



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO
DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**CARCINOMA DE PULMÓN NO CELULA PEQUEÑA,
CON MUTACIÓN DE KRAS: DIFERENCIACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE SUBTIPOS, ASÍ COMO DE LOS
DIFERENTES MECANISMOS DE RESISTENCIA, PARA
LA ELABORACIÓN DE TRATAMIENTOS DIRIGIDOS**

Tesis para optar al grado de doctor

Presentada por

María de los Llanos Gil Moreno

Directores:

**Rafael Rosell Costa
Niki Karachaliou**

Tutor:

Evarist Feliu Frasnado

Barcelona, 2018

+

Dr. Rafael Rosell Costa, Doctor en Medicina y Director del Programa de Biología y Medicina Personalizada del Cáncer del Instituto Català d' Oncologia de l' Hospital Germans Trias i Pujol

Dra. Niki Karachaliou, Doctora en Medicina e investigadora en el laboratorio de biología molecular Pangaea Oncology, Barcelona.

CERTIFICAN:

Que María de los Llanos Gil Moreno, licenciada en Medicina y especialista en Oncología Médica, ha realizado bajo mi dirección el Trabajo de Investigación correspondiente a la Tesis Doctoral: CARCINOMA DE PULMÓN NO CELULA PEQUEÑA, CON MUTACIÓN DE KRAS: DIFERENCIACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SUBTIPOS, ASÍ COMO DE LOS DIFERENTES MECANISMOS DE RESISTENCIA, PARA LA ELABORACIÓN DE TRATAMIENTOS DIRIGIDOS.

Revisada la presente tesis, estimo que corresponde fielmente a los resultados obtenidos, y quedo conforme con su presentación para ser juzgada por el tribunal que sea designado para su lectura.

Y para que conste y surta los efectos oportunos en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo y firmo el presente certificado en

Rafael Rosell Costa

Niki karachaliou

Barcelona, a 4 de septiembre de 2018

Dr. Evarist Feliu Frasnado, Catedrático de Hematología de la Universidad Autónoma de Barcelona

CERTIFICA:

Que María de los Llanos Gil Moreno, licenciada en Medicina y especialista en Oncología Médica ha realizado bajo mi tutoría el Trabajo de Investigación correspondiente a la Tesis Doctoral: CARCINOMA DE PULMÓN NO CELULA PEQUEÑA, CON MUTACIÓN DE KRAS: DIFERENCIACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SUBTIPOS, ASÍ COMO DE LOS DIFERENTES MECANISMOS DE RESISTENCIA, PARA LA ELABORACIÓN DE TRATAMIENTOS DIRIGIDOS.

Revisada la presente tesis, estimo que corresponde fielmente a los resultados obtenidos, y quedo conforme con su presentación para ser juzgada por el tribunal que sea designado para su lectura.

Y para que conste y surta los efectos oportunos en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendiendo y firmo el presente certificado en

Evarist Feliu Frasnado

Barcelona, a 4 de septiembre de 2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a la parte más importante de este proyecto, los pacientes y a sus familias que me han participado y permitido realizar este proyecto. Así como al resto de pacientes y familiares que están padeciendo o han padecido esta enfermedad y por los que día a día intentamos mejorar y aprender para poder ayudarles.

También me gustaría agradecer a Michel por haber estado siempre a mi lado y haber sacrificado mucho tiempo en ayudarme y acompañarme para que esta tesis pudiera acabarse.

A mi familia, a todos y cada uno de ellos, porque lo que soy y lo que tengo es gracias a ellos. A su educación, su apoyo, amor y sacrificio.

Y a mis amigos, algunos casi hermanos como Raquel Martí, por su apoyo incondicional.

No puedo ni quiero olvidarme de mis directores de tesis, el Dr. Rafael Rosell y la Dra. Niki Karachaliou por haber confiado en mi y haberme ayudado tanto en todo este tiempo. Por haberme dado la oportunidad de aprender con y de ellos. Así como a mi tutor el Dr. Everist Feliu.

Además, quiero agradecer su ayuda y paciencia a todos los técnicos y biólogos del laboratorio del Dr. Rosell, en el IGTP (Pepe Ramirez, Itziar de Aguirre, Iman Chaib ...) y del laboratorio de Pangaea Oncology, a todos, pero en especial a Erika Aldeguer y a Carles Codony.

En todos estos años desde que entre en el mundo de la oncología, durante la residencia y mis años de adjunta he tenido y tengo el placer de conocer y aprender con grandes compañeros y amigos que han puesto su granito de arena para llegar a esta meta, a todos

ellos les doy las gracias. Sin poder olvidar a mi compañera de fatigas y amiga, Laia Vilà y nuestra antecesora Nuria Pardo. Por haberme ayudado y aguantando estoicamente en mis momentos de enfado y stress, también me gustaría agradecer a Alejandro Martínez Bueno. Y por su puesto, a todos los compañeros de enfermería, auxiliares, administración, coordinadores de ensayo... que me han ayudado y enseñado durante todo este tiempo.

ABREVIATURAS

- 4EBP1: del inglés “eukaryotic initiator factor 4E binding protein 1”
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADNc: ácido dextrirribonucleico codificante
- ALK: del inglés “anaplastic lymphoma kinase.AKT/PKB: Proteína kinasa B”
- AMPc: adenosina monofosfato cíclica
- ANKRD22: del inglés “ankyrin repeat domain 22”
- AP: fosfatasa alcalina.
- ARF: del inglés “ADP-ribosylation factor”
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- ARNsi: del inglés “small interfering ácido ribonucleico”.
- Asp: aspartate
- ATCC: del inglés “American type culture collection”
- ATF4: del inglés “activating transcription factor 4”
- ATM: del inglés “ataxia telangiectasia mutated”
- BET: bromodominios extra terminal
- BMP2: del inglés “bone morphogenetic protein 2”.
- CDCP1: del inglés “CUB domain containing protein 1”
- CDH1: cadherina 1.
- CDKN2a/b: del inglés “cyclin-dependent kinase inhibitor 2a”
- CEIC: Comité de ética e investigación clínica.
- CI: Índice de Combinación.
- CDK4: del inglés “cyclin dependent kinase 4”
- CPNCP: cáncer de pulmón de célula no pequeña.
- CPCP: cáncer de pulmón de célula pequeña.
- CREB: del inglés CAMP responsive element binding protein1
- CTL4: del inglés “cytotoxic T-lymphocyte antigen 4”
- Cys: cisteína
- DHK1: del inglés “diatom histidine kinase 1”
- EGF: factor de crecimiento epidérmico. Del inglés “epidermal growth factor receptor”
- EGFR: Del inglés “epidermal growth factor receptor”
- ELF3: del inglés “ETS transcription factor 3”

EMT: transición epitelio mesenquimal.

EPO: eritropoyetina.

ERK: del inglés “extracellular signal-regulated protein quinasae”

FGFR1: receptor fibroblástico del factor de crecimiento 1

FRS2: del inglés “Fibroblast growth factor receptor substrate 2”

GDNF: receptores de factor neurotrófico derivado de células gliales

Gly: glicina

GMP: Guanosín monofosfato

Grb2: del inglés “growth factor receptor bound protein 2”

GTP: Guanosín trifosfato

GSK-3 beta: del inglés “Glycogen Synthase Kinase 3beta”

HIF- 1 α : del inglés “hypoxia- inducible factor 1-alpha”

HR: Hazard ratio

HRM: del inglés “High Resolution Melting”

HRP: del inglés “Horseradish Peroxidase”.

HSP90: del inglés “Heat shock protein 90”

IFN: interferón.

ITGB6: del inglés “integrin subunit beta 6”

IHC: inmunohistoquímica.

IL: interleukina.

JAK: Kinasas citosólica Janus

KEAP1: del inglés “kelch-like ECH- associated protein 1”

KRAS: del inglés “Kirsten Rat Sarcoma Viral oncogene homolog”.

LIF: del inglés “leukemia inhibitor factor”

LKB1: del inglés “liver kinasa b1”

MAPK: del inglés “mitogen activated protein kinases”

MET del inglés “tyrosine-protein kinase MET”

MEK: del ingles “mitogen-activated protein kinase”

MSK 1/2: mitogen and stress activated kinase

MST1R: del inglés “macrophage stimulating 1 receptor”

mTOR: mammalian Target of Rapamycin

NFkB: factor nuclear de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NGF: del inglés “nerve growth factor”

NQO1: del inglés “NAD(P)H quinone deshydrogenase 1”

NRF2: del inglés “nuclear factor erythroid 2 related factor 2”

NOTCH: del inglés “Notch (Drosophila) homolog 1 (translocation-associated)”

OS: supervivencia global, del inglés “overall survival”

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PD1: del inglés “programmed cell death protein 1”

PDK1: 3-Phosphoinositide-Dependent Kinase-1

PDL1: del inglés “programmed cell death ligand 1”

PERK: del inglés “PKR (protein kinase R) like endoplasmic reticulum kinase”

Pi3k: Phosphatidyl Inositol-3-Kinase

PIAS3: del inglés “protein inhibitor of activated STAT3”.

PKB γ : del inglés “Protein Kinase B γ ”

PKC ι : Proteína kinasa ι

PLK1: del inglés “polo-like kinase 1”

PTEN: del inglés “phosphatase an tensin homolog”

Rb1: del inglés “retinoblastoma associated protein”.

Rac: Ras-related C3 botulinum toxin substrate

Ran: ras related nuclear protein

RAPTOR: regulatory associated protein of mTOR

Rho: rhodopsin

RICTOR: Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR

RON: del francés “Recepteur d’Origine Nantais”

ROS1: ros protoncogen 1

RSK: del inglés “ribosomal S6 kinasa”

RTK: receptores tirosin kinasa

SG: supervivencia global

SHC: del inglés “Src homology 2 domain containing”

SLP: supervivencia libre de progresión

SPRY1: sprouty 1

SPRY2: sprouty 2

SPRY4: sprouty 4

SPSS: del inglés “Statistical Package for Social Sciences”

STIK11: del inglés “serine/treonine kinasa 11”

SNC: Sistema nervioso central

Src: del inglés “Rous sarcoma oncogene”

STAT: del inglés “signal transducer and activator of transcription”

Syk: del inglés “spleen tyrosine kinasa”

TAM: Tyro2. AXL-Mer

TIC: células iniciadoras de tumores.

Tki: del inglés “tyrosin inhibitor kinase”

TLP: tiempo libre de progresión

TPO: trombopoyetina.

TP53: del inglés “tumor protein 53”

TTF1: factor de transcripción tiroideo 1

Val: valina.

VIM: vimentina

XBP1: del inglés “X box binding protein 1”

YAP1: del inglés “yes-associated protein 1”

ZEB1: del inglés “zinc finger E-box-binding hemoebox 1”.

Resumen

Introducción: El cáncer de pulmón es el tercer tumor más frecuente y produce más de 20.000 muertes al año en España. A pesar de los avances recientes en oncología y el uso de terapias personalizadas para algunos subtipos de pacientes con cáncer de pulmón, la quimioterapia e inmunoterapia sigue siendo el único tratamiento para pacientes con mutaciones de KRAS (25% de adenocarcinomas de pulmón diagnosticados) con resultados subóptimos en cuanto a tiempo libre de progresión y supervivencia global, como en calidad de vida. Además, debido su heterogeneidad, la evolución y la respuesta a tratamientos varían significativamente.

Objetivos: Evaluar las diferencias entre los subgrupos de pacientes con mutación de KRAS en función de la expresión génica y su efecto sobre los resultados del tratamiento y el pronóstico. Encontrar relación entre genes (específicamente, entre HES1, CDCP1, AXL, YAP1, CREB, LKB1, Src y STAT3). Evaluar el efecto del inhibidor de Src / Fak, TPX0005, y el inhibidor de MEK, trametinib, solo y en combinación en 4 líneas celulares de cáncer de pulmón con mutación de KRAS (H23, A549, H460 y Calu-6). Estudiar los mecanismos de acción de Trametinib, TPX0005 y la combinación en estas líneas celulares.

Resultados: se incluyeron 32 pacientes con mutación de KRAS en el estudio. Entre ellos, el 71.88% eran hombres con una edad media de 59 años, el 97% eran fumadores o ex fumadores, G12C y G12V (28.13% cada uno) fueron las mutaciones de KRAS más frecuentes detectados seguidos por G12D (12.5%). El tratamiento de primera línea más frecuente fue la combinación con platino (65,66%). 34,38% de los pacientes tuvieron respuesta parcial, 9,38% enfermedad estable y 25% progresión de la enfermedad. La mediana de supervivencia libre de progresión fue de 3,4 meses y la supervivencia global fue de 13,4 meses. Se analizaron los niveles de expresión de ARNm de HES1, CDCP1, AXL, CREB1, LKB1, SRC, STAT3 y YAP1. Encontramos una correlación significativa mediante la prueba de Spearman entre HES1 y STAT3, CREB1 y LKB1, CREB1 y Src,

CREB1 y STAT3, Src y STAT3, Src y YAP1, STAT3 y YAP1. Los pacientes con alta expresión de Src tuvieron una mediana de SLP de 1,6 meses en comparación con 4,1 meses para aquellos con baja expresión de ARNm de Src (HR = 2,469 IC 95% (1,110 - 5,495) p = 0,0215). Los pacientes con alta expresión de LKB1 tuvieron una mediana de supervivencia más larga libre de progresión de 4,2 meses en comparación con 0,7 meses (HR = 0,344 IC 95% (0,128-0,924) p = 0,0259) para aquellos con baja expresión de LKB1. Finalmente, los pacientes con baja expresión de CDCP1 tuvieron una mediana más larga de supervivencia libre de progresión de 4 meses en comparación con 0.7 meses para aquellos con alta expresión de CDCP1 (HR = 5,495; IC 95% (1,574- 19,231) p = 0,0025). Los niveles de expresión de CDCP1 y LKB1 también afectaron significativamente a la supervivencia global. Específicamente, los pacientes con alta expresión de CDCP1 experimentaron una supervivencia global más corta de 3,2 meses en comparación con 16,3 meses para aquellos con baja expresión de CDCP1 (HR = 0,97 (0,020-0,460) p = 0,0005). Entre pacientes con niveles de expresión de ARNm de LKB1 evaluables, aquellos con alta expresión de LKB1 tuvieron una mediana de supervivencia global de 19.4 meses en comparación a solo 1.1 meses para aquellos con niveles bajos de LKB1 (HR= 0,097 (0,020-0,460) p= 0,0005).

Por otro lado, los estudios de viabilidad se llevaron a cabo en 4 líneas celulares (A459, H23, Calu6 y 460), tratándolas con trametinib (inhibidor de MEK), TPX0005 (inhibidor de Src / FAK) y la combinación de ambos. La combinación fue aditiva en la línea celular A549 y sinérgica en las otras tres líneas celulares (H23, Calu6 y H460). El análisis Western blot demostró la inhibición de la fosforilación de histona 3 por TPX0005 solo y cuando se combinó con trametinib en Calu 6, H23 y H460. Curiosamente, TPX0005 fue capaz de bloquear la fosforilación de histona 3 tras 2 horas de la administración del fármaco. El efecto del tratamiento sobre la morfología celular también se estudió, TPX0005 causa la formación de células binucleadas y aberrantes. Por inmunofluorescencia se encontró que TPX0005 bloqueaba la mitosis entre la profase y la metafase, mientras que el trametinib detenía las células en la fase G1.

Conclusiones: el cáncer de pulmón no microcítico con mutación KRAS es una enfermedad heterogénea con un comportamiento agresivo y un mal pronóstico para los pacientes. Tras la realización del análisis de ARNm de genes que consideramos que se relacionan con la vía de señalización KRAS, confirmamos el racinal biológico planteado

en nuestro estudio. Encontramos un grupo de pacientes con KRAS con mejor pronóstico basado en los niveles de expresión de Src, CDCP1 y LKB1. La combinación de trametinib con el inhibidor de Src / FAK fue sinérgica en la mayoría de las líneas celulares con mutación de KRAS examinadas. Se necesitan más estudios para confirmar nuestra hipótesis y generar nuevas oportunidades terapéuticas para pacientes con CPNCP con KRAS mutado.

Summary

Introduction: Lung cancer is the 3rd most frequent tumor and produces more than 20,000 deaths per year in Spain. Despite recent advances in oncology and use of personalized therapies for some subtypes of lung cancer patients, chemotherapy remains the only remedy for patients whose tumor is driven by RAS mutations, (25% of diagnosed lung adenocarcinomas) with suboptimal results regarding progression-free and overall survival as well as quality of life. In addition, due to the heterogeneity of KRAS mutant lung adenocarcinoma, the evolution and response significantly vary.

Objectives: To evaluate the differences between subgroups of KRAS mutant patients depending on expression as well as the effect of gene expression on treatment outcome and prognosis. Find the between transcripts (specifically, HES1, CDCP1, AXL, YAP1, CREB, LKB1, Src and STAT3). To evaluate the effect of the Src/Fak inhibitor, TPX0005, and the MEK inhibitor trametinib, alone and in combination in 4 KRAS mutant lung cancer cell lines (H23, A549, H460 and Calu-6). To study the mechanisms of action of Trametinib, TPX0005 and the combination *in culture*.

Results: 32 KRAS mutant patients were included in the study. Among them, 71.88% were men with an average age of 59 years, 97% were smokers or former smokers, G12C and G12V (28.13% each) were the most frequent KRAS mutant detected followed by G12D (12.5%). The most frequent first line treatment was combinations with platinum (65,66%).

34,38% of patients had partial response, 9,38% stable disease and 25% progression disease. Overall median progression-free survival was 3.4 months and the overall survival was 13.4 months. The mRNA expression levels of HES1, CDCP1, AXL, CREB1, LKB1, SRC, STAT3 and YAP1 were analyzed. We found a significant correlation by Spearman test between HES1 and STAT3, CREB1 and LKB1, CREB1 and Src, CREB1 and STAT3, Src and STAT3, Src and YAP1, STAT3 and YAP1. Patients with high expression of Src had a median PFS of 1.6 months compared to 4.1 months for those with low Src mRNA expression (HR= 2,469 CI 95% (1.110 - 5.495) p=0,0215). Patients with high expression of LKB1 had a longer median progression-free survival of 4.2 months compared to 0.7 months (HR= 0,344 CI 95% (0,128- 0,924) p=0,0259) for those who had low LKB1 expression. Finally, patients with low expression of CDCP1 had a longer median progression-free survival of 4 months compared to 0.7 months for those with high CDCP1 expression (HR=5,495; CI 95% (1,574- 19.231) p=0,0025). The expression levels of CDCP1 and LKB1 significantly affected also overall survival. Specifically, patients with high CDCP1 expression experienced a shorter overall survival of 3.2 months compared to 16.3 months for those with low CDCP1 expression (HR=0,97 (0,020-0,460) p=0,0005). Among patients with evaluable LKB1 mRNA expression levels, those with high LKB1 expression had a median overall survival for 19.4 months compared to only 1.1 months for those with low levels of LKB1 (HR= 0,097 (0,020-0,460) p= 0,0005).

On the other hand, viability studies were carried out on 4 cell lines (A459, H23, Calu6 and 460), treating them with trametinib (MEK inhibitor), TPX0005 (Src/FAK inhibitor) and the combination of both. The combination was additive in the A549 cell line, and synergistic in the rest three cell lines (H23, Calu6 and H460). Western blot analysis demonstrated the inhibition of histone 3 phosphorylation by TPX0005 alone and when combined with trametinib in Calu 6, H23 and H460. Intriguingly, TPX0005 alone was able to abrogate histone 3 phosphorylation as soon as 2 hours after the cells were exposed to the treatment. The effect of the treatment on cellular morphology was also studied, TPX0005 causes the formation of binucleate and aberrant cells. Through immunofluorescence it was found TPX0005 blocked mitosis between the prophase and metaphase, while trametinib arrested the cells in the G1 phase.

Conclusions: Non small cell lung cancer with a KRAS mutation, is an heterogeneous

disease with an aggressive behavior and poor prognosis for the patients. We performed mRNA analysis of transcripts that we considered they can be related with KRAS signaling pathway. The correlations among the transcripts examined confirmed the biological rationale behind our study. We found a group of KRAS patients with better outcome based on the expression levels of Src, CDCP1 and LKB1. Combining trametinib with the Src/FAK inhibitor was synergistic in most of the KRAS mutant cell lines examined. Further studies are warranted to confirm our hypothesis and generate new therapeutic opportunities for KRAS mutant NSCLC patients.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Datos epidemiológicos del cáncer de pulmón	3
1.2 Tratamiento del carcinoma de pulmón no celula pequeña.....	5
1.3 KRAS.....	13
1.4 Vías moleculares relacionadas con CPNCP con mutación de KRAS	16
a) MAP kinasas	17
b) Vía Pi3K- AKT-mTOR.....	19
c) JAK/STAT3.....	24
d) SRC- PAXILIN- YAP.....	25
e) LKB1 (STK11)- AMPk-YAP.....	27
f) FGFR1 y FRS2.....	27
g) Vía PKCJ- ELF3-NOTCH.....	28
1.4.1. Receptores tirosin kinasa.....	29
a) CDCP1.....	29
b) AXL.....	30
c) EGFR.....	30
d) MET.....	30
1.5 Clasificaciones o subtipos de CPNCP con mutación de KRAS.....	31
a) Subtipo en relación a la mutación de KRAS.....	31
b) Clasificación fenotípica.....	32
c) Subclasificación molecular.....	35
1.6 Desarrollo de fármacos dirigidos para tratamiento de CPNCP con mutación de KRAS.....	39
1.7 . Racional del proyecto.....	41
2. Hipotesis y objetivos	45
2.1. Hipotesis.....	47
2.2. Objetivos.....	48
3. Material y métodos	49
3.1. Recepción de muestras y base de datos.....	51
3.2. Valoración patológica.....	52

3.3. Analisis de las mutaciones de KRAS.....	53
3.4. Análisis de la expresión de ARNm.....	54
a) Extracción del ARNm.....	54
b) Retrotranscripción y Real Time PCR.....	54
c) Validación de sondas y cebadores.....	55
d) Analisis de resultados del Real Time-PCR.....	58
3.5. Experimentos in vitro.....	59
a) Ensayo de viabilidad (MTT) y exposición de fármacos antitumorales.....	60
b) Niveles de proteína por Western Blot.....	62
c) Inmunofluorescencia.....	63
3.6. Análisis estadístico.....	63
4. Resultados.	65
4.1. Características de los pacientes.....	67
4.2 Características moleculares.....	71
4.3. Análisis de supervivencia en relación a la expresión génica.....	73
4.3.1 Supervivencia libre de progresión.....	73
a) Src.....	78
b) LKb1.....	79
c) CDCP1.....	79
4.3.2. Supervivencia Global.....	80
a) CPCP1.....	85
b) LKB1	86
4.4. Análisis de viabilidad celular.....	87
4.5. Expresión génica en diferentes líneas celulares	95
4.6. Efecto sobre el ciclo celular del tratamietno con Trametinib, TPX-0005 y la combinación de ambos.....	96
5. Discusión	103
6. Conclusión	119
7. Lineas de futuro	123
7. Bibliografía.....	126

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS CÁNCER DE PULMÓN.

En el año 2012, tanto a nivel mundial como en España el cáncer de pulmón fue el 3er tumor maligno con mayor incidencia (figura 1). A nivel español se diagnosticaron 26.715 nuevos casos, siendo el 2º tumor más frecuente en hombres y el 4º en mujeres. A nivel mundial, fue el tercero más frecuente en mujeres y el primero en hombres. (1)(4) La edad media al diagnóstico fue de 70 años.

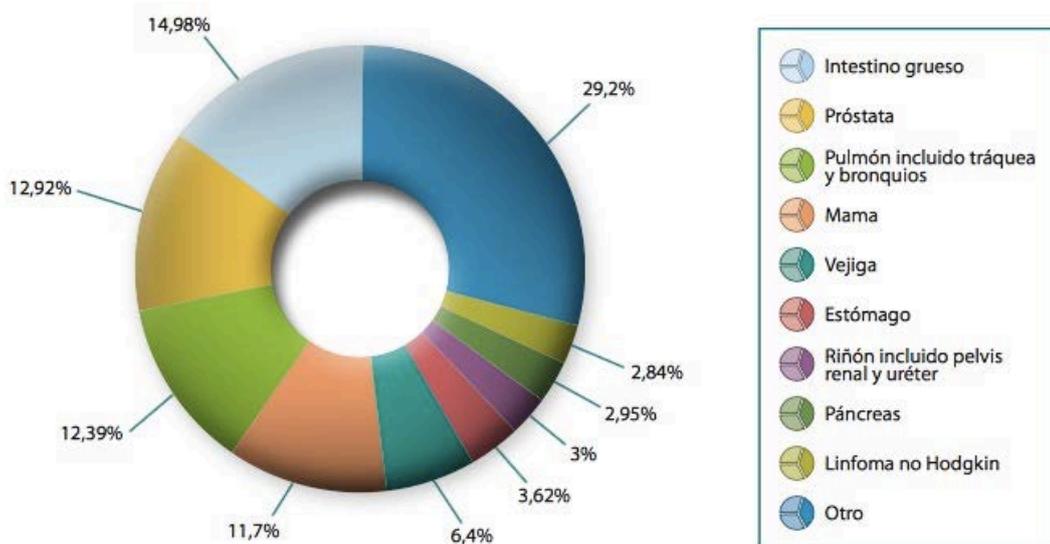


Fig. 1 Distribución de los tumores según la incidencia en el año 2012.(4)

En cuanto a la mortalidad, es la neoplasia con mayor mortalidad en población global y en hombres. En 2012 provocó 21.118 muertes en España (1)(4), con una supervivencia a los 5 años del 16% (2). En los últimos años, la mortalidad en hombres ha descendido un 6% y la mortalidad en mujeres ha aumentado un 7% (1), debido al cambio de hábitos de vida y aumento de consumo de tabaco en mujeres.

El principal factor de riesgo asociado con el cáncer de pulmón es el hábito tabáquico, presente en el 85% de los casos, y se correlaciona con la dosis acumulada. El riesgo disminuye con el abandono del hábito y de forma proporcional al tiempo desde el cese del consumo (1). Otros factores relacionados son la exposición a asbesto, arsénico, radón e hidrocarburos policíclicos aromáticos (presentes en petróleo, carbón, depósitos de alquitrán y compuestos del combustible). Es complicado realizar una asociación de la incidencia de cáncer de pulmón con factores genéticos únicos, pero recientemente han aparecido datos que sugieren que el polimorfismo de ciertos loci en los siguientes genes 15q24-25 (CHRNA3, CHRNA5, CHRNAB4), 6p21.33, 5p15.23 podrían predisponer a un mayor riesgo de cáncer de pulmón. (1)

El cáncer de pulmón tradicionalmente se ha clasificado en dos grandes grupos: carcinoma de pulmón no célula pequeña (CPNCP) que ocupa un 85-90% de las neoplasias de pulmón diagnosticadas y carcinoma de pulmón célula pequeña (CPCP). Dentro del carcinoma de pulmón célula no pequeña existen varios subtipos histológicos, siendo los más frecuentes el adenocarcinoma y carcinoma escamoso.

Más de un 50% de los pacientes se diagnostican como enfermedad metastásica y sólo entre un 20 o 30% de los pacientes presentan enfermedad resecable al diagnóstico. De estos últimos, la mitad recaen en forma de recidiva local o con metástasis a distancia. Por ello, es tan importante el avance en la investigación de nuevos tratamientos para enfermedad metastásica. En los últimos años el tratamiento con fármacos dirigidos para algunos subtipos de la enfermedad y el tratamiento con inmunoterapia ha prolongado la supervivencia global de los pacientes con CPNCP. Pese a ello, la supervivencia global a los 5 años sigue siendo menor al 20%(16).

1.2. TRATAMIENTO DEL CARCINOMA DE PULMÓN NO CELULA PEQUEÑA

En los últimos años gracias al avance de la biología molecular, se ha podido subdividir el adenocarcinoma de pulmón en diferentes subtipos caracterizados por diversas alteraciones moleculares, tales como EGFR, ALK, ROS1, MET, BRAF, RET, etc. (figura 2)

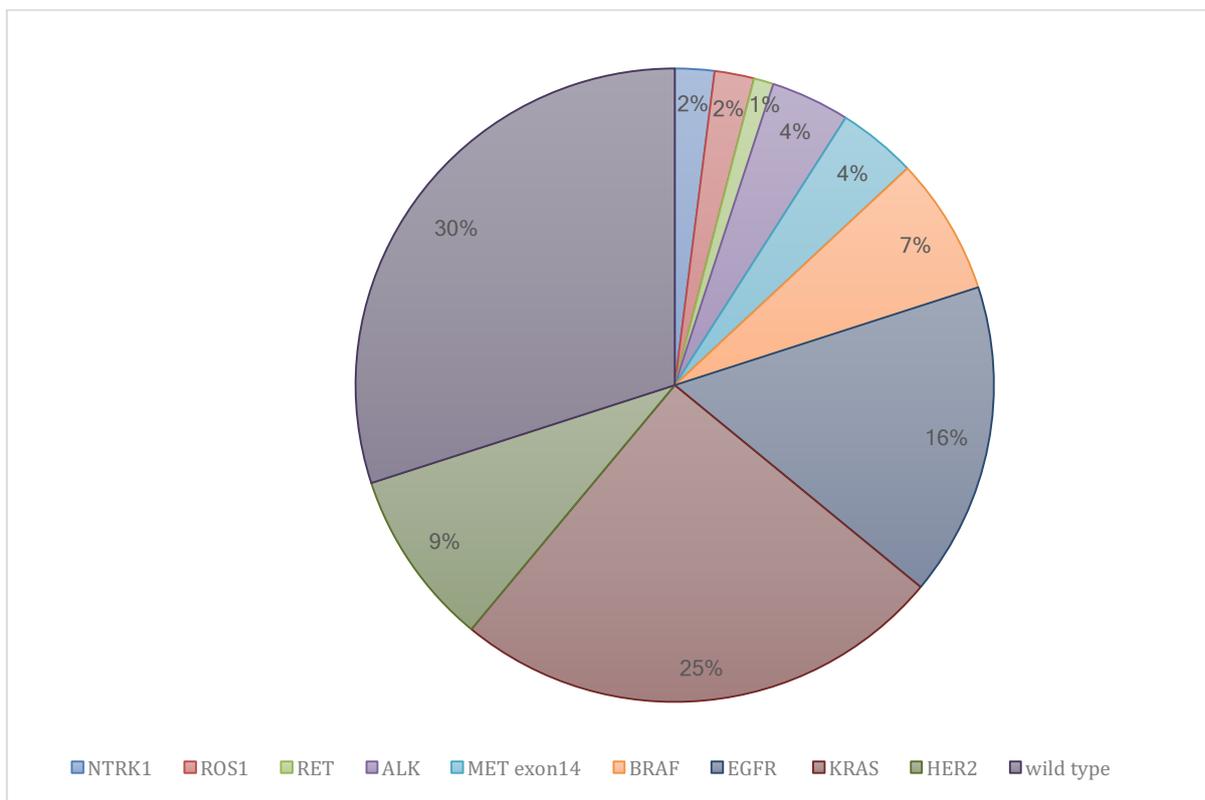


Fig. 2. Diferentes mutaciones según su frecuencia. (2)

El estudio de los diferentes subtipos moleculares ha logrado definir las características en cuanto epidemiología y evolución; y a desarrollar diferentes tratamientos dirigidos frente a estas alteraciones moleculares con aumento en la supervivencia global y mejor perfil de tolerancia que la quimioterapia convencional.

A pesar de esto, el subtipo de CPNCP con mutación de KRAS todavía no se ha conseguido caracterizar completamente ni conseguir tratamiento dirigido eficaz (5).

En pacientes en los cuales no se han identificado alteraciones moleculares susceptibles tratamiento con fármacos dirigidos, el tratamiento standard está basado en quimioterapia o inmunoterapia o la combinación de ambos.

Actualmente, el tratamiento de primera línea para CPNCP no escamoso, está basado en doblete de quimioterapia con platino o inmunoterapia. Las dos opciones más utilizadas son: la combinación con pemetrexed seguido de pemetrexed como tratamiento de mantenimiento hasta progresión o no tolerancia en aquellos pacientes que tras 4 ciclos presentan respuesta (enfermedad estable, respuesta parcial o completa) ⁽¹⁸⁾; o la combinación de platino, paclitaxel y bevacizumab y tratamiento de mantenimiento con bevacizumab en los mismos supuestos que en el caso anterior ⁽¹⁾. Por otra parte, recientemente el tratamiento con inmunoterapia (pembrolizumab)¹⁹ ha sido aprobado para tratamiento de primera línea en CPNCP con expresión de PDL1 mayor del 50%. Su aprobación ha sido dada por los resultados obtenidos en el estudio Keynote 024, publicado en octubre de 2016, que comparaba el tratamiento de pembrolizumab versus doblete de platino y demostró una HR de 0,6 con una supervivencia libre de progresión de 10,3 meses en el grupo de pembrolizumab versus 6 meses en el grupo de quimioterapia. Además, la tasa de respuestas fue del 44,8% en el grupo de pembrolizumab versus 27,8% en el grupo de quimioterapia, con una duración de las respuestas en el grupo de inmunoterapia también mayor. Para intentar aumentar el porcentaje de pacientes que se beneficien de tratamientos inmunoterápicos y evitar resistencias a estos, se están realizando numerosos estudios con combinación de fármacos. Entre ellos tenemos los datos presentados en el congreso americano de oncología médica (ASCO) del año 2016 de la combinación de la quimioterapia con inmunoterapia con varios esquemas de tratamiento (cisplatino/gemcitabina, cisplatino/pemetrexed, carboplatino/paclitaxel con dosis de nivolumab de 5 mg/Kg o 10 mg/Kg). Se mostraron tasas de respuestas de un 47% y con un porcentaje de supervivencia global a los 2 años de hasta un 62% en el grupo de la combinación de nivolumab 5mg/Kg con carboplatino/paclitaxel. También se publicaron los datos de la combinación de nivolumab con ipilimumab (anti CTL4) del estudio fase I con diferentes dosis de ambos fármacos que mostraban en los pacientes con expresión de PDL1 un tiempo libre de progresión de 3,5 meses en la rama de nivolumab versus 12,7 meses en la rama de la combinación, con una SLP todavía no alcanzada en los pacientes con una expresión de PDL1 superior al 50%. En cuanto a la supervivencia global al año en el grupo de pacientes con cualquier expresión del PDL1 fue del 69% en

el grupo de monoterapia versus 87% en la combinación y en aquellos que la expresión era mayor al 50% los resultados fueron del 83% para la monoterapia y del 100% en la combinación.⁽¹¹⁷⁾

Por otra parte, el tratamiento estándar de los pacientes con CPNCP con histología escamosa se trataría de un doblete con platino en combinación con gemcitabina, docetaxel, vinorelbina, o paclitaxel o también al igual que en el caso de la histología no escamosa y en los mismos supuestos, podríamos utilizar tratamiento con pembrolizumab

(1)

Para el tratamiento de segunda línea a la progresión a doblete con platino disponemos de inmunoterapia (nivolumab⁽⁷⁷⁾ ⁽⁷⁸⁾, atezolizumab⁽⁸⁰⁾ o pembrolizumab⁽⁷⁹⁾) o tratamiento con docetaxel que puede ir acompañado de un antiangiogénico (nintedanib ⁽²⁰⁾ en histología no escamosa o ramucirumab ⁽²²⁾ en ambas histologías). O si se ha realizado tratamiento de primera línea con inmunoterapia se podría utilizar los esquemas que hemos descrito en la primera línea de tratamiento para cada histología.

Como tratamientos de 3º, 4º, 5º líneas, etc., tendríamos quimioterapias en monoterapia como gemcitabina, vinorelbina, paclitaxel... teniendo en cuenta los tratamientos previos realizados, las toxicidades y las comorbilidades. ⁽¹⁾

Por otra parte, hay que señalar la importancia de la inclusión de los pacientes en ensayos clínicos dado el beneficio de éstos tanto a nivel individual como global.

En pacientes con alteraciones moleculares en las cuales disponemos de fármacos dirigidos el tratamiento de elección deberá ser con estos. Para algunas alteraciones moleculares todavía no disponemos fármacos aprobados por lo que actualmente la mejor opción para éstos son los tratamientos dentro de ensayo clínico.

Entre las mutaciones que actualmente disponemos con tratamientos dirigidos o con datos importantes dentro de ensayos clínicos se encontrarían (tabla 1):

Mutación	Fármaco dirigido
EGFR	Erlotinib, Gefitinib, Afatinib, Dacomitinib*, erlotinib+bevacizumab
T790M (mecanismo resistencia EGFR)	Osimertinib
ALK	Crizotinib, Ceritinib, Alectinib, Lorlatinib, Brigatinib, Ensartinib*
MET	Crizotinib
RET	Vandetanib
ROS1	Crizotinib, lorlatinib
HER2mut	TDM1*
BRAF (V600E)	Dabrafenib en combinación con trametinib.
NTRK1/2/3	Entrectinib

Tabla 1. Diferentes subtipos moleculares y sus tratamientos dirigidos. (* tratamientos con datos de eficacia pero sin aprobación por EMA o FDA)

La mutación de EGFR aparece entorno al 15-20% de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón, siendo más frecuente en mujeres, no fumadores y población asiática. El tratamiento de elección para pacientes con mutación o delección en EGFR son inhibidores de la tirosin kinasas (Tki) tales como erlotinib, gefitinib o afatinib. En el estudio EURTAC publicado en 2012 en el que se comparaba el tratamiento de 1º línea con erlotinib frente a quimioterapia basada en doblete con platino en pacientes diagnosticados de CPNCP con mutación de EGFR se objetivaron TLP (tiempo libre de progresión) de 9,7 meses en el grupo de erlotinib frente a 5,2 meses en el grupo de quimioterapia con una HR de 0,37 ($p < 0,0001$). (23) Tanto erlotinib como gefitinib tienen tasas de respuestas y TLP en este subtipo de pacientes superior al tratamiento con combinación de platino con otro quimioterápico. Pero no demuestran aumento en supervivencia global. Esto podría estar explicado porque en los estudios se permitía el cambio de rama de tratamiento a la progresión, por lo que todos podían recibir TKi a lo largo de la evolución de la enfermedad. No parece que la secuencia en el tratamiento con estos fármacos influya en la supervivencia global.

