

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA**



# **Determinación del papel de FGFR1 y FGFR4 en cáncer de pulmón**

**Trabajo presentado para optar al grado de Doctor de**

**Álvaro Quintanal Villalonga**

**Sevilla 2017**



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

# Determinación del papel de FGFR1 y FGFR4 en cáncer de pulmón

Álvaro Quintanal Villalonga, Licenciado en biotecnología

Directores: Luis Paz-ares Rodríguez,  
Irene Ferrer Sánchez y Sonia Molina Pinelo  
Tutor: Rafael Fernández Chacón

Instituto de Investigación 12 de Octubre, Centro Nacional de Investigaciones  
Oncológicas (CNIO), Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)



# **Determinación del papel de FGFR1 y FGFR4 en cáncer de pulmón**

El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en el Laboratorio de Investigación en Oncología Clínico-Translacional del Instituto de Investigación 12 de Octubre y en la Unidad Clínica de Investigación en Cáncer de Pulmón del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), así como en el Laboratorio de Oncología Molecular y Nuevas Terapias del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), bajo la dirección del Dr. Luis Paz-Ares Rodríguez, de la Dra. Irene Ferrer Sánchez, y de la Dra. Sonia Molina Pinelo.

Ha sido realizado con una beca Predoctoral de Formación de Investigación en Salud (PFIS) del Instituto de Salud Carlos III (FI12/00429).

El doctorando,

**Álvaro Quintanal Villalonga**

Los Directores,

**Dr. Luis Paz-Ares Rodríguez**

**Dra. Irene Ferrer Sánchez**

**Dra. Sonia Molina Pinelo**



## AGRADECIMIENTOS

En estos años de realización de la presente tesis, llenos de trabajo y sacrificios, han estado a mi lado un gran número de personas cuya ayuda y apoyo, de muchas maneras diferentes y a muchos niveles, han hecho posible que haya completado esta etapa de mi carrera. A todos ellos quiero agradecerles todo lo que me han dado.

A mi director (y compañero), Luis, por darme esta oportunidad y por proporcionarme un laboratorio y un entorno con grandes posibilidades para desarrollar mi trabajo, en unas condiciones que muchas personas en mi situación desearían; por enseñarme a tener una perspectiva translacional, por compartir su visión del mundo de la ciencia conmigo, y por darme valiosos consejos.

A mis co-directoras, Sonia e Irene, por enseñarme en el día a día y estar a mi lado. Por dejarme aprender de ellas un montón de cosas que determinarán mi manera de ser a lo largo de mi carrera profesional; y por escuchar mis aportaciones, haciéndome sentir valorado, y listo para echar a volar.

A Amancio, por todas las horas que me ha dedicado, por todos sus consejos que han sido determinantes para definir mi forma de investigar y mi capacidad crítica. Por sus aportaciones, que han sido clave en el desarrollo de esta tesis, tanto a nivel científico como personal. Y sobre todo por estar siempre ahí sin tener por qué.

Al Dr. Chacón por aceptar ser mi tutor y facilitarme todo este proceso.

A Mariló, por estar conmigo, dirigirme y apoyarme en los primeros pasos en el laboratorio.

A mis compañeras pre-doctorales, Laura y Ángela, por compartir conmigo tantos momentos y hacerme sentir que no estaba solo en el camino. Los experimentos que no se reproducen son menos duros si se sufren entre tres.

A mis compañeros desde el principio en el laboratorio de Sevilla, Ricardo, Ana y Rocío, que tanto me han enseñado desde el primer día y que tanta paciencia han tenido conmigo

A Clara y Raquel, porque su llegada marcó un antes y un después en el laboratorio para mí. Gracias a Clara por todo lo que me ha enseñado, por su cariño y su serenidad. A Raquel por su apoyo constante en los momentos más duros en el

laboratorio, por compartir conmigo su experiencia y por todas esas largas charlas de consejos y risas.

A todos mis compañeros de los laboratorios 214 y 216 del IBiS, y en especial a Sandra, por enseñarme tantas cosas, y a Antonio por esas charlas de ciencia tan estimulantes.

A Santi y a Jon por su ayuda y su asesoramiento que han mejorado mi trabajo, y a la Dra. Ana Belén Enguita por sus importantes aportaciones.

A los técnicos de Servicios del IBiS, y en especial a Meriyoun, por su apoyo técnico y su ayuda.

A mis compañeras del CNIO en Madrid por todo lo que me habéis ayudado, y en especial a Clara por ayudarme a dar los primeros pasos en el CNIO, a Lucía por su apoyo en los malos momentos, y a Patri por poner siempre un punto de madurez y cordura, a pesar de ser la más pequeña.

A todos mis compañeros nuevos del 12 de Octubre, y en especial a Eva por comprenderme bien y por todos sus consejos.

A los técnicos del servicio de animalario, histopatología, y en especial a los de microscopía por su ayuda, consejos y apoyo.

A Valle, por todos los consejos, ayuda y cariño que me ha dado, por su generosidad sin apenas conocerme, que tanto me está ayudando en estos últimos meses de la tesis.

A todos mis amigos de siempre, por escuchar mis desahogos de los problemas de la tesis, intentar entenderme y apoyarme, aún sin saber muy bien a qué me dedico. Y en especial a Pilar, por aportarme su visión optimista de la vida y su fuerza siempre, y por estar siempre a mi lado.

A todos mis amigos nuevos de Madrid, que han hecho que estos últimos años hayan sido menos duros y que han estado a mi lado, y en especial a David y a Dani.

Y por supuesto a mi familia, mis tíos y mis primos, por estar siempre a mi lado y darme tanto. Y en especial a mi Madre, por dárme todo siempre y facilitarme tanto la vida, quitándome muchos problemas de encima para que solo tuviera que preocuparme de mis “bichitos”.





## RESUMEN

El cáncer de pulmón representa uno de los tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad. Su caracterización molecular ha permitido identificar alteraciones moleculares conductoras de esta patología, algunas de las cuales son abordables terapéuticamente. Éste es el caso de FGFR1 y FGFR4, cuya amplificación o sobreexpresión ha demostrado estar asociada a este tipo de tumores y correlacionada con un peor pronóstico de los pacientes afectados. Se han desarrollado diferentes inhibidores dirigidos frente a los FGFRs, actualmente en ensayos clínicos en diferentes tipos tumorales, incluido el de pulmón. Sin embargo, a pesar de los prometedores resultados obtenidos con estos inhibidores en estudios preclínicos, su eficacia a nivel clínico ha sido más que modesta. La causa de esto se ha atribuido a la ausencia de criterios de selección de pacientes apropiados para recibir este tipo de terapia. Por todo esto, el objetivo de este trabajo de tesis es la elucidación del papel de ambos FGFRs en la tumorigénesis pulmonar y de sus implicaciones clínicas, así como la determinación de factores predictivos de respuesta a sus inhibidores.

A lo largo del presente trabajo, mediante la realización de técnicas experimentales *in vitro*, *in vivo* y de análisis de muestras tumorales de cohortes de pacientes con cáncer de pulmón, describiremos el papel de FGFR1 y FGFR4 en la biología del cáncer de pulmón dependiente del contexto molecular. La expresión de cualquiera de estos receptores provoca efectos pro-tumorigénicos en dos contextos diferentes. Por un lado, en modelos con sobreactivación de EGFR, ambos FGFRs interaccionan físicamente con EGFR, produciéndose una activación recíproca de ambos tipos de receptores y de las rutas de señalización oncogénicas canónicas de éstos. En línea con estos resultados, los tratamientos combinados con inhibidores de EGFR y FGFR presentan gran eficacia en modelos de xenoinjertos de tumores derivados de pacientes con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4 y activación de EGFR. Además, el análisis de una cohorte de pacientes tratados con inhibidores de EGFR en monoterapia señala que los pacientes con tumores con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4 presentan peor respuesta al tratamiento.

Por otro lado, en modelos con sobreexpresión de N-cadherina, esta molécula de adhesión interacciona con ambos receptores provocando su activación y la de su

señalización oncogénica. De acuerdo a esto, el tratamiento con inhibidores de FGFR es efectivo solo en los modelos de tumores derivados de pacientes con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4, y de N-cadherina. Además, el análisis de varias cohortes independientes de pacientes indica que la N-cadherina tiene un papel pronóstico en los pacientes afectados de tumores pulmonares con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4, correlacionando con supervivencias más acortadas.

Sin embargo, en ausencia de activación de EGFR y de expresión de N-cadherina, ambos FGFRs ejercen un efecto supresor tumoral mediante una disminución de la señalización oncogénica asociada a estos receptores.

En vista a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral, se propone que la determinación de la expresión de FGFR1 y FGFR4 no es suficiente para determinar la efectividad de los inhibidores de FGFR. La determinación complementaria de la activación de EGFR y de la expresión de N-cadherina podría ser clave para la selección de la terapia a aplicar a cada paciente.

# Índices

---



## ÍNDICE DE APARTADOS

<b>Agradecimientos</b>	<b>VII</b>
<b>Resumen</b>	<b>XI</b>
<b>Índices</b>	<b>XIII</b>
Índice de apartados	XV
Índice de figuras	XIX
Índice de tablas	XXIII
<b>Abreviaturas</b>	<b>XXV</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1. Epidemiología del cáncer de pulmón</b>	<b>3</b>
<b>2. Biología molecular del cáncer de pulmón</b>	<b>5</b>
<b>3. Receptores tirosina quinasa (RTKs)</b>	<b>10</b>
3.1. Estructura de los RTKs	10
<b>4. RTKs y cáncer: Receptores de factores de crecimiento fibroblásticos (FGFRs)</b>	<b>13</b>
4.1. Características de los FGFRs y sus ligandos	13
4.2. Señalización de los FGFRs	15
4.3. Papel de los FGFRs en cáncer	17
4.4. FGFR1 y FGFR4 en cáncer de pulmón	19
4.5. FGFRs como dianas terapéuticas	20
<b>Hipótesis</b>	<b>27</b>
<b>Objetivos</b>	<b>31</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>35</b>
<b>1. Diseño</b>	<b>37</b>
<b>2. Reactivos biológicos</b>	<b>37</b>
2.1. Vectores plasmídicos	37
2.2. Antibióticos para selección en bacterias	37
2.3. Cepas bacterianas utilizadas en la amplificación de plásmidos	38
2.4. Sondas de PCR a tiempo real	38
2.5. Anticuerpos empleados	39
2.6. Inhibidores químicos	39
<b>3. Técnicas de biología molecular</b>	<b>39</b>
3.1. Amplificación plasmídica	39
3.2. Análisis de la expresión génica a nivel de ARNm	41
3.3. Análisis de la expresión a nivel proteico	44
3.4. Extracción de ADN de líneas celulares	47
3.5. Caracterización de las mutaciones de interés clínico en EGFR	47
<b>4. Técnicas de biología celular</b>	<b>47</b>
4.1. Líneas celulares	47
4.2. Cultivo de líneas celulares	47

4.3. Conservación de las líneas celulares _____	49
4.4. Transfección celular _____	49
4.5. Ensayos subrogados de tumorigenicidad _____	51
4.6. Estimulación de las líneas celulares con factores de crecimiento _____	52
4.7. Co-inmunolocalización _____	52
4.8. Determinación de la inhibición del crecimiento de líneas celulares de fármacos en monoterapia (IC50) _____	53
4.9. Determinación de la sensibilidad a fármacos en combinación _____	54
<b>5. Técnicas de experimentación animal _____</b>	<b>54</b>
5.1. Xenoinjertos con líneas celulares en ratones inmunodeprimidos _____	54
5.2. Xenoinjertos de tumores derivados de pacientes (PDXs) _____	55
5.3. Determinación del crecimiento tumoral de los xenoinjertos _____	55
5.4. Tratamientos de xenoinjertos de líneas celulares y PDXs _____	56
<b>6. Datos clínicos: poblaciones de estudio _____</b>	<b>57</b>
6.1. Cohortes de estudio para la determinación del papel pronóstico de FGFR1 y FGFR4 ____	57
6.2. Cohorte de pacientes tratados con inhibidores de EGFR _____	59
<b>7. Análisis estadístico _____</b>	<b>61</b>
7.1. Análisis de los experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> _____	61
7.2. Análisis de las cohortes clínicas _____	61
<b>Resultados _____</b>	<b>63</b>
<b>1. Papel de FGFR1 y FGFR4 en cáncer de pulmón <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> _____</b>	<b>64</b>
1.1. Papel de FGFR1 y FGFR4 en carcinoma epidermoide de pulmón _____	64
1.1.1. Efecto de la sobreexpresión FGFR4 en líneas celulares de carcinoma epidermoide ____	64
1.1.2. Efecto del silenciamiento de FGFR1 o FGFR4 en una línea celular de carcinoma epidermoide _____	67
1.2. Papel de FGFR1 y FGFR4 en adenocarcinoma de pulmón _____	67
1.2.1. FGFR1 y FGFR4 en adenocarcinoma de pulmón no dependiente de EGFR _____	69
1.2.1.1. Efecto de la sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4 en líneas celulares de adenocarcinoma no dependientes de EGFR _____	69
1.2.1.2. Efecto del silenciamiento de FGFR1 y FGFR4 en una línea de adenocarcinoma no dependiente de EGFR _____	72
1.2.2. Papel FGFR1 y FGFR4 en adenocarcinoma de pulmón dependiente de EGFR _____	72
1.2.2.1. Efecto de la sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4 en líneas celulares de adenocarcinoma dependiente de EGFR _____	72
1.2.2.2. Efecto del silenciamiento de FGFR4 en una línea de adenocarcinoma dependiente de EGFR _____	76
1.2.2.3. Efecto de la co-expresión de EGFR nativo o mutado con FGFR1 o FGFR4 en una línea inmortalizada de pulmón _____	77
1.2.2.4. Estudio de la interacción de EGFR con FGFR1 y FGFR4 _____	81
1.2.2.5. Efecto de la cooperación de EGFR con FGFR1 y FGFR4 <i>in vivo</i> _____	82
1.3. Estudio de las causas del papel diferencial de FGFR1 y FGFR4 en adenocarcinoma no dependiente de EGFR y en carcinoma epidermoide _____	83
1.3.1. Papel de E-cadherina en el efecto supresor tumoral de FGFR1/4 _____	85
1.3.2. Papel de N-cadherina en el efecto pro-tumorogénico de FGFR1/4 _____	87

1.3.3. Estudio de la interacción de N-cadherina con FGFR1 y FGFR4 _____	89
1.3.4. EGFR y N-cadherina definen el papel pro-tumorogénico de FGFR1 y FGFR4 <i>in vitro</i> ____	91
1.3.5. EGFR y N-cadherina definen el papel pro-tumorogénico de FGFR1 y FGFR4 <i>in vivo</i> ____	93
<b>2. Abordajes terapéuticos para los tumores con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4 _____</b>	<b>96</b>
2.1. La alta expresión de N-cadherina como factor predictivo de la terapia anti-FGFR _____	96
2.1.1. N-cadherina como factor predictivo de respuesta a la terapia anti-FGFR <i>in vitro</i> _____	96
2.1.2. N-cadherina como factor predictivo de respuesta a la terapia anti-FGFR <i>in vivo</i> _____	97
2.2. Inhibición conjunta de EGFR y FGFR dirigida a pacientes de adenocarcinoma con dependencia de EGFR _____	100
2.2.1. Inhibición conjunta de EGFR y FGFR <i>in vitro</i> _____	100
2.2.2. Inhibición conjunta de EGFR y FGFR <i>in vivo</i> _____	103
<b>3. FGFR1 y FGFR4 como biomarcadores pronósticos y predictivos de respuesta a terapia anti-FGFR en cáncer de pulmón no microcítico _____</b>	<b>106</b>
3.1. FGFR1 y FGFR4 como biomarcadores pronósticos en cáncer de pulmón no microcítico _	106
3.1.1. FGFR1 y FGFR4 como biomarcadores pronósticos en adenocarcinoma y carcinoma epidermoide _____	106
3.1.2. Efecto de la expresión de N-cadherina en el papel pronóstico de FGFR1 y FGFR4 en pacientes con CPNM (Cáncer de pulmón no microcítico) _____	108
3.1.3. Validación del papel pronóstico de N-cadherina y FGFR1 ó FGFR4 en bases de datos públicas _____	111
3.2. FGFR1 y FGFR4 como biomarcadores predictivos de respuesta a la terapia anti-EGFR en adenocarcinoma de pulmón _____	114
<b>Discusión _____</b>	<b>116</b>
<b>Conclusiones _____</b>	<b>132</b>
<b>Bibliografía _____</b>	<b>136</b>
<b>ANEXO _____</b>	<b>153</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más prevalentes _____	4
Figura 2. Frecuencia de las alteraciones moleculares más relevantes descritas en adenocarcinoma de pulmón _____	6
Figura 3. Frecuencia de las alteraciones moleculares más relevantes descritas en carcinoma epidermoide de pulmón _____	9
Figura 4. Estructura y activación de los RTKs _____	12
Figura 5. Esquema de la señalización intracelular de los FGFRs _____	17
Figura 6. Determinación de la expresión de FGFR1, FGFR4, EGFR y EGFR fosforilado (pEGFR) _____	65
Figura 7. Efecto de la sobreexpresión de FGFR4 en líneas de carcinoma epidermoide ____	66
Figura 8. Efecto del silenciamiento de FGFR1 o FGFR4 en una línea de carcinoma epidermoide _____	68
Figura 9. Efecto de la sobreexpresión de FGFR1 en líneas de ADC no dependientes de EGFR _____	70
Figura 10. Efecto de la sobreexpresión de FGFR4 en líneas de ADC no dependientes de EGFR _____	71
Figura 11. Efecto del silenciamiento de FGFR1 o FGFR4 en una línea de adenocarcinoma no dependiente de EGFR _____	73
Figura 12. Efecto de la sobreexpresión de FGFR1 en líneas de adenocarcinoma dependientes de EGFR _____	74
Figura 13. Efecto de la sobreexpresión de FGFR4 en líneas de adenocarcinoma dependientes de EGFR _____	75
Figura 14. Efecto de la estimulación de líneas celulares dependientes de EGFR con sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4, con factores de crecimiento específicos de los FGFRs _____	77
Figura 15. Efecto del silenciamiento de FGFR4 en una línea de adenocarcinoma con alta activación constitutiva de EGFR _____	78
Figura 16. Efecto de la co-sobreexpresión de EGFR nativo o mutado con FGFR1 o FGFR4 en la línea inmortalizada de pulmón NL20 _____	79
Figura 17. Efecto de la co-sobreexpresión de EGFR nativo o mutado con FGFR1 o FGFR4 en la activación de rutas de señalización relacionadas con FGFR, en la línea inmortalizada de pulmón NL20 _____	81
Figura 18. Estudio de la interacción de EGFR con FGFR1 y FGFR4 _____	82
Figura 19. Efecto de FGFR1 y FGFR4 en el crecimiento tumoral de xenoinjertos generados con líneas celulares dependientes de EGFR _____	83
Figura 20. Caracterización de la expresión de E-cadherina y N-cadherina en nuestro panel de líneas celulares de pulmón _____	84
Figura 21. Efecto del silenciamiento de E-cadherina en el papel de FGFR1 y FGFR4 en la	

tumorogenicidad de una línea de adenocarcinoma (H2009) _____	86
Figura 22. Efecto de la sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4 en una línea de adenocarcinoma sin expresión endógena de E-cadherina ni N-cadherina (H460) _____	87
Figura 23. Efecto de la co-sobreexpresión de N-cadherina con FGFR1 o FGFR4 en las líneas de adenocarcinoma H2009 y H3122 _____	88
Figura 24. Efecto de la co-sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4 con N-cadherina en líneas celulares de adenocarcinoma (H2009 y H3122) _____	89
Figura 25. Interacción de N-cadherina con FGFR1 y FGFR4 _____	90
Figura 26. Efecto del silenciamiento de N-cadherina combinado con la sobreexpresión de EGFR y FGFR1 o FGFR4 en la línea inmortalizada de pulmón NL20 _____	92
Figura 27. Efecto molecular del silenciamiento de N-cadherina combinado con la sobreexpresión de EGFR y FGFR1 o FGFR4 en la línea inmortalizada de pulmón NL20 _____	93
Figura 28. Crecimiento tumoral de xenoinjertos en ratones inmunodeprimidos del panel de líneas estables generadas a partir de la línea de pulmón inmortalizada NL20 con diferentes combinaciones de expresión de N-cadherina, EGFR y FGFR1 o FGFR4 _____	95
Figura 29. Efecto sobre la proliferación celular del tratamiento <i>in vitro</i> con inhibidores selectivos de FGFR en líneas con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4 y niveles diferenciales de N-cadherina _____	97
Figura 30. Valor predictivo de la expresión de N-cadherina sobre el efecto de inhibición FGFR en PDXs de pulmón con alta expresión de FGFR1 y FGFR4 _____	99
Figura 31. Determinación de la sensibilidad al tratamiento con inhibidores frente a EGFR y FGFR en líneas celulares de adenocarcinoma no dependientes de la señalización EGFR _____	101
Figura 32. Efecto de la combinación de inhibición FGFR y EGFR <i>in vitro</i> en líneas celulares de adenocarcinoma con dependencia de señalización EGFR _____	102
Figura 33. Efecto de la combinación de erlotinib y AZD4547 en xenoinjertos de líneas celulares con diferentes mutaciones activadoras de EGFR: H1975 (L858R y T790M) y HCC827 (Delección exón 19) _____	104
Figura 34. Efecto de la combinación de erlotinib y AZD4547 en modelos PDX de adenocarcinoma de pulmón con alta activación de EGFR (nativo o mutado) y con alta expresión de FGFR1 _____	105
Figura 35. Asociación de la expresión de ARNm de FGFR1 y FGFR4 con la supervivencia, separando por histologías, en una cohorte de pacientes de CPNM (N=109) _____	107
Figura 36. Relación de la expresión de ARNm de N-cadherina con la histología en nuestra cohorte de pacientes de CPNM (N=104) y en la cohorte de cáncer de pulmón no microcítico (N=1219) _____	108
Figura 37. Asociación de la expresión de ARNm de N-cadherina y de FGFR1 o FGFR4 con la supervivencia en toda la cohorte de pacientes de CPNM (N=109) _____	110
Figura 38. Asociación de la expresión de ARNm de N-cadherina con la supervivencia en el subconjunto de pacientes de nuestra cohorte de CPNM (N=109) con alta expresión de FGFR1, FGFR4 o de ambos _____	111

Figura 39. Asociación de la expresión de ARNm de FGFR1, FGFR4 y N-cadherina con la supervivencia en una cohortes públicas de pacientes de adenocarcinoma de TCGA (N=522) _____	112
Figura 40. Asociación de la expresión de ARNm de FGFR1, FGFR4 y N-cadherina con la supervivencia en una cohorte pública de pacientes de carcinoma epidermoide de TCGA (N=504) _____	113
Figura 41. Efecto de la expresión de FGFR1 y FGFR4 en la respuesta a terapia anti-EGFR en una cohorte de adenocarcinoma (N=47) _____	114
Figura 42. Modelo del papel dependiente de contexto molecular de FGFR1 y FGFR4 en la tumorigénesis pulmonar _____	131

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación y características de los RTKs humanos _____	11
--------------------------------------------------------------------	----

Tabla 2. Asociación de los ligandos específicos a cada isoforma de FGFR _____	15
Tabla 3. Resumen de los ensayos clínicos recientes con fármacos anti-FGFR ____	23
Tabla 4. Plásmidos utilizados a lo largo del trabajo de tesis _____	38
Tabla 5. Sondas usadas para la determinación de la expresión de ARNm de genes de interés _____	39
Tabla 6. Anticuerpos usados para determinar la expresión proteica de las proteínas de interés _____	40
Tabla 7. Protocolo de temperaturas de la retrotranscripción de ARN _____	42
Tabla 8. Protocolo de termociclación de preamplificación de ADNc _____	43
Tabla 9. Protocolo de termociclación de la reacción de PCR a tiempo real _____	43
Tabla 10. Panel de líneas celulares de pulmón _____	48
Tabla 11 .Concentraciones de antibióticos empleadas para la selección de células transfectantes en este proyecto de tesis _____	50
Tabla 12. Características clínicas de la cohorte de cáncer de pulmón no microcítico de estadio temprano _____	58
Tabla 13. Características clínicas de las cohortes de adenocarcinoma y carcinoma epidermoide del TCGA (The Cancer Genome Atlas) _____	59
Tabla 14. Características clínicas de la cohorte de pacientes de adenocarcinoma tratados con inhibidores de EGFR _____	60

## ABREVIATURAS

ADC      Adenocarcinoma

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosina difosfato
AKT	Quinasa de proteínas B
ALK	Quinasa de linfoma anaplásico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
BRAF	Homólogo B del oncogén viral de sarcoma murino v-Raf
CBL	Recibe su nombre de "linfoma de células B Casitas"
CDKN2A	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A
CPM	Cáncer de pulmón microcítico
CPNM	Cáncer de pulmón no microcítico
C-terminal	Extremo carboxi terminal de la proteína
DDR2	Receptor de dominio de discoidina 2
DMEM	Medio modificado fosfato de Dulbecco
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidérmico
EML4	Proteína asociada a microtúbulo de equinodermo 4
ER	Receptor de estrógenos
ESC	Carcinoma epidermoide
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FGFR	Receptor de factor de crecimiento fibroblástico
FOXO	Proteína de cabeza de zorro
FRS2	Substrato de unión a FGFR 2
GDP	Guanosina difosfato
GRB2	Proteína unida a receptor de factor de crecimiento 2
GTP	Guanosina trifosfato
HER	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
HIF1 $\alpha$	Factor inducible por hipoxia alfa
IF	Inmunofluorescencia
IHQ	Inmunohistoquímica
KRAS	Homólogo al oncogén viral de sacroma de rata Kirsten
LB	Medio de cultivo de bacterias Luria-Bertani
MAPK	Quinasa de proteínas activada por mitógenos
MCL-1	Proteína de diferenciación celular de leucemia mieloide inducida
MET	Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos
MKP-3	Fosfatasa específica dual 6
mTOR	Diana en mamíferos de la rapamicina
MYC	Homólogo del oncogén viral de mielociomatosis aviar V-Myc
N-terminal	Extremo amino terminal de la proteína
NTRK	Tirosina quinasa neurotrófica
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PIK3CA	Subunidad catalítica alfa de la fosfatidilinositol-4,3-bisfosfato 3-quinasa
PIM-1	Proto-oncogén serina/treonina proteína quinasa 1
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol difosfato
PIP <sub>3</sub>	Fosfatidilinositol trifosfato
PKC	Fosfoquinasa C
PLCY	Fosfolipasa C gamma
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
RET	Recibe su nombre de "reordenado durante la transfección"
ROS1	Proto-oncogén tirosina proteína quinasa 1
RPMI	Medio del Instituto Roswell Park Memorial
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
SAB	Seroalbúmina bovina
SEF	Recibe su nombre de "expresión similar a FGF"
SFB	Suero fetal bovino
shRNA	Horquilla corta de ARN de interferencia, complementaria a ARNm
STAT	Transductor de señales de activación de la transcripción
STK11	Serina/Treonina quinasa 11
TEM	Transición epitelo-mesénquima
TKI	Inhibidor de tirosina quinasa
RTK	Receptor tirosina quinasa





# Introducción

---



## 1. Epidemiología del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón en Estados Unidos ocupa el segundo puesto en incidencia en pacientes varones, constituyendo el 14% de los casos de cáncer nuevos al año. Igualmente es el segundo en incidencia en mujeres, representando un 12% del total de casos nuevos de cáncer anuales. En este país, esta patología es la principal causa de muerte por cáncer tanto en hombres como en mujeres, representando el 25-27% de la mortalidad por esta enfermedad, y causando más de 150.000 muertes al año (**Figura 1**)<sup>1</sup>. En España se diagnostican entre 25.000 y 30.000 casos nuevos de cáncer de pulmón al año, con una mayor afectación en pacientes varones (80%) que en mujeres (20%). Además, se prevé un aumento de la incidencia en ambos sexos en los próximos años, con hasta 35.000 casos nuevos esperados para 2025, y más de 40.000 nuevos casos en 2035<sup>2-4</sup>.

Muchos de los factores de riesgo asociados al cáncer de pulmón están relacionados con los hábitos de vida. Entre éstos, el hábito tabáquico es el más importante, debido a la presencia de más de 50 carcinógenos en el humo del tabaco<sup>5</sup>. Se ha demostrado que fumar aumenta entre 10 y 20 veces el riesgo de sufrir cáncer de pulmón, y que este riesgo aumenta proporcionalmente con la cantidad de tabaco consumida<sup>6</sup>. Además, este hábito promueve el desarrollo de otras enfermedades tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), que se caracteriza por la obstrucción inflamatoria de las vías aéreas y que está directamente asociada a su vez al desarrollo de los tumores pulmonares<sup>7,8</sup>. Igualmente, una dieta inadecuada y la obesidad pueden favorecer la aparición del cáncer pulmonar<sup>9,10</sup>. El resto de factores de riesgo está asociado a la exposición a carcinógenos ambientales<sup>11,12</sup>, o al contacto profesional con carcinógenos tales como el asbestos, un material frecuentemente empleado en construcción durante décadas, o el radón, presente en suelo y rocas de las que puede desprenderse, acumulándose hasta niveles elevados en el aire en ciertas casas y edificios, así como en fuentes de agua subterránea<sup>13,14</sup>.

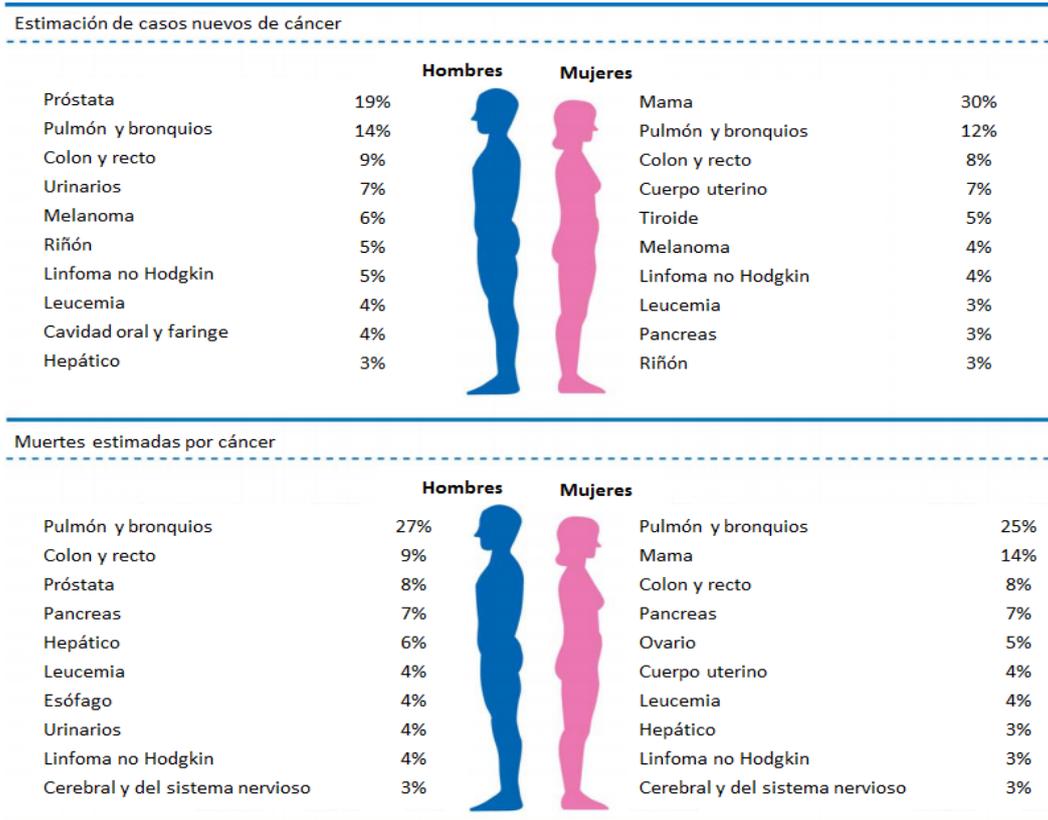


Figura 1. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más prevalentes en Estados Unidos.

Adaptada de Siegel y colaboradores<sup>1</sup>

El cáncer de pulmón es una enfermedad compleja que puede ser dividida en dos grandes grupos atendiendo a su histología: cáncer de pulmón microcítico (CPM) y cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), que representan el 15% y el 85% de los carcinomas de pulmón, respectivamente<sup>15</sup>. El CPNM puede ser clasificado a su vez en adenocarcinoma, carcinoma epidermoide y carcinoma de células grandes, que representan el 50%, 35% y 15% de los casos de CPNM, respectivamente.

En relación a su pronóstico, solo un pequeño subgrupo de pacientes de en torno al 15-20% presentan tumores en estadios tempranos al momento del diagnóstico, y son subsidiarios de tratamiento con cirugía radical potencialmente curativa. La mayor parte de los pacientes con cáncer pulmonar son diagnosticados en estadios avanzados, de forma que la supervivencia a los 5 años tras el diagnóstico de todos los pacientes es de sólo el 18%<sup>6</sup>. En los últimos años los avances en los tratamientos solo han mejorado modestamente la

supervivencia a largo plazo <sup>16</sup>, por lo que la identificación de nuevas estrategias terapéuticas eficaces resulta esencial.

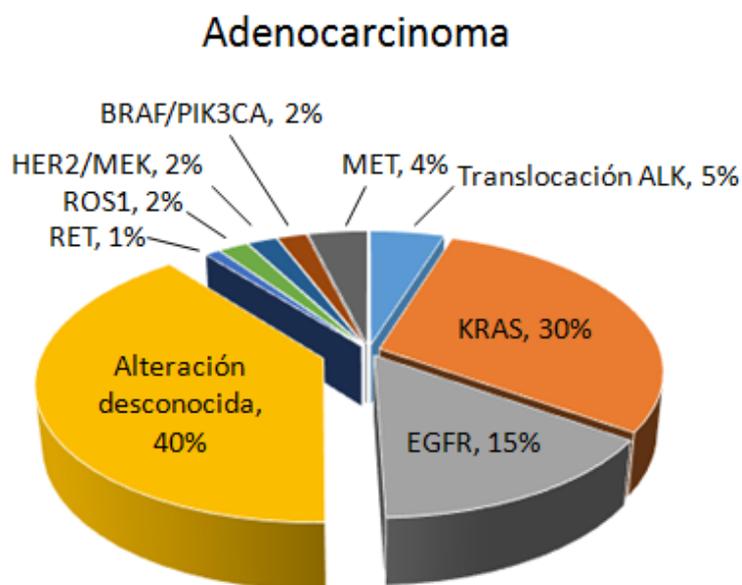
## 2. Biología Molecular del Cáncer de pulmón

Desde el punto de vista molecular, el cáncer de pulmón es una enfermedad muy heterogénea <sup>17</sup>. En los últimos años se han identificado alteraciones moleculares esenciales para el desarrollo de este tipo de tumores gracias al avance de las tecnologías de secuenciación y al análisis de datos masivos, que han permitido la caracterización genética y molecular de amplias cohortes de pacientes. En el contexto del cáncer de pulmón, las alteraciones que cobran más importancia ocurren a nivel genómico <sup>18-20</sup>. Se han descrito alteraciones en genes cuyo papel en esta patología han sido validados a nivel funcional, designando su papel en la tumorigénesis como oncogenes o supresores tumorales.

En el caso del adenocarcinoma pulmonar (**Figura 2**), algunas de las alteraciones genéticas más frecuentes son las mutaciones inactivadoras en el gen supresor tumoral TP53, presentes en entre el 40 y 50% de los pacientes, o en el gen STK11, en un 10-20% de los tumores pertenecientes a este tipo histológico. También se han detectado alteraciones en genes implicados en rutas de señalización oncogénica que han demostrado tener relevancia a nivel terapéutico, como las mutaciones en KRAS o en el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), o las translocaciones del receptor ALK, que se detectan en el 20-30%, 15% y en el 5% de los adenocarcinomas, respectivamente <sup>21</sup>. Otras alteraciones de baja prevalencia con potenciales implicaciones terapéuticas incluyen las translocaciones de ROS1, de RET, NTRK o las mutaciones en BRAF, MET o HER2 <sup>20,22</sup>.

La identificación de algunas de estas alteraciones ha permitido desarrollar terapias dirigidas que ya hoy se aplican en la práctica clínica y que han mejorado notablemente la esperanza de vida de algunos pacientes afectados de tumores con anomalías moleculares determinadas. Uno de los ejemplos más destacados es el

descubrimiento de mutaciones activadoras de EGFR. Este receptor forma parte de una familia de 4 receptores tirosina quinasa (HER1-4), y está implicado en la ruta de señalización activada por el factor de crecimiento epidérmico (EGF). EGFR presenta una gran importancia en el cáncer de pulmón, especialmente en el adenocarcinoma, donde se encuentra alterado en el 10-35% de los casos, dependiendo del tipo de población, siendo menos frecuente en las poblaciones caucásicas y más prevalente en las poblaciones asiáticas, y estando asociado a pacientes con baja carga tabáquica <sup>23</sup>. Estas alteraciones en EGFR causan la activación constitutiva del receptor, y condicionan la progresión del adenocarcinoma pulmonar <sup>24</sup>. Las mutaciones activadoras más frecuentemente detectadas afectan a los exones 19 y 21, y representan el 45% y 41% de la mutaciones en este gen, respectivamente <sup>25</sup>. Entre estas mutaciones, destacan las deleciones en el exón 19 y la mutación puntual L858R en el exón 21. La presencia de estas aberraciones se utiliza como factor predictivo de respuestas a los inhibidores de EGFR, de forma que en el adenocarcinoma de pulmón ya ha sido aprobado el uso clínico de algunos inhibidores como erlotinib, afatinib y gefitinib, en primera y segunda línea en pacientes con tumores que presentan mutaciones en EGFR <sup>26-28</sup>.



**Figura 2. Frecuencia de alteraciones más relevantes descritas en adenocarcinoma de pulmón. Adaptado de Chan y colaboradores <sup>29</sup>**

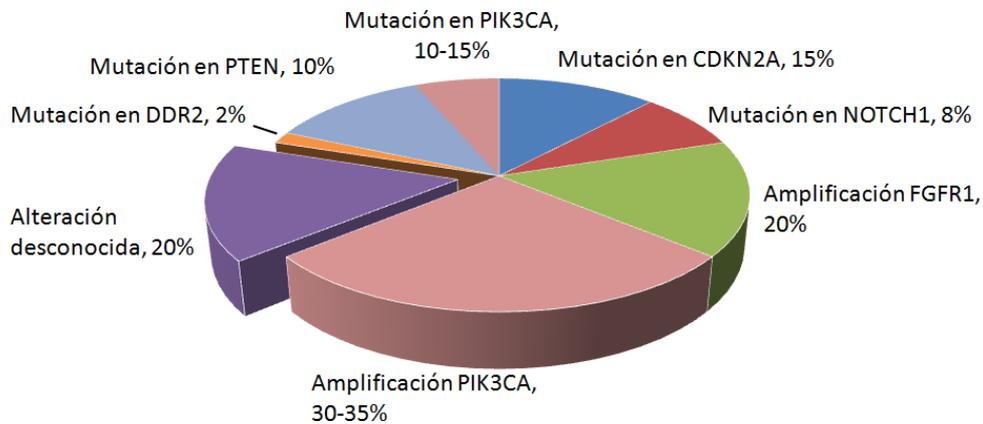
El principal problema de estas terapias lo representa la emergencia de fenómenos de resistencia, que pueden ser intrínsecos al tumor previo al inicio del tratamiento (resistencia primaria) o aparecer bajo la presión selectiva del inhibidor (resistencia adquirida). La resistencia primaria ocurre en el 10-25% de los pacientes que muestran condiciones teóricas predictivas de sensibilidad a terapia anti-EGFR<sup>30,31</sup>. Esta resistencia primaria se asocia en algunos casos a inserciones en el exón 20 del gen, pero en otros muchos casos la razón de esta resistencia es desconocida<sup>32</sup>. Por otro lado, la causa más frecuente de la aparición de resistencia adquirida a los tratamientos anti-EGFR de primera y segunda generación (tales como erlotinib, gefitinib o afatinib), detectada en el 50% de los casos, es la mutación T790M situada en el exón 20 del gen<sup>33</sup>. Para tratar los tumores que presentan la mutación secundaria mencionada se han desarrollado inhibidores de EGFR de tercera generación activos contra esta variante de EGFR. Muchos de éstos se encuentran actualmente en ensayos clínicos<sup>34-39</sup>, y recientemente se ha aprobado el uso clínico de uno de ellos, Osimertinib, para el tratamiento de tumores con la mutación de resistencia. Igualmente, se ha descrito que la causa de algunos casos de resistencia adquirida a la inhibición de EGFR es la activación de otras vías oncogénicas, mediada por la amplificación de otros receptores tirosina quinasa, como MET o HER2; por la ocurrencia de mutaciones en otras proteínas que reactivan la señalización pro-oncogénica, como PIK3CA, KRAS o BRAF; a través de la adquisición de translocaciones del gen ALK<sup>40-42</sup>; o mediante la inducción de la expresión de receptores tirosina quinasa o de sus factores de crecimiento afines, como es el caso de FGFR1 y de su ligando FGF2<sup>43-45</sup>. Otro mecanismo de resistencia a estas terapias viene mediado por la adquisición de un fenotipo mesenquimal a través del fenómeno de transición epitelio mesénquima (TEM), que puede incluso suponer un cambio de histología, de cáncer pulmonar no microcítico a microcítico<sup>46,47</sup>.

Otro de los ejemplos más notables de tratamientos dirigidos en adenocarcinoma pulmonar es el desarrollo de inhibidores frente a ALK (quinasa de linfoma anaplástico). Este gen es susceptible de sufrir un reordenamiento

génico con diferentes genes y en diferentes puntos del gen, generando así distintas variantes de esta proteína de fusión. Estas proteínas aberrantes, en las que la actividad tirosina quinasa de ALK se encuentra activada de forma constitutiva, han demostrado ser conductoras del desarrollo tumoral de algunos pacientes de adenocarcinoma, y ya existen fármacos dirigidos frente a estas proteínas de fusión, tales como crizotinib, aprobados para su uso en CPNM localmente avanzado y metastásico <sup>48,49</sup>. Al igual que en el caso de los tratamientos dirigidos frente a EGFR, en los tumores tratados con terapias anti-ALK también se generan resistencias tras varios meses de tratamiento <sup>50</sup>. Los mecanismos de resistencia a crizotinib más frecuentes descritos son las mutaciones que reducen la afinidad del receptor por el inhibidor y la amplificación del gen del receptor <sup>51</sup>. Para combatir estas resistencias, se han desarrollado inhibidores de segunda generación, como ceritinib y alectinib, cuyo uso en clínica ha sido también recientemente aprobado.

En cuanto al carcinoma epidermoide, se han identificado también numerosas alteraciones moleculares de relevancia (**Figura 3**). En este contexto, son frecuentes las mutaciones en genes supresores tumorales como TP53, que ocurren en hasta el 80% de los casos. Igualmente, se encuentran con alta frecuencia mutaciones en genes relacionados con diferentes vías de señalización oncogénicas, tales como CDKN2A o NOTCH1, en el 15 y 8% de los casos, respectivamente, o en el gen de PI3KCA, que se encuentra frecuentemente amplificado o mutado, en el 30-35 y 10-15% de los casos, respectivamente. En cuanto a las alteraciones genéticas cuya relevancia terapéutica potencial ha generado más interés, destaca la amplificación del gen FGFR1, presente en hasta el 20% de los casos <sup>52,53</sup>. Otras alteraciones moleculares cuyo abordaje terapéutico ha ganado interés recientemente en este tipo de tumores son las mutaciones en DDR2, presentes en el 2% de los casos, así como en PTEN, mutado en el 10% de los casos. Sin embargo, los hallazgos moleculares en esta histología no han dado lugar a terapias dirigidas eficaces utilizables en la clínica oncológica estándar hasta el momento <sup>54</sup>.

