

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**



**Rol del factor de transcripción RUNX2 en la expresión del RNA largo no codificante *TALAM1* en cáncer de pulmón de células no pequeñas.**

**Paula Andrea Sánchez Velásquez**

**BOGOTÁ D.C.**

**2021**

**Rol del factor de transcripción RUNX2 en la expresión del RNA largo no codificantes *TALAM1* en cáncer de pulmón de células no pequeñas.**

**Paula Andrea Sánchez Velásquez**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito para  
optar por el título de Bióloga y microbióloga industrial.**



**ADRIANA PATRICIA ROJAS MORENO, Msc, PhD.  
DIRECTOR**



---

**LITZY GISELLA BERMUDEZ LISCANO. Bact,cMSc.  
COTUTOR**

---

**JOSÉ SALVADOR MONTAÑA LARA, Msc, PhD.  
PAR EVALUADOR**

*“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”*

**ARTICULO NO. 23 DE LA RESOLUCIÓN NO. 13 DE 1946**

## **Agradecimientos**

Primeramente, agradezco a Dios por permitirme dedicarme a la ciencia y la investigación, que sin duda alguna es mi pasión y lo que quiero hacer durante toda mi vida. Gracias a él por darme la salud, la vida y el respaldo que me ha brindado durante toda mi vida.

A mis padres, Sandra Patricia Sánchez y Fernando Gamboa Ruíz, quienes han sido parte fundamental de todos mis logros. A ellos, agradezco el esfuerzo que han hecho para darme la oportunidad de estudiar, el amor y los consejos que me acompañaron durante toda mi carrera; y sobre todo la confianza que depositaron en mí. Son y siempre serán mi más grande motivación.

A mis directoras de tesis Adriana Patricia Rojas y Gisella Bermudez, quienes estuvieron presentes durante toda la realización del trabajo de grado, brindándome la guianza necesaria para completar este proyecto. Y a Daniel González, quien me brindó su ayuda académica para muchos obstáculos que se presentaron.

Finalmente, a mis amigos: Laura González, Sofia Brunal, Valentina Velandia, Paula Payán, Naryi Rojas, Henry Tole, Miguel Vanegas y Yisela Escobar; quienes fueron fundamentales en el proceso de mi carrera y mayor aún, en el desarrollo de este trabajo de grado. Gracias por estar siempre para mí y escucharme, aconsejarme y acompañarme; los llevo siempre en mi corazón.

*Nada en este mundo debe ser temido...solo entendido.*

*Ahora es el momento de comprender más, para que podamos temer menos.*

*Marie Curie.*

## 1. RESUMEN

El cáncer de pulmón es el tipo de cáncer que mayor mortandad tiene, llevándose la vida de millones de personas anualmente pese a las herramientas de diagnóstico y terapia disponibles actualmente. Con el objetivo de entender mejor el panorama de esta enfermedad, la investigación ha hecho arduos esfuerzos para descifrar la compleja biología molecular del cáncer y así brindar a los pacientes diagnósticos rápidos y terapias eficientes, mejorando sus probabilidades de supervivencia. Es por esto que este trabajo tuvo como objetivo evaluar el papel regulatorio de RUNX2, un importante factor de transcripción sobre-expresado en cáncer de pulmón, sobre *TALAM1*, un lncRNA poco estudiado del que se cree, tiene un rol indirecto en la progresión del cáncer. Para determinar los perfiles de expresión de *RUNX2*, *TALAM1* y *MALAT1* se realizaron cuantificaciones de mRNA mediante q-PCR en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón A549 y PC9 y en pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón de origen primario y metastásico. Posteriormente se realizaron ensayos de pérdida de función para RUNX2 mediante tecnología de Short hairpin con el fin identificar su efecto sobre *TALAM1*. Los resultados obtenidos permitieron establecer que tanto RUNX2, como *TALAM1* y *MALAT1* están sobre-expresados tanto en líneas celulares como en pacientes y que el factor de transcripción RUNX2 cumple un papel represor en la expresión de *TALAM1*. Los resultados invitan a realizar mayores investigaciones frente al papel de RUNX2 en cáncer de pulmón para poder utilizar dicha información en pro de mejorar el diagnóstico y el tratamiento de los pacientes con esta patología.

## 2. INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es una neoplasia que se origina a partir del tejido epitelial respiratorio y está asociado no sólo a factores genéticos, sino también a factores ambientales como la contaminación del aire, y conductuales como el alto consumo de tabaco, principal factor de riesgo del cáncer de pulmón [1].

Entre los tipos de cáncer reportados hasta hoy, el de pulmón es el más común y presenta la mayor mortalidad en todo el mundo [2]. En Colombia, para el año 2020 se registraron 6.876 (6,1%) siendo el cuarto tipo de cáncer más común en el país, y con el mayor porcentaje de mortalidad (11,1%) junto con el cáncer de estómago [3-4].

Una de las razones por las cuales hay una alta tasa de mortalidad en el cáncer de pulmón, es su diagnóstico tardío e inespecífico, pues es usualmente diagnosticado en etapas avanzadas con una tasa de supervivencia más baja [5]. Sin embargo, con el advenimiento del uso de herramientas de biología molecular se ha dirigido la atención a moléculas que puedan tener potencial como biomarcadores en el diagnóstico y blancos moleculares que se puedan usar en el tratamiento del cáncer de pulmón.

En general, los factores de transcripción linaje-específicos cumplen un papel crítico en el inicio y evolución del cáncer [6]. Tal es el caso de RUNX2, un factor de transcripción miembro de la familia RUNX que en el contexto normal está involucrado con la diferenciación osteogénica. Estudios recientes han reportado la participación de RUNX2 en la proliferación celular, la transición epitelio-mesénquima, la apoptosis y los procesos metastásicos en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de pulmón, lo que sugiere que puede representar una diana terapéutica útil en el tratamiento de esta patología [7].

Estudios previos en el grupo de investigación de epigenética y cáncer de la Pontificia Universidad Javeriana en pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC), identificaron los blancos funcionales de RUNX2 mediante análisis de Chip-seq. Entre las secuencias encontradas de unión a RUNX2, se encontró la región promotora del gen que codifica para el transcrito antisentido natural en el Locus *MALAT1* (*TALAM1*).

*TALAM1* es un RNA largo no codificante (lncRNA) del cual hasta el día de hoy se desconoce su mecanismo de regulación transcripcional. En cuanto a su función, se ha descrito que *TALAM1* interactúa con su lncRNA complementario, el transcrito 1 de adenocarcinoma pulmonar asociado a metástasis (*MALAT1*), el cual está

implicado en la progresión del cáncer de pulmón al regular de manera indirecta la proliferación, la evasión de la apoptosis y la transición epitelio mesénquima [8]. Estudios anteriores, mostraron en células HeLa que *TALAM1* contribuye a la estabilidad de *MALAT1* al promover la escisión del extremo 3' y con ello, la maduración de *MALAT1* [9], procesamiento que es indispensable para el funcionamiento de *MALAT1* [10]

Dada la poca comprensión sobre la regulación de la expresión de *TALAM1* y los antecedentes reportados para *RUNX2* como un importante inductor del cáncer de pulmón y a su potencial uso como diana terapéutica, en este trabajo de grado se determinó el rol regulatorio de *RUNX2* sobre la expresión del lncRNA *TALAM1* mediante el uso de ensayos de pérdida de función. Adicionalmente, se determinaron los perfiles de expresión génica y la correlación de los genes *RUNX2*, *TALAM1* y *MALAT1* en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón y en pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón de células no pequeñas, mediante análisis de PCR en tiempo real.

### **3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El cáncer es una patología caracterizada por la proliferación celular incontrolada y actualmente se considera un problema de salud pública a nivel mundial. En 2020 se produjeron 19,3 millones de nuevos casos, con alrededor de 9,6 millones de muertes en todo el mundo, de los cuales el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte, con un estimado de 1,8 millones de muertes (18%) [1]. En Colombia, representa el segundo lugar, después del cáncer de estómago, representando anualmente 11,8 afectados por 100.000 habitantes con una tasa de mortalidad del 11,1 % [11]. El cáncer de pulmón representa una baja tasa de supervivencia general de los pacientes, a pesar de los tratamientos estándar disponibles.

El cáncer es el resultado de alteraciones moleculares que impulsan la proliferación, permiten la evasión de las señales de supresión de la proliferación, apoptosis, promueven la angiogénesis, la invasión y la metástasis [12]. Cada vez es más aceptado que la identificación de alteraciones genómicas en el cáncer de pulmón puede tener un impacto en la terapéutica. Por ejemplo, oncogenes que se han identificado en cáncer de pulmón como *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *MET*, *RET* y *HER2* se evalúan de forma rutinaria en la clínica para ofrecer una terapia dirigida a pacientes con adenocarcinoma de pulmón [13].

En la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos, se ha demostrado que el nivel de expresión de *RUNX2* se incrementa en los tejidos de carcinoma de células escamosas de pulmón y adenocarcinoma de pulmón [14]. Además, se ha informado que este factor de transcripción está involucrado en la transición epitelio mesénquima al regular la expresión de genes como *TWIST1*, *SNAIL1* y *VIMENTINA*, que reflejan directamente una mayor capacidad migratoria e invasiva de las células [15], promoviendo así los procesos de metástasis que constituyen la principal causa de muerte para el 90% de los pacientes con cáncer [16]. Estos resultados sugieren que *RUNX2* podría, a futuro, servir como un candidato para la terapia contra el cáncer de pulmón [14].

Sin embargo, las proteínas *RUNX* también funcionan como supresores de tumores dependientes del contexto celular [17]. Se ha reportado que la ablación de *RUNX2* da como resultado la proliferación e inmortalización celular desregulada, lo que respalda su función como supresor de tumores [18].

Por esta razón, resulta indispensable realizar más estudios que mejoren la comprensión del complejo rol del factor de transcripción *RUNX2* en la biología molecular del cáncer para la toma de decisiones en cuanto a su potencial uso como blanco terapéutico en pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón.

Es por esto que en este trabajo de grado se busca evaluar el rol de *RUNX2* en la expresión de *TALAM1*, un lncRNA poco estudiado, con la capacidad de regular a su transcrito complementario *MALAT1*, implicado en la progresión y el mal pronóstico del cáncer de pulmón.



## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Biología del cáncer

El cáncer es caracterizado por la proliferación anormal de células, causado por múltiples cambios en la expresión génica, lo cual conduce a un desequilibrio del ciclo celular y procesos de apoptosis, que finalmente evolucionan hacia una población de células con la capacidad de invadir tejidos y migrar a sitios distantes [19].

Las células tumorales inducen señales estimulantes de crecimiento de manera autocrina [20]. Para ello, producen ligandos de factores de crecimiento y responden con receptores afines para inducir proliferación; pueden también enviar señales para estimular las células normales dentro del estroma asociado, también pueden extender más receptores en la superficie celular, aumentando su hiperreactividad a cantidades limitantes de ligando de factor de crecimiento [21]

Por otro lado, las células tumorales deben evitar los procesos de control celular para impedir la muerte celular programada y la limitación de la proliferación celular. En este proceso pueden intervenir, proteínas como la proteína tumoral (P53) y de retinoblastoma (RB), encargados de bloquear el desarrollo tumoral de las células, las cuales están reprimidas en el cáncer y ocasiona, entre otras cosas, que la célula sobreviva y continúe proliferando [22]. Además, los tumores pueden aumentar la expresión de reguladores antiapoptóticos (*Bcl-2*, *Bcl-x*) o de señales de supervivencia (*Igf1 / 2*), evitando así la apoptosis [21].

La angiogénesis por su parte, definida como el proceso de división celular, migración y ensamblaje de células endoteliales de vasos preexistentes; desencadena un microambiente de hipoxia [23]. Este microambiente induce cambios a nivel celular, por ejemplo, la expresión del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF), que regula la expresión de una multitud de genes no solo involucrados en la angiogénesis, sino también en la supervivencia celular, el metabolismo y la inflamación [24].

Además, las células tumorales son capaces de reprogramar el metabolismo energético, evadir la respuesta inmune e invadir diferentes tejidos [22]. En parte, debido a la interrupción de los mecanismos epigenéticos, que son esenciales para el desarrollo normal y el mantenimiento de patrones de expresión génica específicos de tejido en mamíferos, lo que conduce a una función genética alterada que resulta en una activación o inhibición inapropiada de varias vías de señalización [25].

Por otro lado, la inestabilidad cromosómica es también un sello distintivo del cáncer [21]. Se refiere a la pérdida o reordenamiento de los cromosomas durante la división celular, lo que genera una fuente de variación genética que favorece las adaptaciones tumorales a entornos estresantes y se confieren fenotipos agresivos o resistentes a fármacos durante la evolución del cáncer [26].

Por último, entre los sellos distintivos del cáncer está la metástasis, que es el proceso en el que las células tumorales abandonan su sitio primario, circulan en el torrente sanguíneo, soportando la presión en los vasos sanguíneos y escapando de las células inmunes, hasta adaptarse a un nuevo entorno celular en un sitio secundario [16]. Este proceso se da por la expresión de genes involucrados con la transformación celular a un fenotipo mesenquimal y la liberación de cantidades significativas de exosomas que transfieren factores promotores de la invasión a las células tumorales [27,28,29].

## **4.2 Cáncer de pulmón**

El cáncer de pulmón es una neoplasia que se origina a partir del tejido epitelial respiratorio en el que se incluye bronquios, bronquiolos y alveolos. Se divide histológicamente en dos grupos, de células pequeñas (SCLC) y de células no pequeñas (NSCLC) (21). El SCLC es menos frecuente, representando un 20% de los casos. Sin embargo, es la forma más agresiva del cáncer con un tiempo de duplicación corto y una tasa mitótica alta [30].

El NSCLC por su parte, es el más común de los casos de cáncer de pulmón, representando un 80% de los casos. Se clasifica en adenocarcinoma, con una frecuencia del 46,7%; carcinoma de células escamosas, con una frecuencia de 25,1%; y carcinoma de células grandes, con una frecuencia de 2,7% [31] y otros subtipos que representan una proporción muy pequeña del total de casos como, carcinoma sarcomatoide y carcinoma neuroendocrino de células grandes [32].

Actualmente, se utilizan diferentes biomarcadores para el diagnóstico del cáncer de pulmón como mutaciones en *EGFR*, rearrreglos cromosómicos de ALK, ROS y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*HER2*) [33], el fragmento de la citoqueratina 19 (*CYFRA 21-1*), el antígeno carcinoembrionario (*CEA*), el antígeno SCC, la enolasa específica de neuronas (*NSE*) y el Péptido liberador de progastina (ProGRP) [34].

## 4.2 Factor de transcripción RUNX2

RUNX2 es miembro de la familia de factores de transcripción RUNX caracterizada por codificar proteínas nucleares con un dominio “Runt” de unión a DNA; se compone de tres factores de transcripción relacionados, que participan en la diferenciación de múltiples linajes hematopoyéticos (RUNX1), cartílago y hueso (RUNX2) y tejidos epiteliales principalmente (RUNX3) [35]. RUNX2 es conocido por su función como el regulador maestro de la diferenciación de los osteoblastos en una etapa temprana y cumple un papel fundamental en la morfogénesis esquelética, la condrogénesis y la vasculogénesis [35].

RUNX2 codifica tres isoformas principales, RUNX2-tipo I (Cbfa1 / p56, Cbfa1 / org o PEBP2αA), RUNX2-tipo II (Cbfa1 / p57, Cbfa1 / iso o til -1) y RUNX2-tipo III (también llamado *Osf2* / Cbfa1) que no se expresa en humanos [35]. Las isoformas tipo I y II se encuentran en tejido óseo y pulmonar, mientras que RUNX2-tipo I se expresa más ampliamente y puede detectarse en el corazón, el cerebro, el bazo y

los músculos esqueléticos [36]. RUNX2-II y RUNX2-I podrían tener funciones separadas en la esquelotogénesis. RUNX2-I es suficiente para la osteoblastogénesis temprana, mientras que RUNX2-II es necesaria para la etapa terminal de la maduración osteoblástica [37].

En un contexto anormal se ha establecido que la sobreexpresión de RUNX2 favorece la proliferación e invasión de células tumorales a través de la transición epitelio-mesenquimal. A partir de experimentos de silenciamiento, se determinó que el factor de transcripción RUNX2 participa en la regulación transcripcional de *E-CADHERIN*, *VIMENTIN*, *TWIST1* y *SNAIL1*, *BLCI-2* que afectan la capacidad migratoria en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón A549 [38-39]. También se ha asociado con funciones relacionadas con evasión de la apoptosis, al interactuar con p53 y con genes diana de este [40].

### **4.3 RNA largos no codificantes (lncRNA)**

Los lncRNAs se definen como secuencias de RNA mayores a 200pb, que no codifican para una proteína, pero que participan en múltiples procesos biológicos [41], pues desempeñan un papel regulador clave en procesos celulares como la proliferación, diferenciación y desarrollo. Lo anterior regulando procesos de activación o represión génica mediante diferentes mecanismos [42].

Entre sus mecanismos de acción, esta actuar como guías para dirigir complejos modificadores de cromatina a ubicaciones genómicas específicas. También se ha demostrado que pueden actuar como andamios dinámicos para facilitar la unión de cofactores que tengan función regulatoria en la expresión génica, actúan también uniéndose a factores de transcripción como señuelos para secuestrarlos de sus objetivos y evitar que ejerzan su respectiva función, o bien funcionan como RNA endógenos competitivos (ceRNA), donde actúan como esponjas de microRNA para disminuir la concentración de estos y así reprimir su función [43]. De esta manera,

cumplen funciones como la modulación de la arquitectura de la cromatina, facilitación de interacciones entre regiones genómicas distantes, intermediación de interacciones entre potenciadores y promotores, entre otros [44].

#### **4.4 Transcrito 1 de adenocarcinoma de pulmón asociado a metástasis (*MALAT1*)**

*MALAT1* es un lncRNA de 8,5 kb ubicado en 11q13 [45] que, aunque se desconoce aún con detalle su funcionamiento, está altamente conservado en mamíferos lo que sugiere funciones importantes de dicha molécula. Un estudio realizado en 2010 [46], sugiere que *MALAT1* modula la formación de sinapsis en las neuronas mediante la regulación de la expresión de genes implicados en la sinaptogénesis, pues luego de un agotamiento de *MALAT1*, la sinapsis y el desarrollo dendrítico se vieron significativamente afectados. Otros estudios han reportado funciones para *MALAT1* en la miogénesis esquelética y el crecimiento vascular [47].

El RNA de *MALAT1* maduro se localiza principalmente en las motas nucleares, donde desempeña un papel crucial en la regulación de la organización a nivel postranscripcional con los factores de corte y empalme SR sobre los pre-mRNA de genes críticos involucrados en la migración y adhesión celular, lo que sugiere su importancia regulatoria en el desarrollo del cáncer [48].

Además, *MALAT1* está involucrado en la modulación de varias vías de señalización molecular como *MAPK/ERK*, *PI3K/AKT*, *WNT/ $\beta$ -catenina* y *NF- $\kappa$ B* que conduce a una modificación de la proliferación, muerte celular, ciclo celular, migración, invasión, inmunidad, angiogénesis y oncogénesis [48]. Algunos estudios resaltan el papel de *MALAT1* como un andamio molecular que reprime la expresión génica de reguladores de la proliferación celular, como el factor de transcripción *E2F1*, por la interacción entre proteínas Polycomb 2 [48]. Además, se han reportado otros

mecanismos de regulación postranscripcional de *MALAT1* que incluyen actividades proteicas y RNA endógenos competitivos(ceRNA) [49].

En cáncer de pulmón NSCLC, este lncRNA fue descrito como un indicador predictivo de la metástasis de células tumorales, de ahí su nombre [45]. El crecimiento tumoral inducido por *MALAT1* está parcialmente mediado por la inhibición de miR-124 que tiene a *STAT3* como diana [50] y se ha demostrado que el knockdown de *MALAT1* afecta la transcripción y/o el corte y empalme de pre-RNA de genes críticos involucrados en la migración y adhesión celular, además de genes involucrados en vías críticas del ciclo celular [48].

