prior Chemotherapy: The SPARC Trial. *JCO* (2009) 27:5431–5438. doi: 10.1200/JCO.2008.20.1228
18. Greish K. “Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect for Anticancer Nanomedicine Drug Targeting.,” In: Grobmyer SR, Moudgil BM, editors. *Cancer Nanotechnology. Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press (2010). p. 25–37 doi: 10.1007/978-1-60761-609-2_3
19. Newman MS, Colbern GT, Working PK, Engbers C, Amantea MA. Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (1999) 43:1–7. doi: 10.1007/s002800050855
20. Nishiyama N, Kato Y, Sugiyama Y, Kataoka K. Cisplatin-loaded polymer-metal complex micelle with time-modulated decaying property as a novel drug delivery system. *Pharmaceutical Research* (2001) 18:1035–1041. doi: 10.1023/A:1010908916184
21. Mattheolabakis G, Taoufik E, Haralambous S, Roberts ML, Avgoustakis K. In vivo investigation of tolerance and antitumor activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2009) 71:190–195. doi: 10.1016/j.ejpb.2008.09.011
22. Plummer R, Wilson RH, Calvert H, Boddy AV, Griffin M, Sludden J, Tilby MJ, Eatock M, Pearson DG, Ottley CJ, et al. A Phase I clinical study of cisplatin-incorporated polymeric micelles (NC-6004) in patients with solid tumours. *Br J Cancer* (2011) 104:593–598. doi: 10.1038/bjc.2011.6
23. Jehn CF, Boulikas T, Kourvetaris A, Kofla G, Possinger K, Lüftner D. First safety and response results of a randomized phase III study with liposomal platinum in the treatment of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Anticancer Res* (2008) 28:3961–3964.
24. Baxevanos P, Mountzios G. Novel chemotherapy regimens for advanced lung cancer: Have we reached a plateau? *Ann Transl Med* (2018) 6:139–139. doi: 10.21037/atm.2018.04.04
25. L??vi F, Metzger G, Massari C, Milano G. Oxaliplatin: Pharmacokinetics and

- Chronopharmacological Aspects. *Clinical Pharmacokinetics* (2000) 38:1–21. doi: 10.2165/00003088-200038010-00001
26. Johnsson A, Höglund P, Grubb A, Cavallin-Sta^ohl E. Cisplatin pharmacokinetics and pharmacodynamics in patients with squamous-cell carcinoma of the Head/Neck or esophagus. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (1996) 39:25–33. doi: 10.1007/s002800050534
27. Rudnev AV, Aleksenko SS, Semenova O, Hartinger CG, Timerbaev AR, Keppler BK. Determination of binding constants and stoichiometries for platinum anticancer drugs and serum transport proteins by capillary electrophoresis using the Hummel-Dreyer method. *J Sep Science* (2005) 28:121–127. doi: 10.1002/jssc.200401930
28. Kim ES, Lee JJ, He G, Chow C-W, Fujimoto J, Kalhor N, Swisher SG, Wistuba II, Stewart DJ, Siddik ZH. Tissue Platinum Concentration and Tumor Response in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO* (2012) 30:3345–3352. doi: 10.1200/JCO.2011.40.8120
29. Makovec T. Cisplatin and beyond: Molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiology and Oncology* (2019) 53:148–158. doi: 10.2478/raon-2019-0018
30. Martinho N, Santos TCB, Florindo HF, Silva LC. Cisplatin-Membrane Interactions and Their Influence on Platinum Complexes Activity and Toxicity. *Front Physiol* (2019) 9:1898. doi: 10.3389/fphys.2018.01898
31. Burger H, Zoumaro-Djayoon A, Boersma A, Helleman J, Berns E, Mathijssen R, Loos W, Wiemer E. Differential transport of platinum compounds by the human organic cation transporter hOCT2 (hSLC22A2): Interaction of platinum compounds with hSLC22A2. *British Journal of Pharmacology* (2010) 159:898–908. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00569.x
32. Howell SB, Safaei R, Larson CA, Sailor MJ. Copper Transporters and the Cellular Pharmacology of the Platinum-Containing Cancer Drugs. *Mol Pharmacol* (2010) 77:887–894. doi: 10.1124/mol.109.063172
33. Lin X, Okuda T, Holzer A, Howell SB. The Copper Transporter *CTR1* Regulates Cisplatin Uptake in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Mol Pharmacol* (2002) 62:1154–1159. doi: 10.1124/mol.62.5.1154
34. Holzer AK, Manorek GH, Howell SB. Contribution of the Major Copper Influx Transporter *CTR1* to the Cellular Accumulation of Cisplatin, Carboplatin, and Oxaliplatin. *Mol Pharmacol* (2006) 70:1390–1394. doi: 10.1124/mol.106.022624
35. Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem Rev* (2016) 116:3436–3486. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00597
36. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* (2012) 31:1869–1883. doi: 10.1038/onc.2011.384
37. Tanida S, Mizoshita T, Ozeki K, Tsukamoto H, Kamiya T, Kataoka H, Sakamuro D, Joh T. Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment. *International Journal of*

Surgical Oncology (2012) 2012:1–8. doi: 10.1155/2012/862879

38. Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG. Oxaliplatin: Mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol* (1998) 25:4–12.
39. Galluzzi L, Vitale I, Michels J, Brenner C, Szabadkai G, Harel-Bellan A, Castedo M, Kroemer G. Systems biology of cisplatin resistance: Past, present and future. *Cell Death Dis* (2014) 5:e1257–e1257. doi: 10.1038/cddis.2013.428
40. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* (2014) 740:364–378. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025
41. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: A mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2011) 12:385–392. doi: 10.1038/nrm3115
42. Matsumoto M, Nakajima W, Seike M, Gemma A, Tanaka N. Cisplatin-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer cells is dependent on Bax- and Bak-Induction pathway and synergistically activated by BH3-Mimetic ABT-263 in P53 wild-type and mutant cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2016) 473:490–496. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.03.053
43. Kartal-Yandim M, Adan-Gokbulut A, Baran Y. Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer. *Critical Reviews in Biotechnology* (2016) 36:716–726. doi: 10.3109/07388551.2015.1015957
44. Nikolaou M, Pavlopoulou A, Georgakilas AG, Kyrodimos E. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clin Exp Metastasis* (2018) 35:309–318. doi: 10.1007/s10585-018-9903-0
45. Hammerlindl H, Schaidler H. Tumor cell-intrinsic phenotypic plasticity facilitates adaptive cellular reprogramming driving acquired drug resistance. *J Cell Commun Signal* (2018) 12:133–141. doi: 10.1007/s12079-017-0435-1
46. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* (2013) 13:714–726. doi: 10.1038/nrc3599
47. Xie J, Li D-W, Chen X-W, Wang F, Dong P. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 α and MDR1/P-glycoprotein in laryngeal carcinoma tissue and hypoxic Hep-2 cells. *Oncology Letters* (2013) 6:232–238. doi: 10.3892/ol.2013.1321
48. Yang F, Gao B, Li R, Li W, Chen W, Yu Z, Zhang J. Expression levels of resistant genes affect cervical cancer prognosis. *Molecular Medicine Reports* (2017) 15:2802–2806. doi: 10.3892/mmr.2017.6328
49. Gao B, Yang F-M, Yu Z-T, Li R, Xie F, Chen J, Luo H-J, Zhang J-C. Relationship between the expression of MDR1 in hepatocellular cancer and its biological behaviors. *Int J Clin Exp Pathol* (2015) 8:6995–7001.
50. Tse J, Ghandour R, Singla N, Lotan Y. Molecular Predictors of Complete Response Following Neoadjuvant Chemotherapy in Urothelial Carcinoma of the Bladder and Upper Tracts. *IJMS* (2019) 20:793. doi: 10.3390/ijms20040793
51. Sun Y, Guan Z, Liang L, Cheng Y, Zhou J, Li J, Xu Y. HIF-1 α /MDR1 pathway confers chemoresistance to cisplatin in bladder cancer. *Oncology Reports* (2016) 35:1549–1556. doi:

10.3892/or.2015.4536

52. Li Y-Q, Yin J-Y, Liu Z-Q, Li X-P. Copper efflux transporters ATP7A and ATP7B: Novel biomarkers for platinum drug resistance and targets for therapy: ATP7A/7B AND PLATINUM DRUG RESISTANCE. *IUBMB Life* (2018) 70:183–191. doi: 10.1002/iub.1722
53. Yoshikawa K, Noguchi K, Nakano Y, Yamamura M, Takaoka K, Hashimoto-Tamaoki T, Kishimoto H. The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, confers resistance to cisplatin in human oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology* (2015) 46:2364–2370. doi: 10.3892/ijo.2015.2948
54. Katano K, Safaei R, Samimi G, Holzer A, Rochdi M, Howell SB. The Copper Export Pump ATP7B Modulates the Cellular Pharmacology of Carboplatin in Ovarian Carcinoma Cells. *Mol Pharmacol* (2003) 64:466–473. doi: 10.1124/mol.64.2.466
55. Moinuddin FM, Shinsato Y, Komatsu M, Mitsuo R, Minami K, Yamamoto M, Kawahara K, Hirano H, Arita K, Furukawa T. ATP7B expression confers multidrug resistance through drug sequestration. *Oncotarget* (2016) 7:22779–22790. doi: 10.18632/oncotarget.8059
56. Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer AK, Rochdi M, Tomioka M, Goodman M, Howell SB. Increased Expression of the Copper Efflux Transporter ATP7A Mediates Resistance to Cisplatin, Carboplatin, and Oxaliplatin in Ovarian Cancer Cells. *Clin Cancer Res* (2004) 10:4661–4669. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0137
57. Li T, Peng J, Zeng F, Zhang K, Liu J, Li X, Ouyang Q, Wang G, Wang L, Liu Z, et al. Association between polymorphisms in CTR1, CTR2, ATP7A, and ATP7B and platinum resistance in epithelial ovarian cancer. *CP* (2017) 55:774–780. doi: 10.5414/CP202907
58. Song I-S, Savaraj N, Siddik ZH, Liu P, Wei Y, Wu CJ, Kuo MT. Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells. *Mol Cancer Ther* (2004) 3:1543–1549.
59. Kim ES, Tang X, Peterson DR, Kilari D, Chow C-W, Fujimoto J, Kalhor N, Swisher SG, Stewart DJ, Wistuba II, et al. Copper transporter CTR1 expression and tissue platinum concentration in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* (2014) 85:88–93. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.04.005
60. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* (2011) 144:646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
61. Ciamporcero E, Daga M, Pizzimenti S, Roetto A, Dianzani C, Compagnone A, Palmieri A, Ullio C, Cangemi L, Pili R, et al. Crosstalk between Nrf2 and YAP contributes to maintaining the antioxidant potential and chemoresistance in bladder cancer. *Free Radical Biology and Medicine* (2018) 115:447–457. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.005
62. Chen HHW, Kuo MT. Role of Glutathione in the Regulation of Cisplatin Resistance in Cancer Chemotherapy. *Metal-Based Drugs* (2010) 2010:1–7. doi: 10.1155/2010/430939
63. Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, Huang CS, Hamilton TC, Anderson ME. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1992) 89:3070–3074. doi: 10.1073/pnas.89.7.3070

64. Meijer C, Mulder NH, Timmer-Bosscha H, Sluiter WJ, Meersma GJ, de Vries EG. Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer Res* (1992) 52:6885–6889.
65. Oguri T, Fujiwara Y, Isobe T, Katoh O, Watanabe H, Yamakido M. Expression of γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) and multidrug resistance-associated protein (MRP), but not human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT), genes correlates with exposure of human lung cancers to platinum drugs. *Br J Cancer* (1998) 77:1089–1096. doi: 10.1038/bjc.1998.181
66. Han T, Zhu X, Wang J, Zhao H, Ma Q, Zhao J, Qiu X, Fan Q. Establishment and characterization of a cisplatin-resistant human osteosarcoma cell line. *Oncology Reports* (2014) 32:1133–1139. doi: 10.3892/or.2014.3314
67. Knipp M. Metallothioneins and Platinum(II) Anti-Tumor Compounds. *CMC* (2009) 16:522–537. doi: 10.2174/092986709787458452
68. Habel N, Hamidouche Z, Girault I, Patiño-García A, Lecanda F, Marie PJ, Fromigué O. Zinc chelation: a metallothionein 2A's mechanism of action involved in osteosarcoma cell death and chemotherapy resistance. *Cell Death Dis* (2013) 4:e874–e874. doi: 10.1038/cddis.2013.405
69. Surowiak P, Materna V, Maciejczyk A, Pudełko M, Markwitz E, Spaczyński M, Dietel M, Zabel M, Lage H. Nuclear metallothionein expression correlates with cisplatin resistance of ovarian cancer cells and poor clinical outcome. *Virchows Arch* (2007) 450:279–285. doi: 10.1007/s00428-006-0362-7
70. Riddell IA. Cisplatin and Oxaliplatin: Our Current Understanding of Their Actions. *Met Ions Life Sci* (2018) 18: doi: 10.1515/9783110470734-007
71. Scharer OD. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (2013) 5:a012609–a012609. doi: 10.1101/cshperspect.a012609
72. Li Q, Gardner K, Zhang L, Tsang B, Bostick-Bruton F, Reed E. Cisplatin Induction of ERCC-1 mRNA Expression in A2780/CP70 Human Ovarian Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* (1998) 273:23419–23425. doi: 10.1074/jbc.273.36.23419
73. Sun J-M, Sung J-Y, Park SH, Kwon GY, Jeong BC, Seo SI, Jeon SS, Lee HM, Jo J, Choi HY, et al. ERCC1 as a biomarker for bladder cancer patients likely to benefit from adjuvant chemotherapy. *BMC Cancer* (2012) 12:187. doi: 10.1186/1471-2407-12-187
74. Villalobos M, Czapiewski P, Reinmuth N, Fischer JR, Andreas S, Kortsik C, Serke M, Wolf M, Neuser P, Reuss A, et al. ERCC1 assessment in upfront treatment with and without cisplatin-based chemotherapy in stage IIIB/IV non-squamous non-small cell lung cancer. *Med Oncol* (2018) 35:106. doi: 10.1007/s12032-018-1169-5
75. Mesquita KA, Alabdullah M, Griffin M, Toss MS, Fatah TMAA, Alblihy A, Moseley P, Chan SYT, Rakha EA, Madhusudan S. ERCC1-XPF deficiency is a predictor of olaparib induced synthetic lethality and platinum sensitivity in epithelial ovarian cancers. *Gynecologic Oncology* (2019) 153:416–424. doi: 10.1016/j.ygyno.2019.02.014
76. Jiang H, Li B, Wang F, Ma C, Hao T. Expression of ERCC1 and TYMS in colorectal cancer patients and the predictive value of chemotherapy efficacy. *Oncol Lett* (2019) doi:

