



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

Programa de Doctorado de Biomedicina y Biotecnología

IDENTIFICACIÓN DE GRHL2 COMO
BIOMARCADOR EPIGENÉTICO EN LA
RESISTENCIA A TERAPIAS ANTI-EGFR EN EL
CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO

Tesis Doctoral presentada por:

Cora Palanca Ballester

Dirigida por:

Juan Sandoval del Amor

Marta Benet Giménez

Julián Carretero Asunción

Enero 2023

Dr. Juan Sandoval del Amor, Director de la plataforma de Epigenética e IP de la Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión del Instituto de Investigación Sanitaria de La Fe,

Dra. Marta Benet Giménez, Investigadora post-doctoral senior de la Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión del Instituto de Investigación Sanitaria de La Fe,

Dr. Julián Carretero Asunción, Profesor Titular del Dpto. de Fisiología de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada “IDENTIFICACIÓN DE GRHL2 COMO BIOMARCADOR EPIGENÉTICO EN LA RESISTENCIA A TERAPIAS ANTI-EGFR EN EL CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO.”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por **Dña. Cora Palanca Ballester**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Biotecnología y Biomedicina de la Universidad de Valencia.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, 20 de enero de 2023

Fdo:

Dr. Juan Sandoval del Amor

Fdo:

Dra. Marta Benet Giménez

Fdo:

Dr. Julián Carretero Asunción

A mis padres,

*“Perquè si un dia no estas,
hauries de saber que més no et puc estimar,
que encara et necessite per seguir caminant”*

Mami, La Fumiga

Agradecimientos

Me gustaría aprovechar esta oportunidad para agradecer la ayuda, el apoyo y la implicación que me han brindado mi familia, amigos y compañeros durante los años en los que he estado realizando mi tesis doctoral.

A mi familia, en primer lugar, a las personas a las que les debo todo, los pilares de mi día a día, a mis padres Jaime y Merce. Por el cariño y la educación que me habéis dado confiando siempre en mi, valorándome y apoyándome en todo sin soltarme de la mano, en especial durante este último año; sois mi ejemplo a seguir. A mi segunda madre, “la yaya” por tu “estudia” constante que nos ha hecho llegar tan lejos. Todo lo que somos y lo que hemos logrado, sin duda es tuyo. A mi abuelo, mis tías Nuria y Merce y a los que no están, por darme en cada momento lo que necesito y ser la mejor familia que podría haber deseado. A mis primos (Adrián, Robert, Noelia y Ana) que son los hermanos que siempre quise tener, por sufrirme, animarme y darme fuerzas cada vez que me ven. A Bruce y a Coco por completarme y hacerme tan feliz. Y, por último, a Nacho y Nuria, por ser el engranaje de mi día a día, construir planes juntos, ser hermanos y compartir vida.

No sabría cómo expresar lo agradecida que estoy por todo lo que han hecho por mí Agus y mis directores Juan, Marta y Julián. Gracias por enseñarme este mundo, lo que es la buena ciencia y lo que son unos buenos investigadores, sois inspiración. Gracias por el apoyo, la paciencia y la confianza que me habéis dado día tras día durante todos estos años, haciendo posible todo este trabajo. A Agus por estar ahí cuando lo he necesitado, tener siempre la puerta abierta, preocuparse tanto por mí, ofreciéndome siempre buenos consejos e ideas, haciendo el papel de un director más. A Julián, por iniciar de la mano, ya hará 6 años, este camino a mi lado, por todo lo que he aprendido contigo y hacerte tanto de querer. A Juan, por confiar en mí, en mi trabajo y en mi valía, siendo un jefe comprensivo y bueno, dándome apoyo y la oportunidad de aprender tanto. Y a Marta, por ser tú, cubrirme las espaldas, ser la mamá gallina, la mamá Marta, explicarnos todo tan gráfica y expresivamente, aguantarnos, hacernos reír, escucharnos, ayudarnos tantísimo, por ser apoyo, inspiración, amiga y maestra, gracias por no soltarme de la mano nunca. Gracias a los cuatro, habéis sido el pilar fundamental en el que se apoya esta tesis.

No quiero olvidarme de agradecer al departamento de endoscopias del Hospital la Fe, la ayuda tan indispensable que me han brindado durante estos años, por hacerme sentir una más del equipo y tratarme tan bien. A los doctores Enrique Cases, Andrés Briones y Raquel Martínez quienes nos han permitido proyectar nuestras ideas y dejarnos hacerlas realidad. A Chelo, Cati, Encarna, María y todas las enfermeras de endoscopias, por tratarme tan bien, estando siempre al pie del cañón, con su esfuerzo, dedicación, siendo mi mano derecha en la recogida de muestras.

A mi grupo, la Unidad de Biomarcadores y Medicina de precisión del IIS la Fe. A los doctores que forman parte del grupo, especialmente a Óscar Juan y Quico Aparisi, por las ideas y el aprendizaje que me han ofrecido durante este tiempo. Y a mis compañeros de grupo, cómplices en esta aventura. A Maribel con quien he compartido tiempos y depósito, por la complicidad y la ayuda que me has dado durante todos estos años. A Ester, mi compañera de “epigenética”, por confiar y unirse a esta aventura conmigo, pero sobretodo por los momentos que hemos pasado juntas. A Diana, quien me ha ayudado y ha estado ahí cuando lo he necesitado. A Juan Carlos, por la inspiración que transmites, escuchándome y aconsejándome. A Sonia, por sus consejos. A Vero por acompañarme desde los inicios, haciendo de técnico, investigadora y amiga, por apoyarme y quererme tanto. A mis otras “mamás gallinas”, Laia y Nuri, gracias por acogerme tan bien, escucharme, conectar tanto conmigo, ayudándome siempre que lo he necesitado, haciéndome reír y dándome “vidilla” todos estos años, ¡sois increíbles!. De forma especial quiero dar las gracias a mis “hermanos polluelos”, mis compañeros y amigos Adri y Martita, por aparecer, tener esa complicidad tan nuestra, soñar juntos, por ese viaje que ha sido la vitamina que necesitaba, por hacer tanta piña y apoyarme siempre, siendo confidentes y los mejores compañeros con los que compartir esta aventura y estos años de mi vida, no sé lo que habría sido de Cora sin su mamá gallina y sus hermanos polluelos.

También quiero dedicar una mención especial a mis compañeros del departamento de Fisiología de Farmacia, por el apoyo inicial y estar siempre ahí para resolverme cualquier duda (Dan, Inés, Miguel, Chabeli, Salva, Lourdes y Eva). Muy especialmente a Salva y Chabeli por su cariño, alegrándome y aconsejándome cada vez que me ven. Al grupo de Señalización oncogénica del CIPF, a Rosa y Carol por ayudarnos tanto y tan bien. A Carol

en especial, por el tiempo que ha invertido en mi, dedicándome su tiempo cuando lo he necesitado, escuchándome y aconsejándome.

Finalmente, quiero agradecerles a mis mejores amigos, (Amparo, Mayte, Carmen, David, Josevi, Eva, Ari, Aitana, Marcos, María, Arantxa, Donis, Irene, Jaume, Joan, Malena, Anna, Jorge y Silvia, sin olvidarme de mi sobrina Valeria), ¡¡el haberme hecho tía!!, el estar ahí cada vez que me agobio, habiéndose hecho expertos en cáncer de pulmón, escuchándome hablar de ratones y ratas llegando a normalizar la conversación. Por los veranos juntos, mimarme, consentirme, sacarme a almorzar, a bailar, a cantar y a tomar algo; por enseñarme tanto y hacerme reír solo como vosotros sabéis. Pero sobretodo por ser “casa”, ser “maret” cada vez que lo necesito, queriéndome y apoyándome como lo hacéis. *Vos estime molt.*

Y a Miguel, a ti, por aparecer en la recta final de este proyecto, sorprenderme, cuidarme y hacerme tan feliz.

En definitiva, ¡Muchas gracias a todos!

Índice

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	XI
ABREVIATURAS	XIII
RESUMEN.....	XIX
INTRODUCCIÓN.....	1
1. CÁNCER.....	3
1.1. CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DEL CÁNCER	4
1.2. ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN EL CÁNCER	12
1.2.1. METILACIÓN DEL ADN	13
1.3. CÁNCER DE PULMÓN	16
1.3.1. ETIOLOGÍA EN EL CP	18
1.3.2. CLASIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA DEL CÁNCER DE PULMÓN	19
1.3.3. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DEL CP	21
1.3.4. ESTADIFICACIÓN DEL CP	23
1.3.5. GENÉTICA EN EL CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO	27
1.3.5.1. Oncogenes frecuentemente mutados en CPNM.....	29
1.3.6. EPIGENÉTICA EN EL CPNM.....	32
1.3.6.1. Hipermetilación en el CP	33
1.3.6.2. Hipometilación en CP	34
1.3.7. BIOMARCADORES EPIGENÉTICOS EN EL CP	34
1.3.8. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS PARA EL CPNM	36
1.3.8.1. Terapias no dirigidas	37
1.3.8.2. Terapias dirigidas	39
1.3.9. MECANISMOS DE RESISTENCIA A INHIBIDORES DE EGFR.....	44

2. TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL EN EL CÁNCER (TEM)	47
2.1. MARCADORES EPITELIALES Y MESENQUIMALES INVOLUCRADOS EN EL PROCESO DE LA TEM.....	50
2.2. ACTIVACIÓN DEL PROGRAMA TEM	52
2.3. INVASIÓN Y METÁSTASIS EN TEM.....	55
2.4. RESISTENCIA A LOS ITQS DE EGFR INDUCIDA POR LA TEM EN EL CPNM	56
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	61
MATERIALES Y MÉTODOS	65
1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	67
2. ANÁLISIS DE LA METILACIÓN GLOBAL DEL ADN MEDIANTE <i>MICROARRAYS</i> INFINIUM DE LÍNEAS CELULARES DE CP	68
3. MODELOS EXPERIMENTALES	70
4. CONDICIONES DE CULTIVOS CELULARES	71
5. EXPERIMENTOS DE INHIBICIÓN Y SOBREEXPRESIÓN	72
A. OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS LENTIVIRALES	72
B. PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS LENTIVIRALES	74
C. TRANSDUCCIÓN VIRAL	76
6. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULARES	76
7. ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD CELULAR: MÉTODO DE LA SULFORODAMINA B.....	77
8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE <i>WESTERN BLOT</i>	78
A. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	78
B. ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA.....	78
C. INMUNODETECCIÓN	79

9.	<u>ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-QPCR</u>	80
A.	EXTRACCIÓN DEL ARN	81
B.	SÍNTESIS DEL ADNC	81
C.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	82
10.	<u>ANÁLISIS DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE CHIP</u>	84
A.	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	84
B.	INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA	85
C.	EXTRACCIÓN DEL ADN	87
D.	RT-QPCR DEL CHIP	87
11.	<u>INMUNOFLUORESCENCIA</u>	87
12.	<u>DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES TGFβ1</u>	89
13.	<u>MIGRACIÓN CELULAR</u>	90
14.	<u>ESTUDIO DE FORMACIÓN DE COLONIAS</u>	90
15.	<u>ANÁLISIS EPIGENÉTICOS DE METILACIÓN DEL ADN</u>	91
A.	DESMETILACIÓN CON 5-AZA-2'-DESOXICITIDINA	91
B.	CONVERSIÓN DE BISULFITO	91
C.	DROPLET DIGITAL PCR (DDPCR)	92
I.	DISEÑO DE SONDAS Y CEBADORES	92
II.	PROTOCOLO	93
16.	<u>EXPERIMENTOS CON MODELOS ANIMALES</u>	95
A.	ANIMALES	95
B.	INYECCIÓN SUBCUTÁNEA DE CÉLULAS DE CPNM EN RATÓN	96
C.	RECOGIDA DE MUESTRAS	97
D.	FIJACIÓN DE LOS TEJIDOS	97

17.	<u>MUESTRAS DE PACIENTES</u>	<u>97</u>
A.	<u>ANÁLISIS DE BIOPSIAS TUMORALES</u>	<u>97</u>
18.	<u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u>	<u>98</u>
19.	<u>ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO</u>	<u>98</u>
	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	<u>99</u>
1.	<u>BÚSQUEDA DE NUEVOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE RESISTENCIA ADQUIRIDA A LOS ITQS ASOCIADOS A TEM</u>	<u>101</u>
2.	<u>VALIDACIÓN DE LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA EXPRESIÓN DE GRHL2 MEDIANTE CAMBIOS EN LA METILACIÓN DEL ADN EN SU PROMOTOR EN LÍNEAS CELULARES DE CP...</u>	<u>109</u>
3.	<u>CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GRHL2 CON LOS MARCADORES DE LA TEM EN LÍNEAS CELULARES DE ACP</u>	<u>112</u>
4.	<u>CARACTERIZACIÓN DE MODELOS CELULARES DE CÁNCER DE PULMÓN CON EGFR MUTADO RESISTENTES A LOS ITQS DE EGFR</u>	<u>114</u>
5.	<u>ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA RELACIÓN ENTRE GRHL2 Y LA TEM</u>	<u>120</u>
6.	<u>LA EXPRESIÓN DE GRHL2 MODULA LA SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA A LOS ITQS</u>	<u>135</u>
7.	<u>VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS MODELOS <i>IN VIVO</i></u>	<u>143</u>
8.	<u>VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS EN MUESTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES CON CPNM</u>	<u>153</u>
	<u>CONCLUSIONES</u>	<u>157</u>
	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>161</u>

Lista de figuras

Figura 1. Características funcionales adquiridas por las células tumorales en la mayoría de los cánceres. Adaptado de Hanahan, 2022.....	5
Figura 2. Maquinaria epigenética: Modificaciones en las histonas y el ADN. La conformación de la cromatina abierta se asocia a la ausencia de metilación y por lo tanto a la expresión génica; sin embargo, la conformación de la cromatina cerrada presenta metilación del ADN y marcas de histonas represivas y, por ende, se puede relacionar con el silenciamiento transcripcional. Adaptado de Marx, 2012.....	13
Figura 3. Esquema de los diferentes tipos de CpGs según su localización.....	14
Figura 4. Resumen de los cambios en la metilación del ADN. Proceso de desmetilación o metilación de las islas CpG de las regiones promotoras de los genes, que permiten el acceso a la maquinaria transcripcional y la expresión o represión génica. Adaptada de Klug, et al., 2019, 2020.....	15
Figura 5. Tipos de cáncer más frecuentes en 2020 para ambos sexos: Incidencia y mortalidad. Fuente imágenes: GLOBOCAN 2020 <i>Graph production: Global Cancer Observatory</i> (https://gco.iarc.fr/) <i>International Agency for Research on Cancer</i> 2021. 17	
Figura 6. Ratios de incidencia del CP para ambos sexos y distribución en todo el mundo. Fuente <i>National Cancer Institute</i> (NIC) (https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga/studiedcancers/lungadenocarcinoma).	18
Figura 7. Representación gráfica de los diferentes tipos y subtipos histológicos de CP.	20
Figura 8. Porcentajes aproximados de la tasa mutacional en los subtipos histológicos ACP y SCC del CPNM. Adaptado de Chan & Hughes, 2015 incluyendo datos de Kashima et al., 2019.....	28

Figura 9. Modelo de próxima generación para la estratificación molecular de ACP, donde se muestra las conmutaciones de <i>EGFR</i> y <i>KRAS</i>. Adaptado de Skoulidis & Heymach, 2019.....	29
Figura 10. Vías de señalización que modulan <i>EGFR</i> en el CPNM. Las mutaciones del dominio quinasa de <i>EGFR</i> (incluida la delección del exón 19 y las mutaciones L858R y T790M) aumentan la actividad quinasa de <i>EGFR</i> . Este aumento de la actividad quinasa de <i>EGFR</i> promueve la hiperactivación de las vías de señalización posteriores (o aguas abajo o subsiguientes), incluidas MAPK, PI3K/Akt/mTOR e IL-6/JAK/STAT3, que favorecen la tumorigénesis de las células en el CPNM junto con el programa de TEM. Adaptada de Hsu et al., 2019 y Passaro et al., 2021. Creada con BioRender.com.....	31
Figura 11. Mutaciones específicas dependientes de <i>EGFR</i> o adquiridas después del tratamiento. Esquema que representa los diferentes exones en <i>EGFR</i> y los dominios funcionales en los que se producen las mutaciones sensibilizantes o que confieren resistencia. TM, dominio transmembrana. Adaptada de Passaro et al., 2021.....	46
Figura 12. Cambios producidos en las células durante la TEM. Adaptado de Santamaria et al., 2017; Tam & Weinberg, 2013. Creada con BioRender.com.....	50
Figura 13. Mecanismos de transducción de señal inducidos por TGFβ1 durante TEM. Adaptado de Derynck et al., 2014.....	53
Figura 14. Capas de regulación TEM. La TEM está regulada a nivel epigenético, transcripcional, postranscripcional, traduccional y postraduccional. Los FTs-TEM reclutan la maquinaria de metilación del ADN y modificación de histonas para reprimir de manera estable los genes epiteliales y evitar su transcripción. Se oponen a los FT asociados al epitelio, que a su vez reprimen los FTs-TEM. Tanto los transcritos epiteliales como los mesenquimales se empalman y regulan alternativamente por miRNA y long non-coding RNA (lncRNA). El inicio de la traducción, la estabilidad del ARN mensajero (ARNm) y la poliadenilación afectan la tasa de traducción de las transcripciones epiteliales y mesenquimatosas. Las modificaciones postraduccionales como la ubiquitinación, la acetilación y la fosforilación determinan el equilibrio entre la estabilidad y la degradación de las proteínas epiteliales y mesenquimatosas (Kaimori et al., 2007).	55
Figura 15. Esquema metodológico empleado en este trabajo.....	68

Figura 16. Imágenes de la morfología de las líneas celulares empleadas.....	71
Figura 17. Esquema del plásmido de silenciamiento de GRHL2 empleado.	74
Figura 18. Esquema del plásmido de sobreexpresión de GRHL2 empleado.	74
Figura 19. Esquema de la conversión por bisulfito.....	92
Figura 20. Cartucho empleado para la formación de gotas y orden de los componentes. Adaptada de https://www.bio-rad.com.....	94
Figura 21. Diagrama de Venn extraído del análisis de respuesta a los ITQs de EGFR gefitinib, erlotinib y afatinib en líneas de CPNM.....	102
Figura 22. <i>Volcano Plot</i> de los genes comunes en el análisis de sensibilidad a gefitinib, erlotinib y afatinib en líneas celulares de CPNM, donde se muestra la correlación entre la metilación y la sensibilidad a los ITQs de EGFR. Se muestran aquellos genes con un p-valor < 0,05. En rojo se muestra <i>GRHL2</i>, hipometilado y sobreexpresado en las líneas sensibles a los ITQs de EGFR. NES (Normalized Enrichment Score).	105
Figura 23. Análisis Pearson que representan la correlación entre los valores de metilación y expresión de <i>GRHL2</i> en líneas sensibles y resistentes a afatinib.	108
Figura 24. Estudio de la metilación del promotor de <i>GRHL2</i> obtenidos a partir del <i>array</i> 450K en un panel de líneas celulares de CP del estudio CURELUNG. El color rojo hace referencia a una elevada metilación y el color azul indica una metilación baja.	110
Figura 25. Estudio de la expresión de <i>GRHL2</i> obtenidos de las líneas celulares estudiadas a partir del <i>array</i> 450K en un panel de líneas celulares de CP del estudio CURELUNG.	110
Figura 26. Cuantificación de la expresión de GRHL2 a nivel de ARNm mediante RT-qPCR tras el tratamiento con el agente desmetilante 5-aza.	111
Figura 27. Análisis de correlación entre la expresión de <i>GRHL2</i>, genes epiteliales y mesenquimales y firma TEM en líneas de ACP de la Cancer Cell Line Encyclopedia (Broad Institute). El color rojo hace referencia a una elevada expresión y el color azul indica una expresión baja. El coeficiente de correlación de Pearson y su p-valor fue ajustado mediante FDR.	113
Figura 28. Modelos de estudio <i>in vitro</i> de resistencia adquirida a los ITQs de EGFR llevados a cabo en nuestro laboratorio.	115

- Figura 29. Curvas de citotoxicidad de las líneas celulares de CPNM con *EGFR* mutado sensibles y sus versiones resistentes.** Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control \pm desviación estándar (n=6).116
- Figura 30. Estudio de la metilación del promotor de *GRHL2* de las líneas celulares de CPNM con *EGFR* mutado sensibles y sus versiones resistentes.** El color rojo hace referencia a una elevada metilación y el color azul indica una metilación baja.117
- Figura 31. Cuantificación de la expresión de *GRHL2* a nivel de ARNm mediante RT-qPCR y gel de agarosa tras el tratamiento con el agente desmetilante 5-aza.**117
- Figura 32. Marcadores TEM de las líneas sensibles y resistentes a ITQ. Se utilizaron ARNm de las líneas celulares y se analizó mediante qPCR.** Valores normalizados a cada una de las líneas celulares de CPNM con *EGFR* mutado sensibles. El color rojo hace referencia a una elevada expresión y el color azul indica una expresión baja.....118
- Figura 33. Expresión de *GRHL2* en las líneas celulares de CPNM con *EGFR* mutado sensibles y sus versiones resistentes.** Se utilizaron extractos proteicos y mediante *western blot* se determinaron las proteínas *GRHL2* y β actina (*ACTB*) como control de carga. La imagen corresponde a un experimento representativo de 3 similares.118
- Figura 34. Silenciamiento de *GRHL2* mediante la infección lentiviral de 5 secuencias de shRNA.** A. Análisis de la expresión de la proteína *GRHL2* mediante *western blot* en los extractos protéicos de células HCC4006 infectadas con las distintas secuencias de silenciamiento. B. Análisis de la expresión de *CDH1*, *VIM* y *GRHL2*, mediante *western blot*, en los extractos protéicos de las líneas celulares HCC4006, HCC827 y H1975 infectadas con la secuencia C de silenciamiento En ambas imágenes se empleó *ACTB* como proteína de expresión constitutiva para normalizar la carga (n=3, siendo n el número de réplicas realizadas).122
- Figura 35. Impacto sobre el crecimiento celular tras la modulación de la expresión de *GRHL2* en el modelo celular HCC4006, HCC827 y H1975.** Para el cálculo de la tasa de proliferación las líneas celulares fueron sembradas en placas de 6 pocillos y tras 48 horas se contaron mediante el método de exclusión del azul tripán (n=6).123
- Figura 36. Inmunofluorescencia de marcadores TEM y *GRHL2* en el modelo HCC4006 y H1975 (shNT y sh*GRHL2*).** Las diferentes líneas celulares se sembraron sobre cubreobjetos en placas de 24 pocillos y tras 48h se fijaron con paraformaldehído al 4%.

Los núcleos aparecen en blanco tras marcaje con Hoechst-33342, GRHL2 en rojo, CDH1 en verde y VIM en azul tras el marcaje con anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor® 488, 546 y 633 respectivamente. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal (40X).....124

Figura 37. Expresión de GRHL2 y marcadores TEM a nivel de ARNm en el modelo de silenciamiento de GRHL2. Se emplearon extractos de ARN que se retrotranscribieron a ADNc y por RT-qPCR se determinaron los niveles de GRHL2 y los marcadores TEM, además de ACTB como control de carga en las líneas shNT y shGRHL2, los datos están expresados en log2 del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de la línea shGRHL2 comparada con la shNT (n=3). Ciclo umbral (CT).....125

Figura 38. Análisis de la expresión de la proteína GRHL2, CDH1, ZEB1, VIM y SNAIL/SLUG mediante *western blot* en los extractos protéicos de células H1975 y HCC827 infectadas con shGRHL2 y OEGRHL2. Se empleó ACTB como proteína de expresión constitutiva para normalizar la carga (n=3, siendo n el número de réplicas realizadas). H1975 y HCC827 en azul, H1975 AZDR-HCC827 ER23 en rojo, H1975-HCC827 shGRHL2 en naranja y H1975 AZDR-HCC827 ER23 OEGRHL2 en verde.128

Figura 39. Expresión de GRHL2 y marcadores TEM a nivel de ARNm en el modelo de sobreexpresión de GRHL2. Se emplearon extractos de ARN que se retrotranscribieron a ADNc y por RT-qPCR se determinaron los niveles de GRHL2 y los marcadores TEM, además de ACTB como control de carga, los datos están expresados en log2 del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de la línea OEGRHL2 comparada con la parental resistente (n=3).....129

Figura 40. Niveles de TGFβ1 extracelular y su correlación con los niveles de GRHL2. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos. Tras 24h en condiciones estándar, el medio de cultivo fue sustituido por medio sin suero, y tras 72h se recogieron los sobrenadantes para medir secreción de TGFβ1 (n=3) en condiciones basales. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis t-student donde *p<0,05; **p<0,01 en comparación con el grupo control.130

Figura 41. Ensayo de cierre de herida al modular GRHL2. A. Las células se sembraron en placas de 6 pocillo a razón de 4×10^5 células por pocillo para que a las 24h estuviera confluyente. Después se realizó una herida sobre la monocapa celular y se cambió el medio por medio fresco. Se capturaron imágenes al tiempo 0 y tras 24h de realizar la

herida. Las imágenes en los modelos HCC827 (A) y H1975 (B) son representativas de 3 experimentos independientes. C. Las imágenes adquiridas a lo largo de la herida fueron medidas y los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis *t*-student donde $**p < 0,01$ y $****p < 0,0001$ en comparación con el grupo control en el modelo HCC827 (C) y H1975 (D).131

Figura 42. Análisis de CHIP de genes epiteliales y mesenquimales en líneas de AC pulmonar con *EGFR* mutado y sensibles o resistentes al osimertinib. La cromatina aislada de las células ITQ-sensibles y resistentes se incubó con anticuerpos contra GRHL2 (α -G), e IgG como control negativo para determinar el porcentaje de unión de cada una de estas marcas a los promotores de genes epiteliales (*CDH1*, *GRHL2* y *OVOL2*) y mesenquimales (*ZEB1*, *SNAIL1* y *VIM*). Se representan los datos de la RT-qPCR realizada (A) y del gel de agarosa realizado con el producto de la RT-qPCR (B). Los resultados (Cts) se normalizaron a partir de los Cts de sus respectivos Inputs y se representaron los $\Delta\Delta$ ct cómo % de unión a la región promotora de cada gen. Los $\Delta\Delta$ ct representados se normalizaron con los $\Delta\Delta$ ct del IgG con el fin de eliminar cualquier señal inespecífica asociada. Los resultados (n=3). Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.133

Figura 43. Efecto del gefitinib sobre la viabilidad y la proliferación en células HCC4006 con silenciamiento de GRHL2. Contajes con azul tripán, por triplicado, tras 48 y 72 horas de tratamiento con gefitinib 5 μ M, 10 μ M o vehículo (control). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis *t*-student donde $*p < 0,05$ y $***p < 0,001$ en comparación con el grupo control.136

Figura 44. Efecto del erlotinib sobre la viabilidad y la proliferación en células HCC827 con silenciamiento de GRHL2. Contajes con azul tripán, por triplicado, tras 48 y 72 horas de tratamiento con erlotinib 5 μ M, 10 μ M o vehículo (control). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis *t*-student donde $*p < 0,05$ y $***p < 0,001$ en comparación con el grupo control.137

Figura 45. Efecto del osimertinib sobre la viabilidad y la proliferación en células H1975 con silenciamiento de GRHL2. Contajes con azul tripán, por triplicado, tras 48 y 72 horas de tratamiento con osimertinib 5 μ M, 10 μ M o vehículo (control). Los resultados fueron

analizados estadísticamente mediante el análisis *t-student* donde * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo control.138

Figura 46. Viabilidad celular de la línea HCC4006, HCC827 y H1975 (shGRHL2 y shNT) en respuesta a diferentes dosis de gefitinib, erlotinib y osimertinib (empezando en 10 μM) en células sembradas en placas de 96 pocillos e incubadas con vehículo (control) o gefitinib. La viabilidad celular fue determinada indirectamente por el método de la sulforodamina B tras 72h de tratamiento. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control \pm desviación estándar ($n=6$).139

Figura 47. Viabilidad celular de las líneas HCC827 y H1975 (sensible, resistente y con GRHL2 sobreexpresado) en respuesta a diferentes dosis de erlotinib y osimertinib respectivamente (empezando en 20 μM) en células sembradas en placas de 96 pocillos e incubadas con vehículo (control) o el ITQs correspondiente. La viabilidad celular fue determinada indirectamente por el método de la sulforodamina B tras 72h de tratamiento. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control \pm desviación estándar ($n=6$).140

Figura 48. Ensayos de formación de colonias en presencia de erlotinib o vehículo (control) durante 10 días. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a baja densidad (5000 células por pocillo, por triplicado). Transcurridas 24h se añadieron diferentes concentraciones de erlotinib, que se renovaron cada 72h durante 10 días. Finalmente, las colonias se fijaron con paraformaldehído al 4% y se tiñeron con sulforodamina B para su visualización. La imagen mostrada es representativa de 3 experimentos independientes. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control \pm desviación estándar ($n=3$).141

Figura 49. Ensayos de formación de colonias en presencia de osimertinib o vehículo (control) durante 10 días. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a baja densidad (5000 células por pocillo, por triplicado). Transcurridas 24h se añadieron diferentes concentraciones de osimertinib, que se renovaron cada 72h durante 10 días. Finalmente, las colonias se fijaron con paraformaldehído al 4% y se tiñeron con sulforodamina B para su visualización. La imagen mostrada es representativa de 3 experimentos independientes. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control \pm desviación estándar ($n=3$).141

- Figura 50. Modelo de estudio establecido para el ensayo *in vivo* con ratones.** Los tiempos se adaptaron al crecimiento del tumor de cada una de las líneas.143
- Figura 51. Curvas del crecimiento tumoral de las líneas celulares H1975 shNT y H1975 AZDR antes y después del tratamiento con osimertinib.** El estudio se realizó con una N de 48 ratones totales, 12 por línea (n=6 tratados y n=6 control).144
- Figura 52. El silenciamiento de GRHL2 provoca una tasa de crecimiento más lenta del tumor.** Imágenes de los tumores control (no tratados) de las líneas H1975 shNT y H1975 shGRHL2, y curva del crecimiento tumoral de dichas líneas celulares según el volumen tumoral (mm^3) sin tratamiento con osimertinib. El estudio se realizó con una N de 12 ratones por línea (n=6 tratados y n=6 control).147
- Figura 53. La sobreexpresión de GRHL2 induce una mayor tasa de crecimiento del tumor.** Imágenes de los tumores control (no tratados) de las líneas H1975 AZDR y H1975 AZDR OEGRHL2 y la curva del crecimiento tumoral de dichas líneas celulares según el volumen tumoral (mm^3) sin tratamiento con osimertinib. El estudio se realizó con una N de 12 ratones por línea (n=6 tratados y n=6 control).148
- Figura 54. El silenciamiento de GRHL2 aumenta la resistencia a osimertinib en modelos *in vivo*.** A. Imágenes de los tumores tras el tratamiento con el vehículo (Control) o el fármaco osimertinib (Tratados) de la línea H1975 shNT y H1975 shGRHL2. B. Curva de crecimiento según el volumen tumoral (mm^3) de la línea control parental sensible (H1975 shNT) y la línea silenciada (H1975 shGRHL2) tratados con osimertinib por vía oral durante 20 días. C. Gráfica del crecimiento tumoral (%) post administración de osimertinib, considerando el 100% el tamaño del tumor el del día 0 previo a la administración de osimertinib. El estudio estadístico de todos los resultados se realizó mediante el análisis t student, donde * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$ y **** $p < 0,0001$. Con una N de 12 ratones por línea (n=6 tratados y n=6 control).149
- Figura 55. La sobreexpresión de GRHL2 no afecta a la respuesta a osimertinib en modelos *in vivo*.** A. Imágenes de los tumores tras el tratamiento con el vehículo (Control) o el fármaco osimertinib (Tratados) de la línea H1975 AZDR y H1975 AZDR OEGRHL2. B. Curva de crecimiento según el volumen tumoral (mm^3) de la línea control parental resistente (H1975 AZDR) y la línea sobreexpresada (H1975 AZDR OEGRHL2) tratados con osimertinib por vía oral durante 12 días. C. Gráfica del crecimiento tumoral

(%) post administración de osimertinib, considerando el 100% el tamaño del tumor el del día 0 previo a la administración de osimertinib. El estudio estadístico de todos los resultados se realizó mediante el análisis t student, donde * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$ y **** $p < 0,0001$. Con una N de 12 ratones por línea (n=6 tratados y n=6 control).150

Figura 56. Metástasis a nivel macroscópico producidas en los hígados de los ratones en los que se inyectaron la línea celular H1975 shGRHL2.152

Figura 57. Metástasis a nivel macroscópico producida en un hígado de los ratones en los que se inyectaron la línea celular H1975 AZDR OEGRHL2.152

Figura 58. Metilación y expresión de *GRHL2* en tumor primario y tejido normal en pacientes con ACP.154

Figura 59. Análisis Kaplan-Meier de pacientes con CPNM en función al porcentaje de metilación de *GRHL2* en las CpGs 23973429 y 14202477.155

Figura 60. Análisis Kaplan-Meier en una cohorte de 20 evaluaciones de pacientes con CPNM.155

Lista de tablas

Tabla 1. Estadificación del CP según la 8ª edición del TNM del CP.	24
Tabla 2. Agrupación por estadios según la 8ª edición del TNM del CP.	26
Tabla 3. Líneas celulares de CPNM empleadas como modelos de sensibilidad y resistencia a los ITQs de EGFR y su perfil mutacional.	70
Tabla 4. Secuencias de silenciamiento y sobreexpresión de GRHL2 empleadas.	73
Tabla 5. Lista de los reactivos empleados para la formación de partículas lentivirales:	75
Tabla 6. Lista de anticuerpos primarios empleados para <i>western blot</i>	79
Tabla 7. Lista de anticuerpos secundarios empleados para <i>western blot</i>	80
Tabla 8. Lista de reactivos para la obtención de ADNc.	82
Tabla 9. Lista de reactivos para la RT-qPCR.	82
Tabla 10. Lista de <i>primers</i> utilizamos para ensayos de RT-qPCR.	83
Tabla 11. Condiciones requeridas para la realización de la RT-qPCR.....	84
Tabla 12. Lista <i>primers</i> empleada para ensayos de RT-qPCR CHIP.....	86
Tabla 13. Lista de anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencia.....	88
Tabla 14. Lista de anticuerpos secundarios empleados en inmunofluorescencia.....	88
Tabla 15. Cebadores y sondas utilizados en el análisis de metilación de <i>GRHL2</i> mediante ddPCR. En rojo se presentan las CpGs del análisis.	93
Tabla 16. Reactivos utilizados para la técnica de ddPCR.....	94
Tabla 17. Componentes y porcentajes necesarios para diluir osimertinib.....	96
Tabla 18. Listado de 41 genes comunes en el análisis de sensibilidad a gefitinib, erlotinib y afatinib en líneas celulares de CPNM.....	102
Tabla 19. Evaluación de la superposición del listado de 41 genes con la colección CGP, que incluyen conjuntos de genes que representan firmas de expresión de perturbaciones genéticas y químicas. Varios de estos conjuntos de genes vienen en pares, es decir, se representan genes inducidos (UP) y reprimidos (DN) por la perturbación.....	104

Tabla 20. Valores aproximados de IC₅₀ de las líneas celulares de CPNM con <i>EGFR</i> mutado sensibles y sus versiones resistentes, obtenidas de las curvas de citotoxicidad a corto plazo obtenidas en la Figura 29.	116
Tabla 21. Líneas celulares establecidas donde se moduló la expresión de la proteína GRHL2.....	120
Tabla 22. Valores de IC₅₀ de las líneas celulares de CPNM con <i>EGFR</i> mutado sensibles y sus versiones resistentes, obtenidas de las curvas de citotoxicidad a corto plazo obtenidas en la Figura 46.	139
Tabla 23. Valores aproximados de IC₅₀ de las líneas celulares de CPNM con <i>EGFR</i> mutado sensibles y sus versiones resistentes, obtenidas de las curvas de citotoxicidad a corto plazo obtenidas en la Figura 47.	140

Abreviaturas

5-aza	5-aza-2'-desoxicitidina
5mC	5' del anillo pirimidínico de citidinas
18-FDG	18-fluorodesoxiglucosa
ACP	Adenocarcinoma de pulmón
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNct	ADN circulante
AIS	Adenocarcinoma de células <i>in situ</i>
ALK	Quinasa del linfoma anaplástico (del inglés <i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNnc	ARNs no codificantes
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosín trifosfato
AZDR	AZD9291 resistente
BRAF	B-Raf Proto-Oncogén, Serina/Treonina Quinasa
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CCLE	<i>Cancer Cell Line Encyclopedia</i>
CDH1	E-Cadherina
CDH2	N-Cadherina
CGP	Colección de firmas de perturbaciones químicas y genéticas (del inglés <i>Chemical and genetic perturbations</i>)
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina (del inglés <i>Chromatin Immunoprecipitation</i>)
CIMA	Centro de Investigación Medica Aplicada
CMV	Citomegalovirus

COSMIC	Del inglés <i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i>
CP	Cáncer de pulmón
CpGs	Dinucleótidos de citosina y guanina unidos por un grupo fosfato
CPM	Cáncer de pulmón microcítico o de células pequeñas
CPNM	Cáncer de pulmón no microcítico o de células no pequeñas
CSC	Células madre tumorales (del inglés <i>Cáncer Stem Cells</i>)
Ct	Ciclo umbral (del inglés <i>Threshold Cycle</i>)
ddPCR	PCR digital (del inglés <i>Droplet Digital Polymerase Chain Reaction</i>)
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMR	Del inglés <i>Differential Methylated Regions</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Reprimidos
DNMT	ADN metiltransferasa
DNMTi	Inhibidor de ADN metiltransferasa
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (del inglés <i>Epidermal Growth Factor</i>)
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epitelial
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
ER23	Clon 23 resistente al erlotinib (del inglés <i>Erlotinib Resistant Clone 23</i>)
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares (del inglés <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>)
ERL	Erlotinib
EPCAM	Molécula de adhesión celular epitelial
FBS	Suero bovino fetal (del inglés <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FDG-PET	Tomografía por emisión de positrones con fluorodesoxiglucosa (del inglés <i>Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography</i>)
FDR	Del inglés <i>False Discovery Rate</i>

FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (del inglés <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>)
FNA	Punción con aguja fina (del inglés <i>fine-needle aspiration</i>)
FT	Factores de transcripción
FTs-TEM	Factores de transcripción de la TEM
Gef	Gefitinib
GeR	Gefitinib resistente
GO	Gene Ontology
GRHL2	<i>Grainyhead Like Transcription Factor 2</i>
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
HDAC	Enzima desacetilasa
HDACi	Inhibidores de enzima desacetilasa
HGF	Factor de crecimiento de los hepatocitos
HRP	Peroxidasa del rábano picante (del inglés <i>Horseradish Peroxidase</i>)
HTM	Histona metil transferasa
ICGC	Consortio internacional del genoma del cáncer (del inglés <i>International Cancer Genome Consortium</i>)
IC ₅₀	Concentración de inhibición al 50% (del inglés <i>Inhibit Concentration 50%</i>)
IDIBELL	Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge
IHC	Inmunohistoquímica
IIS la Fe	Instituto de Investigación Sanitaria del hospital la Fe
ITQs	Inhibidores tirosina quinasa
JAK	Quinasa Jano (del inglés <i>Janus Kinase</i>)
JNK	Quinasa C-Jun N-terminal (del inglés <i>C-Jun N-Terminal Kinase</i>)
KRAS	<i>Kristen rat sacoma viral oncogene</i>
LCC	Carcinoma de células grandes (del inglés <i>Large-Cell Carcinoma</i>)
lncRNA	Del inglés Long non-coding RNA
MAPK	Quinasas activadas por mitógenos
MDK	Midquina
miRNA	microARN

NCI	Instituto nacional del cáncer (del inglés <i>National Cancer Institute</i>)
NES	<i>Normalized Enrichment Score</i>
NGS	Secuenciación de segunda generación (del inglés Next-Generation Sequencing)
NICD	Oligoproteína del dominio intracelular de Notch (del inglés <i>Notch Intracellular Domain</i>)
NIH	Institutos de salud nacionales (del inglés <i>National Institute of Health</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Del inglés <i>Overnight</i>
OSI	Osimertinib
Pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato-salino (del inglés Phosphate Buffered Saline)
PD-1	Proteína 1 de la muerte celular programada (del inglés <i>Programmed cell Death protein 1</i>)
PD-L1	Ligando 1 de muerte celular programada 1 (del inglés <i>Programmed cell Death protein 1</i>)
PD-L2	Ligando 2 de muerte celular programada 1 (del inglés <i>Programmed cell Death protein 2</i>)
PEBC	Programa de Epigenética y Biología del Cáncer
PEM	Plastiidad epitelial-mesenquimatosa
PET	Tomografía por emisión de protones
PFA	Paraformaldheído
PRC2	Complejo represor polycomb 2
PTN	Pleiotrofina
qMSP	Del inglés <i>Quantitative methylation specific PCR</i>
RAS	Oncogén viral del sarcoma de rata (del inglés Rat Sarcoma)
RB1	Proteína del retinoblastoma
RED	Del inglés <i>Rare Event Detection</i>
RM	Resonancia magnética
Rho	Rhodopsina

ROS	Especies reactivas del oxígeno (del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>)
RPM	Revoluciones Por Minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (del inglés <i>Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
SASP	Fenotipo secretor asociado a la senescencia (del inglés <i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i>)
SCC	Carcinoma de células escamosas (del inglés <i>Squamous Cell Carcinoma</i>)
SCIS	Carcinoma de células escamosas <i>in situ</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante
shRNA	RNA de silenciamiento (del inglés <i>Short Hairpin RNA</i>)
SLUG	Proteína dedo de zinc SNAI2
SMAD	Proteína de la mosca homóloga a la proteína morfogénica ósea humana (del inglés <i>Mothers Against Decapaplegic homolog</i>)
SNAIL	Proteína de dedo de zinc SNAI1
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (del inglés <i>Single-nucleotide polymorphism</i>)
SP-A	Apoproteína A del surfactante pleural
STAT	Transductor de la señal y activador de la transcripción (del inglés <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>)
TA	Temperatura Ambiente
TAC	Tomografía axial computarizada
TBS-T	Tampón tris salino- Tween 20 (del inglés <i>Tris-Buffered Saline-Tween 20</i>)
TCGA	Programa Atlas genoma del cáncer (del inglés <i>The Cancer Genome Atlas Program</i>)
TEM	Transición epitelio mesenquimal
TME	Transición mesenquimal-epitelial

TGFβ1	Factor de crecimiento transformante beta 1 (del inglés <i>Transforming growth factor beta 1</i>)
TILs	Linfocitos T citotóxicos capaces de infiltrarse en el microambiente tumoral
TMN	Tamaño-Nodos-Tumor
Tris-HCl	Tris-Clorhidrato
TTF1	Factor de transcripción de tiroides
TWIST	Proteína relacionada con la torsión (del inglés <i>Twist-related protein</i>)
UP	Inducidos
VEGF	Factor vascular derivado del endotelio
VEGFR	Receptor del factor vascular derivado del endotelio
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIM	Vimentina
VSV-G	Glicoproteína del virus vesicular de la stomatitis (del inglés <i>Glycoprotein of the Vesicular Stomatitis Virus</i>)
Wnt-1	Miembro 1 de la familia Wnt (del inglés <i>Wingless e Int-1</i>)
ZEB	<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox</i>

Resumen

El cáncer de pulmón (CP) es la principal causa de fallecimiento por cáncer en todo el mundo, debido principalmente a la detección tardía de la enfermedad y la carencia de terapias efectivas. Pese al avance en los últimos años de las terapias dirigidas, como los inhibidores tirosina quinasa (ITQs) de EGFR de primera y segunda generación (erlotinib y gefitinib), que han proporcionado un beneficio importante para un grupo de pacientes con CP no microcítico (CPNM) con mutaciones activadoras en EGFR, los pacientes han mostrado con el tiempo resistencia a los tratamientos debido a nuevas mutaciones en EGFR, como la mutación T790M. Inhibidores de tercera generación, como el osimertinib, superan esta barrera, a pesar de que con el tiempo los pacientes también recaerán de nuevo. Gran parte de los pacientes muestran también signos de activación de la transición epitelio-mesenquimal (TEM), un programa transcripcional caracterizado por la represión de E-cadherina (CDH1) debido a la unión a su promotor de factores de transcripción de la TEM (FTs-TEM). El proceso de la TEM está involucrado en la migración, invasión, metástasis en el cáncer y la resistencia a fármacos antitumorales. La TEM provoca transiciones reversibles entre diferentes estados celulares a través de, entre otros procesos, mecanismos epigenéticos. Por ello, el objetivo general de la presente tesis es identificar genes, que se regulen por mecanismos epigenéticos, y que tengan un papel clave en la resistencia a los ITQs en el CPNM mediada por la TEM. Para ello, se realizó un análisis ómico, combinando el epigenoma con datos de transcriptómica y de sensibilidad/resistencia para una gran batería de fármacos, poniendo especial interés en los fármacos gefitinib, erlotinib y afatinib. Obtuvimos un listado de 41 genes que tenían en común la metilación diferencial con respecto a la sensibilidad a estos ITQs de EGFR, y entre los que se encontraba GRHL2 hipometilado y sobreexpresado en las líneas de CPNM sensibles a los ITQs. GRHL2 es un factor de transcripción que mantiene el estado epitelial de la célula en múltiples tejidos, viéndose alterado con la TEM en diferentes tipos de cáncer. La función de GRHL2 parece ser controvertida actuando como inductor de la proliferación celular o ejerciendo el papel de gen supresor de tumores, dependiendo del tipo de cáncer en el que se estudie. Por esta razón se necesitan más estudios para descubrir cuál sería el papel del gen GRHL2 en el CP. Los estudios funcionales, in vivo e in vitro, de la inhibición y la sobreexpresión del gen en líneas celulares de CPNM sensibles y resistentes a los ITQs de EGFR, han

mostrado su implicación en la respuesta a terapias anti-EGFR y su papel pronóstico en el CPNM. Viéndose involucrado en procesos como la activación de la TEM, la proliferación, la migración, la resistencia adquirida a los ITQs mediada por la TEM y la metástasis en el CPNM.

Introducción

1. Cáncer

El término “cáncer” no comprende sólo una enfermedad, sino que agrupa un amplio grupo de patologías con distintos factores de riesgo y características epidemiológicas, fenotípicas y genéticas diversas y que se puede originar en cualquier tipo celular u órgano del cuerpo humano (Sporn, 1991) («SEER Training Modules, Module Name. U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute. Day Month Year»). Cada una de estas enfermedades muestra alteraciones moleculares y celulares específicas y por tanto podrían definirse tantos tipos de cánceres como enfermos, pero en general se agrupan por el tejido donde se originó.

Theodor Boveri, hace ya más de un siglo, propuso que una constitución anormal de los cromosomas, así como las alteraciones cromosómicas, pueden causar la división descontrolada de las células llevando a promover el cáncer (Boveri, 1902). Si ajustamos esta definición a la actualidad, el cáncer podría considerarse principalmente una enfermedad genética, en la cual las células tumorales han ido obteniendo cambios o mutaciones que han afectado a su secuencia de ADN (ácido desoxirribonucleico). Estos cambios son responsables de la adquisición de ciertas características que provocan que las células tumorales sean capaces de adquirir una mayor capacidad de proliferación y supervivencia que supone una ventaja frente a las células colindantes. (Holland & Cleveland, 2009).

Los factores etiológicos son la contribución cuantitativa entre factores ambientales cancerígenos, que aumentan el riesgo de padecer cáncer al exponerse a estos componentes, ya que se pueden introducir alteraciones genéticas durante la copia del ADN en las células somáticas. Los factores etiológicos que provocan mutaciones somáticas todavía son objeto de discusión. Se dividen en dos grupos, aquellos que pueden evitarse como el tabaco o la exposición al sol y aquellos que no pueden evitarse como el envejecimiento. Diferentes ensayos epidemiológicos han estudiado, a lo largo de los últimos años, el papel de los factores ambientales y la notabilidad de la herencia genética se ha señalado en los estudios con gemelos y la predisposición al desarrollo de ciertos cánceres por la exposición a estos factores ambientales y genéticos (Wei et al., 2010).

Los errores en la replicación del ADN juegan un papel importante en la aparición de estas alteraciones, considerando que el 23% de las mutaciones genéticas se atribuyen a los factores ambientales (siendo más de un 60% en diferentes tipos de cáncer como el de pulmón, esófago o piel), el 5% de estas mutaciones se deben a la herencia genética y el 66% a los errores de replicación (Tomasetti et al., 2017).

Las mutaciones somáticas en el cáncer se pueden clasificar, dependiendo de los efectos que tienen sobre el desarrollo de la enfermedad, en mutaciones conductoras y pasajeras. Las mutaciones conductoras proporcionan una ventaja adaptativa en el crecimiento tumoral a las células cancerosas durante la evolución del tumor. Las mutaciones pasajeras se llaman así porque el impacto no tiene consecuencias funcionales durante la división celular y por tanto no afectan a la progresión del tumor (Martínez-Jiménez et al., 2020).

Las mutaciones conductoras pueden afectar a un gen que regula el crecimiento normal de las células y que como consecuencia de la mutación se activa permanentemente, estos genes reciben el nombre de protooncogenes. Sin embargo, cuando afecta a un gen que como consecuencia a la mutación provoca una pérdida de función, hablando en este caso de un regulador negativo, reciben el nombre de mutaciones inactivadoras (Pleasant et al., 2010).

1.1. Características funcionales del cáncer

Tal y como se ha comentado en la sección anterior, el cáncer se caracteriza por la proliferación anormal de las células y la habilidad para invadir y metastatizar distintas partes del cuerpo. Hanahan y Weinberg, definieron los rasgos por los cuales las células normales adquieren una serie de capacidades para su transformación en células tumorales malignas. Inicialmente, en el año 2000, identificaron 6 funcionalidades que diferenciaban las células normales de las tumorales. Estas propiedades incluían la habilidad del cáncer de evadirse de la apoptosis, la insensibilidad de los supresores de crecimiento, la desregulación de las señales de crecimiento, la angiogénesis tumoral, la replicación descontrolada y la habilidad de invadir tejido y metastatizar (Hanahan & Weinberg, 2000). Durante el año 2011, añadieron nuevas características a la lista que comprendían, la desregulación epigenética de las células, los mecanismos para evitar la

destrucción inmune, la inestabilidad genética y las mutaciones que promueven la inflamación (Hanahan & Weinberg, 2011). Finalmente, en el año 2022 también realizaron una actualización de 4 características más que complementan la lista; el desbloqueo de la plasticidad fenotípica, la reprogramación epigenética no mutacional, microbiomas polimórficos y células senescentes (Figura 1) (Hanahan, 2022). A continuación, describiremos brevemente cada una de ellas:



Figura 1. Características funcionales adquiridas por las células tumorales en la mayoría de los cánceres. Adaptado de Hanahan, 2022.

- 1. Activación y mantenimiento de las señales de proliferación (Hanahan & Weinberg, 2000)** . Esta es una de las características principales de las células tumorales. En las células normales la producción y transducción de las señales de proliferación se encuentran muy controladas. Sin embargo, en las células tumorales las señales promotoras del crecimiento que aseguran la homeostasis celular se ven alteradas. Existen dos maneras distintas por las cuales las células tumorales secretan los factores de crecimiento: autocrina y paracrina. En la autocrina, la señalización se produce en las mismas células que lo secretan y en la paracrina, afecta a las células colindantes. Estas funciones las llevan a cabo para intentar movilizar las células normales del estroma tumoral, ampliar los niveles de los receptores de los factores de crecimiento y activar a

través de mutaciones activadoras los receptores o los componentes de rutas de señalización de interés.

2. **Evasión de señales antiproliferativas (Hanahan & Weinberg, 2000).** Las células tumorales soportan señales inhibitorias que podrían detener su crecimiento. Las principales vías involucradas en este tipo de señales son la autofagia y la apoptosis, las cuales pueden conducir a la muerte celular y la reducción del crecimiento tumoral. La *autofagia* es un proceso de renovación que promueve la supervivencia de las células tumorales para poder sobrevivir al estrés microambiental y aumentar el crecimiento y la agresividad. El proceso está regulado por las vías mTOR/AMPK/PI3K/MAPK. La apoptosis o muerte celular programada puede inducirse mediante la activación de receptores de muerte como Fas, TNF α R, DR3, DR4 y DR5. En condiciones fisiológicas estos programas pueden estar regulados por genes supresores de tumores. Los más conocidos en el cáncer humano, que frecuentemente se encuentran inactivados son *TP53*, *RB1* y el factor de crecimiento transformante beta 1 (*TGF β 1*) (Burkhart & Sage, 2008). Por un lado, *p53* se inactiva en la mayoría de los cánceres, regula negativamente el ciclo celular y está envuelto en la estabilización genómica y la angiogénesis, recibiendo información del estrés y otras alteraciones como el daño al ADN que ocurren en el interior celular (Wang et al., 2018). Por otro lado, *RB1* (proteína del retinoblastoma) se considera un gen supresor tumoral clásico, la proteína que codifica este gen también es un regulador negativo del ciclo celular, pero al contrario de *p53*, es el encargado de recoger las señales inhibitorias cuya procedencia viene del exterior celular (Wang et al., 2018). Finalmente, las células cancerígenas son capaces de evadir el efecto proliferativo de otro gen supresor tumoral como es *TGF β 1*. *TGF β 1* participa en muchos procesos celulares, incluido el crecimiento celular, la supervivencia, la diferenciación, la migración y la apoptosis. Las células tumorales consiguen redirigirlo hacia la activación de la transición epitelio-mesenquimal (TEM, del cuál hablaremos en apartados posteriores) una vez ha progresado la carcinogénesis (Wang et al., 2018).
3. **Activación del proceso de invasión y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2000).** La metástasis es la principal causa de muerte en los pacientes que han desarrollado un cáncer. A menudo, en el caso de los tumores primarios, las células pueden adquirir la capacidad de propagación e invasión a otros órganos del cuerpo, ya sea por vía

sanguínea o linfática y como resultado llegando a metastatizar. Cuando alguna de las células tumorales llega a un nuevo órgano puede ser capaz de originar un tumor secundario, a lo que se denomina colonización, o por el contrario, también puede ocurrir que se mantenga en estado de latencia durante años y que llegue a formar metástasis incluso años después de la eliminación del tumor primario (Jiang et al., 2015).

4. **Potencial replicativo ilimitado (Hanahan & Weinberg, 2000).** Las células normales tienen un número limitado de replicaciones, estos límites los marca la entrada en senescencia de la célula o una crisis en el crecimiento celular que concluye en la muerte celular. Una de las marcas distintivas del cáncer es inducir la inmortalidad replicativa de las células, obteniendo así un potencial replicativo ilimitado. Las células tumorales consiguen esta capacidad replicativa ilimitada incrementando la producción de la enzima telomerasa y aumentando así las mutaciones protumorales, o bien activando la vía de alargamiento alternativo de los telómeros.
5. **Inducción de la angiogénesis (Hanahan & Weinberg, 2000).** La angiogénesis es un término que describe la formación de nuevos vasos sanguíneos y linfáticos a partir de una vasculatura persistente. Esta acción permite a las células tumorales adquirir un sustento en forma de nutrientes y oxígeno y evacuar los desechos metabólicos, jugando un papel crucial en el proceso de génesis del tumor. Proteínas como el factor vascular derivado del endotelio (VEGF), que es secretado en el microambiente tumoral, es uno de los principales factores inductores de la angiogénesis tumoral (Saman et al., 2020).
6. **Resistencia a muerte celular (Hanahan & Weinberg, 2000).** Las células cancerígenas tienen la función de evitar la apoptosis, que es el mecanismo que programa la muerte celular una vez que las células están dañadas. Normalmente, la apoptosis ayuda a mantener un organismo sano a través del crecimiento y desarrollo, manteniendo el tejido corporal al eliminar las células infectadas o dañadas. Pero las células cancerosas no siguen este proceso. Las células cancerosas pueden alterar los mecanismos que detectan el daño, impidiendo la señalización adecuada y la activación de la apoptosis. Las células cancerosas también pueden introducir defectos en la propia señalización o en las proteínas involucradas en la apoptosis, para evitar la apoptosis adecuada (Elmore, 2007).

7. **Promoción de la inflamación (Hanahan & Weinberg, 2011).** Las respuestas inflamatorias tienen un papel importante en las diferentes etapas del desarrollo del tumor, desde el inicio a la progresión. La inflamación crónica puede causar daño en el ADN, y, por tanto, puede promover el cáncer. Además, sería una ventaja evolutiva para aquellas neoplasias que toleraran cierto grado de muerte celular a causa de necrosis, ya que podrían movilizar células inflamatorias que estimularían el crecimiento de las células tumorales (Cruz & Balkwill, 2015; Grivennikov et al., 2010).
8. **Evasión de la destrucción inmunológica y resistencia a la muerte celular (Hanahan & Weinberg, 2011).** La muerte celular programada utiliza el sistema inmunológico para mantener la homeostasis tisular, sirviendo como barrera natural frente al desarrollo tumoral. Algunas células tumorales son capaces de adaptar sus mecanismos para evadir el sistema inmunológico del huésped, limitando o evitando la apoptosis. La forma más común que tienen las células tumorales de hacerlo es la pérdida de la función del gen supresor de tumores *TP53*, evitando así el sensor más importante de la inducción de la apoptosis. Además, otra manera que tienen los tumores de evitar la apoptosis es aumentando la expresión de los reguladores antiapoptóticos (BCL-2, BCL-XL) y regulando la disminución de los factores proapoptóticos (BAX, BIM, PUMA) (Adams & Cory, 2007). En los últimos años, ha cobrado gran interés el estudio de cómo el microambiente tumoral es capaz de modular el sistema inmune (Pandya et al., 2016). Recientes investigaciones sobre la relación entre el sistema inmune y el cáncer revelan mecanismos moleculares mediante los cuales las células neoplásicas se benefician de algunos receptores de los linfocitos T, con funciones inhibitorias de la respuesta citotóxica, para conseguir defenderse del ataque inmune. Los linfocitos T citotóxicos que son capaces de infiltrarse en el microambiente tumoral (TILs), son inhibidos por señales producidas por las células cancerosas (como PD-L1, el ligando del receptor 1 de la muerte celular programada (PD1)). Esto está relacionado con el escape inmunitario de los tumores, que ha permitido el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a reactivar la actividad antitumoral de linfocitos T citotóxicos. Este mecanismo de evasión está siendo estudiado como una diana para las inmunoterapias que se han desarrollado recientemente y que han alcanzado importantes respuestas en tumores de mal pronóstico. Diferentes estudios han identificado ya dianas como PD-1 y sus ligandos PD-

L1 y el Ligando 2 de muerte celular programada 1 (PD-L2), cuya función primaria es limitar la capacidad efectora de los linfocitos frente a los que se han diseñado anticuerpos monoclonales, capaces de desbloquear la respuesta inmunitaria. El uso de estos fármacos llamados inhibidores de control inmunitario (ICI) supone un gran avance en la inmunoterapia (Keir et al., 2006).

9. **Inestabilidad genética y mutabilidad (Hanahan & Weinberg, 2011).** Debido a la proliferación asociada a las células cancerígenas, hay una tendencia a incrementar cambios genómicos y mutaciones que afectan a genes que regulan la división celular y la supresión tumoral provocando inestabilidad genómica. Una elevada mutabilidad sería provocada por una sensibilidad a los agentes mutagénicos que impediría el funcionamiento normal de la maquinaria de reparación del genoma, teniendo *TP53* un papel clave conservando la estabilidad genómica. Asimismo, se pueden producir modificaciones epigenéticas que pueden provocar un cambio en los niveles de proteínas funcionales, afectando a la integridad genómica, permitiendo reordenamientos cromosómicos que conducen a una inestabilidad cromosómica, que se asocia a la pérdida del ADN telomérico en muchos tumores (Artandi & DePinho, 2010; Jeggo et al., 2016; Negrini et al., 2010).
10. **Desregulación del metabolismo energético (Hanahan & Weinberg, 2011).** Las células cancerígenas invierten mucha energía en su crecimiento, por lo que activan unas vías metabólicas diferentes a las células sanas. Las células utilizan glucosa como fuente de energía, se metaboliza por glucólisis y resulta en la creación de piruvato. En las células normales que tienen niveles de oxígeno habituales, gran parte de ese piruvato ingresa en las mitocondrias, donde es oxidado por el ciclo de Krebs para generar el ATP (adenosín trifosfato) y satisfacer las demandas de energía de las células. No obstante, en las células cancerosas gran parte del piruvato se aleja de las mitocondrias para crear lactato a través de la acción de la enzima lactato deshidrogenasa, un proceso que se relaciona con el estado de bajo oxígeno. A diferencia de la glucólisis mitocondrial, la producción de lactato en presencia de oxígeno se denomina glucólisis aeróbica o efecto Warburg (Warburg et al., 1927). Varias vías de señalización contribuyen al efecto Warburg y otros fenotipos metabólicos de las células cancerosas. Como consecuencia, el consumo de glucosa ha sido muy útil en la clínica para desarrollar la tomografía de

emisión de positrones mediante ^{18}F -desoxiglucosa (FDG-PET o F-PET). Esta técnica consigue detectar aquellos tejidos que tienen un consumo de glucosa elevado. Además de este proceso, las células cancerosas también utilizan varios procesos clave para aumentar su crecimiento y seguir replicándose, como el aumento de glicólisis y el uso de la glutamina para promover la proliferación celular (Maximchik et al., 2016).