Si bien, algunos autores han reportado evidencias sobre la expresión aberrante de *MALAT1* y su papel pro-oncogénico y metastásico, otros estudios han controvertido esta hipótesis [51-53]. Un grupo informó que el Knockout de *MALAT1* no afectó la proliferación o la progresión del ciclo celular en células de cáncer de hígado o pulmón humano [49]. Otros estudios reportaron que *MALAT1* suprime la metástasis en cáncer de mama [54] , o que tiene un papel supresor de tumores en cáncer de colon [55]. Ante esta ambigüedad de los reportes de la literatura, se requieren de estudios adicionales que permitan esclarecer la función de este lncRNA en cáncer.

La expresión de este lncRNA ha sido reportada en más de 20 tumores sólidos [56], que incluyen el de pulmón [48], mama [57], cuello uterino [58], esófago [58], vejiga [59], entre otros. Los cuales se correlacionan con la progresión del tumor y la metástasis. Otros estudios han demostrado que la sobreexpresión de *MALAT1* está asociada con la resistencia a los medicamentos en el cáncer [60].

Para cáncer de pulmón, *MALAT1* se ha asociado a una alta supervivencia en NSCLC. Varios estudios han reportado al alza la expresión de *MALAT1* en este tipo de cáncer y se sabe que desempeña un papel fundamental en el desarrollo y progresión del NSCLC [47].

#### 4.5 Transcrito antisentido natural en el Locus *MALAT1* (*TALAM1*)

*TALAM1* es un lncRNA de un tamaño aproximadamente de 8,121 nucleótidos [61] fue descrito en el año 2016 como el transcrito de la hebra complementaria del gen *MALAT1*, es decir la transcripción antisentido natural de *MALAT1*. *TALAM1* regula positivamente los niveles de *MALAT1* al promover la escisión del extremo 3' y con ello su acumulación celular, pues la estabilidad del RNA de *MALAT1* ante exonucleasas, depende de su eficiente división y de la formación de una estructura de triple hélice del extremo 3' [62]. Sin embargo, hasta el día de hoy, solamente se ha publicado un artículo sobre la relación regulatoria entre *TALAM1* y *MALAT1*, por lo que no ha sido sustentada con suficiente evidencia dicha relación. Por otro lado, el RNA de *MALAT1* también regula positivamente la transcripción y la estabilidad de *TALAM1*, por lo que se establece un bucle regulador de retroalimentación positiva entre ambas moléculas para lograr altos niveles celulares de *MALAT1*,  $\approx 2500\text{--}3000$  copias/célula. [62].

Sin embargo, aún se desconoce en qué medida esta regulación postranscripcional mediada por *TALAM1* contribuye a la desregulación de *MALAT1* durante la oncogénesis. Además, aún se desconocen los mecanismos y los actores de la regulación de la expresión de *TALAM1*. Al respecto, estudios de nuestro grupo de investigación indican que la regulación transcripcional de *TALAM1* podría estar siendo mediada por el factor de transcripción RUNX2, proteína que se ha detectado con expresión aberrante en líneas celulares y pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeña NSCLC [38].

Por otro lado, si bien se sabe que *TALAM1* es el transcrito antisentido de *MALAT1* y que está implicado, por mecanismos aún desconocidos, en la maduración y estabilidad del RNA de *MALAT1*; todavía no se conoce nada sobre los mecanismos de su regulación génica.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Determinar el papel regulatorio del factor de transcripción RUNX2 en la expresión del lncRNA *TALAM1* en cáncer de pulmón de célula no pequeña.

### 5.2 Objetivos específicos

- Evaluar los niveles de expresión de los lncRNAs *MALAT1* y *TALAM1* en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón y en muestras de biopsias pulmonares de pacientes con diagnóstico de NSCLC.
- Evaluar los niveles de expresión de RUNX2 en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón y en muestras de biopsias de tejido tumoral pulmonar de pacientes con diagnóstico de NSCLC.
- Encontrar asociaciones entre los niveles de expresión de los lncRNAs *MALAT1* y *TALAM1* con los niveles de expresión de RUNX2 de las muestras analizadas.
- Evaluar la regulación transcripcional de *TALAM1* mediada por el factor de transcripción RUNX2.

## 6. METODOLOGÍA

Este trabajo de grado forma parte del proyecto de investigación: Identificación de lncRNA en Biopsia líquida de pacientes con Cáncer de pulmón NSCLC, ID2003, financiado por la oficina de investigaciones de la Pontificia Universidad Javeriana.



## **6.1 Modelo biológico**

Para evaluar el rol de RUNX2 en la regulación de *TALAM1* se emplearon líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas A549 y PC9. La línea celular A549 (ATCC ® CCL-185™) fue desarrollada por primera vez en 1972 a través de la remoción y cultivo de tejido canceroso de pulmón en un tumor extirpado de un hombre de 58 años, esta línea pertenece a células humanas de epitelio alveolar basal, de naturaleza escamosa [63]. La línea celular PC9 (ATCC CRM-HTB-174D™) por su parte, antes llamada PC-14, perteneció al Riken BioResource Center y es derivado de tejido pulmonar de adenocarcinoma humano [64]. Ambas líneas celulares se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Por otro lado, se utilizó la línea celular BEAS-2B, línea celular epitelial inmortalizada no tumoral del epitelio bronquial humano [64], esta línea se utilizó como control de tejido no tumoral.

## **6.2 Cultivos primarios de pacientes con cáncer de pulmón de origen primario y metastásico**

Las muestras de cDNA usadas para los análisis de expresión génica fueron obtenidas de experimentos previos del grupo de investigación, pertenecientes a una tesis de Maestría en la cual se enmarca este proyecto de Grado (Bermudez, 2022 en proceso). Estas muestras fueron extraídas a partir de cultivos primarios de cáncer de pulmón, obtenidos a partir de biopsias percutáneas y cirugía de tórax.

En total se analizaron 16 muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón de células no pequeñas y 9 muestras control. Las muestras control corresponden a tejido adyacente no tumoral de pulmón.

Criterios de inclusión:

- Muestras de biopsia pulmonar provenientes de pacientes del Hospital Universitario San Ignacio con diagnóstico de cáncer de pulmón NSCLC de origen primario y/o metastásico a pulmón.
- Muestras provenientes de pacientes que hayan firmado el consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Muestras provenientes de pacientes que tengan diagnóstico de cáncer de pulmón diferente a NSCLC.
- Muestras provenientes de pacientes con patologías pulmonares distintas a cáncer.

### **6.3 Consideraciones éticas**

Esta investigación fue de bajo riesgo y se rigió de acuerdo con la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, sobre los principios éticos para investigaciones médicas en seres humanos. Además, contó con todos los estándares impuestos por el ministerio de salud en la resolución N°008430 de 1993 y contó con el aval del comité de ética de la Facultad de medicina de la Pontificia Universidad Javeriana.

Ley de habeas:

Todos los datos recolectados, historias clínicas y datos sensibles de los pacientes, se mantuvieron en anonimidad mediante la asignación aleatoria de códigos numéricos. Dicha información se explicó a los pacientes, quienes reflejaron estar de acuerdo con su firma en el documento de consentimiento informado. Asimismo, los datos colectados fueron almacenados en computadores de la línea de Epigenética y Regulación Transcripcional del Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana, con acceso exclusivo a personal autorizado.

#### **6.4 Extracción de RNA**

La extracción de RNA total se realizó con Trizol (Ambion life technologies) de acuerdo con las especificaciones del fabricante, dicha extracción se realizó a partir de placas de cultivo celular de las líneas A549, PC9 y BEAS-2B de 100 mm con un 80-85% de confluencia. Seguidamente, se adicionaron 200µl de cloroformo por cada 1ml de trizol con el objetivo de separar el RNA total de residuos y componentes proteicos. Por último, se adicionaron 500µl de isopropanol (2 propanol) y etanol al 75% para limpiar y purificar la muestra de RNA. Cada una de las muestras fue sometida a choque térmico en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°. Se emplearon 2µg de RNA total cuantificados usando el NanoDrop™ 2000c.

#### **6.5 Síntesis de RNA complementario (cDNA)**

A partir de 2ug del RNA total extraído, se realizó la síntesis de DNA complementario de acuerdo con el protocolo ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit. (New England Biolabs), compuesto por buffer, DTT, Inhibidor de Rnasa y transcriptasa reversa. Para la síntesis de cDNA, se incubó a 42°C durante 45 minutos y se inactivó la actividad enzimática a 80°C durante 5 minutos haciendo uso del termociclador. Finalmente, el cDNA obtenido se suspendió en agua molecular y se almacenó a -20°C.

#### **6.6 PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR)**

Se realizó una qPCR utilizando el kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche), el equipo LightCycler® nano (Roche) y oligos de la casa comercial Eurofins/Genomics estandarizados previamente mediante PCR convencional, para cuantificar los niveles de expresión relativa por duplicado de RNA de los genes *MALAT1*, *TALAM1* y *RUNX2*. Las secuencias de los cebadores utilizados (Tabla 1) se validaron a través de la herramienta primer-BLAST de NCBI.

**Tabla 1.** Secuencia de cebadores de amplificación por qPCR

<i>MALAT1</i>	Fw: 5'-GAATTGCGTCATTTAAAGCCTAGTT-3' RV: 5'-GTTTCATCCTACCACTCCCAATTAAT-3'
<i>TALAM1</i>	Fw: 5' -GGGTGAAGCAGGACAACCA-3' Rev: 5' -TGATCTCTGCAAACCTGCAACCT-3'
<i>RUNX2</i>	Fw: 5'-GTCACTGTGCTGAAGAGGCT-3' Rev: 5'-GGTTAATCTCCGCAGGTCAC-3'

## 6.7 Ensayos de silenciamiento génico

Se realizaron ensayos de silenciamiento génico mediante el uso de sh-RNA (short-harpin-RNA) en la línea celular tumoral de pulmón A549, con el objetivo de determinar el rol del factor de transcripción RUNX2 sobre la expresión de *TALAM1*. Se utilizaron partículas lentivirales generadas en la línea celular HEK293T que fueron cultivadas en placas de 60 mm en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 5µl de primocin <sup>TM</sup>(Invitrogen). Los cultivos celulares fueron transfectados, al alcanzar una confluencia del 70%, con el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y los plásmidos: pCMV -VSVg (0,2 µg/µl). El plásmido pCMV -dR8.91(Δ89) (0,512 µg/µl) contiene los genes GAG responsables de las proteínas que codifican para la cápside, los genes POL que codifican para las enzimas involucradas en el proceso de replicación, los genes REV asociados a la regulación postraduccional de la expresión viral y el plásmido pLKO.1-shRUNX2 (3,3 µg/µl). Para el control con el plásmido vacío se implementó el plásmido control pLKO.1 EV (vector vacío) (4,275 µg/µl). Para la transfección de la línea celular HEK se utilizó una relación 1:2:3 correspondiente a cada plásmido. Luego de las 24 horas post-transfección, se cambió el medio de cultivo por medio DMEM suplementado con 1% de SFB y transcurridas 72 horas se recolectó el sobrenadante que contenía las partículas virales. El sobrenadante fue filtrado y posteriormente se realizaron alícuotas que se almacenaron a -80°C. La transducción de las células A549 se realizó en placas de seis pozos donde se sembraron 150.000 células con 2ml de medio DMEM al 10%

de SFB con una confluencia del 70%, adicionalmente acoplado a la transducción se implementó el uso de Polybrene (SIGMA-ALDICH) con un volumen de 8µl por pocillo. Pasadas las 48 horas, las células se recolectaron con Trizol (Ambion life technologies) y se realizó la posterior extracción de RNA total y la síntesis de DNAc para la medición mediante qPCR de los genes: *RUNX2*, *TALAM1* y *MALAT1*.

