

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***Expresión de los factores de transcripción SOX5
y Twist y su relación con quimioresistencia en modelos in
vitro de cáncer gástrico***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Bioquímica área de Especialización en
Bioquímica Clínica y Memoria para optar al Título de Bioquímico
por:**

JOAQUÍN IGNACIO REYES GONZÁLEZ

Directores de Tesis: Dr. Héctor Contreras y Dr. Maher Musleh

Santiago-CHILE

Diciembre 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

JOAQUÍN IGNACIO REYES GONZÁLEZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: _____ y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dr. Héctor Contreras _____

Co-director de Tesis:

Dr. Maher Musleh _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Carmen Romero _____

Dra. Valentina Parra _____

Dr. Francisco Aguayo _____

Agradecimientos

A mis padres, Rodrigo y Mariela. Gracias por ser los mejores profesores que la vida me ha dado. De ustedes aprendí lo que es amar incondicionalmente, cuidarse el uno al otro (hasta en los momentos más difíciles) y la importancia de la tenacidad, la bondad y el esfuerzo en cada tarea que uno se pone por delante. Gracias por siempre apoyarme en cada una de mis quinientas indecisiones, por quererme cuando no quería cariño, motivarme cuando solo veía negro y por nunca dejar de confiar en mí cuando yo era el más desconfiado. Gracias por hacerme sentir que los tengo tan cerca, la sensación de calma y amor, a la distancia de un lápiz en el escritorio, cuando en verdad estamos como a 800 km de distancia.

A mi hermana, Antonia. Gracias por siempre sacarme una risa cuando lo necesitaba, por iluminarme con tu icónica presencia de manera presencial o en las videollamadas familiares. Gracias por tu autenticidad, tu honestidad, tu ironía y principalmente, tu eterna compañía.

A Lilian. Gracias por tu cariño. Haberte conocido durante este último proceso de esta carrera es algo que considero invaluable. Este último año no esperaba nada, pero te vi, nos vimos, y me hiciste muy feliz. Espero que yo también esté logrando ese efecto que tú me causas a diario. Eres lo máximo, te quiero mucho.

A mis perritas Lupe y Tara. Por siempre estar felices cuando voy a verlas a Valdivia. Sus sonrisas motivan hasta al estudiante más agotado. Mención al Draguito, mi Bóxer que ahora está velando por sus hermanas desde algún otro lugar.

A la Dra. Anita Flores y todo el equipo de VIGÍA COVID de la UACH. Gracias a ellos decidí elegir el área de bioquímica clínica. Gracias Anita por presentarme a gente tan sensacional en su trabajo y en lo humano. Por ser fundamental en mi formación como bioquímico y por siempre recibirme en el laboratorio con una sonrisa, por preocuparte y por manejar durante la pandemia un escuadrón de testeo y diagnóstico que a mí, en lo personal, me maravilló.

Al LOCyM. Graciélita, Stephi, Paula, Seba, Cathy, Pame, Cami, Cote, Alam, Kevin y Alexis. Gracias por ser la mejor familia de laboratorio que nunca pensé que iba a tener.

Gracias por las enseñanzas, el apoyo incondicional, las risas, las comidas, los felices cumpleaños (faltan 9 meses) y por ser un motor fundamental para querer ir a diario a avanzar en mi tesis. Agradecimientos correspondientes al Dr. Héctor Contreras, por ser fundamental en que este laboratorio se sienta como una casa más. Fue una alegría constante ir a trabajar con ustedes todos los días en mi tesis.

A mis amigos de la universidad. Destacando a Cami, Juanpi, Nacho y Ale. Gracias por la tremenda compañía que me han dado, por las juntas online para jugar Fall Guys, por hacerme reír cuando pasaba toda la pandemia con la cara larga, por los juegos de mesa, los abrazos, los memes y por ser tan brillantes que me obligaban a (intentar) ponerme a sus niveles.

A mis amigos de Valdivia. Por siempre apañarme a la distancia. Por el ánimo que recibía no solo por un chat, sino que cada vez que nos juntábamos cuando viajaba. Gracias por nunca faltarme durante la oscura pandemia y por la calidez que siempre siento cuando estoy con ustedes.

Todos los que mencioné (y varios más que no agregué para no pasarme) fueron fundamentales para que yo estuviera ahora aquí, en la etapa donde tengo que escribir los agradecimientos de una tesis terminada. Estoy eternamente agradecido por el impacto que cada uno de ustedes ha tenido, y seguirán teniendo, en mi vida.

Índice General

1. Abreviaciones:.....	iii
2. Resumen:.....	iv
3. Summary	vi
4. Introducción	1
4.1 Generalidades sobre el cáncer gástrico.	1
4.2 Epidemiología mundial y nacional del cáncer gástrico.....	2
4.3 Prevención y manejo actual del cáncer gástrico.....	3
4.4 Quimioresistencia en cáncer gástrico.....	4
4.5 SOX5, Twist y quimioresistencia en GC.....	6
5 Hipótesis.....	10
6 Objetivo General	10
7 Objetivos específicos.....	10
8 Materiales y Métodos.....	11
8.1 Cultivo Celular	11
8.2 Reagentes quimioterapéuticos.....	11
8.3 Extracción de RNA y qPCR en tiempo real	11
8.4 Extracción de Proteínas y Western Blot.	13
8.5 Inmunofluorescencia.....	14
8.6 Ensayos de Viabilidad Celular	15
8.7 Análisis Estadístico	16
9. Resultados	17
9.1 Objetivo Específico 1.....	17
9.1.1. Niveles de transcrito y proteínas de SOX5 en las líneas celulares de GC.....	17
9.1.2. Localización celular de SOX5 en las líneas celulares de GC.....	18
9.2 Objetivo específico 2.....	20
9.2.1 Ensayos de viabilidad celular.	20
9.3 Objetivo Específico 3.....	24
9.3.1. Expresión de factores de transición epitelio-mesénquima (TEM)	24
9.3.2. Expresión y localización de TWIST en las dos líneas celulares	28
9.3.3. Expresión de marcadores de células madre cancerosas (CSCs).....	30
9.3.4. Expresión de marcadores de fenotipo multi-resistencia a drogas (MDR).....	32
10. Discusión.....	34

11. Conclusiones	40
12. Proyecciones	41
13. Bibliografía:	42

1. Abreviaciones:

5-FU: 5-Fluorouracilo.

ABC: ATP-binding cassette/ transportadores dependientes de ATP.

CSC: Cancer Stem Cells/Células Madre Cancerosas.

GAC: Gastric Adenocarcinoma/ Adenocarcinoma Gástrico

GC: Gastric Cancer/ Cáncer Gástrico.

FBS: Fetal Bovine Serum/ Suero Fetal Bovino.

HMG: High mobility group/ Dominio de alta movilidad.

MDR: Multi-Drug Resistant/ Multi-resistencia a drogas.

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide/ Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio.

Ox: Oxaliplatin/Oxaliplatino.

PBS: Phosphate Buffered Saline/ Solución salina de fosfato.

p-gp: P-Glucoproteína/Glucoproteína-P

RT-qPCR: Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction/ Reacción de Polimerasa en cadena en tiempo real y cuantitativa.

SOX5: SRY-box transcription factor 5/ Factor de transcripción de la familia SRY-box 5

TF: Transcription factor/ Factor de transcripción

TWIST1: Twist-related protein 1/ Proteína asociada a Twist 1

WB: Western Blot

EMT/TEM: Epithelium-Mesenchyme transition/ Transición epitelio-mesénquima.

2. Resumen:

El cáncer gástrico (GC) es una de las enfermedades malignas con mayor incidencia en la actualidad. Con más de un millón de casos surgiendo cada año, este tipo de cáncer es el quinto más prevalente y, con más de ochocientos mil fallecimientos anuales, es el tercer cáncer con mayor mortalidad a nivel mundial. Esto último es debido principalmente a que este expone una sintomatología muy inespecífica y tardía. Estudios dan cuenta que 50% de los pacientes presentan síntomas distintivos cuando estos ya se encontraban en la etapa IV de la enfermedad (Avanzado).

Actualmente, la quimioterapia es el único tratamiento contra el CG, esta de manera neoadyuvante/adyuvante o como principal terapia de tratamiento, en etapas más avanzadas. Los agentes químicos más utilizados en este tipo de terapia corresponden a Oxaliplatino y 5-Fluororacilo (5-FU), dispuestos en régimen como FOLFOX. La resistencia a este tipo de tratamiento a nivel mundial es preocupante, destacándose que el 90% de las muertes de pacientes con cáncer es debido a la generación de un fenotipo de multiresistencia a drogas (MDR). La aparición de este fenotipo MDR está estrechamente asociado con la progresión del cáncer a uno más agresivo e invasivo, que puede ocurrir mediante la activación de la transición epitelio mesénquima (TEM) y la aparición de Cancer Stem Cells (CSC).

En los últimos años se ha descrito que SOX5, un factor de transcripción perteneciente a la familia de proteínas sex-determining region Y (Sry)-box-containing, se encontraría sobreexpresado en distintos tipos de cáncer, promoviendo la aparición de un fenotipo más invasivo y metastásicos en líneas celulares de varios tipos de cánceres, incluyendo CG. Específicamente, en CG, la expresión de SOX5 sería responsable de causar una mayor agresividad debido a la activación del regulador maestro de la TEM, Twist1. También, se ha observado que una sobreexpresión de Twist1 también está asociado a una peor prognosis para el paciente en varios tipos de cáncer. Cabe destacar, que en CG se desconoce la participación de SOX5 y Twist en quimioresistencia.

De acuerdo con los antecedentes presentados, la hipótesis de trabajo en este proyecto es: **“La expresión de los factores de transcripción SOX5 y Twist estarían asociados con la quimioresistencia en modelos *in vitro* de cáncer gástrico”**. El objetivo general es evaluar **la asociación entre SOX5 y Twist con el fenotipo MDR y la quimioresistencia en CG.**

Para esto, se trabajó con líneas celulares de cáncer gástrico (AGS y MKN-45). Primero se realizó la detección de SOX5/Twist en las líneas celulares comerciales a través de RT-qPCR, Western Blot (WB) e inmunofluorescencia (IF). Posteriormente, a través de ensayos de citotoxicidad, se evaluó la resistencia (sobrevivida por MTT) a tratamiento FOLFOX que se utiliza en pacientes con CG y su asociación con la expresión de SOX5 y Twist1. Por último, en las líneas celulares se buscó asociar los niveles de SOX5 encontrados con la presencia de marcadores de MDR, como las glicoproteínas p-gp y marcadores de TEM (Twist1, Snail, Zeb1) y CSC. Los resultados obtenidos indican que en la línea con mayor expresión de SOX5 (AGS), posee un fenotipo más invasivo y también una mayor expresión de la proteína TWIST (junto a una mayor co-localización en el núcleo), todo esto al compararlo con la línea MKN-45. Finalmente, los resultados del ensayo MTT señalaron que AGS era una línea celular más quimiorresistente a tratamientos con 5-FU y Oxaliplatino, tanto en incubaciones separadas como combinadas (asemejando a la terapia FOLFOX). En resumen, la línea AGS con mayor expresión de SOX5 y TWIST presenta un fenotipo de quimiorresistencia a FOLFOX en GC de cáncer avanzado con mayor expresión de proteínas de la familia MDR, proteínas asociadas a TEM y positividad para marcadores de CSC.

Los resultados de esta investigación podrían ser fundamentales para relacionar el factor SOX5 y el regulador Twist con la quimiorresistencia en CG. Esto sería de gran importancia para el trabajo en clínica de la enfermedad, ya que este factor en un futuro podría considerarse como un marcador de la quimiorresistencia en los pacientes, promoviendo la utilización de terapias nuevas o focalizadas para tratar la enfermedad en etapa avanzada.

3. Summary

Gastric Cancer (GC) is one of the malignancies with the highest incidence worldwide. Currently being the fifth type of cancer with most cases each year and the third one with most deaths worldwide per year. This last part is mainly because of the late and nonspecific symptoms of the disease. Literature presents that 50% of the GC patients show a distinctive symptomatology when they have already entered a Stage IV GC. (Advanced Cancer).

Currently, chemotherapy is the only treatment against GC, it can be used in a neoadjuvant/adjuvant way or as an only way of treatment. The chemical agents most utilized in this treatment are Oxaliplatin and 5-Fluorouracil on a FOLFOX regimen. Resistance against this type of treatment has caused medical alarms worldwide, denoting that 90% of the cancer's patients' deaths are product of the acquisition of a multi-drug resistant phenotype (MDR). The appearance of this phenotype is widely related to the cancer progression to one more aggressive and invasive, that can happen because of the activation of the Epithelium-Mesenchyme transition and the emergence of Cancer Stem Cells (CSCs).

In recent years, SOX5, a transcription factor from the sex determining region Y (Sry)-box-containing family of proteins has been investigated as a factor that is overexpressed in several types of cancer, promoting the appearance of an aggressive phenotype and metastasis on various cancer cell lines, including gastric. More specifically, in GC it has been observed that SOX5 it's responsible of a higher aggressiveness caused by the activation of an EMT master regulator, Twist1. Also, it has been described that a Twist overexpression has also been associated with a worse prognosis in several types of cancer-. It is worth noting that in GC is unknown if there is a role for SOX5 and Twist1 in relation to chemoresistance.

The hypothesis of this project was **“The expression of the transcription factors SOX5 and Twist are associated with chemoresistance on in vitro models of gastric cancer”**. The general objective was to evaluate the relation between SOX5, Twist1 and the MDR phenotype with chemoresistance in GC cell lines. To do it, we worked with two GC cell lines (AGS and MKN-45). First, the detection of SOX5 and Twist was realized in these two lines via RT-qPCR, Western Blot (WB) and immunofluorescence. After the latter, via MTT Cytotoxicity assays, we evaluated the resistance to FOLFOX treatment utilized on GC patients and the relation of the results with the levels of SOX5 and Twist. Finally, we analyzed

the presence of MDR markers (such as the p-gp glycoprotein), EMT markers (Snail, Twist, ZEB1) y CSC antigens and made the association between the values detected and the levels of SOX5 in the two cell lines. The results showed that the cell line with a higher expression of SOX5 (AGS) presents a more invasive and mesenchymal phenotype of GC (this thanks to the analysis of the EMT and CSC's markers mentioned before), also, a higher expression of the TWIST protein (with a higher nucleus co-localization) was noticed, all of this after being compared with the MKN-45 line. Finally, the results of the MTT assay detected that AGS was more chemoresistant to treatments with 5-FU and Oxaliplatin, both separately and synergistically (like the FOLFOX regimen). In Summary, the GC cell line with a higher expression of SOX5 presented an advanced cancer phenotype that relates to resistance to the FOLFOX chemotherapy.

The results of this investigation could be relevant for the relation between the SOX5 transcription factor and Twist with the chemoresistance in GC. This could be of great medical importance for the research works of this disease. This because in the future this factor could be consider as a chemoresistance marker on patients, promoting the use of alternative therapies for the treatment of the disease.

4. Introducción

4.1 Generalidades sobre el cáncer gástrico.

El cáncer gástrico (GC) es una neoplasia/patología que se caracteriza por el crecimiento anormal y exacerbado de células cancerosas en el epitelio de la mucosa gástrica (P. Lochhead *et al*, 2008) y que, puede invadir distintas capas de las paredes del estómago, como la submucosa y la capa muscular (X. Wang, *et al*, 2022), para finalmente diseminarse a tejidos cercanos y/o lejanos en el organismo, generando metástasis que producen la muerte de los pacientes (P. Correa, 2013). Esta enfermedad puede clasificarse según su histología en tumores linfoproliferativos, mesenquimales, neuroendocrinos y tumores del estroma gastrointestinal (GIST) (A. Quaas, 2017). El término cáncer gástrico se utiliza generalmente para describir los adenocarcinomas gástricos (GAC), esto debido a que, histológicamente hablando, es el tipo de tumor más común que se puede encontrar en el estómago, representado a más del 95% de los pacientes que han cursado esta enfermedad (JA Ajani *et al*, 2017). El GAC se caracteriza específicamente por originarse en la región glandular del epitelio gástrico (GY Lauwers, 2003).

Para caracterizar los tumores asociados a este tipo de cáncer, existen diversas subclasificaciones que se usan actualmente. La clasificación de Lauren separa el GC en dos grandes subtipos según su histología, indicando que los adenocarcinomas pueden ser de tipo intestinal o difuso (BS Guzmán *et al* 2014); los primeros se destacan por ser generalmente originados por la metaplasia intestinal asociada a factores ambientales y a la infección por *Helicobacter pylori* (HH Hartgrink, *et al*, 2009) mientras que los del tipo difuso suelen ser pobremente diferenciados, ocurren usualmente en pacientes más jóvenes y están más asociados a predisposiciones genéticas (B Hu. *et al*, 2012). Se ha descrito en literatura que los tumores intestinales presentan una mejor tasa de supervivencia en pacientes que los difusos (A. Chiaravalli, *et al* ,2001). Desde una perspectiva molecular, se puede clasificar a el GAC en cuatro tipos: Tumores con inestabilidad cromosomal (CIN), positivos para el virus Epstein-Barr (EBV+), con inestabilidad microsatelital y los genéticamente estables; cada uno de ellos con mutaciones, silenciamientos o sobreexpresión de genes característicos (E. Van Cutsem *et al* 2016). Finalmente, anatómicamente hablando, los tumores pueden ser clasificados en tumores cardiales y no cardiales, los primeros siendo descritos de manera más

correcta como cánceres de la unión gastroesofágica (KF Sharofovna, *et al*, 2021) mientras que los segundos se consideran como cánceres gástricos verdaderos, ya que el carcinoma se encuentra en el estómago bajo la unión con el esófago. Esta separación anatómica para definir los tumores se conoce como la clasificación de Siewert. (NJ Curtis *et al*, 2014).