11. **Reprogramación epigenética no mutacional (Hanahan, 2022).** La característica habilitadora de la inestabilidad y mutación del genoma (ADN) es un componente fundamental de la formación y patogénesis del cáncer. Independientemente de la regulación del genoma, se ha argumentado la evidencia creciente de que alteraciones epigenéticas análogas pueden contribuir a la adquisición de capacidades distintivas durante el desarrollo del tumor y la progresión maligna. El concepto de regulación epigenética no mutacional de la expresión génica está bien establecido como el mecanismo central que media en el desarrollo embrionario, la diferenciación y la organogénesis. En los últimos años, ha habido un mayor número de datos científicos que respaldan la propuesta de que alteraciones epigenéticas análogas puedan contribuir a la adquisición de capacidades distintivas durante el desarrollo del tumor y la progresión maligna. Como, por ejemplo, mecanismos ambientales de reprogramación epigenética, la heterogeneidad regulatoria epigenética y la regulación epigenética de los tipos de células estromales que pueblan el microambiente tumoral.
12. **Microbiomas polimórficos (Hanahan, 2022).** La microbiota es el conjunto de microorganismos que se encuentra viviendo simbióticamente en nuestro cuerpo. El microbioma humano es un ecosistema pequeño que se aloja tanto en los tejidos del cuerpo expuestos al ambiente externo como la epidermis, así como en las mucosas internas, del tracto gastrointestinal, pulmón, mama y el sistema urogenital. Para el cáncer, la evidencia es cada vez más convincente de que la variabilidad polimórfica en los microbiomas entre los individuos de una población puede tener un profundo impacto en los fenotipos del cáncer. Se ha visto que determinadas especies bacterianas pueden estimular directamente el sello distintivo de la señalización proliferativa y modular la supresión del crecimiento. Aun así, efectos directos sobre otras capacidades distintivas, como la evasión de la muerte celular, la inducción de la angiogénesis y la

estimulación de la invasión y la metástasis, siguen siendo desconocidas, al igual que la generalización de estas observaciones a múltiples formas de cáncer humano.

13. **Células senescentes (Hanahan, 2022).** La senescencia celular se ha visto durante mucho tiempo como un mecanismo de protección contra la neoplasia, ya que es el proceso mediante el cual las células envejecen y dejan de dividirse. Al mismo tiempo de cerrar el ciclo de división celular, el programa de senescencia provoca cambios en la morfología y el metabolismo celular, además de la activación de un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP, "*Senescence-Associated Secretory Phenotype*") que implica la liberación de proteínas bioactivas, que incluyen quimiocinas, citoquinas y proteasas cuya identidad depende del tipo de célula y tejido del que proviene la célula senescente. A pesar de considerarse un mecanismo para evitar células tumorales, la mayoría de promotores del programa de senescencia que se ha mencionado, están asociados a malignidad. Se cree que el principal mecanismo por el cual las células senescentes promueven los fenotipos tumorales es el SASP, que es capaz de transmitir, de manera paracrina, a las células cancerosas próximas. Por ello, sería importante tener en cuenta en la búsqueda de los mecanismos del cáncer aquellas células senescentes involucradas en el proceso.
14. **Desbloqueo de la plasticidad fenotípica (Hanahan, 2022).** Existen tres clases de mecanismos de plasticidad fenotípica que parecen operar en múltiples tipos de cáncer no solo durante la formación del tumor primario sino también durante la progresión maligna de la enfermedad o la respuesta a la terapia. El primer mecanismo es la *desdiferenciación*, en el cual la supresión de la expresión del factor de diferenciación, puede facilitar la tumorigénesis, permitiendo que las células maduras bien diferenciadas se desdiferencien en progenitores. El segundo mecanismo corresponde a la *diferenciación bloqueada*, donde las células progenitoras parcialmente diferenciadas pueden sufrir cambios regulatorios que congelen o bloqueen su avance continuo hacia estados completamente diferenciados, típicamente no proliferativos. El tercer mecanismo concierne a la *transdiferenciación*, en el cual células con un fenotipo diferenciado particular, logran cambiar notablemente su morfología para volverse reconocibles como elementos de otro tejido. Los patólogos reconocen este término como metaplasia tisular.

1.2. Alteraciones epigenéticas en el cáncer

Como se ha descrito en el apartado anterior, Hanahan y Weinberg han ido determinando a lo largo de los años ciertas capacidades biológicas que debían adquirirse para el desarrollo del cáncer. Diferentes características distintivas que definen los mecanismos por los que progresan las células y los ecosistemas tumorales dando lugar a las diferentes etapas del cáncer. La mayoría de estos mecanismos se centran en alteraciones genéticas. Sin embargo, los cambios epigenéticos aberrantes se reconocen como uno de los eventos clave de la carcinogénesis (Kanwal & Gupta, 2012), por tanto, muchos tumores pueden presentar programas transcripcionales que son indicativo de un bloqueo de los patrones de diferenciación y reprogramación epigenética. Flavahan, Gaskell y Bernstein hacen referencia a la epigenética del cáncer como una de las características funcionales clave como regulador transcripcional para el desarrollo de la enfermedad, comprendiendo los estímulos ambientales, genéticos y metabólicos específicos que consiguen alterar la armonía homeostática de la cromatina provocando que se convierta en permisiva o restrictiva de forma aberrante (Flavahan et al., 2017). En 1942 Conrad H. Waddington fue el primero que describió el término epigenética y lo definió como aquellos cambios hereditarios y reversibles que regulan la expresión génica sin modificar la secuencia del ADN (Hu, 2002).

Las alteraciones epigenéticas tempranas en el cáncer abarcan tres mecanismos sustanciales (Figura 2): 1) Desregulación de eventos epigenéticos como cambios en la metilación del ADN; 2) Modificaciones de las histonas, posicionamientos de nucleosomas y remodelación de la cromatina; 3) Expresión de ARNs (Ácido ribonucleico) ARN no codificantes (ARNnc), principalmente microARN (miRNA) (Jones & Baylin, 2007).

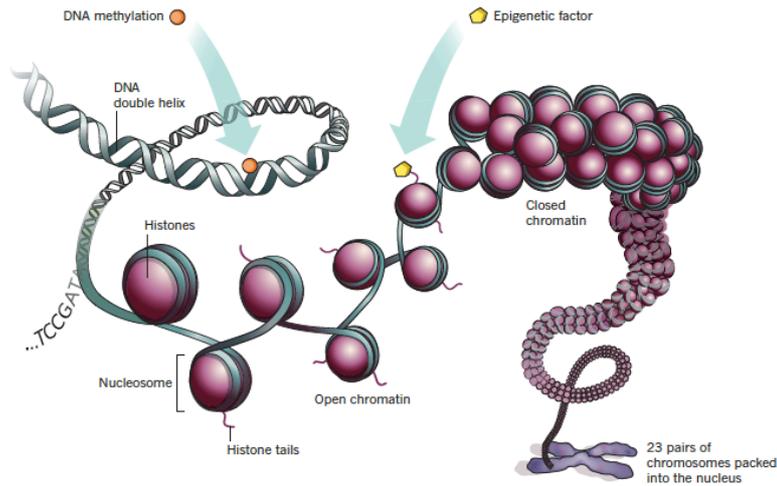


Figura 2. Maquinaria epigenética: Modificaciones en las histonas y el ADN. La conformación de la cromatina abierta se asocia a la ausencia de metilación y por lo tanto a la expresión génica; sin embargo, la conformación de la cromatina cerrada presenta metilación del ADN y marcas de histonas represivas y, por ende, se puede relacionar con el silenciamiento transcripcional. Adaptado de Marx, 2012.

1.2.1. Metilación del ADN

La metilación del ADN es el fenómeno epigenético reversible más estudiado. Su potencial en la clínica como biomarcador de diagnóstico de cáncer, fundamentalmente en biopsias líquidas, ha causado mucho interés y por esta razón, parte de la tesis la centraremos en este proceso. La metilación del ADN es el resultado de la adición de un grupo metilo en el carbono 5' del anillo pirimidínico de citidinas (5mC) que van seguidas de guaninas, denominándose nucleótidos CpG (dinucleótidos de citosina y guanina unidos por un grupo fosfato). Este proceso altera las interacciones entre el ADN y las proteínas, propiciando variaciones en la transcripción génica. La familia de enzimas que cataliza la metilación del ADN se denominan ADN metiltransferasas (DNMTs). Mientras que DNMT1 funciona principalmente en la metilación de mantenimiento que se asocia a la replicación de ADN, tanto DNMT3a y DNMT3b son responsables de la metilación *de novo*, ya que son capaces de introducir marcas de metilación sin necesidad de un molde previo (Uysal et al., 2017). Las marcas de metilación del ADN se agrupan en regiones del ADN conocidas como islas CpGs, enriquecidas sobre todo en las regiones promotoras de los genes. Estas regiones están definidas por tener una longitud entre 200 y 2.000 pares de bases (pb), con un contenido de CG mayor del 50% (Kulis & Esteller, 2010). Gran parte

de los cambios que observamos a nivel de la metilación global del ADN ocurren en las islas CpGs del cuerpo del gen, presentando una correlación positiva entre la metilación del ADN y la expresión génica. Existe cierta contradicción, siendo objeto de controversia, sobre los efectos que tiene la metilación del ADN dependiendo del lugar donde se lleve a cabo, ya sea en el cuerpo o en el promotor del gen (Cao et al., 2022; Jones, 2012). Por tanto, las islas CpGs se pueden clasificar en cuatro tipos dependiendo de la localización en la que se encuentren (Figura 3): 1) islas CpGs tal y como las hemos descrito anteriormente; 2) CpGs *shores*, son regiones que se encuentran localizadas inmediatamente después de las islas CpGs, rodeándolas, hasta una distancia de 2 kilobases (kb); 3) CpGs *shelf*, delimitadas a continuación de las CpGs *shores*, cercanas a las islas CpGs a una distancia entre 2-4 kb; 4) CpGs *open sea*, se encuentran en los extremos de las CpGs *shelf* localizándose a lo largo del genoma. Existe una subclasificación entre las CpGs *shores* y *shelf* dependiendo de si se localizan antes de la isla CpG (*N-shore* y *N-shelf*) o a continuación de la de la isla CpG (*S-shore* y *S-shelf*) (Flam et al., 2019; Irizarry et al., 2009; Kulis & Esteller, 2010; Portela & Esteller, 2010; Sandoval et al., 2011).

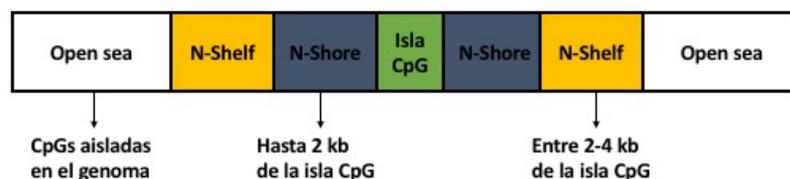


Figura 3. Esquema de los diferentes tipos de CpGs según su localización.

Los cambios en la metilación pueden deberse a la ganancia o a la pérdida de la metilación en las CpGs al comparar esta metilación con los niveles en estados fisiológicos. Es común que cuando las islas CpGs de un determinado promotor se encuentran metiladas (hipermetilación), el gen se localice reprimido y cuando se produce la desmetilación de dichas islas (hipometilación) el gen pase a un estado activo y transcribible (Figura 4).

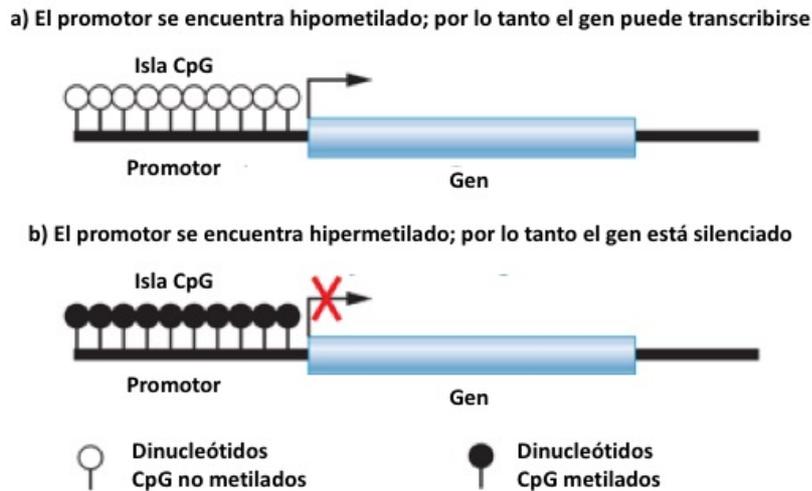


Figura 4. Resumen de los cambios en la metilación del ADN. Proceso de desmetilación o metilación de las islas CpG de las regiones promotoras de los genes, que permiten el acceso a la maquinaria transcripcional y la expresión o represión génica. Adaptada de Klug, et al., 2019, 2020.

En relación al cáncer humano, una de las primeras alteraciones que se encontraron fue **la hipermetilación** de las islas CpGs en los promotores de los genes supresores de tumores que están implicados en diferentes tipos de cáncer. Se pueden destacar diferentes casos de hipermetilación de genes que ya han sido estudiados como el de *MLH1* en el cáncer de colon que ilustra como las alteraciones epigenéticas pueden estar involucradas en la formación de tumores (Li et al., 2013; Niv, 2007), *BRCA1* hipermetilado en el cáncer de mama y de ovario (Kalachand et al., 2020; Kawachi et al., 2020), la metilación de *BCL2*, *CDKN2A* y *NID2* involucrados como biomarcadores de diagnóstico en el cáncer de vejiga (Scher et al., 2012), o la hipermetilación de *VHL* que activa el impulsor más común (*HIF1A*) del cáncer renal (Artemov et al., 2022). La hipermetilación además de estar involucrada en la inactivación de genes supresores de tumores también afecta a genes relacionados con procesos del desarrollo, respuesta y la evolución del cáncer que codifican proteínas que participan en procesos de reparación del ADN, apoptosis, ciclo celular, interacción entre células, angiogénesis, metabolismo de agentes carcinógenos entre otros (Baylin & Jones, 2011; Esteller, 2007; Klionsky et al., 2021; Kulis & Esteller, 2010). Se ha demostrado en estos últimos años que los patrones de metilación del ADN en los tumores son de gran utilidad para la

traslación clínica, ya que pueden ser utilizados como biomarcadores de diagnóstico identificando alteraciones comunes en diferentes tipos de cáncer, facilitando su clasificación y detectando el origen del tumor, así como biomarcadores de pronóstico que evaluarán la enfermedad y biomarcadores de respuesta a fármaco, que predecirán la respuesta que tendrá el paciente al tratamiento, remarcando así el papel de las alteraciones en la metilación del ADN como una característica clave en el desarrollo tumoral. Aunque estas alteraciones no son ampliamente utilizadas aún como biomarcadores en la práctica clínica, se espera que un número importante de estudios, kits comerciales y ensayos clínicos demuestren que los cambios epigenéticos son capaces de ofrecer información muy valiosa sobre los pacientes con cáncer (Constâncio et al., 2020; Koch et al., 2018; Moran et al., 2016; Palanca-Ballester et al., 2021).

Por el contrario, también se observan casos de **hipometilación**. La hipometilación global del ADN del tumor en comparación con el tejido normal (Feinberg & Vogelstein, 1983). Esta hipometilación global afecta a las secuencias repetitivas del ADN, las regiones codificantes y los intrones favoreciendo el desarrollo y la progresión del tumor según va avanzando la lesión, aumentándose el nivel de metilación del ADN y conduciendo desde una lesión benigna hasta un cáncer invasivo (Fraga et al., 2004). La hipometilación global del ADN lleva a una inestabilidad genómica que contribuye a la transformación celular, además reactivar transposones y perder la impronta genómica, favoreciendo así a la recombinación mitótica y promoviendo la reorganización cromosómica (Eden et al., 2003; Kulis & Esteller, 2010).

1.3. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón (CP) es responsable de más muertes que cualquier otro tipo de cáncer tanto en hombres como en mujeres, abarcando aproximadamente el 18% (1.796.144 casos) de las muertes por cáncer. Según los datos mundiales disponibles más recientes (2020), los cánceres más frecuentes para ambos sexos son el de mama (2.261.419 casos), el de pulmón (2.206.771 casos), el de colon (1.931.590 casos) y el de próstata (1.414.259 casos) (Figura 5).

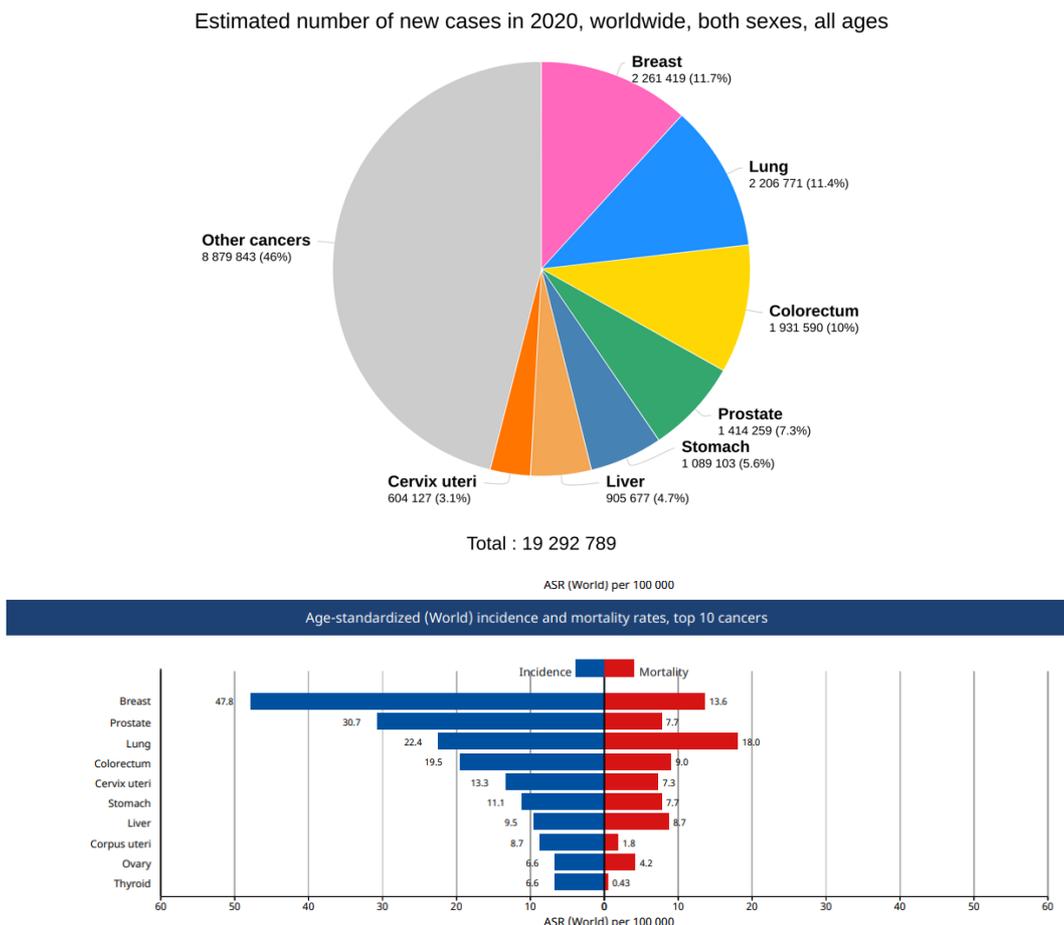


Figura 5. Tipos de cáncer más frecuentes en 2020 para ambos sexos: Incidencia y mortalidad. Fuente imágenes: GLOBOCAN 2020 Graph production: Global Cancer Observatory (<https://gco.iarc.fr/>) International Agency for Research on Cancer 2021.

En España, en el año 2020 se diagnosticaron 29.188 casos nuevos. En el mundo, solamente el 16% de los casos diagnosticados en un año consiguen sobrevivir durante los cinco siguientes años después de su diagnóstico. Esto se debe a que el pronóstico de la mayoría de los pacientes que se diagnostican con CP se encuentra en estadios muy avanzados de la enfermedad, donde las opciones terapéuticas son limitadas. Son diagnosticados tan tardíamente debido a que este tipo de cáncer tarda mucho en mostrar una sintomatología en los pacientes, siendo muy difícil de detectar en fases tempranas. Un nódulo pulmonar neoplásico es capaz de extenderse a otros órganos antes de mostrar ninguna sintomatología. Por esta razón, este tipo de neoplasia es difícil de detectar en fases iniciales y solamente el 20% de estos casos son elegidos para resección quirúrgica del tumor, que sigue siendo la práctica más habitual para esta enfermedad.

No obstante, aunque es una de las neoplasias más diagnosticadas, su distribución no es homogénea en todo el mundo, siendo más predominante en países desarrollados (China, Estados Unidos y Europa especialmente) que en los menos desarrollados (Figura 6).

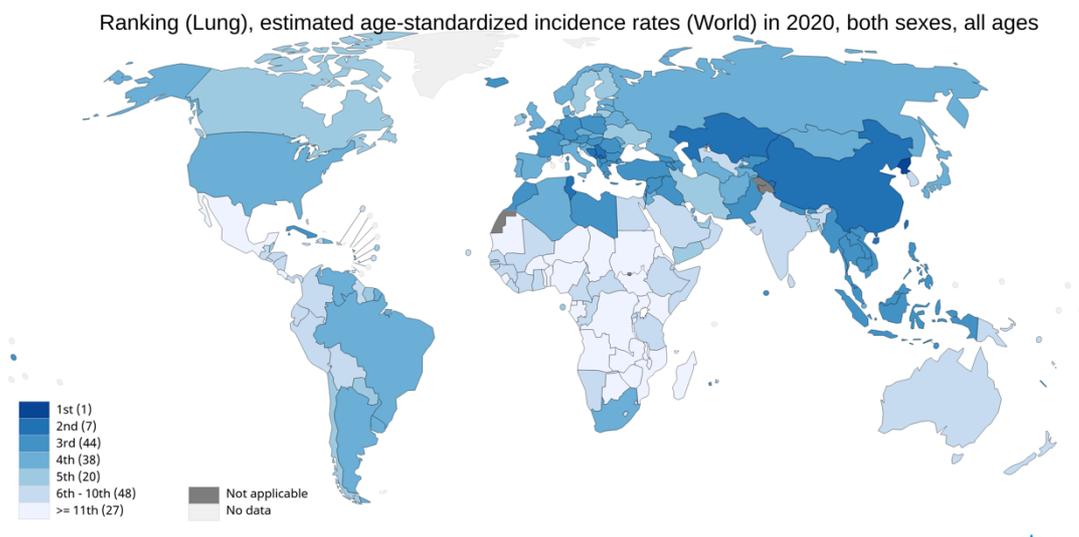


Figura 6. Ratios de incidencia del CP para ambos sexos y distribución en todo el mundo. Fuente National Cancer Institute (NIC) (<https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga/studiedcancers/lungadenocarcinoma>).

1.3.1. Etiología en el CP

A pesar de los avances en nuestra comprensión del riesgo, el desarrollo, el control inmunológico y las opciones de tratamiento para el CP, el tabaco sigue siendo el principal factor de riesgo para esta enfermedad. Se ha observado que, a lo largo de los años, el perfil de incidencia geográfico se corresponde a los hábitos que ha ido adquiriendo el tabaquismo. Aproximadamente el 80% de los hombres y el 50% de las mujeres con CP son o han sido fumadores (Siegel et al., 2017, 2018, 2019).

Los factores de riesgo distintos del tabaco incluyen exposiciones ambientales y ocupacionales, enfermedades pulmonares crónicas, infecciones pulmonares y factores relacionados con el estilo de vida (Bade & Dela Cruz, 2020).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2016 el 18% de las muertes se asocian con la contaminación aérea, estas muertes se asociaron a enfermedad pulmonar obstructiva crónica e infecciones respiratorias agudas, de los que un 6% eran debidos a CP (de Groot et al., 2018).

1.3.2. Clasificación anatomopatológica del cáncer de pulmón

En 1967, la OMS estableció la primera clasificación histológica del CP que se ha ido actualizando durante estos años. El CP es un grupo de neoplasias muy heterogéneas, que dependiendo de la morfología que tengan las células bajo el microscopio se clasifica en dos grandes grupos. En la práctica clínica esta diferencia en la morfología es muy útil, ya que dependiendo del tipo celular la evolución clínica será más o menos favorable y las características moleculares que presente el tumor serán distintas (Figura 7) (Zheng, 2016).

- El primer grupo corresponde al **cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico (CPM)**, el cual comprende el 20% de los casos de CP y está fuertemente asociado con el tabaquismo, alrededor del 95% de los pacientes son fumadores (Gazdar et al., 2017). Este tipo de cáncer está agrupado con otros tumores que tienen una diferenciación neuroendocrina. Se trata de un tumor epitelial maligno formado por células pequeñas con escaso citoplasma, límites celulares poco definidos y una cromatina granular densa. Surge de la mucosa bronquial y la invasión local ocurre en la submucosa con la subsiguiente invasión del tejido conjuntivo peribronquial (Schneider et al., 2011). Las células son pequeñas, ovaladas, con escaso citoplasma y alto recuento mitótico. Se comporta de manera agresiva, tiene alta tasa de crecimiento y diseminación, por lo que en el momento del diagnóstico suelen presentar metástasis extrapulmonares. Los pacientes con este tipo de tumor responden bien a la quimioterapia en un primer momento, aunque es frecuente la adquisición de resistencias. La tasa de supervivencia es muy baja, no alargándose más de 5 años entre el 1-5% de los casos (Alvarado-Luna & Morales-Espinosa, 2016).
- El segundo tipo de **cáncer de pulmón es el cáncer de células no pequeñas o no microcítico (CPNM)**, abarca el 80% de los casos y es el tipo histológico de CP más frecuente. Se divide en 3 subtipos:
 - Adenocarcinoma de pulmón (ACP): es el tipo de CP más común abarcando más del 40% de los casos de CP y el 60% de los casos de CPNM. Se trata de una neoplasia epitelial maligna con diferenciación glandular y producción de mucina. Estos tumores crecen generalmente en la zona

- periférica del pulmón y suelen estar asociados al epitelio alveolar o las glándulas de las mucosas de los bronquios (Chen et al., 2014). Este tipo de cáncer es muy común en pacientes no fumadores, mujeres y jóvenes.
- Carcinoma de células escamosas o epidermoide (“SCC: *squamous cell carcinoma*”): es el segundo tipo más común de CPNM representando el 30% de los casos de CPNM y está asociado al consumo de tabaco y al sexo masculino (Derman et al., 2015). Se trata de un tumor epitelial, cuyas células suelen tener núcleos hiper cromáticos, nucléolos visibles, citoplasma moderado y presencia de puentes intercelulares. Las células que lo forman producen queratinas 5 y 6 (KRT5, KRT6). Habitualmente tienen una localización central, afectando a bronquios de mayor tamaño (Webb et al., 2009).
 - Carcinoma de células grandes (“LCC: *large-cell carcinoma*”): Es el subtipo menos frecuente, comprende el 10% de los casos de CPNM. Tiene una localización periférica. Las células que lo forman son grandes y no está muy diferenciado. Casi todos los pacientes que lo desarrollan son fumadores y su diagnóstico solo se consigue con una resección quirúrgica completa y no de muestras biológicas pequeñas (Travis et al., 2015).

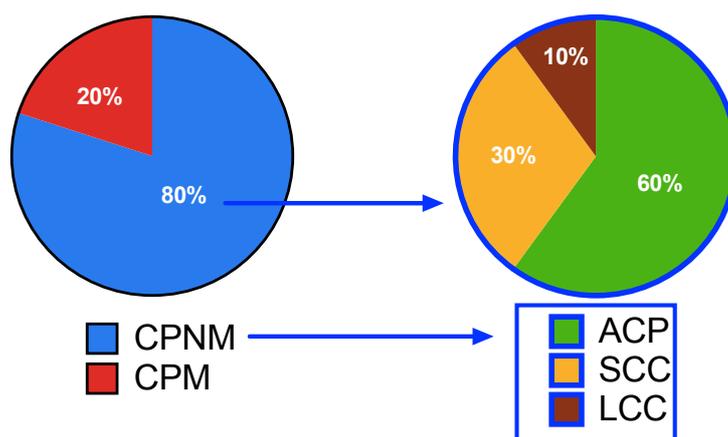


Figura 7. Representación gráfica de los diferentes tipos y subtipos histológicos de CP.

La mayoría de veces únicamente la observación morfológica no es suficiente para un diagnóstico adecuado del subtipo histológico al que pertenece el cáncer, por ello se emplean marcadores inmunocitoquímicos para su diagnóstico. En el caso del

adenocarcinoma para un diagnóstico adecuado se utilizan marcadores inmunohistoquímicos de diagnóstico como el factor de transcripción tiroideo (NKX2-1, también denominado TTF1) y la napsina A para la clasificación dentro de este subtipo histológico, ya que se encuentran expresados en el 75% de ACP. También se utiliza como marcador inmunohistoquímico de diagnóstico la apoproteína A del surfactante (SFTPA1 o SP-A) que se expresa en la mitad de los casos de ACP (Rekhtman et al., 2011; Turner et al., 2012). Para el carcinoma de células escamosas se emplean marcadores inmunohistoquímicos como P40 y P63, además de las queratinas 5, 6 y 7 (KRT5, KRT6, KRT7), siendo un subtipo histológico negativo para TTF1 (Li et al., 2022; Pan et al., 2021). Finalmente, el carcinoma de células grandes suele ser negativo para TTF1 y P40 y positivo para CD56, sinaptofisina y cromogranina (Kriegsmann et al., 2021).

1.3.3. Técnicas de detección del CP

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, el 85% de los casos de CP se diagnostican en etapas tardías, donde las opciones de un tratamiento curativo son muy complicadas. Este es uno de los principales problemas de esta enfermedad, ya que la ausencia de síntomas clínicos y de programas de *screening* en sujetos sanos con alto riesgo a padecer la enfermedad, hace muy complicada la detección en etapas iniciales (Wood et al., 2012).

El diagnóstico del CP habitualmente se da cuando el tumor es capaz de diseminarse a otros órganos e invade tejidos cercanos, en ese momento es cuando aparecen los primeros síntomas (tos, dolor de pecho, disnea, pérdida de peso (Blandin Knight et al., 2017; Wood et al., 2018) y se procede a la localización mediante imagen y posteriormente se realiza una biopsia para confirmar el diagnóstico (Nooreldeen & Bach, 2021).

La localización por imagen se puede realizar mediante diferentes técnicas. Las metodologías más comunes que aportan información sobre la localización, tamaño y número de lesiones, son la radiografía de tórax, que buscará áreas anormales en los pulmones, y la tomografía axial computarizada (TAC) que también se puede usar para buscar masas en las glándulas suprarrenales, el hígado, el cerebro y otros órganos que podrían deberse a la propagación del CP. Otra técnica utilizada para la detección del CP

es la resonancia magnética (RM), que es similar al TAC y se utiliza para la obtención de imágenes detalladas de tejidos blandos, facilitando la visualización de la posible propagación del cáncer hacia el cerebro, hígado o la médula espinal. También se utiliza la tomografía por emisión de positrones (PET) para el diagnóstico de esta enfermedad, en esta técnica se detecta la acumulación del isótopo radioactivo 18-FDG (18-fluorodesoxiglucosa) en tejidos cancerígenos debido a la acumulación en su metabolismo. A pesar de ser una técnica que no detecta el tamaño de las lesiones y se necesita confirmación histológica, es muy útil para ofrecer información sobre los ganglios afectados y la extensión de las lesiones producidas (Castello et al., 2020; Hochegger et al., 2015; Xu et al., 2020).

Aunque las técnicas de imagen no sean invasivas y sean útiles para la localización y el estadiaje del tumor, se requiere un examen de pequeñas muestras obtenidas por broncoscopia, biopsia quirúrgica o citología para estudiar correctamente el diagnóstico de la patología. Dependiendo de la localización de la lesión y el estadio se selecciona una u otra técnica de extracción de la muestra. La obtención de muestras citológicas incluye la punción con aguja fina (*fine-needle aspiration*, FNA), procedimientos exfoliativos como el esputo, lavado bronquial y lavado bronquioalveolar. Estas técnicas de obtención de muestra suelen ir guiadas por técnicas de imagen para ayudar en la recolección de la misma. La broncoscopia, se recomienda para pacientes con el tumor localizado en la región central (Lerner & Feller-Kopman, 2017), ya que permite la visualización del árbol bronquial dónde se pueden evaluar directamente detalles de la mucosa, como el color y la vascularización, además permite obtener material biológico durante el procedimiento. Para pacientes que presenten estadios iniciales se suele incluir la obtención de biopsia o citología, sin embargo, para estadios más avanzados, el material diagnóstico se extrae de las citologías. En cuanto a la citología, las muestras se pueden conservar en parafina, alcohol, formol o criopreservación. El método más común para la realización de análisis moleculares es el frotis previa fijación de alcohol o la inclusión de las células en parafina. El frotis destacará por una mejor conservación en cuanto a análisis moleculares y la parafina permitirá la realización de un gran número de análisis y suele ser el método seleccionado en la mayoría de centros hospitalarios.

Hay que tener en cuenta que la citología se suele concluir con una biopsia, ya que son dos técnicas complementarias para el diagnóstico de la enfermedad. En las muestras citológicas se miden mutaciones para la caracterización molecular como *EGFR* (receptor del factor de crecimiento epitelial), *KRAS* (*kristen rat sacoma viral oncogene*) y *BRAF* (B-Raf Proto-Oncogén, Serina/Treonina Quinasa) (Scarpa et al., 2013). Además, también se utilizan para estudiar reordenamientos génicos como *ALK* (quinasa del linfoma anaplástico) y *ROS* (especies reactivas del oxígeno), mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (Clavé et al., 2019). Otras técnicas que también se podrían realizar en las muestras citológicas sería *next-generation sequencing* (NGS), inmunohistoquímica o inmunofluorescencia de marcadores (como *PD-L1* (Keppens et al., 2021)) o estudios de epigenética (Gkountakos et al., 2021). Dentro de los estudios de epigenética, algunos marcadores epigenéticos útiles en el diagnóstico pueden ser *CDKN2A* y *SHOX2* (Constâncio et al., 2020), se pueden detectar mediante qMSP (*quantitative methylation specific PCR*). En *SHOX2* la sensibilidad se encuentra entre 68-69% mientras que la especificidad está entre 95-98% en lavados alveolares (Zhang et al., 2017). A pesar de esto, aún se necesitan diferentes estudios de validación y estandarización para conseguir aplicarlos en la práctica clínica.

1.3.4. Estadificación del CP

Después de llevar a cabo el diagnóstico del CP, la clasificación (o estadificación) es fundamental para poder evaluar el pronóstico y diseñar un plan de tratamiento adecuado para los pacientes. El *American Joint Comitee on Cancer* ha desarrollado un sistema universal de estadiaje del cáncer. Esta clasificación, de tres componentes, consigue detallar la gravedad del cáncer basándose en el tamaño y su extensión del tumor primario (T), la afectación de los ganglios linfáticos locales (N) y la extensión o no de metástasis (M) (Tabla 1).

La primera clasificación TNM (Tamaño-Nodos-Tumor) publicada en los años 70 (Mountain et al., 1974) ha ido actualizándose durante los siguientes años. Para la presente tesis se ha empleado la octava versión (Rosen & Sapra, 2022) por ser la disponible en el momento de los estudios realizados.

Tabla 1. Estadificación del CP según la 8ª edición del TNM del CP.

T- Tumor primario	
TX	Carcinoma oculto. No se puede certificar la presencia el tumor primario por no haber sido visualizado, pero se sospecha su existencia por la presencia de células malignas.
T0	No hay evidencias del tumor primario.
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> . Adenocarcinoma (Tis(AIS)) y Carcinoma de células escamosas (Tis(SCIS)).
T1	Tumor < 3 cm en su diámetro mayor rodeado por pulmón o pleura. Sin evidencia de invasión al bronquio principal.
T1mi	Adenocarcinoma mínimamente invasivo.
T1a	Tumor ≤ 1 cm en su mayor dimensión.
T1b	Tumor > 1 cm, pero < 2 cm en su mayor dimensión.
T1c	Tumor > 2 cm, pero < 3 cm en su mayor dimensión.
T2	Tumor > 3 cm, pero < 5 cm en su mayor dimensión o con cualquiera de las siguientes características: a) El tumor afecta al bronquio principal pero no involucra a la carina pulmonar. b) El tumor invade la pleura visceral. c) El tumor está asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar ya sea involucrando parte o todo el pulmón.
T2a	Tumores con las características de T2 y con un diámetro > 3 cm, pero < 4 cm en su mayor dimensión.
T2b	Tumores con las características de T2 y con un diámetro > 4 cm, pero < 5 cm en su mayor dimensión.
T3	Tumor > 5 cm, pero < 7 cm en su mayor dimensión o con cualquiera de las siguientes características: a) El tumor ha invadido la pleura parietal (PL3), la pared torácica, el nervio frénico o el pericardio parietal. b) Está asociado a nódulos pulmonares separados en el mismo lóbulo que el primario.

T4	Tumor > 7 cm o que presente cualquiera de las siguientes características. a) El tumor ha invadido cualquiera de las siguientes zonas: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral, carena b) Presenta nódulos pulmonares en un lugar diferente al del tumor primario.
N- Gánglios linfáticos locales	
NX	Los ganglios linfáticos locales no se pueden evaluar.
N0	Los ganglios linfáticos locales no están afectados.
N1	Metástasis en los ganglios peribronquiales y/o en los ganglios linfáticos hiliares e intrapulmonares.
N2	Metástasis en los ganglios linfáticos mediastinos y/o subcarinales.
N3	Metástasis en los ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales o ganglios linfáticos supraclaviculares.
M- Metástasis a distancia	
M0	No existe metástasis a distancia
M1	Existe metástasis a distancia
M1a	Nódulos tumorales separados en un lóbulo contralateral; tumor con nódulos pleurales o derrame pleural o pericárdico maligno.
M1b	Metástasis extratorácica única en un solo órgano y afectación de un solo ganglio no local.
M1c	Metástasis extratorácicas múltiples en uno o diferentes órganos.

Las diferentes composiciones del TNM establecerán en qué estadio se encuentra cada paciente, agrupándolos en 4 estadios (I, II, III y IV), correspondiendo el estadio IV al peor pronóstico para los pacientes (Tabla 2). La supervivencia a 5 años una vez detectada la enfermedad se irá reduciendo conforme aumente el estadio, encontrándose en 92-98% en los pacientes con estadio I, en un 60-53% en el estadio II, 36-13% para el estadio III y estableciéndose entre un 10-1% para el estadio IV (Goldstraw et al., 2016).

Tabla 2. Agrupación por estadios según la 8ª edición del TNM del CP.

Estadio	Clasificación TNM
0	Tis N0 M0
IA1	T1a, (mi) N0 M0
IA2	T1b N0 M0
IA3	T1c N0 M0
IB	T2a N0 M0
IIA	T2b N0 M0
IIB	T1(a-c), T2 (a-b) N1 M0
	T3 N0 M0
IIIA	T1(a-c) N2 M0
	T2(a-b) N2 M0
	T3 N1 M0
	T4 N0 M0
	T4 N1 M0
IIIB	T1(a-c) N3 M0
	T2(a-b) N3 M0
	T3 N2 M0
	T4 N2 M0
IIIC	T3, T4 N3 M0
IVA	(Cualquier T y N) M1a
	(Cualquier T y N) M1b
IVB	(Cualquier T y N) M1c

1.3.5. Genética en el cáncer de pulmón no microcítico

El CP es una enfermedad muy heterogénea en la que durante estos años se ha dedicado esfuerzo para detallar el perfil molecular de la enfermedad, facilitando así la comprensión de la biología del tumor, que puede servir como base para el desarrollo de terapias dirigidas más efectivas. En el CPNM se han identificado centenares de alteraciones genéticas somáticas entre las que se encuentran mutaciones puntuales en la secuencia de ADN. Muchos de estos cambios se han desarrollado en el epitelio normal, lo que da a entender que el CPNM se desarrolla a partir del tejido normal de la célula, en el que se ha dado un proceso secuencial de cambios genéticos sucesivos junto a alteraciones epigenéticas como la hipermetilación de las islas CpG de los promotores de los genes supresores de tumores (Swanton & Govindan, 2016). La introducción de varias plataformas públicas como el programa atlas del genoma del cáncer (TCGA), un proyecto colaborativo liderado por los institutos nacionales de salud (NIH) para realizar un mapa con cambios genéticos de 30 tipos de tumores, junto con el consorcio internacional del genoma del cáncer (ICGC) colaboración internacional que ha analizado 50 tipos de tumores, incluyendo los de mayor incidencia y mortalidad a nivel global, y el uso generalizado de NGS ha facilitado el acceso a una gran cantidad de datos sobre los perfiles moleculares del CP. Gracias a estos proyectos se ha podido determinar la frecuencia de mutaciones en genes supresores de tumores y los oncogenes de los diferentes tipos de cáncer. El análisis molecular de los subtipos histológicos más comunes de CPNM (ACP y SCC) (Figura 8) han mostrado una alta tasa mutacional en ambos grupos, especialmente en fumadores, únicamente superados por el melanoma (Alexandrov et al., 2013). Parte de esta gran variabilidad se da por la exposición a distintos agentes mutagénicos y a defectos que se encuentran activos en la maquinaria de reparación y replicación del ADN. Como hemos indicado el tabaco influye en presentar mayor tasa mutacional en los fumadores en comparación a los no fumadores (Imielinski et al., 2012; Sjöblom et al., 2006). Tal como se muestra en la Figura 8 existe un perfil muy diferente entre ambos grupos (Chang et al., 2021; de Sousa & Carvalho, 2018; Harrison et al., 2020; Imyanitov et al., 2021; Skoulidis & Heymach, 2019).

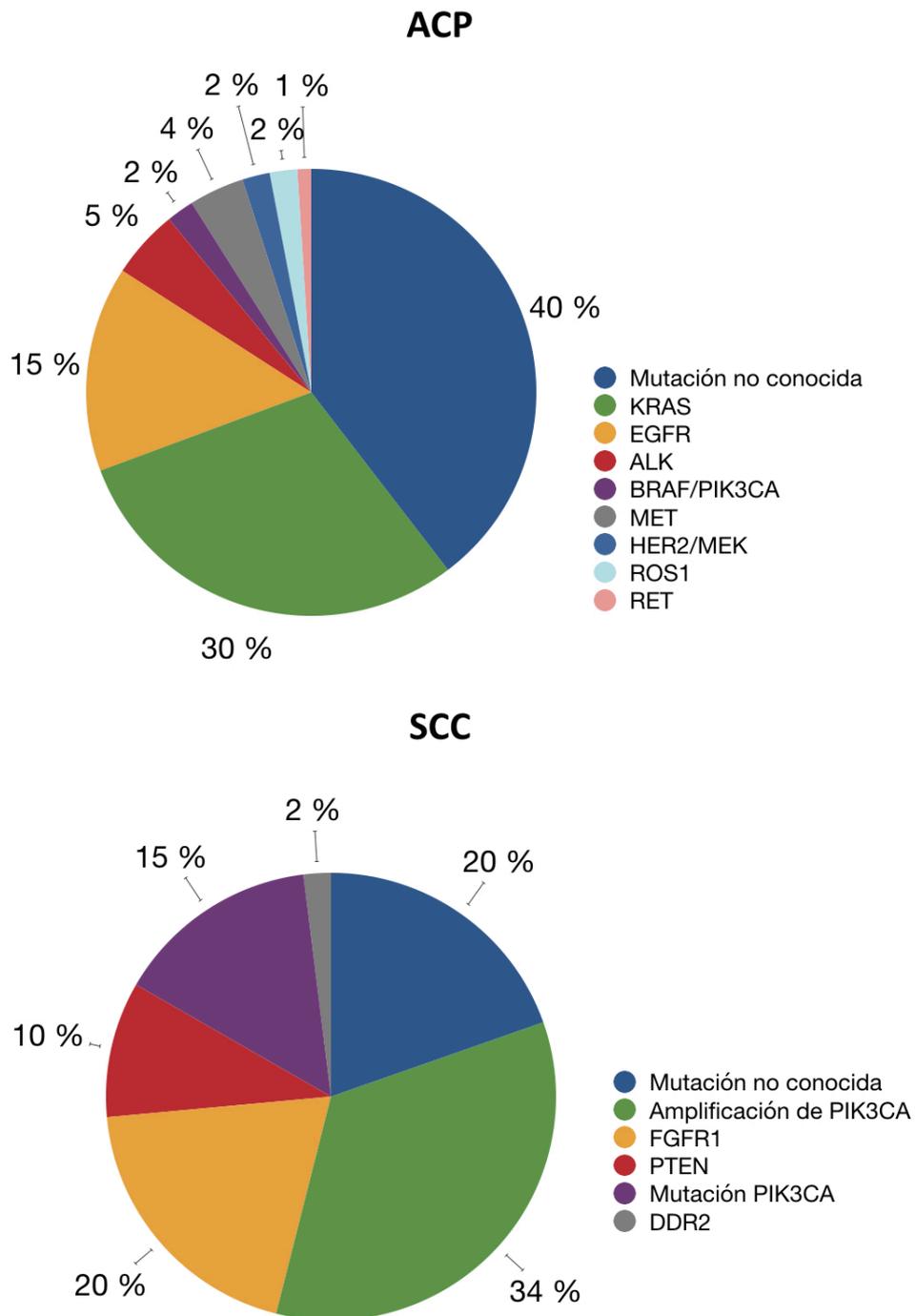


Figura 8. Porcentajes aproximados de la tasa mutacional en los subtipos histológicos ACP y SCC del CPNM. Adaptado de Chan & Hughes, 2015 incluyendo datos de Kashima et al., 2019.

En el caso del ACP (Figura 9), se observa que el gen con mayor tasa mutacional es el *TP53*, otros genes comúnmente mutados en este tipo de cáncer son *KEAP1*, *NF1*, *RB1* y *CDKN2A*. Las mutaciones entre los oncogenes *KRAS* y *EGFR* son mutuamente disjuntos, siendo excluyentes cuando uno de los dos se encuentra activo. Otros oncogenes con

mayor tasa de mutación son *BRAF*, *PIK3CA*, *TME* y *RIT1* (Giordano, 2014). Skoulidis y Heymach plantearon un modelo de última generación para la estratificación molecular de ACP, donde dividieron los oncogenes *KRAS* y *EGFR* en subconjuntos más pequeños para mostrar las conmutaciones que constituyen los principales determinantes de la diversidad molecular del tumor y pueden afectar a las características del cáncer tanto autónomo como no autónomo de las células tumorales; determinar el pronóstico; predecir la respuesta a las terapias sistémicas e influir en los mecanismos de resistencia innata y adquirida (Skoulidis & Heymach, 2019) (Figura 9).

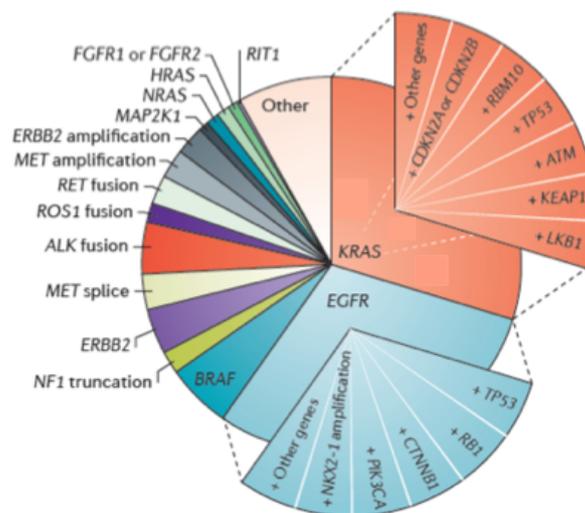


Figura 9. Modelo de próxima generación para la estratificación molecular de ACP, donde se muestra las conmutaciones de EGFR y KRAS. Adaptado de Skoulidis & Heymach, 2019.

1.3.5.1. Oncogenes frecuentemente mutados en CPNM

Debido al gran interés terapéutico que presentan, nos centraremos en el estudio detallado de los oncogenes más frecuentemente mutados en el CPNM, ya que como hemos indicado en el punto anterior, algunos constituyen dianas moleculares clave para las nuevas terapias dirigidas. Las células tumorales tienen dependencia oncogénica, es decir, los oncogenes favorecen su crecimiento y supervivencia y en ausencia de estos acaban muriendo. Tal y como se ha mostrado en la Figura 9, en el ACP encontramos mutaciones conductoras en varios oncogenes, pero a pesar del estudio sobre la enfermedad, todavía existen una porción importante de los casos de ACP en la que

todavía no se ha identificado el oncogén u oncogenes que podrían dirigirlos. A continuación, describiremos algunas de las características más importantes de los oncogenes que participan en el ACP:

- **KRAS.** Es uno de los reguladores más importantes de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Es miembro de la familia RAS y está involucrado en el crecimiento y la división celular, codificando una proteína con actividad GTPasa (guanosina trifosfatasa) que controla diferentes funciones celulares entre las que se encuentra la maduración y destrucción de las células (Ferrer et al., 2018). Las mutaciones conductoras en *KRAS* son de las más comunes en los cánceres humanos, incluido el CPNM. Hasta el 89% de las mutaciones conductoras de *KRAS* ocurren en el codón 12, mientras que las mutaciones en los codones 13 y 61 representan la mayoría de las mutaciones oncogénicas restantes de *KRAS*. Las mutaciones más comunes en *KRAS* en CPNM son G12V (que es la mayoritaria) y G12C que provocan un deterioro de la actividad hidrolítica intrínseca de *KRAS* y una mayor activación de la oncoproteína (Vaclova et al., 2022). *KRAS* promueve las rutas de señalización RAF/MEK/ERK y AKT/PI3K/mTOR.
- **EGFR.** Pertenece a la familia ERBB de receptores tirosina quinasa y su cascada de señalización es clave en la regulación de la proliferación, diferenciación, división, supervivencia y desarrollo de cáncer (Sabbah et al., 2020). *EGFR* codifica una glicoproteína transmembrana con actividad tirosina quinasa, siendo esta proteína el receptor de los miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico. La mutación en *EGFR* es el segundo evento oncogénico más común en pacientes con CPNM. Las mutaciones activadoras clásicas (delección en el exón 19 y la mutación puntual L858R y la T790M) comprenden el 85% de las mutaciones observadas en *EGFR* en CPNM y están descritas como predictoras de la respuesta a inhibidores tirosina quinasa de *EGFR* (ITQs de *EGFR*). Sin embargo, hay mutaciones que se dan con menor frecuencia (15%, aproximadamente 30.000 pacientes nuevos por año) que incluyen mutaciones puntuales, deleciones, inserciones y duplicaciones en los exones del 18 al 25 del gen *EGFR* en CPNM y se asocian a una peor respuesta a los ITQs de *EGFR* (Harrison et al., 2020). Además, *EGFR* participa en diferentes vías de señalización que están involucradas en la proliferación y supervivencia celular (Wee

& Wang, 2017). En la Figura 10 se muestra un esquema de las vías de señalización que modula EGFR.

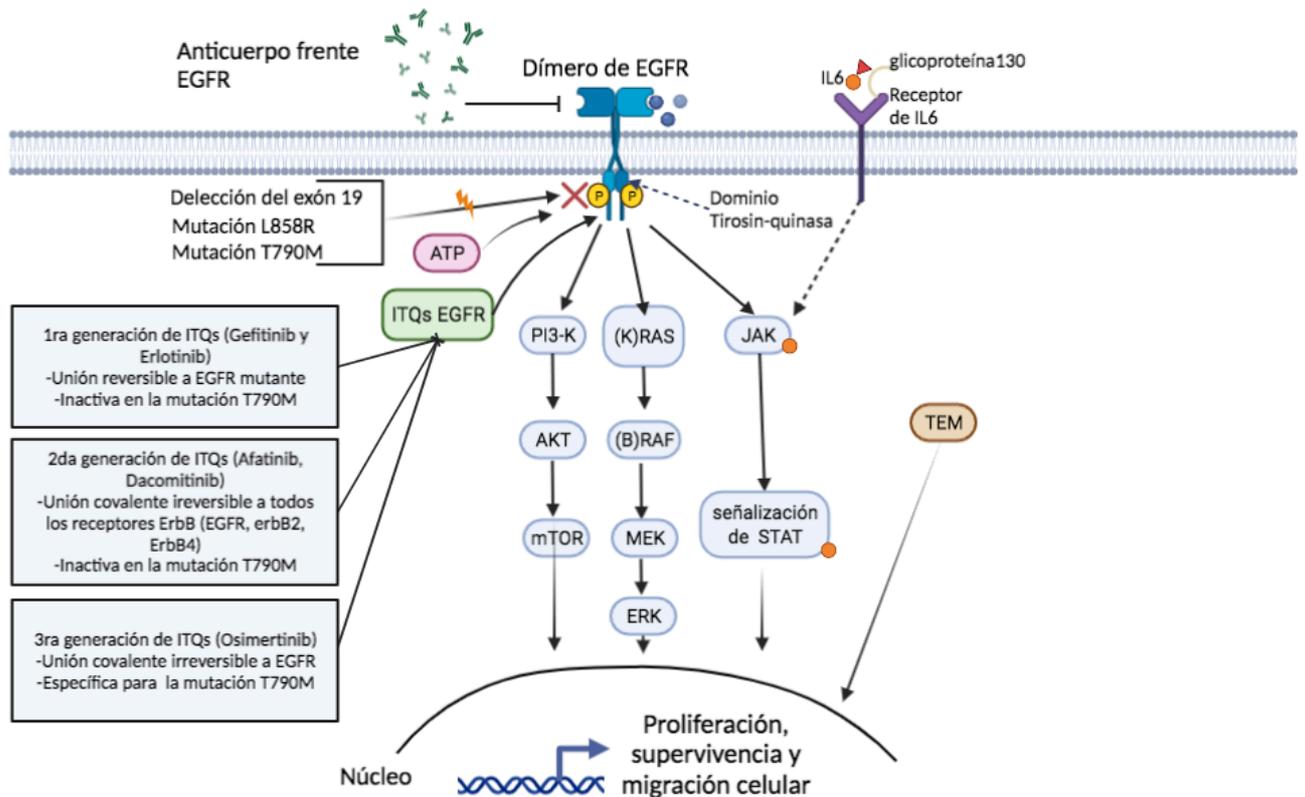


Figura 10. Vías de señalización que modulan EGFR en el CPNM. Las mutaciones del dominio quinasa de EGFR (incluida la delección del exón 19 y las mutaciones L858R y T790M) aumentan la actividad quinasa de EGFR. Este aumento de la actividad quinasa de EGFR promueve la hiperactivación de las vías de señalización posteriores (o aguas abajo o subsiguientes), incluidas MAPK, PI3K/Akt/mTOR e IL-6/JAK/STAT3, que favorecen la tumorigénesis de las células en el CPNM junto con el programa de TEM. Adaptada de Hsu et al., 2019 y Passaro et al., 2021. Creada con BioRender.com

- **BRAF.** El protooncogén *BRAF* codifica para una proteína con actividad serina/treonina quinasa. Se han identificado mutaciones en *BRAF* en diferentes tipos de cáncer incluido el CP. *BRAF* desempeña un papel importante en la proliferación y supervivencia celular (Klionsky et al., 2021), modulando la vía de señalización de las MAP quinasa/ERK (Hussain et al., 2015).
- **ALK.** Juega un papel fisiológico importante en el desarrollo del sistema nervioso y puede alterarse oncogénicamente en varias neoplasias malignas, incluido el CPNM. Las alteraciones de *ALK* más prevalentes son reordenamientos cromosómicos que dan como resultado genes de fusión, suele aparecer en personas que nunca o rara

vez han fumado y padecen CPNM con el subtipo de ACP. Cuando ALK se une a sus ligandos pleiotrofina (PTN) y midquina (MDK) da lugar a la activación de la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK), provocando la proliferación celular y la transducción de señales antiapoptóticas (Holla et al., 2017).

- ***MET***. El oncogén *MET* codifica un receptor transmembrana de tirosina quinasa. *MET* se activa cuando el ligando del factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) se une al receptor de *MET*, lo que induce la homodimerización de los residuos de tirosina intracelulares. Esto activa las vías de señalización RAS/ERK/MAPK, PI3K/AKT, Wnt/ β -catenina y STAT aguas abajo (Drilon et al., 2017). Estas vías pueden inducir la transformación maligna de las células, la progresión tumoral, metástasis y la adquisición de resistencia (Reis et al., 2018). La amplificación de este gen se asocia a resistencia secundaria a los ITQs de EGFR mediante un mecanismo que se conoce como “interruptor oncogénico” (Bean et al., 2007; Engelman et al., 2007b). En el CPNM las mutaciones en *MET* son raras y son excluyentes con las mutaciones de *KRAS* y la amplificación de *EGFR* (Sacco & Clague, 2015)
- ***ROS1***. Este protooncogén, altamente expresado en una variedad de líneas de células tumorales, es un receptor con actividad tirosina quinasa. La proteína codificada por este gen es una proteína de membrana integral de tipo I con actividad tirosina quinasa. La proteína puede funcionar como un receptor del factor de crecimiento o diferenciación. Está correlacionado con las rutas PI3K/m-TOR, JAK/STAT y MAP/ERK (Lin et al., 2017).

1.3.6. Epigenética en el CPNM

Como ya hemos comentado en apartados anteriores, las alteraciones epigenéticas tienen un rol esencial en el desarrollo del tumor, afectando a numerosas rutas de señalización celular y conduciendo a una acumulación secuencial de cambios genéticos y epigenéticos que se van produciendo conforme va evolucionando el cáncer (Esteller, 2008). La metilación en genes supresores de tumores es un mecanismo conocido que favorece la carcinogénesis. Dado que esta modificación epigenética es un proceso reversible, la investigación de fármacos inhibidores de enzimas DNMTs es clave ya que permitiría revertir el silenciamiento génico de los genes supresores de tumores. Por ello,

las alteraciones epigenéticas tienen un papel esencial en este proceso de carcinogénesis, ya que se producen conforme se inicia la adquisición de un fenotipo maligno de las células, así como la ganancia de resistencias primarias o adquiridas a los tratamientos antitumorales administrados. Por esta razón, los biomarcadores epigenéticos detectados en muestras invasivas (como tejidos) o no invasivas (como biopsias líquidas) son de gran importancia para mejorar la sensibilidad y especificidad de los métodos de detección o diagnóstico, además de ofrecer una medicina personalizada con el mejor tratamiento para cada paciente.

1.3.6.1. Hipermetilación en el CP

Se ha descrito ampliamente en la bibliografía que en el CPNM la metilación de los genes supresores de tumores, silenciando su expresión, se asocia a un peor pronóstico de la enfermedad, si se compara con tumores con los mismos genes supresores hipometilados (Duruiseaux & Esteller, 2018). En relación con la metilación del ADN en el CP, se ha observado un aumento en la expresión de las DNMTs (DNMT1, DNMT3a y DNMT3b), mayoritariamente en pacientes fumadores. Más específicamente observaron que el aumento en la expresión de DNMT1 en las fases tempranas de la enfermedad, estaba directamente relacionado con la represión de genes implicados en el CP, como *RASSF1A* y *CDKN2A* (Liu et al., 2016), así como otros genes relacionados con esta neoplasia como *FHIT* (Situ et al., 2022). A su vez, se ha observado que la sobreexpresión de DNMT3b, inducida por carcinógenos, lleva a una transformación maligna y a un peor pronóstico en líneas celulares de CP (Kim et al., 2006; Teneng et al., 2015). Otra de las características que relaciona DNMT3b con el CP es la adquisición de una mayor actividad transcripcional, asociada con una mayor probabilidad de padecer este tipo de cáncer, debido a un polimorfismo genético en su promotor (Lee et al., 2005).

En el CP la hipermetilación del ADN afecta a genes implicados en el ciclo celular (*CDKN2A*), señalización (*APC*, *RASSF1A* y *RARB*), a la maquinaria de reparación del ADN (*MGMT*, *TERT*), la TEM (*CDH1*), apoptosis y angiogénesis (*DAPK*, *EZH2*) (Krishnamurthy et al., 2019; Licchesi et al., 2008; Nakata et al., 2006; Selamat et al., 2011; Stewart, 2014; Zhang et al., 2016). Además el estudio de la hipermetilación de los genes involucrados en diferentes funciones celulares durante el proceso de carcinogénesis ha servido para

determinar ciertos biomarcadores epigenéticos de diagnóstico en el CP, como es el caso de *SHOX2*, cuya hipermetilación ha sido estudiada como un biomarcador de diagnóstico en muestras mínimamente invasivas en el CP (Schmidt et al., 2010; Zhou et al., 2021).

1.3.6.2. Hipometilación en CP

Por otra parte, la hipometilación génica es responsable de la activación de oncogenes. En el CP, la hipometilación de oncogenes como *ELMO3* (Søes et al., 2014) y *14-3-3σ* (Radhakrishnan et al., 2011) han favorecido el desarrollo tumoral.

Tal como estudió Hascher hace años, además de la formación del tumor, el progreso del fenotipo favorecedor de metástasis en el CPNM está ligado también a cambios en la metilación del ADN (Hascher et al., 2014). Diferentes estudios mostraron que la hipometilación del Complejo Represor *Polycomb 2* (*PRC2*) estaba relacionada con la proliferación, el crecimiento celular descontrolado, la progresión del ciclo celular y la invasión en el CPNM (Gan et al., 2018; Hascher et al., 2014).

En este sentido, las alteraciones epigenéticas tienen un papel esencial en el progreso y evolución del CP y es un hecho que se ha ido consolidando durante los últimos años en la investigación sobre esta enfermedad. Por ello es de gran interés el estudio de los mecanismos epigenéticos para la identificación de biomarcadores útiles para la práctica clínica que favorezcan al diagnóstico, pronóstico y tratamiento dirigido de la enfermedad.

1.3.7. Biomarcadores epigenéticos en el CP

El *National Cancer Institute* define “biomarcador” como una molécula biológica presente en muestras de sangre, otros fluidos corporales o tejidos, que se encuentra presente en procesos normales, anormales o como condición de enfermedad. Los biomarcadores tumorales son una buena orientación para muchas áreas de la biología del cáncer (Balgkouranidou et al., 2013), pueden ser una herramienta esencial como biomarcador de diagnóstico, detectando la enfermedad en estadios iniciales, de pronóstico, valorando cuán de agresiva será la enfermedad, o de respuesta a los fármacos, evaluando la probabilidad de beneficio a un tratamiento en particular (Duffy, 2007; Kulasingam & Diamandis, 2008).

Los cambios epigenéticos y genéticos de las moléculas de ADN indican aberraciones que ocurren durante la carcinogénesis, como pueden ser la hipermetilación focal o hipometilación global en el caso de las modificaciones epigenéticas (Wan et al., 2017). A diferencia de las alteraciones genéticas, los cambios epigenéticos, como la metilación del ADN, son muy regulares en pacientes con cáncer (Han et al., 2017). La metilación del ADN ofrece una evaluación sobre las alteraciones epigenéticas, aumentando el número de cambios epigenéticos conforme progresa el tumor (Berdasco & Esteller, 2019). La hipermetilación del ADN tiene la ventaja de que en pacientes con CP se puede detectar mediante lavados o cepillados broncoscópicos, muestras de esputo y muestras de sangre (plasma y suero), siendo todos estos métodos mucho menos invasivos y más fáciles de extraer para el paciente que una biopsia tradicional (Ansari et al., 2016).