77. Reyes GX, Schmidt TT, Kolodner RD, Hombauer H. New insights into the mechanism of DNA mismatch repair. *Chromosoma* (2015) 124:443–462. doi: 10.1007/s00412-015-0514-0
78. Vaisman A, Varchenko M, Umar A, Kunkel TA, Risinger JI, Barrett JC, Hamilton TC, Chaney SG. The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res* (1998) 58:3579–3585.
79. Goodspeed A, Jean A, Costello JC. A Whole-genome CRISPR Screen Identifies a Role of MSH2 in Cisplatin-mediated Cell Death in Muscle-invasive Bladder Cancer. *European Urology* (2019) 75:242–250. doi: 10.1016/j.eururo.2018.10.040
80. Kishi K, Doki Y, Yano M, Yasuda T, Fujiwara Y, Takiguchi S, Kim S, Higuchi I, Monden M. Reduced MLH1 expression after chemotherapy is an indicator for poor prognosis in esophageal cancers. *Clin Cancer Res* (2003) 9:4368–4375.
81. Watanabe Y, Ueda H, Etoh T, Koike E, Fujinami N, Mitsuhashi A, Hoshi H. A change in promoter methylation of hMLH1 is a cause of acquired resistance to platinum-based chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res* (2007) 27:1449–1452.
82. Negreanu L, Salsbury FR. Non-specificity and synergy at the binding site of the carboplatin-induced DNA adduct via molecular dynamics simulations of the MutS α -DNA recognition complex. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* (2014) 32:969–992. doi: 10.1080/07391102.2013.799437
83. Prakash S, Johnson RE, Prakash L. EUKARYOTIC TRANSLESION SYNTHESIS DNA POLYMERASES: Specificity of Structure and Function. *Annu Rev Biochem* (2005) 74:317–353. doi: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133250
84. Chaney SG, Campbell SL, Bassett E, Wu Y. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (2005) 53:3–11. doi: 10.1016/j.critrevonc.2004.08.008
85. Zhang J, Sun W, Ren C, Kong X, Yan W, Chen X. A PolH Transcript with a Short 3'UTR Enhances PolH Expression and Mediates Cisplatin Resistance. *Cancer Res* (2019) 79:3714–3724. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3928
86. Li X, Ren J, Chen P, Chen Y, Wu M, Wu Y, Chen K, Li J. Co-inhibition of Pol η and ATR sensitizes cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cells to cisplatin by impeding DNA damage repair. *Acta Pharmacol Sin* (2018) 39:1359–1372. doi: 10.1038/aps.2017.187
87. Ceppi P, Novello S, Cambieri A, Longo M, Monica V, Lo Iacono M, Giaj-Levra M, Saviozzi S, Volante M, Papotti M, et al. Polymerase η mRNA Expression Predicts Survival of Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Platinum-Based Chemotherapy. *Clin Cancer Res* (2009) 15:1039–1045. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1227
88. Wang Z, Xu Z, Zhu G. A Platinum(IV) Anticancer Prodrug Targeting Nucleotide Excision Repair To Overcome Cisplatin Resistance. *Angew Chem Int Ed* (2016) 55:15564–15568. doi: 10.1002/anie.201608936
89. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci

- L, Amelio I, Andrews DW, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* (2018) 25:486–541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4
90. Kruse J-P, Gu W. Modes of p53 Regulation. *Cell* (2009) 137:609–622. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.050
91. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *JCO* (1998) 16:3158–3168. doi: 10.1200/JCO.1998.16.9.3158
92. Fokkema E, Groen HJM, Helder MN, de Vries EGE, Meijer C. JM216-, JM118-, and cisplatin-induced cytotoxicity in relation to platinum–DNA adduct formation, glutathione levels and p53 status in human tumour cell lines with different sensitivities to cisplatin. *Biochemical Pharmacology* (2002) 63:1989–1996. doi: 10.1016/S0006-2952(02)00983-8
93. Gatti L, Supino R, Perego P, Pavesi R, Caserini C, Carenini N, Righetti SC, Zuco V, Zunino F. Apoptosis and growth arrest induced by platinum compounds in U2-OS cells reflect a specific DNA damage recognition associated with a different p53-mediated response. *Cell Death Differ* (2002) 9:1352–1359. doi: 10.1038/sj.cdd.4401109
94. Lavarino C, Pilotti S, Oggionni M, Gatti L, Perego P, Bresciani G, Pierotti MA, Scambia G, Ferrandina G, Fagotti A, et al. p53 Gene Status and Response to Platinum/Paclitaxel-Based Chemotherapy in Advanced Ovarian Carcinoma. *JCO* (2000) 18:3936–3945. doi: 10.1200/JCO.2000.18.23.3936
95. Yang-Hartwich Y, Soteras MG, Lin ZP, Holmberg J, Sumi N, Craveiro V, Liang M, Romanoff E, Bingham J, Garofalo F, et al. p53 protein aggregation promotes platinum resistance in ovarian cancer. *Oncogene* (2015) 34:3605–3616. doi: 10.1038/onc.2014.296
96. Castedo M, Coquelle A, Vivet S, Vitale I, Kauffmann A, Dessen P, Pequignot MO, Casares N, Valent A, Mouhamad S, et al. Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. *EMBO J* (2006) 25:2584–2595. doi: 10.1038/sj.emboj.7601127
97. Miyake H, Hanada N, Nakamura H, Kagawa S, Fujiwara T, Hara I, Eto H, Gohji K, Arakawa S, Kamidono S, et al. Overexpression of Bcl-2 in bladder cancer cells inhibits apoptosis induced by cisplatin and adenoviral-mediated p53 gene transfer. *Oncogene* (1998) 16:933–943. doi: 10.1038/sj.onc.1201602
98. Kim CW, Lu JN, Go S-I, Jung JH, Yi SM, Jeong J-H, Hah Y-S, Han MS, Park JW, Lee WS, et al. p53 restoration can overcome cisplatin resistance through inhibition of Akt as well as induction of Bax. *International Journal of Oncology* (2013) 43:1495–1502. doi: 10.3892/ijo.2013.2070
99. Michels J, Obrist F, Vitale I, Lissa D, Garcia P, Behnam-Motlagh P, Kohno K, Wu GS, Brenner C, Castedo M, et al. MCL-1 dependency of cisplatin-resistant cancer cells. *Biochemical Pharmacology* (2014) 92:55–61. doi: 10.1016/j.bcp.2014.07.029
100. Toyozumi Y, Arima N, Izumaru S, Kato S, Morimatsu M, Nakashima T. Loss of caspase-8 activation pathway is a possible mechanism for CDDP resistance in human laryngeal squamous cell carcinoma, HEp-2 cells. *Int J Oncol* (2004) 25:721–728.
101. Zhou S-F, Ren T, Shan J, Li M, Qing Y, Wang G, Li Q, Liu G, Li C, Peng Y, et al. Small-

molecule BH3 mimetic and pan-Bcl-2 inhibitor AT-101 enhances the antitumor efficacy of cisplatin through inhibition of APE1 repair and redox activity in non-small-cell lung cancer. *DDDT* (2015)2887. doi: 10.2147/DDDT.S82724

102. Hotamisligil GS, Davis RJ. Cell Signaling and Stress Responses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2016) 8:a006072. doi: 10.1101/cshperspect.a006072
103. Jiao Q, Bi L, Ren Y, Song S, Wang Q, Wang Y. Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Mol Cancer* (2018) 17:36. doi: 10.1186/s12943-018-0801-5
104. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol* (2018) 12:3–20. doi: 10.1002/1878-0261.12155
105. Granados ML, Hudson LG, Samudio-Ruiz SL. Contributions of the Epidermal Growth Factor Receptor to Acquisition of Platinum Resistance in Ovarian Cancer Cells. *PLoS ONE* (2015) 10:e0136893. doi: 10.1371/journal.pone.0136893
106. Lin L, Li X, Pan C, Lin W, Shao R, Liu Y, Zhang J, Luo Y, Qian K, Shi M, et al. ATXN2L upregulated by epidermal growth factor promotes gastric cancer cell invasiveness and oxaliplatin resistance. *Cell Death Dis* (2019) 10:173. doi: 10.1038/s41419-019-1362-2
107. Kaehler C, Isensee J, Nonhoff U, Terrey M, Hucho T, Lehrach H, Krobitsch S. Ataxin-2-Like Is a Regulator of Stress Granules and Processing Bodies. *PLoS ONE* (2012) 7:e50134. doi: 10.1371/journal.pone.0050134
108. Fijołek J, Wiatr E, Rowińska-Zakrzewska E, Giedronowicz D, Langfort R, Chabowski M, Orłowski T, Roszkowski K. p53 and HER2/neu expression in relation to chemotherapy response in patients with non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers* (2006) 21:81–87.
109. Yu M, Qi B, Xiaoxiang W, Xu J, Liu X. Baicalein increases cisplatin sensitivity of A549 lung adenocarcinoma cells via PI3K/Akt/NF- κ B pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* (2017) 90:677–685. doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.001
110. Pietrocola F, Izzo V, Niso-Santano M, Vacchelli E, Galluzzi L, Maiuri MC, Kroemer G. Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Seminars in Cancer Biology* (2013) 23:310–322. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.05.008
111. Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the Integrated Stress Response. *Molecular Cell* (2010) 40:280–293. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.023
112. Panda PK, Mukhopadhyay S, Das DN, Sinha N, Naik PP, Bhutia SK. Mechanism of autophagic regulation in carcinogenesis and cancer therapeutics. *Seminars in Cell & Developmental Biology* (2015) 39:43–55. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.013
113. Daskalaki I, Gkikas I, Tavernarakis N. Hypoxia and Selective Autophagy in Cancer Development and Therapy. *Front Cell Dev Biol* (2018) 6:104. doi: 10.3389/fcell.2018.00104
114. Wu H-M, Jiang Z-F, Ding P-S, Shao L-J, Liu R-Y. Hypoxia-induced autophagy mediates cisplatin resistance in lung cancer cells. *Sci Rep* (2015) 5:12291. doi: 10.1038/srep12291
115. Pagotto A, Pilotto G, Mazzoldi EL, Nicoletto MO, Frezzini S, Pastò A, Amadori A. Autophagy inhibition reduces chemoresistance and tumorigenic potential of human ovarian cancer stem cells. *Cell Death Dis* (2017) 8:e2943–e2943. doi: 10.1038/cddis.2017.327

116. Gaur S, Chen L, Yang L, Wu X, Un F, Yen Y. Inhibitors of mTOR overcome drug resistance from topoisomerase II inhibitors in solid tumors. *Cancer Letters* (2011) 311:20–28. doi: 10.1016/j.canlet.2011.06.005
117. Wozniak AJ, Crowley JJ, Balcerzak SP, Weiss GR, Spiridonidis CH, Baker LH, Albain KS, Kelly K, Taylor SA, Gandara DR, et al. Randomized trial comparing cisplatin with cisplatin plus vinorelbine in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group study. *JCO* (1998) 16:2459–2465. doi: 10.1200/JCO.1998.16.7.2459
118. Lin JJ, Shaw AT. Resisting Resistance: Targeted Therapies in Lung Cancer. *Trends in Cancer* (2016) 2:350–364. doi: 10.1016/j.trecan.2016.05.010
119. Li R, Liu J, Fang Z, Liang Z, Chen X. Identification of Mutations Related to Cisplatin-Resistance and Prognosis of Patients With Lung Adenocarcinoma. *Front Pharmacol* (2020) 11:572627. doi: 10.3389/fphar.2020.572627
120. Sosa Iglesias V, Giuranno L, Dubois LJ, Theys J, Vooijs M. Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer: A Potential for NOTCH Targeting? *Front Oncol* (2018) 8:267. doi: 10.3389/fonc.2018.00267
121. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, McDermott U, Azizian N, Zou L, Fischbach MA, et al. A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. *Cell* (2010) 141:69–80. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.027
122. Song C, Piva M, Sun L, Hong A, Moriceau G, Kong X, Zhang H, Lomeli S, Qian J, Yu CC, et al. Recurrent Tumor Cell–Intrinsic and –Extrinsic Alterations during MAPKi-Induced Melanoma Regression and Early Adaptation. *Cancer Discov* (2017) 7:1248–1265. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0401
123. Vinogradova M, Gehling VS, Gustafson A, Arora S, Tindell CA, Wilson C, Williamson KE, Guler GD, Gangurde P, Manieri W, et al. An inhibitor of KDM5 demethylases reduces survival of drug-tolerant cancer cells. *Nat Chem Biol* (2016) 12:531–538. doi: 10.1038/nchembio.2085
124. Goldman A, Khiste S, Freinkman E, Dhawan A, Majumder B, Mondal J, Pinkerton AB, Eton E, Medhi R, Chandrasekar V, et al. Targeting tumor phenotypic plasticity and metabolic remodeling in adaptive cross-drug tolerance. *Sci Signal* (2019) 12:eaas8779. doi: 10.1126/scisignal.aas8779
125. Shen S, Faouzi S, Souquere S, Roy S, Routier E, Libenciuc C, André F, Pierron G, Scoazec J-Y, Robert C. Melanoma Persister Cells Are Tolerant to BRAF/MEK Inhibitors via ACOX1-Mediated Fatty Acid Oxidation. *Cell Reports* (2020) 33:108421. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108421
126. Russo M, Pompei S, Sogari A, Corigliano M, Crisafulli G, Bertotti A, Gherardi M, Di Nicolantonio F, Bardelli A, Lagomarsino MC. Drug-induced colorectal cancer persister cells show increased mutation rate. [preprint]. *Cancer Biology* (2021). doi: 10.1101/2021.05.17.444478
127. Oren Y, Tsabar M, Cuoco MS, Amir-Zilberstein L, Cabanos HF, Hütter J-C, Hu B, Thakore PI, Tabaka M, Fulco CP, et al. Cycling cancer persister cells arise from lineages with distinct programs. *Nature* (2021) 596:576–582. doi: 10.1038/s41586-021-03796-6
128. Poojan S, Bae S-H, Min J-W, Lee EY, Song Y, Kim HY, Sim HW, Kang E-K, Kim Y-H, Lee H-O, et al. Cancer cells undergoing epigenetic transition show short-term resistance and are