La sintomatología asociada a esta patología varía entre distintos pacientes y estos suelen aparecer cuando la enfermedad se encuentra en un estado avanzado siendo su detección tardía (A. Axon, 2006). Un estudio realizado por Maconi, *et al*, 2008 confirmó que aproximadamente el 50% de los pacientes detectaba los síntomas de alarma cuando estos ya se encontraban en la Etapa IV de la enfermedad, luego de una detección endoscópica, implicando que el cáncer ya había progresado a otros órganos a través de metástasis y migración. (G. Maconi, *et al*, 2008)

4.2 Epidemiología mundial y nacional del cáncer gástrico.

Datos del *Global Cancer Statistics* posicionan al cáncer gástrico como la quinta malignidad más prevalente en el mundo, con más de un millón de casos nuevos al año, siendo la aparición de GAC mucho más común en hombres que en mujeres (2:1) (F. Bray et al, 2018 y DA Norwood et al, 2022). También es el tercer tipo de cáncer con mayor mortalidad en el mundo, causando cada año aproximadamente 800 mil fallecimientos (B.S. Chhikara & K. Parang, 2023). Además, es el tercer tipo de cáncer más mortal entre los hombres, siendo solo superado por el cáncer colorrectal (CRC) y el cáncer de próstata (PCa) (P. Rawla & A. Barsouk, 2019). Con respecto a la prognosis de esta enfermedad, la tasa de supervivencia durante los primeros 5 años de la enfermedad es del 69.5% cuando se encuentra el tumor localizado en el estómago, porcentaje que baja considerablemente cuando el tumor ya ha realizado metástasis, llegando a un 6% (BG Sullivan *et al*, 2023).

La incidencia de esta enfermedad tiene sus valores más altos en Asia Central, Oriental y Latinoamérica donde se estima que más de 15 personas cada 100.000 habitantes tendrían GC (P. Karimi et al, 2014). Cabe destacar que la situación en Asia ha ido mejorando en los últimos años, debido a la implementación de sistemas de screening que permiten la detección de la enfermedad en estadios más tempranos y con mejor pronóstico (K. Sugano, 2015).

En Chile la prevalencia del GC es alta y considerando ambos sexos, se encuentra en la séptima posición entre los países con más incidencia anual de GC (P.Rawla & A. Barsouk, 2019). En términos de incidencia, esta es mayor en la zona centro-sur del país, y mucho menor en las regiones extremas (I, II, XI, XII Región) (A Csendes *et al* 2017). También, en nuestro país, el GC ocasiona 3200 muertes al año, encontrándonos así entre los 10 primeros lugares de mortalidad por CG en el mundo (A. Rollan *et al*, 2014). Según el *Age Standardized Incidence Rate* (ASIR) Chile se considera como una región de riesgo intermedio para CG, con una tasa de mortalidad 10-20/100000 habitantes (A Csendes & M Figueroa, 2017).

Los altos niveles de mortalidad en nuestro país y en el mundo se deben principalmente a que el diagnóstico de esta enfermedad suele ocurrir de manera tardía, disminuyendo de manera considerable las probabilidades de supervivencia del paciente en los siguientes 5 años, aunque este comience un tratamiento (H. Kubota *et al*, 2000). Una posible solución a la situación de mortalidad podría ser la implementación de sistemas de screening, que han dado excelentes resultados en algunas regiones de Asia (HJ Chun *et al*, 2023).

4.3 Prevención y manejo actual del cáncer gástrico.

Uno de los métodos de prevención más importantes contra la aparición del CG es el screening y posterior erradicación de la bacteria cancerígena *Helicobacter pylori* (DB Polk & RM Peek Jr, 2010). La colonización de este microorganismo en el estómago lleva consigo la liberación de múltiples factores de virulencia que pueden resultar en una inflamación o daño gastrointestinal, el que puede evolucionar a metaplasia, displasia y finalmente a un adenocarcinoma gástrico (Amieva & Peek, 2016). Se estima que aproximadamente el 60% de los casos de CG en el mundo han sido producto de la infección de *H. pylori*. Considerando que Japón, China y Corea del Sur poseen el 60% de los casos totales de esta enfermedad (KM Fock, 2014), en las últimas décadas la Asian Pacific Consensus on gastric cancer prevention comenzó a promover la realización de screening en la población, lo que ha ayudado a bajar los niveles de incidencia y mortalidad (KM Fock *et al*, 2008). Por otro lado, los países desarrollados de Europa y Norteamérica presentan niveles bajos de incidencia de esta enfermedad debido a la alta presencia de antibióticos en el mercado, lo que ha ayudado a la erradicación de la bacteria en estas zonas (Song & Zhou, 2015).

Hasta hoy el único tratamiento curativo que existe para el GC es la resección del tumor, la que puede ser realizada mediante una gastrectomía parcial o total (M Orditura *et al* 2014). Cuando no se puede tratar el tumor de manera inmediata a través de una resección endoscópica (cánceres muy iniciales) o gastrectomía, el comité de tratamiento oncológico puede optar a realizar una quimioterapia con distintos propósitos: i) Quimioterapia neoadyuvante para ayudar a delimitar el tumor previo a una cirugía., ii) tratamiento adyuvante para eliminar cualquier vestigio de cáncer y iii) como el único tratamiento, cuando la gastrectomía no es una opción viable debido a que el cáncer ya se ha propagado a varios órganos producto de una metástasis (ACS 2019). Existe una gran cantidad de fármacos que se utilizan actualmente en los esquemas quimioterapéuticos contra el CG, siendo los principales Docetaxel, Oxaliplatino y 5-Fluororacilo (5-FU). El primero es un agente antimetabólico (Nishiyama & Wada, 2009) mientras que 5-FU y Oxaliplatino actúan generando detención en la síntesis de DNA y citotoxicidad, respectivamente (Choi *et al*, 2007). En la actualidad los protocolos más utilizados en CG corresponden a FLOT o FOLFOX (Gürler *et al*, 2022). En terapias neoadyuvantes, el régimen FOLFOX (5FU + Ox) es uno de los más utilizados en la actualidad en casos de cáncer avanzado en las zonas con mayor incidencia (S Dong *et al*, 2016).

4.4 Quimioresistencia en cáncer gástrico.

La resistencia a las terapias descritas anteriormente ha sido un problema difícil de contrarrestar, debido principalmente a la gran cantidad de mecanismos que se pueden ver involucrados en la presentación de quimioresistencia. Las estadísticas muestran que el 90% de las muertes producidas por cáncer son producto de la generación de multiresistencia a drogas (Bukowski *et al* 2020), considerando específicamente lo que ocurre en cáncer gástrico, se ha denotado que la efectividad de la terapia es bastante restringida, ya que las tasas de supervivencia en 5 años de pacientes con tratamiento son muy bajas, siendo solo de un 28%. (Zuo *et al.*, 2017). En el estado avanzado de la enfermedad (no operable), el uso de quimioterapia basada en 5-FU, cisplatino y sus derivados (como Oxaliplatino, en FOLFOX), tiene una efectividad muy baja, observándose un 95% de fracaso en la terapia en este tipo de tumores. (H Li *et al*, 2021)

Uno de los principales factores que se ha visto asociado con la resistencia a drogas en el cáncer es la transición epitelio-mesénquima (TEM). La TEM se refiere a la conversión de las células desde un fenotipo epitelial, a uno más mesenquimal, pasando a ser alargadas y similares a los fibroblastos, adquiriendo una mayor capacidad de invasión y migración, aumentando la agresividad del GC (Wang *et al*, 2011). Esta transición se caracteriza por la desaparición de marcadores celulares típicos de células epiteliales (E-cadherina, citoqueratina) y la expresión de marcadores mesenquimales (N-cadherina, vimentina) (Da Silva *et al*, 2015). La TEM puede ser mediada por factores de transcripción (Snail, Slug, Twist, Zeb), generalmente sobreexpresados (Wang *et al*, 2010) o RNA no codificantes (Wang *et al*, 2019). **(ver Figura 1)**. En ensayos en los cuales se han silenciado reguladores maestros de esta transición se ha observado que las células se hacen más sensibles a la aplicación de fármacos, confirmando así su posible rol en la quimioresistencia, además del rol ya conocido en la migración tumoral (Zhang *et al*, 2019).

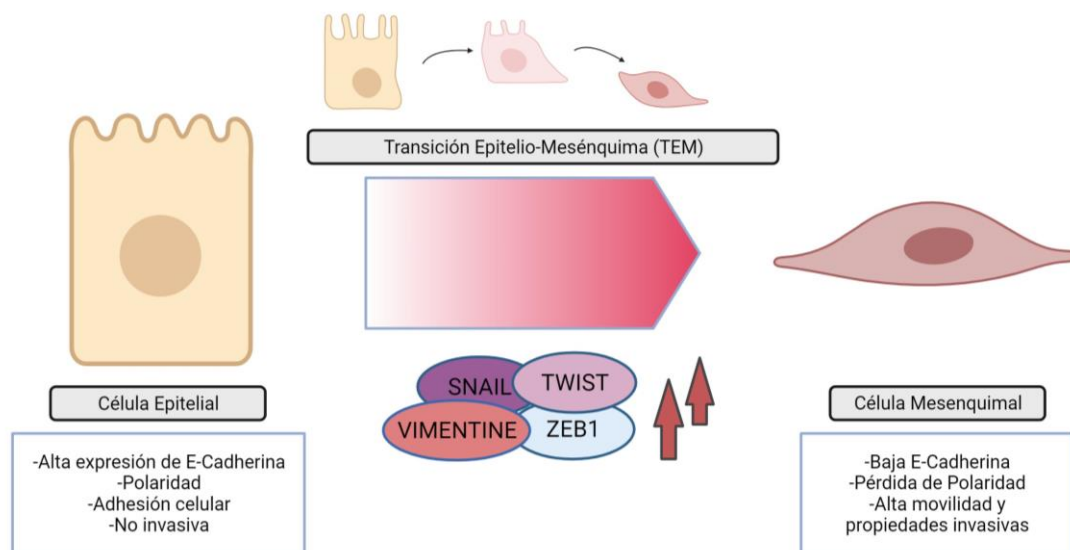


Figura 1. Descripción del evento de Transición Epitelio-Mesénquima. La sobreexpresión de factores de transcripción asociados a la TEM promueve la reprogramación celular de células epiteliales a unas de fenotipo mesenquimal. La morfología de las células pasa de una de gran polaridad y de estructura adoquinada a una más alargada y con poca adhesión celular. La reducción en la expresión de E-Cadherina también se utiliza para denotar la transición. Figura realizada en Biorender.

También en estrecha relación a la quimioresistencia y a la TEM se encuentran las células resistentes a terapia producto de la generación de un fenotipo Cancer Stem-Cell (CSC). En general, incluyendo en el GC, los tumores suelen ser conformados por células muy heterogéneas (Molina-Castro *et al* 2017). Las CSC corresponden a un subconjunto de células que tienen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse (Ojha *et al*, 2015). Se ha estudiado que estas células son resistentes a la quimioterapia convencional, lo que las haría responsables de promover el resurgimiento y futura proliferación de un tumor seguido de una metástasis (Kim & Ryu, 2017). Existen varios marcadores de superficies que son propios de este tipo de células que se han visto en líneas celulares de GC. Los principales marcadores corresponden a glicoproteínas transmembrana, como CD24, CD44 (Zhang *et al*, 2011) y CD133 (Hashimoto *et al*, 2014). Investigaciones de las últimas décadas han ayudado a dilucidar la estrecha relación entre el fenotipo *stem-cell* de las células cancerosas y la TEM (Shibue *et al*, 2017). En este sentido, se ha evidenciado que reguladores maestros de la transición, como Twist1 y SNAIL, serían parte de sus vías de señalización favoreciendo la aparición del fenotipo CSC, asociado a un aumento de marcadores de superficie como CD24 Y CD44 (Mani *et al*, 2008).

Algunos de los marcadores de CSC más importantes que se han asociado a un mecanismo de multiresistencia a drogas (MDR), tienen relación al flujo de drogas de quimioterapia que ocurre dentro de la célula (García-Mayea *et al* 2020). La familia de transportadores ATP-binding cassette (ABC Transporters) son proteínas transportadoras presentes en la membrana plasmática que pueden bombear los fármacos hacia el exterior de la célula produciendo resistencia a drogas (Ruan *et al* 2020). Las principales proteínas a este fenotipo son la glicoproteína P (P-gp), ABCG2 y MRP1 (Robey *et al*, 2018), las que han sido estudiadas en diversos tipos de neoplasias. En particular, P-gp se ha estudiado en CG, observándose su sobreexpresión en esta patología (Xu *et al*, 2010).

4.5 SOX5, Twist y quimioresistencia en GC.

En los puntos anteriores se describieron los principales fenotipos a través de los cuales, se promueve el desarrollo de tumores más agresivos y de resistencia a la terapia en distintos tipos de cánceres, incluyendo el gástrico. Todo esto, expone, la necesidad de avanzar en la caracterización y comprensión de mecanismos aún desconocidos, a través de los cuales se

desarrollarían estos fenotipos celulares. En el siguiente punto se definirán dos factores de transcripción que podrán estar participando en estos mecanismos, el factor SOX5 y Twist1.

Se ha observado que Twist es de gran importancia para el desarrollo de la agresividad de varios tipos de cáncer al ser un regulador de la TEM. Twist1 es un factor de transcripción de 26 kd aproximadamente y que contiene dominios basic helix-loop-helix (Z Zhao *et al*, 2017). Este factor sería fundamental en distintas etapas del desarrollo embrionario, participando en particular en el desarrollo mesenquimal (Zhu *et al*. 2016). Actualmente, es reconocido que la expresión de este factor puede asociarse con la progresión del cáncer, ya que se ha observado que la sobreexpresión de Twist puede correlacionarse con la metástasis y la activación de la TEM (Liu, *et al* 2012). Así, la sobreexpresión de este factor se ha relacionado con una mayor invasión del cáncer y un peor pronóstico para el paciente (Chen *et al*, 2012).

Investigaciones recientes han demostrado que Twist estaría regulando el transportador ABCB1/P-gp en distintos tipos de cáncer, lo que induciría la generación de fenotipos más agresivos de cáncer y multi resistencia a drogas (MDR) (Deng *et al* 2016; Chen *et al*, 2012). Sin embargo, cabe señalar que no se ha descrito una asociación entre Twist1 y fenotipo de MDR para CG. Adicionalmente, se ha observado que algunas proteínas de reparación del genoma XPD (gen *ercc2*) y XRCC1 con funciones de escisión de bases y helicasa, respectivamente (Gurubhagavatula *et al*, 2004), podrían estar altamente asociadas a la resistencia a terapia en diversos cánceres, incluyendo el adenocarcinoma gástrico (Marin *et al*, 2020).

Por otro lado, la familia de proteínas sex-determining region Y (Sry)-box-containing (SOX) corresponden a factores de transcripción de gran importancia en la regulación del destino celular durante el desarrollo embrionario (Sarkar, A., & Hochedlinger, 2012). Actualmente, se han descrito más de 20 tipos de SOX en mamíferos (Schepers *et al*, 2002). En este sentido, en los últimos años se ha estudiado el posible rol que varios de estos factores podrían tener en la progresión del cáncer dependiendo de si estos poseen una disrupción en su regulación normal. Para GC, se han descrito a miembros de la familia SOX que pueden servir como oncogenes como también otras que tienen un rol supresor de tumores. En el caso de SOX1, SOX2 y SOX6 se ha descrito que estos factores al estar expresados en GC, podrían tener capacidad antitumoral, mientras que, por el contrario, se ha investigado extensamente el rol

que tendría SOX4 en la promoción de la proliferación tumoral y metástasis en CG al encontrarse sobreexpresado en tejidos tumorales de pacientes. (Abadi *et al*, 2021).