En el CP, un diagnóstico más temprano permitiría iniciar el tratamiento antes y podría reducir la muerte por cáncer. Muchos genes están hipermetilados en el CP, entre los que podemos mencionar a *P16* y *MGMT*, que se encuentran hipermetilados en el 100% de los pacientes con SCC hasta 3 años antes del diagnóstico de cáncer (Belinsky et al., 1998). En artículos de revisión se han descrito cambios en la metilación de *APC*, *RASSF1A*, *CHD13*, *KLK10* y *DLEC1*, que mostraron hipermetilación en pacientes con CP. Por otro lado, cambios en la metilación de genes como *CDKN2A*, *DAPK1*, *GSP1*, *P16INK4A*, *TAC1*, *HOXA17* y *SOX17* (Han et al., 2017; Palanca-Ballester et al., 2021; Shivapurkar & Gazdar, 2010, Hulbert et al., 2017), detectados en biopsias líquidas, pueden tener un potencial significativo como biomarcadores de riesgo en pacientes con CP. En la actualidad, existen diferentes ejemplos de biomarcadores epigenéticos para el diagnóstico, pero solo un pequeño número de ellos se han convertido en pruebas comercialmente disponibles que tienen una utilidad clínica sustantiva (Berdasco & Esteller, 2019). Diferentes empresas lanzaron al mercado estas pruebas diagnósticas no invasivas, por ejemplo, las pruebas IvyGene (Locke et al., 2019), PanSeer (Chen & Zhao, 2019) o Epi proLung (Locke et al., 2019). En nuestro grupo, hemos publicado recientemente un trabajo que describe el potencial de *BCAT1* como biomarcador epigenético de diagnóstico de CP (Palanca-Ballester et al., 2022).

Un gran número de estudios han demostrado que la hipermetilación de genes en el CP, tiene tanto un papel diagnóstico como pronóstico importante en pacientes con CP y,

que en algunos casos podría predecir la respuesta al tratamiento. Los biomarcadores de pronóstico ayudarían en el cáncer monitoreado por la medición dinámica de ADN circulante (ADNct) (Wan et al., 2017). Zhang et al, reveló en una muestra de más de 64 pacientes con CP, que aquellos con cuatro o más genes metilados simultáneamente en un panel de 14 genes (*APC*, *CHCD13*, *KLK13*, *DLEC1*, *RASSF1A*, *EFEMP1*, *SFRP1*, *RAR*, *p16INK4A*, *RUNX3*, *Hmlh1*, *DAPK*, *BRAC1* y *p14ARF*) tuvieron una supervivencia de dos años libre de progresión más pobre (13,8 meses) en comparación con aquellos que tenían menos de cuatro genes metilados (17,8 meses) (Zhang et al., 2011). Las variaciones epigenéticas específicas en las células cancerosas pueden reflejar las respuestas al tratamiento de los pacientes y es un componente importante para seleccionar las estrategias y los fármacos óptimos antes del inicio de los tratamientos (Han et al., 2017). Salazar et al, mostró que los pacientes con CP con el gen *CHFR* no metilado respondieron significativamente mejor al tratamiento que aquellos que lo tenían metilado, lo que demostró que la metilación del gen influye en el resultado de la quimioterapia frente a los ITQs de EGFR como tratamiento de segunda línea en pacientes con CPNM en estadio IV, siendo útil para predecir las respuestas a la terapia (Salazar et al., 2011).

1.3.8. Tratamientos farmacológicos para el CPNM

En las últimas décadas, ha habido un gran avance en el campo de las opciones terapéuticas del CP, enfocándose cada vez más a la medicina personalizada, donde la elección del tratamiento se basa en diferentes características del tumor, como el estadio, la histología, el perfil molecular del tumor y el estado general del paciente. Se utilizan guías de práctica clínica que establecen una serie de criterios para poder elegir el tratamiento en base a las características moleculares que muestra cada tumor y cada paciente. Actualmente, las opciones terapéuticas para un paciente con CP se establecen en función del estadio del tumor y son fundamentalmente: cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia dirigida (Alexander et al., 2020).

En los estadios iniciales de la enfermedad (Tumor oculto, estadio 0, I o II) la cirugía o resección quirúrgica completa es la opción más efectiva y el tratamiento principal para luchar contra la enfermedad, aunque excepcionalmente también se puede llevar a cabo

en estadios III. En estadios I y II tras la cirugía se suele administrar al paciente radioterapia. Esta técnica consiste en la producción de radicales libres y peróxidos que dañan indirectamente el ADN mediante radiación ionizante. A pesar de esto, en los estadios iniciales también se puede administrar monoterapias cuando los tumores que se tratan no se pueden llevar a cirugía para resección quirúrgica debido a otras patologías que pueda padecer el paciente. A su vez, este tipo de monoterapia se suele dar también como adyuvante tras la resección quirúrgica del tumor, aumentando así las probabilidades de erradicar el tumor o en tumores avanzados que no pueden recibir otro tratamiento. Del mismo modo, se puede utilizar la combinación de quimioterapia con terapia radioquímica para potenciar el efecto de la primera. La terapia radioquímica se da como neoadyuvante en pacientes con estadios más avanzados (II o III) para conseguir reducir el tamaño del tumor de forma que pueda ir a cirugía (PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2002).

1.3.8.1. Terapias no dirigidas

La quimioterapia es una terapia no dirigida que trata de inhibir la proliferación celular, evitando así la invasión y metástasis de la enfermedad mediante el uso de agentes citotóxicos y citostáticos de forma persistente. Los tratamientos principales utilizados en la mayoría de tumores son:

- **Inhibidores de la síntesis del folato**, como el metotrexato (aprobado en 1970 por la FDA para el tratamiento en CP) y el pemetrexed (aprobado en 2004 por la FDA para el tratamiento en CP). El metotrexato inhibe la dihidrofolato reductasa bloqueando así la síntesis del folato y como consecuencia la síntesis de las purinas y pirimidinas, deteniendo el ciclo celular en la fase G1. Este fármaco se utiliza principalmente para tratar CPM y SCC. El pemetrexed inhibe diferentes enzimas de la ruta de la síntesis del folato, compitiendo así por los ciclos de unión, bloqueando la síntesis de purinas y pirimidinas y impidiendo finalmente la replicación celular. Esta terapia se emplea para casos de CPNM como primera línea de tratamiento combinándose con cisplatino y para casos de tumores escamosos como segunda línea después de administrar quimioterapia (Adjei, 2004; Hannoodee & Mittal, 2022; Scagliotti et al., 2009).

- **Agentes alquilantes derivados del platino**, como cisplatino (aprobado en 1978 por la FDA para el tratamiento en CP) y carboplatino (aprobado en 1989 por la FDA para el tratamiento en CP), es una de las familias de quimioterápicos más antiguas. Estos fármacos tienen la capacidad de entrecruzarse con las bases purínicas del ADN, interfiriendo con los mecanismos de reparación del ADN, causando daños en el mismo y, posteriormente, induciendo la apoptosis (Dasari & Tchounwou, 2014). El cisplatino ha sido uno de los grandes descubrimientos contra el cáncer, catalogándose como uno de los agentes quimioterápicos más utilizados en combinación con otros fármacos. En casos de CPNM, se ha observado una mejoría en los pacientes tratados con quimioterapia de cisplatino que han tenido resección quirúrgica completa. El problema principal al que se enfrentan las terapias con cisplatino es que este fármaco tiene un perfil de efectos adversos muy alto con respecto a otros análogos como el carboplatino, que a pesar de que causa mielosupresión, se tolera mucho mejor que el cisplatino. En consecuencia, la terapia con carboplatino se administra con frecuencia en aquellos casos con comorbilidades que no pueden tolerar cisplatino. A su vez, en aquellos pacientes que no son candidatos para el cisplatino, a menudo debido a que padecen una disfunción renal debido a la nefrotoxicidad producida por el transportador OCT2, el tratamiento simultáneo se realiza con un agente diferente o abandonarse por completo (Ho et al., 2016; Xiang et al., 2019). Otros problemas relacionados con esta familia de quimioterápicos son la aparición de mecanismos de resistencia, como por ejemplo la alteración de miRNAs (Cao et al., 2015).
- **Inhibidores de la formación de microtúbulos** como vinorelbina (aprobado en 1994 por la FDA para el tratamiento en CP), docetaxel (aprobado en 1999 por la FDA para el tratamiento en CP) y paclitaxel aprobado en 2012 por la FDA para el tratamiento en CP). La vinorelbina es un alcaloide que al unirse a los monómeros de la β -tubulina inhibe, durante la mitosis, la polimerización de microtúbulos, provocando arresto en la mitosis y muerte celular (Farhat et al., 2015). Habitualmente se suele emplear en monoterapia o combinándose con cisplatino en casos de CPNM en estadio avanzado (estadio III) (Neal et al., 2015). Por otro lado, los fármacos docetaxel y paclitaxel, pertenecientes a la familia de los taxanos, presentan un mecanismo similar a la

vinorelbina afectando también la síntesis de los microtúbulos, provocando una parada en la transición de fases durante la mitosis (metafase a anafase) que como consecuencia produce apoptosis (Farha & Kasi , 2022; Neal et al., 2015; Yuan et al., 2016). El fármaco docetaxel suele ser un tratamiento de segunda línea después de los derivados del platino, se utiliza tanto en monoterapia como en combinación con cisplatino en casos de CPNM localmente avanzado o metastásico no tratado (A Razak et al., 2021). No obstante, el fármaco paclitaxel se utiliza como primera línea en pacientes que presentan SCC en estadios avanzados de la enfermedad, consiguiendo mejorar el tiempo libre de enfermedad y una supervivencia más prolongada en pacientes de edad avanzada (Gupta et al., 2014).

- **Inhibidores de la síntesis de ADN**, como el fármaco gemcitabina (aprobado en 1996 por la FDA para el tratamiento en CP), actúa como un antimetabolito inhibiendo enzimas responsables de la síntesis del ADN (ADN polimerasa) y como consecuencia frenando la división celular. Se utiliza en pacientes con CPNM avanzado, como primera línea, en combinación con cisplatino (Brodowicz et al., 2006).

1.3.8.2. Terapias dirigidas

En los diferentes puntos se han mencionado terapias de los principales agentes quimioterápicos que se han utilizado y se siguen gastando para el tratamiento del CPNM. El estudio de la caracterización de las alteraciones moleculares de la enfermedad ha sido de gran utilidad para desarrollar fármacos encargados de inhibir alteraciones oncogénicas específicas que dirigen el tumor, permitiendo así el avance hacia la medicina de precisión y ofreciendo para cada paciente y tumor el mejor tratamiento en base a sus necesidades. Actualmente, las terapias dirigidas ofrecen la primera línea de tratamiento para tumores avanzados y metastásicos, en pacientes que tienen mutaciones para las que existen inhibidores. Existen diferentes terapias dirigidas para tratar el CPNM en la práctica clínica, a continuación, se detallan las más relevantes (de Mello et al., 2020; Mayekar & Bivona, 2017; Mustachio & Roszik, 2020; Yuan et al., 2019).

- **Inhibidores de EGFR**. Los ITQs de EGFR son compuestos anilinoquinazolina, que al ser análogos de las moléculas del ATP, son capaces de inhibir el sitio de unión

del ATP, uniéndose a él con mayor afinidad, y bloqueando la región del dominio de unión del ATP a EGFR (O'Leary et al., 2020; Yoneda et al., 2019). Existen diferentes generaciones de inhibidores específicos contra la actividad tirosina quinasa de EGFR. En la primera generación de ITQs de EGFR encontramos a gefitinib y erlotinib, estos inhibidores son reversibles, aprobados por la FDA en 2003 y 2004 respectivamente para el tratamiento de primera línea del CPNM, fueron indicados para las mutaciones en EGFR que conferían sensibilidad (delección del exón 19 y la sustitución L858R) a los ITQs de primera generación. Gefitinib y erlotinib demostraron una buena respuesta inicial en una gran proporción de pacientes. El problema fue que en la mayoría de pacientes tratados con los ITQs de EGFR de primera generación (aproximadamente el 60%) acabaron desarrollando resistencias a estos inhibidores, apareciendo en la mayoría de los mismos una nueva mutación (la sustitución T790M), para las que están contraindicados estos ITQs, ya que aumenta la afinidad por el ATP y provoca que estos inhibidores reversibles pierdan su eficacia, volviéndose resistentes a los mismos (Lynch et al., 2004; Mok et al., 2009; Paez et al., 2004; Sequist et al., 2011). A causa de la aparición de resistencias, mediada por T790M, a los ITQs de primera generación, se desarrollaron ITQs de segunda generación como afatinib (BIBW2992), neratinib (HKI-272) y dacomitinib (PF0299804) (Rabindran et al., 2004). En contraste, estos inhibidores se unen covalentemente y de forma irreversible a EGFR. En los estudios realizados *in vitro*, se observó que la eficacia que presentaban al bloquear la activación de EGFR, en líneas tumorales de AC de pulmón *EGFR* mutantes con T790M, disminuían la proliferación celular de las líneas celulares utilizadas (Engelman et al., 2007a; Li et al., 2008). No obstante, estos ensayos también mostraron una baja eficacia clínica, con una respuesta inferior al 10% durante el primer tratamiento. A causa de estos problemas se han desarrollado inhibidores más selectivos que den mejor resultado cuando se produce la mutación T790M, surgiendo así los inhibidores de tercera generación. La tercera generación de ITQs de EGFR incluye a WZ4002, rociletinib (CO-1686) y osimertinib (AZD9291) (Barnes et al., 2017; Ramalingam et al., 2020; Sequist et al., 2015). Estos inhibidores poseen

estructura de pirimidina y un grupo aceptor que se une de manera covalente, que da lugar a una unión irreversible, con el extremo del bolsillo de unión con el ATP. Gracias al tipo de unión, consiguen obtener mayor afinidad que la mutación T790M, por lo que superan este obstáculo. El osimertinib, uno de los fármacos en los que se centra este trabajo, fue aprobado por la FDA en 2015 para tratar pacientes con CPNM que presentaban la mutación T790M en *EGFR*. En un primer momento se utilizó este fármaco en pacientes en los que la enfermedad había progresado tras el tratamiento de los ITQs de primera generación (Mok et al., 2017a, 2017b), no obstante, hoy en día diferentes estudios apoyan utilizar el tratamiento de osimertinib como primera línea de tratamiento en pacientes con cualquier tipo de CPNM *EGFR* mutante, que presente o no la mutación T790M, ya que no se observan diferencias con el tratamiento de osimertinib tras un ITQ de primera línea una vez diagnosticada la mutación (Ramalingam et al., 2020; Soria et al., 2018). A pesar de la eficacia que han demostrado los inhibidores de tercera generación, con el paso del tiempo estos tumores igualmente desarrollan resistencia contra osimertinib, al presentar la mutación C797S que impide formación de la unión covalente, por lo que se han desarrollado además inhibidores de cuarta generación, como por ejemplo EAI045, un inhibidor selectivo de cuarta generación que supera la resistencia de C797S mediada por *EGFR* (Jia et al., 2016; Maity et al., 2020). A diferencia de los anteriores ITQs de *EGFR* que se dirigen a los sitios de unión de ATP de la cinasa, EAI045 es un inhibidor alostérico, que se une a un sitio alostérico en *EGFR* creado por el desplazamiento de la hélice C reguladora en la conformación inactiva de la quinasa (Jia et al., 2016). El eventual desarrollo de resistencia a estos tratamientos sigue siendo un problema con la presencia de mutaciones secundarias dentro de estos tumores resistentes. Por lo tanto, una mejor comprensión de los cambios que ocurren como resultado de la mutación T790M puede ser la clave para mejores oportunidades de tratamiento para estos pacientes.

- **Inhibidores de ALK.** Los tumores que presentan mutaciones de *ALK* tienen un comportamiento similar a los que tienen *EGFR* mutado, haciéndose

dependientes de la quinasa de la misma manera que los tumores *EGFR* mutantes. Actualmente se han avanzado en la búsqueda de inhibidores específicos de ALK desarrollándose ITQs específicos para ALK con un mecanismo de acción muy similar a los de EGFR (Chuang et al., 2021; Khan et al., 2018).

- **Anticuerpos monoclonales contra VEGFR.** La angiogénesis tiene un papel esencial en la carcinogénesis, siendo uno de los sellos distintivos del cáncer. Por lo que se postuló que impedir la llegada de vasos sanguíneos al tumor, bloqueando la angiogénesis, podría ser una diana terapéutica contra el cáncer. Por esta razón se desarrollaron anticuerpos monoclonales contra el receptor del factor de crecimiento vascular derivado del endotelio (VEGFR) como ramucirumab y el bevacizumab. El bevacizumab comenzó empleándose en tumores metastásicos de cáncer colorrectal (McCormack & Keam, 2008), sin embargo, años más tarde también se aprobó para tumores como el de mamá o el de pulmón (Fenicia et al., 2014). Este fármaco bloquea el receptor 1 y 2 de VEGFR, mientras que ramucirumab solamente bloquea el receptor 2. A pesar de eso, ambos fármacos dan lugar a un estado hipóxico intratumoral con escasos nutrientes, ya que bloquean la angiogénesis e impiden la formación de vasos sanguíneos, que acaba dando lugar a muerte celular (Willett et al., 2004; Xu et al., 2012). A pesar de la respuesta observada en diferentes ensayos (Kurzrock & Stewart, 2017), existen diferentes mecanismos de resistencia que causan que estas terapias no tengan tanto éxito como se espera. Uno de los mecanismos es la capacidad que tienen las células tumorales de imitar a las células endoteliales formando vasos sanguíneos que no se pueden inhibir con estos anticuerpos monoclonales contra VEGF.
- **Inhibidores del control inmunitario.** El bloqueo de puntos de control del sistema inmunitario es una de las terapias más innovadoras. Dos proteínas de puntos de control a los que van dirigidos los inhibidores del control inmunitario son PD-1/PD-L1 que se encuentra sobreexpresado en tumores y CTLA-4/B7-1/B7-2 que se encuentran en las células T o en las células cancerosas. Las células tumorales aprovechan sus mecanismos de evasión para modificar estos puntos de control y evadir así el sistema inmunitario, fundamentalmente inhibiendo la actividad de

los linfocitos T (Pardoll, 2012). Cuando se bloquea la acción de estos puntos de control, las células T destruyen mejor las células cancerosas. Algunos inhibidores de puntos de control inmunitario se usan para tratar el cáncer, tratando de reactivar los linfocitos T (Onoi et al., 2020).

- **Terapias epigenéticas.** Como ya hemos descrito anteriormente, las modificaciones de las histonas y los cambios en la metilación del ADN son procesos reversibles. Al ser procesos reversibles, las células tumorales son capaces de adaptarse rápidamente a los cambios provocados por el microambiente tumoral, activando y reprimiendo aquellos genes que favorecen el desarrollo y la progresión de las células aún en presencia de la quimioterapia y las terapias dirigidas. Por todo esto, la investigación de inhibidores de las enzimas responsables de la adición de grupos metilos a la doble hebra del ADN, es esencial, ya que permite revertir el silenciamiento génico de los genes supresores de tumores, solventando los problemas que provocaban su ausencia y dirigiendo así las células hacia un fenotipo que ayude a la regresión del tumor, reactivando los genes que de manera epigenética estaban reprimidos. En la clínica, se han realizado estudios con inhibidores de DNMTs (DNMTi) como decitabina y 5-azacitidina. Los primeros ensayos que se desarrollaron no mostraron beneficios, mostrando baja actividad y toxicidad, como en el caso de la decitabina (Cowan et al., 2010; Schrump et al., 2006; Williamson et al., 1995). La desacetilación de las histonas se lleva a cabo por las enzimas desacetilasas (HDACs). Ensayos con inhibidores de la desacetilación de histonas (HDACi) (Schrump et al., 2006, 2008; Zhang et al., 2008), además de la combinación de los inhibidores con cisplatino y otras terapias dirigidas, como por ejemplo los ITQs de EGFR, siguieron sin aportar beneficios (Reguart et al., 2014; Schwartzmann et al., 2000; Witta et al., 2012). A pesar de esto, comenzaron a diseñarse nuevos ensayos con un enfoque diferente, sabiendo que la combinación de los DNMTi y los HDACi actuaba sinérgicamente en modelos preclínicos (Belinsky et al., 2003; Cameron et al., 1999). Este nuevo enfoque ha mostrado el potencial de la combinación de epifármacos como azacitidina (DNMTi) y entinostat (HDACi) en dosis bajas en el tratamiento del CPNM

avanzado (previamente tratado con quimioterapia) en un ensayo clínico de fase I/II (Juergens et al., 2011). Es importante el uso de dosis bajas de DNMTi, ya que se debe conseguir un equilibrio entre la concentración necesaria para conseguir el cambio en la metilación y la citotoxicidad del fármaco, que anteriormente había generado efectos adversos (Azad et al., 2013). Analizar mutacionalmente los genes implicados en la regulación epigenética es esencial para comprender el impacto de la epigenética, definiendo nuevas dianas terapéuticas. Diferentes mutaciones inactivadoras podrían servir de ayuda para identificar patrones de remodelación de la cromatina que dirijan funcionalidades oncogénicas (Imielinski et al., 2012; Medina et al., 2004; Orvis et al., 2014; Song et al., 2014). Finalmente, también será importante estudiar la reversión de mecanismos de resistencia adquiridas a la quimioterapia convencional, como es el caso de un ensayo en que se realizó análisis multidisciplinar que abarcaba la metilación del ADN y el perfil de la expresión génica, estos datos mostraron que la regulación epigenética podría estar implicada en la adquisición de resistencia al cisplatino de genes como IGFBP3, cuya resistencia puede estar mediada por la hipermetilación de su promotor (Ibanez de Caceres et al., 2010). Así, la combinación de dosis bajas de los DNMTi y HDACi (por ejemplo, azacitidina y tricostatina A), son capaces de revertir la resistencia al cisplatino a través de los cambios de metilación y expresión de genes implicados en la resistencia a fármacos para el tratamiento del CP (Wrangle et al., 2014).

1.3.9. Mecanismos de resistencia a inhibidores de EGFR

A pesar de los avances de la ciencia en el CP y sus terapias, el pronóstico de los pacientes con esta enfermedad sigue siendo poco esperanzador. El principal problema es el diagnóstico tardío de la enfermedad, a causa de que los síntomas aparecen cuando el cáncer se encuentra en estadios avanzados. En más de la mitad de los casos que se diagnostican, la terapia proporcionada suele acabar en fracaso, ya que suelen presentar lesiones metastásicas. Tal como se ha descrito anteriormente, otro de los problemas, y el que trataremos en este punto son las resistencias que pueden presentar los pacientes a las terapias, ya sea resistencia innata, cuando desde el inicio no responde al

tratamiento o resistencia adquirida, que se da cuando la recaída aparece tras una respuesta positiva. Estos problemas pueden llevar a que se aumenten las dosis, que puede provocar un aumento en los efectos adversos y la no mejoría del pronóstico de la enfermedad. En el caso de la los ITQs de EGFR, y a pesar de los buenos resultados que presentaron inicialmente, la mayoría de los casos adquieren resistencia a los inhibidores entre los 9 y los 15 meses de tratamiento, causando la recaída de los pacientes (Leonetti et al., 2019; Passaro et al., 2021).

- **Mecanismos genéticos de resistencia.** Tal como se ha explicado anteriormente, uno de los mecanismos de resistencia más importantes en cuanto a la reactivación de EGFR, aun en presencia del inhibidor, se suele producir normalmente por mutaciones *de novo* en el propio gen *EGFR* (Figura 11) (Passaro et al., 2021). La mutación T790M, que confiere resistencia a los ITQs de primera y segunda generación, se encuentra entre el 50-60% de los pacientes que están recibiendo gefitinib, erlotinib o afatinib (primera y segunda generación), y que preservan sensibilidad a ITQs de tercera generación como el osimertinib. Cuando la mutación T790M se detecta antes del tratamiento puede asociarse con otras mutaciones de *EGFR* como la delección del exón 19 (que confiere sensibilidad a los ITQs de primera generación) o la sustitución L858R (también relacionada con la sensibilidad a los inhibidores). Aunque en el 90% de los casos en los que se producen mutaciones secundarias en *EGFR* están relacionadas con T790M, existen otras mutaciones, aunque actualmente no tienen relevancia clínica, que confieren resistencia a los inhibidores como las mutaciones L747S, D761Y y la T854A (Balak et al., 2006; Bean et al., 2007; Costa et al., 2007). La exposición prolongada al tratamiento con osimertinib (ITQ de tercera generación) también ha desarrollado otro mecanismo de resistencia genético como la sustitución C797S (Maity et al., 2020). Otro mecanismo de resistencia a los ITQs de EGFR, que está asociado a alteraciones genéticas que consiguen activar otras rutas de proliferación y supervivencia celular, es la amplificación de *MET*, que corresponde al segundo mecanismo de resistencia más común incluyendo a los ITQs de tercera generación (Drilon et al., 2017; Reis et al., 2018).

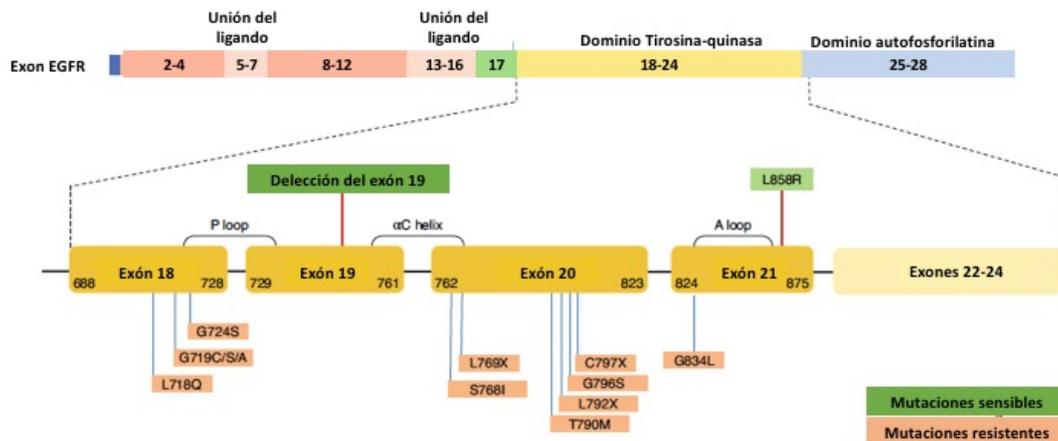


Figura 11. Mutaciones específicas dependientes de EGFR o adquiridas después del tratamiento. Esquema que representa los diferentes exones en EGFR y los dominios funcionales en los que se producen las mutaciones sensibilizantes o que confieren resistencia. TM, dominio transmembrana. Adaptada de Passaro et al., 2021.

- Mecanismos epigenéticos de resistencia.** Tal como veremos en la siguiente sección, otro de los mecanismos que provocan la resistencia a los ITQs de EGFR, es la transformación fenotípica de las células, cuando no se detectan otras alteraciones genéticas. Esta transformación fenotípica se divide en dos clases: la transformación a CPM, que, al ser una transformación histológica, se da mayoritariamente en adenocarcinomas (Sequist et al., 2011). También aparece la TEM que corresponde a un cambio de fenotipo epitelial a mesenquimal de las células, relacionado con la invasión, agresividad tumoral y quimiorresistencia y puede estar dirigido por un mecanismo epigenético. Este proceso se caracteriza por la pérdida de uniones celulares (a causa de la pérdida de proteínas de unión intercelular como E-Cadherina (CDH1) o la molécula de adhesión celular epitelial (EPCAM)), un aumento de la plasticidad celular y de la capacidad de metástasis. Ya que este punto tiene una gran relevancia para la presente tesis doctoral, en el siguiente apartado se desarrollará detalladamente algunas de las características sustanciales, como las que se relacionan con la resistencia a los ITQs de EGFR, y la relación con los mecanismos de remodelación de la cromatina y el control de la expresión génica, afines a la TEM.

2. Transición epitelio-mesenquimal en el cáncer (TEM)

La TEM es un programa de transdiferenciación, en el cual las células epiteliales adquieren comportamientos y fenotipos mesenquimales, fenotipos de la regulación a la baja de características epiteliales, que convierten células de fenotipo epitelial en mesenquimal. El estado epitelial de las células en las que se inicia la TEM, se caracteriza por uniones epiteliales estables célula-célula, polaridad apical-basal e interacciones con la membrana basal (Plygawko et al., 2020). Una característica clave de la morfogénesis del tejido epitelial es la habilidad de las células en cambiar rápida y reversiblemente su fenotipo, entre estados fenotípicos epiteliales y mesenquimales (E-M) (Zeisberg & Neilson, 2009). Esto se denomina plasticidad celular y se ejemplifica por el cambio de células epiteliales polarizadas a un estado mesenquimatoso migratorio no polarizado y viceversa. Muchas células poseen plasticidad epitelial-mesenquimatosa (PEM), lo que les permite cambiar reversiblemente entre estados adherentes más estáticos y estados migratorios más separados. Estos cambios en el comportamiento celular son impulsados por los programas de TEM y transición mesenquimal-epitelial (TME), los cuales juegan un papel vital durante el desarrollo normal, siendo cruciales para eventos como la migración celular y la organización de muchos tipos de células en tejidos y órganos durante la embriogénesis. Además, también juegan un papel importante en contextos homeostáticos, como por ejemplo el proceso de cicatrización y renovación de tejidos. Sin embargo, cuando se activan de una forma inapropiada pueden contribuir a impulsar distintas etapas de progresión del cáncer, incluida la invasividad del tumor, diseminación celular y colonización y crecimiento metastásico, así como la fibrosis (Carmona et al., 2014). El creciente interés en la biología de estas transiciones celulares ayudó tanto a establecer la plasticidad de las células epiteliales como un campo de estudio a fines del siglo XX como a formar gran parte del pensamiento actual sobre la morfogénesis en el desarrollo embrionario temprano, la reparación de tejidos y la metástasis del cáncer. Las células somáticas que cambian de un fenotipo maduro a otro exhiben la propiedad de plasticidad. La noción de plasticidad de las células epiteliales se deriva en gran medida de los primeros estudios de regeneración tisular en modelos experimentales primitivos. Estos modelos involucran una variedad de tejidos, muchos de los cuales tienen un componente epitelial. Cada vez está más claro que las células

epiteliales y endoteliales disfrutan de algo de esta plasticidad, lo que se demuestra fácilmente al estudiar el proceso de la TEM (Yang et al., 2020).

Durante la TEM, los cambios en la expresión génica y la regulación postraduccional conducen a mecanismos como la represión de las características epiteliales y la adquisición de características mesenquimatosas. De manera similar al desarrollo embrionario, se ha demostrado que los cambios en los fenotipos celulares, mediados por la TEM, provocan que las células muestren una morfología similar a la de los fibroblastos, así como un aumento de la capacidad migratoria e invasiva, que acaban desempeñando un papel esencial en el proceso tumorigénico (Brabletz et al., 2018). El proceso reverso, que se conoce como TME, también ocurre con frecuencia durante el desarrollo. Dependiendo del contexto del tejido o de las señales de activación de TEM, las células epiteliales pueden perder solo algunos de sus rasgos o puede mostrar una combinación de rasgos de células epiteliales y mesenquimales, considerándose una TEM "parcial" (Plygawko et al., 2020). Por tanto, una característica de la TEM y de la TME que ocurre *in vivo*, ya sea durante desarrollo normal o en un contexto patológico, es que la transición de un estado epitelial a un estado mesenquimal y viceversa es a menudo incompleta, lo que resulta en células que residen en estados intermedios reteniendo características tanto epiteliales como mesenquimales. Las células que están detenidas o en transición a través de estos estados intermedios (o metaestables) de TEM a menudo se denominan "células fusionadas" ya que tienen atributos de un fenotipo tanto epitelial como mesenquimatoso y también exhiben propiedades similares a las de las células madre. Estas "células fusionadas" también muestran un alto grado de plasticidad entre el epitelio y mesénquima, con fenotipos que juegan un papel crítico en la metástasis del cáncer (Kim et al., 2017).

Varios cambios en los biomarcadores de plasticidad pueden ayudar a identificar al menos tres tipos de TEM y el uso de una colección de criterios para TEM aumenta la probabilidad de que todos estén estudiando el mismo fenómeno, es decir, la transición de células epiteliales y endoteliales a un fenotipo móvil. Existen tres tipos de TEM dependiendo del contexto tisular y temporal al que correspondan (Kalluri & Weinberg, 2009; Kim et al., 2017; Lachat et al., 2021):

- La TEM de tipo 1 ni causa fibrosis ni induce un fenotipo invasivo que resulte en una diseminación sistémica a través de la circulación. Pueden generar células mesenquimales (mesénquima primario) que tienen el potencial de someterse posteriormente a un TME para generar epitelios secundarios. Las funciones que realiza este tipo de TEM son implantación, embriogénesis y desarrollo de órganos.
- La TEM de tipo 2 se activa en el contexto de la inflamación y la fibrosis. El programa comienza como parte de un evento asociado a la reparación que normalmente genera fibroblastos y otras células relacionadas para reconstruir los tejidos después de un traumatismo y una lesión inflamatoria. A diferencia de la del tipo 1, la del tipo 2 se expresa durante largos períodos de tiempo y eventualmente puede destruir un órgano afectado si la inflamación primaria no se elimina o se atenúa. Las funciones que desarrolla este tipo de TEM son cicatrización de heridas, regeneración de tejido y fibrosis.
- La TEM de tipo 3 ocurren en células neoplásicas que previamente han sufrido cambios genéticos y epigenéticos, específicamente en genes que favorecen el crecimiento clonal y el desarrollo de tumores localizados. Estos cambios, que afectan notablemente a los oncogenes y los genes supresores de tumores, conspiran con el circuito regulador de la TEM para producir resultados muy diferentes de los observados en los otros dos tipos. Las células de carcinoma que se someten a una TEM tipo 3 pueden invadir y hacer metástasis y, por lo tanto, generar las manifestaciones finales y potencialmente mortales de la progresión del cáncer, adquiriendo propiedades de células madre tumorales (CSCs).

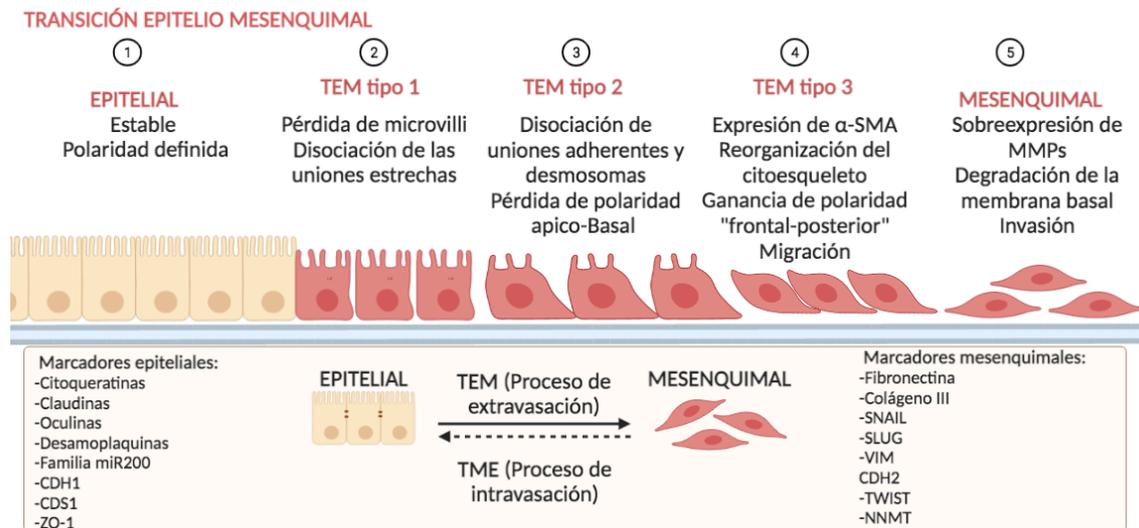


Figura 12. Cambios producidos en las células durante la TEM. Adaptado de Santamaria et al., 2017; Tam & Weinberg, 2013. Creada con BioRender.com

2.1. Marcadores epiteliales y mesenquimales involucrados en el proceso de la TEM

Se han estudiado una variedad de biomarcadores para demostrar los tres subtipos de TEM. CDH1 es el miembro más estudiado de la familia de las cadherinas, es una glicoproteína de adhesión célula-célula dependiente de calcio, relacionada con la unión intercelular, CDH1 está compuesta por 5 repeticiones de cadherina extracelular, una región transmembrana y una cola citoplasmática altamente conservada. CDH1 se expresa en las células epiteliales, y, la pérdida de la función de CDH1 promueve la TEM, utilizándose los cambios en el nivel de expresión de diferentes las cadherinas para monitorear este proceso. E-cadherina (CDH1) disminuye mientras que N-cadherina (CDH2) aumenta durante el proceso de la TEM, expresándose CDH2 en células mesenquimales, fibroblastos, células cancerosas y tejido neural (Plygawko et al., 2020). Como se ha comentado, las células cancerosas pueden pasar a través de la TEM en diferentes grados, conservando rasgos epiteliales mientras adquieren algunos mesenquimales, o bien pueden eliminar todos los vestigios de su origen epitelial o mesenquimal y volverse completamente mesenquimales o epiteliales. Las células epiteliales se diferencian de las mesenquimales principalmente por la morfología que presentan, además de los patrones de expresión de los biomarcadores epiteliales y

mesenquimales que van presentando según en el punto de la transición en el que se encuentran (Yang et al., 2020). Como hemos nombrado anteriormente, las diferencias morfológicas y moleculares que presentan las células se deben principalmente a los programas transcripcionales dirigidos por diferentes factores de transcripción de la TEM (FTs-TEM), entre los que se encuentran SNAIL (proteína de dedo de zinc SNAIL1), TWIST (proteína relacionada con la torsión), ZEB (*Zinc Finger E-Box Binding Homeobox*), SLUG (proteína dedo de zinc SNAIL2). Es importante tener en cuenta que estos FTs-TEM por lo general cooperan entre sí para orquestar la TEM. La unión de los FTs-TEM a las regiones promotoras de CDH1, bloquean su expresión, induciendo una serie de cambios en los patrones de expresión de las células provocando la TEM (Yang et al., 2020).

Otro posible marcador epitelial que se ha estudiado en la TEM, que puede provocar el cambio, es GRHL2 (*Grainyhead Like Transcription Factor 2*). GRHL2 es un factor de transcripción que se encuentra en la región del cromosoma humano 8q22 (He et al., 2020). Además, este gen juega un papel clave en la regulación de muchas funciones fisiológicas del epitelio de las vías respiratorias humanas, incluidas las relacionadas con la morfogénesis celular, la adhesión y la motilidad (Gao et al., 2013). GRHL2 tiene un papel esencial en el mantenimiento de la especificidad del linaje epitelial en múltiples tejidos (Holding et al., 2019) y también está implicado en el desarrollo de tumores como el cáncer oral, el cáncer de mama y el cáncer gástrico, entre otros. Codifica una proteína de 71 kDa que funciona como proteína de unión al ADN que interactúa con las permutaciones de la secuencia consenso 5'-AACCGGT-3' (Werner et al., 2013). GRHL2 parece actuar como represor y/o activador de la transcripción dependiendo del contexto de la cromatina de los genes diana (Mehrazarin et al., 2015). En el pulmón, forma un bucle regulador con NKX2-1 que coordina la morfogénesis y diferenciación de las células epiteliales del pulmón. GRHL2 también está implicado en la carcinogénesis de varios tejidos y órganos, sin embargo, la función de GRHL2 parece ser compleja y controvertida dependiendo del tipo de cáncer en el que se estudie (Cieply et al., 2012; Xiang et al., 2012). MiR194 y miR217 se encargan de traducir GRHL2, inhibiendo la proliferación celular y promoviendo la diferenciación celular (Pan et al., 2017; Zhu et al., 2016). GRHL2 se localiza principalmente en el núcleo (Chen et al., 2010; Petrof et al., 2014), pero también se observa GRHL2 en el citoplasma y en la membrana celular

interna (Petrof et al., 2014). Aunque las razones subyacentes aún no están claras, la desregulación de la expresión específica del tejido/órgano del gen *GHRL2* sugiere los efectos duales del factor de transcripción sobre la promoción de la TEM y el proceso de carcinogénesis.

Durante la TEM, las células aumentan sus niveles de vimentina (VIM), que es una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto, la cual se expresa habitualmente en células embrionarias pluripotentes. Aparte de enriquecer la expresión de VIM, las células mesenquimales, como se ha comentado, varían los niveles de las proteínas de adhesión celular CDH1, disminuyéndolos y sustituyéndolos por CDH2. A causa de modificar las proteínas de adhesión, las células forman uniones intracelulares más débiles, facilitando la migración, la invasión y la metástasis (Shibue & Weinberg, 2017; Singh & Settleman, 2010; Zheng & Kang, 2014).

2.2. Activación del programa TEM

La expresión y activación de factores de transcripción que inducen TEM ocurren en respuesta a diferentes ligandos extracelulares que pertenecen a diferentes vías de señalización que actúan de manera autocrina y paracrina, incluidas aquellas mediadas por TGF β 1, Wnt, RTK/RAS, NF κ B y Notch e integrinas. Se ha demostrado que las vías de señalización interactúan en varios niveles y se ha señalado una serie de mecanismos de activación/represión de retroalimentación en diferentes contextos de TEM.

TGF β 1 es uno de los impulsores clave de TEM en muchos tipos de cáncer. El *TGF β 1* actúa como un supresor de tumores en las primeras etapas del desarrollo tumoral al inhibir la proliferación e inducir la apoptosis. Aun así, en etapas posteriores del desarrollo del tumor, el TGF β 1 interviene como un promotor tumoral al inducir TEM y suprimir las respuestas inmunitarias antitumorales. La activación de este nodo conduce a una activación general de vías adicionales. Estos convergen en una red de factores de transcripción y miRNA que reprimen las características epiteliales e inducen las mesenquimales (Hao et al., 2019). El TGF β 1 es secretado por las células tumorales y por los miofibroblastos que se encuentran presentes en el microambiente tumoral. Cuando se libera al exterior, es transducida por dos receptores serín-treonín quinasa distintos (TGF β R1 y TGF β R2), que al unirse con su ligando fosforilan y activan a las proteínas

citoplasmáticas SMAD (*Mothers Against Decapaplegic homolog*), como son SMAD2 y SMAD3. Finalmente, estas proteínas forman complejos con SMAD4, lo que les permite su translocación al núcleo para regular la expresión de diferentes genes que están implicados en la diferenciación celular. Además, las proteínas SMAD activas, son capaces de activar la expresión de algunos genes mesenquimales, como por ejemplo la fibronectina, vimentina y colágeno de tipo I (Kaimori et al., 2007). La ruta de señalización del TGF β 1 se encuentra habitualmente sobreactivada en varios carcinomas, promoviendo la invasión y la metástasis (Figura 13) (Derynck et al., 2014).

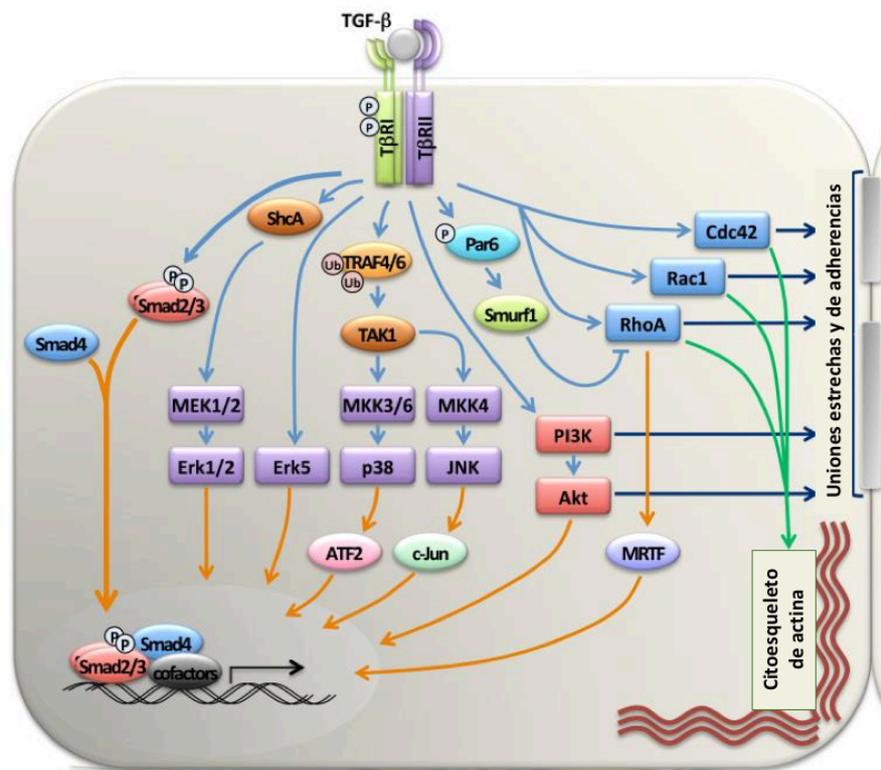


Figura 13. Mecanismos de transducción de señal inducidos por TGF β 1 durante TEM. Adaptado de Derynck et al., 2014.

El TGF β 1, a parte de la señalización vía SMAD (ruta canónica), puede inducir TEM mediante la activación de GTPasas (ruta no canónica), como por ejemplo a través de las rutas de señalización PI3K, AKT, JNK, ERK, MAPK o Rho (Hao et al., 2019; Vander Ark et al., 2018; Wendt et al., 2009). Por otro lado, existen vías alternativas que están involucradas en la inducción de la TEM, como por ejemplo Wnt y Notch. Tanto en las células madre normales como en las cancerosas, la activación de la señalización WNT y los cambios asociados a la TEM en la adhesión celular implican el desplazamiento de la β -catenina de las uniones adherentes, donde se une a CDH1 con el citoesqueleto de

actina. En condiciones fisiológicas, participa en la regulación transcripcional durante el desarrollo embrionario (Basu et al., 2018).

La vía de señalización de Notch mantiene un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis y, por lo tanto, Notch puede desempeñar un papel importante en el desarrollo y la progresión de varias neoplasias malignas. Tras la unión con su ligando, el receptor de Notch sufre una proteólisis y libera la oligoproteína de dominio intracelular de Notch (NICD). La liberación de NICD produce la translocación del núcleo y facilita la síntesis de los FTs de las familias ZEB, SNAIL y TWIST. Además, la liberación de NICD también se ha relacionado con la estabilización de HIF1A y la activación de NFkB (Kopan, 2012; Sahlgren et al., 2008; Villa et al., 2014; Wang et al., 2010). La activación de TEM no solamente se ve asociada con las vías citadas en este punto (Figura 14). Últimamente, se ha relacionado la inducción de TEM con otros mecanismos, como por ejemplo algunas rutas que incluyen miRNA como miR200 y miR205, que interactúan con los factores de transcripción de la familia de ZEB.

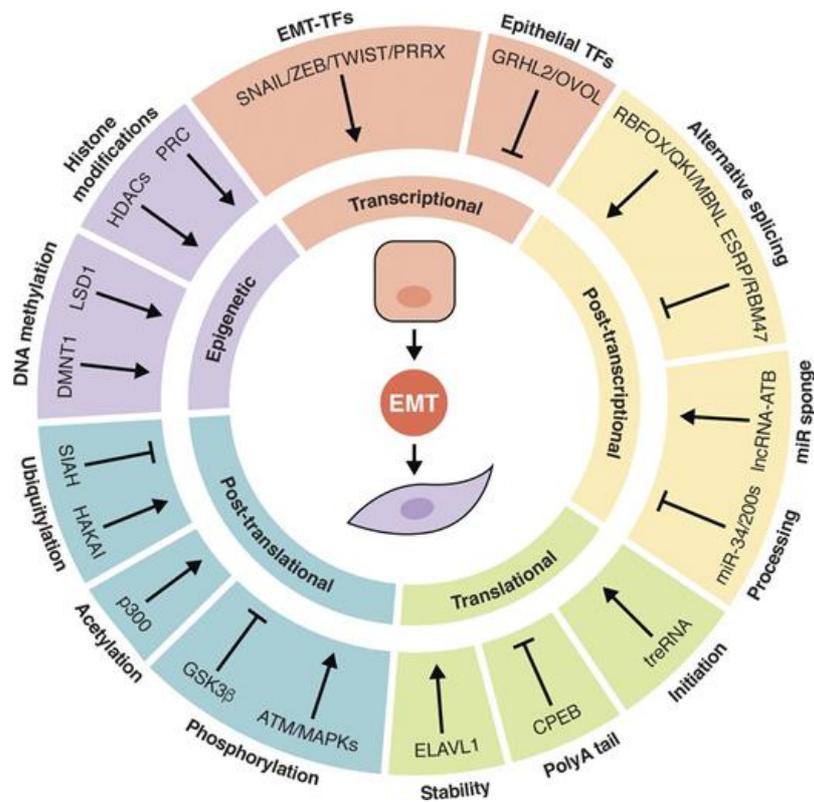


Figura 14. Capas de regulación TEM. La TEM está regulada a nivel epigenético, transcripcional, postranscripcional, traduccional y postraduccional. Los FTs-TEM reclutan la maquinaria de metilación del ADN y modificación de histonas para reprimir de manera estable los genes epiteliales y evitar su transcripción. Se oponen a los FT asociados al epitelio, que a su vez reprimen los FTs-TEM. Tanto los transcritos epiteliales como los mesenquimales se empalman y regulan alternativamente por miRNA y *long non-coding RNA* (lncRNA). El inicio de la traducción, la estabilidad del ARN mensajero (ARNm) y la poliadenilación afectan la tasa de traducción de las transcripciones epiteliales y mesenquimatosas. Las modificaciones postraduccionales como la ubiquitinación, la acetilación y la fosforilación determinan el equilibrio entre la estabilidad y la degradación de las proteínas epiteliales y mesenquimatosas (Kaimori et al., 2007).

2.3. Invasión y metástasis en TEM

En el contexto del cáncer, el modelo TEM/TME de diseminación metastásica intenta reconciliar la observación aparentemente contradictoria de que las lesiones metastásicas tienden a tener características epiteliales, muy parecidas al tumor primario del que surgieron, pero las células epiteliales no son intrínsecamente invasivas. El modelo postula que las células cancerosas de origen epitelial se someten a TEM para lograr los primeros pasos de la cascada metastásica, incluida la invasión del estroma tumoral, la intravasación y posiblemente la extravasación en órganos distantes; sin

embargo, para formar tumores secundarios con éxito, las células cancerosas deben pasar por el proceso inverso de TME después de llegar al sitio metastásico (Aiello & Kang, 2019). Así, las células pseudo-mesenquimales serían las fundadoras de colonias metastásicas y necesitarían generar una progenie de células epiteliales capaz de recrear un microambiente similar al del tumor primario (Klein, 2009). Si bien existe un fuerte apoyo en la literatura para el papel de TEM/TME en la metástasis, el modelo continúa siendo cuestionado y actualizado con nuevos hallazgos de investigación (Aiello & Kang, 2019).

2.4. Resistencia a los ITQs de EGFR inducida por la TEM en el CPNM

La teoría de la evolución clonal de los tumores se describió por primera vez en 1976, donde se realizaron los primeros estudios al respecto (Nowell, 1976). Durante la carcinogénesis, las células tumorales pueden adquirir, por azar, modificaciones genéticas o epigenéticas que les otorgan una ventaja potencial que les permita adaptarse al microambiente tumoral. Aunque, por otro lado, también puede existir la posibilidad de que estas modificaciones en células que se encuentren menos adaptadas al microambiente tumoral y a la presión selectiva ejercida por los fármacos, provoquen una disminución de su frecuencia, e incluso su desaparición. La TEM se asocia clínicamente con la resistencia adquirida a los ITQs de EGFR en el CPNM, ya que al cabo del tiempo la mayoría de estos tumores se hacen resistentes (Li et al., 2017). Como mencionamos anteriormente, en un porcentaje elevado de los tumores la resistencia se da a causa de la mutación T790M en *EGFR* que confiere resistencia a los ITQs de primera y segunda generación gefitinib, erlotinib o afatinib. En ocasiones, la mutación T790M se encuentra en subclones minoritarios preexistentes antes del tratamiento que aumentarán su frecuencia tras tratarlos con los ITQs (Zhu et al., 2019). La exposición prolongada al tratamiento con osimertinib (ITQ de tercera generación) también ha desarrollado otro mecanismo de resistencia genético como la sustitución C797S (Maity et al., 2020). Otro mecanismo de resistencia a los ITQs de EGFR descritos en pacientes, se asocia a la transformación histológica a CPM y a la activación del programa TEM, que corresponde al segundo mecanismo de resistencia más común incluyendo a los ITQs de tercera generación. Los tumores *EGFR* mutados cuando adquieren resistencia a los ITQs

de EGFR, expresan rasgos de CPM, manteniendo la mutación original en *EGFR*, siendo indicativo de plasticidad fenotípica en el tumor (Oser et al., 2015; Ribatti et al., 2020). Desde hace algunos años, está descrita la relación entre la TEM y la resistencia a los ITQs de EGFR. Por un lado, la represión de *CDH1* se relaciona, en estudios *in vitro* con cultivos celulares de CPNM, con la resistencia adquirida a Erlotinib (Suda et al., 2011). Por otro lado, la resistencia al ITQ de EGFR afatinib está relacionada a la activación del programa de TEM con características de CSC (Hashida et al., 2015). Un miRNA al que se le relaciona con la resistencia de los ITQs y el fenotipo TEM de las células es miR-200, su sobreexpresión impide la traducción del *FT*, *ZEB1*, que muestra un efecto antitumoral en células que son resistentes a los ITQs con fenotipo TEM (Sato et al., 2017). La sobreexpresión de *ZEB1* se observa en rebiopsias de pacientes con resistencia adquirida a los ITQ de EGFR (Yoshida et al., 2016). Asimismo, un estudio planteado para correlacionar los resultados de expresión génica y las respuestas a los inhibidores de EGFR o PI3K en muestras de pacientes, mostró como resultado la identificación de una firma TEM de 76 genes que tenían capacidad de predicción de resistencia clínica a los ITQs, matizando la activación de las vías independientes de EGFR como el receptor *AXL* (Byers et al., 2013). También se ha estudiado que la reactivación de *ERK1/2* promueve el desarrollo del programa TEM y la supervivencia a los ITQs de EGFR (Buonato & Lazzara, 2014). Por otro lado, los fibroblastos asociados a tumor pueden actuar como promotores de la resistencia a los ITQs, liberando citoquinas o factores de crecimiento, como *TGFβ1*, que son inductores de TEM (Crawford et al., 2009).

Cada uno de estos estudios remarcan el papel del programa TEM en el desarrollo de resistencias a los ITQs de EGFR. Como se ha comentado, existen diferentes mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a los ITQs de EGFR inducida por la TEM, estos mecanismos moleculares incluyen componentes genéticos y epigenéticos, debidos a la propia célula tumoral o al microambiente que la rodea. Muchos de estos componentes pueden ser modulables y accionables farmacológicamente, este punto resulta de gran interés ya que abre la posibilidad de diseñar tratamientos capaces de detener o revertir la resistencia a los ITQs de EGFR dirigida por la TEM, aumentando así la eficacia terapéutica. A pesar de las evidencias preclínicas, las combinaciones que pudieran parecer adecuadas en modelos celulares específicos, podrían provocar mecanismos de

adquisición de resistencia a los ITQs de EGFR en pacientes de CPNM. Algunos estudios que muestran resultados en modelos celulares concretos hablan por ejemplo de la combinación de fármacos como el pemetrexed y el gefitinib que en ciertos modelos celulares consiguen solventar la aparición de resistencias asociadas al programa de TEM (La Monica et al., 2016). Por otro lado, otro estudio expone que SNAIL juega un papel importante en la tercera generación de resistencia a ITQ de EGFR, como es osimertinib, mostrando que la regulación negativa de SNAIL puede revertir la resistencia a este fármaco en CPNM mutante de EGFR (Qin et al., 2021). Otro estudio, realizado en modelos de CPNM *EGFR* mutantes, relaciona la resistencia a los ITQs de EGFR con el fenotipo mesenquimal de las células, a través de la activación de la vía AXL, donde la combinación de los inhibidores de EGFR y los de AXL son capaces de revertir la resistencia a los ITQs (Byers et al., 2013). Otra aproximación más directa es la realizada por nuestro grupo de investigación en un trabajo previo. En este estudio se demostró en modelos celulares de CPNM con *EGFR* mutado, que la combinación de gefitinib junto a un inhibidor de TGF β 1 conseguía bloquear el mecanismo de resistencia TEM-dependiente, aunque por otro lado favorece el aumento de la subpoblación T790M persistente, sensible al osimertinib (Soucheray et al., 2015). Recientemente, estudiando los mismos modelos combinándolos con otras tecnologías *ómicas* hemos hallado nuevos mecanismos de resistencia a los ITQs asociados a la sobreexpresión del receptor de las quimioquinas relacionadas a las proteínas G CXCR7, que consigue la reactivación de ERK1/2 vinculada con la TEM; bloquear los receptores de un inhibidor concreto podría ser esencial para evitar el programa TEM en pacientes de CPNM tratados con ITQs de EGFR (Becker et al., 2019). Actualmente, en la práctica clínica no existe ninguna estrategia que capaz de revertir o retrasar la adquisición de resistencia a los ITQs de EGFR, excepto el caso de osimertinib con la mutación T790M, aunque finalmente también acaba desarrollando resistencias. Tal y como hemos comentado anteriormente, el programa TEM es un proceso de reprogramación epigenética que proporciona a las células tumorales capacidad adaptativa y plasticidad, por tanto, los moduladores epigenéticos pueden ser una opción terapéutica importante para conservar el fenotipo epitelial de la célula y la sensibilidad a los ITQs de EGFR. En la actualidad, existen estudios muy preliminares en CPNM que experimentan el uso de

inhibidores de HDACs para revertir la TEM en modelos celulares de CPNM *EGFR* mutante con resistencia a los ITQs de EGFR (Weng et al., 2019), también estudian la utilidad de los inhibidores de HDACs en ensayos preclínicos en combinación con los ITQs de EGFR en casos donde la resistencia a los ITQs ya se ha señalado (Liu et al., 2017). Otro estudio realizado también en modelos celulares de CPNM *EGFR* mutante con resistencia a los ITQs de EGFR indicó que tras inhibir la metiltransferasa de histonas G9a, se resensibilizaban las células a los ITQs a través de la reversión del fenotipo TEM (Zhang et al., 2018). A pesar de todos estos ensayos, todavía necesitamos estudios que abarquen modelos celulares diferentes a los citados, que consigan representar la heterogeneidad del CPNM dirigido por EGFR, para conseguir establecer conclusiones más robustas sobre el uso de las terapias epigenéticas. Todo esto nos abre la posibilidad de incluir las terapias epigenéticas en la práctica clínica, realizando abordajes integrativos que incluya diferentes tipos de modelos celulares, modelos animales y muestras de pacientes. La finalidad es definir el papel de la epigenética en la TEM y la resistencia adquirida a los ITQs de EGFR, llevando a cabo una medicina personalizada que prevenga o revierta la resistencia de una manera eficaz.

Hipótesis y Objetivos

La estrategia terapéutica utilizada para los pacientes con CPNM con *EGFR* mutado ha sido el uso de terapias dirigidas (ITQs) frente a EGFR. Sin embargo, a pesar de las buenas respuestas iniciales de estos fármacos, los tumores acaban desarrollando resistencias a este tipo de terapias, bien mediante mecanismos genéticos (mutaciones) o epigenéticos (metilaciones). En base a esta premisa, nuestra hipótesis de trabajo está basada en que la metilación del ADN podría estar implicada en la resistencia a los fármacos dirigidos, actuando en la activación del fenotipo de TEM durante el tratamiento. Por ello, el objetivo general de la presente tesis es identificar genes, que se regulen por mecanismos epigenéticos y que tengan un papel clave en la resistencia a los ITQs en el CPNM. Para ello proponemos los siguientes objetivos:

- a) Realizar un metaanálisis de datos ómicos (transcriptómicos, epigenómicos y farmacológicos) de modelos de resistencia a inhibidores de 1ª y 2ª generación disponibles para identificar potenciales biomarcadores epigenómicos para la TEM asociada a la resistencia a ITQs.
- b) Analizar el fenotipo en modelos *in vitro* e *in vivo* de resistencia adquirida a los ITQs de EGFR reversibles (gefitinib y erlotinib) e irreversibles (osimertinib) a partir de líneas celulares de CPNM dirigidas por mutaciones en EGFR clínicamente relevantes.
- c) Estudiar la contribución específica de estos biomarcadores epigenéticos en los modelos celulares de resistencia adquirida a gefitinib, erlotinib y osimertinib mediante herramientas de transducción génica y ensayos de biología celular y molecular.
- d) Evaluación de la posible traslación de los resultados obtenidos a la práctica clínica.

Materiales y Métodos

1. Diseño experimental

Para llegar a la identificación de genes, que se regulen por mecanismos epigenéticos y que tengan un papel clave en la resistencia o sensibilidad a los ITQs de EGFR en el CPNM, hemos seguido el diseño experimental que se muestra en la Figura 15. En primer lugar, se llevó a cabo un análisis de respuesta de 1001 líneas celulares de cáncer humano, entre las que se encontraban 64 líneas celulares de AP, a 265 fármacos, entre ellos a ITQs de EGFR de 1ª y 2ª generación. Junto a estos resultados se realizó un estudio ómico de las diferentes líneas celulares de CPNM, realizándose un metaanálisis de datos transcriptómicos y epigenómicos. La integración de los datos ómicos obtenidos ofreció información sobre la expresión de 22.000 genes y el estado de metilación de 450.000 posiciones del genoma. Esta información fue publicada en un artículo de investigación en el que participó nuestro grupo (Iorio et al., 2016). El análisis de estos resultados sirvió de base para identificar potenciales biomarcadores epigenómicos para la TEM asociada a la resistencia a ITQs. Por un lado, una vez seleccionado el candidato, se estudió el impacto funcional en el fenotipo TEM asociado a la resistencia o sensibilidad a los ITQs en modelos *in vitro*. Por otro lado, también se analizó en modelos *in vivo* la resistencia adquirida a los ITQs de EGFR y el crecimiento del tumor, específico de este marcador. Finalmente, se estudió cómo podía afectar metilación de este marcador en la práctica clínica para pacientes con CPNM.