- transformed into cells with medium-term resistance by drug treatment. *Exp Mol Med* (2020) 52:1102–1115. doi: 10.1038/s12276-020-0464-3
129. Ravindran Menon D, Das S, Krepler C, Vultur A, Rinner B, Schauer S, Kashofer K, Wagner K, Zhang G, Bonyadi Rad E, et al. A stress-induced early innate response causes multidrug tolerance in melanoma. *Oncogene* (2015) 34:4448–4459. doi: 10.1038/onc.2014.372
130. Hangauer MJ, Viswanathan VS, Ryan MJ, Bole D, Eaton JK, Matov A, Galeas J, Dhruv HD, Berens ME, Schreiber SL, et al. Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature* (2017) 551:247–250. doi: 10.1038/nature24297
131. Niveditha D, Mukherjee S, Majumder S, Chowdhury R, Chowdhury S. A global transcriptomic pipeline decoding core network of genes involved in stages leading to acquisition of drug-resistance to cisplatin in osteosarcoma cells. *Bioinformatics* (2019) 35:1701–1711. doi: 10.1093/bioinformatics/bty868
132. Lopez-Gonzalez JS, Prado-Garcia H, Aguilar-Cazares D, Molina-Guarneros JA, Morales-Fuentes J, Mandoki JJ. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer* (2004) 43:275–283. doi: 10.1016/j.lungcan.2003.09.005
133. López-González JS, Aguilar-Cázares D, Prado-García H, Nieto-Rodríguez A, Mandoki JJ, Avila-Moreno F, Rivera RM, Chavarría-Garcés J. Lack of correlation between growth inhibition by TGF- β and the percentage of cells expressing type II TGF- β receptor in human non-small cell lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer* (2002) 38:149–158. doi: 10.1016/S0169-5002(02)00177-0
134. Àvila-Moreno F, López-González JS, Galindo-Rodríguez G, Prado-García H, Bajaña S, Sánchez-Torres C. Lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma cell lines use different mediators to induce comparable phenotypic and functional changes in human monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* (2006) 55:598–611. doi: 10.1007/s00262-005-0060-3
135. Urien S, Lokiec F. Population pharmacokinetics of total and unbound plasma cisplatin in adult patients. *Br J Clin Pharmacol* (2004) 57:756–763. doi: 10.1111/j.1365-2125.2004.02082.x
136. Rajkumar P. Cisplatin Concentrations in Long and Short Duration Infusion: Implications for the Optimal Time of Radiation Delivery. *JCDR* (2016) doi: 10.7860/JCDR/2016/18181.8126
137. Smith SM, Wunder MB, Norris DA, Shellman YG. A Simple Protocol for Using a LDH-Based Cytotoxicity Assay to Assess the Effects of Death and Growth Inhibition at the Same Time. *PLoS ONE* (2011) 6:e26908. doi: 10.1371/journal.pone.0026908
138. Corchete LA, Rojas EA, Alonso-López D, De Las Rivas J, Gutiérrez NC, Burguillo FJ. Systematic comparison and assessment of RNA-seq procedures for gene expression quantitative analysis. *Sci Rep* (2020) 10:19737. doi: 10.1038/s41598-020-76881-x
139. FastQC. (2015) <https://qubeshub.org/resources/fastqc>
140. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* (2016) 32:3047–3048. doi: 10.1093/bioinformatics/btw354
141. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* (2014) 30:2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170

142. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet j* (2011) 17:10. doi: 10.14806/ej.17.1.200
143. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* (2013) 29:15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635
144. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* (2011) 12:323. doi: 10.1186/1471-2105-12-323
145. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* (2010) 26:139–140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616
146. Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* (2012) 16:284–287. doi: 10.1089/omi.2011.0118
147. Hothorn T, Lausen B. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Computational Statistics & Data Analysis* (2003) 43:121–137. doi: 10.1016/S0167-9473(02)00225-6
148. Lønning PE, Knappskog S. Mapping genetic alterations causing chemoresistance in cancer: identifying the roads by tracking the drivers. *Oncogene* (2013) 32:5315–5330. doi: 10.1038/onc.2013.48
149. Dhimolea E, de Matos Simoes R, Kansara D, Al'Khafaji A, Bouyssou J, Weng X, Sharma S, Raja J, Awate P, Shirasaki R, et al. An Embryonic Diapause-like Adaptation with Suppressed Myc Activity Enables Tumor Treatment Persistence. *Cancer Cell* (2021) 39:240-256.e11. doi: 10.1016/j.ccell.2020.12.002
150. Rehman SK, Haynes J, Collignon E, Brown KR, Wang Y, Nixon AML, Bruce JP, Wintersinger JA, Singh Mer A, Lo EBL, et al. Colorectal Cancer Cells Enter a Diapause-like DTP State to Survive Chemotherapy. *Cell* (2021) 184:226-242.e21. doi: 10.1016/j.cell.2020.11.018
151. Swanton C, Govindan R. Clinical Implications of Genomic Discoveries in Lung Cancer. *N Engl J Med* (2016) 374:1864–1873. doi: 10.1056/NEJMra1504688
152. de Vries G, Rosas-Plaza X, van Vugt MATM, Gietema JA, de Jong S. Testicular cancer: Determinants of cisplatin sensitivity and novel therapeutic opportunities. *Cancer Treatment Reviews* (2020) 88:102054. doi: 10.1016/j.ctrv.2020.102054
153. Sirohi B, Ashley S, Norton A, Popat S, Hughes S, Papadopoulos P, Priest K, O'Brien M. Early Response to Platinum-Based First-Line Chemotherapy in Non-small Cell Lung Cancer May Predict Survival. *Journal of Thoracic Oncology* (2007) 2:735–740. doi: 10.1097/JTO.0b013e31811f3a7d
154. Zhang C, Li C, Wang Y, Xu L, He X, Zeng Q, Zeng C, Mai F, Hu B, Ouyang D. Chemotherapeutic paclitaxel and cisplatin differentially induce pyroptosis in A549 lung cancer cells via caspase-3/GSDME activation. *Apoptosis* (2019) 24:312–325. doi: 10.1007/s10495-019-01515-1
155. Chen J, Zhang L, Zhou H, Wang W, Luo Y, Yang H, Yi H. Inhibition of autophagy promotes cisplatin-induced apoptotic cell death through Atg5 and Beclin 1 in A549 human lung

cancer cells. *Mol Med Report* (2018) doi: 10.3892/mmr.2018.8686

156. Cao F, Shi M, Yu B, Cheng X, Li X, Jia X. Epigenetic Mechanism of Enrichment of A549 Lung Cancer Stem Cells with 5-Fu. *OTT* (2021) Volume 14:3783–3794. doi: 10.2147/OTT.S233129

157. Wang K, Liu X, Liu Q, Ho I ht, Wei X, Yin T, Zhan Y, Zhang W, Zhang W, Chen B, et al. Hederagenin potentiated cisplatin- and paclitaxel-mediated cytotoxicity by impairing autophagy in lung cancer cells. *Cell Death Dis* (2020) 11:611. doi: 10.1038/s41419-020-02880-5

158. Plaimée P, Weerapreeyakul N, Barusrux S, Johns NP. Melatonin potentiates cisplatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells. *Cell Prolif* (2015) 48:67–77. doi: 10.1111/cpr.12158

159. Cao X, Hou J, An Q, Assaraf YG, Wang X. Towards the overcoming of anticancer drug resistance mediated by p53 mutations. *Drug Resistance Updates* (2020) 49:100671. doi: 10.1016/j.drup.2019.100671

160. Lisek K, Campaner E, Ciani Y, Walerych D, Del Sal G. Mutant p53 tunes the NRF2-dependent antioxidant response to support survival of cancer cells. *Oncotarget* (2018) 9:20508–20523. doi: 10.18632/oncotarget.24974

161. Ma X, Rousseau V, Sun H, Lantuejoul S, Filipits M, Pirker R, Popper H, Mendiboure J, Vataire A-L, Le Chevalier T, et al. Significance of TP53 mutations as predictive markers of adjuvant cisplatin-based chemotherapy in completely resected non-small-cell lung cancer. *Molecular Oncology* (2014) 8:555–564. doi: 10.1016/j.molonc.2013.12.015

162. Ma X, Le Teuff G, Lacas B, Tsao MS, Graziano S, Pignon J-P, Douillard J-Y, Le Chevalier T, Seymour L, Filipits M, et al. Prognostic and Predictive Effect of TP53 Mutations in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer from Adjuvant Cisplatin-Based Therapy Randomized Trials: A LACE-Bio Pooled Analysis. *Journal of Thoracic Oncology* (2016) 11:850–861. doi: 10.1016/j.jtho.2016.02.002

163. Menon DR, Das S, Krepler C, Vultur A, Rinner B, Schauer S, Kashofer K, Wagner K, Zhang G, Rad EB, et al. Erratum: A stress-induced early innate response causes multidrug tolerance in melanoma. *Oncogene* (2015) 34:4545–4545. doi: 10.1038/onc.2014.432

164. Gonzalez Rajal A, Marzec KA, McCloy RA, Nobis M, Chin V, Hastings JF, Lai K, Kennerson M, Hughes WE, Vaghjiani V, et al. A non-genetic, cell cycle-dependent mechanism of platinum resistance in lung adenocarcinoma. *eLife* (2021) 10:e65234. doi: 10.7554/eLife.65234

165. Molina JR, Sun Y, Protopopova M, Gera S, Bandi M, Bristow C, McAfoos T, Morlacchi P, Ackroyd J, Agip A-NA, et al. An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nat Med* (2018) 24:1036–1046. doi: 10.1038/s41591-018-0052-4

166. Evans KW, Yuca E, Scott SS, Zhao M, Paez Arango N, Cruz Pico CX, Saridogan T, Shariati M, Class CA, Bristow CA, et al. Oxidative Phosphorylation Is a Metabolic Vulnerability in Chemotherapy-Resistant Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Research* (2021) 81:5572–5581. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-3242

167. Matassa DS, Amoroso MR, Lu H, Avolio R, Arzeni D, Procaccini C, Faicchia D, Maddalena F, Simeon V, Agliarulo I, et al. Oxidative metabolism drives inflammation-induced

- platinum resistance in human ovarian cancer. *Cell Death Differ* (2016) 23:1542–1554. doi: 10.1038/cdd.2016.39
168. Itamochi H, Kigawa J, Terakawa N. Mechanisms of chemoresistance and poor prognosis in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Science* (2008) 99:653–658. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00747.x
169. Dimanche-Boitrel M-T, Pelletier H, Genne P, Petit J-M, Grimellec CL, Canal P, Ardiet C, Bastian G, Chauffert B. Confluence-dependent resistance in human colon cancer cells: Role of reduced drug accumulation and low intrinsic chemosensitivity of resting cells. *Int J Cancer* (1992) 50:677–682. doi: 10.1002/ijc.2910500502
170. Krtinic D, Zivadinovic R, Jovic Z, Pesic S, Mihailovic D, Ristic L, Cvetanovic A, Todorovska I, Zivkovic N, Rankovic GN, et al. Significance of the Ki-67 proliferation index in the assessment of the therapeutic response to cisplatin-based chemotherapy in patients with advanced cervical cancer. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* (2018) 22:5149–5155. doi: 10.26355/eurev_201808_15710
171. Chang CA, Jen J, Jiang S, Sayad A, Mer AS, Brown KR, Nixon AML, Dhabaria A, Tang KH, Venet D, et al. Ontogeny and Vulnerabilities of Drug-Tolerant Persisters in HER2+ Breast Cancer. *Cancer Discovery* (2022) 12:1022–1045. doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-1265
172. Granada AE, Jiménez A, Stewart-Ornstein J, Blüthgen N, Reber S, Jambhekar A, Lahav G. The effects of proliferation status and cell cycle phase on the responses of single cells to chemotherapy. *MBoC* (2020) 31:845–857. doi: 10.1091/mbc.E19-09-0515
173. Liau BB, Sievers C, Donohue LK, Gillespie SM, Flavahan WA, Miller TE, Venteicher AS, Hebert CH, Carey CD, Rodig SJ, et al. Adaptive Chromatin Remodeling Drives Glioblastoma Stem Cell Plasticity and Drug Tolerance. *Cell Stem Cell* (2017) 20:233-246.e7. doi: 10.1016/j.stem.2016.11.003
174. Loren P, Saavedra N, Saavedra K, Zambrano T, Moriel P, Salazar LA. Epigenetic Mechanisms Involved in Cisplatin-Induced Nephrotoxicity: An Update. *Pharmaceuticals* (2021) 14:491. doi: 10.3390/ph14060491
175. Sharma J, Larkin J. Therapeutic Implication of SOCS1 Modulation in the Treatment of Autoimmunity and Cancer. *Front Pharmacol* (2019) 10:324. doi: 10.3389/fphar.2019.00324
176. Beurivage C, Champagne A, Tobelaim WS, Pomerleau V, Menendez A, Saucier C. SOCS1 in cancer: An oncogene and a tumor suppressor. *Cytokine* (2016) 82:87–94. doi: 10.1016/j.cyto.2016.01.005
177. Russo M, Pompei S, Sogari A, Corigliano M, Crisafulli G, Puliafito A, Lamba S, Erriquez J, Bertotti A, Gherardi M, et al. A modified fluctuation-test framework characterizes the population dynamics and mutation rate of colorectal cancer persister cells. *Nat Genet* (2022) 54:976–984. doi: 10.1038/s41588-022-01105-z
178. Shaffer SM, Dunagin MC, Torborg SR, Torre EA, Emert B, Krepler C, Beqiri M, Sproesser K, Brafford PA, Xiao M, et al. Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* (2017) 546:431–435. doi: 10.1038/nature22794
179. Liau NPD, Laktyushin A, Lucet IS, Murphy JM, Yao S, Whitlock E, Callaghan K, Nicola

NA, Kershaw NJ, Babon JJ. The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. *Nat Commun* (2018) 9:1558. doi: 10.1038/s41467-018-04013-1

180. Mallette FA, Calabrese V, Ilangumaran S, Ferbeyre G. SOCS1, a novel interaction partner of p53 controlling oncogene-induced senescence. *Aging* (2010) 2:445–452. doi: 10.18632/aging.100163

Anexo (Artículo requisito para la obtención del grado)



OPEN ACCESS

EDITED BY
Majid Momeny,
University of California San Francisco,
United States

REVIEWED BY
Greta Zara,
City of Hope National Medical Center,
United States
Solmaz AghaAmiri,
University of Texas Health Science Center
at Houston, United States

*CORRESPONDENCE
Jose S. Lopez-Gonzalez
✉ slopezgonzalez@yahoo.com

[†]These authors share first authorship

RECEIVED 19 April 2023
ACCEPTED 22 September 2023
PUBLISHED 17 October 2023

CITATION
Chavez-Dominguez R, Aguilar-Cazares D,
Perez-Medina M, Avila-Rios S,
Soto-Nava M, Mendez-Tenorio A,
Islas-Vazquez L, Benito-Lopez JJ,
Galicia-Velasco M and Lopez-Gonzalez JS
(2023) Transcriptional signature of early
cisplatin drug-tolerant persister cells in
lung adenocarcinoma.
Front. Oncol. 13:1208403.
doi: 10.3389/fonc.2023.1208403

COPYRIGHT
© 2023 Chavez-Dominguez,
Aguilar-Cazares, Perez-Medina, Avila-Rios,
Soto-Nava, Mendez-Tenorio, Islas-Vazquez,
Benito-Lopez, Galicia-Velasco and
Lopez-Gonzalez. 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.