Las proteínas SOX se pueden dividir en distintas subfamilias dependiendo de su similitud en propiedades genómicas, el dominio de unión HMG y la estructura proteica. El factor SOX5 forma parte de la familia SoxD, junto con SOX6, SOX13 Y SOX23 (Bowles *et al*, 2000). Investigaciones han descubierto que estas proteínas están involucradas en la regulación transcripcional de proteínas que regulan distintos procesos, como lo es la formación de cartílagos o el desarrollo embrionario (Rescan & Ralliere, 2010). Hablando específicamente de SOX5, el gen se encuentra en el cromosoma 14 y la proteína codificada tiene un peso de 84 kD (Lefebvre 2010). Su gen posee un motivo de cierre de leucina, que permite homo y heterodimerización. También, junto con los otros miembros de SoxD, SOX5 posee un dominio conservado en la región N-terminal de la proteína, que consiste en residuos formando helicoides enrollados, cierres de leucina y un motivo rico en glutamina. Esto les permite a las proteínas formar homodímeros y heterodímeros estables, lo que se traduce en una mayor flexibilidad al momento de unirse al sitio de unión, cuando deben ejercer como factores de transcripción (Liang, *et al* 2020).

Recientemente se ha demostrado que SOX5 tendría un rol oncogénico en el desarrollo de distintos cánceres (igualmente que otros miembros de la familia SoxD). En cáncer de mama se ha descrito que este factor promovería la proliferación e invasión tumoral al activar a la enzima EZH2 (Sun *et al*, 2019), la que participa en la división mitótica. Además, se ha observado que promovería la metástasis en cáncer de próstata (Hu *et al*, 2018), carcinomas hepatocelulares (Wang *et al* 2015) y de pulmón (Chen *et al*, 2018). En estos tres casos mencionados, la acción de SOX sería mediada por la activación de la TEM activando esta transición a través de Twist1 (Chen *et al*, 2018). Por otro lado, en cáncer de pulmón, también se ha observado que la transactivación de SOX5 tendría relación con la generación de quimioresistencia (Pei, *et al*, 2014). Con relación al CG, en el año 2019 se demostró que SOX5 promovería metástasis a través de la activación de TEM vía Twist (You *et al*, 2019), sin embargo, no se han descrito mecanismos por los cuales SOX5 podría generar quimioresistencia a las terapias utilizadas actualmente, como lo es FOLFOX. Lo más cercano que se ha analizado hasta la fecha, es la resistencia a cisplatino que podría estar generando

SOX5 gracias a la acción de un RNA no codificante circular (circ-LDLRAD3) que evita la inhibición del factor de transcripción al impedir la unión de un microRNA miR-588 a este (Q Liang *et al*, 2023). Información sobre resistencia contra el análogo Oxaliplatino y el otro utilizado en FOLFOX, 5-FU no ha sido descrito. Esta acción que se ha observado en los RNA circulares ha ayudado a concluir la necesidad de verificar las distintas terapias que se deberían tener en cuenta en el tratamiento de GC cuando las terapias de primera línea podrían no estar teniendo resultados óptimos (Y Zheng *et al*, 2023).

Considerando lo propuesto anteriormente sobre SOX5, el desarrollo de fenotipos agresivos en cáncer, y el papel que tendría Twist, la glicoproteína P-gp, proteínas reparadoras de DNA, marcadores TEM y CSC en distintos tipos de cáncer, incluyendo gástrico, en este proyecto de tesis se propone estudiar la asociación entre la expresión de SOX5 y Twist en la quimioresistencia del CG en modelos *in vitro* (figura 1). Este estudio permitiría avanzar en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para predecir el éxito o seleccionar tratamientos que puedan ser más efectivos en esta patología tan relevante a nivel nacional y mundial.

5 Hipótesis

La expresión de los factores de transcripción SOX5 y Twist están asociados con quimioresistencia en modelos *in vitro* de cáncer gástrico

6 Objetivo General

Evaluar la asociación entre SOX5 y el regulador maestro de la TEM, Twist con las proteínas MDR (XRCC1, XPD1 y p-gp), antígenos CSC y la quimioresistencia en CG

7 Objetivos específicos

- 1) *Determinar la expresión de **SOX-5** en líneas de cáncer gástrico CG.* Se evaluó los niveles de expresión de RNA mensajero y de proteínas del factor de transcripción SOX5, a través de la metodología de PCR en tiempo real y Western Blot respectivamente, en las líneas celulares de cáncer gástrico AGS (Tumor Primario) y MKN-45 (Metástasis Hepática). Para complementar este objetivo, también se realizó inmunofluorescencia dirigida a SOX5 para poder visualizar este factor en las líneas de GC.
- 2) *Relacionar la expresión de **SOX5** y el regulador de **la TEM, Twist**, en respuesta a incubaciones con **FOLFOX** en líneas celulares de CG.* Se realizó un ensayo de viabilidad celular utilizando el reactivo MTT en condiciones de distintas concentraciones de oxaliplatino y 5-Fluorouracilo (por separado y juntos), para observar si la presencia de SOX5 y su asociación con Twist, podrían estar asociada a una mayor resistencia a estos compuestos citotóxicos que son utilizados actualmente como parte de una de las terapias más utilizadas para combatir el cáncer gástrico.
- 3) *Asociar la presencia de **SOX5** con marcadores de **CSC** y **MDR** en líneas celulares de cáncer gástrico.* Habiendo concluido sobre la presencia del factor SOX5 en nuestras líneas celulares, se trabajó para determinar si la sobreexpresión de este factor en líneas de cáncer se puede relacionar con marcadores de CSC y MDR. Se realizaron mediciones (vía PCR, WB e IF) de marcadores asociados a TEM, CSC y MDR para caracterizar las líneas de GC y así evaluar cuál de estas sería más agresiva y de fenotipo más invasivo. Misma metodología se empleó para evaluar los niveles de Twist en las células. También se relacionaron estos resultados con los obtenidos en los ensayos de quimio resistencia realizados en el **objetivo específico 2**.

8 Materiales y Métodos.

8.1 Cultivo Celular

Las líneas celulares comerciales de adenocarcinoma gástrico humano (GAC) utilizadas fueron: AGS (ATCC; CRL-1739 TM), que provienen de un tumor primario y MKN-45 (DSMZ; ACC 409 TM), perteneciente a una metástasis hepática. Ambas líneas celulares fueron cultivadas utilizando el medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Corning Life Sciences). Los cultivos fueron mantenidos en incubación a 37°C y 5% de CO₂. Las células fueron sembradas en placas y el medio de cultivo fue cambiado cada 2-3 días luego de dos lavados con una solución salina de buffer de fosfato (PBS, solución hecha en el laboratorio). Se generaron subcultivos utilizando la proteasa Tripsina (Gibco) cuando la confluencia del cultivo sobrepasó el 80%.

8.2 Reagentes quimioterapéuticos

Para recrear la terapia FOLFOX en el objetivo 3 de nuestro proyecto, se utilizaron en los ensayos celulares.

Tabla 1: Quimioagentes utilizados en los ensayos celulares.

Quimioagente	Presentación	Procedencia
5-Fluorouracil , RNA and DNA synthesis inhibitor.	Sólido. Soluble en DMSO. 5g.	Abcam. ab142387.
Oxaliplatin , Platinum anticancer agent.	Sólido. Soluble en H ₂ O y en DMSO. 50 mg.	Abcam. ab141054.

8.3 Extracción de RNA y qPCR en tiempo real

El RNA de a las líneas celulares AGS y MKN-45 fue extraído mediante un protocolo que involucra la utilización del reagente TRIzol (Ambien Technologies) y cloroformo (DC Rio *et al*, 2010). La concentración y pureza de las proteínas fue medida a partir de espectrofotometría a 260 y 280 nm utilizando un lector de placas (Synergy HTX Multimode Reader Spectrophotometer. Biotek.). Se sintetizaron 2000 ng de ADN complementario

(cDNA) a partir del RNA purificado utilizando el kit. All-In-One 5X RT MasterMix (ABM, USA) acorde a las instrucciones del protocolo incluido en dicho kit. El DNA fue amplificado vía PCR cuantitativo en tiempo real usando el kit Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix kit (Agilent Technologies, Inc.) según a lo sugerido en el protocolo incluido en el kit. Las condiciones definidas en el termociclador (Agilent) fueron las siguientes: (1) Denaturación inicial a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de: (2) denaturación a 95°C por 30 segundos, (3) alineación a 60°C por 15 segundos (4) extensión a 72°C por 15 segundos. Los resultados fueron utilizados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (expresión génica relativa) usando como gen de referencia al *housekeeping* GAPDH. Los primers utilizados para SOX5, marcadores TEM, CSC y entre otros fueron obtenidos a partir de IDT (USA) y fueron los siguientes:

Tabla 2: Partidores utilizados para RT-PCR.

GEN	Forward Primer	Reverse Primer
Sox5	5'-AGGAAGCGGTCGAGACGG-3'	5'-CGCCTTCGAAGATGGCGTTG-3'
Twist1	5'-CAGCTACGCCTTCTCGGTCT-3'	5'-CTGTCCATTTTCTCCTTCTCTGGA-3'
Vimentina	5'-CTGCTTCAAGACTCGGTGGAC-3'	5'-ATCTCCTCCTCGTACAGGTCG-3'
E-Cadherina	5'-CGAGAGCTACACGTTACAGG-3'	5'-GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG-3'
ZEB1	5'-GATGATGAATGCGAGTCAGATGC-3'	5'-ACAGCAGTGTCTTGTTGTTGT-3'
Snail	5'-GACGATGACTACGCTTCTGC-3'	5'-T TGTATCCTCTTCGGCTGG-3'
glicoproteína-p	5'-AGCCACGTCAGCTCTGGAT-3'	5'-TGCATTCTGGATGGTGGAC-3'
CD44	5'-CACGTGGAATACACCTGCCA-3'	5'-GACAAGTTTTGGTGGCAGGT-3'
CD133	5'-TCAATTTTGGATTCATATTT-3'	5'-ACTCCCATAAAGCTGGACCC-3'
Ercc2 (XPD)	5'-GGCCTCCTGGTATGAGCA-3'	5'-CCTGGGTCTCAATAAAGAGCA-3'
Xrcc1	5'-CTGGGACCGGGTCAAAT-3'	5'-CAAGCCAAAGGGGGAGTC-3'

8.4 Extracción de Proteínas y Western Blot.

Las proteínas pertenecientes a las dos líneas celulares descritas anteriormente fueron extraídas a partir de la utilización de un buffer de lisis celular RIPA (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EGTA 1mM, NP-40 1% v/v a pH 7,4) en presencia de un cocktail de inhibidores de proteasa (Roche Diagnostics) a 4°C. Los homogenizados fueron centrifugados a 12500 g por 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron recuperados y se sometieron a cuantificación mediante ensayo utilizando el reactivo de Bradford (Sigma Aldrich, USA).

Para los análisis vía Western Blot se cargaron 30 ug de proteína totales por pocillo. Las muestras fueron calentadas a 95°C durante 10 minutos. Las proteínas fueron cargadas a un gel desnaturante de SDS-poliacrilamida al 12% y se sometieron a electroforesis a 80V por media hora para luego seguir a 100V durante 2 horas aproximadamente, esto con el propósito de separar las muestras del gen concentrador al separador. Posterior a esto, se realizó la transferencia de las proteínas a un gel de nitrocelulosa (BioRad) a 4°C por 2 horas. Seguido a esto, se realizó bloqueo de la membrana en leche al 5% en TBS-Tween 0,1% durante 90 minutos. La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante toda una noche (12 horas aproximadamente) a 4°C, donde el anticuerpo se encontraba diluido en la misma solución de bloqueo, mientras que la incubación con el anticuerpo secundario anti-mouse o anti-rabbit (Ambos de Jackson Immunoresearch, dilución de 1:10000 en solución de bloqueo) se realizó a temperatura ambiente por 90 minutos. Entre ambas incubaciones con anticuerpos, se realizaron tres lavados a la membrana con TBS-Tween en agitación (5 minutos por lavado). Para la detección de la banda mediante la enzima HRP se utilizó un kit para la detección de quimioluminiscencia (EZ-ECL; Biological Industries), esta última se logró observar utilizando un revelador automático Fusion FX (Vilber Lourmat). La densidad óptica de las bandas fue analizada utilizando el software Image J v1.51 (National Institute of Health). Para obtener los valores relativos de las proteínas a analizar, se utilizó como proteína de referencia a la beta-actina (Immuno MP Bio, 69100). Las proteínas de interés utilizadas, con sus respectivas diluciones, fueron las siguientes.

Tabla 3: Anticuerpos utilizados para Western Blot e IF

PROTEÍNA	Dilución	Procedencia (Empresa y N° de Catálogo)
SOX5	1:500	Abcam. Código ab94396
TWIST	1:1000	Sigma-Aldrich. Código T6154
VIM	1:1000	Abcam. Código ab8978
ECAD	1:1000	BD Biosciences. Código 610181
ZEB1	1:500	E-Bioscience. Código 14974182
SNAIL	1:1000	Cell Signaling. Código 3879S
CD44	1:500	Abcam. Código ab6124
CD133	1:1000	Invitrogen. Código PA5-38014
XPD	1:500	Cell Signaling. Código 11963S
XRCC1	1:1000	Cell Signaling. Código 2735S

8.5 Inmunofluorescencia.

Las dos líneas celulares anteriormente descritas se dejaron crecer en placas de 12 mm a una confluencia de 40-50% con un cubreobjeto c/u. 48 horas después, las células fueron fijadas utilizando un buffer de fijación (4% paraformaldehído) por 30 minutos a temperatura ambiente. Posterior a esto fueron lavadas y bloqueadas con BSA (Winkler Ltd) al 3% en PBS-glicina por 30 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas toda la noche a 4°C (en cámara húmeda) con los anticuerpos Anti-SOX5, Anti-Twist1 y Anti-ECAD (dilución de 1:200, ver **tabla 3** para conocer catálogo). Luego de tres lavados con PBS-Glicina, se incubó el anticuerpo secundario Alexa Fluor 633 respectivo (ms o rb) por 30 minutos a 37°C. Para la tinción nuclear, DAPI (dilución 1:10000 cat. no. sc3598; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) fue utilizado. Se cubrió a las células con este por siete minutos a temperatura ambiente. Las imágenes fueron obtenidas utilizando el microscopio de inmunofluorescencia Leica D2500 (Leica Microsystems GmbH) y el microscopio confocal LSM 510 (Zeiss, Alemania). El análisis de imágenes se realizó utilizando ImageJ v1.51 (National Institute of Health).

8.6 Ensayos de Viabilidad Celular

Para evaluar la viabilidad celular de las líneas celulares descritas anteriormente, en condiciones de tratamiento con los agentes quimioterapéuticos utilizados en el régimen FOLFOX, se utilizó el ensayo MTT (Sigma-Aldrich). Células en una confluencia del 90% fueron sembradas (5×10^4 células para 5-FU, 10^4 para Oxaliplatino, 1.5×10^5 sinérgico) en placas de 96 pocillos, en un total de 100 uL de medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco). Las células fueron tratadas de tres formas distintas: **(1)** con distintas concentraciones de 5-FU (0,12.5, 25, 50, 100 uM) **(2)** con distintas concentraciones de oxaliplatino (0,20, 40, 60, 80 uM) y **(3)** distintas concentraciones de ambos agentes de manera sinérgica (ver **tabla 4** para las concentraciones). Todas estas incubaciones fueron por 48 horas.

Tabla 4: Concentraciones utilizadas para el ensayo MTT de FOLFOX (48hrs)

Agente	1 ^{era}	2 ^{nda}	3 ^{era}	4 ^{ta}	5 ^{ta}	6 ^{ta}
5-FU (uM)	12,5	12,5	25	50	50	100
Ox. (uM)	0	20	20	20	40	60

Luego de 48 horas de incubación, el medio con químicos es eliminado y 100 uL de la solución de MTT diluida en medio RPMI plano (1:10) es agregada a cada pocillo. Posterior a esto, las células fueron incubadas durante 3 horas a 37°C en ausencia de luz. Al pasar el tiempo, el reactivo fue eliminado y los cristales remanentes en el fondo de los pocillos (precipitados de formazan) fueron solubilizados con 100 uL de una solución de DMSO e Isopropanol (20% DMSO/80% Isoprop.) y se mantuvieron en agitación a temperatura ambiente por 15 minutos para luego medir la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de placas (Synergy HT, Biotek). Cabe destacar que se utilizaron pocillos en la placa de 96 como blancos (medio sin células) y como controles (medio con células, sin tratamiento). El porcentaje de viabilidad se calculó utilizando la siguiente fórmula: $(\% \text{viabilidad}) = (X \times 100\%) / Y$, donde X es la absorbancia de las células en tratamiento e Y es la absorbancia de los controles. (Figura 2)

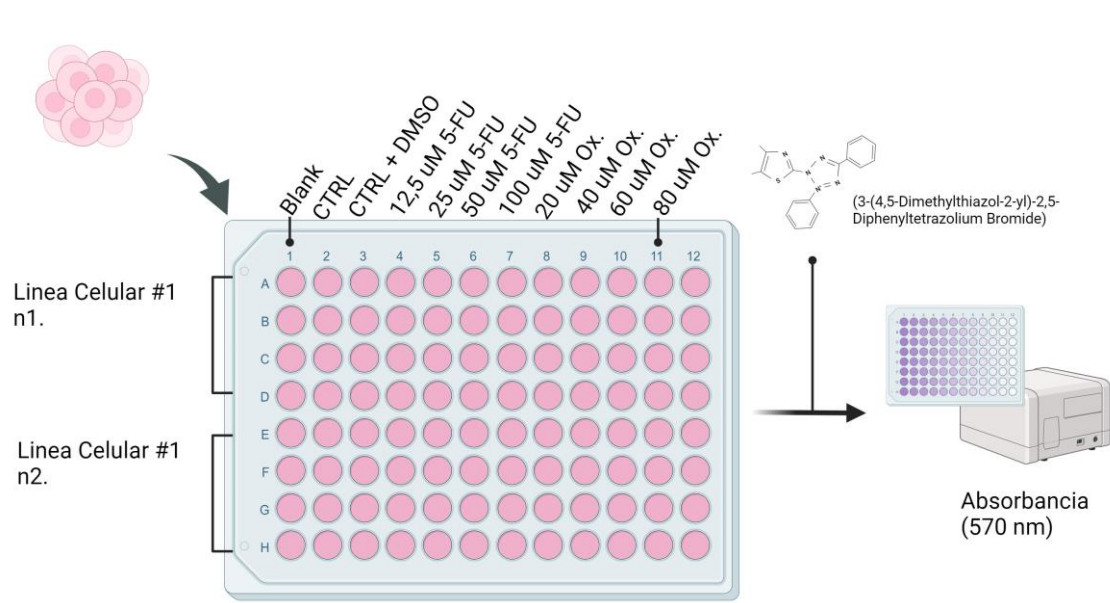


Figura 2. Diseño de la placa de 96 pocillos utilizada en los dos primeros experimentos de viabilidad celular. En cada placa se trabajó con 2n, por lo que para tener los 4n de cada línea celular se necesitaron 2 placas por línea. Figura realizada por Biorender.