En cuanto a SG con afatinib, tenemos los datos obtenidos en los estudios LUX-Lung 3(36) y LUX-lung 6(37) que parece tener una SG mayor en pacientes tratados en primera línea

con afatinib 27,3 meses versus 24.2 meses en pacientes con delección del exón 19. Sin embargo, estos datos no se han observado en pacientes tratados con afatinib en primera línea con mutación del exón 21. En el estudio LUX-Lung7₍₃₈₎ en el cual se compara afatinib con gefitinib, se han objetivado tasas de supervivencia global (SG) con afatinib 27,3 meses y de 24.2 meses en el grupo de gefitinib. En el estudio por subgrupos, teniendo en cuenta las diferentes alteraciones moleculares, en el subgrupo con delección exón 19 se objetivaron tasas de SG de 30,7 meses en el grupo de afatinib frente a 26,4 meses en el grupo de gefitinib y en el subgrupo con mutación EGFR L858R se objetivaron tasas de 25 meses frente 21.2 meses respectivamente, siendo las diferencias no estadísticamente significativas. Por lo que no parece en este estudio que afatinib tenga mejores resultados en cuanto a SG.

Además, en el congreso de la sociedad americana de oncología (ASCO) de 2017 se publicaron los datos de dacomitinib del estudio ARCHER 20150₍₃₉₎ que lo compara con gefitinib, en el cual se objetivó tasas de respuesta del 54,9% con una PFS de 14,4 meses vs 9,2 meses. En el estudio se incluyeron pacientes asiáticos y no asiáticos siendo superiores los resultados en pacientes asiáticos. Por otra parte, las tasas de toxicidad fueron mayores en la rama de dacomitinib.

También disponemos combinación de fármacos como erlotinib con bevacizumab. El ensayo clínico Belief (estudio fase II) de erlotinib en combinación con bevacizumab mostró una supervivencia libre de progresión de 13,2 meses, con una progresión libre de progresión del 55% a los 12 meses. Unos de los datos con mayor relevancia del estudio fueron los datos de SLP en el grupo que presentaban la mutación T790M, la cual fue de 16 meses (SLP del 68% a los 12 meses) mientras que en el grupo de T790M negativo la supervivencia libre de progresión fue de 10,5 meses (SLP del 48% a los 12 meses). ⁽⁶²⁾

Se conocen múltiples mecanismos de resistencia a inhibidores de tirosin kinasa en pacientes con mutación de EGFR. La más conocida es la mutación T790M. Frente a dicha mutación el único tratamiento aprobado es osimertinib. En el estudio fase III (AURA3)₂₄ de 2º línea de tratamiento de pacientes con dicha mutación tras progresión a inhibidor de tirosin kinasas se comparaba osimertinib versus platino en combinación con pemetrexed y se objetivó un TLP de 10,1 meses versus 4,4 meses con una HR de 0,30. En el subgrupo de pacientes con afectación SNC (sistema nervioso central) el TLP fue de 8,5 vs 4,2 meses. También fue superior en cuanto a tasa de respuesta con un 71% versus 31%. La

toxicidad fué inferior en la rama de osimertinib con unos efectos adversos grado III o superior del 23% versus 47%. Ya se conocen también mutaciones de resistencia a osimertinib como C797S entre otras.

Otras mutaciones de resistencia como AXL y MET están siendo objeto de ensayos clínicos con moléculas inhibitoras de dichas mutaciones en combinación o monoterapia con Tki.

Otra alteración molecular que podemos objetivar en un 4% aproximadamente de los pacientes afectos de adenocarcinoma de pulmón es la traslocación de ALK (anaplastic lymphoma kinase). El tratamiento de estos pacientes ha evolucionado mucho en los últimos años, teniendo actualmente diferentes tratamientos dirigidos, como:

- Crizotinib: fue el primer tratamiento aprobado en segunda línea y posteriormente en primera línea con los datos obtenidos en el estudio PROFILE 1014 en el cual se obtuvieron un TLP de 10,9 meses vs 7 meses con tratamiento con platino y alimta. Además, unas tasas de respuesta del 74% con una correcta tolerancia. (25)
- Ceritinib: los datos obtenidos en el estudio clínico fase III ASCEND-4 que comparaba ceritinib con platino en combinación con pemetrexed mostraron una TLP de 16,6 meses vs 8,1 meses, siendo de 10,7 versus 6,7 meses en pacientes con afectación SNC y de 26,3 vs 8,8 meses en pacientes sin afectación SNC. En cuanto a la supervivencia global en la rama de la quimioterapia fue de 26,2 meses y no fue alcanzada en la rama de ceritinib. La tasa de respuesta también fue superior en la rama de ceritinib con un 72,5% y en la rama de quimioterapia de un 26,7%. (26)
- Alectinib: en este último año se han publicado los datos obtenidos en el estudio clínico ALEX que compara crizotinib versus alectinib en el cual demuestra que alectinib es más efectivo con una TLP de 10,4 meses en la rama de crizotinib y 25,7 meses en la rama de alectinib. Además, hay una reducción de las tasas de progresión a nivel SNC al año, con un 41,4% de pacientes con afectación SNC en la rama de crizotinib y del 9,4% en la rama de alectinib. (27)
- Lorlatinib: en el último congreso de la sociedad americana de oncología realizado y posteriormente en diciembre de 2017 en la revista lancet se publicaron los datos del ensayo clínico Fase I/II con lorlatinib en pacientes con al menos una línea de tratamiento que muestra unas tasas de respuesta de entre el 57,1% y el 30,8%

dependiendo de las líneas previas de tratamiento. Parece ser sensible a la mutación de resistencia G1202R la cual es resistente a crizotinib, ceritinib, alectinib y brigatinib. (28)

- Brigatinib: disponemos de datos del estudio fase II con brigatinib con dosis de 90mg diarios (rama A) y 180 mg (rama B) diarios tras progresión a crizotinib que muestra una tasa de respuesta del 45% en la rama A y de 54% en la rama B, además muestra un TLP de 9,2 meses en la rama A y 12,9 meses en la rama B. La tasa de respuestas en pacientes con afectación SNC fue del 42% y del 67% respectivamente (29). Actualmente está en marcha el estudio fase III ALTA-1 que compara brigatinib versus crizotinib en primera línea de tratamiento.
- Ensartinib: se disponen de datos preliminares publicados en el congreso americano, ASCO, de 2017 y en el congreso europeo de cáncer de pulmón de 2017 que muestra una tasa de respuesta del 87% en paciente sin tratamientos previos y del 71% a la progresión a crizotinib, con tasas de respuestas del 69% a nivel SNC. Actualmente está en marcha el estudio fase III que compara ensartinib versus crizotinib en primera línea de tratamiento. (30)

MET exón 14, es objetivada en el 3-4 % de los pacientes con CPNCP no escamoso siendo superior en escamoso y hasta un 30% en sarcomatoide. Otras alteraciones de MET serían exón 7/8, amplificación y sobreexpresión. En el estudio fase I PROFILE 1001 crizotinib mostraba una tasa de respuesta en pacientes con variante de splicing del exón 14 del 44%. Además, existen múltiples ensayos clínicos actualmente con inhibidores de MET en pacientes con dicha alteración, con amplificación por FISH y sobreexpresión por inmunohistoquímica. (31)

Fusiones en RET fueron descritas por primera vez en 2012. Están presentes en el 1-2% de los pacientes con CPNCP. Disponemos de datos publicados del estudio fase II LURET, en el que pacientes con fusiones de RET fueron tratados con vandetanib con una tasa de respuesta del 47%, PFS de 4,7 meses y una supervivencia al año del 47%. (32)

Otra fusión o reordenación que está relacionada con CPNCP es la fusión en ROS1. Aparece en el 1,5% de los CPNCP. En el estudio fase I con crizotinib PROFILE 10001(40) además de pacientes con ALK reordenado y c-MET positivos se realizó una rama con

ROS1 reordenado. En estos pacientes se objetivó una tasa de respuestas del 72%, con una media de duración de la respuesta de 17,6 meses. Además, se obtuvo un TLP de 19,2 meses. También se conocen los datos del ensayo clínico OXONC₍₄₁₎, estudio fase II que muestra la eficacia en pacientes con ROS1 reordenado que confirman los datos del estudio fase I. Actualmente, está aprobado el tratamiento con crizotinib en pacientes con ROS1 reordenado. Por otra parte, fármacos como lorlatinib también han demostrado en ensayos fase I-II eficacia en este subtipo.

Por otro lado, mutaciones en HER2 aparece en el 1,5-2% de los pacientes diagnosticado de CPNCP. Se han realizado diferentes estudios para esta población, con dacomitinib, neratinib, neratinib en combinación con temsirolimus y afatinib, siendo todos negativos. Recientemente se han publicado los resultados de un estudio fase II (NCT02675829) con TDM1 (ado-trastuzumab emtansina) en el cual una de sus ramas se trataba de pacientes con esta alteración molecular y se han objetivado tasas de respuestas del 44% con una PFS de 4 meses con una duración media de la respuesta de 5 meses. ⁽³³⁾

BRAF aparece en aproximadamente el 7% de los CPNCP, aunque la mutación V600E que es la más frecuente en otros tipos de tumores en CPNCP es infrecuente apareciendo en un 1-2% de adenocarcinoma de pulmón. Recientemente la FDA ha aprobado la combinación de dabrafenib y trametinib en 1º y 2º línea de tratamiento en pacientes con mutación BRAF V600E. Se ha realizado un estudio fase II con la combinación de dabrafenib y tremetinib. Las tasas de respuestas de la combinación como tratamiento de segunda línea fueron del 63% con una duración media de la respuesta de 12,6 meses. En el grupo de pacientes tratados en primera línea la tasa de respuestas fue del 61%. ⁽³⁴⁾ En la rama de monoterapia con dabrafenib la tasa de respuesta fue del 27% con una duración media de las respuestas de 9,9 meses.

NTRK1 aparece en el 2% de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Entrectinib está aprobado por la FDA desde mayo de 2017 en tumores sólidos por los datos obtenidos en los estudios fase I, STARTK1 y ALKA373-001₍₈₁₎ en los cuales se incluyeron pacientes con CPNCP con NTRK1/2/3.

1.3. KRAS.

RAS es una proteína G monomérica que es capaz de unir GTP y GDP con alta afinidad y especificidad, actuando en la transducción de señales.⁽⁴²⁾

La actividad de RAS (figura 3) está regulada por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs), un grupo de proteínas que estimulan la liberación de difosfato de guanosina (GDP) para favorecer la unión entre la pequeña GTPasa y el trifosfato de guanosina (GTP). Se inhibe mediante la activación de proteínas GTPasas (GAPs), que inducen la hidrólisis de GTP. Una vez se activa el receptor, se produce la unión al factor de crecimiento de proteína 2 (Grb2) unida al receptor proteína adaptadora. Grb2 se une al factor de intercambio de nucleótidos de guanina SOS (SOS1), lo que facilita el intercambio de RAS PIB-GTP, lo que lleva a la activación de RAS, que a su vez estimula la vía RAF-MEK-ERK activada por MAPK, el fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) -AKT-mTOR₍₆₎ entre otras vías.

En el hombre, en la familia de proteínas RAS se incluyen entre otros 3 protooncogenes: H-Ras, N-Ras y K-ras. Dentro de K-Ras debido a un procesamiento diferente del cuarto exón de este gen se forman dos formas A y B, siendo la K-Ras4B más abundante en la mayoría de los tipos celulares.

Ras es una proteína de 21 kDa y su molécula contiene 189 aminoácidos, a excepción de K-Ras4b que posee 199. Los dominios funcionales importantes para la unión a los nucleótidos y la hidrólisis del GTP están en el extremo amino terminal. En el carboxilo terminal se encuentra la región hipervariable con la caja CAAX (cisteína, alifático, alifático y metionina o serina), en esta región es donde se realizan las modificaciones lipídicas postraduccionales. La actividad de Ras depende de su localización en la membrana y su unión a la caja CAAX de farnesilos isoprenoides de 15 carbonos de su extremo terminal. Esta unión se realiza mediante la enzima farnesil transferasa que incorpora grupos farnesilos al sulfuro de la cadena lateral de la cisteína. Posteriormente los aminoácidos AAX del extremo terminal son hidrolizados por proteólisis y la cisteína es metilada. Esto provoca que el extremo carboxilo se convierta en hidrofóbico. Para conseguir la estabilización completa de la unión de RAS a la membrana es necesario la unión de 6 residuos de lisina adyacentes a la caja CAAX en el caso de KRAS o la unión

de un ácido graso (ácido palmítico) a cisteínas situadas cerca del extremo C terminal en el caso de N-Ras y H-Ras.

En las células tumorales se producen alteraciones génicas que tienen como resultado la activación constitutiva de oncogenes (como la mutación en KRAS, vía de RAS) o la inactivación de genes supresores de tumores. Esto provoca que estas vías de señalización estén constitutivamente activadas provocando la proliferación celular, diferenciación y en otras ocasiones provocan la inhibición de la apoptosis contribuyendo en la supervivencia. (42)

En nuestro proyecto nos centraremos en la mutación de KRAS (Kirsten Rat Sarcoma Viral oncogene homolog). Es el oncogen más frecuente en tumores de pulmón no célula pequeña, objetivándose hasta en un 20-25% de estos tumores y está relacionado con el hábito tabáquico.

KRAS está situado en brazo pequeño del cromosoma 12 y codifica para dos variantes de splicing diferentes. Su función principal es mediar en las vías de señalización intracelular como respuesta a la activación de receptores localizados en la superficie celular. (6)

Las mutaciones patológicas de KRAS se producen principalmente en los codones 12, 13 y 61(6). En pacientes no fumadores, la mutación más frecuente es de tipo transición de G por A en el 92% de los casos en el codón 12 o codón 13. La mayoría son cambios de glicina (Gly) por Aspartato (Asp, en el 50% de los casos), por valina (val, en el 28% de los casos) o por cisteína (cys en el 9% de los casos). En pacientes fumadores se produce una mutación de tipo transversión G por T (en el 84% de los casos)(figura4) también en el codón 12 o 13. Siendo en este caso los cambios más comunes por cys (en el 47% de los casos), val (24% de los casos), Asp (15% de los casos) y por alanina (7% de los casos).

(15)

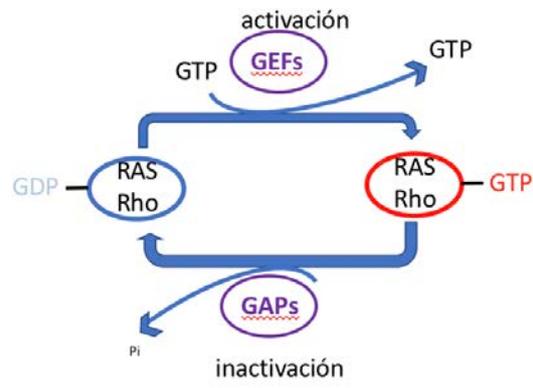


Figura 3. Mecanismo de activación e inactivación RAS.

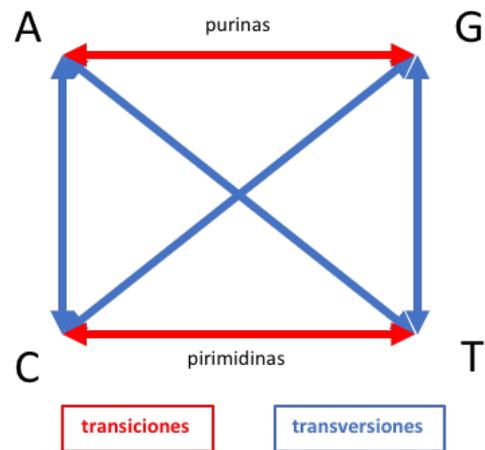


Figura 4. Diferencias entre transición y tranversión.

1.4. VIAS MOLECULARES RELACIONADAS EN CPNCP CON MUTACIÓN KRAS

La mutación de KRAS en cáncer de pulmón está relacionada con múltiples genes (figura 5), entre ellas MAPK, PI3K- mTOR, CDCP1₍₁₂₎, MEK-ERK₍₃₎, Ral, PKC_{t(13)} (14), YAP1, p70 S6 kinasa, entre otras y su efecto sobre estas provoca diferentes cambios funcionales. La expresión de estos genes, su dependencia de KRAS y su función es diferente en las distintas líneas celulares de CPNCP con mutación de KRAS.

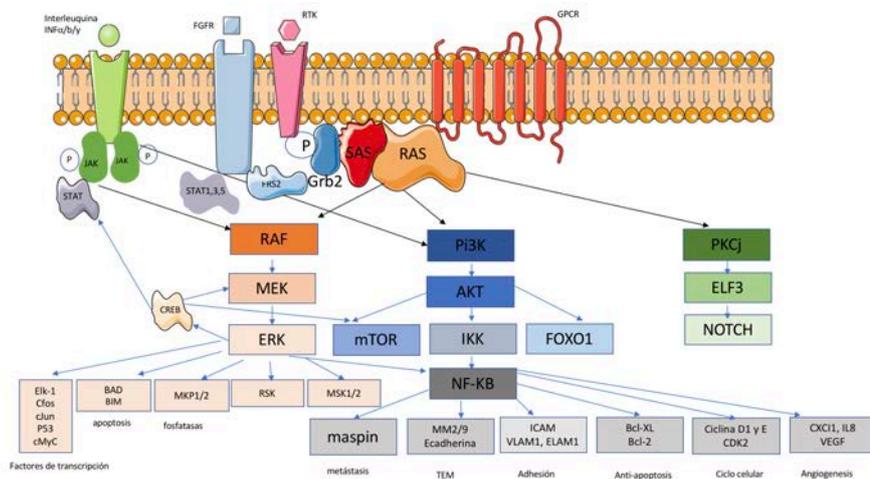


Figura 5. Vías relacionadas con KRAS.

Existen múltiples estudios basados en inhibición de las diferentes vías implicadas para inhibir el crecimiento, diferenciación celular y/o aumento de apoptosis celular en CPNCP con mutación de KRAS.

A continuación explicaremos las diferentes vías relacionadas con KRAS con tal de poder conocer la relación que existen entre ellas y así entender la complejidad de esta alteración molecular, los mecanismos de acción de los tratamientos probados hasta el momento y sus vías de resistencias, así como nuestra hipótesis en cuanto a la combinación de fármacos.

a) Vía MAP kinasas.

Es bien conocida la relación de KRAS con la vía MAPK (mitogen activated protein kinases). Dentro de la familia de MAPK en mamíferos se conocen 6 proteínas kinasas que están reguladas por señales extracelulares, entre ellas las más conocidas son ERK 1/2 (extracelular signal-regulated protein kinases), proteínas kinasas del extremo N-terminal de cJun (JNK, cJun N terminal kinases) y las p38 MAPKs. (42)

Las MAPKs (Figura 6) son una familia de proteínas serina/treoninas kinasas que se organizan en 3 niveles. Las MAPKs se activan por hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, factores externos estresantes (radiación, daño isquémico...) que actúan sobre receptores tirosin kinasas (RTKs) lo cuales están acoplados a proteínas G (GPCRs) como RAS, receptores de citoquinas o receptores serina/treonina kinasa, MAPK kinasa kinasa (MAPKKK, MAPK kinasa kinasa) que es activada por fosforilación. Ésta activa mediante fosforilación una MAPK kinasa (MAPKK, MAPkinasa) que a su vez activa MAPK por fosforilación doble en residuos de treonina y tirosina. Posteriormente, las MAPKs fosforilan a sus sustratos en residuos de serina o treonina. Las MAPKs tienen sustratos en citosol y en el núcleo donde fosforilan factores de transcripción y regulan la expresión génica.

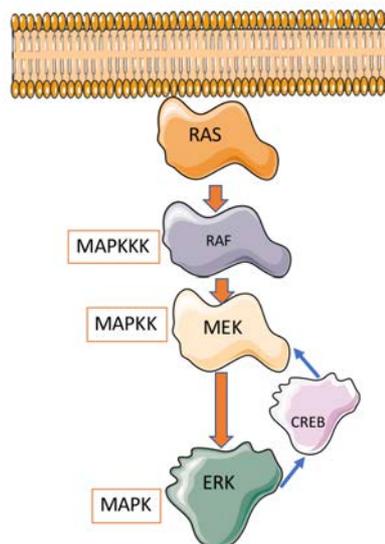


Figura 6. Vía MAP kinasas.

Dentro de las vías de las MAPKs está la vía de RAS. El gen RAF codifica una proteína kinasa kinasa kinasa MAP (MAP3K). Una vez activada mediante RAS, la proteína celular RAF puede fosforilar para activar las proteínas kinasas MEK1 y MEK2, que a su vez se fosforilan para activar las proteínas kinasas específicas de serina / treonina, ERK1 y ERK2. La activación de ERK puede fosforilar más de 150 sustratos nucleares y citosólicos, entre ellos MSK1/2 (mitogen and stress activated kinase), RSK (también conocida como p90 RSK S6 Kinasas), fosfatasa como MKP1/2, proteínas relacionadas con la apoptosis como BAD o BIM, factores de transcripción como Elk-1, c-Fos, cJun, p53 y cMyc. Éste último, codifica una proteína multifuncional que participa en la progresión del ciclo celular, apoptosis y transformación celular. (58)(figura5)

En CPNCP con mutación de KRAS, Myc tiene como función la doble inhibición, por una parte la inhibición de la vía de MAPK y PI3K y también su propia inhibición mediante la defosforilación de una serina-62 y fosforilación de treonina-58, lo que produce una degradación de Myc mediada por una proteasa.(42)

La vía MAP kinasa por lo tanto, participa en el control de la expresión génica implicada en el ciclo de división celular, la apoptosis, la diferenciación celular y la migración celular.

Se ha intentado la inhibición de KRAS mediante la inhibición de MEK (mitogen-activated protein/extracelular signal-regulated kinase), pero los resultados han sido limitados por la activación de otras múltiples vías.

En la vía RAS/MEK/ERK participa también CREB (Figura5 y 6). CREB es un factor de transcripción miembro de la familia de las ZIPPER leucina. Esta proteína se une como un homodímero a cAMP. La proteína es fosforilada por varias proteínas kinasas, e induce la transcripción de genes en respuesta a la estimulación hormonal de la vía de AMPc. (48)

CREB es activado por ERK1/2 y este activa MEK1/2 por lo que amplifica esta vía. CREB a su vez activa de la vía ubiquitin proteosoma, mTOR y STAT3. La activación de este último provoca la inducción de la transición epitelial mesenquimal (EMT). (72).(73) (74).

b) Vía Pi3K- AKT-mTOR. Activación

Las proteínas PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) forman una familia de enzimas capaces de fosforilar el grupo 3-OH del anillo de inositol del fosfoinositol (PI) y generar fosfatidilinositoles PIP3. (42)

La familia de PI3K está constituida por tres clases diferentes: la clase I (con dos subgrupos IA y IB), la clase II y la clase III. Sólo la clase IA está relacionada con la carcinogénesis.

Las proteínas PI3K son heterodímeros formados por una subunidad reguladora y otra catalítica. La clase IA tiene cinco isoformas de la subunidad reguladora, de las cuales p85 es la más conocida. Ésta contiene dos dominios SH2, a través de los cuales se une a residuos de fosfotirosina de RTKs y un dominio de unión a la subunidad catalítica p110. La subunidad catalítica p110 tiene tres isoformas diferentes con la misma estructura básica, que incluye varios dominios responsables de la interacción con p85 y Ras, un dominio C2, importante en la unión a la membrana, y el dominio catalítico kinasa.

El complejo p85/p110, en ausencia de señales, se encuentra inactivo en el citoplasma. Se activa con la unión de un ligando a RTK, que da lugar a la transfosforilación de su dominio citoplasmático. Después, el dímero p85/p110 se une al receptor a través del dominio SH2 de p85 y esta subunidad sufre cambios conformacionales que activan la subunidad p110. A su vez, p110 activa se sitúa junto a sus sustratos lipídicos en la membrana celular. Los receptores RTKs también pueden activar a PI3K de forma indirecta a través de Ras (figura 7), la cual se une directamente a la subunidad catalítica p110, activándola, sin necesidad de la participación de la subunidad reguladora p85.

PI3K IA mediante la fosforilación de PIP2, lo transforma en PIP3 y actúa como segundo mensajero activando AKT. PTEN en cambio, es una fosfatasa que regula los niveles de PIP3, impidiendo la activación de AKT, por lo que tiene un efecto inhibitorio y regulador (figura 8).

AKT es una familia de proteínas formada por 3 formas: AKT1, AKT2 y AKT3, también conocidos como PKB α , PKB β y PKB γ (Protein Kinase B α , β y γ). Cada isoforma está

implicada en una función. AKT1 tiene como función la supervivencia, AKT2 el transporte de glucosa y AKT3 regula el crecimiento celular a nivel cerebral.

La regulación de AKT (figura 6) empieza en la translocación desde el citoplasma a la membrana plasmática. PI3K se une a la cara interna de la membrana plasmática y a AKT de forma directa a través de su dominio PH. Al situarse en la membrana se une a las proteínas kinasas, quienes la fosforilan y activan, provocando un cambio de conformación en AKT. La fosforilación se produce en los residuos T308 y S473.

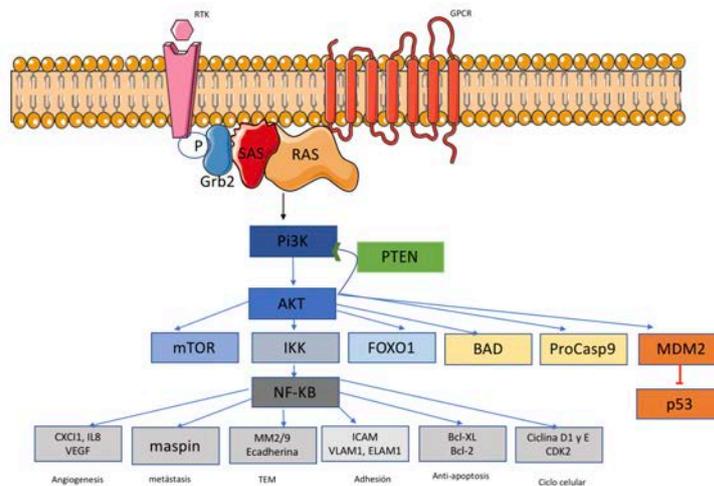


Figura 7. Vía Pi3K-AKT-mTOR

La fosforilación de T308 se produce por la proteína serina/treonina kinasa PDK1 (3-Phosphoinositide-Dependent Kinase-1) y la de S473 por PDK2. Pese a que para la activación de AKT es suficiente con la fosforilación de T308, su activación máxima se produce con la activación también de S473. (42)(figura 8)

mTOR (mammalian Target of Rapamycin) es una proteína con actividad serina/treonina kinasa. Es la subunidad catalítica de dos complejos moleculares, mTORC1 y mTORC2 (mTOR complex 1 y 2). (figura 8)

mTORC1₍₈₄₎ está formado por mTOR, la proteína reguladora LST8, PRAS40, DEPTOR y la proteína Raptor (regulatory associated protein of mTOR). Regula el crecimiento celular en respuesta a factores de crecimiento, modula la transcripción y la síntesis de proteínas. Este complejo está regulado negativamente por TSC1/2 que inhibe

al activador de mTORC1, Rheb. TSC1/2 puede ser inhibido mediante la fosforilación de AKT, ERK y RSK. Los sustratos de mTORC1 son las proteínas reguladoras de la traducción pT70S6K y el factor de iniciación de la traducción 4EBP1 (eukaryotic initiator factor 4E binding protein 1). (figura 8)

mTORC2 está formado por mTOR, LST8, RICTOR (Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR) y mSin1 (también conocida como MK1 (MAPK-Associated Protein 1)). Entre sus funciones está la de activar AKT₍₈₅₎ mediante la fosforilación del residuo S473, también es necesario para la fosforilación de AKT en otros sustratos como FoxO1/3a y la fosforilación de varias PKC. mTORC2 puede asociarse a ribosomas de forma dependiente del factor de crecimiento siendo importante en la activación de mTORC2 mediada por insulina/PI3K. También se asocia con MAM estimulada por factores de crecimiento, promoviendo el metabolismo mitocondrial y la supervivencia celular.

mTORC2 está regulado por diferentes mecanismos, entre ellos TSC, que al contrario que en mTORC2, lo activa. La inhibición de TSC produce una activación de mTORC1 elevada y constitutiva independiente del estado del factor de crecimiento y atenúa la señalización de PI3K, produciendo así un estado de resistencia a la insulina celular. S6K1 y mTORC1 fosforilan IRS-1 directamente para inducir su degradación, desacoplando así el receptor de insulina de PI3K. mTORC2 también limita la señalización de PI3K induciendo la degradación de IRS-1. mTORC2 fosforila y estabiliza Fbw7, una subunidad de ubiquitina ligasa que se dirige a IRS-1 para la degradación. La fosforilación mediada por mTORC1 de Grb10 limita la señalización del factor de crecimiento, estabiliza Grb10 y atenúa tanto la señalización de PI3K como la de MAPK / ERK. Dependiendo del contexto celular, S6K1 o Akt fosforilan mSin1 directamente (en T86 y T398), disociando mSin1 del complejo y disminuyendo la señalización de mTORC2. En líneas similares, es conocido que S6K1 fosforila rictor directamente (T1135), lo que puede reducir la señalización de mTORC2 a Akt. Estos datos revelan que tanto mTORC1 como mTORC2 participan en la retroalimentación negativa para mantener una señalización adecuada por los receptores del factor de crecimiento y los mTORCs.

Otra proteína reguladora sería Rac1 GTPasa que interactúa con mTOR y activa tanto mTORC1 como mTORC2.

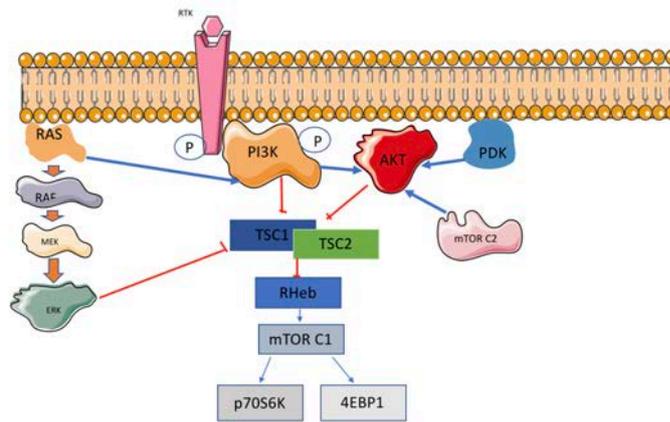


Fig. 8. vía PI3K- AKT- mTOR y sus funciones.

La vía de PI3K-AKT- mTOR se encuentra desregulada en el 30% de los tumores esporádicos, provocando un aumento en la proliferación y supervivencia celular.

Funciones biológicas de PI3K-AKT- mTOR:

Proliferación celular y crecimiento celular: AKT además de su asociación con la vía RAS/ERK-MAPK tiene su papel en el proceso de proliferación celular regulando el ciclo celular. AKT fosforila la proteína GSK-3 beta (glycogen Synthase Kinase 3beta) y la inhibe. GSK3beta fosforila e inhibe proteínas que intervienen en el ciclo celular como Myc, ciclina D1 y ciclina E (figura 7). Además, también fosforila mediante factores de la transcripción como FOXO o directamente inhibidores del ciclo celular como p21^{WAF1/CIP1} y p27^{kip1}. Por otro lado, AKT regula el ciclo celular mediante inhibición de la actividad de TSC1 (tuberous Sclerosis 2). La proteína TSC2 inhibe la vía Rheb/mTOR, que activa el crecimiento celular. Por lo que la inhibición de TSC2 mediante AKT activa la vía Rheb/mTOR. (figura 8)

Supervivencia celular: AKT fosforila e inactiva factores de transcripción proapoptosis como FOXO, secuestrándolos en el citoplasma e impidiendo su translocación al núcleo y, por tanto, evitando la activación de sus genes diana, entre los que se encuentran las proteínas proapoptóticas BIM y su ligando FAS. Además, AKT regula NFkB, que induce supervivencia celular en respuesta a estímulos apoptóticos. AKT disminuye la actividad

proapoptótica de p53 por fosforilación de su inhibidor MDM2, este se transloca al núcleo y se une a p53 degradándolo.

Dentro de las proteínas NFκB hay 5 proteínas diferentes: Rel, p65/rel, p50/NFκB1 y p52/NFκB2. Se trata de un factor de transcripción que se encuentra en el citoplasma de manera inactiva unido a proteínas inhibidores IκB. Al activarse mediante un estímulo activador, se produce la activación del complejo de kinasas de IκB (IKK-IκB). Este complejo está formado por 4 subunidades, las catalíticas IKK1 y 2 (también conocidas como alfa y beta) que tienen actividad kinasas y fosforilan a IκB la reguladora de IKK3, IKKγ o NEMO (NFκB esencial modulador). La fosforilación de IκB favorece su ubiquitinación y su degradación mediada por el proteosoma, lo que produce la liberación del heterodímero NFκB seguida de su translocación al núcleo donde regula la expresión de más de 200 genes. (42)

La actividad de NFκB está regulada por diferentes proteínas, los más conocidos son los que actúan a través de receptores de la familia TNFalfa, TLRs y receptor de IL-1.

NFκB interviene en múltiples funciones como, regular el sistema inmunológico (citoquinas, proteínas proinflamatorias, quimioquinas...) que regulan tanto al sistema inmune innato y proteínas que regulan el sistema inmune específico (MHC y citoquinas como IL-2, IL-12, e interferón), además de participar en la proliferación y diferenciación de linfocitos. Por otra parte, también regula la expresión de proteínas que inhiben la apoptosis y promueven la supervivencia y la proliferación celular (C-IAP-1 y 2, XIAP, FAS) y miembros antiapoptóticos de la familia bcl-2 como Bcl-X_L y FLIP y miembros del ciclo celular como ciclina D1, ciclina E, CDK2 y Myc.(figura 7)

Se ha demostrado que la presencia de mutación de Ras provoca un aumento en la expresión de NFκB y este a su vez provoca la proliferación celular e inhibe la apoptosis. Además, en células tumorales también provoca el fenómeno de transición epitelio-mesenquimal (EMT) a través de la regulación de la transcripción de E-cadherina, metaloproteasas MMP2 y MMP9 y las moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1 y ELAM-1. También favorece la angiogénesis a través de la regulación del factor de crecimiento de células endoteliales (VEGF), CXCL1 e IL8.

c) JAK/STAT3.