Transcriptional signature of early cisplatin drug-tolerant persister cells in lung adenocarcinoma

Rodolfo Chavez-Dominguez^{1,2†}, Dolores Aguilar-Cazares^{1†},
Mario Perez-Medina^{1,3†}, Santiago Avila-Rios⁴,
Maribel Soto-Nava⁴, Alfonso Mendez-Tenorio⁵,
Lorenzo Islas-Vazquez⁶, Jesus J. Benito-Lopez^{1,2},
Miriam Galicia-Velasco⁷ and Jose S. Lopez-Gonzalez^{1*}

¹Departamento de Enfermedades Crónicas-Degenerativas, Laboratorio de Cáncer Pulmonar, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ismael Cosío Villegas, Ciudad de México, México, ²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México, ³Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México, ⁴Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Ciudad de México, México, ⁵Laboratorio de Biotecnología y Bioinformática Genómica, Departamento de Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México, ⁶Departamento de Inmunología y Unidad de Investigación, Instituto de Oftalmología "Conde de Valenciana", Ciudad de México, México

Resistance to cisplatin is the main cause of treatment failure in lung adenocarcinoma. Drug-tolerant-persister (DTP) cells are responsible for intrinsic resistance, since they survive the initial cycles of treatment, representing a reservoir for the emergence of clones that display acquired resistance. Although the molecular mechanisms of DTP cells have been described, few studies have investigated the earliest molecular alterations of DTP cells in intrinsic resistance to cisplatin. In this work, we report a gene expression signature associated with the emergence of cisplatin-DTP cells in lung adenocarcinoma cell lines. After a single exposure to cisplatin, we sequenced the transcriptome of cisplatin-DTPs to identify differentially expressed genes. Bioinformatic analysis revealed that early cisplatin-DTP cells deregulate metabolic and proliferative pathways to survive the drug insult. Interaction network analysis identified three highly connected submodules in which SOCS1 had a significant participation in controlling the proliferation of cisplatin-DTP cells. Expression of the candidate genes and their corresponding protein was validated in lung adenocarcinoma cell lines. Importantly, the expression level of SOCS1 was different between CDDP-susceptible and CDDP-resistant lung adenocarcinoma cell lines. Moreover, knockdown of SOCS1 in the CDDP-resistant cell line partially promoted its susceptibility to CDDP. Finally, the clinical relevance of the candidate genes was analyzed *in silico*, according to the overall survival of cisplatin-treated patients from The Cancer Genome Atlas. Survival analysis showed that downregulation or upregulation of the selected genes was associated with overall survival. The results obtained indicate that these genes could be employed as predictive biomarkers or potential targets to improve the effectiveness of CDDP treatment in lung cancer patients.

KEYWORDS

lung cancer, non-small cell lung carcinoma, lung adenocarcinoma, cisplatin, chemotherapy resistance, intrinsic resistance, drug-tolerant persister cells, SOCS1

1 Introduction

Lung cancer is one of the leading causes of cancer-related mortality worldwide, according to GLOBOCAN (1). Lung cancer is divided into small cell lung carcinoma (SCLC) and non-small cell lung carcinoma (NSCLC). The latter group accounts for 85% of diagnosed cases and adenocarcinoma is the most frequent histologic type (2). Despite the great efforts that have been made in lung cancer diagnosis, most lung cancer patients are diagnosed at advanced stages, where metastasis is already present, limiting the treatment options to targeted or conventional therapy (2). According to the National Comprehensive Cancer Network guidelines for lung cancer treatment, patients whose tumors harbor *EGFR*-activating mutations must be treated with targeted therapy using tyrosine kinase inhibitors (TKIs) (3). However, not all patients benefit from treatment with TKIs, since some patients do not present favorable responses at treatment onset, or responders eventually acquire resistance. In both cases, or in patients not harboring *EGFR* mutant tumors, administration of cisplatin (CDDP) is the standard care treatment (3, 4). CDDP mainly affects cells that show high proliferation rates by forming adducts at the N-7 position of purines, causing DNA lesions that inhibit cell proliferation and induce cell death (5). However, the effectiveness of CDDP treatment in lung cancer remains limited due to the acquisition of therapy resistance (6). Although the mechanisms of CDDP-acquired resistance have been extensively studied in distinct types of cancer (7), little is known about the early molecular alterations that could be related to CDDP intrinsic resistance.

Recent reports demonstrate that non-genetic processes play a critical role in the development of resistance against different antitumoral agents (8, 9). During this process, a sub-population of cells known as drug-tolerant persister (DTP) cells survive the initial exposure to chemotherapy or targeted therapy. DTP cells are characterized by limited proliferation, altered metabolism associated with dormancy, activation of chromatin-remodeling enzymes, and activation of less error-prone DNA polymerases (10–12). These DTP cells represent a reservoir for the emergence of clones showing irreversible genetic drug resistance. Initial studies from Sharma et al. demonstrated that *EGFR*-mutant lung adenocarcinoma TKI-DTP cells exhibited altered chromatin remodeling and overexpression of insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R). Thus, targeting IGF-1R and chromatin-modifying enzymes allowed this resistance to be overcome, eliminating DTP cells (13). Hangauer et al. demonstrated that DTP cells of breast cancer cell lines upregulated their antioxidant metabolism, rendering these cells susceptible to knockdown or pharmacological inhibition of the enzyme glutathione peroxidase-4 (14). Recently, research in osteosarcoma cell lines revealed that CDDP-DTP cells reprogram their transcriptome by altering the expression of genes of the MAPK, TGF- β , and NF- κ B pathways, suggesting promising targets to ablate these cells (15). Therefore, DTP cells represent an excellent target to overcome resistance to antitumoral agents. Currently, most *in vitro* studies using DTP cells are focused on molecular changes elicited after several weeks of drug exposure. However, the key mechanisms

governing the earliest stages of the emergence of CDDP-DTP cells in lung cancer remain to be understood.

In the present work, lung adenocarcinoma cell lines were single exposed to CDDP to analyze the earliest molecular changes associated with the emergence of CDDP-DTP cells. After 24 h of CDDP exposure, residual DTP cells exhibited transcriptional changes, which allowed them to survive the initial insult of the cytotoxic treatment. We employed RNA-seq to examine the transcriptional changes of early CDDP-DTP cells and identify key genes associated with this event. Interestingly, this early DTP state was controlled by a network of protein-coding genes participating in chromatin remodeling, metabolism of lipid kinases, and cell proliferation. Clinical validation using public datasets revealed that the overexpression or underexpression of these hub genes is associated with better or worse overall survival (OS) of lung cancer patients treated with CDDP. Among these genes, overexpression of the Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS1) was notably associated with poor survival of lung cancer patients. Furthermore, high expression of SOCS1 was associated with resistance to CDDP in the lung cancer cell lines employed. Further studies are needed to deepen the understanding of the role of SOCS1 in the chemoresistance process. These hub genes could represent promising predictive biomarkers or potential therapeutic targets, leading to improved efficacy of CDDP treatment and clinical outcome for lung cancer patients.

2 Materials and methods

2.1 Cell lines and culture conditions

The A549, H1299, and H1573 cell lines acquired from the ATCC (Manassas, VA, USA), and the 3B1A cell line, previously established by our group, were studied (16). All cell lines were obtained from treatment-free patients with lung adenocarcinoma, and do not harbor mutations in the *EGFR* gene. All cell lines were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1% antibiotics (complete media) and incubated in a humidified atmosphere at 37°C with 5% CO₂. Cisplatin (CDDP) was purchased from Sigma-Aldrich, cat. P4394 (St. Louis, MO, USA) and dissolved in isotonic saline solution. Dilutions were performed using complete media prior to each experiment.

2.2 Dose–response curves of CDDP in lung adenocarcinoma cell lines

After cell cultures reached 80% confluence, cells were harvested by enzymatic treatment and their viability always exceeded 95%. Cells were seeded in 96-well plates: A549 and H1299 cell lines at 1.2×10^4 cells and H1573 and 3B1A cell lines at 5×10^4 . Cells were cultured overnight to allow cell attachment to plastic. Then, cell cultures were exposed to serial dilutions of CDDP ranging from 5 to 160 μ M for 24 h. The plasmatic concentration of CDDP reported in lung cancer patients,

which is 10–30 μM , was included in the concentration range tested in cell lines (17, 18). After treatment, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA, cat. 4890-25K) was added to each well and the plate was incubated for 4 h at 37°C. Then, supernatants were discarded and resulting formazan crystals were dissolved with 150 μL of DMSO. Absorbance was recorded at 560 nm in a Multiskan Ascent plate reader (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). The percentage of cytotoxicity was calculated considering the readout of untreated cells as 0% cytotoxicity. From the results, dose-response curves were obtained. Three independent experiments, each one in triplicate were performed.

2.3 Annexin-V/PI assay

To quantify the percentage of viable, early, and late apoptotic/necrotic cells after CDDP exposure, the Annexin-V/PI assay was employed. A549, H1299 (7×10^5 cells for both cell lines), H1573, and 3B1A (3×10^6 cells for both cell lines) cells were seeded in T-25 flasks and cultured overnight to allow cell attachment. Next day, CDDP was diluted in fresh complete media and added to cell cultures. After treatment, floating cells were collected, adherent cells were detached using trypsin, and both tubes were mixed. For a rigorous examination of cell death events, cells were divided in two fractions. One fraction was employed for performing the Annexin-V/PI assay and the other fraction for caspase-3/7 activity measurement (see below). For the Annexin-V/PI assay, cells were washed with ice-cold $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -free PBS and rinsed in binding buffer. A total of $2\text{--}3 \times 10^5$ cells were stained with FITC Annexin-V/PI, following instructions of the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA, cat. 556570). A total of 15,000 events were immediately acquired in the FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Since cell death is a time-dependent process, events were recorded at different times. However, only results from 24 h of exposure are shown. Two independent experiments were performed in triplicate. The percentages of viable, early, and late apoptotic/necrotic cells were calculated using the FlowJo (v10) software (Ashland, OR, USA).

2.4 LDH assay

To confirm the cytotoxic effect elicited by CDDP, lactate dehydrogenase (LDH) released in the culture media was measured using a cytotoxicity detection kit (Promega, WI, USA, cat. J2380). Cell cultures were seeded in 96-well plates under the same experimental conditions previously mentioned. After CDDP exposure, 50 μL of supernatants were mixed with 150 μL of the reaction mixture. Additionally, a positive control (cells treated with 1% Triton X-100) was included following instructions of the manufacturer. The plate, protected from light, was incubated at room temperature (RT) for 30 min and absorbance was immediately recorded at 490 nm using the Multiskan Ascent plate reader. The percentage of released LDH was calculated according to the equation previously reported (19). Three independent experiments, each one in triplicate were performed.

2.5 Caspase-3/7 activity assay

To verify whether CDDP-induced cell death was mediated by apoptosis, we measured the activity of caspase-3/7 in cell cultures after CDDP exposure. The Caspase-3/7 fluorometric assay kit (Promega, WI, USA, cat. G8981) was employed following instructions of the manufacturer. As previously indicated, cells from the remaining fraction of the Annexin-V/PI assay were centrifuged and pellets were rinsed in ice-cold lysis buffer and incubated on ice for 10 min. An amount of 50 μL of each extract was mixed with 50 μL of reaction buffer containing the DEVD-AFC substrate in a black 96-well plate. For each cell line, negative (untreated cells), positive (only floating dead cells), and blank controls were included. Once the substrate was added, the plate was incubated at 37°C for 2 h and fluorescence was measured in the Fluoroskan Ascent FL microplate reader (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) using the 390 and 485 nm excitation/emission filters. Caspase-3/7 activity was normalized per mg of protein. Thereby, total protein was quantified from each cell extract using the Micro BCA protein assay kit (Thermo Fischer Scientific, cat. 23235) in the Multiskan Ascent plate reader at 562 nm. The results are reported as the fold-change in the activity of caspase-3/7 with respect to untreated cells. Two independent experiments, each one in triplicate were performed.

2.6 Cell cycle analysis in residual cells

To investigate cell cycle alterations, cell lines were cultured in T-25 flasks under the same experimental conditions previously mentioned. After treatment, cells were collected, washed in PBS, fixed in 70% (v/v) cold ethanol, and stored at -20°C for at least 24 h. Then, cells were permeabilized with PBS containing 0.1% (v/v) Triton X-100 and treated with RNase A (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA, cat. EN0531) to avoid non-specific RNA staining. Finally, propidium iodide (PI) (Invitrogen, Waltham, MA, USA) was added for DNA staining, and the cells were incubated for 30 min at RT. After incubation, the DNA content was measured using the FACS Canto II flow cytometer. The first step in the analysis was to gate the population of singlet cells using an FSC-A/FSC-H dot plot. Then, a new gate for residual viable cells (CDDP-DTP cells) was set, from which a PI-A vs. FSC-A dot plot was obtained. Histograms were constructed to quantify the proportion of cells in each phase of cell cycle using FlowJo (v10) software. For this quantification, a total of 10,000 events were acquired from the gate of viable cells. Three independent experiments were performed in triplicate.