## Carcinoma escamoso



**Figura 3. Frecuencia de alteraciones más relevantes descritas en carcinoma epidermoide de pulmón.** Adaptado de Chan y colaboradores <sup>29</sup>

A pesar del éxito clínico obtenido en los pacientes susceptibles de ser tratados con terapias dirigidas, el 50% de los CPNMs no presentan mutaciones abordables terapéuticamente y en aquéllos que sí las presentan la aparición de resistencia es universal. En los últimos años ha cobrado fuerza una aproximación terapéutica alternativa en diferentes tipos de tumores, entre los que destaca el cáncer de pulmón. Ésta es la inmunoterapia, que trata de inhibir la capacidad de algunos tumores de evadir al sistema inmune. En este campo, destacan dianas como los receptores PD-1 y su ligando PD-L1, cuya señal inhibe la respuesta inmune que genera un tumor, evitando así su destrucción citotóxica. Se ha descrito que un amplio porcentaje de tumores de CPNM muestran una expresión aumentada de PD-L1 <sup>55,56</sup>, que se asocia con un mal pronóstico <sup>57,58</sup>. Estos tumores representan el subgrupo que mayor beneficio obtiene de los tratamientos anti-PD-1/PD-L1 <sup>59,60</sup>. De interés, este tipo de terapias presenta asimismo una mayor eficacia en tumores con una carga mutacional alta <sup>58</sup>. Sin embargo, el beneficio de este tipo de terapia es limitado en aquellos tumores con alguna alteración molecular conductora definida, como en el caso de aquéllos que presentan mutaciones en EGFR, asociadas a un bajo número de aberraciones genéticas acompañantes <sup>60</sup>. En la actualidad, se están estudiando

estrategias terapéuticas combinadas de inmunoterapia y fármacos dirigidos, que se espera mejoren los resultados en subgrupos específicos de pacientes.

### 3. Receptores tirosina quinasa (RTKs)

En los organismos pluricelulares, la comunicación intercelular se realiza a través de la recepción, integración y respuesta a señales provenientes del exterior celular. Estas funciones se llevan a cabo mediante un sistema integrado por proteínas que sirven de receptores de estas señales y por moléculas efectoras que actúan como mensajeros. Entre éstas, se encuentran los receptores tirosina quinasa (RTKs), que han demostrado tener gran relevancia en el desarrollo del cáncer actuando como oncogenes en muchos contextos, y sirviendo como potenciales dianas terapéuticas.

#### 3.1. Estructura de los RTKs

En condiciones fisiológicas, la activación de los receptores tirosina quinasa depende de la unión a sus ligandos, los factores de crecimiento. Éstos se unen al dominio extracelular del receptor de forma reversible y estabilizan la dimerización de dos moléculas de receptor, que se fosforilan recíprocamente, transactivándose. Una vez activos, los receptores son capaces de fosforilar otras moléculas de su cascada de señalización que serán las efectoras de la respuesta a la señal inicial. Para realizar esta función, los receptores presentan una estructura conservada, integrada por un dominio extracelular (N-terminal), un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático (C-terminal). De acuerdo a sus características estructurales, los RTKs se clasifican en diferentes familias, cada una de las cuales contiene diferentes miembros (**Tabla 1**).

La unión a los ligandos se produce en el extremo N-terminal de la proteína, donde residen regiones que los reconocen con mayor o menor especificidad. Estas regiones se componen de estructuras similares a la de la inmunoglobulina, de regiones ricas en residuos de lisina, leucina y cisteína, o de

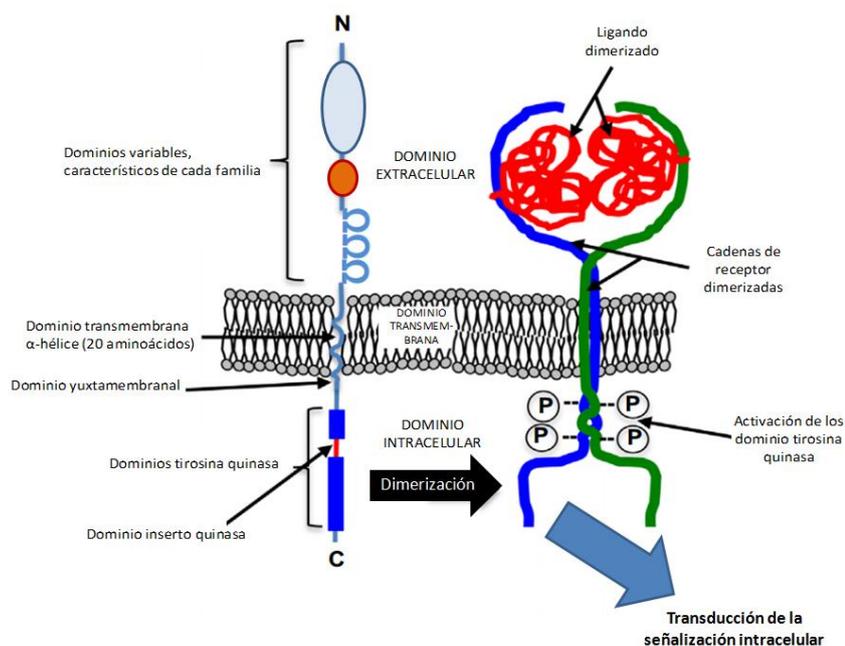
estructuras de fibronectina tipo III, entre otras, dependiendo de la clase de receptor (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Clasificación y características de los RTKs humanos. Adaptada de Segaliny y colaboradores** <sup>61</sup>

Clase	Nombre de la familia	Miembros	Dominios característicos
I	EGFR	EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4	Dos dominios ricos en cisteína
II	Insulina R	INSR, IGFR	Dos cadenas alfa y beta, con un dominio rico en cisteína y 2 dominios FNIII
III	PDGFR	PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , M-CSGR, KIT, FLT3L	5 dominios similares a inmunoglobulina
IV	VEGFR	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3	7 dominios similares a inmunoglobulina
V	FGFR	FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4	3 dominios similares a inmunoglobulina
VI	CCK	CCK4	7 dominios similares a inmunoglobulina
VII	NGFR	TRKA, TRKB, TRKC	2 dominios similares a inmunoglobulina y dominios ricos en leucina
VIII	HGFR	MET, RON	Una cadena transmembrana $\alpha$ unida a una cadena $\alpha$ extracelular
IX	EPHR	EPHA1-6, EPHB1-6	Un dominio similar a inmunoglobulina, un dominio rico en cisteína y dos dominios similares a FNIII
X	AXL	AXL, MER, TYRO3	Dos dominios similares a inmunoglobulina y dos dominios similares a FNIII
XI	TIE	TIE, TEK	2 dominios similares a inmunoglobulina, un dominio EGF y tres dominios similares a FNIII
XII	RYK	RYK	Una cadena transmembrana $\beta$ unida a una cadena $\alpha$ extracelular
XIII	DDR	DDR1, DDR2	Un dominio similar a discoidina
XIV	RET	RET	Un dominio similar a cadherina
XV	ROS	ROS	Seis dominios similares a FNIII
XVI	LTK	LTK, ALK	Un dominio rico en cisteína
XVII	ROR	ROR1, ROR2	Un dominio de inmunoglobulina, un dominio rico en cisteína y un dominio similar a kringle
XVIII	MUSK	MUSK	Cuatro dominios similares a inmunoglobulina y un dominio rico en cisteína
XIX	LMR	AATYK1, AATYK2, AATYK3	Un dominio extracelular corto
XX	Indeterminado	RTK106	Una cadena corta de receptor con un dominio extracelular corto

EGFR: Receptor de factor de crecimiento epidérmico; InSR: Receptor de insulina; PDGFR: Receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas; VEGFR: Receptor de factor de crecimiento endotelial vascular; FGFR: Receptor de factor de crecimiento fibroblástico; CCK: Quinasa de carcinoma de colon; NGFR: Receptor de factor de crecimiento de nervios; HGFR: Receptor de factor de crecimiento de hepatocitos; EphR: Receptor de efrina; Axl: del griego "anex-elektó", que significa "descontrolado"; Tyro3: Proteína tirosina quinasa; TIE: Receptor tirosina quinasa en células endoteliales; RYK: Receptor relacionado con tirosinas quinasa; DDR: Receptor con dominios de discoidina; Ret: Reorganizado durante la transfección; ROS: Receptor tirosina quinasa expresado en algunas células epiteliales; LTK: Tirosina quinasa de leucocitos; ROR: Receptor huérfano; MuSK: Quinasa específica de músculo; LMR: Lemur; Ig: Inmunoglobulina; FN: Fibronectina

Estas estructuras determinan la afinidad del receptor por uno u otro ligando. Además, el extremo N-terminal se caracteriza por sufrir glicosilaciones y presentar puentes disulfuro, que intervendrán en la dimerización entre dos receptores tras su unión al ligando. El dominio transmembrana posibilita la inserción del receptor en la membrana plasmática gracias a su carácter hidrofóbico, y también participa en el proceso de dimerización, facilitando la pre-dimerización de receptores en la membrana, que facilita la interacción con el correspondiente ligando <sup>62,63</sup>. Por último, el dominio citoplasmático es donde reside la actividad catalítica del receptor y es el responsable de la transducción de la señal. Éste contiene un dominio específico con actividad tirosina quinasa, implicado en la fosforilación dependiente de ATP de residuos aminoacídicos de la otra molécula de receptor con la que dimeriza. Este dominio tirosina quinasa incluye un bucle de activación, cuya orientación va a determinar si el dominio está en una conformación activa o inactiva. La orientación de este dominio dependerá de la presencia de ATP, de forma que en presencia de esta molécula la orientación del dominio permitirá la unión a su sustrato proteico y la transferencia del grupo fosfato proveniente del ATP al residuo de tirosina correspondiente, resultando así en la transducción de la señal (**Figura 4**) <sup>64</sup>.



**Figura 4. Estructura y activación de los RTKs.** Adaptada de Segaliny y colaboradores <sup>61</sup>

#### **4. RTKs y cáncer: Receptores de factores de crecimiento fibroblásticos (FGFRs)**

Alrededor del 30% de los RTKs muestran alteraciones genéticas en diferentes tipos de cáncer <sup>65</sup>. Estas alteraciones, que incluyen amplificaciones génicas, sobreexpresión del propio receptor o de sus ligandos, translocaciones génicas y mutaciones, conllevan con frecuencia la activación del receptor y de sus vías de señalización, que ejercen efectos pro-tumorogénicos. La naturaleza estructural de los RTKs permite su abordaje terapéutico, y por ello la identificación de estas alteraciones ha permitido desarrollar terapias dirigidas frente a determinados RTKs concretos que han demostrado eficacia en pacientes. De la importancia clínica que han supuesto estos descubrimientos deriva la necesidad de estudiar otros RTKs que puedan actuar como oncogenes, como es el caso de los receptores de factores de crecimiento fibroblásticos (FGFRs). Dentro de esta familia de receptores, FGFR1 ha demostrado tener propiedades pro-oncogénicas en diferentes tipos de cáncer, como el cáncer de mama, el de pulmón y el de cabeza y cuello <sup>66-68</sup>. De la misma forma, se han descrito mutaciones y translocaciones en FGFR2 y FGFR3 en diferentes tumores, tales como el de mama, vejiga, páncreas, o pulmón con una frecuencia de aproximadamente un 1% de los casos. Según los estudios realizados, estas alteraciones podrían ser predictivas de respuesta a terapia anti-FGFR <sup>69,70</sup>. Igualmente, FGFR4 ha sido asociado a la tumorogénesis en diferentes tipos de cáncer, como el carcinoma hepatocelular, el colorrectal o el de pulmón <sup>71-74</sup>.

##### *4.1 Características de los FGFRs y sus ligandos*

Los FGFRs constituyen una familia de receptores tirosina quinasa cuya señalización está implicada en múltiples funciones en diferentes tipos celulares y se encuentra regulada por complejos patrones de expresión de sus isoformas y de afinidad por sus diferentes ligandos, los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) <sup>75,76</sup>. Algunos de los procesos mejor descritos en los que participa esta familia de receptores son la regulación de diferentes fases del desarrollo embrionario <sup>77</sup> y la formación de diferentes órganos <sup>78</sup>. En el organismo adulto,

participan en la homeostasis y reparación tisular, en la angiogénesis y en procesos inflamatorios<sup>75,76,79</sup>.

En condiciones fisiológicas, la activación de los FGFRs depende de la unión a sus ligandos afines, los FGFs. En mamíferos, esta familia de factores de crecimiento se compone de 22 proteínas que han demostrado ejercer funciones relacionadas con la supervivencia celular, diferenciación, migración y angiogénesis a través de la activación de sus receptores (**Tabla 2**)<sup>80</sup>. La mayoría de los FGFs son glicoproteínas secretadas que funcionan de manera autocrina o paracrina, con la excepción de FGF19, 21 y 23 que son hormonas capaces de distribuirse por el torrente sanguíneo<sup>81-83</sup>. Además de a los FGFRs, los FGFs pueden unirse también a receptores de baja afinidad que se encuentran en la mayoría de tipos celulares, los proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPGs). Al unirse a los FGFs y a los FGFRs, los HSPGs integran un complejo ternario que estabiliza la unión FGF-FGFR.

La familia de los FGFRs está formada por cinco miembros (FGFR1-5), de los cuales solamente FGFR5 no tiene actividad quinasa<sup>84</sup>. El resto de miembros de la familia se caracteriza por tener dos o tres dominios proteicos similares a los de las inmunoglobulinas en su porción extracelular. Se ha descrito que el primero de estos dominios está implicado en la autoinhibición del receptor, mientras que los otros dos están implicados en el reconocimiento del ligando<sup>85</sup>. En los FGFR1-3 el tercer dominio proteico similar a inmunoglobulina sufre un proceso de maduración alternativa que genera isoformas diferentes de los receptores (IIIb o IIIc). Debido a la función de reconocimiento de ligando de este dominio, esta maduración alternativa determinará la preferencia de unión a los diferentes FGFs (**Tabla 2**)<sup>86,87</sup>. Estas variantes obtenidas durante la maduración parecen ser relevantes en el mantenimiento de la homeostasis entre los tejidos epiteliales y mesenquimales, ya que la expresión de las diferentes isoformas de los FGFRs presenta un patrón específico, de tal forma que las isoformas IIIc se expresan en tejidos mesenquimales y las IIIb en células epiteliales<sup>88</sup>.

**Tabla 2. Asociación de los ligandos específicos a cada isoforma de FGFR** <sup>85,89-100</sup>.

Isoforma de FGFR	Ligandos específicos
<b>FGFR1, IIIb</b>	FGF-1, 2, 3, 10, and 22
<b>FGFR1, IIIc</b>	FGF-1, 2, 4, 5, 6, 19, 20, and 21
<b>FGFR2, IIIb</b>	FGF-1, 3, 4, 6, 7, 10, and 22
<b>FGFR2, IIIc</b>	FGF-1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 17, 18, 19, 21, and 23
<b>FGFR3, IIIb</b>	FGF-1 and 9
<b>FGFR3, IIIc</b>	FGF-1, 2, 4, 8, 9, 17, 18, 19, 21 and 23
<b>FGFR4</b>	FGF-1, 2, 4, 6, 8, 9, 16, 17, 18, and 19

#### 4.2 Señalización de los FGFRs

En condiciones fisiológicas, la activación de los FGFRs ocurre como en cualquier receptor tirosina quinasa, tras la unión a su ligando <sup>80,101</sup> (**Figura 5**). Existen siete residuos de tirosina que pueden ser fosforilados tras la activación del receptor descritos para FGFR1, Y463 (en posición yuxtamembranal), Y583/Y585 (en el inserto quinasa), Y653/Y654 (en el bucle de activación), Y730 (en el dominio quinasa) e Y766 (en el extremo C-terminal) <sup>102,103</sup>. Los dominios quinasa de FGFR1-4 se encuentran altamente conservados, con un 75-92% de homología (33). La mayoría de residuos de autofosforilación se encuentran conservados entre los diferentes FGFRs. Sin embargo, FGFR4 no presenta los residuos Y463, Y583/Y585 <sup>103,104</sup>.

Los residuos de tirosina fosforilados constituyen sitios de unión para diversas proteínas adaptadoras como FRS2 (sustrato 2 de FGFR), que es fosforilado por el FGFR activo. Otras proteínas adaptadoras como GRB2 pueden unirse a través de un dominio SH2 de unión a fosfotirosina al FRS2 ya fosforilado. A su vez, GRB2 se une a SOS, que es un factor de intercambio de nucleótidos guanina. Al formarse el complejo RTK-GRB2-SOS, SOS se activa y promueve la retirada de GDP (Guanina di-fosfato) de la proteína RAS y su consecuente unión a GTP (Guanina tri-fosfato), produciendo su activación. Así, RAS activa a las proteínas RAF mediante su fosforilación, y éstas entonces fosforilan a MEK1 y MEK2, que finalmente fosforilan a ERK (p42/p44), que será translocada al núcleo para activar factores de transcripción que regularán la expresión de genes implicados

en proliferación celular, muerte celular, diferenciación, migración y angiogénesis<sup>105,106</sup>.

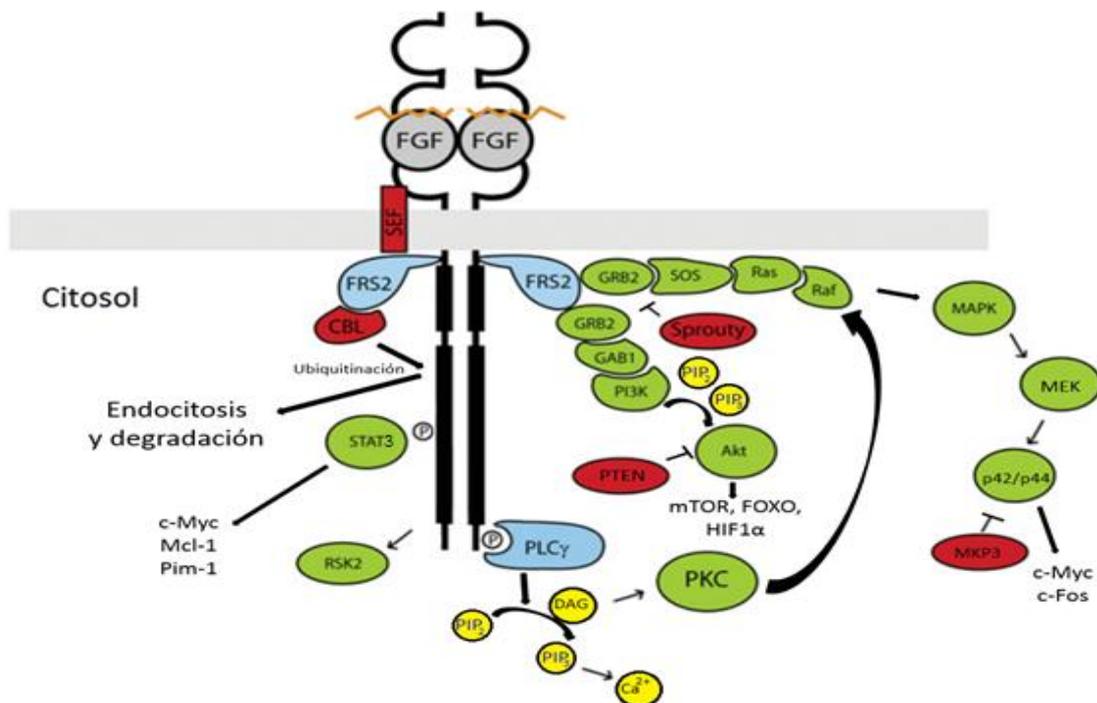
Por otro lado, la unión de las proteínas adaptadoras GRB2 y GAB1 al FGFR permitirá su unión a PI3K, que será entonces activada por fosforilación. PI3K es una quinasa que una vez activa fosforila lípidos de membrana. Su activación provoca la producción de PIP3 (fosfatidil inositol trifosfato), que fosforila a AKT, activándola. Posteriormente, AKT activa a otras proteínas que producen señales de supervivencia y proliferación, tales como mTOR, e induce la expresión de proteínas anti-apoptóticas, como MCL-1. Igualmente, AKT favorece la proliferación celular inhibiendo varios represores del ciclo celular como FOXO, e induce la transcripción de genes pro-angiogénicos como HIF1 $\alpha$  y VEGF, implicados en diferentes procesos tumorogénicos<sup>107</sup>. Uno de los principales reguladores de esta ruta es PTEN, que defosforila PIP3 a PIP2, disminuyendo así la activación de AKT<sup>108</sup>.

Otra proteína adaptadora que también puede ser fosforilada y activada directamente por el FGFR<sup>101</sup> es la PLC $\gamma$  (fosfolipasa C gamma), que se une al FGFR en su residuo fosforilado de tirosina Y766<sup>102</sup>. Una vez fosforilada, PLC $\gamma$  provoca la liberación de calcio intracelular que induce la función de los miembros dependientes de calcio de la familia proteína quinasa C (PKC), y la señalización de MAPK a través de la fosforilación de RAF<sup>109</sup>.

Por otro lado, la activación de los FGFRs promueve la inducción de otras rutas de señalización oncogénicas, como la ruta de las STATs<sup>75,110</sup>, que es mediada por la fosforilación en el residuo de tirosina Y766 del FGFR, a la que STAT3 se une, provocando su fosforilación<sup>111</sup>. La activación de las STATs induce su propia dimerización y translocación al núcleo, donde promueven la inducción de diferentes genes diana implicados en proliferación, supervivencia, invasión e inmunosupresión, tales como *C-MYC*, *MCL-1* o *PIM-1*<sup>112</sup>.

La regulación de la señalización inducida por los FGFRs se encuentra regulada por diferentes proteínas como la fosfatasa 3 de MAPK (MKP3), las proteínas SPROUTY (SPRY)<sup>113,114</sup> y los miembros de la familia de expresión similar a FGF (SEF)<sup>115</sup>. Esta modulación de la señal de FGFR puede ocurrir a diferentes niveles de la cascada de señalización. Por ejemplo, MKP3 defosforila

a ERK, atenuando la señalización MAPK, y las proteínas SPROUTY compiten con la proteína adaptadora GRB2 de forma dominante negativa, evitando la activación de RAS por SOS <sup>113,114</sup>. Además, la señalización de FGFR se encuentra negativamente regulada por la endocitosis de los FGFRs y su posterior degradación en lisosomas <sup>101</sup>, proceso que regula la proteína CBL, que se encarga de ubiquitinar al FGFR, marcándolo así para su posterior degradación <sup>116</sup>.



**Figura 5. Esquema de la señalización intracelular de los FGFRs.** Adaptado de Wesche y colaboradores <sup>117</sup>. En azul, proteínas adaptadoras; en verde, proteínas de transducción; en rojo, proteínas reguladoras de la señalización; en amarillo, mensajeros intermediarios.

#### 4.3. Papel de los FGFRs en cáncer

Debido a la implicación de los FGFRs en procesos como la angiogénesis, proliferación, diferenciación y supervivencia celular, resulta entendible que se hayan identificado numerosas alteraciones moleculares en estos genes que contribuyen a la progresión de diversos tipos de tumores. Un ejemplo de éstas es la sobreexpresión de los FGFRs, que puede ser debida a diferentes alteraciones en los mecanismos de regulación de la expresión génica, o a amplificaciones cromosómicas. Se han descrito altos niveles de expresión de varios FGFRs en

diferentes tipos de tumores, tales como los de próstata, pulmón, o estómago, en comparación con muestras de su correspondiente tejido sano <sup>52,118,119</sup>. Además, se han llevado a cabo numerosos estudios que demuestran el papel oncogénico que ejerce esta sobreexpresión <sup>120</sup>. En el caso concreto de FGFR1, sus altos niveles de expresión proteica han sido asociados a un peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama luminal tipo B (Receptor de estrógenos (ER) positivo y HER2 negativo) <sup>121</sup>. También se ha asociado la amplificación de FGFR1 con diferentes tipos de tumores digestivos <sup>122,123</sup>, donde además correlaciona con un comportamiento clínico más agresivo <sup>124</sup>. En cáncer colorrectal, se ha demostrado que la sobreexpresión de FGFR1 es un indicador de sensibilidad a la inhibición selectiva de FGFR en modelos *in vitro* e *in vivo* <sup>125</sup>, e igualmente se han obtenido resultados concordantes para mesotelioma pleural maligno <sup>126</sup>. En cuanto a FGFR4, se ha descrito que su sobreexpresión ejerce un papel pro-tumorogénico en diferentes tipos de tumores, como el cáncer de mama, donde se correlaciona con un estadio tumoral más avanzado y promueve la supervivencia celular a través de la activación de la vía PI3K/AKT <sup>127</sup>. También se ha descrito que la expresión de FGFR4 es mayor en cáncer colorrectal con respecto al tejido sano, y se ha observado que su silenciamiento *in vitro* reduce la viabilidad celular a través de una reducción de la activación de la ruta de las STATs, y predice la sensibilidad a quimioterapia en este tipo de cáncer <sup>72</sup>. Otra de las patologías donde FGFR4 ha demostrado tener gran relevancia es el carcinoma hepatocelular, donde se ha comprobado la sobreexpresión de este gen con respecto al tejido normal. Además, se ha descrito que FGFR4 podría tener relación con la hepatocarcinogénesis y que su inhibición resulta eficaz en modelos preclínicos <sup>71,128</sup>.

Otro ejemplo importante de alteraciones tumorogénicas descritas en los FGFRs son las mutaciones puntuales. Se ha descrito la presencia de numerosas mutaciones activadoras en miembros de la familia de los FGFR en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el de próstata, pulmón, vejiga, mama y estómago <sup>129-131</sup>. Estas mutaciones pueden aumentar la afinidad del receptor por su ligando, favorecer su dimerización o su activación, o dificultar su degradación <sup>76,132</sup>. Cabe destacar una variante en el gen de FGFR4 (rs351855, o Gly388Arg) que ha

mostrado tener relevancia pronóstica en diferentes tipos de cáncer, incluidos pulmón, próstata, cabeza y cuello, y mama, y se han descrito diversos mecanismos funcionales que podrían explicar este papel, como la sobreactivación de la vía de STAT3, o la inducción de la transición epitelio-mesénquima<sup>74,133-137</sup>.

Por otro lado, se han descrito algunas translocaciones cromosómicas que involucran a los genes de los FGFRs y que generan proteínas de fusión. Éstas generalmente presentan el dominio tirosina quinasa del FGFR activado de forma constitutiva. Este tipo de aberración afecta sobre todo a FGFR2 y FGFR3, para los que se han caracterizado diferentes proteínas de fusión en cáncer gástrico, vesical, de mama, próstata, y pulmón<sup>70,138,139</sup>. El potencial oncogénico de estas proteínas de fusión ha sido caracterizado en diferentes modelos, y se refleja en la efectividad de la inhibición de FGFR en tumores con estas translocaciones<sup>139,140</sup>.

Además de las alteraciones que ocurren en los FGFRs causando su activación constitutiva, pueden darse otras mutaciones que impiden que los diferentes bucles de inhibición de la señalización tengan lugar, ya sea en el mismo gen de FGFR o en genes que codifican para las proteínas responsables de esta regulación. Por ejemplo, se han descrito mutaciones en CBL, la proteína responsable de ubiquitinar al FGFR para inducir su degradación, que provocan la acumulación de RTKs en leucemia mieloide aguda<sup>141</sup>. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito cómo pueden afectar las mutaciones de esta proteína a la señalización de FGFR.

#### 4.4. *FGFR1 y FGFR4 en cáncer de pulmón*

Existen diferentes estudios sobre FGFR1 en cáncer de pulmón que demuestran su relevancia en esta patología, en especial en el carcinoma epidermoide. En este subtipo histológico, el gen de FGFR1 se encuentra amplificado hasta en el 20% de los casos mientras que en adenocarcinoma solo se ha reportado en el 1-3% de los casos<sup>142</sup>. También se ha demostrado que la

inhibición de FGFR1 es eficaz como aproximación terapéutica en modelos tumorales *in vitro* e *in vivo* con sobreexpresión de FGFR1<sup>143-146</sup>. A nivel clínico, se ha asociado de forma retrospectiva la amplificación de FGFR1 con un peor pronóstico de la enfermedad en varias cohortes asiáticas<sup>147,148</sup>. Sin embargo, estos resultados no se han reproducido en otros estudios prospectivos<sup>53</sup>, de forma que el papel pronóstico de la amplificación de este receptor no está del todo claro. Recientemente, se han identificado variantes de fusión con FGFR1, que se han asociado al hábito tabáquico y a una menor diferenciación tumoral, en algunos casos aislados de cáncer de pulmón no microcítico, concentrándose éstos sobre todo en carcinomas epidermoides<sup>149</sup>.

En cuanto a FGFR4, recientemente se ha descrito en una cohorte asiática de pacientes de CPNM que la alta expresión proteica de FGFR4 correlaciona con un mayor tamaño tumoral y con una peor supervivencia. Otros investigadores han descrito una variante polimórfica del gen, rs351855, o FGFR4 Gly388Arg en cáncer de pulmón, cuya presencia se ha asociado en algunos estudios a la afectación ganglionar y a un peor pronóstico en pacientes con adenocarcinoma o carcinoma epidermoide de pulmón con afectación linfática<sup>136,137,150-152</sup>.

#### 4.5. *FGFRs como dianas terapéuticas*

Dado el papel oncogénico que presentan los FGFRs en diferentes tipos de cáncer, se han hecho numerosos esfuerzos para desarrollar moléculas dirigidas a bloquear la acción de estos receptores. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales, secuestradores de ligando, y pequeñas moléculas inhibitoras, siendo estas últimas las que más atención han recabado en los últimos años. De hecho, existen ya varios inhibidores de tirosina quinasa (TKIs) frente a los FGFRs que se encuentran actualmente en ensayos clínicos<sup>153</sup>. Los TKIs inhiben la actividad quinasa del receptor interfiriendo en su unión a ATP o en su unión a proteínas que serán sustrato de fosforilaciones. Estos inhibidores se clasifican atendiendo a su selectividad por FGFR, distinguiendo entre TKIs no selectivos y TKIs selectivos de FGFR.

A día de hoy, los TKIs más avanzados en su desarrollo a nivel clínico son los no selectivos, como lucitanib, ponatinib, nintendanib, y dovitinib. Éstos presentan actividad no solo frente a los FGFRs, sino también frente a otros receptores tirosina quinasa, como los VEGFRs y PDGFRs, dada la similitud estructural que existe entre todos estos tipos de receptores. A destacar, en un ensayo clínico de fase I/II con lucitanib, en pacientes de cáncer de mama con amplificación de FGFR1 y/o de FGF3/4/19, se alcanzó una respuesta parcial en el 50% de los pacientes <sup>154</sup>. Sin embargo, en otro ensayo con dovitinib en pacientes de mama altamente pretratados no se consiguió mejorar la supervivencia global de los pacientes seleccionados con amplificación de FGFR1 <sup>155</sup>.

Se cree que la inhibición simultánea de varias rutas de señalización en el caso de los inhibidores no selectivos puede aumentar la eficacia del tratamiento en algunos casos, por bloquear diferentes vías de señalización oncogénica. Sin embargo, la inhibición conjunta de múltiples dianas diferentes aumenta la toxicidad del tratamiento. Además, la actividad farmacológica de los TKIs no selectivos frente a los FGFRs es limitada debido a la relativamente baja afinidad que éstos presentan por los FGFRs. Por todo esto, se han desarrollado TKIs selectivos para FGFR, con una bioactividad mucho mayor frente a la activación de los mismos. Uno de éstos es JNJ-42756493, que mostró beneficio clínico preliminar en pacientes con carcinoma urotelial y glioblastoma que presentaban la fusión FGFR3-TACC3, y que alcanzó la estabilización de la enfermedad en algunos pacientes con cáncer de pulmón, condrosarcoma y cáncer de mama que presentaban amplificación de FGFR1 <sup>156</sup>. Otro inhibidor selectivo, AZD4547, ha demostrado tener eficacia en pacientes con cáncer gástrico con amplificación de FGFR2 <sup>153</sup>.

A pesar de las numerosas evidencias que apoyan el papel oncogénico de los FGFRs, por el momento solo un pequeño subconjunto de pacientes ha presentado una respuesta objetiva al tratamiento con inhibidores dirigidos frente a estos receptores (**Tabla 3**). En cáncer de pulmón, se han publicado resultados de ensayos clínicos con inhibidores de FGFR en pacientes con amplificación de FGFR1, que ha sido hasta la fecha el criterio de inclusión en más comúnmente utilizado en estos estudios. A pesar de que hasta el momento la

frecuencia descrita para esta amplificación era de en torno al 20%, estos ensayos reportan una frecuencia bastante menor, en el rango del 5-10%. Además, los beneficios terapéuticos de estos inhibidores han sido modestos, obteniendo tan solo respuestas parciales y tasas globales de respuesta de en torno al 5-10%, razón por la que se cuestiona la validez de la amplificación de FGFR1 como biomarcador predictivo de respuesta a estas terapias <sup>54,69,157</sup>. Por estos motivos, resulta imprescindible la identificación de nuevos biomarcadores predictivos de respuesta a estos tratamientos para optimizar los criterios de selección de pacientes en los siguientes estudios clínicos que evaluarán la eficacia de las terapias anti-FGFR.

Tabla 3. Resumen de los ensayos clínicos recientes con fármacos anti-FGFR

Fármaco	Histología	Fase del estudio	Biomarcador	Respuesta	Toxicidad	Identificador del ensayo clínico
<b>Dovitinib (Novartis)</b>	Carcinoma urotelial	II	NR	Estudio interrumpido	Trombocitopenia (9%), fatiga (9%) y astenia (9%)	NCT00790426 <sup>158</sup>
	Carcinoma urotelial	II (en curso, inclusión de pacientes completada)	Expresión de FGFR3 por IHQ o FGFR3 mutado	8% de respuestas completas, 0% en pacientes con tinción inmunohistoquímica y sin mutaciones, y 33% en pacientes con tinción inmunohistoquímica y mutados.	Hipertensión (15%), hipertrigliceridemia (15%), hepatotoxicidad (1%), estomatitis, sarpullido	NCT01732107
	Cáncer gástrico	II (inclusión de pacientes en curso)	Número de copias de FGFR3 > 3 por RT-PCR	NR	NR	NCT0171949
<b>AZD4547 (Astra Zeneca)</b>	Tumores sólidos avanzados	I (Completado)	Amplificación de FGFR1 por FISH (FGFR1:CEP8≥2)	NR	NR	NCT00979134
	Carcinomas escamosos (Cohorte de expansión)	Ib (Completado)	NR	Respuesta parcial en 1/14, estabilización de la enfermedad en 4/14	Retinopatía serosa central, deshidratación, hiponatremia	<sup>69</sup>
	Cáncer gástrico y gastroesofágico	Ib (Completado)	NR	Respuesta parcial en 1/3, estabilización de la enfermedad en 4/13	Vómitos (61.5%), falta de apetito y diarrea (53.9%), fatiga y náuseas (46.2%), hiperfosfatemia y sequedad ocular (30.7%), estomatitis (38.5%), toxicidad ocular (30.8%)	<sup>69</sup>
	Estudio prueba de concepto de AZD4547 en pacientes con amplificación de FGFR1 o FGFR2	II	Amplificación por FISH de FGFR2 (cáncer gástrico y gastroesofágico) o FGFR1 (cáncer de mama)	Cáncer gástrico/gastroesofágico: tasa de respuesta de 33% (3/9) en tumores con amplificación de FGFR2. Cáncer de mama: tasa de respuesta de 12.5% (1/8) en tumores con amplificación de FGFR1	Fatiga (71%), mucositis (41%), náuseas (35%).	NCT01795768 <sup>69</sup>

Fármaco	Histología	Fase del estudio	Biomarcador	Respuesta	Toxicidad	Identificador del ensayo clínico
	Lung-MAP: Terapia en segunda línea dirigida por biomarcadores en pacientes con carcinoma escamoso recurrente en estadio IV	II/III	Amplificación, fusión o mutación de FGFR1/2/3	NR	NR	NCT02154490
<b>BGJ398 (Novartis)</b>	Pacientes con tumores con alteraciones genéticas en FGFR	II (En curso, reclutamiento de pacientes completado)	Alteraciones genéticas en FGFR	NR	NR	NCT02160041
	Estudio de escala de dosis en pacientes adultos con tumores sólidos avanzados	I (Inclusión de pacientes en curso)	FISH/CISH	NR	NR	NCT01004224
	Cohorte de expansión de carcinomas epidermoides	Ib	Amplificación de FGFR1	Respuesta parcial en 2/17 dentro de la fecha de corte, y 2/17 adicionales tras esta fecha. Estabilización de la enfermedad en 3/17	Hiperfosfatemia, estomatitis, alopecia, falta de apetito y fatiga	<sup>69</sup>
	Carcinoma urotelial	Ib	Mutaciones activadoras de FGFR3	Tasa de respuesta del 36% (9/25), de las cuales una respuesta completa sin confirmar y 8 respuestas parciales (4 confirmadas)	Hiperfosfatemia (42%), estreñimiento (36%), fatiga (36%), creatinina elevada (36%)	92,144 <sup>69</sup>
	BGJ398 en carcinoma urotelial de vejiga no invasivo	Estudio piloto (inclusión de pacientes en curso)	Mutaciones activadoras o genes de fusión con FGFR3	NR	NR	NCT02657486
	Estudio de fase 2 de BGJ398 en pacientes con glioblastoma recurrente	II (inclusión de pacientes en curso)	Amplificación, translocación o mutación activadora en FGFR1/2/3/4	NR	NR	NCT01975097

Fármaco	Histología	Fase del estudio	Biomarcador	Respuesta	Toxicidad	Identificador del ensayo clínico
	Estudio de la eficacia de BGJ398 en monoterapia en carcinoma epidermoide de cabeza y cuello con amplificación o translocación de FGFR1-3	IIa (inclusión de pacientes aún no inicializada)	Mutación, amplificación o translocación de FGFR1/2/3 detectada en ADN o ARN	NR	NR	NCT02706691
<b>JNJ-42756493 (janssen)</b>	Estudio para evaluar la seguridad, farmacocinética y farmacodinámica de JNJ-42756493 en pacientes con tumores sólidos o linfoma avanzados o refractarios	I (activo, inclusión de pacientes finalizada)	Translocación de FGFR2 o FGFR3	4/23 respuestas completas, 1/23 respuestas parciales sin confirmar en glioblastoma, carcinoma urotelial y endometrial. 16/23 con estabilización de la enfermedad.	Hiperfosfatemia (65%), astenia (55%), sequedad bucal (45%), estreñimiento (34%), falta de apetito (32%) y disgeusia (31%),	NCT01703481 <sup>159</sup>
	Estudio de eficacia y seguridad de JNJ-42756493 en pacientes con cáncer urotelial	II (inclusión de pacientes en curso)	NR	NR	NR	NCT02365597 <sup>69</sup>
	Estudio para evaluar la seguridad, farmacocinética y farmacodinámica de JNJ-42756493 en pacientes con carcinoma hepatocelular avanzado	I (inclusión de pacientes en curso)	NR	NR	NR	NCT02421185

NR: No referido



# Hipótesis

---



FGFR1 y FGFR4 podrían tener un papel relevante en la biología y progresión de los cánceres pulmonares y, subsecuentemente, en el pronóstico de los pacientes afectados. La caracterización funcional de FGFR1 y FGFR4 y de su señalización en diferentes modelos de cáncer de pulmón podría ayudar a comprender el papel de estos genes en la enfermedad y a predecir en qué condiciones su inhibición podría tener relevancia terapéutica.



# Objetivos

---



1. Determinación del papel de FGFR1 y FGFR4 en la tumorigénesis pulmonar *in vitro* e *in vivo* en diferentes contextos histológicos y moleculares.
2. Elucidación del mecanismo molecular del papel de FGFR1 y FGFR4 en cáncer de pulmón no microcítico.
3. Análisis del papel pronóstico de la expresión de FGFR1 y FGFR4 en cohortes de pacientes con cáncer de pulmón.
4. Determinación de la eficacia de la terapia anti-FGFR en cáncer de pulmón no microcítico y validación de factores predictivos de respuesta a dicha terapia.



# Materiales y métodos

---



## 1. Diseño

A fin de caracterizar el efecto de FGFR1 y FGFR4 en diferentes contextos histológicos y moleculares del cáncer de pulmón, sobreexpresaremos o silenciaremos la expresión de estos genes en líneas celulares representativas de las histologías y alteraciones genéticas más relevantes de esta patología. Así, caracterizaremos el efecto de la expresión de ambos FGFRs en las características tumorogénicas y el mecanismo molecular que las media.

Asimismo, utilizaremos xenoinjertos en ratones inmunodeprimidos de algunas de estas líneas celulares y de tumores pulmonares derivados de pacientes (PDXs) para comprobar el efecto de la expresión de FGFR1 y FGFR4 en el crecimiento de estos tumores, y analizar la eficacia de la inhibición de FGFR en estos modelos, con el fin de buscar biomarcadores predictivos de respuesta y nuevas alternativas terapéuticas para determinados subgrupos de pacientes.

Por último, determinaremos la expresión tumoral de ARNm de FGFR1 y FGFR4 en cohortes de pacientes de cáncer de pulmón no microcítico para definir el papel pronóstico de éstos. Igualmente, realizaremos la validación de los hallazgos realizados en bases de datos públicas caracterizadas para la expresión de estos genes.

## 2. Reactivos biológicos

### 2.1. Vectores plasmídicos

A continuación se detallan los plásmidos utilizados en este proyecto con el fin de sobreexpresar y silenciar los genes en estudio (**Tabla 4**).

### 2.2. Antibióticos para selección en bacterias

Para seleccionar las bacterias transformadas con los diferentes plásmidos usamos los antibióticos ampicilina (Calbiochem) y kanamycin (Calbiochem).

Tabla 4. Plásmidos usados a lo largo del trabajo de tesis

Nombre plásmido	Plásmido	Método de selección (mamíferos)	Referencia	Proveedor	Uso
pCMV6	pCMV6	G418	PS100001	Origene	Vector vacío control de la sobreexpresión de FGFR1 y FGFR4
pCMV6 FGFR1	pCMV6	G418	RC202080	Origene	Sobreexpresión de FGFR1
pCMV6 FGFR4	pCMV6	G418	RG204230	Origene	Sobreexpresión de FGFR4
pRS scramble shRNA	pRS	Puromicina	TR20003	Origene	Vector con shRNA “scramble”, control del silenciamiento de FGFR1 y FGFR4
pRS shRNA FGFR1	pRS	Puromicina	TR320354	Origene	Silenciamiento por shRNA de FGFR1
pRS shRNA FGFR4	pRS	Puromicina	TR320356	Origene	Silenciamiento por shRNA de FGFR4
pBABE	pBABE	Puromicina	#51070	Addgene	Vector vacío control de la sobreexpresión de EGFR nativo y mutado
pBABE wtEGFR	pBABE	Puromicina	#11011	Addgene	Sobreexpresión de EGFR nativo
pBABE EGFR (L858R/T790M)	pBABE	Puromicina	#32073	Addgene	Sobreexpresión de EGFR con las mutaciones L858R/T790M
PL-SIN-PGK-EGFP	PL-SIN-PGK	GFP	#21316	Addgene	Vector vacío control de la sobreexpresión de N-cadherina
pCCL-c-MNDU3c-PGK-EGFP N-cadherin	pCCL-c-MNDU3c-PG	GFP	#38153	Addgene	Sobreexpresión de N-cadherina
pB-RS	pB-RS	Blasticidina	TR30024	Origene	Vector vacío control del silenciamiento de N-cadherina y E-cadherina
pB-RS shRNA N-cadherin	pB-RS	Blasticidina	HC138304	Origene	Silenciamiento de N-cadherina
pB-RS shRNA E-cadherin	pB-RS	Blasticidina	HC138277	Origene	Silenciamiento de E-cadherina

### 2.3. *Cepas bacterianas utilizadas en la amplificación de plásmidos*

Todos los plásmidos adquiridos fueron amplificados usando la cepa de *E. coli* “*E. coli* strain Max Efficiency DH10B” (Invitrogen).

