



**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del  
Medi Natural

**Papel del CDP-diacilglicerol sintasa  
(CDS1) en la transición epitelio -  
mesenquimal en el cáncer de pulmón no  
microcítico**

**TRABAJO DE FIN DE GRADO**  
Grado en Biotecnología

**Autora:** Inés Sánchez Abad

**Tutor académico:** José Salvador Vicente Antón

**Tutora en institución:** Marta Benet Giménez

**Curso 2020-2021**

Valencia, Julio de 2021

**Título:** Papel del CDP-diacilglicerol sintasa (CDS1) en la transición epitelio-mesenquimal en el cáncer de pulmón no microcítico.

**Resumen:** El cáncer de pulmón es la principal causa de fallecimiento por neoplasias en todo el mundo y es el segundo tipo de cáncer más común tanto en hombres como en mujeres (después del cáncer de próstata y de mama, respectivamente). No obstante, ha sido posible desarrollar terapias basadas en el uso de inhibidores de los dominios tirosina quinasa (ITQs) del receptor EGFR, el cual se encuentra mutado en un 40-50% de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), los cuales han permitido generar importantes beneficios en la supervivencia de estos. A pesar de ello, el desarrollo de resistencias frente a estos fármacos continúa complicando el tratamiento, siendo la activación de la transición epitelio - mesenquimal (EMT) una de las causas de la aparición de las mismas. Este programa se caracteriza por la inducción de la expresión de genes mesenquimales y la represión de caracteres propios de células epiteliales, como es la expresión de la enzima CDP-diacilglicerol sintasa 1 (CDS1), implicada en el metabolismo de los fosfolípidos que juega un importante papel en el desarrollo del cáncer. De esta manera, en este estudio se han utilizado cultivos *in vitro* de líneas celulares de CPNM sensibles y resistentes al ITQ osimertinib, y de clones, generados a partir de éstas, de sobreexpresión y silenciamiento de la enzima CDS1, con lo que se pretende valorar si la modificación de la expresión de esta enzima ejerce un papel importante en la EMT para este tipo de cáncer. Para ello, se ha analizado la expresión génica y proteica tanto de marcadores epiteliales y mesenquimales, como de genes metabólicos involucrados en la ruta del ácido fosfatídico en la que participa CDS1. Asimismo, se ha estudiado la respuesta citotóxica al osimertinib, se han realizado ensayos de herida para evaluar la capacidad de migración celular y se ha llevado a cabo un estudio lipidómico mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-EM). De esta forma, en este trabajo se ha observado cómo la inhibición de CDS1 en células de CPNM sensibles a osimertinib favorece la expresión de factores mesenquimales, sugiriendo una posible activación de la EMT que, sin embargo, no queda reflejada en un aumento en la resistencia hacia este ITQ. Por otra parte, la sobreexpresión de CDS1 en células resistentes, a pesar de no producir cambios significativos en el fenotipo mesenquimal, permite generar una resensibilización parcial hacia el osimertinib. Además, el estudio lipidómico muestra la adquisición de caracteres mesenquimales con la inhibición de CDS1, caracterizados por el descenso en la producción de diglicéridos (DG) y fosfatidilinositol (PI), y la adquisición de características epiteliales con la sobreexpresión de CDS1, caracterizadas por el aumento en la producción de DG y PI.

**Palabras clave:** Cáncer de pulmón no microcítico (CPNM); CDP-diacilglicerol sintasa (CDS1); Transición epitelio-mesenquimal (EMT); Clones; Osimertinib

**Autora:** Inés Sánchez Abad

**Localidad y fecha:** Valencia, Julio 2021

**Tutor académico:** José Salvador Vicente Antón

**Tutora en institución:** Marta Benet Giménez

**Licencia:** Creative Commons. Reconocimiento - No Comercial - Sin Obra Derivada (by-nc-nd)

**Title:** Role of CDP-diacylglycerol synthase (CDS1) in epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer

**Summary:** Lung cancer is the leading cause of death from neoplasms worldwide and is the second most common cancer in both men and women (after prostate and breast cancer, respectively). However, it has been possible to develop therapies based on the use of inhibitors of the tyrosine kinase domains (TKIs) of the EGFR receptor, which is mutated in 40-50% of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), and have led to significant survival benefits. Despite this, the development of resistance to these drugs continues to complicate treatment, with activation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) being one of the causes of their appearance. This programme is characterized by the induction of mesenchymal gene expression and the repression of epithelial cell traits, such as the expression of the enzyme CDP-diacylglycerol synthase 1 (CDS1), involved in phospholipid metabolism, which plays an important role in the development of cancer. Thus, in this study we have used in vitro cultures of NSCLC cell lines sensitive and resistant to the ITQ osimertinib, and clones, generated from these, of overexpression and inhibition of the CDS1 enzyme, with the aim of assessing whether the modification of the expression of this enzyme plays an important role in the EMT for this type of cancer. To this end, we have analyzed the protein and gene expression of both epithelial and mesenchymal markers, as well as metabolic genes involved in the phosphatidic acid pathway in which CDS1 participates. In addition, the cytotoxic response to osimertinib has been studied, wound assays have been performed to assess cell migration capacity and a lipidomic study has been carried out using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS). Thus, in this study we have observed how CDS1 inhibition in osimertinib-sensitive NSCLC cells favours the expression of mesenchymal factors, suggesting a possible activation of EMT, which, however, is not reflected in an increase in resistance to this TKI. On the other hand, the overexpression of CDS1 in osimertinib-resistant cells, despite not producing significant changes in the mesenchymal phenotype, allows for partial resensitisation to osimertinib. Furthermore, the lipidomic study shows the acquisition of mesenchymal characteristics with CDS1 inhibition, characterised by a decreased production of diglycerides (DG) and phosphatidylinositol (PI), and the acquisition of epithelial characteristics with CDS1 overexpression, characterised by increased production of DG and PI.

**Key words:** Non-small cell lung cancer; CDP-diacylglycerol synthase (CDS1); Epithelial-mesenchymal transition (EMT); Clones; Osimertinib

**Author:** Inés Sánchez Abad

**Location and date:** Valencia, Julio 2021

**Academic supervisor:** José Salvador Vicente Antón

**Institution supervisor:** Marta Benet Giménez

**License:** Creative Commons. Attribution – Non Commercial – No Derivatives (by-nc-nd)

# ÍNDICE

1. Introducción.....	2
1.1. Concepto de cáncer.....	2
1.2. Cáncer de pulmón.....	3
1.2.1 Pronóstico, diagnóstico y estadificación.....	3
1.2.2 Clasificación.....	4
1.2.2.1 Cáncer de pulmón no microcítico. Tratamiento.....	4
1.3. Transición epitelio mesenquimal.....	6
1.4. Implicación del metabolismo de los lípidos en el cáncer.....	7
1.5. CDP – diacilglicerol sintasa, CDS1.....	8
2. Hipótesis y objetivos.....	11
3. Materiales y métodos.....	12
3.1. Cultivo de líneas celulares de CPNM.....	12
3.1.1 Tratamiento con Plasmocin™.....	12
3.2. Ensayos de sensibilidad a osimertinib a corto y largo plazo. Curvas de citotoxicidad.....	13
3.3. Extracción de ARN y reacción de retrotranscripción.....	13
3.4. Ensayo de expresión génica mediante PCR cuantitativa.....	14
3.5. Extracción de ADN genómico.....	15
3.5.1 Análisis STR.....	16
3.6. Extracción, cuantificación y detección de proteínas.....	16
3.7. Ensayo de migración.....	18
3.8. Análisis lipidómico.....	18
4. Resultados.....	20
4.1. Tratamiento con Plasmocin™ para eliminar micoplasma de las líneas celulares afectadas.....	20
4.2. Estudio de los marcadores epiteliales y mesenquimales mediante RT-PCR cuantitativa.....	20
4.3. Análisis de expresión de proteínas.....	22
4.4. Ensayo de citotoxicidad.....	23
4.4.1 Curvas de citotoxicidad a corto plazo.....	24
4.4.2 Curvas de citotoxicidad a largo plazo.....	25
4.5. Ensayos de migración celular.....	26

4.6. Análisis de expresión de genes metabólicos involucrados en la ruta del ácido fosfatídico en la que participa CDS1 .....	27
4.7. Estudio lipidómico.....	30
5. Discusión .....	33
6. Conclusiones .....	34
7. Bibliografía .....	35
8. Anexo .....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aspectos distintivos del cáncer y sus enfoques terapéuticos. Recuperado de Hanahan & Weinberg, 2011.....	2
<b>Figura 2.</b> Número estimado de casos y mortalidad para los 10 tipos de cáncer más comunes con respecto a ambos sexos. Adaptado de Sung et al., 2021.....	3
<b>Figura 3.</b> Activación del dominio tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Adaptado de Yoneda & Tanaka, 2018. ....	5
<b>Figura 4.</b> Ruta de la síntesis de fosfatidilinositol (PI) en el retículo endoplasmático y de cardioplipina (CL) en la mitocondria. PA, ácido fosfatídico; CDP-DAG, CDP-diacilglicerol; CDS1/CDS2, CDP-diacilglicerol sintasa 1/2; PIS, fosfatidilinositol sintasa; PI, fosfatidilinositol; TAMM41, Fosfatidato citidiltransferasa mitocondrial; PGPS, fosfatidilglicerol fosfato sintasa; PGP, fosfatidilglicerol fosfato; PTPMT1, proteína tirosina fosfatasa mitocondrial; PG, fosfatidilglicerol; CLS, cardioplipina sintasa; CL, cardioplipina. Recuperado de Blunsom & Cockcroft, 2020. ....	9
<b>Figura 5.</b> Representación del ciclo del PI. CDP-DAG, CDP-diacilglicerol; CDS1/CDS2, CDP-diacilglicerol sintasa 1/2; PIS, fosfatidilinositol sintasa; PI, fosfatidilinositol; DAG, diacilglicerol; PI4K, fosfatidilinositol 4-quinasa; PIP5K, fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa; PIP2, fosfatidilinositol bifosfato; PLC, fosfolipasa C; IP3, inositol trifosfato; DGK, diacilglicerol quinasa. ....	10
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática de las rutas del metabolismo de PA. La línea discontinua indica que esta reacción ocurre esencialmente en células eucariotas de hepatocitos. PA, ácido fosfatídico; CDP-DAG, CDP-diacilglicerol; CDS1/CDS2, CDP-diacilglicerol sintasa 1/2; PIS, fosfatidilinositol sintasa; PI, fosfatidilinositol; PGPS, fosfatidilglicerol fosfato sintasa; PGP, fosfatidilglicerol fosfato; PTPMT1, proteína tirosina fosfatasa mitocondrial; PG, fosfatidilglicerol; CLS, cardioplipina sintasa; CL, cardioplipina; DAG, diacilglicerol; TAG, triacilglicerol; LPIN1, lipin 1; DGAT1/2, Diacilglicerol O-aciltransferasa 1/2; CDP-C, CDP – colina; CDP-E, CDP – etanolamina; CEPT, colina/etanolamina fosfotransferasa; PS, fosfatidilserina; PDS1/2, PE, fosfatidiletanolamina; PEMT, fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa; PC, fosfatidilcolina; PLD1, fosfolipasa D-1.....	10
<b>Figura 7.</b> Gel de agarosa con los resultados de la PCR para la detección de micoplasma tras el tratamiento con Plasmocin™. (1) Marcador, (2) control negativo, (3) 1975 SH-CTRL medio con Plasmocin™, (4) 1975 SH2-CDS1 medio con Plasmocin™, (5) 1975 AZDR CDS1 medio con Plasmocin™, (6) 1975 SH-CTRL medio sin Plasmocin™, (7) 1975 SH2-CDS1 medio sin Plasmocin™, (8) 1975 AZDR CDS1 medio sin Plasmocin™, (9) línea celular negativa para micoplasma HCC827 Chicago, (10) línea celular negativa para micoplasma HCC827 AZDR, (11) 1975 SH-CTRL sin tratar, (12) control interno de amplificación, (13) control positivo y (14) marcador. ....	20
<b>Figura 8.</b> Análisis de la expresión génica de genes epiteliales y mesenquimales para los clones de sobreexpresión e inhibición de la enzima CDP – diacilglicerol sintasa (CDS1) con respecto a las líneas parentales H1975 y H1975 AZDR. Los valores se representan CDH1, cadherina 1; GRLH2, Grainyhead like transcription factor 2; ZEB2, Zinc finger E-box-binding homeobox 2; NNMT, Nicotinamida N-metiltransferasa; CDH2, cadherina 2; VIM, vimentaina; ZEB1, Zinc finger E-box-binding homeobox 1 .....	21

<b>Figura 9.</b> Expresión proteica de cadherina 1 (CDH1), desaturasa de ácidos grasos 3 (FADS3), CDP-diacilglicerol sintasa 1 (CDS1) y cadherina 2 (CDH2) en las líneas celulares de CPNM resistente al osimertinib, 1975 AZDR, la línea control de infección 1975 shNT y los clones de silenciamiento, 1975 sh2-CDS1, y sobreexpresión de CDS1, 1975 AZDR CDS1. ....	<b>23</b>
<b>Figura 10.</b> Efecto del osimertinib sobre la viabilidad celular a corto plazo de las líneas parentales, sensibles, H1975, y resistentes, H1975 AZDR, y de los clones de sobreexpresión, y silenciamiento de CDS1, 1975 AZDR CDS1 y 1975 SH2 CDS1, respectivamente. Los resultados representan la media obtenida de los 3 experimentos independientes realizados. Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos y la viabilidad celular se determinó mediante el método de la sulforrodamina B tras la incubación durante 72 horas con osimertinib (OSI). La viabilidad se muestra en % de células con respecto al control.....	<b>24</b>
<b>Figura 11.</b> Efecto del osimertinib sobre la viabilidad celular a largo plazo de las líneas parentales, sensibles, H1975, y resistentes, H1975 AZDR, como de los clones de sobreexpresión, y silenciamiento de CDS1, 1975 AZDR CDS1 y 1975 SH2 CDS1, respectivamente. Los resultados representan la media obtenida de los 3 experimentos independientes realizados. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y la viabilidad celular se determinó mediante el método de la sulforrodamina B. Tras 24 horas se cambió el medio añadiendo diferentes concentraciones de osimertinib (OSI), renovándolo cada 72 horas durante 10 días aproximadamente, atendiendo a la confluencia. La viabilidad se muestra en % de células con respecto al control. ....	<b>25</b>
<b>Figura 12.</b> Ensayo de migración celular para (A) las líneas parentales H1975 y H1975 AZDR, y (B) los clones control de infección y de silenciamiento de CDS1, 1975 SH CTRL y 1975 SH2 CDS1 respectivamente. ....	<b>26</b>
<b>Figura 13.</b> Análisis de la expresión génica de genes metabólicos involucrados en el metabolismo de los lípidos para los clones de sobreexpresión e inhibición de la enzima CDP – diacilglicerol sintasa (CDS1) con respecto a las líneas parentales H1975 y H1975 AZDR. CD36, ácido graso traslocasa CD36; SCD, Estearoil-CoA Desaturasa 1; SCD5, Estearoil-CoA Desaturasa 5; LPIN1, lipin 1; FOXA1, Forkhead Box A1; FADS3, Desaturasa de ácidos grasos 3; FASN, ácido graso sintasa; TMM41, Mitochondrial translocator assembly and maintenance homolog; DGAT1, diacilglicerol O-aciltransferasa 1; DGAT2, diacilglicerol O-aciltransferasa 2; CDS2, CDP-diacilglicerol sintasa 2; CPT1A, Carnitina palmitoiltransferasa I A; CPT1B, Carnitina palmitoiltransferasa I B. ....	<b>28</b>
<b>Figura 14.</b> Perfil de fosfatidilinositoles (PI) obtenido mediante análisis por HPLC-MS para las células de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) H1975 y H1975 AZDR, sensibles y resistentes a osimertinib respectivamente, y los clones de inhibición y sobreexpresión de CDP-diacilglicerol sintasa 1 (CDS1), H1975 SHCDS1 y H1975 AZDR CDS1 respectivamente, y el clon control de infección, H1975 SHCTRL. ....	<b>31</b>
<b>Figura 15.</b> Perfil de diacilgliceroles (DG) (A), y fosfatidilglicerol (PG) (B) obtenido mediante análisis por HPLC-MS para las células de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) H1975 y H1975 AZDR, sensibles y resistentes a osimertinib respectivamente, y los clones de inhibición y sobreexpresión de CDP-diacilglicerol sintasa 1 (CDS1), H1975 SHCDS1 y H1975 AZDR CDS1 respectivamente, y el clon control de infección, H1975 SHCTRL. ....	<b>32</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clones generados de las líneas utilizadas en el estudio.....	<b>12</b>
<b>Tabla 2.</b> Genes analizados utilizados en el ensayo de expresión por qPCR.....	<b>14</b>
<b>Tabla 3.</b> Anticuerpos primarios utilizados para el ensayo de expresión de proteínas mediante ensayo Western. ....	<b>17</b>
<b>Tabla 4.</b> Anticuerpos secundarios utilizados para el análisis de expresión de proteínas mediante ensayo Western .....	<b>17</b>
<b>Tabla S1.</b> Resultados del análisis STR para la autenticación de las líneas celulares utilizadas en este trabajo.....	<b>40</b>



## ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo	DDA: Adquisición dependientes de datos
ACTB: $\beta$ actina	DGAT: Diacilglicerol O-Aciltransferasa
ADN: Ácido desoxirribonucleico	DGK: Diacilglicerol quinasa
ADNc: ADN complementario	DIA: Adquisición independiente de datos
ADNg: ADN genómico	DMSO: Dimetilsulfóxido
AG: Ácidos grasos	dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato
AGR2: Homólogo de la proteína 2 del gradiente anterior	EGF: Factor de crecimiento epidérmico
ARN: Ácido ribonucleico	EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ARNm: ARN mensajero	ELOVL: Elongasas de ácidos grasos
ARNsh: ARN de horquilla corta	ER: Retículo endoplasmático
ATCC: American Type Culture Collection	ESI: Ionización por electrospray
ATP: Adenosín trifosfato	FABPs: Proteínas de unión a ácidos grasos
BRAF: B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase	FADS: Desaturasas de ácidos grasos
BSA: Albúmina de suero bovino	FASN: Ácido graso sintasa
CDH1: Cadherina 1	FATPs: Proteínas transportadoras de ácidos grasos
CDH2: Cadherina 2	FBS: Suero bovino fetal
CDP-DAG: CDP – diacilglicerol	FBS: Suero bovino fetal
CDS1: CDP-diacilglicerol sintasa 1	FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos
CDS2: CDP-diacilglicerol sintasa 2	FOXA1: Forkhead Box A1
CEPT: Colina/etanolamina fosfotransferasa	GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
CL: Cardiolipina	GRLH2: Grainyhead like transcription factor 2
CLS: Cardiolipina sintasa	HPLC-EM: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
CP: Cáncer de pulmón	IC50: Concentración inhibidora media máxima
CPM: Cáncer de pulmón microcítico	IP3: Inositol trifosfato
CPNM: Cáncer de pulmón no microcítico	IPA: Isopropanol
CPT1: Carnitina palmitoiltransferasa 1	
DAG: Diacilglicerol	

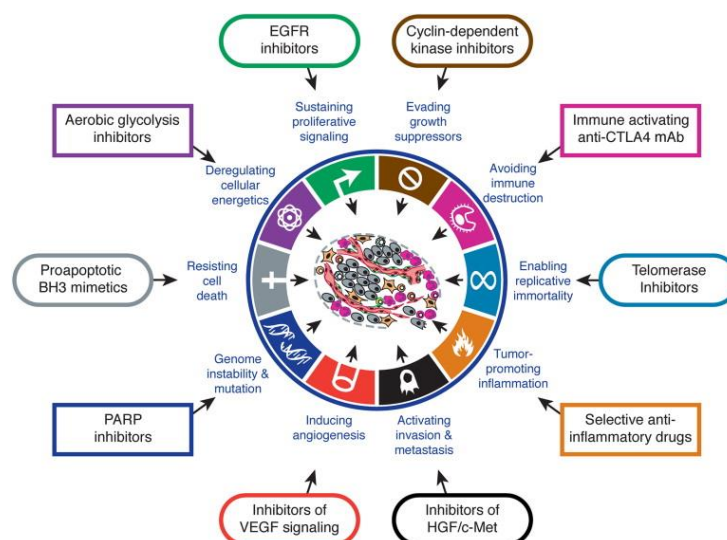
IS: internal standard o estándar interno	LPIN1: Lipin 1
ITQ: Inhibidores de tirosina quinasas	MUFAs: Ácidos grasos monoinsaturados
NNMT: Nicotinamida N-metiltransferasa	RPLP0: Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0
OMS: Organización Mundial de la Salud	RT: Reacción de retrotranscripción
PA: Ácido fosfatídico	SCD: Esteroil-CoA desaturasa
PBS: Tampón fosfato salino	SDS-PAGE: Dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
PC: Fosfatidilcolina	SLP: Supervivencia libre de progresión
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa	SNAI1: Snail Family Transcriptional Repressor 1
PE: Fosfatidiletanolamina	SNAI2: Snail Family Transcriptional Repressor 2
PEMT: Fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa	TAGs: Triacilgliceroles
PFA: Paraformaldehido	TAMM41: Mitochondrial Translocator Assembly and Maintenance Homolog
PG: Fosfatidilglicerol	TBS-T: Tampón salino Tris – Tween
PGP: Fosfatidil-glicerol fosfato	TC: Tomografía computerizada
PGPS: Fosfatidilglicerol fosfato sintasa	TF-EMT: Factores de transcripción inductores de la EMT
PI: Fosfatidilinositol	TGF- $\beta$ : Factor de Crecimiento Transformante $\beta$
PI4K: Fosfatidilinositol 4-quinasa	TGS: Tampón Tris – Glicina - SDS
PIP2: Fosfatidilinositol bifosfato	TNM: Tumor/Nódulos/Metástasis
PIP5K: Fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa	TQ: Tirosina quinasa
PIS: Fosfatidilinositol sintasa	TWIST1: Twist Family BHLH Transcription Factor 1
PLB: Protein Loading Buffer	VIM: Vimentina
PLC: Fosfolipasa C	Wnt: Familia de proteínas tipo wingless
PLD: Fosfolipasa D	ZEB1: Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
PTPMT1: Proteína tirosina fosfatasa mitocondrial 1	ZEB2: Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2
PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados	
QC: Control de calidad	
qPCR: Reacción de PCR en tiempo real	
RNAsaH: Ribonucleasa H	
ROS: Especies reactivas de oxígeno	

# 1. Introducción

## 1.1. Concepto de cáncer

El cáncer hace referencia a un amplio conjunto de enfermedades en las cuales un grupo de células, de cualquier órgano o tejido, comienzan a tener un crecimiento y división incontrolados, permitiéndoles invadir tejidos vecinos e incluso propagarse a otras zonas del cuerpo (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2019). En condiciones normales, a través de un proceso regulado por una serie de mecanismos de control celular, las células se dividen de forma periódica y regular, reemplazando a las células dañadas o envejecidas. Sin embargo, con el desarrollo del cáncer, este proceso se ve alterado de forma que las células dañadas o envejecidas no son reemplazadas, y se produce un crecimiento descontrolado de nuevas células que da lugar a los tumores. (AECC, 2010). Se trata de una enfermedad genética causada por alteraciones originadas en los genes que controlan el funcionamiento, crecimiento y división de las células. Estos cambios genéticos pueden ser heredados, pero también pueden surgir como resultado de errores en los procesos de división celular o por daños provocados en el ADN a causa de factores ambientales. Dentro de los cambios genéticos que inducen al desarrollo del cáncer encontramos 3 tipos principales de genes afectados: los protooncogenes, los genes supresores de tumores y los genes de reparación del ADN. (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021)

Conforme las células normales van cambiando hacia un estado neoplásico, éstas van adquiriendo una serie de propiedades específicas que les permiten finalmente convertirse en células tumorales. Hanahan y Weinberg en el año 2000 enumeraron los 6 aspectos distintivos del cáncer, permitiendo así proporcionar un marco claro para poder entender la diversidad de las enfermedades neoplásicas. Sin embargo, en el año 2011, debido al progreso en la investigación del cáncer, los distintivos previamente propuestos fueron modificados y adaptados. De esta forma, se establecieron 10 rasgos característicos del cáncer los cuales son: la capacidad de mantener una proliferación crónica, la evasión de los inhibidores del crecimiento, la resistencia a la apoptosis, la inmortalidad replicativa, la inducción de la angiogénesis, la invasión y metástasis, la inestabilidad genómica y mutaciones, la inflamación promovida por los tumores, la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la destrucción inmune. (Figura 1) (Hanahan & Weinberg, 2011).

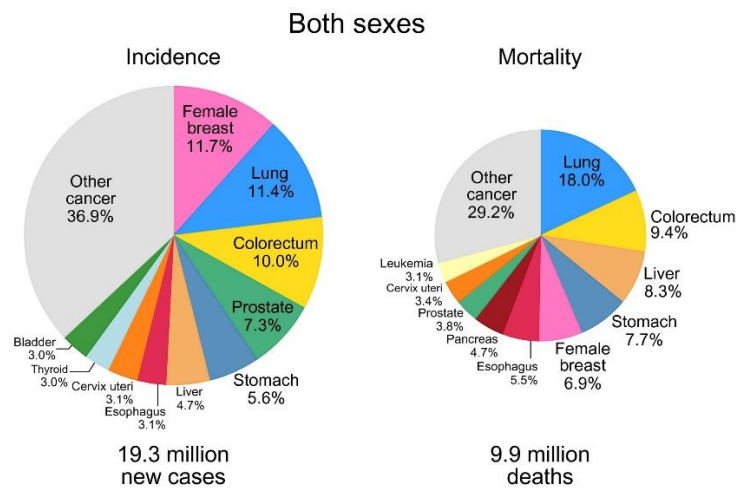


**Figura 1.** Aspectos distintivos del cáncer y sus enfoques terapéuticos. Recuperado de Hanahan & Weinberg, 2011.

Por otro lado, también es importante destacar que, en el cáncer, los tumores no representan únicamente un grupo celular, sino que están conformados por un grupo altamente heterogéneo de células, factores de secreción y por la matriz extracelular. Este microambiente tumoral parece estar implicado en la progresión del cáncer, existiendo una relación entre las células cancerosas y el microambiente que permite la supervivencia de estas células, la invasión de tejidos y la metástasis (Anderson & Simon, 2020).

## 1.2. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón (CP) corresponde con la primera causa de muerte relacionada con el cáncer, siendo el segundo tipo de cáncer más comúnmente diagnosticado, después del cáncer de mama en mujeres y el cáncer de próstata en hombres (Figura 2) (Sung et al., 2021). La incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón se encuentra estrechamente relacionada con el consumo de tabaco, siendo este la causa más importante de este tipo de cáncer (Youlden et al., 2008). Sin embargo, aunque un 90% de los casos de cáncer de pulmón son atribuidos al consumo de tabaco, entre las otras posibles causas encontramos la exposición a diferentes carcinógenos tales como el amianto, la contaminación y calidad del aire o el daño provocado por procesos infectivos (de Groot et al., 2018).



**Figura 2.** Número estimado de casos y mortalidad para los 10 tipos de cáncer más comunes con respecto a ambos sexos. Adaptado de Sung et al., 2021.

### 1.2.1 Pronóstico, diagnóstico y estadificación

La detección, diagnóstico y el tratamiento a tiempo del cáncer del pulmón es crucial para la evolución y salud de los pacientes, por lo que cualquier retraso en el desarrollo de estos procedimientos puede afectar de forma significativa el pronóstico de los mismos. (Jacobsen et al., 2017). El sistema de estadificación TNM utilizado para el CP permite proporcionar información pronóstica de gran utilidad: T, hace referencia al tamaño y extensión del tumor principal; N, se refiere a si ha diseminado a los ganglios y M, se refiere a si el cáncer ha metastazado. Con este sistema se establece un estadio clínico basado en el examen, la imagen, la realización de biopsias y clasificación quirúrgica llevada a cabo previamente al tratamiento; y un estadio patológico basado en una muestra quirúrgica y la información obtenida a partir de la resección quirúrgica definitiva. A pesar de que este sistema de estadificación es uno de los factores de predicción más importantes, los resultados de supervivencia pueden variar mucho dentro de cada estadio. Por ello, existe un gran interés en identificar las características clínicas y marcadores

biológicos tumorales que permitan afinar la estimaciones pronósticas para cada estadio TNM (Woodard et al., 2016).

Con respecto al diagnóstico, el método utilizado dependerá del tipo de cáncer pulmonar que se esté tratando, del tamaño y la localización del tumor primario, de la existencia o no de diseminación y del estado general de salud del paciente (Rivera et al., 2003). Además, de forma idónea las técnicas de detección deben tratar de ser lo menos invasivas posible, cuantitativas, sensibles y específicas (Prabhakar et al., 2018). Existen diversos métodos diagnósticos entre los que encontramos, de menos a más invasivos, la realización de biopsias o aspiraciones con aguja fina de zonas metastásicas o ganglios linfáticos accesibles, el uso de la broncoscopia convencional, aspiraciones transtorácicas guiadas por tomografía computarizada (TC), aspiraciones transbronquiales con aguja, broncoscopias de navegación electromagnética, ultrasonidos endobronquiales, biopsia pleural, mediante citología de esputos, toracocentesis o realizando cirugía torácica asistida por vídeo (Latimer & Mott, 2015).

### **1.2.2 Clasificación**

El cáncer de pulmón constituye un grupo heterogéneo de tumores de acuerdo con la clasificación de los tumores pulmonares establecida por la OMS en 2015. Esta clasificación está basada en el uso de herramientas inmunohistoquímicas y la microscopía óptica que, atendiendo a la histología y características genéticas de los tumores, y gracias al avance en la medicina personalizada, permite llevar a cabo unos tratamientos u otros (Travis et al., 2015).

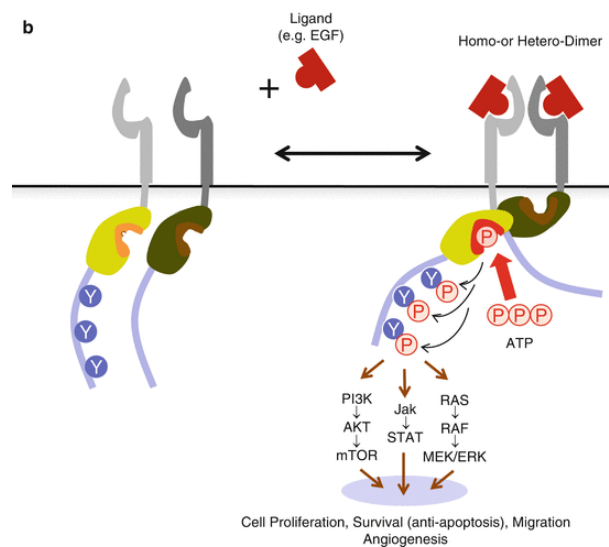
De esta forma, el CP puede ser clasificado en 2 amplios grupos histológicos: los carcinomas de células pequeñas o microcíticos (CPM) y los carcinomas de células no pequeñas o no microcíticos (CPNM). El CPM deriva de las células hormonales presentes en el pulmón y representa entre un 10-15% de todas las neoplasias. Se trata de tumores muy desdiferenciados y tremendamente agresivos, con capacidad de diseminar rápidamente. Por otro lado, el CPNM está constituido a su vez por varios tipos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas o epidermoide y carcinoma de células grandes. El adenocarcinoma es el tipo de cáncer pulmonar más común (alrededor de un 40% del total de casos) y surge en los bronquios periféricos. El carcinoma de células escamosas representa entre un 25% y un 30% del total de las neoplasias pulmonares y suele surgir en los bronquios principales. Por último, el carcinoma de células grandes comprende un 10% de todos los CPNM y se comporta de forma similar a las CPM, provocando una diseminación fatal (Lemjabbar-Alaoui et al., 2015).

#### **1.2.2.1 Cáncer de pulmón no microcítico. Tratamiento**

El cáncer de pulmón no microcítico o de células no pequeñas representa alrededor del 85% de todas las neoplasias pulmonares (Zhang et al., 2016). A lo largo de los años se han llevado a cabo grandes avances con respecto a la terapia de esta enfermedad. Para un grupo reducido de pacientes, la cirugía representa el procedimiento más efectivo, no siéndolo en los casos mayoritarios de cáncer avanzado (Yoneda et al., 2019). En estos últimos casos, la terapia estaba inicialmente restringida a la quimioterapia citotóxica. Sin embargo, este clásico tratamiento ofrece una baja especificidad, puesto que los agentes quimioterapéuticos atacan tanto a las células cancerosas como a células normales, generando efectos secundarios significativos. No obstante, debido a los recientes avances, se han podido encontrar tratamientos específicos y dirigidos para esta patología (de Mello et al., 2020). Estos avances surgen del descubrimiento de que entre un 40 y un 45% de los pacientes con esta condición presentan mutaciones en los exones 19 o 21.

Estas alteraciones provocan la activación constitutiva de los dominios tirosina quinasa (TQ) de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Gelatti et al., 2019).

EGFR es un receptor transmembrana que efectúa importantes funciones tales como la migración y la proliferación celular. Cuando un ligando específico reconoce este receptor en el dominio de unión, se produce la activación del dominio TQ como resultado del aumento en la afinidad de unión con el ATP. Con esto, se produce la activación de diferentes rutas de señalización a través de la autofosforilación de los residuos de tirosina, resultando en una proliferación y migración celular acelerada, lo cual prolonga la supervivencia celular al evadir la apoptosis y provoca un aumento en la angiogénesis (Figura 3).



**Figura 3.** Activación del dominio tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Adaptado de Yoneda & Tanaka, 2018.

Con todo esto, se han podido desarrollar inhibidores de los dominios tirosina quinasa (ITQs) de EGFR, generando un efecto antitumoral. Encontramos tratamientos de primera, segunda y tercera generación. El gefitinib y erlotinib pertenecen a la primera generación de los ITQs producidos, los cuales actúan por competición inhibitoria de los dominios TQ. Sin embargo, a pesar de haber observado una mejora en la supervivencia sin progresión con respecto al uso de los quimioterapéuticos tradicionales, los pacientes generalmente desarrollan resistencias a estos fármacos (Yoneda et al., 2019).

Existen diversos mecanismos de resistencia que se han podido identificar, tales como el desarrollo de mutaciones secundarias en EGFR como la T790M, la activación de vías de señalización como resultado de mutaciones adquiridas en genes como BRAF, la activación de rutas de señalización paralelas para evitar la inhibición de EGFR, y la transformación histológica, específicamente, la transición epitelio-mesenquimal (Zhou & Yao, 2016).

A consecuencia de la aparición de estas resistencias, se desarrollaron los ITQs de segunda generación, afatinib y dacomitinib entre otros. Estos han resultado tener una mayor actividad inhibitoria del dominio TQ, al unirse covalentemente y de forma irreversible a éste. Sin embargo, el uso de estos fármacos está asociado a una mayor toxicidad, por lo que no pueden ser prescritos a dosis lo suficientemente altas para combatir las resistencias. Por último, el fármaco osimertinib

pertenece a la tercera generación de ITQs, inhibiendo de forma selectiva el dominio TQ a través de una unión covalente irreversible. A partir de los resultados obtenidos de los ensayos clínicos llevados a cabo, en los cuales se hace uso del osimertinib como tratamiento de primera línea, se pudo observar una supervivencia libre de progresión (SLP) significativamente mayor. Además, debido a la inhibición selectiva, los efectos asociados a su utilización son menos frecuentes con el uso de este fármaco (Yoneda et al., 2019).