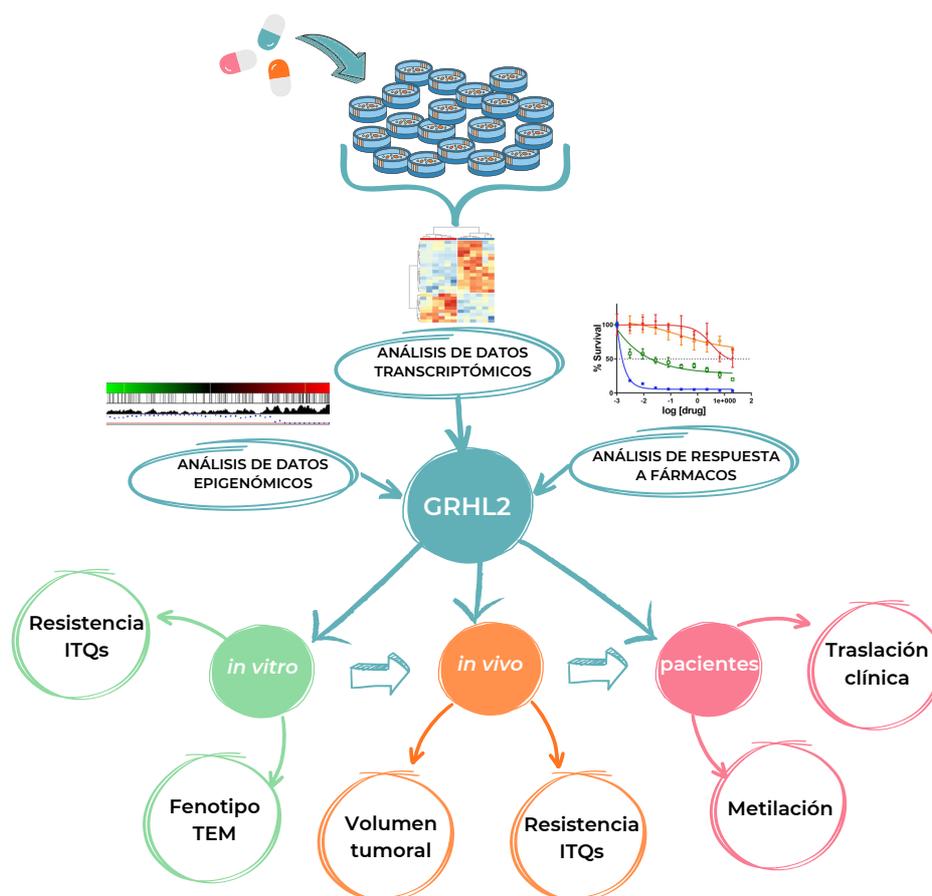


Figura 15. Esquema metodológico empleado en este trabajo.

2. Análisis de la metilación Global del ADN mediante *microarrays* Infinium de líneas celulares de CP

Los datos de sensibilidad del fármaco se descargaron de COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) y la clasificación en sensible/resistente se realizó utilizando el IC_{50} (*Inhibit Concentration 50%*) como punto de corte: Afatinib: 1 μM ; camptotecina: 0,05 μM ; cisplatino: 8 μM ; erlotinib: 1 μM ; etopósido: 5 μM ; gefitinib: 0,4 μM ; gemcitabina: 0,5 μM ; metotrexato: 0,15 μM ; paclitaxel: 0,05 μM ; rapamicina: 0,09 μM y vinorelbina: 0,04 μM .

Los datos de metilación sin procesar (*arrays* Illumina 450K) se obtuvieron del repositorio COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>) y se procesaron con la biblioteca *Minfi* (Aryee et al., 2014). Los datos sin procesar se normalizaron mediante la normalización de Illumina y se asignaron al genoma. Los DMR (*Differential Methylated Regions*) se identificaron utilizando la biblioteca mCSEA (Martorell-Marugán et al., 2019), con un

mínimo de 5 CPG por DMR y 1000 permutaciones. Se seleccionaron todas las DMR en promotores con NES (*Normalized Enrichment Score*) < 0 y FDR (*False Discovery Rate*) $< 0,25$ (Benjamini et al., 2001).

Los datos de expresión *Reads Per Kilo base per Million mapped reads* se obtuvieron del repositorio CCLE (*Cancer Cell Line Encyclopedia*) (Barretina et al., 2012; Cancer Cell Line Encyclopedia Consortium & Genomics of Drug Sensitivity in Cancer Consortium, 2015) y se transformaron para adaptar nuestros datos.

Se realizó el promedio de los valores beta para las regiones identificadas como promotoras según el manifiesto de Illumina y se realizó la correlación de Pearson para calcular la correlación entre expresión y metilación. Finalmente, seleccionamos como candidatos aquellos DMR con correlación negativa estadísticamente significativa (Smyth, 2004). Finalmente, se evaluó la superposición de un conjunto de genes de interés y una estimación de la importancia estadística, con tantas colecciones de MSigDB como se quisiera elegir. Las firmas utilizadas en este estudio están disponibles en la *Molecular Signatures Database* (MSigDB v7.0, <http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/annotate.jsp>) ordenadas por categorías (genes de rutas KEGG o Biocarta, dianas transcripcionales de factores de transcripción o miRNAs, términos GO (Gene Ontology), o firmas transcripcionales asociadas a perturbaciones químicas o genéticas). En nuestro caso, seleccionamos una colección de firmas de perturbaciones químicas y genéticas (CGP) que involucran conjuntos de genes que representan firmas de expresión de relacionadas con estos aspectos.

3. Modelos experimentales

Para el desarrollo de la tesis se han empleado las líneas celulares de AC pulmonar con *EGFR* mutado HCC4006, H1975 y HCC827 (Tabla 3), todas ellas obtenidas de la compañía *American Type Culture Collection* (ATCC). Además, a partir de estas líneas se generaron líneas resistentes, tratándolas con concentraciones progresivas de ITQs de *EGFR* hasta que adquirieron resistencia y eran capaces de crecer con normalidad a concentraciones de 10 μM (Figura 16).

Tabla 3. Líneas celulares de CPNM empleadas como modelos de sensibilidad y resistencia a los ITQs de *EGFR* y su perfil mutacional.

Línea celular	Mutación	Línea resistente
HCC4006	Deleción del exón 19 (E747-A749), A750P	HCC4006 GeR (gefitinib)
HCC827	Deleción del exón 19 (E746-A750)	HCC827 ER23 (erlotinib)
H1975	L858R/T790M	H1975 AZDR (osimertinib)

Para el empaquetamiento de partículas lentivirales se utilizó la línea celular HEK 293 LTV, que es una línea embrionaria de riñón. Para los ensayos con 5-aza-2'-deoxicitidina se utilizaron líneas celulares con el promotor de *GRHL2* hipermetilado como A549 (línea celular de ACP con *KRAS* mutado), H1703 (línea celular de SCC) y H460 (línea celular de LCC).

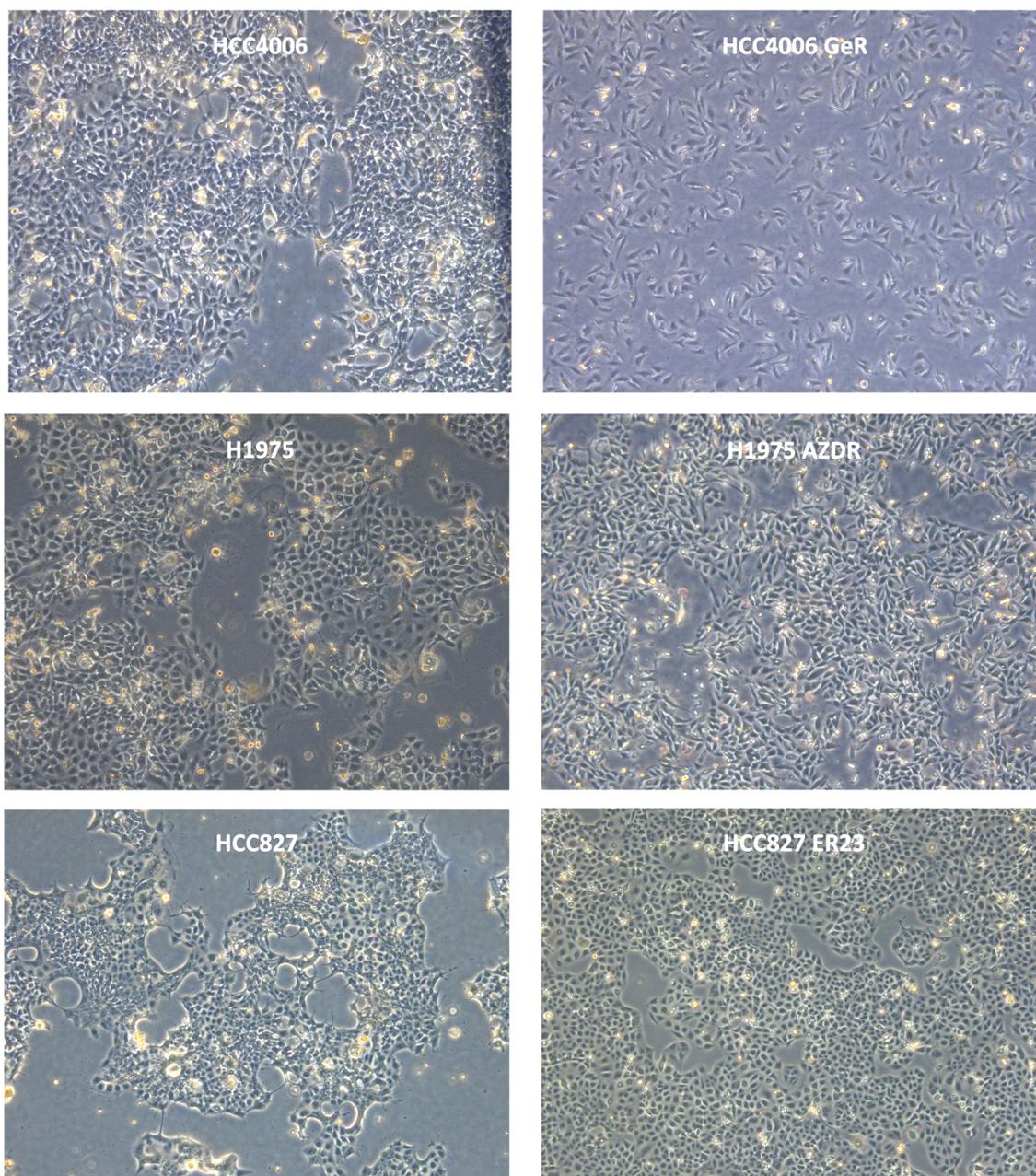


Figura 16. Imágenes de la morfología de las líneas celulares empleadas.

4. Condiciones de cultivos celulares

Las líneas celulares se incubaron en una estufa a 37°C con un 5% de CO₂ y con una humedad relativa del 90% aproximadamente. El medio de cultivo empleado para las líneas fue RPMI-1640 (Biowest) o DMEM High Glucose (4,5 g/l) (Capricorn Scientific), según las condiciones de la ATCC específicas de cada línea celular, suplementados en ambos casos con 10% de suero bobino fetal inactivado (Gibco) y con un 1% de

antibiótico/antimicótico 100x (Biowest). Este medio se cambió cada 3-4 días para renovar nutrientes y evitar la acumulación de metabolitos tóxicos, así como de células muertas.

Todas las líneas fueron testadas periódicamente para la detección de posibles contaminaciones por micoplasma mediante el kit comercial Mycoplasma Gel Detection Kit (Biotools). Todos los experimentos se realizaron con líneas celulares libres de micoplasma.

5. Experimentos de inhibición y sobreexpresión

Para el estudio funcional del gen *GRHL2*, se llevaron a cabo infecciones en las líneas celulares HCC4006, HCC827 y H1975 (sensibles y resistentes) con partículas lentivirales para poder modificar la expresión de *GRHL2*.

a. Obtención de los plásmidos lentivirales

Para el silenciamiento del gen se utilizaron 5 vectores lentivirales, cedidos por el grupo liderado por el Dr. Takeshi (Chicago, USA), que colabora con nuestro grupo de investigación. Los 5 vectores estaban basados en el plásmido pLKO.1 y se diferenciaban en que cada uno contenía una secuencia distinta de short hairpin para inhibir *GRHL2*. En el caso de la sobreexpresión del *GRHL2*, el vector fue diseñado y sintetizado por la empresa Vectorbuilder. Las secuencias pLKO.1 de silenciamiento y sobreexpresión de *GRHL2* y el esquema del plásmido utilizado en ambos casos se muestran en la Tabla 4 y las Figuras 17 y 18. Estos vectores contienen el gen de resistencia a la puomicina que va a facilitar la selección positiva de las células infectadas. En ambos casos el plásmido de interés estaba incorporado en bacterias *E. coli* y conservado en un stock de glicerol. Partiendo del stock de glicerol en cada caso, se cogió una parte de esas bacterias y se introdujeron en 5 ml de medio LB (Sigma Aldrich) junto con antibiótico de selección para que únicamente crecieran las bacterias que tenían incorporado el plásmido a 37°C y con agitación durante 24 horas. Pasado el tiempo, se realizó la extracción del plásmido de las bacterias mediante el kit *Qiaprep® Spin Miniprep Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo propuesto por el kit. Una vez obtenido el plásmido, se cuantificó su concentración mediante el espectrofotómetro *Nano Drop lite* (Thermo Scientific).

Tabla 4. Secuencias de silenciamiento y sobreexpresión de GRHL2 empleadas.

Silenciamiento (Sh) / Sobreexpresión (OE)	ID secuencia	Secuencia diana/Tamaño	Origen
ShGRHL2- Secuencia A	TRCN0000015808	GCCGATTACAAGGAGAGCTT T	Takeshi Lab
ShGRHL2- Secuencia B	TRCN0000015809	CCTCAAAGCAGATGAAAGA A	Takeshi Lab
ShGRHL2- Secuencia C*	TRCN0000015810	GCTGAAGATTTACACCAGT T	Takeshi Lab
ShGRHL2- Secuencia D	TRCN0000015812	CCAGTGAACCTTTCCTAAAT	Takeshi Lab
ShGRHL2- Secuencia E	TRCN0000422022	AGACATCAAGTGGCACATTT C	Takeshi Lab
Sh-NT	TRC1/1.5	CAACAAGATGAAGAGCACCA A	Takeshi Lab
OE-GRHL2	pLV[TetOn]- EGFP:T2A:Puro- TRE3G>hGRHL2[NM _024915.3]	1878 pb	Vector Builder
OE-CTRL	pLV[TetOn]- EGFP:T2A:PuroTRE3 G>{Stuffer_300bp} (VB201104-1016rgq)	8865 pb	Vector builder

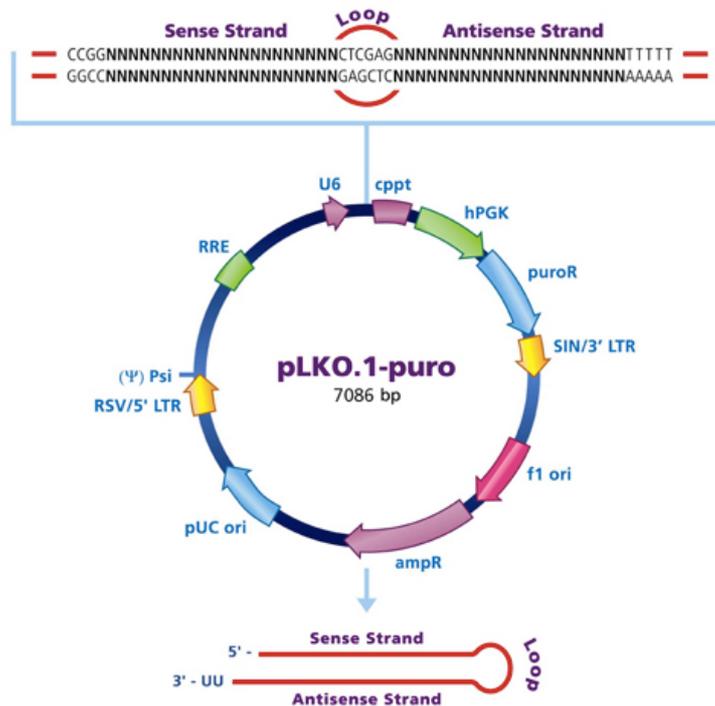


Figura 17. Esquema del plásmido de silenciamiento de GRHL2 empleado.

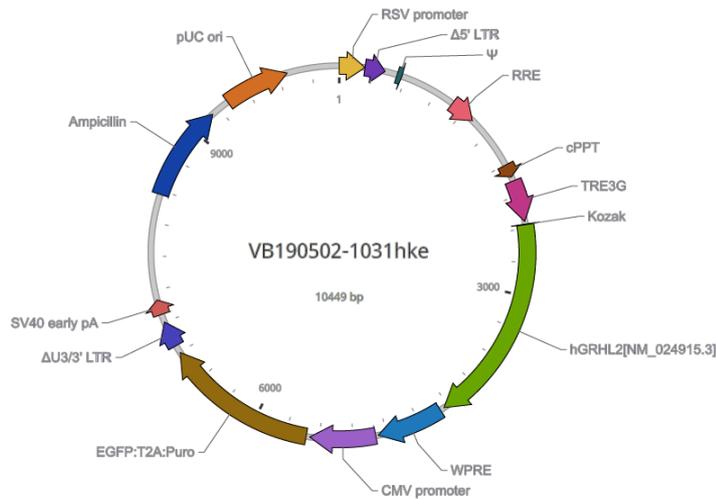


Figura 18. Esquema del plásmido de sobreexpresión de GRHL2 empleado.

b. Producción de partículas lentivirales

Una vez obtenidos los plásmidos lentivirales con la secuencia de interferencia (silenciamiento) o el ADN complementario (ADNc) para sobreexpresar GRHL2, el siguiente paso era introducirlo en las células empaquetadoras HEK293 junto a los plásmidos de envoltura de la cápside y el de empaquetamiento. El gen de la envoltura

(env) viene codificado en el plásmido pCMV-VSV-G (*Glycoprotein of the Vesicular Stomatitis Virus*) y, al plásmido de empaquetamiento (pCMV- Δ R8.2), se han eliminado genes (*vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*) para evitar la generación de virus competentes). El proceso de co-transfección consiste en mezclar los 3 plásmidos (el de interés, VSV-G y pCMV- Δ R8.2) con un reactivo de transfección (en nuestro caso Trans IT-LT1) en un microtubo estéril de polipropileno e incubar 20-30 minutos. En la Tabla 5 aparecen las cantidades utilizadas con estos reactivos.

Tabla 5. Lista de los reactivos empleados para la formación de partículas lentivirales.

Reactivos	Para placa Petri 6 cm ²
Optimem	Hasta 200 μ l
Plásmido de interés	4 μ g
Plásmido R8.2	4 μ g
Plásmido VSV-G	0,5 μ g
TransIT-LT1	24 μ L

En el tiempo de la incubación de los reactivos mencionados anteriormente, se tripsinizaron las células HEK 2973 LTV y se resuspendieron en un medio de transfección (DMEM +10% SBF sin antibióticos) y se sembraron las células a razón de 1×10^6 células en placas de alta adherencia tratadas con colágeno I BIOCOAT *Cell Environments* (Beckton and Dickinson). Al terminar la incubación, se añadió la mezcla gota a gota sobre las células productoras y se movió ligeramente para una correcta distribución.

Pasadas 24 horas, se realizó un cambio de medio a uno que favorecía la producción viral (DMEM, 10% FBS (Suero bovino fetal) y 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*)). Entre las 24 y las 72 horas, se produce la producción de virus en el interior de las células hasta que las células se lisan y en el medio quedan los virus. Tras 72 horas, se recogió el medio donde están las partículas virales, se centrifugó durante 3 minutos a 400g y se filtró con un filtro de 0,45 μ m para eliminar los restos celulares.

c. Transducción viral

Para la transducción viral, las células en las que se deseaba sobreexpresar o silenciar un gen, fueron sometidas a dos series consecutivas de infección viral. Se añadió en primer lugar al medio con las partículas virales polibreno, a una concentración de 10 µg/ml, para favorecer la infección, dicha mezcla se añadió al medio de cultivo de las células. Pasadas 24 horas, se retiró este medio y se añadió de nuevo medio fresco con las partículas virales. Al día siguiente, se reemplazó este medio por medio completo junto al antibiótico de selección puromicina. La selección se considera completa cuando las células control (células sin infectar y por tanto sin el gen de resistencia al antibiótico) mueren totalmente mientras que las células infectadas crecen de forma normal. Para demostrar que la infección se hubiese producido de forma correcta, se extrajo ARN para la confirmación por RT-qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real) y proteína para realizar la técnica de western blot.

6. Estudios de proliferación y viabilidad celulares

El conteo de los cultivos celulares se determinó mediante el contador automático *Countess*[®] II (Invitrogen). La técnica de conteo que utiliza este aparato se basa en el método de exclusión del colorante vital azul tripán, que es capaz de introducirse en el interior de las células con roturas en la membrana. Las células que presentan la membrana íntegra no permiten la entrada del colorante, conservando un aspecto redondeado y transparente. Sin embargo, las alteradas adquieren un color azul, aunque conservan una morfología similar a las viables.

Para llevar a cabo el conteo celular, después de la tripsinización y la resuspensión en medio completo, se mezcló en proporción 1:1 una alícuota de la suspensión celular obtenida, con el mismo volumen de la solución de azul tripán al 0,4% (Invitrogen) y se cargó en las cámaras de conteo específicas para el aparato (*Countess*[®] *cell counting chamber slides*; Invitrogen).

7. Estudio de la citotoxicidad celular: Método de la sulforodamina B

El método de sulforodamina B se emplea para cuantificar la citotoxicidad de las células midiendo el contenido de proteína celular total que es directamente proporcional al número de células. Desde que se desarrolló en la década de los 90 (Skehan et al., 1990), se ha ido adaptando para realizar ensayos con todo tipo de fármacos. El protocolo empleado fue el implantado por el Instituto nacional del cáncer (NCI) (www.cancer.gov). Esta técnica tiene la ventaja de que permite realizar ensayos de citotoxicidad a gran escala en placas de 96 pocillos (Vichai & Kirtikara, 2006).

En primer lugar, se sembraron 5×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos en un volumen 100 μl de medio completo. A las 24 horas tras la siembra, se añadieron los fármacos disueltos en medio RPMI. Se emplearon 6 réplicas por condición, realizando diluciones seriadas 1:3 a partir de 10 μM . Se utilizó DMSO (Dimetilsulfóxido) como control, ya que era el vehículo en el que se disolvía el fármaco.

Una vez pasadas 72 horas después del tratamiento, las células se fijaron mediante la adición de ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich) al 50% de manera que se quedase a la concentración final del 10% (p/v) en el pocillo, y se incubaron durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, las placas fueron lavadas cinco veces con agua y se dejaron secar.

Las placas fijadas fueron teñidas con 100 μl de una solución de sulforodamina B (Sigma-Aldrich) al 0.4% (p/v) en ácido acético al 1%, durante 20 minutos. Tras este tiempo las placas se lavaron con ácido acético al 1%, para eliminar cualquier exceso de tinción y se dejaron secar. Después, el colorante unido a las proteínas se solubilizó con 200 μl de tampón Tris a 10mM.

Finalmente, se midió en el espectrofotómetro la absorbancia a 570 nm en un lector de placas (Multiskan spectrum; Thermo Scientific) y se le restó el ruido de fondo medido a 620 nm para cada pocillo. Los datos se expresan como porcentaje de viabilidad celular que se calculó de acuerdo con la expresión:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = 100 \times \frac{\text{Absorbancia condición}}{\text{Absorbancia control}}$$

8. Análisis de la expresión proteica mediante *western blot*

El *western blot* se trata de una técnica que nos permite examinar la cantidad de una proteína específica en un extracto proteico y comparar así sus niveles con respecto a los existentes en otras muestras. Para ello, se realizaron los siguientes pasos:

a. Extracción de proteínas

Para la obtención de las proteínas de los cultivos celulares en monocapa, en primer lugar, se retiró el medio de cultivo de las placas y se lavaron con PBS (*Phosphate Buffered Saline*) frío. Después, tras eliminar el PBS, las células se rascaron en hielo en presencia del tampón de lisis *CellLytic™ M* (Sigma) y suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (ThermoFisher Scientific). Una vez recogido el lisado celular, se sometió cada muestra a sonicación aplicando tres ciclos de 5 segundos de ultrasonidos intercalados por 15 segundos de parada empleando un sonicador Branson SLPe. A continuación, la muestra se centrifugó a 15000 RPM (Revoluciones Por Minuto), 10 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante y desechando el pellet que contienen restos celulares. La concentración de proteínas se estableció mediante el método descrito por Bradford, usando el reactivo Coomassie Blue G-250 (Bio-Rad) y midiendo la absorbancia de las muestras a 595 nm. Los valores obtenidos se interpolaron en una recta patrón de albúmina sérica bovina (BSA; Roche) con un rango de concentraciones entre 0.01 mg/ml-2 mg/ml.

b. Electroforesis y transferencia

Las proteínas se separaron en función de su peso molecular mediante la electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE). Se mezclaron 35 µg de proteína con el volumen adecuado de tampón de carga (*Laemmli Sample Buffer*, Bio-Rad) y se incubaron durante 5 minutos a 98°C para desnaturizar las proteínas.

Cuando ya estaban desnaturizadas, se cargaron las muestras en geles comerciales en gradiente de poliacrilamida del 4-20% (*Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gels*, Bio-Rad) y se sometieron a electroforesis utilizando el sistema *Mini PROTEAN® Tetra System* (Bio-Rad) en el tampón comercial *Tris/Glicine/SDS Buffer* (Bio-Rad). Junto a las muestras de

proteínas, se utilizó un marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Standards Dual Color*, Bio-Rad).

Tras la electroforesis, las proteínas presentes en el gel se transfirieron en seco a las membranas comerciales (PVDF) *Trans-Blot Turbo Transfer Pack* (Bio-Rad) utilizando el mismo sistema de electroforesis *TransBlot® Turbo Transfer System* (Bio-Rad) durante 7 minutos a 1.3 A y 25V.

c. Inmunodetección

La inmunodetección comenzó con el bloqueo de las uniones inespecíficas con una solución de bloqueo de compuesta con leche desnatada al 5% en TBS-Tween o TBS-T (Tris-Cl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1%, pH 7.5) durante 60 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave. A continuación, se incubó la membrana con los anticuerpos primarios durante toda la noche (ON) a 4°C, que se diluyeron en leche desnatada al 5% en TBS-T, dirigidos contra las proteínas especificadas en la Tabla 6.

Tabla 6. Lista de anticuerpos primarios empleados para western blot.

Anticuerpos primarios					
Diana	PM (KDa)	Origen	Dilución	Casa comercial	Referencia
ACTB	45	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	8457S
CDH1	135	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	3195S
CDH2	140	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	D4R1H
GRHL2	71	Policlonal de conejo	1:1000	Sigma Aldrich	hpa004820
VIM	57	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	5741S
ZEB1	200	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	83243
ZEB2	157	Monoclonal de ratón	1:1000	Cell Signaling Technology	97885
SNAIL/SLUG	29	Monoclonal de ratón	1:1000	Abcam	ab180713

Tabla 7. Lista de anticuerpos secundarios empleados para western blot.

Anticuerpos secundarios				
Diana	Conjugado	Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti Conejo IgG	HRP	1:1000	Cell Signaling Technology	9789
Anti Ratón IgG	HRP	1:1000	Cell Signaling Technology	7076

Tras la incubación con el anticuerpo primario, para llevar a cabo la detección de la proteína, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS-T en agitación lenta para eliminar el exceso de anticuerpo no unido a la membrana. A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (mostrados en la Tabla 7) conjugado a la peroxidasa de rábano picante (HRP).

Finalmente, tras realizar 3 lavados durante 5 minutos en agitación fuerte con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, las membranas se incubaron con el reactivo comercial ECL (*ClarityTM Western ECL Substrate*, Bio-Rad), que permite la detección por quimioluminiscencia de los anticuerpos conjugados con peroxidasa. La reacción se produce debido a que el luminol del ECL, en presencia de peróxido de hidrógeno, se transforma por la HRP (conjugada en el anticuerpo secundario) a un dianión excitado, capaz de emitir luz al regresar a su estado fundamental. Esta luz se captó por la cámara de quimioluminiscencia *ChemiDocTM XRS+* de Bio-Rad. La señal obtenida se analizó mediante densitometría utilizando el software *Image Lab 2.0.1* (Bio-Rad).

9. Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR

A lo largo de este trabajo, se midió la expresión relativa de varios genes mediante RT-qPCR cuantitativa. Esta técnica monitoriza y cuantifica la amplificación de una secuencia específica de ADNc a lo largo de la reacción. El ADNc se obtiene a partir del ARNm

extraído de las muestras mediante la reacción de transcriptasa inversa. Para llevar a cabo esta técnica se necesita un molde de ADN, un par de cebadores (*primers*) específicos, un tampón de reacción adecuado y la encima ADN polimerasa termoestable.

a. Extracción del ARN

Para la extracción de ARN total de los cultivos celulares en monocapa empleamos el kit de extracción E.Z.N.A.[®] *Total RNA kit I* (Omega) siguiendo las indicaciones de la empresa comercial. En primer lugar, se retiró el medio de cultivo de las placas y se lavaron con PBS frío. Tras eliminar el PBS, las células se rascaron en hielo en presencia de 350 μ l de tampón de lisis TRK suplementado con β -mercaptoetanol 0,02% (v/v). Las muestras se homogeneizaron y posteriormente se añadió el mismo volumen de etanol al 70% (Fisher-scientific). Una vez añadido el etanol se mezclaron bien por vortex y se transfirió la muestra a columnas *HiBind[®] RNA Mini Column* del kit de extracción. Las muestras se centrifugaron a 10.000 g 1 minuto y se desechó el filtrado quedando el ARN retenido en la columna. Posteriormente se realizaron varios lavados y centrifugaciones con tampones de lavado del kit para purificar las muestras y se desecharon los líquidos filtrados. Se hizo secar bien la columna para eliminar restos de etanol de los tampones de lavado y se añadió agua libre de RNasas para eluir el ARN de la columna, centrifugando a máxima velocidad durante dos minutos. Una vez extraído el ARN total, se cuantificó su concentración mediante el espectrofotómetro *Nano Drop lite* (Thermo Scientific).

b. Síntesis del ADNc

Tras cuantificar el ARN total, se llevó a cabo la obtención del ADNc mediante la reacción con la transcriptasa reversa. Se utilizó el kit *PrimeScriptTM Reverse Transcriptase* (Takara) y 500 ng de ARN total por muestra junto con los componentes que se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Lista de reactivos para la obtención de ADNc.

Reactivo	Cantidad
5x PrimeScript buffer	2 μ l
Oligo dT primer 50 μ M	0,5 μ l
Random 6 mers 100 μ M	0,5 μ l
PrimeScript Enzyme mix I	0,5 μ l
ARN	500 ng
Agua libre de RNasas	Hasta 10 μ l

Una vez realizada la mezcla, se llevaron las muestras al termociclador (*Veriti Thermal Cycler*, Applied Biosystems) con el programa indicado para la retrotranscripción: 15 minutos a 37°C, 5 segundos a 85°C y finalizando el programa a 4°C. Tras acabar el programa, se recogieron las muestras y se diluyeron con agua libre de RNasas.

c. Reacción en cadena de la polimerasa

Tras obtener el ADNc, se llevó a cabo la RT-qPCR para amplificar las secuencias de ADN de los genes que se querían estudiar. Para ello, se emplearon placas de PCR de 96 pocillos (*PCR Microplate, PCR-96-AB-C, Axygen*) en las que se cargaron triplicados de las muestras para cada pareja de *primers* del gen correspondiente. De tal modo, en cada pocillo se mezclaron los reactivos indicados en la Tabla 9. Los *primers* utilizados en este ensayo se indican en la Tabla 10.

Tabla 9. Lista de reactivos para la RT-qPCR.

Reactivo	Cantidad
ADNc muestra	2 μ l (10ng)
<i>Mix Primers (Forward y reverse)</i> 10 μ M	1 μ l
<i>TB Green Premix Ex Taq 2x</i> (SYBR Takara)	6 μ l
Agua libre de RNasas	3 μ l

Tabla 10. Lista de primers utilizados para ensayos de RT-qPCR.

Gen	Secuencia
ACTB-Forward	ACAGAGCCTCGCCTTTGC
ACTB-Reverse	CGCGGCGATATCATCATCCA
GRHL2-Forward	CCCACAGCGCCTATCTCAAA
GRHL2-Reverse	TACTCCTCAGCCCCAACTGA
CDH1-Forward	GGCCTCCGTTTCTGGAAT
CDH1-Reverse	TGGCCAGTGATGCTGTAGAA
CDH2-Forward	GCAGCTCTTCACCCTGTTCTA
CDH2-Reverse	CTCGCACACATAGCGGTG
SNAIL1-Forward	CGTCATCCCCTTCCAGTTCG
SNAIL1-Reverse	CCTCATTCGGGGTGGTATC
TWIST2-Forward	TGGGCGGTGCTACAACCTG
TWIST2-Reverse	TCTCCGATGTGTTGGAGAAGC
ZEB1-Forward	GGGAGGATGACACAGGAAAG
ZEB1-Reverse	GGTGCCTCAGGAAAAATGAC
ZEB2-Forward	CCTACTGGCATTGCTGAACG
ZEB2-Reverse	GACAATTAGTGCAGCCAGGTC
VIM-Forward	CAGACAGGATGTTGACAATGC
VIM-Reverse	TTGGCAGCCACACTTTCATA
CDS1-Forward	GTGTTTGGATTTCATTGCTGCCT
CDS1-Reverse	TGGAAGGGTACAAGCTCACTC

Tras cargar la placa, se centrifugó para descartar cualquier burbuja y se introdujo en el termociclador *ViiA 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) donde se realizó la PCR (siguiendo el programa indicado en la Tabla 11). En último lugar, los datos y resultados adquiridos fueron analizados por el *ViiA™ 7 Software* y normalizados en archivos de Excel.

Tabla 11. Condiciones requeridas para la realización de la RT-qPCR.

Programa	Tiempo	Temperatura
Calentamiento	2 minutos	50°C
Desnaturalización	1 minuto	95°C
Amplificación	15 segundos	95°C
40 ciclos	35 segundos	60°C
<i>Melting</i>	15 segundos	95°C
	1 minuto	60°C
	15 segundos	95°C

10. Análisis de regulación de la expresión génica mediante ChIP

La inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) es un método que se utiliza para analizar la regulación de la expresión génica a través del estudio de las interacciones entre las proteínas y las regiones promotoras de ADN de genes de interés, para establecer potenciales vínculos sobre si esas proteínas permiten la activación o represión del gen. Para llevar a cabo la técnica del ChIP se realizaron los siguientes pasos de acuerdo con el protocolo del kit empleado *truChIP Chromatin Shearing Kit with Formaldehyde* (Covaris).

a. Preparación de la muestra

En primer lugar, se sembraron las líneas celulares de interés en placas tratadas de cultivo celular de 10 cm para que tras 24 horas alcanzaran una confluencia del 80%. Pasadas las 24 horas, se retiró el medio de las placas y se lavaron las células con PBS frío, se retiró el sobrenadante y se añadieron 5 mL del tampón de fijación A atemperado a las placas. A continuación, se procedió a fijar la muestra para que las interacciones proteína-cromatina permanecieran estables. Para ello se añadieron 500 µl de formaldehído al 11,1% y se colocaron las placas de cultivo celular en un agitador de placas durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Después, se añadieron 300 µl de *Quenching Buffer E* a la muestra para detener el proceso de fijación y se dejaron las placas en

agitación a TA durante 5 minutos. Seguidamente, se aspiró completamente la solución y se añadieron 5 mL de PBS frío en cada placa de cultivo para rascar las células con ayuda del rascador de células. Se lavaron las placas con 5 mL adicionales de PBS y se recogieron las células de cada placa de cultivo. Se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 4°C y 200 g. A continuación, se lavó el pellet 2 veces con 5 mL de PBS frío y se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 4°C y 200 g. Una vez centrifugadas las muestras, se aspiró completamente el sobrenadante y se colocaron las muestras en hielo. A continuación, se resuspendió el pellet en 1 mL de tampón de lisis B con inhibidor de proteasas. La muestra se incubó 10 minutos a 4°C en agitación media. Tras los 10 minutos de incubación, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 1700 g a 4°C y se decantó el sobrenadante con cuidado. Se resuspendió el pellet en 1 mL de tampón de lavado C con inhibidor de proteasas y se incubó en agitación 10 minutos a 4°C. Se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 1700 g a 4°C y se decantó el sobrenadante teniendo cuidado de no alterar el pellet. Seguidamente, se enjuagaron los lados del tubo con 1 mL de Tampón *Shearing* D3 con inhibidor de proteasas y se transfirieron a unos tubos especiales para el sonicador Covaris (Tubos AFA de 1 mL). Finalmente, se sonicaron las muestras en el sonicador Covaris con ciclos de intensidad indicados en el protocolo del kit utilizado durante 5 minutos a 4°C para asegurar que los fragmentos de ADN se quedaran en un tamaño óptimo para el ensayo, entre 250 y 500 pares de bases. Una vez sonicada la muestra, se centrifugó a 1200 rpm, 10 minutos a 4°C y se rescató el sobrenadante, desechando el pellet.

b. Inmunoprecipitación de la cromatina

Para realizar la inmunoprecipitación, en primer lugar, se prepararon 50 µl de las bolas magnéticas (25 µl de IgA y 25 µl de IgG) por cada muestra del ChIP, y se realizaron 3 lavados de las bolas magnéticas con 1 mL del tampón de dilución. A continuación, se realizaron otros 3 lavados de las bolas magnéticas con 1 mL de BSA a 5mg/mL disuelto en PBS. Una vez realizados los lavados, se resuspendieron las bolas magnéticas en 1 mL de BSA a 5mg/mL. A continuación, se añadieron a cada tubo 2 µg de anticuerpo específico (ver anticuerpos empleados en la Tabla 12) y se incubaron en rotación ON a 4°C para asegurar la unión entre el anticuerpo y las bolas magnéticas.

Tras la incubación del anticuerpo, se colocaron en una gradilla magnética que permite la retención de las bolas magnéticas mientras se retira el sobrenadante. Una vez retirado el sobrenadante, se añadieron 100 µg por ensayo de las muestras sonicadas a cada tubo de ChIP junto con las bolas magnéticas unidas al anticuerpo, se enrasaron las muestras a 1 mL con el tampón TE y se retiraron de la muestra sonicada además 100 µl como input. Las muestras se incubaron con el anticuerpo unido a las bolas magnéticas ON en rotación a 4°C. Al día siguiente se retiró el sobrenadante dejando las bolas magnéticas unidas al anticuerpo y a la proteína que interacciona con el anticuerpo, se realizaron tres lavados de 1 mL con tampón TSE I para eliminar cualquier resto de proteína que no se haya unido al anticuerpo, a continuación se realizaron tres lavados de 1 mL con el tampón TSE II, seguidamente se realizaron tres lavados más con el tampón TSE III y por último se realizó un lavado de 1mL con el tampón TE. Finalmente, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo descartando las bolas magnéticas, se centrifugó a 4.000 RPM durante 1 minuto, se descartó el sobrenadante y se añadió al pellet 170 µL del tampón de elución, se vorteoó y tras resuspenderlo, se incubó a 65°C durante 30 minutos. Pasado el tiempo, se centrifugó la muestra durante 30 segundos a máxima velocidad y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Para finalizar se incuban las muestras a 65°C ON para revertir el entrecruzamiento.

Tabla 12. Lista primers empleada para ensayos de RT-qPCR ChIP.

Gen	Secuencia
ZEB1 ChiP Forward	CGAGACCTGAACATGTGGTG
ZEB1 ChiP_Reverse	GCCCCGAGATAACCAGAAAT
CDH1 ChiP_Forward	CCCTTTCTGATCCCAGGTCT
CDH1 ChiP_Reverse	GCCTGGAGTTGCTAGGGTCT
GRHL2 ChiP_Forward	AGCTCCCCAGCCAATCAT
GRHL2 ChiP_Reverse	GCGGCCACAGGTAACCTTC
VIM ChiP_Forward	AAGAGCGAGAGGAGACCAGA
VIM ChiP_Reverse	AAACTTCTGCAGCCTTTGGA
SNAIL1 ChiP-Forward-1	GGGCCTTTCCCTTGATAAT
SNAIL1 ChiP-Reverse-1	AAGGGAAGTGTGCTTTGGTG
OVOL2 ChiP_Forward	CCGCCCGGTGGATTTGTCTTC
OVOL2 ChiP_Reverse	GACCGCCAGATTCATCAAGC

c. Extracción del ADN

Para realizar la extracción del ADN se añadieron a las muestras 150 μL de tampón TE y RNAsa a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó durante 2 horas a 37°C. Tras la incubación, se añadió 7 μL de proteinasa K (20 mg/mL) y se incubó durante 2 horas a 37°C. Finalmente, se purificó el ADN con el kit *PCR purification* (Qiagen) y se resuspendió el pellet en 50 μL de tampón EB.

d. RT-qPCR del ChIP

Tras obtener las muestras del ChIP se procedió a realizar la RT-qPCR para amplificar las secuencias de ADN del promotor de los genes de interés siguiendo los mismos pasos que en el apartado 9.3 de materiales y métodos.

11. Inmunofluorescencia

La técnica de inmunofluorescencia sirve para establecer la localización subcelular de los antígenos a través de anticuerpos sensibles y altamente específicos que están conjugados con una marca fluorescente (fluorocromo).

Para los ensayos de inmunofluorescencia se sembraron $8,5 \times 10^4$ células en placas de 24 pocillos. Una vez transcurridas 24 horas de la siembra y consiguiendo una confluencia del 80%, las células se fijaron a TA durante 30 minutos con paraformaldehído al 4%. Seguidamente, se permeabilizaron las células con Triton X-100 al 0.2% durante 2 minutos, para bloquear las uniones específicas con tampón de bloqueo (SBF al 5%, 1% de BSA y 0.3% de Triton X-100). Los anticuerpos primarios (Tabla 13) se incubaron durante toda la noche en una cámara húmeda. Tras la incubación se lavaron las muestras con un tampón al 0.25% BSA y 0.1% Triton X-100. Finalmente, se diluyó 1:1000 en 0.25% BSA y 0.1 Triton X-100 el anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo (Tabla 14) durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Para el marcaje de los núcleos, se incubaron las muestras 5 minutos con Hoechst 33342 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Molecular Probes®, Life Technologies). Por último, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con medio de montaje (Prolong Gold Antifade Mountant, ThermoFisher Scientific).

Tabla 13. Lista de anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencia.

Anticuerpos primarios				
Diana	Origen		Dilución	Casa comercial
CDH1	Policlonal de cabra	de	1:20	R&D Systems
GRHL2	Policlonal de conejo	de	1:75	Sigma Aldrich
VIM	Monoclonal de ratón	de	1:100	Sigma Aldrich

Tabla 14. Lista de anticuerpos secundarios empleados en inmunofluorescencia.

Anticuerpos secundarios					
Diana	Ex/Em		Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti IgG de conejo- Alexa Fluor® 488	488/519		1:1000	Molecular Probes, Life Technologies	A21206
Anti IgG de ratón- Alexa Fluor® 633	633/647		1:1000	Molecular Probes, Life Technologies	A21209
Anti IgG de cabra- Alexa Fluor® 546	556/573		1:1000	Abcam	ab150132

Una vez se secaron las preparaciones se visualizaron por microscopía confocal (Olympus FV1000). Las imágenes se obtuvieron con un objetivo 40x de aceite utilizando los láseres 405 nm para el Hoechst 33342, 488 nm para el Alexa Fluor 488, 559 nm para el Alexa 546 y 635 nm para el Alexa 633.

12. Determinación de los niveles TGFβ1

Como se ha comentado en la introducción, TGFβ1 es una proteína homodimérica de 25 kDa que pertenece a la familia de las citoquinas. Este factor de crecimiento está involucrado en diferentes funciones celulares como la proliferación celular, el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis. Además, el TGFβ1 es uno de los promotores de la TEM que en la fisiopatología del cáncer está relacionada con la motilidad, invasión, resistencia a fármacos y la aparición de CSCs.

Para cuantificar los niveles de TGFβ1 empleamos el kit *Quantikine Elisa Human TGFβ1 Immunoassay* de R&D Systems. Los ensayos ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas) son una técnica de inmunoensayo donde un anticuerpo primario que reconoce a un antígeno (aquel que se pretende cuantificar) es reconocido por un anticuerpo secundario unido a un enzima capaz de generar un producto detectable, mediante espectrofotometría.

Sembramos por triplicado 2×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos, tras 24 horas realizamos un cambio de medio sin suero bovino fetal (BSA 20% en RPMI libre). Tras 72 horas se recogió el sobrenadante y se congeló a -80°C , también se realizó el conteo de células para relativizar la cantidad de TGFβ1 al número de células. Una vez recogidas todas las muestras se procedió a activar el TGFβ1 latente para que fuera inmunorreactivo mediante la adición de 20 μl de HCl 1N y la neutralización con 20 μl de NaOH 1.2N/HEPES 0.5 M. A continuación, las muestras se añadieron a una placa que contenía el anticuerpo frente TGFβ1 y tras la incubación se añadió el segundo anticuerpo conjugado al enzima que produjo un cambio de color de azul amarillo, cuantificable con una lectura de la absorbancia a 450 nm en *Multiskan spectrum* (Thermo Scientific), con una corrección de la longitud de onda a 540 nm. Los valores se restaron a las cantidades del medio control, se integraron en los valores de la recta patrón y se multiplicaron por 1.4 para ajustar la dilución inicial de la muestra.

13. Migración celular

La técnica de migración celular consiste en evaluar la capacidad que tienen las células para cerrar una herida realizada artificialmente. De esta forma, una vez generada la herida las células irán migrando hacia la apertura para cerrarla.

Para realizar este ensayo, se sembraron los cultivos a razón de 5×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos con el fin de conseguir una monocapa celular de alta densidad (80% de confluencia). Al alcanzar la confluencia esperada se realizaron 2 incisiones verticales (en dos extremos del pocillo, evitando hacer las incisiones en las esquinas del pocillo) con puntas estériles. Para eliminar las células despegadas, se lavó la placa con PBS y se renovó el pocillo con medio completo.

Se tomaron fotos de la herida a tiempo 0 (inmediatamente después de realizar la herida), a tiempo 24 horas y en el caso de que todavía no se hubiese cerrado la herida, también se tomaron imágenes a las 48 horas. Las imágenes se analizaron con ImageJ para poder cuantificar el área de la superficie cerrada por migración a tiempo 0, con respecto a las 24 y 48 horas.

14. Estudio de formación de colonias

Los ensayos de colonias son una técnica habitual para evaluar el efecto citostático o citotóxico de compuestos antitumorales. Son ensayos *in vitro* que miden la capacidad que tiene una célula aislada de proliferar formando una colonia, entendiendo colonia como un grupo de al menos 50 células, al ser sometida a la acción de un fármaco. Por tanto, con esta técnica se evalúa la viabilidad de cada una de las células que forman el cultivo celular (Franken et al., 2006).

La siembra de las células se realiza a muy baja densidad (5×10^3 células por pocillo) en placas de 6 pocillos. Pasadas 24 horas de la siembra, se realizó un cambio de medio del pocillo con los fármacos que se querían testar. Cada 3 días se cambió el medio por medio fresco (renovando también el fármaco). Las colonias aparecen entre los 10 y 15 días tras el tratamiento, dependiendo de la línea celular testada. Concluidos los días, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a TA y se tiñeron con cristal

violeta 0,4% (v/v) durante 30 minutos. Finalmente, las placas se lavaron con agua corriente y una vez secadas se digitalizaron.

15. Análisis epigenéticos de metilación del ADN

a. Desmetilación con 5-aza-2'-desoxicitidina

Se realizaron ensayos con el agente desmetilante 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza) (Sigma-Aldrich) para comprobar el efecto de la desmetilación en la expresión del gen de interés (*GRHL2*).

Para llevar a cabo esta técnica, se sembraron 1×10^5 células por pocillo, en una placa de 6 pocillos. Las líneas se trataron con 5-aza a una concentración de 2, 4, o 5 μM durante 48 y 72 horas. Uno de los pocillos se dejó sin tratar como control y se le añadió el vehículo en el que se había disuelto el 5-aza. El efecto del 5-aza se cuantificó mediante qPCR.

b. Conversión de bisulfito

Para la conversión de bisulfito se emplearon ADN genómico de líneas celulares y de parafinas de pacientes. Para la extracción del ADN genómico en ambos casos se empleó el kit de extracción de ADN *QiaAmp DNA Mini Kit* de Qiagen.

Una vez obtuvimos el ADN genómico, se llevó a cabo la conversión de bisulfito para el posterior análisis de metilación del ADN. La conversión de bisulfito trata de la desaminación de las citosinas no modificadas de la cadena de ADN, transformándolas en uracilos, mientras que las citosinas metiladas permanecerán como citosinas, ya que el bisulfito no podrá actuar sobre ellas. El proceso de conversión consiste en la desnaturalización y conversión simultánea del ADN, seguido de un proceso de desulfonación y lavados del ADN para su posterior uso del ADN modificado, tal y como muestra la Figura 19.

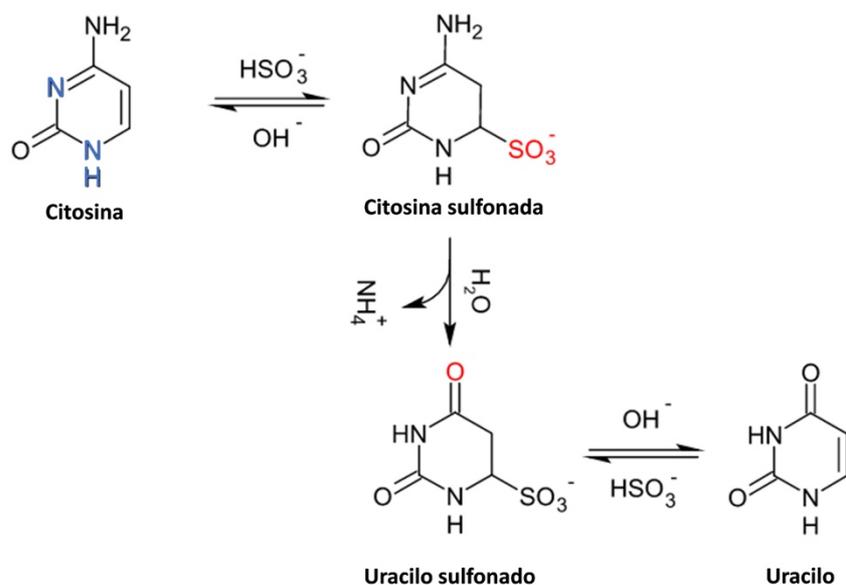


Figura 19. Esquema de la conversión por bisulfito.

Para llevar a cabo este proceso se empleó el kit *EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit* (Zymo Research). El ADN genómico modificado se analizó mediante Droplet Digital PCR (ddPCR).

c. Droplet digital PCR (ddPCR)

La ddPCR es una técnica cuantitativa que consiste en fraccionar el ADN a amplificar y los reactivos de la PCR en 20.000 gotas. Por tanto, en cada una de las gotas ocurrirán reacciones de PCR independientes entre sí, de manera que se consigue una mayor sensibilidad para la detección de eventos poco frecuentes en una muestra de partida. Asimismo, con esta técnica se consigue llegar a una cuantificación absoluta sin la necesidad de una recta patrón o genes normalizadores. En este trabajo se empleó esta técnica para el estudio de la metilación de *GRHL2* en líneas celulares y pacientes con CPNM tratados con ITQs de EGFR.

i. Diseño de sondas y cebadores

Para el diseño de cebadores y sondas, contamos con la ayuda del Departamento Técnico de Bio-Rad y el Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de Navarra. Se

diseñaron cebadores para amplificar en el promotor la región de interés de *GRHL2*, que contuviese la/s CpGs cuya metilación fuese objeto de estudio. También se diseñaron sondas de hibridación con fluorocromos (FAM o HEX) que nos permitiesen diferenciar entre CpG metilada o no metilada. Para el diseño de las sondas se tuvieron en cuenta las siguientes características:

- Longitud de los nucleótidos fueran de entre 20-22 nucleótidos.
- CpG de interés localizada en el centro de la sonda.

Se diseñó una sonda para la detección de la secuencia tras la conversión de bisulfito en el caso de tener la CpG metilada, que se marcó con FAM y también se diseñó una sonda con la misma región, solo que con la CpG sin metilar y marcada con HEX. Las sondas y los cebadores diseñados para *GRHL2* se encuentran en la Tabla 15.

Tabla 15. Cebadores y sondas utilizados en el análisis de metilación de *GRHL2* mediante ddPCR. En rojo se presentan las CpGs del análisis.

Gen		Secuencia (5'-3')
<i>GRHL2</i>	Primer Forward	GGTTTGTATTTTTAGTGAAAGAA
	Sonda Metilada	TTAGTTTTTTG CG AGAAAGTTATTTG
	Sonda No Metilada	TTAGTTTTTTG TG AGAAAGTTATTTGT
	Primer Reverse	TGTTTTGTGTTTGTATTGTTA

ii. Protocolo

Una vez obtenido el ADN convertido se pasó a realizar los siguientes pasos:

Preparación de la muestra

Tras realizar varios ajustes se partió de 50 ng totales de ADN genómico de los pacientes y 25 ng totales de ADN genómico de las líneas celulares, previamente convertido por bisulfito. Tras la conversión por bisulfito se preparó la siguiente mezcla por pocillo (Tabla 16):

Tabla 16. Reactivos utilizados para la técnica de ddPCR.

Reactivo	Cantidad
Sonda HEX (Bio-Rad)	1 μ L
Sonda FAM (Bio-Rad)	1 μ L
SuperMix ddPCR (noUTP) (Bio-Rad)	19 μ L
ADN convertido	Hasta 8 μ L
Agua libre de DNAsas	Hasta 8 μ L

Formación de gotas

Para la formación de gotas se empleó el QX200™ *Droplet Generator* (Bio-Rad). Se utilizaron cartuchos en los que se prepararon las muestras en tandas de 8 en 8, tal como se observa en la Figura 20.

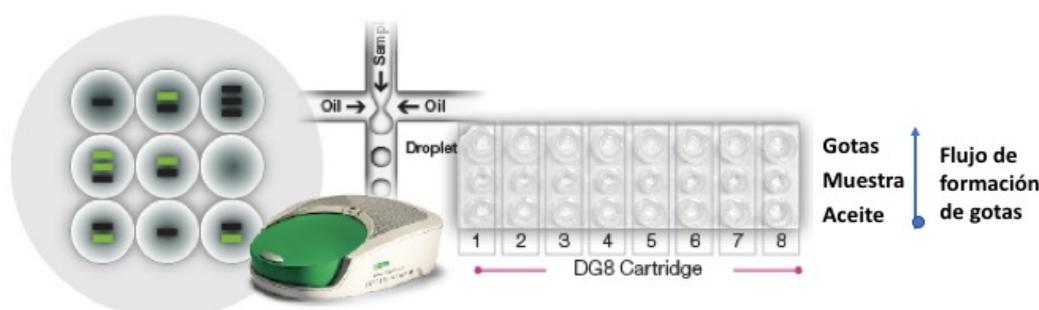


Figura 20. Cartucho empleado para la formación de gotas y orden de los componentes. Adaptada de <https://www.bio-rad.com>.

Los triplicados se realizaron en diferentes cartuchos para asegurarnos de que si algún cartucho fallaba tuviéramos muestra de todos los pacientes. En los pocillos inferiores se colocó el aceite generador de gotas (Bio-Rad), en los intermedios se añadió la muestra y gracias a la presión aplicada al cartucho, el aceite se dirigió hacia las muestras a través de unos capilares que se encuentran en el cartucho, generando micelas que acabarán pasando al pocillo superior formando las gotas de reacción. Las líneas celulares utilizadas como controles para la puesta a punto de la ddPCR fueron HCC827 y A549.

PCR

Se colocaron las gotas que se formaron en el paso anterior en una placa de 96 pocillos específica para ddPCR (Bio-Rad), esta placa fue sellada con aluminio para evitar que se evaporara la muestra y se sometió a las siguientes condiciones: 95°C durante 10

minutos; 40 ciclos de 94°C, 30 segundos y 55°C, 1 minuto; 98°C durante 10 minutos y finalmente hasta llegar a 4°C. La temperatura de *annealing* se fijó tras hacer un gradiente para cada pareja de cebadores empleados. Todos los pasos tuvieron lugar en un termociclador *C1000 Touch Thermal Cycler with 96-Deep Well Reaction Module* (Bio-Rad).

Lectura de gotas

Después de la amplificación de la muestra, se leyó la placa en el *QX200 Droplet Reader* (Bio-Rad) y se empleó para el análisis y la lectura el *software QuantaSoft™*, con el que se fijaron las condiciones del experimento. Se definió el marcaje de cada una de las sondas (HEX y FAM), se indicó el tipo de *SuperMix* utilizada (no dUTP) y se empleó la opción de RED (*Rare Event Detection*) para el análisis.

Cuantificación

La cuantificación se llevó a cabo con el *software QuantaSoft™*. Se descartaron aquellas muestras que no alcanzaron un mínimo de 7.000 eventos o gotas. En el resto de los casos, se fueron ajustando en cada pocillo las poblaciones positivas para FAM y para HEX.

A partir de ahí, se extrajeron los datos del número de gotas positivas para cada una de las sondas y se calculó el porcentaje de metilación de la muestra mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Gotas positivas FAM (Sonda metilada)}}{\text{Gotas positivas FAM (Sonda metilada)} + \text{Gotas positivas HEX (Sonda no metilada)}} \times 100$$

16. Experimentos con modelos animales

a. Animales

El manejo de los animales y procedimientos experimentales se realizaron según los requisitos estipulados por el real decreto 53/2013 sobre la protección de los animales de experimentación y otros fines científicos. En todo momento se siguieron las normas y recomendaciones del Comité de ética para el Bienestar Animal del Centro de Investigación Príncipe Felipe. Un total de 48 ratones desnudos atómicos (CrI:NU(NCr)-*Foxn1^{nu}*) se incluyeron en el estudio. Estos ratones presentan una mutación que les

confiere un timo disfuncional, por lo que son incapaces de producir linfocitos T competentes. Por ello, se emplean para generar modelos murinos portadores de tumores humanos, ya que aceptan la implantación de tejido humano, minimizando la posibilidad de rechazo del injerto por el huésped.

b. Inyección Subcutánea de células de CPNM en ratón

El ratón desnudo atímico (CrI:NU(NCr)-*Foxn1^{nu}*, Charles River) de 5-6 semanas se anestesió con Isoflurano (con una dosis inicial al 5% y una dosis de mantenimiento al 2.5%), se colocó en posición supina y se realizó una inyección subcutánea de 5×10^6 de células de CPNM (H1975 shNT, H1975 shGRHL2, H1975 AZDR y H1975 AZDR OEGRHL2) en un volumen de 200 μ l (medio libre de suero y Matrigel (1:1)) en la zona inguinal derecha. Una vez realizada la inyección, esperamos a que el ratón se despierte para volverlo a meter en la jaula. A partir de aquí se observa el crecimiento tumoral en el lugar de la inyección o alrededores, hasta alcanzar volumen de 1000 mm³. El tamaño tumoral se midió con un pie de rey tres veces por semana. Una vez que el tumor ha alcanzado las condiciones óptimas descritas, se administró Osimertinib (10 mg/kg) o vehículo de manera oral cada 2-3 días. Los ratones se eutanasiaron con dióxido de carbono (<70%) y se aislaron los tumores, los pulmones y el hígado para proceder a su estudio histológico y morfológico, histológico y molecular.

El osimertinib se diluyó según se detalla en la Tabla 17, basándose en los métodos de un trabajo previo de nuestro grupo (Pulido et al., 2020).

Tabla 17. Componentes y porcentajes necesarios para diluir osimertinib.

30% de Polietilenglicol (PC400)
5% de Tween 80
5% de DMSO
60% de H2O

Se administró el 10% del peso del ratón (aproximadamente 100 μ L) a una concentración de 10 mg/kg. Para llevar a cabo la dilución del fármaco, en primer lugar, se resuspendió el osimertinib en polvo en DMSO, seguidamente, se diluyó en Tween80 y a continuación

en PC400. En último lugar, se vorteo toda la mezcla para conseguir una completa disolución. Finalmente, se añadió el agua y se vorteo de nuevo.

c. Recogida de muestras

Una vez extirpado el tumor, éste se dividió en 4 fragmentos que se utilizaron como se describe a continuación:

- 1 fragmento se fijó con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 16 horas a 4°C.
- 1 fragmento se conservó en FBS+10% DMSO en N₂ líquido.
- 2 fragmentos (cada uno de ellos en un vial diferente) se congelaron en N₂ líquido y se conservaron a -80°C.

d. Fijación de los tejidos

Un fragmento del tumor, los pulmones y el hígado se lavaron 2 veces con PBS frío y se fijaron con PFA al 4% durante 16 horas a 4°C en agitación. A continuación, se realizaron 5 lavados de 10 minutos con PBS y se mantuvieron en PBS + 0.05% de azida sódica hasta el momento del análisis.

17. Muestras de pacientes

a. Análisis de biopsias tumorales

Las muestras de ADN total de biopsias de tejido tumoral para el análisis de la metilación de *GRHL2* procedían del biobanco de Hospital Universitario de la Ribera (Alzira) (n=30). Incluimos en el estudio pacientes con CPNM en estadios avanzados que habían recibido ITQs de EGFR como tratamiento único o en combinación con otros fármacos. Este estudio contaba con el consentimiento informado de los pacientes y había sido aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario de la Ribera.

La metilación de *GRHL2* se determinó mediante ddPCR a partir de ADN genómico, extraído de las muestras de parafina.

18. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado. Los datos se han expresado como la media \pm Desviación estándar (DS) calculados con Excel. Los análisis estadísticos (t-test, curvas de Kaplan-Meier...) se llevaron a cabo con el *software* GraphPad Prism.

Los datos obtenidos en los experimentos se analizaron a través de un análisis de la varianza *one-way* ANOVA y la homogeneidad de las varianzas se analizó mediante el test de *Turkey*. Se consideraron significativos aquellos datos con un p-valor menor que 0,05.

19. Análisis bioinformático

Los datos de epigenómica (Infinium Human Methylation 450K BeadChip) generados en nuestro laboratorio fueron procesados y analizados con las herramientas *Comparative Marker Selection* y *Gene-E* del paquete analítico Genepattern (disponible en <http://software.broadinstitute.org/cancer/software/genepattern>) mediante los test estadísticos signal2noise, t-test y corrección de múltiple testing mediante FDR según el método de Bonferroni (Benjamini et al., 2001).