### 2.4. *Sondas de PCR a tiempo real*

A continuación se detallan las sondas empleadas en la preamplificación y determinación de la expresión de ARNm (**Tabla 5**).

**Tabla 5. Sondas usadas para la determinación de la expresión de ARNm de genes de interés.**

Gen diana	Referencia	Proveedor
FGFR1	Hs00917379_m1	Life technologies
FGFR4	Hs01106908_m1	Life technologies
EGFR	Hs01076090_m1	Life technologies
N-cadherin	Hs00983056_m1	Life technologies
E-cadherin	Hs01023894_m1	Life technologies
B2M	Hs99999907_m1	Life technologies
GAPDH	Hs99999905_m1	Life technologies

## 2.5. Anticuerpos empleados

Los anticuerpos utilizados en esta tesis, así como su procedencia, especie utilizada en su producción y dilución empleada se detallan en la **Tabla 6**.

## 2.6. Inhibidores químicos

Se emplearon diferentes moléculas inhibitoras de pequeño tamaño en los tratamientos de líneas celulares y xenoinjertos celulares y de tumores derivados de pacientes (“Patient-derived xenografts”, PDXs). Se seleccionaron dos inhibidores selectivos de FGFR: BGJ398 (#S2183, Selleckchem) y AZD4547 (#S2081, Selleckchem); y dos inhibidores de EGFR: erlotinib (Tarceva, Genetech) y osimertinib (#S7297, Selleckchem).

## 3. Técnicas de biología molecular

### 3.1. Amplificación plasmídica

#### 3.1.1. Transformación de células quimiocompetentes

Las bacterias *E. coli* quimiocompetentes (DH10B) se descongelaron a 4°C. Para cada transformación se utilizó una fracción de 30-40 µL de bacterias a los que se añadieron 2 µL de ADN plasmídico a 100 ng/µL. A su vez, a una fracción de células competentes se le añadió el mismo volumen de agua autoclavada libre de DNA como control negativo de la transformación. Tras incubar estas mezclas en hielo durante 30 minutos, se les dio un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos, a fin de alterar la estructura de la membrana y facilitar la entrada del plásmido al citoplasma, y se volvió

**Tabla 6. Anticuerpos usados para determinar la expresión proteica de las proteínas de interés.**

Proteína diana	Tipo anticuerpo	Peso molecular proteína	Referencia	Proveedor	Dilución para western blot	Dilución para inmunofluorescencia
FGFR1	Monoclonal de conejo	150 kDa	9740	CST	1:1000	1:100
FGFR4	Monoclonal de conejo	100 kDa	8562	CST	1:1000	1:100
pFGFR1 (Tyr653/654)	Policlonal de conejo	150 kDa	06-1433	Millipore	1:2000	-
pFGFR4 (Tyr642)	Policlonal de conejo	100 KDa	MBS856043	MyBiosource	1:2000	-
AKT	Policlonal de conejo	60 KDa	9272	CST	1:1000	-
pAKT (Ser473)	Policlonal de conejo	60 KDa	9271	CST	1:1000	-
p42/p44 (ERK1/2)	Policlonal de conejo	42/44 kDa	9102	CST	1:1000	-
p-p42/p44 (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)	Policlonal de conejo	42/44 kDa	9101	CST	1:1000	-
STAT3	Monoclonal de ratón	80 kDa	9139	CST	1:1000	-
pSTAT3 (Tyr705)	Policlonal de conejo	80 kDa	9145	CST	1:1000	-
EGFR	Monoclonal de conejo	160 kDa	4267	CST	1:1000	-
EGFR	Monoclonal de ratón	160 kDa	MA5-13269	ThermoFisher	-	1:100
pEGFR (Tyr1068)	Policlonal de conejo	160 kDa	2234	CST	1:1000	-
N-cadherina	Monoclonal de conejo	135 kDa	13116	CST	1:1000	-
N-cadherina		135 kDa		ThermoFisher	-	1:100
E-cadherina	Monoclonal de conejo	125 kDa	3195	CST	1:1000	-
$\alpha$ -Tubulina	Monoclonal de ratón	55 kDa	T9206	Sigma	1:5000	-
Secundario anti-Rabbit (Peroxidasa ácida de rábano)	Policlonal de cabra		7074	CST	1:5000	-
Secundario anti-Mouse (Peroxidasa ácida de rábano)	Policlonal de caballo		7076	CST	1:5000	-
Secundario anti-Rabbit (Alexa Fluor 488)	Policlonal de cabra		R37116	ThermoFisher	-	1:250
Secundario anti-Mouse (Alexa Fluor 555)	Policlonal de burro		A-31570	ThermoFisher	-	1:250

CST: Cell Signaling Technology

a incubar la mezcla en hielo durante otros 2 minutos. Posteriormente, se añadió 1 mL de medio SOC (#15544034, Invitrogen) a temperatura ambiente a cada vial. A continuación, los viales se incubaron en agitación durante una hora a 37°C y se centrifugaron. Se descartó el sobrenadante, dejando solo un pequeño resto para resuspender el pelet celular y sembrar las células transformadas en placas de LB-agar

con el antibiótico de selección apropiado, y dejarlas incubando a 37°C durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, se seleccionó una de las colonias generadas y se cultivó en medio LB con el antibiótico de selección durante 16 horas, para realizar la extracción plasmídica.

### *3.1.2. Extracción de ADN plasmídico*

Se realizó usando el protocolo para MaxiPrep del kit de JETSTAR, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este protocolo se basa en realizar una lisis alcalina de las bacterias transformadas con el plásmido de interés, seguida de la precipitación y purificación del ADN plasmídico por medio de una columna de intercambio iónico. El ADN se une a la columna en condiciones apropiadas de concentración salina y de pH, y las impurezas pueden ser retiradas por medio de lavados de la columna con una solución de carga iónica intermedia. Tras los pasos de limpieza, el ADN se eluyó pasando por la columna un tampón con alta concentración salina, y se precipitó por medio de la adición de isopropanol y centrifugación para concentrar el ADN y aislarlo de las sales en el tampón de elución. Finalmente, el ADN plasmídico se lavó con etanol al 75% y se eluyó en agua miliQ.

## *3.2. Análisis de la expresión génica a nivel de ARNm*

### *3.2.1. Extracción de ARN*

Por un lado, se realizó la extracción de ARN de las líneas celulares incluidas en el proyecto. Para ello se usó el reactivo Trizol (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este reactivo lisa las células y conserva el ARN, y mediante la adición de cloroformo permite la separación de la muestra en tres fases diferentes, lo que permite recuperar el ARN aislado de una de estas fases. Posteriormente, el ARN se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol al 75% y fue resuspendido en agua DEPC (agua tratada con dietilpirocarbonato).

Por otro lado, para realizar la extracción de ARN total de tejido fijado con formalina y conservado en parafina se desparafinaron las láminas de tejido tumoral mediante el uso de Xilol. El ARN total se extrajo usando el kit de extracción RecoverAll (Life Technologies), según las instrucciones del fabricante para la extracción de ARN de tejido biológico. Este kit permite aislar el ARN de la muestra a través de una separación en fases, y mediante el uso de columnas de afinidad a las que se une el ARN, permite extraerlo con gran eficiencia y sin apenas restos de contaminantes.

Una vez extraído el ARN, su concentración se cuantificó por medio del equipo NanoDrop (ThermoScientific) y se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

### 3.2.2. Transcripción reversa

Se retrotranscribieron las muestras de ARN usando el kit de retrotranscripción TaqMan Reverse Transcription (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada reacción se utilizaron 1000 ng de ARN en 10 uL, con 10uL de mezcla madre, en un volumen final de 20 uL. Las reacciones fueron sometidas al siguiente protocolo de retrotranscripción de la **tabla 7**.

**Tabla 7. Protocolo de temperaturas de la retrotranscripción de ARN**

Temperatura	Tiempo	Función
25°C	10 minutos	Apareamiento de los cebadores
37°C	120 minutos	Retrotranscripción
85°C	5 minutos	Inactivación de la enzima

### 3.2.3. Preamplificación del ADNc

El ARN extraído del tejido parafinado se preamplificó usando el kit TaqMan Preamp Master Mix kit (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen final de la reacción de amplificación fue de 10 uL, y añadimos 100 ng de ADNc total por reacción. Empleamos el protocolo de preamplificación de 14 ciclos descrito en las instrucciones del fabricante (**Tabla 8**).

**Tabla 8. Protocolo de temperaturas para la preamplificación de ADNc**

Temperatura	Tiempo	Repeticiones	Función
95°C	10 minutos	1x	Activación de la enzima
95°C	15 segundos	14x	Desnaturalización del ADN
60°C	4 minutos		Apareamiento con los cebadores y extensión del ADN

Tras la preamplificación, las muestras se diluyeron 1:20 previamente a la realización de la PCR cuantitativa.

### 3.2.4. PCR cuantitativa a tiempo real

Cada reacción de PCR cuantitativa a tiempo real se realizó por triplicado (réplicas técnicas), según el protocolo indicado por el fabricante para las sondas Taqman (ThermoFisher) y la master mix de TaqMan para qPCR (ThermoFisher). El volumen final de cada reacción fue de 10 uL, que contenían 5 uL de la master mix, 2.5 uL de la sonda TaqMan del gen en estudio, y 2.5 uL de muestra de ADNc. La concentración de las muestras de ADNc fue de 25 ng/uL en el caso de las muestras no preamplificadas. En las muestras previamente preamplificadas, se usaron 2,5 uL de la dilución 1:20 de la reacción de preamplificación. Además, para cada sonda se llevó un control negativo (sin muestra de ADNc), para descartar contaminaciones en el agua, en la mezcla madre o en la sonda. Se siguió un protocolo de termociclación de 40 ciclos, detallado en la **Tabla 9**.

**Tabla 9. Protocolo de termociclación de la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real**

Temperatura	Tiempo	Repeticiones	Función
95°C	10 minutos	1x	Activación de la enzima
95°C	15 segundos	40x	Desnaturalización del ADN
60°C	1 minuto		Apareamiento con los cebadores y extensión del ADN

La cuantificación relativa de la expresión de ARNm se determinó a partir de los valores Ct obtenidos en la reacción, definiendo Ct como el número del ciclo en el que

se detecta señal de amplificación del gen diana por encima de un umbral predeterminado, que permite discernir entre una señal de amplificación real y ruido. Para cada muestra se calculó la media de tres replicados técnicos para cada gen, y este valor medio de Ct se normalizó con el Ct del gen endógeno (Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, GAPDH, para extractos de líneas celulares y Beta-2-microglobulina, B2M, para extractos de tumores), obteniéndose el valor  $\Delta Ct$ . Los niveles de expresión se representaron en la forma  $2^{-\Delta Ct}$ , más intuitiva debido a que valores más altos de  $2^{-\Delta Ct}$  indican mayor expresión del gen<sup>160,161</sup>.

En el caso de la determinación de expresión de ARNm en extractos procedentes de líneas celulares, se calculó la media y desviación estándar de los valores de  $2^{-\Delta Ct}$  procedentes de tres replicados biológicos independientes.

### 3.3. *Análisis de la expresión a nivel proteico*

#### 3.3.1. *Extracción proteica de líneas celulares*

Las células se lavaron con PBS dos veces y se añadió sobre ellas un volumen apropiado de tampón de lisis. Los lisados celulares se recogieron mediante raspado, en hielo, y se añadieron a un tubo. Los restos de debrís celular se eliminaron por centrifugación a 15000 x g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante (extracto proteico) se guardó en alícuotas a -80°C. El tampón de extracción proteica usado fue RIPA (Sigma), suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete Mini EDTA-free, Roche) y un cóctel de inhibidores de fosfatasas (PhosSTOP EASYpack, Roche) a la concentración recomendada por el fabricante. La cuantificación de los extractos proteicos se realizó usando el método Bradford modificado (BioRad), según las instrucciones del fabricante, utilizando como control concentraciones conocidas de albumina sérica (BSA).

#### 3.3.2. *Extracción proteica de tejido tumoral*

También se obtuvieron lisados de proteína a partir de tumores procedentes de xenoinjertos en ratón conservados a -80°C. En estos casos se añadió el tampón de lisis sobre el fragmento de tejido previamente pulverizado en un mortero preenfriado con

nitrógeno líquido para evitar la descongelación del fragmento, se incubó en hielo durante 2 horas, agitando cada 10 minutos, y se recogió el volumen en tubos de 2ml que se centrifugaron a 15000 x g durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos de tejido sin disgregar, y el sobrenadante se guardó a -80°C. El tampón de extracción y el método de cuantificación usados fueron los mismos que en el caso de la extracción proteica de líneas celulares.

### 3.3.3. *Desnaturalización y conservación de las muestras*

Después de tomar la cantidad apropiada de proteína para realizar cada western blot (30-100 µg), se añadió a las muestras *tampón de carga 5X* (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 1%, 2-mercaptoethanol 5%, azul de bromofenol 0.0025% (Sigma)) y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C. Entonces se procedió a su carga en el gel de electroforesis para realizar el western blot, o se almacenaron a -20°C.

### 3.3.4. *Western blot*

La inmunodetección de proteínas se realizó de acuerdo a un protocolo estándar sobre membranas de PDVF (GE Healthcare). En primer lugar, los extractos proteicos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (con una concentración dependiente del tamaño de la proteína a detectar, de entre el 6 y 15%), utilizando el sistema Mini-Protean 3 (BioRad). Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS utilizando un tampón de electroforesis 1X Tris HCl 0.13 M, glicina 0.95 M, SDS 0.5% y se transfirieron a membranas de PDVF utilizando un equipo Trans-Blot Turbo (BioRad). La transferencia se realizó a 400 mA durante 3 horas en *tampón de transferencia* (TrisHCl 0.025 M, glicina 0.2 M, 20% metanol). Las membranas se bloquearon durante 1 hora en agitación con el tampón de bloqueo que contenía TBS, 0.1% Tween20 y 1% de BSA. Posteriormente las membranas se incubaron con la dilución adecuada de anticuerpo primario durante 16 horas a 4°C. Tras esta incubación, las membranas se lavaron con tampón de lavado (TBS 0,1% Tween-20) y se incubaron con una dilución 1:5000 del anticuerpo secundario apropiado conjugado con peroxidasa, durante una hora a temperatura ambiente. La detección se realizó

mediante una reacción quimioluminiscente (ECL Clarity, Biorad) y la visualización mediante un equipo de detección de luminiscencia (ChemiDoc, BioRad).

### 3.3.5. *Co-inmunoprecipitación de proteínas de membrana*

Se realizaron extractos proteicos como se indica anteriormente pero usando un tampón de extracción con la siguiente composición: 50 mM HEPES, 150 mM NaCl y al 1% de n-octilglucósido (Sigma), suplementado además con un cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete Mini EDTA-free, Roche) y de fosfatasa (PhosSTOP EASYpack, Roche). Se cuantificó la concentración proteica de los extractos como se indica previamente y se realizaron alícuotas de 2 mg de proteína total. En estas alícuotas, se realizó un pre-aclaramiento proteico mediante su incubación con 10  $\mu$ L de la resina EZ View Red Protein G Affinity Gel (Sigma), que se utilizó como sustrato de inmunoprecipitación, durante 2 horas a 4°C en agitación suave. A continuación, se retiró la resina mediante centrifugación a 6000 g a 4°C durante 1 minuto. En paralelo al pre-aclaramiento se realizó la conjugación de la resina con el anticuerpo primario contra la proteína a inmunoprecipitar, incubándose 10  $\mu$ L de resina con 2  $\mu$ g de anticuerpo por cada mg de proteína en la muestra, en tampón de lisis al 3% de seroalbúmina bovina (SAB), durante 2 horas en agitación suave a 4°C. Como control negativo de la inmunoprecipitación, se incubó una alícuota de la muestra proteica con partículas conjugadas a un anticuerpo inespecífico del mismo isotipo que el anticuerpo contra la proteína de interés, a la misma concentración que éste. A continuación, se realizaron tres lavados de la resina conjugada con el anticuerpo con tampón de lisis, centrifugando entre lavados 1 minuto a 6000 g a 4°C para retirar el tampón usado y añadir nuevo. Posteriormente, se incubó la resina con el anticuerpo con la muestra durante 16 horas en agitación suave a 4°C. A continuación, se realizaron 5 lavados de la resina con el inmunoprecipitado mediante la resuspensión de ésta con tampón de lisis y posterior centrifugación de 1 minuto a 6000 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 20-30  $\mu$ L de tampón de lisis y la cantidad apropiada de tampón de carga 5x, como indicado anteriormente. Entonces, se hirvieron las muestras 5 minutos a 95°C, tras lo cual se centrifugaron a 12000 g durante 3 minutos, y se conservó el sobrenadante para realizar con él el protocolo de western blot, y comprobar la detección tanto de la proteína inmunoprecipitada, como de la proteína co-inmunoprecipitada de interés.

Como control de la inmunoprecipitación, se conservaron dos alícuotas del extracto proteico, una anterior y otra posterior a la inmunoprecipitación.

### 3.3.6. *Cuantificación de la expresión proteica en el western blot*

Para cuantificar las bandas detectadas en los ensayos de western blot, se utilizó el software incluido en el equipo de detección de quimioluminiscencia (ImageLab, BioRad). Se cuantificó el volumen de la banda de nuestra proteína de interés y éste fue normalizado con el volumen de la banda correspondiente al gen de expresión constitutiva (alfa tubulina).

### 3.4. *Extracción de ADN de líneas celulares*

La extracción de ADN de las líneas celulares se realizó mediante el kit Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en la liberación del ADN genómico mediante lisis celular, y en su captura mediante columnas de afinidad a las que éste se une para ser posteriormente sometido a una serie de lavados que retiran las impurezas celulares. Finalmente, el ADN es eluido de la columna.

### 3.5. *Caracterización de las mutaciones de interés clínico en EGFR*

La determinación de mutaciones en el gen de EGFR se realizó mediante el kit Terascreen EGFR RGQ PCR Kit (Qiagen) y se confirmó mediante el test de mutaciones el EGFR Cobas v2 (Roche), siguiendo en ambos casos las instrucciones del fabricante.

## 4. **Técnicas de biología celular**

### 4.1. *Líneas celulares*

Se utilizó un panel de líneas celulares que contenía dos líneas celulares de pulmón inmortalizadas, cuatro líneas de carcinoma epidermoide de pulmón y doce líneas de adenocarcinoma, cuyas características moleculares se recogen en la siguiente tabla (**Tabla 10**).

### 4.2. *Cultivo de las líneas celulares*

Las líneas celulares se cultivaron siguiendo las indicaciones de la ATCC, suplementando además todos los medios con 40u/mL de penicilina (Sigma), 40 µg/mL de esteptomicina (Sigma), y 1 µg/mL de anfotericina B (Sigma), y con glutamina (Sigma) en el caso de los medios que no incluían en su composición glutamina estable. La única excepción fue A549, que se cultivó en medio DMEM suplementado con HEPES 0,01M (Sigma), piruvato de sodio 1mM (Sigma) y aminoácidos no esenciales 1X (Sigma), además de los suplementos anteriormente descritos. Las células se cultivaron en placas de 10 cm y se subcultivaron 1:4 cada 2-3 días mediante tratamiento con tripsina. La manipulación de las líneas celulares se realizó en una cabina de flujo laminar de tipo II-Bio-II-A (nivel de bioseguridad 2) y su cultivo se realizó en incubadores (ThermoScientific, Series 8000 Water-Jacketed CO<sub>2</sub> Incubators) al 95% de humedad relativa y al 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tabla 10. Panel de líneas celulares de pulmón**

Línea celular	Tipo histológico	Mutación conductora descrita	Referencia	Medio de cultivo
A549	ADC	KRAS p.G12S	<sup>162</sup>	DMEM suplementado con piruvato de sodio, HEPES y aminoácidos no esenciales
H460	ADC	KRAS p.Q61H	<sup>162</sup>	RPMI 1640
H2009	ADC	KRAS p.G12A	COSMIC	RPMI 1640
H358	ADC	KRAS p.G12C	<sup>162</sup>	RPMI 1640
H1650	ADC	EGFR E746-E750 del	<sup>163</sup>	RPMI 1640
H1975	ADC	EGFR L858R/T790M	COSMIC	RPMI 1640
HCC827	ADC	EGFR E746-E750 del	<sup>162</sup>	RPMI 1640
H3122	ADC	Translocación EML4-ALK v1	COSMIC	RPMI 1640
H2228	ADC	Translocación EML4-ALK v3	COSMIC	RPMI 1640
H1437	ADC	TN	COSMIC	RPMI 1640
H1781	ADC	EGFR L858R	Comprobado en el laboratorio	RPMI 1640
Calu-3	ADC	TN	<sup>162</sup>	DMEM
Calu-1	ESC	KRAS p.G12C	COSMIC	McCoy's 5 <sup>a</sup>
HTB59	ESC	KRAS p-G12V	COSMIC	McCoy's 5a
H520	ESC	TN	COSMIC, <sup>162</sup>	RPMI 1640
H226	ESC	TN	COSMIC, <sup>162</sup>	RPMI 1640
NL20	I	TN	COSMIC	F12 suplementado siguiendo las indicaciones de la ATCC
NuLi-1	I	TN	COSMIC	LHC9

ADC = Adenocarcinoma, ESC = Carcinoma epidermoide, TN = Triple negativo (nomenclatura referida a líneas celulares sin alteraciones en KRAS, EGFR o ALK), I = Inmortalizada

#### 4.3. Conservación de las líneas celulares

Las células se congelaron en criotubos de 2 mL en medio de cultivo rutinario suplementado con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y se congelaron inicialmente en contenedores con isopropanol en congeladores a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las células se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  a medio plazo y en contenedores con nitrógeno líquido a largo plazo. Para descongelar una línea celular criopreservada, el criotubo se sumergió en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 2 minutos. Una vez que la suspensión celular estaba descongelada, el contenido del criotubo se añadió a 5 mL de medio de cultivo y se centrifugó esta suspensión celular. El sobrenadante con DMSO se descartó y se añadió medio de cultivo fresco para resuspender el pelet obtenido, que se añadió finalmente a la placa de cultivo.

#### 4.4. *Transfección celular*

Las líneas celulares se transfectaron con el reactivo de transfección TransIT-X2 (Mirus), siguiendo las instrucciones del fabricante. La transfección con este reactivo se basa en la utilización de liposomas catiónicos que forman complejo con el ADN y permiten su introducción al núcleo celular. Veinticuatro horas antes de la transfección se sembraron las células en placas de 6 pocillos, buscando aproximadamente un 40% de confluencia en cada pocillo para el día de la transfección. Antes de la transfección, se cambió el medio a las células añadiendo 2,5 mL de medio. A continuación se añadieron las partículas de transfección con el ADN y las células se incubaron con éstas durante 72 horas. Tras este tiempo, las células se pasaron a placas de 10 cm y, una vez adheridas a la placa (tras unas 24 horas), se añadió medio fresco con el antibiótico de selección a la concentración adecuada (**Tabla 11**). Como control negativo de la transfección se utilizó una placa con la línea celular sin transfectar también expuesta al medio de selección. Durante el proceso de selección de las células transfectadas (3 ó 4 semanas), el medio de cultivo con antibiótico se fue renovando 3 veces por semana. Tras este periodo, se comprobó que en el control negativo ninguna célula sobreviviera. Las colonias generadas se tripsinizaron y se sembraron en una nueva placa,

estableciendo un *pool* de los diferentes clones transfectados, con el que se constituyó una línea celular transfectada estable. En la línea generada se confirmó la sobreexpresión o silenciamiento realizado y se criopreservó. Durante el cultivo de las líneas generadas se mantuvo el antibiótico de selección a la mitad de concentración de la utilizada previamente. En cada transfección se utilizó el antibiótico apropiado a la concentración indicada, según el plásmido transfectado y la línea celular: puromicina (Calbiochem), blasticidina (Sigma) o G418 (Santa Cruz) (**Tabla 11**). En el caso de las transfecciones con plásmidos con un gen reportero (GFP) se amplificaron las células y posteriormente se separaron las transfectadas mediante un separador celular por citometría de flujo usando el equipo BD LSRFortessa (BD).

**Tabla 11 .Concentraciones de antibióticos empleadas para la selección de células transfectantes en este proyecto de tesis, para cada línea celular**

Línea celular	Concentración		
	G418	Puromicina	Blasticidina
A549		2 ug/mL	
H460	2 mg/mL		
H2009	1 mg/mL		3 ug/mL
H1650	1 mg/mL		
H1975	1 mg/mL		
HCC827	1 mg/mL		
H3122	2 mg/mL		3 ug/mL
Calu-3		2 ug/mL	
Calu-1	1 mg/mL		
H520		2 ug/mL	2 ug/mL
H226	1 mg/mL		
NL20	1 mg/mL	1 ug/mL	2 ug/mL

En el caso de las transfecciones de ARNs de interferencia (shRNAs), se generaron dos líneas estables con silenciamiento de la expresión del gen de interés, utilizando en cada una un ARN de interferencia diferente, a fin de asegurar que los efectos observados posteriormente no derivaban del silenciamiento inespecífico de la expresión de un gen diferente al de interés.

En el caso de realizar co-transfecciones de más de un plásmido en una misma línea celular, las transfecciones se realizaron de forma independiente y subsecuente. Los antibióticos de selección de los plásmidos transfectados se mantuvieron en el

medio a la concentración de mantenimiento para mantener una presión selectiva, combinando dos o tres antibióticos. El único momento en que el/los antibiótico/s de selección no estuvieron presentes fueron durante el periodo de incubación de las células con el reactivo de transfección (72 horas), ya que éstos podrían interferir con la transfección, disminuyendo su eficiencia.

#### 4.5. *Ensayos subrogados de tumorigenicidad*

En estos ensayos, cada experimento se repitió un mínimo de tres veces independientes a fin de confirmar los resultados. Además, dentro de cada repetición del experimento, cada condición se sembró por triplicado.

##### 4.5.1. Ensayo de clonabilidad

Se sembró un número de células de entre 1000 y 5000 células, según la línea celular, en placas de 10 cm. El medio se renovó una vez a la semana durante 2 o 3 semanas dependiendo de la línea celular. Tras este tiempo, las células se fijaron con una solución de glutaraldehído en PBS al 0.5% durante 20-30 minutos y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 1% en agua. Tras lavar y secar las placas, se cuantificó el número de colonias.

##### 4.5.2. Curva de crecimiento

Se sembraron 3500 células por pocillo en placas de 12 pocillos. A las 24 horas (día 0) se fijaron las células del primer punto de la curva, y cada 24-48 horas se fijó un nuevo punto de la curva y se cambió el medio al resto. En el caso de las curvas con baja concentración de SFB, el día 0 se realizó el cambio de medio a medio al 0,5% de SFB tras dos lavados con PBS para retirar los restos de suero. Las placas fijadas se conservaron con las células en PBS a 4°C hasta que todos los puntos de la curva estuvieron fijados. Entonces, se tiñeron las placas con cristal violeta durante 20 minutos. Posteriormente, las placas se lavaron y se dejaron secar. Una vez secas, se añadió un volumen fijo por pocillo de ácido acético al 20% para diluir el cristal violeta, y se midió la absorbancia a 595nm en un equipo de lectura óptica VICTOR

(PerkinElmer). Todas las absorbancias se normalizaron con respecto a la absorbancia del día 0 de cada condición experimental. Por último, se representó este valor normalizado (crecimiento relativo al día 0) con respecto al tiempo.

También se realizaron curvas de crecimiento en presencia de fármacos. En éstas, se sembraron las células de la manera indicada anteriormente, y a las 24 horas se les retiró el medio y se les añadió medio con fármaco. La duración de estos experimentos fue de 72 horas, fijando una placa cada 24 horas. El resto del procedimiento se realizó como se ha descrito previamente.

#### 4.5.3. Crecimiento libre de anclaje (Ensayo de agar blando)

Se resuspendieron 100.000 células/pocillo en medio con agarosa al 0.35%, que se sembraron sobre una base de medio con agarosa al 0.7% previamente solidificado, en placas de 6 pocillos. Tras 24 horas se añadieron 3 mL de medio completo a cada pocillo, que se renovó dos veces por semana. Tras uno o dos meses, dependiendo de la línea en ensayo, se tomaron un mínimo de 10 fotos por pocillo de las colonias por medio de un microscopio (#IX2-SLP, Olympus) con cámara integrada (#U-CMAD3, Olympus). En estas fotos se cuantificó el número de colonias y se determinó su tamaño.

#### 4.6. *Estimulación de líneas celulares con factores de crecimiento*

Se sembraron las células, y al alcanzar un 60-70% de confluencia se incubaron durante 5 horas con medio sin SFB, para obtener un estado basal de fosforilación de las proteínas implicadas en las rutas oncogénicas de interés. Entonces, por un lado se obtuvieron extractos proteicos correspondientes al estado basal, y por otro lado se procedió a la estimulación con diferentes factores de crecimiento añadiendo medio sin suero con FGF1 (50ng/mL, Immunostep), FGF19 (100ng/mL, Immunostep), EGF (50ng/ml, Immunostep), o SFB al 10%. Las células se estimularon durante 15 minutos y se procedió a la extracción proteica (explicada en el apartado 2.3.1).

#### 4.7. *Co-inmunolocalización*

Se sembraron y se fijaron las células en cubreobjetos estériles con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos. Tras dos lavados con PBS, las células se impermeabilizaron con una solución al 0,1% de Tritón X-100 en PBS durante 5 minutos. Después se incubaron durante una hora en solución de bloqueo (PBS, 0.1% Tritón X-100, 1% SAB) a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con la dilución apropiada en solución de bloqueo de anticuerpo primario (**Tabla 6**), durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras tres lavados con PBS 0.1% Tritón X-100 de 5 minutos de duración y en agitación, se incubaron las células con el anticuerpo secundario a la dilución apropiada (**Tabla 6**), en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente. En un microscopio confocal (SP5-WLL), se realizaron fotos de al menos 20 células por condición experimental en las distintas réplicas del experimento para analizar la co-localización de las proteínas en estudio.

#### *4.8. Determinación de la inhibición del crecimiento de líneas celulares producida por fármacos en monoterapia*

Para determinar la sensibilidad a diferentes fármacos se empleó el ensayo de citotoxicidad con determinación de la inhibición del crecimiento IC50, que sirve para calcular la concentración de fármaco a la cual la proliferación celular se reduce al 50% con respecto al control no tratado. Para realizar este ensayo, se sembraron en placas de 96 pocillos tres filas de 12 columnas con cada línea celular en ensayo, y se añadieron concentraciones decrecientes de fármaco en las 11 primeras columnas, dejando la última sin tratar. Este rango de concentraciones se decidió en primer lugar buscando en la bibliografía los valores de IC50 de líneas celulares similares para el fármaco en estudio, y se fue ajustando en función de la sensibilidad de la línea. Tras 96 horas de exposición al fármaco, las células se fijaron y se tiñeron con cristal violeta, como se ha indicado anteriormente, y las placas se lavaron y se dejaron secar. A continuación, el cristal violeta adherido a las células se disolvió en una solución de ácido acético al 20% y la absorbancia (595 nM) se midió en un equipo detector VICTOR (PerkinElmer). Posteriormente, se calculó la concentración que inhibía el 50% del crecimiento mediante el software de análisis bioestadístico GraphPad Prism.

#### 4.9. *Determinación de la sensibilidad a fármacos en combinación*

Para determinar el efecto de la combinación de diferentes inhibidores se realizaron igualmente ensayos con determinación de la IC50. A partir de la IC50, se calculó para cada inhibidor de FGFR la concentración que inhibía el 20% del crecimiento (IC20) y se seleccionó el valor medio de concentración correspondiente a la IC20, así como el doble de esta concentración. Estas concentraciones se combinaron con concentraciones decrecientes del inhibidor EGFR en ensayo para calcular la IC50 del inhibidor frente a EGFR combinado con el de FGFR. Para determinar el efecto de la combinación de dos fármacos, se utilizó la fórmula del método de Chou-Talalay<sup>164</sup>. Esta fórmula calcula el índice de combinación (CI), comparando la sensibilidad a los dos fármacos en combinación con respecto a las sensibilidades de los fármacos por separado, e informa sobre si la combinación de dos fármacos tiene un efecto antagónico (CI>1), aditivo (CI=1), o sinérgico (CI<1). La fórmula empleada para su cálculo es la siguiente:

$$CI = \frac{IC50 \text{ Fármaco1 en combinación}}{IC50 \text{ Fármaco1 en monoterapia}} + \frac{\text{Concentración del fármaco2 en combinación}}{IC50 \text{ Fármaco2 en monoterapia}}$$

## 5. Técnicas de experimentación animal

### 5.1. *Xenoinjertos con líneas celulares en ratones inmunodeprimidos*

Se contaron las células de la línea celular a xenoinjertar y en cada caso se preparó a una concentración final de 2 millones de células en 100 µL de PBS. A continuación, se añadió solución de Matrigel (BD, #356234) a la suspensión celular en PBS, a razón de 1:1. Se inyectaron subcutáneamente 200 µL de esta mezcla, en ambos flancos de ratones desnudos inmunodeprimidos de 5-6 semanas de edad, bajo anestesia por inhalación de isofluorano.

## 5.2. *Xenoinjertos de tumores derivados de pacientes (PDXs)*

Para establecer los PDXs los tumores extraídos quirúrgicamente de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico fueron troceados e implantados cubiertos de Matrigel (BD) en el flanco de ratones desnudos inmunodeprimidos de 5-6 semanas de edad, bajo anestesia por inhalación de isofluorano y bajo analgesia por buprenorfina. Para realizar el implante, se realizó un pequeño corte en el flanco del ratón y se introdujo un fragmento tumoral de unos 100-150 mm<sup>3</sup> de volumen. Una vez los tumores alcanzaron un volumen de 1000 mm<sup>3</sup> se sacrificó al animal que los portaba, y se trocearon. Algunos de los fragmentos tumorales fueron implantados en más ratones para expandir el modelo, y otros fueron criopreservados para implantar después en un mayor número de ratones y realizar los tratamientos que permitirán realizar los experimentos de evaluación terapéutica. Además, algunos fragmentos fueron fijados con formaldehído y conservados en parafina, o congelados para su posterior caracterización.

Cada uno de los modelos PDXs fue caracterizado para diferentes alteraciones genómicas de relevancia clínica mediante secuenciación masiva (mutación en KRAS, en EGFR,...), así como para la expresión de las proteínas de interés mediante western blot, lo que permitió su selección para la realización de los tratamientos con inhibidores tirosina quinasa.

## 5.3. *Determinación del crecimiento tumoral de los xenoinjertos*

El tamaño de los tumores generados por los xenoinjertos se midió semanalmente, o dos veces por semana en el caso de los tratamientos, mediante un calibre de medición. Se tomó medida de la longitud más corta y de la más larga de cada tumor y el volumen tumoral se calculó con la fórmula:

$$0,5 \times (\text{dimensión más larga}) \times (\text{dimensión más corta})^2$$

Se representó la media de los volúmenes tumorales normalizados con respecto al tiempo. Ésta se calculó normalizando el volumen tumoral de cada medida a la

primera realizada (15 días tras la implantación). El error medio se calculó con la fórmula: desviación estándar/ $\sqrt{n}$ , donde n es el número de tumores en cada grupo.

Una vez que los tumores alcanzaron los 1000 mm<sup>3</sup> de volumen, los ratones fueron sacrificados y los tumores extraídos. Se realizó la necropsia completa de estos ratones en busca de tejidos que pudieran estar alterados, y se recogió una muestra de éstos en caso de estarlo, que fue fijada en formalina y conservada en parafina para su posterior análisis. Las muestras tumorales fueron troceadas y un fragmento fue fijado en formalina e incluido en parafina para su conservación. El resto de la muestra tumoral se troceó y se congeló rápidamente en criotubos, para su conservación a -80°C y posterior extracción de ADN, ARN o proteína.

Los procedimientos realizados con animales fueron aprobados por el Comité de Protección Animal de la Comunidad autónoma de Madrid (PROEX 084/15 y PROEX134/16).

#### 5.4. *Tratamientos de xenoinjertos de líneas celulares y PDXs*

Se realizaron tratamientos con algunos de los inhibidores de FGFR y EGFR mencionados en el *apartado 1.6* para comprobar su efecto en el crecimiento de los tumores (los xenoinjertos de líneas celulares o PDXs). Para esto, se implantó el modelo de interés en 4-6 ratones por grupo de tratamiento a realizar como se indica anteriormente, y se siguió el crecimiento de los tumores generados. Al alcanzar éstos un volumen de entre 100 y 150 mm<sup>3</sup>, los ratones se distribuyeron en los diferentes grupos de tratamiento, con una media y desviación estándar similar de tamaño tumoral en cada grupo, y dejando un grupo control tratado con el vehículo, como referencia. Tras el establecimiento de los grupos, se comenzaron los tratamientos, de entre 3 y 5 semanas de duración, dependiendo de la velocidad de crecimiento de cada modelo y del fármaco o fármacos utilizados.

Las concentraciones de fármacos utilizadas fueron de 7.5 mg/kg/día administrado de lunes a viernes, en el caso de AZD4547 en monoterapia. En los tratamientos combinados de erlotinib y AZD4547, se administró AZD4547 a 5

mg/kg/día de lunes a viernes, en monoterapia o en combinación con erlotinib. La concentración de erlotinib, tanto en el grupo en monoterapia como en el grupo en combinación con AZD4547, fue de 50 mg/kg/día en el caso de los modelos que presentaban algún indicador de resistencia a erlotinib (generalmente la mutación T790M en EGFR), o de 20 mg/kg/día en el resto de modelos, tratándose de lunes a viernes en ambos casos. La vía de administración de todos los fármacos fue la oral. Al final del tratamiento, los ratones fueron sacrificados y los tumores procesados y almacenados como se indicó anteriormente.

El crecimiento de los tumores se muestra mediante gráficas de crecimiento tumoral frente al tiempo, donde se relativiza cada medida del volumen tumoral a la inicial tras comenzar el tratamiento, y se representa la media y el error medio para cada grupo de tratamiento. La variación de volumen tumoral se representa mediante gráficos de barras, que muestran el incremento (o decrecimiento), expresado en porcentaje, del volumen de cada tumor con respecto al volumen inicial, en cada grupo de tratamiento.

## 6. Cohortes clínicas

Se realizaron estudios de cohortes de carácter observacional y retrospectivo. Para la realización de tales estudios se utilizaron series de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico a fin de validar los resultados obtenidos.

### 6.1. Cohortes de estudio para la determinación del papel pronóstico de *FGFR1* y *FGFR4*

#### 6.1.1. Cohorte de descubrimiento

Se utilizó una cohorte de 109 pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón no microcítico en estadio temprano (I-IIIa) tratados con cirugía radical, del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla) y del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid). El proyecto de investigación fue valorado y aprobado por el comité ético del Hospital Virgen del Rocío (2012PI/241). Los pacientes firmaron el preceptivo consentimiento informado del biobanco del hospital. Las muestras de tejido fueron

etiquetadas, manteniendo anónima la identidad e información personal de todos los pacientes incluidos en el proyecto. El tratamiento de los datos de carácter personal se atuvo a la normativa vigente, el RD233/2004 de 6 de Febrero y la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de Diciembre sobre protección de datos de carácter personal. Las características clínico-patológicas de interés fueron obtenidas de la historia del paciente y registrados en una base de datos que incluyó los siguientes parámetros: edad, sexo, raza, subtipo histológico, diferenciación tumoral, estadio TNM al momento de la cirugía, hábito tabáquico, principales tratamientos médicos y quirúrgicos recibidos, y resultados terapéuticos de los mismos. Las características de la cohorte se encuentran resumidas en la **tabla 12**. Se analizaron las muestras de tejido tumoral incluidas en parafina de todos los casos a estudio, tras realizarse el diagnóstico anatomopatológico. Finalmente se integraron en una base de datos conjunta la información molecular y clínica obtenida para establecer las correlaciones correspondientes de interés.

**Tabla 12. Características de nuestra cohorte de cáncer de pulmón no microcítico**

<b>Número de pacientes</b>	109
<b>Sexo</b>	
<b>Masculino</b>	100 (92%)
<b>Femenino</b>	9 (8%)
<b>Mediana de edad (años)</b>	65.0 [54.0-78.0]
<b>Hábito tabáquico</b>	
<b>Fumador</b>	56 (51.3%)
<b>Ex-fumador</b>	48 (44.1%)
<b>No fumador</b>	5 (4.6%)
<b>Carcinoma epidermoide</b>	58 (53.2%)
<b>Estadio I-II</b>	43 (74.1%)
<b>Estadio III</b>	15 (25.9%)
<b>Adenocarcinoma</b>	36 (33%)
<b>Estadio I-II</b>	30 (83.3%)
<b>Estadio III</b>	6 (16.6%)
<b>Otras histologías</b>	15 (13.7%)

Las variables categóricas están representadas como número de pacientes (porcentaje del total) y las cuantitativas como mediana [rango intercuartílico].

### 6.1.2. Cohortes de validación

A fin de validar los resultados obtenidos en nuestra cohorte de descubrimiento, utilizamos la información clínica y de expresión de ARNm (ARNseq) de dos cohortes disponibles públicamente, procedentes del The Cancer Genome Atlas (TCGA), una de pacientes de adenocarcinoma (N=522) y otra de carcinoma epidermoide (N=504) (<http://cancergenome.nih.gov/>). Las características de estos pacientes se encuentran resumidas en la **tabla 13**. Puede observarse que las características de estas cohortes son similares a las de nuestra cohorte.

**Tabla 13. Características de las cohortes de adenocarcinoma y carcinoma epidermoide del TCGA**

<b>Histología</b>	<b>Adenocarcinoma</b>	<b>Carcinoma epidermoide</b>
<b>Número de pacientes</b>	522	504
<b>Sexo</b>		
<b>Masculino</b>	219 (37.9%)	314 (42.4%)
<b>Femenino</b>	253 (43.8%)	108 (21.2%)
<b>Desconocido</b>	106 (18.3%)	83 (16.4%)
<b>Mediana de edad (años)</b>	66.9 [59.6-73.4]	68.6 [62.3-73.8]
<b>Hábito tabáquico</b>		
<b>Fumador</b>	111 (19.2%)	113 (22.2%)
<b>Ex-fumador</b>	276 (47.8%)	284 (56.3%)
<b>No fumador</b>	71 (12.3%)	17 (3.4%)
<b>Desconocido</b>	120 (20.7%)	91 (18.1%)
<b>Estadio</b>		
<b>I</b>	252 (43.6%)	212 (41.4%)
<b>II</b>	115 (24.4%)	124 (24.3%)
<b>III</b>	79 (13.7%)	77 (15.2%)
<b>IV</b>	25 (4.3%)	6 (1.2%)
<b>Desconocido</b>	107 (18.5%)	86 (17,1%)

Las variables categóricas están representadas como número de pacientes (porcentaje del total) y las cuantitativas como mediana [rango intercuartílico].