## 6.8 Western Blot

Se realizaron ensayos de Western Blot (WB) para evaluar la expresión a nivel de proteína de RUNX2, utilizando anticuerpos específicos para RUNX2. Todos los procedimientos de Western Blot se llevaron a cabo a partir de extractos nucleares de la línea celular A549 con 48 horas post-transfección para sh*RUNX2* y sh*CONTROL*.

Se utilizaron 25 µg de proteínas y se separaron por electroforesis SDS-PAGE. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, para seguidamente bloquear los sitios de unión inespecífica incubando la membrana en solución leche 5% en TBS-Tween (solución de bloqueo) durante dos horas, seguido de una incubación “over-night” a 4°C con anticuerpo policlonal de conejo anti-RUNX2 y Anti-TFIIB en una dilución con leche al 3% en TBS-Tween.

A la membrana se le hicieron 3 lavados de 10 minutos y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario Cabra anti-Conejo IgG Poly-HRP (32260) en una dilución 1:10000 en leche al 3% en TBS-Tween por dos horas a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos y finalmente se estimuló la membrana con el sustrato durante 3 minutos y finalmente, en condiciones de oscuridad se realizó el proceso de revelado.

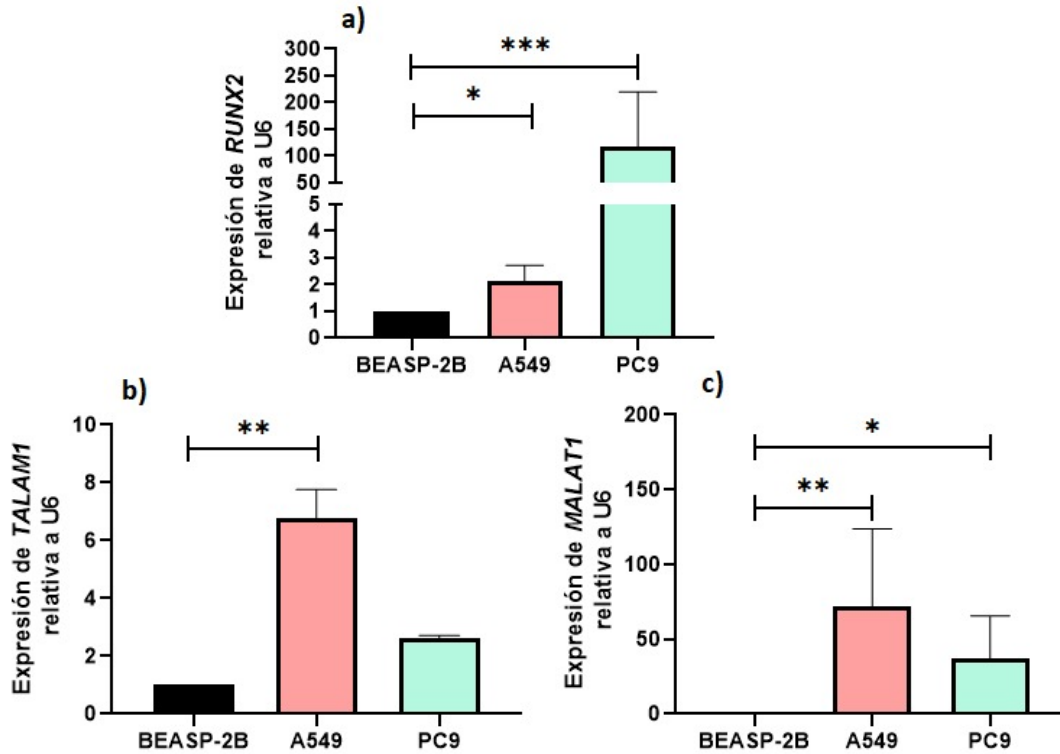
## 6.9 Tratamiento estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0. para pruebas no paramétricas, utilizando la prueba U de Mann-Whitney para análisis de datos con distribución no normal de dos variables y la prueba H de Kruskal-Wallis para datos con distribución no normal para más de dos variables. Por otro lado, se determinó el coeficiente de correlación de Spearman para determinar la relación existente entre las cuantificaciones encontradas de *RUNX2* frente a *TALAM1* y a *MALAT1*. En cada figura se ilustra el resultado de los análisis estadísticos, siendo: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , los valores de  $p < 0.05$  fueron clasificados como estadísticamente significativos.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Análisis de expresión de *RUNX2*, *TALAM1* y *MALAT1* en líneas celulares A549 y PC9

Con el objetivo de evaluar los perfiles de expresión de los genes *RUNX2*, *TALAM1* y *MALAT1*, se realizaron ensayos de qPCR. Para *RUNX2* los resultados muestran un aumento significativo en la expresión del RNA en las líneas celulares A549 y PC9 comparado con las células no tumorales (BEAS-2B). Por otra parte, la expresión tanto de *TALAM1* como de *MALAT1* fue significativamente mayor en las dos líneas celulares tumorales evaluadas respecto a la no tumoral, siendo mayor la expresión en la línea celular A549 (Fig. 1b-c) para ambos. Los datos aquí representados están graficados como expresión relativa a U6, un RNA no codificante constitutivo perteneciente a la maquinaria del espliceosoma, donde desempeña funciones necesarias para la química del empalme alternativo [61] y que fue usado como housekeeping.

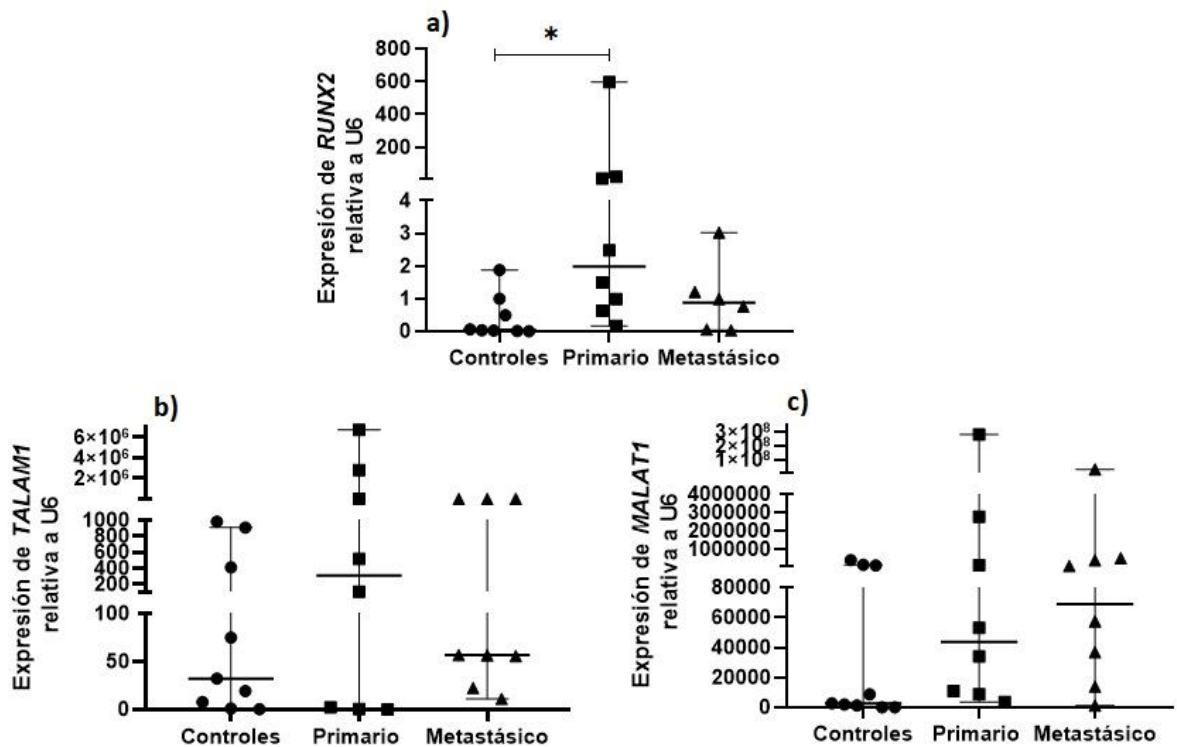


**Figura 1.** Expresión de *RUNX2* (a), *TALAM1* (b) y *MALAT1* (c) relativo a U6 en líneas celulares A549 y PC9 en comparación con tejido epitelial pulmonar no tumoral (BEAS-2B) cuantificado mediante q-PCR (n=3). Se realizaron análisis estadísticos con respecto al control \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 7.2 Análisis de expresión de *RUNX2*, *TALAM1* y *MALAT1* en cultivos primarios obtenidos a partir de tejido tumoral de pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón NSCLC

En cuanto a la expresión de mRNA de los tres genes analizados en pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón NSCLC (Fig. 2), se encontró para *RUNX2* un incremento en los cultivos primarios de tejidos tumorales de pacientes con cáncer de origen primario y metastásico respecto al grupo control, siendo mayor y significativo en el tejido tumoral de pacientes con cáncer de origen primario (Fig. 2

a). *TALAM1* por su parte, mostró una mayor expresión en pacientes con cáncer de origen primario, pero también se evidenció expresión al alza del grupo de pacientes con tumores de origen metastásico (Fig. 2b). Finalmente, los resultados de qPCR para la expresión del lncRNA *MALAT1* muestran que *MALAT1* se está expresado al alza en tejido tumoral respecto al tejido no tumoral, tanto en el grupo de pacientes con cáncer de origen primario y en el grupo de pacientes con cáncer de origen metastásico, siendo más alta la expresión de *MALAT1* en este último grupo (Fig 2c).