### **1.3. Transición epitelio mesenquimal**

Las células epiteliales tienen la capacidad de reprimir su morfología característica, elongándose y adquiriendo propiedades invasivas y migratorias. Este proceso es lo que se conoce como transición epitelio mesenquimal (EMT), puesto que se reprimen las características epiteliales, induciéndose la expresión de genes propios de las células mesenquimales (Derynck & Weinberg, 2019). Las células epiteliales y mesenquimales difieren en varios aspectos. Por un lado, las células epiteliales presentan polarización apical-basolateral y forman capas que se encuentran estrechamente unidas a través de enlaces como las uniones oclusivas, uniones adherentes, desmosomas o uniones tipo gap. Por otro lado, las células mesenquimales no se organizan formando capas ni cuentan con el mismo tipo de polarización que las epiteliales, sino que contactan con células vecinas focalmente. Mientras que las células mesenquimales presentan una morfología fusiforme que asemeja a la de los fibroblastos, las células epiteliales crecen formando cúmulos para mantener las uniones con las células vecinas (Thiery & Sleeman, 2006).

De esta forma, las células sometidas a este proceso de transición reprimen los genes epiteliales que posibilitan la adhesión celular, permitiéndoles separarse de las células vecinas. Asimismo, estas células también activan genes mesenquimales para adquirir los cambios morfológicos y funcionales necesarios (Aiello & Kang, 2019). El programa EMT es desencadenado por varios factores tales como TGF- $\beta$ , Notch, Wnt, FGF o EGF (Otsuki et al., 2018) y está mediado por una serie de factores de transcripción los cuales incluyen SNAI1, SNAI2, TWIST1, ZEB1 y ZEB2. Estos factores activan el proceso de transición epitelio mesenquimal, sin embargo, la combinación exacta de los factores activados es dependiente de cada fenotipo EMT específico (Stemmler et al., 2019). Es importante señalar que este proceso no genera una completa transformación de las características celulares, sino que las células fluctúan entre etapas intermedias, generando fenotipos híbridos entre epiteliales y mesenquimales (Nieto et al., 2016).

En condiciones fisiológicas normales, este proceso de transdiferenciación tiene lugar durante la formación de nuevas células y tejidos a lo largo del desarrollo, durante la cicatrización y en los sitios de inflamación, permitiendo restaurar la integridad del tejido (Derynck & Weinberg, 2019). Sin embargo, debido a que el fenotipo EMT potencia la movilidad celular, este proceso fomenta la progresión y diseminación de las células tumorales en el cáncer (Aiello & Kang, 2019).

El fenotipo EMT en las células tumorales viene inducido a través de diversos factores que incluyen citoquinas, condiciones de hipoxia y las especies reactivas de oxígeno (ROS). En el caso específico de las neoplasias pulmonares, la mutación originada en los dominios tirosina quinasa de EGFR entre otros factores, induce un aumento en la expresión de los factores de transcripción de la EMT (FT-EMT). Esta sobreexpresión de los FT-EMT se ha visto asociada al desarrollo de características propias de células madre, invasivas y metastáticas (Otsuki et al., 2018).

Adicionalmente, también se ha podido observar que la resistencia a fármacos en el CPNM está asociada a la EMT. Las células de adenocarcinoma pulmonar resistentes a las ITQs han mostrado previamente un fenotipo mesenquimal, lo cual sugiere que la EMT realmente juega un papel en la respuesta a estos fármacos (Otsuki et al., 2018). Con todo esto y habiendo comprobado que la EMT contribuye en la aparición de caracteres tumorales, este proceso puede actuar como una posible diana de las terapias anticancerígenas.

#### **1.4. Implicación del metabolismo de los lípidos en el cáncer**

Durante el desarrollo del cáncer, el rápido crecimiento y expansión que sufren las células tumorales provoca cambios importantes en su metabolismo. Específicamente, la alteración del metabolismo de los lípidos es uno de los cambios metabólicos más notables en el cáncer, caracterizándose por una elevada biosíntesis y captación de ácidos grasos (AG). Estas modificaciones permiten dotar a las células cancerosas de una fuente de AG, los cuales son utilizados para la producción de fosfolípidos para la biogénesis de membranas, la producción de energía y la modificación de proteínas, promoviendo la progresión del cáncer (Munir et al., 2019).

Los ácidos grasos son sintetizados a partir de acetil-CoA, procedente de la glucosa, glutamina o acetato, que es posteriormente convertido a malonil-CoA. A partir de éste y mediante la acción de la enzima ácido graso sintasa (FASN), se genera el ácido graso saturado palmitato. Este puede ser elongados por acción de las elongasas de ácidos grasos (ELOVL), e insaturado por la acción de las estearoil-CoA desaturasas, SCD y SCD5, o por las desaturasas de ácidos grasos, FADS1-3, generando así todo un conjunto de AG con diferentes niveles de saturación. Por otro lado, puesto que las células humanas no son capaces de sintetizar los ácidos grasos esenciales ( $\omega 3$  y  $\omega 6$ ), la captación de lípidos del medio extracelular juega también un papel muy importante en el metabolismo de las células cancerosas. La obtención de lípidos exógenos tiene lugar a través de endocitosis mediada por receptores, como es el caso de las lipoproteínas de baja densidad, por medio de la traslocasa CD36 o mediante proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATPs). Además, las proteínas de unión a ácidos grasos o FABPs también participan en el transporte de estas moléculas. Una vez obtenidos o sintetizados los AG, estos son incorporados rápidamente en triglicéridos, formando las gotas lipídicas (Snaebjornsson et al., 2020) (Baenke et al., 2013).

Las células tumorales se enfrentan a lo largo del desarrollo del cáncer a ambientes con escasez de nutrientes y oxígeno, generando un estrés metabólico que provoca un desequilibrio entre la síntesis y la captación de ácidos grasos (Munir et al., 2019). Las condiciones de hipoxia a las que se ven sometidas provienen de la alta tasa de proliferación que caracteriza a estas células. En esta situación, el metabolismo de los ácidos grasos se ve modificado puesto que, tanto la oxidación de los mismos como la producción de citrato a partir de la glucosa, se ven impedidas en ausencia de oxígeno (Mylonis et al., 2019). De esta forma, para mantener la biosíntesis de AG, las células cancerosas utilizan la glutamina o el acetato como sustratos alternativos. Además, para compensar la síntesis de novo de ácidos grasos a partir de la glucosa, estas células van a necesitar captar ácidos grasos del medio, principalmente ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), reduciéndose los niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), puesto que estos son más susceptibles a la peroxidación en presencia de ROS (Munir et al., 2019) (Snaebjornsson et al., 2020) (Baenke et al., 2013). Por otra parte, puesto que el catabolismo de los AG se ve inhibido en estas condiciones, se produce la acumulación intracelular de AG libres, lo cual provoca lipotoxicidad. Por ello, las células convierten estos AG libres a triglicéridos, que quedan almacenados en gotas lipídicas (Mylonis et al., 2019). Sin embargo, como se ha comentado, la escasa irrigación sanguínea en los tumores provoca la reducción en el suministro de nutrientes a



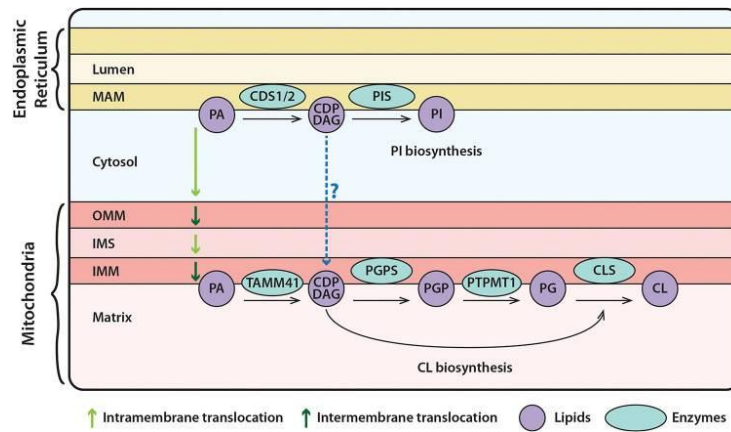
estas células, entre estos, los ácidos grasos. De esta forma, las células cancerosas son más dependientes de la síntesis interna de AG. No obstante, debido a que la biosíntesis de AG a partir de glucosa se ve afectada por las condiciones de hipoxia características del tumor, tal como se ha expresado anteriormente, las células dependen de la glutamina o el acetato como sustratos (Munir et al., 2019).

### **1.5. CDP – diacilglicerol sintasa, CDS1**

La enzima CDP – diacilglicerol sintasa (CDS) es la encargada de catalizar la conversión del ácido fosfatídico (PA) a CDP – diacilglicerol (CDP-DAG). De forma inicial, únicamente se identificaron y caracterizaron 2 isoformas de esta enzima en mamíferos, CDS1 y CDS2, unas proteínas integrales de membrana localizadas en el retículo endoplasmático (ER). Sin embargo, más tarde, se pudo observar la actividad CDP-DAG sintasa en la mitocondria, lo cual llevó finalmente al descubrimiento de que esa actividad era debida a la enzima TAMM41, una proteína periférica de la membrana interna de la mitocondria. A pesar de llevar a cabo una misma función, esta última no presenta ninguna homología estructural ni de secuencia con las enzimas CDS. (Blunsom & Cockcroft, 2020) (D'Souza et al., 2014). A lo largo de este trabajo, nos centraremos principalmente en la actividad de CDS1, cuya expresión es característica de células epiteliales (THE HUMAN PROTEIN ATLAS, 2021).

La actividad de estas enzimas juega un papel muy importante en la síntesis de los fosfolípidos. De esta manera, una vez el PA ha sido convertido a CDP-DAG por la acción de CDS1/2, este último es utilizado por la fosfatidilinositol sintasa (PIS) para sintetizar fosfatidilinositol (PI) en el ER. Adicionalmente, el ácido fosfatídico puede ser transportado desde el ER hasta la mitocondria, donde será utilizado en este caso por TAMM41 para producir CDP-DAG, que es utilizado a su vez por la fosfatidilglicerol fosfato sintasa (PGPS) para generar fosfatidil-glicerol fosfato (PGP). Posteriormente la proteína tirosina fosfatasa mitocondrial 1 (PTPMT1) produce fosfatidilglicerol (PG) a partir del PGP producido y finalmente, el PG es utilizado para producir cardiolípidina (CL) gracias a la acción de la cardiolípidina sintasa (CLS). Por otra parte, también es posible que el CDP-DAG pueda ser transportado a la mitocondria donde sea utilizado para la producción de CL tal como se indica en la figura 4 (Blunsom & Cockcroft, 2020).

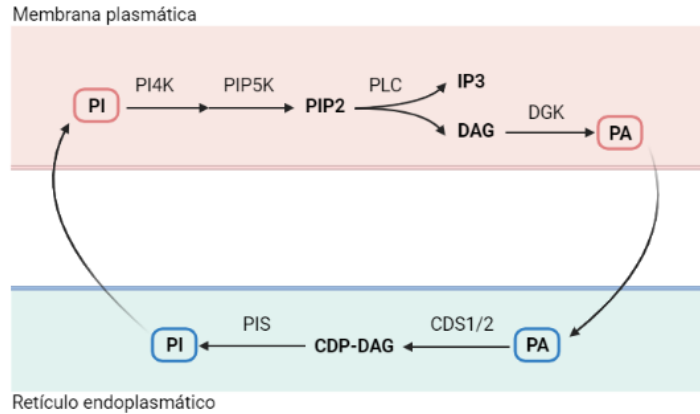
Además de la ruta mediada por la acción de las enzimas CDS1, CDS2 y TAMM41 para producir CDP-DAG, el ácido fosfatídico también puede ser utilizado por enzimas implicadas en la síntesis de glicerofosfolípidos y triacilgliceroles. El PA puede ser defosforilado por la fosfatidato fosfatasa LPIN1 dando lugar a diacilglicerol (DAG) (Han & Carman, 2010), el cual puede ser utilizado como precursor para la producción de triacilglicerol a través de una acilación mediada por las enzimas DGAT1 y 2 (Diacylglycerol O-acyltransferase 1 y 2). Además, el DAG también puede ser utilizado para la producción de fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) a partir de CDP – colina y CDP – etanolamina mediante la acción de la colina/etanolamina fosfotransferasa (CEPT). Asimismo, y en el caso específico de los hepatocitos, la PE generada puede ser convertida a PC a través de una serie de metilaciones como resultado de la acción de la fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT). Finalmente, la PC puede ser utilizada para producir de nuevo PA mediante la acción hidrolítica de la fosfolipasa D (PLD) (Athenstaedt & Daum, 1999) (Bhatt-Wessel et al., 2018) (van der Veen et al., 2017) (Zhukovsky et al., 2019).



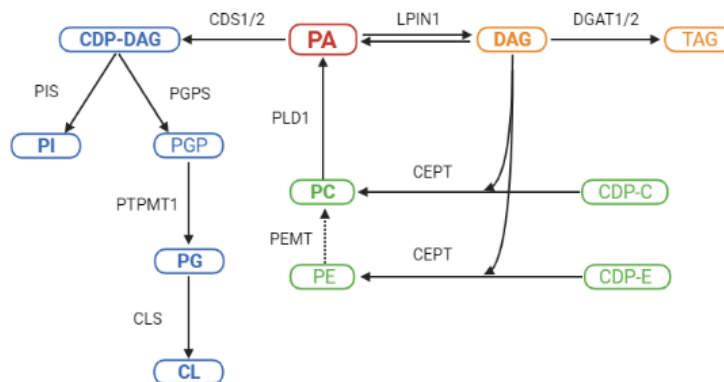
**Figura 4.** Ruta de la síntesis de fosfatidilinositol (PI) en el retículo endoplasmático y de cardiolipina (CL) en la mitocondria. PA, ácido fosfatídico; CDP-DAG, CDP-diacilglicerol; CDS1/CDS2, CDP-diacilglicerol sintasa 1/2; PIS, fosfatidilinositol sintasa; PI, fosfatidilinositol; TMM41, Fosfatidato citidiltransferasa mitocondrial; PGPS, fosfatidilglicerol fosfato sintasa; PGP, fosfatidilglicerol fosfato; PTPMT1, proteína tirosina fosfatasa mitocondrial; PG, fosfatidilglicerol; CLS, cardiolipina sintasa; CL, cardiolipina. Recuperado de Blunsom & Cockcroft, 2020.

El PI producido a partir de CDP-DAG constituye el pilar fundamental de todos los fosfatidilinositoles, cuyo metabolismo resulta interesante debido a su implicación en diversas rutas intracelulares de transducción (Lykidis et al., 1997). Entre ellas, la ruta PI3K/AKT/mTOR es una de las que se pueden encontrar alteradas en el CPNM y la activación anómala de la misma es uno de los mecanismos responsables de la resistencia a los ITQs en pacientes portadores de mutaciones de activación de EGFR (Fumarola et al., 2014). Una vez se ha generado el PI en el retículo, éste es transportado a la membrana plasmática donde, mediante sucesivas fosforilaciones llevadas a cabo por las quinasas PI4 y PIP5, finalmente se produce fosfatidilinositol bifosfato (PIP2). Posteriormente, con la activación de la fosfolipasa C (PLC), el PIP2 es hidrolizado, dando a lugar a los segundos mensajeros inositol trifosfato (IP3) y DAG. Este último, gracias a la acción de la diacilglicerol quinasa (DGK), es utilizado para producir PA de nuevo, que puede ser transportado hacia el ER, donde es empleado para la producción, una vez más, de PI. (Figura 5) (Blunsom et al., 2019).

Con lo expuesto anteriormente, podemos observar cómo el ácido fosfatídico se reparte entre la producción de CDP-diacilglicerol para la producción de fosfatidil inositol, fosfatidilglicerol y cardiolipina, y hacia la producción de diacilglicerol (Figura 6), lo cual representa un importante punto regulador del metabolismo de los lípidos, particularmente de los fosfolípidos, en células eucariotas. Conociendo la importante función del metabolismo lipídico en la progresión del cáncer, en este trabajo nos centraremos en el papel que juega la enzima epitelial CDS1 en el desarrollo de estas neoplasias, intentando entender su implicación en la EMT y cómo ello repercute en la actividad de las células de CPNM con respecto a su capacidad de resistencia ante las ITQs, su capacidad de migración y en referencia al metabolismo lipídico.



**Figura 5.** Representación del ciclo del PI. CDP-DAG, CDP-diacilglicerol; CDS1/CDS2, CDP-diacilglicerol sintasa 1/2; PIS, fosfatidilinositol sintasa; PI, fosfatidilinositol; DAG, diacilglicerol; PI4K, fosfatidilinositol 4-quinasa; PIP5K, fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa; PIP2, fosfatidilinositol bifosfato; PLC, fosfolipasa C; IP3, inositol trifosfato; DGK, diacilglicerol quinasa.



**Figura 6.** Representación esquemática de las rutas del metabolismo de PA. La línea discontinua indica que esta reacción ocurre esencialmente en células eucariotas de hepatocitos. PA, ácido fosfátidico; CDP-DAG, CDP-diacilglicerol; CDS1/CDS2, CDP-diacilglicerol sintasa 1/2; PIS, fosfatidilinositol sintasa; PI, fosfatidilinositol; PGPS, fosfatidilglicerol fosfato sintasa; PGP, fosfatidilglicerol fosfato; PTPMT1, proteína tirosina fosfatasa mitocondrial; PG, fosfatidilglicerol; CLS, cardioplipina sintasa; CL, cardioplipina; DAG, diacilglicerol; TAG, triacilglicerol; LPIN1, lipin 1; DGAT1/2, Diacilglicerol O-aciltransferasa 1/2; CDP-C, CDP – colina; CDP-E, CDP – etanolamina; CEPT, colina/etanolamina fosfotransferasa; PS, fosfatidilserina; PDS1/2, PE, fosfatidiletanolamina; PEMT, fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa; PC, fosfatidilcolina; PLD1, fosfolipasa D-1.