Los datos de metilación se calcularon como valores *beta* (β -score) y con el mismo software se calculó la significancia estadística de las comparaciones (*DiffScore*) y la diferencia media de metilación (*Delta beta*) entre los grupos mediante t-test y corrección de múltiple testing mediante FDR según el método de Bonferroni. El análisis de enriquecimiento funcional de las firmas relacionadas con reguladores epigenómicos se llevó a cabo con la herramienta *EnrichR* (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>) (Kuleshov et al., 2016).

Los datos genómicos y epigenómicos de las líneas celulares de CPNM del proyecto CCLE (Broad Institute) y pacientes de CPNM (TCGA, NCI-NIH) fueron obtenidos a partir del CBioPortal (<https://www.cbioportal.org>) y analizados mediante una correlación de Pearson y corrección de *multiple testing* mediante FDR, y representados con el paquete analítico *Genepattern*.

Resultados y Discusión

1. Búsqueda de nuevos mecanismos epigenéticos de resistencia adquirida a los ITQs asociados a TEM

Este trabajo de tesis doctoral se inició con la generación de datos ómicos por parte de uno de mis co-directores en el Programa de Epigenética y Biología del Cáncer (PEBC) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Bellvitge (IDIBELL) en Barcelona y dirigido por el Dr. Manel Esteller. En concreto, se aprovecharon el desarrollo de las recientes técnicas de análisis masivo del transcriptoma y el epigenoma para identificar nuevas dianas sin sesgos previos mediante análisis integrativos. El estudio del epigenoma de líneas celulares de CPNM lo realizamos con la plataforma Infinium 450K, que permite conocer el estado de metilación en 450000 posiciones distintas. Se analizaron 1001 líneas celulares de cáncer humano, entre las que se encontraban 64 líneas de ACP para las cuales se estudio su comportamiento frente a un amplio espectro de fármacos. Nuestro grupo tuvo acceso a los datos de transcriptómica y de sensibilidad/resistencia (IC_{50}) para una gran batería de fármacos relacionados con el cáncer, que posteriormente fueron publicados en un artículo de investigación (Iorio et al., 2016).

Tras mi incorporación a la Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión (UBMP) del Instituto de Investigación Sanitaria la Fe (IIS La Fe) continué con este trabajo mediante el análisis bioinformático de los datos ómicos. Como se ha comentado en la sección de materiales y métodos, de todos los datos generados, nos enfocamos en el subconjunto de líneas celulares de CPNM mutadas en *EGFR*. Finalmente, se realizó un análisis que correlacionaba el estado de metilación de los genes (epigenómica) con la respuesta a 265 fármacos de estas líneas celulares seleccionadas de las que se obtuvo el valor de IC_{50} para cada uno de ellos. Poniendo especial interés en los ITQs de primera (gefitinib y erlotinib) y segunda (afatinib) generación que se administran a los pacientes con CPNM (Figura 21), del análisis de correlación obtuvimos un conjunto de 41 genes candidatos (Tabla 18) que presentaban metilación diferencial con respecto a la sensibilidad de estos fármacos.

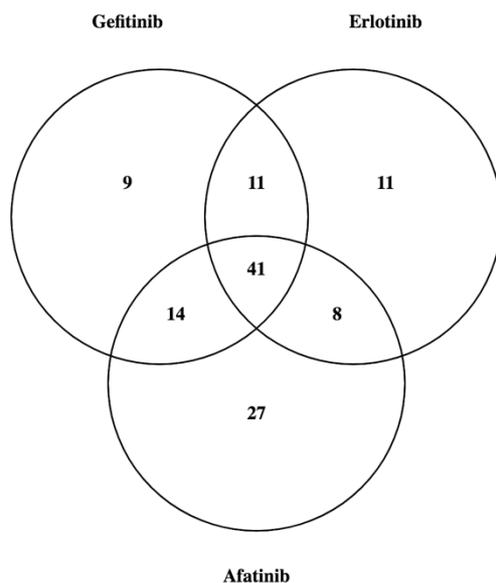


Figura 21. Diagrama de Venn extraído del análisis de respuesta a los ITQs de EGFR gefitinib, erlotinib y afatinib en líneas de CPNM.

Tabla 18. Listado de 41 genes comunes en el análisis de sensibilidad a gefitinib, erlotinib y afatinib en líneas celulares de CPNM.

Listado de los genes		
BATF	GPR56	RAB17
ADIRF	GRHL2	RAB38
KDF1	IL20RA	S100A2
CLDN4	IRS1	SPINT1
CLDN7	IVD	TMBIM1
DAPP1	JUP	TMEM154
DDO	LAD1	TMEM159
DEF6	LAMB3	TMEM40
DNAH3	MKRN3	TRIM61
DUSP4	MST1R	TRIP6
ESRP1	NAA11	UGT1A6
FAM83A	PKP3	ZNF256
FAM83H	PLEKHG3	ZNF750
GNA15	PVRL4	

En vista al listado de 41 genes comunes a aquellas líneas de CPNM sensibles a los ITQs de EGFR que obtuvimos, decidimos realizar un análisis en el que calculamos la evaluación de la superposición del listado de genes con la colección CGP (*Human MSigDB Collections*) para estudiar las rutas con las que podrían estar implicados estos genes (Tabla 19). El análisis muestra unas firmas comunes para la gran mayoría de los genes, que son de interés para seleccionar el biomarcador candidato con el que trabajar. La primera de estas firmas está vinculada a la TEM, seguidamente también detectamos otra ruta vinculada con la relación de los genes estudiados y el marcador epitelial CDH1, que tiene un gran papel en el mantenimiento del fenotipo epitelial de las células, otra de las firmas común a los 41 genes estudiados es la resistencia de estos genes a ITQs de EGFR como gefitinib y finalmente la relación de los marcadores de estudio con la metástasis. Los genes que más se relacionaron con estas rutas y en los que seguimos centrando nuestros análisis fueron *CLDN7*, *CLDN4*, *SPINT1*, *GRHL2*, *JUP*, *ESPR1* y *LAD1*, los cuales mostraban al menos relación con 6 de las firmas de la colección CGP en el análisis de la Tabla 19.

Tabla 19. Evaluación de la superposición del listado de 41 genes con la colección CGP, que incluyen conjuntos de genes que representan firmas de expresión de perturbaciones genéticas y químicas. Varios de estos conjuntos de genes vienen en pares, es decir, se representan genes inducidos (UP) y reprimidos (DN) por la perturbación.

ID del gen	Símbolo del gen	ONDER_CDH1_TARGETS_2_DN	HOLLERN_EMT_BREAST_TUMOR_DN	COLDREN_GEFITINIB_RESISTANCE_DN	CHARAFE_BREAST_CANCER_LUMINAL_VS_MESENCHYMAL_UP	WU_CELL_MIGRATION	JAEGER_METASTASIS_DN	KOINUMA_TARGETS_OF_SMAD2_OR_SMAD3	RICKMAN_TUMOR_DIFFERENTIATED_WELL_VS_POORLY_DN	MCBRYAN_PUBERTAL_BREAST_4_5WK_UP	LIM_MAMMARY_STEM_CELL_DN
1366	CLDN7										
1364	CLDN4										
6692	SPINT1										
79977	GRHL2										
3728	JUP										
11187	PKP3										
54845	ESPR1										
3898	LAD1										
4486	MST1R										
23682	RAB38										
27071	DAPP1										
55287	TMEM40										
10974	ADIRF										
9289	ADGRG1										
64284	RAB17										
6273	S100A2										
3914	LAMB3										
2769	GNA15										
81607	NECTIN4										
126695	KDF1										
286077	FAM83H										
79755	ZNF750										
84985	FAM83A										
26030	PLEKHG3										
64114	TMBIM1										
201799	TMEM154										
3712	IVD										
10538	BATF										
53832	IL20RA										
1846	DUSP4										
8528	DDO										
3667	IRS1										
55567	DNAH3										
54578	UGT1A6										
50619	DEF6										
84779	NAA11										
7681	MKRN3										
7205	TRP6										
57146	LDAF1										
391712	TRIM61										
10172	ZNF256										

Otro criterio de selección, para continuar con la detección del gen de interés, fue el estudio de la correlación de la metilación y la resistencia a los ITQs de EGFR (gefitinib, erlotinib y afatinib) de cada uno de estos genes, para ello realizamos un Volcano Plot (Figura 22) para mostrar aquellos genes con correlación más elevada entre la metilación y la sensibilidad a los ITQs de EGFR.

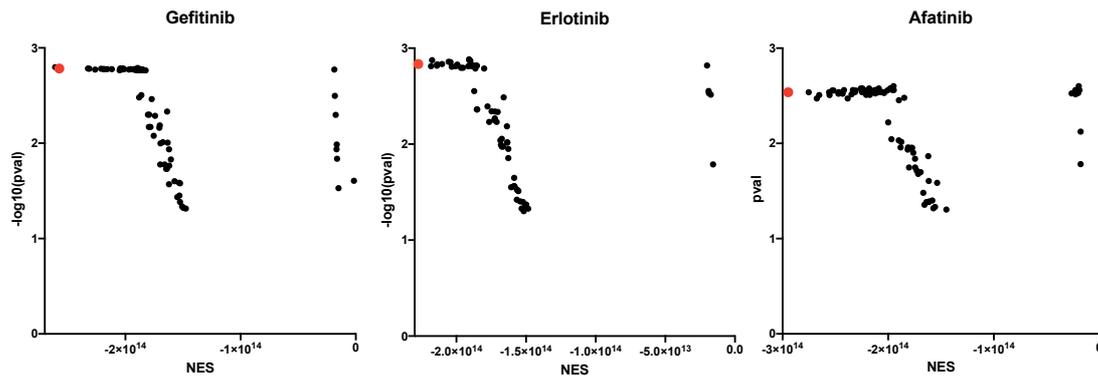


Figura 22. Volcano Plot de los genes comunes en el análisis de sensibilidad a gefitinib, erlotinib y afatinib en líneas celulares de CPNM, donde se muestra la correlación entre la metilación y la sensibilidad a los ITQs de EGFR. Se muestran aquellos genes con un p-valor < 0,05. En rojo se muestra *GRHL2*, hipometilado y sobreexpresado en las líneas sensibles a los ITQs de EGFR. NES (Normalized Enrichment Score).

En vista a los resultados obtenidos, observamos un gen que destaca en el Volcano Plot y que se encuentra entre los genes que seleccionamos tras el análisis de la Tabla 19. En la Figura 22 se puede observar que *GRHL2* (en rojo) es el gen que tiene la correlación más elevada entre la metilación de varias CpG de la región promotora de cada gen y la resistencia a los ITQs de EGFR. En este contexto, centramos nuestra atención en *GRHL2*. *GRHL2* (*Grainyhead Like Transcription Factor 2*), es un factor de transcripción que está involucrado en la embriogénesis y mantiene el estado epitelial de la célula en múltiples tejidos, además, también se ve alterado con la TEM en diferentes tipos de cáncer (como el cáncer de mama, ovario, hígado, sarcomas, entre otros). La función de *GRHL2* es compleja y controvertida actuando como potenciador o inhibidor tumoral, dependiendo del contexto y del tipo de cáncer en el que se estudie (Cieply et al., 2012; Xiang et al., 2012). Por esta razón se necesitan más estudios para descubrir cuál sería el papel del gen *GRHL2* en el CP.

En la Tabla 19, observamos que entre las rutas que aparecen en el estudio, destaca la vinculación de *GRHL2* con 6 de estas rutas vinculadas con la TEM, con la resistencia a gefitinib (que confirmamos con los datos plasmados del Volcano Plot, Figura 22), la relación de este factor de transcripción con la metástasis una vez reprimido el gen, y su vinculación con el mantenimiento del estado epitelial de la célula. La primera de las rutas con las que se relaciona *GRHL2* (Tabla 19), la explica Onder y sus colaboradores. En su estudio hipotetizaron que la pérdida epitelial *CDH1* desencadenaba en metástasis al producirse la pérdida de las uniones intercelulares (Onder et al., 2008). Para dar respuesta a su hipótesis, inhibieron la función de *CDH1* y concluyeron que la disminución de la molécula de adhesión epitelial conducía a la TEM en las células, adquiriendo un carácter más invasivo y características que permitían la evasión a la anoikis (muerte celular programada inducida por el desprendimiento de células de la matriz extracelular). Según la Tabla 19, *GRHL2* se relaciona con este punto del análisis, por tanto, debe mostrar una correlación positiva con *CDH1*, reprimiéndose cuando *CDH1* no se expresa. Por otro lado, la segunda ruta con las que se relaciona *GRHL2* tiene correlación con el estudio que realizaron Hollern et al, donde se discute que los subtipos histológicos de tumores mamarios de ratón revelan relaciones conservadas con cánceres humanos, para ello, en este ensayo se validaron firmas de expresión de TEM prediciendo en ratón eventos clínicos que sucedían en cáncer de mama humano (Hollern et al., 2018). Comprobaron que estas firmas de TEM también sucedían en otros tipos de cáncer como el escamoso de pulmón. Por tanto, según el análisis realizado en la Tabla 19, *GRHL2* también muestran relación con esta condición, por lo que tendrá una correlación negativa con la firma TEM, validada en el ensayo realizado por Hollern et al, reprimiéndose cuando los marcadores de TEM se encuentran activos. Coldren y sus colaboradores analizan la tercera ruta con la que se vincula a *GRHL2*, en su estudio utilizaron perfiles de expresión génica para predecir un patrón de expresión asociado con la sensibilidad a los ITQs de EGFR mediante la comparación de líneas celulares de CPNM que eran muy sensibles o resistentes al ITQ de primera línea, gefitinib (Coldren et al., 2006). Según la Tabla 19, *GRHL2* muestran similitud con este punto, ya que se encuentran en el conjunto de genes que tienen un patrón de expresión alto en líneas que son sensibles a gefitinib, por tanto, están reprimidos en las líneas que muestran

resistencia a gefitinib. La cuarta ruta con la que se relaciona a *GRHL2* en el análisis de la Tabla 19, la explica Charafe y sus colaboradores, que realizaron un estudio sobre la caracterización molecular de líneas celulares de mama para predecir nuevos marcadores basales potenciales para el cáncer de mama (Charafe-Jauffret et al., 2006). Estudiaron perfiles de expresión de genes y proteínas de 31 líneas celulares de cáncer de mama utilizando micromatrices de ADN de genoma completo e IHC. El agrupamiento jerárquico final discriminó dos grupos de líneas celulares, uno de líneas celulares luminales, y otro de líneas celulares basales y mesenquimatosas. La firma basal/luminal de las líneas de mama estudiadas sirvieron para identificar los subtipos moleculares, lo que sugiere que los marcadores identificados deberían ser útiles para la clasificación de tumores y podrían representar objetivos prometedores para el tratamiento de enfermedades. Como *GRHL2* muestra correlación con este punto (Tabla 19), estos datos sugieren que *GRHL2* se expresa en la firma que discrimina el grupo de líneas celulares luminales de las mesenquimales en cáncer de mama. Por otro lado, Jaeger y sus colaboradores plasmaron un perfil de expresión génica de melanomas primarios y metástasis de melanoma para comprender mejor los mecanismos moleculares de la progresión y metástasis del melanoma maligno (Jaeger et al., 2007), estos datos pertenecen a la quinta ruta con la que se vincula a *GRHL2*. El estudio concluyó con 308 genes que mostraban una expresión diferencial significativa entre los melanomas primarios y las metástasis de melanoma, identificando así marcadores que se relacionaban con el proceso de metástasis. En consecuencia, *GRHL2* debería poseer una baja expresión cuando se produce el proceso de metástasis. Finalmente, la última de las rutas con las que se relaciona a *GRHL2* viene explicada por Rickman y sus colaboradores, en su estudio analizaron la propensión a la metástasis a distancia en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Rickman et al., 2008). Para ello recopilaban datos de transcriptoma proporcionando una base para el desarrollo de firmas moleculares pronósticas, marcadores y dianas terapéuticas para la metástasis de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Por ende, como *GRHL2* se relaciona con este punto, debería encontrarse silenciado cuando el carcinoma de células escamosas de cabeza desarrolle metástasis. Respaldándonos en estos datos y para terminar de confirmar la selección de *GRHL2*, decidimos estudiar también el estado de metilación de

toda la isla promotora de CpG de este factor de transcripción y su relación con los valores de IC_{50} de los ITQs de EGFR (Iorio et al., 2016). La clasificación de las líneas celulares de CPNM basada en el valor de metilación promedio de todos los sitios CpG en la isla promotora de *GRHL2*, corrobora la asociación obtenida previamente entre el aumento de la quimiorresistencia a los a los ITQs de EGFR una vez hipermetilada la región del promotor del gen. En la Figura 23 se observa como el grupo de líneas celulares con el promotor *GRHL2* más metilado mostraron valores promedio de IC_{50} a afatinib significativamente más altos que el grupo de líneas celulares sensibles a este fármaco con *GRHL2* hipometilado. Además, al utilizar los datos transcriptómicos disponibles de la expresión del gen *GRHL2*, mostrados en esta figura, encontramos una asociación significativa entre la metilación del promotor CpG de *GRHL2* con niveles disminuidos de *GRHL2* (Figura 23). En este sentido, evaluamos la correlación negativa entre los valores de IC_{50} para la sensibilidad a los ITQs de EGFR, la expresión de *GRHL2* y la metilación del promotor de *GRHL2* (Figura 23).

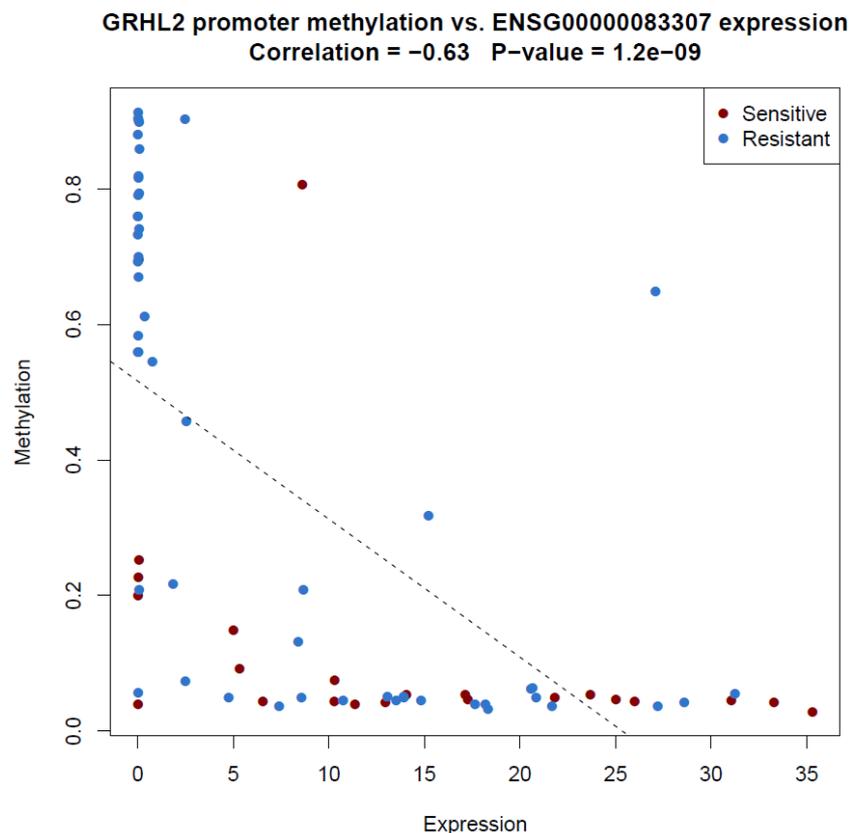


Figura 23. Análisis Pearson que representan la correlación entre los valores de metilación y expresión de *GRHL2* en líneas sensibles y resistentes a afatinib.

Por ello, en base a los resultados previamente descritos nos permitió la identificación de *GRHL2* como un posible biomarcador de respuesta a los ITQs de EGFR en el CPNM. Este gen presentaba en los estudios ómicos realizados su región promotora hipometilada y se sobreexpresaba a nivel de ARNm en líneas de CPNM sensibles a los ITQs de EGFR. Por ello, en esta tesis nos centramos en *GRHL2* como posible candidato para ser un buen predictor de quimiorresistencia en pacientes con CPNM, su papel en el CP y la relación con la resistencia a fármacos vinculada a TEM.

2. Validación de la regulación epigenética de la expresión de *GRHL2* mediante cambios en la metilación del ADN en su promotor en líneas celulares de CP

Para conocer si *GRHL2* se regulaba a nivel epigenómico, el primer paso fue estudiar los datos de metilación del promotor de *GRHL2* en dichas líneas celulares a partir del *microarray* 450K (Illumina) del estudio CURELUNG (Proyecto Europeo del programa FP7 de la Unión Europea, en el que participó uno de mis co-directores). Se realizó un *Heatmap* con dendograma con el fin de agrupar las líneas celulares de CP en función de su patrón de metilación (Figura 24). El análisis mostró la clasificación de los dos grupos de líneas celulares: el primero (HCC4006, HCC827 y H1975) con el promotor de *GRHL2* hipometilado y el otro grupo (NCI-H460, A549 y NCI-H1703), hipermetilado. Para corroborar estos resultados, se analizó la expresión del gen *GRHL2* mediante RT-qPCR en estos dos grupos y se confirmó que en las células donde el promotor estaba hipometilado la expresión era alta en comparación a las células que tenían *GRHL2* hipermetilado (Figura 25) cuya expresión era casi no detectable.

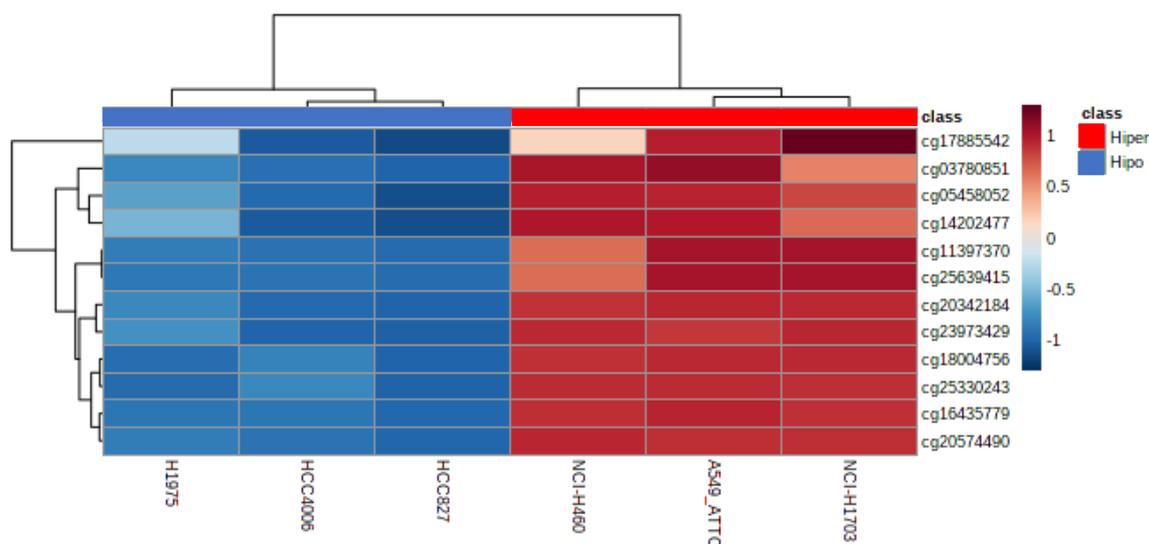


Figura 24. Estudio de la metilación del promotor de GRHL2 obtenidos a partir del array 450K en un panel de líneas celulares de CP del estudio CURELUNG. El color rojo hace referencia a una elevada metilación y el color azul indica una metilación baja.

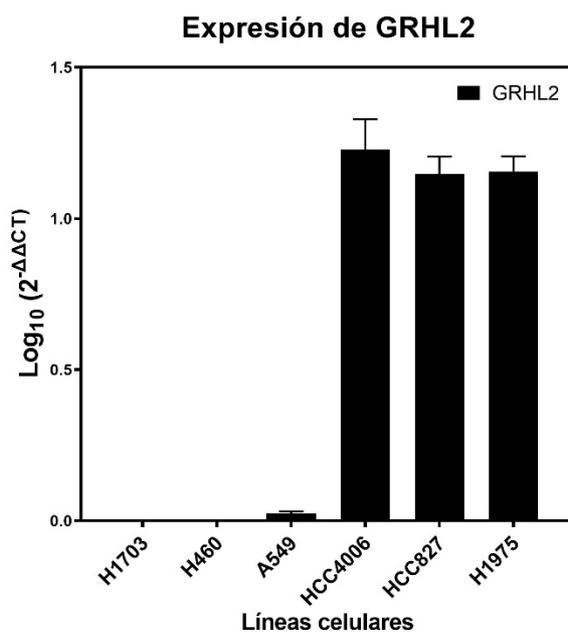


Figura 25. Estudio de la expresión de GRHL2 obtenidos de las líneas celulares estudiadas a partir del array 450K en un panel de líneas celulares de CP del estudio CURELUNG.

A continuación, se escogieron aquellas líneas celulares con el promotor de *GRHL2* hipermetilado y con baja expresión de *GRHL2* (NCI-H460, A549 y NCI-H1703) para poder determinar el efecto de la metilación sobre la actividad transcripcional de *GRHL2*. Para ello, se llevaron a cabo experimentos con 5-azacitidina (un agente desmetilante), durante 48 horas a 2 y 4 μM . La expresión de *GRHL2* se analizó en dichas líneas mediante

RT-qPCR (Figura 26), observándose una re-expresión de dicho gen tras el tratamiento con 5-aza, confirmando de este modo que este factor de transcripción se regula mediante cambios epigenéticos en su promotor.

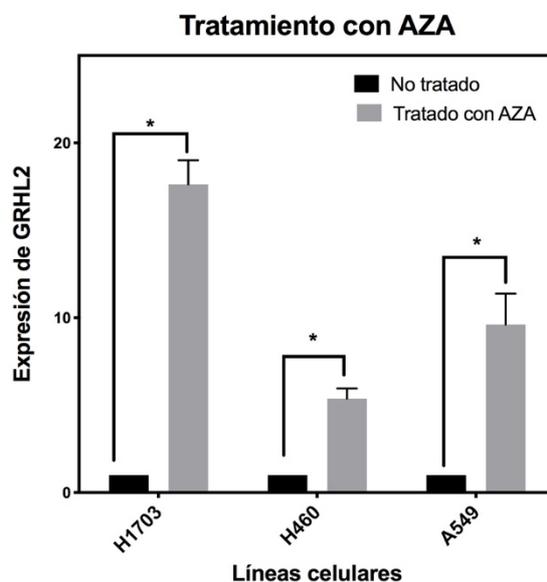


Figura 26. Cuantificación de la expresión de GRHL2 a nivel de ARNm mediante RT-qPCR tras el tratamiento con el agente desmetilante 5-aza.

Diferentes artículos mencionan la implicación de *GRHL2* en mecanismos epigenéticos en queratinocitos (Chung et al., 2019) y diferentes tipos de cáncer (ovario, mama, leucemia y sarcomas (Bai et al., 2022; Chung et al., 2016, 2019; Hua et al., 2022; Rhee et al., 2013; Somarelli et al., 2016)). Concretamente, en cáncer de mama se ha discutido recientemente que la expresión de *GRHL2* podría regularse por metilación (Bai et al., 2022; Rhee et al., 2013). En cáncer de ovario, se ha descrito como el silenciamiento de *GRHL2* se asocia con una ganancia en la metilación del gen (Chung et al., 2016, 2019). En leucemia también se ha definido recientemente como la expresión de *GRHL2* se ve regulada por la metilación, afectando en este caso al pronóstico de la enfermedad (Hua et al., 2022). Finalmente, también se ha estudiado la metilación de *GRHL2* en sarcomas siendo más alta en células con carácter mesenquimal (Somarelli et al., 2016). Para el CPNM existen pocos artículos en los que al evaluarse el perfil de metilación del ADN se mencione a *GRHL2*, aun así, Walter y su equipo en 2012, estudiaron el perfil de metilación de líneas de CPNM con fenotipo epitelial y mesenquimal, y mencionaron que

entre los genes metilados en las líneas con fenotipo mesenquimal se encontraba *GRHL2* (Walter et al., 2012). También, recientemente, Galle y sus colaboradores destacaron la metilación de una firma de marcadores de TEM, entre los que se encontraba *GRHL2* que se relacionaban con una posible predicción de resistencia a tratamientos (Galle et al., 2020). En conjunto, relacionando la bibliografía con nuestros resultados, todos estos datos muestran la relevancia del grado de metilación del promotor en *GRHL2* sobre su expresión, por lo que podemos decir que *GRHL2* se regula por metilación.

3. Correlación de la expresión de GRHL2 con los marcadores de la TEM en líneas celulares de ACP

A nivel molecular, el fenotipo TEM es consecuencia de la expresión diferencial de un complejo programa transcripcional. Dada la relación de *GRHL2* con el mantenimiento epitelial de la célula, nos preguntamos si la expresión de *GRHL2* correlacionaba positiva o negativamente con la expresión de los genes epiteliales o mesenquimales, respectivamente, en algunas de las bases de datos de información genómica disponibles actualmente. Para ello extrajimos los datos de la CCLE y calculamos el coeficiente de correlación de Pearson entre la expresión de *GRHL2* y el resto de los genes epiteliales y mesenquimales y el p-valor ajustado en todas las líneas anotadas como adenocarcinoma de pulmón (Figura 27).

Los datos observados en la Figura 27 muestran una correlación positiva entre la expresión de *GRHL2* y los marcadores epiteliales y negativa con los mesenquimales. Así, en la línea A549 (KRAS mutada), cuyo fenotipo es mesenquimal, caracterizada por valores elevados de marcadores mesenquimales como *VIM* o *ZEB1* y bajos de marcadores epiteliales como *CDH1* y *CDS1*, también muestra valores bajos de *GRHL2*. Por el contrario, otras líneas celulares con un marcado fenotipo epitelial como HCC4006 (EGFR mutado) presentan niveles elevados de expresión de *CDS1* y *CDH1*, así como de *GRHL2*, mientras que los niveles de marcadores mesenquimales como *NNMT*, *VIM* o *ZEB* se encuentran disminuidos. Por tanto, analizando estos datos genómicos en su conjunto, y revisando diferentes artículos científicos que comentan la relación de *GRHL2* con el mantenimiento del fenotipo epitelial de la célula (Chung et al., 2016; Shen et al., 2020a; Walter et al., 2012), podemos afirmar que la expresión de *GRHL2* puede estar asociada al fenotipo TEM en modelos *in vitro* de CPNM.

4. Caracterización de modelos celulares de cáncer de pulmón con *EGFR* mutado resistentes a los ITQs de EGFR

Como hemos comentado, uno de los problemas en el tratamiento de pacientes con cáncer es el desarrollo de resistencias a los fármacos quimioterapéuticos. Hay casos en los que la resistencia es innata (por ejemplo, en el CPNM, aquellos pacientes que no están dirigidos por mutaciones EGFR no responden a los ITQs), y otros en los que la resistencia se adquiere con el tiempo y la exposición al fármaco, debido a la presión selectiva que realiza la terapia farmacológica. La presión selectiva consigue, al inicio del tratamiento, seleccionar clones minoritarios en la población del tumor que terminan formando la población principal, o bien conforma la aparición de mutaciones *de novo* y adaptaciones fenotípicas del tumor a lo largo de la exposición al fármaco.

Con el fin de estudiar el papel funcional de *GRHL2* en el CP relacionado con la adquisición de resistencia a los ITQs de EGFR (primera, segunda y tercera generación) vinculada a la TEM, utilizamos tres modelos de estudio *in vitro* de resistencia adquirida a diferentes ITQs de EGFR. Estos modelos celulares fueron generados en nuestro laboratorio a partir de líneas comerciales de CPNM humano que muestran una sensibilidad innata a estos

ITQs, debido a su potente adicción oncogénica. Las líneas celulares de las que partieron los modelos de resistencia fueron, HCC4006 y HCC827 que contienen la delección del exón 19 y son sensibles a los ITQs de primera y segunda generación. Por otra parte, también se estableció un modelo de resistencia con la línea celular H1975 utilizando el inhibidor de tercera generación osimertinib. La línea celular H1975, al presentar la mutación T790M del exón 20 es resistente a los inhibidores de 1ª y 2ª generación, pero es sensible al osimertinib. El modelo de resistencia se estableció cultivando las células con concentraciones progresivas de los ITQs, comenzando con concentraciones subletales de 50 nM hasta alcanzar 10 µM, momento en el cual se consideraron resistentes a gefitinib (HCC4006 GeR), erlotinib (HCC827 ER23) y osimertinib (H1975 AZDR) (Figura 28) (Soucheray et al., 2015).

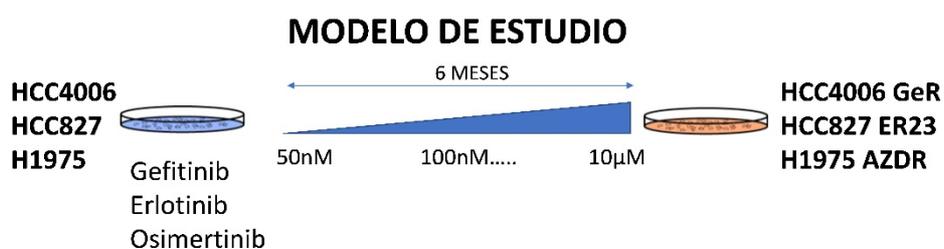


Figura 28. Modelos de estudio in vitro de resistencia adquirida a los ITQs de EGFR llevados a cabo en nuestro laboratorio.

Una vez obtenidas las células resistentes a los ITQs, caracterizamos los modelos celulares a nivel de resistencia y sensibilidad a los fármacos, estudiamos los niveles de expresión y el estado de metilación del promotor de *GRHL2* y analizamos los marcadores relacionados con la TEM en nuestros modelos de resistencia y sensibilidad.

Tal y como muestra la Figura 29, en los tres casos la curva se desplaza hacia la derecha mostrando resistencia a los ITQs de EGFR. Con este tipo de gráficas podemos obtener la IC_{50} para cada línea que se muestra resumido en la Tabla 20.

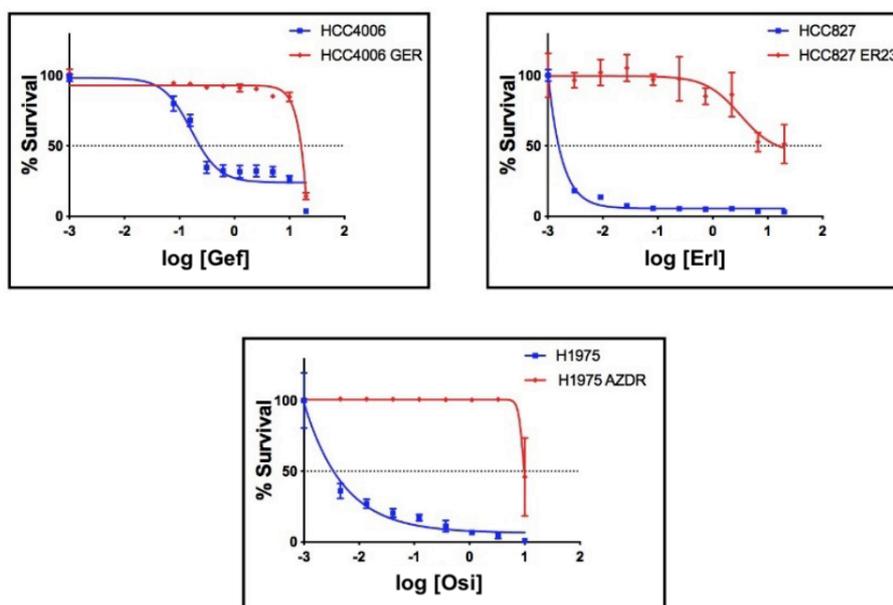


Figura 29. Curvas de citotoxicidad de las líneas celulares de CPNM con EGFR mutado sensibles y sus versiones resistentes. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control \pm desviación estándar (n=6).

Tabla 20. Valores aproximados de IC_{50} de las líneas celulares de CPNM con EGFR mutado sensibles y sus versiones resistentes, obtenidas de las curvas de citotoxicidad a corto plazo obtenidas en la Figura 29.

	HCC4006	HCC4006-GeR	HCC827	HCC827-ER23	H1975	H1975-AZDR
IC_{50} (μ M)	<0,004	>10	<0,041	>10	<0,004	>10

Una vez comprobada la resistencia, estudiamos los valores de metilación del promotor de *GRHL2* y de expresión en los tres modelos de resistencia, que se obtuvieron a partir del *microarray* 450K (Illumina), realizado en un trabajo previo por nuestro grupo. Mostrando que las líneas celulares sensibles presentan el promotor de *GRHL2* no metilado en los tres casos, mientras que sus versiones resistentes lo muestran hipermetilado (Figura 30). Por tanto, decidimos comprobar si al desmetilar el promotor utilizando el agente desmetilante 5-aza a concentraciones de 2 y 5 μ M durante 72 horas, se revertía la expresión de *GRHL2*. La expresión de *GRHL2* se analizó en dichas líneas mediante RT-qPCR (Figura 31), y se contrastaron los resultados con un gel de agarosa del producto obtenido en la RT-qPCR, observándose un aumento de expresión de dicho gen tras el tratamiento con 5-aza.

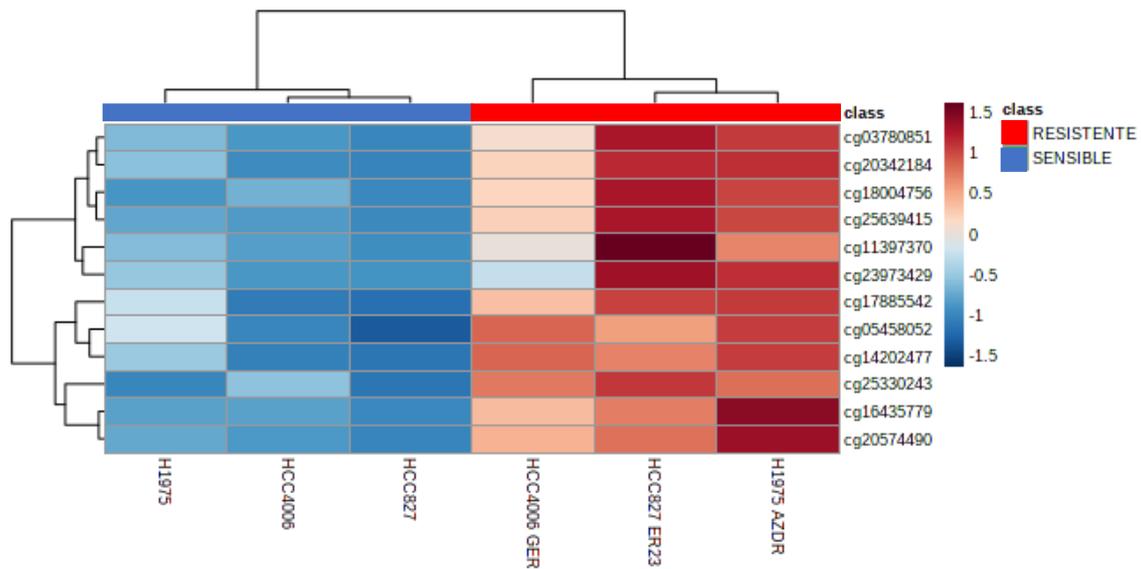


Figura 30. Estudio de la metilación del promotor de GRHL2 de las líneas celulares de CPNM con EGFR mutado sensibles y sus versiones resistentes. El color rojo hace referencia a una elevada metilación y el color azul indica una metilación baja.

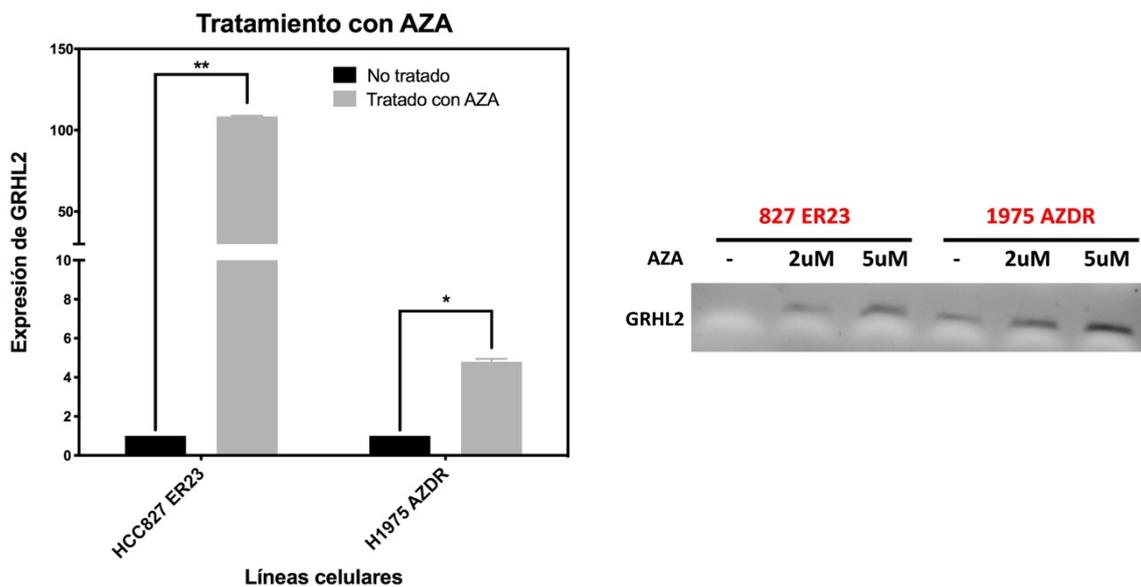


Figura 31. Cuantificación de la expresión de GRHL2 a nivel de ARNm mediante RT-qPCR y gel de agarosa tras el tratamiento con el agente desmetilante 5-aza.

Una vez comprobada la regulación epigenética de GRHL2, nos propusimos cuantificar en las líneas sensibles y resistentes la expresión de GRHL2 mediante RT-qPCR, así como de varios marcadores epiteliales y mesenquimales. La Figura 32 es un heatmap donde están reflejados los genes analizados, cuyos valores están referenciados a la línea sensible (con valor 1) y normalizados respecto a la B-actina. Como se puede observar,

GRHL2 es prácticamente indetectable en las líneas resistentes. Del mismo modo, comprobamos la expresión de proteínas de las líneas celulares mediante *western blot*, tal como muestra la Figura 33, *GRHL2* solamente se observaba en las líneas sensibles, siendo prácticamente indetectable en sus versiones resistentes.

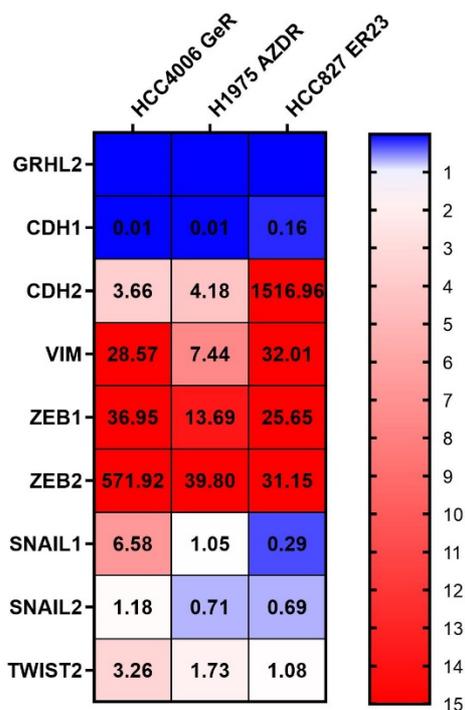


Figura 32. Marcadores TEM de las líneas sensibles y resistentes a ITQ. Se utilizaron ARNm de las líneas celulares y se analizó mediante qPCR. Valores normalizados a cada una de las líneas celulares de CPNM con EGFR mutado sensibles. El color rojo hace referencia a una elevada expresión y el color azul indica una expresión baja.

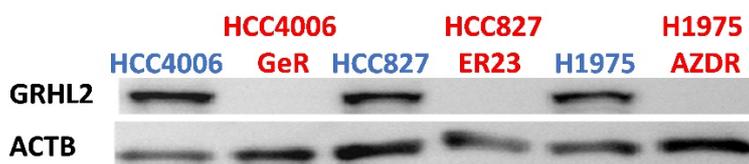


Figura 33. Expresión de GRHL2 en las líneas celulares de CPNM con EGFR mutado sensibles y sus versiones resistentes. Se utilizaron extractos proteicos y mediante western blot se determinaron las proteínas GRHL2 y β actina (ACTB) como control de carga. La imagen corresponde a un experimento representativo de 3 similares.

Estos modelos celulares de resistencia, a pesar de mostrar características individuales, comparten un rasgo común, y es la pérdida de sus características epiteliales, mostrando un metaestado mesenquimal, que se caracteriza por una reprogramación transcripcional que causa la represión de *CDH1* e inicia la sobreexpresión de proteínas propias del linaje mesenquimal (*VIM* y *CDH2*), y a su vez de factores de FTs-TEM (*ZEB1*, *ZEB2* y *SNAIL*), que se unen al promotor de *CDH1* y reprimen su expresión (Figura 32). Este proceso da lugar a la remodelación del citoesqueleto, provocando un cambio de morfología de las células similar la de los fibroblastos (Figura 16), una forma mucho más alargada, con una aparente pérdida de las uniones intercelulares. Fijándonos en la expresión y metilación de *GRHL2* en las líneas sensibles (epiteliales) y en las resistentes (mesenquimales) a los ITQs de EGFR, observamos una diferencia de expresión de *GRHL2* entre las líneas sensibles epiteliales y las líneas resistentes mesenquimales, mostrándose en estas últimas una ausencia de la expresión y una mayor metilación de *GRHL2*. Con estos resultados confirmamos que la expresión de *GRHL2* se regula por metilación y por ende se asocia a la disminución de su expresión. Además, este gen se encuentra expresado únicamente en el grupo de células con fenotipo epitelial, como ya se había descrito en otras líneas mesenquimales y epiteliales de CPNM (Walter et al., 2012), por lo que debemos estudiar su implicación en el mantenimiento del fenotipo epitelial de las células, que podría ser similar a la de *CDH1*. Onder y sus colaboradores, hablaron del papel que tiene la represión de *CDH1* mediante shRNAs (*Short hairpin RNA*) específicos, este silenciamiento confiere a las células un estado TEM irreversible (Fang & Kang, 2021; Onder et al., 2008) y lo que es más importante, resistente a los ITQs de EGFR. Por lo que fijándonos en el bloqueo de la expresión de *GRHL2* que aparece cuando las líneas celulares adquieren resistencia, y en vista de los resultados analizados en los apartados anteriores, suponemos que *GRHL2* tendrá una implicación en la adquisición de resistencia de estas líneas celulares similares a la de *CDH1*. Además cabe destacar que la inducción de la TEM se detecta principalmente por la identificación de un cambio fenotípico que afecta a la morfología de la célula (Suda et al., 2011), la Figura 16, en materiales y métodos, mostró imágenes representativas de los cambios morfológicos asociados al fenotipo TEM en las células que adquirieron resistencia a los ITQs. De este modo, gracias al estudio multidimensional realizado identificamos *GRHL2* como un gen

sometido a una regulación epigenética, y lo que es más importante, con unos niveles de proteína constitutivamente elevados en todos los modelos epiteliales analizados (Figura 30). Además, el hecho de que se haya descrito a GRHL2 como un importante regulador del mantenimiento epitelial de la célula (Walter et al., 2012) hacen de esta proteína un candidato ideal para la fase de validación.

5. Análisis funcional de la relación entre GRHL2 y la TEM

Como se ha comentado anteriormente, existe una relación directa entre la ausencia de GRHL2 y la activación de la TEM (Chung et al., 2016; Shen et al., 2020a; Walter et al., 2012). Este mismo efecto nosotros lo hemos observado en el apartado 4: al someter a las células a la presión de un ITQ de EGFR, que induce un fenotipo mesenquimal, la expresión de GRHL2 disminuye drásticamente. De esta manera, el siguiente paso era evaluar si el silenciamiento de *GRHL2* era una asociación o un agente puntual de la resistencia a los ITQs de EGFR y por ende un gen clave en el fenotipo TEM. Para dar respuesta a estas hipótesis se generaron dos modelos celulares de trabajo. En primer lugar, se reprimió el ARNm endógeno infectando las líneas parentales ITQ-sensibles con lentivirus que contenían secuencias de interferencia para GRHL2. De manera similar y, en segundo lugar, se sobreexpresó ectópicamente la proteína GRHL2 infectando las líneas ITQ-resistentes con lentivirus donde se había clonado la región codificante de GRHL2 (Tabla 21). Tanto para el silenciamiento como para la sobreexpresión, siempre se infectaron las células con un vector control.

Tabla 21. Líneas celulares establecidas donde se moduló la expresión de la proteína GRHL2.

Silenciamiento de GRHL2		Sobreexpresión de GRHL2	
HCC4006	HCC4006 shNT	HCC4006	HCC4006 GeR
	HCC4006 shGRHL2	GeR	HCC4006 GeR OEGRHL2
HCC827	HCC827 shNT	HCC827	HCC827 ER23
	HCC827 shGRHL2	ER23	HCC827 ER23 OEGRHL2
H1975	H1975 shNT	H1975	H1975 AZDR
	H1975 shGRHL2	AZDR	H1975 AZDR OEGRHL2

Para llevar a cabo el **silenciamiento** de GRHL2, en un primer momento se infectaron las células HCC4006 con 5 secuencias diferentes de shRNA diseñadas contra diferentes regiones del ARNm de GRHL2 por el *RNAi Consortium* (Root et al., 2006). Para establecer cuál era la secuencia capaz de reprimir la proteína de la manera más eficaz, se analizaron sus niveles por *western blot*. En la Figura 34A se observa como no hay apenas diferencias entre las células control (shNT) y la secuencia A, la represión es mínima con la secuencia B y E, algo mayor con la secuencia D, y mucho más alta con la secuencia C. En los siguientes experimentos utilizamos las células estabilizadas con esta última secuencia, que en adelante se denominará HCC4006 shGRHL2. Con el fin de extender estas observaciones a otro contexto celular, esta secuencia de silenciamiento también se utilizó para generar las líneas estables HCC827 shGRHL2 y H1975 shGRHL2. En la Figura 34B se estudiaron los marcadores TEM en las líneas HCC4006, HCC827 y H1975 (shNT y shGRHL2). Se puede observar que además de que la secuencia C tiene un buen nivel de represión de la proteína GRHL2 en comparación con la secuencia control (shNT), además, como vemos en la Figura 34B, la secuencia C tiene una re-expresión aceptable de la proteína mesenquimal VIM, así como niveles reprimidos del marcador epitelial CDH1 en las tres líneas celulares.

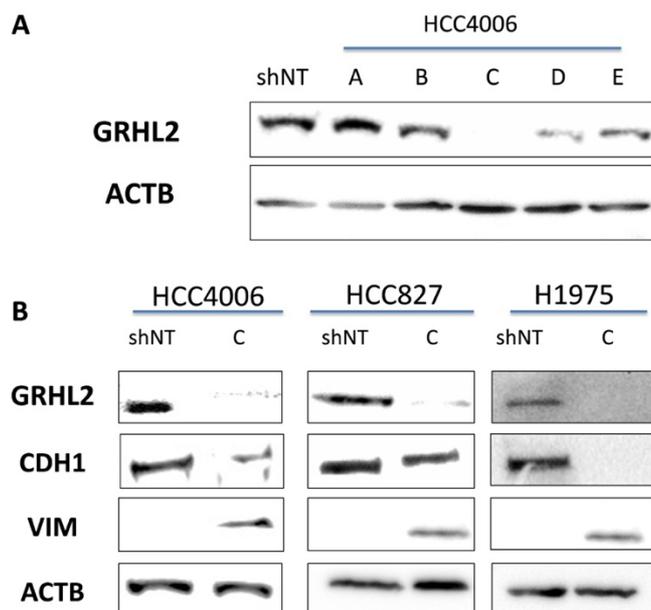


Figura 34. Silenciamiento de GRHL2 mediante la infección lentiviral de 5 secuencias de shRNA.

A. Análisis de la expresión de la proteína GRHL2 mediante western blot en los extractos protéicos de células HCC4006 infectadas con las distintas secuencias de silenciamiento. B. Análisis de la expresión de CDH1, VIM y GRHL2, mediante western blot, en los extractos protéicos de las líneas celulares HCC4006, HCC827 y H1975 infectadas con la secuencia C de silenciamiento. En ambas imágenes se empleó ACTB como proteína de expresión constitutiva para normalizar la carga (n=3, siendo n el número de réplicas realizadas).

En cuanto a la relación entre los niveles de expresión de GRHL2 y la proliferación celular, en la Figura 35 podemos observar como el silenciamiento de GRHL2 en los modelos celulares HCC4006, HCC827 y H1975 (shNT y shGRHL2) supone una ligera disminución de la tasa de crecimiento, un efecto previsible teniendo en cuenta el arresto celular que produce la activación de la TEM en múltiples tipos celulares (Ribatti et al., 2020; Xue et al., 2019).

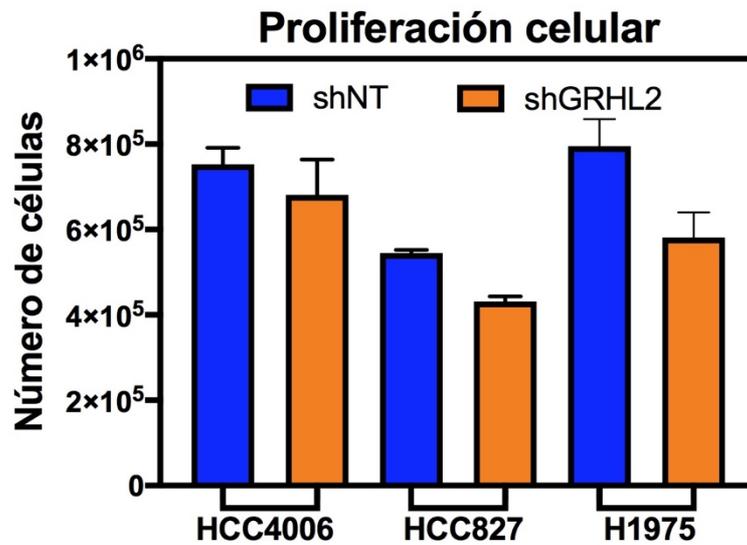


Figura 35. Impacto sobre el crecimiento celular tras la modulación de la expresión de GRHL2 en el modelo celular HCC4006, HCC827 y H1975. Para el cálculo de la tasa de proliferación las líneas celulares fueron sembradas en placas de 6 pocillos y tras 48 horas se contaron mediante el método de exclusión del azul tripán (n=6).

Debido a la importancia de la proteína de adhesión celular CDH1 para mantener el fenotipo epitelial de la célula, analizamos mediante microscopía confocal y anticuerpos fluorescentes los niveles y la localización celular no solo de CDH1, sino también de VIM y del propio GRHL2 en las líneas silenciadas (Figura 36). En la línea celular HCC4006 shNT y H1975 shNT podemos observar una elevada expresión de la proteína CDH1, que define claramente las uniones intercelulares de las células, al igual que se aprecia una elevada expresión de GRHL2, estando expresado a niveles mucho menores el marcador mesenquimal VIM. Al contrario, para las líneas silenciadas HCC4006 shGRHL2 y H1975 shGRHL2, observamos la disminución de sus niveles citoplasmáticos que se correlaciona además con la aparición de fibras de VIM también citoplasmáticas y una disminución en la intensidad de los tabiques intercelulares definidos por la presencia de CDH1.

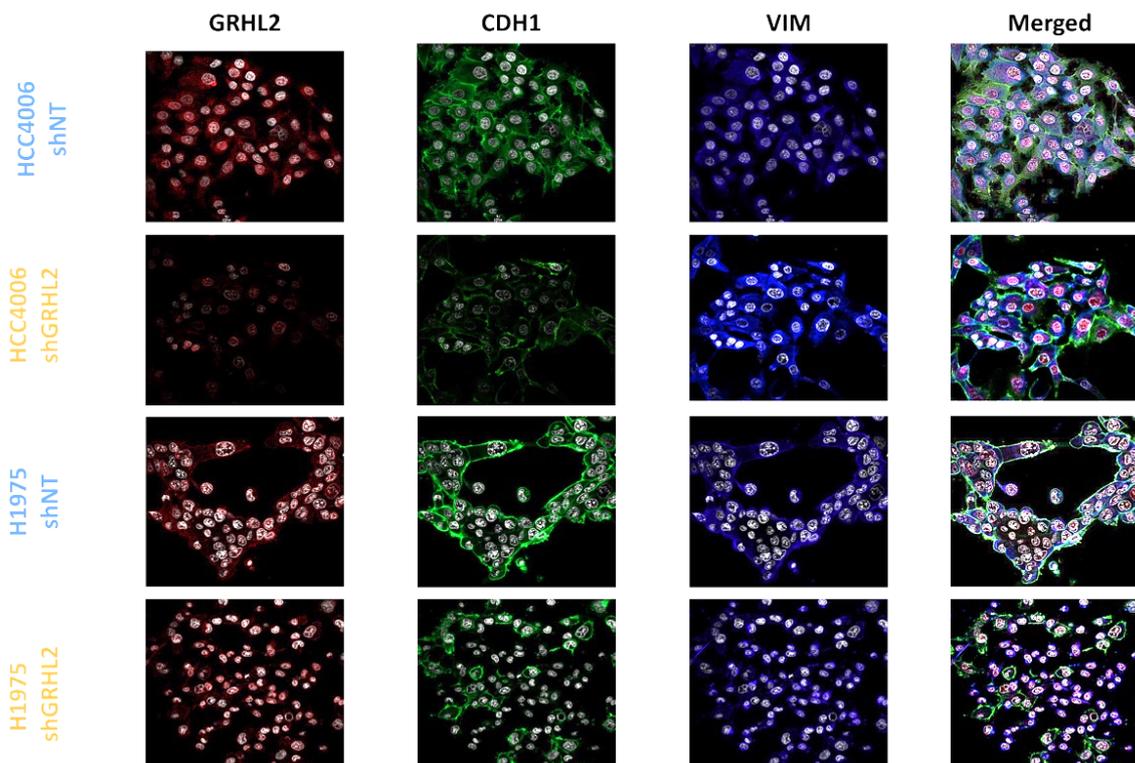


Figura 36. Inmunofluorescencia de marcadores TEM y GRHL2 en el modelo HCC4006 y H1975 (shNT y shGRHL2). Las diferentes líneas celulares se sembraron sobre cubreobjetos en placas de 24 pocillos y tras 48h se fijaron con paraformaldehído al 4%. Los núcleos aparecen en blanco tras marcaje con Hoechst-33342, GRHL2 en rojo, CDH1 en verde y VIM en azul tras el marcaje con anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor® 488, 546 y 633 respectivamente. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal (40X).

Por otro lado, quisimos comprobar mediante RT-qPCR los niveles de ARN mensajero en las líneas HCC4006, HCC827 y H1975 (shNT y shGRHL2), tanto de GRHL2 como de los marcadores epiteliales y mesenquimales. En las Figuras 37 y 39, los valores están referenciados a la línea celular sensible (Figura 37) o resistente (Figura 39) que adquieren valor 1 y están normalizados a los valores de la beta-actina. En la Figura 37 se puede observar que los genes epiteliales, *GRHL2* y *CDH1*, disminuyen drásticamente.

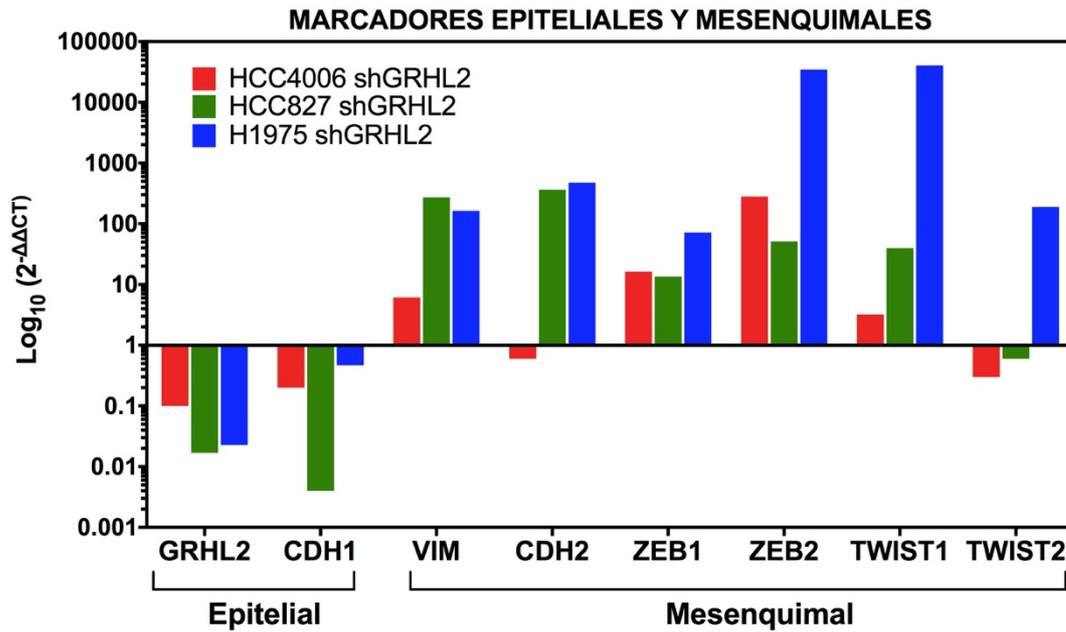


Figura 37. Expresión de GRHL2 y marcadores TEM a nivel de ARNm en el modelo de silenciamiento de GRHL2. Se emplearon extractos de ARN que se retrotranscribieron a ADNc y por RT-qPCR se determinaron los niveles de GRHL2 y los marcadores TEM, además de ACTB como control de carga en las líneas shNT y shGRHL2, los datos están expresados en \log_2 del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de la línea shGRHL2 comparada con la shNT (n=3). Ciclo umbral (CT).