8.7 Análisis Estadístico

El análisis de datos fue realizado utilizando el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc.). Los datos de todos los experimentos descritos están expresados como el promedio \pm desviación estándar de cuatro experimentos independientes (n=4). La prueba no paramétrica de Mann-Whitney fue usada para el análisis de significancia entre las distintas líneas celulares comparadas. $P \leq 0.05$ fue considerado para marcar una diferencia significativa. Los intervalos de confianza de todas las pruebas fueron de un 95%.

9. Resultados

9.1 Objetivo Específico 1

Objetivo específico 1: Determinar la **EXPRESIÓN DE SOX-5** en líneas de cáncer gástrico CG.

9.1.1. Niveles de transcrito y proteínas de SOX5 en las líneas celulares de GC.

Los resultados indicaron que en ambas líneas celulares hay presencia de RNA mensajero de SOX5. Cabe destacar que la línea AGS presentó, significativamente, una mayor expresión del transcrito al compararse con la línea metastásica MKN-45. De manera concordante, se observó que, a nivel proteico, la línea AGS también presentaba una mayor expresión de SOX5, en comparación a la línea MKN-45, siendo esta diferencia de expresión una significativa. Los resultados de tanto los qPCR, los WB y sus imágenes representativas respectivas, se pueden visualizar en la **figura 3**.

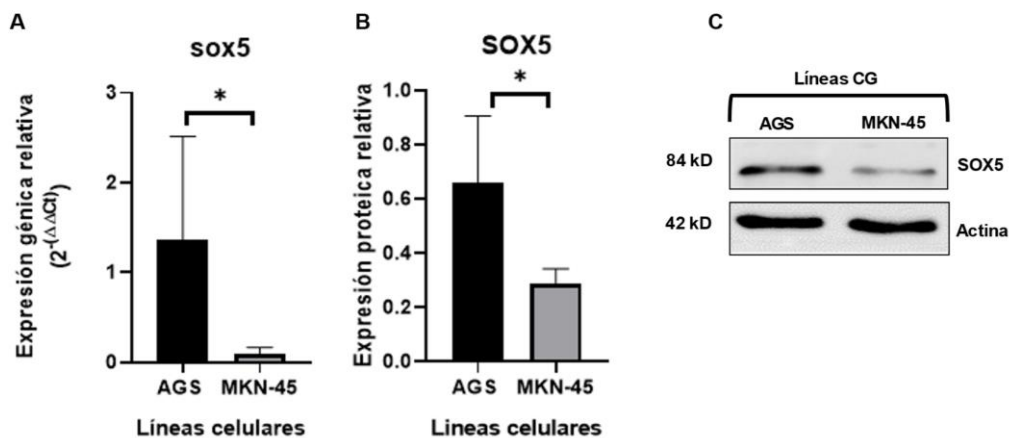


Figura 3. Expresión del factor de transcripción SOX5 en dos líneas de CG. (A) Expresión relativa de los niveles del transcrito (RNAm) de la proteína SOX5 en las líneas de cáncer gástrico AGS y MKN-45. Para el análisis cuantitativo se utilizó el gen de *housekeeping* gapdh. **(B)** Cuantificación de la expresión relativa de la proteína SOX5 en las líneas celulares AGS y MKN-45, se utilizó como proteína de referencia a Beta-Actina. **(C)** Imagen representativa de los resultados obtenidos de la cuantificación de la expresión proteica. Se puede observar las bandas de las proteínas de interés y sus respectivos pesos moleculares en kD. Los datos se muestran como promedio \pm desv. estándar (n=4). Las diferencias significativas se calcularon utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, * $P \leq 0.05$.

9.1.2. Localización celular de SOX5 en las líneas celulares de GC

La localización celular del factor de transcripción SOX5 se estudió a través de la técnica de inmunofluorescencia en ambas líneas celulares anteriormente descritas. Realizándose, además, una cuantificación relativa de la fluorescencia emitida.

En los resultados se logró observar que ambas líneas celulares tendían a tener una expresión de la proteína por toda la superficie celular, incluyendo en el núcleo ya que se observa en ambas líneas celulares colocación entre la marca del anticuerpo secundario y la tinción DAPI. En la imagen de la inmunofluorescencia, se logra observar una tendencia a una mayor expresión nuclear de este factor de transcripción en la línea AGS (en comparación con la MKN-45), pero, para corroborar esto, se realizó un análisis cuantitativo de la señal de inmunofluorescencia de nuestra proteína de interés (En ImageJ = **RawIntDen Señal SOX5 en Núcleo/ RawIntDen Señal DAPI**), donde se observó que la línea AGS posee una mayor expresión significativa de la proteína SOX5 en el núcleo celular, en comparación con la línea MKN-45. Las imágenes de la inmunofluorescencia de ambas líneas junto con el análisis cuantitativo se pueden visualizar en la **figura 4**.

En resumen, al analizar ambas líneas celulares, se puede concluir de este objetivo específico que ambas líneas celulares expresan el factor de transcripción SOX5. Con la distinción de que la línea de cáncer gástrico AGS posee una mayor expresión de proteína, mayor expresión de transcrito y una mayor colocación nuclear del factor de transcripción de interés. Todo lo anterior al realizar una comparación con la otra línea de cáncer analizada, MKN-45.

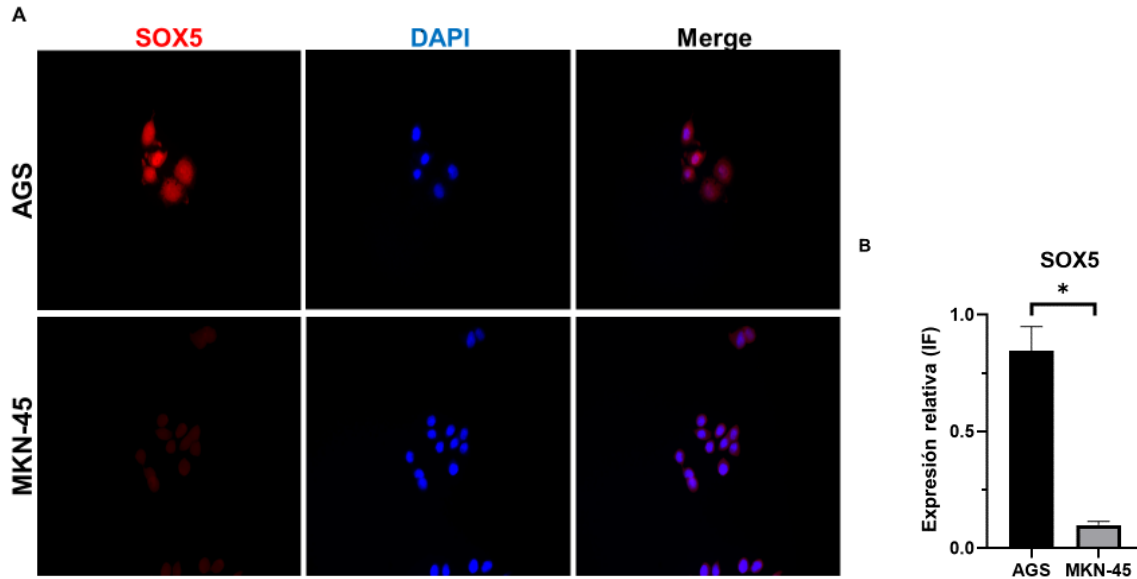


Figura 4. Localización celular del factor de transcripción SOX5 en dos líneas de CG. (A) Inmunofluorescencia representativa para la detección de la proteína SOX5 en las líneas de cáncer gástrico AGS (arriba) y MKN-45 (abajo). La ubicación de la proteína se encuentra marcada en rojo mientras que el núcleo (DAPI) se encuentra marcado de color azul. Para los dos grupos de imágenes se trabajó con un microscopio de fluorescencia y las imágenes fueron tomadas con aumento de 40X. **(B)** Cuantificación de los niveles de fluorescencia nucleares del factor de transcripción en ambas líneas celulares anteriormente mencionadas. Los datos se muestran como promedio \pm desv. estándar (n=4). Las diferencias significativas se calcularon utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, * $P \leq 0.05$. Valores de intensidad de fluorescencia fueron obtenidos a partir de ImageJ.

9.2 Objetivo específico 2.

*Objetivo específico 2: Correlacionar la expresión de **SOX5** y el regulador de la TEM, **Twist**, en respuesta a incubaciones con **FOLFOX** en líneas celulares de CG.*

9.2.1 Ensayos de viabilidad celular.

Los ensayos se realizaron con el propósito de analizar la resistencia a distintas concentraciones de agentes quimioterapéuticos utilizados en la terapia FOLFOX.

-En el caso de 5-Fluorouracilo (5-FU) se logró observar una disminución de la viabilidad celular en ambas líneas a medida que se aumenta la concentración del quimioterapéutico. Sin embargo, se puede observar en las primeras tres concentraciones (12.5, 25 y 50 [uM]) hay una tendencia significativa a que la línea celular AGS tenga una mayor viabilidad celular en comparación a MKN-45, lo que se puede relacionar a que esta línea celular, en comparación a MKN-45, es más resistente a la acción del químico. En el último punto de concentración (100 [uM]) esta tendencia también se presenta, pero al ser una concentración muy elevada la resistencia de las células es débil y por ende la diferencia que se presenta entre las dos líneas celulares no es significativa.

En el caso del ensayo de viabilidad con incubación de Oxaliplatino (Ox.) se observó algo similar a lo visto con 5-FU. Las mediciones de viabilidad celular en las dos primeras concentraciones (20 y 40 [uM]) fueron significativamente más altas en las AGS, haciéndolas más resistente al tratamiento con oxaliplatino. Dicha tendencia se mantuvo en los siguientes puntos (60 y 80 [uM]), pero debido a las elevadas concentraciones del fármaco la muerte celular aumentó, no alcanzando la diferencia estadísticamente significativa al compararse con MKN-45. En la **figura 5** se observan los resultados de los ensayos de viabilidad celular con los quimioterapéuticos en incubaciones independientes.

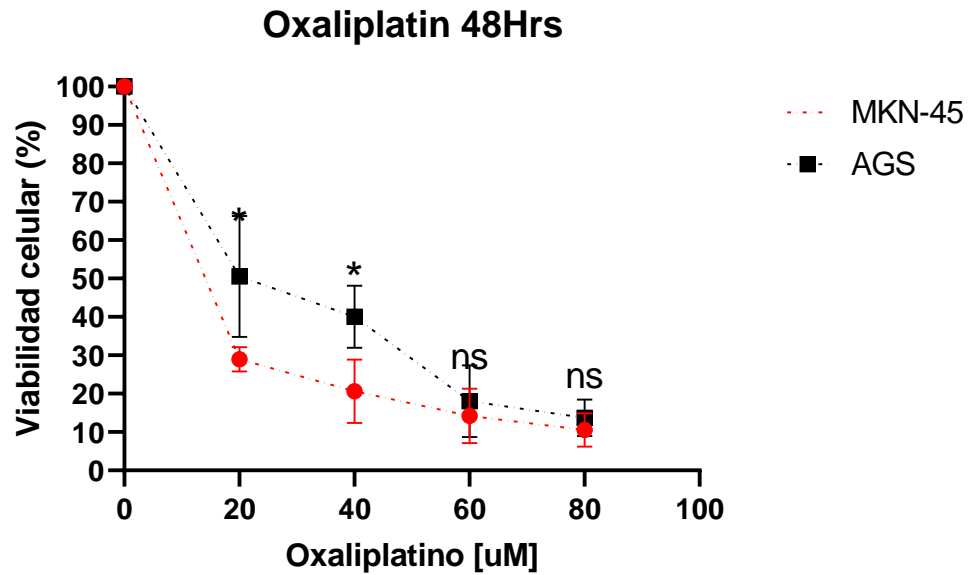
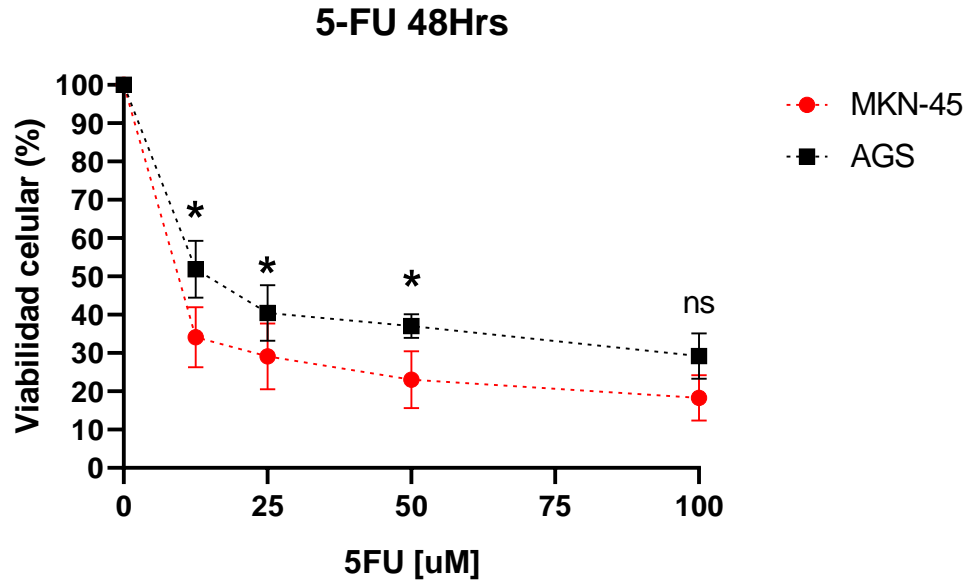
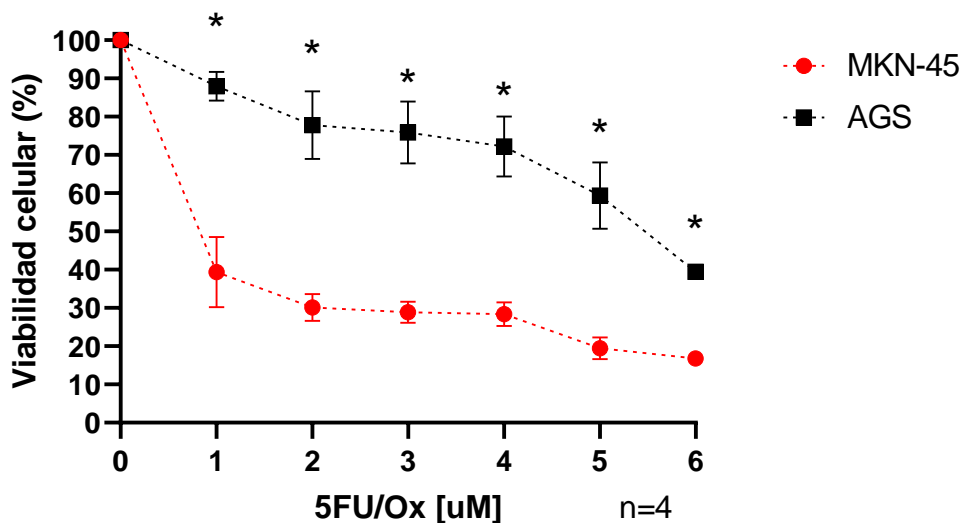


Figura 5. Ensayos de viabilidad celular en dos líneas celulares de CG posterior a incubaciones independientes con quimioterapéuticos. (A) 5000 células, MKN-45 y AGS, en crecimiento exponencial fueron tratadas con una serie de concentraciones de 5-FU (0, 12.5, 25, 50 y 100 [uM]) **(B)** 10000 células, MKN-45 y AGS, en crecimiento exponencial fueron tratadas con una serie de concentraciones de oxaliplatino (0, 20, 40, 60 y 80 [uM]). Las diferencias significativas se calcularon utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, * $P \leq 0.05$. ns = no hay diferencia significativa.