## 2. Hipótesis y objetivos

El descubrimiento de las mutaciones activadoras de EGFR en pacientes con CPNM ha permitido el desarrollo de terapias basadas en ITQs que han demostrado tener un importante beneficio en referencia a la supervivencia y calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, la aparición de resistencias hacia estos fármacos complica el tratamiento. Una de las causas que impulsa el desarrollo de resistencias en los tumores es la adquisición de un fenotipo mesenquimal como resultado de la EMT. Por otro lado, la enzima CDS1 resulta tener una actividad fundamental en el metabolismo de los fosfatidilinositoles y fosfolípidos, implicados en diversas rutas de transducción intracelulares que pueden estar implicadas en el desarrollo de tumores.

De esta forma, planteamos como **hipótesis** en este proyecto que la modificación de la expresión de la enzima CDS1 podría ejercer un papel fundamental en la transición epitelio-mesenquimal en el CPNM. Así, los **objetivos** específicos de este proyecto son:

1. Analizar la expresión de marcadores genéticos epiteliales y mesenquimales en los clones de sobreexpresión y silenciamiento de CDS1 con respecto a las líneas parentales.
2. Estudiar la respuesta citotóxica al osimertinib de los clones de sobreexpresión y silenciamiento de CDS1 a corto y a largo plazo con respecto a las líneas parentales.
3. Evaluar la capacidad de migración celular de las líneas celulares a las que se ha silenciado CDS1.
4. Analizar la expresión de genes metabólicos involucrados en la ruta del ácido fosfatídico en la que participa CDS1 en los clones de sobreexpresión y silenciamiento con respecto a las líneas parentales.
5. Estudio lipidómico mediante espectrómetro de masas de los clones de sobreexpresión y silenciamiento de CDS1 con respecto a las líneas parentales.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Cultivo de líneas celulares de CPNM

A lo largo de este trabajo se utilizó una línea celular de CPNM la cual fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC). Se trata de la línea H1975 dirigida por la mutación L858R exón 21/ T790M Exón 20 en EGFR y sensible al ITQ osimertinib, de la cual también disponemos de la línea resistente correspondiente, H1975 AZDR. La resistencia se obtuvo por exposición prolongada (durante un plazo mayor de 6 meses) a concentraciones crecientes de este mismo fármaco (Soucheray et al., 2015).

Estas líneas celulares fueron cultivadas en medio completo compuesto por un 90% de medio RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA), un 10% de suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 100 U/ml de penicilina (Invitrogen, Carlsbad, CA), 100 µg/ml de estreptomina (Invitrogen, Carlsbad, CA) y fungizona (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células fueron mantenidas en cultivo a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda.

A partir de la línea celular H1975, se realizó un procedimiento para la generación de clones de sobreexpresión con lentivirus que contenían el ADNc de CDS1, y silenciamiento de la enzima CDS1 con lentivirus con ARN de horquilla corta (short hairpin, sh) para interferir el ARNm de CDS1. De igual manera, también se generaron clones de H1975 que se infectaron con un lentivirus que contenía ARNsh aleatorios, para servir como controles de infección. En la Tabla 1 se muestra el resumen de los clones generados a partir de cada línea celular utilizada.

**Tabla 1.** Clones generados de las líneas utilizadas en el estudio.

Línea parental	Clon generado	Transformación
H1975	1975 sh-CTRL CDS1	Control de infección (sh scrambled)
H1975	1975 sh2-CDS1	Silenciamiento CDS1
H1975 AZDR	1975 AZDR CDS1	Sobreexpresión CDS1

Los clones fueron cultivados utilizando los mismos medios que para la líneas parentales, con la adición de un 2,5 µg/ml de puromicina Gibco™ y en las mismas condiciones de temperatura, humedad y concentración de CO<sub>2</sub>.

##### 3.1.1 Tratamiento con Plasmocin™

Con la descongelación de los clones y tras hacer una PCR de estudio, se confirmó la presencia de contaminación de las células con micoplasma. A consecuencia, se empezó a realizar el tratamiento con 25 µg/mL de Plasmocin™ (InvivoGen) durante 15 días. Tras este tiempo, se recogieron muestras de 1 ml de medio para realizar de nuevo un ensayo de PCR y así confirmar la ausencia de contaminación.

### 3.2. Ensayos de sensibilidad a osimertinib a corto y largo plazo. Curvas de citotoxicidad

Para poder cuantificar el efecto citotóxico del ITQ osimertinib sobre las líneas celulares utilizadas, se realizaron ensayos de viabilidad celular con sulforrodamina B (Vichai & Kirtikara, 2006) a corto y a largo plazo.

Con respecto al ensayo de sensibilidad a corto plazo, las líneas celulares parentales, H1975 y H1975 AZDR, y los clones 1975 sh-CTRL CDS1, 1975 sh2-CDS1 y 1975 AZDR CDS1 fueron sembrados en placas de 96 pocillos, realizando 3 experimentos independientes con cada una de las líneas. Estas células fueron cultivadas a razón de 2500 células por pocillo para las líneas parentales, 2500 células por pocillo para 1975 sh-CTRL CDS1, 5000 células/pocillo para 1975 sh2-CDS1 y 3000 células/pocillo en el caso de 1975 AZDR CDS1, considerando el ritmo de crecimiento particular de cada línea. Tras 24 horas de cultivo, el medio fue renovado y se realizó una dilución seriada de factor 3 partiendo de una concentración de 10 mM del fármaco osimertinib, que fue preparado previamente en dimetilsulfóxido (DMSO). Después de 72 horas, las células fueron fijadas con 50  $\mu$ l de paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se eliminó el PFA y se realizaron 5 lavados con agua. Se secaron las células y a continuación, se tiñeron con 100  $\mu$ l de sulforrodamina B al 0,4%, incubándolas durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se realizaron 5 lavados con ácido acético glacial al 1% y se dejaron secar. La solubilización se llevó a cabo con 200  $\mu$ l de trizma® (TRIS base) a 10 mM y la absorbancia fue cuantificada a  $\lambda = 570$  nm y  $\lambda = 620$  nm con un espectrofotómetro Multiskan Spectrum (Thermo Scientific). El valor final de la absorbancia se obtuvo como  $Abs_{muestra} = Abs_{570} - Abs_{620}$ , y la viabilidad celular se calculó como el porcentaje (%) de células con respecto al control, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad} = 100 \times \% \text{ viabilidad} = 100 \times \frac{Abs_{muestra}}{Abs_{control}}$$

Por otro lado, para el ensayo de sensibilidad a largo plazo, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos, realizando de nuevo 3 experimentos independientes para cada línea utilizada. En esta ocasión, las células se sembraron a razón de 1500 células por pocillo para las líneas parentales, 1975 sh-CTRL CDS1 y 1975 AZDR CDS1 y 3000 células/pocillo para 1975 sh2-CDS1. Tras 24 horas, el medio se renovó y se añadieron concentraciones de osimertinib a 50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM y 1  $\mu$ M, dejando uno de los pocillos como control. El medio fue renovado cada 3 días y tras 7-10 días de incubación, atendiendo a la confluencia de cada tipo celular, las células fueron fijadas siguiendo el mismo protocolo detallado anteriormente, en este caso con 2 ml de PFA al 4%. Posteriormente se tiñeron con 2 ml de sulforrodamina B al 0,4%, y finalmente las células se solubilizaron con 1 ml de trizma® (TRIS base). La medida de absorbancia y el cálculo de la viabilidad celular se realizó siguiendo las mismas directrices que las especificadas para el ensayo a corto plazo.

### 3.3. Extracción de ARN y reacción de retrotranscripción

Para cada uno de los tipos celulares se cultivaron  $5 \times 10^4$  células en placas Petri de 35 mm y se mantuvieron en las condiciones de cultivo anteriormente especificadas hasta obtener células confluentes. En ese momento, las placas se colocaron en hielo y las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X frío. Seguidamente, se añadieron 350  $\mu$ l de tampón de lisis (conteniendo 20

µl/ml de β-mercaptoetanol) para recoger las células y traspasarlas a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Estas muestras fueron congeladas a -80°C hasta proceder con la extracción.

Para llevar a cabo la extracción de ARN de la células, se utilizó el E.Z.N.A Total RNA Kit I de Omega Bio-tek (Norcross, Georgia). De esta forma, se descongelaron las muestras y haciendo uso de jeringas, se hizo pasar el contenido de los Eppendorf varias veces a través de éstas a modo de lisis. Posteriormente se adicionaron 350 µl de etanol al 70% a las muestras y se vortearon. Seguidamente, se trasvasaron 700 µl a las columnas para proceder con la extracción siguiendo el protocolo establecido por el kit especificado. Finalmente, se eluyó el ARN retenido en la columna haciendo uso de 50 µl de agua libre de RNAsas. La concentración de ARN obtenido fue cuantificada en NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer de Thermo Scientific (Massachusetts, USA).

La reacción de retrotranscripción (RT) de ARN a ADNc se realizó haciendo uso del PrimeScrip™ RT Reagent Kit de Takara Bio Inc. (Nojihigashi, Japón) y se siguieron los pasos de acuerdo con el protocolo proporcionado por la casa comercial. Para llevar a cabo esta reacción se necesitaron 500 ng de ARN total de cada una de las muestras, con un volumen final de reacción de 10 µl. Finalmente, la reacción de PCR se realizó en el equipo Veriti 96-Well Thermal Cycler de Applied Biosystems (California, USA) en condiciones de 37°C durante 15 minutos y 85°C durante 5 segundos.

### 3.4. Ensayo de expresión génica mediante PCR cuantitativa

El ensayo de expresión génica mediante qPCR se realizó haciendo uso del kit TB Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH plus) de Takara Bio Inc. (Nojihigashi, Japón). Este kit contiene la DNA Master Mix (2X) compuesta por dNTPs, RNaseH, SYBR Green y la enzima Taq polimerasa. Los primers que se utilizaron fueron obtenidos de Metabion International AG, se diseñaron con la herramienta Primer Blast y fueron usados a una concentración final de 10 µM. Se utilizó una placa de 96 pocillos, cada uno de ellos conteniendo 10 µl de volumen final, con 2 µl del ADNc obtenido tras la RT (diluido 10 veces) y 8 µl de un MIX constituido por ROX dye II (50X), forward primer (0,3 µM), reverse primer (0,3 µM) y la DNA Master SYBR Premix Ex Taq Takara (2X). Una vez preparada la placa, esta fue llevada al termociclador ViiA™ 7 Real-Time PCR System de Applied Biosystems (California, USA) donde se produjo la reacción de qPCR. Las condiciones de esta reacción consistieron en un calentamiento de 2 minutos a 50°C, una desnaturalización de 1 minuto a 95°C y una amplificación de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 35 segundos a 60°C.

Se realizaron 2 réplicas diferentes por placa. Además, se incluyó un control negativo con agua para poder comprobar la ausencia de contaminaciones. En total se analizaron 24 genes, los cuales quedan representados en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Genes analizados utilizados en el ensayo de expresión por qPCR.

Gen	Descripción
RPLP0	Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0
ACTB	Beta actina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
CDS1	CDP-Diacilglicerol sintasa 1
CDH1	Cadherina 1

CDH2	Cadherina 2
VIM	Vimentina
ZEB1	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
ZEB2	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2
FOXA1	Forkhead Box A1
GRLH2	Grainyhead like transcription factor 2
NNMT	Nicotinamida N-metiltransferasa
FADS3	Fatty Acid Desaturase 3
SCD	Stearoyl-CoA Desaturase
SCD5	Stearoyl-CoA Desaturase 5
CD36	CD36 Molecule
FASN	Fatty acid synthase
DGAT1	Diacylglycerol O-Acyltransferase 1
DGAT2	Diacylglycerol O-Acyltransferase 2
LPIN1	Lipin 1
TAMM41	Mitochondrial Translocator Assembly and Maintenance Homolog
CDS2	CDP-Diacilglicerol sintasa 2
CPT1A	Carnitina palmitoiltransferasa 1A
CPT1B	carnitina palmitoiltransferasa 1B

### 3.5. Extracción de ADN genómico

Para el aislamiento de ADN genómico (ADNg), se recuperaron  $2 \times 10^6$  células de cada uno de los tipos celulares utilizados. Estas células fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min y posteriormente resuspendidas y lavadas en 1 ml de PBS. Después, fueron trasvasadas a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y centrifugadas de nuevo en las mismas condiciones. Finalmente, se aspiró el sobrenadante dejando el pellet generado totalmente seco. Puesto que la extracción no se realizó el mismo día, las muestras se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su mantenimiento.

Para proceder con la extracción de ADNg, se utilizó el kit QIAamp DNA Minikit (Qiagen). Los pellets generados fueron recuperados y resuspendidos en 200  $\mu\text{l}$  de PBS. Posteriormente, se adicionaron 20  $\mu\text{l}$  de Proteinasa K, seguido de 4  $\mu\text{l}$  de RNAsa a un concentración de 10 mg/ml. Después, fueron añadidos 200  $\mu\text{l}$  del tampón AL proporcionado y las muestras fueron vorteadas durante 15 segundos. Seguidamente, se incubaron a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Tras la incubación, a las muestras se les adicionó 200  $\mu\text{l}$  de etanol al 100% y fueron vorteadas de nuevo durante 15 segundos. El contenido fue después traspasado a las columnas y centrifugado durante 1 minuto a 8000rpm. Posteriormente, se añadieron 500  $\mu\text{l}$  del tampón AW1, se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones, se añadieron 500  $\mu\text{l}$  del tampón AW2 y se centrifugaron a máxima velocidad durante 4 minutos. El filtrado fue descartado y se realizó una nueva centrifugación de secado a máxima velocidad durante 1 minuto. Finalmente, se realizó la elución del contenido de la columna con la adición de 47  $\mu\text{l}$  de tampón AE. Tras incubar durante 1 minuto con este tampón, se llevó a cabo una última centrifugación a 8000rpm durante 1 minuto. Las muestras fueron cuantificadas en NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer de Thermo Scientific (Massachusetts, USA).



### 3.5.1 Análisis STR

Con el propósito de conocer la “huella genética” de cada línea celular utilizada en el estudio, se utilizó el ADNg extraído de cada una de ellas para llevar a cabo un análisis de los perfiles STR del ADN genómico de las mismas. Para ello, se utilizó el kit AmpFLSTR™ Identifiler™ Plus PCR Amplification (Thermo Scientific). Los resultados de este ensayo pueden encontrarse en el Anexo (Tabla S1).

### 3.6. Extracción, cuantificación y detección de proteínas

Para la extracción de proteínas las células se cultivaron en una placa Petri de 60 mm y se mantuvieron en las condiciones de cultivo anteriormente especificadas hasta obtener células confluentes. En ese momento, las placas se colocaron sobre el hielo, el medio fue aspirado y se añadieron 5 ml de PBS 1X frío dos veces para lavar. Una vez retirados los restos de PBS, se pusieron 150 µl de buffer de lisis (CellLytic™ M, Sigma), con inhibidor de proteasas (Halt™ protease & phosphatase single-use inhibitor cocktail 100X, ThermoScientific). Las placas se rascaron y el contenido se pasó a tubos Eppendorf de 1,5 ml que fueron posteriormente sonicados. Tras la sonicación, las muestras fueron centrifugadas a máxima velocidad durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, los sobrenadantes fueron recogidos, traspasados a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml y almacenados a -80°C.

Para la cuantificación de las proteínas extraídas se preparó una curva por duplicado de la proteína BSA realizando 10 diluciones de la misma desde 0 mg/ml a 2 mg/ml en PBS. Para las muestras, se realizó una dilución 1:3 de cada una en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se prepararon por triplicado. En una placa de 96 pocillos se repartieron 200 µl del reactivo Bradford a cada uno, añadiendo 5 µl de cada dilución de BSA o de muestra a los correspondientes pocillos. El reactivo Bradford se preparó diluyendo una parte del reactivo Bradford concentrado (Protein assay dye reagent concentrate, Bio-Rad) en 4 partes de agua destilada. La placa fue incubada a temperatura ambiente entre 30 y 40 minutos en oscuridad y tras este tiempo, se midió la absorbancia a  $\lambda = 595\text{nm}$  en el lector de placas Multiskan Spectrum (Thermo Scientific).

Posteriormente, se llevó a cabo la electroforesis (SDS-PAGE) de las muestras, separándolas en función de su peso molecular. De acuerdo con los resultados de las absorbancias obtenidos tras la cuantificación por el método de Bradford, se prepararon diluciones para cada muestra con 40 µg de proteína en “Protein Loading Buffer”, PLB 5X y tampón de lisis. Una vez preparadas las muestras, estas se calentaron durante 5 minutos a 95°C. Para llevar a cabo la electroforesis se utilizaron geles en gradiente del 4 al 20% de poliacrilamida Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels (Bio-Rad). Una vez ensamblada la cubeta de electroforesis, se colocó el gel y se rellenó con un tampón Tris-Glicina-SDS (TGS) 1X. Posteriormente, se cargaron 40 µl de las muestras y 4 µl del marcador en el gel. Este se dejó correr a 100V durante 5 minutos y a 150V a continuación. Una vez corrido el gel, este fue observado con el transiluminador para ser activado y así comprobar la cantidad de proteína presente en el mismo.

La transferencia se realizó utilizando el dispositivo de transferencia semiseca Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad) siguiendo el protocolo Mixed Mw 7min 1.3A 25V para uno de los experimentos y el protocolo Turbo de 3 min para otro de los experimentos realizados. Para hacer la transferencia se utilizó el Trans-Blot Turbo Mini 0.2 µm PVDF Transfer Pack (Bio-Rad). Al terminar, la membrana fue llevada al transiluminador para activarla y comprobar la transferencia de las proteínas desde el gel. Seguidamente y de forma previa a la incubación con el anticuerpo

primario, se realizó un bloqueo de la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente, utilizando como solución de bloqueo leche al 5%. Se realizaron diluciones de los anticuerpos primarios utilizados en solución de bloqueo, tal como se indica en la tabla 3, utilizando acidasa en una dilución 1/1000 para la futura reutilización de los anticuerpos preparados. Tras retirar la solución de bloqueo, se añadieron los anticuerpos primarios diluidos en leche y se realizó una incubación durante toda la noche a 4°C en agitación. Tras esta incubación, se llevaron a cabo 3 lavados de 5 minutos en agitación con tampón salino de Tris con el detergente Tween-20 (TBS-T) a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario preparado (Tabla 4), también con acidasa en dilución 1/1000. Esta incubación se mantuvo durante 1 hora en agitación y temperatura ambiente, y posteriormente se procedió a realizar de nuevo los lavados correspondientes.