La vía JAK-STAT tiene su función en la transmisión de las acciones de las citoquinas y factores de crecimiento, compartiendo muchos elementos de las vías de los RTKs. Regula el crecimiento y diferenciación y supervivencia celular (42)-(figura 5)

STAT3 es un gen que codifica una proteína de la familia STAT. En respuesta a citoquinas y factores de crecimiento, los miembros de la familia STAT son fosforilados por kinasas asociadas al receptor y posteriormente forman homó o heterodímeros que se translocan al núcleo celular donde actúan como activadores de la transcripción. Regula la expresión de una variedad de genes en respuesta a los crecimientos celulares y por tanto desempeña un papel clave en muchos procesos celulares tales como crecimiento celular y la apoptosis. Pero también su activación constitutiva ha sido detectada en muchos tipos de tumores, así como está relacionada con peor pronóstico en muchos tumores. También se ha demostrado que está relacionado con la carcinogénesis y la transformación de fibroblastos o células epiteliales en células tumorales. (94)(95),

La vía se inicia a partir de la activación de los receptores de citoquinas, tales como eritropoyetina (Epo), trombopoyetina (TPO), factor estimulador de la formación de colonias de granulocitos (G-CSF), interferón I y II (IFN) e interleuquinas (Il 5, Il 6...). Estos receptores, no tienen capacidad catalítica intrínseca en sus dominios citosólicos y se unen a miembros de la familia de proteínas kinasas citosólicas Janus (JAK) que está formada por JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2. La unión de una citoquina al dominio extracelular de su receptor específico provoca un cambio conformacional que promueve la dimerización o formación de oligómeros de monómeros activados. Esto provoca la activación de JAK, mediante autofosforilación y/o transfosforilación de otro miembro de la familia. (figura 9)

Al activarse JAK, fosforila al receptor en los residuos de tirosina que sirven de sitios de unión para proteínas con dominio SH2. Los sustratos más destacados son los miembros de la familia de los factores de transcripción transductores y activadores de la transcripción (STATs). Estos factores de transcripción una vez unidos al receptor son fosforilados bien por el propio receptor, mediante JAK o Src. Al fosforilarse STAT provoca su homodimerización o heterodimerización con otro miembro de la familia y al

dimerizarse se translocan al núcleo donde regulan la expresión de genes específicos, entre los que destaca Myc. (42)(figura 9)(97)

Está descrito el papel regulador de RAC1 (GTPasa) y el papel inhibidor específico de la proteína PIAS3 sobre STAT3. (52)

Además, la interacción de los receptores de citoquinas con otras proteínas que contienen dominios SH2 como kinasas Src, proteínas fosfatasa y otras proteínas adaptadoras de la señalización como Shc, Grb2 y PI3K activan varias vías de señalización.(Figura 5)

La activación de la vía de JAK- STAT confiere resistencia al tratamiento con platino. Existen fármacos como ruxolitinib que son inhibidores de esta vía que actualmente se están probando en combinación con otros fármacos para evitar resistencias. (54)

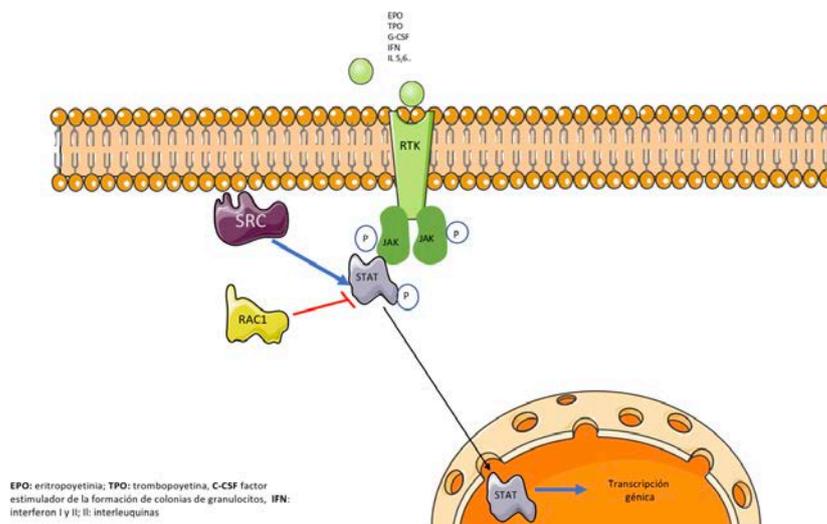


Figura 9. Vía de señalización JAK-STAT.

d) SRC- PAXILIN- YAP. (86)

Los receptores tirosin quinasa mediante SHP2 activa Src fosforilándolo. Src es similar al V-rsc (virus del sarcoma de Rous). Es un protooncogen que participa en el desarrollo embrionario y en el crecimiento celular. La proteína codificada por dicho gen es una

tirosin-kinasas cuya actividad puede ser inhibida por la fosfolización de ésta. Las mutaciones activadoras en este gen están relacionadas en el desarrollo tumoral. (51)

La paxilina es un sustrato de Src, BCR/ABL o FAK y está implicada en la transformación celular, la migración y la adhesión celular, mediada por moléculas de integrina transmembrana por sus ligandos de la matriz extracelular que incluyen fibronectina, vitronectina, colágeno y laminina. Esta interacción induce la fosforilación de proteínas, cambios en el pH intracelular y los niveles de calcio y la activación de MAP kinasa mediante activación de receptores tirosin kinasa y estas a su vez, activan diferentes vías relacionadas como la vía de JNK. (Figura 10)

El gen YAP1 codifica una proteína nuclear de la vía Hippo, la cual está relacionada con desarrollo, crecimiento, reparación y homeostasis. Pero también puede estar expresada independientemente de la vía HIPPO. Es importante en el desarrollo y progresión tumoral. (47) YAP puede estar fosforilado en diferentes residuos: YAP- p (Y357) que se produce mediante Src, independiente de la vía Hippo y tiene una función activadora y YAP-p (S127), en cuya fosforilación interviene la vía HIPPO. Tiene una función inhibidora.

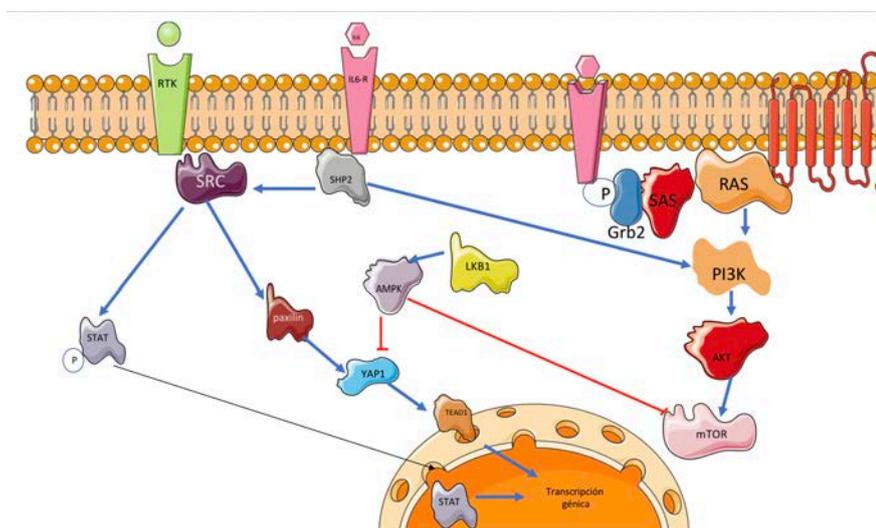


Figura 10. Relación de la vía LKB1-AMPK con vía Pi3K-AKT-mTOT y YAP1.

e) LKB1 (STK11)- AMPk-YAP.

LKB1 o STK11 codifica un miembro de la familia serina/treonina kinasa. La cual regula la polaridad celular y funcional como un supresor de tumores. ⁽⁵⁰⁾ LKB1 suprime el crecimiento celular a través de la activación de AMPK y su vez inhibe mTOR y YAP1. YAP también puede ser inhibida directamente por LKb1 de forma independiente de AMPK. ^{(75)(116)(figura 10)}

f) FGFR1 y FRS2

El receptor del factor de crecimiento 1 (FGFR1) consiste en una proteína extracelular compuesta de tres dominios de tipo inmunoglobulina, un segmento que está en la membrana y un dominio tirosin kinasa citoplasmática. ⁽⁵⁶⁾

Tiene como ligandos a los factores de crecimiento monoméricos (FGF2), los cuales no contactan directamente con FGFR1 sino mediante una molécula de heparina. Esta unión permite la unión de otro FGFR1 produciendo su dimerización y transfosforilación. ⁽⁵⁵⁾

Una vez activada inicia una cascada de señalización que influye en la mitogénesis y en la diferenciación y autofagia. ⁽⁵⁷⁾

FGFR1 está relacionado con la activación de vía RAS/MAPK, fosforilación de AKT (activación vía Pi3K/AKT) y fosforilación de ERK y la vía dependiente de STAT. ⁽⁴²⁾ (figura 5)

FRS2 (Fibroblast growth factor receptor substrate 2) es una proteína de acoplamiento anclada a membrana que desempeña un papel importante en la unión de FGF, factor de crecimiento nervioso (NGF) y receptores de factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) con la vía de RAS- MAPKkinasa.

También hay publicaciones que demuestra la relación de FRS2 con el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Tras la estimulación con EGF, FRS2 media la actividad de MAPK y fosforila residuos de tirosina así como serina / treonina. Esto implica la interacción directa del dominio PTB de FRS2 con el EGFR y da como resultado una movilidad significativamente alterada de FRS2 en SDS-PAGE que también se observa

en células estimuladas con FGF. Este desplazamiento de la migración de FRS2 es completamente derogado por U0126, un inhibidor específico de MAPK kinasa 1 (MEK1), lo que sugiere que ERK1 / 2 actúa como serina / treonina kinasa en la vía de FRS2. La parte central de FRS2 se asocia constitutivamente con ERK1 / 2, mientras que la región carboxi-terminal FRS2 sirve como sustrato para la fosforilación de ERK2 en respuesta a la estimulación de EGF y FGF. En particular, la fosforilación de tirosina de FRS2 se mejora cuando la activación de ERK1/2 se inhibe después de la estimulación de EGF y FGF. Estos resultados indican un bucle de retroalimentación regulador negativo estimulado por ligando en el que se activaron los fosforilados de ERK1 / 2 FRS2 en residuos de serina / treonina regulando a la baja su fosforilación de tirosina.⁽⁵³⁾⁽⁵⁴⁾

g) Vía PKC_γ- ELF3-NOTCH.

La vía de NOTCH la cual está relacionada con células madres, las cuales son las responsables de la iniciación y mantenimiento de las células tumorales. Se conoce que estas células son quiescentes y resistentes a quimioterapia y radioterapia. La sobreexpresión de NOTCH se relaciona con peor pronóstico, dado que juega un papel esencial en las células madres tumorales. Además, la inhibición de la vía de NOTCH mediante gamma secretasa induce la apoptosis y el crecimiento in vivo. La hipoxia por otra parte induce la activación de la vía NOTCH. ⁽⁴⁴⁾HES1 está presente en la vía NOTCH y su presencia se relaciona con la activación de ésta.

En tumores de pulmón con mutación de KRAS se ha demostrado la activación de la vía PKC_γ-ELF3-NOTCH, la cual es importante en células con fenotipo TIC (células iniciadoras de tumor) presentes en las primeras etapas de la tumorigénesis. Se ha demostrado que la sobreexpresión de PKC_γ otorga un peor pronóstico. ⁽⁴²⁾⁽¹³⁾

El bloqueo farmacológico de PKC_γ y NOTCH produce un efecto sinérgico antitumoral en vivo y en vitro en CPNCP con mutación de KRAS. PKC_γ regula NOTCH3 pero no tiene efecto sobre NOTCH1 ni NOTCH2 ni sobre sus ligandos JAG1, JAG2, DLL1, DLL3 o DLL4. Al bloquear PKC_γ se observa un aumento de NOTCH3.⁽¹⁴⁾ El bloqueo de NOTCH3 inhibe al crecimiento de oncosferas cuando se realizan experimentos con líneas celulares con mutación de KRAS y los cultivos se realizan en condiciones de baja adherencia en

medios para células madre, lo que afecta disminuyendo la expansión clonal y viabilidad celular. Este comportamiento no se ha objetivado en líneas celulares de carcinoma escamoso de pulmón ni en adenocarcinoma de pulmón sin mutación de KRAS.

1.4.1. RECEPTORES TIROSIN KINASA

Los receptores tirosin kinasa al activarse mediante la unión a ellos de hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, factores externos estresantes (radiación, daño isquémico...), etc. provocan la activación de múltiples vías de señalización. Entre otros receptores de tirosin kinasa en las células tumorales de pulmón con mutación de KRAS intervienen en diferentes procesos:

a) CDCP1 (SIMA135, gp140 o Trask)

Este gen codifica una proteína transmembrana que actúa como sustrato para kinasas de la familia de Src. La proteína juega un papel en la fosforilación de tirosina dependiente, que está involucrado en la invasión tumoral y metástasis. (45)(92)(93)

CDCP1 al ser fosforilada se une directamente a la proteína kinasa_J (PKC_J) activándola, lo que provoca la resistencia a la anoikis (92)(apoptosis producida por la pérdida de anclaje de la célula a la matriz extracelular), migración e invasión celular, además de la secreción de metaloproteínas in vitro. Por lo tanto, la vía CDCP1-PKC_J se requiere para el proceso de metastatización₍₁₂₎. La expresión de CDCP1 en varios trabajos se ha relacionado con peor pronóstico.

La expresión de CDCP1 se ve aumentada en células tumorales con KRAS mutado. Se han realizado estudios en los que al inhibir MEK, se reduce la fosforilación de ERK y a la vez se reduce la expresión de CDCP1, por lo que se demuestra que CDCP1 está relacionada con la vía RAS-RAF-MEK-ERK. Además, la activación de Src mediante Ras permite la fosfolización de CDCP1 y ésta permite la transducción de CDCP1 a PKC_J. Líneas celulares con baja expresión de SFK (src) producen una baja expresión de CDCP1 pese a la mutación de KRAS.

b) AXL:

AXL (proteína receptor tirosin kinasa UFO, TYRO7 y ARK) es una proteína que tiene un dominio extracelular el cual está compuesto por dos inmunoglobulinas con dos motivos N terminal y dos fibronectinas tipo III. Traduce las señales de la matriz extracelular hacia el citoplasma mediante la unión a Gas6. Al unirse produce una activación catalítica de la actividad kinasa, lo que provoca la activación de una cascada de señales como MAPK/ERK y PI3K/AKT relacionadas con el crecimiento celular, invasión, supervivencia, metastatización, antiapoptosis y resistencia a tratamientos dirigidos y quimioterapia. Además, hay estudios que presentan indicios de que pudiera estar relacionado con afectación de SNC. (46)

La expresión de AXL está relacionado también con la inducción de la transición epitelio mesenquimal (EMT).

c) EGFR:

EGFR es una proteína de superficie celular que se une al factor de crecimiento epidérmico. La unión de la proteína a un ligando induce la dimerización del receptor y la autofosforilación de tirosina y conduce a la proliferación celular.

d) MET:

MET se procesa proteolíticamente para generar subunidades alfa y beta que están unidas mediante enlaces disulfuro para formar el receptor maduro. La unión de su ligando, factor de crecimiento de hepatocitos, induce la dimerización y activación del receptor, que desempeña un papel en la supervivencia celular, la embriogénesis y la migración e invasión celular.

1.5. CLASIFICACIONES O SUBTIPOS DE CPNCP CON MUTACIÓN DE KRAS

En la lucha por caracterizar correctamente el CPNCP con mutación de KRAS para poder conseguir tratamientos dirigidos y efectivos se han desarrollado diferentes subdivisiones, por fenotipo, según mutaciones de KRAS o co- expresión de otros genes (STIK11, TP53 y CDKN2A/B).

a) SUBTIPO CON RELACIÓN A MUTACIÓN DE KRAS.

Las diferentes mutaciones de KRAS influyen en sus funciones dentro de las diferentes vías de señalización (7).

Se ha encontrado que la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular como PLK1, cyclin B y ciclina E está disminuida en tumores con KRAS G12C (Cys) o KRAS G12V (Val) comparado con otros tumores con diferentes mutaciones de KRAS₍₁₅₎. En líneas celulares con mutaciones KRAS G12C o G12V se han encontrado niveles bajos de AKT fosforilado, mTOR y pMEK, pero aumento de la activación de RAL. En cambio, en líneas celulares con mutación KRAS G12D (asp) encontramos elevados niveles de fosforilación de AKT y bajos niveles de activación de RAL con respecto a líneas celulares sin mutación de KRAS. Por otra parte, también se objetivó que la activación de mTOR en diferentes mutaciones de KRAS presenta una activación de pAKT y una disminución de la expresión de p70 S6 kinasa (cuya función es regular mediante retroalimentación la señalización de factores de crecimiento). mTOR puede ser activado mediante AKT además de mediante la vía MAPK y RAL.

En resumen, KRAS G12D presenta activación de RAF y AKT (y por tanto activación la vía de Pi3K y MEK) mientras que KRAS G12C presenta activación de RAF y RAL y leve activación de AKT. Además, como hemos dicho anteriormente, la vía de activación de AKT es diferente dependiendo del tipo de mutación. En KRAS G12D la vía PI3K está constitutivamente activada y no está sujeta a la inhibición de mTOR, en cambio, en células sin mutación de KRAS o con KRAS G12C la activación de AKT es vía mTOR

(Figura 11).

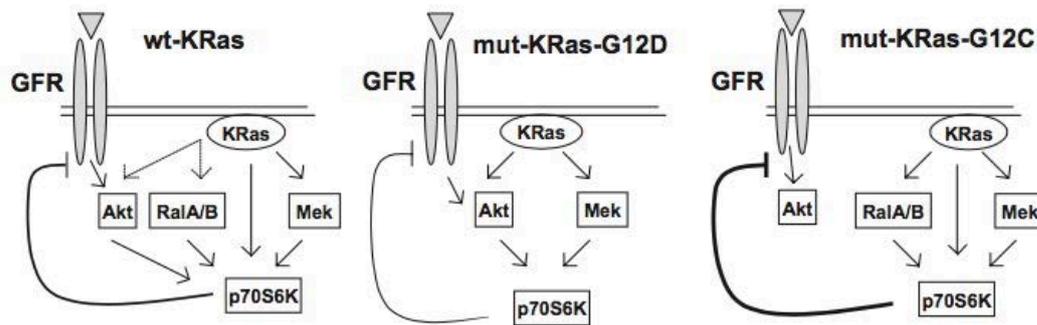


Fig.11. Vías moleculares relacionadas con diferentes mutaciones de KRAS.⁽¹⁵⁾

No queda claro el papel pronóstico de KRAS, dado que hay resultados discordantes en diferentes estudios. Existe un análisis retrospectivo realizado en 85 pacientes con CPNCP operados ⁽⁸⁾ que mostró que la presencia de G12C estaba asociada con menor supervivencia global (SG) y tiempo libre de progresión (TLP), en cambio otro grupo publicó que la presencia de la mutación de KRAS G12C o G12V estaba relacionada con una mayor supervivencia global y supervivencia libre de progresión ⁽⁹⁾. Recientemente, el análisis retrospectivo realizado en 841 pacientes con CPNCP operados, 265 presentaban mutaciones de KRAS, de ellos los pacientes con mutación G12V presentaban un peor pronóstico ⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹⁵⁾.

b) CLASIFICACIÓN FENOTÍPICA:

Existen estudios publicados que han demostrado la existencia de subtipos de adenocarcinoma de pulmón con mutación de KRAS: epitelial y mesenquimal. ⁽³⁾

La EMT (transición epitelio mesenquimal) promueve la pérdida de adhesión celular provocando un cambio fenotípico de epitelial a mesenquimal. Este proceso está relacionado con la resistencia adquirida y primaria a los tratamientos (por ejemplo, predice sensibilidad a tratamientos con inhibidores de tirosin kinasa en pacientes con adenocarcinoma de pulmón con mutación de EGFR ⁽³⁾) y en el comportamiento del tumor.

El resultado de la inhibición de MEK es diferente dependiendo del fenotipo mesenquimal o epitelial de las células tumorales. En células con fenotipo epitelial con mutación de KRAS la inhibición de MEK provoca una expresión de ERBB3, el cual a su vez activa la vía de PI3K y AKT y MAPK. En cambio, en las células mesenquimales la inhibición de MEK provoca una inhibición de la expresión de FGFR1 que en situación basal su expresión es alta. En cultivos celulares con líneas con mutación de KRAS y fenotipo mesenquimal la inhibición de MEK y de FGFR1 induce la apoptosis y reducción tumoral en vivo.

La inhibición de MEK con trametinib o selumetinib provoca una activación posterior de ERK. La inhibición de PI3K/AKT o MEK provoca una disminución de la retroalimentación negativa sobre RTKs. En experimentos con líneas celulares la inhibición de MEK mediante tratamiento con trametinib ha objetivado un aumento de la fosforilación de ERBB3 y ERBB2, sobretodo en líneas celulares con KRAS mutado y fenotipo epitelial. Además, se objetiva una sobreexpresión de PI3K mediada por ERBB3. Se ha demostrado también, que la inhibición mediante fármacos paninhibidores de ERBB o bloqueo mediante siARN junto con inhibidores de MEK (trametinib) produce una anulación del rebrote de la activación de ERK y la sobreexpresión de la fosforilación de AKT aumentando la apoptosis, hecho que también se ha objetivado en estudios in vivo.

En líneas celulares con mutación de KRAS y fenotipo mesenquimal se ha demostrado una pérdida de ERBB3 junto con el resto de proteínas de la familia ERBB (EGFR, ERBB2, ERBB3 y ERBB4) y CDH1 (E-cadherina) y una sobreexpresión de FGFR1 y VIM (vimentina).

En células mesenquimales con mutación de KRAS la inhibición de MEK activa FRS2 y este a su vez provoca la activación de ERK. En estas células también se objetiva aumento de la fosforilación de PI3K y AKT. Además, inhibidores de MEK como trametinib suprime la expresión de reguladores inhibidores de la vía MAPK, incluyendo proteínas Sprouty (SPRY1, SPRY2 y SPRY4) y MAPK fosfatasa (MPKs y DUSP). Las proteínas Sprouty antagonizan la activación mediada por FGFR mediante la competición con la unión de FRS2 con GRB2 y el complejo SOS. Por lo que se hipotetiza que la supresión

de las proteínas SPRY o DUSP permite la activación de FRS2 y este a su vez activa FGFR1. Por lo que la inhibición de MEK con trametinib activa ERK mediante la activación de FRS2. En líneas celulares mesenquimales la inhibición de MEK y de FGFR provoca una inhibición de la fosforilación de ERK y mejora la supresión de la fosforilación de AKT. Esta combinación no provoca esta inhibición en líneas celulares epiteliales, provocando niveles de apoptosis similares que con el tratamiento en monoterapia con inhibidores de MEK. Dada esta heterogeneidad dentro de las células tumorales con mutación de KRAS se barajan múltiples posibilidades de combinaciones, tratando el CPNCP KRAS mutado como no una única enfermedad homogénea.

Hay estudios publicados ⁽⁷⁾ que afirman que las líneas celulares de CPNCP con mutación de KRAS en las cuales la apoptosis y crecimiento celular son dependientes de la mutación de KRAS son mayoritariamente líneas celulares con fenotipo epitelial. Es decir, en células epiteliales de CPNCP con mutación de KRAS, la supresión de la mutación de KRAS modifica la apoptosis y crecimiento celular, en cambio en células con diferenciación mesenquimal, este efecto es menor, por lo que se orienta a que dependa también de otros factores. En este grupo se dividen las CPNCP en dos subgrupos, dependientes e independientes.

Dentro del subgrupo dependientes de KRAS, se estudia la expresión de SYK, ITGB6 y MST1R los cuales producen las proteínas SyK tirosin kinasa, subunidad integrina beta6 y RON receptor tirosin kinasa. Estas 3 proteínas presentan niveles altos en células de CPNCP dependientes de KRAS. En cambio, líneas celulares de CPNCP independientes de KRAS aunque pueden expresar dichas proteínas no se expresan en todas. La inhibición de la expresión exógena y endógena de KRAS provoca la reducción de la expresión de SyK y Ron- beta, pero no de beta6 integrina. Por lo que parte de los genes relacionados con la dependencia de KRAS se produce bajo el control transcripcional o postranscripcional de KRAS. Lo mismo ocurre con ANKRD22 y PROM2 que está poco expresada en líneas celulares independientes, pero es elevada en líneas celulares dependientes de KRAS. Además, se ha visto que en CPNCP dependientes de KRAS, la inhibición mediante shRNA de ITGB6, ANKRD22 o SYK provoca la pérdida de la expresión de caspasa 3 y de E-cadherina, lo que es indicativo de EMT (transición epitelio mesenquimal).

Por otra parte, se realizó un subestudio de la expresión de genes dependiendo de la diferenciación celular y de subtipos de CPNCP adenocarcinoma y escamoso. Objetivándose también diferente expresión de genes en estos subtipos.

Se han testado fármacos inhibidores de Syk (proteína con función antiapoptótica) como R406 (fármaco desarrollado para artritis reumatoides y linfoma B) y se ha observado alta sensibilidad para líneas celulares dependientes de KRAS en comparación con líneas celulares independientes de KRAS.

C) SUBCLASIFICACIÓN MOLECULAR

El equipo del Dr. Skoulidis han realizado una clasificación del CPNCP con mutación de KRAS en subgrupos dependiendo de la expresión de STIK11/LKB1, TP53 y CDKN2A/B. Esta clasificación parece no tener relación con la expresión fenotípica (mesenquimal y epitelial)⁽¹⁷⁾ ni tampoco con el tipo de mutación de KRAS.^(figura 12)

- Subgrupo 1 (Kc): caracterizado por mutaciones en CDKN2a y CDKN2b que codifican p16 y p15 (genes supresores de tumores) respectivamente. En este subgrupo se objetiva una baja expresión de TTF1 (NKX2) que puede ser valorada por inmunohistoquímica (IHC) y que está relacionada con la vía mTORC1, por lo que en este subgrupo la vía PI3K-AKT-mTOR no se encuentra activada. También se ha relacionado este subgrupo con la diferenciación histológica de carcinoma mucinoso invasivo por su delección completa de la expresión de NKX2 (TTF1). Esta histología no se ha detectado en otros subgrupos.
- Subgrupo 2 (Kp): caracterizado por mutaciones de TP53. Se relaciona con el hábito tabáquico y con alta carga mutacional. Además, en este subgrupo se ha objetivado una alta expresión de genes relacionados con respuesta a inmunoterapia como PDL1 (CD274), PD1 (CD279) y CTL4(CD152). Además, muestran un aumento en la activación de la vía JAK/STAT e interferón. Por otro lado, en el tejido tumoral de CPNCP con mutación de KRAS (Kp) hay una tendencia a mayor infiltración por poblaciones de linfocitos CD3+, CD8+ y

CD45RO+ con buena respuesta a inmunoterapia. En cambio, el subgrupo K1 está relacionado con baja respuesta a inmunoterapia y Kc con respuesta intermedia.

- Subgrupo 3 (K1): caracterizado por mutación negativa de LKb1. En este subgrupo se ha detectado baja expresión de LKb1 (por mutaciones negativas en LKb1) y de p-AMPK thr172.

Además, aunque en menor correlación se ha hallado relación con mutaciones de NRF2 y mutaciones o pérdida de copias en KEAP1 (ambos LKB1 y KEAP1 están en el brazo corto del cromosoma 19, en 19p1313.2 y 19p13.3, lo que lo justificaría). KEAP1 funciona como regulador de la degradación proteosomal de NRF2 (un factor de transcripción que participa en la defensa contra el estrés oxidativo). La expresión de NRF2 no es exclusiva de K1 sino que también se ha objetivado en el subgrupo Kc, aunque por mecanismos independientes de KEAP1. Otros genes relacionados con función antioxidante y chaperonas, tales como XBP1 y ATF4, están sobre expresadas en este subgrupo.

También encontramos sobreexpresado ATM, que es un gen que codifica una quinasa apical en respuesta al daño en el ADN y mutaciones somáticas en RB1, componente del mecanismo de transición G1/S del ciclo celular.

- Triple mutación (KPL^m): presenta mutaciones de TP53 y LKB1. Solo está presente en un 4% de los CPNCP con mutación de KRAS.

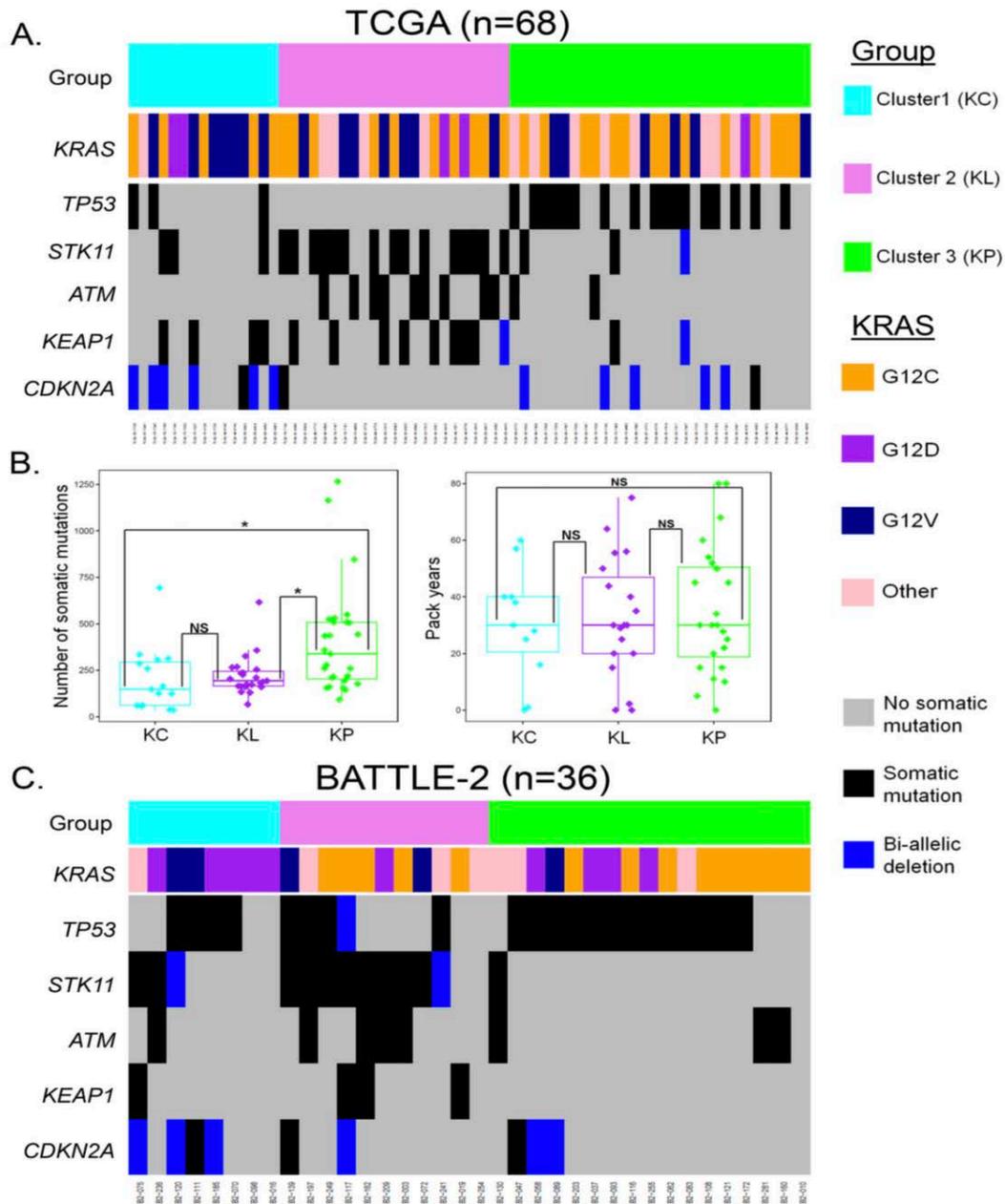


Fig 12. Clasificación de subtipos dependiendo la co-expresión de otros genes. (17)

En cuanto al pronóstico, parece que también existe una asociación entre subgrupo y pronóstico de la enfermedad. El subgrupo KP presenta un tiempo libre de progresión superior al grupo Kl y Kc y Kc en solitario. Pero parece que no hay diferencias significativas entre grupos en cuanto a supervivencia global. Aunque los datos que tenemos hasta el momento son en estudios con poco número de muestras y de cortos seguimientos, por lo que estos datos deberían validarse con otros estudios.

Por otro lado, además de la sensibilidad a la inmunoterapia dependiendo de los subgrupos, parece que la pérdida de expresión de LKB1 también predice respuestas diferentes a algunos tratamientos. Por ejemplo, parece que la pérdida de expresión de LKB1 es la causa de la resistencia al tratamiento con docetaxel y selumetinib y a los inhibidores de PI3K. En cambio, el subgrupo K1 con pérdida de expresión de LKB1 parece ser sensible al tratamiento con inhibidores de HSP90. En las líneas celulares tratadas con inhibidores de HSP90 se objetivó una reducción de los niveles de cMYC y de HIF-1 α . Además, suprime simultáneamente la vía de mTORC1, activación de la vía de MAP quinasa (objetivado por los niveles de pERK1/2) y fosforilación de SRC kinasas. Otros genes como CHK1 (cuya inhibición es letal en contexto de LKB1 inactivada), IRE1a y PERK se ven inhibidos también por el tratamiento celular con inhibidores de HSP90. Otros estudios indican que en CPNCP KRAS con mutaciones en LKB1 y KEAP1 expresan altos niveles de NQO1. NQO1 tiene como función la activación biológica de los inhibidores de HSP90. Tenemos fármacos como dicumarol (fármaco anticoagulante) que provoca una inhibición de la actividad enzimática de NQO1, por lo que darían resistencia a fármacos como HSP90 en líneas celulares con mutación de LKB1 y KEAP1.

1.6. Desarrollo de fármacos dirigidos para tratamiento de CPNCP con mutación de KRAS

Para el tratamiento de CPNCP con KRAS mutado se han intentado diversos tratamientos, pero ninguno ha conseguido los resultados esperados hasta ahora. (3)

Entre estos tratamientos existen compuestos que actúan sobre RAS, SOS o RAF (43) como ARS-853, actualmente está en fase de estudio, que se une de forma específica a KRAS con mutación G12C cuando está unido a GDP. Tras el tratamiento con ARS-853, la unión entre GTP y KRAS disminuye en un 95%, lo que disminuye también la actividad de CRAF, AKT, ERK y aumentando la apoptosis. Además, in vitro se ha objetivado que los receptores de tirosin kinasa contribuyen a la actividad de KRAS G12C y el bloqueo de los receptores tirosin kinasa con inhibidores de MET, SRC o FGFR aumenta la eficacia de la ARS-853.

Otros fármacos están dirigidos a la unión de las regiones de intercambio de RAS y a sus proteínas efectoras RAF, PI3K, Ral-GDS... Entre ellas está Rigosertib, una molécula inhibidora de la proteína RAS-RBDla.(52) Rigosertib inhibe la activación de RAF inducida por factores de crecimiento, el bloqueo de la dimerización de RAF y la supresión de la señalización de MEK, aunque estos datos no han sido validados por otros grupos de investigación que hipotetizan con un efecto indirecto sobre RAF mediante la inhibición JNk. Rigosertib se une también otros efectores de RAS, incluyendo Ral-GDS y PI3K, que inhiben múltiples vías de señalización. Se han realizado ensayos clínicos fase II y III en pacientes con adenocarcinoma de páncreas, pero no ha sido eficaz (53). Aunque habría que tener en cuenta las diferencias moleculares que existen en adenocarcinoma de páncreas y pulmón dado que los tumores pancreáticos dependen de la vía PI3K -PDK1- Akt, y los tumores de pulmón son menos dependientes de PI3K.

Por otra parte, también se han probado fármacos inhibidores de BET (bromodominios extra terminal) bromodominio como JQ1 que inhibe myc y promueve la apoptosis de las células tumorales con KRAS mutado. También se conoce que la presencia concomitante de mutación de KRAS y LKB1 produce resistencia a JQ1. (59)

Otra estrategia de tratamiento pasaría por actuar sobre el ciclo celular. Por ejemplo, inhibir la kinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4). Recientemente se ha publicado la

relación que existe entre la pérdida de LKB1 y la sobreexpresión de CDK4 en células tumorales. LKB1 actúa como gen supresor de tumores, y entre otras vías lo realiza mediante la inhibición de CDK4. Esto provoca el bloqueo del ciclo celular e impide el paso de G1 a S. Por lo que en el subgrupo de pacientes con CPNCP con mutación de KRAS y mutación negativa sobre LKB1 (K1) que provoca la baja expresión de LKB1 y por tanto la sobreexpresión de CDK4 la inhibición de CDK4 con fármacos como palbociclib podría ser una estrategia terapéutica. (44) También se ha realizado ensayos clínicos con doble inhibición MEK y CDK4 (76)-(Figura 13)

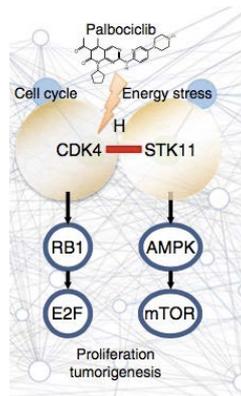


Figura 13. Relación STK11/LKB1 con CDK4 y su función. (44)

Existen otros fármacos como trametinib o salmetinib que además de actuar sobre el ciclo celular arrojando la célula en la fase G1, actúan inhibiendo MEK. (82)(83)

Otro inhibidor de MEK es Selumetinib. Selumetinib es un inhibidor altamente selectivo. Se realizó estudio de fase II comparó la eficacia de selumetinib con pemetrexed en 84 pacientes con CPNCP previamente tratados con al menos un régimen quimioterapia (23). Los pacientes no fueron seleccionados para la histología o la presencia de mutaciones de KRAS. No se observaron diferencias entre los dos grupos de tratamiento en cuanto a la SLP o la tasa de respuesta. Recientemente, un estudio de fase II que compara la combinación de erlotinib con selumetinib frente erlotinib en CPNCP con mutación de KRAS estadio IV en el cual no se objetivaron diferencias significativas (24). Además, está publicado un ensayo clínico fase II(2), en el cual se probaba la combinación de docetaxel más selumetinib frente a docetaxel más placebo que mostró ventajas en la combinación en cuanto a supervivencia libre de progresión y tasa de respuestas pero no en supervivencia global, teniendo mejores resultados en el subgrupo de pacientes con

mutación G12C. Recientemente se han dado a conocer los resultados del estudio fase III (SELECT-1) en el cual participan pacientes con NSCLC con mutación de KRAS en 2º línea de tratamiento en el que se compara docetaxel en combinación con selumetinib frente a docetaxel y placebo en el cual no se han conseguido los objetivos de tiempo libre de progresión ni de supervivencia global.

Actualmente, están en marcha numerosos estudios con combinación de fármacos, como momelotinib (Jak inhibidor) y trametinib o navitoclax (Bcl inhibidor) y trametinib.

1.7. Racional del proyecto:

El cáncer de pulmón es uno de los tumores con mayor morbimortalidad pese a que ha evolucionado de forma importante en los últimos años. El progreso en la biología molecular ha logrado subdividir esta enfermedad en subgrupos consiguiendo un mayor conocimiento de ellos y mejores tratamientos, así como aumentar la supervivencia de estos pacientes.

En CPNCP con mutación de KRAS, aun caracterizando mejor sus subgrupos, no tenemos un tratamiento dirigido adecuado.

Nuestro proyecto pretende, la mejor caracterización de estos pacientes, estudiando la expresión de diferentes genes y así intentar encontrar factores pronósticos. Para ello se ha analizado la expresión de diferentes genes en muestras de pacientes diagnosticados de CPNCP con mutación de KRAS. Hemos elegido genes presentes en las diferentes vías de señalización relacionadas con KRAS.