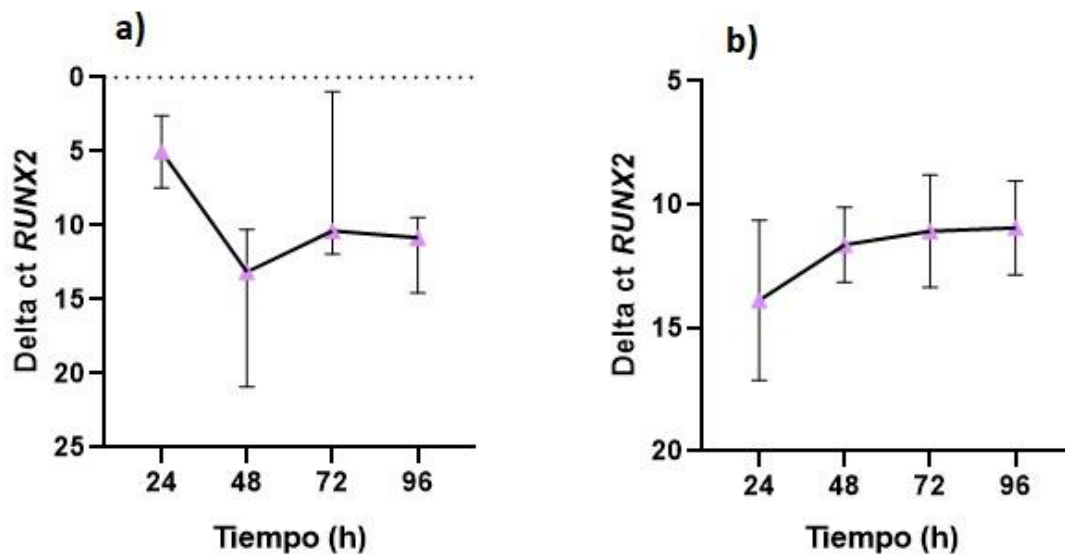


**Figura 2.** Sobreexpresión de *RUNX2* (a), *TALAM1* (b) y *MALAT1* (c) en tejidos de pacientes con cáncer de pulmón primario (n=8) y pacientes con cáncer secundario con metástasis de pulmón (n=8) comparados con el grupo de pacientes controles (n=9). Los niveles de RNAm se cuantificaron mediante q-PCR y se normalizaron a RNAm de U6. Se realizaron análisis estadísticos con respecto a al grupo control. \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001.



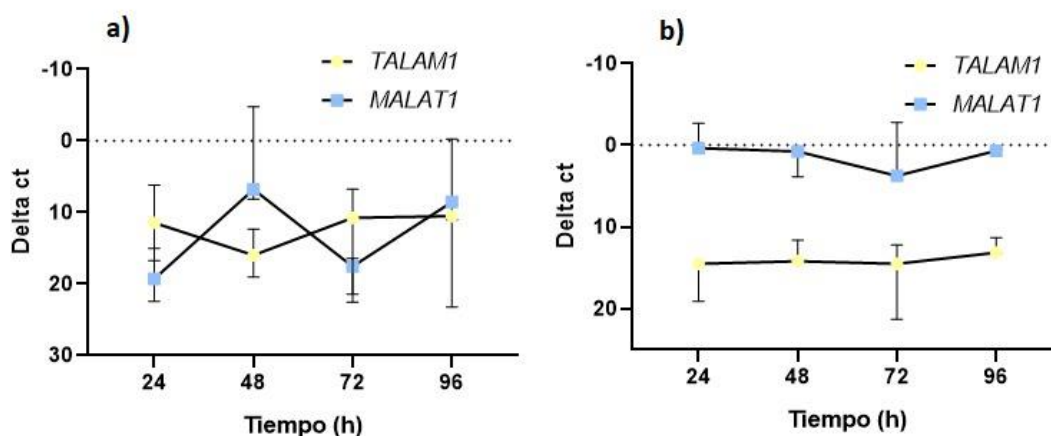
### 7.3 Perfiles de expresión de *RUNX2*, *MALAT1* y *TALAM1* en líneas celulares A549 y PC9 en diferentes tiempos de cultivo (24,48,72 y 96 horas)

Con el fin de analizar los perfiles de expresión de *RUNX2*, *TALAM1* y *MALAT1* en diferentes tiempos de cultivo (24, 48, 72 y 96 horas) en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón A549 y PC9, se realizaron experimentos de qPCR. Para este caso los resultados muestran que la expresión de los genes evaluados *RUNX2*, *TALAM1* y *MALAT1* cambia respecto al tiempo de incubación de los cultivos celulares. En la **Figura 3** se encuentran representados los resultados para *RUNX2*, donde se observó para A549 una expresión máxima a las 24 horas y una posterior disminución a las 48 horas; a las 72 horas, la expresión de *RUNX2* empieza a aumentar progresivamente y tiene una leve caída nuevamente a las 96 horas (Fig. 3a). Por otro lado, la expresión de *RUNX2* en PC9 tiene un comportamiento ascendente desde las 24 horas hasta una expresión máxima a las 96 horas. (Fig. 3 b).



**Figura 3.** Delta ct de la expresión de *RUNX2* a las 24, 48, 72 y 96 horas en línea celular A549 (a) y PC9 (b). Se tomaron 3 réplicas (n=3) para cada una de las horas. Menores valores de ct significan mayor expresión, por lo que para facilitar la interpretación de la gráfica se invierte el eje.

En La **Figura 4** se representan los perfiles de expresión de los lncRNAs *TALAM1* y *MALAT1* en A549 y PC9; a las 24, 48, 72 y 96 horas. En A549 la relación entre la expresión de *TALAM1* y *MALAT1* parece ser inversa, cuando uno baja, el otro aumenta y viceversa (Fig. 4 a). En cuanto a la línea celular PC9 la relación entre la expresión de estos dos lncRNAs es más estable y lineal, siendo siempre la expresión de *MALAT1* mayor que la de *TALAM1* (Fig. 4 b).

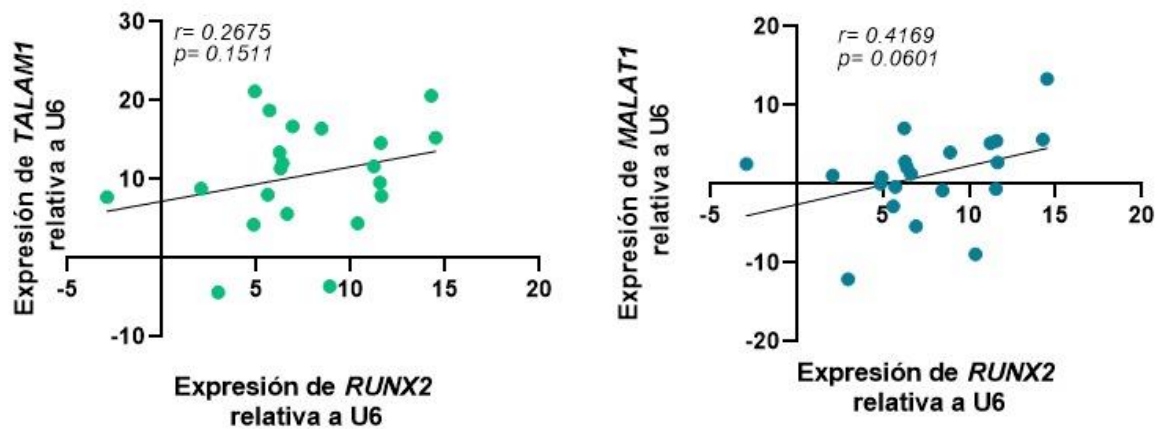


**Figura 4.** Delta ct de la expresión de *TALAM1* y *MALAT1* a las 24, 48, 72 y 96 horas en línea celular A549 (a) y PC9 (b). Se tomaron 3 réplicas (n=3) para cada una de las horas. Menores valores de ct significan mayor expresión, se invierte el eje para facilitar la interpretación.

#### 7.4 Análisis de Correlación entre la expresión de *RUNX2*, *TALAM1* y *MALAT1*

Para dar respuesta al objetivo 3 del presente estudio, se realizó una correlación de Spearman para datos no paramétricos entre la expresión de *RUNX2* y la expresión

de *TALAM1* y *MALAT1* en pacientes. Se encontró que no hubo correlación entre los niveles de expresión de *RUNX2* con los de los lncRNAs para los pacientes evaluados (Fig. 5). Para *TALAM1* el coeficiente de correlación fue de 0,267 (Fig. 5 a) mientras que para *MALAT1* se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,417 (Fig. 5 b). Si bien los datos parecen tender al aumento, la relación no fue estadísticamente significativa lo que muestra que no hay correlación entre los genes evaluados.