**Tabla 3.** Anticuerpos primarios utilizados para el ensayo de expresión de proteínas mediante ensayo Western.

Anticuerpo Primario	PM (kDa)	Dilución	Casa comercial
E – Cadherin (CDH1) rabbit mAb	135	1/1000	Cell Signalling Technology
N – Cadherin (CDH2) rabbit mAb	140	1/1000	Cell Signalling Technology
FADS3 Rabbit polyclonal antibody	51	1/1000	Proteintech
CDS1 polyclonal antibody rabbit	53	1/500	GeneTex
$\beta$ – Actin Rabbit mAb	45	1/1000	Cell Signalling Technology

**Tabla 4.** Anticuerpos secundarios utilizados para el análisis de expresión de proteínas mediante ensayo Western

Anticuerpo Secundario	Dilución	Casa comercial
Anti – rabbit IgG HRP – linked antibody	1/10000	Cell Signalling Technology

Para llevar a cabo el revelado de la membrana se utilizó el reactivo de revelado Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate. Se depositó 1 ml de este reactivo encima de la membrana y se mantuvo entre 4-5 minutos hasta finalmente revelar en el transiluminador.

Una vez realizada la detección de las proteínas de interés, se procedió a realizar un *stripping* utilizando un tampón de deshibridación o stripping para así eliminar los anticuerpos primarios y secundarios previamente utilizados y poder reutilizar la membrana para la detección de  $\beta$  – Actina (ACTB). De esta forma, la membrana fue incubada durante 1 minuto con este tampón a temperatura ambiente, seguido de 3 minutos en agitación. Posteriormente, se realizaron 3 lavados en TBS-T de 3 minutos. Una vez terminado el procedimiento de deshibridación, se bloqueó de nuevo la membrana y se incubó toda la noche a 4°C en agitación con el anticuerpo primario para la detección de ACTB. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos en TBS-T para eliminar el anticuerpo primario restante, y se realizó la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 hora en agitación y temperatura ambiente. Finalmente, tras realizar los

lavados correspondientes en TBS-T para eliminar restos de anticuerpo secundario, se llevó a cabo el revelado utilizando el reactivo de Femto especificado anteriormente, que se mantuvo sobre la membrana durante 5 minutos y fue seguidamente revelada en el transiluminador.

### **3.7. Ensayo de migración**

Para llevar a cabo el estudio de la capacidad de migración celular se sembraron las células en placas de 6 pocillos. En el caso de las líneas parentales la línea sensible H1975 se sembró a razón de  $5 \times 10^5$  células/pocillo mientras que la línea resistente H1975 AZDR se sembró a razón de  $3 \times 10^5$  células/pocillo. Para los clones únicamente se utilizaron el control de infección 1975 sh-CTRL, del cual se sembraron  $5 \times 10^4$  células/pocillo, y el clon de silenciamiento de CDS1, 1975 sh2-CDS1 del que se sembraron  $6 \times 10^5$  células/pocillo. Las células fueron incubadas hasta alcanzar altas confluencias y tras retirar el medio, se realizaron 2 heridas en cada uno de los pocillos, haciendo uso de puntas estériles de 10  $\mu$ l. Seguidamente, para eliminar restos de células despegadas, se limpiaron los pocillos con PBS 1X y posteriormente el medio fue renovado.

Se tomaron fotos de las heridas a tiempo 0 en el momento en que estas fueron realizadas y las células se dejaron en cultivo durante 24 horas, tras lo cual, se volvieron a tomar fotos de las mismas para anotar cambios.

### **3.8. Análisis lipidómico**

Para realizar el análisis lipidómico, inicialmente se sembraron las células en placas de 6 pocillos y una vez los pocillos se encontraron a una confluencia del 80%, se retiró el medio y se lavaron con PBS 1X frío. Tras el lavado, las placas se colocaron en hielo y se rascaron las células de los pocillos tras añadir 400  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O MilliQ fría, recogiendo las células en un Eppendorf de 1,5 ml. Posteriormente se añadieron 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O MilliQ fría más para terminar de recoger todas las células y se depositaron de nuevo en el Eppendorf. Las muestras fueron guardadas a -80°C hasta su procesado.

Las muestras generadas se descongelaron y se recogieron alícuotas de 200  $\mu$ l a las que se adicionó 800  $\mu$ l de isopropanol (IPA), se vortearon y se mantuvieron a -20°C durante 20 minutos. Posteriormente, éstas fueron centrifugadas a 15000g a 4°C durante 15 minutos y se trasvasaron 800  $\mu$ l del sobrenadante obtenido a un nuevo Eppendorf de 1,5 ml. Seguidamente las muestras se concentraron a sequedad haciendo uso del concentrador Savant Speed Vac SPD121P de Thermo Scientific (Massachusetts, USA). Tras este paso, las muestras se resuspendieron en 100  $\mu$ l de IPA: acetonitrilo (ACN): H<sub>2</sub>O, en proporción 2:1:1, con el estándar interno (IS) a una concentración de 5  $\mu$ g/ml. El IS utilizado constaba de LysoPC (17:0), PC (17:0/17:0), PG (17:0/17:0), Cer (17:0/17:0), TG (17:0/17:0/17:0), CE (17:0), FA (17:0), PS (17:0/17:0) y SM (d18:1/17:0). De la resuspensión, 90  $\mu$ l fueron trasvasados a viales para el análisis, utilizando además 5  $\mu$ l de cada muestra para preparar un control de calidad (QC) en otro vial. Finalmente se procedió a analizar las muestras por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-EM) utilizando el equipo Q Exactive UHMR Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific).

Para el análisis por HPLC-EM se utilizó la columna Waters CSH C18. La detección se realizó mediante un análisis en modo de ionización positivo (ESI+) y negativo (ESI-). En el caso del ESI-, se utilizó una fase móvil A constituida por acetato de amonio 10 mM en una proporción 60:40 de ACN: H<sub>2</sub>O, y una fase móvil B constituida por acetato de amonio 10 mM en una

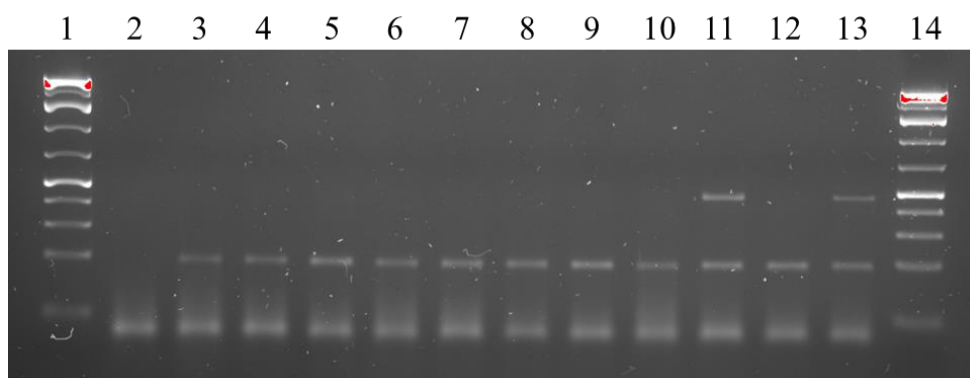
proporción 90:10 de IPA: ACN. Por otro lado, para ESI+ se utilizó una fase móvil A constituida por formiato de amonio 10 mM en una proporción 60:40 de ACN: H<sub>2</sub>O, y una fase móvil B de formiato de amonio 10 mM en una proporción 90:10 de IPA: ACN. Con todo ello, se utilizó un flujo de inyección de 0,4 ml/min, con un volumen de inyección de 5 µl. Se estableció un gradiente de elución de forma que la composición inicial constaba de 20% B, a los 4 minutos un 43% B, 4,1 min 50% B, 14 min 54%, 14,1 min 70% B, 20-24 min 99% B, 24,5-28 min 20% B.

Con respecto a la adquisición de datos se utilizó el método *Full Scan* para las muestras y los métodos *Full Scan*, DIA (adquisición independiente de datos) y DDA (adquisición dependientes de datos) para los QC. Finalmente, para el tratamiento de los datos lipidómicos, estos fueron procesados con un *script* de R creado previamente en el laboratorio por el personal de bioinformática.

## 4. Resultados

### 4.1. Tratamiento con Plasmocin™ para eliminar micoplasma de las líneas celulares afectadas

Debido a la detección por PCR de contaminación por micoplasma en los clones utilizados, se procedió a tratar las células con Plasmocin™ a lo largo de un periodo de 15 días. Una vez transcurrido este tiempo se realizó de nuevo una PCR para comprobar la ausencia de contaminación tras el tratamiento. Tal como se observa en la figura 7, los resultados que se obtuvieron de la PCR llevada a cabo muestran el correcto tratamiento de las células, consiguiendo la eliminación de la contaminación por micoplasma.



**Figura 7.** Gel de agarosa con los resultados de la PCR para la detección de micoplasma tras el tratamiento con Plasmocin™. (1) Marcador, (2) control negativo, (3) 1975 SH-CTRL medio con Plasmocin™, (4) 1975 SH2-CDS1 medio con Plasmocin™, (5) 1975 AZDR CDS1 medio con Plasmocin™, (6) 1975 SH-CTRL medio sin Plasmocin™, (7) 1975 SH2-CDS1 medio sin Plasmocin™, (8) 1975 AZDR CDS1 medio sin Plasmocin™, (9) línea celular negativa para micoplasma HCC827 Chicago, (10) línea celular negativa para micoplasma HCC827 AZDR, (11) 1975 SH-CTRL sin tratar, (12) control interno de amplificación, (13) control positivo y (14) marcador.

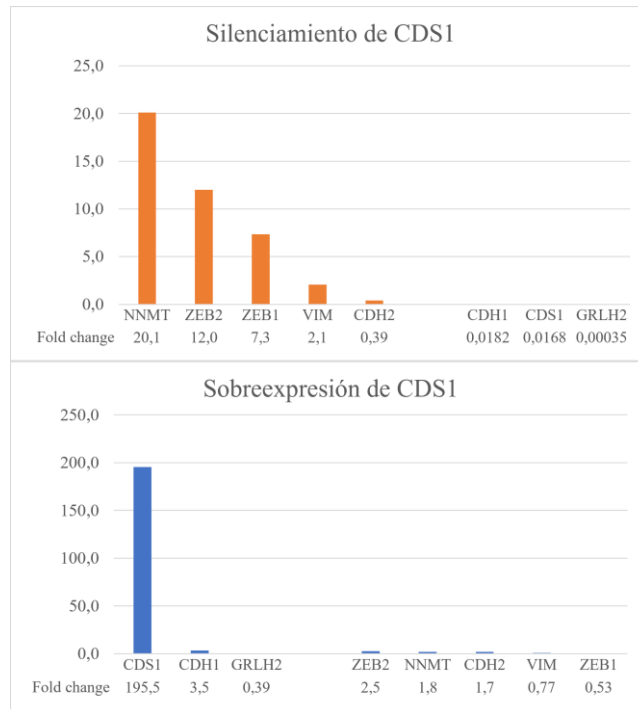
### 4.2. Estudio de los marcadores epiteliales y mesenquimales mediante RT-PCR cuantitativa

A lo largo de este estudio se analizó la expresión de 3 genes epiteliales, cadherina 1 (CDH1), el factor de transcripción GRHL2 y la enzima CDP – diacilglicerol sintasa 1 (CDS1). Adicionalmente, también se estudió la expresión de 5 marcadores mesenquimales que incluyen cadherina 2 (CDH2), la enzima nicotinamida N – metiltransferasa (NNMT), los factores de transcripción de la familia ZEB (ZEB1, ZEB2) y la proteína vimentina (VIM). Para llevar a cabo la normalización de los resultados se utilizó la media geométrica de 3 genes normalizadores  $\beta$  – Actina (ACTB), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la proteína ribosómica ácida 60S P0 (RPLP0). Además, los resultados de expresión de los clones quedan expresados con respecto a la expresión obtenida en las líneas parentales de las que proceden.

En la figura 8 quedan representados los valores de expresión de los diferentes genes analizados. Por un lado, para la inhibición de CDS1, los valores de expresión en la línea celular silenciada se reducen drásticamente. Esta inhibición viene acompañada por una reducción notable

de los genes epiteliales (CDH1 y GRLH2) y un aumento de los mesenquimales, a excepción de CDH2, destacando a la enzima NNMT.

Por otro lado, en el caso de la sobreexpresión de CDS1, podemos confirmar el correcto aumento en la expresión de esta enzima como cabría esperar. Sin embargo, en referencia al resto de marcadores epiteliales, observamos un ligero aumento de CDH1, pero no de GRLH2. Contrariamente, en el caso de los genes mesenquimales, encontramos valores de expresión ligeramente superiores para ZEB2, NNMT y CDH2, pero la expresión que podemos observar es baja en comparación con los niveles de expresión obtenidos en las células con el silenciamiento de CDS1 para estos mismos marcadores.



**Figura 8.** Análisis de la expresión génica de genes epiteliales y mesenquimales para los clones de sobreexpresión e inhibición de la enzima CDP – diacilglicerol sintasa (CDS1) con respecto a las líneas parentales H1975 y H1975 AZDR. Los valores se representan CDH1, cadherina 1; GRLH2, Grainyhead like transcription factor 2; ZEB2, Zinc finger E-box-binding homeobox 2; NNMT, Nicotinamida N-metiltransferasa; CDH2, cadherina 2; VIM, vimentaina; ZEB1, Zinc finger E-box-binding homeobox 1.

Estos datos nos indican que cuando se produce la inhibición del gen epitelial CDS1, al disminuir la expresión de factores epiteliales, se produce un incremento en la expresión de factores mesenquimales, lo cual indicaría una posible activación del programa EMT. Los factores cuya expresión se ha visto incrementada incluyen los factores de la familia ZEB, encargados de reprimir la expresión de la cadherina 1 como inicio de la EMT (Sánchez-Tilló et al., 2011); la enzima NNMT, la cual ha sido relacionada previamente con la progresión del cáncer (Hah et al., 2019) y la vimentina, proteína constitutivamente expresada en células mesenquimales (Kidd et al., 2014). Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en el laboratorio en el que se ha llevado a cabo el presente proyecto, los cuales muestran una disminución de los valores de expresión de CDS1 para los modelos de resistencia a los ITQs vía EMT, indicando que no se trata de un gen mesenquimal. En este sentido, esperaríamos una activación de la EMT en estas células que permita una mayor resistencia ante los ITQs y mayor capacidad migratoria.

Por otra parte, al generar la sobreexpresión de CDS1, no vemos cambios significativos en el fenotipo mesenquimal, puesto que la expresión de los factores epiteliales no aumenta de forma importante, y se mantiene la expresión de algunos de los factores mesenquimales analizados. En esta situación no esperaríamos encontrar cambios importantes en el comportamiento de las células con respecto a su resistencia a osimertinib o su capacidad de migración.

### **4.3. Análisis de expresión de proteínas**

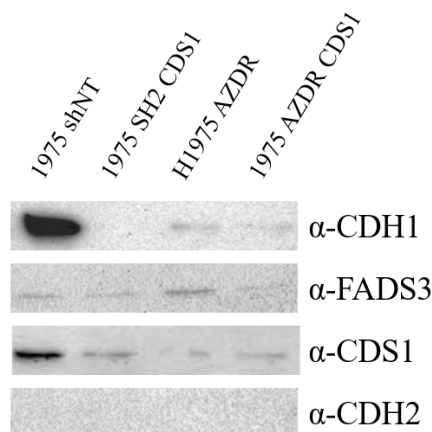
Tras el estudio de la expresión génica se procedió a analizar la expresión proteica con el objetivo de relacionar los niveles de expresión obtenidos para los diferentes genes estudiados con la cantidad de proteína producida entre las diferentes líneas celulares utilizadas. En este sentido, se estudió la expresión de las proteínas epiteliales cadherina 1 (CDH1) y CDP-diacilglicerol sintasa 1 (CDS1), la mesenquimal cadherina 2 (CDH2) y de la desaturasa de ácidos grasos 3 (FADS3). Particularmente, este estudio se realizó sobre la línea parental resistente H1975 AZDR, y los clones de silenciamiento 1975 SH2 CDS1 y de sobreexpresión 1975 AZDR CDS1, utilizando como control de infección en este caso el clon 1975 shNT proporcionado en el laboratorio.

En la figura 9 se pueden observar los resultados obtenidos a partir de los ensayos de expresión de proteínas. Por un lado, se puede comprobar que en el caso de la línea parental resistente y el clon de infección que debe comportarse como la línea parental sensible puesto que no ha sufrido ningún cambio, muestras diferencias claras en la expresión de CDH1, presentando elevados niveles en las células sensibles con características epiteliales y niveles más bajos para las células resistentes con características más mesenquimales. En el caso de los clones, podemos observar cómo la diferencia en la expresión de CDS1 permite observar pequeñas diferencias entre estos, obteniendo niveles superiores de CDH1 con la sobreexpresión de CDS1 con respecto a la inhibición, donde apenas se puede apreciar la presencia de CDH1. Estos resultados coinciden con los niveles de expresión génica obtenidos a partir de los ensayos de qPCR realizados (Figura 8).

Para CDS1 podemos comprobar la diferencia de expresión proteica para esta enzima en el caso de las líneas parentales sensible y resistente, mostrando niveles de expresión mayores para las primeras, apoyando estudios previos de este laboratorio que muestran una regulación a la baja de CDS1 en los modelos de resistencia. No obstante, con respecto a los clones de sobreexpresión y silenciamiento, no es posible observar las diferencias de expresión que se detectaron a nivel génico (Figura 8).