YAP1 como hemos explicado es un gen que interviene en la vía NOTCH, cuya función es esencial para las células madres, y en nuestro caso células iniciadores de tumores y oncoesferas. En pacientes con mutación de KRAS se ha objetivado que la vía PKC β -ELF3-NOTCH está activada. Además YAP1 está relacionado con diferentes vías génicas

dependientes o independientes de la vía HIPPO con múltiples funciones en células tumorales

CDCP1 es un receptor de transmembrana que activa kinasas como Src, PKC β o RAS. Sabemos que en pacientes con mutación de KRAS la expresión de CDCP1 está aumentada y también es conocido que la vía de RAS interviene en la regulación de la expresión de CDCP1. Interviene en la metastatización por lo que se le otorga mal pronóstico.

AXL es un receptor tirosin quinasa que activa la vía MAPK quinasa y PI3K/AKT que como hemos visto está estrechamente relacionada con RAS. Sus funciones conocidas más importantes son como mecanismo de resistencia a fármacos, antiapoptosis, crecimiento celular, metastatización e inducción de la transición epitelio mesenquimal.

Se ha demostrado que la presencia de mutaciones de LKB1 está relacionado con la mutación de KRAS. LKB1 es un gen supresor de tumores, por lo que las mutaciones en él provocan una pérdida de función y con ello la pérdida de dicha supresión. LKB1 inhibe YAP1 provocando la disminución en la transcripción de receptores tirosin quinasa entre otros, disminuyendo la activación de otras vías relacionadas con actividad tumoral. Con la pérdida de función de LKB1 no se produce dicha inhibición y por consiguiente se produce la activación de otras vías celulares mediante estos receptores tirosin quinasa. Debido a estas relaciones hemos elegido tanto LKB1 como YAP1 para analizar su expresión.

CREB participa en la amplificación de la actividad de la vía de RAS, activación de STAT3 y de la vía ubiquitin proteosoma por lo que juega un papel importante de activación y regulación en pacientes con mutación de KRAS. STAT3 además interviene en la regulación de la transcripción génica por lo que lo elegimos también para su estudio y cuantificación.

Src está presente en numerosas vías de señalización y entre ellas dos importantes relacionadas con KRAS como hemos explicado ya, la vía de Paxilin-YAP y la de STAT3. Y tiene un papel importante como mecanismo de resistencia a la inhibición de ERK. Además, disponemos de fármacos inhibidores de Src por lo que podría ser un punto de inhibición farmacológica en el tratamiento de estos pacientes.

Por otra parte, hemos estudiado la combinación de diferentes fármacos en líneas celulares de CPNCP con mutación de KRAS analizando viabilidad y también el efecto de dichos fármacos sobre la expresión de genes también relacionados con KRAS o con viabilidad celular (ciclo celular, apoptosis...). Para ello hemos elegido trametinib como inhibidor de MEK e inhibidor del ciclo celular y TPX-0005 por su poder como inhibidor de Src.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS:

Hasta ahora se ha enfocado el tratamiento dirigido frente a adenocarcinoma de pulmón con mutación de KRAS como una enfermedad única con un mismo comportamiento.

Nuestra hipótesis es demostrar que se trata de una enfermedad heterogénea con diferente comportamiento a nivel molecular y evolutivo.

Debido a su complejidad el tratamiento debe consistir en la combinación de fármacos con diferentes funciones y en la inhibición de distintas vías moleculares relacionadas.

2.2 OBJETIVOS

PRINCIPAL: Evaluar las diferencias entre subgrupos dependiendo de la expresión de los diferentes genes analizados y su repercusión sobre la evolución y pronóstico.

SECUNDARIOS:

- 1- Hallar la relación entre los diferentes genes analizados (HES1, CDCP1, AXL, YAP1, CREB, LKB1, Src y STAT3).
- 2- Evaluar el efecto del tratamiento con TPX0005 y trametinib y la combinación de ambos en 4 líneas celulares de carcinoma de pulmón con mutación de KRAS (H23, A549, H460 y Calu-6)
- 3- Estudiar los mecanismos de inhibición celular de Trametinib, TPX0005 y de la combinación de ambos.

MATERIAL Y METODOS

3- MATERIAL Y METODOS:

3.1. Recepción de muestras y base de datos

Se han recogido muestras de pacientes diagnosticados de carcinoma de pulmón no célula pequeña con mutación de KRAS. Para ello se consiguió la aprobación por el CEIC (Comité de ética e investigación clínica) de los centros de los cuales se han obtenido las muestras y se obtuvo los consentimientos informados de los pacientes según marca la ley 14/2007 de investigación biomédica, la ley orgánica 15/1999 de protección de datos personales:

- Los casos anteriores al año 2007 previos a la Ley 14/2007 que regula la Investigación Biomédica, pueden entrar en el estudio, tras obtener la autorización del CEIC.
- Se realiza un esfuerzo razonable para obtener el consentimiento informado de los familiares de pacientes fallecidos cuyo diagnóstico y seguimiento es posterior al año 2007 (año en que entra en vigor la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica).
- Se contactó con los pacientes vivos diagnosticados y controlados con fecha posterior a la entrada en vigor de la Ley 14/2007 para obtener el consentimiento informado.
- Se recogieron los datos clínicos (fecha de nacimiento, género, hábito tabáquico, antecedentes patológicos, fecha de diagnóstico, histología, perfil molecular, TNM al diagnóstico, progresión, fecha de progresión y los diferentes tratamientos recibidos y estado actual del paciente). Los datos clínicos procedentes de información médica confidencial fueron debidamente anonimizados para no permitir la identificación del paciente participante.

3.2. Valoración Patológica

Las muestras teñidas con Hematoxilina & Eosina fueron valoradas por el patólogo responsable, Dr. Jose Luis Mate H. Germans Trias i Pujol y Dr. Vicente Peg en Pangaea en H. Dexeus- Quirón. Se realizó una valoración cuantitativa y cualitativa.

Dichas valoraciones se pueden definir como:

Valoración cuantitativa

- *Material adecuado*: Se considerará adecuado para el análisis de mutaciones, copy number y expresión de mRNA cuando haya un 20% de células tumorales en un muestra de al menos 8 mm².
- *Material insuficiente*: Se considera material insuficiente, en el caso del análisis de mutaciones, cuando el tejido contenga menos de 8 células tumorales y, en el caso de expresión de mRNA, cuando haya menos de un 5% de infiltración tumoral de una muestra tumoral inferior a 4 mm².

Se definirá el porcentaje de infiltración tumoral, estroma, necrosis e infiltrado inflamatorio. Para el análisis de mutaciones como copy number o expresión de mARN, se utilizarán solo las muestras consideradas adecuadas, teniendo en cuenta la clasificación anterior.

Valoración cualitativa

Consiste en indicar si en el tejido es posible distinguir las células tumorales de las zonas no neoplásicas, o si por artefactos u otras incidencias de fijación o de procesamiento del tejido no es posible realizar dicho análisis.

- *Valorable*: Es posible distinguir las células tumorales de las áreas no tumorales, y por tanto es posible realizar un estudio adecuado de la muestra.

- *No valorable*: No es posible distinguir las células tumorales de las áreas no tumorales y no es posible conseguir un diagnóstico adecuado.

Microdissección/Macrodissección

A partir de la muestra montada en un portaobjetos normal, se seleccionó la zona tumoral donde se realizaron los siguientes pasos. En la zona seleccionada, se valoró el infiltrado inflamatorio y el porcentaje de estroma y necrosis y se estableció el porcentaje de infiltración tumoral. En los casos en los que el porcentaje de infiltración tumoral era inferior al 85% se procedió a microdissecar, y en los casos en los que fue superior, se realizó macrodissección.

Los estudios moleculares se realizaron a partir de las siguientes técnicas de laboratorio:

3.3. Análisis de las mutaciones de KRAS

Las mutaciones de los codones 12-13 de gen KRAS fueron examinadas utilizando la técnica de High Resolution Melting (HRM) (Applied Biosystems).

La reacción de amplificación fue de 50 ciclos en un termociclador standard (30 seg a 94°C, 30 seg a 51°C y 1 min a 72°C). El proceso de disociación se realizó en una 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 10 seg a 95°C, 1min a 60°C, 15 seg a 95°C (con una rampla de un 1%) y un ciclo final de 15 seg a 60°C.

La amplificación se realizó siguiendo las recomendaciones de la casa comercial: 20 µl de volumen final donde 10 µL son de Melt Doctor TM HRM Master Mix, y 1.2 µl de primers (stock 5µM). La secuencia de los primers utilizados se describe a continuación:

F: ACATGTTCTAATATAGTCACATTTTCA

R: GGCCTGCACCAGTAATATGCA

DNA de la línea celular NCI-H23 fue utilizado como control mutado (G12C) y DNA de la línea H1975 como control wild type.

Las mutaciones detectadas por HRM se confirmaron por secuencia directa, utilizando el kit BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems), siguiendo las

instrucciones del fabricante. Los productos de secuenciación se analizaron en el ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando el software Sequencing Analysis 5.3.

3.4. Análisis de la expresión de ARNm

a) Extracción del ARNm

El procedimiento para la determinación de los niveles de expresión de ARNm de los genes de interés requirió de la obtención de RNA a partir de la muestra primaria. A partir de la muestra obtenida mediante microdissección o macrodissección, se extrajeron los ácidos nucleicos mediante una lisis celular con una solución de EDTA 0.1M, SDS 2%, TRIS 0.5M y proteinasa K (20mg/ml). Para separar los ácidos nucleicos del resto de componentes celulares se empleó el método cloroformo-isoaminoalcohol : fenol pH4.5-5.5 dil (1:6). Con el fin de que dichos ácidos nucleicos precipitaran, se trató la fase acuosa con 2.5µL de glicógeno (20mg/ml), 300 µL de isopropanol y 20 µL de acetato sódico. La solución obtenida se incubó durante 30 minutos a $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$. Mediante una centrifugación de $12600\text{rpm} \pm 200\text{rpm}$ durante 10 minutos se obtuvo un pellet que se limpió con etanol al 70%. El material obtenido se secó a temperatura y se resuspendieron en 53 µL de agua destilada estéril. Para eliminar el DNA contaminante, se realizó un tratamiento con un kit (DNAasa/DNAasa buffer 10x Inactivation buffer). Consiste en someter los 53 µL de la muestra obtenida, con 1.5 µL de enzima DNAasa y 6 µL del tampón durante 30 minutos a $37 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Para evitar enzima libre se inactivó con 6 µL del tampón Inactivation buffer 10x y se centrifugó a $1000\text{rpm} \pm 200\text{rpm}$.

b) Retrotranscripción y Real Time PCR

El cDNA se sintetiza usando un Kit basado en la enzima de retrotranscripción MMLV (200u/µL) / RNASE OUT (20u/ µL). Se homogeniza 10 µL de muestra de RNA y controles con 2 µL de MIX1 (12.5 µL Random primer 250ng/ µL, 150 µL DNTP's 10mM y 137.5 µL de agua destilada estéril. Este proceso se realiza también para los controles de la técnica: controles de extracción, calibradores (una muestra de referencia que se usa como base para resultados comparativos) de RNA comercial Liver Total ARN Human

Adult Liver (1ug/ μ L) (STRATAGENE), Lung MVP Total RNA Human Adult Lung (1ug/ μ L) (STRATAGENE) y agua destilada estéril. La cuantificación relativa mide el cambio relativo en los niveles de expresión de ARNm. Para usar el método de Ct comparativo, donde los niveles de expresión de genes se pueden calcular determinando la proporción obtenida se compara entre distintas muestras (una de ellas es el calibrador), es imprescindible que la eficiencia de amplificación de los cebadores y las sonda de TaqMan® que se usan para los distintos genes y el gen endógeno sean comparables. La amplificación mediante PCR a Tiempo Real se lleva a cabo introduciendo por triplicado 2.5 μ L del ADNc obtenido de muestras y controles con 10 μ L de MIX específica (en función del gen sometido a estudio), tanto para el gen problema (gen del que se desea estudiar la expresión) como para el gen endógeno (gen específico caracterizado por ser de copia única y tener expresión constante e un porcentaje elevado de células del tejido a estudiar y poca variabilidad entre los individuos de la misma especie), que en este estudio es la β -Actina. La MIX consiste en 5000 μ L Taqman Universal Master Mix 2x, 2336 μ L agua destilada estéril, 600 μ L cebadores (ABI) específicos para cada gen y 150 μ L de sonda (ABI) específica para cada gen. El ADNc obtenido se amplifica mediante PCR a tiempo real con un sistema de detección ABI Quanti studio Flex 6 (Applied Biosystems) utilizando sondas y cebadores específicos para cada uno de los genes a analizar. Cada sonda tiene en el extremo 5' un fluorocromo emisor y en el extremo 3' un fluorocromo receptor. Durante la fase de extensión de la PCR, la sonda hidroliza por la actividad 5'nucleasa de la Taq polimerasa, comportando la separación de los fluorocromos emisores y receptores consecuentemente un aumento de la fluorescencia. Esta fluorescencia se cuantifica utilizando un software interno y se transforma en un valor numérico conocido como CT (número de ciclos necesarios para que haya un aumento de fluorescencia significativo respecto a la señal de base, es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde).

c) Validación de sondas y cebadores

Tanto las sondas como los cebadores se han diseñado utilizando el programa Primer Express 3.0 Software ABI. Una vez diseñados se desarrollará un control de calidad in silico para reconocer posibles homologías con otras secuencias y establecer la especificidad y linealidad establecidos por ABI respecto al diseño. Los cebadores y las sondas se validarán realizando banco de diluciones independientes con 12 puntos (dilución $\frac{1}{2}$) cada uno por triplicado, a partir de RNA extraído y retrotranscrito a ADNc

con el método anteriormente descrito. Paralelamente los cebadores también se validarán por la técnica de secuenciación con el producto de amplificación utilizando ARN de muestras de referencia (Lung)

La expresión de los genes que se van analizar en el presente estudio, junto con sus cebadores y sondas se describen la siguiente tabla (Tabla 2):

GENES	Refseq		Cebadores	Sonda
B-actin	NM_0011013	F	5'CGTCTTCCCCTCCATCGTG 3'	6FAM5' CACCAGGGCGTGATG' MGB
		R	5'CCTTCTGACCCATGCCCAC 3'	
STAT3	NM_139276	F	5' CACCTTCAGGATGTCCGGAA 3'	6FAM 5'AGAGTGCAGGATCTAGA 3'MGB
		R	5' ATCCTGGAGATTCTCTACCACTTT CA 3'	
		R	5' GTTTCTCGATCAGGACCATCAAC 3'	
SRC	NM_005417	F	5' GAGCGGCTCCAGATTGTCAA 3'	6FAM 5' AACACAGAGGGAGACTG3 ' MGB
		R	5' CCTGTCTGTCCTGTGCTGAGC3'	
YAP1	NM_006106	F	5' TTGGGAGATGGCAAAGACATC 3'	6FAM 5' TCAGAGATACTTCTTAAA TCACA' MGB
		R	5' GCCATGTTGTTGTCTGATCGA 3'	
AXL	NM_001699	F	5' CAGCGCAGCCTGCATGT 3'	6FAM 5' CAGGGCTGAACAAGAC 3' MGB
		R	5' GCGTTATGGGCTTCGCAG 3'	

HES1	NM_005524	F	5' GGACATTCTGGAAATGACAGTGA A 3'	6FAM 5' ATGACGGCTGCGCTGA 3' MGB
		R	5' CAGCACACTTGGGTCTGTGC 3'	
Lkb1	NM_000455.4	F	5' AGCTGGTGGATGTGTTATAACAACG 3'	6FAM5' GCAGAAAATGTATATGGT G 3' MGB
		R	5' TGCCACACACGCAGTACTCC 3'	
CDCP1	NM_022842	F	5' AGCTGCCAGAGTCCTGAGAATC 3'	6FAM 5' ACTTTGTCATAGAGATCCA 3' MGB
		R	5' TGGGCCTGACATACAGTCAATATT 3'	
Creb1	NM_134442	F	5' AAGCGAAGGGAAATTCTTTCAA 3'	6FAM 5' CTTCCTACAGGAAAATT 3' MGB
		R	5' TCCTGGTGCATCAGAAGATAAGTC 3'	

Tabla 2. Secuencia de cebadores y sondas.

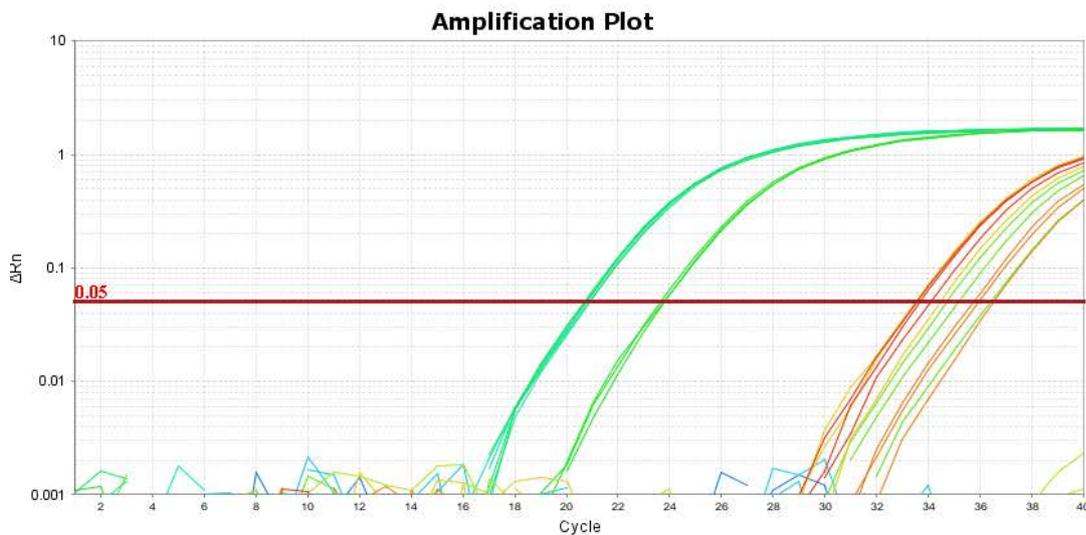


Fig. 14. Amplificación STAT3

d) Análisis de resultados de Real Time-PCR

El valor relativo de expresión se calculó utilizando en método de Ct comparativo usando β -actin como endógeno y RNA comercial como calibrador (Liver and Lung; Stratagene, La Jolla, CA USA).

Para ello, a partir de los valores numéricos obtenidos de la Real Time-PCR se realizaron los siguientes cálculos matemáticos.

1- Promedio de las tres réplicas:

Promedio de las tres repeticiones de cada uno de los genes, en cada uno de los casos (estará marcado como Mean).

2- dCt de cada una de las muestras para cada uno de los genes:

Promedio del gen problema menos el promedio del gen endógeno (estará marcado como delta Ct (dCt))

3- Media de los calibradores (media de los dCt de los calibradores (LIVER-LUNG), marcarlo como media Liver-Lung)

4- ddCt para cada una de las muestras y los calibradores:

5- Calculo del valor de ddCt utilizando la fórmula:

$$2^{-(dCt_{gen} - dCt_{liver-lung})}$$

Sample Name	Target Name	CT	Ct Mean	Ct SD	dCT	
KRAS 3	B-ACTINA NUEVA	28,49	28,59	0,15		
		28,70				
		35,54				
	AXL	35,76	35,65	0,16	7,06	
	YAP	34,37	34,43	0,19	5,83	
		34,27				
		34,64				
	CREB	37,22	37,30	0,13	8,71	
		37,39				
	KRAS 7	B-ACTINA NUEVA	29,94	29,94	0,00	
			29,94			
37,70						
AXL		36,87	37,29	0,59	7,34	
		Undetermin				
		34,30				
YAP		34,56	34,43	0,19	4,49	
CREB		Undetermin	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
		Undetermin				
		Undetermin				

Figura 15. Ejemplo de calculo de expresion genica.

Experimentos in Vitro

Paralelamente se trabajó con cultivos celulares de líneas celulares tumorales con características moleculares similares a las muestras a analizar. Esto nos permitió valorar el comportamiento de las líneas frente a inhibidores antitumorales.

Las líneas celulares que se utilizaron son H23, A549, H460 y Calu-6 procedentes de la casa comercial ATCC (American type culture collection) y tienen las siguientes características moleculares (tabla 3):

Líneas celulares	KRAS	PTEN	LKB1	TP53	PIK3CA
H23	G12C	C697T	G 996T	G737T	wt
A549	G12S	wt	C109T	wt	C1636A
H460	Q61H	wt	C109T	wt	G1633A
Calu-6	Q61K	wt	wt	wt	wt

Tabla 3. Características de las líneas celulares utilizadas.

a- Ensayo de viabilidad (MTT) y Exposición a los fármacos antitumorales

El ensayo de viabilidad (MTT) se emplea frecuentemente para evaluar el efecto de fármacos sobre células en cultivo. En un ensayo de viabilidad se siembra una placa de cultivo de 96 pocillos y se trata cada columna de la placa con concentraciones crecientes de fármaco, más un control sin fármaco. Los pocillos de los bordes no se emplean (se llenan de agua estéril) debido a su evaporación diferencial. Así se dispone de 6 réplicas para cada concentración de fármaco. Las células se incuban durante un período de tiempo que depende del fármaco. A continuación, el tratamiento con MTT (Bromuro de [3-(4,5-dimethylthiazol – 2 -yl) - 2,5 - diphenyltetrazol) y posterior revelado permite obtener la curva dosis-respuesta y la IC50 del fármaco (concentración que inhibe al 50% el crecimiento de las células). Cada línea celular transforma el MTT de una forma más o menos intensa. Por ello, el mismo número de células dará diferente intensidad de color en el caso de líneas diferentes. Para pasar de absorbencia a número de células se debe disponer de una recta patrón para cada línea que se está empleando. La recta patrón se obtiene sembrando en una placa de 96 pocillos cantidades crecientes de células, por sextuplicado (habitualmente de 500 a 64000). A las 72 h se revela la placa con un lector de ELISA y se representa la gráfica número de células-absorbencia a 550nm. La gráfica así obtenida tiene una parte lineal seguida de una zona de saturación. A la hora de diseñar los ensayos de proliferación nunca se debe usar un número de células más allá del límite de saturación del ensayo.

Los ensayos de exposición a los fármacos antitumorales se calcularán mediante el cálculo del Índice de Combinación (CI, Combination Index)_(figura 15) con el algoritmo de Chou-Talalay (Chou and Talalay, 1984) y Chou- Talalay adaptado.

$$CI[ndrugs] = \frac{[\sum [\frac{1}{V_n}]] - [\frac{n-1}{100}]}{[\frac{1}{V_{1..n}}]}$$

Figura 15. Fórmula CI.

Existen tres posibles resultados con este algoritmo: CI<1, donde el efecto de la combinación es sinérgico; CI=1, que implica un comportamiento aditivo; y CI>1, lo que se traduce en un efecto antagónico.

También se ha utilizado el método de Loewe. Dicho método se basa en la referencia de combinación que describe el equilibrio en la potencia entre dos agentes cuando ambos lados de la matriz de dosis contienen el mismo compuesto. Es decir, si se alcanza el IC50 por separado en 1 nM del fármaco A o 1 uM del fármaco B, una combinación de 0,5 uM de A y 0,5 uM del fármaco B también debería alcanzar el IC50. La sinergia en este nivel es especialmente importante cuando se justifica el uso clínico de las terapias de combinación, ya que define el punto en el que la combinación puede proporcionar un beneficio adicional en lugar de simplemente aumentar la dosis de cualquiera de los agentes. La sinergia relativa a la aditividad de Loewe se puede ilustrar gráficamente usando un simbolograma, donde los datos de la matriz de dosis experimentales se utilizan para dibujar un contorno, en función de las concentraciones del componente X e Y, a las que la combinación alcanza un nivel de inhibición I elegido. Las combinaciones de aditivos Loewe producen contornos que son líneas rectas que conectan las concentraciones efectivas de agente único XI e YI y la sinergia ocurre cuando el contorno de datos cae entre línea de aditividad y el origen. Matemáticamente, la sinergia se puede medir en términos de un índice de combinación, IC= X/XI +Y/YI o la relación total del fármaco requerido en combinación para alcanzar I sobre las concentraciones de agente único correspondientes, donde IC<1 para combinaciones sinérgicas. Para su análisis y visualización se utilizó el software Combeneft.

b- Análisis de los niveles de proteína por Western Blot

Western Blot es una técnica analítica, ampliamente utilizada, para el estudio de proteínas. Este método, descrito por primera vez por Towbin, et. al, permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica. El Western Blot, también llamado inmunoblot, es una técnica analítica muy utilizada para identificar una proteína diana en una mezcla de proteínas complejas gracias a la especificidad de la interacción anticuerpo-antígeno. El método se basa en la construcción de un complejo anticuerpo-proteína a través de la unión específica de anticuerpos a las proteínas inmovilizadas sobre una membrana de nitrocelulosa o PVDF y en la detección del anticuerpo unido mediante uno de los dos diferentes métodos de detección de western blot: el método de detección directo y el indirecto. En la detección indirecta de Western Blot (método tradicional), las muestras de proteínas se resuelven primero por SDS-PAGE y luego son electroforéticamente transferidas a la membrana. Después de una etapa de bloqueo, se añade primero un anticuerpo primario para unirse al epítipo de la proteína diana. Luego se incubaba con un anticuerpo secundario marcado que está dirigido contra el anticuerpo primario. En un gran número de marcadores se utilizan: enzima, tal como Horseradish Peroxidase (HRP) o fosfatasa alcalina (AP), biotina, sondas fluorescentes tales como fluoresceína o rodamina. En la detección directa de Western blot, sólo un anticuerpo primario, marcado con un marcador fluorescente o enzima, se utiliza para detectar un antígeno en la mancha (blot), sin necesidad de un anticuerpo secundario. Ambos métodos son válidos y presentan cada uno pros y contras en comparación con el otro.

Para la realización de Histona H3 se han utilizado los siguientes anticuerpos^(tabla 4).

Objetivo	Fuente	Dilución	Compañía	Ref	MW	desarrollo	Bloqueo
beta-Actin (ACTB)	Ratón IgG1	1/5000	Sigma	A5441	42	normal	Odissey
Histone H3	Conejo	1/1000	abcam	ab1791	17	normal	Odissey
P-Histone H3 (Ser10)	Conejo	1/1000	Milliope	06-570	17	dura	Odissey

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para WB.

c- Inmunofluorescencia:

Se sembraron $2,2 \times 10^4$ células en cubreobjetos colocados en placas de 24 pocillos y se cultivaron durante la noche. Al día siguiente, las células se trataron a las concentraciones descritas de los fármacos indicados. 24 h después, los cubreobjetos se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% (PFA) durante 15 minutos y se trataron con metanol frío. Después de un lavado en tampón de lavado inmunocitoquímico (PBS 1x, Troton-X-100 al 0,1%, azida sódica al 0,05% y albúmina sérica bovina al 0,5%), se bloquearon los cubreobjetos en tampón de lavado inmunocitoquímico que contenía FBS al 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente y se incubó durante una noche con anticuerpos primarios contra los epítopes indicados a 4 ° C. Después de tres etapas de lavado, se incubaron durante 2 horas con anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific). Los cubreobjetos se lavaron tres veces con tampón de lavado inmunocitoquímico antes de la contratinción 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y se lavaron una vez más con H₂O antes de montarse en portaobjetos de vidrio con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.)

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis descriptivo se incluyeron los datos clínicos y moleculares del total de los pacientes (n=32).

La supervivencia libre de progresión (SLP) se definió como el tiempo desde el inicio del tratamiento de primera línea hasta la progresión o muerte. Los pacientes que no progresaron ni murieron fueron censurados con fecha del último contacto con ellos.

La supervivencia global (SG) fue definida como el tiempo desde el inicio de la primera línea hasta la muerte. Los pacientes que no fallecieron fueron censurados con fecha del último contacto como en el caso de la supervivencia libre de progresión.

Para las comparaciones entre las variables categóricas se utilizaron test de Chi-cuadrado de Pearson o de Fisher. Las curvas de SLP y SG se trazaron mediante el método de

Kaplan-Meier y se compararon con la prueba log-rank. Los análisis multivariantes para SLP y SG se realizaron con el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox. El nivel de significación se estableció en $p \leq 0,05$. Todos los análisis se realizaron con el software SPSS (Statistical Package for Social Sciences) v15 (IBM).

El cálculo de puntos de corte para el estudio de genes relacionados con factor pronóstico respecto a supervivencia libre de progresión y supervivencia global se hallaron mediante los cálculos de Contal y O'Quigley. Este método se basa en la estadística de long-rank y proporciona valores p corregidos para examinar múltiples puntos de corte potenciales. El punto de corte se determinó usando una macro SAS proporcionada por Mandrekar et al. (70)(71)

RESULTADOS

4. RESULTADOS:

Nuestro proyecto consta de dos partes. El estudio realizado sobre muestras tumorales de pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de pulmón con mutación de KRAS (parte A) y el estudio realizado sobre líneas celulares. (parte B)

PARTE A:

4.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

En nuestro proyecto se incluyeron 32 pacientes. El 71,88% de estos eran hombres con una edad media de 59 años (tabla 5). El 50% de los pacientes eran fumadores en el momento del diagnóstico y el 47% de los pacientes eran ex fumadores. Solo 1 paciente (3,13%) eran no fumadores, pero con alto contacto tabáquico (fumador pasivo). El 6,26 % tenía un hábito tabáquico acumulado de 10 paquetes-año o menos, el 31,26% presentaban una tasa entre 10 y 30 paquetes año y el 62,54% superior a 30 paquetes-año. La dosis más frecuente fue de 60 paquetes-año con un 15,63% seguida de 20 paquetes-año con un 12,50%. (tabla 5). Las características de nuestra muestra en cuanto a sexo, hábito tabáquico y edad de presentación son similares a la de la población general. (tabla 5)

La histología de nuestros pacientes fue el 81,25% adenocarcinoma, el 6,25% adenoescamoso y el 12,5% restante está compuesto por 3 pacientes con carcinoide atípico y uno con histología no célula pequeña indiferenciado. (tabla 5) Las localizaciones metastásicas más frecuentes fueron pulmón contralateral con 37,5%, hueso 28,13%, y sistema nervioso central con un 21,88%. (tabla 5)

La mutación de KRAS más frecuente fue G12C y G12V ambas con un 28,13% seguida de G12D (12,50%) y G12S y G13C (9,38% cada una).

El tratamiento de elección de primera línea fueron dobles con platino (65,66%), siendo el cisplatino el platino más utilizado (en el 50% de los pacientes). La media de ciclos utilizados fue de 4,44 ciclos (mínimo 1 ciclo y máximo 19 ciclos). El 34,38% tuvieron

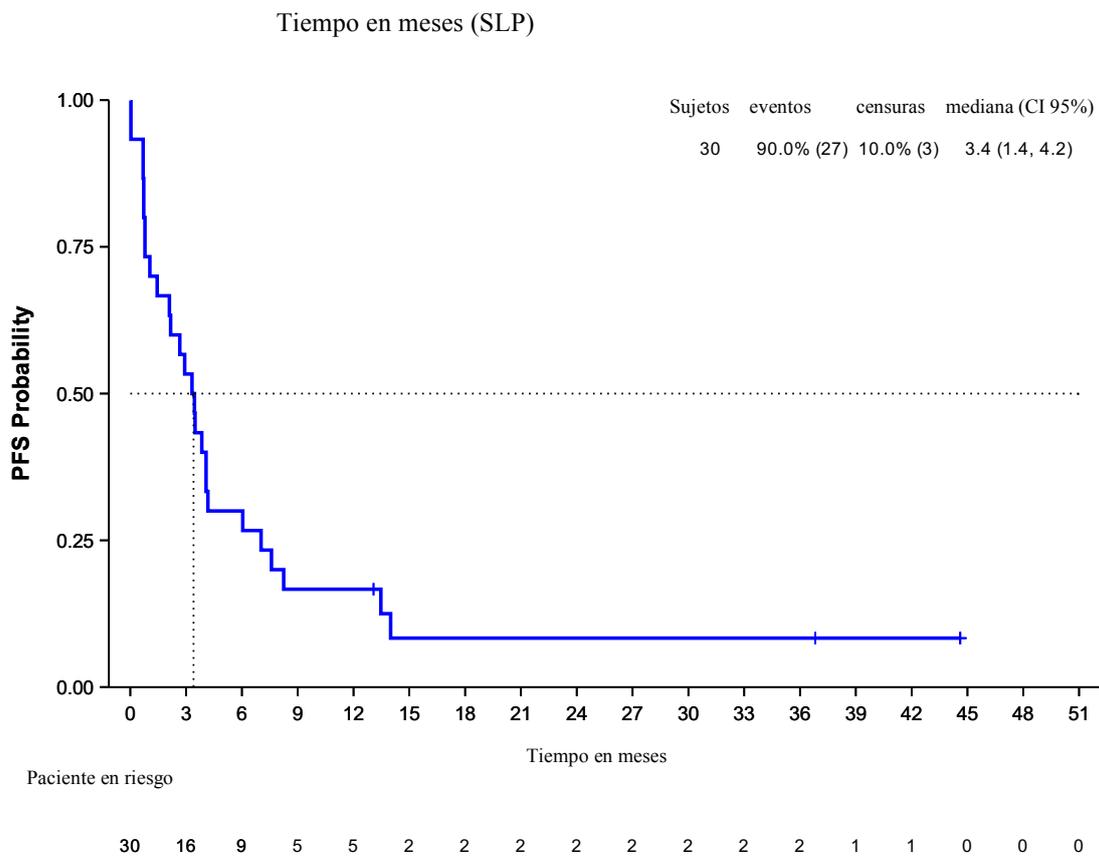
respuesta parcial al tratamiento, el 9,38% enfermedad estable y el 25% progresión de la enfermedad. (tabla 5)

GÉNERO	Nº pacientes	% pacientes
Mujeres	9	28,13
Hombres	23	71,88
EDAD		
	media	58,99
	mediana	58,61
	min, max	36,89-78,85
Hábito tabáquico	Nº pacientes	% pacientes
Nunca fumador	1	3,13
Ex fumador	16	50
Fumador	15	46,88
Paquetes-año	Nº pacientes	% pacientes
<30 paq-año	12	37,5%
30-70 paq-año	16	50%
>70 paq-año	4	12,5%
HISTOLOGIA	Nº pacientes	% pacientes
Adenocarcinoma	26	81,25
Adenoescamoso	2	6,16
Otros *	4	12,51
Estadio al diagnóstico	Nº pacientes	% pacientes
I	1	3,1%
II	4	12,5%
III	10	31,25%
IV	17	53,12%
Localización metástasis	Nº pacientes	% pacientes
Pulmón	12	37,5%
SNC	7	21,8%
Hueso	9	28,1%
Hígado	2	6,25%
Suprarenal	6	18,75%
Ganglionar	10	31,25%
Pleural	2	6,25%
Nº ciclos	Media	Min,max
	4,44	1-19
Tipo de tratamiento	Nº pacientes	% pacientes
Doblete platino	22	65,3%
EC inmunoterapia	3	9,3%
Afatinib	1	3%
No evaluado	6	18,75%
Respuesta al tratamiento	Nº pacientes	% pacientes
Respuesta Parcial	11	34,38 %
Enfermedad estable	3	9,38 %
Progresión de la enfermedad	8	25 %
No evaluado	10	31,25%

Tabla 5. Características de la muestra. * Carcinoma atípico y CPNCP indiferenciado

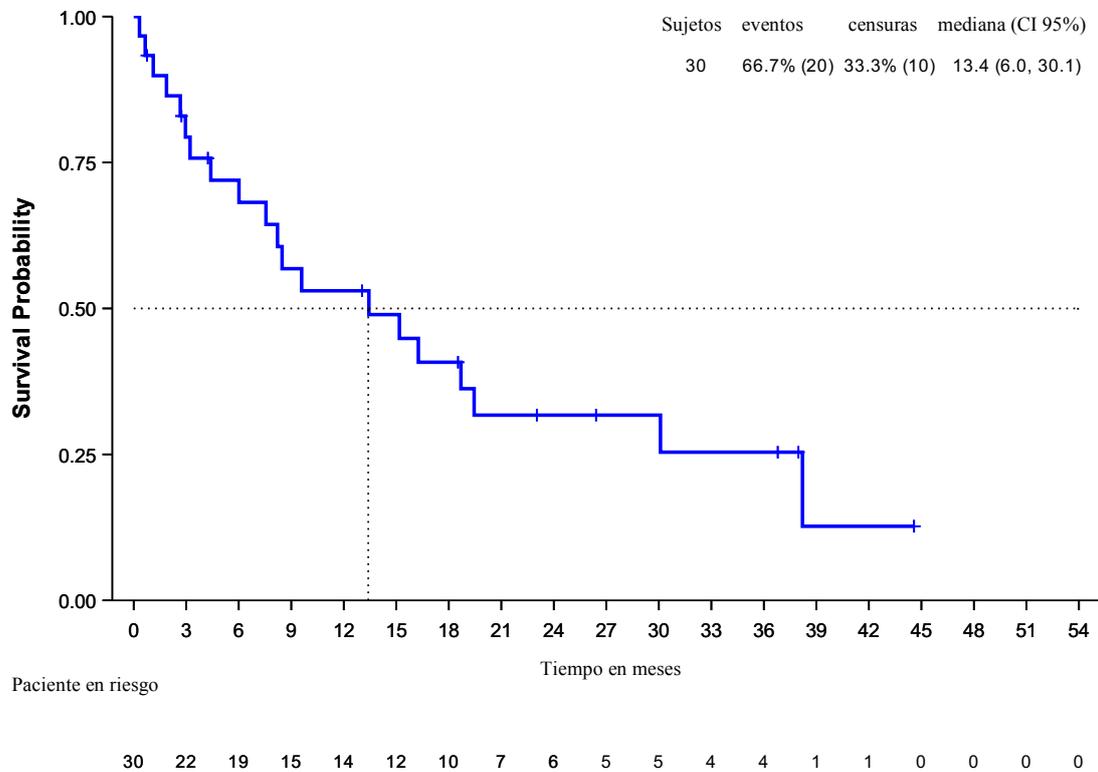
En cuanto a las tasas de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia global de nuestra muestra fue de 3,4 meses y 13, 4 meses, respectivamente. (grafica 1) (grafica 2)

La supervivencia libre de progresión se ha calculado como el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento a la progresión o muerte. En los pacientes en los cuales no se haya constatado la progresión o la muerte, son censurados con fecha del último contacto.