2.7 RNA-seq

To identify the genes related to the CDDP intrinsic resistance of lung adenocarcinoma cell lines, we sequenced the transcriptome of CDDP-DTP and untreated cells and performed differential expression analysis using bulk RNA sequencing. Cell lines were

exposed to CDDP under the same experimental conditions previously mentioned. After treatment, to guarantee the collection of only adherent (CDDP-DTP) cells, we discarded the supernatants containing dead cells and washed the cell cultures several times, using fresh complete media, until floating/dead cells were not visualized in the microscope. Then, adherent cells were harvested by trypsinization, and cell viability was always higher than 95%. Total RNA was isolated from CDDP-DTPs and untreated cells (control) using the RNeasy kit (Qiagen, Germany, cat. 74004). The quality of RNA was evaluated using the Agilent Bioanalyzer 2100 system (Agilent, Santa Clara, CA, USA) and always exceeded RIN > 8. For library preparation, we employed 2 µg of RNA per sample as input using the TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina, San Diego, CA, USA) and following directions of the manufacturer. Polyadenylated RNA was isolated using magnetic beads with polydT. Libraries were sequenced on the NextSeq 500 platform (Illumina, San Diego, CA, USA) at a depth of approximately 30 million reads and 2 x 75 bp paired-end reads were generated. We sequenced the libraries of three independent experiments in duplicate.

2.8 Bioinformatic analysis

The quality of sequenced raw reads was examined using the FastQC (20) (v0.11.9) and MultiQC (v1.6) software (21). Raw reads were trimmed to eliminate low quality sequences (PhredScore < 25) and the presence of Illumina adapters using Trimmomatic (v0.38) and Cutadapt (v2.7), respectively (22, 23). Cleaned reads were aligned and mapped to the human genome GRCh38 (release 95) using STAR (v2.7.3a) (24) and abundance estimation of aligned reads was quantified using RSEM (v1.3.1) (25). Then, genes were tested for differential expression using edgeR (v3.32.1) (26), preserving those genes with a mean of one count per million across samples. The library size was normalized using the Trimmed Mean of M-values (TMM) method, and data were fitted to a negative-binomial model to estimate gene dispersion (common, trended, and gene-wise). Differential expression analysis was performed and genes showing a False Discovery Rate (FDR) of < 0.01 and $|\log_2 \text{fold change}| > 1$ were considered as differentially expressed. For functional annotation of the transcriptome of CDDP-DTP, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), employing gene sets retrieved from the Molecular Signature database (MSigDB), were performed using the fgSEA (v1.16.0) package. Enriched pathways showing a *p*-adjusted value of < 0.05 were considered as significant.

To construct the gene association network, the list of differentially expressed genes was analyzed using the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) database with the default parameters. Network analysis was conducted using the igraph (v1.2.10) package from R. Self-loops, and node-redundant connections were discarded. Additionally, only empirical genes (i.e., those present in the original list) were kept. Topological analysis of the network included the calculation of centrality measures such as total degree, betweenness, closeness, and eigenvalue. To select the most influencing centrality measure,

PCA analysis was performed. For obtaining highly connected subnetworks, community detection analysis was conducted and functional annotation of the resulting subnetworks was performed using clusterProfiler (v3.18.1) (27).

2.9 Real-time quantitative PCR

To validate the results obtained in the bioinformatic analysis of RNA-seq data of CDDP-DTP cells, RT-qPCR was performed in the lung adenocarcinoma cell lines. Briefly, cell lines cultured in T-25 flasks were exposed to CDDP under the experimental conditions indicated above. After treatment, adherent cells from control or CDDP-treated cell lines were collected for total RNA isolation using the PureLink RNA Minikit (Ambion, Austin, TX, USA, cat. 12183018A). cDNA was synthesized using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Ambion, Austin, TX, USA, cat. 4368814). A set of TaqMan probes (Applied Biosystems, Thermo Fischer, USA) was employed to amplify: *SOCS1*, *GADD45A*, *HEXIM1*, *HBEGF*, *BUB1B*, *KIF18A*, *ERCC6L*, and *NR2F2*. The housekeeping gene *GAPDH* was employed as an endogenous control (Supplementary Table 1). Gene amplification was performed in a StepOne Real Time PCR System (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Data were normalized to the expression of the housekeeping gene, relative expression was calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, and the \log_2 value is shown. Two independent experiments, each one in triplicate, were performed.

2.10 Survival analysis

By using clinical public data from the lung adenocarcinoma (LUAD) project of The Cancer Genome Atlas (TCGA) database, we investigated the relevance of the hub genes associated with patients' OS. Clinical and expression datasets were retrieved using the RTCGA (v1.20.0) and TCGA-biolinks (v2.18.0) packages (28). Clinical data were curated by removing duplicated samples and preserving those from patients treated with CDDP. Patients were categorized using the maximally selected rank statistics method (29) with respect to the expression of high central genes associated with better or worse OS of patients. A Cox-regression test was conducted and Kaplan–Meier survival curves were obtained for each gene with their respective *p*-value (long-rank test) using the survival (v3.2-11) (30) and survminer (v0.4.9) packages. Log rank *p*-values of < 0.05 were considered as statistically significant.

2.11 Western blotting

The protein expression levels of *SOCS1* were examined by Western blot (WB). Total protein extracts from cell under the aforementioned experimental conditions were obtained. For this, cellular extracts from control and CDDP-DTP cells were obtained using NaCl (150 mM), Tris-HCl (50 mM), and Triton X-100 (1%) lysis buffer. Total protein was quantified using the MicroBCA

Protein Assay Kit. A total of 25–40 µg of protein was loaded and resolved in 12% SDS-PAGE and subsequently transferred onto a nitrocellulose membrane using the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, USA). Then, membranes were incubated in 2% BSA in PBS for 30 min to block non-specific binding sites. The primary antibody for SOCS1 (dilution 1:150, Abcam, UK, cat. ab137384) or actin β (dilution 1:10,000, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA, cat. A1978-200UL) were applied to membranes, respectively, and incubated at 4°C overnight. After washing, membranes were incubated with corresponding biotinylated species-specific secondary antibodies, anti-rabbit or anti-mouse, (dilution 1:1,000, Invitrogen, USA, cat. 65-6140 and 31803) for 1 h at RT. Membranes were washed and incubated with the ABC complex at 1:300 for 30 min (Vector Laboratories, CA, USA, cat. PK-6100) and protein bands were visualized using the ECL kit (Cytiva, USA, cat. RPN2235) using the BioRad Universal Hood II Gel Doc System (BioRad, Hercules, CA, USA). Images were acquired using the Quantity One (v4.6) software (BioRad, Hercules, CA, USA). Band density was analyzed using the ImageJ software (v1.53), and results were normalized with respect to the signal of actin β. The results are expressed as the fold-change in intensity with respect to control cells. Three independent experiments were performed for each cell line studied.

2.12 SOCS1 localization in CDDP tolerant-persister cells

To detect the cellular localization of SOCS1 in untreated and residual cells after CDDP treatment, indirect immunofluorescence (IF) staining was performed. Lung adenocarcinoma cell lines were cultured in four-chamber slides (Lab-Tek, USA), washed, and fixed with ethanol. Then, cells were washed and treated for 30 min with blocking solution to avoid non-specific binding. The slides were incubated with SOCS1 antibody (dilution 1:150, Abcam, UK, cat. ab137384) for 2 h in a humidified atmosphere at 37°C. After washing, the slides were incubated with Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (dilution 1:250, Invitrogen, USA, cat. A11070) at 37°C for 90 min. Finally, the cells were incubated with DAPI (dilution 1:150, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, cat. 62248) for nuclear staining during 15 min. The slides were mounted with Vectashield (Vector Laboratories, CA, USA, cat. H1000) and micrographs were acquired using the EVOS FL microscope (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Two independent experiments were performed.

2.13 SOCS1 knockdown

Since the 3B1A cell line has high SOCS1 expression previous to treatment, we studied the effect of SOCS1 knockdown in the sensitivity to CDDP. Briefly, cells were seeded in 48-well plates (1 × 10⁵ cells per well) and cultured overnight to allow attachment. Then, cells were washed with RPMI without FBS, and maintained in serum-free media for 4 h. Knockdown was performed with TriFECTa RNAi Kit in OptiMEM medium (Thermo Fisher,

Waltham, MA, USA, cat. 31985), according to the manufacturer's instructions. Cells were incubated with 3 µL of lipofectamine 3000, (Invitrogen, USA, cat. L3000-015) and mixes of DsiRNAs SOCS1 (IDT, USA, HS.Ri.SOCS1.13.1-3) or HPRT1 (IDT, USA, HPRT1-S1) at final concentrations of 10 nM for 48 h, at which maximum knockdown was obtained. Controls employed were lipofectamine alone (Mock), negative control (DsiRNA nontargeting human genes), and DsiRNA for an unrelated gene (HPRT1). DsiRNA sequences for knockdown are provided in [Supplementary Table 2](#).

Knockdown efficiency was determined by RT-qPCR. At 24 h of knockdown, cells were single exposed to CDDP, and cell viability was evaluated by dose response curves employing MTT, as described above.

2.14 Statistical analysis

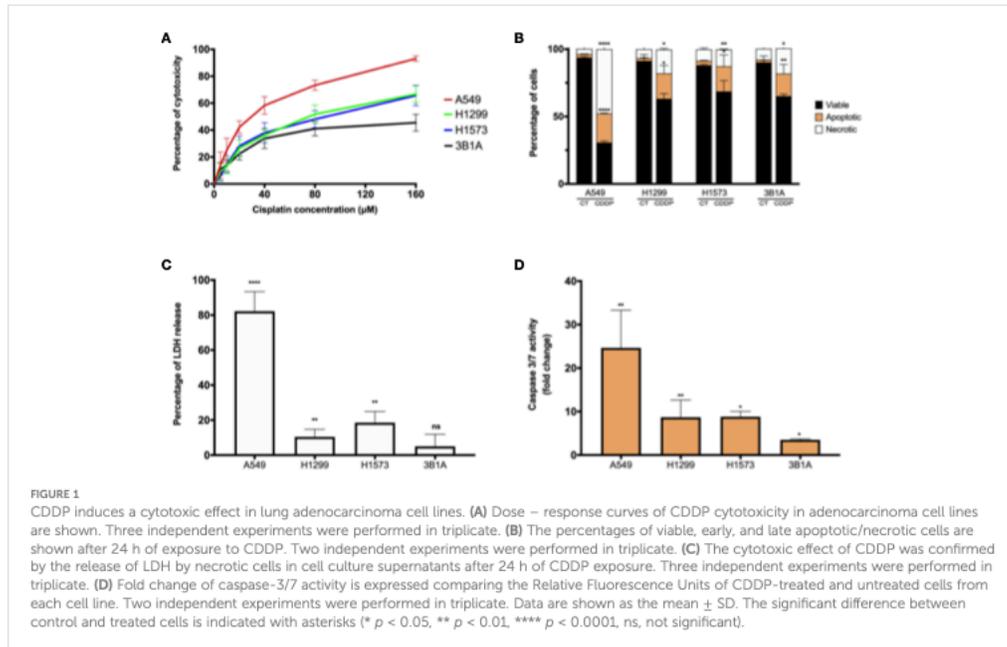
Data were expressed as mean ± SD. For comparison, experimental and control groups were analyzed by Student's *t*-test. For comparison among groups, we used the ANOVA test, and Tukey's *post hoc* test. Unless otherwise specified, statistical analysis was performed using Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A *p*-value of less than 0.05 was considered as statistically significant.

3 Results

3.1 Lung cancer cell lines show different sensitivity to CDDP

CDDP is an antitumoral agent employed as a standard-care treatment for cancer, owing to its cytotoxic activity. In our study, we evaluated the cytotoxic effect of CDDP in four *EGFR*-WT lung adenocarcinoma cell lines. In the A549 cell line, we observed a high proportion of cell death at the higher concentration of CDDP employed, which induced approximately 90% cytotoxicity ([Figure 1A](#); [Supplementary Figure 1A](#)). The H1299 and H1573 cell lines showed a mild sensitivity, since the CDDP induced 60% cytotoxicity ([Figure 1A](#)). After exposure to CDDP, both cell lines presented a lower proportion of dead cells compared to A549 cells ([Supplementary Figure 1A](#)). Conversely, the 3B1A cell line showed the highest resistance to CDDP, since the drug induced 40% cytotoxicity ([Figure 1A](#)). In this cell line, a scarce proportion of dead cells was observed ([Supplementary Figure 1A](#)). These results indicate that each lung adenocarcinoma cell line shows a specific sensitivity to CDDP.

To examine whether CDDP-induced cell death was mediated by apoptosis, the percentages of viable, early, and late apoptotic/necrotic cells were measured using the Annexin-V/PI assay at the final time of CDDP exposure ([Supplementary Figure 1B](#)). In A549 cells, CDDP induced a significant increase ($p < 0.0001$) of 8.5-fold and 12-fold in the proportion of apoptotic and necrotic cells, respectively, compared to control cells ([Figure 1B](#)). In the H1299, H1573, and 3B1A cells, CDDP induced a similar effect, as apoptotic and necrotic cells significantly ($p < 0.05$) increased 9–10-fold and 2–2.5-fold, respectively ([Figure 1B](#)). These results are in line with those obtained in the MTT assay.



To confirm the cytotoxic effect induced by CDDP, we evaluated the release of the enzyme LDH as a biochemical marker of cell death. In the A549 cell line, the most sensitive to CDDP, a significant increase of 80% ($p < 0.0001$) in the release of LDH was detected. In contrast, in H1299 and H1573 cell lines CDDP exposure caused a release of approximately 10 – 20% ($p < 0.005$) of the enzyme. The 3B1A cell line, showing resistance to CDDP, caused a marginal release of LDH of less than 5% (Figure 1C). To corroborate the apoptotic cell death induced by CDDP, we measured the activity of caspases 3/7. In the A549 cell line, CDDP exposure significantly increased (25-fold, $p < 0.005$) the activity of these caspases. H1299 and H1573 cells, which showed mild sensitivity to CDDP, a significant increase of eight-fold ($p < 0.05$) in activity of caspases 3/7 was detected. In 3B1A cells, an increase of five-fold ($p < 0.05$) in the activity of these executioner caspases was detected. Comparisons were performed with respect to the corresponding control cells of each cell line (Figure 1D).