## 6.2. Cohorte de pacientes tratados con inhibidores de EGFR

Se utilizó una cohorte de 47 pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón avanzado en el Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid), que no habiendo recibido terapia inhibitoria de EGFR previamente, fueron tratados con los inhibidores de EGFR erlotinib o gefitinib en primera, segunda o tercera línea. El proyecto de investigación fue valorado y aprobado por el comité ético del hospital. Los pacientes firmaron el preceptivo consentimiento informado del biobanco del hospital. Las características clínico-patológicas de interés fueron obtenidas de la historia del paciente y registrados en una base de datos que incluyó los siguientes parámetros: edad, sexo, estado general, estadio TNM, tratamiento recibido, y resultados terapéuticos del mismo. Las características de la cohorte se encuentran resumidas en la **tabla 14**. El análisis y tratamiento de los datos de carácter personal se realizó como se indica en el *apartado 5.1.1*.

**Tabla 14.** Características de las cohortes de adenocarcinoma tratados con inhibidores de EGFR

<b>Número de pacientes</b>	47
<b>Sexo</b>	
<b>Masculino</b>	25 (53.2%)
<b>Femenino</b>	22 (46.8%)
<b>ECOG</b>	
<b>0</b>	15 (31.9%)
<b>1</b>	17 (36.2%)
<b>≥2</b>	15 (31.9%)
<b>Estadio</b>	
<b>III</b>	2 (4.2%)
<b>IV</b>	45 (95.8%)
<b>Mutación en EGFR</b>	
<b>Sí</b>	25 (53.2%)
<b>No</b>	19 (40.4%)
<b>Desconocido</b>	3 (6.4%)
<b>Tratamiento</b>	
<b>Erlotinib</b>	32 (68.1%)
<b>Gefitinib</b>	15 (31.9%)
<b>Línea de tratamiento</b>	
<b>Primera</b>	18 (38.3%)
<b>Segunda</b>	11 (23.4%)
<b>≥Tercera</b>	18 (38.3%)

Las variables categóricas están representadas como número de pacientes (porcentaje del total) y las cuantitativas como mediana [rango intercuartílico].

## 7. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete de software estadístico SPSS (IBM) o GraphPad Prism, usando los test estadísticos que se detallan a continuación para obtener los p-valores. Se consideraron estadísticamente significativos aquéllos por debajo de 0.05.

### 7.1. Análisis de los experimentos *in vitro* e *in vivo*

Para analizar si las diferencias encontradas entre las diferentes condiciones testadas en los experimentos *in vitro* eran estadísticamente significativas, se realizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, en los valores correspondientes a las réplicas biológicas independientes de los experimentos. Para analizar si las diferencias de crecimiento de los tumores de las diferentes condiciones experimentales en los ensayos *in vivo* alcanzaban la significancia estadística, se realizó el mismo test en los valores correspondientes a los valores normalizados de los tamaños tumorales. Para determinar las diferencias entre valores de supervivencia de los ratones en los experimentos de xenoinjertos de líneas celulares, se realizaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y se utilizó el modelo de Log-Rank y el modelo de Cox de riesgos proporcionales para obtener los p-valores.

### 7.2. Análisis de las cohortes clínicas

Respecto a los datos clínicos, se usó el método de Kaplan Meier para el análisis de la supervivencia, usando el modelo de Log-Rank y el modelo de Cox de riesgos proporcionales para ajustar a las variables explicativas y obtener los p-valores. La supervivencia global se definió como el periodo de tiempo entre el diagnóstico y la

última revisión clínica o fallecimiento. La supervivencia libre de progresión se definió como el periodo de tiempo entre el diagnóstico inicial y el diagnóstico de recidiva en el caso de las cohortes para la determinación del papel pronóstico de FGFR1 y FGFR4, y como el periodo de tiempo entre el inicio del tratamiento y el diagnóstico de recidiva en la cohorte de pacientes tratados con inhibidores de EGFR.

# Resultados

---



## 1. Papel de FGFR1 y FGFR4 en cáncer de pulmón *in vitro* e *in vivo*

Para estudiar el efecto de FGFR1 y FGFR4 en cáncer de pulmón se utilizó un panel de 16 líneas celulares de cáncer pulmonar no microcítico representantes de las dos histologías más relevantes de esta patología, adenocarcinoma y carcinoma epidermoide. Se seleccionaron líneas celulares con las alteraciones moleculares de mayor relevancia terapéutica en cáncer de pulmón (mutación en KRAS, mutación en EGFR, translocación EML4-ALK), o líneas sin ninguna de las alteraciones citadas, a las que denominaremos “triple negativas”, y dos líneas celulares de pulmón inmortalizadas.

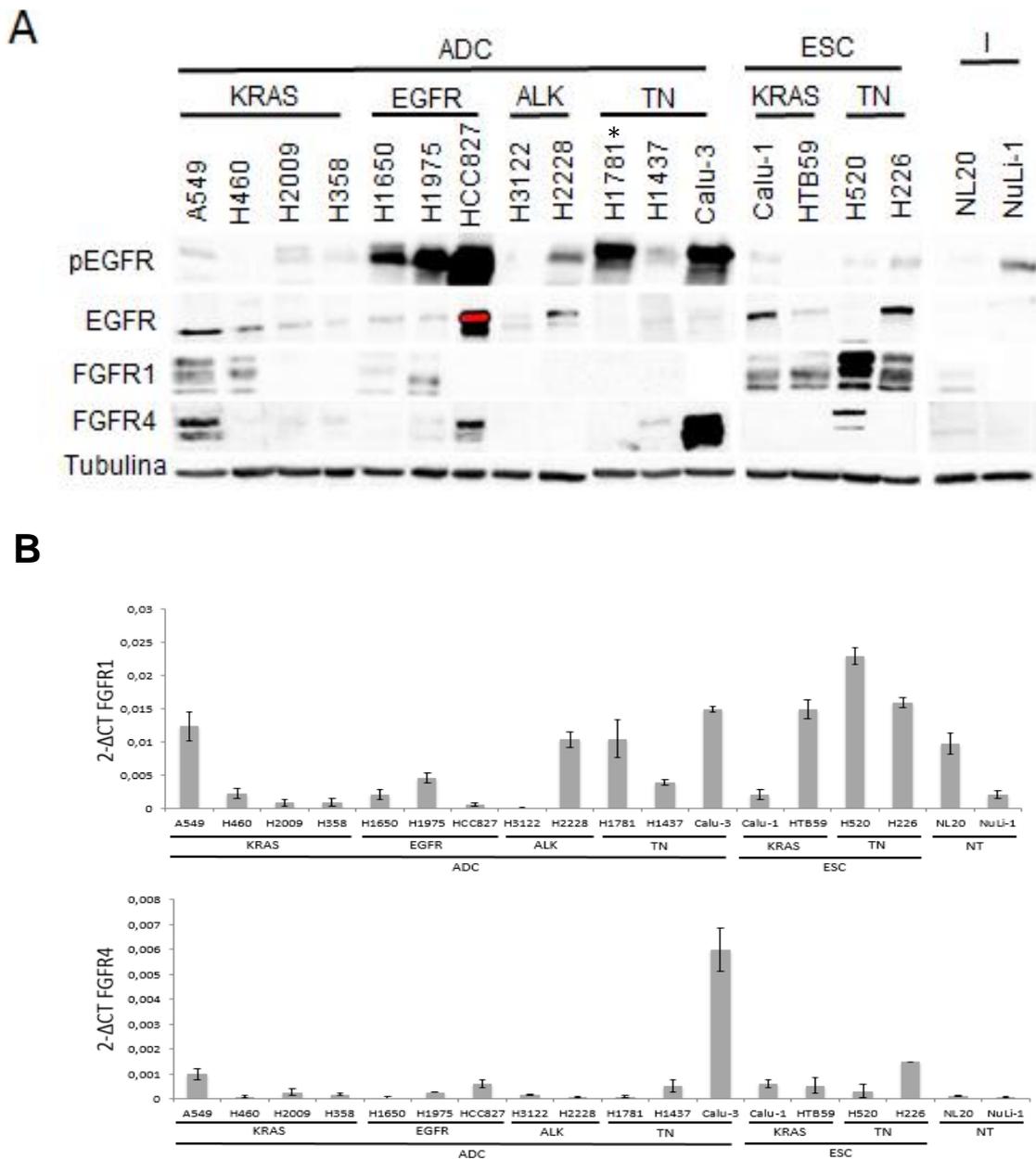
Se determinó la expresión de FGFR1 y FGFR4 a nivel proteico (**Figura 6A**) y a nivel de ARNm (**Figura 6B**). La expresión proteica de FGFR1 en las líneas celulares de adenocarcinoma fue baja en comparación con las líneas de carcinoma epidermoide. La expresión proteica de FGFR4 era menos frecuente y no se asociaba a ninguno de los tipos histológicos en estudio.

Igualmente, se identificó la expresión proteica de EGFR y el nivel de activación de este receptor midiendo su fosforilación (pEGFR). Se observó que dos líneas, descritas como triple negativas, mostraban activación constitutiva de EGFR. La caracterización del gen de EGFR en ADN de estas líneas mostró que la línea H1781 contenía la mutación L858R, mientras que la línea Calu-3 no presentaba ninguna de las alteraciones genómicas en EGFR de relevancia en clínica.

### 1.1. Papel de FGFR1 y FGFR4 en carcinoma epidermoide de pulmón

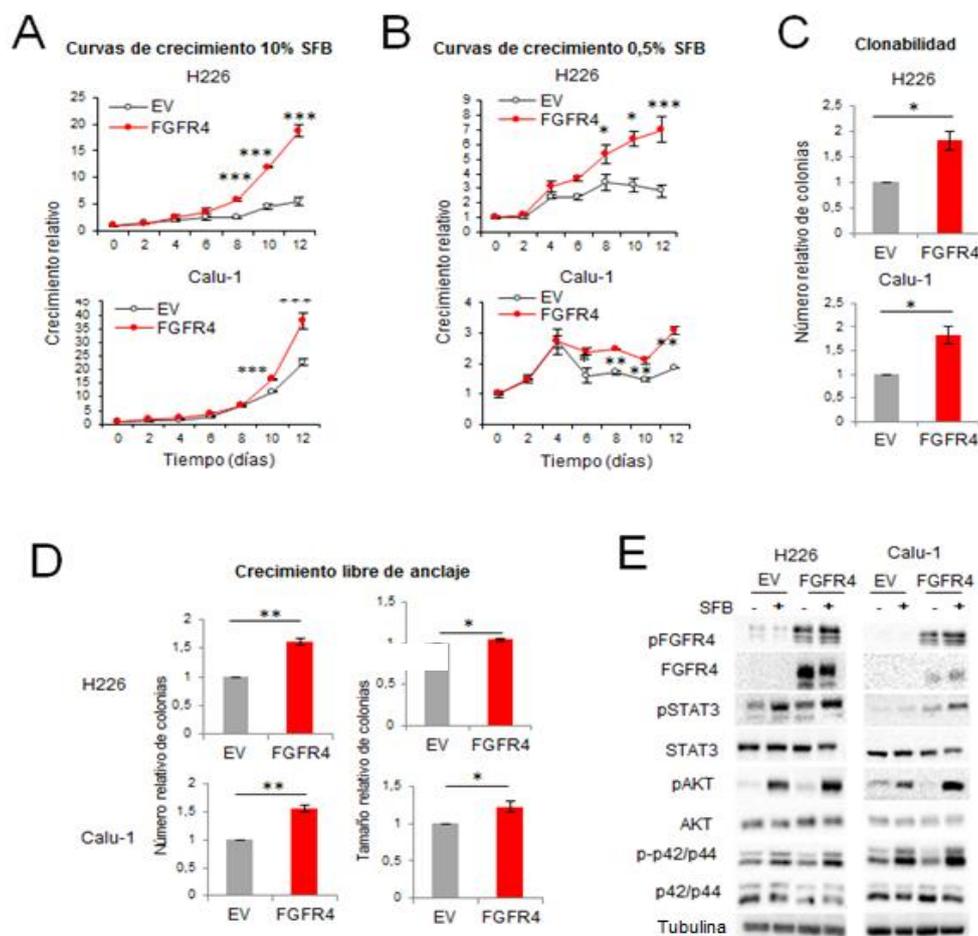
#### 1.1.1. Efecto de la sobreexpresión de FGFR4 en líneas celulares de carcinoma epidermoide

Para determinar el papel de FGFR4 en líneas celulares de carcinoma epidermoide, se sobreexpresó este gen en dos líneas celulares, H226 y Calu-1, que no mostraban expresión de FGFR4. No se realizó lo propio con FGFR1 porque todas las líneas de carcinoma epidermoide de nuestro panel expresaban altos niveles proteicos



**Figura 6. Determinación de la expresión de FGFR1, FGFR4, EGFR y EGFR fosforilado (pEGFR).** Determinación proteica (A) y de ARNm de FGFR1 y FGFR4 (B) en nuestro panel de líneas celulares de pulmón. ADC = Adenocarcinoma, ESC = Epidermoide, I = Inmortalizada, KRAS = KRAS mutada, EGFR = EGFR mutada, ALK = Portadora de translocación ALK-EML4, TN = Triple negativo (sin ninguna de las alteraciones previamente citadas). Esta imagen de western blot, debido al número de líneas celulares en estudio, fue resultado de la unión de imágenes diferentes de western blots realizados en paralelo y con una muestra común en ambas membranas. \* La línea H1781 está caracterizada en la literatura como triple negativa. Sin embargo, detectamos la mutación activadora de EGFR L858R en ella.

basales de FGFR1 de forma constitutiva. Se observó que la sobreexpresión de FGFR4 en Calu-1 y H226 aumentaba el crecimiento celular, la clonabilidad y la capacidad de generar colonias con independencia de anclaje, en comparación con las respectivas líneas control (**Figuras 7A-D**). También se estudió la activación de rutas de señalización pro-oncogénicas relacionadas con FGFR. Los western blot mostraron que la sobreexpresión de FGFR4 en estas dos líneas inducía su propia sobreactivación, además de la de las rutas de STAT3, ERK (p42/p44) y AKT (**Figura 7E**).



**Figura 7. Efecto de la sobreexpresión de FGFR4 en líneas de carcinoma epidermoide.** Curvas de crecimiento al 10% (A) y 0,5% (B) de SFB, clonabilidad (C) y crecimiento libre de anclaje (D). Medida de la activación de rutas de señalización relacionadas con FGFR por western blot (E). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se muestran curvas de crecimiento representativas. Para la clonabilidad y el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra la media y desviación estándar de las réplicas, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Para el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra además la media y desviación estándar del tamaño de las colonias. EV= vector vacío, FGFR4 = sobreexpresión de FGFR4, SFB = Suero fetal bovino. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

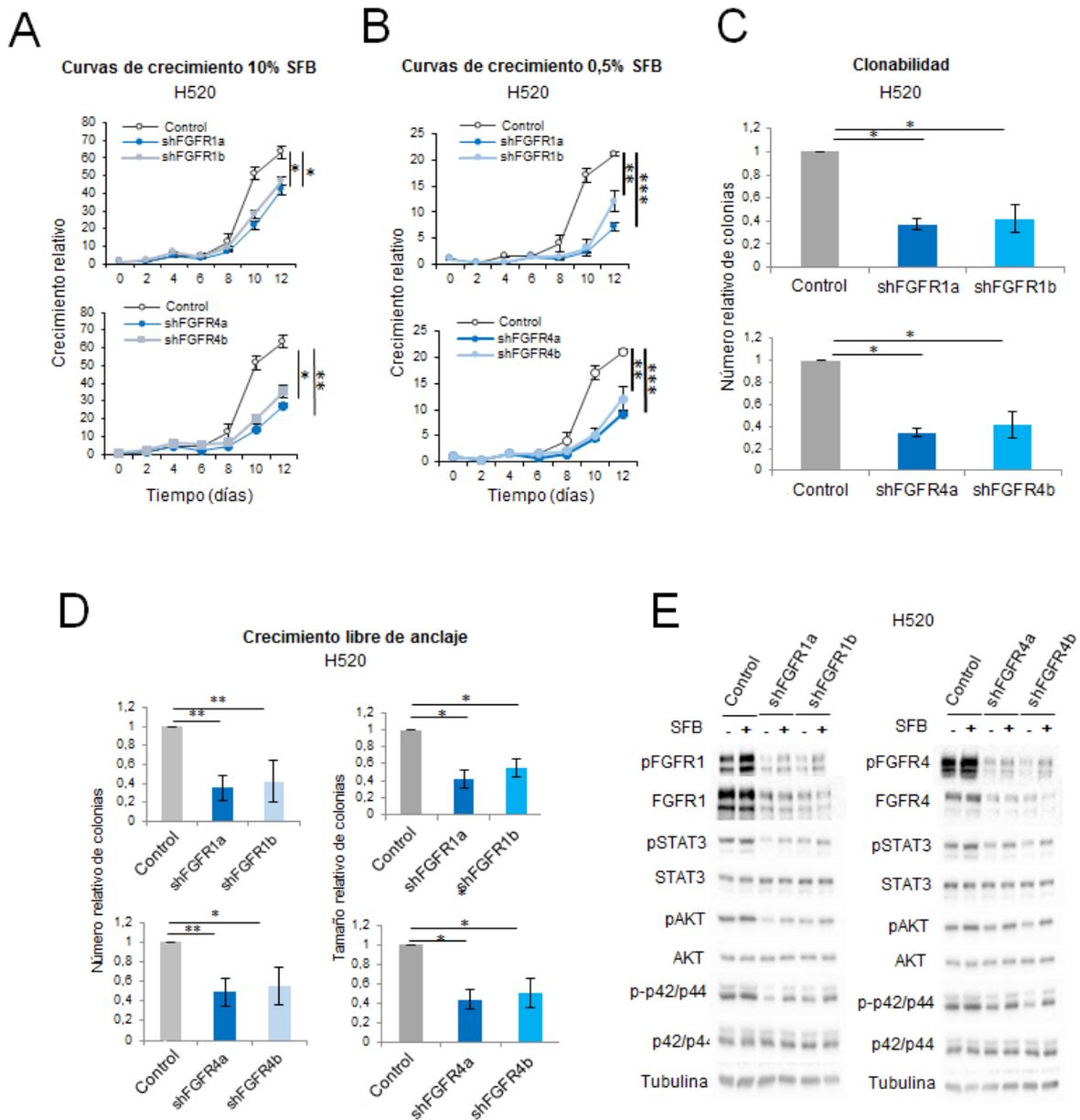
### 1.1.2. Efecto del silenciamiento de FGFR1 o FGFR4 en una línea celular de carcinoma epidermoide

Para comprobar el efecto pro-oncogénico de FGFR1 descrito en la literatura<sup>144</sup> y estudiar en más profundidad el papel de FGFR4 en diferentes propiedades tumorogénicas de las líneas celulares de carcinoma epidermoide, se silenciaron de forma independiente ambos genes en la línea celular H520, que mostraba alta expresión endógena de ambos genes. El silenciamiento de cualquiera de los dos genes resultó en una reducción de la proliferación, clonabilidad y crecimiento libre de anclaje (**Figura 8A-D**). En cuanto a la activación de las rutas de señalización oncogénicas en estudio, se observó que el silenciamiento de cualquiera de los dos genes producía una disminución de la activación del receptor FGFR silenciado, así como de las rutas de STAT3, AKT y ERK (p42/p44) (**Figura 8E**). Estos resultados, en combinación con los del apartado anterior, confirman el papel pro-oncogénico de FGFR1 en carcinoma epidermoide de pulmón descrito en la literatura, y sugieren un papel similar para FGFR4 en líneas celulares de esta histología de cáncer de pulmón.

### 1.2. Papel de FGFR1 y FGFR4 en adenocarcinoma de pulmón

Se estudió el efecto de FGFR1 y FGFR4 en las propiedades tumorogénicas en líneas celulares de adenocarcinoma con diferentes perfiles moleculares, con el fin de comprobar si su efecto era dependiente del contexto molecular. Para ello, seleccionamos una línea representativa de cada grupo de alteraciones moleculares de relevancia en adenocarcinoma, con baja expresión de ambos receptores, a fin de sobreexpresarlos de forma independiente. Las líneas seleccionadas fueron H2009 (con mutación en KRAS), H3122 (portadora de la translocación EML4-ALK), H1975 (con mutación de EGFR) y H1437 (triple negativa). Además, se seleccionó una línea celular de adenocarcinoma con alta expresión endógena de ambos FGFRs (A549, con mutación en KRAS) para silenciar ambos FGFRs individualmente.

El efecto de ambos FGFRs en las características tumorogénicas de estas líneas resultó ser opuesto entre las líneas celulares no dependientes de EGFR y aquéllas con activación constitutiva de este receptor. Por ello, describiremos los resultados obtenidos para ambos tipos de líneas por separado.



**Figura 8. Efecto del silenciamiento de FGFR1 o FGFR4 en una línea de carcinoma epidermoide.** Curvas de crecimiento al 10% (A) y 0,5% (B) de SFB, clonabilidad (C) y crecimiento libre de anclaje (D). Análisis de la activación de rutas de señalización relacionadas con FGFR (E). Se utilizaron dos ARNs de interferencia diferentes para evitar resultados debidos a efectos inespecíficos. Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado. Se muestran curvas de crecimiento representativas. Para la clonabilidad y el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra la media y desviación estándar de las colonias de las réplicas, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Para el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra además la media y desviación estándar del tamaño de las colonias. Control = ARN de interferencia inespecífico, como control, shFGFR1 = ARN de interferencia contra FGFR1, shFGFR4 = ARN de interferencia contra FGFR4, SFB = Suero fetal bovino. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

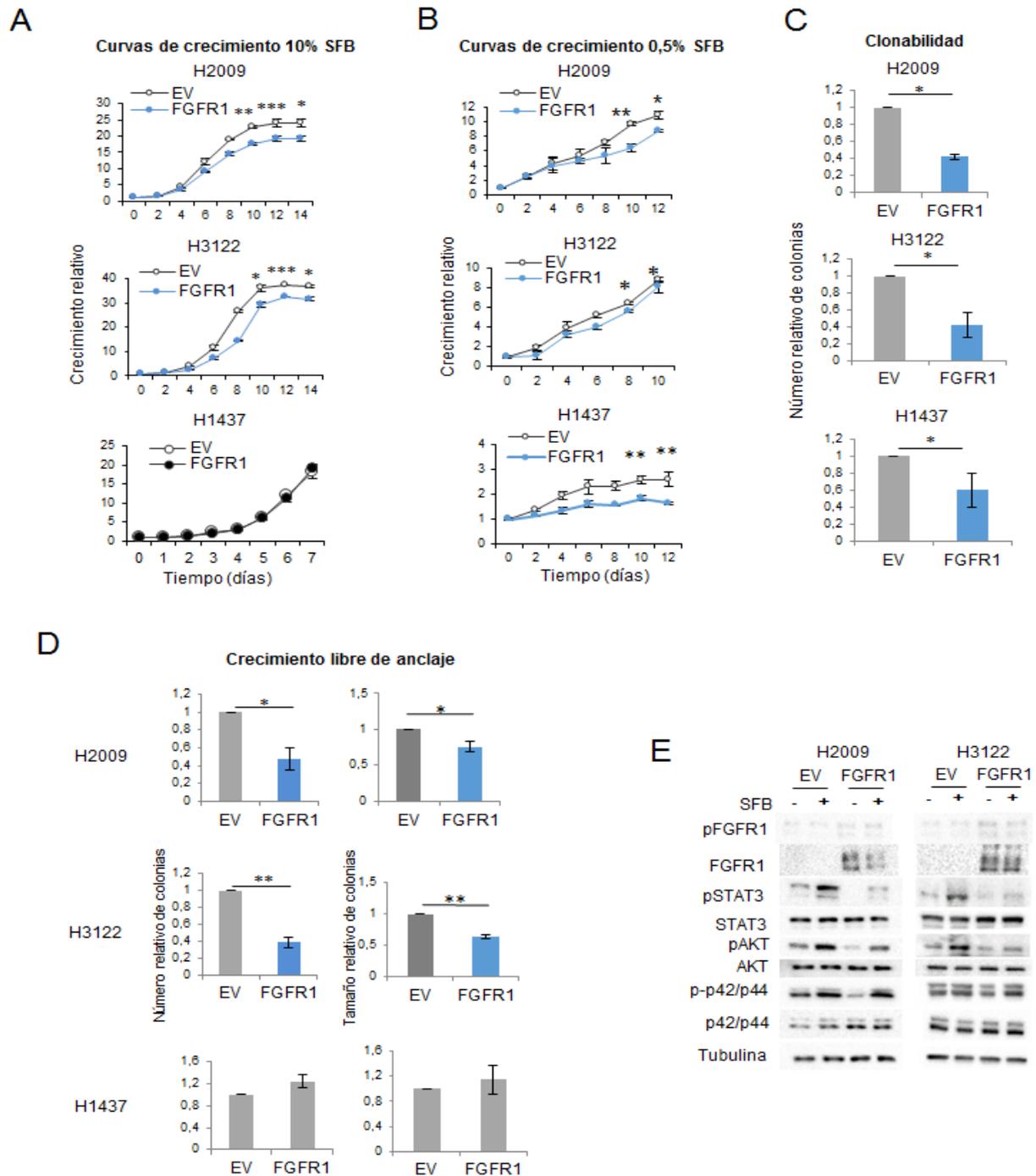
### 1.2.1. *FGFR1 y FGFR4 en adenocarcinoma de pulmón no dependiente de EGFR*

#### 1.2.1.1. *Efecto de la sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4 en líneas celulares de adenocarcinoma no dependientes de EGFR*

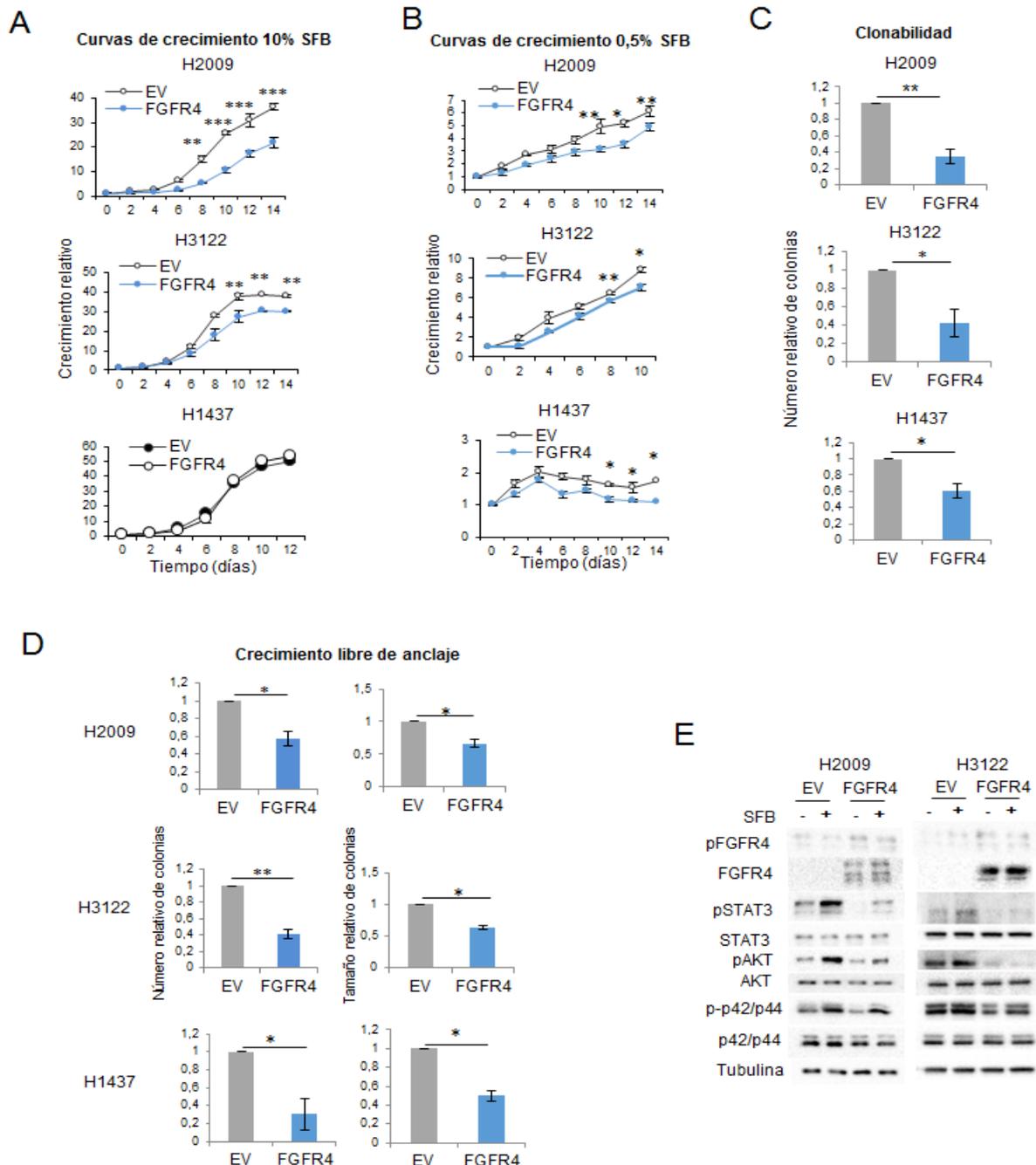
Las líneas celulares H2009 (con mutación en KRAS), H3122 (translocación EML4-ALK) y H1437 (Triple negativa) fueron transfectadas con un plásmido para sobreexpresar FGFR1, FGFR4, o con su correspondiente vector vacío, para generar líneas celulares estables. Las líneas H2009 y H3122 con sobreexpresión de FGFR1 mostraron una reducción de la proliferación celular, del número y tamaño de colonias en el ensayo de crecimiento libre de anclaje, y de su capacidad clonogénica, con respecto a sus respectivas líneas control con el vector vacío (**Figura 9A-D**). En el caso de H1437, los efectos de la sobreexpresión de los FGFRs fueron menos marcados. La sobreexpresión de éstos en esta línea produjo una disminución de la proliferación solo en condiciones de 0.5% SFB y en términos de la capacidad clonogénica. Sin embargo, no se observaron diferencias en la curva de crecimiento al 10% de SFB ni en el ensayo de crecimiento libre de anclaje.

A continuación se midió la activación de varias rutas de señalización relacionadas con FGFR en las líneas H2009 y H3122 y se observó una menor activación de STAT3 y AKT bajo las condiciones de sobreexpresión de FGFR1 (**Figura 9E**). Cabe destacar que la sobreexpresión de FGFR1 en estas líneas no indujo la sobreactivación del receptor sobreexpresado, como en el caso de las líneas de epidermoide.

La sobreexpresión de FGFR4 en H2009 y H3122 produjo los mismos efectos que la de FGFR1, con una reducción del crecimiento y de las propiedades tumorigénicas testadas (**Figura 10A-D**), así como de la activación de STAT3 y AKT (**Figura 10E**). En el caso de H1437, la sobreexpresión de FGFR4 solo redujo la proliferación al 0,5% de SFB. Sin embargo, la sobreexpresión de FGFR4 en esta línea sí produjo una disminución en el número y tamaño de las colonias generadas en el ensayo de agar blando, al compararlo con la línea control, además de una reducción de su capacidad clonogénica (**Figura 10A-D**).



**Figura 9. Efecto de la sobreexpresión de FGFR1 en líneas de ADC no dependientes de EGFR.** Curvas de crecimiento al 10% (A) y 0,5% (B) de SFB, clonabilidad (C) y crecimiento libre de anclaje (D). Estudio de la activación de rutas de señalización relacionadas con FGFR por western blot (E). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se muestran curvas de crecimiento representativas. Para la clonabilidad y el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra la media y desviación estándar de las réplicas, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Para el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra además la media y desviación estándar del tamaño de las colonias. EV = vector vacío, FGFR1 = sobreexpresión de FGFR1, SFB = Suero fetal bovino. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).



**Figura 10. Efecto de la sobreexpresión de FGFR4 en líneas de ADC no dependientes de EGFR.** Curvas de crecimiento al 10% (A) y 0,5% (B) de FBS, clonabilidad (C) y crecimiento libre de anclaje (D). Medida de la activación de rutas de señalización relacionadas con FGFR (E). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se muestran curvas de crecimiento representativas. Para la clonabilidad y el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra la media y desviación estándar de las colonias de las réplicas, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Para el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra además la media y desviación estándar del tamaño de las colonias. EV = vector vacío, FGFR4 = sobreexpresión de FGFR4, SFB = Suero fetal bovino. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

### *1.2.1.2. Efecto del silenciamiento de FGFR1 y FGFR4 en una línea de adenocarcinoma no dependiente de EGFR*

Una de las líneas de adenocarcinoma de nuestro panel, A549, con mutación en KRAS, expresaba niveles basales relativamente altos de FGFR1 y FGFR4. Para comprobar el efecto de ambos genes en las características tumorigénicas de esta línea, silenciamos ambos FGFRs de forma independiente usando ARN de interferencia (shRNA). En concordancia con los resultados obtenidos anteriormente, el silenciamiento de la expresión de cualquiera de los dos genes causó un aumento de la proliferación celular, así como un aumento en la generación de colonias en el ensayo de crecimiento libre de anclaje y en el tamaño de estas colonias, con respecto a la línea control. En los ensayos de clonabilidad, sin embargo, no se observaron diferencias en el número de colonias generadas en ninguno de los casos (**Figura 11A-D**). Cuando se midió la activación de STAT3 y AKT, se observó una mayor activación de estas rutas en las líneas con silenciamiento de FGFR1 o FGFR4, con respecto a la línea control, y lo mismo ocurría en el caso de ERK (p42/p44), si bien con un aumento de su activación menos marcado (**Figura 11E**).

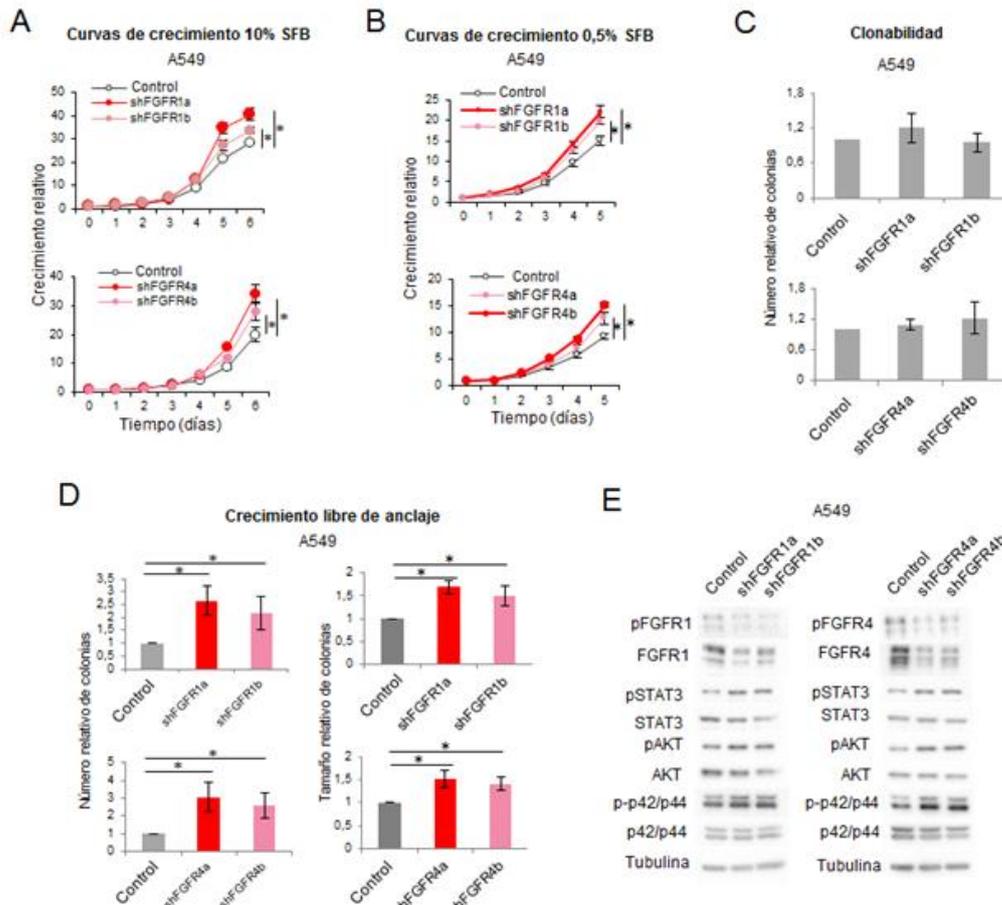
Estos datos sugieren que FGFR1 y FGFR4 podrían ejercer un papel como supresores tumorales en adenocarcinoma de pulmón no dependiente de EGFR.

### *1.2.2. Papel de FGFR1 y FGFR4 en adenocarcinoma de pulmón dependiente de EGFR*

#### *1.2.2.1. Efecto de la sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4 en líneas celulares de adenocarcinoma dependiente de EGFR*

Al contrario que para las líneas de adenocarcinoma previamente estudiadas, cuando se sobreexpresó FGFR1 o FGFR4 en la línea H1975 (con mutación en EGFR), las características tumorigénicas testadas se vieron aumentadas con respecto a la línea control. Para evaluar si estos efectos eran exclusivos de esta línea o si podían extenderse a más líneas con alteraciones en EGFR, se sobreexpresaron ambos FGFRs en las otras dos líneas EGFR mutadas de nuestro panel, HCC827 y H1650.

Se observó que tanto la proliferación como la clonabilidad se veían aumentadas en las tres líneas con FGFR1 sobreexpresado. En nuestras manos, solo una de las tres líneas celulares, HCC827, fue capaz de generar colonias en medio semisólido. El

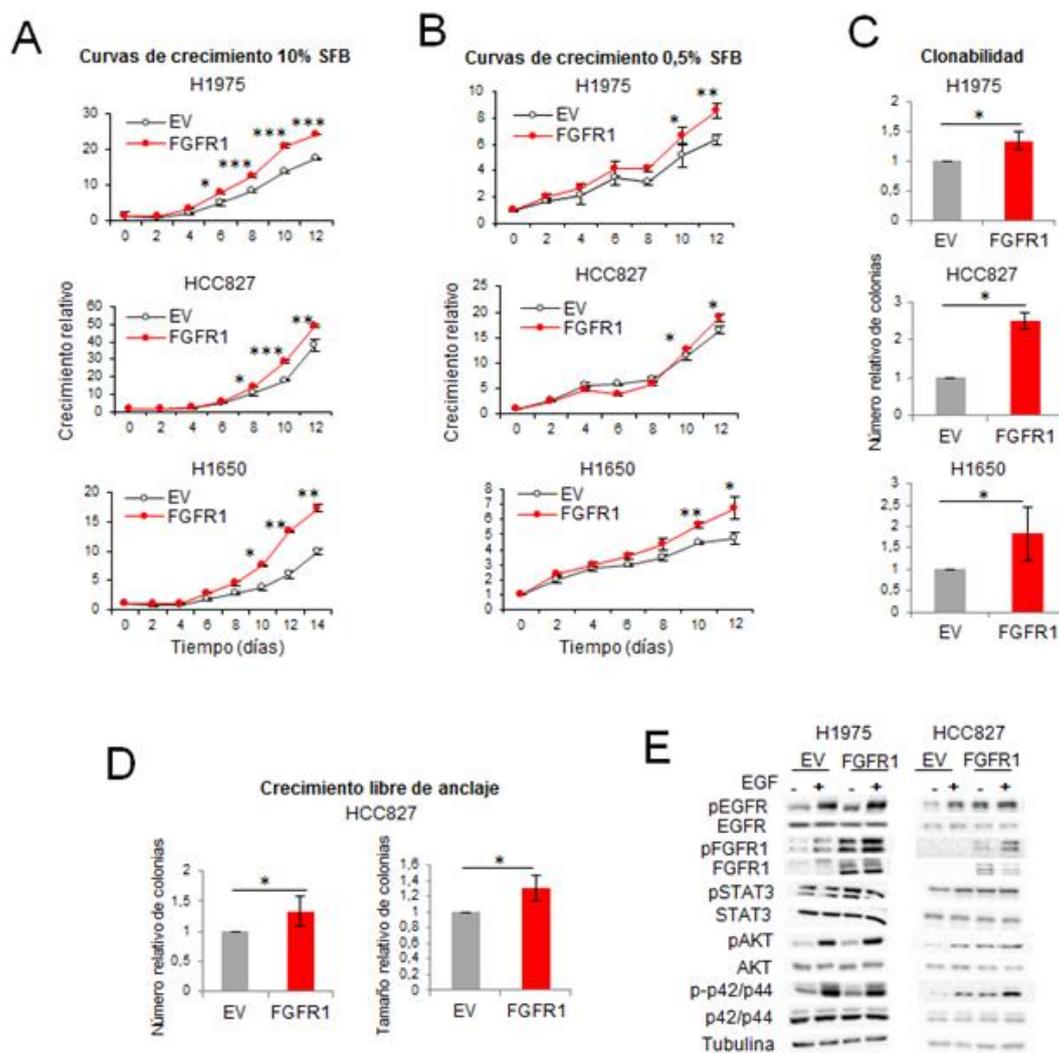


**Figura 11. Efecto del silenciamiento de FGFR1 o FGFR4 en una línea de adenocarcinoma no dependiente de EGFR.** Curvas de crecimiento al 10% (A) y 0,5% (B) de FBS, clonabilidad (C) y crecimiento libre de anclaje (D). Medida de la activación de rutas de señalización relacionadas con FGFR (E). Se utilizaron dos ARN de interferencia independientes para evitar resultados debidos a efectos inespecíficos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se muestran curvas de crecimiento representativas. Para la clonabilidad y el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra la media y desviación estándar de las réplicas, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Para el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra además la media y desviación estándar del tamaño de las colonias. Control = ARN de interferencia inespecífico, shFGFR1 = silenciamiento de FGFR1, shFGFR4 = silenciamiento de FGFR4, SFB = Suero fetal bovino. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

número de colonias producidas y su tamaño fueron mayores en condiciones de sobreexpresión de FGFR1, respecto a la línea control (**Figura 12A-D**).