Grafica 1. Supervivencia libre de progresión (SLP) de nuestra muestra.

La supervivencia global se definió como el tiempo desde el inicio del tratamiento de primera línea a la fecha de la muerte. Si el paciente no ha fallecido o no se ha recogido su muerte es censurado con la fecha del último contacto.



Grafica 2. Supervivencia global (SG) de nuestra muestra.

La tasa de respuesta de nuestra población fue del 34,38%, las de enfermedad estable fueron del 9,38% y las de progresión del 25%. Entorno al 31% no fue evaluada la respuesta por pérdida de seguimiento o deterioro del paciente que impidió realizar pruebas de reevaluación de la enfermedad.

4.2 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

En el análisis molecular de las muestras se ha analizado la mutación de KRAS y la expresión de los genes: HES1, CDCP1, AXL, CREB1, LKB1, SRC, STAT3 y YAP1.

La determinación de la expresión de la totalidad de los genes en todas las muestras no ha sido posible por la calidad del material genético obtenido de las muestras. Los genes determinados en más muestras han sido CDCP1 y Src (30 muestras) y el gen con mayores dificultades para el análisis ha sido HES1 y LKB1 los cuales se han analizado en 21 y 22 muestras, respectivamente.

Para comprobar si los genes elegidos eran relevantes o no, se han realizado estudios de correlación de los diferentes genes mediante dos diferentes fórmulas, el test de correlación para datos no paramétricos, test de Spearman (tabla 5), y de Pearson. Además de las diferencias en cuanto al tipo de distribución normal o paramétrica, otra diferencia entre estos tests estadísticos es la relación, que en el caso de Pearson es lineal y en el caso de Spearman es monótona.

Con el coeficiente de correlación de Pearson (tabla 7), encontramos correlación entre YAP y CDCP1, YAP1 y Creb1, YAP1 y Src, YAP1 y STAT3, Src y CDCP1, Src y CREB1, LKB1 y HES1, CREB1 y LKB1 y AXL y CDCP1.

En el test de Spearman (tabla 6) encontramos correlación positiva estadísticamente significativa entre HES1 y STAT3, CREB1 y LKB1, CREB1 y Src, CREB1 y STAT3, Src y STAT3, Src y YAP1, STAT3 y YAP1.

Dado el pequeño tamaño muestral, pese a que ambos pueden identificar la correlación, el test estadístico que hemos considerado más adecuado es el test de Spearman por lo que nos hemos centrado en los datos obtenidos mediante este test estadístico.

Coeficiente de Correlación de Spearman							
GEN	HES1	CDCP1	AXL	CREB1	LKB1	SRC	STAT3
Pvalor							
N							
YAP1	0.8161 21	0.5643 27	0.4390 25	0.1733 25	0.9980 22	0.0005 27	0.0006 27
STAT3	0.0352 21	0.8120 28	0.9099 25	0.0264 25	0.4233 22	0.0140 28	
SRC	0.3593 21	0.6382 29	0.2481 26	0.0196 25	0.1931 22		
LKB1	0.0690 20	0.7093 22	0.5847 22	0.0002 21			
CREB1	0.1063 20	0.2385 25	0.8181 24				
AXL	0.8997 20	0.1848 27					
CDCP1	0.8623 21						

Tabla 6. Correlación entre genes, test de Spearman.

Coeficiente de Correlación de Pearson							
GEN	HES1	CDCP1	AXL	CREB1	LKB1	SRC	STAT3
P valor							
N							
YAP1	0.5919 21	0.0287 27	0.2912 25	0.0383 25	0.4731 22	0.0002 27	0.0263 27
STAT3	0.2851 21	0.9720 28	0.7868 25	0.1029 25	0.8400 22	0.3703 28	
SRC	0.0808 21	0.0025 29	0.2574 26	0.0325 25	0.1560 22		
LKB1	0.0031 20	0.6163 22	0.5533 22	0.0002 21			
CREB1	0.1176 20	0.5627 25	0.7909 24				
AXL	0.5945 20	0.0412 27					
CDCP1	0.7672 21						

Tabla 7. Correlación entre genes, test de Pearson.

4.3 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA CON RELACIÓN A LA EXPRESIÓN GENICA.

4.3.1. SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN

Se analizó la expresión de los diferentes genes como factor influyente en el tiempo libre de progresión como variante continua y no se encontró relación estadísticamente significativa.

A continuación, se analizó categorizando la expresión de los genes en función del nivel de expresión.

Se realizaron 3 grupos: baja expresión que se definió como la expresión el percentil 33, intermedia la expresión entre el percentil 33 y 66 y alta expresión por encima del percentil 66.

TLP- Analisis Univariable ARNm expresión LIH								
Variable		Modelo Kaplan-Meier			Regresión de Cox			
	Valor estratificado	N	Mediana (CI 95%)	Log-rank (p-value)	N	Contraste	Pr > ChiSq	Hazard Ratio (CI 95%)
HES1	Alta	8	4.12 (0.03,13.47)	.	.		.	
	Media	5	4.07 (1.05,7.03)	.	.	Bajo vs alto	.	1.165 (0.365, 3.717)
	Baja	6	2.83 (0.69,,)	0.7266	19	Media vs alto	0.7338	1.608 (0.492, 5.262)
CDCP1	Alta	11	2.66 (0.72,7.03)	.			.	
	Media	8	3.12 (0.03,,)	.	.	Bajo vs alto	.	0.806 (0.322, 2.016)
	Baja	9	4.07 (0.69,7.59)	0.4262	28	Media vs alto	0.4419	0.491 (0.165, 1.462)
AXL	Alta	9	3.45 (0.03,7.03)	.	.		.	
	Media	8	5.06 (0.69,8.25)	.	.	Bajo vs alto	.	0.737 (0.260, 2.084)

TLP- Analisis Univariable ARNm expresión LIH								
Variable		Modelo Kaplan-Meier			Regresión de Cox			
	Valor estratificado	N	Mediana (CI 95%)	Log-rank (p-value)	N	Contraste	Pr > ChiSq	Hazard Ratio (CI 95%)
	Baja	8	3.20 (0.03,,)	0.6771	25	Media vs alto	0.6851	0.655 (0.242, 1.772)
CREB1	Alta	9	3.45 (0.03,7.59)	.	.		.	
	Media	8	5.55 (3.32,13.47)	.	.	Bajo vs alto	.	1.008 (0.328, 3.102)
	Baja	6	2.18 (0.72,,)	0.5189	23	Media vs alto	0.5314	0.588 (0.211, 1.638)
LKB1	Alta	8	4.12 (1.05,,)	.	.		.	
	Media	7	4.07 (2.17,7.03)	.	.	Bajo vs alto	.	3.047 (0.909, 10.213)
	Baja	5	0.72 (0.03,8.25)	0.1451	20	Media vs alto	0.1737	1.258 (0.404, 3.922)
SRC	Alta	11	2.10 (0.69,3.48)	.	.		.	
	Media	10	4.07 (0.79,7.03)	.	.	Bajo vs alto	.	0.369 (0.126, 1.080)
	Baja	7	4.17 (0.72,,)	0.1244	28	Media vs alto	0.1427	0.532 (0.216, 1.306)
STAT3	Alta	10	3.65 (0.03,4.17)	.	.		.	
	Media	9	4.07 (0.69,7.59)	.	.	Bajo vs alto	.	0.676 (0.220, 2.074)
	Baja	7	3.32 (0.72,,)	0.7377	26	Media vs alto	0.7430	1.012 (0.397, 2.583)
YAP1	Alta	10	3.25 (0.69,8.25)	.	.		.	
	Media	9	4.07 (1.45,7.03)	.	.	Bajo vs alto	.	0.705 (0.213, 2.335)
	Baja	6	2.74 (0.03,,)	0.8044	25	Media vs alto	0.8085	1.046 (0.404, 2.710)

Tabla 8. Analisis univariable. Estratificado en alto, medio y bajo.

Estratificando la expresión de genes en alto, medio y baja expresión tampoco se encontró que ningún gen tuviera influencia estadísticamente significativa con respecto al tiempo libre de progresión. (tabla 8) Pero al estratificarlo en bajo e intermedio o alto sí que se encontró relación de Src con la supervivencia libre de progresión con una p de 0.0499 y HR de 0.459 (0.206, 1.023) (Tabla 9).

TLP- Analisis Univariable ARNm expresión LIH								
Variable		Modelo Kaplan-Meier				Regresión de Cox		
	Valor estratificado	N	Mediana (CI 95%)	Log-rank (p-value)	N	Contraste	Pr > ChiSq	Hazard Ratio (CI 95%)
HES1	Alto	8	4.12 (0.03,13.47)	.			.	
	Bajo/ Medio	11	3.48 (0.72,7.03)	0.5430	19	Bajo/medio vs alto	0.5471	1.348 (0.510, 3.558)
CDCP1	Alto	11	2.66 (0.72,7.03)	.			.	
	Bajo/ Medio	17	4.07 (1.05,7.59)	0.3062	28	Bajo/medio vs alto	0.3129	0.656 (0.289, 1.488)
AXL	Alto	9	3.45 (0.03,7.03)	.			.	
	Bajo/ Medio	16	3.66 (1.05,7.59)	0.3896	25	Bajo/medio vs alto	0.3966	0.690 (0.293, 1.626)
CREB1	Alto	9	3.45 (0.03,7.59)	.			.	
	Bajo/ Medio	14	4.07 (1.45,8.25)	0.4587	23	Bajo/medio vs alto	0.4639	0.714 (0.290, 1.758)
LKB1	Alto	8	4.12 (1.05,.)	.			.	
	Bajo/ Medio	12	3.58 (0.69,7.03)	0.2790	20	Bajo/medio vs alto	0.2896	1.715 (0.632, 4.657)
SRC	Alto	11	2.10 (0.69,3.48)	.			.	
	Bajo/ Medio	17	4.07 (2.17,8.25)	0.0499	28	Bajo/medio vs alto	0.0570	0.459 (0.206, 1.023)
STAT3	Alto	10	3.65 (0.03,4.17)	.			.	
	Bajo/ Medio	16	3.40 (1.05,7.03)	0.7355	26	Bajo/medio vs alto	0.7373	0.864 (0.368, 2.028)
YAP1	Alto	10	3.25 (0.69,8.25)	.			.	
	Bajo/ Medio	15	3.48 (1.45,6.04)	0.8195	25	Bajo/medio vs alto	0.8208	0.906 (0.384, 2.133)

Tabla 9. Analisis univariante, estratificado como alto o medio/bajo.

Se realizaron las mismas determinaciones poniendo otros puntos de corte para estratificar los datos. Al estratificar en dos grupos, menor que percentil 25 o mayor o igual a percentil 25, se obtuvo relación estadísticamente significativa entre LKB1 y TLP con una p 0,0096 y HR 0,05. (tabala 10)

TLP análisis univariable. Expresión ARNm Q25								
Variable		Modelo Kaplan-Meier			Regression de Cox			
	Valor estratificación	N	Mediana (CI 95%)	Log-rank (p-value)	N	Contraste	Pr > ChiSq	Hazard Ratio (CI 95%)
HES1	< Q25	5	2.17 (0.69,8.25)	0.1420	19	>=Q25 vs < Q25	0.1534	0.457 (0.156, 1.339)
	>=Q25	14	4.12 (3.32,7.59)	.	.		.	
CDCP1	< Q25	7	4.07 (0.69,7.59)	0.9347	28	>=Q25 vs < Q25	0.9348	0.963 (0.394, 2.355)
	>=Q25	21	2.92 (1.05,4.17)	.	.		.	
AXL	< Q25	6	2.51 (0.03,..)	0.5760	25	>=Q25 vs < Q25	0.5799	0.752 (0.274, 2.064)
	>=Q25	19	4.07 (1.45,7.03)	.	.		.	
CREB1	< Q25	4	1.82 (0.72,..)	0.8164	23	>=Q25 vs < Q25	0.8178	0.863 (0.248, 3.010)
	>=Q25	19	4.07 (2.17,7.03)	.	.		.	
LKB1	< Q25	3	0.72 (0.69,0.72)	0.0002	20	>=Q25 vs < Q25	0.0096	0.050 (0.005, 0.483)
	>=Q25	17	4.07 (3.32,7.59)	.	.		.	
Src	< Q25	5	8.25 (0.72,..)	0.0826	28	>=Q25 vs < Q25	0.0967	2.875 (0.827, 9.997)
		23	3.45 (1.45,4.07)	.	.		.	
STAT3	< Q25	5	2.92 (0.72,..)	0.9786	26	>=Q25 vs < Q25	0.9786	0.985 (0.331, 2.929)
	>=Q25	21	3.84 (1.45,6.04)	.	.		.	
YAP1	< Q25	5	3.32 (0.72,..)	0.2475	25	>=Q25 vs < Q25	0.2589	2.064 (0.587, 7.262)
	>=Q25	20	3.66 (1.45,6.04)	.	.		.	

Tabla 10. Analisis univariable dependiendo de mayor o menor de percentile 25.

Mediante la herramienta estadística del análisis de Contal y O'Quigley se determinaron los mejores límites para separar los pacientes en base al resultado (progresión y muerte). Este método se basa en el análisis estadístico log-rank y proporciona valores P corregidos para examinar múltiples puntos de corte potenciales. El punto de corte para cada gen se determinó utilizando una macro SAS proporcionada por Mandrekar et al. No se pudieron hallar en todos los genes dado el número de pacientes encontrado en alguno de los subgrupos. Se halló una relación estadísticamente significativa con respecto a tiempo libre de progresión con CDCP1, LKB1 y Src. (tabla 11)

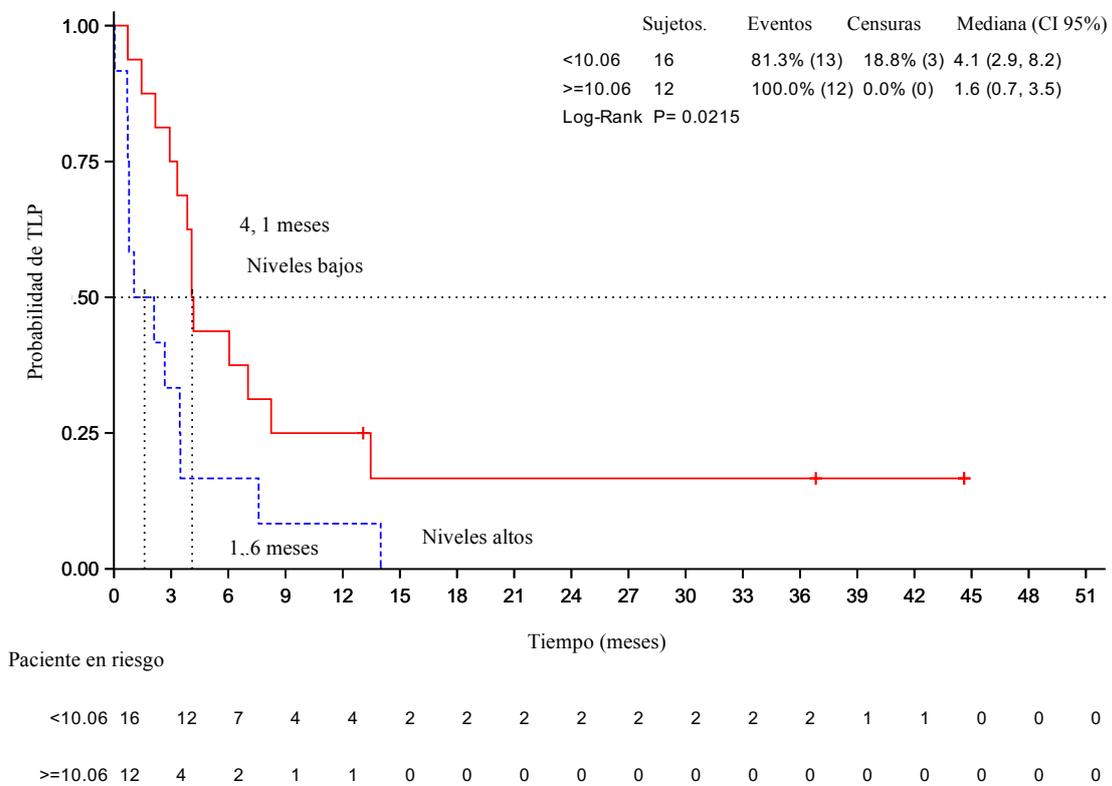
Variable		Modelo Kaplan-Meier			Regresión de Cox			
	Valor estratificación	N	Mediana (CI 95%)	Log-rank (p-value)	N	Contraste	Pr > ChiSq	Hazard Ratio (CI 95%)
CDCP1	<CUTPOINT	24	4.0 (2.2,7.0)	0.0025	28	>=42.55 vs <42.55	0.0075	5.495 (1.574, 19.231)
	>=CUTPOINT	4	1.1 (0.0,2.7)	.			.	
CREB1	<CUTPOINT	1	0.7 (NA,NA)	0.0141	23	>=1.31 vs <1.31	0.0533	0.094 (0.009, 1.034)
	>=CUTPOINT	22	4.0 (2.10,4.17)	.			.	
LKB1	<CUTPOINT	7	0.7 (0.03,3.8)	0.0259	20	>=0.35 vs <0.35	0.0343	0.344 (0.128, 0.924)
	>=CUTPOINT	13	4.2 (3.4,7.6)	.			.	
SRC	<CUTPOINT	16	4.1 (2.9,8.2)	0.0215	28	>=10.06 vs <10.06	0.0267	2.469 (1.110,5.495)
	>=CUTPOINT	12	1.6 (0.7,3.5)	.			.	

Tabla 11. Analisis univariable en relación con el punto de corte.

Teniendo en cuenta dichos datos se realizó curvas de Kaplan Meier para la obtención del tiempo libre de progresión dependiendo de la expresión de dichos genes.

a) Src

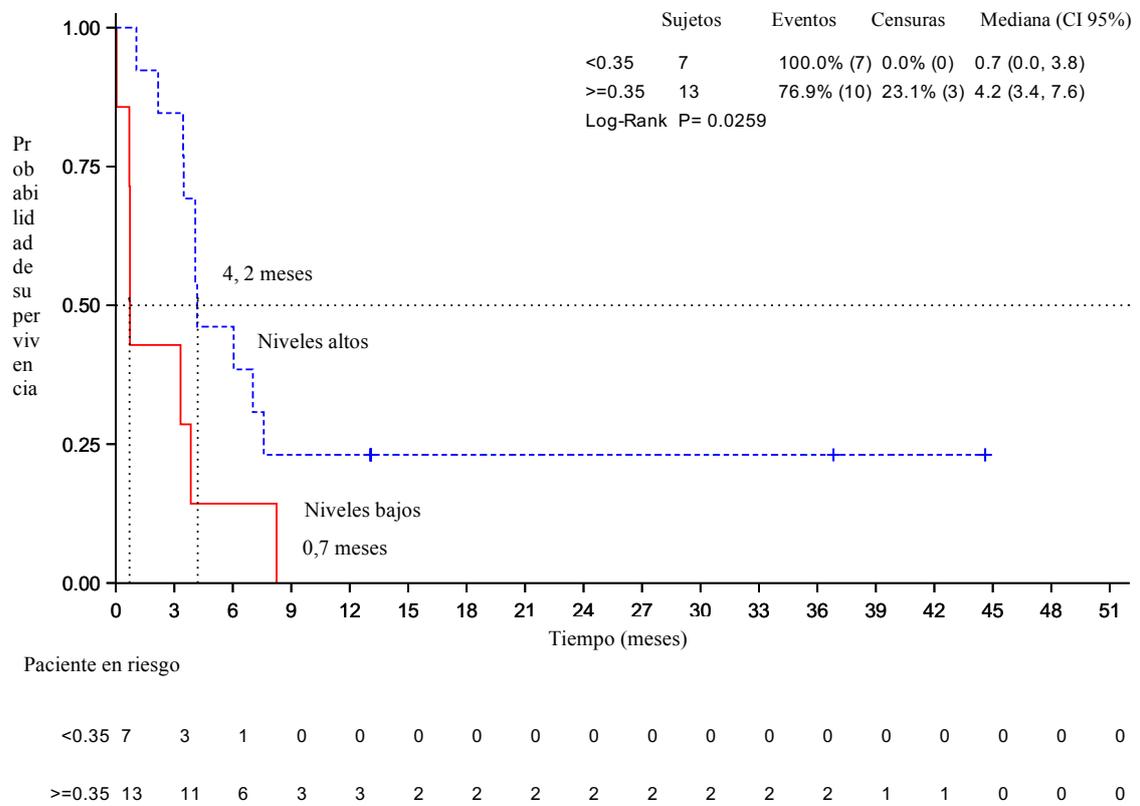
El punto de corte para Src se estableció en 10.06, formando dos grupos de 16 sujetos en el grupo con expresión inferior a este punto y 12 sujetos en el grupo superior. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,0215$) (grafica 3) en tiempo libre de progresión, con 4,1 meses en el grupo con expresión inferior al punto de corte y 1,6 meses en el grupo de expresión superior. Con una HR de 2,469 (1.110,5.495) (grafica 3).



Grafica 3. SLP según expresión de Src.

b) Lkb1

El punto de corte para Lkb1 se estableció en 0.35, formando dos grupos de 7 sujetos en el grupo con expresión inferior a este punto y 13 sujetos en el grupo superior. De las 32 muestras sólo 20 fueron óptimas para analizar la expresión de Lkb1. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,0259$) (grafica 4) en tiempo libre de progresión, con 4,2 meses en el grupo con expresión superior al punto de corte y 0,7 meses en el grupo de expresión inferior. Con una HR de 0.344 (0.128, 0.924).

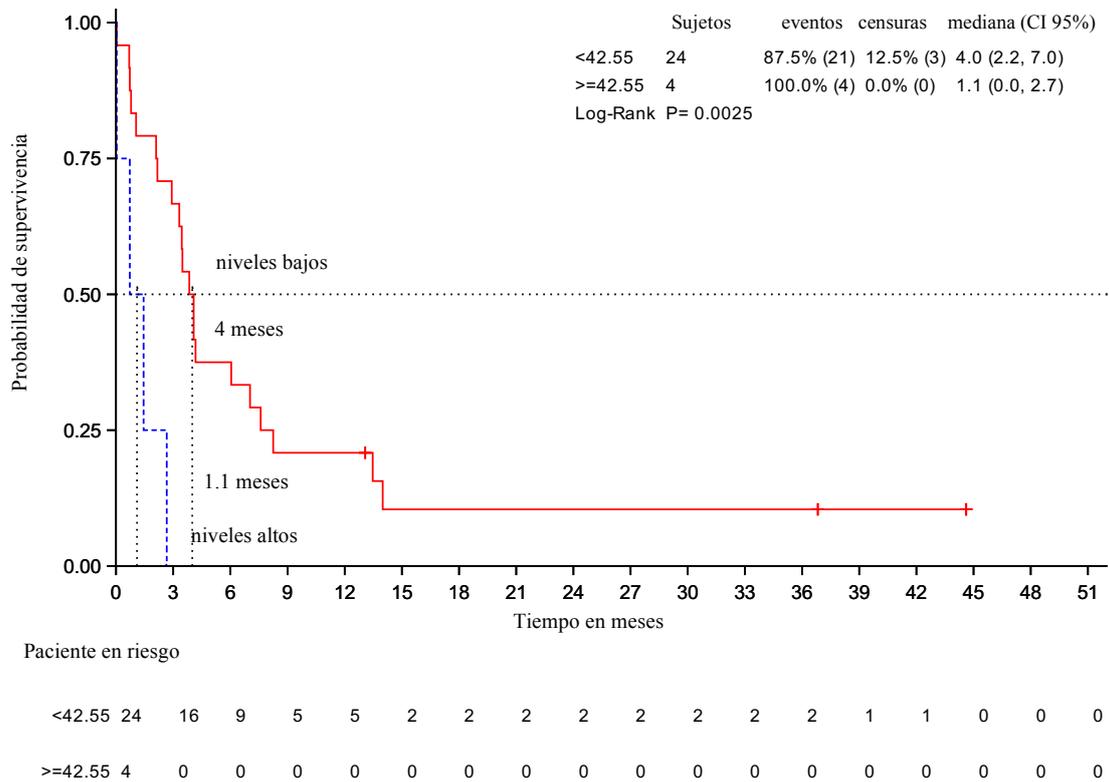


Grafica 4. SLP según expresión de Lkb1.

c) CDCP1

El punto de corte para CDCP1 se estableció en 42,55, formando dos grupos. Con 24 sujetos en el grupo de expresión inferior al punto de corte y 4 sujetos en el grupo superior.

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,0025$) (gráfica 5) en tiempo libre de progresión, con 3,5 meses en el grupo con expresión inferior al punto de corte y 1,1 meses en el grupo de expresión superior. Con una HR de 5.495 (1.574, 19.231).



Grafica 5. SLP según expresión de CDCP1.

4.3.2. SUPERVIVENCIA GLOBAL:

Al igual que en tiempo libre de progresión se analizó la relación entre la expresión de los diferentes genes y la supervivencia global. Se utilizó el modelo de regresión de COX. Se halló una relación entre LKB1 y la supervivencia global.

De la misma manera que para SLP, se analizó la influencia de la expresión de los diferentes genes como variante continua en la SG. En este caso sí que se objetivó relación estadísticamente significativa con LKB1 ($p=0.0324$)

Al igual que en el análisis de SLP se realizaron diferentes estudios con diversos puntos de corte. En todos ellos, se halló relación estadísticamente significativa únicamente entre Lkb1 y supervivencia global.

En el análisis dividiendo la expresión en alto (mayor al percentil 66), intermedio (entre el percentil 33 y 66) y bajo (inferior al percentil 33), se encontró relación estadísticamente significativa entre LKB1 y SG. (tabla 12)

SG. Análisis univariable según expresión génica								
Variable			Modelo Kaplan Meier		Regresión de Cox			
	Valor estratificación	N	Mediana (CI 95%)	Log-rank (p-value)	N	Contraste	Pr > ChiSq	Hazard Ratio (CI 95%)
HES1	Alto	8	19.45(0.33,30.0)					
	Intermedio	5	15.18 (4.40,,)			Bajo vs Alto		1.724 (0.453,6.563)
	Bajo	6	8.21 (0.66,,)	0.7211	19	Intermedio vs alto	0.7249	1.331 (0.355, 4.995)
CDCP1	Alto	11	15.18(1.12,38.2)					
	Intermedio	8	17.48 (0.33,,)			Bajo vs Alto		1.734 (0.570, 5.275)
	Bajo	9	8.21 (0.66,30.09)	0.4276	28	Intermedio vs alto	0.4393	0.849 (0.256, 2.814)
AXL	Alto	9	16.26 (3.22,,)					
	Intermedio	8	7.88 (0.66,,)			Bajo vs Alto		0.628 (0.159, 2.478)
	Bajo	8	34.15(0.33,38.2)	0.6978	25	Intermedio vs alto	0.7028	1.054 (0.305, 3.643)
CREB1	Alto	9	. (0.33,,)					
	Intermedio	8	15.18(4.40,19.4)			Bajo vs Alto		2.442 (0.536,11.140)
	Bajo	6	6.01 (1.12,38.21)	0.2694	23	Intermedio vs alto	0.2986	2.910 (0.735, 11.518)
LKB1	Alto	8	. (7.56,,)					
	Intermedio	7	15.18(4.40,30.0)			Bajo vs Alto		23.793 (3.266,173.332)
	Bajo	5	1.12 (0.33,8.21)	0.0007	20	Intermedio vs alto	0.0070	3.818 (0.766, 19.038)
Src	Alto	11	9.59 (0.66,,)					
	Intermedio	10	15.18(2.66,30.0)			Bajo vs Alto		0.470 (0.119, 1.863)
	Bajo	7	. (3.22,,)	0.5033	28	Intermedio vs alto	0.5175	0.953 (0.350, 2.598)
STAT3	Alto	10	18.69(0.33,30.0)					
	Intermedio	9	7.56 (0.66,19.45)			Bajo vs Alto		0.451 (0.089, 2.283)
	Bajo	7	38.21 (4.40,,)	0.1345	26	Intermedio vs alto	0.1638	1.871 (0.646, 5.422)

SG. Análisis univariable según expresión génica								
Variable			Modelo Kaplan Meier			Regresion de Cox		
	Valor estratifica- acción	N	Mediana (CI 95%)	Log-rank (p-value)	N	Contraste	Pr > ChiSq	Hazard Ratio (CI 95%)
YAP1	Alto	10	13.44 (0.66,,)					
	Intermedio	9	19.45(3.22,38.2)			Bajo vs Alto		0.735 (0.182, 2.967)
	Bajo	6	8.48 (0.33,,)	0.9100	25	Intermedio vs alto	0.9105	0.913 (0.300, 2.777)

Tabla 12. SG, SG, Análisis univariable según percentil bajo, intermedio y alto.

Si únicamente se dividió entre expresión baja e intermedia/alta encontramos también relación estadísticamente significativa entre LKb1 y SG. (Tabla 13)

SG. Análisis univariable según expresión génica								
Variable			Modelo Kaplan Meier			Regresion de Cox		
	Valor estratifica- acción	N	Mediana (CI 95%)	Log-rank (p-value)	N	Contraste	Pr > ChiSq	Hazard Ratio (CI 95%)
HES1	Intermedio/alto	13	18.69(6.01,30.)					
	Bajo	6	8.21 (0.66,,)	0.4833	19	Bajo vs Intermedio/alto	0.4864	1.531 (0.461, 5.081)
CDCP1	Intermedio/alto	19	16.26 (8.48,,)					
	Bajo	9	8.21 (0.66,30.09)	0.2006	28	Bajo vs Intermedio/alto	0.2076	1.872 (0.706, 4.964)
AXL	Intermedio/alto	17	15.18 (6.01,19.45)					
	Bajo	8	34.15 (0.33,38.21)	0.3994	25	Bajo vs Intermedio/alto	0.4040	0.609 (0.190, 1.951)
CREB1	Intermedio/alto	17	18.69 (8.21,,)					
	Bajo	6	6.01 (1.12,38.21)	0.5989	23	Bajo vs Intermedio/alto	0.6000	1.378 (0.416, 4.568)
LKB1	Intermedio/alto	15	19.45 (7.56,,)					
	Bajo	5	1.12 (0.33,8.21)	0.0005	20	Bajo vs Intermedio/alto	0.0033	10.350 (2.175, 49.248)
Src	Intermedio/alto	21	15.18 (4.40,19.45)					
	Bajo	7	. (3.22,,)	0.2428	28	Bajo vs Intermedio/alto	0.2526	0.484 (0.139, 1.678)

SG. Análisis univariable según expresión génica								
Variable			Modelo Kaplan Meier			Regresión de Cox		
	Valor estratificación	N	Mediana (CI 95%)	Log-rank (p-value)	N	Contraste	Pr > ChiSq	Hazard Ratio (CI 95%)
STAT3	Intermedio/alto	19	13.44 (3.22,19.45)					
	Bajo	7	38.21 (4.40,,)	0.1294	26	Bajo vs Intermedio/alto	0.1476	0.329 (0.073, 1.481)
YAP1	Intermedio/alto	19	15.18 (7.56,30.09)					
	Bajo	6	8.48 (0.33,,)	0.6872	25	Bajo vs Intermedio/alto	0.6881	0.769 (0.213, 2.774)

Tabla 13. SG, Análisis univariable según percentil bajo e intermedio/alto

De igual modo LKB1 tiene una relación estadísticamente significativa con SG cuando dividimos en alto o intermedio/bajo (tabla 14) y cuando ponemos como punto de corte la mediana. (tabla 15)

SG. Análisis univariable según expresión génica								
Variable			Modelo Kaplan Meier			Regresión de Cox		
	Valor estratificación	N	Mediana (CI 95%)	Log-rank (p-value)	N	Contraste	Pr > ChiSq	Hazard Ratio (CI 95%)
HES1	Alto	8	19.45 (0.33,30.09)					
	Intermedio/bajo	11	8.48 (1.12,18.69)	0.4793	19	Intermedio/bajo vs alto	0.4821	1.499 (0.485, 4.632)
CDCP1	Alto	11	15.18 (1.12,38.21)					
	Intermedio/bajo	17	16.26 (4.40,30.09)	0.7085	28	Intermedio/bajo vs alto	0.7089	1.207 (0.449, 3.244)
AXL	Alto	9	16.26 (3.22,,)					
	Intermedio/bajo	16	19.45 (4.40,,)	0.7518	25	Intermedio/bajo vs alto	0.7521	0.833 (0.268, 2.591)
CREB1	Alto	9	. (0.33,,)					
	Intermedio/bajo	14	15.18 (4.40,30.09)	0.1111	23	Intermedio/bajo vs alto	0.1260	2.715 (0.755, 9.759)
LKB1	Alto	8	. (7.56,,)					
	Intermedio/bajo	12	8.21 (0.66,18.69)	0.0165	20	Intermedio/bajo vs alto	0.0316	5.339 (1.159, 24.598)

SG. Análisis univariable según expresión génica								
Variable			Modelo Kaplan Meier			Regresión de Cox		
	Valor estratificación	N	Mediana (CI 95%)	Log-rank (p-value)	N	Contraste	Pr > ChiSq	Hazard Ratio (CI 95%)
Src	Alto	11	9.59 (0.66,,)					
	Intermedio/bajo	17	15.18 (6.01,30.09)	0.5784	28	Intermedio/bajo vs alto	0.5795	0.764 (0.295, 1.979)
STAT3	Alto	10	18.69 (0.33,30.09)					
	Intermedio/bajo	16	13.44 (4.40,38.21)	0.7639	26	Intermedio/bajo vs alto	0.7641	1.169 (0.421, 3.249)
YAP1	Alto	10	13.44 (0.66,,)					
	Intermedio/bajo	15	15.18 (4.40,,)	0.7498	25	Intermedio/bajo vs alto	0.7501	0.847 (0.306, 2.346)

Tabla 14. SG, análisis univariable según percentil alto e intermedio/bajo

SG. Análisis univariable según expresión génica								
Variable			Modelo Kaplan Meier			Regresión de Cox		
Gen	Valor estratificación	N	Mediana (CI 95%)	Log-rank (p-value)	N	Contraste	Pr > ChiSq	Hazard Ratio (CI 95%)
HES1	< median	8	8.21 (0.66,,)	0.8504	19	>=median vs < median	0.8505	0.895 (0.284, 2.822)
	>=median	11	18.69 (6.01,30.09)					
CDCP1	< median	15	18.69 (4.40,,)	0.8899	28	>=median vs < median	0.8895	1.069 (0.417, 2.739)
	>=median	13	15.18 (2.66,38.21)					
AXL	< median	13	19.45 (1.12,38.21)	0.9075	25	>=median vs < median	0.9073	1.063 (0.377, 2.997)
	>=median	12	15.72 (3.22,,)					
CREB1	< median	10	8.21 (1.12,38.21)	0.1291	23	>=median vs < median	0.1392	0.447 (0.154, 1.299)
	>=median	13	30.09 (7.56,,)					
LKB1	< median	8	4.40 (0.33,18.69)	0.0111	20	>=median vs < median	0.0184	0.247 (0.077, 0.790)
	>=median	12	19.45 (7.56,,)					
Src	< median	13	16.44 (4.40,38.21)	0.4248	28	>=median vs < median	0.4272	1.464 (0.571, 3.755)
	>=median	15	15.18 (1.12,,)					
STAT3	< median	12	8.48 (1.12,38.21)	0.7927	26	>=median vs < median	0.7928	0.874 (0.321, 2.381)
	>=median	14	15.18 (6.01,,)					
YAP1	< median	11	15.18 (4.40,,)	0.8491	25	>=median vs < median	0.8491	1.106 (0.391, 3.132)
	>=median	14	18.69 (3.22,,)					

Tabla 15. Análisis univariable según percentil alto e intermedio/bajo

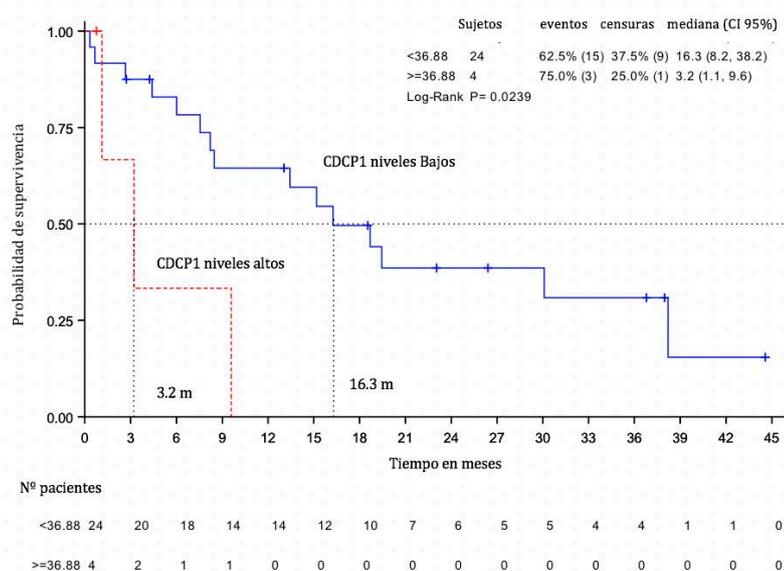
Para la supervivencia global también se realizó el análisis mediante la herramienta estadística del análisis de Contal y O'Quigley para determinar los mejores límites de corte y para separar los pacientes en base al resultado (progresión y muerte). En este caso, se pudo determinar en LKB1 y CDCP1 y se encontró relación estadísticamente significativa con supervivencia global en los genes: CDCP1 y LKB1. (tabla 16)

SG. Análisis univariable según expresión génica por punto de corte								
Variable		Modelo Kaplan Meier			Regresión de Cox			
Gen	Valor estratificación	N	Mediana (CI 95%)	Log-rank (p-value)	N	Contraste	Pr > ChiSq	Hazard Ratio (CI 95%)
LKB1	<CUTPOINT	5	1.12 (0.33,8.21)	0.0005	20	>=0.31 vs <0.31	0.0033	0.097 (0.020, 0.460)
	>=CUTPOINT	15	19.45 (7.56,..)					
CDCP1	<CUTPOINT	24	16.26 (8.21,38.21)	0.0239	28	<36.88 vs >= 36.88	0.0372	4.208 (1.089, 16.267)
	>=CUTPOINT	4	3.22 (1.12,9.59)					

Tabla 16. Analisis univariable de SG según la expresión LKB1 y CDCP1 mayor o menor al punto de corte.

a) CDCP1:

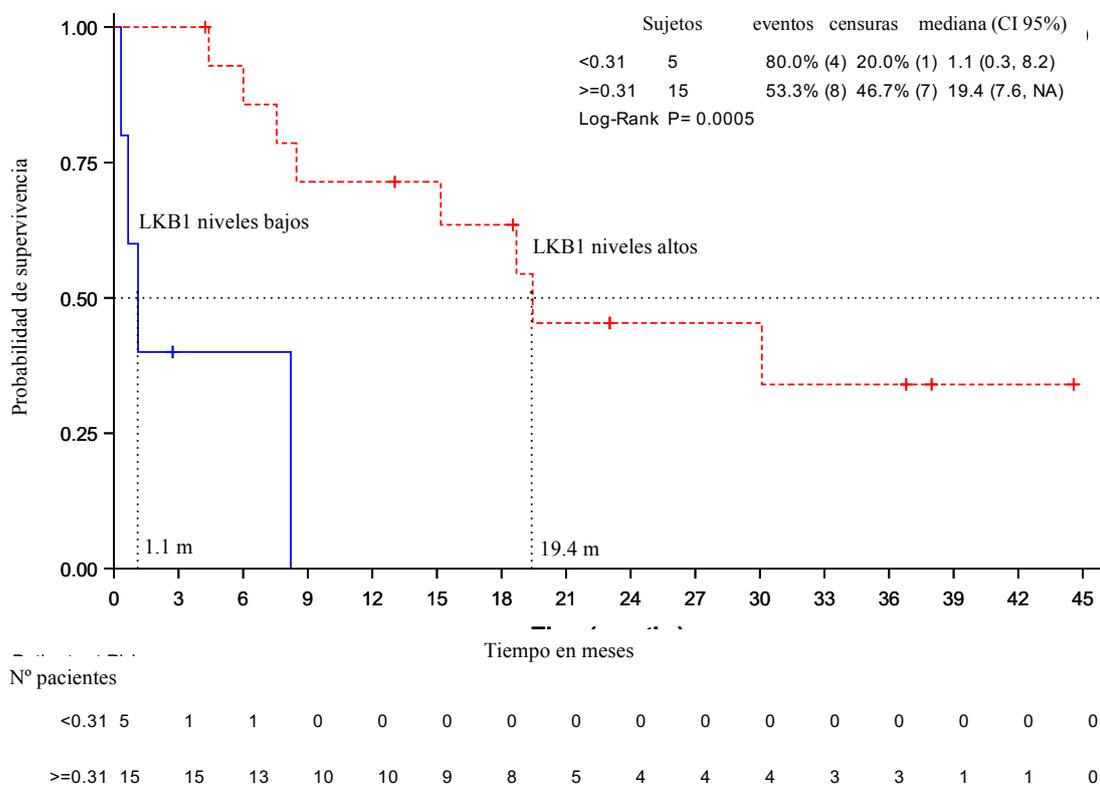
En los pacientes con una alta expresión de CDCP1 la supervivencia global es menor, con una media de 3,2 meses frente a 16,3 meses en los pacientes con CDCP1 bajo con una HR de 4,208 (CI 95% 1,089-16,267) con una p=0,0239. La mayor parte de los pacientes (n=24) pertenecen al grupo de expresión menor a 36.88 (punto de corte). (Grafica 6)



Grafica 6. SG según expresión de CDCP1.

b) LKB1:

En cuanto a la expresión de LKB1, al igual que ocurría en el caso de supervivencia libre de progresión, la expresión por encima del punto de corte (0,31) proporciona una supervivencia global superior de 19,4 meses frente a 1,1 meses en el caso de expresión inferior a 0,31 con una HR de 0,097 (CI 95% 0,020-0,46) con una $p=0,0005$. La mayor parte de los pacientes ($n=15$) presenta una expresión superior al punto de corte.