La observación que GRHL2 modula transcripcionalmente a *CDH1* ha sido ya descrita por otros autores en otros cánceres. En células de cáncer de ovario, se ha descrito que GRHL2 es un regulador crucial en el mantenimiento del fenotipo epitelial (Chung et al., 2016). Observaron que al deplecionar *GRHL2* en este tipo de células, producía disminución de los genes epiteliales *CDH1* y *CLD4*, alterando así la TEM incluyendo un aumento en la migración y en la invasión celular. En un estudio más reciente del mismo grupo de investigación (Chung et al., 2019) quisieron estudiar la remodelación epigenética en el mismo modelo en el que habían deplecionado GRHL2, pero de forma más global ya que integraron análisis de metilación, secuenciación de ChIP de cinco marcas de histonas (H3K4me1, H3K4me3, H3K27Ac, H3K27me3 y H3K9me3) y el perfil transcriptómico. Demostraron que los genes epiteliales, como *CDH1*, estaban sujetos a un control epigenético durante las fases intermedias de TEM/TME que involucraban a GRHL2. En cáncer de mama, también se ha observado este papel regulador positivo de GRHL2 sobre *CDH1* (Cieply et al., 2012; Werth et al., 2010; Xiang et al., 2012). Weth y sus colaboradores demostraron que GRHL2 mecanísticamente se asociaba con elementos reguladores cis en el intron2 del gen *CDH1*. Por otra parte, la expresión

estable de GRHL2 en las células mamarias mesenquimales HMLE (Cieply et al., 2012) y en células 4T1 inoculadas a ratones (Xiang et al., 2012), aumentaba significativamente la expresión de CDH1.

Por otra parte, con respecto a los marcadores mesenquimales, detectamos un aumento de los factores de transcripción ZEB1 y ZEB2 (Figura 37), tal y como esperábamos, ya que artículos describen que ZEB1 es capaz de reprimir la expresión de *GRHL2*, a través de la interacción directa con el promotor de *GRHL2*, pudiendo inducir así la TEM en otros tipos de cáncer (Cieply et al., 2013). Por otra parte, se ha descrito un ciclo de retroalimentación recíproco crítico entre GRHL2 y ZEB1, de modo que en líneas celulares de cáncer de ovario (Chung et al., 2016), carcinoma colorrectal (Quan et al., 2014) y cáncer de mama (Werner et al., 2013), se ha encontrado que los niveles de expresión de GRHL2 y ZEB1 se correlacionan inversamente. Esta relación está mediada, al menos parcialmente, por la represión directa de GRHL2 del promotor *ZEB1*, como se demuestra a través del ensayo CHIP (Cieply et al., 2012). Finalmente, también observamos un aumento de los valores mesenquimales de VIM, así como de los factores de transcripción TWIST1 y TWIST2. El aumento de estos marcadores mesenquimales ha sido ya descrito por otros autores en otros cánceres. En células de cáncer de ovario, se ha descrito que el silenciamiento de GRHL2 se asocia a un aumento del marcador mesenquimal VIM, ligado a una disminución del marcador epitelial CDH1 que provoca en las células una TEM parcial (Chung et al., 2019). Asimismo se ha observado en células de cáncer de vejiga, como el silenciamiento de GRHL2 provocaba un aumento de los niveles de VIM, así como la sobreexpresión de GRHL2 se veía ligada a una disminución del marcador mesenquimal VIM, regulando el proceso de TEM y de TME (Shen et al., 2020b). Del mismo modo, en células de cáncer de mama se ha observado, al igual que en los casos anteriores, como el silenciamiento de GRHL2 provocó un incremento de los niveles de VIM, indicando que la caída de GRHL2 conducía a que las células se sometieran a cambios de la TEM, en este caso además también se vieron aumentados los niveles del marcador mesenquimal TWIST, observándose unas células con carácter mesenquimatoso (Xiang et al., 2012). Reafirmando de nuevo que la disminución de GRHL2 provoca una alteración en el mantenimiento epitelial de la célula, disminuyendo

los niveles de CDH1 y aumentando los niveles de marcadores mesenquimales, pudiendo promover por tanto la TEM.

Para llevar a cabo **la sobreexpresión de GRHL2**, de forma similar, realizamos la sobreexpresión ectópica de la proteína GRHL2 infectando las líneas ITQ-resistentes con lentivirus donde se había clonado la región codificante de GRHL2. Realizamos la sobreexpresión en las líneas resistentes HCC4006 GeR, HCC827 ER23 y H1975 AZDR. En la línea HCC4006 GeR no conseguimos establecer una sobreexpresión adecuada de GRHL2, por lo que el resto de experimentos de sobreexpresión se realizaron en las líneas HCC827 ER23 y las H1975 AZDR. Para establecer si la sobreexpresión de la proteína se había completado correctamente, se analizaron sus niveles por western blot (Figura 38), comparando las líneas sensibles control (HCC827 o H1975), las líneas silenciadas (shGRHL2), las líneas resistentes control (HCC827 ER23 o H1975 AZDR) y las líneas sobreexpresadas (OEGRHL2). En la Figura 38 se observa cómo tras sobreexpresar GRHL2 en las dos líneas celulares (OEGRHL2) aumentan los niveles de esta proteína, a su vez observamos un aumento significativo de los niveles de la proteína epitelial CDH1, al contrario que tras silenciar GRHL2 (shGRHL2). Por otro lado, tras silenciar GRHL2, aumentan los niveles del factor de transcripción ZEB1, que como hemos comentado anteriormente en otros tipos de cáncer consigue unirse al promotor de *GRHL2* reprimiendo su expresión. Sin embargo, tras sobreexpresar GRHL2 en la línea HCC827 ER23 OEGRHL2 los niveles de ZEB1 se mantienen constantes sin ningún cambio con respecto a su control HCC827 ER23, aunque si que observamos una disminución de ZEB1 en la línea H1975 AZDR OEGRHL2 con respecto a su control H1975 AZDR. Asimismo, observamos que los niveles de VIM, como ya habíamos confirmado anteriormente, aumentan tras silenciar GRHL2, mientras que tras sobreexpresar GRHL2 observamos una pequeña disminución de la proteína VIM en ambas líneas sobreexpresadas. Finalmente, si nos fijamos en los niveles de SNAIL/SLUG observamos que tras silenciar GRHL2 en ambas líneas se observa un aumento de la expresión con respecto a la secuencia control HCC877 y H1975, a su vez tras sobreexpresar GRHL2 observamos que en la línea HCC827 ER23 OEGRHL2 disminuyen los niveles de SNAIL/SLUG mientras que en la línea H1975 AZDR OEGRHL2 se mantienen constante. Cabe destacar que a menudo la transición que realizan las células de un estado mesenquimal a uno epitelial es

incompleta, convirtiéndose en células fusionadas que residen en estados intermedios (Kim et al., 2017). Por ello, la línea en la que se ha sobreexpresado GRHL2 retiene características tanto epiteliales como mesenquimales, mostrando todavía niveles similares a su secuencia control de algunos de los marcadores mesenquimales.

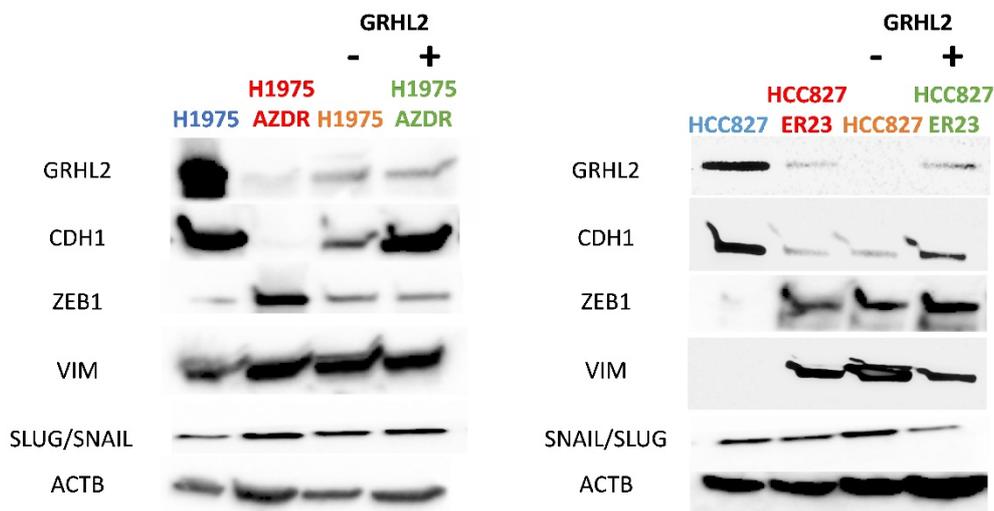


Figura 38. Análisis de la expresión de la proteína GRHL2, CDH1, ZEB1, VIM y SNAIL/SLUG mediante western blot en los extractos proteicos de células H1975 y HCC827 infectadas con *shGRHL2* y *OEGRHL2*. Se empleó ACTB como proteína de expresión constitutiva para normalizar la carga (n=3, siendo n el número de réplicas realizadas). H1975 y HCC827 en azul, H1975 AZDR-HCC827 ER23 en rojo, H1975-HCC827 shGRHL2 en naranja y H1975 AZDR-HCC827 ER23 OEGRHL2 en verde.

Analizando todos estos datos a nivel de proteínas podemos predecir que el silenciamiento de GRHL2 parece que pueda provocar una TEM más completa que al sobreexpresar GRHL2, que observamos que aumentan los niveles epiteliales pero los mesenquimales en su mayoría se mantienen constantes, por lo que en este caso quizá la TME es parcial. Otro de los análisis que realizamos para comprobar esta hipótesis fue el estudio de los niveles de ARN mensajero tras sobreexpresar GRHL2. En la Figura 39 podemos confirmar como tras la sobreexpresión en ambas líneas aumentan más de 100 veces los niveles de GRHL2 con respecto a la secuencia control de sobreexpresión (HCC823 ER23 y H1975 AZDR), a su vez comprobamos un aumento de los marcadores epiteliales CDH1 y CDS1. Por otro lado, tal y como comprobamos a nivel de proteínas, el marcador mesenquimal VIM no presenta cambios, así como ZEB1 y ZEB2 únicamente se ven mínimamente disminuidos en la línea HCC827 ER23 OEGRHL2, sin embargo, sí que observamos un aumento en ambas líneas del marcador mesenquimal CDH2.

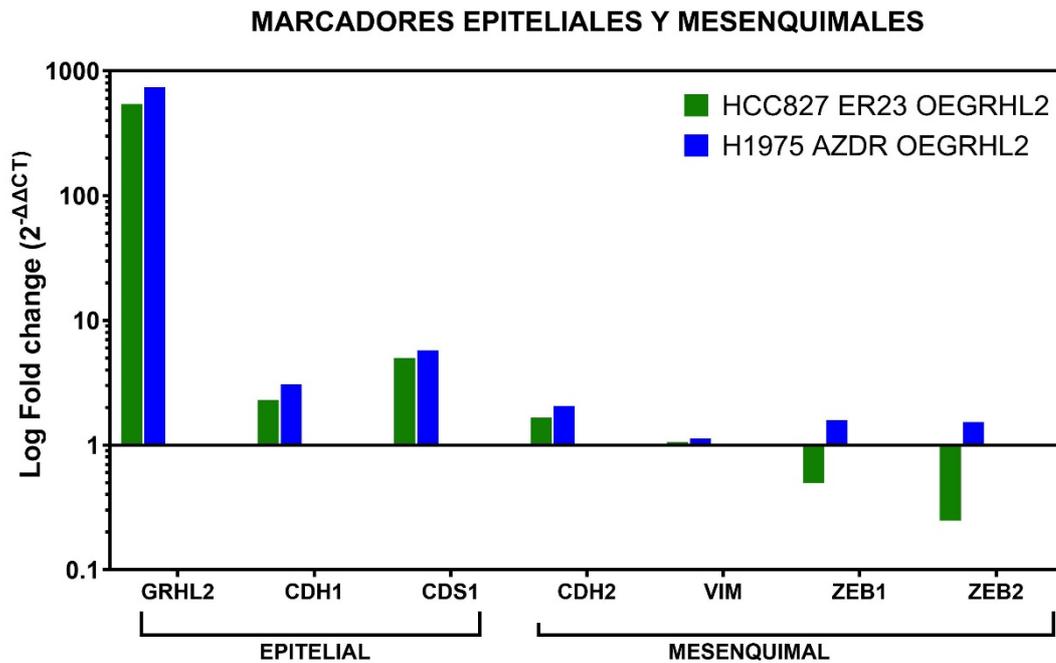


Figura 39. Expresión de GRHL2 y marcadores TEM a nivel de ARNm en el modelo de sobreexpresión de GRHL2. Se emplearon extractos de ARN que se retrotranscribieron a ADNc y por RT-qPCR se determinaron los niveles de GRHL2 y los marcadores TEM, además de ACTB como control de carga, los datos están expresados en log₂ del 2^{-ΔΔCt} de la línea OEGRHL2 comparada con la parental resistente (n=3).

El inductor más conocido e importante de la TEM es TGFβ₁, además las células son capaces de producir este inductor cuan más mesenquimal es su fenotipo (Hao et al., 2019; Xu et al., 2009). Por esta razón determinamos la producción de TGFβ₁ liberado al medio extracelular por los modelos celulares de silenciamiento de GRHL2, dónde modulamos su expresión, comparándolos con sus controles shNT. En la Figura 40 podemos observar una correlación entre la inhibición de GRHL2 (shGRHL2) y una mayor concentración de TGFβ₁ en el medio de cultivo que la secretada por la secuencia control (shNT). Estos datos sugieren que la inducción del fenotipo de la TEM y el arresto celular parcial que observamos en las células en los ensayos de proliferación (Figura 35), provocado por la represión de GRHL2, podría estar mediado por el TGFβ₁, el inductor de la TEM mejor conocido y que es capaz de provocar una detención del ciclo celular en múltiples modelos experimentales (Zhang et al., 2017). En este contexto, se ha descrito que GRHL2 previene la TEM inducida por TGFβ en células MCF10a (células de cáncer de mama) que expresan constitutivamente GRHL2 (Werner et al., 2013). En particular, observaron que GRHL2 regula al alza BMP-2, un miembro de la familia de proteínas

morfogénicas óseas, perteneciente a la superfamilia TGF β 1, que se sabe que inhibe la señalización del receptor TGF β 1 a través de la competencia con SMAD2/3 por la unión a SMAD4 y su translocación nuclear (Cieply et al., 2012).

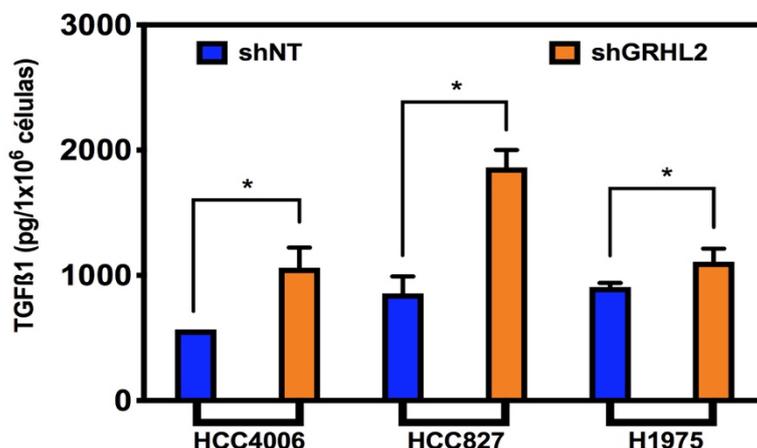


Figura 40. Niveles de TGF β 1 extracelular y su correlación con los niveles de GRHL2. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos. Tras 24h en condiciones estándar, el medio de cultivo fue sustituido por medio sin suero, y tras 72h se recogieron los sobrenadantes para medir secreción de TGF β 1 (n=3) en condiciones basales. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis t-student donde *p<0,05; **p<0,01 en comparación con el grupo control.

La TEM se ha relacionado con la ganancia de capacidades migratorias e invasivas propias de las células metastásicas. Podemos decir que las células que se encuentran en el frente del tumor son las de mayor capacidad invasiva y además muestran características de la TEM (Mayor & Etienne-Manneville, 2016). Por esta razón nos propusimos estudiar si los niveles de GRHL2 podrían determinar la capacidad migratoria de las células a través de experimentos de cierre de herida (también conocidos como *wound healing* o *scratch assays*). En la Figura 41 se muestra como las células ITQs resistentes cierran la herida completamente tras 24 horas. Por otro lado, las células sensibles a los ITQs solo conseguían cerrar la herida aproximadamente un 50% tras 24 horas. Fijándonos en las células que silencian GRHL2 vemos que tras 24 horas consiguen cerrar la herida en su totalidad, mientras que las células que sobreexpresan GRHL2 tras 24 horas solamente han cerrado un 60% de la herida. De esta manera podemos concluir que la ausencia de GRHL2 provoca que la célula adquiera una mayor capacidad migratoria (Figura 41C y Figura 41D) en comparación con la misma línea celular que lo sobreexpresa.

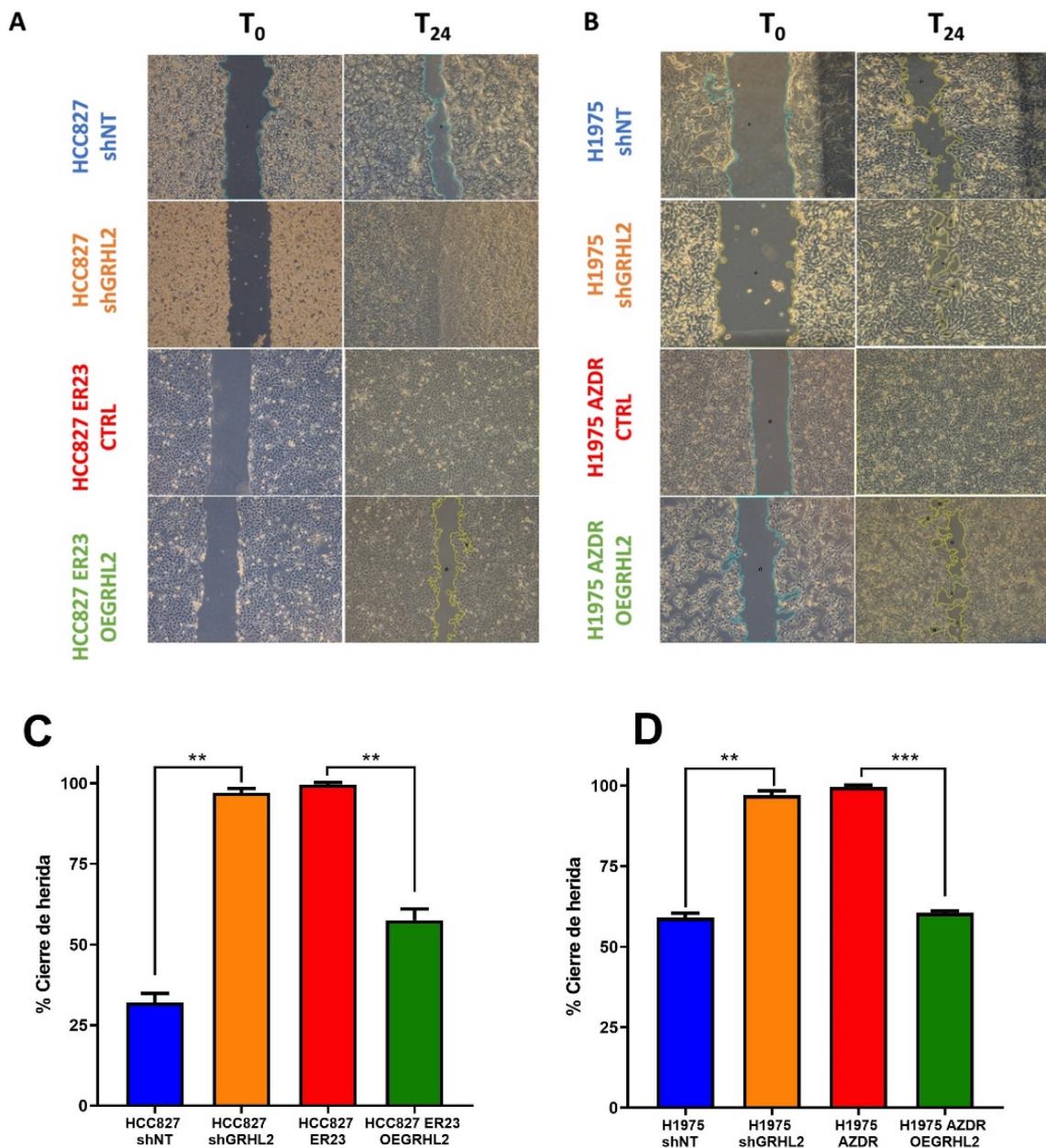


Figura 41. Ensayo de cierre de herida al modular GRHL2. A. Las células se sembraron en placas de 6 pocillo a razón de 4×10^5 células por pocillo para que a las 24h estuviera confluyente. Después se realizó una herida sobre la monocapa celular y se cambió el medio por medio fresco. Se capturaron imágenes al tiempo 0 y tras 24h de realizar la herida. Las imágenes en los modelos HCC827 (A) y H1975 (B) son representativas de 3 experimentos independientes. C. Las imágenes adquiridas a lo largo de la herida fueron medidas y los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis t-student donde $**p < 0,01$ y $***p < 0,0001$ en comparación con el grupo control en el modelo HCC827 (C) y H1975 (D).

Finalmente, al ver que *GRHL2* se relaciona con genes epiteliales como *CDH1* y que su silenciamiento y sobreexpresión ha llevado a la modulación de dicha proteína de adhesión intracelular, decidimos comprobar el papel de *GRHL2* y la remodelación epigenética en la plasticidad epitelial-mesenquimal de las células. Por tanto, decidimos realizar un ensayo de ChIP para examinar la interacción de *GRHL2* con los promotores de genes implicados en los procesos de TEM y TME. En la Figura 42 podemos observar la unión de *GRHL2* a distintas regiones promotoras de genes epiteliales y mesenquimales en las líneas H1975 shNT, que expresa de forma endógena *GRHL2* y H1975 sh*GRHL2*, en la que está silenciado. En primer lugar, si nos fijamos en los datos de la interacción de *GRHL2* con su propio promotor, podemos observar un aumento en H1975 shNT respecto al control negativo IgG, lo que nos indica que *GRHL2* seguramente se pueda autoregular a sí mismo. Este efecto no se observa en la línea que no expresa *GRHL2* (H1975 sh*GRHL2*). La auto-regulación de *GRHL2* a pesar de no ser objeto de estudio podría ser importante en futuras investigaciones. En segundo lugar, también observamos unión de *GRHL2* tanto al promotor de *OVOL2* como de *CDH1* en la célula que expresa *GRHL2* y no en la silenciada. Estos datos concuerdan con los datos de la literatura que mostraban una interacción significativa de la regulación positiva de *GRHL2* no solo con *CDH1* sino también de otros genes epiteliales como *ESRP1* y *OVOL2* en cáncer de ovario (Chung et al., 2016, 2019). También se ha observado este suceso en otros tipos de tejido como el renal, revelando así un enriquecimiento de *GRHL2* con el promotor *OVOL2* (Aue et al., 2015). Por otro lado, respecto a la unión del factor de transcripción *GRHL2* a los promotores de los genes mesenquimales, observamos un patrón similar. *GRHL2* se une al promotor de *ZEB1*, *SNAIL1* y *VIM* en las células que expresan *GRHL2* y no en las que este gen está deplecionado. Chung y sus colaboradores apreciaron, en cáncer de ovario, la unión de *GRHL2* con el promotor de *ZEB1* (Chung et al., 2016, 2019), cabe destacar que *GRHL2* y *ZEB1* crean un bucle de retroalimentación negativa, causando la inhibición del otro cuando uno de ellos se encuentra activo (Perez-Oquendo & Gibbons, 2022).

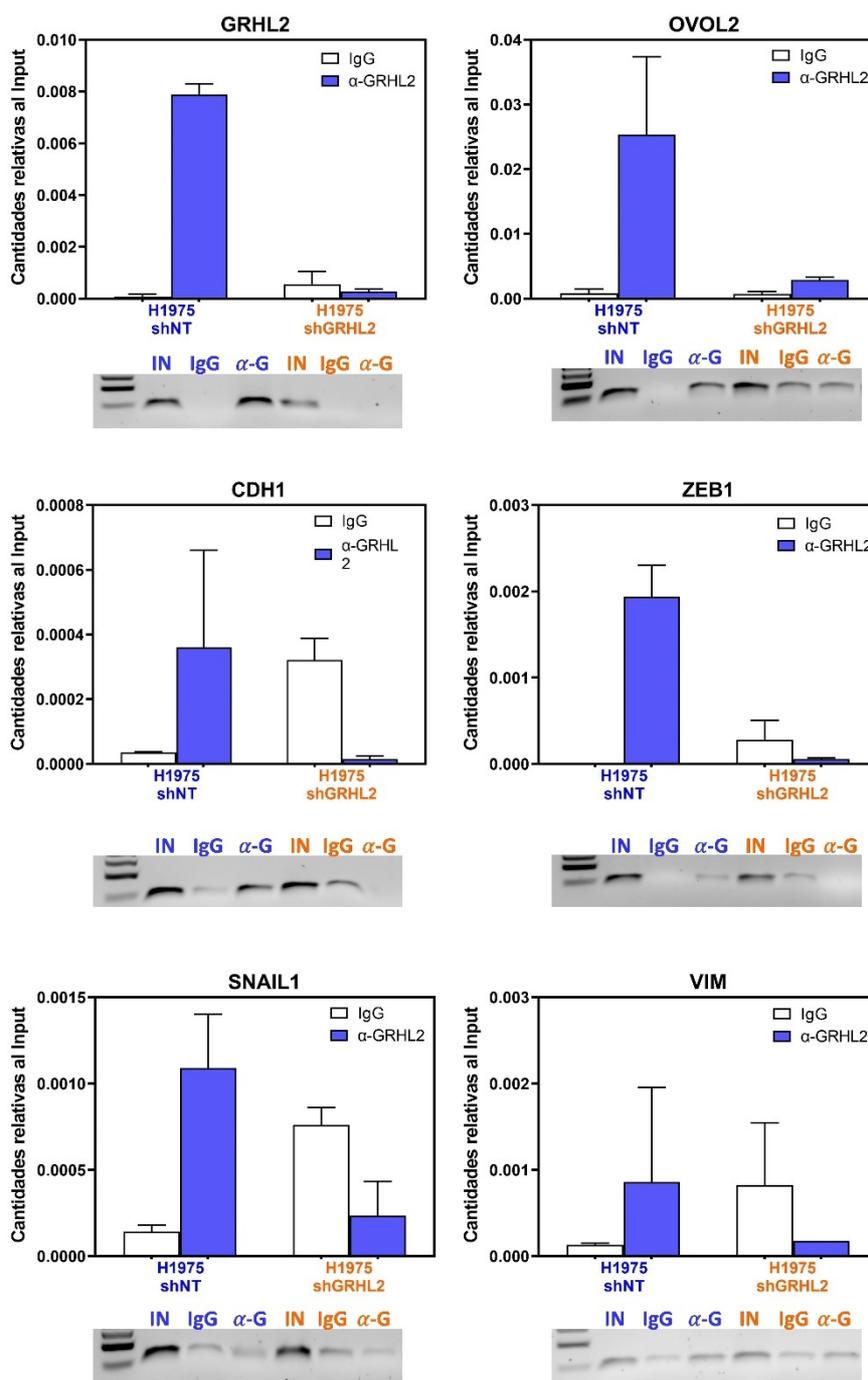


Figura 42. Análisis de CHIP de genes epiteliales y mesenquimales en líneas de AC pulmonar con EGFR mutado y sensibles o resistentes al osimertinib. La cromatina aislada de las células ITQ-sensibles y resistentes se incubó con anticuerpos contra GRHL2 (α -G), e IgG como control negativo para determinar el porcentaje de unión de cada una de estas marcas a los promotores de genes epiteliales (*CDH1*, *GRHL2* y *OVOL2*) y mesenquimales (*ZEB1*, *SNAIL1* y *VIM*). Se representan los datos de la RT-qPCR realizada (A) y del gel de agarosa realizado con el producto de la RT-qPCR (B). Los resultados (Cts) se normalizaron a partir de los Cts de sus respectivos Inputs y se representaron los $\Delta\Delta$ ct como % de unión a la región promotora de cada gen. Los $\Delta\Delta$ ct representados se normalizaron con los $\Delta\Delta$ ct del IgG con el fin de eliminar cualquier señal inespecífica asociada. Los resultados (n=3). Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

Con todos los datos analizados en este punto, podemos predecir que el silenciamiento de *GRHL2* puede inducir la TEM en CPNM, apoyándonos de manera consistente con los trabajos publicados en carcinomas de vejiga (Shen et al., 2020a), colorectal (Yang et al., 2019), mama (Mooney et al., 2017), ovario (Chung et al., 2016), próstata (Pistore et al., 2017), estómago (Xiang et al., 2017), páncreas (Nishino et al., 2017) y en sarcomas (Somarelli et al., 2016). Además, tras la sobreexpresión observamos una TME parcial, con células pseudo-epiteliales, debido a la complicidad que conlleva el proceso de pasar de un fenotipo mesenquimal a uno epitelial (Klein, 2009). Por lo que creemos que para revertir completamente este proceso deberíamos ayudarnos con otro cambio como la modulación de algún gen mesenquimal como *ZEB1*. Estos datos se respaldan con los obtenidos tras la medición *TGFβ1*, ya que sabemos que la inducción del fenotipo de la TEM, provocado por la represión de *GRHL2*, podría estar mediado por el *TGFβ1*, mostrándose mayores valores de *TGFβ1* en aquellas células que apreciamos un fenotipo mesenquimal más definido. Asimismo, en este apartado, hemos podido comprobar como la modulación de *GRHL2* tiene un impacto importante con la proliferación celular, disminuyéndola cuando no se expresa *GRHL2*, así como en la migración celular, aumentándola cuando las células inhiben *GRHL2* y presentan características mesenquimales propias de células metastásicas (Mayor & Etienne-Manneville, 2016). Observando que este proceso se revierte a una menor migración cuando *GRHL2* se expresa en las células. Finalmente, diferentes artículos mantienen que *GRHL2*, *CDH1* y *OVOL2* respaldan un fenotipo epitelial y contrarrestan a factores de la TEM como *ZEB*, *VIM* y *SNAIL* (Chung et al., 2019; Wang et al., 2020). Por tanto, si nos fijamos en los datos mostrados en el análisis del ChIP y nos respaldamos con estudios mencionados, podemos advertir que existe una unión de *GRHL2* a los promotores de los genes *CDH1* y *OVOL2*. Asimismo, también advertimos una unión de *GRHL2* y *ZEB1*, actuando reguladores negativos entre ellos (Wang et al., 2020). Por tanto, en consonancia con su papel en la morfogénesis epitelial y fijándonos en los resultados obtenidos, podemos hipotetizar que *GRHL2* podría actuar tanto como supresor tumoral mediante el control de la TEM, característica esencial de la progresión tumoral, como un oncogén, promoviendo la proliferación celular y la supervivencia de las células tumorales en el CPNM (Cieply et al., 2012, 2013).

6. La expresión de GRHL2 modula la sensibilidad y resistencia a los ITQs

Después de mostrar que los modelos de sensibilidad de los ITQs de EGFR con fenotipo epitelial sobreexpresan GRHL2 y su silenciamiento convierte a las células a un estado más mesenquimal, así como, que los modelos de resistencia a los ITQs de EGFR con fenotipo mesenquimal tienen reprimida la expresión de GRHL2 y su sobreexpresión transforma a las células parcialmente a un estado más epitelial, nos planteamos determinar si la modulación de GRHL2 en estos modelos tendría efectos sobre la sensibilidad y la resistencia a los ITQs de EGFR. Para ello, realizamos diferentes aproximaciones para detectar el efecto citotóxico de los ITQs de EGFR en las líneas celulares donde se moduló la expresión de GRHL2. Para estudiar la resistencia y la sensibilidad a los ITQs realizamos dos estrategias. Por un lado, el estudio a corto plazo mediante contajes directos midiendo la viabilidad celular y la proliferación tras administrar el fármaco en las líneas sensibles y su sublínea con GRHL2 silenciada, además de curvas de citotoxicidad celular en las líneas sensibles y resistentes y sus sublíneas en las que silenciamos y sobreexpresamos GRHL2. Por otro lado, hicimos estudios a medio plazo con ensayos de colonias, donde se evaluó la sensibilidad y la resistencia a los ITQs de las líneas HCC827 y H1975 sensibles y resistentes y las sublíneas que silencian y sobreexpresan GRHL2. En primer lugar, en las figuras 43, 44 y 45 observamos cómo la exposición a los ITQs disminuía de forma contundente la viabilidad en las células sensibles, pero no en las células a las que se les había silenciado GRHL2, cuya supervivencia se mantenía a más del 80% transcurridas 72 horas tras la incubación con el fármaco.

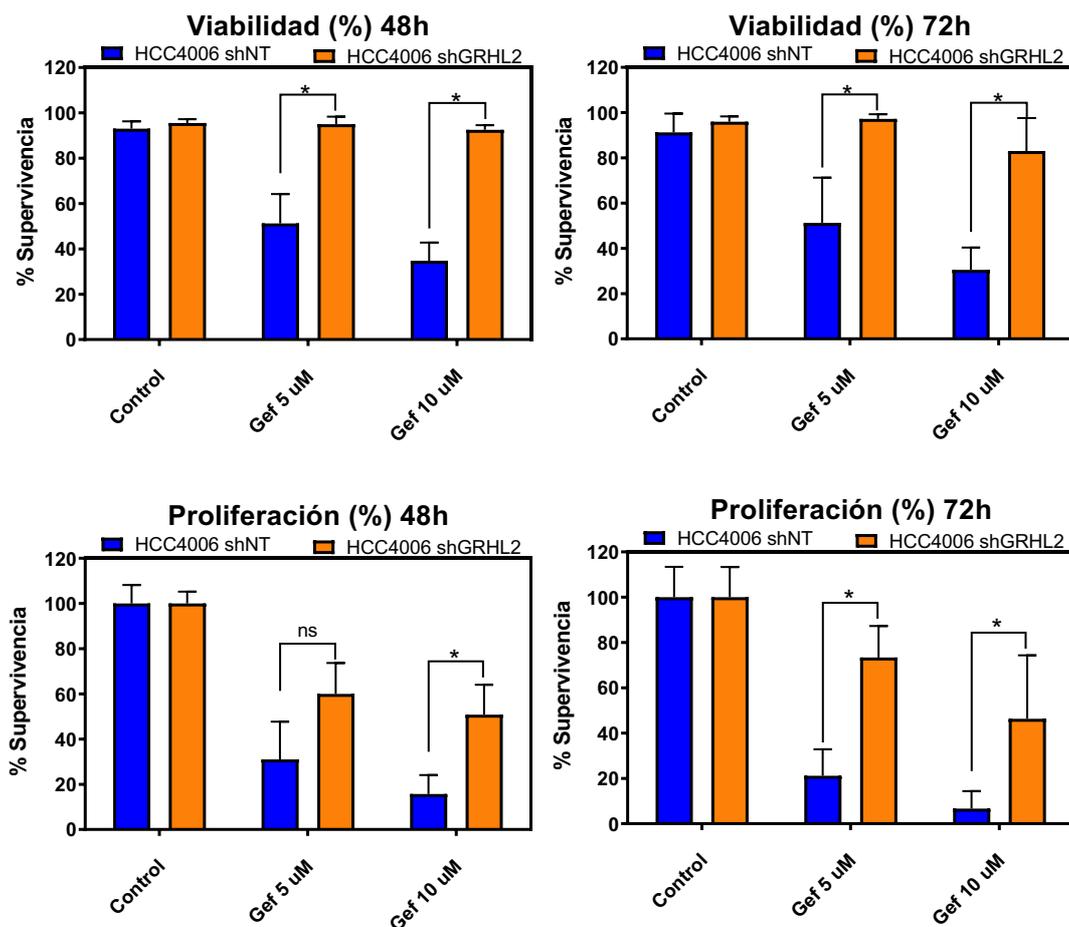


Figura 43. Efecto del gefitinib sobre la viabilidad y la proliferación en células HCC4006 con silenciamiento de GRHL2. Contajes con azul tripán, por triplicado, tras 48 y 72 horas de tratamiento con gefitinib 5 μ M, 10 μ M o vehículo (control). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis *t-student* donde * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo control.

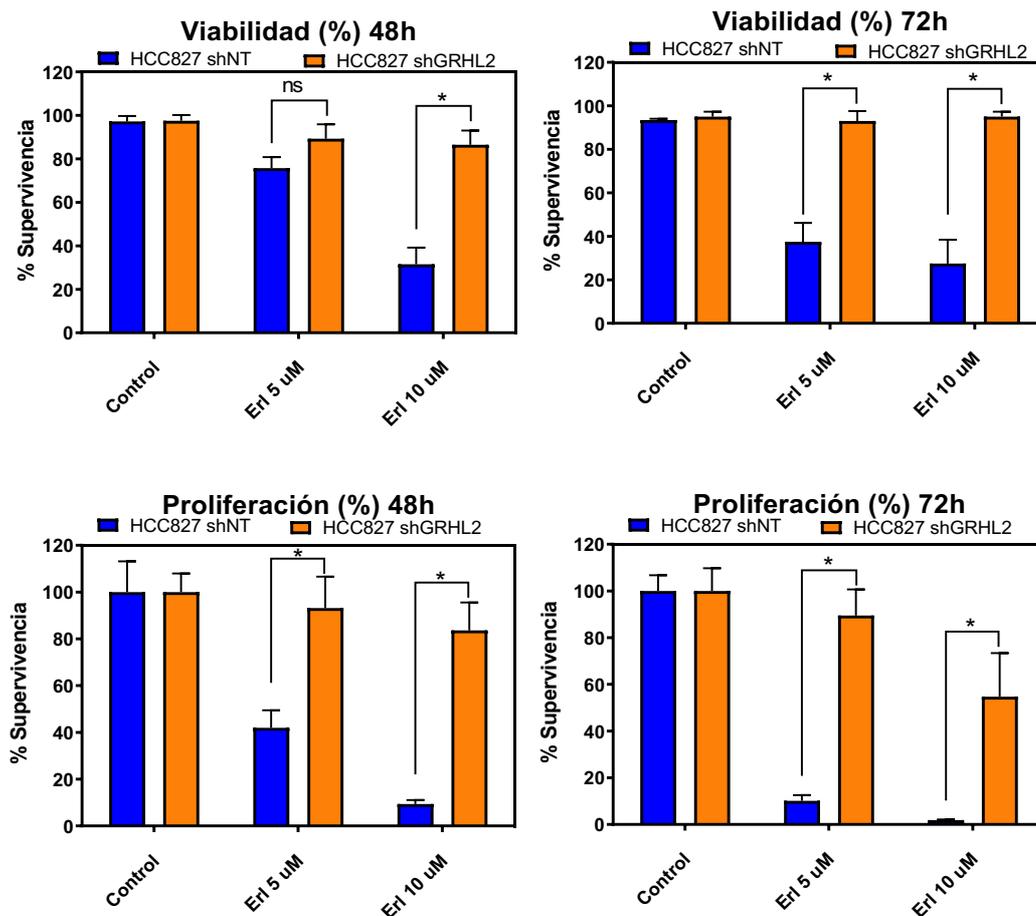


Figura 44. Efecto del erlotinib sobre la viabilidad y la proliferación en células HCC827 con silenciamiento de GRHL2. Contajes con azul tripán, por triplicado, tras 48 y 72 horas de tratamiento con erlotinib 5 μ M, 10 μ M o vehículo (control). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis *t-student* donde * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo control.

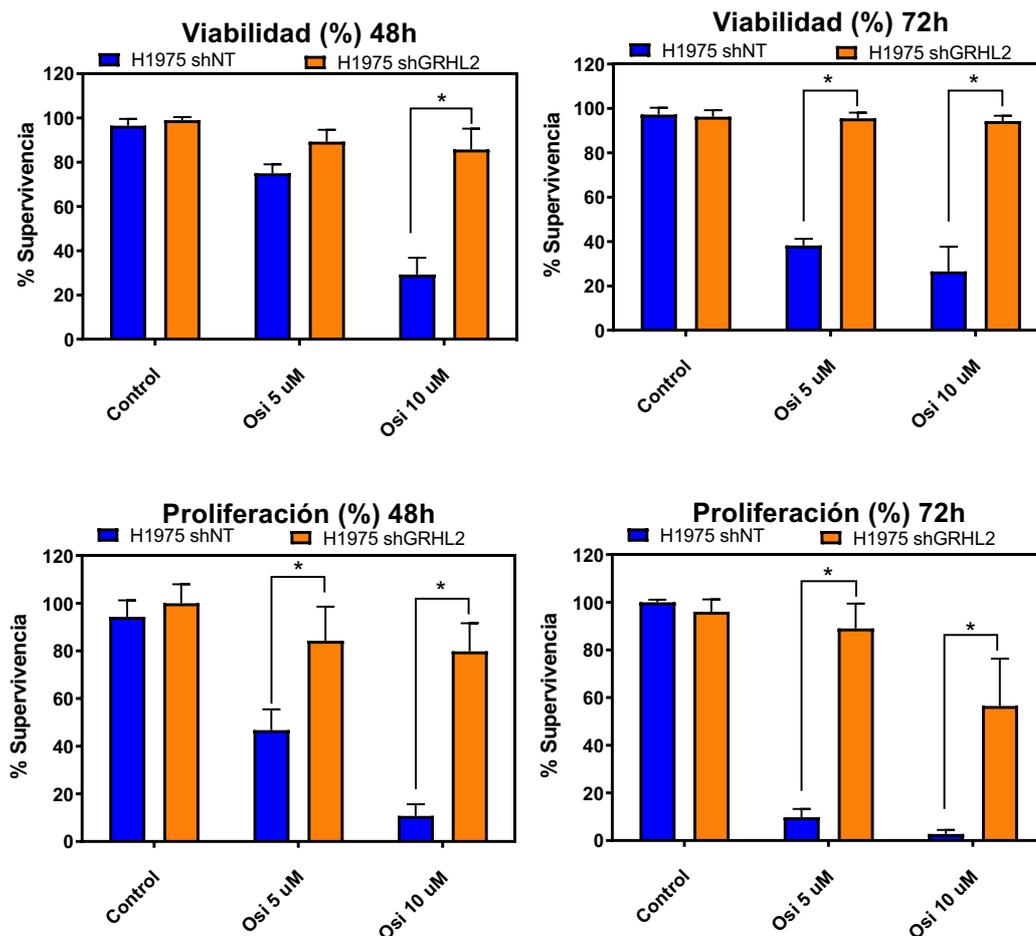


Figura 45. Efecto del osimertinib sobre la viabilidad y la proliferación en células H1975 con silenciamiento de GRHL2. Contajes con azul tripán, por triplicado, tras 48 y 72 horas de tratamiento con osimertinib 5 μ M, 10 μ M o vehículo (control). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis *t-student* donde * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo control.

En segundo lugar, si observamos las curvas de citotoxicidad (Figura 46) vemos cómo se produce un desplazamiento de la curva hacia la derecha, que señala una mayor resistencia en las tres sublíneas silenciadas con respecto al control. Con este tipo de gráficas podemos obtener la IC_{50} para cada línea que se muestra resumido en la Tabla 22.

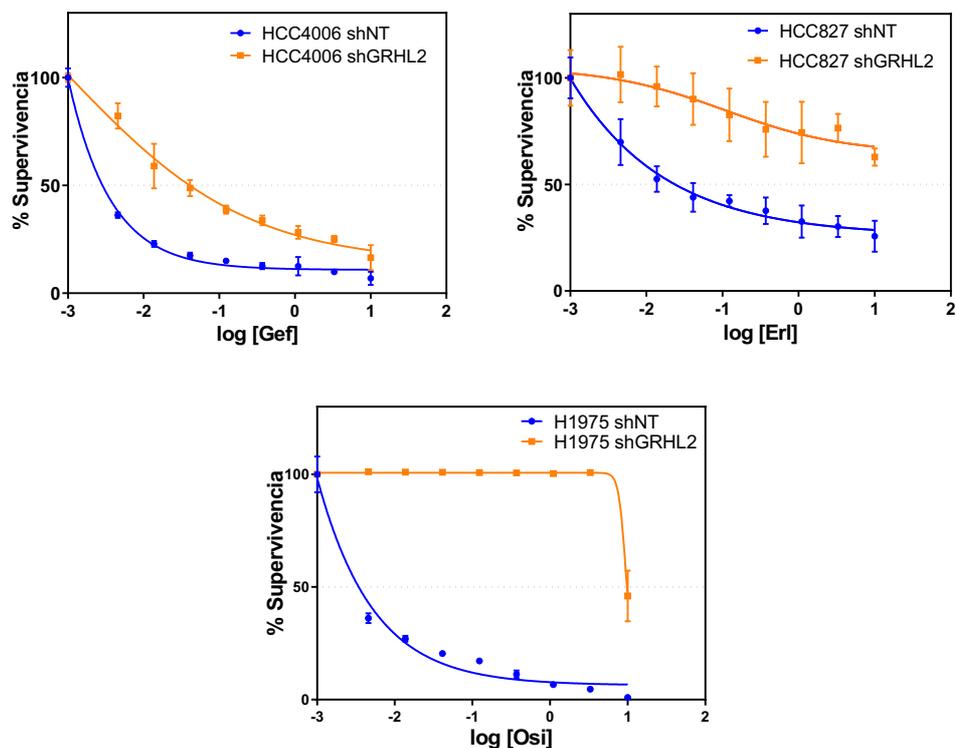


Figura 46. Viabilidad celular de la línea HCC4006, HCC827 y H1975 (shGRHL2 y shNT) en respuesta a diferentes dosis de gefitinib, erlotinib y osimertinib (empezando en $10 \mu\text{M}$) en células sembradas en placas de 96 pocillos e incubadas con vehículo (control) o gefitinib. La viabilidad celular fue determinada indirectamente por el método de la sulforodamina B tras 72h de tratamiento. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control \pm desviación estándar ($n=6$).

Tabla 22. Valores de IC_{50} de las líneas celulares de CPNM con EGFR mutado sensibles y sus versiones resistentes, obtenidas de las curvas de citotoxicidad a corto plazo obtenidas en la Figura 46.

	HCC4006	HCC4006- shGRHL2	HCC827	HCC827- shGRHL2	H1975	H1975- shGRHL2
IC_{50} (μM)	<0.004	0,041	<0,041	> 10	<0.004	10

En el caso de las sublíneas en las que sobreexpresamos GRHL2 (**verde**), los ensayos de citotoxicidad a corto plazo mostraron una resensibilización parcial, observándose un desplazamiento de la curva hacia la izquierda con respecto a su control resistente (**rojo**) (Figura 47). Con este tipo de gráficas podemos obtener la IC_{50} para cada línea que se muestra resumido en la Tabla 23.

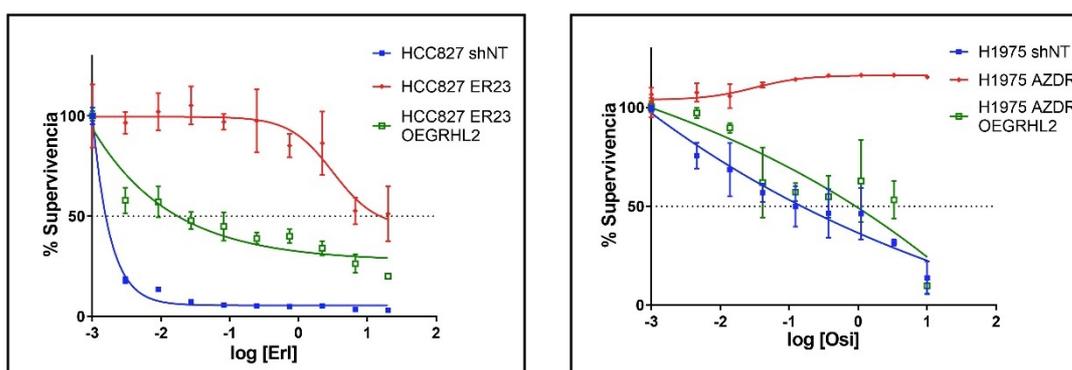


Figura 47. Viabilidad celular de las líneas HCC827 y H1975 (sensible, resistente y con GRHL2 sobreexpresado) en respuesta a diferentes dosis de erlotinib y osimertinib respectivamente (empezando en 20 μ M) en células sembradas en placas de 96 pocillos e incubadas con vehículo (control) o el ITQs correspondiente. La viabilidad celular fue determinada indirectamente por el método de la sulforodamina B tras 72h de tratamiento. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control \pm desviación estándar (n=6).

Tabla 23. Valores aproximados de IC_{50} de las líneas celulares de CPNM con EGFR mutado sensibles y sus versiones resistentes, obtenidas de las curvas de citotoxicidad a corto plazo obtenidas en la Figura 47.

	HCC827 ER23	HCC827 ER23- OEGRHL2	H1975 AZDR	H1975 AZDR- OEGRHL2
IC_{50} (μM)	>10	0,02	> 10	0,2

Esta resensibilización inducida por la sobreexpresión de GRHL2 y el aumento de resistencia provocado por el silenciamiento de GRHL2 también se deduce de la presencia de colonias supervivientes en el cultivo de las líneas HCC827 y H1975 sensibles y resistentes (con sus versiones silenciadas y sobreexpresadas) expuesto a diferentes concentraciones de erlotinib y osimertinib respectivamente (Figura 48 y 49).

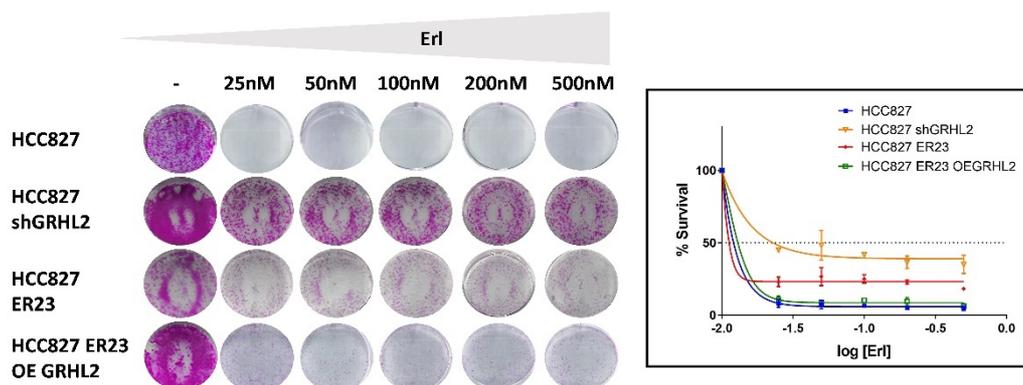


Figura 48. Ensayos de formación de colonias en presencia de erlotinib o vehículo (control) durante 10 días. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a baja densidad (5000 células por pocillo, por triplicado). Transcurridas 24h se añadieron diferentes concentraciones de erlotinib, que se renovaron cada 72h durante 10 días. Finalmente, las colonias se fijaron con paraformaldehído al 4% y se tiñeron con sulfurodamina B para su visualización. La imagen mostrada es representativa de 3 experimentos independientes. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control \pm desviación estándar (n=3).

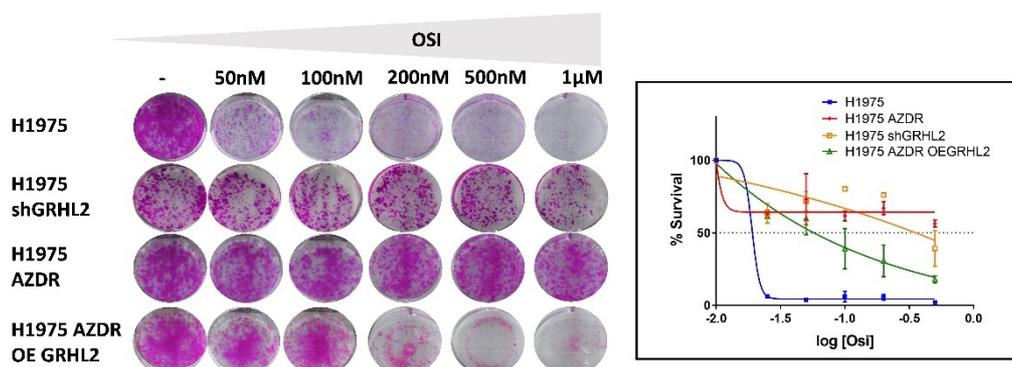


Figura 49. Ensayos de formación de colonias en presencia de osimertinib o vehículo (control) durante 10 días. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a baja densidad (5000 células por pocillo, por triplicado). Transcurridas 24h se añadieron diferentes concentraciones de osimertinib, que se renovaron cada 72h durante 10 días. Finalmente, las colonias se fijaron con paraformaldehído al 4% y se tiñeron con sulfurodamina B para su visualización. La imagen mostrada es representativa de 3 experimentos independientes. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control \pm desviación estándar (n=3).

Nuestros resultados demuestran claramente que la baja actividad de GRHL2, resultante del silenciamiento de este, es una característica diferencial de las células ITQ-resistentes con fenotipo TEM, y, es necesaria para promover el estado mesenquimal, resistente a la terapia, además de un carácter más invasivo de las células, devolviendo a las células hacia un estado más mesenquimal. En los últimos años se ha intentado entender la TME

en términos de plasticidad y estados transitorios, afirmando que existen estados parciales, con células fusionadas que adquieren características de ambos fenotipos (Grigore et al., 2016). Esto refleja la flexibilidad de las células para inducir o revertir los programas TEM y TME (Tam & Weinberg, 2013). Por lo que hay ejemplos de TME transitorios en varios contextos celulares donde coexisten la expresión de marcadores tanto epiteliales como mesenquimales (Huang et al., 2013). Por ello, se necesita una visión más amplia de este proceso, que no solo considere la expresión de algunos marcadores canónicos epiteliales y mesenquimales, sino que también constituya diferentes funcionalidades asociadas a la TEM como la migración, o el aumento de sensibilidad o resistencia a los fármacos. De hecho, nuestros resultados indican que, pese a encontrarse en un metaestado alejado de la TME completa, las células que sobreexpresan de manera ectópica GRHL2 han adquirido algunas características funcionales propias del fenotipo epitelial que comparten con las células epiteliales sensibles a los ITQs de EGFR. Las líneas que sobreexpresan GRHL2 a pesar de no conseguir cambiar todos los marcadores mesenquimales, adquieren menores capacidades migratorias y una mayor sensibilización a los ITQs de EGFR que las células mesenquimales resistentes. Estos resultados abren las puertas a una posible intervención farmacológica basada en la sobreexpresión de GRHL2, que favorecería la adquisición de un fenotipo más epitelial y más sensible a los ITQs. Este proceso debería ser motivo de estudio a pesar de la complejidad con la que contamos al ser GRHL2 un factor de transcripción complejo.

7. Validación de los resultados modelos *in vivo*

Para poder confirmar *in vivo* las consecuencias de la TEM asociada a la resistencia a los ITQs de EGFR, nos propusimos inyectar subcutáneamente nuestros modelos celulares en ratones desnudos atímicos (Crl:NU(NCr)-Foxn1nu). En estos ensayos, por un lado, se pretendía estudiar si la expresión de GRHL2 afectaba al tamaño y a la velocidad del crecimiento del tumor y, por otro, el efecto del osimertinib con respecto al tamaño del tumor y a la resistencia/sensibilidad del fármaco dependiendo de los niveles de GRHL2 en cada uno de los modelos celulares.

Para ello, se inyectaron subcutáneamente las líneas celulares H1975 shNT, H1975 shGRHL2, H1975 AZDR y H1975 AZDR OE-GRHL2 (n=12 ratones por modelo celular). Una vez el tumor era palpable, la mitad de los ratones fueron tratados con 10 mg/kg de osimertinib, y a la otra mitad se les administró el vehículo en el que estaba disuelto (ratones control). Tanto el tratamiento farmacológico como el vehículo se administraron mediante vía oral como se ha descrito en Materiales y Métodos (Pulido et al., 2020). Los tiempos establecidos y el modelo de estudio se muestran en la Figura 50.

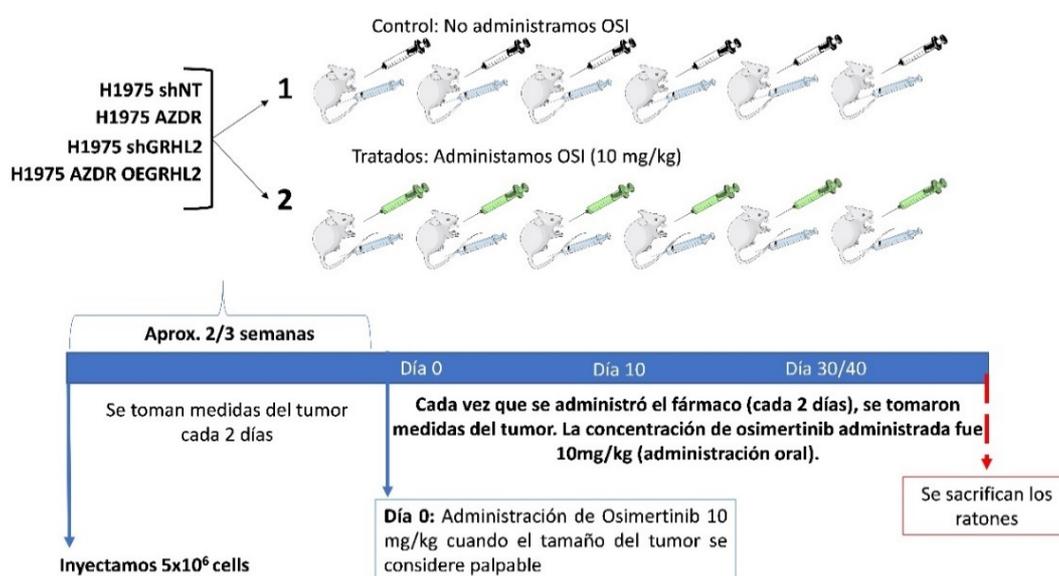


Figura 50. Modelo de estudio establecido para el ensayo *in vivo* con ratones. Los tiempos se adaptaron al crecimiento del tumor de cada una de las líneas.

En la Figura 51 se muestran las curvas de crecimiento de los tumores ITQ-sensibles con fenotipo epitelial H1975 (H1975 shNT) y los ITQ-resistentes con fenotipo mesenquimal H1975 AZDR, antes y después de la administración del osimertinib o del vehículo. En primer lugar, observamos que la tasa de crecimiento de los tumores H1975 es muy rápida, lo que nos obligó a sacrificar a los ratones tan solo 2 días después de la administración del vehículo control por consideraciones éticas y en cumplimiento de los parámetros de bienestar animal establecidos en el procedimiento aprobado por la Comité de Ética de Experimentación Animal del Centro de Investigación Príncipe Felipe. Respecto a los ratones tratados con osimertinib, observamos que el tamaño tumoral disminuye más de un 50% con respecto al inicio del tratamiento (día 30), unos resultados que están en la línea de los obtenidos por Della Corte y sus colaboradores que, utilizando xenoinjertos de las líneas celulares de CPNM HCC827 y H1975 evaluaron diferentes combinaciones de administración de osimertinib para explorar potenciales mecanismos de resistencia (Della Corte et al., 2018). Por otro lado, los tumores H1975 AZDR mostraron una tasa de crecimiento muy lenta, lo cual nos obligó a iniciar el tratamiento a partir del día 97 post-inoculación. Como podemos observar, no existen diferencias significativas en el volumen tumoral entre los ratones control y los tratados con osimertinib, por lo que podemos afirmar, tal y como era de esperar, que los tumores derivados de la línea H1975 AZDR con fenotipo mesenquimal siguen siendo resistentes al tratamiento *in vivo*.

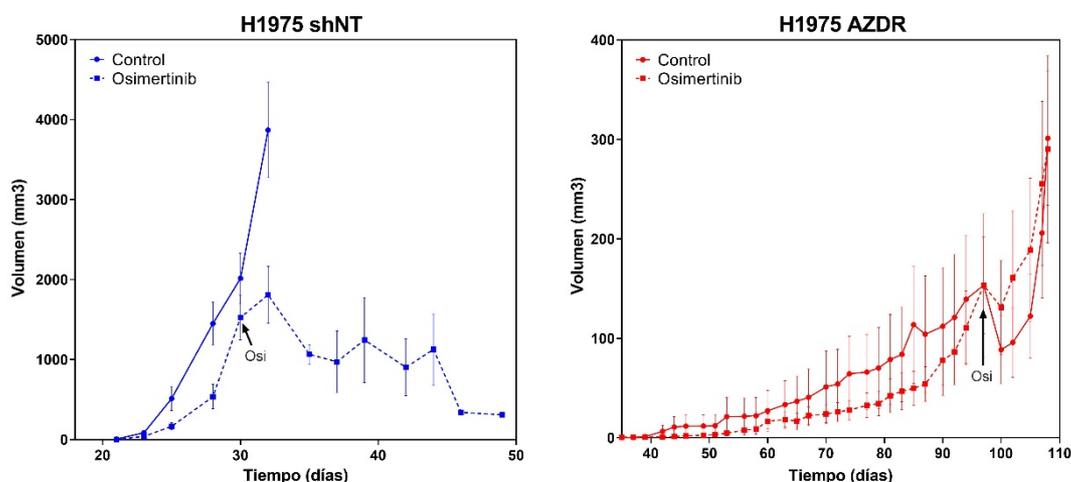


Figura 51. Curvas del crecimiento tumoral de las líneas celulares H1975 shNT y H1975 AZDR antes y después del tratamiento con osimertinib. El estudio se realizó con una N de 48 ratones totales, 12 por línea (n=6 tratados y n=6 control).