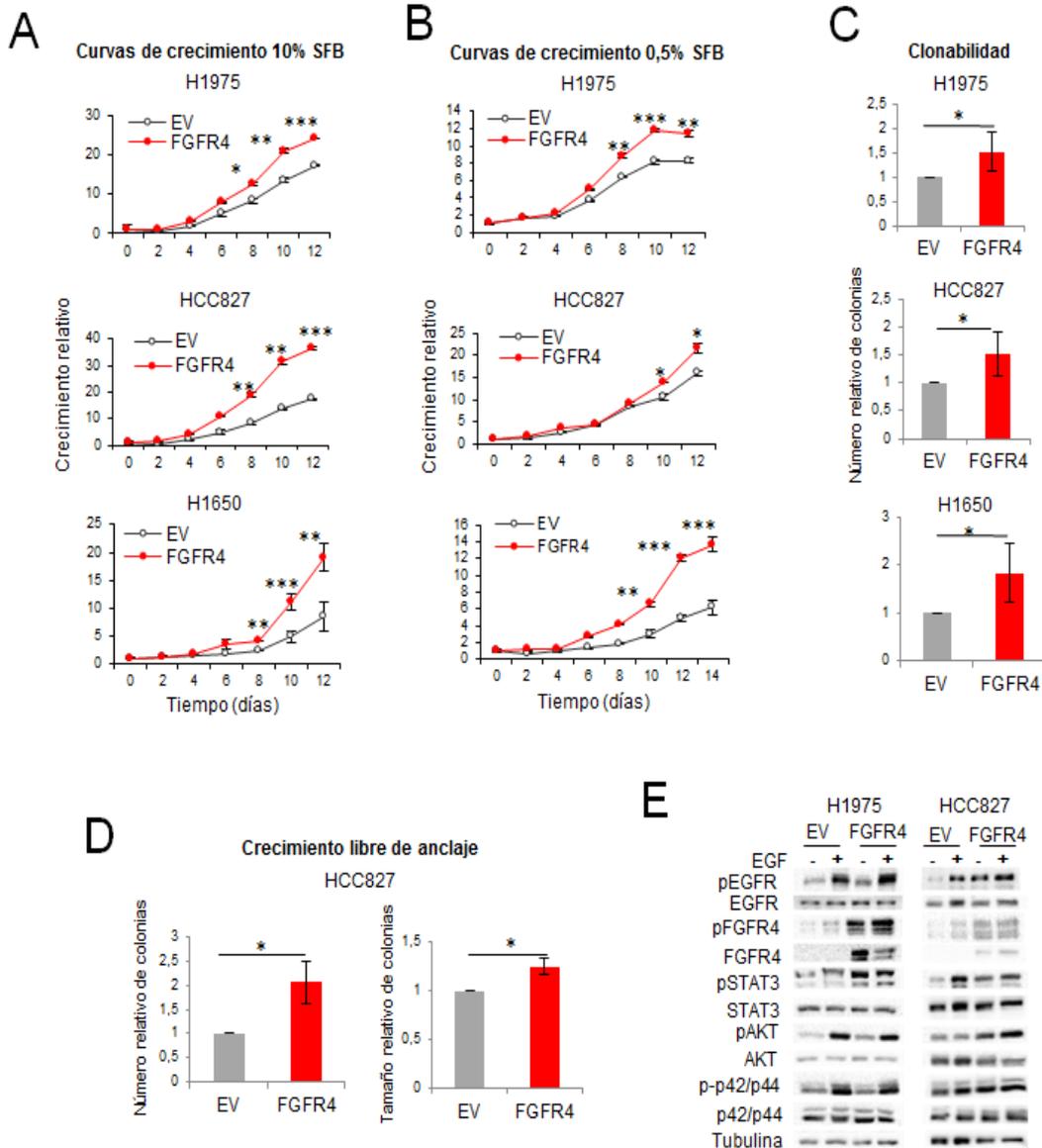
A continuación, se comprobó el efecto de la sobreexpresión de FGFR1 en la activación de rutas de señalización relacionadas con este gen en dos de estas líneas, H1975 y HCC827, en presencia o ausencia del ligando de EGFR (EGF) (**Figura 12E**). En ausencia de estimulación con EGF, la sobreexpresión de FGFR1 causó una mayor

activación de EGFR y STAT3 en ambas líneas, y de AKT en HCC827. Tras la estimulación con EGF, la activación de EGFR también era mayor en las líneas con sobreexpresión de FGFR1, en comparación con las líneas control. En estas líneas, al contrario que en las líneas de adenocarcinoma sin sobreexpresión de EGFR, FGFR1 mostraba una gran activación tras su sobreexpresión, que fue incrementada tras la estimulación con EGF, lo que sugiere la existencia de una cooperación entre ambas vías.



**Figura 12. Efecto de la sobreexpresión de FGFR1 en líneas de adenocarcinoma dependientes de EGFR.** Curvas de crecimiento al 10% (A) y 0,5% (B) de SFB, clonabilidad (C) y crecimiento libre de anclaje (D). (E) Medida de la activación de rutas de señalización relacionadas con FGFR. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se muestran curvas de crecimiento representativas. Para la clonabilidad y el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra la media y desviación estándar de las réplicas, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Para el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra además la media y desviación estándar del tamaño de las colonias. EV = vector vacío, FGFR1 = sobreexpresión de FGFR1, EGF = Factor de crecimiento epidérmico (50 ng/mL). Los p-valoros se encuentran representados por asteriscos (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

La sobreexpresión de FGFR4 en las tres líneas con alteraciones en EGFR mostró los mismos resultados que la de FGFR1 (**Figura 13A-D**), aumentando la proliferación, clonabilidad y crecimiento libre de anclaje.



**Figura 13. Efecto de la sobreexpresión de FGFR4 en líneas de adenocarcinoma dependientes de EGFR.** Curvas de crecimiento al 10% (A) y 0,5% (B) de SFB, clonabilidad (C) y crecimiento libre de anclaje (D). (E) Medida de la activación de rutas de señalización relacionadas con FGFR. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se muestran curvas de crecimiento representativas. Para la clonabilidad y el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra la media y desviación estándar de las réplicas, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Para el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra además la media y desviación estándar del tamaño de las colonias. EV = vector vacío, FGFR4 = sobreexpresión de FGFR4, EGF = Factor de crecimiento epidérmico (50 ng/mL). Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

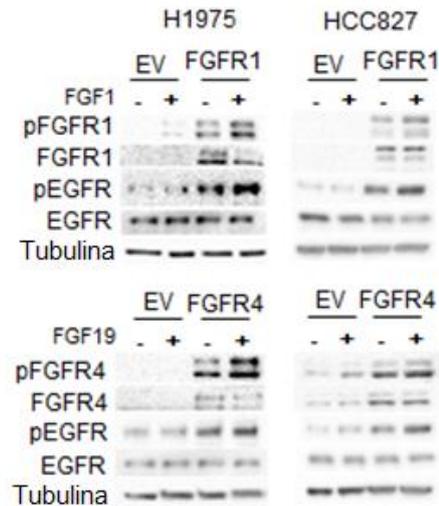
Igualmente, se determinó el efecto de la sobreexpresión de FGFR4 en la activación de las rutas anteriormente mencionadas en H1975 y HCC827. Se observó que en ausencia de estimulación por EGF, la activación de EGFR, STAT3 y AKT era mayor en estas líneas cuando se sobreexpresaba FGFR4. Al estimular con EGF, se observó una mayor activación EGFR en ambas líneas, en condiciones de sobreexpresión de FGFR4, con respecto al control. En el caso de H1975, con la sobreexpresión de FGFR4 se indujo una mayor activación de STAT3 también al estimular con EGF. Sin embargo, en HCC827, la sobreexpresión de FGFR4 provocó una mayor activación de AKT y ERK (p42/p44) tras la estimulación con EGF. Al igual que ocurría con FGFR1, se detectaron altos niveles de FGFR4 activado tras la sobreexpresión del receptor (**Figura 13E**).

También se observó que la sobreexpresión de cualquiera de los FGFRs induce una sobreactivación de EGFR en ambas líneas (**Figuras 12E y 13E**), lo que sugiere la existencia de una relación de cooperación entre ambos tipos de receptores.

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo de cooperación entre ambos FGFRs y EGFR, se estimularon las líneas H1975 y HCC827 con sobreexpresión de FGFR1 y FGFR4 con factores de crecimiento que se unen específicamente a estos FGFRs, para ver si la activación de los FGFRs producía también la activación de EGFR. La estimulación de ambas líneas con sobreexpresión de FGFR1 con su factor de crecimiento específico (FGF1) incrementó la fosforilación no sólo de FGFR1 como cabría esperar, sino también de EGFR con respecto a su línea control. Y lo mismo sucedió en condiciones de sobreexpresión de FGFR4 al estimular con FGF19, su factor de crecimiento específico (**Figura 14**).

#### *1.2.2.2. Efecto del silenciamiento de FGFR4 en una línea de adenocarcinoma dependiente de EGFR*

Entre las líneas celulares en estudio, Calu-3 mostraba una activación relevante de la señalización de EGFR a pesar de no presentar mutaciones en el gen (**Figura 6A**) y altos niveles de expresión proteica de FGFR4. Aprovechando estas características, a fin de estudiar en profundidad la cooperación entre FGFR4 y EGFR, se silenció FGFR4 en esta línea. Esto provocó una disminución tanto en el crecimiento como en la

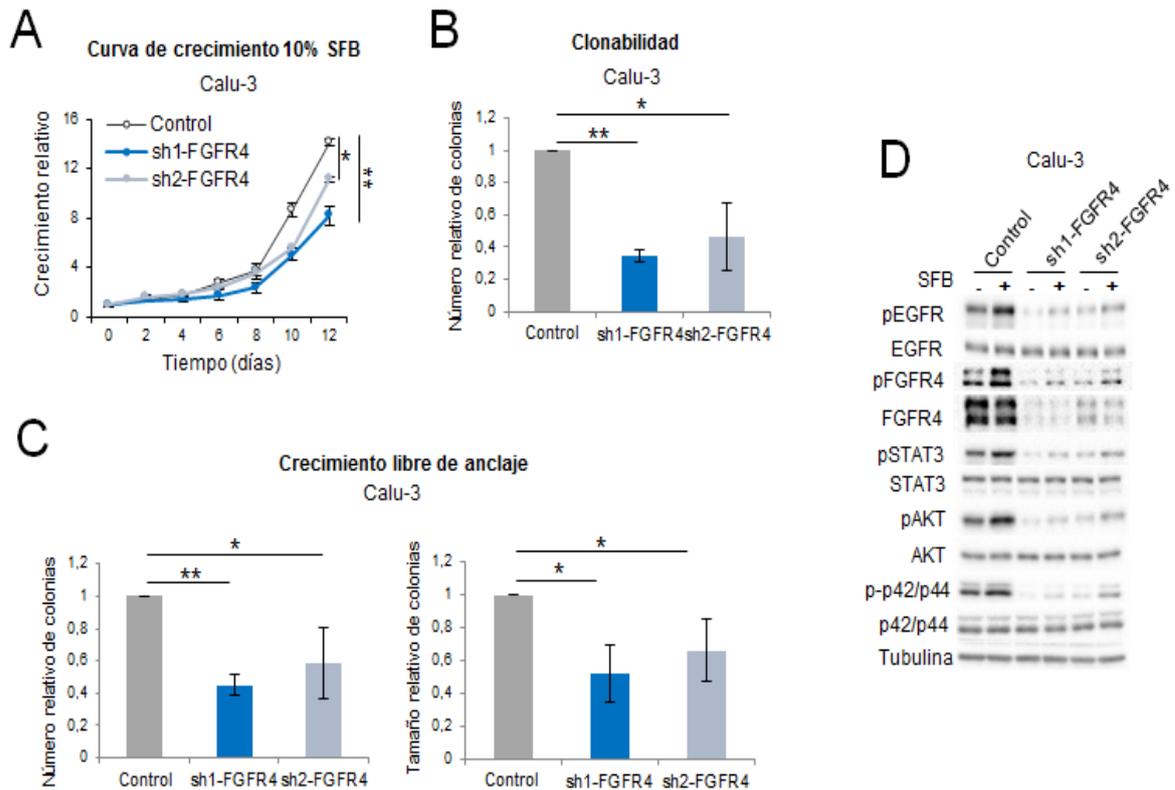


**Figura 14. Efecto de la estimulación de líneas celulares dependientes de EGFR con sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4, con factores de crecimiento específicos de los FGFRs.** EV = vector vacío, FGFR1 = sobreexpresión de FGFR1, FGFR4 = sobreexpresión de FGFR4, FGF1 = Factor de crecimiento fibroblástico 1 (50 ng/mL), FGF19 = Factor de crecimiento fibroblástico 19 (100 ng/mL). Todos los ensayos se realizaron al por triplicado y se muestra un western blot representativo.

clonabilidad y en la formación de colonias en el ensayo de crecimiento libre de anclaje, en comparación con la línea control (**Figura 15A-C**). En concordancia con estos efectos observados, este silenciamiento provocó una disminución de la activación de EGFR, FGFR4, STAT3, AKT y ERK (p42/p44) (**Figura 15D**). Todos estos datos sugerían que la cooperación observada entre FGFR4 y EGFR no era exclusivamente dependiente de la presencia de mutaciones activadoras de EGFR, sino que también ocurría en otras circunstancias, como la sobreactivación de este receptor.

#### 1.2.2.3. Efecto de la co-sobreexpresión de EGFR nativo o mutado con FGFR1 o FGFR4 en una línea inmortalizada de pulmón

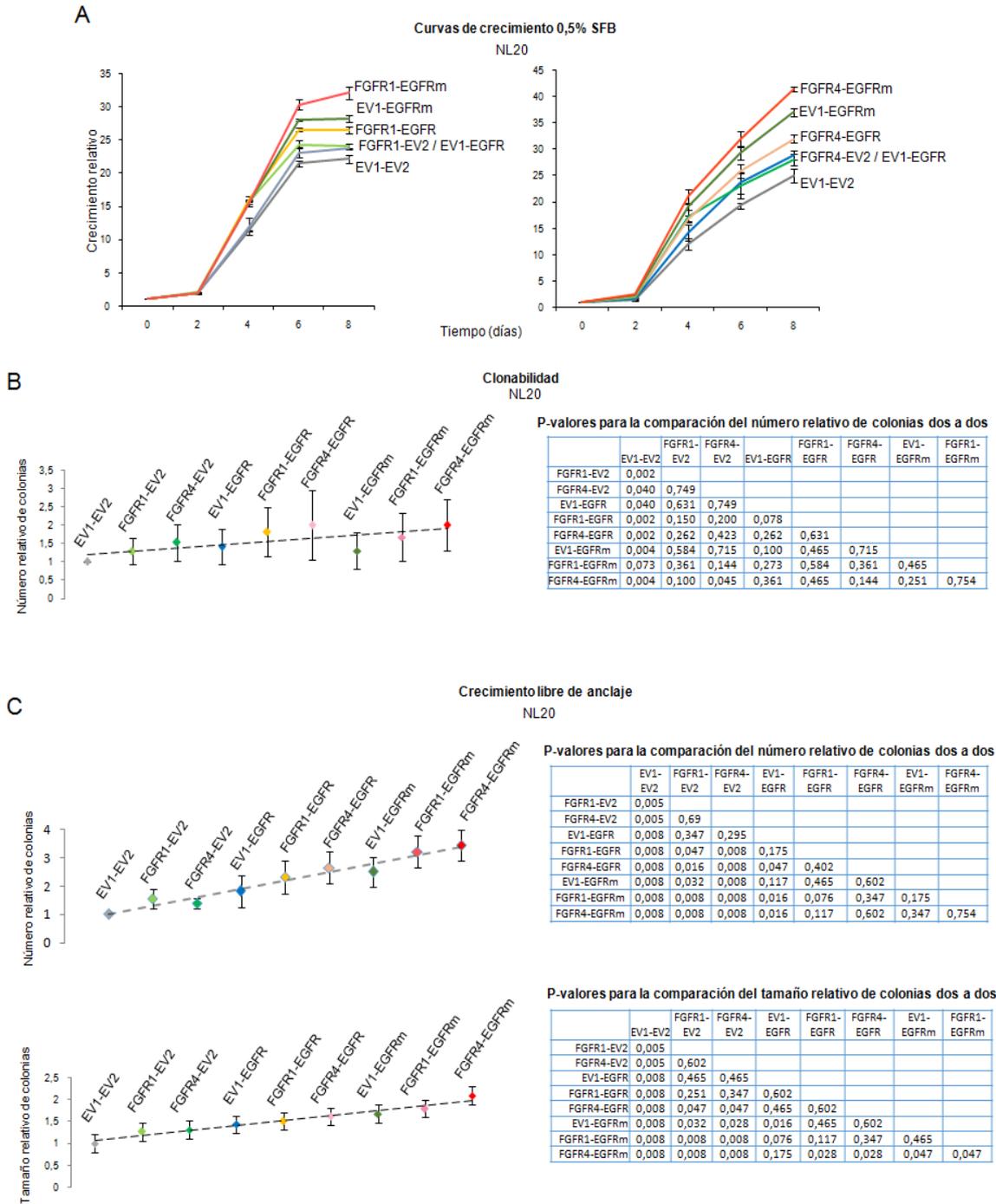
A fin de confirmar la cooperación entre EGFR y los FGFRs y si ésta es independiente de la presencia de mutaciones activadoras de EGFR, se generó un modelo *in vitro* para reproducir esta interacción. Partiendo de una línea celular de pulmón inmortalizada, NL20, generamos varias líneas celulares con sobreexpresión estable de FGFR1 o FGFR4, en co-sobreexpresión o no con EGFR. Además, con el objetivo de analizar si esta cooperación era exclusiva de EGFR mutado, se emplearon la variante nativa de EGFR y una variante mutada, con las mutaciones L858R y T790M.



**Figura 15. Efecto del silenciamiento de FGFR4 en una línea de adenocarcinoma con activación constitutiva de EGFR (Calu-3).** Curvas de crecimiento al 10% de SFB (A), clonabilidad (B) y crecimiento libre de anclaje (C). Medida de la activación de rutas de señalización con implicación en cáncer por western blot (D). Se utilizaron dos ARN de interferencia diferentes para evitar resultados debidos a efectos inespecíficos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se muestran curvas de crecimiento representativas. Para la clonabilidad y el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra la media y desviación estándar de las réplicas, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Para el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra además la media y desviación estándar del tamaño de las colonias. Control = ARN de interferencia inespecífico, shFGFR4 = silenciamiento de FGFR4, SFB = Suero fetal bovino. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

Seleccionamos una línea inmortalizada para estos experimentos dado que este tipo de líneas generalmente presentan menos alteraciones genómicas que las líneas tumorales, las cuales podrían influir en los efectos observados.

Al realizar curvas de crecimiento con estas líneas en las condiciones normales de cultivo (4% SFB), no se observaron diferencias en la proliferación celular (datos no mostrados). Sin embargo, en condiciones de baja concentración de suero (0.5% SFB), sí se observaron diferencias en el crecimiento (**Figura 16A**). En estas condiciones, se



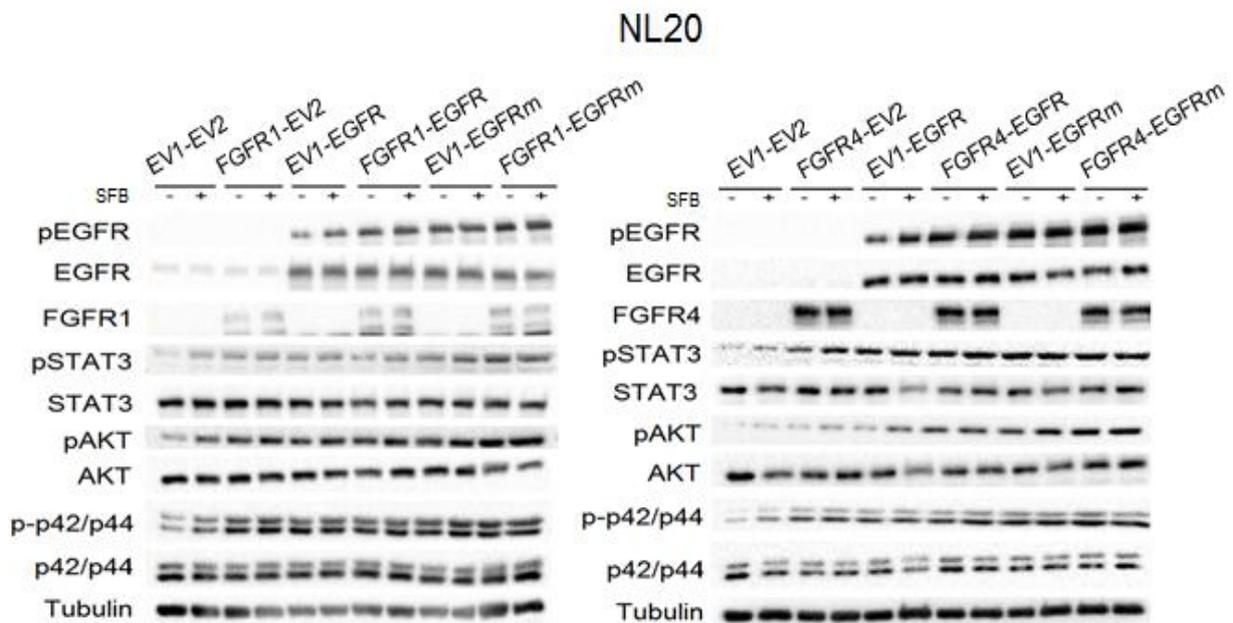
**Figura 16. Efecto de la co-sobreexpresión de EGFR nativo o mutado con FGFR1 o FGFR4 en la línea inmortalizada de pulmón NL20.** Crecimiento al 0.5% FBS de las líneas establecidas con co-sobreexpresión de EGFR y FGFR1 o FGFR4 (A), clonabilidad (B) y crecimiento libre de anclaje (C) para estas líneas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se muestran curvas de crecimiento representativas. Para la clonabilidad y el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra la media y desviación estándar de las réplicas, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Para el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra además la media y desviación estándar del tamaño de las colonias. Para la clonabilidad se muestran tablas con los p-valores de la comparación entre las diferentes condiciones del experimento, dos a dos. EV1 = vector vacío 1, EV2 = vector vacío 2, F1 = sobreexpresión de FGFR1, F4 = sobreexpresión de FGFR4, EGFR = sobreexpresión de EGFR nativo, EGFRm = sobreexpresión de EGFR con las mutaciones L858R y T790M.

observó que la sobreexpresión de cualquiera de los dos FGFRs o del EGFR nativo ocasionaba un aumento del crecimiento similar para los tres casos, en comparación con la línea control transfectada con el doble plásmido vacío. Al co-sobreexpresar cualquiera de los dos FGFRs junto con EGFR nativo, se producía un mayor incremento en la proliferación con respecto a las condiciones anteriores. La sobreexpresión de EGFR mutado mostró una mayor proliferación incluso que la co-sobreexpresión de EGFR nativo con los FGFRs y, por último, la co-sobreexpresión de cualquiera de los dos FGFRs con EGFR mutado en esta línea ocasionó el mayor aumento en la capacidad de proliferación. Además, estos resultados obtenidos en las curvas de crecimiento correlacionaban con los ensayos de clonabilidad y de crecimiento libre de anclaje (**Figuras 16B-C**).

A continuación se analizó la activación de varias rutas de señalización en estas líneas, realizando experimentos de estimulación con SFB (**Figura 17**). Se observó de nuevo una correlación entre el aumento en la proliferación y las propiedades tumorigénicas con la activación de estas rutas de señalización. Esta correlación fue bastante destacable para el caso de la activación de EGFR, STAT3 y AKT. En el caso de la activación de ERK (p42/p44) observamos una tendencia similar pero no tan evidente, lo que sugiere que quizás esta ruta podría no ser tan importante en cuanto a los efectos tumorigénicos observados en estas líneas.

En general, se observó que la sobreexpresión de EGFR nativo o de cualquiera de los dos FGFRs producía un aumento en la activación de las rutas STAT3, AKT y ERK (p42/p44) en comparación con la línea control, similar en los tres casos. La co-sobreexpresión de EGFR nativo con cualquiera de los FGFRs producía un mayor aumento en la activación de estas rutas que en los casos anteriores. La sobreexpresión de EGFR mutado (L858R/T790M) produjo un aumento aún mayor, y el mayor incremento en la activación de estas rutas en el experimento correspondió a la condición de co-sobreexpresión de cualquiera de los dos FGFRs con esta variante mutante de EGFR.

Todos estos datos confirman la cooperación entre EGFR y los FGFR1/4 y que ésta no depende de la presencia de mutaciones activadoras en EGFR, ya que también se da en el caso de la sobreexpresión de EGFR nativo.

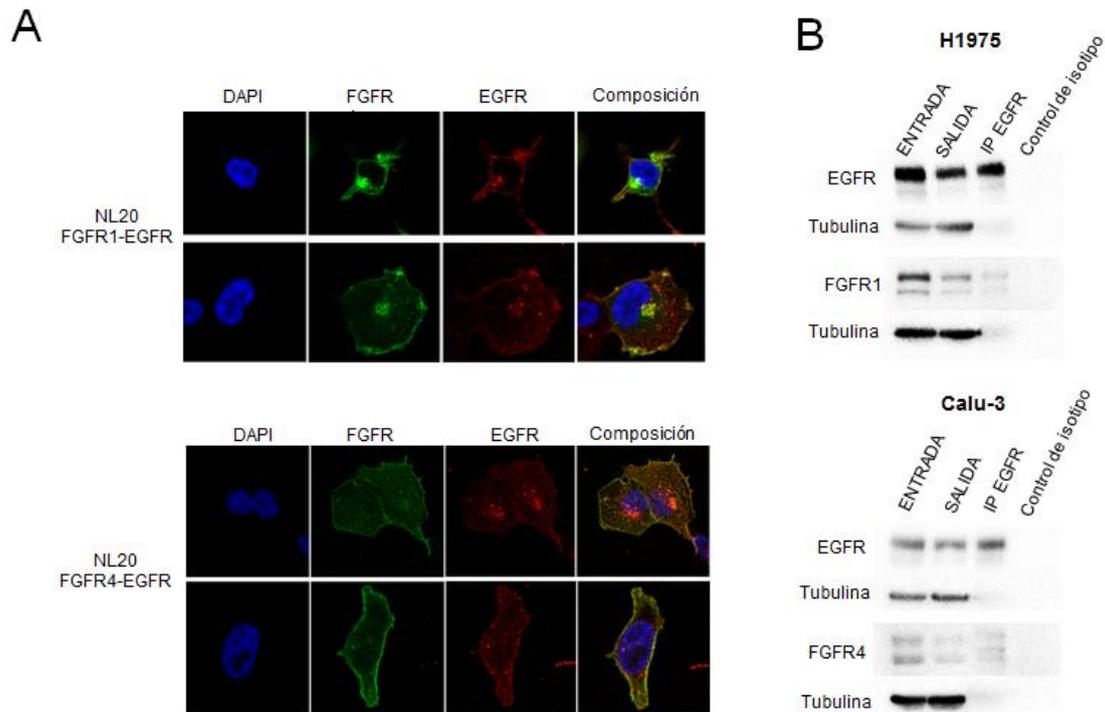


**Figura 17.** Efecto de la co-sobreexpresión de EGFR nativo o mutado con FGFR1 o FGFR4 en la activación de rutas de señalización relacionadas con FGFR, en la línea inmortalizada de pulmón NL20. Co-sobreexpresión de EGFR nativo y mutado y FGFR1 (A) o FGFR4 (B). EV1 = vector vacío 1, EV2 = vector vacío 2, F1 = sobreexpresión de FGFR1, F4 = sobreexpresión de FGFR4, EGFR = sobreexpresión de EGFR nativo, EGFRm = sobreexpresión de EGFR con las mutaciones L858R y T790M, SFB = suero fetal bovino.

#### 1.2.2.4. Estudio de la interacción de EGFR con FGFR1 y FGFR4

Al objeto de profundizar en la cooperación entre EGFR y FGFR1 o FGFR4, se estudió si estos receptores interactuaban físicamente. En primer lugar, se realizaron experimentos de co-inmunofluorescencia para comprobar si estos receptores co-localizaban en la membrana. Se utilizó una línea (NL20) con sobreexpresión exógena de FGFR1 y EGFR, o de FGFR4 y EGFR. En estos experimentos se observó que existía una co-localización parcial de EGFR y FGFR1, así como de EGFR y FGFR4, en algunas regiones de la membrana celular (**Figura 18A**). Estos resultados sugerían que la interacción entre ambos receptores podría ser física, y para comprobar esta hipótesis se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación. En este caso, se seleccionaron líneas celulares con alta expresión endógena de EGFR y FGFR1 (H1975) o de FGFR4 (Calu-3) (**Figura 6A**). En ambas líneas, se realizó la inmunoprecipitación de EGFR, y se determinó la presencia de FGFR1 o FGFR4 en el inmunoprecipitado. Se observó que FGFR1 co-inmunoprecipitaba con EGFR en los extractos de la línea celular H1975, y lo

mismo pasaba con FGFR4 en la línea Calu-3 (**Figura 18B**), lo que apoyaba la existencia de una interacción física entre ambos tipos de receptores.

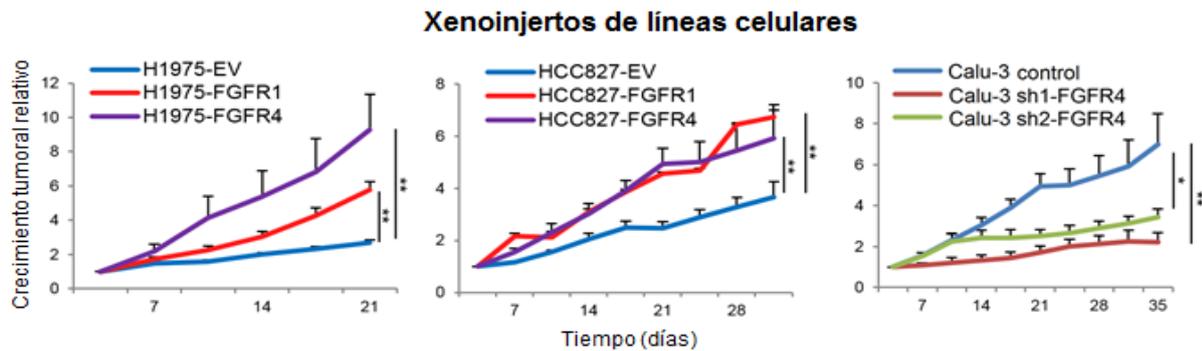


**Figura 18. Estudio de la interacción de EGFR con FGFR1 y FGFR4.** (A) Ensayo de co-inmunolocalización de EGFR y FGFR1 o FGFR4 en la línea celular NL20 con sobreexpresión exógena de estos genes. (B) Co-inmunoprecipitación de EGFR con FGFR1 en la línea celular H1975, y de EGFR con FGFR4 en la línea Calu-3. ENTRADA = Extracto proteico previo a la inmunoprecipitación. SALIDA = Extracto proteico posterior a la inmunoprecipitación, IP EGFR = Inmunoprecipitado con anticuerpo anti-EGFR, Control de isotipo = Inmunoprecipitado con anticuerpo inespecífico del mismo isotipo que el utilizado para el inmunoprecipitado de EGFR.

#### 1.2.2.5. Efecto de la cooperación de EGFR con FGFR1 y FGFR4 *in vivo*

Para estudiar el efecto de la cooperación observada de EGFR con FGFR1 y FGFR4 en un contexto más fisiológico, se generaron xenoinjertos en ratones inmunodeprimidos de diferentes líneas celulares donde esta cooperación se había mostrado relevante *in vitro*. Se utilizaron las líneas con mutación en EGFR H1975 y HCC827, con sobreexpresión o no de FGFR1 o FGFR4, y la línea con activación constitutiva de EGFR nativo Calu-3, en la que se silenció la alta expresión endógena de FGFR4. Se observó que en los xenoinjertos producidos por la línea H1975, la sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4 produjo un aumento del crecimiento tumoral correspondiente al doble o el cuádruple, respectivamente, en comparación con la línea

control. En el caso de los tumores producidos por HCC827, la sobreexpresión de cualquiera de los dos FGFRs produjo una velocidad de crecimiento de los tumores que doblaba a la línea control. En los xenoinjertos generados por Calu-3, se observaba una velocidad menor de crecimiento tumoral en las líneas con el FGFR4 silenciado (**Figura 19**).

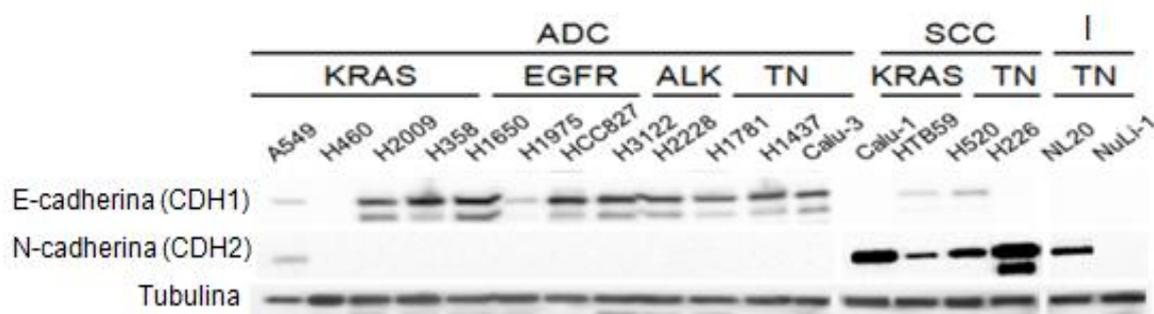


**Figura 19. Efecto de FGFR1 y FGFR4 en el crecimiento tumoral de xenoinjertos generados con líneas celulares dependientes de EGFR.** Efecto de la sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4 en xenoinjertos de las líneas celulares EGFR mutadas H1975 y HCC827, y del silenciamiento de FGFR4 en la línea celular con sobreactivación de EGFR nativo Calu-3. Se utilizaron dos ARNs de interferencia diferentes para evitar efectos inespecíficos. EV= vector vacío, FGFR1 = sobreexpresión de FGFR1, FGFR4 = sobreexpresión de FGFR4, control = shRNA inespecífico, shFGFR4 = silenciamiento de FGFR4.

### 1.3. Estudio de las causas del papel diferencial de FGFR1 y FGFR4 en adenocarcinoma no dependiente de EGFR y carcinoma epidermoide

Hasta este punto, se han descrito para FGFR1 y FGFR4 papeles diferenciales en la tumorigénesis de cáncer de pulmón no microcítico. Según los resultados expuestos anteriormente, ambos receptores parecen ejercer un papel pro-tumoral en carcinoma epidermoide, y el papel contrario en adenocarcinoma, con la excepción de aquellas líneas celulares de adenocarcinoma dependientes de la señalización de EGFR (bien por mutación o por sobreactivación), en las que se observa un papel pro-tumorigénico de ambos FGFRs causado por la cooperación de éstos con EGFR. En este apartado estudiaremos las causas del papel diferencial de FGFR1 y FGFR4 en carcinoma epidermoide y en adenocarcinoma no dependiente de EGFR.

El punto de partida fue el efecto diferencial en la tumorigénesis descrito previamente para otro miembro de la familia FGFR, FGFR3, que presentaba un efecto pro-tumoral en líneas celulares de carcinoma pancreático con características mesenquimales, y el efecto contrario en líneas con características epiteliales <sup>165</sup>. Así, decidimos comprobar si las características mesenquimales o epiteliales de las líneas celulares podrían determinar el papel de los FGFRs en cáncer de pulmón. Se sabe que N-cadherina es un marcador mesenquimal, y que E-cadherina es un marcador epitelial <sup>166</sup>. Además, se ha visto que N-cadherina coopera con FGFR, promoviendo la migración y la metástasis en varios tipos de tumores <sup>167</sup>. Por esta razón, analizamos la expresión proteica de ambas cadherinas en nuestras líneas celulares para ver si éstas podían estar implicadas en el papel diferencial de los FGFRs entre las diferentes histologías de líneas celulares de nuestro panel. Se observó que ambas proteínas se expresaban diferencialmente entre ambas histologías, de forma que E-cadherina se expresaba prácticamente en todas las líneas de adenocarcinoma, pero en ninguna de carcinoma epidermoide, y lo contrario ocurría con N-cadherina (**Figura 20**). Además, es importante señalar que la línea celular inmortalizada NL20, donde la sobreexpresión de FGFR1 y FGFR4 provocaba un aumento de la tumorigenicidad (**Figura 16**), como ocurre en las líneas celulares de carcinoma epidermoide, mostraba también una alta expresión de N-cadherina (**Figura 20**). Este dato sugería que la N-cadherina podría estar implicada



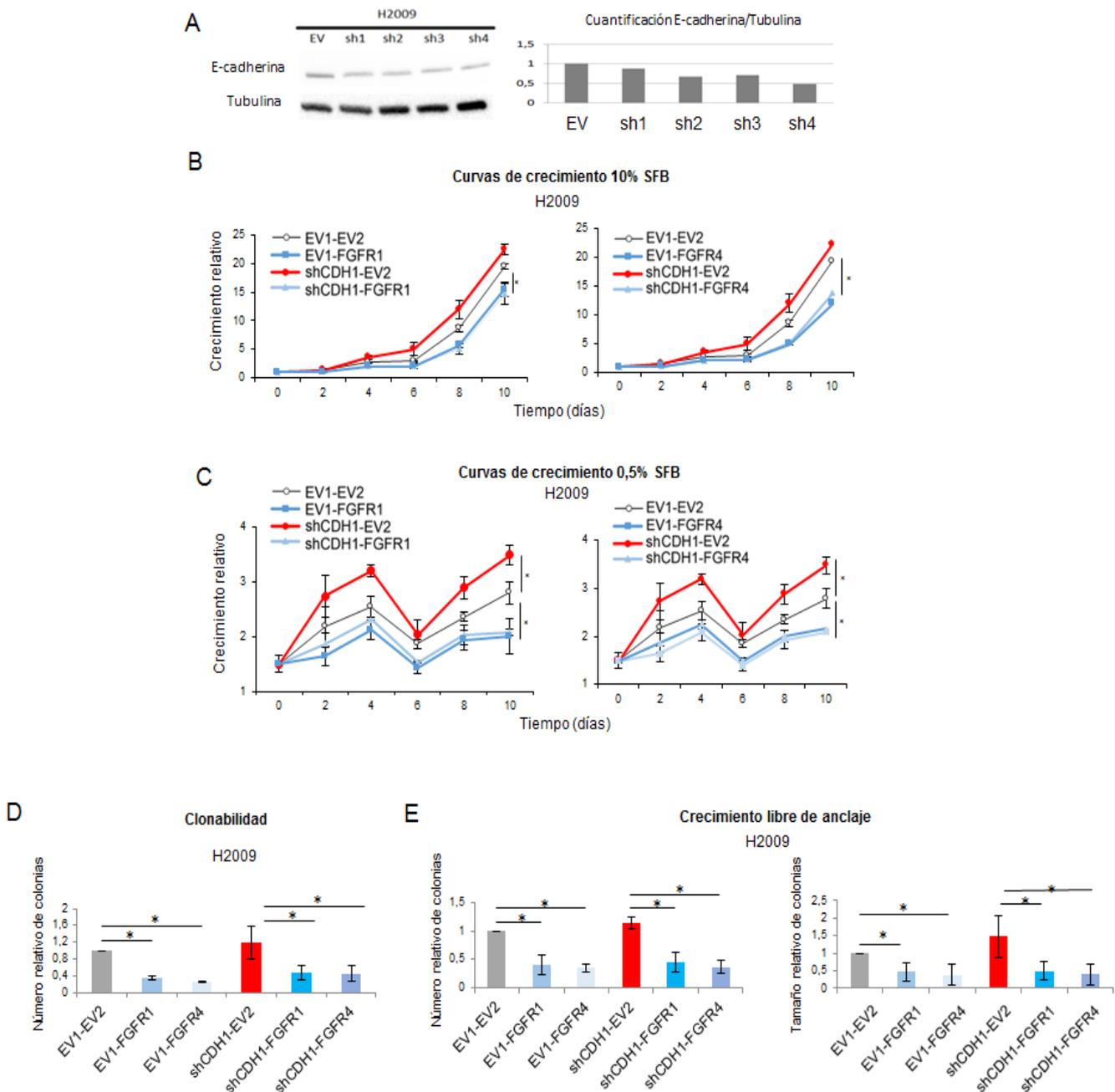
**Figura 20. Caracterización de la expresión de E-cadherina y N-cadherina en nuestro panel de líneas celulares de pulmón.** ADC = Adenocarcinoma, ESC = Epidermoide, I = Inmortalizada, KRAS = KRAS mutada, EGFR = EGFR mutada, ALK = Portadora de translocación de ALK, TN = Triple negativo (referido a la ausencia de alteraciones en KRAS, EGFR o ALK). Debido al número de líneas celulares en estudio, esta imagen fue resultado de la unión de imágenes diferentes de western blot realizadas en paralelo y con una muestra común en ambas membranas.

en el incremento de las propiedades tumorigénicas causado por FGFR1 y FGFR4 en las líneas celulares de carcinoma epidermoide, y que la E-cadherina podría estar implicada en el papel supresor tumoral de ambos FGFRs visto en las líneas de adenocarcinoma no dependientes de EGFR.

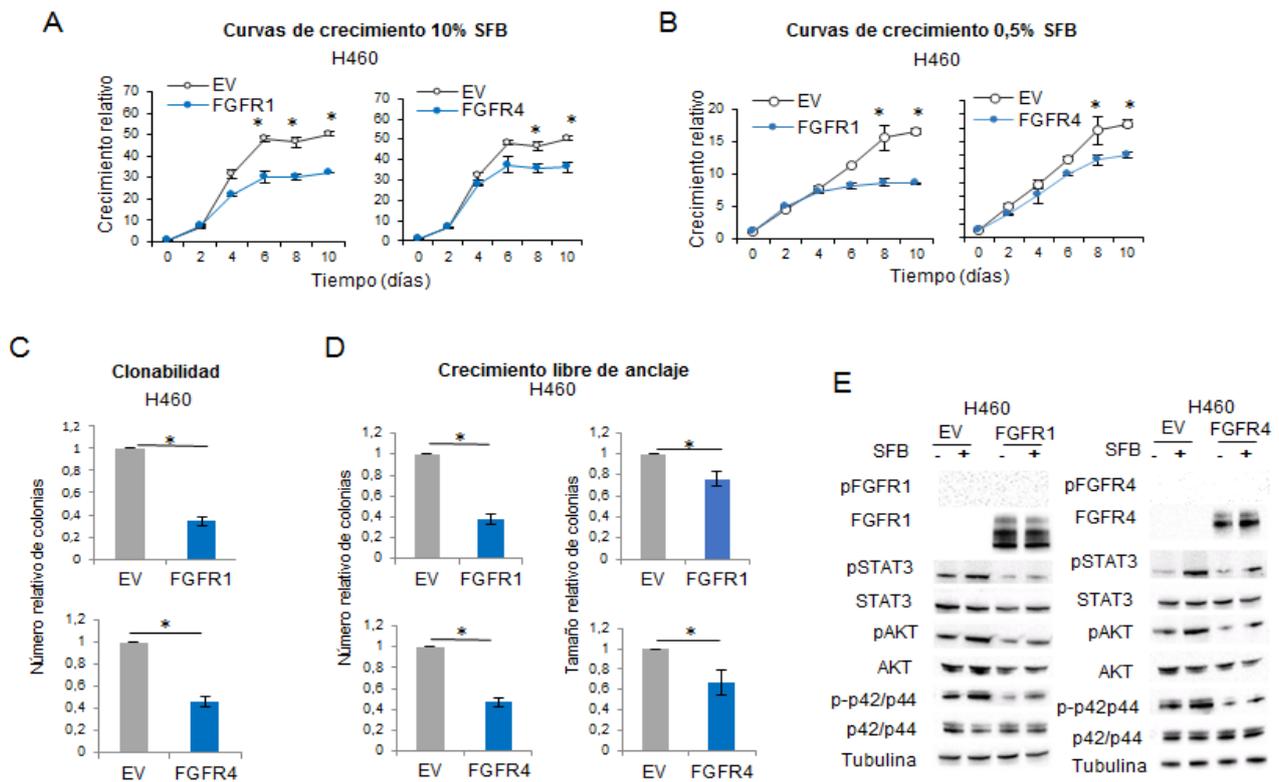
#### 1.3.1. *Papel de la E-cadherina en el efecto supresor tumoral de FGFR1/4*

Con el objeto de comprobar si E-cadherina jugaba un papel determinante en el efecto diferencial de los FGFRs, se silenció la expresión de esta cadherina en una línea celular de adenocarcinoma, H2009. A pesar de que la reducción en la expresión de E-cadherina conseguida fue solo de alrededor del 50% (**Figura 21A**), se observó un ligero efecto de su silenciamiento en los ensayos subrogados realizados. Este silenciamiento provocó un pequeño aumento en el crecimiento celular, clonabilidad y formación de colonias libre de anclaje. Este efecto observado es consistente con el papel supresor tumoral de E-cadherina descrito en la literatura <sup>168</sup>(**Figuras 21B-E**). Sin embargo, en estos ensayos, la sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4 seguía presentando un efecto supresor tumoral, independientemente del nivel de expresión de E-cadherina.