Finalmente, se realizó un ensayo de viabilidad celular con la combinación de los 2 fármacos (5FU/Ox), con la finalidad de evaluar a las líneas de cáncer gástrico con un tratamiento sinérgico que se asemeje a lo que ocurre en la terapia FOLFOX aplicada a los pacientes. Las concentraciones de químicos utilizadas en cada grupo de células fueron aumentando de manera similar a lo visto anteriormente en la **figura 10**.

Posterior las 48 horas de incubación y la medición, se obtuvieron resultados que se asemejan a lo anteriormente presentado en **9.3.1**, ya que, se logra observar que la línea celular AGS presenta una significativa mayor resistencia al tratamiento con los dos químicos al aumentar las concentraciones de ambos. Al comparar con MKN-45, se logró observar una diferencia significativa de viabilidad celular en AGS en todos los puntos de concentración realizados. Habiendo una diferencia promedio de 35% de mayor viabilidad celular en la línea AGS al promediar las diferencias encontradas en cada punto. Cabe recalcar, que debido a que en este experimento se trabajaron con 15.000 células (en vez de 10.000, ver **8.6 en Materiales y Métodos**) la viabilidad celular de este MTT es similar a la vista en los experimentos presentados en la **figura 5**. Estos resultados nos ayudan a concluir que la línea AGS, que posee una mayor expresión de SOX5 y (por lo visto en **9.2**) presenta un fenotipo de agresividad mayor (al comparar con la línea MKN-45) es más resistente a tratamiento con los quimioterapéuticos de la terapia FOLFOX, siendo esta con sus agentes por separado, como de manera sinérgica. Los resultados de este último ensayo de viabilidad celular, junto con las concentraciones utilizadas para cada química, se pueden visualizar en la **figura 6**.

5FU/Oxaliplatin 48 HRS



[uM]	1	2	3	4	5	6
5-FU	12,5	12,5	25	50	60	100
Oxaliplatine	0	20	20	20	40	60

Figura 6. Ensayo de viabilidad celular en dos líneas de CG con incubaciones sinérgicas de quimioterapéuticos de la terapia FOLFOX por 48 horas. (A) 15000 células en crecimiento exponencial fueron tratadas con una serie de concentraciones de 5-FU (0-100 [uM]) y Oxaliplatino (0-60 [uM]). Luego de 48 horas, el reactivo MTT fue utilizado para la medición de viabilidad celular. (B) Concentraciones de cada químico utilizada en cada punto de concentración expuesto en (A). Las diferencias significativas se calcularon utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, * $P \leq 0.05$.

9.3 Objetivo Específico 3.

Objetivo específico 3: Asociar la presencia de SOX5 con marcadores de CSC y MDR en líneas celulares.

9.3.1. Expresión de factores de transición epitelio-mesénquima (TEM)

Una vez confirmada la expresión y localización del factor de transcripción SOX5 en las dos líneas de cáncer gástrico anteriormente descritas, se procedió a detectar marcadores que podrían estar asociados a un fenotipo mesenquimal o de cáncer agresivo (resistencia a terapia, invasividad y migración). Para esto, se comenzó realizando mediciones de los transcritos y nivel de proteínas de los marcadores canónicos de la transición epitelio-mesenquimal como son: Vimentina, ZEB1 y SNAIL (mesenquimal) y E-Cadherina (epitelial).

En relación con los marcadores mesenquimales, se observó que existía expresión de estas proteínas en las dos líneas, con la aclaración de que, para los tres factores analizados, se encontraba una mayor expresión de estos en la línea celular AGS, siendo en los tres casos una diferencia significativa al compararlo con los niveles en MKN-45. Cabe destacar que la línea AGS es también la que presentaba una mayor expresión de nuestro factor de transcripción de interés, SOX5. Similares resultados se encontraron al hacer las mediciones de los transcritos de las tres proteínas (Vimentina, ZEB1 y SNAIL) En todos los casos se observó una tendencia en la que AGS presentaba mayores niveles de estos RNAs, con la importante distinción de que en SNAIL y ZEB1 esta diferencia (al igual a lo ocurrido con las respectivas proteínas) era significativa, mientras que en el caso de la vimentina esta no fue una diferencia significativa, todo esto al comparar con la línea MKN-45. Los resultados de tanto los qPCR, los WB y sus imágenes representativas respectivas, pueden ser visualizadas en la **figura 7**.

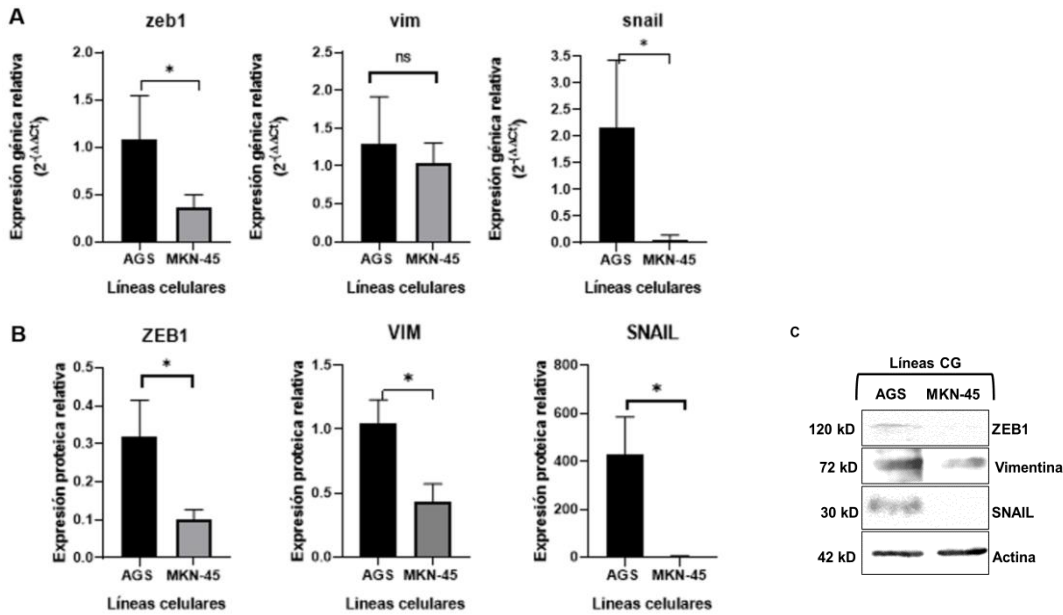


Figura 7. Expresión de factores mesenquimales dos líneas de CG. (A) Expresión relativa de los niveles del transcrito (RNAm) de los factores de la TEM, SNAIL, Vimentina y ZEB1 en las líneas de cáncer gástrico AGS y MKN-45. Para el análisis cuantitativo se utilizó el gen de *housekeeping* gapdh. **(B)** Cuantificación de la expresión relativa de las proteínas SNAIL, Vimentina y ZEB1 en las líneas celulares AGS y MKN-45, se utilizó como proteína de referencia a Beta-Actina. **(C)** Imagen representativa de los resultados obtenidos de la cuantificación de la expresión proteica. Se puede observar las bandas de las proteínas de interés y sus respectivos pesos moleculares en kD (a la derecha de la imagen). Los datos se muestran como promedio \pm desv. estándar (n=4). Las diferencias significativas se calcularon utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, * $P \leq 0.05$.

Con respecto al marcador epitelial E-Cadherina, se observó el caso contrario a lo descrito anteriormente con los factores mesenquimales. Se observó que la expresión del transcrito era significativamente mayor en la línea MKN-45, en comparación con la línea AGS. Complementando lo obtenido anteriormente, existe una mayor expresión de la proteína de E-Cadherina en la misma línea MKN-45, siendo significativa al compararse con las células AGS. La mayor expresión de este marcador en MKN-45, tanto en transcrito como en proteínas, nos estaría indicando que esta línea celular cancerosa presenta mayores propiedades epiteliales que AGS, lo que tiene sentido al observar los valores de expresión encontrados para los factores mesenquimales presentes en la transición (ver **figura 7**).

Complementariamente se realizaron inmunofluorescencias para la detección del marcador E-Cadherina en las dos líneas celulares anteriormente mencionadas. Cabe destacar que E-Cadherina es una proteína de adhesión celular, que se localiza canónicamente en la membrana plasmática, esto anteriormente descrito es lo que se puede observar en las inmunofluorescencias tomadas en MKN-45, mientras que en la línea AGS hay una expresión tenue y localizada mayoritariamente en el citoplasma de la célula. Los resultados de los experimentos asociados a la detección de E-Cadherina junto a sus imágenes representativas se pueden en la **figura 8**.

Los resultados presentados hasta ahora en este objetivo nos ayudan a concluir que la línea celular AGS, que presenta una mayor expresión del factor de transcripción SOX5, presenta un fenotipo más cercano a uno mesenquimal, al compararse con MKN-45, que presenta características cercanas a las de una célula epitelial.

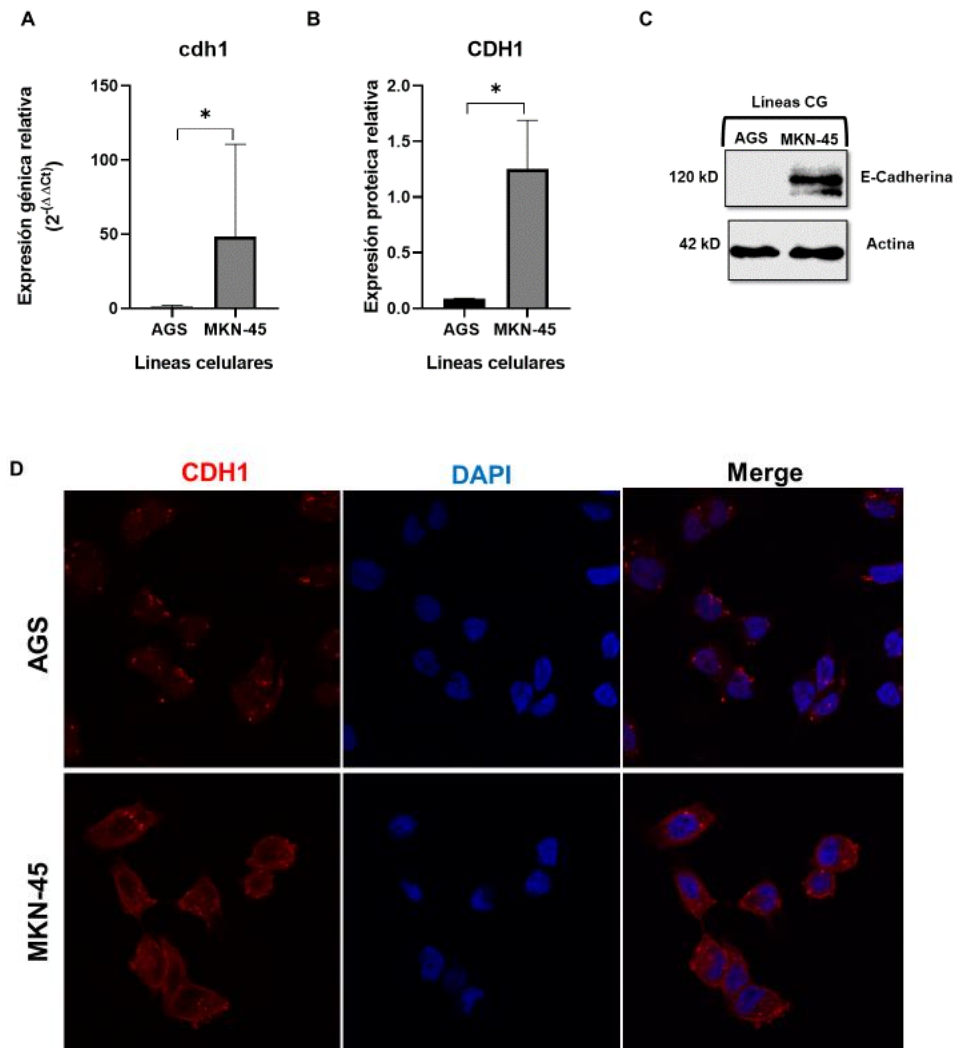


Figura 8. Expresión del marcador E-Cadherina en dos líneas de CG. (A) Expresión relativa de los niveles del transcrito (RNAm) de la proteína E-Cadherina en las líneas de cáncer gástrico AGS y MKN-45. Para el análisis cuantitativo se utilizó el gen de *housekeeping gapdh*. (B) Cuantificación de la expresión relativa de la proteína E-Cadherina en las líneas celulares AGS y MKN-45, se utilizó como proteína de referencia a Beta-Actina. (C) Imagen representativa de los resultados obtenidos de la cuantificación de la expresión proteica (D) IF representativa para la detección de E-cadherina en AGS y MKN-45. Se trabajó con un microscopio confocal y las imágenes fueron tomadas con un lente 60X Los datos se muestran como promedio \pm desv. estándar (n=4). Las diferencias significativas se calcularon utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, * $P \leq 0.05$.

9.3.2. Expresión y localización de TWIST en las dos líneas celulares

Siguiendo con el segundo objetivo, y acorde a lo descrito exhaustivamente en el estado del arte de este proyecto, se debió analizar el segundo factor de transcripción de interés para esta investigación, el regulador maestro de la transición epitelio mesénquima, Twist (gen Twist1). Como en los objetivos anteriores, se realizó medición del transcrito (gen) como también de la proteína con las técnicas de qPCR y Western Blot, respectivamente. A esto se le agregó un análisis de cuantificación y localización de la proteína de interés a través de inmunofluorescencia. Este último análisis se realizó de manera similar a lo descrito en el punto **9.1.2**.

Con respecto a las mediciones del transcrito del gen de TWIST, se observó que existen en ambas líneas celulares una expresión de este, con la distinción de que hay una significativa mayor expresión del gen en la línea celular MKN-45, al compararse con la expresión vista en AGS. De todas formas, resulta importante destacar lo observado a nivel proteico, donde en los resultados del Western Blot se indica una mayor significativa expresión de la proteína TWIST en la línea AGS. Complementando lo anterior, también se observó en la inmunofluorescencia una expresión más marcada del factor en la línea AGS, corroborándose esto con una medición de la intensidad de fluorescencia de TWIST en colocalización con el núcleo, donde se observó que esta también era significativamente mayor en la línea AGS, al compararla con MKN-45. Visualmente también se puede observar como en la zona del núcleo en las MKN-45 la señal es mucho más tenue en comparación al resto de la superficie celular, mientras que en las AGS ocurre todo lo contrario. Los resultados de tanto los qPCR, los WB, sus imágenes representativas respectivas y la inmunofluorescencia pueden ser visualizadas en la **figura 9**.