En el caso de la expresión de FADS3 podemos apreciar valores superiores para las células resistentes H1975 AZDR con respecto al resto de líneas. Mientras que observamos una menor expresión para la sobreexpresión de CDS1 con respecto a su parental, los niveles de expresión para el silenciamiento son similares a los observados para su parental sensible correspondiente, 1975 shNT, obteniendo niveles de expresión similares entre los clones de sobreexpresión y silenciamiento. Se trata de una enzima implicada en la producción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), jugando un papel importante en el mantenimiento del balance entre ácidos grasos saturados e insaturados, por lo que podría resultar de interés en el desarrollo de tumores. En este sentido, estos resultados indicarían una mayor producción de PUFAs con la adquisición de un fenotipo más mesenquimal y con ello de resistencias. Esto concordaría con la reducción de expresión de FADS3 en los clones de sobreexpresión, que cuentan con características más epiteliales. No obstante, con la represión de CDS1, generando un fenotipo EMT, no vemos un incremento en la expresión de FADS3 a nivel proteico.

Sin embargo, el ensayo de expresión proteica para la detección de CDH2 requiere ser repetido de nuevo para poder valorarlo correctamente, puesto que con la realización de este estudio no se pudieron detectar niveles de esta proteína. De acuerdo con los valores de expresión génica obtenidos (Figura 8), deberían poder apreciarse diferencias entre los clones de sobreexpresión y silenciamiento, con niveles de expresión superiores para el primero. Además, esperaríamos niveles altos de CDH2 en la línea resistente puesto que consta de un fenotipo más mesenquimal en comparación con la línea sensible, donde sería esperable tener valores bajos para esta. Sin embargo, el proceso de detección de esta enzima resultó fallido, seguramente debido a un fallo en la actuación del anticuerpo primario, por lo que queda pendiente de repetición.



**Figura 9.** Expresión proteica de cadherina 1 (CDH1), desaturasa de ácidos grasos 3 (FADS3), CDP-diacilglicerol sintasa 1 (CDS1) y cadherina 2 (CDH2) en las líneas celulares de CPNM resistente al osimertinib, 1975 AZDR, la línea control de infección 1975 shNT y los clones de silenciamiento, 1975 sh2-CDS1, y sobreexpresión de CDS1, 1975 AZDR CDS1.

Con todo ello y a pesar de los fallos mencionados, sí podemos observar una correlación clara entre los niveles de ARN mensajero y la cantidad de proteína obtenida para CDH1 en las diferentes líneas analizadas. Esto permite mostrar cómo la modulación de CDS1 afecta a los caracteres epiteliales y mesenquimales de las células utilizadas, observando un aumento de la proteína epitelial CDH1 con la sobreexpresión de otra factor epitelial como es CDS1, y una represión de CDH1 con el silenciamiento de la misma.

#### 4.4. Ensayo de citotoxicidad

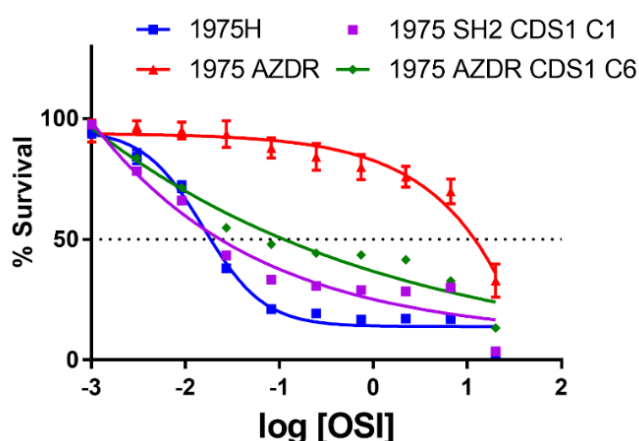
Como se ha indicado anteriormente, a pesar de la efectividad de las terapias con ITQs en pacientes con CPNM, el desarrollo de resistencias hacia estos fármacos constituye una gran barrera a la hora de tratar a estos pacientes. Una de las diversas causas que derivan en la aparición de resistencias es la activación del programa EMT, provocando una represión de los genes epiteliales y una activación de los mesenquimales.

De esta forma, con la utilización de las líneas celulares anteriormente especificadas, se pretende observar cómo el cambio en la expresión de un factor epitelial, en este caso la enzima CDS1, tiene la capacidad de afectar al programa EMT y por lo tanto a la aparición de resistencias o sensibilización frente al osimertinib. Esto se pudo comprobar a través de la elaboración de curvas de citotoxicidad a corto y a largo plazo



#### 4.4.1 Curvas de citotoxicidad a corto plazo

Las curvas de citotoxicidad resultantes de los ensayos de viabilidad celular con osimertinib a corto plazo quedan representadas en la figura 10. Atendiendo a estos resultados, podemos observar la diferente viabilidad entre las líneas parentales, con lo que comprobamos la resistencia adquirida de la línea H1975 AZDR tal como se esperaba. Con respecto a los clones generados, vemos que al sobreexpresar el marcador epitelial CDS1, la viabilidad celular se ve reducida con respecto a la línea parental resistente H1975 AZDR, pudiendo observar un desplazamiento de la curva hacia la izquierda que indica un aumento en la sensibilidad hacia el osimertinib. Por otro lado, con el silenciamiento de este factor epitelial, la viabilidad celular no se ve incrementada de forma significativa con respecto a la línea parental sensible H1975, teniendo en ambos casos un IC50 similar.



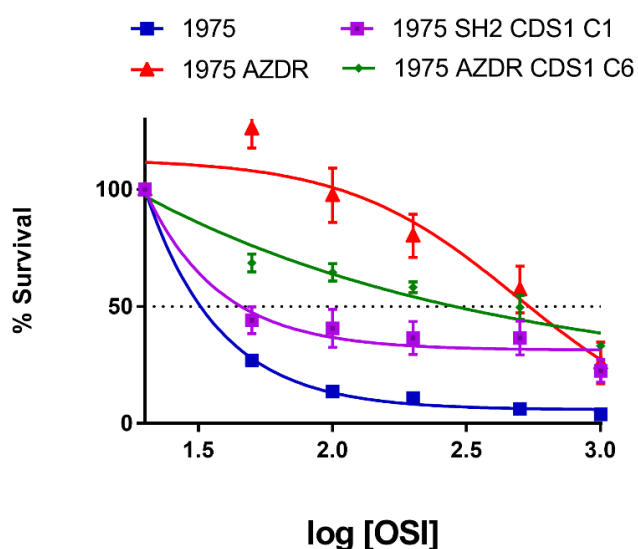
**Figura 10.** Efecto del osimertinib sobre la viabilidad celular a corto plazo de las líneas parentales, sensibles, H1975, y resistentes, H1975 AZDR, y de los clones de sobreexpresión, y silenciamiento de CDS1, 1975 AZDR CDS1 y 1975 SH2 CDS1, respectivamente. Los resultados representan la media obtenida de los 3 experimentos independientes realizados. Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos y la viabilidad celular se determinó mediante el método de la sulforrodamina B tras la incubación durante 72 horas con osimertinib (OSI). La viabilidad se muestra en % de células con respecto al control.

Con todo ello, podemos comprobar que al reprimir la expresión de la enzima CDS1, originando por lo tanto un fenotipo menos epitelial, no se consigue generar una mayor resistencia ante el ITQ osimertinib. Esto podría ser debido a una mala activación del programa EMT, sin embargo, los resultados del estudio de marcadores epiteliales y mesenquimales indican una buena activación de este, aumentando los niveles de expresión de genes mesenquimales e inhibiendo los epiteliales (Figura 8). No obstante, es importante destacar que, entre los genes mesenquimales analizados, la expresión de CDH2 resultó baja en comparación con el resto de ellos. Puesto que CDH2 cuenta con una importante implicación en la EMT, siendo el aumento en la expresión de esta uno de los principales pasos en este programa (Cao et al., 2019), esto podría afectar a la completa activación del mismo y por lo tanto, al desarrollo de resistencias. Por otro lado, vemos que, con el aumento de la expresión de esta enzima, generando en este caso un fenotipo más epitelial, no se consigue revertir completamente la resistencia hacia el fármaco. A pesar de que la viabilidad celular se ve reducida, no se observan los mismos valores que para la línea sensible de

referencia, H1975, indicando que esta sobreexpresión no permite restablecer el fenotipo EMT, pese al incremento en la expresión de este factor epitelial.

#### 4.4.2 Curvas de citotoxicidad a largo plazo

Con respecto al efecto que desencadena la exposición de osimertinib a largo plazo, los resultados se pueden observar en la figura 11. De este modo, podemos ver de nuevo la diferencia entre la viabilidad celular para las dos líneas parentales, corroborando la resistencia adquirida a largo plazo. En referencia a los clones, vemos que con una incubación más prolongada con osimertinib, para la sobreexpresión de CDS1 se observa un pequeño desplazamiento de la curva hacia la izquierda con respecto a su parental, con muy poca diferencia entre los IC50 de ambas. Mientras que para el silenciamiento de CDS1, se muestra un pequeño cambio de la curva a la derecha, resultando en un IC50 mayor al de su parental correspondiente.



**Figura 11.** Efecto del osimertinib sobre la viabilidad celular a largo plazo de las líneas parentales, sensibles, H1975, y resistentes, H1975 AZDR, como de los clones de sobreexpresión, y silenciamiento de CDS1, 1975 AZDR CDS1 y 1975 SH2 CDS1, respectivamente. Los resultados representan la media obtenida de los 3 experimentos independientes realizados. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y la viabilidad celular se determinó mediante el método de la sulforrodamina B. Tras 24 horas se cambió el medio añadiendo diferentes concentraciones de osimertinib (OSI), renovándolo cada 72 horas durante 10 días aproximadamente, atendiendo a la confluencia. La viabilidad se muestra en % de células con respecto al control.

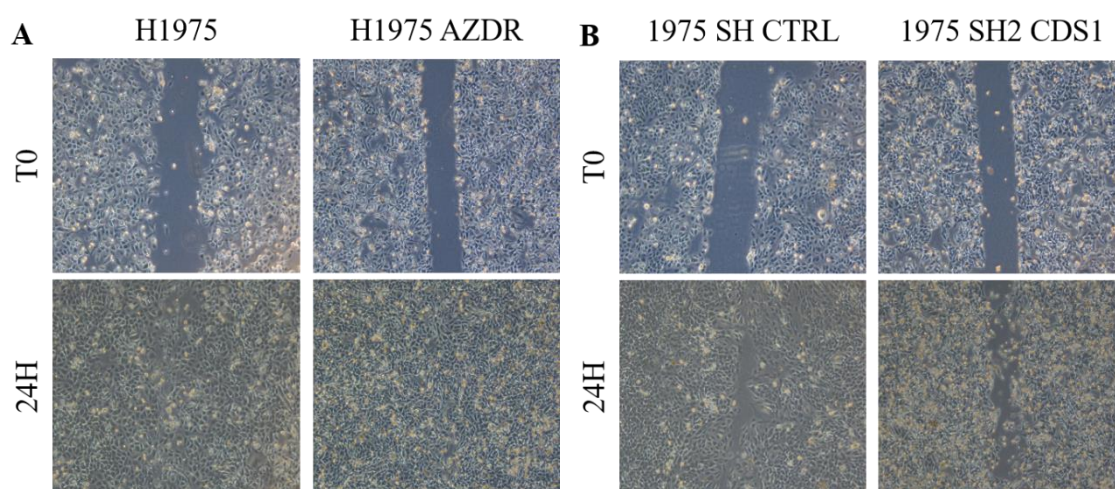
Con todo esto vemos que, a diferencia de los ensayos llevados a cabo a corto plazo, con la incubación de las células en presencia de osimertinib durante un periodo de tiempo superior, la sobreexpresión del marcador epitelial CDS1 no permite producir una resensibilización de las células resistentes, obteniendo una viabilidad celular mayor que en el ensayo a las 72 horas. Esto correlaciona con los resultados de expresión génica obtenidos, puesto que no se observaron cambios significativos en la expresión de los marcadores epiteliales y mesenquimales analizados (Figura 8). Por otra parte, en el caso del silenciamiento de CDS1, a pesar de poder observar una cierta mayor resistencia hacia el fármaco, en comparación con los resultados obtenidos a corto plazo, la viabilidad celular se mantiene similar a la correspondiente con la línea parental sensible H1975. De esta forma, podemos comprobar que el aumento en la expresión del gen epitelial CDS1 no consigue reestablecer el fenotipo EMT a largo plazo, lo cual lleva al mantenimiento de la

resistencia frente al osimertinib, y en el caso de la inhibición de la expresión de CDS1, esta represión tampoco permite inducir de forma aparente ninguna activación del programa EMT que lleve a la adquisición de resistencias hacia este fármaco.

#### 4.5. Ensayos de migración celular

Dado que la activación del programa EMT ha sido relacionada con el potenciamiento de la movilidad celular, la progresión y la diseminación, se quiso estudiar si la modulación de la expresión de la enzima CDS1 puede afectar a la capacidad de migración de las células. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de *wound healing* o cierre de herida. Para la realización de estos ensayos únicamente se utilizaron las dos líneas parentales, H1975 y H1975 AZDR, sensible y resistentes respectivamente y el clon 1975 SH2 CDS1, de silenciamiento de CDS1, junto con el control de infección, 1975 SH CTRL. En este caso, no se utilizó el clon de sobreexpresión 1975 AZDR CDS1, puesto que, de acuerdo con los resultados de expresión génica obtenidos (Figura 8), no se observaron cambios significativos a nivel de factores epiteliales y mesenquimales. De esta forma, en la figura 12 podemos observar los resultados obtenidos para estos ensayos.

Podemos comprobar como para las líneas parentales, tanto las células sensibles como las resistentes tienen una capacidad migratoria similar, consiguiendo cerrar la herida a las 24 horas. Estos no son los resultados que cabría esperar, puesto que las células sensibles al osimertinib cuentan con un fenotipo epitelial, sin propiedades de migración tan aumentadas. Esto puede deberse a la realización de estos ensayos a niveles de confluencia altamente elevados, si las células se encuentran demasiado confluentes en los pocillos, es más difícil apreciar diferencias en la capacidad migratoria de éstas. Sin embargo, sí que se pudieron apreciar diferencias en referencia a los clones. El control de infección muestra una capacidad de migración alta, cerrando la herida casi en su totalidad a las 24 horas, lo cual es consistente con la capacidad migratoria obtenida para la línea parental sensible de la que parte. Por otro lado, en los clones de inhibición de CDS1 podemos observar una capacidad migratoria menor, no consiguiendo cerrar la herida a las 24 horas.



**Figura 12.** Ensayo de migración celular para (A) las líneas parentales H1975 y H1975 AZDR, y (B) los clones control de infección y de silenciamiento de CDS1, 1975 SH CTRL y 1975 SH2 CDS1 respectivamente.

Con todo esto vemos que, a pesar de inhibir la enzima epitelial CDS1, esperando un cambio hacia un fenotipo más mesenquimal al reducir los factores epiteliales y, por lo tanto, mayor capacidad migratoria, los resultados muestran que esta capacidad no parece verse aumentada. Por otra parte, hemos podido detectar fallos a la hora de realizar estos ensayos, ya que, a pesar de que en estudios previos se han podido observar diferencias claras entre las líneas parentales resistentes y sensibles, no se ha podido comprobar en estos ensayos.

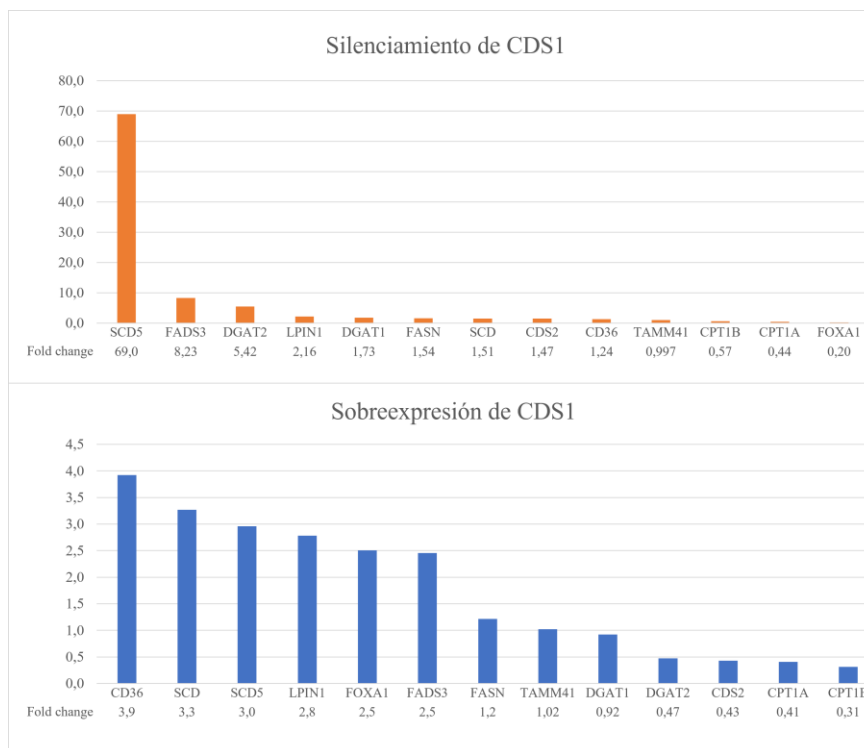
De esta forma creemos que se debería estudiar la capacidad de migración de las líneas celulares de una forma alternativa que no dependa de la confluencia celular inicial con la que se realizan las heridas. En este sentido, como experimentos a realizar en el futuro se ha pensado llevar a cabo un ensayo de *soft agar* para evaluar el crecimiento celular independiente de anclaje, una capacidad celular característica de la carcinogénesis, permitiendo determinar si se han producido transformaciones malignas en las células. Con esta técnica las células son sembradas en una capa de agar mezclado con medio celular que se deposita sobre otra capa de agar y medio de cultivo a mayor concentración, creando un gradiente. En estas condiciones las células no pueden adherirse a la placa. Mientras que las células normales no podrán crecer puesto que dependen del contacto con la matriz extracelular, las células transformadas tendrán la capacidad de crecer, dividirse y formar colonias independientemente del ambiente en el que se encuentren (Borowicz et al., 2014).