Para confirmar si el papel supresor tumoral de FGFR1 y FGFR4 en las líneas celulares de adenocarcinoma no dependientes de EGFR era independiente de la expresión de E-cadherina, decidimos sobreexpresar ambos FGFRs en una línea de adenocarcinoma, H460, que no presentaba expresión proteica de E- ni N-cadherina. Se observó que la sobreexpresión de cualquiera de los dos FGFRs causaba una reducción en la proliferación, clonabilidad y crecimiento libre de anclaje, en comparación con la línea control (**Figura 22A-D**). En este caso, como en otras líneas de adenocarcinoma no dependientes de EGFR, la sobreexpresión de los FGFRs no provocaba su propia activación, y a nivel de rutas de señalización oncogénicas relacionadas con FGFR, la sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4 redujo la activación de STAT3, AKT y ERK (p42/p44) en comparación con la línea control (**Figura 22E**). Todos estos datos sugerían que el papel de FGFR1 y FGFR4 como supresores tumorales era independiente de la expresión de E-cadherina.



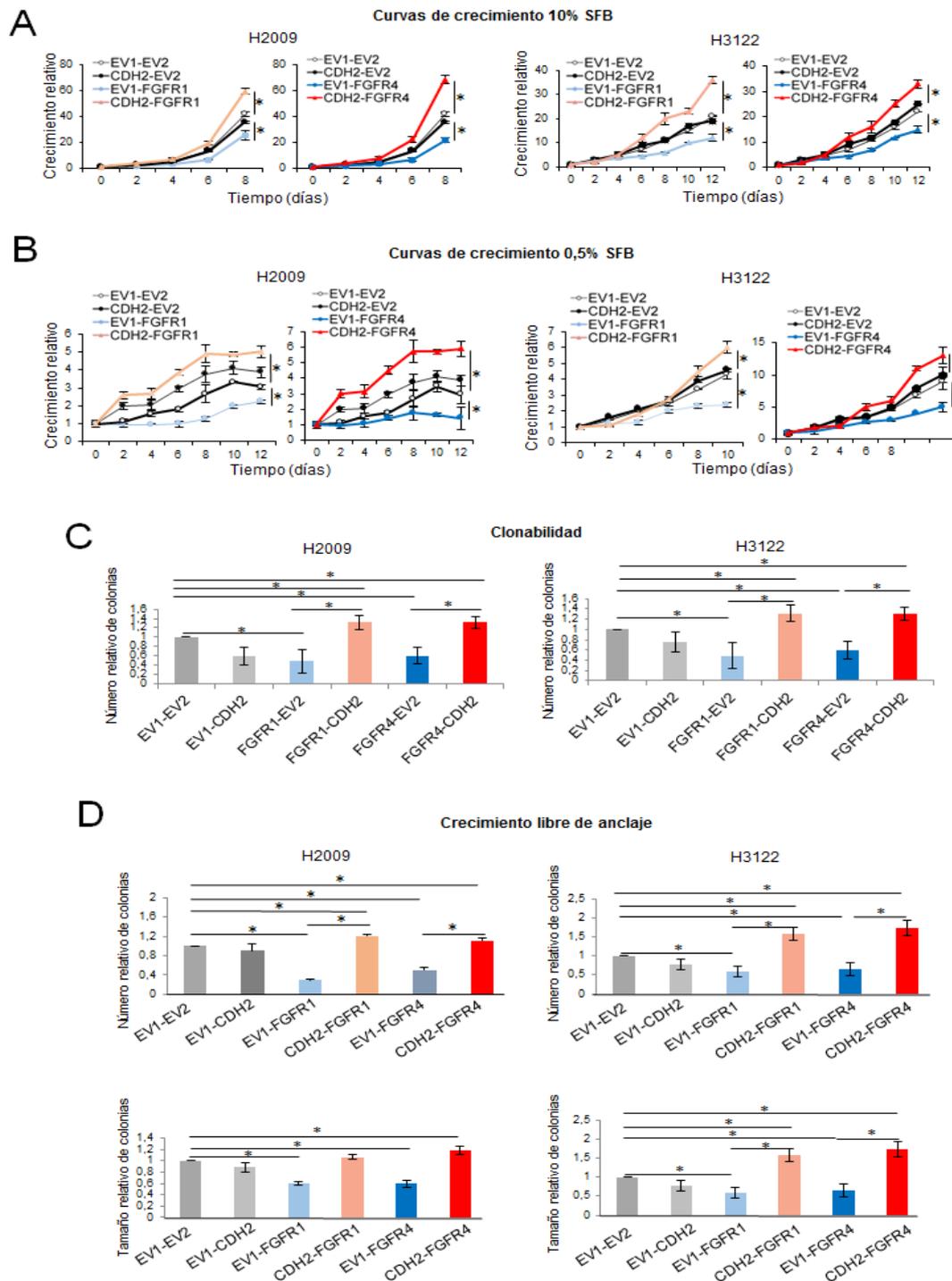
**Figura 21. Efecto del silenciamiento de E-cadherina en el papel supresor tumoral de FGFR1 y FGFR4 en una línea de adenocarcinoma (H2009).** Análisis por western blot de la efectividad del silenciamiento por 4 shRNAs de E-cadherina en la línea de ADC H2009. Se seleccionó el shRNA número 4 para los experimentos. Curvas de crecimiento al 10% (B) y 0,5% (C) de SFB, clonabilidad (D) y crecimiento libre de anclaje (D). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se muestran curvas de crecimiento representativas. Para la clonabilidad y el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra la media y desviación estándar de las réplicas, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Para el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra además la media y desviación estándar del tamaño de las colonias. EV1 = vector vacío 1, EV2 = vector vacío 2, shCDH1 = shRNA E-cadherina (se seleccionó el sh4 de (A)), FGFR1 = Sobreexpresión de FGFR1, FGFR4 = Sobreexpresión de FGFR4, SFB = Suero fetal bovino. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).



**Figura 22.** Efecto de la sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4 en una línea de adenocarcinoma sin expresión endógena de E-cadherina ni N-cadherina (H460). Curvas de crecimiento al 10% (A) y 0,5% (B) de SFB, clonabilidad (C) y crecimiento libre de anclaje (D). Medida de la activación de rutas de señalización relacionadas con FGFR (E). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se muestran curvas de crecimiento representativas. Para la clonabilidad y el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra la media y desviación estándar de las réplicas, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Para el ensayo de crecimiento libre de anclaje se muestra además la media y desviación estándar del tamaño de las colonias. EV = vector vacío, FGFR1 = sobreexpresión de FGFR1, FGFR4 = sobreexpresión de FGFR4, SFB = Suero fetal bovino. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

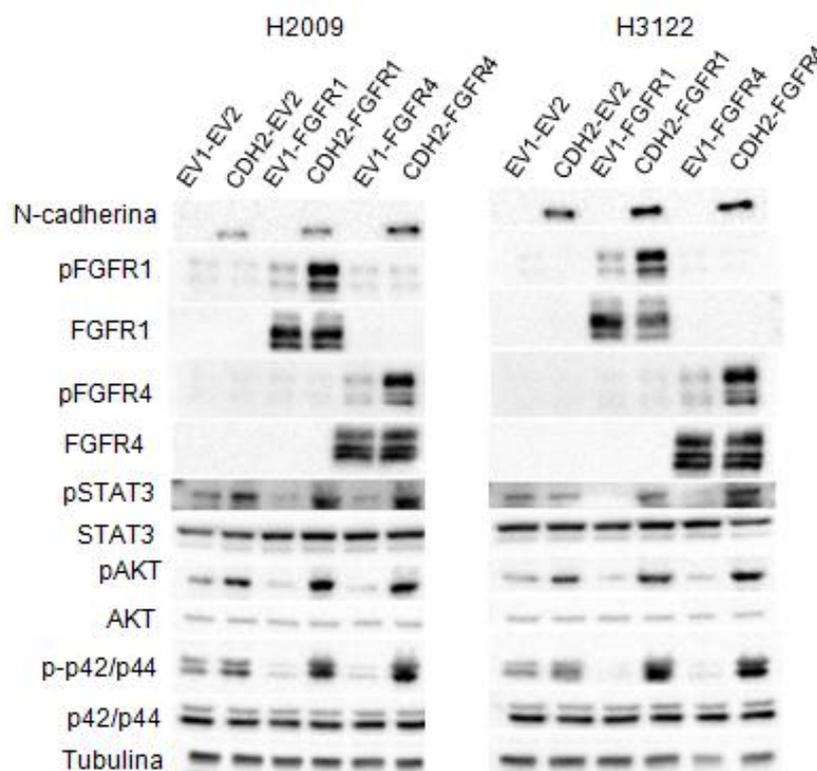
### 1.3.2. Papel de N-cadherina en el efecto pro-tumorigénico de FGFR1/4

A fin de comprobar si N-cadherina tiene algún papel determinante en los efectos pro-tumorigénicos de FGFR1 y FGFR4, se sobreexpresó esta proteína en dos líneas celulares de adenocarcinoma en las que la sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4 provocaba un efecto supresor tumoral (H2009 y H3122). En estas líneas, la co-sobreexpresión de N-cadherina con los FGFRs no solo revertía su efecto supresor tumoral, sino que producía el papel opuesto, induciendo un aumento en la proliferación, clonabilidad y crecimiento libre de anclaje (**Figura 23A-D**).



**Figura 23. Efecto de la co-sobreexpresión de N-cadherina con FGFR1 o FGFR4 en las líneas de adenocarcinoma H2009 y H3122.** Curvas de crecimiento al 10% (A) y 0,5% (B) de SFB, clonabilidad (C) y crecimiento libre de anclaje (D). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se muestran curvas de crecimiento representativas. Para la clonabilidad y el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra la media y desviación estándar de las réplicas, tras haber sido normalizadas a la condición control, que toma el valor de 1. Para el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra además la media y desviación estándar del tamaño de las colonias. EV1= vector vacío 1, EV2 = vector vacío 2, CDH2 = Sobreexpresión de N-cadherina, FGFR1 = Sobreexpresión de FGFR1, FGFR4 = Sobreexpresión de FGFR4, SFB = Suero fetal bovino. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

Al estudiar la activación de rutas de señalización oncogénicas relacionadas con FGFR en estas líneas, observamos que correlacionando con los ensayos subrogados y a diferencia de lo que ocurre en ausencia de N-cadherina, la activación de estas rutas aumentaba con respecto a la línea control en condiciones de co-sobreexpresión del FGFR con N-cadherina, condiciones en las cuales se producía un gran incremento de la activación del FGFR sobreexpresado (**Figura 24**). Estos datos sugieren que en presencia de N-cadherina, ambos receptores se activan de un modo más acusado y presentan un efecto pro-tumorigénico independientemente del fondo histológico de la línea celular.

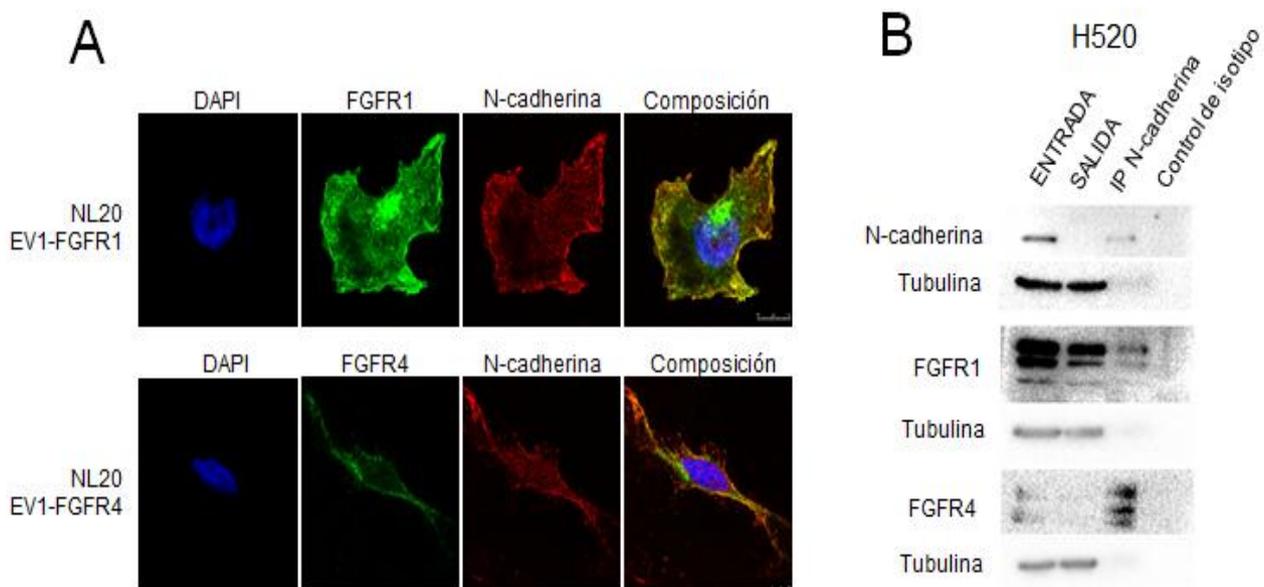


**Figura 24. Efecto molecular de la co-sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4 con N-cadherina en líneas celulares de adenocarcinoma (H2009 y H3122).** EV1 = vector vacío 1, EV2 = vector vacío 2, CDH2 = Sobreexpresión de N-cadherina, FGFR1 = Sobreexpresión de FGFR1, FGFR4 = Sobreexpresión de FGFR4, SFB = Suero fetal bovino.

### 1.3.3. Estudio de la interacción de N-cadherina con FGFR1 y FGFR4

Para estudiar la interacción de N-cadherina con los FGFRs, se realizaron experimentos de co-inmunofluorescencia para comprobar si ambas proteínas co-localizaban en la membrana. Se utilizó una línea (NL20) con alta expresión endógena

de N-cadherina, y sobreexpresión exógena de FGFR1 o FGFR4 (**Figura 20**). En estos experimentos se observó que existía una co-localización parcial de N-cadherina con FGFR1 y FGFR4 en algunas regiones de la membrana celular (**Figura 25A**). Estos resultados sugerían que la interacción entre ambas proteínas podría ser física, y para comprobar esta hipótesis se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación. En este caso, se seleccionó una línea celular con alta expresión endógena de ambas proteínas (H520) (**Figura 6A**). Se realizó la inmunoprecipitación de N-cadherina, y se determinó la presencia de FGFR1 o FGFR4 en el inmunoprecipitado. Se observó que tanto FGFR1 como FGFR4 co-inmunoprecipitaban con N-cadherina en los extractos proteicos (**Figura 25B**), lo que apoyaba la existencia de una interacción física entre ambos tipos de receptores.



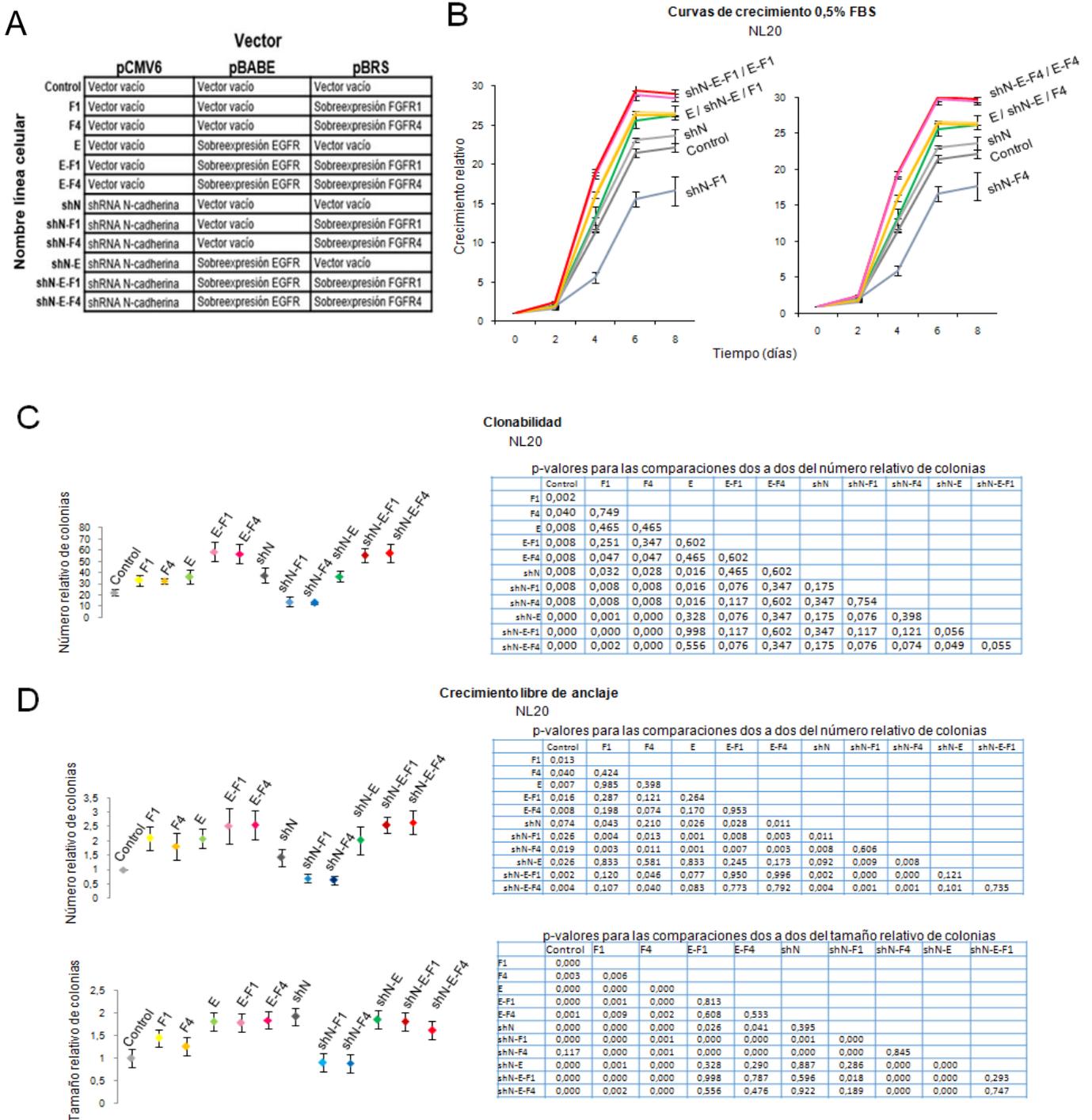
**Figura 25. Interacción de N-cadherina con FGFR1 y FGFR4.** (A) Ensayo de co-inmunolocalización de N-cadherina y FGFR1 o FGFR4 en la línea celular NL20 con sobreexpresión exógena de los receptores. (B) Co-inmunoprecipitación de N-cadherina con FGFR1 y FGFR4 en la línea celular H520. ENTRADA = Extracto proteico previo a la inmunoprecipitación, SALIDA = Extracto proteico posterior a la inmunoprecipitación. IP N-cadherina = Inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-N-cadherina, Control de isotipo = Inmunoprecipitación con un anticuerpo inespecífico del mismo isotipo que el anticuerpo contra N-cadherina utilizado.

#### 1.3.4. EGFR y N-cadherina definen el papel pro-tumorogénico de FGFR1 y FGFR4 in vitro

Hasta ahora, los resultados obtenidos sugieren que en líneas celulares con alta expresión de N-cadherina, FGFR1 y FGFR4 presentan un papel pro-tumorogénico. Sin embargo, en ausencia de esta proteína, ambos FGFRs presentan un efecto supresor tumoral, salvo en el caso de aquellas líneas celulares que presentan dependencia de EGFR, donde ambos FGFRs parecen cooperar con EGFR, incrementando sus efectos oncogénicos. Para estudiar conjuntamente ambos factores inductores de la oncogenicidad de FGFR1 y FGFR4 generamos un modelo celular utilizando la línea inmortalizada NL20. A partir de esta línea se generaron 12 líneas estables con diferentes combinaciones de expresión o ausencia de FGFR1 o FGFR4 con EGFR y N-cadherina.

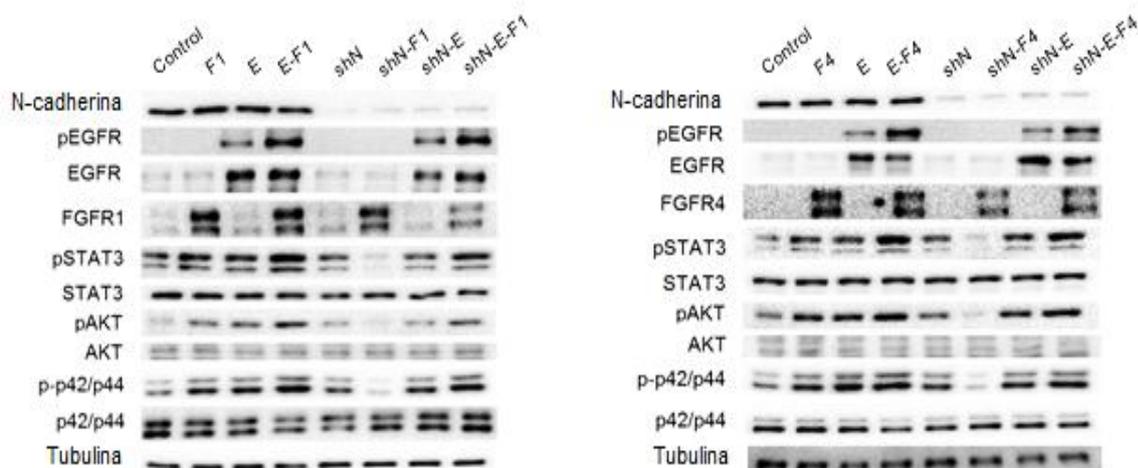
A partir de estas líneas se realizaron ensayos de crecimiento al 0.5% de SFB, de clonabilidad y de crecimiento libre de anclaje, y los resultados observados fueron consistentes entre los tres ensayos. De esta forma, la sobreexpresión en solitario de cualquiera de los FGFRs en presencia de la N-cadherina endógena causó un aumento en la proliferación y en las características tumorogénicas con respecto a la línea celular control con los tres plásmidos vacíos. Sin embargo, tras el silenciamiento mediante ARN de interferencia de N-cadherina, ambos FGFRs mostraron un efecto supresor tumoral, con una menor proliferación y menor tumorogenicidad, en comparación con la línea control. La sobreexpresión individual de EGFR provocó un efecto similar al de la sobreexpresión de los FGFRs en presencia de N-cadherina, pero en este último caso, el efecto era independiente de la expresión de la cadherina. La co-sobreexpresión de EGFR junto a cualquiera de los FGFRs mostró mayor proliferación y tumorogenicidad, también independientemente de la expresión de N-cadherina (**Figuras 26A-D**).

Determinamos la activación de rutas de señalización relacionadas con FGFR en estas líneas, y de nuevo la activación de estas rutas correlacionaba con los efectos observados en los ensayos subrogados. La sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4, en presencia de N-cadherina, ocasionaba una mayor activación de STAT3, AKT y ERK (p42/p44), respecto a la línea control con el triple vector vacío. La sobreexpresión de EGFR provocaba un efecto similar en estas rutas, y este efecto era independiente de la presencia o ausencia de N-cadherina. En estos experimentos, la mayor activación de



**Figura 26. Efecto del silenciamiento de N-cadherina combinado con la sobreexpresión de EGFR y FGFR1 o FGFR4 en la línea inmortalizada de pulmón NL20.** (A) Nomenclatura de las 12 líneas generadas a partir de la línea NL20, con diferentes combinaciones de expresión de FGFR1, FGFR4, EGFR y N-cadherina. Curvas de crecimiento al 0.5% de SFB (B), clonabilidad (C) y crecimiento libre de anclaje (D). Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado. Se muestran curvas de crecimiento representativas. Para la clonabilidad y el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra la media y desviación estándar de las réplicas, tras haber sido normalizadas a la condición control. Para el ensayo de crecimiento libre de anclaje, se muestra además la media y desviación estándar del tamaño de las colonias. Los p-valores de las comparaciones de las condiciones dos a dos para cada experimento se encuentran reflejados en las tablas mostradas. F1 = Sobreexpresión de FGFR1, F4 = Sobreexpresión de FGFR4, E = Sobreexpresión de EGFR, shN = silenciamiento por ARN de interferencia de N-cadherina.

estas rutas correspondía a las líneas con co-sobreexpresión de cualquiera de los FGFRs junto con EGFR, de nuevo independientemente de la presencia de N-cadherina. Sin embargo, en ausencia de N-cadherina, la sobreexpresión de cualquiera de los FGFRs resultaba en una disminución de la activación de estas rutas de señalización en comparación con la condición control (**Figura 27**).



**Figura 27. Efecto molecular del silenciamiento de N-cadherina combinado con la sobreexpresión de EGFR y FGFR1 o FGFR4 en la línea inmortalizada de pulmón NL20.** Determinación de la activación de rutas de señalización relacionadas con FGFR en estas líneas. La leyenda para la nomenclatura de las líneas celulares se encuentra en la **Figura 26A**. F1 = Sobreexpresión de FGFR1, F4 = Sobreexpresión de FGFR4, E = Sobreexpresión de EGFR, shN = silenciamiento por ARN de interferencia de N-cadherina.

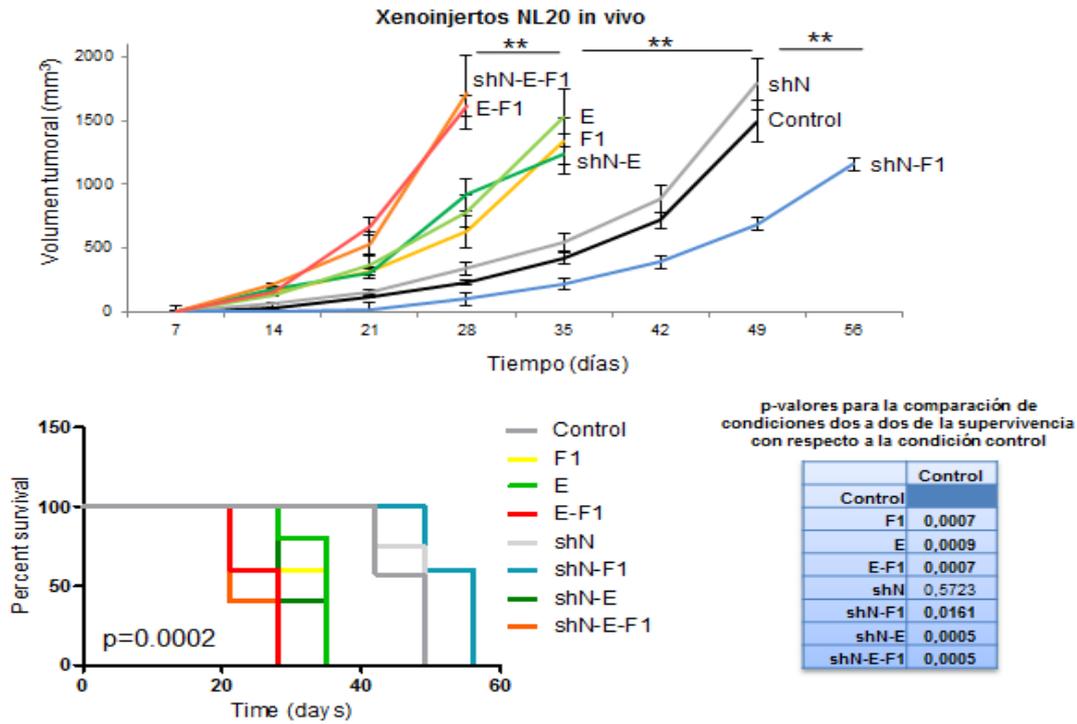
### 1.3.5. EGFR y N-cadherina definen el papel pro-tumorogénico de FGFR1 y FGFR4 *in vivo*

Para estudiar la interacción FGFR/EGFR/N-cadherina en un contexto más fisiológico, se xenoinjertaron las doce líneas celulares del modelo *in vitro* de interacción en ratones desnudos inmunodeprimidos y se determinó el crecimiento de los tumores generados. Todas las líneas celulares generaron tumores a pesar de que NL20 está catalogada como una línea celular no transformada y por tanto no se esperaba que en condiciones basales esta línea generara tumores *in vivo*. El crecimiento de los tumores generados por las diferentes líneas correlacionaba con los resultados obtenidos *in vitro*. Los tumores de más rápido crecimiento fueron aquellos generados por las líneas con co-sobreexpresión de EGFR con cualquiera de los FGFRs, tanto en presencia como en ausencia de N-cadherina. Las líneas celulares con sobreexpresión de EGFR mostraron un menor crecimiento tumoral con respecto a las

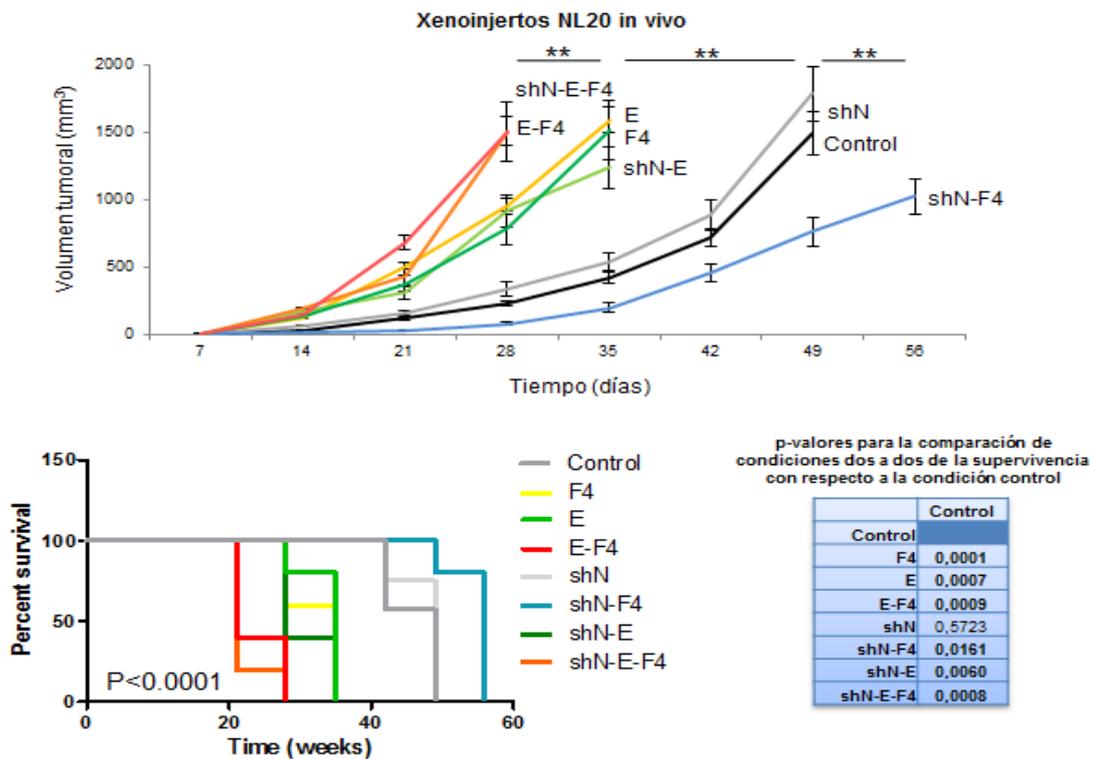
condiciones anteriores, y la expresión de N-cadherina no pareció tener influencia en los resultados en estos casos. La sobreexpresión de cualquiera de los dos FGFRs en presencia de N-cadherina mostró un crecimiento tumoral similar al de la sobreexpresión de EGFR, por encima de la línea control. Sin embargo, en ausencia de N-cadherina, la sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4 produjo una ralentización del crecimiento tumoral, en comparación con el crecimiento de la línea control (**Figura 28A-B**).

Todos estos resultados refuerzan los obtenidos anteriormente y nuestra hipótesis de que FGFR1 y FGFR4 tienen un papel diferencial en la tumorigénesis, dependiente de la expresión de N-cadherina y de la sobreactivación de EGFR. En ausencia de expresión de N-cadherina y de la activación constitutiva de EGFR, FGFR1 y FGFR4 ejercen un papel como supresor de tumor. Sin embargo, en presencia de N-cadherina o en cooperación con EGFR sobreactivado, ambos FGFRs actúan como oncogenes. Además, estos resultados indican que la expresión de N-cadherina no interviene en la cooperación entre EGFR y los FGFRs.

A



B



**Figura 28. Crecimiento tumoral de xenoinjertos en ratones inmunodeprimidos del panel de líneas estables generadas a partir de la línea de pulmón inmortalizada NL20 con diferentes combinaciones de expresión de N-cadherina, EGFR y FGFR1 (A) o FGFR4 (B).** Se muestran el crecimiento de los tumores con respecto al tiempo, así como la supervivencia de los ratones portadores de los tumores, que fueron sacrificados al alcanzar los tumores un volumen de 1000 mm<sup>3</sup>. La leyenda para la nomenclatura de las líneas celulares se encuentra en la **Figura 26A**. F1 = Sobreexpresión de FGFR1, F4 = Sobreexpresión de FGFR4, E = Sobreexpresión de EGFR, shN = silenciamiento por ARN den interferencia de N-cadherina. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (\*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001).

## 2. Abordajes terapéuticos para los tumores con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4

La descripción de los contextos moleculares en los que FGFR1 y FGFR4 presentan un comportamiento oncogénico realizada previamente sugiere que el uso de inhibidores dirigidos frente a FGFR podría ser una alternativa terapéutica a tener en cuenta en los pacientes de algunos subgrupos moleculares de tumores de pulmón. Para estudiar esta posibilidad, se comprobó la eficacia de estos inhibidores en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*.

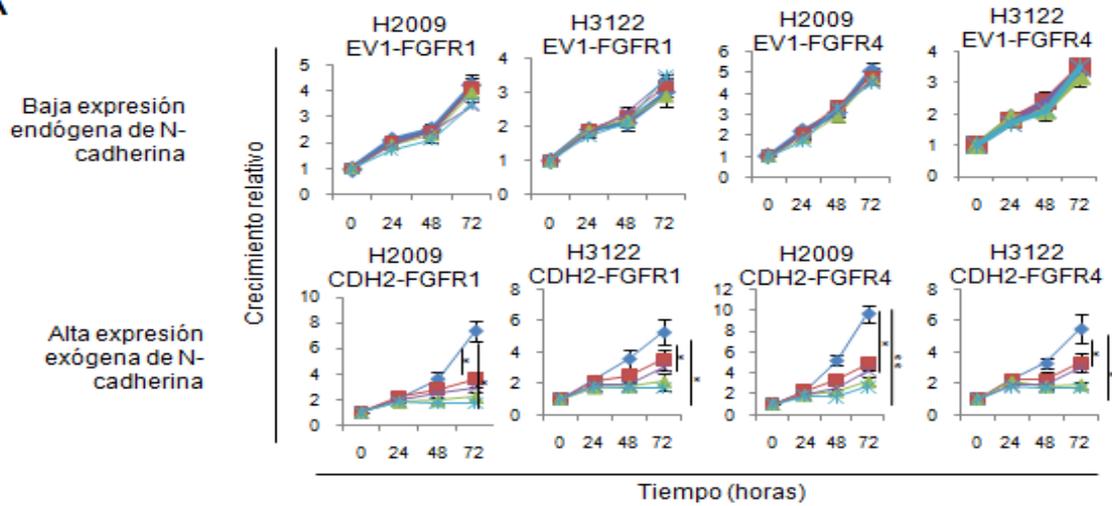
### 2.1. La alta expresión de N-cadherina como factor predictivo de la terapia anti-FGFR

Los datos obtenidos apoyan que la expresión de N-cadherina es decisiva en cuanto a los efectos oncogénicos ejercidos por FGFR1 y FGFR4. De esta manera, la alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4 por sí misma no determinaría la eficacia de su inhibición, sino que serían necesarios niveles altos de expresión de N-cadherina, ya que esta molécula de adhesión parece ser la responsable de la activación pro-oncogénica de los FGFRs en ausencia de activación de EGFR.

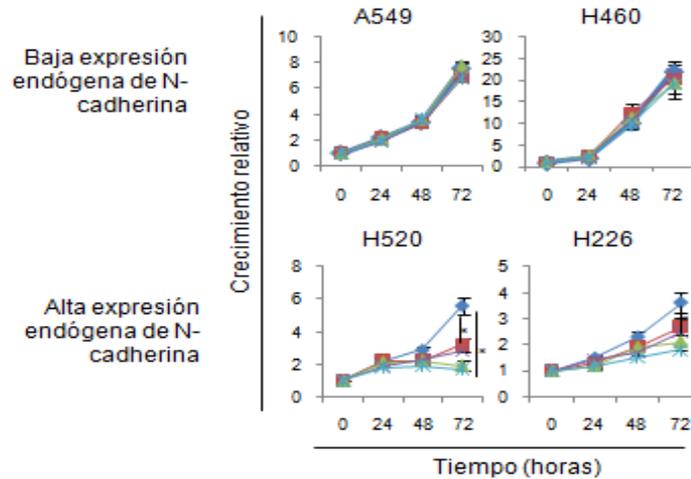
#### 2.1.1. N-cadherina como factor predictivo de respuesta a la terapia anti-FGFR *in vitro*

Para comprobar esta hipótesis, se probó la eficacia, en términos de inhibición del crecimiento, de dos inhibidores selectivos de FGFR (BGJ398 y AZD4547) en varias líneas celulares. Se seleccionaron las líneas celulares H2009 y H3122 con sobreexpresión inducida de FGFR1 o FGFR4, en combinación o no con sobreexpresión inducida de N-cadherina. Además, se seleccionaron varias líneas celulares con alta expresión endógena de FGFR1 y/o FGFR4, y con baja expresión de N-cadherina (A549 y H460), o con alta expresión de N-cadherina (H520 y H226, **Figura 6A**). Se observó que ambos inhibidores reducían el crecimiento en aquellas líneas con alta expresión de N-cadherina, endógena o exógena, pero no ejercían un efecto significativo en aquellas líneas con baja o nula expresión de N-cadherina a las concentraciones testadas (**Figura 29**). Estos resultados apoyaban el papel predictivo de la N-cadherina en relación a la eficacia de las terapias inhibitorias de FGFR.

A



B



◆ Control    ■ BGJ398 0.5 μM    ▲ BGJ398 1 μM    × AZD4547 0,5 μM    \* AZD4547 1 μM

**Figura 29. Efecto sobre la proliferación celular del tratamiento *in vitro* con inhibidores selectivos de FGFR en líneas con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4 y niveles diferenciales de N-cadherina. (A) Efecto del tratamiento con dos inhibidores selectivos de FGFR (BGJ398 y AZD4547) en el crecimiento de líneas de adenocarcinoma con sobreexpresión exógena de FGFR1 o FGFR4, en combinación o no con sobreexpresión exógena de N-cadherina. (B) Efecto del tratamiento en el crecimiento en líneas celulares con alta expresión endógena de FGFR1 y/o FGFR4, y niveles variables de N-cadherina endógenos.**

### 2.1.2. N-cadherina como factor predictivo de respuesta a la terapia anti-FGFR *in vivo*

A continuación, para comprobar si este papel predictivo tenía igualmente relevancia *in vivo*, probamos la eficacia del inhibidor que mostró mejor respuesta en nuestros experimentos *in vitro*, AZD4547, en diferentes tumores pulmonares derivados de pacientes xenoinjertados subcutáneamente en ratones inmunodeprimidos (PDXs).

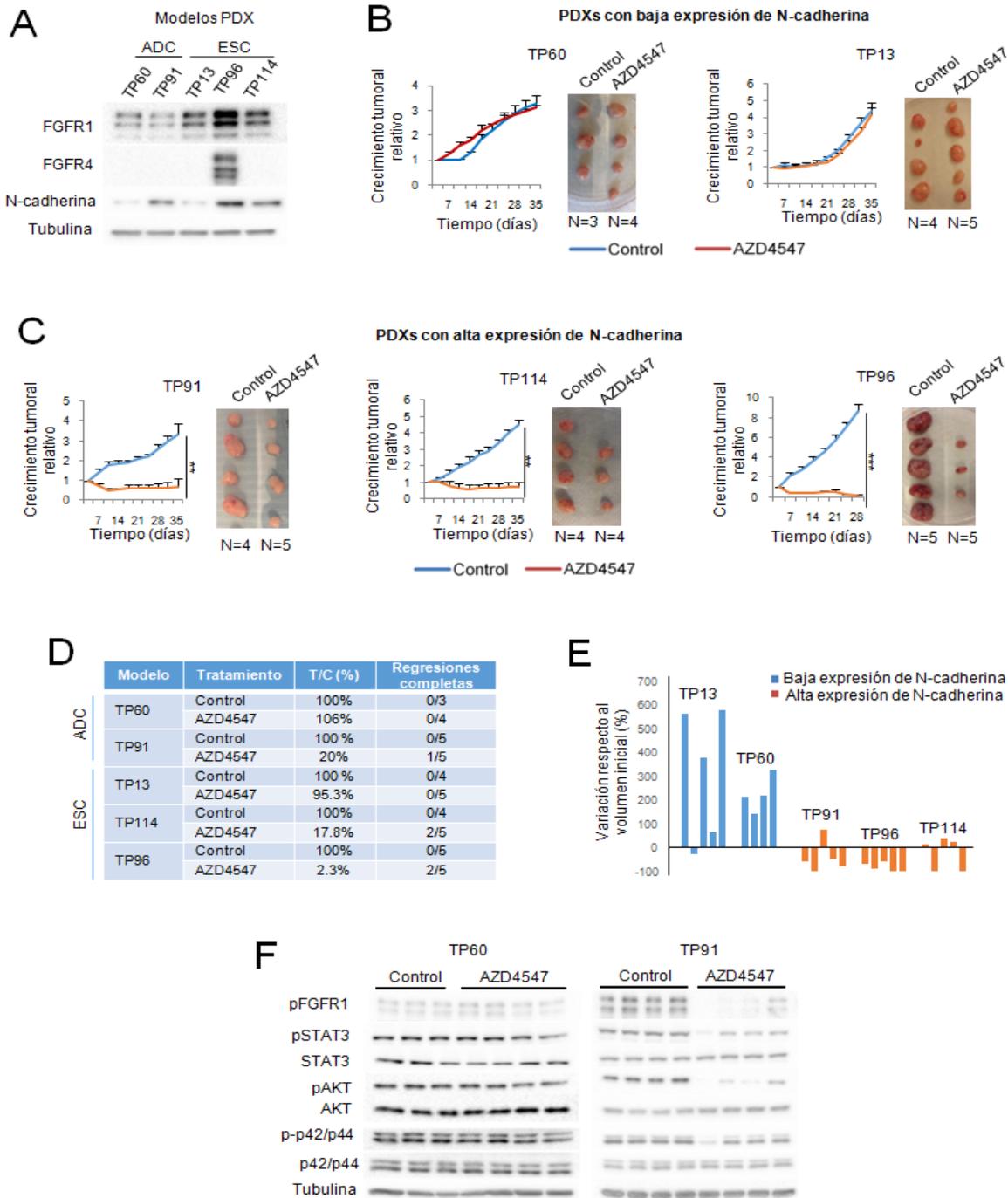
Seleccionamos modelos de tumores de diferentes histologías, todos con alta expresión de FGFR1. Entre nuestros modelos PDXs no contábamos con ninguno con alta expresión de FGFR4 sin alta expresión de FGFR1, por lo que no pudimos comprobar la eficacia frente a FGFR4 de este inhibidor.