In summary, all these results indicate that CDDP has a different cytotoxic effect among lung adenocarcinoma cell lines. It is important to highlight that in all cell lines after CDDP exposure we observed a fraction of viable cells which could be related to DTP cells.

3.2 Identification of cell cycle alterations in residual cells

Previous studies report that DTP cells exhibit limited proliferation related to dormancy (8, 31). For this reason, we decided to evaluate alterations in the cell cycle phases in CDDP-

residual cells. In the A549 cell line, treatment induced a significant reduction of cells in the S and G2/M phases and a significant increase of 1.4-fold ($p < 0.0001$) in the proportion of cells in the G0/G1 phase. In H1299 cells, CDDP exposure reduced the number of cells in the G0/G1 and G2/M phases. Surprisingly, CDDP induced a significant increase in the number of cells in the S-phase (3.5-fold, $p < 0.001$). After exposure, H1573 showed a slightly increase in the number of cells in the S and G2/M phases with a concomitant decrease of cells in the G0/G1 phase. In 3B1A cells, CDDP caused accumulation of cells in G2/M, since a two-fold ($p < 0.005$) increase of cells in this phase was observed (Supplementary Figures 2A–C). These results suggest that CDDP-residual cells show cell cycle alterations related to the DTP state.

3.3 Transcriptomic profile of CDDP-DTP cells

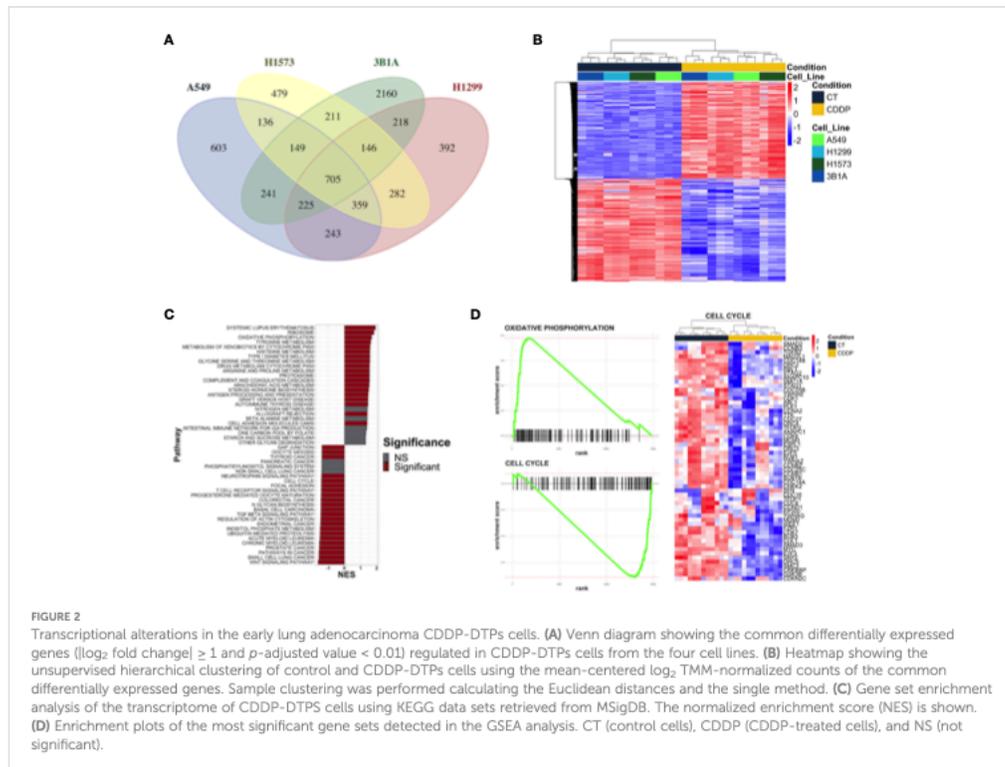
We performed RNA-sequencing of poly-adenylated RNA from CDDP-DTP cells and control cells and tested for differentially expressed genes. Unsupervised reduction of dimensions revealed that the main source of variation in our datasets was the CDDP treatment, since control and drug-persister cells tended to form distinct clusters in the first component (PC1), indicating that CDDP-DTP cells showed a different transcriptional profile (Supplementary Figure 3). Additionally, a high degree of reproducibility in the biological replicates from both experimental groups in each dataset was found. Differential expression analysis between DTP and control cells found distinct proportions of

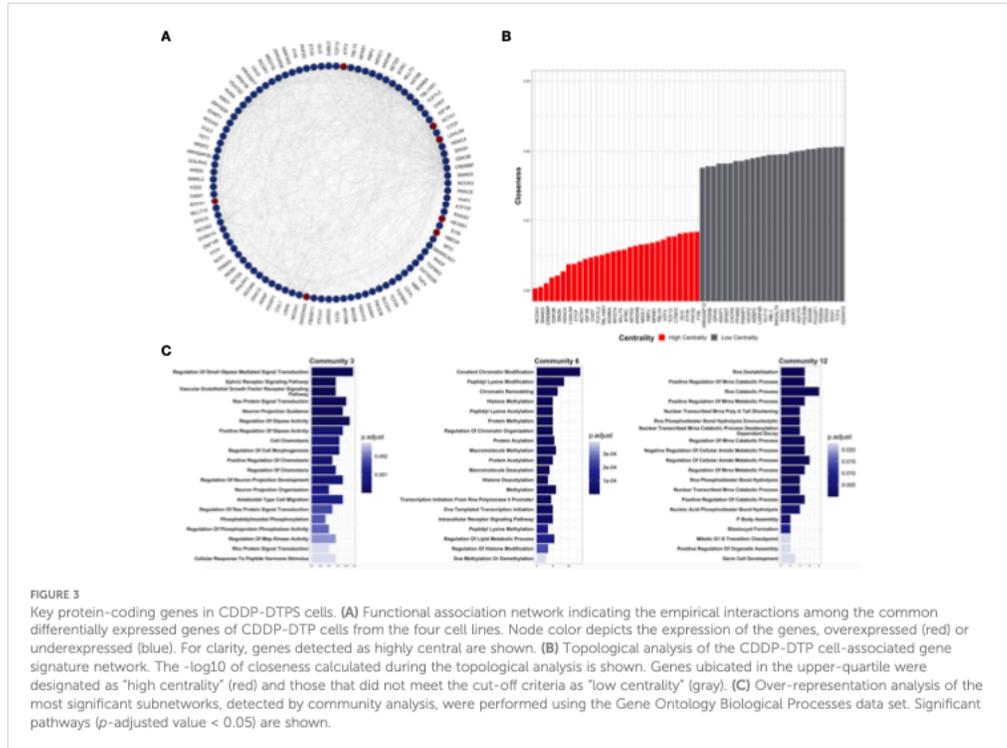
differentially expressed genes (DEGs) ($|\log_2FC| > 1$ and $FDR < 0.01$) for each cell line (Supplementary Figure 4). When all datasets were analyzed, CDDP-DTP cells from the four cell lines shared a total of 705 DEGs (343 upregulated and 362 downregulated), showing consistent expression across the persisters cells of the four cell lines (Figure 2A). Interestingly, unsupervised hierarchical clustering analysis using the expression of these 705 shared DEGs, showed that CDDP-DTP cells tended to cluster according to the degree of sensitivity detected in previous assays (Figure 2B). Gene-set enrichment analyses showed that the transcriptome of CDDP-DTP cells is positively enriched in genes participating in pathways associated with oxidative phosphorylation, cytochrome P450-mediated detoxification of drugs, RNA metabolism and proteasome activity (Figures 2C, D), suggesting that these pathways are activated. Contrarywise, negatively enriched pathways were involved in the activation of MAPK, TGF- β , and WNT signaling, as well as the cell cycle and apoptosis (Figures 2C, D), suggesting that these pathways are repressed in CDDP-DTP cells. These results corroborate our previous observations of the cell cycle alterations after treatment indicating that CDDP-DTP cells disabled the expression of genes involved in the cell cycle control (Figure 2D; Supplementary Figure 2).

To understand the functional interaction among shared DEGs from CDDP-DTP cells, a protein-protein interaction (PPI) network

was constructed using information from the STRING database (Figure 3A). Validation analysis showed that gene interactions of the resulting network were more significant (enrichment p -value $< 10^{-6}$) than those obtained from a random selection of the same number of genes from the human genome. This result indicates that the CDDP-DTP-associated genes have a higher tendency to establish a network than would be expected by random chance. Further topological analyses of the constructed network showed that closeness was the centrality measure which had most information related to central nodes (Supplementary Figure 5). Using the $-\log_{10}$ of closeness value, 99 of 396 genes were identified as highly central ($-\log_{10}$ of closeness in the 75th percentile) (Figure 3B; Supplementary Table 3). These 99 genes were defined as hub genes. In support of these findings community detection analysis detected 25 subnetworks with at least five members. Almost 75% (74/99) of hub genes were distributed in the three largest subnetworks. Functional annotation of these subnetworks included activation of WNT, PI3KCA, and RAS GTPase pathways. Also, biological processes such as chromatin remodeling, post-translational modifications on histones, and regulation of mitosis were listed (Figure 3C).

Overall, these results indicate that CDDP-DTP cells have a specific transcriptomic profile in which genes related to pathways, such as drug detoxification, cell proliferation, and survival are altered. Additionally, the subset of CDDP-DTP-associated genes





is strongly linked and participates in controlling the activation of pathways related to gene expression and cell proliferation.

3.4 RT-qPCR of hub genes of DTP cells

We analyzed the expression of 8 of the 99 hub genes found in CDDP-DTP cells by RT-qPCR, using RNA samples independent from those employed for transcriptome sequencing. For this analysis we selected four overexpressed hub genes (*GADD45A*, *SOCS1*, *HEXIM1*, and *HBEGF*), and four underexpressed hub genes (*BUB1B*, *KIF18A*, *ERCC6L*, and *NR2F2*). We found that the expression of the selected hub genes was concordant between RNA-seq and RT-qPCR, showing a significant correlation in the four lines studied (Figures 4A–C).

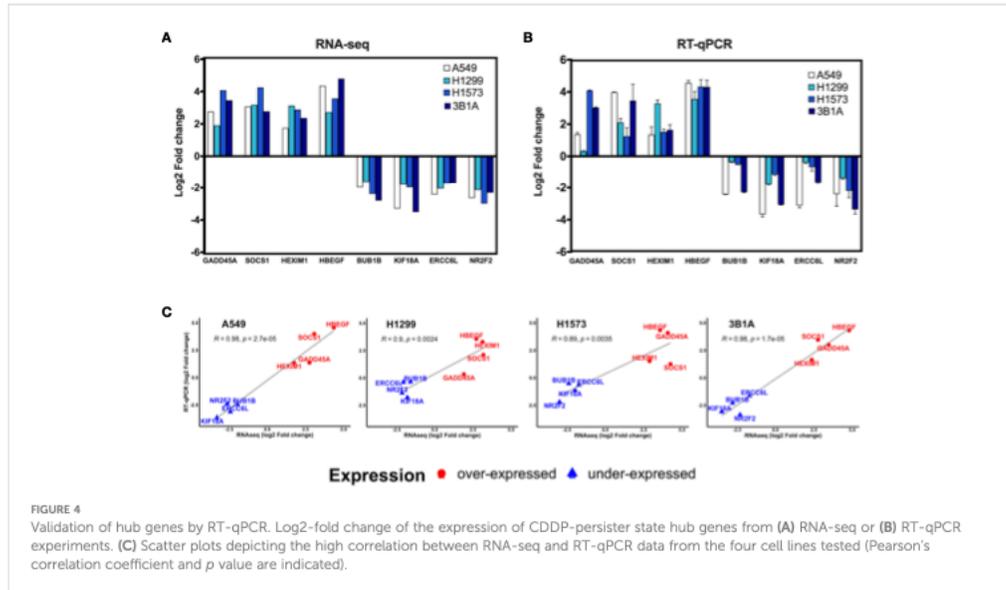
3.5 Different expression of CDDP-DTP-associated hub genes between tumor and normal tissue

Data retrieved from the LUAD project of the TCGA database were used to analyze the clinical significance of the hub genes. First, we compared the expression of hub genes between tumor and normal adjacent tissue. Only the expression of *GADD45A* was significantly increased in tumor samples ($p < 0.05$) compared to normal tissue,

which is in line with the overexpression we found in CDDP-DTP cells (Figure 4). In contrast, the expressions of *SOCS1*, *EPS15*, *GLI3*, *NR2F2*, and *RCOR1* were significantly decreased in tumor compared to normal tissue ($p < 0.05$) (Supplementary Figure 6).