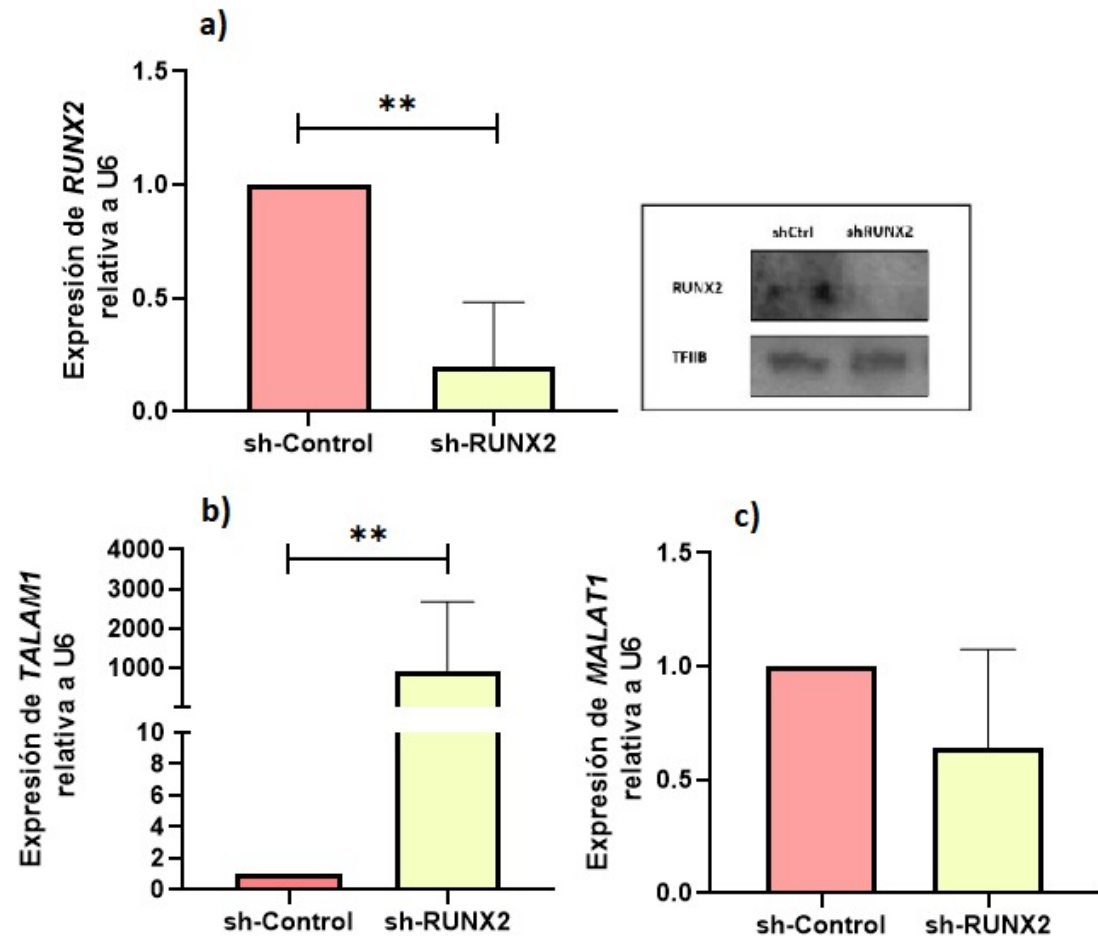
**Figura 5.** Correlación entre los niveles de expresión de *RUNX2* a nivel de mRNA y los niveles de expresión del mRNA *TALAM1* (a) y *MALAT1* (b) relativos a U6, en pacientes controles (n=8), con cáncer de origen primario (n=8) y con cáncer de origen metastásico (n=5). Los niveles de mRNA de *RUNX2*, *TALAM1* y *MALAT1* se cuantificaron mediante q-PCR.

#### 7.4 Regulación transcripcional de *TALAM1* mediada por el factor de transcripción *RUNX2*.

Finalmente, para determinar la función regulatoria del factor de transcripción *RUNX2* en la expresión génica de los lncRNA *TALAM1* y *MALAT1*, se realizaron ensayos de silenciamiento génico mediante el uso de shRNAs obtenidos a partir de partículas lentivirales (Fig. 6). En la figura 5a, se muestran los resultados de expresión de RNA

mensajero y proteína. Para este caso se observa una disminución significativa en los niveles de expresión de RNAm en las células que fueron infectadas con el shRUNX2. Esta disminución a nivel de RNAm se vio reflejada a nivel de proteína, en donde se observa expresión de la proteína RUNX2 solo en las células infectadas con el shCtrl (Fig. 6 a).

Una vez confirmado el silenciamiento de RUNX2, se realizaron ensayos de qPCR para identificar la expresión de RNAm de los lncRNAs *TALAM1* y *MALAT1* en las condiciones shCtrl y shRUNX2. Los resultados para este caso mostraron que sólo los niveles de RNAm de *TALAM1* se vieron afectados tras el silenciamiento de RUNX2 (Fig. 6 b), lo que evidencia su posible rol regulatorio sobre *TALAM1*. Específicamente en este caso se observa que en las células infectadas con el shRUNX2 se observó un aumento significativo en la expresión de *TALAM1*. Contrario a lo anterior, los niveles de expresión del lncRNA *MALAT1* no cambiaron en ninguna de las condiciones analizadas (Fig. 6 c).



**Figura 6.** Silenciamiento de RUNX2 a nivel de mRNA y proteína (n=3) (a) y expresión de *TALAM1* (b) y *MALAT1* (c) en sh-control y en sh-RUNX2. Los niveles de RNAm se cuantificaron mediante q-PCR y se normalizaron a RNAm de U6. Se realizaron análisis estadísticos con respecto a al grupo control. \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001.

## 8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que tanto en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón A549 y PC9 (Fig.1), como en pacientes con cáncer de pulmón de origen primario y metastásico (Fig. 2); hay sobreexpresión

de *RUNX2*. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura en donde se ha demostrado que las proteínas de la familia *RUNX2* están sobre-expresadas en diferentes tipos de cáncer; incluyendo el cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, leucemia linfoblástica aguda, melanoma, osteosarcoma, leucemia, linfoma, cáncer de ovario y cáncer de pulmón [65-68].

Por otro lado, *RUNX2* tuvo una mayor expresión en la línea celular PC9, que es una línea celular de origen primario más diferenciada que A549 y, por ende, menos agresiva [69]. Sin embargo, estos datos se tomaron a las 48 horas, donde se evidencia una caída en la expresión de *RUNX2* en A549 (Fig. 3) y un aumento en la expresión en PC9. La expresión de *RUNX2* a las 24 horas de cultivo fue más alta en A549, consecuente a lo reportado a la literatura sobre *RUNX2* expresado predominantemente en estadios avanzados o agresivos del NSCLC [38].

En cuanto a los pacientes, *RUNX2* se vio mayormente expresado en pacientes con cáncer de origen primario, lo que es congruente a lo encontrado por Herreño *et al*, donde el grupo de pacientes con cáncer NSCLC de origen primario tuvo una mayor expresión que el grupo con cáncer de origen metastásico [38]. Estos resultados apoyan la idea de que *RUNX2* está mayormente asociado a estadios II y III y no en estadios IV cuando existe un mayor factor de riesgo asociado a metástasis [38].

Por otro lado, para *TALAM1* también se evidenció un aumento en la expresión tanto en líneas celulares como en pacientes lo que es coherente con lo reportado en la literatura, donde se ha observado que tanto los niveles de *TALAM1* como los de *MALAT1* se co-expresan con una correlación positiva en múltiples líneas celulares humanas y de ratón, donde *TALAM1* es menos abundante que *MALAT1* [70].

En líneas celulares la expresión entre *TALAM1* y *MALAT1* fue mayor en la línea A549, lo que se relaciona con un fenotipo más agresivo del NSCLC. En otros estudios, *TALAM1* y *MALAT1* también se vieron mayormente expresados en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 que en la línea MDA-MB-231 [71], siendo la primera más resistente y agresiva que la segunda, lo que da indicios de que estos lncRNA se encuentran más activos en etapas más avanzadas del cáncer y formas más agresivas. Además, múltiples estudios han reportado a *MALAT1* como un

marcador de la progresión del cáncer y del mal pronóstico de la patología [72], lo que es congruente con encontrar expresión de ambos lncRNA en un modelo como A549.

Respecto a las dinámicas de estos lncRNA en el tiempo (Fig. 4) se observó en A549 una relación inversa para *TALAM1* y *MALAT1* (Fig. 4 a), diferente de PC9, donde la relación parece ser más constante y siempre menor en *TALAM1* (Fig. 4b). Las fluctuaciones observadas se pueden relacionar con la interacción entre los transcritos de *TALAM1* y *MALAT1*, pues se ha reportado que no sólo *TALAM1* empieza a aumentar para favorecer los niveles de *MALAT1*, sino que también *MALAT1* estabiliza a *TALAM1* al formar estructuras de cadena doble, que le confieren a su transcrito antisentido estabilidad frente a la degradación [73]. Sin embargo, en PC9 no se ven dichas fluctuaciones en la dinámica de expresión de estos lncRNAs (Fig. 4b) pero puede deberse a las diferencias biológicas entre las líneas celulares. Por ejemplo, A549 y PC9 difieren en el tiempo en entrar en estado de confluencia, A549 entra más rápido en dicho estado y se ha observado que junto con los cambios morfológicos, pueden alterarse las expresiones génicas, incluso de genes housekeeping [74]

Sin embargo, en pacientes la expresión de *TALAM1* fue mayor en cáncer de origen primario y fue diferente al comportamiento de *MALAT1*, siendo este mayor en cáncer de origen metastásico. Esto puede deberse a que en el grupo de pacientes con cáncer de origen metastásico existen distintos orígenes del tumor, es decir tumores que se originaron en otro tejido y llegaron al pulmón [75], lo que puede afectar los niveles de expresión de *TALAM1* y *MALAT1* encontrados en este grupo, frente a los encontrados en el grupo de cáncer de origen primario, es decir los que se originaron en pulmón. Estudios recientes muestran que los niveles de expresión de *MALAT1*, y por ende posiblemente los de *TALAM1*, varían dependiendo el tejido donde se haga la cuantificación [76].

Dado el aumento de los genes analizados *RUNX2*, *TALAM1* y *MALAT1* tanto en líneas celulares como en pacientes con NSCLC; se llevó a cabo un análisis de correlación para asociar los niveles de expresión de *RUNX2* con los lncRNA. Sin

embargo, no se encontró una significancia para los coeficientes de correlación encontrados (Fig. 5). Si bien, no hay una correlación clara en los genes evaluados, la función regulatoria de *RUNX2* es a nivel de proteína, como un factor de transcripción, y se ha demostrado que la transcripción y la traducción están lejos de tener una relación lineal, pues múltiples mecanismos pueden reprimir o potenciar la síntesis de proteínas a partir de moléculas de RNAm [77], por lo que no tener un resultado de correlación a nivel transcripcional, no significa que no pueda haberla a nivel de proteína de *RUNX2*.

Por tal motivo, se realizó un ensayo de silenciamiento dirigido al gen que codifica para el factor de transcripción *RUNX2* y se corroboró dicho silenciamiento a nivel de mRNA y de proteína (Fig. 6 a). Posteriormente, se analizó el efecto de dicho silenciamiento sobre la expresión de *TALAM1* y de *MALAT1* donde se encontró que *RUNX2* sorprendentemente tiene un rol supresor hacia *TALAM1*, puesto que tras el silenciamiento de *RUNX2*, se da un aumento estadísticamente significativo de *TALAM1*.