Grafica 7. SG según expresión de LKB1

En resumen, en el análisis de SG se objetivó relación entre LKB1 y CDCP1. En el caso de LKB1 la expresión de dicho gen otorga mejor pronóstico y en el de CDCP1 la expresión de éste se relaciona con peor pronóstico.

PARTE B

4.4 ANALISIS DE VIABILIDAD CELULAR

En nuestro estudio hemos utilizado 4 líneas celulares con mutación de KRAS: H23, A549, H460 y Calu 6.(tabla 3)

En la siguiente tabla se muestra la IC₅₀ para la inhibición de difentes genes.

Target	IC ₅₀ (nM) 10 mM ATP	Target	IC ₅₀ (nM) 10mM ATP	Target	IC ₅₀ (nM) 10mM ATP
TRKB	0.05	SNARK	13.0	JAK3	50
ROS1	0.07	HCK	16.4	EPHA8	50.2
TRKC	0.1	IRR	18.1	IGFR	111
TRKA	0.83	LCK	18.6	PLK4	126
ALK	1.04	JAK1	19	AXL	149
JAK2	1.04	TYK2	21.6	MARK3	512
FYN	1.05	LTK	21.8		
LYN	1.66	DDR2	23		
YES	2.15	BTK	23.7		
FGR	3.05	TNK2	24.1		
TXK	3.17	EPHA1	25.0		
ARK5	4.46	BLK	32.3		
SRC	5.3	GRK7	35.2		
DDR1	5.7	PYK2	39.9		
FAK	6.96	RET	47.1		

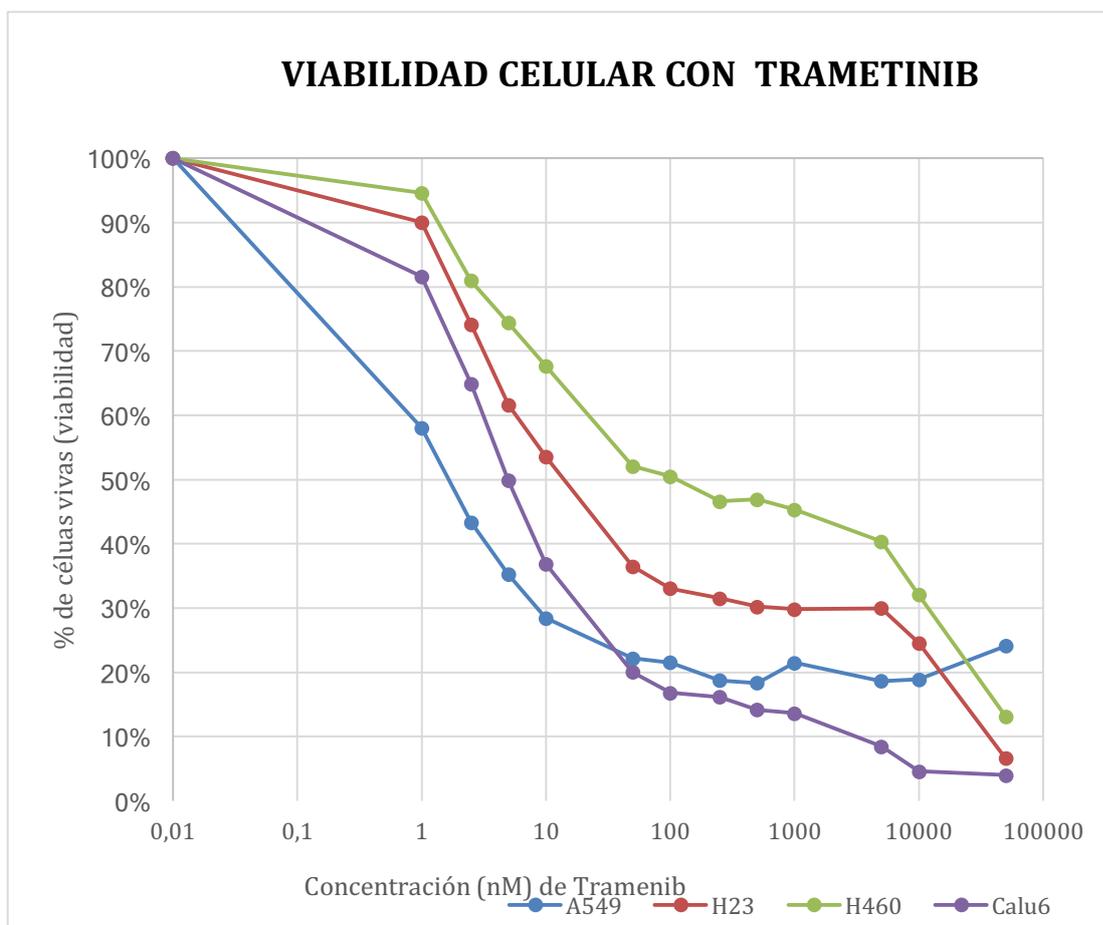
Tabla 17. IC₅₀ con proteínas purificadas a 10mM de ATP.

Realizamos estudios de viabilidad sobre las 4 líneas celulares de análisis de la IC50 e índice de combinación.

Los resultados de IC 50 para Trametinib y TPX-0005, fueron los siguientes (tabla 18) (gráfica 8):

TRAMETINIB (nM)	
	IC50
A549	1,72
H23	15,87
H460	169,23
Calu6	5,54

Tabla 18. IC 50 con Trametinib cada línea celular utilizada.

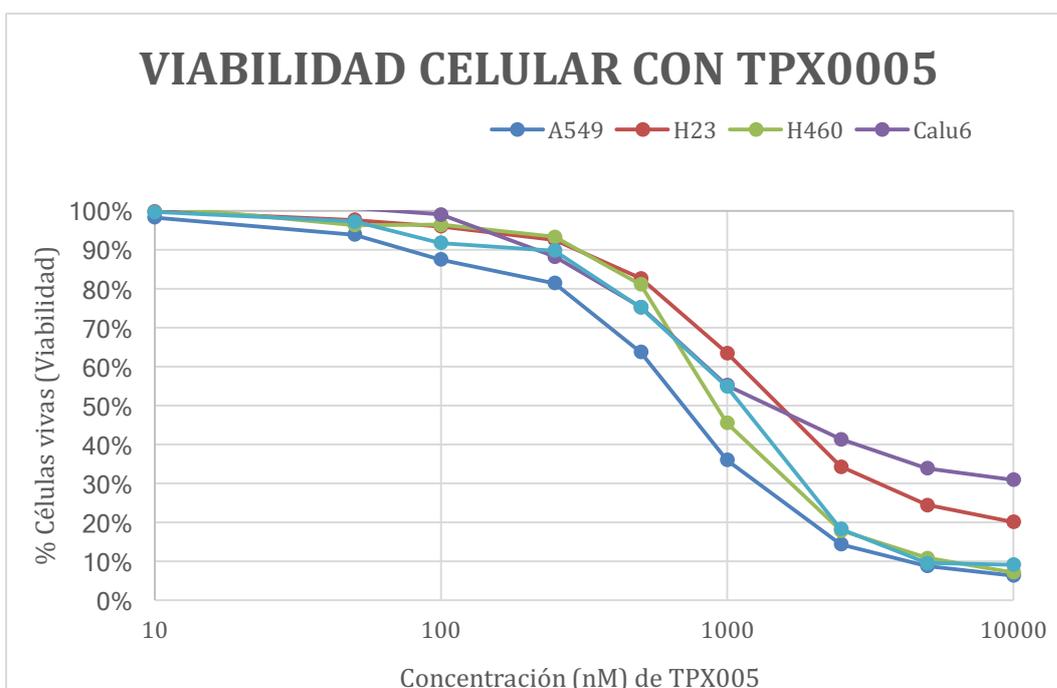


Gráfica 8. Viabilidad celular tras tratamiento con Trametinib.

TPX-0005 (nM)	
	IC50
A549	731,07
H23	1584,71
H460	960,65
Calu6	1433,50

Tabla 19. IC50 con Trametinib para cada línea celular utilizada.

Se analizó la IC50 para las mismas líneas celulares, pero tratándolas con TPX-0005 (tabla 19) (gráfica 9).



Gráfica 9. Viabilidad celular tras tratamiento con TPX0005.

Posteriormente, se realizaron los experimentos para hallar el índice de combinación de ambos fármacos. En cada línea celular, para calcularlo se utilizó el algoritmo de Chou Talalay modificado por Narajan y el método alternativo de Loewe. Los experimentos se realizaron por duplicado y se obtuvieron los siguientes resultados.

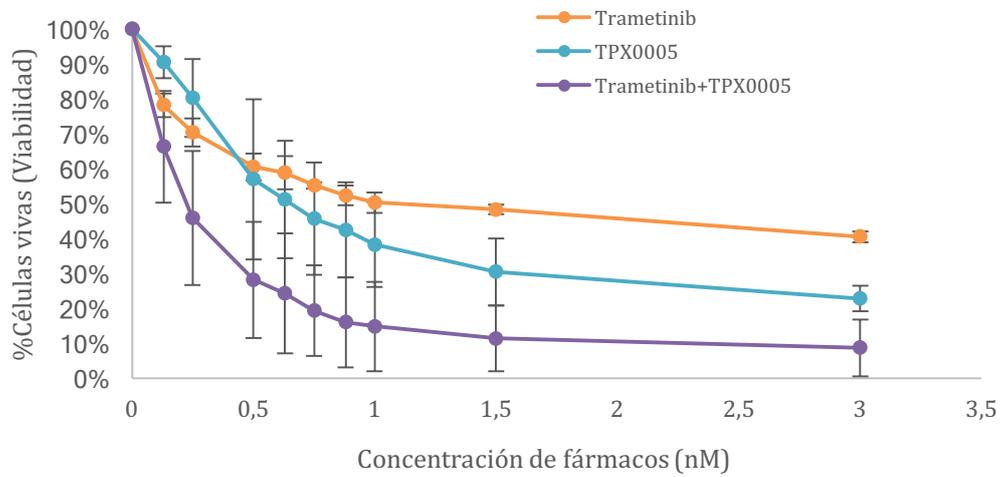
FORMULA CHOU TALALAY (NARAYAN)		
	MEDIA	DESV. ESTAND
A549	0,91	0,13
H23	0,60	0,26
H460	0,79	0,09
Calu6	0,45	0,09

Tabla 20. Chou Talalay (Narajan).

Teniendo en cuenta estos resultados, consideramos que la combinación de Trametinib y TPX0005 en la línea celular A549 tiene efecto aditivo y en las líneas H23 y Calu6 fuertemente sinérgico y en H460 es pobremente sinérgico.

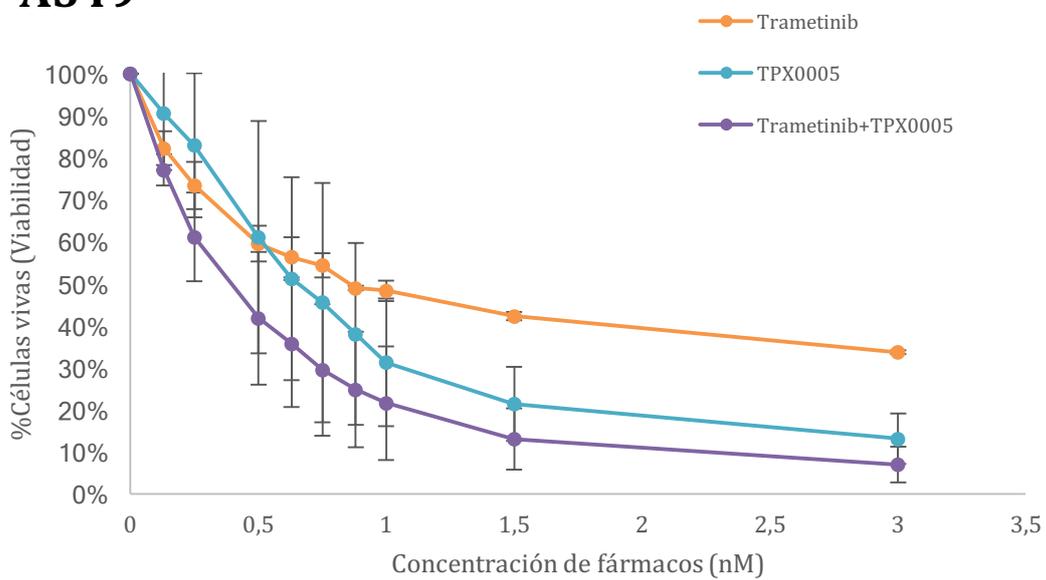
En las siguientes gráficas se puede observar el efecto del tratamiento con Trametinib, TPX-0005 y de la combinación de ambos en las 4 líneas celulares. En ellas podemos ver el efecto que provoca en el porcentaje de células vivas con respecto al aumento de concentración de fármaco. (gráfica 10 a 13)

H23

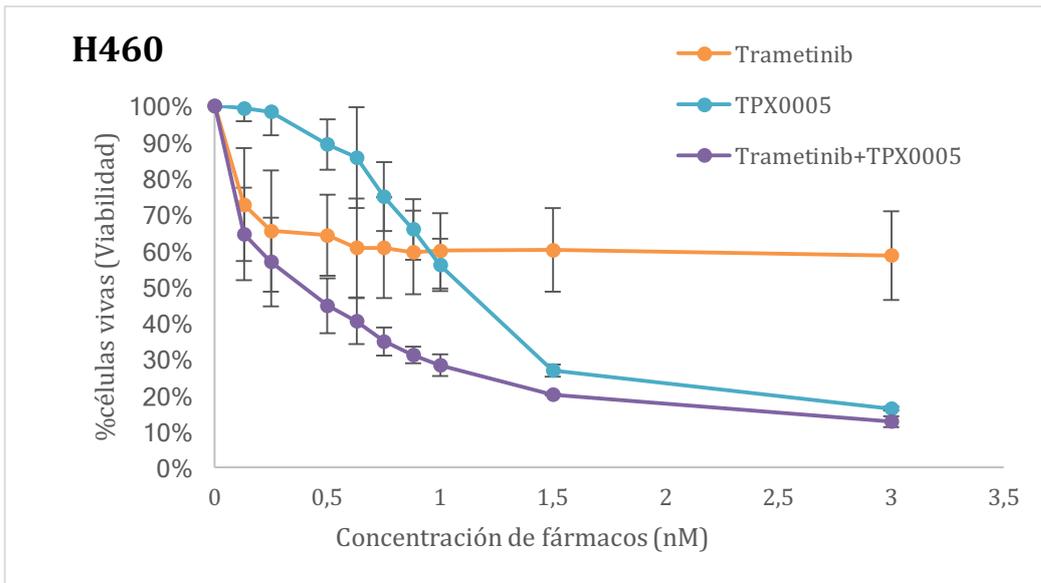


Gráfica 10. Viabilidad en la línea celular H23

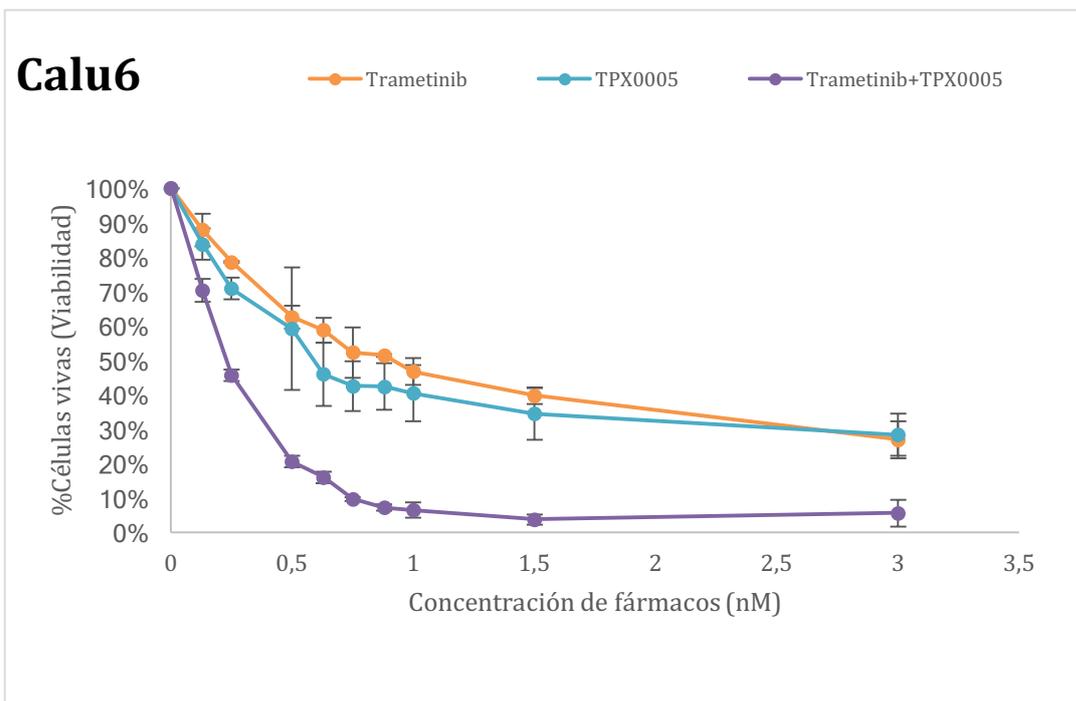
A549



Gráfica 11. Viabilidad en la línea celular A549



Gráfica 12. Viabilidad en la línea celular H460



Gráfica 13. IC en la línea celular H23

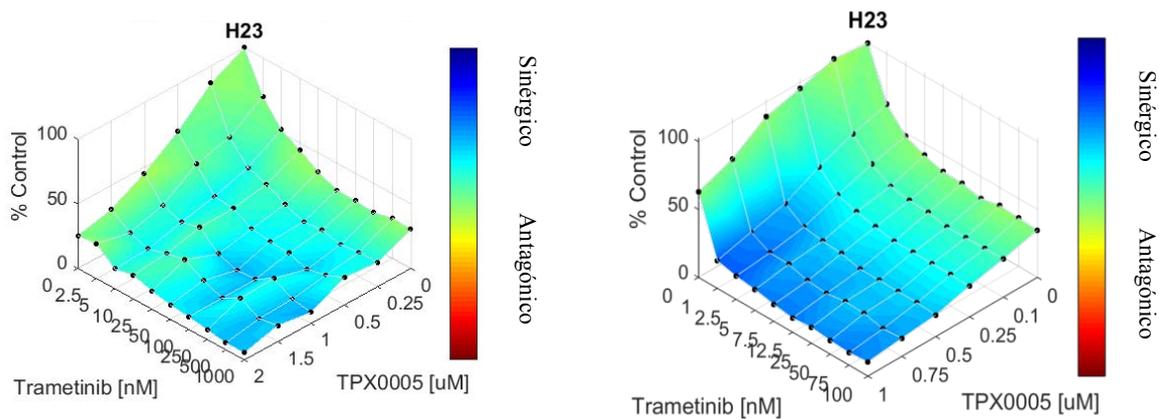
Nuestro trabajo se ha realizado en las 4 líneas celulares que hemos utilizado también para el estudio de índice de combinación mediante Chou Talalay.

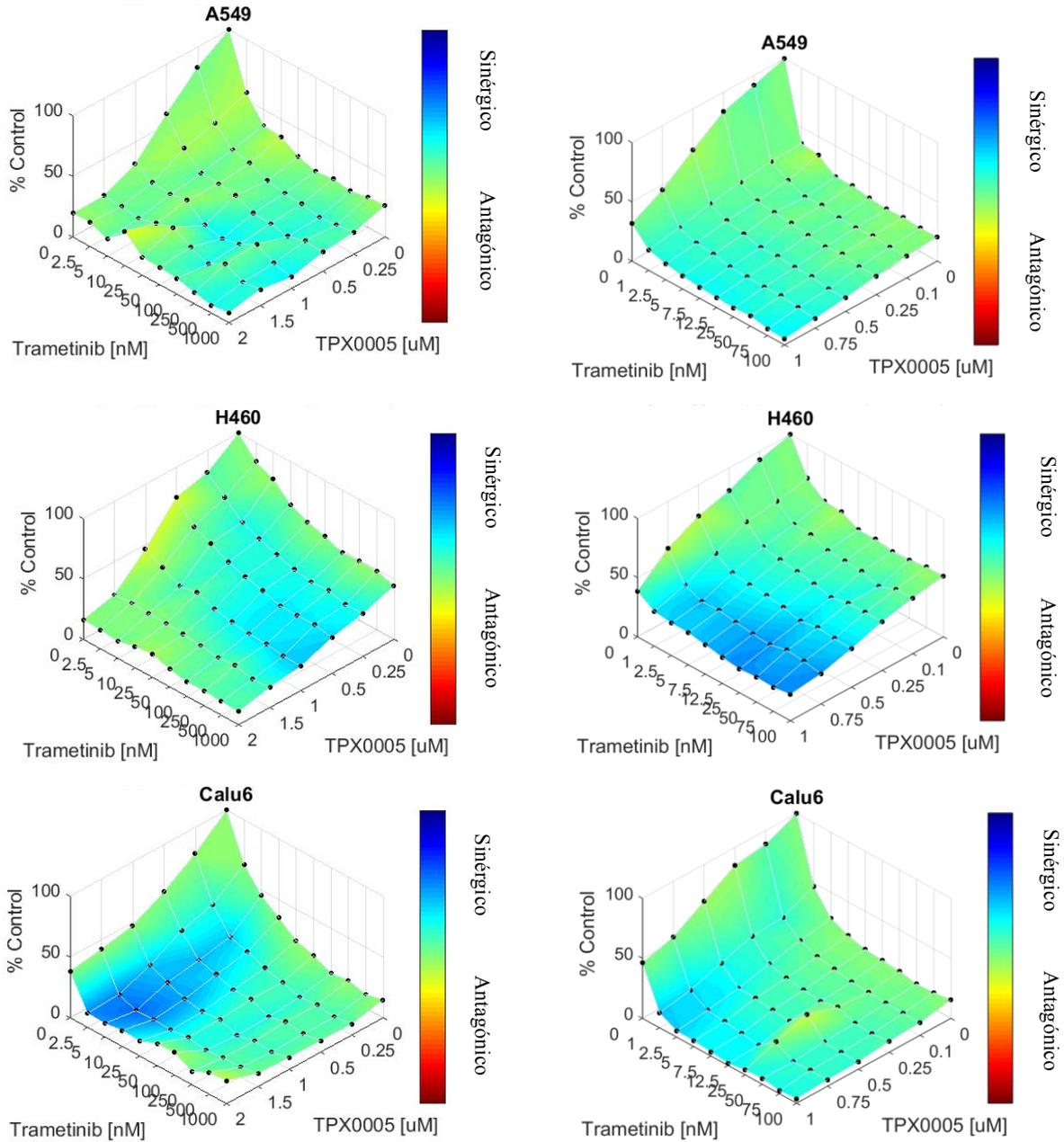
A549										
Trametinib (nM)	0	0,2375	0,475	0,95	1,1875	1,425	1,6625	1,9	2,85	5,7
TPX-0005 (nM)	0	93,75	187,5	375	468,75	562,5	656,25	750	1125	2250
H23										
Trametinib (nM)	0	1,875	3,75	7,5	9,375	11,25	13,125	15	22,5	45
TPX-0005 (nM)	0	187,5	375	750	937,5	1125	1312,5	1500	2250	4500
H460										
Trametinib (nM)	0	18,75	37,5	75	93,75	112,5	131,25	150	225	450
TPX-0005 (nM)	0	125	250	500	625	750	875	1000	1500	3000
Calu6										
Trametinib (nM)	0	0,75	1,5	3	3,75	4,5	5,25	6	9	18
TPX-0005 (nM)	0	200	400	800	1000	1200	1400	1600	2400	4800

Tabla 21. Concentraciones de TPX-0005 y de trametinib utilizadas para las diferentes líneas celulares.

También se observó la actividad mediante la fórmula de LOEWE. Basado en el programa informático Combeneft.

En las gráficas de Loewe (gráficas 14) se representa el tipo de relación entre fármacos en dos rangos de concentraciones comunes a todas las líneas celulares. La relación se representa mediante diferentes colores. Siendo azul las combinaciones sinérgicas, roja las combinaciones antagonistas y verde las combinaciones con efecto aditivo.





Gráfica 14. Método Loewe en las 4 líneas celulares a dosis altas de concentración de fármaco (derecha) y dosis bajas (izquierda)

Al igual que obtuvimos mediante el método de Chou-Talalay en las líneas H23, H460 y Calu6 se objetiva efecto sinérgico.

En H23 el efecto sinérgico se consigue con altas concentración de trametinib y TPX-0005. En cambio, en Calu6 se encuentran en altas concentraciones de TPX-0005 con bajas concentraciones de trametinib.

Se realizaron estudios de viabilidad mediante la técnica de formación de colonias, con la combinación de los dos fármacos a diferentes concentraciones. (figura16)

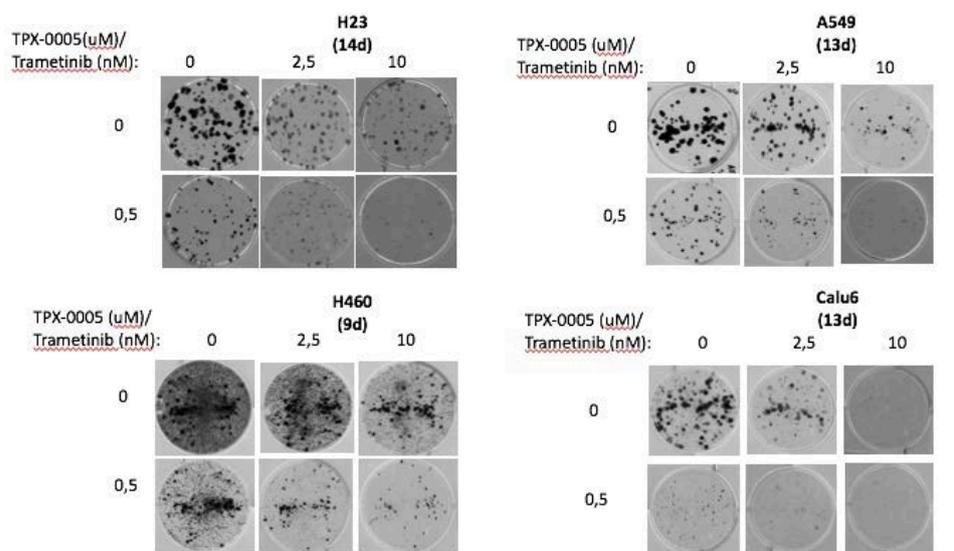


Figura 16. Formación de colonias en las 4 líneas celulares y a diferente concentración de fármacos.

En estos experimentos se consigue la muerte celular con la combinación de ambos fármacos, pero a distintas concentraciones dependiendo de la línea celular. En las 4 líneas celulares con TPX-0005 a 1uM presenta una mortalidad celular prácticamente del 100%, no consiguiendo el mismo efecto con trametinib en monoterapia a las dosis más altas probadas (10nM) o con la combinación con dosis de TPX0005 inferior a 1uM.

4.5 EXPRESIÓN GÉNICA EN DIFERENTES LINEAS CELULARES

Conocemos la expresión génica y la presencia de diferentes mutaciones en estas líneas celulares. (Tabla 3)

Teniendo en cuenta las características que hemos explicado, podríamos clasificar estas líneas celulares según la subclasificación molecular de Skoulidis et al (17) que en la introducción describimos, H23 pertenecería al grupo KPL con doble mutación de LKB1

y TP53, A459 y H460 estaría en el grupo de KL dado que solo presenta mutación de LKB1 y Calu 6 dado que no cumple ninguno de los otros criterios pertenecería al subgrupo Kc.

4.6 EFECTO SOBRE EL CICLO CELULAR DEL TRATAMIENTO CON TRAMETINIB, TPX-0005 Y LA COMBINACIÓN DE AMBOS.

Se ha estudiado el efecto sobre la morfología celular de trametinib y TPX-0005 (figura 17), objetivándose que el uso de TPX-0005 produce la formación de células binucleadas. Fenómeno que no ocurre con el tratamiento con trametinib.

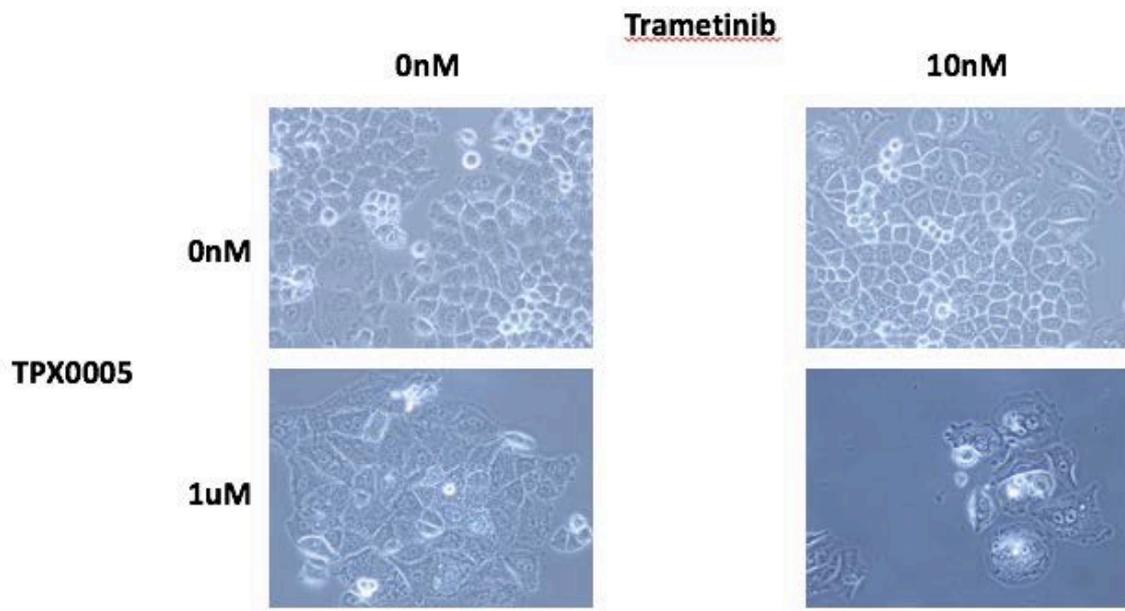


Figura 17. Cambio de morfología nuclear con el tratamiento de trametinib y TPX-0005

A raíz de observar este cambio morfológico se inició un estudio más profundo acerca del efecto sobre el ciclo celular.

Para entender el mecanismo de acción de trametinib, TPX-0005 y la combinación de ambos sobre el ciclo celular se han realizado experimentos con Western Blot, formación de colonias y estudios de inmunofluorescencia.

Para el análisis del efecto de TPX-0005 y trametinib mediante western blot se han utilizado dos líneas celulares donde la combinación de estos fármacos es sinérgica, H23 y Calu 6 (figura 19) y también en H460 (figura 18) donde es sinérgico pero más débil.

En la figura 18 podemos ver que en la línea celular H460 el efecto de trametinib y de TPX-0005 sobre la fosforilación de Histona 3 y la histona 3 total. Trametinib inhibe su fosforilación a partir del segundo día de tratamiento en cambio con el tratamiento con TPX-0002 su inhibición se produce a partir de la segunda hora. La histona total se mantiene prácticamente invariable con trametinib, TPX-0005 o su combinación.

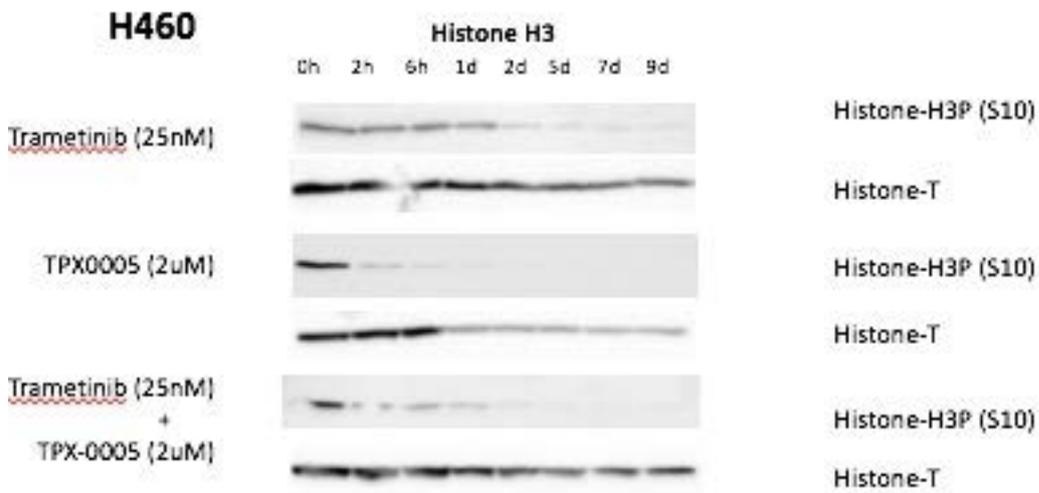


Figura 18. Efecto de Trametinib, TPX-0005 en la fosforilación de Histona H3 y Histona total.