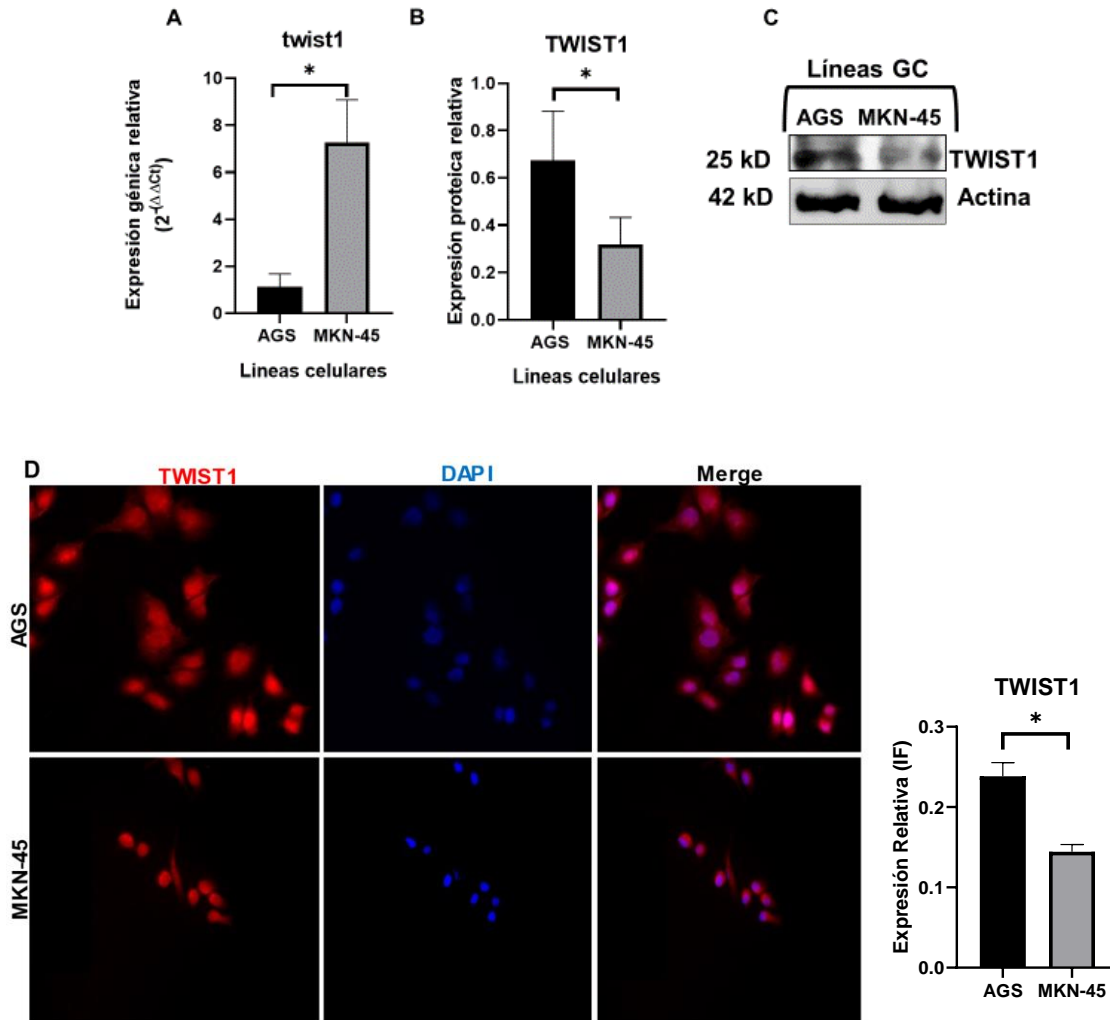


Figura 9. Expresión de TWIST en dos líneas de CG. (A) Expresión relativa de los niveles del transcrito (RNAm) de la proteína TWIST1 en las líneas de cáncer gástrico AGS y MKN-45. Para el análisis cuantitativo se utilizó el gen de *housekeeping* gapdh. (B) Cuantificación de la expresión relativa de la proteína TWIST1 en las líneas celulares AGS y MKN-45, se utilizó como proteína de referencia a Beta-Actina. (C) Imagen representativa de los resultados obtenidos de la cuantificación de la expresión proteica (D) IF representativa para la detección de TWIST1 en AGS y MKN-45. Se trabajó con un microscopio de fluorescencia y las imágenes fueron tomadas con un lente 40X. (E) Cuantificación de los niveles de fluorescencia nucleares del factor de transcripción en ambas líneas celulares anteriormente mencionadas. Los datos se muestran como promedio \pm desv. estándar (n=4). Las diferencias significativas se calcularon utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, * $P \leq 0.05$.

9.3.3. Expresión de marcadores de células madre cancerosas (CSCs)

Para la caracterización de marcadores de un fenotipo de troncalidad o *Stem Cell* se consideraron los marcadores de superficie a las glicoproteínas/antígenos CD44 y CD133. Con respecto al CD44 se observó que ambas líneas celulares poseían expresión tanto de transcrito como de proteínas de CD44. Sin embargo y a diferencia de la tendencia mostrada anteriormente, se observó que el RNA mensajero de esta proteína posee una expresión significativamente mayor en la línea celular MKN-45. Además, la expresión de esta proteína es mayor en las células MKN-45, sin embargo, esta diferencia no es significativa al compararse con la línea AGS.

Con respecto a la glicoproteína CD133, se observó que esta, a diferencia de CD44, poseía una expresión transcrita significativamente mayor del transcrito en la línea AGS cuando se compara con la línea MKN-45. Acorde a esto, se observó que la expresión de la glicoproteína también era significativamente mayor en AGS. (ver resultados en **figura 10**)

Parcialmente podemos concluir que ambas líneas celulares tienen una expresión diferenciada de distintos marcadores de troncalidad, destacando que la línea con una mayor expresión de SOX5 y fenotipo mesenquimal, también posee una mayor expresión de antígenos específicos de células madre cancerosas, en nuestro caso de CD133.

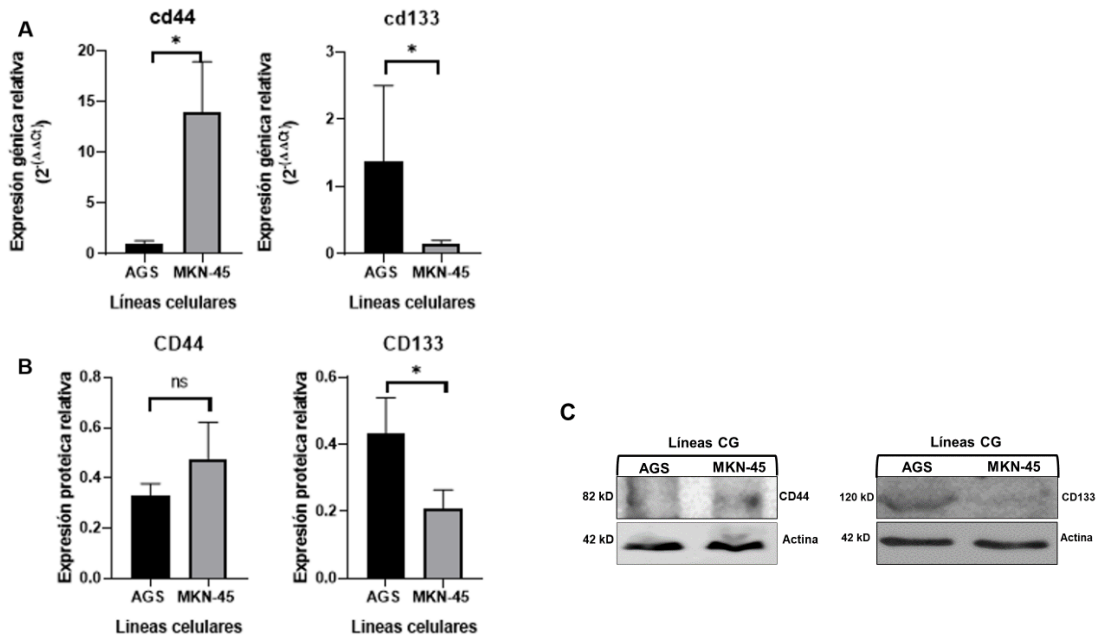


Figura 10. Expresión de marcadores de troncalidad en dos líneas de CG. (A) Expresión relativa de los niveles del transcrito (RNAm) de los factores CSC, CD44 y CD133 en las líneas de cáncer gástrico AGS y MKN-45. Para el análisis cuantitativo se utilizó el gen de *housekeeping* gapdh. (B) Cuantificación de la expresión relativa de las glicoproteínas CD44 y CD133 en las líneas celulares AGS y MKN-45, se utilizó como proteína de referencia a Beta-Actina. (C) Imagen representativa de. Los datos se muestran como promedio \pm desv. estándar (n=4). Las diferencias significativas se calcularon utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, * $P \leq 0.05$. ns= no hay diferencia significancia.

9.3.4. Expresión de marcadores de fenotipo multi-resistencia a drogas (MDR)

En relación con los distintos marcadores que se han asociado con un fenotipo de multiresistencia a drogas (MDR), así como también de proteínas de reparación del DNA relacionadas con resistencia a distintos agentes quimioterapéuticos; se evaluaron la glicoproteína P (P-gp, gen *abcb1*) y las proteínas de reparación XPD y XRCC1.

Con respecto a la medición del transcrito de glicoproteína P (gen *abcb1*), se observó que se presenta una expresión significativamente mayor de este gen en la línea celular AGS, en comparación con MKN-45. Resultados similares se observaron al analizar la expresión de transcrito y proteico de XRCC1 y XPD, donde en ambos casos, se observó una expresión significativamente mayor de transcrito y proteínas en la línea celular AGS (Ver **figura 11**). Estos resultados confirman que la línea AGS **(1)** presenta un fenotipo más mesenquimal al presentar una mayor expresión de mediadores de la TEM **(2)** una expresión diferenciada de antígenos de CSC CD44 y CD133 y **(3)** un fenotipo más marcado de resistencia a drogas (MDR) debido a los elevados valores de transcrito de P-gp y proteínas XPD y XRCC1. Todo lo anterior al compararse con la línea celular MKN-45

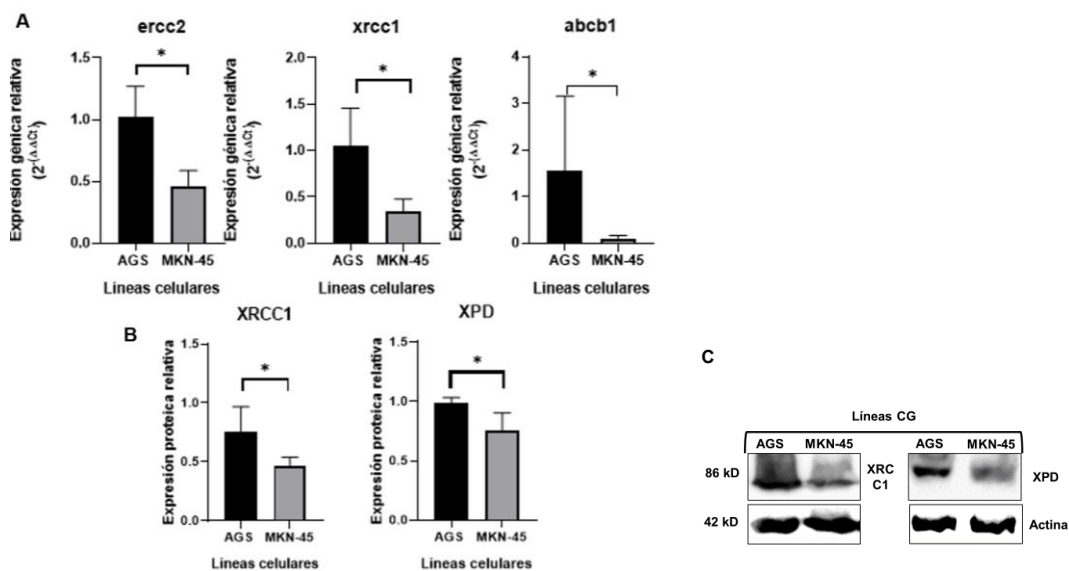


Figura 11. Expresión de marcadores de resistencia en dos líneas de GC. (A) Expresión relativa de los niveles del transcrito (RNAm) de los factores MDR y de resistencia, abcb1, ercc2 y xrcc1 en las líneas de cáncer gástrico AGS y MKN-45. Para el análisis cuantitativo se utilizó el gen de *housekeeping* gapdh. **(B)** Cuantificación de la expresión relativa de las glicoproteínas XPD y XRCC1 en las líneas celulares AGS y MKN-45, se utilizó como proteína de referencia a Beta-Actina. **(C)** Imagen representativa de. Los datos se muestran como promedio \pm desv. estándar (n=4). Las diferencias significativas se calcularon utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, * $P \leq 0.05$.

10. Discusión

El rol del factor de transcripción SOX5 ha sido descrito ampliamente en distintos tipos de cánceres. Una elevada expresión en cáncer de próstata, de hígado y pulmón ha sido asociado a una mayor proliferación celular, fenotipo invasivo y desarrollo de metástasis (Grimm *et al*, 2020). Específicamente en CG, la expresión de genes de la familia SOX se había asociado con el desarrollo de un fenotipo agresivo, debido a la sobreexpresión de las proteínas SOX2 y SOX4 (Abadi *et al*, 2021). La aparición de SOX5 como un potencial marcador de agresividad en el CG se generó cuando se analizó en tejidos y líneas celulares comerciales, donde se concluyó que a través de la activación de la proteína TWIST se podía inducir la TEM (You, *et al* 2019).

La detección de SOX5 indica que las células AGS presentan una mayor expresión de transcrito y de su proteína, al comparar con MKN-45. Se ha descrito que SOX5 puede ser marcador de prognosis negativo y del desarrollo de metástasis (Chen *et al* 2015). Es importante destacar que, en la literatura, se describe que la línea AGS corresponde a una línea celular de tumor primario (ubicada en el estómago) (Amini-Sarteshnizi *et al*, 2015) mientras que la línea MKN-45 de metástasis positiva hepática (Liu *et al*, 2013), como se destacó en lo escrito por You, *et al* (2019) y lo mencionado en otros tipos de cánceres, SOX5 es un factor que presenta mayor expresión en tejidos metastásicos (ya que promueve la TEM), por lo que encontrar los niveles de SOX5 elevados en la línea celular de GAC de tumor primario y no en la línea metastásica puede resultar contradictorio. Esto se puede explicar debido a que, al trabajar con líneas cancerosas comerciales (sistema *in vitro*) se tiene en conocimiento que los resultados obtenidos no siempre se aproximan a lo que se espera en un modelo con tejido humano o *in vivo*. El perfil de transcriptomas y proteomas que se pueden encontrar en una línea celular pueden diferir con lo que se puede encontrar con un tumor *in vivo* (Mirabelli *et al*, 2019). Complementando lo anterior, se ha descrito en literatura el proceso de Transición Mesénquima-Epitelio (TME), en el cual las células metastásicas recuperan propiedades y marcadores epiteliales para así poder colonizar un sitio metastásico (Guo *et al*, 2014), que, en el caso de CG, suele ser en el hígado (Qiu *et al*, 2018). Esta información hace relevante la exhaustiva caracterización de marcadores y FTs que se realizó en el **objetivo específico 3** de este proyecto. Así, nosotros basaremos los siguientes análisis de los resultados con lo

obtenido de nuestra caracterización y no de la literatura descrita para los casos *in vivo* de metástasis y/o tumor primario.

Se encontró una mayor expresión de los factores de transcripción SNAIL, ZEB1 y del marcador mesenquimal Vimentina en la línea cancerosa AGS, la misma con una mayor expresión de SOX5. En distintos cánceres (incluyendo GC) ZEB1 y SNAIL se han descrito ampliamente como factores que responsables de la reprogramación celular de células de un fenotipo epitelial a uno mesenquimal, generando células alargadas similares a los fibroblastos (Murai *et al*, 2014). Este cambio celular facilita que las células cancerosas pueden tener una mayor movilidad e invasión (Yang *et al*, 2006), promoviendo así la llegada del tumor a zonas distantes al origen primario del cáncer en lo que conocemos como metástasis. Vimentina como marcador mesenquimal en GC se ha asociado con un peor pronóstico en pacientes (Otsuki *et al*, 2011), por lo que estos resultados refuerzan la idea de que nuestras líneas de cáncer con SOX5 elevado podrían asociarse a un fenotipo más agresivo de cáncer.

Una de las maneras en que los FTs asociados a la TEM logran reprogramar las células epiteliales a un fenotipo mesenquimal es a través de la represión de la E-Cadherina (Murai *et al*, 2014). Este marcador epitelial tiene la función de mantener la polaridad celular y la adhesión célula-célula en el epitelio (Shenoy, 2019). Por lo que, en condiciones normales, esta glicoproteína presenta una mayor expresión en la membrana plasmática de una célula epitelial. (La pérdida de la expresión de E-Cadherina está fuertemente enlazada con el desarrollo de un fenotipo mesenquimal, debido a que, la célula, al perder adherencia y polaridad con otras células, ganan más motilidad y capacidad de invadir otras zonas del organismo (Chan, 2006). Nuestros resultados del objetivo **9.3.1** exponen que la línea AGS, al compararla con MKN-45 presenta una significativa menor expresión de este factor epitelial (**figura 8**). Esto nos ayuda a complementar los resultados presentados anteriormente, ya que ahora tenemos claridad en que nuestra línea celular cancerosa con una alta expresión de SOX5 (AGS) presenta también un mayor fenotipo mesenquimal en comparación a la línea MKN-45.

Por otro lado, los resultados asociados a las células madre cancerosas (CSCs), apuntan a una mayor expresión de CD133, tanto a nivel génico como proteico, en la línea AGS. En CG, la presencia de CD133⁺ se ha asociado con mal prognosis, recurrencia del tumor, crecimiento

del tumor y generación de quimio resistencia (Soleimani, *et al* 2022). Características similares se pueden asociar con células que expresan CD44⁺ (Ojha *et al*, 2015), caso que ha tenido un estudio más extenso en líneas de CG comerciales, donde se ha destacado en estudios de caracterización como la línea MKN-45 tiende a tener una mayor expresión de dicho antígeno, siendo utilizado usualmente como modelo de CD44⁺ para el estudio de terapias contra el avance de la agresividad del CG (Takaishi *et al*, 2009). Es importante destacar que, en estas caracterizaciones, los factores de TEM destacados anteriormente presentan una mayor expresión en MKN-45 que la descrita en este proyecto, por lo que no se debería comparar el fenotipo de agresividad de nuestra línea utilizada con la que fue utilizada en esos artículos, aunque la expresión de los antígenos CSC sean distintos. De todas formas, al analizar los niveles proteicos de la línea AGS, se pudo determinar que es una línea CD44⁺, esto, sumado a que también es una línea CD133+, lo que nos estará indicando que AGS presenta un fenotipo de cáncer agresivo, que, por lo visto en literatura, podría tener además de características invasivas, mayores propiedades en proliferación y resistencia a la terapia.