Los genes *RUNX* han mostrado funciones duales y contradictorias en el cáncer, ya que pueden comportarse como oncogenes o genes supresores de tumores [78-80]. De hecho, Las proteínas *RUNX* son activadores deficientes por sí mismas y deben interactuar con coactivadores transcripcionales como las histonas acetiltransferasas [81]. Por el contrario, las proteínas *RUNX* son potentes represores de la transcripción incluso cuando se expresan solas, lo que sugiere que su función predeterminada puede ser la de represión transcripcional [81].

Se presume que *RUNX2* podría estarse uniendo en el promotor de *TALAM1* y reclutando co-represores para regular a la baja la expresión de *TALAM1*. Por ejemplo, se sabe que *RUNX2* se une a mSin3, que recluta histonas deacetilasas (HDAC) [82]. Por otro lado, *RUNX2* se puede unir también a TLE, un homólogo de Groucho que se une a dominios C-terminales que contienen el motivo de unión a Groucho VWRPY en la estructura de *RUNX2* y que además se ha reportado que los miembros de la familia Groucho / TLE pueden ser correpresores específicos para los factores de transcripción de *RUNX* [83]. Finalmente, se ha informado de la



interacción entre proteínas RUNX e histonas deacetilasas (HDAC), para el caso de RUNX2, se ha observado un reclutamiento directo específico de la HDAC6 [84] lo que aumenta la carga positiva de las histonas al eliminar grupos acetilo, y por tanto la afinidad de estas proteínas por el DNA, condensando la cromatina e impidiendo así la transcripción.

Esta función dual de RUNX2, se ha reportado en otros factores de transcripción. Por ejemplo, el factor de transcripción activador 3 (ATF3), que en un estudio en cáncer colorrectal se determinó que regula negativamente la expresión de Bcl-2, los factores de transcripción inductores de EMT, la  $\beta$ -catenina y la expresión del retinoblastoma (Rb), actuando como supresor de tumores; pero, por otro lado, aumentó la migración celular colectiva y la expresión del grupo de diferenciación 44 (CD44) [84].

Los resultados aquí presentados sugieren que RUNX2 estaría teniendo un efecto negativo sobre *MALAT1*, a través de *TALAM1*. Bajo este escenario, surge la pregunta de cómo un factor de transcripción que está implicado en la EMT en NSCLC puede estar inhibiendo un lncRNA como *TALAM1* que aparentemente está implicado también de manera indirecta en el proceso de metástasis, por medio de la estabilización de *MALAT1*.

Sin embargo, por un lado, la sobreexpresión de *TALAM1*, tras el silenciamiento de RUNX2, no se refleja (o no se alcanzan a evidenciar a las 48h) en la expresión de *MALAT1* (Fig. 6 c) por lo que hacen falta nuevas investigaciones que profundicen sobre la regulación entre *TALAM1* y *MALAT1* y; por otro lado, *MALAT1* está asociado a hallmarks del cáncer diferentes a la metástasis, como la proliferación celular [85], por lo que el efecto esperado para *MALAT1* podría deberse a otros procesos llevados a cabo por este lncRNA en un determinado contexto celular.

Aunque en cáncer de pulmón no se ha reportado una función represora para RUNX2, estos resultados dan luz e invitan a realizar más investigaciones sobre el complejo funcionamiento de este factor de transcripción y su posible papel dual en NSCLC para que pueda ser validado como diana terapéutica en un futuro.

## 9. CONCLUSIONES

- Existe una sobre-expresión de *RUNX2* tanto en líneas celulares A549 y PC9 como en Pacientes con cáncer de origen primario y de origen metastásico. Siendo la expresión mayor en la línea celular PC9 y en el grupo de pacientes con cáncer de origen primario.
- Existe una sobreexpresión del lncRNA *TALAM1* en líneas celulares A549 y PC9, siendo mayor la expresión en A549. Además, también se encontró sobreexpresión en el grupo de pacientes evaluados, siendo mayor en pacientes con cáncer de origen primario.
- Existe una sobreexpresión del lncRNA *MALAT1* en líneas celulares A549 y PC9, siendo mayor la expresión en A549. Por otro lado, también se encontró sobreexpresión en el grupo de pacientes evaluados, siendo mayor la expresión en pacientes con cáncer de origen metastásico.
- No existe correlación estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de *RUNX2* y *TALAM1* y tampoco hubo correlación entre los niveles de expresión de *RUNX2* y *MALAT1*.
- *RUNX2* cumple un rol represor en la regulación del lncRNA *TALAM1*, pues después del silenciamiento del gen que codifica para el factor de transcripción *RUNX2* se evidencia un aumento estadísticamente significativo en los niveles de *TALAM1*, no así los de *MALAT1*.

## 10. PERSPECTIVAS Y PROYECCIONES

Luego de la determinación del papel del factor de transcripción *RUNX2* sobre la regulación negativa de *TALAM1*, se deben realizar más investigaciones que confirmen estos resultados y diluciden los mecanismos por los cuales *RUNX2*, mediante el reclutamiento de proteínas represoras, actúa sobre el promotor del lncRNA *TALAM1*.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Furrukh M. Tobacco smoking and lung cancer: Perception-changing facts. *Sultan Qaboos University Medical Journal*. 2013;13(3):345–58.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel R, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A.. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209–49.
3. Cancer Today [Internet]. [cited 2020 Sep 2]. Available from: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode\\_population=continents&population=900&population\\_s=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&gr](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&population_s=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&gr)
4. Ito Y, Bae S, Chuang L. The RUNX family: Developmental regulators in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2015;15(2):81–95.
5. Emaminejad N, Qian W, Guan Y, Tan M, Qiu Y, Liu H, et al. Fusion of Quantitative Image and Genomic Biomarkers to Improve Prognosis Assessment of Early Stage Lung Cancer Patients. 2016;63(5):1034–43.
6. Zhao W, Yang H, Chai J, Xing L. RUNX2 as a promising therapeutic target for malignant tumors. *Cancer Manag Res*. 2021;16(13):2539-2548.
7. Valenti, M. T., Serafini, P., Innamorati, G., Gili, A., Cheri, S., Bassi, C., & Dalle Carbonare, L. Runx2 expression: A mesenchymal stem marker for cancer. *Oncology letters*, (2016);12(5):4167–4172.
8. El-Telbany A, Ma P. Cancer genes in lung cancer: racial disparities: are there any?. *Genes Cancer*. 2012;3(7-8):467-480.
9. Zong X, Nakagawa S, Freier S, Fei J, Ha T, Prasanth S, Prasanth K. Natural antisense RNA promotes 3' end processing and maturation of MALAT1 lncRNA. *Nucleic Acids Res*. 2016 Apr 7;44(6):2898-908
10. Xinying Z, Shinichi N, Susan F, Jingyi F, Taekjip H, Supriya P, Kannanganattu P. Natural antisense RNA promotes 3' end processing and maturation of MALAT1 lncRNA, *Nucleic Acids*. 2016;44(6): 2898–2908
11. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2015;65(1):5–29.
12. Camargo M., Guisier, F., Rock L., Becker D., Sage A., Marshall E. & Lam, W. Tumour Suppressor Genes with Oncogenic Roles in Lung Cancer. *Genes and Cancer*. 2019;5(1):7-16

13. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J, Debievre D, Mosser J, Lena H, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: Results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet*. 2016;387(10026):1415-1426.
14. Xiao D, Liu K, Chen J, Gong Y, Zhou X, Huang J, et al. RUNX2 as a Potential Prognosis Biomarker and New Target for Human Lung Cancer. *Explor Res Hypothesis Med*. 2021;6(3):99-109.
15. Tavares A, Brown J, Ulrich E, Dvorak K, Runyan R. Runx2-I is an Early Regulator of Epithelial-Mesenchymal Cell Transition in the Chick Embryo. *Dev Dyn*. 2018;247(3):542-554.
16. Fares J., Fares M., Khachfe H. et al. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Sig Transduct Target Ther* 5, 28 (2020).
17. Otálora B, Henríquez B, López L, Rojas A. RUNX family: Oncogenes or tumor suppressors (Review). *Oncol Rep*. 2019;42(1):3-19.
18. Yun S., Yoon H., Bae S. et al. Transcriptional repression of RUNX2 is associated with aggressive clinicopathological outcomes, whereas nuclear location of the protein is related to metastasis in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2012;15(1): 369–373.
19. Raymond W., Ruddon M. 4 cancer biology. In: *Cancer Biology* [Internet]. Oxford Uni. New York; 2007. p. 3–17. Available from: <https://eds-b-ebscohost-com.ezproxy.javeriana.edu.co/eds/ebookviewer/ebook/ZTAwMHh3d19fMTkxNTQ4X19BTg2?sid=dd1c33a2-04c6-4861-b86f-0ab9e9c1415f@pdc-v-sessmgr06&vid=3&format=EB&rid=1>.
20. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review Douglas. *Cell*. 2000;100(7):57–70.
21. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74.
22. Marco E. Semblanza de Ada Raquel Aular Alfonzo. *Canales Venezolanos de Nutricion*. 2013;26(1):62.
23. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249–57.
24. Yang Y, Sun M, Wang L, Jiao B. HIFs, angiogenesis, and cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2013;114(5):967–74.
25. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2009;31(1):27–36.
26. Vargas-Rondón N, Villegas VE, Rondón-Lagos M. The role of chromosomal instability in cancer and therapeutic responses. *Cancers*. 2018;10(1):1–21.
27. Weidle, U. H., Birzele, F., Kollmorgen, G. & Ruger, R. The multiple roles of exosomes in metastasis. *Cancer Genomics Proteom*. 2017;(14):1-15.