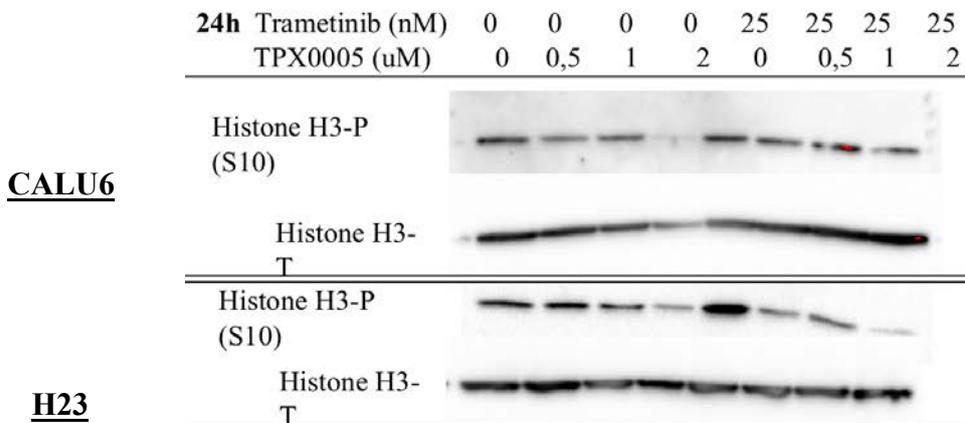


Figura 19. Efecto sobre Histona H3P de trametinib y TPX-0005

En la línea Calu 6 y H23, la fosforilación de histona H3 disminuye con el tratamiento a dosis altas de TPX-0005, no se ve modificada por el tratamiento con trametinib, pero si, con la combinación de ambos fármacos y en mayor medida conforme aumenta la concentración de TPX-0005. En cambio, la expresión total de Histona H3 no se ve afectada.(figura 19).

Por otra parte, se realizaron estudios con inmunofluorescencia con marcadores como DAPI (unión a ADN), Histona H3-P (unión a Histona H3 fosforilada presente en mitosis) y alfa tubulina (unión a microtúbulos) para visualizar las diferentes etapas de la mitosis.

(figura 23)

En la figura 20, podemos visualizar la representación de la mitosis de forma esquemática, con la condensación de la cromatina (profase) y formación de los usos cromáticos (metafase) y posterior división del material celular (anafase) y división celular (telofase).

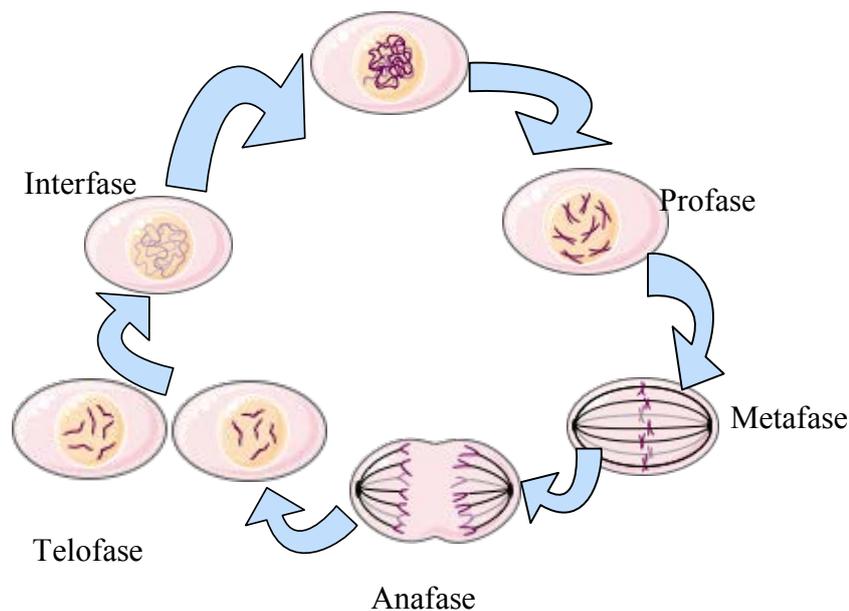


Figura 20. Fases de la mitosis.

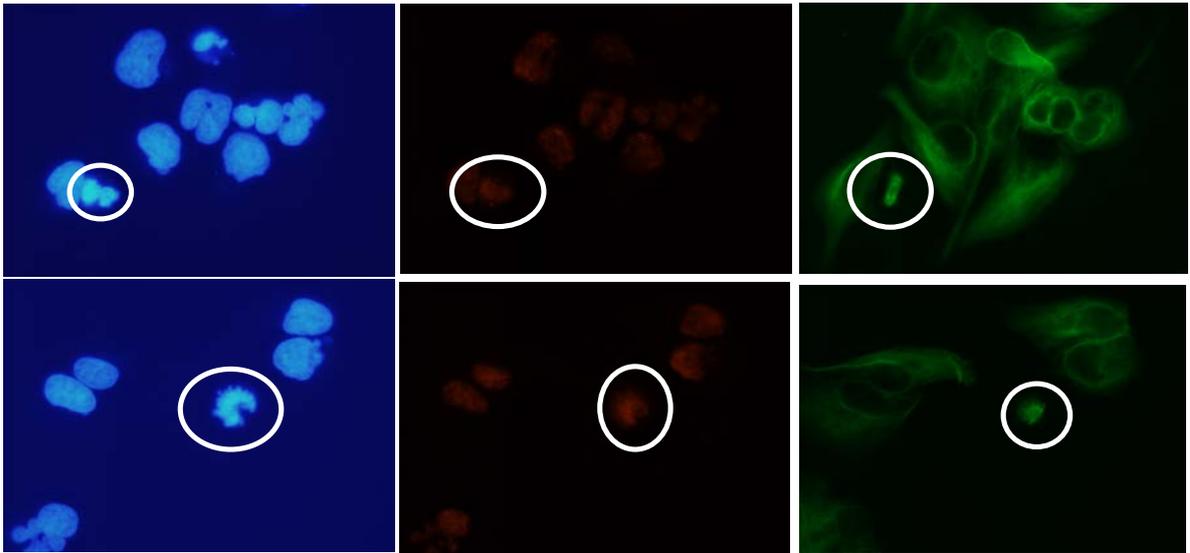


Figura 21. Línea H23 tratado con TPX0005 2 uM a las 24h.

En la figura 21, vemos que las posibles metafases son aberrantes con el huso cromático no orientado correctamente respecto a los cromosomas o bien que los cromosomas están desorganizados. Con estos resultados, podemos interpretar que el uso de TPX-0005 inhibe la mitosis entre profase y metafase, en algunos casos no llegando a formar el huso cromático y en otros formándolo aberrante y no funcional.

En la siguiente figura 22, observamos el efecto del tratamiento con TPX-005 sobre la línea celular H460. Cuando usamos el marcador fluorescente DAPI vemos como a las 24h la morfología es abigarrada, no observamos anafases ni telofases, las células están en profase, los cromosomas están desalineados y son aberrantes.

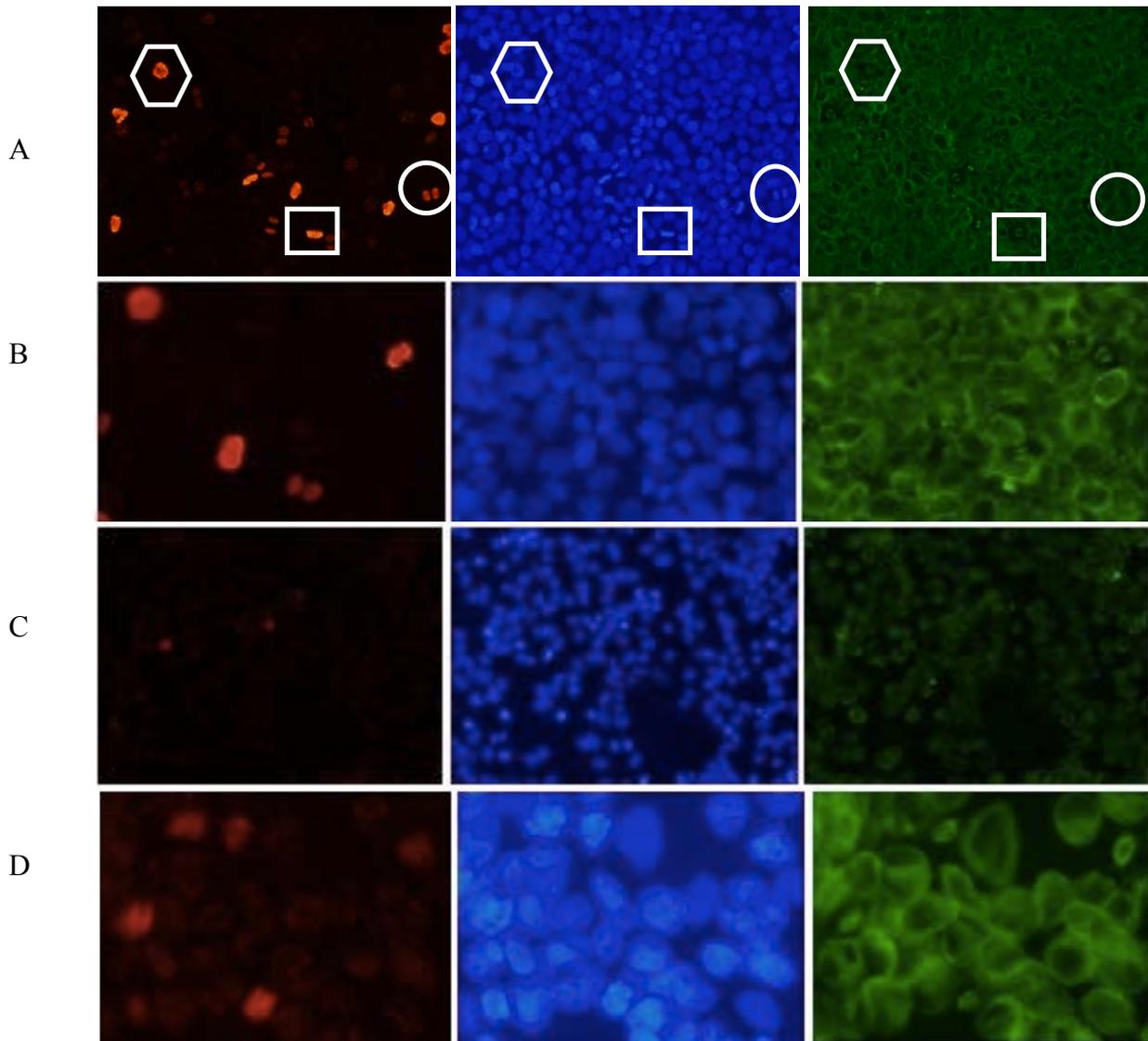


Figura 22. Línea celular H460: A) Sin tratamiento vista con aumetno de 20x. Los círculos señalan la telofase, el cuadrado la metafase y el hexágono las profases. B) Sin tratamietno vista con 60 aumentos. C) a las 4h de ser tratada con TPX-0005(2uM) vista con aumento D) a las 4h de ser tratada con TPX-0005(2uM) vista con aumento 80-100x.

Este efecto se consigue cuando utilizamos menores concentraciones de TPX0005 (0,5 uM) como puede observarse en la figura 23, donde se ven algunas células en profase, telofase y metafase.

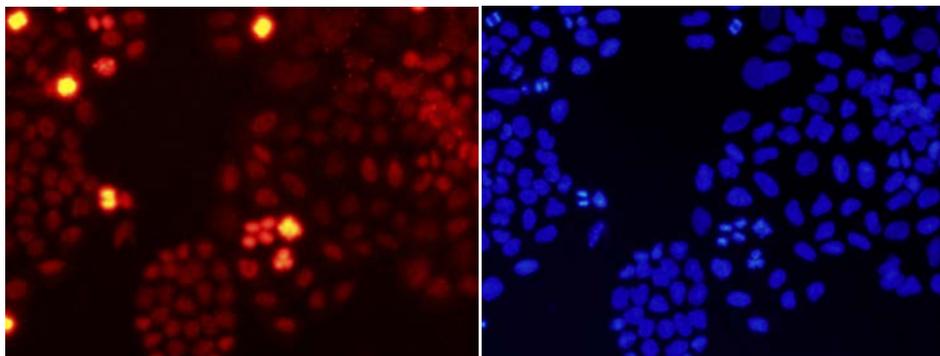


Figura 23. Línea H460 tratada con TPX0005 a concentraciones 0,5 uM a las 48h.

En las figuras 24 y 25 podemos observar la línea celular A459 sin tratamiento (figura 27) y con TPX-0005 (figura 28). En la figura 24 podemos distinguir las diferentes fases de la mitosis, de izquierda a derecha están señaladas mediante círculos células en las siguientes fases, profase, metafase, anafase y en la figura de la derecha la telofase. En cambio, en la figura 25 no podemos distinguir todas las fases dado que no se objetivó ninguna célula en telofase, y las que distinguimos, profase, metafase y anafase son abigarradas o con orientación incorrecta. Es decir, los usos cromáticos no están correctamente orientados hacia los cromosomas por lo que la división del material genético probablemente no es correcta.

Con todos estos datos podemos concluir que TPX-0005 interfiere en el ciclo celular entre profase y metafase a altas concentraciones.

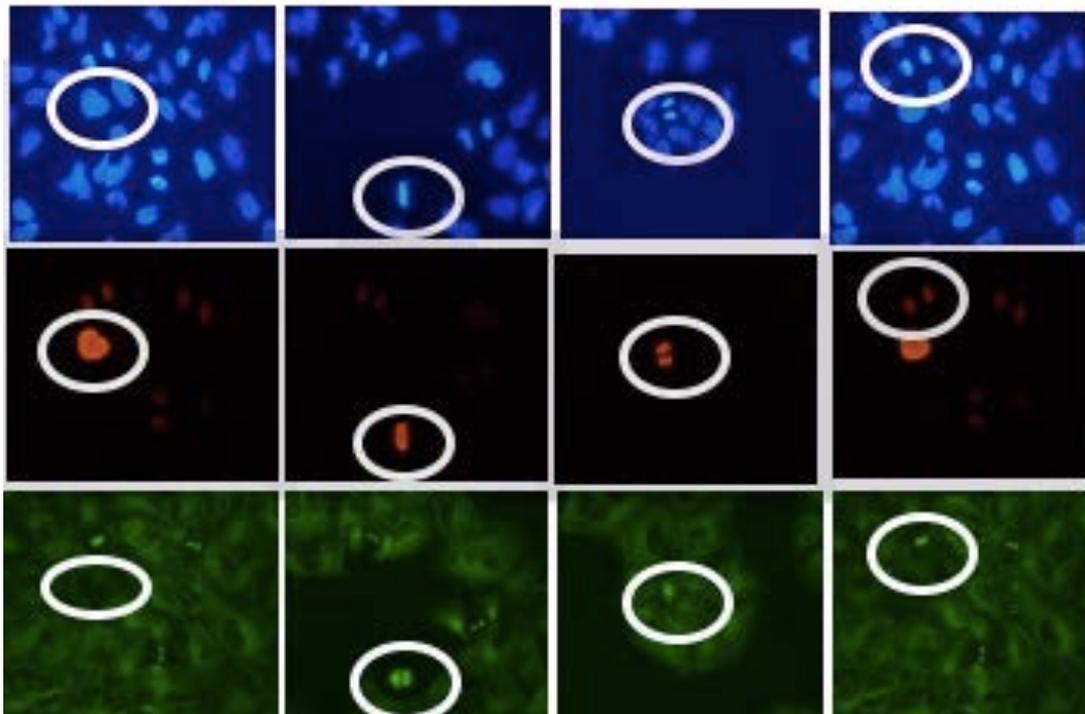


Figura 24. Línea A459 sin tratamiento a las 24h. De izquierda a derecha se pueden distinguir células en profase, metafase, anafase y telofase.

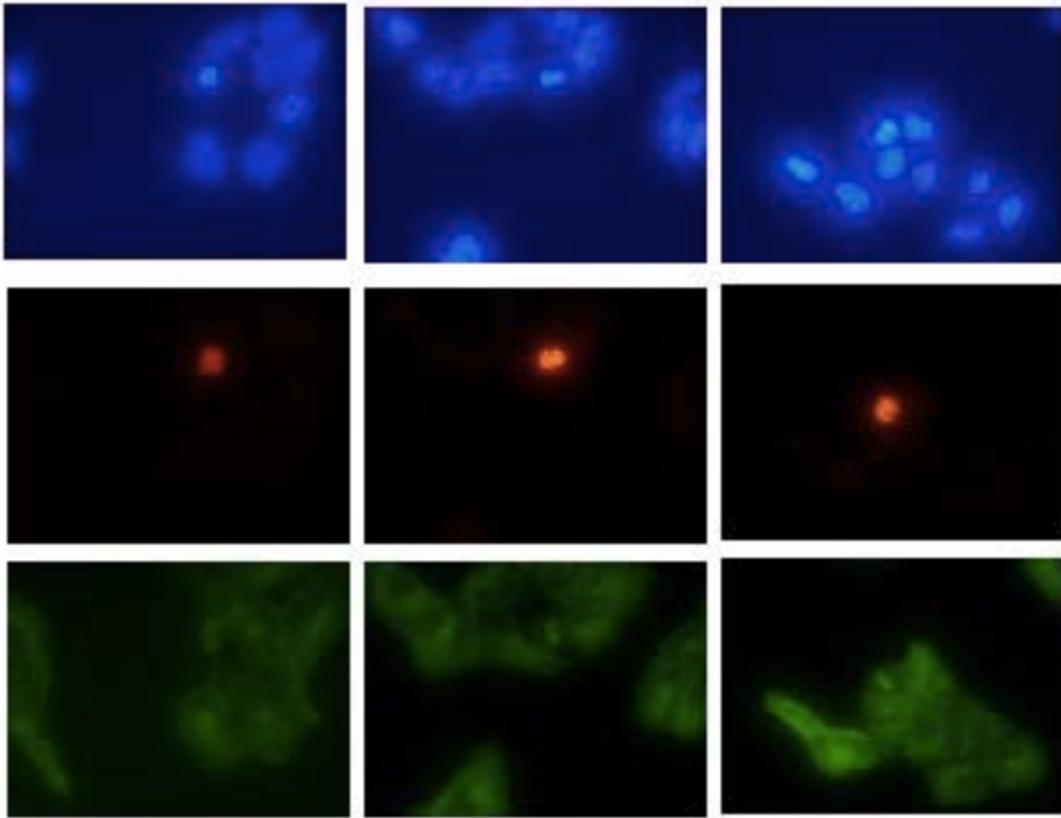


Figura 25. Línea A459 a las 24h, tratamiento con TPX-0005 a 2uM.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN:

Los pacientes afectos de adenocarcinoma de pulmón con mutación de KRAS siguen sin tener tratamiento dirigido eficaz, pese al gran avance experimentado en la oncología médica en los últimos años. Ello es debido, en gran parte, a la heterogeneidad de esta enfermedad.

En nuestro trabajo nos hemos centrado en dos diferentes líneas de actuación. Por una parte, la caracterización demográfica de nuestra muestra y su caracterización molecular para encontrar factores genéticos relacionados con la supervivencia. Y, por otra parte, el estudio de diferentes líneas celulares con mutación de KRAS con características basales diferentes y su comportamiento bajo el tratamiento con trametinib (inhibidor de ERK) y TPX-0005 (inhibidor de Src).

Una de las limitaciones de nuestro estudio es el pequeño número de pacientes que hemos podido estudiar. Esto se debe a que la mutación de KRAS, dado que no tiene tratamiento dirigido, su determinación no se realiza de rutina en todos los pacientes. Por ello se ha tenido que testar en un número importante de muestras cuyas características eran susceptibles de presentar dicha mutación (adenocarcinoma, no mutación de EGFR ni ALK, y fumadores o ex fumadores con alta dosis tabáquica acumulada) para obtener la muestra final. Además, en este tipo de tumor la cantidad de material tumoral y la calidad es baja debido a la dificultad para la obtención de muestra en pacientes con neoplasias pulmonares, ya que la mayoría de los pacientes son diagnosticados mediante fibrobroncoscopia o ecobroncoscopia y las muestras son citologías o biopsias de pequeño tamaño.

Para comparar los resultados de los pacientes de nuestra muestra con respecto a la población general, dado que el esquema más utilizado fue platino en combinación con pemetrexed hemos comparado nuestros datos con los obtenidos en el estudio Paramount con dicho esquema. En este estudio la supervivencia libre de progresión fue de 4,1 meses

el grupo que realizó mantenimiento y 13,9 meses en cuanto a supervivencia global. ⁽⁵⁴⁾. Pese a ser muy similares (SG 13,4 meses y SLP 3,4 meses en nuestra muestra), estas pequeñas diferencias en cuanto a supervivencia libre de progresión y supervivencia global podrían deberse a que en nuestra muestra todos los pacientes presentan mutación KRAS, y en cambio, en la población general la mutación de KRAS aparece en un 25% de los pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de pulmón. Además, los pacientes incluidos en un ensayo clínico no son representativos de la población general dado que han sido seleccionados y tienen una condición óptima para el tratamiento.

La tasa de respuesta de nuestra población fue del 34,38% en cambio en el estudio Paramount fue del 30% y las tasas de enfermedad estable fueron del 45% en el estudio y en cambio en nuestra es del 9,38% en nuestra población. Las tasas de progresión fueron similares 23% en el estudio y 25% en nuestra muestra. Dado que nuestros pacientes la mayoría fueron tratados según práctica clínica habitual, entorno al 31% no fue evaluada la respuesta por pérdida de seguimiento o deterioro del paciente que impidió realizar pruebas de reevaluación de la enfermedad. Esto asemejaría las tasas de progresión de la enfermedad de nuestra población con las del estudio Paramount.

Se analizó el tipo de mutación de KRAS siendo la más frecuente fue G12C y G12V ambas con un 28,13%. Dado que prácticamente la totalidad de los pacientes de la muestra son fumadores es de esperar que la mutación más frecuente sea G12C (cambio de glicina por cisteína), ya que es la que más se relaciona con el hábito tabáquico. A su vez coincide en frecuencia en la muestra con G12V (cambio de glicina por valina) también descrita en la literatura como objetivadas en pacientes fumadores. Él único paciente no fumador (pero con importante contacto pasivo con el tabaco) presentó G12D (cambio de glicina por aspartato) que aparece en el 50% de los pacientes no fumadores con mutación de KRAS.

Se halló la relación entre los diferentes genes estudiados, encontrando una relación estadísticamente significativa, ya descrita por otros grupos de investigación, entre HES y STAT3 ⁽¹⁰¹⁾⁽¹⁰²⁾, CREB1 y LKb1 ⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁷⁾⁽⁵⁸⁾⁽¹⁰³⁾, CREB y Src ⁽¹⁰⁸⁾, Src y STAT3 ⁽¹⁰⁴⁾, Src y YAP1 ⁽¹⁰⁰⁾ y STAT3 y YAP1 ⁽¹⁰⁵⁾. También la relación de Src y YAP1 ha sido demostrada en muchos otros trabajos ⁽¹⁰⁰⁾.

Las relaciones entre estos genes podrían explicarse de la siguiente manera:

a) Relación entre HES1 y STAT3

La vía de NOTCH está relacionada con las células madres tumorales, éstas tienen la capacidad de autoregenerarse (dar lugar a más células de su propio tipo) y de diferenciarse en múltiples tipos de células. Las células madres tienen dos vías dentro de la vía de Notch para desarrollar dichas funciones, la vía canónica y no canónica, controlando cada una diferentes dianas (por ejemplo, Hes1 y HES5 frente a Hes3). En la vía canónica HES1,5 se asocia con JAK2 y este complejo fosforila STAT3 en su residuo Tyr705 promoviendo la diferenciación celular; en cambio en la vía no canónica NOTCH fosforila STAT3 en su residuo Serina promoviendo la autoregeneración. (55)(figura 26)

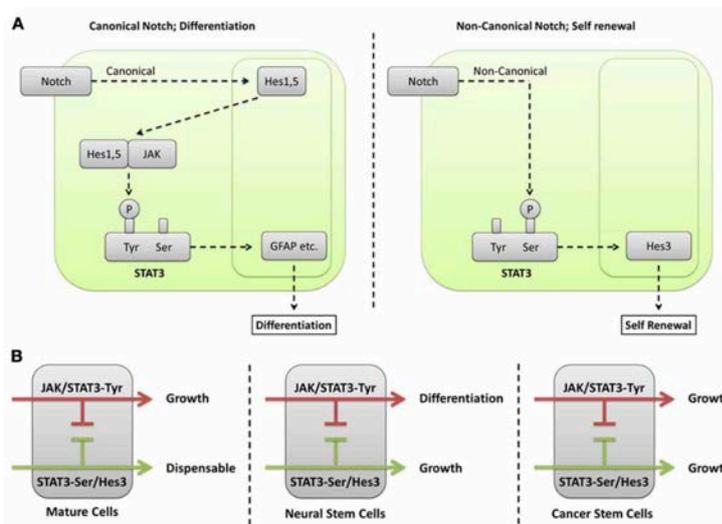


Figura 26. Vía canónicas y no canónicas de NOTCH (55)

Existen publicaciones que demuestran que la inhibición de HES1 reduce la fosforilación de STAT3- tyr705. (56).

Hes1 no activa directamente la vía MAPK mediante su fosforilación, pero sí puede activarla mediante la vía Src/JAK, ya que HES1 sí que activa STAT3 fosforilando JAK2 y este activa la cascada actuando sobre RAF. (figura 5)

Por lo que esta sería la explicación por la cual justificaríamos la relación positiva entre STAT3 y HES1, y esto está demostrado en otros muchos trabajos publicados en la literatura. (101) (102)

b) Relación entre CREB1 y LKB1

LKB1 o STK11 es una serina/treonina kinasa y un reconocido supresor de tumores. Controla la actividad de AMPK regulando el metabolismo celular, la polaridad celular, apoptosis y respuesta al daño al ADN.

CREB (Cyclic AMP-responsive element (CRE)-binding protein) es un factor de transcripción miembro de la familia de las ZIPPER leucina. La proteína es fosforilada por varias proteínas kinasas e induce la transcripción de genes en respuesta a la estimulación hormonal de la vía de AMPc uniéndose a uno de los homodímeros de este.

SIK1 (kinasa inducible por sal) es un miembro de la familia AMPK que se ha objetivado en la cascada de LKB1. No queda claro el mecanismo de acción de SIK1 sobre CREB1 dado que se han descrito mecanismos directos como indirectos. (57) (Figura 27)

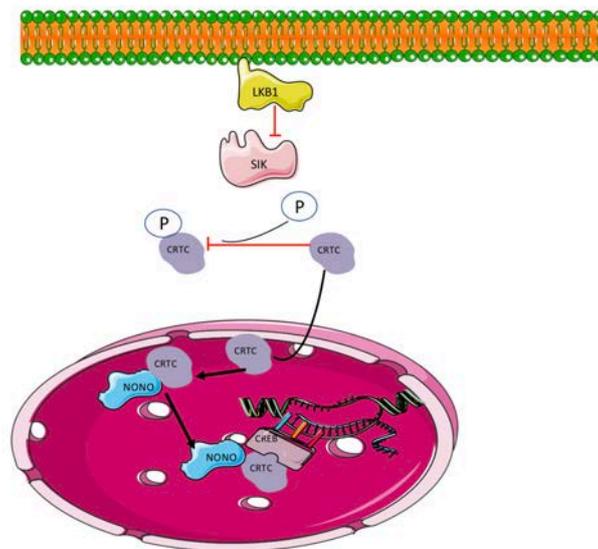


Figura 27. Relación LKB1 y CREEB. (57)

Está descrito que LKB1 produce una activación de la familia de AMPK kinasas, entre ellos activa SIK mediante su fosforilación en Thr182. SIK fosforila el residuo homólogo de serina 151 de CRTC lo que produce su inhibición. ⁽⁵⁸⁾ La inactivación de CRTC provoca su no traslocación al núcleo y por tanto no se produce la activación de CREB mediante CRTC/nono. ⁽¹⁰³⁾

La vía LKB1 / CRTC / CREB controla directamente la transcripción LINC00473. La expresión de LINC00473 está fuertemente ligada a la señalización de LKB1. LINC00473 es un lncRNA nuclear que promueve el reclutamiento de NONO a CRTC (MECT/TORC1) y activa la transcripción mediada por CREB. ^{(56)(figura 27)}

Es decir, en células con alta expresión de LKB1, SIK está inhibido por lo que CRTC está activado y se trasloca al núcleo donde activa CREB fosforilándolo o vía AMPc. Una baja expresión de LKB1 no inhibe SIK, por lo que éste fosforila CRTC y lo inhibe, provocando que esté en citoplasma y no trasloque al núcleo, no activando CREB.

c) Relación entre CREB1 y SRC

La prostaglandina E2 (PGE2), juegan un papel central en funciones celulares relacionadas con el desarrollo tumoral y la capacidad migratoria. Se ha demostrado que PGE2 se une a receptores de membrana acoplados a proteína G (GPCR), EP1, EP2, EP3 y EP4. Estos receptores tienen diferente afinidad de unión a PGE2 y pertenecen a diferentes vías de señalización. En nuestro caso, participa EP2 y EP4 que se unen a Gas para estimular una adenylil ciclase.

La activación de EP2 y EP4 promueve carcinogénesis y metástasis. PGE2 unida a EP2 activa Gas y ésta a la adenilil ciclase con la subsiguiente activación de la proteína quinasa A (PKA) y posteriormente efectores como CREB y la vía de PI3K/AKT.

Además, estudios más recientes han indicado que el GPCR puede activar proteínas G independientes de las vías de señalización a través de la formación de complejos

GPCR/ β -arrestina. Los complejos GPCR / β -arrestina provocan la activación de PI3K, ERK, Src, STAT3 y EGFR.

Tanto mediante la vía Src como Gas/AMPC/PKA/CREB se produce un aumento de la expresión de EP2 que produce una retroactivación de la vía. (59)(figura 28)

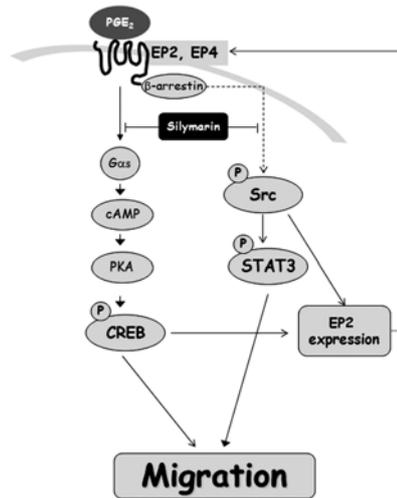


Figura 28. Relación entre CREB1 y Src. (59)

Estos datos justifican la correlación positiva objetivada en nuestras muestras entre Src y CREB. Dado que al aumentar Src aumenta EP2 que produce la retroalimentación y el aumento de CREB y a su vez el aumento de CREB también produce un aumento de la expresión de EP2.

d) Relación entre SRC y STAT3

Src participa en múltiples funciones incluida la progresión del ciclo celular, sistema inmunitario, adhesión, migración, apoptosis y diferenciación celular. En las células tumorales la activación constitutiva de Src altera muchos de estos procesos. Se ha demostrado que su inhibición produce una disminución de la proliferación celular, aumento de la susceptibilidad a anoikis y disminución de la invasión y migración in vitro con disminución de las metástasis y la vascularización in vivo (104).

Src modula numerosos sustratos como FAK, PI3K y STAT3.

Las tirosin kinasas no receptoras como Src o ABL activan de forma constitutiva STAT3. Por otra parte, las señales autocrinas o parácrinas activan los receptores tirosin kinasa de y las kinasas de la familia Janus (JAKs) asociadas a los receptores de citoquinas y las tirosinas kinasas SRC. Este conjunto fosforila y activa STAT3.

Después de la fosforilación de la tirosina, las moléculas STAT3 dimerizan y translocan al núcleo, donde regulan directamente la expresión génica. (60)(Figura 29)

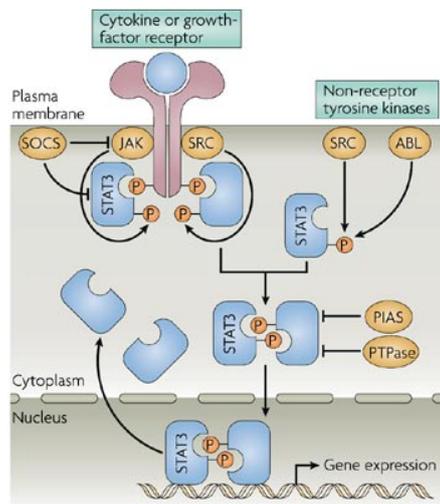


Figura 29. Relación entre Src y STAT3.(60)

Los datos obtenidos en nuestras muestras reflejan la relación existente en esta vía de señalización entre Src y STAT3, mostrando una relación positiva en la que al aumentar Src se produce un aumento de STAT3 por la activación de este.

e) Relación entre SRC y YAP1

La activación de Src mediante la activación de receptores de factores de crecimiento de la membrana celular mediada por la unión a ellos de activadores o activada como consecuencia de la pérdida de la adhesión célula célula que se produce en el proceso de transición epitelio mesenquimal (98) produce una activación de YAP mediante su

fosforilación (Y357) ⁽⁹⁹⁾ mediante paxilin independiente de la vía Hippo ⁽¹⁰⁰⁾. YAP fosforilado se transloca al núcleo para activar la transcripción de génica. ^(figura 10)

Por lo que un aumento en la expresión de Src produciría una activación y por consiguiente un aumento en la expresión de YAP1. ⁽⁶¹⁾

f) Relación entre STAT3 y YAP1

El gen YAP1 está presente en la vía Hippo y codifica un efector nuclear, la cual está relacionada con desarrollo, crecimiento, reparación y homeostasis.

En nuestra hipótesis hemos representado de manera visual las relaciones entre las diferentes vías moleculares. Tanto STAT3 como YAP1 Receptor tirosin kinasa o receptores de interleuquina 6 activan Src y este activa STAT3 mediante su fosforilación o YAP1 mediante paxilin. Por lo que ambos podrían aumentar de forma paralela con el aumento de Src y la activación de estos mediante Src. ^(figura 10)

Por otro lado, pese a que está descrita la relación entre Src y CDCP1⁽¹⁰⁷⁾ en nuestro estudio solo hemos hallado relación estadísticamente significativa mediante el test de Pearson pero no con Spearman. Ello podría deberse al bajo número de muestras en las cuales se ha podido determinar CDCP1 y Src.

También se analizó la relación pronóstica de la expresión de los diferentes genes, encontrando que una alta expresión de Src y CDCP1 está relacionado con peor pronóstico y una baja expresión de LKB1 está relacionada con mal pronóstico. Ello se podría justificar con la función que presentan dichos genes. Src codifica una tirosin kinasa que está relacionada con el desarrollo tumoral y CDCP1 codifica una proteína transmembrana que actúa como sustrato para kinasas de la familia de Src y está relacionada con la invasión tumoral y metástasis. Por otro lado, LKB1 codifica una proteína de la familia serina/treonina kinasa cuya función es supresora de tumores, por lo que su expresión está relacionada con supresión de tumores y por consiguiente mejor pronóstico.

En cuanto a supervivencia global, como hemos explicado se objetivó relación con LKB1 y CDCP1. En el caso de LKB1 la expresión de dicho gen otorga mejor pronóstico y en el de CDCP1 la expresión de éste se relaciona con peor pronóstico. La justificación de dichos resultados la encontramos en sus funciones al igual que hemos descrito en el caso de la relación con la supervivencia libre de progresión.

En la bibliografía ya existen otras publicaciones como las publicadas por Ikeda et al. (96) que avalan nuestros resultados. Además, hay publicaciones que han demostrado que la inhibición de éstos genes y otros relacionados con la vía de RAS y Notch podrían ser útiles para el tratamiento de tumores (98) (99) (105)(108)(111)(113). Como, por ejemplo, la α E catenina, gen supresor de tumores que produce una regulación negativa sobre YAP1(106) y se plantea que en tumores con déficit de α E catenina la inhibición de Src sería una estrategia efectiva.

Por otra parte, encontramos datos de una posible relación pronóstica con CREB1, aunque no es estadísticamente significativa y ello podría deberse a la pequeña muestra obtenida para el estudio de dicho gen, por lo que se abre una hipótesis para trabajos posteriores.

Esta información, podría utilizarse para la elaboración de futuros paneles génicos para la caracterización pronóstica y el tratamiento de nuestros pacientes junto con p53 y LKB1 que son importantes para la caracterización de subgrupos en cuanto a pronóstico y respuesta a diferentes tratamientos como la inmunoterapia. (17)

En la segunda parte de nuestro proyecto, hemos intentando demostrar la eficacia de la combinación de trametinib y TPX-0005 para el tratamiento del adenocarcinoma de pulmón con mutación de KRAS.