Se seleccionaron dos modelos de adenocarcinoma con expresión similar de FGFR1, uno con alta expresión de N-cadherina (TP91) y otro con baja expresión de esta proteína (TP60). También seleccionamos dos modelos de carcinoma epidermoide con expresión comparable de FGFR1, con alta y baja expresión de N-cadherina (TP114 y TP13, respectivamente). Además, seleccionamos un modelo con muy alta expresión de FGFR1, FGFR4 y N-cadherina (TP96) (**Figura 30A**).

El tratamiento con AZD4547 no produjo efecto alguno en el crecimiento tumoral de los modelos con baja expresión de N-cadherina (TP60 y TP13), independientemente de su histología (**Figura 30B**). Sin embargo, en los modelos tumorales con alta expresión de N-cadherina (TP91, TP114 y TP96), el tratamiento con este inhibidor selectivo de FGFR causó una considerable reducción del crecimiento (con unos valores de T/C de 20, 17.8 y 2.3%, respectivamente).

Cabe destacar que el tratamiento con AZD4547 causó una regresión tumoral completa en 1/5, 2/5 y 2/5 de los tumores tratados, respectivamente en cada modelo (**Figura 30C-E**). Al analizar el efecto del inhibidor en las rutas de señalización relacionadas con FGFR en dos de los modelos tratados (TP60 y TP91), observamos que el tratamiento no alteró la activación de las rutas estudiadas en el modelo con baja expresión de N-cadherina (TP60), mientras que en el modelo con alta expresión de N-cadherina, TP91, AZD4547 causó una disminución en los niveles de pSTAT3, pAKT y una modesta reducción de la activación p-ERK (p42/p44) (**Figura 30F**).

Todos estos resultados apoyan el papel predictivo de la N-cadherina en la respuesta a la terapia dirigida frente a FGFR, independientemente de la histología.



**Figura 30. Valor predictivo de la expresión de N-cadherina sobre el efecto de inhibición FGFR en PDXs de pulmón con alta expresión de FGFR1 y FGFR4.** (A) Western blot de la expresión de FGFR1, FGFR4 y N-cadherina en los PDXs en estudio. Efecto del tratamiento con AZD4547 en dos PDXs con baja expresión de N-cadherina (B) y en tres modelos con alta expresión de este gen (C). (D) Valores de comparación entre el crecimiento de los tumores tratados en relación a los controles (T/C), expresado en porcentajes; y de las regresiones tumorales completas para cada modelo. (E) Gráfica representando la variación de volumen de los tumores respecto al inicio del tratamiento, expresado en porcentajes. (F) Determinación por western blot del efecto del tratamiento en rutas de señalización relacionadas con FGFR. Los tratamientos tuvieron una duración de 5 semanas, a no ser que el rápido crecimiento de los tumores obligara a su detención anterior. Se usaron dosis de 7.5 mg/kg/día 5 días a la semana por vía oral. ADC = Adenocarcinoma, ESC = Carcinoma epidermoide, N = Número de ratones por grupo de tratamiento. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

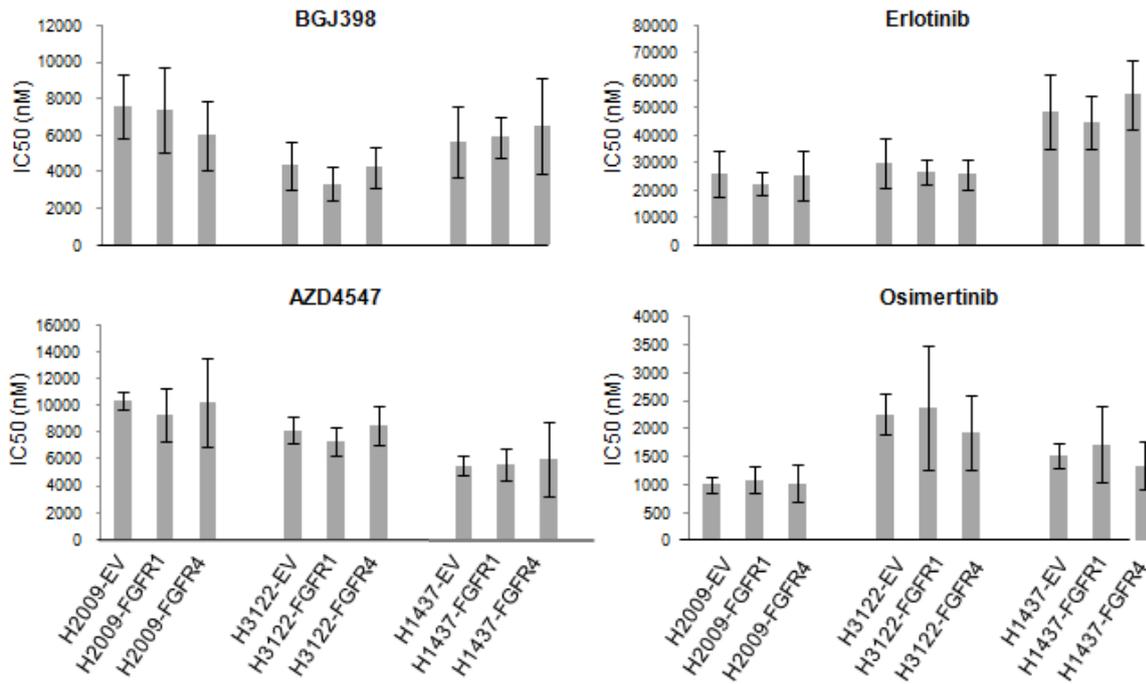
## 2.2. Inhibición conjunta de EGFR y FGFR dirigida a pacientes con adenocarcinoma con sobreactivación de EGFR

El segundo contexto molecular en el que FGFR1 y FGFR4 mostraban efectos oncogénicos es bajo la sobreactivación de EGFR. Los datos anteriormente presentados muestran que FGFR1 y FGFR4 interaccionan con EGFR, lo que produce su activación recíproca, incrementando la activación de diferentes rutas de señalización pro-oncogénicas dependientes de ambos receptores. De esta forma, la inhibición conjunta de estos FGFRs y de EGFR en tumores con dependencia de señalización de EGFR podría ser una aproximación terapéutica eficaz para el subgrupo de pacientes cuyos tumores presentan esta condición.

### 2.2.1. Inhibición combinada de EGFR y FGFR *in vitro*

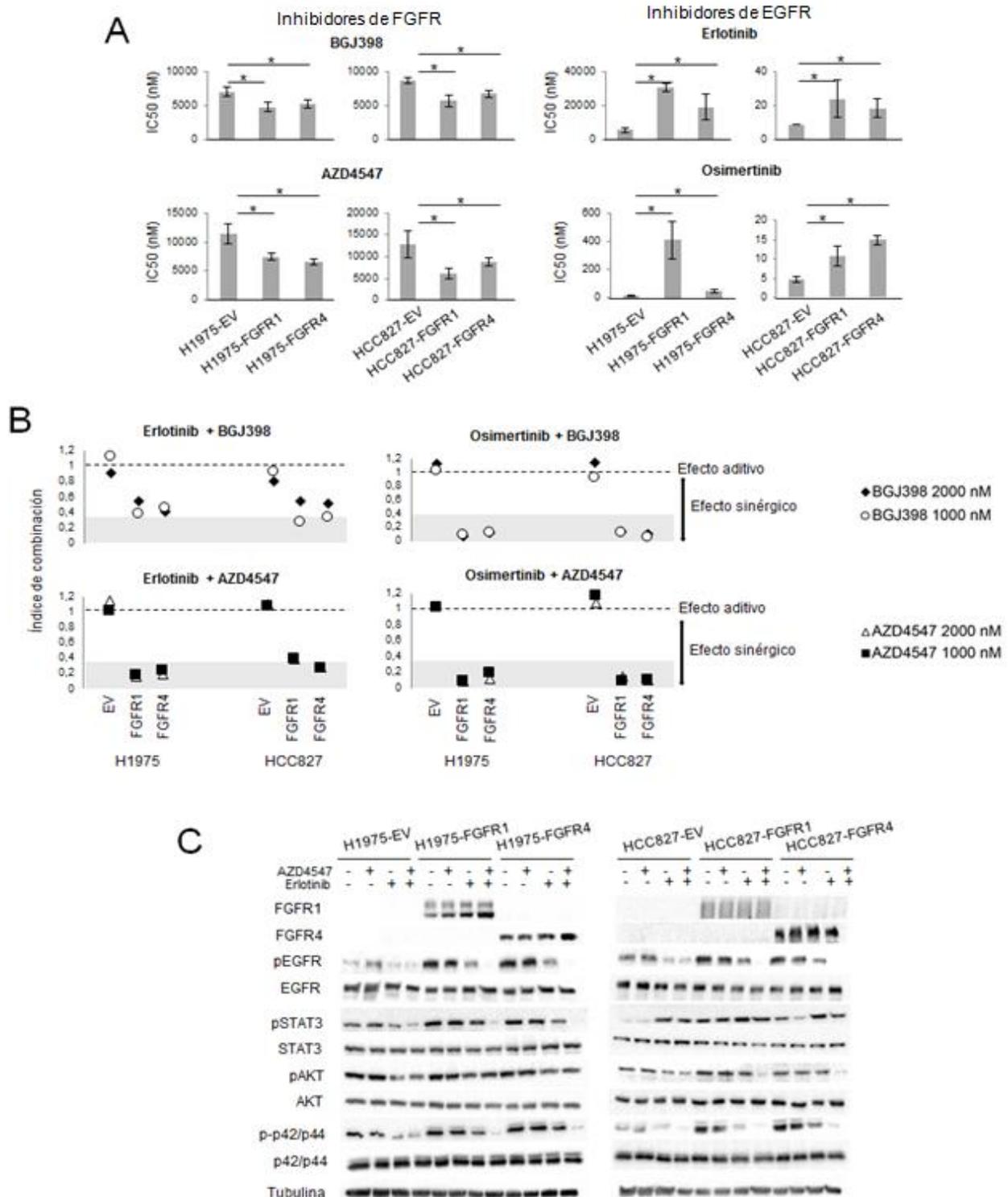
Para comprobar esta hipótesis, se estudió el efecto *in vitro* de los dos inhibidores selectivos de FGFR BGI398 y AZD4547, y de dos inhibidores de EGFR, erlotinib y osimertinib, en diferentes líneas celulares. Se seleccionaron como control tres líneas sin activación de EGFR (H2009, H3122 y H1437), y dos líneas con mutaciones activadoras de EGFR (H1975 y HCC827). Al comprobar la sensibilidad a estos inhibidores en estas líneas, en condiciones de sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4, se observó que la expresión de estos FGFRs no alteraba significativamente la sensibilidad a ninguno de estos inhibidores en las líneas sin activación de EGFR, en relación a la respectiva línea control con el vector de sobreexpresión vacío (**Figura 31**).

Sin embargo, en las dos líneas con activación de EGFR, la sobreexpresión de cualquiera de los FGFRs produjo un aumento de la sensibilidad a los inhibidores de FGFR y un aumento de la resistencia frente a los inhibidores de EGFR, en comparación con la respectiva línea control (**Figura 32A**). A continuación, se testó la sensibilidad de las dos líneas con activación de EGFR a las 4 diferentes combinaciones posibles de los inhibidores en estudio, y determinamos el efecto de cada una de ellas por medio del cálculo del índice de combinación. Se observó que en las líneas control con el plásmido vacío el efecto de cualquiera de las combinaciones era aditivo (índice de combinación próximo a 1). Sin embargo, en condiciones de sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4, las combinaciones adquirirían un efecto sinérgico (índice de combinación menor que 1,



**Figura 31. Determinación de la sensibilidad al tratamiento con inhibidores frente a EGFR y FGFR en líneas celulares de adenocarcinoma no dependientes de la señalización EGFR con sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4.** Se realizaron ensayos para calcular la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento (IC<sub>50</sub>) con dos inhibidores selectivos de FGFR (BGJ398 y AZD4547) y con dos inhibidores de EGFR de uso en clínica (erlotinib y osimertinib). EV = Línea celular control con vector vacío, FGFR1 = Sobreexpresión de FGFR1, FGFR4 = Sobreexpresión de FGFR4.

**Figura 32B).** Se seleccionó la combinación que mostraba el efecto sinérgico más potente con erlotinib (AZD4547 y erlotinib) y se comprobó el efecto de esta terapia combinada en la activación de rutas de señalización oncogénicas relacionadas con FGFR. En ambas líneas celulares, el tratamiento con erlotinib en monoterapia alcanzaba la inhibición parcial de la activación de EGFR, pero solo la terapia combinada conseguía la inhibición completa de EGFR en las líneas con sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4. Además, se obtuvieron resultados similares en cuanto a la señalización de la ruta ERK (p42/p44). En cuanto a la ruta de AKT, en la línea celular HCC827 con sobreexpresión de cualquiera de los FGFRs, la combinación alcanzó mayores niveles de inhibición que erlotinib en monoterapia, al contrario que en la línea H1975, donde la combinación no consiguió una mayor inhibición de esta ruta que el tratamiento con erlotinib.



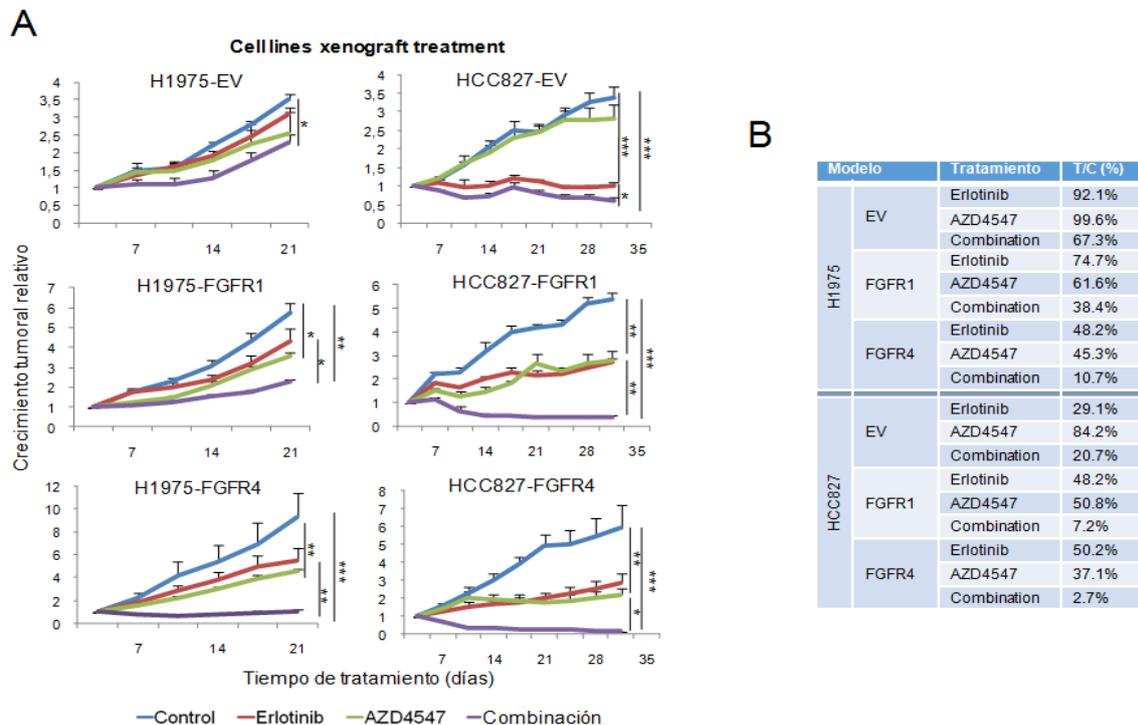
**Figura 32. Efecto de la combinación de la inhibición de FGFR y EGFR *in vitro* en líneas celulares de adenocarcinoma con dependencia de la señalización de EGFR y con sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4. (A)** Sensibilidad a los inhibidores selectivos de FGFR BGJ398 y AZD4547 y a los inhibidores de EGFR erlotinib y osimertinib en monoterapia, determinada mediante el ensayo de citotoxicidad IC50. **(B)** Efecto de la combinación de estos inhibidores mediante la determinación de la IC50 de los inhibidores de EGFR en combinación con dos dosis fijas del inhibidor de FGFR, analizado mediante el cálculo del Índice de combinación. **(C)** Efecto del tratamiento con AZD4547 y erlotinib en monoterapia y en combinación en las rutas de señalización oncogénicas relacionadas con FGFR, determinado por western blot.

Respecto a la señalización de STAT3, en la línea H1975 la combinación de ambos inhibidores alcanzó mayores niveles de inhibición de la activación de esta ruta que el tratamiento con erlotinib en monoterapia. En la línea HCC827 se observó que el tratamiento con erlotinib no solo no disminuía la activación de STAT3, sino que la inducía. Sin embargo, la adición de AZD4547 al tratamiento con erlotinib redujo la activación de esta ruta (**Figura 32C**).

### 2.2.2. Inhibición conjunta de EGFR y FGFR *in vivo*

A continuación, se comprobó la eficacia de la combinación de erlotinib y AZD4547 *in vivo*, en xenoinjertos de líneas celulares en ratones inmunodeprimidos. Se xenoinjertaron las líneas con mutaciones activadoras de EGFR H1975 y HCC827 con sobreexpresión exógena de FGFR1 o FGFR4. Cabe destacar que la línea H1975 también presentaba la mutación T790M, conocida por conferir resistencia a los TKIs de primera generación frente a EGFR, como erlotinib. En ambas líneas celulares, la sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4 provocó una mayor sensibilidad de los tumores generados a la inhibición de FGFR, de modo que podía observarse que la administración de AZD4547 en monoterapia producía una reducción del crecimiento tumoral con respecto al control (porcentajes T/C de 99.6, 61.6 y 45.3% en el caso de los xenoinjertos de H1975, y de 84.2, 50.8 y 37.1% en el caso de los xenoinjertos de HCC827 control, con sobreexpresión de FGFR1 y con sobreexpresión de FGFR4, respectivamente). Además, este efecto parecía ser específico de la inhibición de FGFR, ya que la administración de AZD4547 no tuvo gran efecto en los tumores generados por las líneas celulares control, sin sobreexpresión de los FGFRs. Los tumores generados por H1975 fueron intrínsecamente resistentes al tratamiento con erlotinib, como cabría esperar al portar la mutación de resistencia T790M (T/C de 92.1%). En estos tumores, la combinación de erlotinib con AZD4547 demostró mayor eficacia que la administración de erlotinib en monoterapia, en especial en los modelos con sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4, donde el efecto fue más acusado, alcanzándose incluso la estabilización del crecimiento tumoral en el caso de la sobreexpresión de FGFR4 (porcentajes T/C de 67.3, 38.4 y 10.7, para los xenoinjertos de H1975 control, con sobreexpresión de FGFR1 y con sobreexpresión de FGFR4, respectivamente).

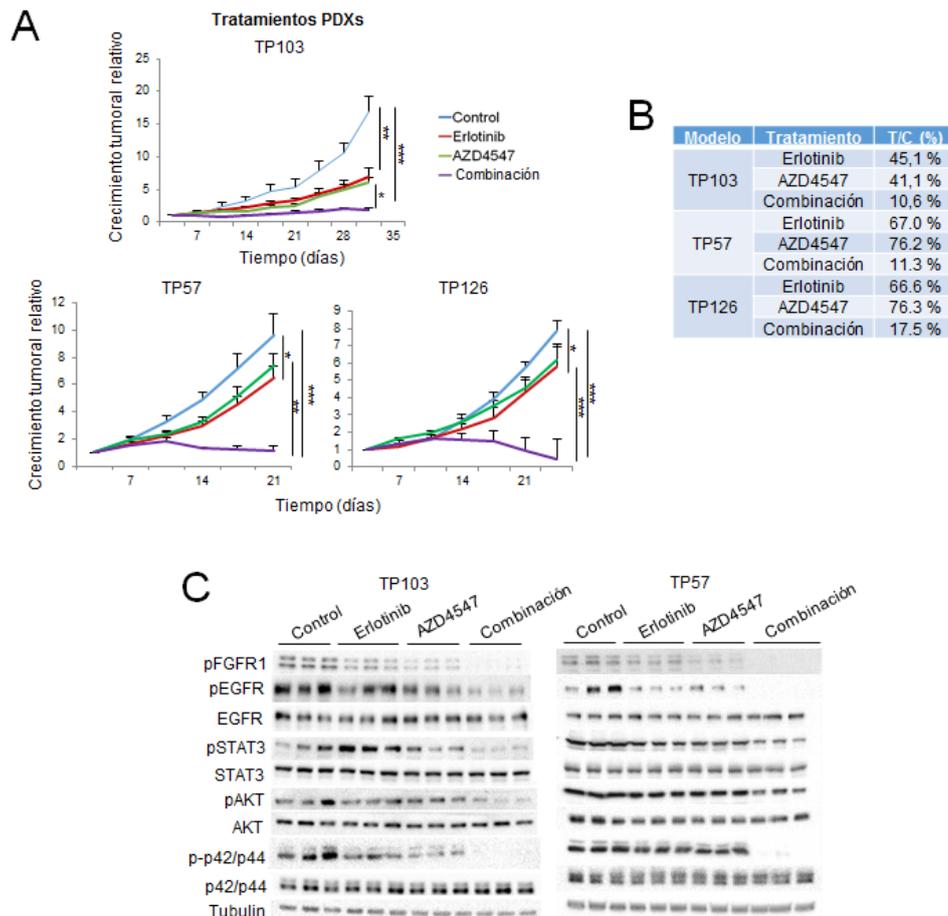
En los tumores generados por la línea HCC827, la sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4 confirió una mayor resistencia a la inhibición de EGFR (valores de T/C de 29.1%, 48.2% y 50.2% para los modelos control y con sobreexpresión de FGFR1 y FGFR4, respectivamente), que fue revertida por el tratamiento combinado (T/C de 20.7%, 7.2% y 2.7%, respectivamente) (**Figura 33**).



**Figura 33. Efecto de la combinación de erlotinib y AZD4547 en xenoinjertos de líneas celulares con diferentes mutaciones activadoras de EGFR: H1975 (L858R y T790M) y HCC827 (Delección exón 19).** (A) Efecto de la administración de erlotinib y AZD4547 en monoterapia y en combinación en el crecimiento de los tumores generados por estas líneas celulares. (B) Tabla de valores de comparación entre el crecimiento de los tumores tratados en relación a los controles (T/C), expresado como porcentajes. Los tratamientos tuvieron una duración de 5 semanas, a no ser que el rápido crecimiento de los tumores exigiera detenerlo antes. Se utilizaron grupos de 5 ratones por brazo de tratamiento. Se administró AZD4547 a 5 mg/kg/día de lunes a viernes, en monoterapia o en combinación con erlotinib, por vía oral. La concentración de erlotinib, tanto en el grupo en monoterapia como en el grupo en combinación con AZD4547, fue de 50 mg/kg/día en el caso de los xenoinjertos de H1975, o de 20 mg/kg/día en el caso de los xenoinjertos de HCC827, tratándose de lunes a viernes en ambos casos. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

Además, se probó el efecto de esta terapia combinada en varios modelos PDX de adenocarcinoma con alta expresión de FGFR1: uno con la mutación activadora de EGFR L858R y la de resistencia a erlotinib T790M en EGFR (TP103), y dos con EGFR

nativo pero altamente activado y con mutaciones en KRAS (TP57 y TP126). En estos modelos, los tratamientos con erlotinib o con AZD4547 en monoterapia consiguieron reducir el tamaño de los tumores, en comparación con los tumores sin tratar, pero la combinación de ambos fármacos consiguió una reducción mucho más acusada, demostrando la superioridad del tratamiento combinado (**Figuras 34A-B**).



**Figura 34. Efecto de la combinación de erlotinib y AZD4547 en modelos PDX de adenocarcinoma de pulmón con alta activación de EGFR (nativo o mutado) y con alta expresión de FGFR1.** (A) Efecto de la administración de erlotinib y AZD4547 en monoterapia y en combinación en el crecimiento de los PDXs. (B) Tabla de valores de comparación entre el crecimiento de los tumores tratados en relación a los controles (T/C), expresado como porcentajes. (C) Efecto de estos tratamientos en la señalización oncogénica relacionada con EGFR y FGFR. Los tratamientos tuvieron una duración de 5 semanas, a no ser que el rápido crecimiento de los exigiera detenerlo antes. Se utilizaron grupos de 5 ratones por brazo de tratamiento. Se administró AZD4547 a 5 mg/kg/día de lunes a viernes, en monoterapia o en combinación con erlotinib, por vía oral. La concentración de erlotinib, tanto en el grupo en monoterapia como en el grupo en combinación con AZD4547, fue de 50 mg/kg/día en el caso del modelo TP103, con la mutación de resistencia a erlotinib en EGFR T790M, o de 20 mg/kg/día en el caso de los modelos con EGFR nativo, TP57 y TP126, tratándose de lunes a viernes en ambos casos. Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

Al estudiar los efectos de los tratamientos en las rutas de señalización oncogénicas en estudio, se observó que tanto el AZD4547 como el erlotinib redujeron la activación de las rutas de ERK (p42/p44) y AKT a un nivel similar, y que la combinación producía una mayor inhibición de estas rutas. Cabe destacar que respecto a la señalización de STAT3, en el modelo TP103 el tratamiento con erlotinib produjo un aumento de la activación de esta ruta, que pudo ser reducido por la combinación de ambos fármacos (**Figura 34C**).

### **3. FGFR1 y FGFR4 como biomarcadores pronósticos y predictivos de respuesta a terapia anti-FGFR en cáncer de pulmón no microcítico**

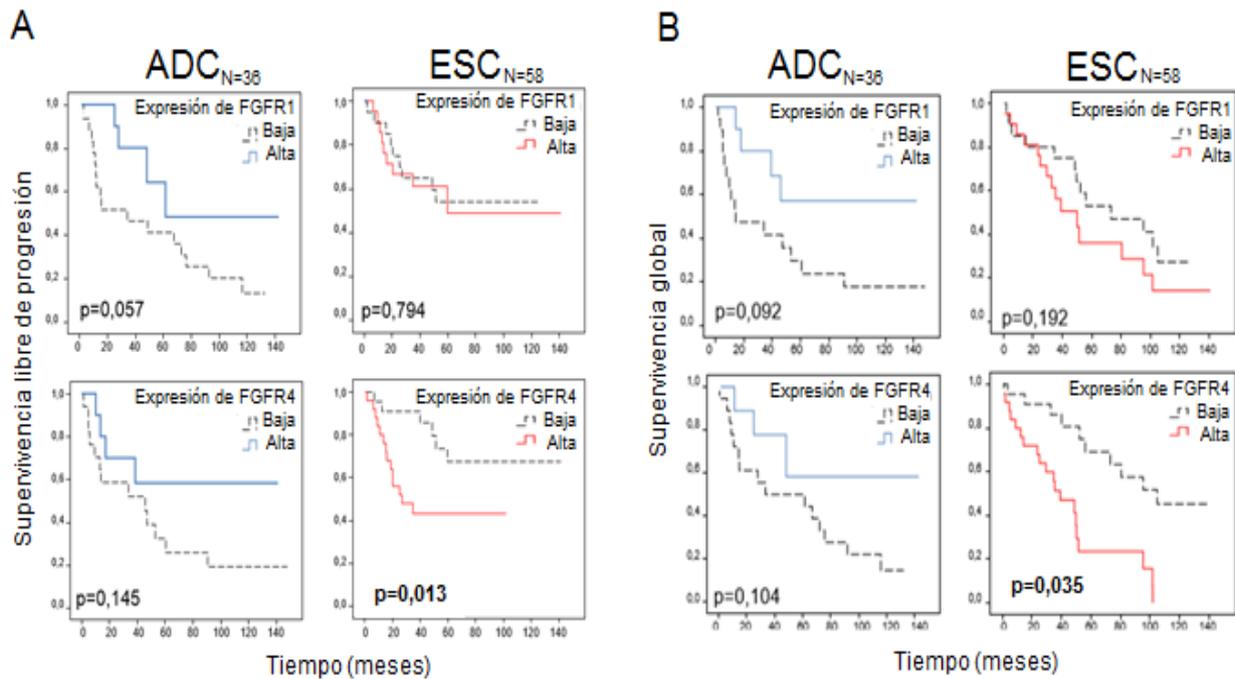
#### **3.1. FGFR1 y FGFR4 como biomarcadores pronósticos en cáncer de pulmón no microcítico**

Se determinó la expresión de FGFR1, FGFR4 y N-cadherina a nivel de ARNm en muestras parafinadas de tumores de 109 pacientes de CPNM, y se correlacionó con la información clínica de los mismos. La cohorte estaba compuesta principalmente por pacientes de adenocarcinoma y carcinoma epidermoide de pulmón de los hospitales Virgen del Rocío (Sevilla) y 12 de Octubre (Madrid), que presentaban tumores en estadio temprano (I-IIIa) tratados con cirugía radical.

##### *3.1.1. FGFR1 y FGFR4 como biomarcadores pronósticos en adenocarcinoma y carcinoma epidermoide*

Para comprobar si ambos FGFRs presentaban un papel pronóstico concordante con su papel oncogénico en carcinoma epidermoide y su papel supresor tumoral en adenocarcinoma, descritos según los datos previamente presentados, de entre la cohorte de casos de CPNM se establecieron dos subgrupos en función de la histología de los tumores: uno con los pacientes de adenocarcinoma (n=36) y otro con los de carcinoma epidermoide (n=58). En cada subgrupo se correlacionó la expresión de FGFR1 y FGFR4 con la supervivencia, definiendo dos grupos de pacientes según la

expresión a nivel de ARNm de los FGFRs, con valores inferiores, o superiores o iguales a la mediana (**Figura 35**).



**Figura 35. Asociación de la expresión de ARNm de FGFR1 y FGFR4 con la supervivencia, separando por histologías, en una cohorte de pacientes de CPNM (N=109).** El criterio para discernir entre baja y alta expresión fue el valor de la mediana de expresión para cada gen.

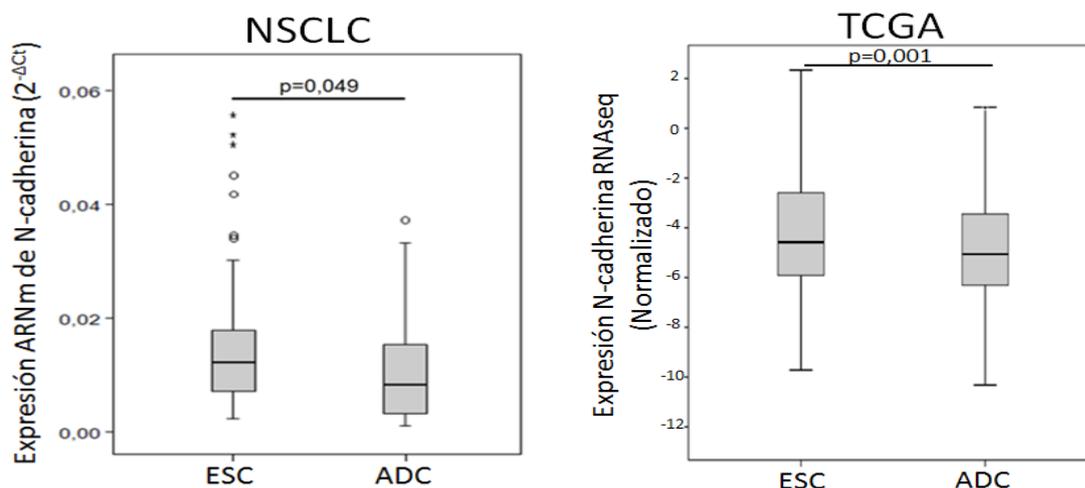
En los pacientes con adenocarcinoma, la alta expresión de FGFR1 correlacionaba con una mayor supervivencia libre de progresión (cociente de riesgo 0.76 [0.42-1.22]) y global (cociente de riesgo 0.55 [0.34-1.41]). Sin embargo, en los pacientes de carcinoma epidermoide, ocurría lo contrario (cocientes de riesgo de 1.12 [0.83-1.33] y 1.55 [0.77-1.89] para la supervivencia libre de progresión y global, respectivamente). Sin embargo, estas asociaciones no alcanzaron la significancia estadística. De forma similar, la alta expresión de FGFR4 correlacionaba con una mayor supervivencia global (cociente de riesgo de 0.63 [0.38-1.23]) y libre de progresión (cociente de riesgo de 0.56 [0.23-1.45] en adenocarcinoma, pero de nuevo sin significancia estadística. En los pacientes de carcinoma epidermoide, sin embargo, la expresión de FGFR4 correlacionaba claramente con una peor supervivencia global y libre de progresión, alcanzando en estos casos la significancia estadística (cociente de

riesgo 1.89 [1.12-2.99],  $p=0,013$  y cociente de riesgo 2.13 [1.33-3.25],  $p=0,035$ ; respectivamente) (**Figura 35**).

### 3.1.2. Efecto de la expresión de N-cadherina en el papel pronóstico de FGFR1 y FGFR4 en pacientes con CPNM

A pesar de que el papel diferencial de ambos FGFRs inicialmente parecía dependiente de histología, nuestros datos indican que el responsable biológico subyacente es la expresión de N-cadherina y no la histología tumoral, si bien es cierto que es en las líneas de carcinoma epidermoide donde se observan mayores niveles de expresión de N-cadherina, lo que explicaría el efecto pro-oncogénico de ambos FGFRs en éstas (**Figura 20**).

En concordancia con nuestros datos *in vitro*, se observó que los tumores epidermoides presentaban una mayor expresión de N-cadherina que los adenocarcinomas, a nivel de ARNm tanto en nuestra cohorte propia como en la cohortes públicas (TCGA) (**Figura 36**).

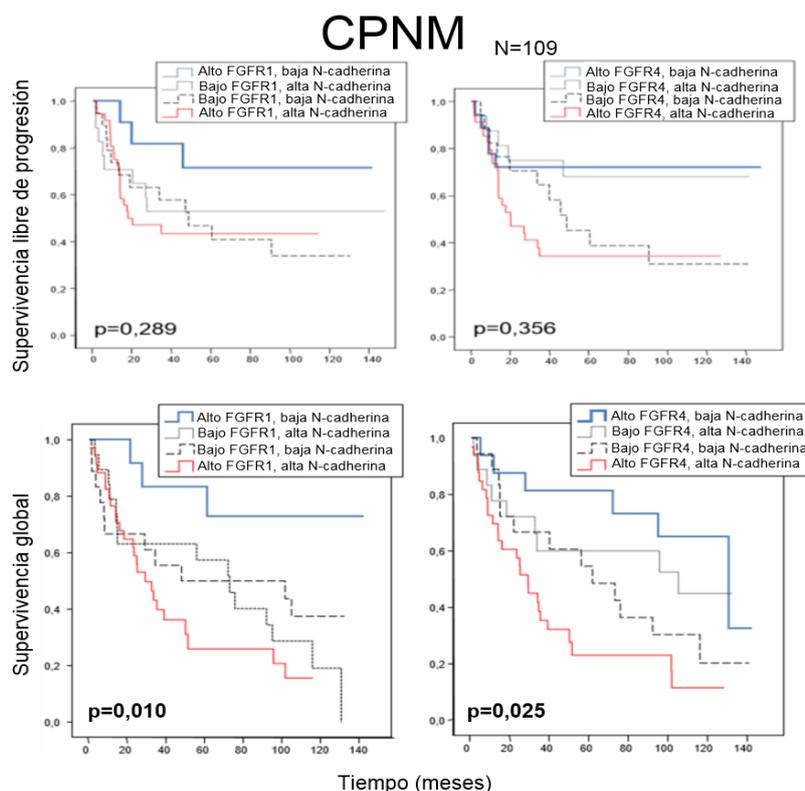


**Figura 36.** Relación de la expresión de ARNm de N-cadherina con la histología en nuestra cohorte de pacientes de CPNM (N=104) y en la cohorte de cáncer de pulmón no microcítico (N=1219) . Los p-valores se encuentran representados por asteriscos (\*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ; \*\*\*,  $p<0.001$ ). ESC = Carcinoma epidermoide y ADC = Adenocarcinoma.

Esta observación es consistente con el papel de la N-cadherina como potencial modulador del papel oncogénico de FGFR1 y FGFR4 que proponemos. De esta manera, para estudiar el papel de la N-cadherina en el efecto pronóstico de FGFR1 y FGFR4 en nuestra cohorte de pacientes de CPNM, dividimos en cuatro grupos la cohorte completa de pacientes (N=109), incluyendo adenocarcinomas, carcinomas epidermoides y otras histologías de CPNM, y los relacionamos con los datos de supervivencia. Los cuatro grupos fueron los siguientes: (i) Alta expresión de FGFR1 y baja expresión de N-cadherina (N=20, 18.3%), (ii) alta expresión de FGFR1 y alta expresión de N-cadherina (N=40, 36.7%), (iii) baja expresión de FGFR1 y baja expresión de N-cadherina (N=22, 20.2%) y (iv) baja expresión de FGFR1 y alta expresión de N-cadherina (N=27, 24.8%); definiendo alta o baja expresión como aquellos valores por encima y por debajo de la mediana. El grupo con alta expresión de ambos genes mostró los peores datos de supervivencia libre de progresión y global, mientras que el grupo con alta expresión de FGFR1 y baja expresión de N-cadherina mostró los mejores datos para ambos tipos de supervivencia. Los otros dos grupos presentaron datos de supervivencia intermedios. Estas diferencias encontradas entre los cuatro grupos de pacientes no alcanzaron la significancia estadística para la supervivencia libre de progresión. Sin embargo, es destacable que en el grupo de baja expresión de N-cadherina y alta de FGFR1, más de un 70% de los pacientes continuaban libres de progresión al final del tiempo de observación, contrastando con el 30-40% en los otros grupos. En el caso de la supervivencia global sí se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,01$ ), y destaca que al final del tiempo de observación, en el grupo de alta expresión de FGFR1 y baja de N-cadherina de nuevo más del 70% de los pacientes continuaban con vida, en contraste con el 0-40% de los otros grupos (**Figura 37**). Al realizar la misma división en grupos, pero teniendo en cuenta los niveles de expresión de ARNm de FGFR4 en lugar de los de FGFR1 (alta expresión de FGFR4 y baja expresión de N-cadherina (N=22, 20.1%), alta expresión de FGFR4 y alta expresión de N-cadherina (N=37, 33.9%), baja expresión de FGFR4 y baja expresión de N-cadherina (N=20, 18.3%) y baja expresión de FGFR4 y alta expresión de N-cadherina (N=30, 27.5%)), observamos resultados muy similares a los obtenidos para FGFR1. De nuevo, las diferencias observadas entre los cuatro grupos no fueron estadísticamente significativas para la supervivencia libre de progresión, aunque de la misma manera

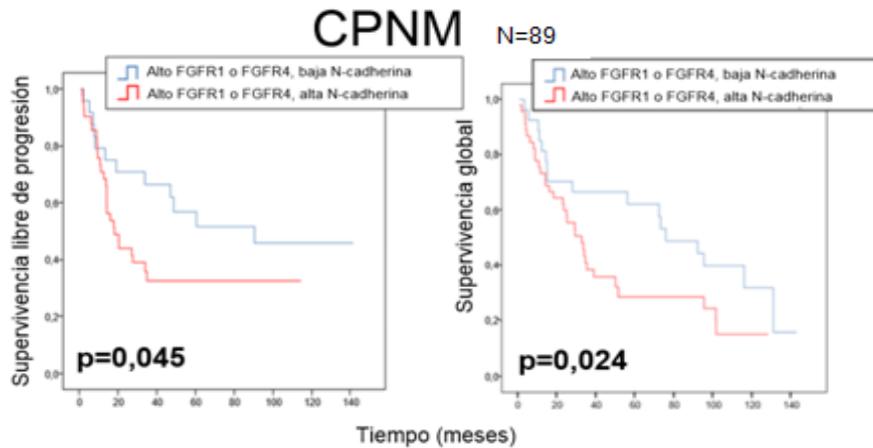
que para FGFR1, más del 70% de los pacientes con alta expresión de FGFR4 y baja de N-cadherina permanecían libres de progresión al final del tiempo de observación. En el caso de la supervivencia global, los resultados obtenidos sí mostraron diferencias significativas ( $p=0,025$ ) (Figura 37).

Además, se realizó otro análisis complementario seleccionando los pacientes con alta expresión de FGFR1, FGFR4 o de los dos y dividiendo este subconjunto en dos grupos, según la expresión de N-cadherina ( $N=89$ ). Como se esperaba, los pacientes con alta expresión de uno o de los dos FGFRs y con baja expresión de N-cadherina mostraban una mejor supervivencia libre de progresión y global que el subconjunto con alta expresión de ambos genes (cociente de riesgo 2.06 [1.01-4.23],  $p=0,045$  y



**Figura 37. Asociación de la expresión de ARNm de N-cadherina y de FGFR1 o FGFR4 con la supervivencia en toda la cohorte de pacientes de CPNM (N=109).** El criterio utilizado para calificar como baja y alta expresión fue el valor de la mediana de expresión para cada gen. CPNM = Cáncer de pulmón no microcítico.

cociente de riesgo 1.89 [1.02-3.49]  $p=0,039$ ; respectivamente) (**Figura 38**). Estas curvas de supervivencia muestran claramente el efecto de la N-cadherina como modulador del papel de FGFR1 y FGFR4 en la oncogénesis del cáncer de pulmón.