En relación con el fenotipo resistente a drogas (MDR), nuestros resultados indican que en la línea AGS existe una mayor expresión del transcrito de glicoproteína-p (p-gp) junto con una mayor expresión de las proteínas de reparación del ADN XRCC1 y XPD. Con respecto al transportador p-gp, se ha visto que este está asociado con la expulsión de fármacos hacia el espacio extracelular y que su alta expresión se puede relacionar con una prognosis baja en un paciente con GC debido a una adquisición de resistencia la terapia (Zhang, *et al*, 2007). Específicamente, se ha visto que podría generar resistencia a el tratamiento con químicos derivados del platino (oxaliplatino, cisplatino) (Jiang *et al*, 2021). Sobre la mayor expresión de ERCC2/XPD, estudios recientes en pacientes de CG con invasión localizada y/o metástasis mostraron que, el tener una sobreexpresión de esta proteína en el tejido gástrico podría estar fuertemente relacionado con una baja efectividad de la terapia FOLFOX, por ende, estar presentando mayor quimioresistencia a la terapia (Yeh *et al*, 2020). Sobre XRCC1, se ha observado que el reclutamiento de esta proteína a sitios de daño al DNA producidos por la acción del quimioterapéutico cisplatino, podría evitar la apoptosis celular y por ende generar resistencia a la terapia (Xu *et al*, 2018). Hasta la fecha, no existe en la literatura información que asocie de manera directa la sobreexpresión de estas proteínas con

SOX5, aunque, de acuerdo con nuestros resultados, podemos analizar que la línea celular con una mayor expresión de SOX5 y que ya observamos, posee un fenotipo mesenquimal más marcado, presenta una mayor expresión de estas proteínas marcadoras de la resistencia a FOLFOX y a cisplatino respectivamente.

También se analizó al regulador maestro de la TEM TWIST1, factor esencial en el paso a un fenotipo mesenquimal al asociarse con SOX5. *In vivo*, este factor de transcripción se ha asociado con invasión y migración en nódulos linfáticos (Zhu *et al*, 2015) en etapas avanzadas de CG. En otros tipos de cánceres, como de vesícula biliar, se ha visto directamente como este factor puede favorecer la sobreexpresión de la glicoproteína P y, por ende, ayudar a la quimioresistencia en estas células (Chen *et al*, 2012). Similar a lo encontrado con SOX5, se observó una mayor expresión de proteína TWIST en la línea AGS, ubicada preferentemente en el núcleo en comparación a lo visto en MKN-45. Esto indicaría, que la línea AGS presenta un fenotipo más agresivo, invasivo y mesenquimal en comparación a MKN-45, complementando los resultados previamente analizados. De todas formas, es importante mencionar lo que se observó con la expresión del transcrito de TWIST1 en ambas líneas celulares, donde MKN-45 presentó una significativa mayor expresión de RNAm en comparación a AGS. Una posible explicación a esta situación tiene relación con las regulaciones postranscripcionales que pueden ocurrir en células cancerosas y que, por ende, podrían justificar la relación inversa entre transcrito/proteína que se encontró. En distintos tipos de cáncer, incluyendo GC, se ha descrito exhaustivamente como los RNAs no codificantes podrían funcionar como represores de la expresión proteica de factores de transcripción asociados con el desarrollo de la TEM, a través de la degradación del RNA o la supresión del proceso de traducción (Bure *et al*, 2019). Se ha observado en la literatura que RNAs no codificantes con un rol supresor de tumores como MEG3 y BM742401 se encuentran disminuidos en su expresión en líneas con fenotipos más mesenquimales (Fang, *et al*, 2015). La explicación, entonces, a la relación inversa en nuestros valores de transcrito y proteínas en TWIST, podría recaer en que en MKN-45, al ser una línea con un fenotipo preferentemente epitelial de acuerdo con lo visto en nuestra caracterización podría tener una mayor expresión de RNAs no codificantes que estarían regulando post-transcripcionalmente la expresión de la proteína TWIST. Algunos de los RNAs no codificantes que tienen como blanco a TWIST y que, además, se encuentran mayormente expresados en células con un

fenotipo epitelial (similar a lo que obtuvimos con la línea MKN-45) son los siguientes: miR-186, miR-519d y miR-495. Cabe mencionar que pueden existir más RNAs en las líneas de cáncer, pero estos mencionados anteriormente ya han sido analizados en tejido de cáncer gástrico (Ghafouri-Fard *et al*, 2021). Otra explicación a estos valores proteicos de TWIST1 tiene relación con la regulación postraducciona que puede tener este factor. En casos de TME, se ha descrito que para que la célula recupere características epiteliales, esta debe degradar proteínas asociadas con fenotipos mesenquimales, siendo una de estas TWIST1 (Kang *et al*, 2021). Fosforilaciones vía AKT en los residuos Ser42 y Thr121 producen la degradación vía ubiquitinación de la proteína (Vichalkovski *et al*, 2010), favoreciendo la vuelta a un fenotipo epitelial. Lo último podría explicar los valores de Twist en MKN-45 en el contexto de los marcadores analizados **en el objetivo 3** (Baja expresión de marcadores mesenquimales, alta de epiteliales, en comparación con AGS).

Finalmente, los tres ensayos de viabilidad celular, caracterizados por la presencia de (1) 5-FU, (2) Oxaliplatino y (3) 5-FU+Oxa, dieron resultados similares. En los tres casos se observó que la línea AGS era más resistente a la aplicación de estos quimioagentes, mientras que MKN-45 presentaba una mayor sensibilidad a estos, en especial cuando a esta línea celular se le trató con Oxaliplatino o a la combinación de ambos (régimen que buscaba asemejarse a la terapia FOLFOX). Durante el desarrollo de este análisis ya se ha fundamentado las propiedades de AGS que justifican su mayor resistencia a la terapia. Esto, se podría justificar con la mayor expresión de marcadores y factores de transcripción mesenquimales, presencia de marcadores de troncalidad como CD44 y CD133, alta expresión de proteínas asociadas a resistencia a compuestos propios del régimen FOLFOX (como lo son p-gp, XPD y XRCC1) y la expresión positiva y aumentada de proteínas esenciales en la regulación de los procesos de invasión y migración como lo es TWIST1. La expresión elevada de SOX5 y su rol en el desarrollo de un fenotipo de cáncer agresivo ha sido descrito en distintos tipos de cáncer, incluyendo próstata, colon e hígado. En este trabajo, se logró ampliar aún más el rol que podría tener este factor de transcripción en el desarrollo de cáncer gástrico, ya que logramos asociar de manera directa su expresión con la quimioresistencia a una de las terapias más utilizadas en Chile y el mundo para mantener controlada el avance de la enfermedad, como lo es el régimen FOLFOX. En la **figura 12** se

muestra, de manera resumida, los resultados obtenidos en este proyecto, señalando la importancia de estos para la generación de resistencia en GC.

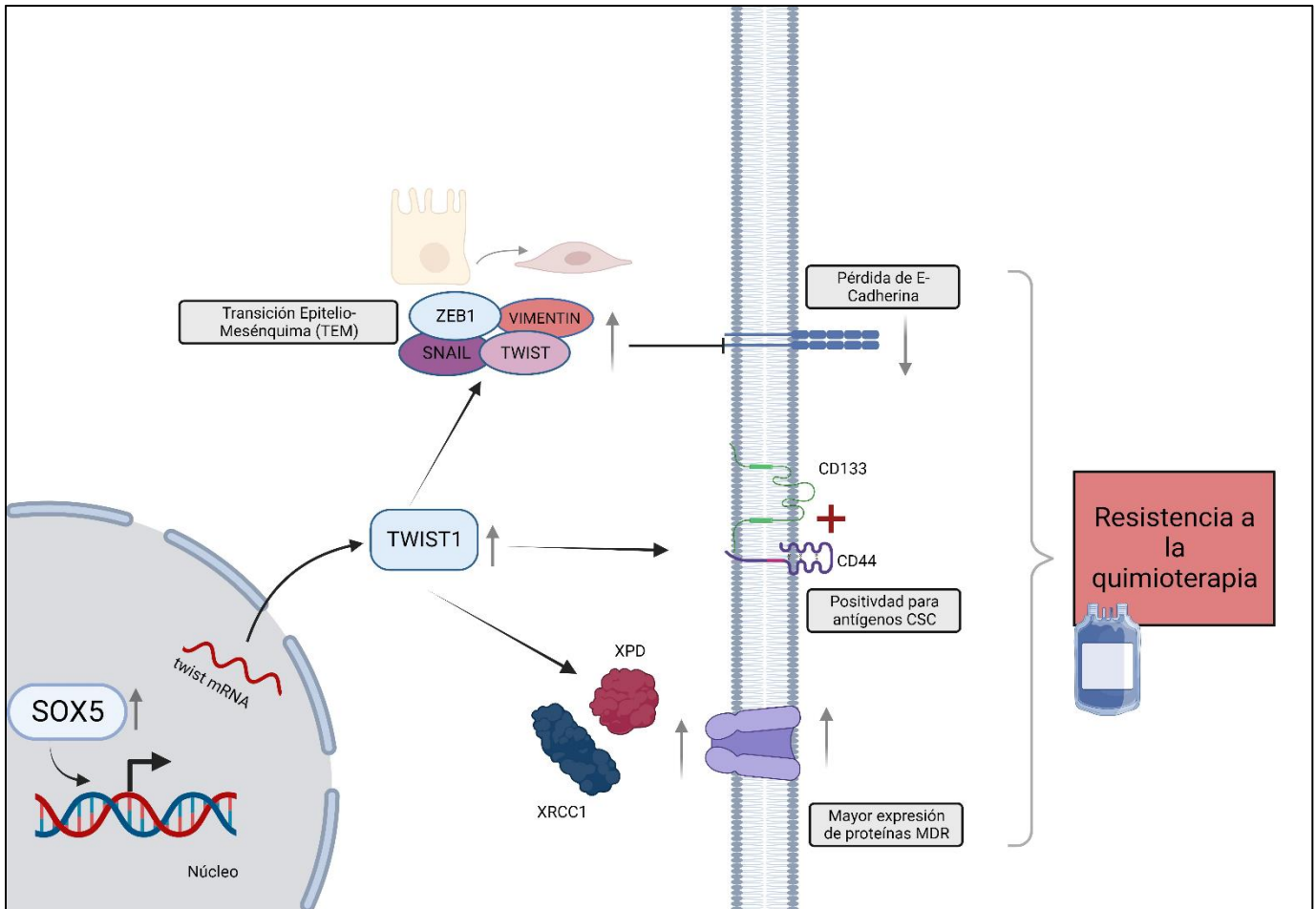


Figura 12. Modelo gráfico de los resultados obtenidos. La sobreexpresión del factor de transcripción SOX5 y la activación de TWIST1 está asociado con la generación de quimioresistencia en CG debido al desarrollo de la TEM, aparición de fenotipo de troncalidad en las células cancerosas y el aumento de la expresión de proteínas asociadas al fenotipo de MDR. Figura realizada por Biorender.

11. Conclusiones

- La expresión del factor de transcripción SOX5 se puede relacionar con la expresión de factores reguladores y marcadores de la TEM (TWIST1, SNAIL, ZEB1, E-cadherina) y antígenos de fenotipo CSC (CD44 y CD133), generando un fenotipo de célula cáncer mesenquimal, caracterizado por la pérdida de factores epiteliales y la adquisición de propiedades de MDR (Alta expresión de p-gp, XRCC1 y XPD).
- Una mayor expresión del factor de transcripción SOX5 se puede relacionar con la resistencia a terapia con agentes de platino (Oxaliplatino), como también a 5-Fluoracilo en régimen independiente como también en terapia FOLFOX. Lo que se puede relacionar con el aumento en los niveles de proteínas asociadas a quimioresistencia en una de las líneas de cáncer gástrico estudiadas.
- Se comprueba nuestra hipótesis, ya que logramos asociar la expresión del factor de transcripción SOX5 y el regulador de la TEM, Twist 1, con la quimioresistencia al régimen FOLFOX en dos modelos in vitro de cáncer gástrico.

12. Proyecciones

- Los resultados de este proyecto podrían ser de gran importancia para la salud pública, ya que al conocer la relación entre los niveles de SOX5 y la resistencia a ciertos tipos de quimioterapia se podría comenzar a promover la utilización de dicho factor de transcripción como un biomarcador que ayude a promover el uso de terapias alternativas contra el cáncer gástrico, dependiendo de los niveles de proteína que presente dicho paciente. Esto podría desarrollarse al trabajar con muestras de tejidos extraídas de biopsias.
- Sería de gran interés hacer análisis de los RNA no codificantes que podrían estar asociados a los niveles de TWIST y SOX5 encontrados en las dos líneas de cáncer gástrico. Ya que, actualmente, estas son las moléculas que se están promoviendo para que sean utilizadas como biomarcador de la prognosis de la enfermedad. Mediciones de microRNAs en biopsias que se conozcan que tengan como blanco a SOX5 o a Twist1 podrían asociarse a la quimio resistencia que podría estar generando un paciente.

13. Bibliografía:

- Abadi, A. J., Zarrabi, A., Hashemi, F., Zabolian, A., Najafi, M., Entezari, M., ... & Hamblin, M. R. (2021). The role of SOX family transcription factors in gastric cancer. *International journal of biological macromolecules*, 180, 608-624.
- American Cancer Society. (2019, 27 febrero). Quimioterapia para el cáncer de estómago. Recuperado 19 de noviembre de 2021, de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-destomago/tratamiento/quimioterapia.html>
- Amieva, M., & Peek Jr, R. M. (2016). Pathobiology of Helicobacter pylori–induced gastric cancer. *Gastroenterology*, 150(1), 64-78.
- Amini-Sarteshnizi, N., Mobini-Dehkordi, M., Khosravi-Farsani, S., & Teimori, H. (2015). Anticancer activity of ethanolic extract of propolis on AGS cell line. *Journal of Herbmec Pharmacology*, 4(1), 29-34.
- Axon, A. (2006). Symptoms and diagnosis of gastric cancer at early curable stage. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 20(4), 697-708.
- Ajani, J. A., Lee, J., Sano, T., Janjigian, Y. Y., Fan, D., & Song, S. (2017). Gastric adenocarcinoma. *Nature reviews Disease primers*, 3(1), 1-19.
- Bowles, J., Schepers, G., & Koopman, P. (2000). Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Developmental biology*, 227(2), 239-255.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- Bukowski, K., Kciuk, M., & Kontek, R. (2020). Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3233.
- Bure, I. V., Nemtsova, M. V., & Zaletaev, D. V. (2019). Roles of E-cadherin and Noncoding RNAs in the Epithelial–mesenchymal Transition and Progression in Gastric Cancer. *International journal of molecular sciences*, 20(12), 2870.
- Chan, A. O. O. (2006). E-cadherin in gastric cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 12(2), 199.

- Chen, Y., Li, L., Zeng, J., Wu, K., Zhou, J., Guo, P., ... & He, D. (2012). Twist confers chemoresistance to anthracyclines in bladder cancer through upregulating P-glycoprotein. *Chemotherapy*, 58(4), 264-272.
- Chen, X., Fu, Y., Xu, H., Teng, P., Xie, Q., Zhang, Y., ... & Li, W. (2018). SOX5 predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma and promotes tumor metastasis through epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget*, 9(13), 10891.
- Chiaravalli, A., Cornaggia, M., Furlan, D., Capella, C., Fiocca, R., Tagliabue, G., ... & Solcia, E. (2001). The role of histological investigation in prognostic evaluation of advanced gastric cancer: analysis of histological structure and molecular changes compared with invasive pattern and stage. *Virchows Archiv*, 439, 158-169.
- Chhikara, B. S., & Parang, K. (2023). Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chemical Biology Letters*, 10(1), 451-451.
- Choi, I. S., Oh, D. Y., Kim, B. S., Lee, K. W., Kim, J. H., & Lee, J. S. (2007). Oxaliplatin, 5-FU, folinic acid as first-line palliative chemotherapy in elderly patients with metastatic or recurrent gastric cancer. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association*, 39(3), 99-103.
- Chun, H. J., Park, S. J., Lim, Y. J., & Song, S. Y. (2023). Screening of Gastric Cancer. In *Gastrointestinal Cancer: A Comprehensive Guide to Diagnosis and Management* (pp. 9-12). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Correa, P. (2013). Gastric cancer: overview. *Gastroenterology Clinics*, 42(2), 211-217.
- Csendes, A., & Figueroa, M. (2017). Situación del cáncer gástrico en el mundo y en Chile. *Revista chilena de cirugía*, 69(6), 502-507.
- Curtis, N. J., Noble, F., Bailey, I. S., Kelly, J. J., Byrne, J. P., & Underwood, T. J. (2014). The relevance of the Siewert classification in the era of multimodal therapy for adenocarcinoma of the gastro-oesophageal junction. *Journal of Surgical Oncology*, 109(3), 202-207.
- Da Silva, S. D., Morand, G. B., Alobaid, F. A., Hier, M. P., Mlynarek, A. M., Alaoui-Jamali, M. A., & Kowalski, L. P. (2015). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers have prognostic impact in multiple primary oral squamous cell carcinoma. *Clinical & experimental metastasis*, 32, 55-63.