#### **4.6. Análisis de expresión de genes metabólicos involucrados en la ruta del ácido fosfatídico en la que participa CDS1**

De forma adicional, también se estudió la expresión de diversos genes involucrados en el metabolismo lipídico. De esta forma, se analizó la expresión génica de las enzimas lipin 1 (LPIN1), ácido graso sintasa (FASN), diacilglicerol aciltransferasa 1 y 2 (DGAT1/2), esteroil-CoA desaturasa 1 y 5 (SCD1/5), desaturasa de ácidos grasos 3 (FADS3), la traslocasa CD36, carnitina palmitoiltransferasa I A y B (CPT1A/B) y de las otras dos isoformas de la enzima CDS1 objeto del estudio, CDS2 y TMM41. Asimismo, se incluyó también el activador de la transcripción FOXA1 para el estudio de la expresión por su implicación en el desarrollo y la progresión tumoral. De nuevo, los genes normalizadores utilizados fueron los mismos que para el análisis de expresión de los marcadores epiteliales y mesenquimales.

En la figura 13, quedan representados los valores de expresión obtenidos para los marcadores metabólicos indicados anteriormente. Como podemos observar, de forma general destaca la diferencia entre los valores de expresión obtenidos para SCD1 y SCD5 en la condición de inhibición, obteniendo niveles mucho mayores de expresión para SCD5 que para SCD1. Sin embargo, encontramos valores similares de expresión entre ambas en el caso de la sobreexpresión de CDS1. Se trata de las dos isoformas humanas de las esteroil-CoA desaturasas, encargadas de la conversión de ácidos grasos saturados a ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), jugando, por tanto, un importante papel en el mantenimiento del ratio entre AG saturados y MUFAs. Mientras que SCD1 ha sido previamente descrita en muchas ocasiones, observando una sobreexpresión de la misma en muchos tipos de cáncer (Scaglia et al., 2009), no existe tanta bibliografía para SCD5, aunque se ha podido ver anteriormente una asociación entre la alteración de la expresión de la misma con el cáncer (Igal & Sinner, 2021). En estudios realizados previamente en el laboratorio del presente proyecto, se pudo observar una sobreexpresión de la enzima SCD5 en modelos de resistencia a ITQs, indicando un posible aumento en la producción de ácidos grasos insaturados. De esta forma, con los resultados obtenidos podemos comprobar

que al reprimir la expresión de CDS1 en células sensibles, se consigue una importante sobreexpresión de SCD5 de forma similar a lo que ocurre en los modelos de resistencia, lo cual podría respaldar el papel en la CDS1 en la activación del programa EMT. Sin embargo, basándonos en los resultados obtenidos de los ensayos de citotoxicidad (Figuras 10,11) este suceso no correlaciona con la resistencia al osimertinib. Sin embargo, para SCD1 con la inhibición de CDS1 no vemos cambios en la expresión de éste, mientras que sí que observamos una sobreexpresión del mismo al sobreexpresar CDS1.



**Figura 13.** Análisis de la expresión génica de genes metabólicos involucrados en el metabolismo de los lípidos para los clones de sobreexpresión e inhibición de la enzima CDP – diacilglicerol sintasa (CDS1) con respecto a las líneas parentales H1975 y H1975 AZDR. CD36, ácido graso traslocasa CD36; SCD, Estearoil-CoA Desaturasa 1; SCD5, Estearoil-CoA Desaturasa 5; LPIN1, lipin 1; FOXA1, Forkhead Box A1; FADS3, Desaturasa de ácidos grasos 3; FASN, ácido graso sintasa; TMM41, Mitochondrial translocator assembly and maintenance homolog; DGAT1, diacilglicerol O-aciltransferasa 1; DGAT2, diacilglicerol O-aciltransferasa 2; CDS2, CDP-diacilglicerol sintasa 2; CPT1A, Carnitina palmitoiltransferasa I A; CPT1B, Carnitina palmitoiltransferasa I B.

Con respecto a las enzimas de la familia DGAT, vemos que su expresión se encuentra reducida en el caso de la sobreexpresión, teniendo DGAT1 valores más elevados que DGAT2. No obstante, con la inhibición de CDS1, destaca la diferencia de expresión entre ambas isoformas, teniendo en este caso DGAT2 unos niveles de expresión mayores. Esto puede deberse a las diferencias en la actuación de ambas isoformas, mientras que la actividad de DGAT2 parece estar especializada en la incorporación del glicerol 3 – fosfato procedente de la glucólisis, para generar triacilglicérols que se almacenan formando gotas lipídicas, DGAT1 incorpora ácidos grasos exógenos a los triacilglicérols (Bhatt-Wessel et al., 2018). De esta forma, al inhibir la actividad de CDS1, en la ruta del PA, puesto que este puede ser usado por CDS1 para obtener CDP-DAG o por LPIN1 para la obtención de DAGs, al suprimir la primera ruta, este se utilizará mayoritariamente para la producción de DAGs y posteriormente, gracias a la acción

principalmente mediada por DGAT2, a la producción de TAGs. Contrariamente, al sobreexpresar CDS1, la actividad de esta enzima tendería a aumentar y, por lo tanto, la acción de las enzimas DGAT podría verse reducida (Figura 6). Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en el laboratorio, donde se pudo comprobar que en los modelos de resistencia de H1975 hacia los ITQs *via* EMT la expresión de DGAT2 se encuentra aumentada, lo cual sugiere que, al aumentar las características mesenquimales, aumenta la síntesis de triglicéridos. A pesar de ello, al estudiar la expresión de LPIN1 vemos que ésta aumenta en ambos casos, tanto en la sobreexpresión como en la inhibición, siendo ligeramente mayor en el primer caso.

En cuanto a la enzima FASN podemos observar un incremento similar de los valores de expresión entre la sobreexpresión y la inhibición de CDS1, con un aumento mayor en la inhibición de CDS1. En este sentido, cambios en la expresión de CDS1 no parecen afectar de forma significativa a la actividad de FASN y por lo tanto en la producción de ácido palmítico y el resto de los ácidos grasos saturados.

En el caso de la expresión de CD36, una glicoproteína que tiene capacidad de unirse a los ácidos grasos facilitando su transporte a las células (Silverstein & Febbraio, 2009), observamos un aumento en los niveles de expresión de la misma para los clones de sobreexpresión, mientras que no existen cambios importantes en la expresión de ésta para el silenciamiento de CDS1. Estos resultados sugieren un incremento en la captación de ácidos grasos exógenos con la sobreexpresión de un factor epitelial, que podría correlacionar con una menor síntesis *de novo*.

En referencia a la enzima FADS3, una desaturasa de ácidos grasos cuya función principal es la generación de ceramidas (Jojima et al., 2020), vemos un aumento importante de la expresión al inhibir CDS1, mientras que este aumento es menor en el caso de la sobreexpresión. Estos resultados correlacionan con los niveles de expresión proteica de FADS3 para la línea parental resistente (Figura 9), indicando la presencia de mayores niveles de esta enzima con la adquisición de un fenotipo más mesenquimal. De esta forma, estos valores indicarían un aumento en la producción de AG poliinsaturados (PUFAs) con la inhibición de CDS1, y por ello, con un fenotipo más mesenquimal, sugiriendo que la producción de PUFAs podría correlacionar con la activación de la EMT.

En relación a CPT1A y CPT1B, su expresión se ve reducida para ambas condiciones, tanto de sobreexpresión como de silenciamiento. Se trata de unas enzimas encargadas del transporte de la carnitina a través de la membrana mitocondrial (Schlaepfer & Joshi, 2020). En el caso de CPT1A, los valores de expresión son muy similares entre ambas condiciones, y para CPT1B, vemos una cierta mayor expresión con la inhibición. Puesto que estas enzimas están relacionadas con el transporte de ácidos grasos hacia la mitocondria para la obtención de energía, una represión de las mismas indicaría una disminución en la  $\beta$ -oxidación, lo cual provocaría una acumulación de ácidos grasos libres que, para evitar la lipotoxicidad, serían convertidos a triglicéridos y almacenados formando gotas lipídicas, aumentando, por lo tanto, la producción de éstas.

Adicionalmente, vemos que la expresión de FOXA1 correlaciona con la de CDS1 puesto que, como podemos observar, esta queda reprimida con la inhibición de CDS1 y aumentada con la sobreexpresión. El factor FOXA1 se ha visto previamente relacionado con la estimulación de la proliferación y la supresión de la apoptosis mediante la regulación de la expresión de AGR2, enzima que se encuentra sobreexpresada en diversos tumores y que está implicada en la proliferación e invasión (Yuan et al., 2020). De nuevo, resultados anteriores obtenidos en el

laboratorio muestras una represión de FOXA1 en los modelos de resistencia caracterizados por un fenotipo más mesenquimal, lo cual coincide con la represión de FOXA1 al inhibir CDS1, reduciendo las características epiteliales, y con el aumento de FOXA1 con la sobreexpresión de CDS1, reduciendo las características mesenquimales.

Para las isoformas de CDS1, la expresión de TMM41 parece no sufrir cambios con respecto a las líneas parentales, tanto en la condición de sobreexpresión como de silenciamiento. Se trata de la isoforma presente en la mitocondria, por lo que cambios en la expresión de CDS1, presente en el ER, no deberían afectar a la actividad de esta. Por otro lado, la expresión de CDS2 se ve ligeramente reducida con la sobreexpresión de CDS1, mientras que ésta aumenta al silenciar CDS1. En este caso, tanto CDS1 como CDS2 se encargan de catalizar la misma reacción en el ER, por lo que el silenciamiento de una de las isoformas podría favorecer la actividad de la otra.

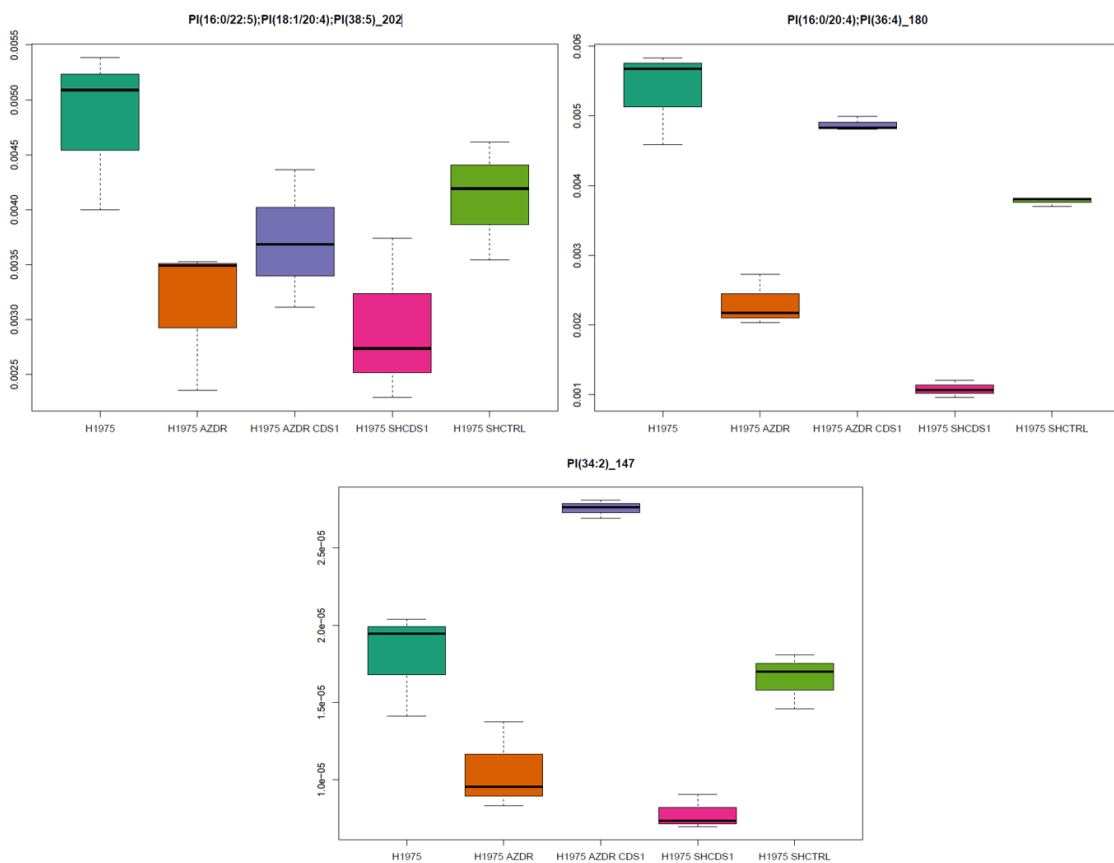
#### **4.7. Estudio lipidómico**

Con el análisis de los perfiles lipidómicos de cada tipo celular, primero que todo podemos observar diferencias entre los perfiles obtenidos para las células sensibles y resistentes al osimertinib. Vemos que los niveles de las diferentes especies de fosfatidilinositol (PI) analizadas quedan reducidos con la adquisición de resistencias (Figura 14), de igual forma que los niveles de diacilglicerol (DG) (Figura 15A), mientras que los niveles de fosfatidilglicerol (PG) parecen incrementarse con respecto a la línea sensible (Figura 15B). Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente en el laboratorio, donde se comprobó la reducción de PI y aumento de PG en los modelos de resistencia, junto con un aumento en los niveles de TAGs que concuerda con la reducción en los niveles de DGs.

Con respecto al silenciamiento de CDS1, tal como observamos en la figura 14, los niveles de las diferentes especies de fosfatidilinositoles analizadas se ven reducidos, lo cual coincide con lo esperado para esta condición, puesto que, al inhibir esta enzima, se reducirá la producción de CDP-DAG y por lo tanto la producción de PI a partir de esta. Adicionalmente, también comprobamos una disminución en los valores de PG (Figura 15B), lo que concuerda con una menor producción de CDP-DAG. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Qi et al. (2016) en los que también se observa una reducción en los niveles de PI y PG con la inhibición de CDS1. Adicionalmente, comprobamos también niveles reducidos de DGs (Figura 15A), lo cual sugiere un incremento en la producción de TAGs y la formación de gotas lipídicas, tal como se observa en el estudio de Qi et al. (2016). Esto coincide con la adquisición de un fenotipo más mesenquimal, puesto que los modelos de resistencia presentan también valores reducidos para los DGs, como se ha indicado anteriormente. Además, podemos comprobar también cómo esto se correlaciona con el aumento de expresión observado por qPCR para las enzimas DGAT1 y 2 (Figura 13), encargadas de la producción de TAGs.

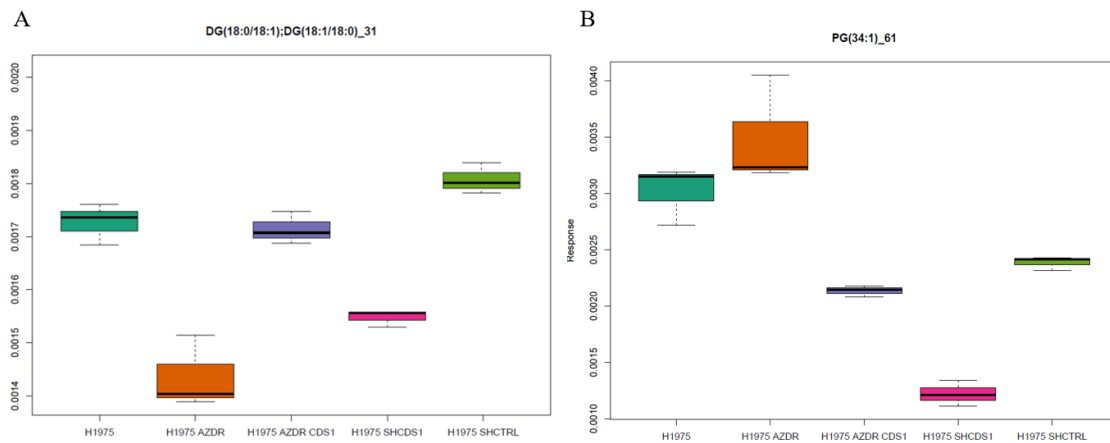
Por otro lado, en el caso de la sobreexpresión de CDS1, podemos observar una mayor producción de algunas de las especies de PI analizadas, siendo este aumento no tan evidente para otras especies (Figura 14). El aumento en PI correspondería con el aumento en los niveles de CDS1 que permitiría una mayor producción de CDP-DAG. Sin embargo, cabe destacar que en estudio previos se pudo observar que la sobreexpresión de CDS1 no resultaba en un aumento claro en los niveles de CDP-DAG o PI, lo cual indicaría que realmente esta enzima no juega un papel crítico en la determinación de los contenidos celulares de fosfatidilinositoles (Lykidis et al., 1997). En referencia a los niveles de PG, estos deberían aumentar con el incremento en la producción de CDP-DAG, sin embargo, los resultados muestran una reducción de los mismos

(Figura 15B). Esto podría estar relacionado con el aumento de PG en los modelos de resistencia a pesar de haber observado una disminución de los niveles de expresión de CDS1, lo cual llevaría a una menor producción de PG. En ese sentido, viendo que PG aumenta con la adquisición de resistencias hacia el osimertinib, es decir, un fenotipo más mesenquimal, tendría sentido observar una reducción de PG al sobreexpresar CDS1, obteniendo por tanto un fenotipo más epitelial y una menor resistencia. Con respecto a los niveles de DG, comprobamos un incremento en los valores de estos (Figura 15A), sugiriendo una reducción en la producción de TAGs. Esto concuerda con los valores altos de DGs observados para las células sensibles, indicando la adquisición de un fenotipo más epitelial con la sobreexpresión de CDS1. Además, esta acumulación de DGs coincide con la reducción en los niveles de expresión de DGAT1 y 2 para los clones de sobreexpresión (Figura 13).