28. Tickner, J. A. et al. Functions and therapeutic roles of exosomes in cancer. *Front Oncol.* 2014(4):127
29. Harris, D. A. et al. Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement. *PLoS ONE* 10, e0117495 (2015).
30. Inamura K. Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Frontiers in Oncology.* 2017;7(3):1–7.
31. Oliveira MBDR, Souza LC, Sampayo EJJ, Carvalho GS de, Mello FCDQ, Paschoal MEM. O impacto da histologia do carcinoma pulmonar na frequência das metástases ósseas. *Revista Brasileira de Ortopedia.* 2019;54(5):524–30.
32. Hoseok I, Cho JY. Lung Cancer Biomarkers [Internet]. 1st ed. Vol. 72, *Advances in Clinical Chemistry.* Elsevier Inc.; 2015. 107–170. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.acc.2015.07.003>
33. Biomarkers LC. *HHS Public Access.* 2018;31(1):13–29.
34. Yang Y, Sun M, Wang L, Jiao B. HIFs, angiogenesis, and cancer. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2013;114(5):967–74.
35. Vimalraj S, Arumugam B, Miranda PJ, Selvamurugan N. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *International Journal of Biological.* 2017;9(67):3–9.
36. Xiao Z, Hjelmeland A, Quarles L. Selective Deficiency of the “Bone-related” Runx2-II Unexpectedly Preserves Osteoblast-mediated Skeletogenesis. *Journal of Biological Chemistry.* 2004;279(19):20307–13.
37. Li Y lin, Xiao Z sheng. Advances in Runx2 regulation and its isoforms. *Medical Hypotheses.* 2007;68(1):169–75.
38. Herreño AM, Ramírez AC, Chaparro VP, Fernandez MJ, Cañas A, Morantes CF, et al. Role of RUNX2 transcription factor in epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer lung cancer: Epigenetic control of the RUNX2 P1 promoter. *Tumor Biology.* 2019;41(5):1–13.
39. Ito Y, Bae SC, Chuang LSH. The RUNX family: Developmental regulators in cancer. *Nature Reviews Cancer* [Internet]. 2015;15(2):81–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3877>.
40. Ozaki T, Wu D, Sugimoto H, Nagase H, Nakagawara A. Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) inhibits p53-dependent apoptosis through the collaboration with HDAC6 in response to DNA damage. *Cell Death Dis.* 2013;4(4):610.
41. Zhang P, Wu W, Chen Q, Chen M. Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. *Journal of integrative bioinformatics.* 2019;16(3):1–12.
42. Bolha L, Ravnik-glava M, Glava D. Review Article Long Noncoding RNAs as Biomarkers in Cancer. 2017;10(5):32–55

43. Balas M, Johnson A. Exploring the mechanisms behind long noncoding RNAs and cancer. *Non-coding RNA Research* [Internet]. 2018;3(3):108–17.
44. Yao R, Wang Y, Chen LL. Cellular functions of long noncoding RNAs. *Nature Cell Biology*. 2019;21(5):542–551.
45. Ji P, Diederichs S, Wang W, Bo S, Metzger R, Paul M, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin b 4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. 2003;(34):8031–41.
46. Bernard D, Prasanth K v, Tripathi V, Colasse S, Nakamura T, Xuan Z, et al. A long nuclear-retained non-coding RNA regulates synaptogenesis by modulating gene expression. 2010;29(18):3082–93.
47. Zhang X, Hamblin MH, Yin KJ. The long noncoding RNA Malat1: Its physiological and pathophysiological functions. *RNA Biology* [Internet]. 2017;14(12):1705–14.
48. sen Li ZM& H-BH. The lncRNA MALAT1 contributes to non-small cell lung cancer development via modulating miR-124/STAT3 axis. *Journal of cellular physiology*. 2017;233(9):6679–88.
49. Jonathan Posner, James A. Russell and BSP. Public Access. *Bone*. 2008;23(1):1–7.
50. Shi X, Sun M, Wu Y, Yao Y, Liu H, Wu G, et al. Post-transcriptional regulation of long noncoding RNAs in cancer. *Tumor Biology*. 2015;36(2):503–13.
51. Chen Q, Zhu C, Jin Y. The Oncogenic and Tumor Suppressive Functions of the Long Noncoding RNA MALAT1: An Emerging Controversy. *Front Genet*. 2020;11:93
52. Arun G, Diermeier S, Akerman M, et al. Differentiation of mammary tumors and reduction in metastasis upon Malat1 lncRNA loss. *Genes Dev*. 2016;30(1):34–51
53. Kim J, Piao HL, Kim BJ, et al. Long noncoding RNA MALAT1 suppresses breast cancer metastasis. *Nat Genet*. 2018;50(12):1705–1715
54. Yang L, Lin C, Liu W, Zhang J, Ohgi KA, Grinstead JD, et al. ncRNA- and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs. *Cell* [Internet]. 2011;147(4):773–88.
55. Kim J, Piao H, Kim B, Yao F, Han Z, Wang Y, et al. cancer metastasis. 2018;50(65): 45–56
56. The Global Cancer Observatory. GLOBOCAN 2020: International Agency Research on Cancer. 2020;509:1–2.
57. Implications F. MALAT1 Long Non-Coding RNA: Functional Implications. 2020;1–17.
58. Arun G, Diermeier S, Akerman M, Chang K, Wilkinson JE, Hearn S, et al. Differentiation of mammary tumors and reduction in metastasis upon Malat1 lncRNA loss. 2016;34–51
59. Guo F, Liu Y, Li Y, Li G. Inhibition of ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 1 suppresses proliferation and reduces tumor cell invasion in CaSki human cervical cancer cells. 2010;1:3819–25.

60. Wang X, Li M, Wang Z, Han S, Tang X, Ge Y, et al. Silencing of Long Noncoding RNA *MALAT1* by miR-101 and miR-217 Inhibits Proliferation, Migration, and Invasion of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells. 2015;290(7):3925–35.
61. *TALAM1* gene – *TALAM1* transcript, *MALAT1* antisense RNA. Gene Cards. 2017[noviembre 11]. Disponible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TALAM1>.
62. Kwok ZH, Roche V, Chew XH, Fadieieva A, Tay Y. non-coding RNA *MALAT1* in colon and breast cancers. 2018; 678:668–78.
63. Ying L, Chen Q, Wang Y, Zhou Z, Huang Y, Qiu F. Molecular BioSystems Upregulated *MALAT-1* contributes to bladder cancer cell migration by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. 2012;2289–94.
64. Tang D, Yang Z, Long F, Luo L, Yang B, Zhu R, et al. Inhibition of *MALAT1* reduces tumor growth and metastasis and promotes drug sensitivity in colorectal cancer. Cellular Signalling. 2019;57(5):21–8.
65. Olfa G, Christophe C, Philippe L, Romain S, Khaled H, Pierre H, Odile B, Jean-Christophe D. *RUNX2* regulates the effects of TNF $\alpha$  on proliferation and apoptosis in SaOs-2 cells. Bone. 2010 Apr;46(4):901
66. Han, X., Na, T., Wu, T, & Yuan, B. Human lung epithelial BEAS-2B cells exhibit characteristics of mesenchymal stem cells. PLOS ONE. 2010;15(1):34-45
67. Vishal, M., Swetha, R., Thejaswini, G., Arumugam, B., & Selvamurugan, N. Role of Runx2 in breast cancer-mediated bone metastasis. International Journal of Biological Macromolecules. 2017;99(1):608–614.
68. T. Komori. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors J. Cell. Biochem. 2005;95(3): 445-453
69. S.-S. Sun, L. Zhang, J. Yang, X. Zhou. Role of runt-related transcription factor 2 in signal network of tumors as an intermedator. Cancer Lett. 2015;361(1):1-7
70. A549 cell line. In: Invitrogen [Internet]. 2007 (noviembre 14) Available from: <https://www.invivogen.com/a549-dual>.
71. Zong X., Nakagawa S., Freier S. M., Fei J., Ha T., Prasanth S.& Prasanth V. Natural antisense RNA promotes 3' end processing and maturation of *MALAT1* lncRNA. Nucleic Acids Research. 2016;44(6):2898–2908.
72. Ji P, Diederichs S, Wang W, Böing S, Metzger R, Schneider PM, Tidow N, Brandt B, Buerger H, Bulk E, Thomas M, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C. *MALAT-1*, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. Oncogene. 2003;22(39):8031-41.
73. Zong X, Nakagawa S, Freier SM, et al. Natural antisense RNA promotes 3' end processing and maturation of *MALAT1* lncRNA. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(6):2898-2908. doi:10.1093/nar/gkw047

74. Minervini CF, Izumi M, Miki T. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la expresión de genes de referencia en células madre derivadas de placenta. *Int J Stem Cells* . 2009;2(1): 69-75.
75. Vogt A, Schmid S, Heinimann K, et al. Multiple primary tumours: challenges and approaches, a review. *ESMO Open*. 2017;2(2):34-56
76. Li ZX, Zhu QN, Zhang HB, Hu Y, Wang G, Zhu YS. MALAT1: a potential biomarker in cancer. *Cancer Manag Res*. 2018;10:6757-6768.
77. Maier T, Güell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett*. Dec 2017;583(24):3966-73.
78. Blyth K, Cameron ER, Neil JC. The RUNX genes: Gain or loss of function in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(26):376–387
79. Kilbey A, Terry A, Cameron ER, Neil JC. Oncogene-induced senescence: An essential role for Runx. *Cell Cycle*. 2008;7(3):2333–2340.
80. Blyth K, Vaillant F, Jenkins A, McDonald L, Pringle MA, Huser C, Stein T, Neil J, Cameron ER. Runx2 in normal tissues and cancer cells: A developing story. *Blood Cells Mol Dis*. 2010;45(78):117–123.
81. Durst, K., Hiebert, S. Role of RUNX family members in transcriptional repression and genesilencing. *Oncogene*. 2004;23: 4220–4224.
82. Laherty C, Yang W, Sun J, Davie J, Seto E y Eisenman R. *Cell*,1997;89: 349–356.
83. Javed A, Guo B, Hiebert S, Choi JY, Green J, Zhao SC, Osborne MA, Stifani S, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ y Stein GS. *Cell Sci*, 2000;113 (12): 2221–2231.
84. Jiang X, Kim KJ, Ha T, Lee SH. Potential Dual Role of Activating Transcription Factor 3 in Colorectal Cancer. *Anticancer Res*. 2016;36(2):509-16
85. Wu S, Wang A, Wu W, Hu Y, Li M, Ding Q, Weng H, Shu Y, Liu T, Jiang L, Cao Y, Bao R, Mu J, Tan Z, Tao F, Liu Y. MALAT1 promotes the proliferation and metastasis of gallbladder cancer cells by activating the ERK/MAPK pathway. *Cancer Biol Ther*. 2014;15(6):806-14.