Con el objetivo de estudiar el efecto de la presencia o ausencia de GRHL2 en el crecimiento del tumor, comparamos el volumen tumoral de las líneas H1975 shNT frente a las H1975 shGRHL2, y de las H1975 AZDR frente a H1975 AZDR OEGRHL2 (Figura 52 y 53). La línea H1975 shNT, con fenotipo epitelial, tiene un crecimiento más rápido que H1975 shGRHL2, que hemos visto en los experimentos *in vitro* que ha adquirido un fenotipo mesenquimal tras reprimir GRHL2 (Figura 52). Por otra parte, la tasa de crecimiento de la línea H1975 AZDR OEGRHL2, que adquirió *in vitro* una TME parcial, es mayor que la de su línea parental H1975 AZDR (Figura 53). Estos resultados, obtenidos con el mismo número de células inyectadas inicialmente y tras haber transcurrido el mismo tiempo desde la inoculación, corroboran que los tumores mesenquimales son significativamente menores que los que presentan un fenotipo más epitelial. El aumento de la capacidad proliferativa asociado a altos niveles de GRHL2 ya ha sido ya definido por otros autores en diferentes tipos de cáncer. Se ha descrito que GRHL2 promueve el crecimiento celular en líneas *in vitro* de CPNM, (Pan et al., 2017), del mismo modo que en células de cáncer pancreático el silenciamiento de GRHL2 reduce significativamente la proliferación (Nishino et al., 2017). Uno de los motivos que podrían explicar esta disminución de la proliferación que observamos en el fenotipo mesenquimal, podría ser la desregulación de la angiogénesis, un proceso biológico propio del microambiente tumoral que se establece *in vivo* para soportar el crecimiento tumoral. Esta acción permite a las células tumorales adquirir un sustento en forma de nutrientes y oxígeno y eliminar los desechos metabólicos (Saman et al., 2020). Por otro lado, la disminución de la tasa de proliferación de los tumores subcutáneos por parte de las células con fenotipo mesenquimal, podría explicarse por el aumento en la secreción de TGF β 1, una citoquina con demostrado efecto inhibitor sobre el ciclo celular (Soucheray et al., 2015). En nuestros resultados *in vitro* (Figura 35), se observa una disminución del crecimiento tumoral en los modelos celulares con fenotipo TEM, que tienen silenciado GRHL2. Además, diferentes estudios en otros tipos de cáncer, como por ejemplo en cáncer colorrectal, se ha descrito *in vivo* que la expresión de GRHL2 aumenta el crecimiento tumoral con respecto a las líneas que no expresan GRHL2 y que presentan características más mesenquimales (Quan et al., 2014, 2015), del mismo modo que hemos descrito en nuestros experimentos (Figura 55 y 56). Por otro lado, en la Figura 40, donde

determinamos la producción de TGF β 1 liberado al medio extracelular, observamos que la inducción del fenotipo de la TEM de las líneas celulares en las que silenciamos GRHL2 y el arresto celular parcial que observamos en los ensayos de proliferación *in vitro*, podrían estar mediados por TGF β 1. Este efecto también se ha observado previamente en otros trabajos que corroboran nuestros resultados, incluyendo un estudio realizado en nuestro laboratorio que se basa en el papel de la endotelina-1 (EDN1) en la resistencia a fármacos en pacientes de cáncer de pulmón con mutaciones de *EGFR*. En este trabajo (Pulido et al., 2020) se demostró que las células de CPNM *EGFR* mutantes e ITQ-resistentes con fenotipo mesenquimal secretan factores que dificultan el crecimiento eficiente *in vivo* y por tanto su tasa de crecimiento es mucho menor que con las células de carácter epitelial ITQ sensibles. Por tanto, nuestros resultados podrían indicar que el papel clave de GRHL2 en la proliferación tumoral del CPNM *in vitro* e *in vivo* podría estar mediado, entre otros factores, por el TGF β 1.

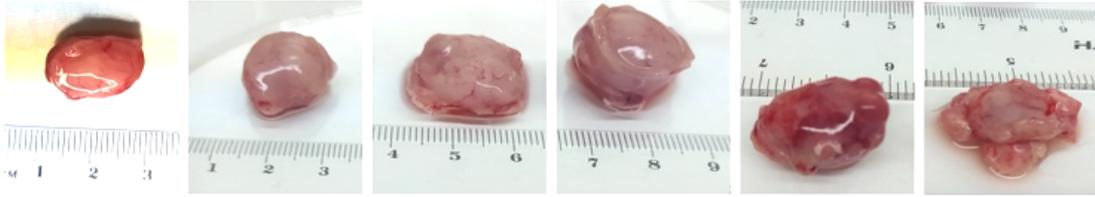
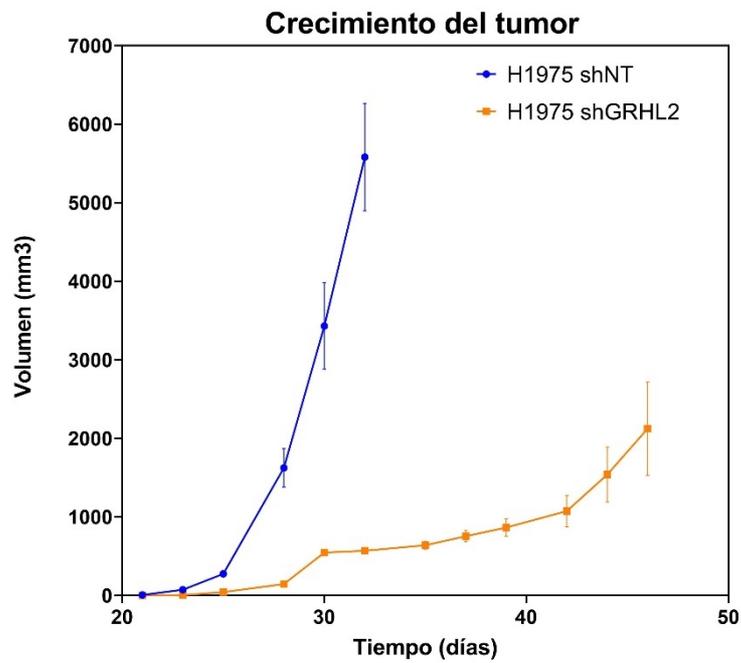
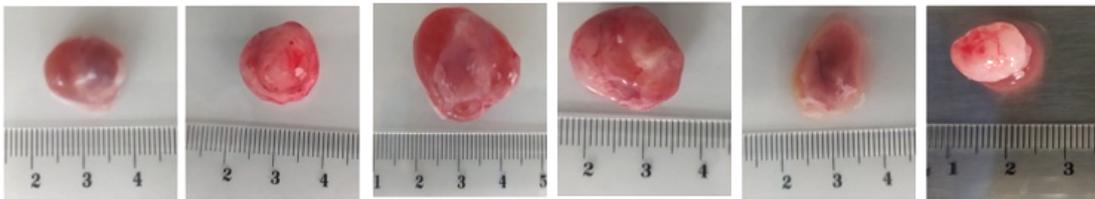
1975 shNT**1975 shGRHL2**

Figura 52. El silenciamiento de GRHL2 provoca una tasa de crecimiento más lenta del tumor. Imágenes de los tumores control (no tratados) de las líneas H1975 shNT y H1975 shGRHL2, y curva del crecimiento tumoral de dichas líneas celulares según el volumen tumoral (mm³) sin tratamiento con osimertinib. El estudio se realizó con una N de 12 ratones por línea (n=6 tratados y n=6 control).

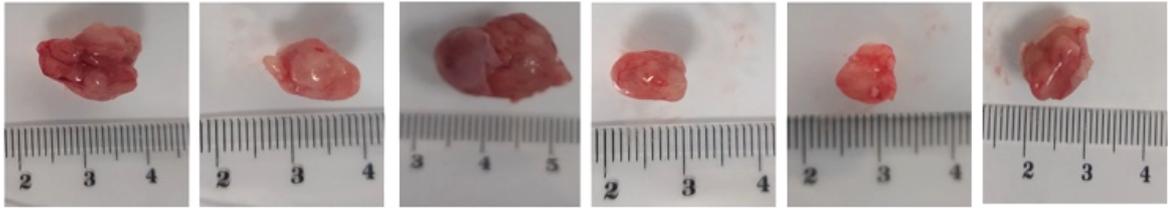
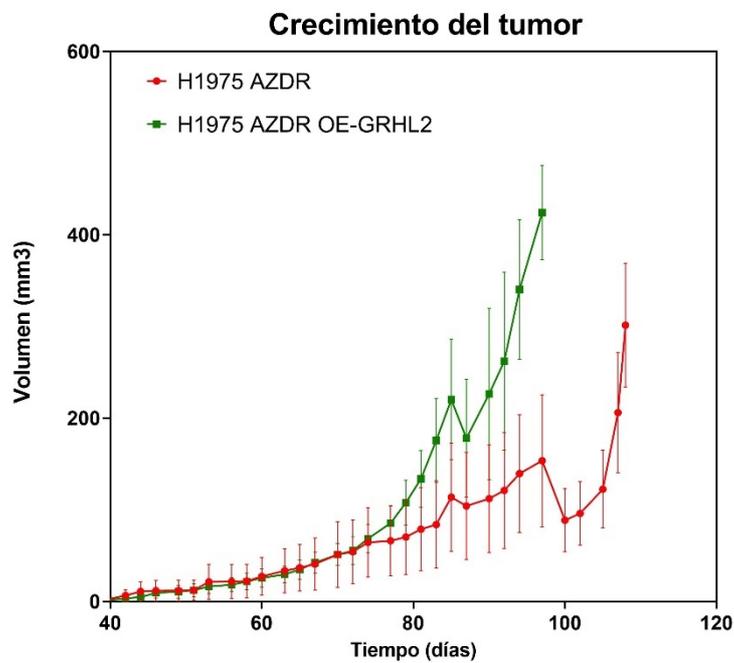
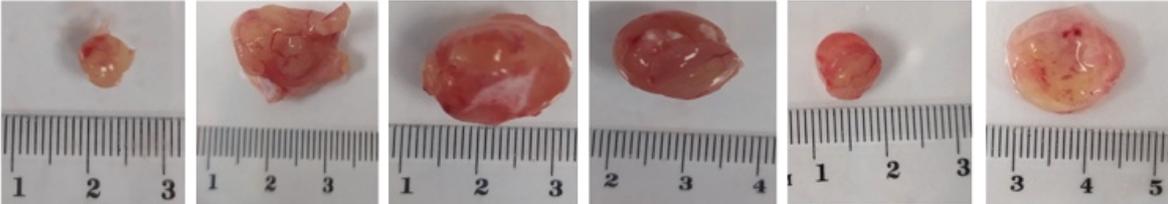
1975 AZDR**1975 AZDR OE-GRHL2**

Figura 53. La sobreexpresión de GRHL2 induce una mayor tasa de crecimiento del tumor. Imágenes de los tumores control (no tratados) de las líneas H1975 AZDR y H1975 AZDR OEGRHL2 y la curva del crecimiento tumoral de dichas líneas celulares según el volumen tumoral (mm³) sin tratamiento con osimertinib. El estudio se realizó con una N de 12 ratones por línea (n=6 tratados y n=6 control).

Una vez estudiado el tamaño y la velocidad del crecimiento tumoral en los ratones sin tratar, nos centramos en cómo afecta la presencia o ausencia de GRHL2 en la sensibilidad o resistencia a la administración del fármaco en cada una de los modelos celulares. Comparando la línea H1975 shNT con H1975 shGRHL2 podemos observar macroscópicamente que el tamaño de los tumores de la línea H1975 shNT disminuye al tratar con osimertinib, mientras que la línea H1975 shGRHL2 no disminuye con respecto al control no tratado (Figura 54A). En la Figura 54B encontramos que tras la administración de osimertinib el volumen tumoral de la línea H1975 shNT se reduce más de un 50%, mientras que el ITQ no reduce el tamaño tumoral en la línea celular H1975 shGRHL2. Comparando los datos de las líneas H1975 shNT y shGRHL2 (Figura 54C), podemos observar un cambio estadísticamente significativo tras el silenciamiento de GRHL2, que provoca una mayor resistencia al osimertinib.

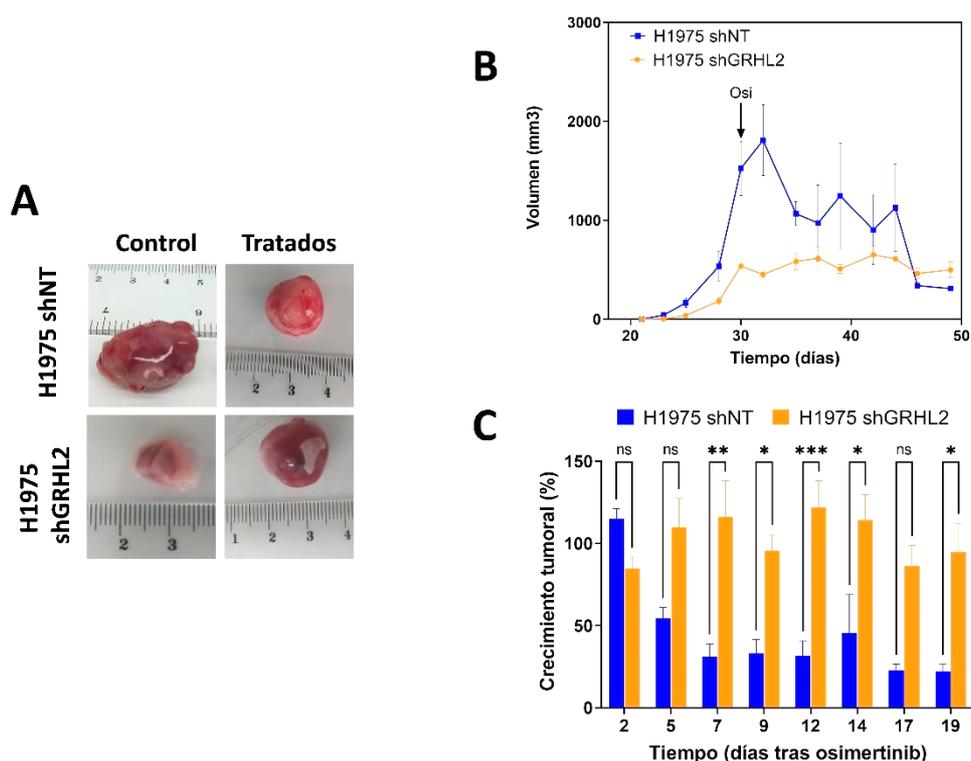


Figura 54. El silenciamiento de GRHL2 aumenta la resistencia a osimertinib en modelos in vivo.

A. Imágenes de los tumores tras el tratamiento con el vehículo (Control) o el fármaco osimertinib (Tratados) de la línea H1975 shNT y H1975 shGRHL2. B. Curva de crecimiento según el volumen tumoral (mm^3) de la línea control parental sensible (H1975 shNT) y la línea silenciada (H1975 shGRHL2) tratados con osimertinib por vía oral durante 20 días. C. Gráfica del crecimiento tumoral (%) post administración de osimertinib, considerando el 100% el tamaño del tumor el día 0 previo a la administración de osimertinib. El estudio estadístico de todos los resultados se realizó mediante el análisis t student, donde * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$ y **** $p < 0,0001$. Con una N de 12 ratones por línea ($n=6$ tratados y $n=6$ control).

Como ya hemos indicado anteriormente, la baja tasa de crecimiento de las líneas H1975 AZDR y H1975 AZDR OEGRHL2 nos obligó a iniciar el tratamiento con osimertinib a diferentes tiempos, a partir del día 97 en el caso de la H1975 AZDR y del día 77 para la H1975 OE-GRHL2 (Figura 55B). En la Figura 55 (A, B y C) podemos observar que el volumen de los tumores aumenta al ser tratados con osimertinib en ambas líneas. Estos resultados pueden deberse a que la sobreexpresión de GRHL2, tal y como hemos mencionado anteriormente, da lugar a una TME incompleta, únicamente observándose una resensibilización parcial en los ensayos *in vitro* que no consigue observarse *in vivo*.

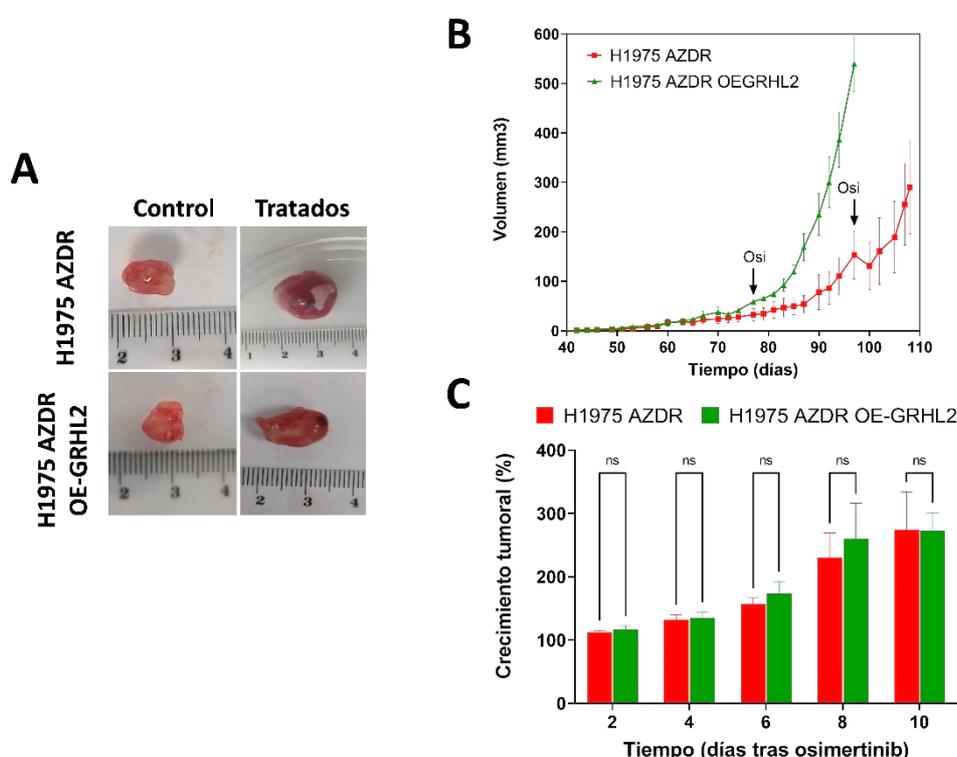


Figura 55. La sobreexpresión de GRHL2 no afecta a la respuesta a osimertinib en modelos *in vivo*. A. Imágenes de los tumores tras el tratamiento con el vehículo (Control) o el fármaco osimertinib (Tratados) de la línea H1975 AZDR y H1975 AZDR OEGRHL2. B. Curva de crecimiento según el volumen tumoral (mm^3) de la línea control parental resistente (H1975 AZDR) y la línea sobreexpresada (H1975 AZDR OEGRHL2) tratados con osimertinib por vía oral durante 12 días. C. Gráfica del crecimiento tumoral (%) post administración de osimertinib, considerando el 100% el tamaño del tumor el del día 0 previo a la administración de osimertinib. El estudio estadístico de todos los resultados se realizó mediante el análisis t student, donde * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$ y **** $p < 0,0001$. Con una N de 12 ratones por línea (n=6 tratados y n=6 control).

Finalmente, el último aspecto a estudiar fue el desarrollo de metástasis a distancia a partir de nuestros xenoinjertos subcutáneos. Analizando a nivel macroscópico los hígados observamos 3 metástasis visibles en los ratones inoculados con la línea H1975 shGRHL2, mientras que en los portadores de la H1975 shNT no se observó ninguna (Figura 56). Estos resultados son consistentes con el hecho bien conocido de que las células mesenquimales tienen mayores capacidades invasivas, por lo que corroboramos los resultados que obtuvimos con los ensayos de migración *in vitro*, confirmando que *in vivo* las células que donde se reprime GRHL2 generan metástasis. Por otro lado, detectamos una metástasis hepática macroscópica en uno de los 12 ratones inoculados subcutáneamente con la línea H1975 AZDR OEGRHL2 (Figura 57). Esto podría deberse a que las células que sobreexpresan GRHL2 provienen de una línea mesenquimal, y a pesar de que hemos observado en ella una TME parcial, siguen siendo células que presentan un fenotipo mesenquimal en transición, y que de hecho continúan mostrando una tasa de crecimiento lenta con respecto a las células epiteliales. En nuestra revisión bibliográfica únicamente hemos encontrado dos estudios donde GRHL2 inhibe la metástasis en modelos de xenoinjertos *in vivo* en otro tipo de cáncer como es el gástrico. En el trabajo de Xiang y colaboradores, se describe que la sobreexpresión de GRHL2 inhibió significativamente la capacidad de invasión y migración (Xiang et al., 2017). Recientemente, otro estudio en cáncer gástrico ha descrito que el silenciamiento de PMCA4, un factor que regula positivamente la expresión de GRHL2 y CDH1 (y otros genes implicados en el desarrollo del fenotipo epitelial), aumentó la capacidad de migración e invasión, y promovió la resistencia a los fármacos citotóxicos (Wang et al., 2020). Por tanto, el silenciamiento de GRHL2 mediado por la TEM podría tener un papel en el desarrollo de metástasis en CPNM, así como en otros tipos de cáncer, como es el gástrico.

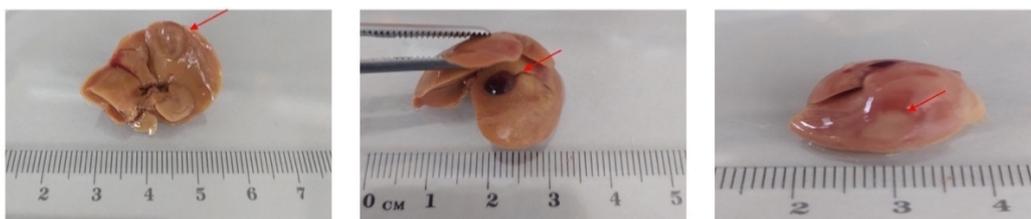


Figura 56. Metástasis a nivel macroscópico producidas en los hígados de los ratones en los que se inyectaron la línea celular H1975 shGRHL2.



Figura 57. Metástasis a nivel macroscópico producida en un hígado de los ratones en los que se inyectaron la línea celular H1975 AZDR OEGRHL2.

Tras este primer análisis macroscópico, queda pendiente analizar sistemáticamente las histologías de los pulmones y los hígados para confirmar estos hallazgos relacionados con la capacidad metastásica a nivel microscópico. También se realizará un análisis histológico comparativo de los tumores generados por cada una de las líneas de estudio sometidas o no a un tratamiento con osimertinib. A pesar de no contar con estos resultados podemos concluir que la línea H1975 donde silenciamos GRHL2 adquiere, al igual que en los modelos *in vitro*, mayor resistencia al osimertinib, presenta una menor tasa de crecimiento (en el grupo no tratado) y una mayor capacidad invasiva que la línea H1975 shNT. Por otro lado, en las células que sobreexpresan GRHL2 de manera ectópica, a pesar de que ha mostrado características más propias de una línea epitelial (con un crecimiento más rápido que su línea parental), no hemos observado una resensibilización al osimertinib *in vivo*.

8. Validación de los resultados en muestras clínicas de pacientes con CPNM

Recientemente, GRHL2 ha llamado mucho la atención, por su posible implicación en la práctica clínica, debido a sus funciones fisiológicas en la embriogénesis y a su vinculación en patologías como el cáncer (Ma et al., 2017). Nuestros resultados demuestran que, en el CP, tanto en modelos *in vitro* (cultivos celulares), como en modelos *in vivo* (ratones), los niveles elevados de GRHL2 son necesarios para mantener el fenotipo epitelial de las células en este tipo de cáncer. Diferentes artículos corroboraban estos datos en otros tipos de cáncer, como el cáncer de ovario (Chung et al., 2019) o el de vejiga (Shen et al., 2020a) entre otros. No obstante, el papel de *GRHL2* es diferente según el tipo de cáncer que se estudie (Chung et al., 2019) y su expresión o ausencia de ella está involucrada de diferentes formas en múltiples enfermedades. La placenta, el cerebro, los pulmones, las glándulas salivales, el timo y el páncreas en adultos humanos muestran una expresión de GRHL2 relativamente alta. Apoyándonos en un estudio reciente sobre la expresión de GRHL2 en el CP (Pan et al., 2017) y en los datos disponibles en “*The Human Protein Atlas*”, ambos discuten que existe una clara relación entre una baja expresión de *GRHL2* y una mayor supervivencia entre los pacientes con ACP. Por tanto, creemos que podría ser de especial interés el estudio de la expresión de GRHL2 como un posible biomarcador de pronóstico en el CP. En primer lugar, decidimos contrastar los datos que teníamos en nuestras bases de datos, que recopilamos en el proyecto CURELUNG, y que mostraba datos de metilación y expresión de diferentes genes en pacientes con CP. Estos datos mostraron que la metilación de *GRHL2* en tumores primarios era más baja que en tejidos normales y se correlacionaba con una mayor expresión de *GRHL2*, al contrario que en los tejidos normales que mostraba una expresión muy baja de *GRHL2* (Figura 58).

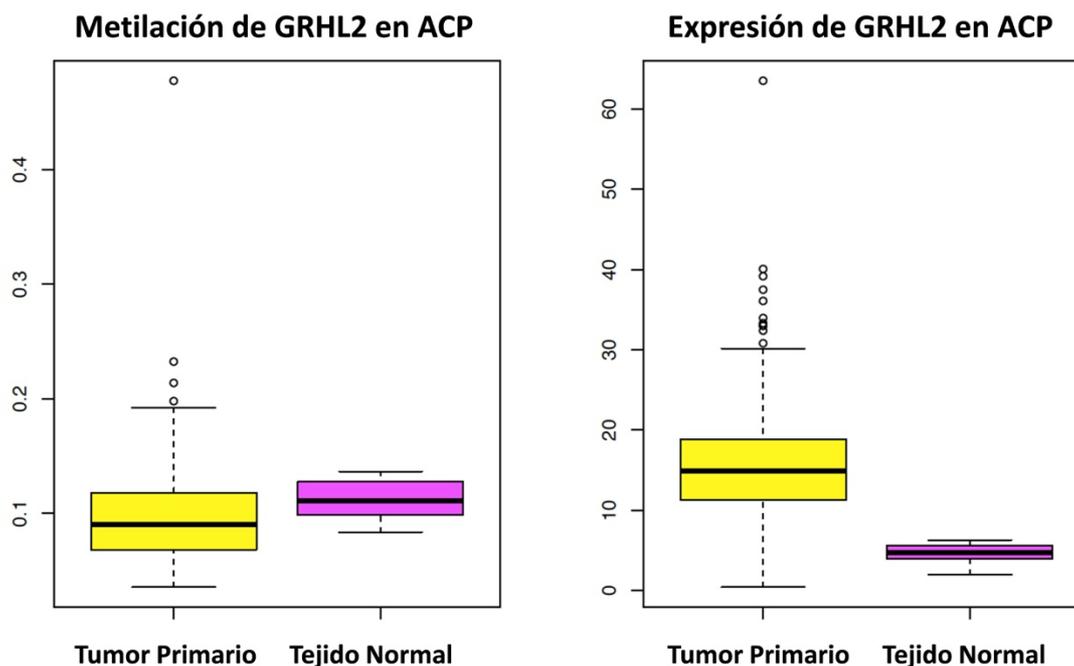


Figura 58. Metilación y expresión de GRHL2 en tumor primario y tejido normal en pacientes con ACP.

En segundo lugar, una vez comprobada la metilación y la expresión de *GRHL2* entre un tejido de tumor primario y un tejido normal, y apoyándonos en los datos de la bibliografía anteriormente descrita que correlacionan en el tumor una mayor expresión con una peor supervivencia, nos planteamos analizar los niveles de metilación de pacientes con CPNM y la relación con la evolución clínica que mostraban de manera retrospectiva. Los datos que se muestran en la Figura 59 son valores extraídos de las bases de datos del proyecto CURELUNG. En la Figura 59 se estudiaron la CpG 14202477 y la CpG 23973429, que ya analizamos al inicio de esta tesis doctoral para llegar a seleccionar *GRHL2* como gen de estudio. Fijándonos en los resultados obtenidos en la Figura 59, observamos como una mayor metilación de *GRHL2*, que la correlacionamos según la Figura 58, con una menor expresión de *GRHL2*, se relaciona con una mayor supervivencia en ambas CpGs. Por tanto, con nuestros datos confirmamos que una mayor expresión y una menor metilación de *GRHL2* se relaciona con un peor pronóstico de la enfermedad.

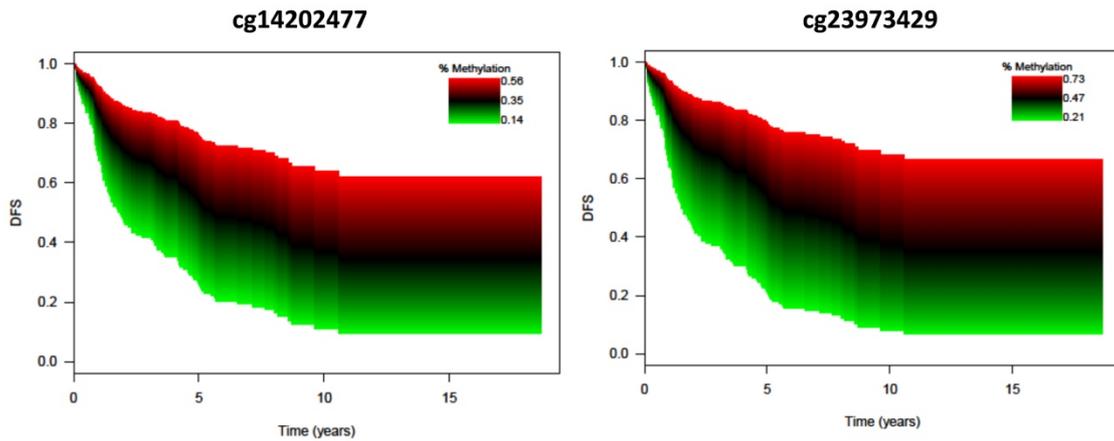


Figura 59. Análisis Kaplan-Meier de pacientes con CPNM en función al porcentaje de metilación de *GRHL2* en las CpGs 23973429 y 14202477.

Finalmente, analizamos los valores de metilación de *GRHL2* mediante ddPCR en 20 evaluaciones de muestras de ADN de parafinas de pacientes de CPNM tratados con ITQs de EGFR. Estos datos mostraron de nuevo como, en las evaluaciones de los pacientes, una menor metilación de *GRHL2* podría asociarse a una peor supervivencia de los pacientes (Figura 60).

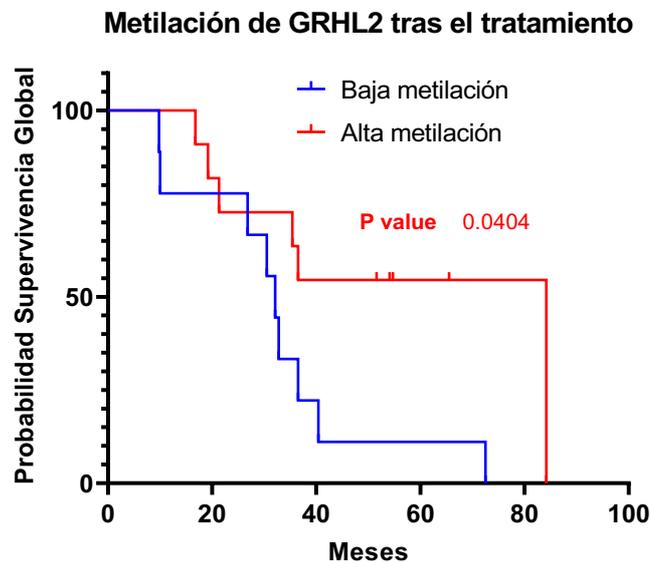


Figura 60. Análisis Kaplan-Meier en una cohorte de 20 evaluaciones de pacientes con CPNM.

En definitiva, la suma de todas estas evidencias parciales sugiere que la metilación de *GRHL2*, en los pacientes con CPNM con *EGFR* mutado tratados con ITQs, es relevante en un escenario clínico. Concluimos que una mayor metilación y una menor expresión de *GRHL2* está relacionado con una mayor supervivencia a la enfermedad, por tanto, según nuestros datos, *GRHL2* podría ser también un biomarcador de pronóstico en el CP. En este sentido, Xiang y colaboradores, describieron en 2017 en una cohorte de 66 pacientes que la sobreexpresión de *GRHL2* está estrechamente relacionada con un mal pronóstico en CPNM (Pan et al., 2017). Sin embargo, este estudio utilizó únicamente datos de expresión de *GRHL2*, sin estudiar los valores epigenéticos (metilación del ADN en la región promotora de *GRHL2*) de estos mismos pacientes. Además, diferentes estudios en otros tipos de cáncer han relacionado la sobreexpresión de *GRHL2* con la predicción hacia un peor pronóstico, aunque como en el anterior trabajo, ninguno de ellos añade el estudio de la metilación del ADN. Estos estudios se han descrito en cáncer de ovario, cáncer de mama y páncreas (Nie et al., 2020; Bai et al., 2021; Wang et al., 2019). Como ejemplo, Bai y colaboradores utilizaron 14 bases de datos para describir que niveles altos de expresión de *GRHL2* en cáncer de mama se correlacionaba hacia un peor pronóstico (Bai et al., 2021). Con todo, la suma de todas estas evidencias parciales sugiere que la activación de *GRHL2* en pacientes de CPNM es relevante en un escenario clínico, dándole a *GRHL2* un valor como biomarcador de pronóstico en el CP. Aun así, será necesario un estudio más ambicioso ampliando las cohortes de pacientes para establecer de forma concluyente la relación entre el aumento de metilación de *GRHL2* con un mejor pronóstico en el tejido tumoral. Además de observar si al ampliar la cohorte observamos la misma respuesta en las muestras basales de los pacientes.

Conclusiones

- La estrategia multiómica realizada descubre la importancia biológica que pueden tener los modelos experimentales para identificar nuevos impulsores de la TEM e identificar posibles dianas farmacológicas.
- El análisis integral de los estudios epigenómicos y transcriptómicos, en combinación con el análisis de respuesta a fármacos, identificó a *GRHL2* como potencial biomarcador de respuesta a los ITQs de EGFR en el CPNM.
- La activación de la TEM, según nuestros modelos celulares de CPNM mutantes en *EGFR*, puede impulsar la adquisición de resistencia a los ITQs.
- La expresión de *GRHL2* está regulada por la metilación de su promotor en el CPNM, manteniendo el estado epitelial de las células.
- El silenciamiento de *GRHL2* induce la activación del fenotipo TEM, favoreciendo la migración y la adquisición de resistencia a los ITQs de EGFR en líneas celulares de CPNM.
- Los estudios *in vivo* en ratones muestran que la baja expresión de *GRHL2* se relaciona con un crecimiento más lento, mayor capacidad de formación de metástasis y mayor resistencia a los ITQs en tumores de CPNM con mutaciones en *EGFR*.
- *GRHL2* parece tener un papel dual en el CPNM. Por un lado, actuando como un gen supresor de tumores al frenar la TEM, y por otro como un oncogén, promoviendo la proliferación y supervivencia de las células tumorales.
- La metilación de *GRHL2* muestra potencial para ser un buen biomarcador epigenético de pronóstico y respuesta a fármacos en el CPNM mutante en *EGFR*.

Bibliografía

A Razak, S. A., Mohd Gazzali, A., Fisol, F. A., M Abdulbaqi, I., Parumasivam, T., Mohtar, N., & A Wahab, H. (2021). Advances in Nanocarriers for Effective Delivery of Docetaxel in the Treatment of Lung Cancer: An Overview. *Cancers*, 13(3), 400. <https://doi.org/10.3390/cancers13030400>.

Adams, J. M., & Cory, S. (2007). Bcl-2-regulated apoptosis: Mechanism and therapeutic potential. *Current Opinion in Immunology*, 19(5), 488-496. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.05.004>.

Adjei, A. A. (2004). Pharmacology and mechanism of action of pemetrexed. *Clinical Lung Cancer*, 5 Suppl 2, S51-55. <https://doi.org/10.3816/clc.2004.s.003>.

Aiello, N. M., & Kang, Y. (2019). Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *The Journal of Experimental Medicine*, 216(5), 1016-1026. <https://doi.org/10.1084/jem.20181827>.

Alexander, M., Kim, S. Y., & Cheng, H. (2020). Update 2020: Management of Non-Small Cell Lung Cancer. *Lung*, 198(6), 897-907. <https://doi.org/10.1007/s00408-020-00407-5>.

Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A. J. R., Behjati, S., Biankin, A. V., Bignell, G. R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A.-L., Boyault, S., Burkhardt, B., Butler, A. P., Caldas, C., Davies, H. R., Desmedt, C., Eils, R., Eyfjörd, J. E., Foekens, J. A., ... Stratton, M. R. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500(7463), 415-421. <https://doi.org/10.1038/nature12477>.

Alvarado-Luna, G., & Morales-Espinosa, D. (2016). Treatment for small cell lung cancer, where are we now?-a review. *Translational Lung Cancer Research*, 5(1), 26-38. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2016.01.13>.

Ansari, J., Shackelford, R. E., & El-Osta, H. (2016). Epigenetics in non-small cell lung cancer: From basics to therapeutics. *Translational Lung Cancer Research*, 5(2), 155-171. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.02.02>.

Artandi, S. E., & DePinho, R. A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 9-18. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp268>.

Artemov, A. V., Zhenilo, S., Kaplun, D., Starshin, A., Sokolov, A., Mazur, A. M., Szpotan, J., Gawronski, M., Modrzejewska, M., Gackowski, D., & Prokhortchouk, E. B. (2022). An IDH-independent mechanism of DNA hypermethylation upon VHL inactivation in cancer. *Epigenetics*, 17(8), 894-905. <https://doi.org/10.1080/15592294.2021.1971372>.

Aryee, M. J., Jaffe, A. E., Corrada-Bravo, H., Ladd-Acosta, C., Feinberg, A. P., Hansen, K. D., & Irizarry, R. A. (2014). Minfi: A flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(10), 1363-1369. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu049>.

Aue, A., Hinze, C., Walentin, K., Ruffert, J., Yurtdas, Y., Werth, M., Chen, W., Rabien, A., Kilic, E., Schulzke, J.-D., Schumann, M., & Schmidt-Ott, K. M. (2015). A Grainyhead-Like 2/Ovo-Like 2 Pathway Regulates Renal Epithelial Barrier Function and Lumen Expansion. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 26(11), 2704-2715. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014080759>.

Azad, N., Zahnow, C. A., Rudin, C. M., & Baylin, S. B. (2013). The future of epigenetic therapy in solid tumours—Lessons from the past. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *10*(5), 256-266. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.42>.

Bade, B. C., & Dela Cruz, C. S. (2020). Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine*, *41*(1), 1-24. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>.

Bai, X., Li, Y., Li, Y., Li, F., Che, N., Ni, C., Zhao, N., Zhao, X., & Liu, T. (2021). *GRHL2 is a Candidate Prognostic and Immunotherapy Biomarker in Breast Cancer* [Preprint]. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-999774/v1>.

Bai, X., Li, Y., Li, Y., Li, F., Che, N., Ni, C., Zhao, N., Zhao, X., & Liu, T. (2022). GRHL2 Expression Functions in Breast Cancer Aggressiveness and Could Serve as Prognostic and Diagnostic Biomarker for Breast Cancer. *Clinical Medicine Insights. Oncology*, *16*, 11795549221109512. <https://doi.org/10.1177/11795549221109511>.

Balak, M. N., Gong, Y., Riely, G. J., Somwar, R., Li, A. R., Zakowski, M. F., Chiang, A., Yang, G., Querfelli, O., Kris, M. G., Ladanyi, M., Miller, V. A., & Pao, W. (2006). Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *12*(21), 6494-6501. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1570>.

Balgkouranidou, I., Liloglou, T., & Lianidou, E. S. (2013). Lung cancer epigenetics: Emerging biomarkers. *Biomarkers in Medicine*, *7*(1), 49-58. <https://doi.org/10.2217/bmm.12.111>.

Barnes, T. A., O’Kane, G. M., Vincent, M. D., & Leighl, N. B. (2017). Third-Generation Tyrosine Kinase Inhibitors Targeting Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Frontiers in Oncology*, *7*, 113. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00113>.

Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A. A., Kim, S., Wilson, C. J., Lehár, J., Kryukov, G. V., Sonkin, D., Reddy, A., Liu, M., Murray, L., Berger, M. F., Monahan, J. E., Morais, P., Meltzer, J., Korejwa, A., Jané-Valbuena, J., ... Garraway, L. A. (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*, *483*(7391), 603-607. <https://doi.org/10.1038/nature11003>.

Basu, S., Cheriyaundath, S., & Ben-Ze’ev, A. (2018). Cell-cell adhesion: Linking Wnt/ β -catenin signaling with partial EMT and stemness traits in tumorigenesis. *F1000Research*, *7*, F1000 Faculty Rev-1488. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15782.1>.

Baylin, S. B., & Jones, P. A. (2011). A decade of exploring the cancer epigenome—Biological and translational implications. *Nature Reviews Cancer*, *11*(10), Art. 10. <https://doi.org/10.1038/nrc3130>.

Bean, J., Brennan, C., Shih, J.-Y., Riely, G., Viale, A., Wang, L., Chitale, D., Motoi, N., Szoke, J., Broderick, S., Balak, M., Chang, W.-C., Yu, C.-J., Gazdar, A., Pass, H., Rusch, V., Gerald, W., Huang, S.-F., Yang, P.-C., ... Pao, W. (2007). MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- America*, 104(52), 20932-20937. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710370104>.
- Becker, J. H., Gao, Y., Soucheray, M., Pulido, I., Kikuchi, E., Rodríguez, M. L., Gandhi, R., Lafuente-Sanchis, A., Aupí, M., Alcácer Fernández-Coronado, J., Martín-Martorell, P., Cremades, A., Galbis-Caravajal, J. M., Alcácer, J., Christensen, C. L., Simms, P., Hess, A., Asahina, H., Kahle, M. P., ... Shimamura, T. (2019). CXCR7 Reactivates ERK Signaling to Promote Resistance to EGFR Kinase Inhibitors in NSCLC. *Cancer Research*, 79(17), 4439-4452. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0024>.
- Belinsky, S. A., Klinge, D. M., Stidley, C. A., Issa, J.-P., Herman, J. G., March, T. H., & Baylin, S. B. (2003). Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. *Cancer Research*, 63(21), 7089-7093.
- Belinsky, S. A., Nikula, K. J., Palmisano, W. A., Michels, R., Saccomanno, G., Gabrielson, E., Baylin, S. B., & Herman, J. G. (1998). Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(20), 11891-11896. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.11891>.
- Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., & Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behavioural Brain Research*, 125(1-2), 279-284. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00297-2](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00297-2).
- Berdasco, M., & Esteller, M. (2019). Clinical epigenetics: Seizing opportunities for translation. *Nature Reviews. Genetics*, 20(2), 109-127. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0074-2>.
- Blandin Knight, S., Crosbie, P. A., Balata, H., Chudziak, J., Hussell, T., & Dive, C. (2017). Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open Biology*, 7(9), 170070. <https://doi.org/10.1098/rsob.170070>.
- Boveri, T. (1902). *Über mehrpolige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. [Concerning multipolar mitoses as a means of analysing the cell nucleus.]* C. Kabitzch, Würzburg and Verh. d. phys. med. Ges. zu Würzburg. N.F.
- Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A., & Weinberg, R. A. (2018). EMT in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 18(2), 128-134. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.118>.
- Brodowicz, T., Krzakowski, M., Zwitter, M., Tzekova, V., Ramlau, R., Ghilezan, N., Ciuleanu, T., Cucevic, B., Gyurkovits, K., Ulsperger, E., Jassem, J., Grgic, M., Saip, P., Szilasi, M., Wiltschke, C., Wagnerova, M., Oskina, N., Soldatenkova, V., Zielinski, C., ... Central European Cooperative Oncology Group CECOG. (2006). Cisplatin and gemcitabine first-line chemotherapy followed by maintenance gemcitabine or best supportive care in advanced non-small cell lung cancer: A phase III trial. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 52(2), 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2006.01.006>.
- Buonato, J. M., & Lazzara, M. J. (2014). ERK1/2 blockade prevents epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells and promotes their sensitivity to EGFR inhibition. *Cancer Research*, 74(1), 309-319. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4721>.

Burkhardt, D. L., & Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews. Cancer*, 8(9), 671-682. <https://doi.org/10.1038/nrc2399>.

Byers, L. A., Diao, L., Wang, J., Saintigny, P., Girard, L., Peyton, M., Shen, L., Fan, Y., Giri, U., Tumula, P. K., Nilsson, M. B., Gudikote, J., Tran, H., Cardnell, R. J. G., Bearss, D. J., Warner, S. L., Foulks, J. M., Kanner, S. B., Gandhi, V., ... Heymach, J. V. (2013). An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(1), 279-290. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1558>.

Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myöhänen, S., Herman, J. G., & Baylin, S. B. (1999). Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature Genetics*, 21(1), 103-107. <https://doi.org/10.1038/5047>.

Cancer Cell Line Encyclopedia Consortium & Genomics of Drug Sensitivity in Cancer Consortium. (2015). Pharmacogenomic agreement between two cancer cell line data sets. *Nature*, 528(7580), 84-87. <https://doi.org/10.1038/nature15736>.

Cao, J., He, Y., Liu, H.-Q., Wang, S.-B., Zhao, B.-C., & Cheng, Y.-S. (2015). MicroRNA 192 regulates chemo-resistance of lung adenocarcinoma for gemcitabine and cisplatin combined therapy by targeting Bcl-2. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(8), 12397-12403.

Cao, Y.-N., Li, Q.-Z., & Liu, Y.-X. (2022). Discovered Key CpG Sites by Analyzing DNA Methylation and Gene Expression in Breast Cancer Samples. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 815843. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.815843>.

Carmona, F. J., Davalos, V., Vidal, E., Gomez, A., Heyn, H., Hashimoto, Y., Vizoso, M., Martinez-Cardus, A., Sayols, S., Ferreira, H. J., Sánchez-Mut, J. V., Morán, S., Margelí, M., Castella, E., Berdasco, M., Stefansson, O. A., Eyfjord, J. E., Gonzalez-Suarez, E., Dopazo, J., ... Esteller, M. (2014). A Comprehensive DNA Methylation Profile of Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Research*, 74(19), 5608-5619. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3659>.

Castello, A., Rossi, S., & Lopci, E. (2020). 18F-FDG PET/CT in Restaging and Evaluation of Response to Therapy in Lung Cancer: State of the Art. *Current Radiopharmaceuticals*, 13(3), 228-237. <https://doi.org/10.2174/1874471013666191230144821>.

Chan, B. A., & Hughes, B. G. M. (2015). Targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current standards and the promise of the future. *Translational Lung Cancer Research*, 4(1), 36-54. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2014.05.01>.

Chang, Y.-S., Tu, S.-J., Chen, Y.-C., Liu, T.-Y., Lee, Y.-T., Yen, J.-C., Fang, H.-Y., & Chang, J.-G. (2021). Mutation profile of non-small cell lung cancer revealed by next generation sequencing. *Respiratory Research*, 22(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01608-5>.

Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Monville, F., Finetti, P., Adélaïde, J., Cervera, N., Fekairi, S., Xerri, L., Jacquemier, J., Birnbaum, D., & Bertucci, F. (2006). Gene expression

profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene*, 25(15), 2273-2284. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209254>..

Chen, M., & Zhao, H. (2019). Next-generation sequencing in liquid biopsy: Cancer screening and early detection. *Human Genomics*, 13(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s40246-019-0220-8>.

Chen, W., Dong, Q., Shin, K.-H., Kim, R. H., Oh, J.-E., Park, N.-H., & Kang, M. K. (2010). Grainyhead-like 2 enhances the human telomerase reverse transcriptase gene expression by inhibiting DNA methylation at the 5'-CpG island in normal human keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(52), 40852-40863. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.103812>.

Chen, Z., Fillmore, C. M., Hammerman, P. S., Kim, C. F., & Wong, K.-K. (2014). Non-small-cell lung cancers: A heterogeneous set of diseases. *Nature Reviews. Cancer*, 14(8), 535-546. <https://doi.org/10.1038/nrc3775>.

Chuang, C.-H., Chen, H.-L., Chang, H.-M., Tsai, Y.-C., Wu, K.-L., Chen, I.-H., Chen, K.-C., Lee, J.-Y., Chang, Y.-C., Chen, C.-L., Tu, Y.-K., Hung, J.-Y., Yang, C.-J., & Chong, I.-W. (2021). Systematic Review and Network Meta-Analysis of Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Inhibitors for Treatment-Naïve ALK-Positive Lung Cancer. *Cancers*, 13(8), 1966. <https://doi.org/10.3390/cancers13081966>.

Chung, V. Y., Tan, T. Z., Tan, M., Wong, M. K., Kuay, K. T., Yang, Z., Ye, J., Muller, J., Koh, C. M., Guccione, E., Thiery, J. P., & Huang, R. Y.-J. (2016). GRHL2-miR-200-ZEB1 maintains the epithelial status of ovarian cancer through transcriptional regulation and histone modification. *Scientific Reports*, 6, 19943. <https://doi.org/10.1038/srep19943>.

Chung, V. Y., Tan, T. Z., Ye, J., Huang, R.-L., Lai, H.-C., Kappei, D., Wollmann, H., Guccione, E., & Huang, R. Y.-J. (2019). The role of GRHL2 and epigenetic remodeling in epithelial-mesenchymal plasticity in ovarian cancer cells. *Communications Biology*, 2, 272. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0506-3>.

Cieply, B., Farris, J., Denvir, J., Ford, H. L., & Frisch, S. M. (2013). Epithelial-mesenchymal transition and tumor suppression are controlled by a reciprocal feedback loop between ZEB1 and Grainyhead-like-2. *Cancer Research*, 73(20), 6299-6309. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4082>.

Cieply, B., Riley, P., Pifer, P. M., Widmeyer, J., Addison, J. B., Ivanov, A. V., Denvir, J., & Frisch, S. M. (2012). Suppression of the epithelial-mesenchymal transition by Grainyhead-like-2. *Cancer Research*, 72(9), 2440-2453. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-4038>.

Clavé, S., Rodon, N., Pijuan, L., Díaz, O., Lorenzo, M., Rocha, P., Taus, Á., Blanco, R., Bosch-Barrera, J., Reguart, N., de la Torre, N., Oliveras, G., Espinet, B., Bellosillo, B., Puig, X., Arriola, E., & Salido, M. (2019). Next-generation Sequencing for ALK and ROS1 Rearrangement Detection in Patients With Non-small-cell Lung Cancer: Implications of FISH-positive Patterns. *Clinical Lung Cancer*, 20(4), e421-e429. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2019.02.008>.

Coldren, C. D., Helfrich, B. A., Witta, S. E., Sugita, M., Lapadat, R., Zeng, C., Barón, A., Franklin, W. A., Hirsch, F. R., Geraci, M. W., & Bunn, P. A. (2006). Baseline gene

expression predicts sensitivity to gefitinib in non-small cell lung cancer cell lines. *Molecular Cancer Research: MCR*, 4(8), 521-528. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0095>.

Constâncio, V., Nunes, S. P., Henrique, R., & Jerónimo, C. (2020). DNA Methylation-Based Testing in Liquid Biopsies as Detection and Prognostic Biomarkers for the Four Major Cancer Types. *Cells*, 9(3), 624. <https://doi.org/10.3390/cells9030624>.

Costa, D. B., Halmos, B., Kumar, A., Schumer, S. T., Huberman, M. S., Boggon, T. J., Tenen, D. G., & Kobayashi, S. (2007). BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Medicine*, 4(10), 1669-1679; discussion 1680. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040315>.

Cowan, L. A., Talwar, S., & Yang, A. S. (2010). Will DNA methylation inhibitors work in solid tumors? A review of the clinical experience with azacitidine and decitabine in solid tumors. *Epigenomics*, 2(1), 71-86. <https://doi.org/10.2217/epi.09.44>.

Crawford, Y., Kasman, I., Yu, L., Zhong, C., Wu, X., Modrusan, Z., Kaminker, J., & Ferrara, N. (2009). PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell*, 15(1), 21-34. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.12.004>.

Crusz, S. M., & Balkwill, F. R. (2015). Inflammation and cancer: Advances and new agents. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 12(10), 584-596. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.105>.

Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364-378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.

de Groot, P. M., Wu, C. C., Carter, B. W., & Munden, R. F. (2018). The epidemiology of lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 7(3), 220-233. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2018.05.06>.

de Mello, R. A., Neves, N. M., Tadokoro, H., Amaral, G. A., Castelo-Branco, P., & Zia, V. A. de A. (2020). New Target Therapies in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Review of the Literature and Future Perspectives. *Journal of Clinical Medicine*, 9(11), E3543. <https://doi.org/10.3390/jcm9113543>.

de Sousa, V. M. L., & Carvalho, L. (2018). Heterogeneity in Lung Cancer. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*, 85(1-2), 96-107. <https://doi.org/10.1159/000487440>.

Della Corte, C. M., Ciaramella, V., Cardone, C., La Monica, S., Alfieri, R., Petronini, P. G., Malapelle, U., Vigliar, E., Pepe, F., Troncone, G., Castellone, M. D., Troiani, T., Martinelli, E., Ciardiello, F., & Morgillo, F. (2018). Antitumor Efficacy of Dual Blockade of EGFR Signaling by Osimertinib in Combination With Selumetinib or Cetuximab in Activated EGFR Human NCLC Tumor Models. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 13(6), 810-820. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.02.025>.

Derman, B. A., Mileham, K. F., Bonomi, P. D., Batus, M., & Fidler, M. J. (2015). Treatment

of advanced squamous cell carcinoma of the lung: A review. *Translational Lung Cancer Research*, 4(5), 524-532. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2015.06.07>.

Derynck, R., Muthusamy, B. P., & Saeteurn, K. Y. (2014). Signaling pathway cooperation in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition. *Current Opinion in Cell Biology*, 31, 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.09.001>.

Drilon, A., Cappuzzo, F., Ou, S.-H. I., & Camidge, D. R. (2017). Targeting MET in Lung Cancer: Will Expectations Finally Be MET? *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 12(1), 15-26. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.10.014>.

Duffy, M. J. (2007). Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review. *European Journal of Internal Medicine*, 18(3), 175-184. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2006.12.001>.

Duruiseaux, M., & Esteller, M. (2018). Lung cancer epigenetics: From knowledge to applications. *Seminars in Cancer Biology*, 51, 116-128. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.09.005>.

Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A., & Jaenisch, R. (2003). Chromosomal Instability and Tumors Promoted by DNA Hypomethylation. *Science*, 300(5618), 455-455. <https://doi.org/10.1126/science.1083557>.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.

Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Gale, C.-M., Lifshits, E., Gonzales, A. J., Shimamura, T., Zhao, F., Vincent, P. W., Naumov, G. N., Bradner, J. E., Althaus, I. W., Gandhi, L., Shapiro, G. I., Nelson, J. M., Heymach, J. V., Meyerson, M., Wong, K.-K., & Jänne, P. A. (2007a). PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib. *Cancer Research*, 67(24), 11924-11932. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1885>.

Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J. O., Lindeman, N., Gale, C.-M., Zhao, X., Christensen, J., Kosaka, T., Holmes, A. J., Rogers, A. M., Cappuzzo, F., Mok, T., Lee, C., Johnson, B. E., Cantley, L. C., & Jänne, P. A. (2007b). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5827), 1039-1043. <https://doi.org/10.1126/science.1141478>.

Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics*, 8(4), Art. 4. <https://doi.org/10.1038/nrg2005>.

Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *The New England Journal of Medicine*, 358(11), Art. 11. <https://doi.org/10.1056/NEJMra072067>.

Fang, C., & Kang, Y. (2021). E-Cadherin: Context-Dependent Functions of a Quintessential Epithelial Marker in Metastasis. *Cancer Research*, 81(23), 5800-5802. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-3302>.

Farha NG & Kasi A. (2022). Farha NG, Kasi A. Docetaxel. [Updated 2022 Feb 24]. In:

StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537242/> [StatPearls]. *Docetaxel*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537242/>.

Farhat, F. S., Ghosn, M. G., & Kattan, J. G. (2015). Oral vinorelbine plus cisplatin followed by maintenance oral vinorelbine as first-line treatment for advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 76(2), 235-242. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2785-9>.

Feinberg, A. P., & Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 111(1), Art. 1. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(83\)80115-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(83)80115-6).

Fenicia, V., Abdolrahimzadeh, S., Mannino, G., Verrilli, S., Balestrieri, M., & Recupero, S. M. (2014). Intravitreal bevacizumab in the successful management of choroidal metastases secondary to lung and breast cancer unresponsive to systemic therapy: A case series. *Eye (London, England)*, 28(7), 888-891. <https://doi.org/10.1038/eye.2014.96>.

Ferrer, I., Zugazagoitia, J., Herbertz, S., John, W., Paz-Ares, L., & Schmid-Bindert, G. (2018). KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 124, 53-64. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.07.013>.

Flam, E. L., Danilova, L., Kelley, D. Z., Stavrovskaya, E., Guo, T., Considine, M., Qian, J., Califano, J. A., Favorov, A., Fertig, E. J., & Gaykalova, D. A. (2019). Differentially Methylated Super-Enhancers Regulate Target Gene Expression in Human Cancer. *Scientific Reports*, 9(1), 15034. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51018-x>.

Flavahan, W. A., Gaskell, E., & Bernstein, B. E. (2017). Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 357(6348), Art. 6348. <https://doi.org/10.1126/science.aal2380>.

Fraga, M. F., Herranz, M., Espada, J., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Erkek, E., Bozdogan, O., Peinado, H., Niveleau, A., Mao, J.-H., Balmain, A., Cano, A., & Esteller, M. (2004). A Mouse Skin Multistage Carcinogenesis Model Reflects the Aberrant DNA Methylation Patterns of Human Tumors. *Cancer Research*, 64(16), 5527-5534. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-4061>.

Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315-2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.

Galle, E., Thienpont, B., Cappuyns, S., Venken, T., Busschaert, P., Van Haele, M., Van Cutsem, E., Roskams, T., van Pelt, J., Verslype, C., Dekervel, J., & Lambrechts, D. (2020). DNA methylation-driven EMT is a common mechanism of resistance to various therapeutic agents in cancer. *Clinical Epigenetics*, 12(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s13148-020-0821-z>.

Gan, L., Yang, Y., Li, Q., Feng, Y., Liu, T., & Guo, W. (2018). Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: From biological insights to therapeutic potential. *Biomarker Research*, 6, 10. <https://doi.org/10.1186/s40364-018-0122-2>.

Gao, X., Vockley, C. M., Pauli, F., Newberry, K. M., Xue, Y., Randell, S. H., Reddy, T. E., & Hogan, B. L. M. (2013). Evidence for multiple roles for grainyhead-like 2 in the establishment and maintenance of human mucociliary airway epithelium.[corrected]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(23), 9356-9361. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307589110>.

Gazdar, A. F., Bunn, P. A., & Minna, J. D. (2017). Small-cell lung cancer: What we know, what we need to know and the path forward. *Nature Reviews Cancer*, *17*(12), 725-737. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.87>.

Giordano, T. J. (2014). The cancer genome atlas research network: A sight to behold. *Endocrine Pathology*, *25*(4), 362-365. <https://doi.org/10.1007/s12022-014-9345-4>.

Gkoutakos, A., Delfino, P., Lawlor, R. T., Scarpa, A., Corbo, V., & Bria, E. (2021). Harnessing the epigenome to boost immunotherapy response in non-small cell lung cancer patients. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, *13*, 175883592110069. <https://doi.org/10.1177/17588359211006947>.

Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, J., Rami-Porta, R., Asamura, H., Eberhardt, W. E. E., Nicholson, A. G., Groome, P., Mitchell, A., Bolejack, V., Goldstraw, P., Rami-Porta, R., Asamura, H., Ball, D., Beer, D. G., Beyruti, R., Bolejack, V., Chansky, K., Crowley, J., ... Yokoi, K. (2016). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, *11*(1), 39-51. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2015.09.009>.

Grigore, A. D., Jolly, M. K., Jia, D., Farach-Carson, M. C., & Levine, H. (2016). Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *Journal of Clinical Medicine*, *5*(5), 51. <https://doi.org/10.3390/jcm5050051>.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, *140*(6), 883-899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>.

Gupta, N., Hatoum, H., & Dy, G. K. (2014). First line treatment of advanced non-small-cell lung cancer—Specific focus on albumin bound paclitaxel. *International Journal of Nanomedicine*, *9*, 209-221. <https://doi.org/10.2147/IJN.S41770>.

Han, X., Wang, J., & Sun, Y. (2017). Circulating Tumor DNA as Biomarkers for Cancer Detection. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, *15*(2), 59-72. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.12.004>.

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), Art. 1. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), Art. 5. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Hannoodee, M., & Mittal, M. (2022). Methotrexate. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556114/>.

Hao, Y., Baker, D., & Ten Dijke, P. (2019). TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(11), E2767. <https://doi.org/10.3390/ijms20112767>.

Harrison, P. T., Vyse, S., & Huang, P. H. (2020). Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Seminars in Cancer Biology*, *61*, 167-179. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.09.015>.

Hascher, A., Haase, A.-K., Hebestreit, K., Rohde, C., Klein, H.-U., Rius, M., Jungen, D., Witten, A., Stoll, M., Schulze, I., Ogawa, S., Wiewrodt, R., Tickenbrock, L., Berdel, W. E., Dugas, M., Thoenissen, N. H., & Müller-Tidow, C. (2014). DNA methyltransferase inhibition reverses epigenetically embedded phenotypes in lung cancer preferentially affecting polycomb target genes. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *20*(4), 814-826. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1483>.

Hashida, S., Yamamoto, H., Shien, K., Miyoshi, Y., Ohtsuka, T., Suzawa, K., Watanabe, M., Maki, Y., Soh, J., Asano, H., Tsukuda, K., Miyoshi, S., & Toyooka, S. (2015). Acquisition of cancer stem cell-like properties in non-small cell lung cancer with acquired resistance to afatinib. *Cancer Science*, *106*(10), 1377-1384. <https://doi.org/10.1111/cas.12749>.

He, J., Feng, C., Zhu, H., Wu, S., Jin, P., & Xu, T. (2020). Grainyhead-like 2 as a double-edged sword in development and cancer. *American Journal of Translational Research*, *12*(2), 310-331.

Ho, G. Y., Woodward, N., & Coward, J. I. G. (2016). Cisplatin versus carboplatin: Comparative review of therapeutic management in solid malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *102*, 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.03.014>.

Hochhegger, B., Alves, G. R. T., Irion, K. L., Fritscher, C. C., Fritscher, L. G., Concatto, N. H., & Marchiori, E. (2015). PET/CT imaging in lung cancer: Indications and findings. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, *41*(3), 264-274. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132015000004479>.

Holding, A. N., Giorgi, F. M., Donnelly, A., Cullen, A. E., Nagarajan, S., Selth, L. A., & Markowitz, F. (2019). VULCAN integrates ChIP-seq with patient-derived co-expression networks to identify GRHL2 as a key co-regulator of ERa at enhancers in breast cancer. *Genome Biology*, *20*(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1698-z>.

Holla, V. R., Elamin, Y. Y., Bailey, A. M., Johnson, A. M., Litzenburger, B. C., Khotskaya, Y. B., Sanchez, N. S., Zeng, J., Shufean, M. A., Shaw, K. R., Mendelsohn, J., Mills, G. B., Meric-Bernstam, F., & Simon, G. R. (2017). ALK: A tyrosine kinase target for cancer therapy. *Cold Spring Harbor Molecular Case Studies*, *3*(1), a001115. <https://doi.org/10.1101/mcs.a001115>.