**Figura 14.** Perfil de fosfatidilinositoles (PI) obtenido mediante análisis por HPLC-MS para las células de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) H1975 y H1975 AZDR, sensibles y resistentes a osimertinib respectivamente, y los clones de inhibición y sobreexpresión de CDP-diacilglicerol sintasa 1 (CDS1), H1975 SHCDS1 y H1975 AZDR CDS1 respectivamente, y el clon control de infección, H1975 SHCTRL.





**Figura 15.** Perfil de diacilgliceroles (DG) (A), y fosfatidilglicerol (PG) (B) obtenido mediante análisis por HPLC-MS para las células de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) H1975 y H1975 AZDR, sensibles y resistentes a osimertinib respectivamente, y los clones de inhibición y sobreexpresión de CDP-diacilglicerol sintasa 1 (CDS1), H1975 SHCDS1 y H1975 AZDR CDS1 respectivamente, y el clon control de infección, H1975 SHCTRL.

De esta forma, vemos cómo el fenotipo lipídico, específicamente de fosfolípidos, varía con la modulación de la expresión de CDS1, anotando diferencias a nivel de PI, PG y DG, lo cual sugiere una implicación del metabolismo lipídico en el programa EMT.

## 5. Discusión

A lo largo de este estudio, hemos comprobado cómo la inhibición de CDS1 permite reducir los niveles de PI y PG, probablemente a causa de una reducción de CDP-DAG. Además, se produce una reducción de los niveles de DGs, posiblemente debido a que el PA acumulado es convertido a TAGs, puesto que correlaciona con un aumento en los niveles de expresión de DGAT1 y 2. Para poder confirmar esta hipótesis, esto debería ser comprobado a través del estudio de los niveles de TAGs y la formación de gotas lipídicas. Estas características corresponden con un fenotipo mesenquimal de resistencia a osimertinib, caracterizado por un aumento en los niveles de TAGs y un descenso en los PI, a excepción de los PG, los cuales se encuentran incrementados en los modelos de resistencia, pero descienden con la inhibición de CDS1. Sin embargo, esta reducción de PG ha sido previamente observada en anteriores estudios Qi et al. (2016). Adicionalmente, el silenciamiento de CDS1 a pesar de haber mostrado a nivel de expresión tanto génica como proteica de factores mesenquimales y epiteliales, un cambio hacia un fenotipo de resistencia más mesenquimal, los resultados de citotoxicidad no muestran cambios en la respuesta celular hacia el osimertinib. Además, tampoco se observan diferencias en la capacidad migratoria, puesto que esta no se ve aumentada.

Para la sobreexpresión de CDS1, se observa un aumento en la producción de PI de forma general, lo cual es esperable debido a la mayor producción de CDP-DAG, pero no de PG. Sin embargo, esta reducción en la producción de PG y el aumento de DG correspondería con la adquisición de un fenotipo más epitelial, puesto que las células sensibles presentan niveles altos de PI, y bajos para PG y TAGs, esto último relacionado con una mayor producción de DG, que coincide con la represión a nivel de expresión génica de DGAT1 y 2. Además, a pesar de que el estudio de marcadores epiteliales y mesenquimales no mostrara una importante represión de los segundos, sí se pudo observar cierta resensibilización hacia el osimertinib en los estudios de citotoxicidad.

De esta forma, con este estudio hemos podido comprobar cómo la modulación de la expresión de la enzima CDS1 afecta al fenotipo EMT de las células de manera que la inhibición de esta enzima consigue generar cambios en los factores epiteliales y mesenquimales, dotando a las células de un fenotipo más mesenquimal que, sin embargo, no parece traducirse en una mayor resistencia al osimertinib, tal como ocurre en las líneas parentales. No obstante, los cambios a nivel lipídico sí muestran la adquisición de características propias de células mesenquimales. De la misma forma, la sobreexpresión de CDS1, a pesar de no generar cambios claros en los factores mesenquimales y epiteliales, parece generar una resensibilización parcial al osimertinib, produciendo de igual manera cambios a nivel lipídico que muestran la adquisición de caracteres epiteliales.

## 6. Conclusiones

Este trabajo ha derivado en las siguientes conclusiones:

1. La inhibición del factor epitelial CDS1 en células sensibles a osimertinib parece favorecer la expresión de factores mesenquimales indicando una posible activación de la EMT. Sin embargo, esta no queda reflejada en la resistencia al inhibidor de tirosina quinasa osimertinib.
2. La sobreexpresión de la enzima CDS1 en células resistentes no produce cambios significativos en el fenotipo mesenquimal, aunque se ha podido observar una resensibilización parcial hacia el osimertinib en los ensayos de citotoxicidad.
3. Los ensayos de expresión de proteínas para CDH1 correlacionan con los niveles de expresión génicos, incrementando la expresión de la misma con la sobreexpresión del factor epitelial CDS1 y obteniendo niveles de expresión reducidos para el silenciamiento de CDS1.
4. Los ensayos de migración realizados no han permitido evaluar de forma eficiente la capacidad migratoria de las líneas celulares sensibles y resistentes al osimertinib.
5. El estudio lipidómico muestra la adquisición de características mesenquimales con la inhibición de CDS1, caracterizadas por el descenso en la producción de DG y PI, y la adquisición de características epiteliales con la sobreexpresión de CDS1, caracterizadas por el aumento en la producción de DG y PI de forma general.

## 7. Bibliografía

- ASOCIACIÓN ESPAÑOLA CONTRA EL CÁNCER (AECC). (2010). ¿Qué es el Cáncer? ¿Cómo se Desarrolla? | AECC. Consultado 19 de mayo de 2021. Disponible en: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/que-es-cancer>
- AIELLO, N. M. & KANG, Y. (2019). Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *Journal of Experimental Medicine*, 216(5): 1016–1026.
- ANDERSON, N. M., & SIMON, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current Biology*, 30(16): R921–R925.
- ATHENSTAEDT, K. & DAUM, G. (1999). Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. *European Journal of Biochemistry*, 266: 1–16.
- BAENKE, F.; PECK, B.; MIESS, H. & SCHULZE, A. (2013). Hooked on fat: The role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 6(6): 1353–1363.
- BHATT-WESSEL, B.; JORDAN, T. W.; MILLER, J. H. & PENG, L. (2018). Role of DGAT enzymes in triacylglycerol metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 655: 1–11.
- BLUNSOM, N. J. & COCKCROFT, S. (2020). CDP-Diacylglycerol Synthases (CDS): Gateway to Phosphatidylinositol and Cardiolipin Synthesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8: 63.
- BLUNSOM, N. J.; GOMEZ-ESPINOSA, E.; ASHLIN, T. G. & COCKCROFT, S. (2019). Sustained phospholipase C stimulation of H9c2 cardiomyoblasts by vasopressin induces an increase in CDP-diacylglycerol synthase 1 (CDS1) through protein kinase C and cFos. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(7): 1072–1082.
- BOROWICZ, S.; VAN SCOYK, M.; AVASARALA, S.; KARUPPUSAMY RATHINAM, M. K.; TAULER, J.; BIKKAVILLI, R. K. & WINN, R. A. (2014). The soft agar colony formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 92: e51998.
- CAO, Z. Q.; WANG, Z. & LENG, P. (2019). Aberrant N-cadherin expression in cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 118: 109320.
- D'SOUZA, K.; KIM, Y. J.; BALLA, T. & EPAND, R. M. (2014). Distinct properties of the two isoforms of CDP-diacylglycerol synthase. *Biochemistry*, 53(47): 7358–7367.
- DE GROOT, P. M.; WU, C. C.; CARTER, B. W. & MUNDEN, R. F. (2018). The epidemiology of lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 7(3): 220–233.
- DE MELLO, R. A.; NEVES, N. M.; TADOKORO, H.; AMARAL, G. A.; CASTELO-BRANCO, P. & ZIA, V. A. DE A. (2020). New Target Therapies in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Review of the Literature and Future Perspectives. *Journal of Clinical Medicine*, 9(11): 3543.
- DERYNCK, R. & WEINBERG, R. A. (2019). EMT and Cancer: More Than Meets the Eye. *Developmental Cell*, 49(3): 313–316.

- FUMAROLA, C.; BONELLI, M. A.; PETRONINI, P. G. & ALFIERI, R. R. (2014). Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochemical Pharmacology*, 90(3): 197–207.
- GELATTI, A. C. Z.; DRILON, A. & SANTINI, F. C. (2019). Optimizing the sequencing of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation-positive non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*, 137: 113–122.
- HAH, Y. S.; CHO, H. Y.; JO, S. Y.; PARK, Y. S.; YOON, T. J. & HEO, E. P. (2019). Nicotinamide N-methyltransferase induces the proliferation and invasion of squamous cell carcinoma cells. *Oncology Reports*, 42(5): 1805–1814.
- HAN, G. S. & CARMAN, G. M. (2010). Characterization of the human LPIN1-encoded phosphatidate phosphatase isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 285(19): 14628–14638.
- HANAHAHAN, D. & WEINBERG, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5): 646–674.
- IGAL, R. A. & SINNER, D. I. (2021). Stearoyl-CoA desaturase 5 (SCD5), a  $\Delta$ -9 fatty acyl desaturase in search of a function. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1866(1): 158840.
- JACOBSEN, M. M.; SILVERSTEIN, S. C.; QUINN, M.; WATERSTON, L. B.; THOMAS, C. A.; BENNEYAN, J. C. & HAN, P. K. J. (2017). Timeliness of access to lung cancer diagnosis and treatment: A scoping literature review. *Lung Cancer*, 112: 156–164.
- JOJIMA, K.; EDAGAWA, M.; SAWAI, M.; OHNO, Y. & KIHARA, A. (2020). Biosynthesis of the anti-lipid-microdomain sphingoid base 4,14-sphingadiene by the ceramide desaturase FADS3. *FASEB Journal*, 34(2): 3318–3335.
- KIDD, M. E.; SHUMAKER, D. K. & RIDGE, K. M. (2014). The role of Vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 50(1): 1–6.
- LATIMER, K. M. & MOTT, T. F. (2015). Lung Cancer: Diagnosis, Treatment Principles, and Screening. *American Family Physician*, 91(4): 250–6.
- LEMJABBAR-ALAOUI, H.; HASSAN, O. U. I.; YANG, Y. W. & BUCHANAN, P. (2015). Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1856(2): 189–210.
- LYKIDIS, A.; JACKSON, P. D.; ROCK, C. O. & JACKOWSKI, S. (1997). The role of CDP-diacylglycerol synthetase and phosphatidylinositol synthase activity levels in the regulation of cellular phosphatidylinositol content. *Journal of Biological Chemistry*, 272(52): 33402–33409.
- MUNIR, R.; LISEC, J.; SWINNEN, J. V. & ZAIDI, N. (2019). Lipid metabolism in cancer cells under metabolic stress. *British Journal of Cancer*, 120: 1090–1098.
- MYLONIS, I.; SIMOS, G. & PARASKEVA, E. (2019). Hypoxia-Inducible Factors and the Regulation of Lipid Metabolism. *Cells*, 8(3): 214.

- NATIONAL CANCER INSTITUTE. (2021). What Is Cancer?. Consultado 5 de mayo de 2021. Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- NIETO, M. A.; HUANG, R. Y. Y. J.; JACKSON, R. A. A. & THIERY, J. P. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1): 21–45.
- OTSUKI, Y.; SAYA, H. & ARIMA, Y. (2018). Prospects for new lung cancer treatments that target EMT signaling. *Developmental Dynamics*, 247(3): 462–472.
- PRABHAKAR, B.; SHENDE, P. & AUGUSTINE, S. (2018). Current trends and emerging diagnostic techniques for lung cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 106: 1586–1599.
- QI, Y.; KAPTERIAN, T. S.; DU, X.; MA, Q.; FEI, W.; ZHANG, Y.; HUANG, X.; DAWES, I. W. & YANG, H. (2016). CDP-diacylglycerol synthases regulate the growth of lipid droplets and adipocyte development. *Journal of Lipid Research*, 57(5): 767–780.
- RIVERA, M. P.; DETTERBECK, F. & MEHTA, A. C. (2003). Diagnosis of lung cancer: The guidelines. *Chest*, 123(1): 129S-136S.
- SÁNCHEZ-TILLÓ, E.; SILES, L.; DE BARRIOS, O.; CUATRECASAS, M.; VAQUERO, E. C.; CASTELLS, A. & POSTIGO, A. (2011). Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *American Journal of Cancer Research*, 1(7): 897–912.
- SCAGLIA, N.; CHISHOLM, J. W. & IGAL, R. A. (2009). Inhibition of stearoylCoA desaturase-1 inactivates acetyl-CoA carboxylase and impairs proliferation in cancer cells: Role of AMPK. *PLoS ONE*, 4(8): e6812.
- SCHLAEPFER, I. R. & JOSHI, M. (2020). CPT1A-mediated Fat Oxidation, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Endocrinology (United States)*, 161(2): bqz046
- SILVERSTEIN, R. L. & FEBBRAIO, M. (2009). CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Science Signaling*, 2(72): re3
- SNAEBJORNSSON, M. T.; JANAKI-RAMAN, S. & SCHULZE, A. (2020). Greasing the Wheels of the Cancer Machine: The Role of Lipid Metabolism in Cancer. *Cell Metabolism*, 31(1): 62-76
- SOUCHERAY, M.; CAPELLETTI, M.; PULIDO, I.; KUANG, Y.; PAWELETZ, C. P.; BECKER, J. H.; KIKUCHI, E.; XU, C.; PATEL, T. B.; AL-SHAHROUR, F.; CARRETERO, J.; WONG, K.; JÄNNE, P. A.; SHAPIRO, G. I. & SHIMAMURA, T. (2015). Intratumoral heterogeneity in EGFR-mutant NSCLC results in divergent resistance mechanisms in response to EGFR tyrosine kinase inhibition. *Cancer Research*, 75(20): 4372–4383.
- STEMMLER, M. P.; ECCLES, R. L.; BRABLETZ, S. & BRABLETZ, T. (2019). Non-redundant functions of EMT transcription factors. *Nature Cell Biology*, 21: 102–112.
- SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A. & BRAY, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3): 209–249.

- THE HUMAN PROTEIN ATLAS. (2021). CDS1 protein expression summary. Consultado 14 de junio de 2021. Disponible en: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000163624-CDS1>
- THIERY, J. P. & SLEEMAN, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7: 131–142.
- TRAVIS, W. D.; BRAMBILLA, E.; NICHOLSON, A. G.; YATABE, Y.; AUSTIN, J. H. M.; BEASLEY, M. B.; CHIRIEAC, L. R.; DACIC, S.; DUHIG, E.; FLIEDER, D. B.; GEISINGER, K.; HIRSCH, F. R.; ISHIKAWA, Y.; KERR, K. M.; NOGUCHI, M.; PELOSI, G.; POWELL, C. A.; TSAO, M. S. & WISTUBA, I. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(9): 1243–1260.
- VAN DER VEEN, J. N.; KENNELLY, J. P.; WAN, S.; VANCE, J. E.; VANCE, D. E. & JACOBS, R. L. (2017). The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1859(9B): 1558–1572.
- VICHAI, V. & KIRTIKARA, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1: 1112–1116.
- WOODARD, G. A.; JONES, K. D. & JABLONS, D. M. (2016). Lung cancer staging and prognosis, in *Lung Cancer. Cancer Treatment and Research*. Springer, Cham: 47–75.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2019). Cancer. Consultado 19 de mayo de 2021. Disponible en: [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1)
- YONEDA, K.; IMANISHI, N.; ICHIKI, Y. & TANAKA, F. (2019). Treatment of non-small cell lung cancer with EGFR-mutations. *Journal of UOEH*, 41(2): 153–163
- YONEDA, K. & TANAKA, F. (2018). Molecular Diagnosis and Targeting for Lung Cancer, in *Molecular Diagnosis and Targeting for Thoracic and Gastrointestinal Malignancy. Current Human Cell Research and Applications*. Springer, Singapore: 1-32
- YOULDEN, D. R.; CRAMB, S. M. & BAADE, P. D. (2008). The international epidemiology of lung cancer: Geographical distribution and secular trends. *Journal of Thoracic Oncology*, 3(8): 819–831.
- YUAN, Z.; YE, M.; QIE, J. & YE, T. (2020). Foxa1 promotes cell proliferation and suppresses apoptosis in HCC by directly regulating miR-212-3p/FOXA1/AGR2 signaling pathway. *OncoTargets and Therapy*, 13: 5231–5240.
- ZHANG, Y. L.; YUAN, J. Q.; WANG, K. F.; FU, X. H.; HAN, X. R.; THREAPLETON, D.; YANG, Z. Y.; MAO, C. & TANG, J. L. (2016). The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 7(48), 78985–78993.
- ZHOU, C. & YAO, L. DI. (2016). Strategies to improve outcomes of patients with EGRF-Mutant Non-Small cell lung cancer: Review of the literature. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(2): 174–186.

ZHUKOVSKY, M. A., FILOGRANA, A., LUINI, A., CORDA, D., & VALENTE, C. (2019).  
Phosphatidic acid in membrane rearrangements. *FEBS Letters*, 593(17): 2428–2451.



## 8. Anexo

**Tabla S1.** Resultados del análisis STR para la autenticación de las líneas celulares utilizadas en este trabajo.

	<b>H1975</b>		<b>H1975 AZDR</b>		<b>1975 sh-CTRL</b>		<b>1975 sh2-CDS1</b>		<b>1975 AZDR CDS1</b>	
D8S1179	13	16	13	13	13	16	13	13	13	13
D21S11	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
D7S820	8	8	8	8	8	11	8	8	8	8
CSF1PO	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
D3S1358	14	15	14	15	14	15	14	15	14	15
TH01	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
D13S317	10	10	10	13	10	10	10	10	10	10
D16S539	9	12	9	12	9	12	9	12	9	12
D2S1338	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
D19S433	15	15,2	15	15,2	15	15,2	15	15,2	15	15,2
vWA	17	18	17	18	18	18	18	18	18	18
TPOX	8	11	11	11	8	11	8	11	11	11
D18S51	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
AMEL	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
D5S818	11	12	11	11	11	12	11	11	11	11
FGA	21	24	21	24	21	24	21	24	21	24