- Deng, J. J., Zhang, W., Xu, X. M., Zhang, F., Tao, W. P., Ye, J. J., & Ge, W. (2016). Twist mediates an aggressive phenotype in human colorectal cancer cells. *International journal of oncology*, 48(3), 1117-1124.
- Dong, S., Yu, J. R., Zhang, Q., & Liu, X. S. (2016). Neoadjuvant chemotherapy in controlling lymph node metastasis for locally advanced gastric cancer in a Chinese population. *Journal of Chemotherapy*, 28(1), 59-64.
- Fang, X. Y., Pan, H. F., Leng, R. X., & Ye, D. Q. (2015). Long noncoding RNAs: novel insights into gastric cancer. *Cancer letters*, 356(2), 357-366.
- Fock, K. M., Talley, N., Moayyedi, P., Hunt, R., Azuma, T., Sugano, K., ... & Sollano, J. (2008). Asia-Pacific consensus guidelines on gastric cancer prevention. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 23(3), 351-365.
- Fock, K. M. (2014). The epidemiology and prevention of gastric cancer. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 40(3), 250-260.
- Garcia-Mayea, Y., Mir, C., Masson, F., Paciucci, R., & LLeonart, M. E. (2020, February). Insights into new mechanisms and models of cancer stem cell multidrug resistance. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 60, pp. 166-180). Academic Press.
- Ghafouri-Fard, S., Abak, A., Bahroudi, Z., Shoorei, H., Raza, S. H. A., & Taheri, M. (2021). The interplay between non-coding RNAs and Twist1 signaling contribute to human disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 135, 111220.
- Grimm, D., Bauer, J., Wise, P., Krüger, M., Simonsen, U., Wehland, M., ... & Corydon, T. J. (2020, December). The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 67, pp. 122-153). Academic Press.
- Guo, F., Parker Kerrigan, B. C., Yang, D., Hu, L., Shmulevich, I., Sood, A. K., ... & Zhang, W. (2014). Post-transcriptional regulatory network of epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions. *Journal of hematology & oncology*, 7(1), 1-11.
- Guzmán, B. S., & Norero, M. E. (2014). Cáncer gástrico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(1), 106-113.
- Gurubhagavatula, S., Liu, G., Park, S., Zhou, W., Su, L., Wain, J. C., ... & Christiani, D. C. (2004). XPD and XRCC1 Genetic Polymorphisms Are Prognostic Factors in

Advanced Non—Small-Cell Lung Cancer Patients Treated With Platinum Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 22(13), 2594-2601.

- Gürler, F., İlhan, A., Güven, D. C., Turhan, O., İnci, B. K., Sütçüoğlu, O., ... & Özet, A. (2022). Does docetaxel matter in metastatic gastric cancer? FOLFOX versus FLOT regimens as first-line treatment. *Anti-cancer drugs*, 33(1), e477-e485.
- Hartgrink, H. H., Jansen, E. P., van Grieken, N. C., & van de Velde, C. J. (2009). Gastric cancer. *The Lancet*, 374(9688), 477-490.
- Hashimoto, K., Aoyagi, K., Isobe, T., Kouhujii, K., & Shirouzu, K. (2014). Expression of CD133 in the cytoplasm is associated with cancer progression and poor prognosis in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 17, 97-106.
- Hu, B., El Hajj, N., Sittler, S., Lammert, N., Barnes, R., & Meloni-Ehrig, A. (2012). Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *Journal of gastrointestinal oncology*, 3(3), 251.
- Hu, J., Tian, J., Zhu, S., Sun, L., Yu, J., Tian, H., ... & Shang, Z. (2018). Sox5 contributes to prostate cancer metastasis and is a master regulator of TGF- β -induced epithelial mesenchymal transition through controlling Twist1 expression. *British journal of cancer*, 118(1), 88-97.
- Jiang, L., Zhang, Y., Guo, L., Liu, C., Wang, P., & Ren, W. (2021). Exosomal microRNA-107 reverses chemotherapeutic drug resistance of gastric cancer cells through HMGA2/mTOR/P-gp pathway. *BMC cancer*, 21(1), 1-16.
- et al
- Karimi, P., Islami, F., Anandasabapathy, S., Freedman, N. D., & Kamangar, F. (2014). Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 23(5), 700-713.
- Kim, W. T., & Ryu, C. J. (2017). Cancer stem cell surface markers on normal stem cells. *BMB reports*, 50(6), 285.
- Krejs, G. J. (2010). Gastric cancer: epidemiology and risk factors. *Digestive diseases*, 28(4-5), 600-603.
- Kubota, H., Kotoh, T., Masunaga, R., Dhar, D. K., Shibakita, M., Tachibana, M., ... & Nagasue, N. (2000). Impact of screening survey of gastric cancer on

clinicopathological features and survival: retrospective study at a single institution. *Surgery*, 128(1), 41-47.

- Lauwers, G. Y. (2003). Defining the pathologic diagnosis of metaplasia, atrophy, dysplasia, and gastric adenocarcinoma. *Journal of clinical gastroenterology*, 36(5), S37-S43.
- Lefebvre, V. (2010). The SoxD transcription factors—Sox5, Sox6, and Sox13—are key cell fate modulators. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(3), 429-432.
- Li, H., Wang, C., Lan, L., Wu, W., Evans, I., Ruiz, E. J., ... & Zhang, C. (2021). Oxaliplatin Compromised CDK1 Activity Sensitizes BRCA-Proficient Cancers to PARP Inhibition in Oxaliplatin Resistance Gastric Cancer.
- Liang, Q., Chu, F., Zhang, L., Jiang, Y., Li, L., & Wu, H. (2023). circ-LDLRAD3 knockdown reduces cisplatin chemoresistance and inhibits the development of gastric cancer with cisplatin resistance through miR-588 enrichment-mediated SOX5 inhibition. *Gut and Liver*, 17(3), 389.
- Liang, Z., Xu, J., & Gu, C. (2020, December). Novel role of the SRY-related high-mobility-group box D gene in cancer. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 67, pp. 83-90). Academic Press.
- Liu, A. N., Zhu, Z. H., Chang, S. J., & Hang, X. S. (2012). Twist expression associated with the epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *Molecular and cellular biochemistry*, 367, 195-203.
- Liu, J., Ma, L., Xu, J., Liu, C., Zhang, J., Liu, J., ... & Zhou, Y. (2013). Spheroid body-forming cells in the human gastric cancer cell line MKN-45 possess cancer stem cell properties. *International journal of oncology*, 42(2), 453-459.
- Lochhead, P., & El-Omar, E. M. (2008). Gastric cancer. *British medical bulletin*, 85(1), 87-100.
- Maconi, G., Manes, G., & Porro, G. B. (2008). Role of symptoms in diagnosis and outcome of gastric cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 14(8), 1149.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., ... & Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704-715.

- Marin, J. J., Perez-Silva, L., Macias, R. I., Asensio, M., Peleteiro-Vigil, A., Sanchez-Martin, A., ... & Lozano, E. (2020). Molecular bases of mechanisms accounting for drug resistance in gastric adenocarcinoma. *Cancers*, 12(8), 2116.
- Marin, J. J., Macias, R. I., Monte, M. J., Romero, M. R., Asensio, M., Sanchez-Martin, A., ... & Briz, O. (2020). Molecular bases of drug resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancers*, 12(6), 1663.
- Mirabelli, P., Coppola, L., & Salvatore, M. (2019). Cancer cell lines are useful model systems for medical research. *Cancers*, 11(8), 1098.
- Molina-Castro, S., Pereira-Marques, J., Figueiredo, C., Machado, J. C., & Varon, C. (2017). Gastric cancer: Basic aspects. *Helicobacter*, 22, e12412.
- Murai, T., Yamada, S., Fuchs, B. C., Fujii, T., Nakayama, G., Sugimoto, H., ... & Kodera, Y. (2014). Epithelial-to-mesenchymal transition predicts prognosis in clinical gastric cancer. *Journal of surgical oncology*, 109(7), 684-689.
- Nishiyama, M., & Wada, S. (2009). Docetaxel: its role in current and future treatments for advanced gastric cancer. *Gastric cancer*, 12(3), 132-141.
- Norwood, D. A., Montalvan-Sanchez, E., Dominguez, R. L., & Morgan, D. R. (2022). Gastric cancer: emerging trends in prevention, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology Clinics*, 51(3), 501-518.
- Ojha, R., Bhattacharyya, S., & Singh, S. K. (2015). Autophagy in cancer stem cells: a potential link between chemoresistance, recurrence, and metastasis. *BioResearch open access*, 4(1), 97-108.
- Oritura, M., Galizia, G., Sforza, V., Gambardella, V., Fabozzi, A., Laterza, M. M., ... & De Vita, F. (2014). Treatment of gastric cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(7), 1635.
- Otsuki, S., Inokuchi, M., Enjoji, M., Ishikawa, T., Takagi, Y., Kato, K., ... & Sugihara, K. (2011). Vimentin expression is associated with decreased survival in gastric cancer. *Oncology reports*, 25(5), 1235-1242.
- Pei, X. H., Lv, X. Q., & Li, H. X. (2014). Sox5 induces epithelial to mesenchymal transition by transactivation of Twist1. *Biochemical and biophysical research communications*, 446(1), 322-327.

- Polk, D. B., & Peek Jr, R. M. (2010). Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond. *Nature reviews cancer*, 10(6), 403-414.
- Qiu, M. Z., Shi, S. M., Chen, Z. H., Yu, H. E., Sheng, H., Jin, Y., ... & Xu, R. H. (2018). Frequency and clinicopathological features of metastasis to liver, lung, bone, and brain from gastric cancer: a SEER-based study. *Cancer medicine*, 7(8), 3662-3672.
- Quaas, A. (2017). Malignant Gastric Tumours: The Role of Pathologist in the Diagnosis and for Therapeutic Decisions. *Gastric Cancer*, 267.
- Rawla, P., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Gastroenterology Review/Przeegląd Gastroenterologiczny*, 14(1), 26-38.
- Rescan, P. Y., & Ralliere, C. (2010). A Sox5 gene is expressed in the myogenic lineage during trout embryonic development. *The International Journal of Developmental Biology*, 54(5), 913-918.
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb-prot5439.
- Robey, R. W., Pluchino, K. M., Hall, M. D., Fojo, A. T., Bates, S. E., & Gottesman, M. M. (2018). Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(7), 452-464.
- Rollán, A., Cortés, P., Calvo, A., Araya, R., Bufadel, M. E., González, R., ... & Parra-Blanco, A. (2014). Diagnóstico precoz de cáncer gástrico: Propuesta de detección y seguimiento de lesiones premalignas gástricas: protocolo ACHED. *Revista médica de Chile*, 142(9), 1181-1192.
- Ruan, T., Liu, W., Tao, K., & Wu, C. (2020). A review of research progress in multidrug-resistance mechanisms in gastric cancer. *OncoTargets and therapy*, 1797-1807.
- Sarkar, A., & Hochedlinger, K. (2013). The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell stem cell*, 12(1), 15-30.
- Schepers, G. E., Teasdale, R. D., & Koopman, P. (2002). Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Developmental cell*, 3(2), 167-170.

- Sharofovna, K. F., & Narzullayevich, A. K. (2021). Early Diagnosis and Treatment of Gastric Cancer in Modern Oncology. *IJTIMOIY FANLARDA INNOVASIYA ONLAYN ILMIY JURNALI*, 1(4), 46-50.
- Shenoy, S. (2019). CDH1 (E-cadherin) mutation and gastric cancer: genetics, molecular mechanisms and guidelines for management. *Cancer management and research*, 10477-10486.
- Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature reviews Clinical oncology*, 14(10), 611-629.
- Soleimani, A., Dadjoo, P., Avan, A., Soleimanpour, S., Rajabian, M., Ferns, G., ... & Hassanian, S. M. (2022). Emerging roles of CD133 in the treatment of gastric cancer, a novel stem cell biomarker and beyond. *Life Sciences*, 293, 120050.
- Song, Z. Q., & Zhou, L. Y. (2015). Helicobacter pylori and gastric cancer: clinical aspects. *Chinese Medical Journal*, 128(22), 3101-3105.
- Sugano, K. (2015). Screening of gastric cancer in Asia. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 29(6), 895-905.
- Sullivan, B. G., Karalis, J. D., Wang, S. C., & Senthil, M. (2023). Gastric Cancer Epidemiology, Genetics, and Screening. In *The AFS Textbook of Foregut Disease* (pp. 451-459). Cham: Springer International Publishing.
- Sun, C., Ban, Y., Wang, K., Sun, Y., & Zhao, Z. (2019). SOX5 promotes breast cancer proliferation and invasion by transactivation of EZH2. *Oncology Letters*, 17(3), 2754-2762.
- Takaishi, S., Okumura, T., Tu, S., Wang, S. S., Shibata, W., Vigneshwaran, R., ... & Wang, T. C. (2009). Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem cells*, 27(5), 1006-1020.
- Van Cutsem, E., Sagaert, X., Topal, B., Haustermans, K., & Prenen, H. (2016). Gastric cancer. *The Lancet*, 388(10060), 2654-2664.
- Vichalkovski, A., Gresko, E., Hess, D., Restuccia, D. F., & Hemmings, B. A. (2010). PKB/AKT phosphorylation of the transcription factor Twist-1 at Ser42 inhibits p53 activity in response to DNA damage. *Oncogene*, 29(24), 3554-3565.

- Wang, D., Han, S., Wang, X., Peng, R., & Li, X. (2015). SOX5 promotes epithelial–mesenchymal transition and cell invasion via regulation of Twist1 in hepatocellular carcinoma. *Medical oncology*, 32, 1-8.
- Wang, M., Mao, C., Ouyang, L., Liu, Y., Lai, W., Liu, N., ... & Zhang, B. (2019). Long noncoding RNA LINC00336 inhibits ferroptosis in lung cancer by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell Death & Differentiation*, 26(11), 2329-2343.
- Wang, X., Zhang, J., Cao, G., Hua, J., Shan, G., & Lin, W. (2022). Emerging roles of circular RNAs in gastric cancer metastasis and drug resistance. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 41(1), 218.
- Wang, Z., Li, Y., Ahmad, A., Azmi, A. S., Kong, D., Banerjee, S., & Sarkar, F. H. (2010). Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance. *Drug resistance updates*, 13(4-5), 109-118.
- Wang, Z., Li, Y., Ahmad, A., Banerjee, S., Azmi, A. S., Kong, D., & Sarkar, F. H. (2011). Pancreatic cancer: understanding and overcoming chemoresistance. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 8(1), 27-33.
- Xu, H. W., Xu, L., Hao, J. H., Qin, C. Y., & Liu, H. (2010). Expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein is associated with multidrug resistance in gastric cancer. *Journal of International Medical Research*, 38(1), 34-42.
- Xu, W., Zhou, B., Zhao, X., Zhu, L., Xu, J., Jiang, Z., ... & Jin, H. (2018). KDM5B demethylates H3K4 to recruit XRCC1 and promote chemoresistance. *International journal of biological sciences*, 14(9), 1122.
- Yang, J., Mani, S. A., & Weinberg, R. A. (2006). Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer research*, 66(9), 4549-4552.
- You, J., Zhao, Q., Fan, X., & Wang, J. (2019). SOX5 promotes cell invasion and metastasis via activation of twist-mediated epithelial–mesenchymal transition in gastric cancer. *Oncotargets and therapy*, 12, 2465.
- Zhang, D., & Fan, D. (2007). Multidrug resistance in gastric cancer: recent research advances and ongoing therapeutic challenges. *Expert review of anticancer therapy*, 7(10), 1369-1378.

- Zhang, C., Li, C., He, F., Cai, Y., & Yang, H. (2011). Identification of CD44+ CD24+ gastric cancer stem cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 137, 1679-1686.
- Zhang, J., Zhao, D., Li, Q., Du, X., Liu, Y., Dai, X., & Hong, L. (2019). Upregulation of LSD1 promotes migration and invasion in gastric cancer through facilitating EMT. *Cancer Management and Research*, 4481-4491.
- Zhang, X., Zhang, Y., He, Z., Yin, K., Li, B., Zhang, L., & Xu, Z. (2019). Chronic stress promotes gastric cancer progression and metastasis: An essential role for ADRB2. *Cell Death & Disease*, 10(11), 788.
- Zheng, Y., Li, Z., Wang, Y., Chen, W., Lin, Y., Guo, J., & Ye, G. (2023). CircRNA: A new class of targets for gastric cancer drug resistance therapy. *Pathology and Oncology Research*, 29, 1611033.
- Zhao, Z., Rahman, M. A., Chen, Z. G., & Shin, D. M. (2017). Multiple biological functions of Twist1 in various cancers. *Oncotarget*, 8(12), 20380.
- Zhu, Q. Q., Ma, C., Wang, Q., Song, Y., & Lv, T. (2016). The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers. *Tumor Biology*, 37, 185-197.
- Zuo, T., Zheng, R., Zeng, H., Zhang, S., & Chen, W. (2017). Epidemiology of stomach cancer in China. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 52-58.