Holland, A. J., & Cleveland, D. W. (2009). Boveri revisited: Chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10*(7), 478-487. <https://doi.org/10.1038/nrm2718>.

Hollern, D. P., Swiatnicki, M. R., & Andrechek, E. R. (2018). Histological subtypes of mouse mammary tumors reveal conserved relationships to human cancers. *PLoS*

Genetics, 14(1), e1007135. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007135>.

Hsu, P.-C., Jablons, D. M., Yang, C.-T., & You, L. (2019). Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Pathway, Yes-Associated Protein (YAP) and the Regulation of Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), E3821. <https://doi.org/10.3390/ijms20153821>.

Hu, K. (2002). [The meaning of epigenetics]. *Yi Chuan = Hereditas*, 24(6), 734-738.

Hua, J., Ma, C., Wang, C. H., Wang, Y., Feng, S., Xiao, T., & Zhu, C. (2022). Abnormal GRHL2 Methylation Confers Malignant Progression to Acute Leukemia. *Applied Bionics and Biomechanics*, 2022, 9708829. <https://doi.org/10.1155/2022/9708829>.

Huang, R. Y.-J., Wong, M. K., Tan, T. Z., Kuay, K. T., Ng, A. H. C., Chung, V. Y., Chu, Y.-S., Matsumura, N., Lai, H.-C., Lee, Y. F., Sim, W.-J., Chai, C., Pietschmann, E., Mori, S., Low, J. J. H., Choolani, M., & Thiery, J. P. (2013). An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). *Cell Death & Disease*, 4(11), e915. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.442>.

Hussain, M. R. M., Baig, M., Mohamoud, H. S. A., Ulhaq, Z., Hoessli, D. C., Khogeer, G. S., Al-Sayed, R. R., & Al-Aama, J. Y. (2015). BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(4), 359-373. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.10.002>.

Ibanez de Caceres, I., Cortes-Sempere, M., Moratilla, C., Machado-Pinilla, R., Rodriguez-Fanjul, V., Manguán-García, C., Cejas, P., López-Ríos, F., Paz-Ares, L., de CastroCarpeño, J., Nistal, M., Belda-Iniesta, C., & Perona, R. (2010). IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, 29(11), 1681-1690. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.454>.

Imielinski, M., Berger, A. H., Hammerman, P. S., Hernandez, B., Pugh, T. J., Hodis, E., Cho, J., Suh, J., Capelletti, M., Sivachenko, A., Sougnez, C., Auclair, D., Lawrence, M. S., Stojanov, P., Cibulskis, K., Choi, K., de Waal, L., Sharifnia, T., Brooks, A., ... Meyerson, M. (2012). Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell*, 150(6), 1107-1120. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.029>.

Imyanitov, E. N., Iyevleva, A. G., & Levchenko, E. V. (2021). Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current status and perspectives. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 157, 103194. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103194>.

Iorio, F., Knijnenburg, T. A., Vis, D. J., Bignell, G. R., Menden, M. P., Schubert, M., Aben, N., Gonçalves, E., Barthorpe, S., Lightfoot, H., Cokelaer, T., Greninger, P., van Dyk, E., Chang, H., de Silva, H., Heyn, H., Deng, X., Egan, R. K., Liu, Q., ... Garnett, M. J. (2016). A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer. *Cell*, 166(3), 740-754. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.017>.

Irizarry, R. A., Wu, H., & Feinberg, A. P. (2009). A species-generalized probabilistic model-based definition of CpG islands. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 20(9-10), 674-680.

<https://doi.org/10.1007/s00335-009-9222-5>.

Jaeger, J., Koczan, D., Thiesen, H.-J., Ibrahim, S. M., Gross, G., Spang, R., & Kunz, M. (2007). Gene expression signatures for tumor progression, tumor subtype, and tumor thickness in laser-microdissected melanoma tissues. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *13*(3), 806-815. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1820>.

Jeggo, P. A., Pearl, L. H., & Carr, A. M. (2016). DNA repair, genome stability and cancer: A historical perspective. *Nature Reviews Cancer*, *16*(1), 35-42. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.4>.

Jia, Y., Yun, C.-H., Park, E., Ercan, D., Manuia, M., Juarez, J., Xu, C., Rhee, K., Chen, T., Zhang, H., Palakurthi, S., Jang, J., Lelais, G., DiDonato, M., Bursulaya, B., Michellys, P.-Y., Epple, R., Marsilje, T. H., McNeill, M., ... Eck, M. J. (2016). Overcoming EGFR(T790M) and EGFR(C797S) resistance with mutant-selective allosteric inhibitors. *Nature*, *534*(7605), 129-132. <https://doi.org/10.1038/nature17960>.

Jiang, W. G., Sanders, A. J., Katoh, M., Ungefroren, H., Gieseler, F., Prince, M., Thompson, S. K., Zollo, M., Spano, D., Dhawan, P., Sliva, D., Subbarayan, P. R., Sarkar, M., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A. G., Amedei, A., Niccolai, E., Amin, A., ... Santini, D. (2015). Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Seminars in Cancer Biology*, *35*, S244-S275. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2015.03.008>.

Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews. Genetics*, *13*(7), 484-492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>.

Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, *128*(4), 683-692. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.029>.

Juergens, R. A., Wrangle, J., Vendetti, F. P., Murphy, S. C., Zhao, M., Coleman, B., Sebree, R., Rodgers, K., Hooker, C. M., Franco, N., Lee, B., Tsai, S., Delgado, I. E., Rudek, M. A., Belinsky, S. A., Herman, J. G., Baylin, S. B., Brock, M. V., & Rudin, C. M. (2011). Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discovery*, *1*(7), 598-607. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0214>.

Kaimori, A., Potter, J., Kaimori, J.-Y., Wang, C., Mezey, E., & Koteish, A. (2007). Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(30), 22089-22101. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700998200>.

Kalachand, R. D., Stordal, B., Madden, S., Chandler, B., Cunningham, J., Goode, E. L., Ruscito, I., Braicu, E. I., Sehouli, J., Ignatov, A., Yu, H., Katsaros, D., Mills, G. B., Lu, K. H., Carey, M. S., Timms, K. M., Kupryjanczyk, J., Rzepecka, I. K., Podgorska, A., ... Hennessy, B. T. (2020). BRCA1 Promoter Methylation and Clinical Outcomes in Ovarian Cancer: An Individual Patient Data Meta-Analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, *112*(12), 1190-1203. <https://doi.org/10.1093/jnci/djaa070>.

Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(6), 1420-1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.

- Kanwal, R., & Gupta, S. (2012). Epigenetic modifications in cancer. *Clinical Genetics*, 81(4), 303-311. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01809.x>.
- Kashima, J., Kitadai, R., & Okuma, Y. (2019). Molecular and Morphological Profiling of Lung Cancer: A Foundation for “Next-Generation” Pathologists and Oncologists. *Cancers*, 11(5), 599. <https://doi.org/10.3390/cancers11050599>.
- Kawachi, A., Yamashita, S., Okochi-Takada, E., Hirakawa, A., Tsuda, H., Shimomura, A., Kojima, Y., Yonemori, K., Fujiwara, Y., Kinoshita, T., Ushijima, T., & Tamura, K. (2020). BRCA1 promoter methylation in breast cancer patients is associated with response to olaparib/eribulin combination therapy. *Breast Cancer Research and Treatment*, 181(2), 323-329. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05647-w>.
- Keir, M. E., Liang, S. C., Guleria, I., Latchman, Y. E., Qipo, A., Albacker, L. A., Koulmanda, M., Freeman, G. J., Sayegh, M. H., & Sharpe, A. H. (2006). Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(4), 883-895. <https://doi.org/10.1084/jem.20051776>.
- Keppens, C., Dequeker, E. M., Pauwels, P., Ryska, A., 't Hart, N., & von der Thüsen, J. H. (2021). PD-L1 immunohistochemistry in non-small-cell lung cancer: Unraveling differences in staining concordance and interpretation. *Virchows Archiv*, 478(5), 827-839. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02976-5>.
- Khan, M., Lin, J., Liao, G., Tian, Y., Liang, Y., Li, R., Liu, M., & Yuan, Y. (2018). ALK Inhibitors in the Treatment of ALK Positive NSCLC. *Frontiers in Oncology*, 8, 557. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00557>.
- Kim, D. H., Xing, T., Yang, Z., Dudek, R., Lu, Q., & Chen, Y.-H. (2017). Epithelial Mesenchymal Transition in Embryonic Development, Tissue Repair and Cancer: A Comprehensive Overview. *Journal of Clinical Medicine*, 7(1), E1. <https://doi.org/10.3390/jcm7010001>.
- Kim, H., Kwon, Y. M., Kim, J. S., Han, J., Shim, Y. M., Park, J., & Kim, D.-H. (2006). Elevated mRNA levels of DNA methyltransferase-1 as an independent prognostic factor in primary nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, 107(5), 1042-1049. <https://doi.org/10.1002/cncr.22087>.
- Klein, C. A. (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nature Reviews. Cancer*, 9(4), 302-312. <https://doi.org/10.1038/nrc2627>.
- Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M. H., Abudu, Y. P., Acevedo-Arozena, A., Adamopoulos, I. E., Adeli, K., Adolph, T. E., Adornetto, A., Aflaki, E., Agam, G., Agarwal, A., Aggarwal, B. B., Agnello, M., ... Tong, C.-K. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. *Autophagy*, 17(1), 1-382. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>.
- Klug, Cummings, M. R., Spencer, C. A., Palladino, M. A., & Killian, D. J. (2019). *Concepts of genetics (12th ed., global ed.)*. Pearson Education.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., Palladino, M. A., & Killian, D. J. (2020). *Concepts of genetics (Twelfth edition, global edition)*. Pearson.

Koch, A., Joosten, S. C., Feng, Z., de Ruijter, T. C., Draht, M. X., Melotte, V., Smits, K. M., Veeck, J., Herman, J. G., Van Neste, L., Van Criekinge, W., De Meyer, T., & van Engeland, M. (2018). Analysis of DNA methylation in cancer: Location revisited. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *15*(7), 459-466. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0004-4>.

Kopan, R. (2012). Notch signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(10), a011213. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011213>.

Kriegsmann, K., Zgorzelski, C., Muley, T., Christopoulos, P., Thomas, M., Winter, H., Eichhorn, M., Eichhorn, F., von Winterfeld, M., Herpel, E., Goeppert, B., Stenzinger, A., Herth, F. J. F., Warth, A., & Kriegsmann, M. (2021). Role of Synaptophysin, Chromogranin and CD56 in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung lacking morphological features of neuroendocrine differentiation: A retrospective large-scale study on 1170 tissue samples. *BMC Cancer*, *21*(1), 486. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08140-9>.

Krishnamurthy, K., Mishra, T. K., Saxena, A., Daga, M. K., Khurana, N., Masroor, M., & Jamatia, E. (2019). Evaluating NISCH and CDH1 Promoter Hypermethylation in Nonsmokers, Cancer Free Smokers and Lung Cancer Patients: A Case Control Study. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *34*(4), 458-464. <https://doi.org/10.1007/s12291-018-0767-5>.

Kulasingam, V., & Diamandis, E. P. (2008). Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nature Clinical Practice. Oncology*, *5*(10), 588-599. <https://doi.org/10.1038/ncponc1187>.

Kuleshov, M. V., Jones, M. R., Rouillard, A. D., Fernandez, N. F., Duan, Q., Wang, Z., Koplev, S., Jenkins, S. L., Jagodnik, K. M., Lachmann, A., McDermott, M. G., Monteiro, C. D., Gundersen, G. W., & Ma'ayan, A. (2016). Enrichr: A comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Research*, *44*(W1), W90-97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw377>.

Kulis, M., & Esteller, M. (2010). DNA methylation and cancer. *Advances in Genetics*, *70*, 27-56. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2>.

Kurzrock, R., & Stewart, D. J. (2017). Exploring the Benefit/Risk Associated with Antiangiogenic Agents for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *23*(5), 1137-1148. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1968>.

La Monica, S., Madeddu, D., Tiseo, M., Vivo, V., Galetti, M., Cretella, D., Bonelli, M., Fumarola, C., Cavazzoni, A., Falco, A., Gervasi, A., Lagrasta, C. A., Naldi, N., Barocelli, E., Ardizzoni, A., Quaini, F., Petronini, P. G., & Alfieri, R. (2016). Combination of Gefitinib and Pemetrexed Prevents the Acquisition of TKI Resistance in NSCLC Cell Lines Carrying EGFR-Activating Mutation. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, *11*(7), 1051-1063. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.03.006>.

Lachat, C., Peixoto, P., & Hervouet, E. (2021). Epithelial to Mesenchymal Transition History: From Embryonic Development to Cancers. *Biomolecules*, *11*(6), 782. <https://doi.org/10.3390/biom11060782>.

- Lee, S. J., Jeon, H.-S., Jang, J.-S., Park, S. H., Lee, G. Y., Lee, B.-H., Kim, C. H., Kang, Y. M., Lee, W. K., Kam, S., Park, R. W., Kim, I.-S., Cho, Y. L., Jung, T. H., & Park, J. Y. (2005). DNMT3B polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Carcinogenesis*, *26*(2), 403-409. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh307>.
- Leonetti, A., Sharma, S., Minari, R., Perego, P., Giovannetti, E., & Tiseo, M. (2019). Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, *121*(9), 725-737. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0573-8>.
- Lerner, A. D., & Feller-Kopman, D. (2017). Bronchoscopic Techniques Used in the Diagnosis and Staging of Lung Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, *15*(5), 640-647. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2017.0065>.
- Li, D., Ambrogio, L., Shimamura, T., Kubo, S., Takahashi, M., Chirieac, L. R., Padera, R. F., Shapiro, G. I., Baum, A., Himmelsbach, F., Rettig, W. J., Meyerson, M., Solca, F., Greulich, H., & Wong, K.-K. (2008). BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene*, *27*(34), 4702-4711. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.109>.
- Li, L., Gu, X., Yue, J., Zhao, Q., Lv, D., Chen, H., & Xu, L. (2017). Acquisition of EGFR TKI resistance and EMT phenotype is linked with activation of IGF1R/NF-κB pathway in EGFR-mutant NSCLC. *Oncotarget*, *8*(54), 92240-92253. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21170>.
- Li, Q., Wang, R., Yang, Z., Li, W., Yang, J., Wang, Z., Bai, H., Cui, Y., Tian, Y., Wu, Z., Guo, Y., Xu, J., Wen, L., He, J., Tang, F., & Wang, J. (2022). Molecular profiling of human non-small cell lung cancer by single-cell RNA-seq. *Genome Medicine*, *14*(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s13073-022-01089-9>.
- Li, X., Yao, X., Wang, Y., Hu, F., Wang, F., Jiang, L., Liu, Y., Wang, D., Sun, G., & Zhao, Y. (2013). MLH1 promoter methylation frequency in colorectal cancer patients and related clinicopathological and molecular features. *PloS One*, *8*(3), e59064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059064>.
- Licchesi, J. D. F., Westra, W. H., Hooker, C. M., & Herman, J. G. (2008). Promoter hypermethylation of hallmark cancer genes in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *14*(9), 2570-2578. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2033>.
- Lin, J. J., Ritterhouse, L. L., Ali, S. M., Bailey, M., Schrock, A. B., Gainor, J. F., Ferris, L. A., Mino-Kenudson, M., Miller, V. A., Iafrate, A. J., Lennerz, J. K., & Shaw, A. T. (2017). ROS1 Fusions Rarely Overlap with Other Oncogenic Drivers in Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, *12*(5), 872-877. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.01.004>.
- Liu, B., Song, J., Luan, J., Sun, X., Bai, J., Wang, H., Li, A., Zhang, L., Feng, X., & Du, Z. (2016). Promoter methylation status of tumor suppressor genes and inhibition of expression of DNA methyltransferase 1 in non-small cell lung cancer. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *241*(14), 1531-1539. <https://doi.org/10.1177/1535370216645211>.
- Liu, C., Lv, D., Li, M., Zhang, X., Sun, G., Bai, Y., & Chang, D. (2017). Hypermethylation of

miRNA-589 promoter leads to upregulation of HDAC5 which promotes malignancy in non-small cell lung cancer. *International Journal of Oncology*, 50(6), Art. 6. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3967>.

Locke, W. J., Guanzon, D., Ma, C., Liew, Y. J., Duesing, K. R., Fung, K. Y. C., & Ross, J. P. (2019). DNA Methylation Cancer Biomarkers: Translation to the Clinic. En *Frontiers in Genetics* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01150>.

Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Haserlat, S. M., Supko, J. G., Haluska, F. G., Louis, D. N., Christiani, D. C., Settleman, J., & Haber, D. A. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England Journal of Medicine*, 350(21), 2129-2139. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040938>.

Ma, L., Yan, H., Zhao, H., & Sun, J. (2017). Grainyhead-like 2 in development and cancer. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(5), 1010428317698375. <https://doi.org/10.1177/1010428317698375>.

Maity, S., Pai, K. S. R., & Nayak, Y. (2020). Advances in targeting EGFR allosteric site as anti-NSCLC therapy to overcome the drug resistance. *Pharmacological Reports: PR*, 72(4), 799-813. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00131-0>.

Martínez-Jiménez, F., Muiños, F., Sentís, I., Deu-Pons, J., Reyes-Salazar, I., Arnedo-Pac, C., Mularoni, L., Pich, O., Bonet, J., Kranas, H., Gonzalez-Perez, A., & Lopez-Bigas, N. (2020). A compendium of mutational cancer driver genes. *Nature Reviews. Cancer*, 20(10), 555-572. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0290-x>.

Martorell-Marugán, J., González-Rumayor, V., & Carmona-Sáez, P. (2019). mCSEA: Detecting subtle differentially methylated regions. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 35(18), 3257-3262. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz096>.

Marx, V. (2012). Epigenetics: Reading the second genomic code. *Nature*, 491(7422), 143-147. <https://doi.org/10.1038/491143a>.

Maximchik, P. V., Kulikov, A. V., Zhivotovsky, B. D., & Gogvadze, V. G. (2016). Cellular energetics as a target for tumor cell elimination. *Biochemistry (Moscow)*, 81(2), 65-79. <https://doi.org/10.1134/S0006297916020012>.

Mayekar, M. K., & Bivona, T. G. (2017). Current Landscape of Targeted Therapy in Lung Cancer. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 102(5), 757-764. <https://doi.org/10.1002/cpt.810>.

Mayor, R., & Etienne-Manneville, S. (2016). The front and rear of collective cell migration. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(2), 97-109. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.14>.

McCormack, P. L., & Keam, S. J. (2008). Bevacizumab: A review of its use in metastatic colorectal cancer. *Drugs*, 68(4), 487-506. <https://doi.org/10.2165/00003495-200868040-00009>.

Medina, P. P., Carretero, J., Fraga, M. F., Esteller, M., Sidransky, D., & Sanchez-Cespedes,

M. (2004). Genetic and epigenetic screening for gene alterations of the chromatin-remodeling factor, SMARCA4/BRG1, in lung tumors. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 41(2), 170-177. <https://doi.org/10.1002/gcc.20068>.

Mehrazarin, S., Chen, W., Oh, J.-E., Liu, Z. X., Kang, K. L., Yi, J. K., Kim, R. H., Shin, K.-H., Park, N.-H., & Kang, M. K. (2015). The p63 Gene Is Regulated by Grainyhead-like 2 (GRHL2) through Reciprocal Feedback and Determines the Epithelial Phenotype in Human Keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(32), 19999-20008. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.659144>.

Mok, T., Ahn, M.-J., Han, J.-Y., Kang, J. H., Katakami, N., Kim, H., Hodge, R., Ghiorghiu, D. C., Cantarini, M., Wu, Y.-L., Papadimitrakopoulou, V., & Garassino, M. C. (2017). CNS response to osimertinib in patients (pts) with T790M-positive advanced NSCLC: Data from a randomized phase III trial (AURA3). *Journal of Clinical Oncology*, 35(15_suppl), 9005-9005. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.9005.

Mok, T. S., Wu, Y.-L., Ahn, M.-J., Garassino, M. C., Kim, H. R., Ramalingam, S. S., Shepherd, F. A., He, Y., Akamatsu, H., Theelen, W. S. M. E., Lee, C. K., Sebastian, M., Templeton, A., Mann, H., Marotti, M., Ghiorghiu, S., Papadimitrakopoulou, V. A., & AURA3 Investigators. (2017). Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 376(7), 629-640. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1612674>.

Mok, T. S., Wu, Y.-L., Thongprasert, S., Yang, C.-H., Chu, D.-T., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Han, B., Margono, B., Ichinose, Y., Nishiwaki, Y., Ohe, Y., Yang, J.-J., Chewaskulyong, B., Jiang, H., Duffield, E. L., Watkins, C. L., Armour, A. A., & Fukuoka, M. (2009). Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 361(10), 947-957. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810699>.

Mooney, S. M., Talebian, V., Jolly, M. K., Jia, D., Gromala, M., Levine, H., & McConkey, B. J. (2017). The GRHL2/ZEB Feedback Loop-A Key Axis in the Regulation of EMT in Breast Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(9), 2559-2570. <https://doi.org/10.1002/jcb.25974>.

Moran, S., Arribas, C., & Esteller, M. (2016). Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics*, 8(3), 389-399. <https://doi.org/10.2217/epi.15.114>.

Mountain, C. F., Carr, D. T., & Anderson, W. A. D. (1974). A SYSTEM FOR THE CLINICAL STAGING OF LUNG CANCER. *American Journal of Roentgenology*, 120(1), 130-138. <https://doi.org/10.2214/ajr.120.1.130>.

Mustachio, L. M., & Roszik, J. (2020). Current Targeted Therapies for the Fight against Non-Small Cell Lung Cancer. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 13(11), E374. <https://doi.org/10.3390/ph13110374>.

Nakata, S., Sugio, K., Uramoto, H., Oyama, T., Hanagiri, T., Morita, M., & Yasumoto, K. (2006). The methylation status and protein expression of CDH1, p16INK4A, and fragile histidine triad in nonsmall cell lung carcinoma: Epigenetic silencing, clinical features, and prognostic significance. *Cancer*, 106(10), 2190-2199. <https://doi.org/10.1002/cncr.21870>.

Neal, J. W., Gainor, J. F., & Shaw, A. T. (2015). Developing biomarker-specific end points in lung cancer clinical trials. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *12*(3), 135-146. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.222>.

Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability—An evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *11*(3), 220-228. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>.

Nie, Y., Ding, Y., & Yang, M. (2020). GRHL2 Upregulation Predicts a Poor Prognosis and Promotes the Resistance of Serous Ovarian Cancer to Cisplatin. *OncoTargets and Therapy*, *13*, 6303-6314. <https://doi.org/10.2147/OTT.S250412>.

Nishino, H., Takano, S., Yoshitomi, H., Suzuki, K., Kagawa, S., Shimazaki, R., Shimizu, H., Furukawa, K., Miyazaki, M., & Ohtsuka, M. (2017). Grainyhead-like 2 (GRHL2) regulates epithelial plasticity in pancreatic cancer progression. *Cancer Medicine*, *6*(11), 2686-2696. <https://doi.org/10.1002/cam4.1212>.

Niv, Y. (2007). Microsatellite instability and MLH1 promoter hypermethylation in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, *13*(12), 1767-1769. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i12.1767>.

Nooreldeen, R., & Bach, H. (2021). Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), 8661. <https://doi.org/10.3390/ijms22168661>.

Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (New York, N.Y.)*, *194*(4260), 23-28. <https://doi.org/10.1126/science.959840>.

O'Leary, C., Gasper, H., Sahin, K. B., Tang, M., Kulasinghe, A., Adams, M. N., Richard, D. J., & O'Byrne, K. J. (2020). Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC). *Pharmaceuticals*, *13*(10), 273. <https://doi.org/10.3390/ph13100273>.

Onder, T. T., Gupta, P. B., Mani, S. A., Yang, J., Lander, E. S., & Weinberg, R. A. (2008). Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Research*, *68*(10), 3645-3654. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2938>.

Onoi, K., Chihara, Y., Uchino, J., Shimamoto, T., Morimoto, Y., Iwasaku, M., Kaneko, Y., Yamada, T., & Takayama, K. (2020). Immune Checkpoint Inhibitors for Lung Cancer Treatment: A Review. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(5), 1362. <https://doi.org/10.3390/jcm9051362>.

Orvis, T., Hepperla, A., Walter, V., Song, S., Simon, J., Parker, J., Wilkerson, M. D., Desai, N., Major, M. B., Hayes, D. N., Davis, I. J., & Weissman, B. (2014). BRG1/SMARCA4 inactivation promotes non-small cell lung cancer aggressiveness by altering chromatin organization. *Cancer Research*, *74*(22), 6486-6498. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0061>.

Oser, M. G., Niederst, M. J., Sequist, L. V., & Engelman, J. A. (2015). Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: Molecular drivers and cells of origin. *The Lancet. Oncology*, *16*(4), e165-172. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71180-](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71180-)

5.

Paez, J. G., Jänne, P. A., Lee, J. C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F. J., Lindeman, N., Boggan, T. J., Naoki, K., Sasaki, H., Fujii, Y., Eck, M. J., Sellers, W. R., Johnson, B. E., & Meyerson, M. (2004). EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science (New York, N.Y.)*, *304*(5676), 1497-1500. <https://doi.org/10.1126/science.1099314>.

Palanca-Ballester, C., Hervas, D., Villalba, M., Valdes-Sanchez, T., Garcia, D., Alcoriza-Balaguer, M. I., Benet, M., Martinez-Tomas, R., Briones-Gomez, A., Galbis-Caravajal, J., Calvo, A., Juan, O., Lahoz, A., Cases, E., & Sandoval, J. (2022). Translation of a tissue epigenetic signature to circulating free DNA suggests BCAT1 as a potential noninvasive diagnostic biomarker for lung cancer. *Clinical Epigenetics*, *14*(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s13148-022-01334-3>.

Palanca-Ballester, C., Rodriguez-Casanova, A., Torres, S., Calabuig-Fariñas, S., Exposito, F., Serrano, D., Redin, E., Valencia, K., Jantus-Lewintre, E., Diaz-Lagares, A., Montuenga, L., Sandoval, J., & Calvo, A. (2021). Cancer Epigenetic Biomarkers in Liquid Biopsy for High Incidence Malignancies. *Cancers*, *13*(12), 3016. <https://doi.org/10.3390/cancers13123016>.

Pan, B., Wei, Z.-X., Zhang, J.-X., Li, X., Meng, Q.-W., Cao, Y.-Y., Qi, L.-S., & Yu, Y. (2021). The value of AGR2 and KRT5 as an immunomarker combination in distinguishing lung squamous cell carcinoma from adenocarcinoma. *American Journal of Translational Research*, *13*(5), 4464-4476.

Pan, X., Zhang, R., Xie, C., Gan, M., Yao, S., Yao, Y., Jin, J., Han, T., Huang, Y., Gong, Y., Wang, J., & Yu, B. (2017). GRHL2 suppresses tumor metastasis via regulation of transcriptional activity of RhoG in non-small cell lung cancer. *American Journal of Translational Research*, *9*(9), 4217-4226.

Pandya, P. H., Murray, M. E., Pollok, K. E., & Renbarger, J. L. (2016). The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches. *Journal of Immunology Research*, *2016*, 4273943. <https://doi.org/10.1155/2016/4273943>.

Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, *12*(4), 252-264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>.

Passaro, A., Jänne, P. A., Mok, T., & Peters, S. (2021). Overcoming therapy resistance in EGFR-mutant lung cancer. *Nature Cancer*, *2*(4), 377-391. <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00195-8>.

PDQ Adult Treatment Editorial Board. (2002). Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version. En *PDQ Cancer Information Summaries*. National Cancer Institute (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66043/>.

Perez-Oquendo, M., & Gibbons, D. L. (2022). Regulation of ZEB1 Function and Molecular Associations in Tumor Progression and Metastasis. *Cancers*, *14*(8), 1864. <https://doi.org/10.3390/cancers14081864>.

Petrof, G., Nanda, A., Howden, J., Takeichi, T., McMillan, J. R., Aristodemou, S., Ozoemena, L., Liu, L., South, A. P., Pourreyron, C., Dafou, D., Proudfoot, L. E., Al-Ajmi, H.,

Akiyama, M., McLean, W. H. I., Simpson, M. A., Parsons, M., & McGrath, J. A. (2014). Mutations in GRHL2 result in an autosomal-recessive ectodermal Dysplasia syndrome. *American Journal of Human Genetics*, *95*(3), 308-314. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.08.001>.

Pistore, C., Giannoni, E., Colangelo, T., Rizzo, F., Magnani, E., Muccillo, L., Giurato, G., Mancini, M., Rizzo, S., Riccardi, M., Sahnane, N., Del Vescovo, V., Kishore, K., Mandruzzato, M., Macchi, F., Pelizzola, M., Denti, M. A., Furlan, D., Weisz, A., ... Bonapace, I. M. (2017). DNA methylation variations are required for epithelial-to-mesenchymal transition induced by cancer-associated fibroblasts in prostate cancer cells. *Oncogene*, *36*(40), 5551-5566. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.159>.

Pleasance, E. D., Cheetham, R. K., Stephens, P. J., McBride, D. J., Humphray, S. J., Greenman, C. D., Varela, I., Lin, M.-L., Ordóñez, G. R., Bignell, G. R., Ye, K., Alipaz, J., Bauer, M. J., Beare, D., Butler, A., Carter, R. J., Chen, L., Cox, A. J., Edkins, S., ... Stratton, M. R. (2010). A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature*, *463*(7278), 191-196. <https://doi.org/10.1038/nature08658>.

Plygawko, A. T., Kan, S., & Campbell, K. (2020). Epithelial-mesenchymal plasticity: Emerging parallels between tissue morphogenesis and cancer metastasis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *375*(1809), 20200087. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0087>.

Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, *28*(10), 1057-1068. <https://doi.org/10.1038/nbt.1685>.

Pulido, I., Ollosi, S., Aparisi, S., Becker, J. H., Aliena-Valero, A., Benet, M., Rodríguez, M. L., López, A., Tamayo-Torres, E., Chuliá-Peris, L., García-Cañaveras, J. C., Soucheray, M., Dalheim, A. V., Salom, J. B., Qiu, W., Kaja, S., Fernández-Coronado, J. A., Alandes, S., Alcácer, J., ... Shimamura, T. (2020). Endothelin-1-Mediated Drug Resistance in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Cancer Research*, *80*(19), 4224-4232. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0141>.

Qin, Q., Li, X., Liang, X., Zeng, L., Wang, J., Sun, L., & Zhong, D. (2021). Targeting the EMT transcription factor Snail overcomes resistance to osimertinib in EGFR-mutant non-small cell lung cancer. *Thoracic Cancer*, *12*(11), 1708-1715. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13906>.

Quan, Y., Jin, R., Huang, A., Zhao, H., Feng, B., Zang, L., & Zheng, M. (2014). Downregulation of GRHL2 inhibits the proliferation of colorectal cancer cells by targeting ZEB1. *Cancer Biology & Therapy*, *15*(7), 878-887. <https://doi.org/10.4161/cbt.28877>.

Quan, Y., Xu, M., Cui, P., Ye, M., Zhuang, B., & Min, Z. (2015). [Expression and clinical significance of GRHL2 in colorectal cancer]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi [Chinese Journal of Oncology]*, *37*(10), 764-768.

Rabindran, S. K., Discafani, C. M., Rosfjord, E. C., Baxter, M., Floyd, M. B., Golas, J., Hallett, W. A., Johnson, B. D., Nilakantan, R., Overbeek, E., Reich, M. F., Shen, R., Shi, X., Tsou, H.-R., Wang, Y.-F., & Wissner, A. (2004). Antitumor activity of HKI-272, an orally active, irreversible inhibitor of the HER-2 tyrosine kinase. *Cancer Research*, *64*(11), 3958-

3965. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2868>.

Radhakrishnan, V. M., Jensen, T. J., Cui, H., Futscher, B. W., & Martinez, J. D. (2011). Hypomethylation of the 14-3-3 σ promoter leads to increased expression in non-small cell lung cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *50*(10), 830-836. <https://doi.org/10.1002/gcc.20904>.

Ramalingam, S. S., Vansteenkiste, J., Planchard, D., Cho, B. C., Gray, J. E., Ohe, Y., Zhou, C., Reungwetwattana, T., Cheng, Y., Chewaskulyong, B., Shah, R., Cobo, M., Lee, K. H., Cheema, P., Tiseo, M., John, T., Lin, M.-C., Imamura, F., Kurata, T., ... FLAURA Investigators. (2020). Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *The New England Journal of Medicine*, *382*(1), 41-50. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1913662>.

Reguart, N., Rosell, R., Cardenal, F., Cardona, A. F., Isla, D., Palmero, R., Moran, T., Rolfo, C., Pallarès, M. C., Insa, A., Carcereny, E., Majem, M., De Castro, J., Queralt, C., Molina, M. A., & Taron, M. (2014). Phase I/II trial of vorinostat (SAHA) and erlotinib for non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations after erlotinib progression. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, *84*(2), 161-167. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.02.011>.

Reis, H., Metzenmacher, M., Goetz, M., Savvidou, N., Darwiche, K., Aigner, C., Herold, T., Eberhardt, W. E., Skiba, C., Hense, J., Virchow, I., Westerwick, D., Bogner, S., Ting, S., Kasper, S., Stuschke, M., Nensa, F., Herrmann, K., Hager, T., ... Wiesweg, M. (2018). MET Expression in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Effect on Clinical Outcomes of Chemotherapy, Targeted Therapy, and Immunotherapy. *Clinical Lung Cancer*, *19*(4), e441-e463. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2018.03.010>.

Rekhtman, N., Ang, D. C., Sima, C. S., Travis, W. D., & Moreira, A. L. (2011). Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *24*(10), 1348-1359. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.92>.

Rhee, J.-K., Kim, K., Chae, H., Evans, J., Yan, P., Zhang, B.-T., Gray, J., Spellman, P., Huang, T. H.-M., Nephew, K. P., & Kim, S. (2013). Integrated analysis of genome-wide DNA methylation and gene expression profiles in molecular subtypes of breast cancer. *Nucleic Acids Research*, *41*(18), 8464-8474. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt643>.

Ribatti, D., Tamma, R., & Annese, T. (2020). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Translational Oncology*, *13*(6), 100773. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100773>.

Rickman, D. S., Millon, R., De Reynies, A., Thomas, E., Wasylyk, C., Muller, D., Abecassis, J., & Wasylyk, B. (2008). Prediction of future metastasis and molecular characterization of head and neck squamous-cell carcinoma based on transcriptome and genome analysis by microarrays. *Oncogene*, *27*(51), 6607-6622. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.251>.

Root, D. E., Hacoheh, N., Hahn, W. C., Lander, E. S., & Sabatini, D. M. (2006). Genome-

scale loss-of-function screening with a lentiviral RNAi library. *Nature Methods*, 3(9), 715-719. <https://doi.org/10.1038/nmeth924>.

Rosen RD, Sapa A. (2022). TNM Classification. [Updated 2022 Feb 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553187/> [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553187/]. *StatPearls*.

Sabbah, D. A., Hajjo, R., & Sweidan, K. (2020). Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 20(10), 815-834. <https://doi.org/10.2174/1568026620666200303123102>.

Sacco, J. J., & Clague, M. J. (2015). Dysregulation of the Met pathway in non-small cell lung cancer: Implications for drug targeting and resistance. *Translational Lung Cancer Research*, 4(3), 242-252. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2015.03.05>.

Sahlgren, C., Gustafsson, M. V., Jin, S., Poellinger, L., & Lendahl, U. (2008). Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(17), 6392-6397. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802047105>.

Salazar, F., Molina, M. A., Sanchez-Ronco, M., Moran, T., Ramirez, J. L., Sanchez, J. M., Stahel, R., Garrido, P., Cobo, M., Isla, D., Bertran-Alamillo, J., Massuti, B., Cardenal, F., Manegold, C., Lianes, P., Trigo, J. M., Sanchez, J. J., Taron, M., & Rosell, R. (2011). First-line therapy and methylation status of CHFR in serum influence outcome to chemotherapy versus EGFR tyrosine kinase inhibitors as second-line therapy in stage IV non-small-cell lung cancer patients. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 72(1), 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.07.008>.

Saman, H., Raza, S. S., Uddin, S., & Rasul, K. (2020). Inducing Angiogenesis, a Key Step in Cancer Vascularization, and Treatment Approaches. *Cancers*, 12(5), 1172. <https://doi.org/10.3390/cancers12051172>.

Sandoval, J., Heyn, H., Moran, S., Serra-Musach, J., Pujana, M. A., Bibikova, M., & Esteller, M. (2011). Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics*, 6(6), 692-702. <https://doi.org/10.4161/epi.6.6.16196>.

Santamaria, P. G., Moreno-Bueno, G., Portillo, F., & Cano, A. (2017). EMT: Present and future in clinical oncology. *Molecular Oncology*, 11(7), 718-738. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12091>.

Sato, H., Shien, K., Tomida, S., Okayasu, K., Suzawa, K., Hashida, S., Torigoe, H., Watanabe, M., Yamamoto, H., Soh, J., Asano, H., Tsukuda, K., Miyoshi, S., & Toyooka, S. (2017). Targeting the miR-200c/LIN28B axis in acquired EGFR-TKI resistance non-small cell lung cancer cells harboring EMT features. *Scientific Reports*, 7, 40847. <https://doi.org/10.1038/srep40847>.

Scagliotti, G., Hanna, N., Fossella, F., Sugarman, K., Blatter, J., Peterson, P., Simms, L., & Shepherd, F. A. (2009). The differential efficacy of pemetrexed according to NSCLC histology: A review of two Phase III studies. *The Oncologist*, 14(3), 253-263. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0232>.

Scarpa, A., Sikora, K., Fassan, M., Rachiglio, A. M., Cappellesso, R., Antonello, D., Amato, E., Mafficini, A., Lambiase, M., Esposito, C., Bria, E., Simonato, F., Scardoni, M., Turri, G., Chilosi, M., Tortora, G., Fassina, A., & Normanno, N. (2013). Molecular Typing of Lung Adenocarcinoma on Cytological Samples Using a Multigene Next Generation Sequencing Panel. *PLoS ONE*, *8*(11), e80478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080478>.

Scher, M. B., Elbaum, M. B., Mogilevkin, Y., Hilbert, D. W., Mydlo, J. H., Sidi, A. A., Adelson, M. E., Mordechai, E., & Trama, J. P. (2012). Detecting DNA methylation of the BCL2, CDKN2A and NID2 genes in urine using a nested methylation specific polymerase chain reaction assay to predict bladder cancer. *The Journal of Urology*, *188*(6), 2101-2107. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.08.015>.

Schmidt, B., Liebenberg, V., Dietrich, D., Schlegel, T., Kneip, C., Seegebarth, A., Flemming, N., Seemann, S., Distler, J., Lewin, J., Tetzner, R., Weickmann, S., Wille, U., Liloglou, T., Raji, O., Walshaw, M., Fleischhacker, M., Witt, C., & Field, J. K. (2010). SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates. *BMC Cancer*, *10*, 600. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-600>.

Schneider, B. J., Saxena, A., & Downey, R. J. (2011). Surgery for early-stage small cell lung cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, *9*(10), 1132-1139. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2011.0094>.

Schrump, D. S., Fischette, M. R., Nguyen, D. M., Zhao, M., Li, X., Kunst, T. F., Hancox, A., Hong, J. A., Chen, G. A., Pishchik, V., Figg, W. D., Murgo, A. J., & Steinberg, S. M. (2006). Phase I study of decitabine-mediated gene expression in patients with cancers involving the lungs, esophagus, or pleura. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *12*(19), 5777-5785. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0669>.

Schwartzmann, G., Schunemann, H., Gorini, C. N., Filho, A. F., Garbino, C., Sabini, G., Muse, I., DiLeone, L., & Mans, D. R. (2000). A phase I trial of cisplatin plus decitabine, a new DNA-hypomethylating agent, in patients with advanced solid tumors and a follow-up early phase II evaluation in patients with inoperable non-small cell lung cancer. *Investigational New Drugs*, *18*(1), 83-91. <https://doi.org/10.1023/a:1006388031954>.

SEER Training Modules, Module Name. U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute. Day Month Year. (s. f.). *SEER Training Modules, Module Name. U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute. Day Month Year.* <<https://training.seer.cancer.gov/>>.

Selamat, S. A., Galler, J. S., Joshi, A. D., Fyfe, M. N., Campan, M., Siegmund, K. D., Kerr, K. M., & Laird-Offringa, I. A. (2011). DNA methylation changes in atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma in situ, and lung adenocarcinoma. *PLoS One*, *6*(6), e21443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021443>.

Sequist, L. V., Rolfe, L., & Allen, A. R. (2015). Rociletinib in EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *373*(6), 578-579. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1506831>.

Sequist, L. V., Waltman, B. A., Dias-Santagata, D., Digumarthy, S., Turke, A. B., Fidias, P., Bergethon, K., Shaw, A. T., Gettinger, S., Cosper, A. K., Akhavanfard, S., Heist, R. S.,

- Temel, J., Christensen, J. G., Wain, J. C., Lynch, T. J., Vernovsky, K., Mark, E. J., Lanuti, M., ... Engelman, J. A. (2011). Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Science Translational Medicine*, *3*(75), 75ra26. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002003>.
- Shen, J., Lv, X., & Zhang, L. (2020a). GRHL2 Acts as an Anti-Oncogene in Bladder Cancer by Regulating ZEB1 in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Process. *OncoTargets and Therapy*, *13*, 2511-2522. <https://doi.org/10.2147/OTT.S239120>.
- Shen, J., Lv, X., & Zhang, L. (2020b). GRHL2 Acts as an Anti-Oncogene in Bladder Cancer by Regulating ZEB1 in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Process. *OncoTargets and Therapy*, *13*, 2511-2522. <https://doi.org/10.2147/OTT.S239120>.
- 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. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>.
- Shivapurkar, N., & Gazdar, A. F. (2010). DNA methylation based biomarkers in non-invasive cancer screening. *Current Molecular Medicine*, *10*(2), 123-132. <https://doi.org/10.2174/156652410790963303>.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2017). Cancer Statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *67*(1), 7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21387>.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018: Cancer Statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(1), 7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *69*(1), 7-34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>.
- Singh, A., & Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: An emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, *29*(34), 4741-4751. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.215>.
- Situ, Y., Gao, R., Lei, L., Deng, L., Xu, Q., & Shao, Z. (2022). System analysis of FHIT in LUAD and LUSC: The expression, prognosis, gene regulation network, and regulation targets. *The International Journal of Biological Markers*, *37*(2), 158-169. <https://doi.org/10.1177/03936155221084056>.
- Sjöblom, T., Jones, S., Wood, L. D., Parsons, D. W., Lin, J., Barber, T. D., Mandelker, D., Leary, R. J., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Buckhaults, P., Farrell, C., Meeh, P., Markowitz, S. D., Willis, J., Dawson, D., Willson, J. K. V., Gazdar, A. F., ... Velculescu, V. E. (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science (New York, N.Y.)*, *314*(5797), 268-274. <https://doi.org/10.1126/science.1133427>.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., & Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, *82*(13), 1107-1112. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>.

Skoulidis, F., & Heymach, J. V. (2019). Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nature Reviews. Cancer*, *19*(9), 495-509. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0179-8>.

Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, *3*, Article3. <https://doi.org/10.2202/1544-6115.1027>.

Søes, S., Daugaard, I. L., Sørensen, B. S., Carus, A., Mattheisen, M., Alsner, J., Overgaard, J., Hager, H., Hansen, L. L., & Kristensen, L. S. (2014). Hypomethylation and increased expression of the putative oncogene ELMO3 are associated with lung cancer development and metastases formation. *Oncoscience*, *1*(5), 367-374. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.42>.

Somarelli, J. A., Shetler, S., Jolly, M. K., Wang, X., Bartholf Dewitt, S., Hish, A. J., Gilja, S., Eward, W. C., Ware, K. E., Levine, H., Armstrong, A. J., & Garcia-Blanco, M. A. (2016). Mesenchymal-Epithelial Transition in Sarcomas Is Controlled by the Combinatorial Expression of MicroRNA 200s and GRHL2. *Molecular and Cellular Biology*, *36*(19), 2503-2513. <https://doi.org/10.1128/MCB.00373-16>.

Song, S., Walter, V., Karaca, M., Li, Y., Bartlett, C. S., Smiraglia, D. J., Serber, D., Sproul, C. D., Plass, C., Zhang, J., Hayes, D. N., Zheng, Y., & Weissman, B. E. (2014). Gene silencing associated with SWI/SNF complex loss during NSCLC development. *Molecular Cancer Research: MCR*, *12*(4), 560-570. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0427>.

Soria, J.-C., Ohe, Y., Vansteenkiste, J., Reungwetwattana, T., Chewaskulyong, B., Lee, K. H., Dechaphunkul, A., Imamura, F., Nogami, N., Kurata, T., Okamoto, I., Zhou, C., Cho, B. C., Cheng, Y., Cho, E. K., Voon, P. J., Planchard, D., Su, W.-C., Gray, J. E., ... FLAURA Investigators. (2018). Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *378*(2), 113-125. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1713137>.

Soucheray, M., Capelletti, M., Pulido, I., Kuang, Y., Paweletz, C. P., Becker, J. H., Kikuchi, E., Xu, C., Patel, T. B., Al-Shahrour, F., Carretero, J., Wong, K.-K., Jänne, P. A., Shapiro, G. I., & Shimamura, T. (2015). Intratumoral Heterogeneity in EGFR-Mutant NSCLC Results in Divergent Resistance Mechanisms in Response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibition. *Cancer Research*, *75*(20), 4372-4383. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0377>.

Sporn, M. B. (1991). Carcinogenesis and cancer: Different perspectives on the same disease. *Cancer Research*, *51*(23 Pt 1), 6215-6218.

Stewart, D. J. (2014). Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *106*(1), djt356. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt356>.

Suda, K., Tomizawa, K., Fujii, M., Murakami, H., Osada, H., Maehara, Y., Yatabe, Y., Sekido, Y., & Mitsudomi, T. (2011). Epithelial to mesenchymal transition in an epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, *6*(7), 1152-1161. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318216ee52>.

Swanton, C., & Govindan, R. (2016). Clinical Implications of Genomic Discoveries in Lung

Cancer. *New England Journal of Medicine*, 374(19), 1864-1873. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1504688>.

Tam, W. L., & Weinberg, R. A. (2013). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature Medicine*, 19(11), Art. 11. <https://doi.org/10.1038/nm.3336>.

Teneng, I., Tellez, C. S., Picchi, M. A., Klinge, D. M., Yingling, C. M., Snider, A. M., Liu, Y., & Belinsky, S. A. (2015). Global identification of genes targeted by DNMT3b for epigenetic silencing in lung cancer. *Oncogene*, 34(5), 621-630. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.580>.

Tomasetti, C., Li, L., & Vogelstein, B. (2017). Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*, 355(6331), 1330-1334. <https://doi.org/10.1126/science.aaf9011>.

Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., Chirieac, L. R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D. B., Geisinger, K., Hirsch, F. R., Ishikawa, Y., Kerr, K. M., Noguchi, M., Pelosi, G., Powell, C. A., Tsao, M. S., Wistuba, I., & WHO Panel. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(9), 1243-1260. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>.

Turner, B. M., Cagle, P. T., Sainz, I. M., Fukuoka, J., Shen, S. S., & Jagirdar, J. (2012). Napsin A, a New Marker for Lung Adenocarcinoma, Is Complementary and More Sensitive and Specific Than Thyroid Transcription Factor 1 in the Differential Diagnosis of Primary Pulmonary Carcinoma: Evaluation of 1674 Cases by Tissue Microarray. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 136(2), 163-171. <https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0320-OA>.

Uysal, F., Ozturk, S., & Akkoyunlu, G. (2017). DNMT1, DNMT3A and DNMT3B proteins are differently expressed in mouse oocytes and early embryos. *Journal of Molecular Histology*, 48(5-6), 417-426. <https://doi.org/10.1007/s10735-017-9739-y>.

Vaclova, T., Chakraborty, A., Sherwood, J., Ross, S., Carroll, D., Barrett, J. C., Downward, J., & de Bruin, E. C. (2022). Concomitant KRAS mutations attenuate sensitivity of non-small cell lung cancer cells to KRAS G12C inhibition. *Scientific Reports*, 12(1), 2699. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06369-3>.

Vander Ark, A., Cao, J., & Li, X. (2018). TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling. *Cellular Signalling*, 52, 112-120. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.09.002>.

Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112-1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>.

Villa, J. C., Chiu, D., Brandes, A. H., Escorcía, F. E., Villa, C. H., Maguire, W. F., Hu, C.-J., de Stanchina, E., Simon, M. C., Sisodia, S. S., Scheinberg, D. A., & Li, Y.-M. (2014). Nontranscriptional role of Hif-1 α in activation of γ -secretase and notch signaling in breast cancer. *Cell Reports*, 8(4), 1077-1092. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.028>.

Walter, K., Holcomb, T., Januario, T., Du, P., Evangelista, M., Kartha, N., Iniguez, L.,

Soriano, R., Huw, L., Stern, H., Modrusan, Z., Seshagiri, S., Hampton, G. M., Amler, L. C., Bourgon, R., Yauch, R. L., & Shames, D. S. (2012). DNA methylation profiling defines clinically relevant biological subsets of non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(8), 2360-2373. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2635-T>.

Wan, J. C. M., Massie, C., Garcia-Corbacho, J., Mouliere, F., Brenton, J. D., Caldas, C., Pacey, S., Baird, R., & Rosenfeld, N. (2017). Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumour DNA. *Nature Reviews. Cancer*, 17(4), 223-238. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.7>.

Wang, G., Pan, J., Zhang, L., & Wang, C. (2019). Overexpression of grainyhead-like transcription factor 2 is associated with poor prognosis in human pancreatic carcinoma. *Oncology Letters*, 17(2), 1491-1496. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9741>.

Wang, L.-H., Wu, C.-F., Rajasekaran, N., & Shin, Y. K. (2018). Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(6), 2647-2693. <https://doi.org/10.1159/000495956>.

Wang, T., Li, N., Jin, L., Qi, X., Zhang, C., & Hua, D. (2020). The calcium pump PMCA4 prevents epithelial-mesenchymal transition by inhibiting NFATc1-ZEB1 pathway in gastric cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1867(12), 118833. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118833>.

Wang, Z., Li, Y., Kong, D., & Sarkar, F. H. (2010). The role of Notch signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition (EMT) during development and tumor aggressiveness. *Current Drug Targets*, 11(6), 745-751. <https://doi.org/10.2174/138945010791170860>.

Wang, Z., Wu, H., Daxinger, L., & Danen, E. H. (2020). *Genome-wide identification of binding sites of GRHL2 in luminal-like and basal A subtypes of breast cancer* [Preprint]. *Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1101/2020.02.13.946947>.

Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of General Physiology*, 8(6), 519-530. <https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>.

Webb, J. L., Burns, R. E., Brown, H. M., LeRoy, B. E., & Kosarek, C. E. (2009). Squamous cell carcinoma. *Compendium (Yardley, PA)*, 31(3), E9.

Wee, P., & Wang, Z. (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers*, 9(5), E52. <https://doi.org/10.3390/cancers9050052>.

Wei, E. K., Wolin, K. Y., & Colditz, G. A. (2010). Time Course of Risk Factors in Cancer Etiology and Progression. *Journal of Clinical Oncology*, 28(26), 4052-4057. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.9324>.

Wendt, M. K., Allington, T. M., & Schiemann, W. P. (2009). Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF-beta. *Future Oncology (London, England)*, 5(8), 1145-1168. <https://doi.org/10.2217/fon.09.90>.

Weng, C.-H., Chen, L.-Y., Lin, Y.-C., Shih, J.-Y., Lin, Y.-C., Tseng, R.-Y., Chiu, A.-C., Yeh, Y.-

H., Liu, C., Lin, Y.-T., Fang, J.-M., & Chen, C.-C. (2019). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) beyond EGFR mutations per se is a common mechanism for acquired resistance to EGFR TKI. *Oncogene*, *38*(4), 455-468. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0454-2>.

Werner, S., Frey, S., Riethdorf, S., Schulze, C., Alawi, M., Kling, L., Vafaizadeh, V., Sauter, G., Terracciano, L., Schumacher, U., Pantel, K., & Assmann, V. (2013). Dual roles of the transcription factor grainyhead-like 2 (GRHL2) in breast cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(32), 22993-23008. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.456293>.

Werth, M., Walentin, K., Aue, A., Schönheit, J., Wuebken, A., Pode-Shakked, N., Vilianovitch, L., Erdmann, B., Dekel, B., Bader, M., Barasch, J., Rosenbauer, F., Luft, F. C., & Schmidt-Ott, K. M. (2010). The transcription factor grainyhead-like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex. *Development (Cambridge, England)*, *137*(22), 3835-3845. <https://doi.org/10.1242/dev.055483>.

Willett, C. G., Boucher, Y., di Tomaso, E., Duda, D. G., Munn, L. L., Tong, R. T., Chung, D. C., Sahani, D. V., Kalva, S. P., Kozin, S. V., Mino, M., Cohen, K. S., Scadden, D. T., Hartford, A. C., Fischman, A. J., Clark, J. W., Ryan, D. P., Zhu, A. X., Blaszkowsky, L. S., ... Jain, R. K. (2004). Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nature Medicine*, *10*(2), 145-147. <https://doi.org/10.1038/nm988>.

Williamson, S. K., Crowley, J. J., Livingston, R. B., Panella, T. J., & Goodwin, J. W. (1995). Phase II trial and cost analysis of fazarabine in advanced non-small cell carcinoma of the lung: A Southwest Oncology Group study. *Investigational New Drugs*, *13*(1), 67-71. <https://doi.org/10.1007/BF02614223>.

Witta, S. E., Jotte, R. M., Konduri, K., Neubauer, M. A., Spira, A. I., Ruxer, R. L., Varella-Garcia, M., Bunn, P. A., & Hirsch, F. R. (2012). Randomized phase II trial of erlotinib with and without entinostat in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed on prior chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *30*(18), 2248-2255. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.9411>.

Wood, D. E., Eapen, G. A., Ettinger, D. S., Hou, L., Jackman, D., Kazerooni, E., Klippenstein, D., Lackner, R. P., Leard, L., Leung, A. N. C., Massion, P. P., Meyers, B. F., Munden, R. F., Otterson, G. A., Peairs, K., Pipavath, S., Pratt-Pozo, C., Reddy, C., Reid, M. E., ... Yang, S. C. (2012). Lung Cancer Screening. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, *10*(2), 240-265. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2012.0022>.

Wood, D. E., Kazerooni, E. A., Baum, S. L., Eapen, G. A., Ettinger, D. S., Hou, L., Jackman, D. M., Klippenstein, D., Kumar, R., Lackner, R. P., Leard, L. E., Lennes, I. T., Leung, A. N. C., Makani, S. S., Massion, P. P., Mazzone, P., Merritt, R. E., Meyers, B. F., Midthun, D. E., ... Hughes, M. (2018). Lung Cancer Screening, Version 3.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, *16*(4), 412-441. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2018.0020>.

Wrangle, J., Machida, E. O., Danilova, L., Hulbert, A., Franco, N., Zhang, W., Glöckner, S. C., Tessema, M., Van Neste, L., Easwaran, H., Schuebel, K. E., Licchesi, J., Hooker, C. M., Ahuja, N., Amano, J., Belinsky, S. A., Baylin, S. B., Herman, J. G., & Brock, M. V. (2014). Functional identification of cancer-specific methylation of CDO1, HOXA9, and TAC1 for

the diagnosis of lung cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(7), 1856-1864. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2109>.

Xiang, J., Fu, X., Ran, W., & Wang, Z. (2017). Grhl2 reduces invasion and migration through inhibition of TGF β -induced EMT in gastric cancer. *Oncogenesis*, 6(1), e284. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2016.83>.

Xiang, M., Colevas, A. D., Holsinger, F. C., Le, Q.-T. X., & Beadle, B. M. (2019). Survival After Definitive Chemoradiotherapy With Concurrent Cisplatin or Carboplatin for Head and Neck Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 17(9), 1065-1073. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2019.7297>.

Xiang, X., Deng, Z., Zhuang, X., Ju, S., Mu, J., Jiang, H., Zhang, L., Yan, J., Miller, D., & Zhang, H.-G. (2012). Grhl2 determines the epithelial phenotype of breast cancers and promotes tumor progression. *PLoS One*, 7(12), e50781. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050781>.

Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, 19(2), 156-172. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.5>.

Xu, T., Zhang, X., Zhang, S., Liu, C., Fu, W., Zeng, C., & Chen, Y. (2020). Imaging features and prognostic value of 18F-FDG PET/CT detection of soft-tissue metastasis from lung cancer: A retrospective study. *BMC Cancer*, 20(1), 596. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07080-0>.

Xu, Y., Li, Q., Li, X.-Y., Yang, Q.-Y., Xu, W.-W., & Liu, G.-L. (2012). Short-term anti-vascular endothelial growth factor treatment elicits vasculogenic mimicry formation of tumors to accelerate metastasis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 31, 16. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-16>.

Xue, Y., Zhang, L., Zhu, Y., Ke, X., Wang, Q., & Min, H. (2019). Regulation of Proliferation and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) of Gastric Cancer by ZEB1 via Modulating Wnt5a and Related Mechanisms. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 25, 1663-1670. <https://doi.org/10.12659/MSM.912338>.

Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H. L., Fuxe, J., García de Herreros, A., Goodall, G. J., Hadjantonakis, A.-K., Huang, R. Y. J., Kalchauer, C., ... EMT International Association (TEMTIA). (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21(6), 341-352. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>.

Yang, Z., Wu, D., Chen, Y., Min, Z., & Quan, Y. (2019). GRHL2 inhibits colorectal cancer progression and metastasis via oppressing epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biology & Therapy*, 20(9), 1195-1205. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1599664>.

Yoneda, K., Imanishi, N., Ichiki, Y., & Tanaka, F. (2019). Treatment of Non-small Cell Lung Cancer with EGFR-mutations. *Journal of UOEH*, 41(2), 153-163. <https://doi.org/10.7888/juoeh.41.153>.

- Yoshida, T., Song, L., Bai, Y., Kinose, F., Li, J., Ohaegbulam, K. C., Muñoz-Antonia, T., Qu, X., Eschrich, S., Uramoto, H., Tanaka, F., Nasarre, P., Gemmill, R. M., Roche, J., Drabkin, H. A., & Haura, E. B. (2016). ZEB1 Mediates Acquired Resistance to the Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One*, *11*(1), e0147344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147344>.
- Yuan, M., Huang, L.-L., Chen, J.-H., Wu, J., & Xu, Q. (2019). The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *4*, 61. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0099-9>.
- Yuan, X., Ji, W., Chen, S., Bao, Y., Tan, S., Lu, S., Wu, K., & Chu, Q. (2016). A novel paclitaxel-loaded poly(d,l-lactide-co-glycolide)-Tween 80 copolymer nanoparticle overcoming multidrug resistance for lung cancer treatment. *International Journal of Nanomedicine*, *11*, 2119-2131. <https://doi.org/10.2147/IJN.S92271>.
- Zeisberg, M., & Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(6), 1429-1437. <https://doi.org/10.1172/JCI36183>.
- Zhang, C., Yu, W., Wang, L., Zhao, M., Guo, Q., Lv, S., Hu, X., & Lou, J. (2017). DNA Methylation Analysis of the SHOX2 and RASSF1A Panel in Bronchoalveolar Lavage Fluid for Lung Cancer Diagnosis. *Journal of Cancer*, *8*(17), 3585-3591. <https://doi.org/10.7150/jca.21368>.
- Zhang, H., Qi, J., Reyes, J. M., Li, L., Rao, P. K., Li, F., Lin, C. Y., Perry, J. A., Lawlor, M. A., Federation, A., De Raedt, T., Li, Y. Y., Liu, Y., Duarte, M. A., Zhang, Y., Herter-Sprie, G. S., Kikuchi, E., Carretero, J., Perou, C. M., ... Wong, K.-K. (2016). Oncogenic Deregulation of EZH2 as an Opportunity for Targeted Therapy in Lung Cancer. *Cancer Discovery*, *6*(9), 1006-1021. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0164>.
- Zhang, K., Wang, J., Yang, L., Yuan, Y.-C., Tong, T. R., Wu, J., Yun, X., Bonner, M., Pageni, R., Liu, Z., Yuchi, T., Kim, J. Y., & Raz, D. J. (2018). Targeting histone methyltransferase G9a inhibits growth and Wnt signaling pathway by epigenetically regulating HP1 α and APC2 gene expression in non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer*, *17*(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0896-8>.
- Zhang, N., Liu, Y., Wang, Y., Zhao, M., Tu, L., & Luo, F. (2017). Decitabine reverses TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer by regulating miR-200/ZEB axis. *Drug Design, Development and Therapy*, *11*, 969-983. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S129305>.
- Zhang, X.-H., Rao, M., Lopriato, J. A., Hong, J. A., Zhao, M., Chen, G.-Z., Humphries, A. E., Nguyen, D. M., Trepel, J. B., Yu, X., & Schrupp, D. S. (2008). Aurora A, Aurora B and survivin are novel targets of transcriptional regulation by histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cancer Biology & Therapy*, *7*(9), 1388-1397. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.9.6415>.
- Zhang, Y., Wang, R., Song, H., Huang, G., Yi, J., Zheng, Y., Wang, J., & Chen, L. (2011). Methylation of multiple genes as a candidate biomarker in non-small cell lung cancer. *Cancer Letters*, *303*(1), 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.12.011>.
- Zheng, H., & Kang, Y. (2014). Multilayer control of the EMT master regulators. *Oncogene*,

33(14), 1755-1763. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.128>.

Zheng, M. (2016). Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 25(3), 447-468. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2016.02.003>.

Zhou, X., Lu, X., Wu, H., Liu, J., & Huang, H. (2021). Diagnostic performance of SHOX2 promoter methylation as biomarker for lung cancer identification: A meta-analysis update. *Thoracic Cancer*, 12(24), 3327-3332. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.14206>.

Zhu, H., Hou, L., Liu, J., & Li, Z. (2016). MiR-217 is down-regulated in psoriasis and promotes keratinocyte differentiation via targeting GRHL2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 471(1), 169-176. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.157>.

Zhu, X., Chen, L., Liu, L., & Niu, X. (2019). EMT-Mediated Acquired EGFR-TKI Resistance in NSCLC: Mechanisms and Strategies. *Frontiers in Oncology*, 9, 1044. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01044>.