3.6 Association of CDDP-DTP hub gene expression and overall survival of LUAD patients

To validate *in silico* the clinical significance of the hub genes, the association of their expression with the OS of CDDP-treated patients was analyzed using data retrieved from the LUAD project of the TCGA database. Analyses were conducted in the cohort of patients ($n = 87$) treated with CDDP, and Cox regression testing showed that 9 of 99 hub genes reached statistical significance with the OS of patients (p -value < 0.05 , log-rank test). Low expression of *JARID2*, *MLLT3*, *TET3*, *TAF4*, *NCOA3*, *PPP2R5E*, *NR2F2*, and *IGF1R*, and high expression of *SOCS1* was associated with poor OS of the CDDP-treated LUAD patients (Figure 5). Interestingly, we found the same dysregulation of these hub genes in our transcriptomic analysis (Supplementary Table 3), which suggest that these gene signature may be related to the presence of CDDP-DTP cells and CDDP-treatment resistance. Moreover, six of the nine (60%) clinically relevant genes were part of the subnetwork 6 (Chromatin

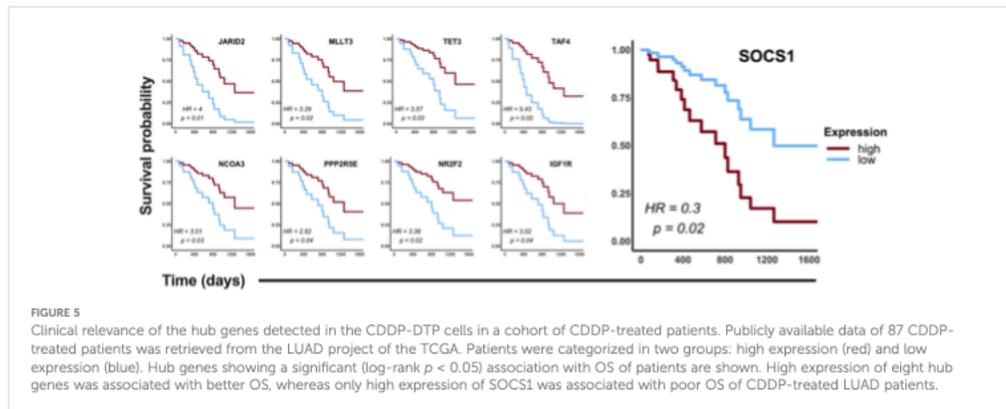


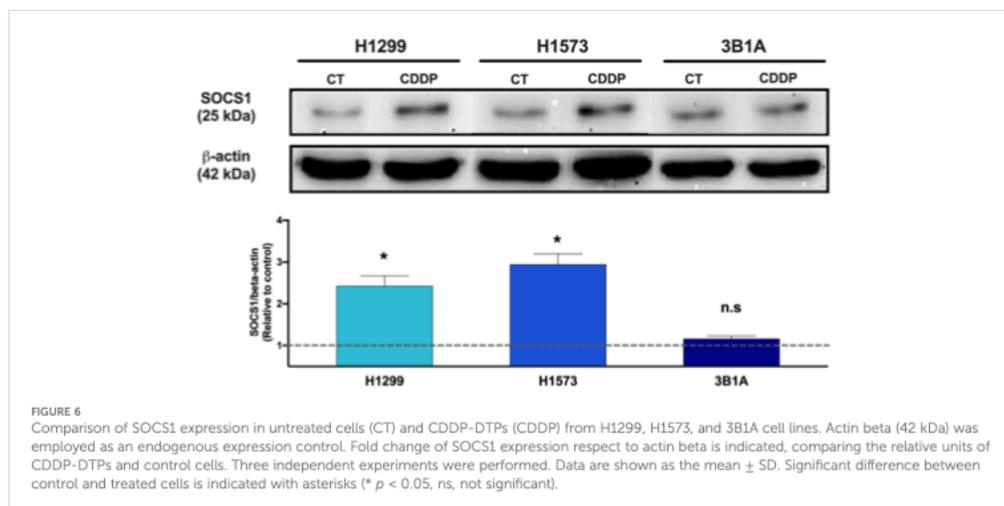
remodeling), suggesting a relationship between this process and the response to CDDP in patients (Supplementary Table 3).

3.7 SOCS1 protein expression in lung adenocarcinoma cell lines with different sensitivity to CDDP

Since SOCS1 was found upregulated in CDDP-DTP cells and its overexpression correlated with poor OS in the cohort of LUAD patients treated with CDDP, we sought to analyze the protein

expression of this molecule in the 3B1A cell line (resistant to CDDP), and in the H1573 and H1299 cell lines (mild sensitive to CDDP), in control and CDDP-DTP cells. Western blot (WB) analysis showed that the mildly sensitive cell lines H1299 and H1573 show low protein expression of SOCS1 before exposure, but these levels are significantly (*p* < 0.05) increased in CDDP-DTP cells, by 2.5-fold and 3-fold, respectively (Figure 6). In contrast, the 3B1A cell line has higher levels of SOCS1 before exposure to CDDP and displays no significant changes after CDDP exposure (Figure 6). This result supports the notion that high SOCS1 expression might be related to intrinsic resistance to CDDP.





3.8 Localization of SOCS1 in CDDP-DTP cells

To assess the localization of SOCS1 and corroborate the WB results, we performed IF on control and DTP cells. In H1299 and H1573 cells, a slight to no cytoplasmic expression of SOCS1 was observed prior to treatment. However, the fluorescence increased in CDDP-DTP cells. In comparison, 3B1A cells showed a higher signal of cytoplasmic fluorescence of SOCS1 before treatment that was maintained after CDDP exposure (Figure 7). These observations are consistent with the protein expression detected by WB.

3.9 Effect of SOCS1 knockdown in CDDP resistance

To further explore the role of SOCS1 in CDDP resistance, we performed DsiRNA-mediated knockdown in the CDDP-resistant 3B1A cell line and assessed its effect on CDDP cytotoxicity. Fluorescently labeled transfection control showed an efficiency of transfection above 80% (Figure 8A). RT-qPCR showed a 50% decrease in the mRNA expression of SOCS1, compared to mock control and cells transfected with an independent DsiRNA (HPRT1) (Figure 8B). The cell viability assay revealed that knockdown of SOCS1 reduced approximately 30 to 40% of cell viability of 3B1A cells, compared to control cells, at concentrations tested of 20 and 40 μ M of CDDP (Figure 8C).

Cells with SOCS1 knockdown decreased fluorescent compared to that of siHRTP and mock controls (Figure 8D).

Taken together, these results suggest that the differential expression of SOCS1 before and after treatment may be related to the phenomenon of intrinsic resistance as well as the differential sensitivity to CDDP previously observed in cell lines.

4 Discussion

Despite the development of new therapeutic strategies, CDDP remains as the standard care treatment for advanced lung tumors that do not harbor EGFR mutations or that show resistance to TKIs. However, not all lung cancer patients show a favorable response at treatment onset, and responders eventually acquire resistance to CDDP therapy. Previous reports indicate that during the development of acquired resistance to chemotherapy, a population of cells survives since the initial exposure. These cells are known as drug persister cells (10, 32). According to the drug persister model proposed by Lin and Shaw (33), these cells propagate and give rise to subclones that show acquired resistance to chemotherapy, leading to tumor relapse. Most reports indicate that DTP cells emerge after continuous exposure to antitumoral agents (10, 13, 34). Recent studies performed in osteosarcoma, melanoma, colorectal, and lung cancer cell lines showed that, after two weeks of drug exposure, DTP cells reprogram their transcriptome by altering key cellular pathways which favor their survival (8, 15, 35, 36). However, current research has not yet clarified the early molecular mechanisms underlying the intrinsic resistance against CDDP in drug persister cells in lung cancer. For this reason, we considered it necessary to investigate the transcriptomic alterations in CDDP-DTP cells after a single CDDP exposition and their impact on the emergence of drug resistant cell populations and subsequent tumor relapse. To our knowledge, this is the first study evaluating the earliest transcriptional changes associated with the drug-tolerant persister state after a unique exposure to CDDP in lung adenocarcinoma cell lines.

Bronte et al. (37) reported that one of the primary sources of variable sensitivity to chemotherapy in patients is the presence of pre-existing mutations in cancer driver genes. *TP53* is one of the most relevant genes controlling the cytotoxic effect induced by

In order to investigate other factors that may be participating in the early drug persistence or tolerant state related to CDDP resistance, we sought to evaluate the interactions among DEGs associated with the DTP state. Reports indicate that following radiation or CDDP exposure, nasopharyngeal and osteosarcoma cell lines reprogram their transcriptomes to survive the insult as soon as 24 h (15, 46). Similarly, we found that CDDP-DTP cells differentially expressed a subset of genes that could be related to the early drug-tolerant persist state. Functional annotation of the transcriptomes revealed that CDDP-DTP cells activate pathways associated with oxidative phosphorylation, drug metabolism, enzymes of cytochrome P450, and proteasome activity. These results are in accordance with previous findings of models of CDDP-acquired resistance in which detoxifying enzymes that neutralize the oxidative species of the drug were detected (47).

Additionally, the activation of oxidative phosphorylation has been reported to be linked with CDDP resistance in ovarian cancer by stimulating the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and IL-8, which favor the expression of membrane pumps involved in the extrusion of CDDP (48). We found that CDDP-DTP cells inactivate pathways associated with cell proliferation, such as the canonical WNT, TGF- β signaling, and cell cycle pathways. These results are in line with previous studies showing that at advanced exposure times, a population of DTP cells lose the capacity to cycle (8, 31). Moreover, Krtinic et al. reported that ovarian cancer cells with decreased gene expression associated with proliferation exhibit CDDP resistance (49). Accordingly, we found alterations in the distribution of the cell cycle phases of CDDP-residual cells. A possible explanation for this finding is that CDDP-DTP cells might be delayed in the cell cycle due to the DNA damage caused by CDDP, as previously mentioned. Recent evidence in osteosarcoma and lung adenocarcinoma cell lines shows that after CDDP exposure, a residual population of tumor cells survives because they are delayed in proliferation, since they require time to activate DNA repair mechanisms to alleviate the stress caused by CDDP (50, 51). Our findings suggest that CDDP-residual cells survive the cytotoxic insult by altering the distribution of cells in cell cycle phases and decreasing their proliferation rate, which is associated with the DTP state.

One of the main objectives of the present work was to identify a transcriptional signature related to the emergence of early CDDP-DTP cells in lung adenocarcinoma cell lines. Prior studies have reported the importance of genes participating in decreased cell proliferation, chromatin remodeling, and metabolic alterations associated with dormancy after prolonged exposure to antitumoral drugs in cell lines (31, 34, 35). Liao's and Vinogradova's groups demonstrated that persisters cells upregulate histone demethylases, such as KDM5 or KDM6B as a survival strategy (34, 52). Glioblastoma DTP cells, in addition to upregulating histone demethylases, also decrease the expression of cell cycle genes as a strategy to survive the cytotoxic effect of kinase inhibitors (52). These pathways remain altered for prolonged exposure times, and, in our study, we found that these pathways are involved since early stages of the persist state to CDDP.

The use of publicly available data bases such as the TCGA has facilitated progress in the study of the different cancer types. The

analysis of DEGs between tumor and normal tissue has enabled the proposal of molecular markers for the diagnosis and prognosis of treatment response, especially in lung cancer. Comparing the expression of the CDDP-DTP-associated genes between tumor and normal adjacent tissue, and its clinical relevance, we found that six (*GADD45A*, *SOCS1*, *EPS15*, *GLI3*, *NR2F2*, and *RCOR1*) of the hub genes have significant differences. Interestingly, according to the data analyzed, the expression of *SOCS1* is lower in the tumor tissue than in normal adjacent tissue.

By analyzing the clinical relevance of the CDDP-DTP-associated hub genes with the five-year OS of CDDP-treated patients from the LUAD cohort of the TCGA, we found a positive correlation with the expression of eight of these hub genes (*JARID2*, *MLLT3*, *TET3*, *TAF4*, *NCOA3*, *PPP2R5E*, *NR2F2*, and *IGF1R*). With respect to the findings of *SOCS1* in the OS of patients, which appear to be contrary to those reported in tumor tissue, overexpression of *SOCS1* correlates with poor OS of the CDDP-treated LUAD patients. This may be due to *SOCS1* expression could be related to the abundance of tumor cells that pretreatment display the DTP state. These cells would be able to survive CDDP exposure and expand to favor treatment resistance and eventual tumor relapse. Further studies in tumor samples and liquid biopsies evaluating the expression of the proposed genes at treatment onset, with treatment, and incorporating results of Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) are required to confirm their biological relevance in lung adenocarcinoma patients.

Since overexpression of *SOCS1* was associated with poor OS of CDDP-treated LUAD patients, which may suggest that it plays an important role in resistance to treatment, we wanted to evaluate if *SOCS1* expression was associated with the different sensitivity to CDDP observed among cell lines. *SOCS1* belongs to a family of eight intracellular proteins that negatively regulate the signaling induced by pro-inflammatory cytokines via JAK/STAT, TLR, and NF- κ B activation (53). Alterations in *SOCS1* activity are implicated in autoimmune diseases such as psoriasis, systemic lupus erythematosus, recurrent uveitis, and cancer (53). In this regard, the dichotomous participation of *SOCS1* in cancer has been extensively discussed since, depending on the tumor stage, it displays both tumor-promoting or antitumor activities (54, 55). However, its role in chemotherapy resistance is not well understood. Our results suggest a direct relationship between the level of *SOCS1* expression and the resistance of cell lines to CDDP. The 3B1A cell line, derived from an untreated patient, showed the highest resistance to CDDP and the highest expression of *SOCS1*, suggesting the presence of CDDP-DTP cells, which may emerge alongside tumor development. In comparison, H1299 and H1573 cell lines showed mild sensitivity to CDDP and lower *SOCS1* expression; this expression augmented in residual cells. This suggests the existence of tumor cells that survive the initial exposure to CDDP and overexpress *SOCS1* in response to the insult as another possible source of CDDP-DTP cells. It has been reported that *SOCS1* interacts with proteins of the DNA damage response such as ATM and ATR (56). In this setting, CDDP-DTP cells could alleviate the stress in DNA caused by CDDP by increasing the expression of *SOCS1* at the transcript and protein levels. These findings suggest the role of *SOCS1* in the intrinsic resistance against CDDP of lung cancer cell lines. However, further basic and clinical studies are needed to examine *SOCS1* alterations and to precisely identify its molecular

mechanism after CDDP exposure in lung adenocarcinoma and its relationship with treatment efficacy.

In accordance with previous reports, we found that SOCS1 was mainly localized in the cytoplasm, where it can interact with STAT family members, such as STAT3 and STAT1 (57). These results may be explained by the fact that STAT1-STAT3 heterodimer displays antitumor effects by regulating the transcription of genes participating in cell death (58).

To further confirm the role of SOCS1 in CDDP resistance, we transfected the 3B1A cell line with a DsiRNA against SOCS1. The increase in cell death of transfected cells supports the proposal that targeting of SOCS1 expression sensitizes a previously resistant cell line against CDDP.

In conclusion, our work provided a comprehensive network of the genes participating in the early stages of CDDP-DTP cells. The transcriptional changes associated with this state activated key cellular processes regulated by the interaction of critical protein-coding genes. We suggest that the genes in this signature display an important functional and clinical relevance for lung adenocarcinoma patients before CDDP treatment. This gene signature could represent a promising alternative to improve the outcome of lung cancer patients. Importantly, SOCS1 could be used as a response biomarker of CDDP treatment and as a potential target to overcome resistance to this standard chemotherapeutic.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/Supplementary Material.