Nuestra hipótesis es que los tumores de pulmón con mutación de KRAS se comportan como un tumor heterogéneo que presenta diversas relaciones con diferentes vías celulares. Como hemos comentado, existe mucha bibliografía publicada que demuestra que la inhibición única de la vía de ERK con fármacos como Trametinib no es suficiente para su tratamiento. (63)

Trametinib ⁽⁶²⁾ es un inhibidor alostérico reversible y altamente selectivo de la activación de MEK1 y MEK2. En los estudios de actividad se objetivó la fosforilación de MEK en los residuos 217 y 221 de forma dependiente de RAF y también inhibe la fosforilación de ERK. Además, actúa sobre el ciclo celular arretando la célula en la fase G1⁽⁸⁷⁾.

Existen numerosos estudios preclínicos y clínicos en los que se evalúa la eficacia de diferentes combinaciones de fármacos como inhibidores de MAPK e inhibidor de mTOR ⁽⁹⁰⁾, combinación de inhibidores de PI3K y MAPK⁽⁹¹⁾, rigosertinib (inhibidor de PI3K y PLK), e inhibidores del ciclo celular en G2) en combinación con gemcitabina ⁽⁵²⁾, inhibidores de MEK y STAT3 ⁽⁶⁶⁾, inhibidor de MEK con inhibidor de ciclinas ⁽⁷⁶⁾, etc, con la idea de bloquear los mecanismos de resistencia acaecidos por la inhibición de una vía celular, y por otra parte, producir un efecto sinérgico con estas combinaciones. Ambas otorgarían a la combinación una mayor sensibilidad y eficacia.

Teniendo en cuenta que Src podría ser un mecanismo de resistencia ⁽¹¹⁵⁾ para el tratamiento en monoterapia con inhibidores de MEK, que está presente en diferentes vías como la vía Hippo⁽¹⁰⁹⁾⁽¹¹⁰⁾⁽¹¹²⁾, Src- paxilin-YAP1, Src-STAT3⁽¹¹⁴⁾ y los resultados obtenidos en nuestra muestra, donde objetivamos que Src es un factor de mal pronóstico, elegimos TPX-0005 como fármaco para su combinación.

TPX-0005 es un potente inhibidor de Src y Fak^(tabla 17), además de inhibidor de ALK, ROS1 y TRK. Tiene una estructura macrocíclica tridimensional rígida y un tamaño mucho menor (MW <370) que otros inhibidores. La estructura compacta permite al TPX-0005 dirigirse eficazmente al centro del sitio de unión al ATP y ser capaz de eludir la interferencia estérica de las mutaciones clínicas resistentes. Por lo tanto, TPX-0005 potentemente inhibe tanto el tipo salvaje como diferentes mutantes de las proteínas de fusión ALK, ROS1 y TRK, incluyendo diferentes gatekeeper y también diversas mutaciones a baja concentración, a nivel nanomolar, además, es un potente inhibidor de Src/FAK y JAK2 (y por tanto mediante la inhibición de JAK2 también inhibe STAT3).

Además, los datos obtenidos en la parte clínica de este proyecto, donde Src se relaciona con SLP, apollan su interés como posible diana para su inhibición en la combinación con trametinib.

La concentración máxima tolerada en sangre de Trametinib en monoterapia en sangre es de 36 nM⁽⁸⁸⁾. Por lo que sería la concentración máxima que deberíamos tener en cuenta para valorar sensibilidad al fármaco. Teniendo en cuenta que la IC 50 que obtuvimos en la línea H460 es 169,23 nM, Trametinib no sería un fármaco sensible, dado que la concentración máxima tolerada es inferior a la IC 50.

TPX-0005, el cual está en ensayos fase I, no conocemos cual es la concentración máxima en sangre tolerable, por lo que no podemos conocer si las dosis utilizadas para nuestra línea celular pueden ser tóxicas. Se espera que para los próximos meses podamos conocer dichos datos de los ensayos que se están llevando a cabo actualmente.

En un trabajo publicado por K. Chua ⁽⁸⁹⁾ se objetiva sinergismo en las combinaciones de inhibidor de MEK (salmetinib) e inhibidor de Src (PD0325901) en líneas celulares utilizadas también por nosotros de CPNCP con mutación de KRAS como H23, A549 y H460 ⁽⁸⁹⁾.

En nuestro trabajo hallamos sinergia entre el inhibidor de Src (TPX-0005) y el inhibidor de MEK (trametinib) en la línea Calu6, no testada en dicha publicación, y en la línea celular H23 y H460 que si habían sido utilizadas en dicha publicación. Por otro lado, hallamos un efecto aditivo en la línea A549, que si habían sido utilizada en sus experimentos y habían encontrado efecto sinérgico.

Dada la sinergia encontrada en nuestro proyecto, con resultados similares a los señalados por otras publicaciones, sería interesante probar in vivo y posteriormente en ensayos clínicos fase I de combinación esta estrategia terapéutica, dado que ya existen datos de fase I con trametinib y está pendiente en los próximos meses la publicación de datos de TPX-0005 en monoterapia.

Para comprender el efecto de estos fármacos sobre las células tumorales, además de realizar estudios de IC50 y de viabilidad, se realizaron estudios de expresión de proteínas mediante western blot e inmunofluorescencia. Inicialmente encontramos que la morfología celular se veía afectada con el tratamiento de TPX-0005, siendo los núcleos aberrantes y polinucleados. Por ello quisimos estudiar el ciclo celular mediante el estudio de la expresión de Histona H3 fosforilada mediante Western Blot y el estudio morfológico

mediante inmunofluorescencia con marcadores de ADN (DAPI), marcadores nucleares (histona H3) y de microtúbulos (alfa tubulina).

Las histonas (un octámero de 4 histonas, H3, H4, H2A, H2B) envueltas por pares de base de DNA constituyen un nucleosoma. Las histonas están altamente reguladas por modificaciones post-traduccionales tales como metilación, fosforilación, acetilación, etc. regulando la transcripción, duplicación y la formación de cromatina. Por ello, hemos estudiado el efecto de trametinib, TPX-0005 y de la combinación de ambos sobre la fosforilación (activación) del residuo S10 de la Histona H3 (como marcador de la mitosis).

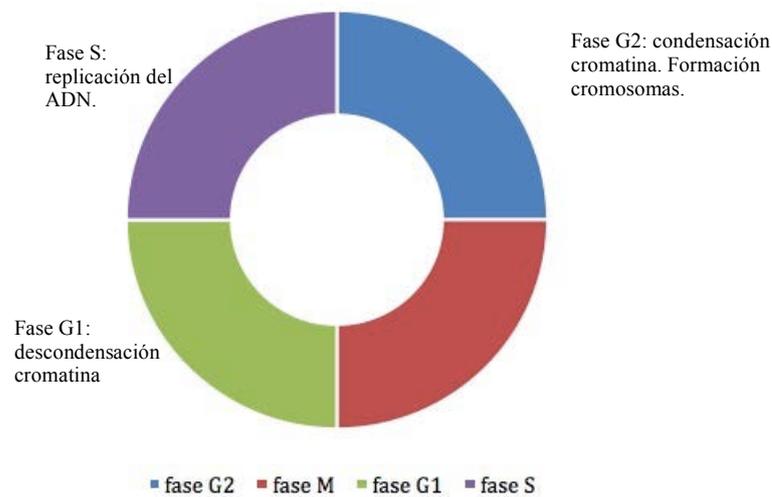


Figura 30. Fases del ciclo celular

En todos estos estudios se ha objetivado que el tratamiento con TPX-0005 inhibe el ciclo celular mediante la inhibición de la fosforilación de Histona H3 y la inhibición de la mitosis, con la formación de estructuras aberrantes, parando el ciclo celular en la profase.

Trametinib como hemos dicho actúa sobre el ciclo celular arrojando la célula en la fase G1 y TPX-0005 inhibe la fosforilación de Histona H3 en su residuo S10, además de inhibir el ciclo celular en la mitosis.

Por otra parte, los datos preliminares obtenidos con esta combinación de fármacos sobre la expresión de diferentes vías celulares relacionadas con la mutación de KRAS, abren futuras vías de investigación y aproximación a este cáncer.

CONCLUSIONES

6. **CONCLUSIÓN:**

- 1- El carcinoma de pulmón no célula pequeña con mutación de KRAS es una enfermedad heterogénea y compleja cuya evolución, pronóstico y respuesta a tratamiento está relacionada con diferentes genes acompañantes.
- 2- Existen relaciones estadísticamente significativas entre la expresión de HES1 y STAT3; CREB1 y LKB1; CREB1 y Src; Src y STA3; Src y YAP1 y STAT3 y YAP1.
- 3- La expresión de genes con Src, CDCP1 y LKB1 tiene relación estadísticamente significativa en cuanto a tiempo libre de progresión, mientras que la expresión de los genes CDCP1 y LKB1 tiene relación con la supervivencia global. La alta expresión de Src y CDCP1 y la baja expresión de LKB1 están relacionadas con un peor pronóstico.
- 4- El tratamiento de este subtipo de cáncer de pulmón con la combinación de TPX-0005 y trametinib, tanto por su sinergismo y viabilidad, como por la inhibición de posibles mecanismos de resistencia, podría ser una alternativa de tratamiento que debería ser estudiada en estudios in vivo y en estudios clínicos para corroborar nuestra hipótesis.

LÍNEAS DE FUTURO

7. LÍNEAS DE FUTURO

Tras los resultados obtenidos en nuestro proyecto se abren varias líneas de investigación. Por una parte, extender nuestro proyecto a un número más amplio de pacientes para corroborar los datos obtenidos.

Por otro lado, se han iniciado experimentos en el laboratorio para estudiar el efecto de la combinación de Trametinib y TPX-0005 y de dichos fármacos en monoterapia, sobre otras vías relacionadas con KRAS mutado y así poder ampliar nuestro conocimiento sobre el mecanismo de acción de esta combinación y sus posibles mecanismos de resistencia.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la combinación de Trametinib y TPX-0005 que muestra sinergia en diferentes líneas celulares los siguientes pasos en este proyecto sería probar la combinación in vivo y estudios clínicos fase I con la combinación, dado que ya tenemos los datos de seguridad de Trametinib en monoterapia y preliminares de TPX-0005 en monoterapia.

BIBLIOGRAFÍA

8. **BIBLIOGRAFIA:**

1. Novello, S, Califano R, Califano R, Cufer T, Ekman S, Levra G, et al. Metastatic non-small-lung cancer: ESMO clinical practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology* 27 (supplement 5):v1-v27, 2016.
2. Rosell R and Karachaliou N. Large-scale screening for somatic mutations in lung cancer. *Lancet*. 2016; 387:1354-1355.
3. Kitai H, Ebi H, Tomida S, Floros KV, Kotani H, Adachi Y et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Defines Feedback Activation of Receptor Tyrosine Kinase Signaling Induced by MEK Inhibition in KRAS-Mutant Lung Cancer. *Cancer Research* 2016; 7: 754-769.
4. Las cifras del cáncer en España 2016. Soc española oncología Médica. 2016.
5. Janne PA, Shaw AT, Pereira JR, Jeannin G, Vansteenkiste J, Barrios C, et al. Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2013;14(1):38–47
6. Lazzari C, Verlicchi A, Gkountakos. A, Pilotto S, Santarpia M, Chaib I et al. Molecular Bases for Combinatorial Treatment Strategies in Patients with KRAS Mutant Lung Adenocarcinoma and Squamous Cell Lung Carcinoma. *Pulmonary Therapy* 2016; 2: 1-18.
7. Singh A, Greninger P, Rhodes D, Koopman L, Violette S, Bardeesy N, et al. A gene expression signature associated with “K-Ras addiction” reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell*. 2009;15(6):489–500.
8. Nadal E, Chen G, Prensner JR, Shiratsuchi H, Sam C, Zhao L, et al. KRAS-G12C mutation is associated with poor outcome in surgically resected lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2014;9(10):1513-22.
9. Zar B, Zhou H, Heist RS, Azzoli CG, Muzikansky A, Scribner EE, et al. The prognostic impact of KRAS, its codon and amino acid specific mutations, on survival in resected stage I lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2014;9(9):1363-9.
10. Renaud S, Falcoz PE, Schaeffer M, Guenot D, Romain B, Olland A, et al. Prognostic value of the KRAS G12V mutation in 841 surgically resected Caucasian lung adenocarcinoma cases. *Br J Cancer*. 2015;113(8):1206-15.

11. Alamo P, Gallardo A, Di Nicolantonio F, Pavon MA, Casanova I, Trias M, et al. Higher metastatic efficiency of KRas G12V than KRas G13D in a colorectal cancer model. *FASEB J.* 2015;29(2):464-76.
12. Uekita T, Fujii S, Miyazawa Y, Iwakawa R, Narisawa-Saito M, Nakashima K, et al. Oncogenic Ras/ERK Signaling Activates CDCP1 to promote tumor invasion and metastasis. *Mol Cancer Res* 2014;12:1449-1459.
13. Regala RP, Weems C, Jamieson L, Khor A, Edell ES, Lohse CM, et al. Atypical protein kinase C iota is an oncogene in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2005;65(19):8905-11.
14. Ali A, Justilien V, Jamieson L, Murray N, Fields AP. Protein Kinase Ci Drives a NOTCH3-dependent Stem-like Phenotype in Mutant KRAS Lung Adenocarcinoma. *Fields Cancer Cell* 2016; 29, 367–378
15. Ihle NT, Byers LA, Kim ES, Saintigny P, Lee JJ, Blumenschein GR, et al. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(3):228–39
16. Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Breast A, Yu M et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2016.
17. Skoulidis F, Byers L, Diao L, Papadimitrakopoulou V. Tong P, Izzo J et al. Co-occurring genomic alterations define major subsets of KRAS-mutant lung adenocarcinoma with distinct biology, immune profiles, and therapeutic vulnerabilities. *Cancer discov.* 2015, 5(8): 860-877.
18. Paz-Ares L, de Marinis F. Dediu M, Thomas M, Bidoli P, Moliner O et al. Maintenance therapy with pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care after induction therapy with pemetrexed plus cisplatin for advanced non squamous non small cell lung cancer (PARAMOUNT): a double-blind, phase 3, randomized controlled trial. *Lancet Oncol* 2012;13:247-255.
19. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinsons A. Hui R, Csozsi T, Fulop A et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1 positive non small lung cancer. *N engl J med* 2016;375;1823-1833.
20. Reck, M, Kaiser R, Mellemegaard A, Douillard J, Krzakowski M, Von Pawel J, et al. Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with

- previously treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2014;15:143-55.
21. Hellman M, Rizvi N, Doldman J, Gerringer S, Borghaei H, Brahmer JR et al. Nivolumab plus ipilimumab as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 012): results of an open label, phase 1, multicohort study. *Lancet Oncol* 2017;18:31-41.
 22. Garon E, Ciuleanu, Arrieta O, Prabhaskar K, Syrigos K, Goksel T et al. Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): a multicentre, double-blind, randomised phase 3 trial *Lancet* 2014; 384: 665–73
 23. Rosell. R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, MAssuti B, Felip E et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012 Mar;13(3):239-46.
 24. Mok T, Wu Y, Ahn M, Garassino M, Kim H, Suresh S et al. Osimertinib or platinum pemetrexed in EGFR T790M positive lung cancer. *N engl J. Med* 2017; 376:629-40.
 25. Solomon B, Mok T, Kim D, Wu Y, Nakagawa K, Mekhail T, J et al. First line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK rearranged non small cell lung cancer (ASCEND-4): a randomized, open label, phase 3 study. *Lancet* 2017, 389 (10072);917-929.
 26. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim DW et al. Alectinib versus crizotinib in untreated ALK positive non small cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2017 Aug 31;377(9):829-838
 27. Shaw AT, Felip E, Bauer T, Besse B, Navarro A, Postel-Vinay S et al. Lorlatinib in non small cell lung cancer with ALK or ROS1 rearrangement: an international, multicentre, open-label, single-arm first in man phase 1 trial. *Lancet Oncol.* 2017 Dec;18(12):1590-1599.
 28. Kim D, Tiseo M, Ahn MJ, Reckamp KI, Hansen KH, Kim SW et al. Brigatinib in patients with crizotinib refractory anaplastic lymphoma kinase positive non small cell lung cancer. A randomized multicenter phase II trial. *J Clin Oncol*, 2017 May 5. doi: 10.1200/JCO.2016.71.5904

29. Wakelee H, Sanborn R, Nieva J, Wagar S, Brzezniak C, Bauman J et al. Response to ensartinib in TKI naïve ALK+ NSCLC patients. Presented at: IASLC 18th World Conference on Lung Cancer; October 15-18, 2017; Yokohama, Japan. Abstract MA 07.02
30. A. Drilon, R. Camidge, Ignatios Ou S, Clark J, Socinski M, Weiss J. Efficacy and safety of crizotinib in patients with advanced MET exon 14 altered non small cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 34, no. 15_suppl (May 2016) 108-
31. Yoh K, Seto T, Satouchi M, Nishio M, Yamamoto N, Murakami H et al. Vendetanib in patients with previously treated RET. Rearranged advanced non small cell lung cancer (LURET): an openlabel, multicenter phase II trial. *Lancet Respiratory Medicine*, 2017 Jan;5 (1): 42-50.
32. Li B, Shen R, Buonocore D, Olah Z, Ni A, Ginsberg M et al. Ado trastuzumab emtansine in patients with HWE2 mutant lung cancers: Results from a phase II basket trial. *J Clin Oncol* 35, 2017 (suppl; abstr 8510)
33. Planchard D, Besse, Kim T, Quoix E, Souquet P, Mazieres J. Updated survival of patients with previously treated BRAF V600E mutant advanced non small cell lungcancer (NSCLC) who received dabrafenib or dabrafenib + trametinib in the phase II BRF 113928 study. *J Clin Oncol* 35, 2017 (suppl; abstr 9075).
34. Wu X, Ma W, Zhou Q, Yan H, Lim Z, Huang M et al. AXL-GAS6 expression can predict for adverse prognosis in non small cell lung cancer with brain metastases. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017 Oct;143(10):1947-1957.
35. Sequist L, Yang JC, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh W, Mok T et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol*. 2013 Sep 20;31(27):3327
36. Wu L, Zhou C, Hu C, Feng J, Lu S, Huang Y, Li W et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014 Feb;15(2):213-22.
37. Park K, Tan E, O'Byrne K, Zhang L, Boyer M, Mok T, et al. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with *EGFR* mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. Volume 17, No. 5, p577–589, May 2016.
38. Boyer M, Janne P, Mok T, O'Byrne K, Paz-ares L, Suresh S et al. ARCHER: Dacomitinib (D; PF-00299804) versus erlotinib (E) for advanced (adv) non-small

- cell lung cancer (NSCLC)—A randomized double-blind phase III study. *J Clin Oncol* 30, 2012 (suppl; abstr TPS7615).
39. Shaw A, Riley G, Bang Y, Camidge D, Varella-Garcia M, Lafrate A et al. Crizotinib in advanced ROS1-rearranged non-small cell lung cancer (NSCLC): updated results from PROFILE 1001. *Annals of Oncology, Volume 27, Issue suppl_6, 1 October 2016, 1206PD*
 40. Goto K, Yang J, Kim D, Lu S, Seto T, Yang J et al. Phase II study of crizotinib in east Asian patients (pts) with ROS1-positive advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl; abstr 9022)
 41. . Chiloeches A. Curso Oncología molecular. Universidad de Alcalá.
 42. . Patricelli M, Janes M, Li L, Hansen R, Peters Y, LAssier LV, et al. Selective inhibition of oncogenic KRAS output with small molecules targeting the inactive state. *Cancer Discov* 2016;6:316-329.
 43. Li Z, Ivanov A, Su R, Gonzalez-Pecchi V, Qui Q, Liu S, Webber P et al. The OncoPPI network of cáncer-focused protein-protein interactions to inform biological insights and therapeutic strategies. *Nature communications*. DOI: 10.1038/ncomms14356.
 44. HES1. NCBI. National center for biotechnology information, US. National library of medicine. 8600 Rockville Pike, Bethesda, 20894 USA. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov (consultado el 14 de julio de 2017)
 45. CDCP1. NCBI. National center for biotechnology information, US. National library of medicine. 8600 Rockville Pike, Bethesda, 20894 USA. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov (consultado el 14 de julio de 2017)
 46. AXL. NCBI. National center for biotechnology information, US. National library of medicine. 8600 Rockville Pike, Bethesda, 20894 USA. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov (consultado el 14 de julio de 2017)
 47. YAP1. NCBI. National center for biotechnology information, US. National library of medicine. 8600 Rockville Pike, Bethesda, 20894 USA. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov (consultado el 14 de julio de 2017)
 48. CREB. NCBI. National center for biotechnology information, US. National library of medicine. 8600 Rockville Pike, Bethesda, 20894 USA. Disponible en:

www.ncbi.nlm.nih.gov (consultado el 14 de julio de 2017)

49. LKB1. NCBI. National center for biotechnology information, US. National library of medicine. 8600 Rockville Pike, Bethesda, 20894 USA. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov (consultado el 14 de julio de 2017)

50. SRC. NCBI. National center for biotechnology information, US. National library of medicine. 8600 Rockville Pike, Bethesda, 20894 USA. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov (consultado el 14 de julio de 2017)

51. STAT3. NCBI. National center for biotechnology information, US. National library of medicine. 8600 Rockville Pike, Bethesda, 20894 USA. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov (consultado el 14 de julio de 2017)

52. O'Neil BH, Scott AJ, Ma W, Cohen S, Aisner D, Menter A et al. A phase II/III randomized study to compare the efficacy and safety of rigosertinib plus gemcitabine versus gemcitabine alone in patients with previously untreated metastatic pancreatic cancer. *Ann Oncol* 2016 Jun (6):1180.

53. Wu. Y, Chen Z, Ullrich A. EGFR and FGFR signaling through FRS2 Is subject negative feedback control by ERK1/2. *Biol.Chem* 2003 aug (384): 1215-1226.

54. Reck. M, Paz-ares L. de Marinis F, Molinier O, Sahoo T, Laack E et al. Paramount: Descriptive subgroup analyses of final overall survival for the phase III Study of Maintenance pemetrexed versus placebo following induction treatment with pemetrexed plus cisplatin for advanced nonsquamous non-small cell lung cancer. *J Thorac oncol.* 2014 feb; 9(2):205-213.

55. Poser S., Park D, Androutsellis-Theotokis A. The STT3/HES3 signaling axis: an emerging regulator of endogenous regeneration and cancer growth. *Front Physiol* 2013 Oct 1:4:273.

55. Kamakura S, Oishi K, Yoshimatsu T, Nakafuku M, Masuyama N, Gotoh Y. Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling. *Nat Cell Biol.* 2004 Jun;6(6):547-54.

56. Chen Z, Li J, Cao C, Gimbrone N, Yang R, Fu D et al. cAMP/CREB- regulated

LINC00473 marks LKB1 inactivated lung cancer and mediates tumor growth. *J Clin Invest*. 2016 Jun 1;126(6):2267-79.

57. Katoh Y, Takemori H, Lin X, Tamura M, Muraoka M, Satoh T, et al. Silencing the constitutive active transcription factor CREB by the -SIK signaling cascade. *FEBS J*. 2006 Jun;273 (12):2730-48.

58. Komiya T, Coxon A, Park Y, Chen W, Zajac-Kaye M, Meltzer P. Enhanced activity of the CREB co-activator CRTC1 in LKB1 null lung . *Oncogene* (2010) 29, 1672-1680.

59. Woo S, Min K, Chae I, Chun K, Kwon T. Silymarin suppresses the PGE2- induced cell migration through inhibition of EP2 activation; G protein-dependent PKA-CREB and G protein. Independent Src-STAT3 signal pathway. *Mol Carcinog*. 2015 Mar;54(3):216-28. doi: 10.1002/mc.22092. Epub 2013 Oct 11.

60. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumor microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jan;7(1):41-51.

61. Smot R, Werneburg N, Sugihara , Hernandez M, Yang L, Mehner C et al. Platelet derived Growth Factor Regulates YAP Transcriptional Activity via Src Family Kinase Dependent Tyrosine Phosphorylation. *Journal of cellular Biochemistry*. DOI 10.1002/jcb.26246 .

62. Rosell R, Dafni U, Felip E, Curioni-Fontecedro A, Gautschi O, Peters S et al. Erlotinib and bevacizumab in patients with advanced non small cell lung cancer and activating EGFR mutations (BELIEF): an international, multicenter, single arm, phase 2 trial. *Lancet Respir Med*. 2017 May;5(5):435-444

63. Infante JR, Fecher L, Falchook G, Nallapareddy S, Gordon M, Becerra C et al. Safety, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy data for the oral MEK inhibitor trametinib: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncolo* 2012 Aug;13(8):773-81.

64. Cui, J. Zhai D, Deng W, Huang Z, Rogers E, Ung J et al.. P3. 02a-009 TPX-0005: A Multi-Faceted Approach to Overcoming Clinical Resistances from Current ALK

or ROS1 Inhibitor Treatment in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 12(1), S1164-S1165.

65. Sachdev S, Bu Y, Gelman I. Paxilin Y118 phosphorylation contributes to the control of Src inducen anchorage independent growth by FAK and adhesion. *BMC cancer*. 2009 Jan 12;9:12.

66. Zhao Ch, Xiao H, Wu X, Li C, Liang G, Yang S, Lin J. Rational combination of MEK inhibitor and the STAT3 pathway modulator for the therapy in KRAS mutated pancreatic and colon cancer cells. *Oncotarget* 2015;6:144472-14487.

67. Xiong S, Klausen Ch, Cheng J, Leung P. Activin B promotes endometrial cancer cell migration by down regulating E cadherin via SMAD- independent MEK-ERK1/2- Snail signaling. *Oncotarget*, 2016;7:40060-40072.

68. Chen HR, Yeh Yc, Liu C, Wu Y, Lo F, Tang, Wang Y. DDR1 promotes E cadherin stability via inhibition of integrin beta1- Src activation mediated E cadherin endocytosis. *Sci Rep* 2016 Nov 8;6:36336.

69. You B, Yang Y, Xu Z, Dai Y, Liu S, Mao H, et al. Inhibition of ERK1/2 down-regulates the Hippo/YAP signaling pathway in human NSCLC cells. *Oncotarget* 2015 Feb 28;6(6): 4357-68.

70. Contal C, O'Quigley J. An application of changepoint methods in studying the effect of age on survival in breast cancer. *Comput Statist Data Anal* 1999;253–270.

71. Mandrekar JN, Mandrekar SJ, Cha SS. Cutpoint determination methods in survival analysis using SAS®. *SAS® users group international proceedings* 28 2003.

72. Liu Z, Chen W, Wang Y, Peng H, Wang Y, Jing Y, Zhang H. PDK4 protein promotes tumorigenesis through activation of cAMP-response element-binding protein (CREB)-Ras homolog enriched in brain (RHEB)-mTORC1 signaling cascade. *J Biol Chem*. 2014 Oct 24;289(43):29739-49.

73. Liu YL, Lai F, Wilmott J, Yan X, Liu X, Luan Q et al. Noxa upregulation by oncogenic activation of MEK/ERK through CREB promotes autophagy in human melanoma cells. *Oncotarget*. 2014 Nov 30;5(22):11237-51.

74. Cho JH, Hong W, Jung Y, Lee J, Lee E, Hwang S, Um H, Parj J. Γ -Ionizing radiation-induced activation of the EGFR-p38/ERK-STAT3/CREB-1-EM pathway promotes the migration/invasion of non-small cell lung cancer cells and is inhibited by podophyllotoxin acetate. *Tumour Biol.* 2016 Jun;37(6):7315-25.
75. Nguyen HB, Badcock JT, Wells C, Quilliam L. LKB1 tumor suppressor regulates AMP kinase/mTOR-independent cell growth and proliferation via the phosphorylation of Yap. *Oncogene.* 2013 Aug 29;32(35):4100-9.
76. Tao Z, Le Blanc J, Wang C, Zhan T, Zhuang H, Wang P, Yuan Z, Lu B. Coadministration of Trametinib and Palbociclib Radiosensitizes KRAS-Mutant Non-Small Cell Lung Cancers In Vitro and In Vivo. *Clin Cancer Res.* 2016 Jan 1;22(1):122-33.
77. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, crino L, Eberhardt E, Poddubskaya E et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 123–135.
78. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L , Spigel D, Steins M, Ready N et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 1627–1639.
79. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Perez Garcia J, Han Y et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387: 1540–1550
80. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, Von Pawel J et al. Atezolizumab versus Docetaxel in patients with previously treated non small cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2017 Jan 21;389(10066):255-265.
81. Drilon A, Siena S, Ou S, Patel M, Ahn M, Lee J, Bauer T et al. Safety and antitumor activity of the multi-targeted Pan-TRD, ROS1, and AKJ inhibitor entrectinib (RXDX-101): combined results from two phase 1 trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer discov.* 2017 Apr;7(4):400-409.

82. Schick U, Kyula K, Barker H, Patel R, Waidi S, Gregory C et al. Trametinib radiosensitises RAS- and BRAF mutated melanoma by perturbing cell cycle and inducing senescence. *Radiother Oncol*. 2015 Nov;117(2):364-75.
83. Zhou Y, Lin S, Tseng K, Han K, Wang Y, Gan Q, Min D, Hu H. Selumetinib suppresses cell proliferation, migration and trigger apoptosis, G1 arrest in triple-negative breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2016 Oct 21;16(1):818.
84. Dibble C, Cantley L. Regulation of mTORC1 by signaling. *Trends Cell Biol*. 2015 Sep; 25(9): 545–555.
85. Huang K, Fingar D. Growing knowledge of the mTOR signaling network. *Semin Cell Dev Biol*. 2014 December ; 0: 79–90.
86. Chaib I, Karachaliou N, Pilotto S, Dodony J, Li X, Drozdowskyj A, Servat C et al. Co-activation of STAT3 and YES-Associated Protein 1 (YAP1) Pathway in EGFR-Mutant NSCLC. *J Natl Cancer Inst*. 2017 Sep 1;109(9).
87. Watanabe M, Sowa Y, Yogosawa M, Sakai T. Novel MEK inhibitor trametinib and other retinoblastoma gene (RB)-reactivating agents enhance efficacy of 5-fluorouracil on human colon cancer cells. *Cancer Sci*. 2013 Jun;104(6):687-93.
88. Infante JR, Fecher LA, Falchook G, Nallapareddy S, Gordon M, Becerra C et al. Safety, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy data for the oral MEK inhibitor trametinib: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol*. 2012 Aug;13(8):773-81.
89. Chua K, Kong L, Sim W, Chun NG H, Ong W, Thiery J et al. Combinatorial treatment using targeted MEK and Src inhibitors synergistically abrogates tumor cell growth and induces mesenchymal-epithelial transition in non-small-cell lung carcinoma. *Oncotarget*, 2015 Aug; 13(30): 29991-30005.
90. Legrier ME, Yang CP, Yan HG, Lopez-Barcons L, Keller SM, Perez-Soler R, Horwitz SB, McDaid HM. Targeting protein translation in human non small cell lung cancer via combined MEK and mammalian target of rapamycin suppression. *Cancer research*. 2007; 67:11300–11308.

91. Sos ML, Fischer S, Ullrich R, Peifer M, Heuckmann JM, Koker M, et al. Identifying genotype-dependent efficacy of single and combined PI3K- and MAPK-pathway inhibition in cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106:18351–18356.
92. Uekita T, Jia , Narisawa-Saito. M, Yokota J, Kiyono T, Sakai R. CUB Domain-containing protein 1 is a novel regulator of anoikis resistance in lung adenocarcinoma. *Molecular and cellular biology*, 2007 nov;27(21), 7649-7660.
93. Liu H, Ong, S, Badu-NKansah, Schindeler, White F, Hynes R. CUB-domain-containing protein 1 (CDCP1) activates Src to promote melanoma metastasis. *PNAS*, 2011, Jan;108(4) 379-1384.
94. ZhouJ, Qu Z, Yan S, Sun F, Whitsett J, Shapiro S, Xiao G. Differential roles of STAT3 in the initiation and growth of lung cancer. *Oncogene* 2015 July; 34(29): 3804-3814.
95. Grabner B, Schramek D, Mueller K, Moll H, Svinka J, Hoffman T, et al. Disruption of STAT3 signalling promotes KRAS induced lung tumorigenesis. *Nature communications* 2015 mar. DOI:10.1038/ncomms7285.
96. Ikeda J, Oda T, Inoue M, Uekita T, Sakai R, Okumura et al. Expression of CUB domain containing protein (CDCP1) is correlated with prognosis and survival of patients with adenocarcinoma of lung. *Cancer Si* 2009 March; 100(3): 429-433.
97. Song L, Rawal B, Nemeth J, Haura E. Jak1 activaes STAT3 acrivity in non-small-cell lung cancer cells and IL-6 neutralizing antibodies can suppress JAK1-STAT3 signaling. *Mol Cancer Ther*, 2011 Mar; 10(3):481-494.
98. Li, Peng; Silvis, Mark R; Honaker, Yuchi; Lien, Wen-Hui; Arron, Sarah T; Vasioukhin, Valeri. α E-catenin inhibits a Src-YAP1 oncogenic module that couples tyrosine kinases and the effector of Hippo signaling pathway. *Genes Dev*, 2016 Apr; 30(7): 798-811.
99. Kim N, Gumbiner. *Adhesion to fibronectin regulates Hippo signaling via the FAK-Srk-Pi3K pathway*. *JCB*, 2015 July;210(3):503-515.

100. Yuan Si, Xinyan Ji, Xiaolei Cao, Xiaoming Dai, Lingyi Xu, Hongxia Zhao et al. Src inhibits the Hippo tumor suppressor pathway through tyrosine phosphorylation of Lats1. *Cancer Res*, sept 2017; 77(18); 4868-4880.
101. Weng M, Tsao P, Lin H, Tung C, Change M, Chang Y, et al. (2015) Hes1 Increases the Invasion Ability of Colorectal Cancer Cells via the STAT3-MMP14 Pathway. *PlosOne* 10(12):e0144322. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144322>
102. Lee JH, Suk J, Park J, Kim SB, Kwak SS, Kim JW, et al. Notch signal activates hypoxia pathway through HES1-dependent SRC/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Mol Cancer Res*. 2009 Oct;7(10):1663-71.
103. Gu Y, Lin S, Li JL, Nakagawa H, Chen Z, Jin B, et al. Altered LKB1/CREB-regulated transcription co-activator (CRTC) signaling axis promotes esophageal cancer cell migration and invasion. *Oncogene*. 2012 Jan 26;31(4):469-79.
104. Byers LA1, Sen B, Saigal B, Diao L, Wang J, Nanjundan M et al. Reciprocal regulation of c-Src and STAT3 in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Nov 15;15(22):6852-61.
105. Lue HW, Cole B, Rao SA, Podolak J, Van Gaest A, King C et al. Src and STAT3 inhibitors synergize to promote tumor inhibition in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015 Dec 29;6(42):44675-87.
106. Blair W. Benham-Pyle, Beth L. Pruitt, and W. James Nelson. Mechanical strain induces E-cadherin-dependent Yap1 and β -catenin activation to drive cell cycle entry. *Science*. 2015 May 29; 348(6238): 1024–1027.
107. Benes CH, Poulgiannis G, Cantley LC, Soltoff SP. The SRC associated protein CUB Domain containing protein 1 regulates adhesion and motility. *Oncogene* 2012 february 2;31 (5):653-663.
108. Uekita T, Fujii S, Miyazawa Y, Hashiguchi A, Abe H, Sakamoto M. Sakai R. Suppression of autophagy by CUB domain-containing protein 1 signaling is essential for anchorage-independent survival of lung cancer cells. *Cancer Sci*. 2013 Jul;104(7):865-70

109. Lung L, Bivona T. The Hippo effector YAP regulates the response of cancer cells to MAPK pathway inhibitors. *Mol cell Oncol* 2016 Jan; 3(1):e 1021441-1.
110. Hong X, Nguyen H T, Chen Q, Zhang R, Hagman Z, Voorhoeve P, Cohen S. Opposing activities of the Ras and Hippo pathways converge on regulation of YAP protein turnover. *EMBO journal* November 2014; 33(21): 2447-2457.
111. Lee S, Lee J, Lee M, Ryu M, Kim Y, Choi M, et al. RAF kinase inhibitor-independent constitutive activation of Yes-associated protein 1 promotes tumor progression in thyroid cancer. *Oncogenesis* (2013)2,e55; doi:10.1038/oncsis.2013.12.
112. Lin L, Sabnis A, Chan E, Olivas V, Cade L, Pazarentzos E, et al. The Hippo effector YAP promotes resistance to RAF- and MEK- targeted cancer therapies. *Nat Genet.* 2015 March; 47(3): 250–256.
113. Nussinov R, Tsai CJ, Jang H, Korcsmáros T, Csermely P. Oncogenic KRAS signaling and YAP1/ β -catenin: Similar cell cycle control in tumor initiation. *Semin Cell Dev Biol.* 2016 Oct;58:79-85.
114. Dai B, Meng J, Peyton M, Girard L, Bornmann W, Ji L, Minna J, Fang B, Roth J. STAT3 Mediates Resistance to MEK Inhibitor through. MicroRNA miR-17. *Cancer Res.* 2011 May 15;71(10):3658-68.
115. Purnell P, Mack P, Tepper C, Evans C, Green T, Gumerlock P et al. The Src inhibitor AZD0530 blocks invasion and may act as a radiosensitizer in lung cancer cells. *J Thorac Oncol.* 2009 April ; 4(4): 448–454.
116. Zhang W, Gao Y, Li F, Tong X, Ren Y, Han X et al. YAP promotes malignant progression of Lkb1-deficient lung adenocarcinoma through downstream regulation of surviving. *Cancer Res.* 2015 Nov 1;75(21):4450-7.
117. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, Domine M, Clingan P et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018 May 31;378(22):2078-2092