Ethics statement

Ethical approval was not required for the studies on humans in accordance with the local legislation and institutional requirements because only commercially available established cell lines were used.

Author contributions

Conceptualization and design, RC-D, DA-C, and JL-G. Methodology, RC-D, DA-C, MP-M, MS-N, LI-V, MG-V, JJB-L,

and SA-R. Software, bioinformatics and statistical analyses, RC-D, MP-M, SA-R, and AM-T. Bioinformatic clinical validation, RC-D, MP-M, and AM-T. Writing—original draft preparation, RC-D, DA-C, and JL-G. Writing—review and editing, RC-D, DA-C, JJB-L, and JL-G. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Acknowledgments

This paper is part of the requirements for obtaining the Doctoral degree at the Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM of RC-D, whom is recipient of a fellowship from CONACyT (631047). Analyses in this paper were carried out on CONABIO's computing cluster, supported by their system administrator and the Subcoordinación de soporte informático. Flow cytometry analyses were carried out on Unidad de Citometría at Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

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.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2023.1208403/full#supplementary-material>

References

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer J Clin* (2021) 71:209–49. doi: 10.3322/caac.21660
- Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-small cell lung cancer: epidemiology, screening, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinic Proc* (2019) 94:1623–40. doi: 10.1016/j.mayocp.2019.01.013
- Etinger DS, Wood DE, AISner DL, Akerley W, Bauman J, Chirieac LR, et al. Non-small cell lung cancer, version 5.2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* (2017) 15:504–35. doi: 10.6004/jnccn.2017.0050
- Wu S-G, Shih J-Y. Management of acquired resistance to EGFR TKI-targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* (2018) 17:38. doi: 10.1186/s12943-018-0777-1
- Trudu F, Amato F, Vañhara P, Pivetta T, Peña-Méndez EM, Havel J. Coordination compounds in cancer: past, present and perspectives. *J Appl BioMed* (2015) 13:79–103. doi: 10.1016/j.jab.2015.03.003
- Sirohi B, Ashley S, Norton A, Popat S, Hughes S, Papadopoulos P, et al. Early response to platinum-based first-line chemotherapy in non-small cell lung cancer may predict survival. *J Thorac Oncol* (2007) 2:735–40. doi: 10.1097/JTO.0b013e31811f3a7d

7. Galluzzi L, Vitale I, Michels J, Brenner C, Szabadkai G, Harel-Bellan A, et al. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis* (2014) 5: e12577. doi: 10.1038/cddis.2013.428
8. Rehman SK, Haynes J, Collignon E, Brown KR, Wang Y, Nixon AML, et al. Colorectal cancer cells enter a diapause-like DTP state to survive chemotherapy. *Cell* (2021) 184:226–242.e21. doi: 10.1016/j.cell.2020.11.018
9. Guler GD, Tindell CA, Pitti R, Wilson C, Nichols K, KaiWai Cheung T, et al. Repression of stress-induced LINE-1 expression protects cancer cell subpopulations from lethal drug exposure. *Cancer Cell* (2017) 32:221–237.e13. doi: 10.1016/j.ccr.2017.07.002
10. Ravindran Menon D, Das S, Krepler C, Vultur A, Rinner B, Schauer S, et al. A stress-induced early innate response causes multidrug tolerance in melanoma. *Oncogene* (2015) 34:4448–59. doi: 10.1038/ncr.2014.372
11. Mikubo M, Inoue Y, Liu G, Tsao M-S. Mechanism of drug tolerant persister cancer cells: the landscape and clinical implication for therapy. *J Thorac Oncol* (2021) 16:1798–809. doi: 10.1016/j.jtho.2021.07.017
12. Russo M, Pompei S, Sogari A, Corigliano M, Crisafulli G, Puliafito A, et al. A modified fluctuation-test framework characterizes the population dynamics and mutation rate of colorectal cancer persister cells. *Nat Genet* (2022) 54:976–84. doi: 10.1038/s41588-022-01105-z
13. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* (2010) 141:69–80. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.027
14. Hangauer MJ, Viswanathan VS, Ryan MJ, Bole D, Eaton JK, Matov A, et al. Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature* (2017) 551:247–50. doi: 10.1038/nature24297
15. Niveditha D, Mukherjee S, Majumder S, Chowdhury R, Chowdhury S. A global transcriptomic pipeline decoding core network of genes involved in stages leading to acquisition of drug-resistance to cisplatin in osteosarcoma cells. *Bioinformatics* (2019) 35:1701–11. doi: 10.1093/bioinformatics/bty868
16. López-González JS, Aguilar-Cázares D, Prado-García H, Nieto-Rodríguez A, Mandoki JJ, Avila-Moreno F, et al. Lack of correlation between growth inhibition by TGF- β and the percentage of cells expressing type II TGF- β receptor in human non-small cell lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer* (2002) 38:149–58. doi: 10.1016/S0169-5002(02)00177-0
17. Souid A-K, Dubowy RL, Blaney SM, Hershon L, Sullivan J, McLeod WD, et al. Phase I clinical and pharmacologic study of weekly cisplatin and irinotecan combined with amifostine for refractory solid tumors. *Clin Cancer Res* (2003) 9:703–10.
18. Urien S, Lokiec F. Population pharmacokinetics of total and unbound plasma cisplatin in adult patients. *Br J Clin Pharmacol* (2004) 57:756–63. doi: 10.1111/j.1365-2125.2004.02082.x
19. Smith SM, Wunder MB, Norris DA, Shellman YG. A simple protocol for using a LDH-based cytotoxicity assay to assess the effects of death and growth inhibition at the same time. *PLoS One* (2011) 6:e26908. doi: 10.1371/journal.pone.0026908
20. FastQC. (2015). Available at: <https://qubeshub.org/resources/fastqc>.
21. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Källner M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* (2016) 32:3047–8. doi: 10.1093/bioinformatics/btw354
22. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics* (2014) 30:2114–20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
23. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J* (2011) 17:10. doi: 10.14806/ej.17.1.200
24. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* (2013) 29:15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635
25. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinf* (2011) 12:323. doi: 10.1186/1471-2105-12-323
26. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* (2010) 26:139–40. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616
27. Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* (2012) 16:284–7. doi: 10.1089/omi.2011.0118
28. Colaprico A, Silva TC, Olsen C, Garofano L, Cava C, Garolini D, et al. TCGAbiolinks: an R/bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res* (2016) 44:e711. doi: 10.1093/nar/gkv1507
29. Hothorn T, Lausen B. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Comput Statist Data Anal* (2003) 43:121–37. doi: 10.1016/S0167-9473(02)00225-6
30. Therneau TM, Grambsch PM. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. New York: Springer (2000). p. 350.
31. Dhimolea E, de Matos Simoes R, Kansara D, Al'Khafaji A, Bouysson J, Weng X, et al. An embryonic diapause-like adaptation with suppressed myc activity enables tumor treatment persistence. *Cancer Cell* (2021) 39:240–256.e11. doi: 10.1016/j.ccr.2020.12.002
32. Ramirez M, Rajaram S, Steining RJ, Osipchuk D, Roth MA, Morinishi LS, et al. Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells. *Nat Commun* (2016) 7:10690. doi: 10.1038/ncomms10690
33. Lin JJ, Shaw AT. Resisting resistance: targeted therapies in lung cancer. *Trends Cancer* (2016) 2:350–64. doi: 10.1016/j.trecan.2016.05.010
34. Vinogradova M, Gehling VS, Gustafson A, Arora S, Tindell CA, Wilson C, et al. An inhibitor of KDM5 demethylases reduces survival of drug-tolerant cancer cells. *Nat Chem Biol* (2016) 12:531–8. doi: 10.1038/nchembio.2085
35. Shen S, Faouzi S, Souquere S, Roy S, Routier E, Libenciu C, et al. Melanoma persister cells are tolerant to BRAF/MEK inhibitors via ACOX1-mediated fatty acid oxidation. *Cell Rep* (2020) 33:108421. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108421
36. Oren Y, Tsabar M, Cuoco MS, Amir-Zilberstein L, Cabanos HF, Hütter J-C, et al. Cycling cancer persister cells arise from lineages with distinct programs. *Nature* (2021) 596:576–82. doi: 10.1038/s41586-021-03796-6
37. Bronte G, Rizzo S, La Paglia L, Adamo V, Siragusa S, Ficorella C, et al. Driver mutations and differential sensitivity to targeted therapies: a new approach to the treatment of lung adenocarcinoma. *Cancer Treat Rev* (2010) 36:S21–9. doi: 10.1016/S0305-7372(10)70016-5
38. Chee JLY, Saidin S, Lane DP, Leong SM, Noll JE, Neilsen PM, et al. Wild-type and mutant p53 mediate cisplatin resistance through interaction and inhibition of active caspase-9. *Cell Cycle* (2013) 12:278–88. doi: 10.4161/cc.23054
39. Sangster-Guity N, Conrad BH, Papadopoulos N, Bunz F. ATR mediates cisplatin resistance in a p53 genotype-specific manner. *Oncogene* (2011) 30:2526–33. doi: 10.1038/ncr.2010.624
40. Lisek K, Campaner E, Ciani Y, Walerych D, Del Sal G. Mutant p53 tunes the NRF2-dependent antioxidant response to support survival of cancer cells. *Oncotarget* (2018) 9:20508–23. doi: 10.18632/oncotarget.24974
41. Donzelli S, Fontemaggi G, Fazi F, Di Agostino S, Padula F, Biagioni F, et al. MicroRNA-128-2 targets the transcriptional repressor E2F5 enhancing mutant p53 gene of function. *Cell Death Differ* (2012) 19:1038–48. doi: 10.1038/cdd.2011.190
42. Ma X, Rousseau V, Sun H, Lantuejoul S, Filipits M, Pirker R, et al. Significance of TP53 mutations as predictive markers of adjuvant cisplatin-based chemotherapy in completely resected non-small-cell lung cancer. *Mol Oncol* (2014) 8:555–64. doi: 10.1016/j.molonc.2013.12.015
43. Ma X, Le Teuff G, Lacs B, Tsao MS, Graziano S, Pignon J-P, et al. Prognostic and predictive effect of TP53 mutations in patients with non-small cell lung cancer from adjuvant cisplatin-based therapy randomized trials: A LACE-bio pooled analysis. *J Thorac Oncol* (2016) 11:850–61. doi: 10.1016/j.jtho.2016.02.002
44. Liu K, Gao W, Lin J. Effect of the p53 α Gene on the chemosensitivity of the H1299 human lung adenocarcinoma cell line. *Oncol Lett* (2017) 14:1411–8. doi: 10.3892/ol.2017.6356
45. Chavez-Dominguez RL, Perez-Medina MA, Lopez-Gonzalez JS, Galicia-Velasco M, Matias-Florentino M, Avila-Rios S, et al. Role of HMGBl1 in cisplatin-persistent lung adenocarcinoma cell lines. *Front Oncol* (2021) 11:750677. doi: 10.3389/fonc.2021.750677
46. Zhou J, Cao S, Li W, Wei D, Wang Z, Li G, et al. Time-course differential lncRNA and mRNA expressions in radioresistant hypopharyngeal cancer cells. *Oncotarget* (2017) 8:40994–1010. doi: 10.18632/oncotarget.17343
47. Silva MM, Rocha CRR, Kinker GS, Pelegri AL, Menck CFM. The balance between NRF2/GSH antioxidant mediated pathway and DNA repair modulates cisplatin resistance in lung cancer cells. *Sci Rep* (2019) 9:17639. doi: 10.1038/s41598-019-54065-6
48. Matassa DS, Amoroso MR, Lu H, Avolio R, Arzeni D, Procaccini C, et al. Oxidative metabolism drives inflammation-induced platinum resistance in human ovarian cancer. *Cell Death Differ* (2016) 23:1542–54. doi: 10.1038/cdd.2016.39
49. Krtnic D, Zivadinovic R, Jovic Z, Pestic S, Mihailovic D, Ristic L, et al. Significance of the Ki-67 proliferation index in the assessment of the therapeutic response to cisplatin-based chemotherapy in patients with advanced cervical cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* (2018) 22:5149–55. doi: 10.26355/eurrev_201808_15710
50. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids* (2010) 2010:1–16. doi: 10.4061/2010/201367
51. Granada AE, Jiménez A, Stewart-Ornstein J, Blüthgen N, Reber S, Jambhekar A, et al. The effects of proliferation status and cell cycle phase on the responses of single cells to chemotherapy. *Mol Biol Cell* (2020) 31:845–57. doi: 10.1091/mbc.E19-09-0515
52. Liao BB, Sievers C, Donohue LK, Gillespie SM, Flavahan WA, Miller TE, et al. Adaptive chromatin remodeling drives glioblastoma stem cell plasticity and drug tolerance. *Cell Stem Cell* (2017) 20:233–246.e7. doi: 10.1016/j.stem.2016.11.003
53. Sharma J, Larkin J. Therapeutic implication of SOCS1 modulation in the treatment of autoimmunity and cancer. *Front Pharmacol* (2019) 10:324. doi: 10.3389/fphar.2019.00324
54. Beurivage C, Champagne A, Tobelaim WS, Pomerleau V, Menendez A, Saucier C. SOCS1 in cancer: an oncogene and a tumor suppressor. *Cytokine* (2016) 82:87–94. doi: 10.1016/j.cyto.2016.01.005
55. Zhao J, Zhao Y, Ma X, Feng H, Jia L. Outstanding prognostic value of novel ferroptosis-related genes in chemoresistance osteosarcoma patients. *Sci Rep* (2022) 12:5029. doi: 10.1038/s41598-022-09080-5
56. Calabrese V, Mallette FA, Deschênes-Simard X, Ramanathan S, Gagnon J, Moores A, et al. SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence. *Mol Cell* (2009) 36:754–67. doi: 10.1016/j.molcel.2009.09.044
57. Liao NPD, Laktyushin A, Lucet IS, Murphy JM, Yao S, Whitlock E, et al. The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. *Nat Commun* (2018) 9:1558. doi: 10.1038/s41467-018-04013-1
58. Thomas M, Finnegan CE, Rogers KM-A, Purcell JW, Trimble A, Johnston PG, et al. STAT1. *Cancer Res* (2004) 64:8357–64. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1864