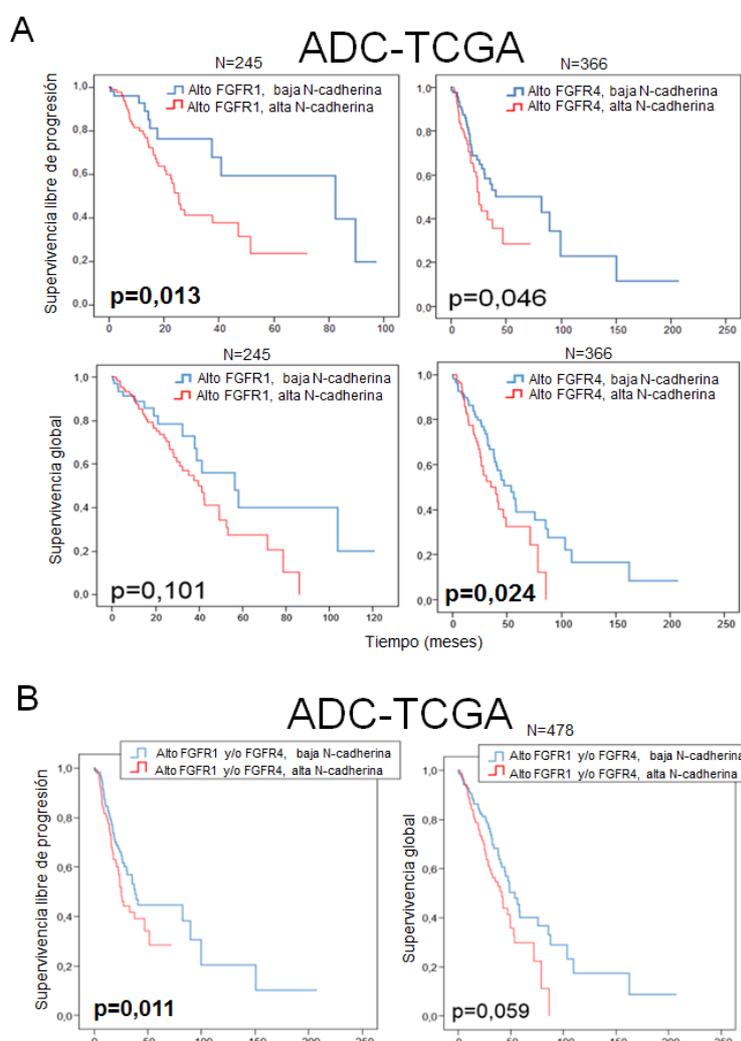


**Figura 38.** Asociación de la expresión de ARNm de N-cadherina con la supervivencia en el subconjunto de pacientes de nuestra cohorte de CPNM (N=89) con alta expresión de FGFR1, FGFR4 o de ambos). El criterio utilizado para calificar como baja y alta expresión fue el valor de la mediana de expresión para cada gen CPNM = Cáncer de pulmón no microcítico.

### 3.1.3. Validación del papel pronóstico de N-cadherina y FGFR1 o FGFR4 en bases de datos públicas

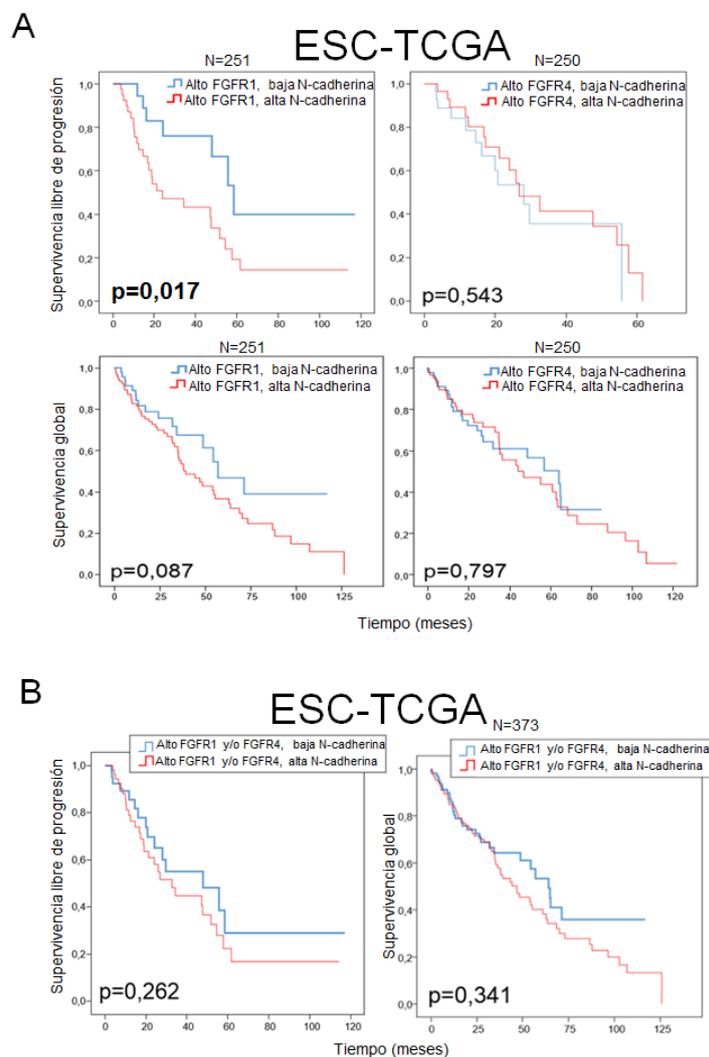
Se realizaron los mismos análisis realizados en nuestra cohorte de pacientes, en dos bases de datos clínicas disponibles públicamente del TCGA; una de pacientes de adenocarcinoma (n=522) y otra de carcinoma epidermoide (n=504). En estas cohortes, se dividió a los pacientes en función de la expresión de ARNm de FGFR1 y N-cadherina, o de FGFR4 y N-cadherina y analizamos la supervivencia. En la cohorte de adenocarcinoma, el punto de corte entre alta y baja expresión se definió como la mediana de expresión para N-cadherina y FGFR1, y como el primer cuartil para FGFR4. En el caso de la cohorte de carcinoma epidermoide, se estableció como punto de corte la mediana para los 3 genes. Seleccionado los pacientes con alta expresión de FGFR1 en la cohorte de adenocarcinoma (N=245), de nuevo, la alta expresión de FGFR1 y baja de N-cadherina correlacionaban con un mejor pronóstico, mientras que la alta expresión de ambos correlacionaba con unos peores valores de supervivencia (Cociente de riesgo de 2.38 [1.15-4.94],  $p=0.016$  para la supervivencia libre de progresión, y de 1.63 [0.90-2.95],  $p=0.101$  para la supervivencia global). Realizando lo mismo con FGFR4 (N=366), se obtuvieron resultados similares (cociente de riesgo de

1.61 [1.01-2.59],  $p=0.046$  para la supervivencia libre de progresión, y de 1.79 [1.06-2.51],  $p=0.024$  para la supervivencia global) (**Figura 39A**). Además, se seleccionó en cada cohorte a los pacientes con alta expresión de uno o de ambos FGFRs y se dividió este subconjunto de pacientes en función del nivel de expresión de N-cadherina ( $N=478$ ). Se observó una clara tendencia a que en este subconjunto de pacientes, los altos niveles de expresión de N-cadherina se asociaban a una peor supervivencia (Cociente de riesgo de 1.46 [0.98-2.17],  $p=0.059$  para la supervivencia libre de progresión, y de 1.63 [1.11-2.38],  $p=0.011$  para la supervivencia global, **Figura 39B**), reproduciendo así los resultados obtenidos en nuestra cohorte de pacientes.



**Figura 39. Asociación de la expresión de ARNm de FGFR1, FGFR4 y N-cadherina con la supervivencia en una cohortes públicas de pacientes de adenocarcinoma de TCGA ( $N=522$ ). El criterio utilizado para clasificar como baja y alta expresión fue el valor de la mediana de expresión para cada gen, salvo para FGFR4, donde se utilizó el primer cuartil. ADC = adenocarcinoma.**

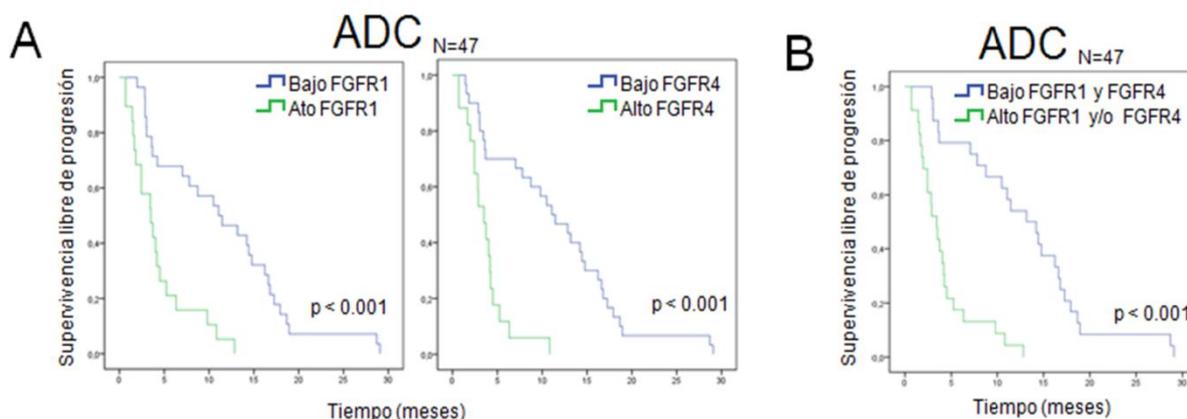
En la cohorte de carcinoma epidermoide, los datos fueron muy similares para FGFR1, observándose que en los pacientes con alta expresión de FGFR1 (N=251), aquéllos con alta expresión de N-cadherina presentaban peor pronóstico (cociente de riesgo de 1.88 [1.25-2.79],  $p=0.017$  para la supervivencia libre de progresión, y de 1.34 [0.89-1.99],  $p=0.087$  para la supervivencia global). Sin embargo, en el caso de FGFR4 (N=250) no parecían observarse diferencias en cuanto a pronóstico en esta cohorte (**Figura 40A**) y al tener en cuenta los tumores con alta expresión de alguno o de ambos receptores (N=373), se perdía la significancia estadística obtenida al considerar solo la expresión de FGFR1 (**Figura 40B**).



**Figura 40. Asociación de la expresión de ARNm de FGFR1, FGFR4 y N-cadherina con la supervivencia en una cohorte pública de pacientes de carcinoma epidermoide de TCGA (N=504).** El criterio utilizado para clasificar como baja y alta expresión fue el valor de la mediana de expresión para cada gen. ESC = Carcinoma epidermoide.

### 3.2. FGFR1 y FGFR4 como biomarcadores predictivos de respuesta a la terapia anti-EGFR en adenocarcinoma de pulmón

A la vista de la cooperación demostrada entre EGFR y los FGFRs *in vitro* e *in vivo* en los modelos de adenocarcinoma estudiados, se decidió estudiar si la expresión de FGFR1 y/o FGFR4 podría predecir la respuesta a terapia frente a EGFR en pacientes de adenocarcinoma de pulmón. Se analizó una cohorte de pacientes de adenocarcinoma avanzado tratados por primera vez con erlotinib o gefitinib en primera, segunda o tercera línea. Como según nuestros datos obtenidos la cooperación EGFR-FGFR1/4 ocurría tanto en pacientes con EGFR mutado como nativo, se incluyeron no solo pacientes con EGFR mutado (53,2%), sino también pacientes con la variante nativa del gen (40,4%). Determinamos la expresión de FGFR1 y FGFR4 en estos tumores y la relacionamos con la supervivencia libre de progresión en estos pacientes tratados, clasificando los casos según la expresión baja o alta (por debajo o por encima del valor de la mediana en la cohorte) de cada gen. Observamos que tanto la alta expresión de FGFR1 como la de FGFR4 por separado correlacionaban con peores valores de supervivencia libre de progresión (cocientes de riesgo de 3.44 [2.09-5.69],  $p < 0,001$  y de 3.62 [2.18-6.11],  $p < 0,001$ ; respectivamente). Al tener en cuenta los datos de expresión de ambos genes, se producía una separación más clara en los valores de supervivencia libre de progresión para ambos grupos ( $p < 0,001$ ) (**Figura 41**).



**Figura 41.** Efecto de la expresión de FGFR1 y FGFR4 en la respuesta a terapia anti-EGFR en una cohorte de adenocarcinoma (N=47). Correlación de la supervivencia libre de progresión de pacientes tratados

con erlotinib o gefitinib con la expresión de ARNm de FGFR1 o FGFR4 (A), o de ambos (B). El criterio utilizado para clasificar como baja y alta expresión fue el valor de la mediana de expresión para cada gen. ADC = Adenocarcinoma

Estos resultados sugieren que la expresión de FGFR1 y FGFR4 es predictiva de la eficacia de terapias frente a EGFR, de forma que los pacientes con alta expresión de alguno o de ambos genes progresan más rápidamente al tratamiento con erlotinib o gefitinib. Además, estos datos también podrían indicar la existencia de un subconjunto de pacientes de adenocarcinoma que podrían beneficiarse potencialmente de la terapia combinada frente a EGFR y a FGFR.

# Discusión

---



A lo largo de este trabajo se describe el papel diferencial de FGFR1 y FGFR4 en la tumorigénesis pulmonar. Estos receptores parecen ejercer efectos pro- o anti-oncogénicos dependiendo del contexto molecular, que definiría el papel pronóstico de su expresión en los pacientes con cáncer de pulmón, y determinaría la eficacia de la inhibición terapéutica de FGFR en estos tumores.

En presencia de altos niveles de expresión de N-cadherina, frecuentes en carcinoma epidermoide, ambos FGFRs aumentan la señalización y propiedades tumorigénicas. En ausencia de N-cadherina, situación más asociada al adenocarcinoma, ambos FGFRs ejercen por lo general un efecto supresor tumoral, mediado por una disminución de la activación de determinadas rutas oncogénicas. En concordancia con este papel de la N-cadherina como cooperador en el efecto pro-tumorigénico de ambos FGFRs, la determinación de la expresión de esta molécula de adhesión junto con la de FGFR1 y FGFR4 representa un biomarcador pronóstico en pacientes con CPNM, y predictivo de la eficacia de la inhibición de FGFR.

Por otro lado, en adenocarcinomas dependientes de la activación de EGFR, FGFR1 y FGFR4 cooperan con EGFR, independientemente de la expresión de N-cadherina. La co-expresión produce la activación recíproca de ambos tipos de receptores, que induce un incremento de la señalización subsidiaria y efectos oncogénicos. Además, la alta expresión de ambos FGFRs confiere resistencia a la inhibición de EGFR, lo que a nivel clínico se refleja en una peor respuesta al tratamiento con inhibidores de EGFR en los pacientes que presentan tumores con alta expresión de FGFR1, FGFR4 o ambos receptores. La inhibición conjunta de EGFR y FGFR produce efectos sinérgicos y presenta una alta eficacia en modelos de xenoinjertos derivados de pacientes con sobreactivación de ambos receptores.

Respecto a la cooperación entre EGFR y FGFR1/4, la sobreexpresión de cualquiera de estos FGFRs aumentaba la activación de EGFR e incrementaba las propiedades pro-tumorigénicas en modelos celulares y animales que presentaban alta activación de EGFR, independientemente de si ésta era derivada de mutaciones activadoras en el propio gen del receptor o de otro mecanismo. A nivel molecular, se observó que ambos FGFRs co-localizaban en la membrana celular con EGFR, y que ambos tipos de receptores co-inmunoprecipitaban, lo que sugería una interacción física entre ellos, integrando un complejo FGFR1/4-EGFR. En estos modelos la

estimulación con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) aumentaba la activación del FGFR sobreexpresado. Y de modo similar, la estimulación con factores específicos del FGFR sobreexpresado provocaba una mayor activación de EGFR. La sobreactivación de ambos receptores en estas circunstancias, sin embargo, producía efectos heterogéneos a nivel de señalización oncogénica, observándose en todos los casos un aumento de la activación de STAT3, y una activación de AKT o ERK (p42/p44) desigual según la línea celular en estudio. Estos datos sugieren que la respuesta de esta cooperación FGFR1/4-EGFR a nivel de señalización oncogénica podría depender del contexto molecular.

Para estudiar la relevancia clínica de esta cooperación molecular, se estudió una cohorte de pacientes de adenocarcinoma tratados por primera vez con terapia anti-EGFR (erlotinib o gefitinib). En estos pacientes, la sobreexpresión de FGFR1 y/o FGFR4 correlacionaba con un menor tiempo a la progresión, sugiriendo que esta cooperación podría tener relevancia en la respuesta a la terapia dirigida frente a EGFR. En línea con estos resultados, la sobreexpresión de cualquiera de los dos FGFRs en líneas celulares de adenocarcinoma con EGFR mutado concedía una mayor resistencia a inhibidores de EGFR y sensibilizaba al tratamiento con inhibidores selectivos de FGFR *in vitro*. Además, en condiciones de sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4, la inhibición combinada de EGFR y FGFR producía efectos sinérgicos en estos modelos. En concordancia con estas observaciones, los ensayos *in vivo* mostraron que la sobreexpresión de cualquiera de estos FGFRs confería una mayor resistencia al tratamiento con erlotinib en un modelo de xenoinjerto con una línea celular de adenocarcinoma inicialmente sensible a este fármaco. Además, la inhibición combinada de EGFR y FGFR mostró gran eficacia en modelos de xenoinjertos de líneas celulares de adenocarcinoma y en los tumores de adenocarcinoma derivados de pacientes (PDXs) con sobreactivación de EGFR (mutado o nativo) y con sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4. Esta eficacia se reflejaba tanto a nivel de crecimiento tumoral, consiguiéndose incluso regresiones completas en algunos de los ratones tratados, como a nivel molecular, observándose que esta terapia combinada conseguía inhibir diferentes rutas de señalización oncogénicas de manera mucho más eficiente que la administración de los fármacos en monoterapia. Igualmente, cabe destacar que un modelo de xenoinjerto de línea celular y en otro de PDX, el tratamiento con erlotinib

en monoterapia producía un aumento de la activación de STAT3. Este fenómeno se ha relacionado con la aparición de resistencia a terapias dirigidas en modelos con alteraciones en EGFR, HER2, ALK, MET, o KRAS, con frecuencia ocasionadas por la inducción de la expresión de otro receptor tirosina quinasa, del que pasa a depender el tumor<sup>169</sup>. Por ejemplo, la inhibición de MEK en modelos de tumores pulmonares se ha asociado a una mayor activación de STAT3 y a la inducción de la expresión de FGFR1. En estos modelos, la inhibición combinada de MEK y FGFR ha demostrado revertir la resistencia generada<sup>169,170</sup>. En nuestros modelos donde el tratamiento con erlotinib producía un aumento de la activación de STAT3, la administración conjunta de erlotinib junto al inhibidor de FGFR producía una disminución de los niveles de pSTAT3, lo que podría indicar que esta terapia combinada podría dificultar la aparición de resistencias a través de este mecanismo. Ciertamente, la inducción de la expresión de FGFR1 o FGFR2, o la aparición de mutaciones en FGFR3, han sido caracterizadas como mecanismos de resistencia adquirida a terapia frente a EGFR en tumores con mutaciones activadoras de EGFR<sup>43-45,171,172</sup>. Esto sugiere que la inhibición combinada de EGFR y FGFR podría ser además una alternativa terapéutica para aquellos casos de resistencia adquirida a través del desarrollo de estas alteraciones. Nuestros datos, sin embargo, muestran que existen tumores con alta activación de EGFR, independientemente de su estado mutacional, y que presentan una alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4 previamente a la terapia con inhibidores de EGFR, los cuales presentarían una resistencia intrínseca a estos tratamientos. Por tanto, en estos tumores la terapia combinada propuesta podría ser una alternativa terapéutica eficaz, que además podría retrasar la aparición de resistencias adquiridas.

Análogamente a esta interacción pro-oncogénica de FGFR1 y FGFR4 con EGFR, existen en la literatura diversos ejemplos de fenómenos de heterodimerización entre receptores tirosina quinasa de diferentes familias, conllevando un aumento en la señalización oncogénica. Se ha publicado que IGF1R heterodimeriza con el receptor de insulina en líneas celulares de carcinoma hepatocelular y gástrico, y que el empleo de un anticuerpo que impide esta interacción produce una disminución de la activación de STAT3 y AKT<sup>173</sup>. En cáncer de vejiga, se ha descrito que EGFR puede interactuar físicamente con PDGF- $\beta$  produciendo un aumento de la activación de ERK, así como de la proliferación y la invasión en modelos *in vitro*. Además, de manera similar a los

resultados presentados en este trabajo, esta interacción provocaba una mayor resistencia a fármacos frente a EGFR<sup>174</sup>. En el contexto del cáncer de pulmón, se ha identificado incluso la heterodimerización de EGFR con IGF1R como mecanismo de resistencia a erlotinib, que podía ser revertida mediante tratamiento con inhibidores de IGF1R<sup>175</sup>. Además, en concordancia con nuestros resultados, se ha descrito que la señalización del EGFR confiere resistencia a los inhibidores de FGFR en líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello<sup>176</sup>.

Hasta ahora, la gran mayoría de abordajes terapéuticos dirigidos en cáncer de pulmón se han centrado en modelos con alteraciones genéticas concretas que inducen adicción oncogénica. Sin embargo, los trabajos arriba mencionados y los datos de esta tesis destacan la importancia de la realización de una caracterización molecular exhaustiva de este tipo de tumores, que no presentan una única sino numerosas aberraciones genómicas. El estudio de la co-activación de vías de señalización podría tener gran relevancia clínica, permitiendo predecir resistencias primarias a terapias dirigidas y proponer terapias combinadas efectivas.

A pesar de la consistencia entre nuestros datos *in vitro*, *in vivo* y clínicos, que apoyan la potencial eficacia de la inhibición conjunta de EGFR y FGFR en tumores con alta activación de EGFR y alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4, el estudio aquí expuesto presenta ciertas limitaciones. En un primer lugar, sería necesario confirmar estos hallazgos en una cohorte mayor de modelos PDXs como primer paso hacia la aplicación clínica potencial de esta aproximación terapéutica. En la actualidad, en nuestro laboratorio se está ampliando la cohorte de modelos PDXs tratados. Por otra parte, en los análisis de muestras clínicas aquí presentados, la medición de la expresión de FGFR1 y FGFR4 se ha realizado a nivel de ARNm. En la clínica, la implementación de esta tecnología no es siempre factible, bien por motivos de disponibilidad de muestra tumoral, o por limitaciones técnicas de los laboratorios de anatomía patológica en los hospitales. Por este motivo, nuestro grupo de investigación, en colaboración con otros laboratorios, está trabajando en la determinación y cuantificación de la expresión de ambos receptores por medio de técnicas de inmunohistoquímica, que requieren una menor cantidad de muestra, y son accesibles de forma rutinaria en la clínica. Así, se realizará la determinación inmunohistoquímica de la expresión de ambos FGFRs en las muestras de la cohorte de pacientes tratados con erlotinib o gefitinib. Esto permitirá

definir los niveles de expresión proteicos de estos receptores que correlacionarían con una peor respuesta a estos fármacos y que podrían beneficiarse de la inhibición conjunta de EGFR y FGFR, para validar su papel como biomarcador predictivo a nivel técnico. Así, se tratará de establecer un criterio de utilidad clínica para seleccionar pacientes de adenocarcinoma de pulmón a incluir en un ensayo clínico de fase I/II planteado por nuestro grupo de investigación, a realizarse en el Hospital Universitario 12 de Octubre para probar la seguridad y eficacia del tratamiento combinado de un inhibidor de EGFR y otro de FGFR, así como el papel predictivo de la determinación de la activación de EGFR y de la expresión de FGFR1 y FGFR4 sobre la eficacia con esta aproximación terapéutica. Por último, hay que destacar que a pesar del potencial que parece tener la terapia propuesta en este trabajo de tesis, la aplicación clínica de cócteles de inhibidores puede resultar problemática, presentando en muchos casos un exceso de efectos adversos, que impiden la implementación de la terapia testada, incluso si ésta demuestra eficacia <sup>177-179</sup>. La toxicidad suele incrementarse especialmente cuando se combinan inhibidores no selectivos que inhiben diferentes dianas moleculares (efecto inespecífico, u “off-target”) <sup>180,181</sup>. En este sentido, un ensayo reciente de fase I con erlotinib y dovitinib (inhibidor no selectivo de FGFR) en pacientes con CPNM avanzado tuvo que ser detenido debido a niveles inaceptables de toxicidad (NCT01515969) <sup>182</sup>. Por esto, es de vital importancia evaluar la seguridad y eficacia de la aproximación terapéutica propuesta, si bien, debido a que la combinación terapéutica sugerida en este trabajo incluye un inhibidor selectivo de FGFR, cabría esperar que la toxicidad fuera menos acusada.

Por otro lado, para estudiar el papel diferencial de ambos FGFRs en la tumorigénesis en adenocarcinoma no dependiente de EGFR y en carcinoma epidermoide, se generaron diferentes modelos *in vitro* con niveles de expresión variables de FGFR1 y FGFR4. En estudios previos se había descrito que la mera sobreexpresión de los FGFRs era suficiente para su activación <sup>183</sup>, razón por la cual decidimos usar esta aproximación experimental para estudiar los efectos de estos genes en la tumorigénesis. Y aunque en las líneas de carcinoma epidermoide se observó que efectivamente al sobreexpresar los FGFRs se inducía su activación como era de esperar, en las líneas de adenocarcinoma sin dependencia de EGFR no se detectó un aumento de la activación del receptor sobreexpresado. Esto sugería que el

papel oncogénico ejercido por ambos FGFRs en las líneas de carcinoma epidermoide podría ser efecto de su activación, mientras que el papel supresor tumoral observado en las líneas de adenocarcinoma podría deberse a un mecanismo independiente de la activación de la vía canónica de señalización.

En concordancia con nuestros datos, se ha descrito un papel diferencial en la tumorigénesis dependiente de contexto para otro miembro de la familia FGFR, en concreto FGFR3<sup>165</sup>. Lafitte y colaboradores sobreexpresaron FGFR3 en diferentes líneas celulares de cáncer de páncreas y observaron que esta sobreexpresión tenía un efecto pro-oncogénico en las líneas que presentaban un fenotipo mesenquimal, y el efecto contrario en aquellas líneas celulares con un fenotipo epitelial<sup>165</sup>. Estos resultados sugerían que el papel de FGFR1/4 podría también estar influenciado por el estado de diferenciación epitelial o mesenquimal, y en consecuencia decidimos estudiar en nuestros modelos la expresión de diferentes genes relacionados con la transición epitelio-mesenquima. Entre estos genes se seleccionaron E-cadherina, cuya expresión está asociada a un fenotipo epitelial, y N-cadherina, asociada a fenotipos mesenquimales. Estos genes, además de ser claves en el fenómeno de la transición epitelio-mesenquima, relacionado con la progresión tumoral<sup>184</sup>, pueden interactuar con receptores tirosina quinasa<sup>185-187</sup>. De hecho, existen numerosos datos en la literatura que describen la existencia de una cooperación entre N-cadherina y los FGFRs, que es relevante en diferentes procesos fisiológicos como el crecimiento axonal, a través de la prolongación en el tiempo de la activación del FGFR y del aumento de la activación de la ruta de ERK<sup>188,189</sup>. Además, se ha descrito en diferentes contextos tumorales la interacción entre N-cadherina y FGFR, que se ha asociado con un aumento en la migración y en la metástasis en varios tipos de cáncer<sup>167,187,190,191</sup>. Al comprobar el nivel de expresión proteica de ambas cadherinas en las diferentes líneas celulares de pulmón de nuestro panel, se observó un patrón diferencial de expresión en función de la histología, definido por una alta expresión proteica de E-cadherina en las líneas de adenocarcinoma, y baja o indetectable expresión de esta cadherina en carcinoma epidermoide. En el caso de la N-cadherina, se observó el patrón contrario. Estos resultados eran compatibles con que, o bien la E-cadherina podría estar implicada en el papel supresor tumoral de ambos FGFRs en las líneas celulares de adenocarcinoma no dependientes de EGFR, o bien que la N-cadherina podría estar

implicada en su papel pro-tumorogénico observado en las líneas de carcinoma epidermoide.

Para comprobar el posible papel de la E-cadherina en la función de ambos FGFRs, se silenció su expresión en una línea de adenocarcinoma que mostraba alta expresión endógena de esta cadherina, y en la que previamente se había observado que la expresión de los FGFRs ejercía un papel supresor tumoral. A pesar de que la reducción de la expresión no fue completa, se observó un pequeño efecto pro-tumorogénico derivado de este silenciamiento, lo que está en concordancia con el papel supresor tumoral de esta cadherina descrito en la literatura <sup>192</sup>. Sin embargo, la función supresora tumoral ejercida por la sobreexpresión de FGFR1 o FGFR4 no se vio alterada por la reducción de la expresión de E-cadherina. Por otro lado, se sobreexpresaron ambos FGFRs en una línea celular de adenocarcinoma sin expresión de E-cadherina ni N-cadherina, y se observó que ambos FGFRs reducían las características tumorogénicas de la línea. Estos resultados sugerían que E-cadherina no era determinante en el papel diferencial de FGFR1/4 en la tumorogénesis pulmonar.

Con el fin de estudiar el papel que la N-cadherina podría ejercer en los efectos pro-tumorogénicos inducidos por FGFR1/4, en primer lugar se co-sobreexpresaron N-cadherina y FGFR1 o FGFR4 en dos líneas celulares de adenocarcinoma donde la sobreexpresión de cualquiera de los dos FGFRs tenía un efecto supresor tumoral. Se observó que la sobreexpresión conjunta de N-cadherina con FGFR1 o FGFR4 en estas líneas no solo revertía su efecto supresor tumoral, sino que pasaba a ejercer el efecto opuesto. Además, se sobreexpresó FGFR1 o FGFR4 en una línea epitelial de pulmón inmortalizada (NL20), que expresaba altos niveles endógenos de N-cadherina, y se observaron efectos pro-tumorogénicos tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, al silenciar la expresión de N-cadherina en esta línea, ambos FGFRs adquirieron una función anti-tumoral. A pesar de que esta línea celular está descrita como no tumorogénica, fue capaz de generar tumores en los experimentos realizados *in vivo*. Esta línea celular se inmortalizó originalmente mediante la sobreexpresión del SV40, que puede provocar inestabilidad celular y transformar a las células en cultivo <sup>193,194</sup>, lo que podría explicar los resultados obtenidos. Sin embargo, ya que las conclusiones obtenidas a raíz de estos experimentos no están relacionadas con la iniciación tumoral, y teniendo en cuenta que estos datos se correlacionaban con el resto de resultados

obtenidos en los experimentos *in vitro* e *in vivo*, no pensamos que el citado comportamiento inesperado de la línea NL20 tenga mayor relevancia en las conclusiones presentadas.

De acuerdo con los resultados funcionales obtenidos en las líneas celulares, se observó que en presencia de altos niveles de N-cadherina se producía la activación del FGFR sobreexpresado, mientras que en su ausencia no se activaba el receptor. Por otro lado, la activación del FGFR en presencia de N-cadherina producía un aumento generalizado de la activación de las rutas de STAT3 y AKT, y en menor medida de ERK, y solo en algunos de los modelos estudiados. Sin embargo, la sobreexpresión del FGFR en ausencia de N-cadherina producía el efecto opuesto.

En la literatura se encuentran datos que señalan que N-cadherina interacciona físicamente con FGFR1 y FGFR4 en un contexto tumoral. En líneas celulares de cáncer de mama, se ha descrito la interacción entre FGFR1 y N-cadherina, que induce una mayor activación de la vía de ERK <sup>190</sup>. En el caso de FGFR4, se ha descrito la formación de un complejo macromolecular entre N-cadherina, FGFR4 y otras moléculas de adhesión tales como N-CAM, que induce la señalización pro-oncogénica del receptor en modelos *in vitro* de tumores pancreáticos <sup>191</sup>. Los resultados de co-localización y co-inmunoprecipitación de ambas proteínas en nuestros modelos *in vitro* sugerían que esta interacción entre N-cadherina y FGFR1/4 también podría ocurrir en el contexto de los tumores pulmonares, y podría ser responsable de la activación de los FGFRs. En la actualidad, en nuestro laboratorio se está profundizando en el estudio de la cooperación FGFR-N-cadherina en términos de análisis por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia (localización de FGFR en presencia/ausencia de N-cadherina), estudio del marco temporal de la activación y tiempo de degradación de FGFR en presencia/ausencia de N-cadherina, etc. En conjunto, todos estos datos indican que la presencia de altos niveles de N-cadherina favorece la interacción de ésta con los FGFRs en la membrana, activando la cascada de señalización oncogénica dependiente del receptor y aumentando la tumorigenicidad.

A continuación se analizó la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global en una cohorte de pacientes con CPNM en estadios tempranos, en función de la expresión de N-cadherina y de FGFR1 y/o FGFR4. Los pacientes con tumores que

presentaban altos niveles de expresión de cualquiera de estos FGFRs en combinación con altos niveles de N-cadherina presentaban supervivencias acortadas. Sin embargo, aquellos pacientes con alta expresión de FGFR1 o FGFR4 y baja expresión de N-cadherina presentaban el mejor pronóstico de entre los subgrupos analizados. Además, estos resultados fueron validados “*in silico*” en una cohorte de adenocarcinomas y en otra de carcinomas epidermoides del TCGA. Dichos análisis corroboraron la influencia de la expresión de N-cadherina en el papel pro-tumoral de FGFR1 y FGFR4 observado en nuestros ensayos *in vitro* e *in vivo*. Ciertamente, al comprobar la expresión de ARNm de N-cadherina en nuestra cohorte de pacientes de CPNM y en una cohorte pública independiente de CPNM, se observó que la expresión de este gen era mayor en los tumores epidermoides que en los adenocarcinomas, lo que justificaría el papel diferencial de FGFR1/4 en estas histologías.

Es importante destacar que en las muestras de nuestra cohorte de pacientes no se realizó la caracterización del estado mutacional de EGFR, debido a que ésta no se realiza de manera rutinaria en tumores de estadios precoces. De esta manera, es probable que algunas de las muestras de adenocarcinoma incluidas en estos análisis de supervivencia presentaran activación de EGFR, lo que afectaría al papel de FGFR1/4. Sin embargo, debido a la baja frecuencia de estas mutaciones, de entre un 3 y 5% en clínica, es poco probable que la influencia de esta limitación a los resultados sea relevante.

En resumen, estos resultados sugieren que el papel diferencial de FGFR1 y FGFR4 observado en adenocarcinoma no dependiente de EGFR y en carcinoma epidermoide es en realidad dependiente de contexto molecular, definido por la expresión de N-cadherina, y no de la histología.

Por otro lado, en diferentes análisis de carácter retrospectivo se ha analizado el impacto de la amplificación de FGFR1 en CPNM. Aunque en algunos de estos estudios la amplificación de este gen se ha asociado a un peor pronóstico, en otros se han obtenidos resultados contradictorios<sup>53,147,148</sup>. La variabilidad obtenida en estos estudios podría deberse a que la amplificación de FGFR1 no se asocia en todos los casos a una sobreexpresión del gen, responsable de los efectos pro-oncogénicos<sup>146</sup>. Recientemente se ha publicado un estudio retrospectivo en pacientes con CPNM, donde se ha asociado la expresión proteica de FGFR1, determinada por

inmunohistoquímica, a un peor pronóstico<sup>195</sup>. Si bien en este estudio no se analizaba la expresión de N-cadherina y su impacto en el papel pronóstico de FGFR1, la mayoría de pacientes incluidos presentaba estadios avanzados de la enfermedad y fueron diagnosticados de carcinoma epidermoide. Estas condiciones serían propicias para la expresión elevada de N-cadherina, según nuestros datos, y estarían en concordancia con el papel pronóstico de la expresión proteica de FGFR1 descrito en este estudio. Igualmente, se ha asociado la expresión proteica de FGFR4 con un peor pronóstico en pacientes con CPNM<sup>73</sup>. Aunque de nuevo, en este estudio no se analizó la expresión de N-cadherina, aproximadamente la mitad de los pacientes fueron diagnosticados con carcinoma epidermoide, y la mayoría de los tumores incluidos en el análisis presentaban una baja diferenciación, característica que ha sido ampliamente asociada con la expresión de N-cadherina en diferentes tipos tumorales<sup>196,197</sup>.

Por otro lado, la expresión misma de N-cadherina ha sido asociada a un peor pronóstico en pacientes de CPNM<sup>198,199</sup>. Sin embargo, en nuestros análisis, la alta expresión de FGFR1 y FGFR4 parecía ejercer un efecto pronóstico negativo más acusado, dentro del subgrupo de pacientes con tumores que presentaban alta expresión de N-cadherina, lo que en principio no sugiere que el efecto observado dependa solo de la expresión de esta cadherina.

Los datos experimentales aquí presentados apoyan el papel de la N-cadherina como responsable del papel pro-tumoral de FGFR1 y FGFR4. Respecto al papel supresor tumoral de FGFR1/4 observado en adenocarcinoma, éste podría estar mediado por un mecanismo independiente a la activación del receptor. Sin embargo, en vista de los resultados de este trabajo no puede concluirse si este efecto es ejercido por los FGFRs *per se* o a través de su interacción con otros genes expresados en ausencia de N-cadherina. Se ha descrito que algunos FGFRs pueden ejercer diferentes funciones a través de su translocación al núcleo, que ocurre de forma independiente a su activación. En el núcleo, éstos pueden interactuar con proteínas nucleares que regulan la transcripción génica<sup>200,201</sup>. Sin embargo, no se han realizado estudios sobre la función de su señalización nuclear en tumores pulmonares, donde podrían ejercer un efecto anti-oncogénico en algunos contextos. A fin de estudiar si FGFR1 y FGFR4 ejercen alguna función en el núcleo, y de si ésta podría estar relacionada con el papel supresor tumoral descrito en ausencia de expresión de N-cadherina, en nuestro

laboratorio se está determinando si estos FGFRs se localizan en el núcleo mediante tinción inmunohistoquímica en tejido tumoral y por inmunofluorescencia en líneas celulares.

Habiendo definido la expresión de N-cadherina como determinante para la ejecución del papel oncogénico por parte de FGFR1 y FGFR4, se decidió explorar el papel de la N-cadherina como biomarcador predictivo de eficacia de la inhibición de FGFR. Se observó que en las líneas celulares de CPNM con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4, solamente respondían a la inhibición selectiva de FGFR aquéllas que presentaban alta expresión de N-cadherina, independientemente de su procedencia histológica. Igualmente, en modelos PDX de CPNM con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4, se observó que solo aquellos modelos con alta expresión de N-cadherina mostraban una reducción del crecimiento al ser tratados con un inhibidor selectivo de FGFR. Estos modelos, independientemente de su histología, mostraban una gran sensibilidad al tratamiento, consiguiéndose incluso algunas regresiones tumorales totales. Estos datos apoyan el papel de la N-cadherina como biomarcador predictivo de la eficacia de la inhibición de FGFR en tumores con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4, y muestran que esta aproximación terapéutica podría ser relevante para pacientes seleccionados con alta expresión tumoral de esta cadherina. Cabe destacar que un modelo con alta expresión de N-cadherina que presentaba gran sensibilidad a la inhibición de FGFR en monoterapia, presentaba mutación en KRAS. Este tipo de tumores no cuentan hasta la fecha con una alternativa terapéutica dirigida eficaz en la clínica, de modo que estos tratamientos podrían representar una aproximación terapéutica interesante para algunos pacientes con tumores con mutaciones en KRAS. En relación a este resultado, Manchado y colaboradores han descrito recientemente que el tratamiento de diferentes modelos de tumores pulmonares con mutaciones en KRAS con el inhibidor trametinib induce la expresión de FGFR1, provocando la resistencia al inhibidor de MEK, que puede revertirse haciendo uso combinado de trametinib y de inhibidores de FGFR <sup>170</sup>. En este trabajo, y en otros tantos de la literatura, se ha observado que el tratamiento con trametinib induce la activación de STAT3 <sup>169,170,202,203</sup>. Se ha descrito en modelos de carcinoma hepatocelular que STAT3, una vez activo, puede unirse al promotor de Twist, un gen clave en el desarrollo de la transición epitelio-mesénquima, promoviendo así la expresión de N-cadherina.

Igualmente, se ha asociado la activación de este transductor de señales con la inducción del fenotipo mesenquimal y de la expresión de N-cadherina en diversos contextos tumorales<sup>204-206</sup>. Estos hallazgos estarían en concordancia con los resultados presentados en este trabajo de tesis, ya que la activación de STAT3 tras el tratamiento por trametinib podría estar induciendo la expresión de N-cadherina, razón por la cual la inhibición de FGFR presentaría eficacia en estos modelos.

Diversos ensayos clínicos en fase temprana han evaluado el papel de los inhibidores de FGFR en neoplasias sólidas<sup>54,159,169,207</sup>. Los resultados de estos estudios clínicos han sido modestos, observándose respuestas parciales en solo un 5-10% de los pacientes<sup>54,157</sup>. En la gran mayoría de estos ensayos, el biomarcador de selección más extendido ha sido la amplificación de FGFR1, cuyo potencial predictivo está siendo puesto en duda debido a los limitados resultados obtenidos en estos estudios. Además, se han publicado trabajos que demuestran que el número de copias de FGFR1 es menos predictivo de la eficacia de la inhibición de FGFR *in vitro* que otros parámetros como son la expresión proteica o de ARNm de este receptor<sup>146</sup>. Además, se ha comprobado en estos ensayos que la prevalencia de la amplificación de FGFR es de un 5-10% en los carcinomas epidermoides, inferior al 20% descrito en las cohortes iniciales<sup>53</sup>. Los análisis de cohortes de pacientes realizados en este trabajo indican que entre un 30 y un 40% de los pacientes, incluyendo adenocarcinomas y carcinomas epidermoides, presentan niveles altos de expresión de ARNm de FGFR1 y/o FGFR4 y de N-cadherina. Este relevante subgrupo de pacientes, que paradójicamente son aquéllos que presentan el peor pronóstico, podrían ser los que biológicamente presentarían mayor predisposición a beneficiarse de la inhibición de FGFR.

Sin embargo, son escasos los datos acerca del valor predictivo de la expresión proteica de FGFR como marcador de beneficio al tratamiento con inhibidores de FGFR y, como hemos comentado anteriormente, la determinación de ARNm de muestras tumorales puede ser complicada en la clínica. Por estas razones, nuestro laboratorio está trabajando actualmente en la evaluación de la expresión proteica de FGFR1/4 y N-cadherina mediante técnicas de inmunohistoquímica, más fácilmente aplicables en la práctica clínica. Para ello, estamos analizando la reproducibilidad y concordancia entre datos de expresión por RT-PCR, western blot e inmunohistoquímica de estos tres genes en una cohorte de 25 modelos PDXs de CPNM, que posteriormente

comprobaremos también en una cohorte de pacientes de CPNM. El fin de este trabajo es la puesta a punto de la determinación inmunohistoquímica de la expresión de estas proteínas para relacionar sus niveles con el efecto de la inhibición de FGFR en un ensayo clínico de fase I/II con pacientes de CPNM avanzado. Mediante la evaluación de la respuesta al inhibidor en los pacientes incluidos en el ensayo y el análisis de la expresión de FGFR1, FGFR4 y N-cadherina por inmunohistoquímica, estableceremos los niveles de expresión que predicirían la eficacia del tratamiento, a fin de instaurar un criterio de selección de pacientes efectivo para futuros ensayos clínicos con este tipo de inhibidores.

En conclusión, a la luz de los resultados obtenidos se propone un modelo de oncogénesis dependiente de contexto molecular para FGFR1 y FGFR4 en la tumorigénesis pulmonar, basado en la expresión de N-cadherina, y en la dependencia de la señalización de EGFR (**Figura 42**). Los datos obtenidos *in vitro* e *in vivo* muestran que tanto la sobreexpresión de N-cadherina como la activación de EGFR determinan el efecto pro-tumorigénico de FGFR1 y FGFR4. Además, la evidencia obtenida a nivel clínico apoya este modelo, y sugiere un papel pronóstico para FGFR1 y FGFR4 dependiente de la expresión de N-cadherina, un papel predictivo para ambos FGFRs en la respuesta a terapia anti-EGFR, y un papel predictivo para N-cadherina en la respuesta a terapia anti-FGFR. Igualmente, nuestros datos apoyan la potencial eficacia de dos nuevas estrategias terapéuticas para los pacientes con CPNM: La terapia anti-FGFR para los pacientes con alta expresión de N-cadherina y de FGFR1 y/o FGFR4, y la terapia combinada anti-EGFR y anti-FGFR para los pacientes con tumores con alta activación de EGFR y alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4.

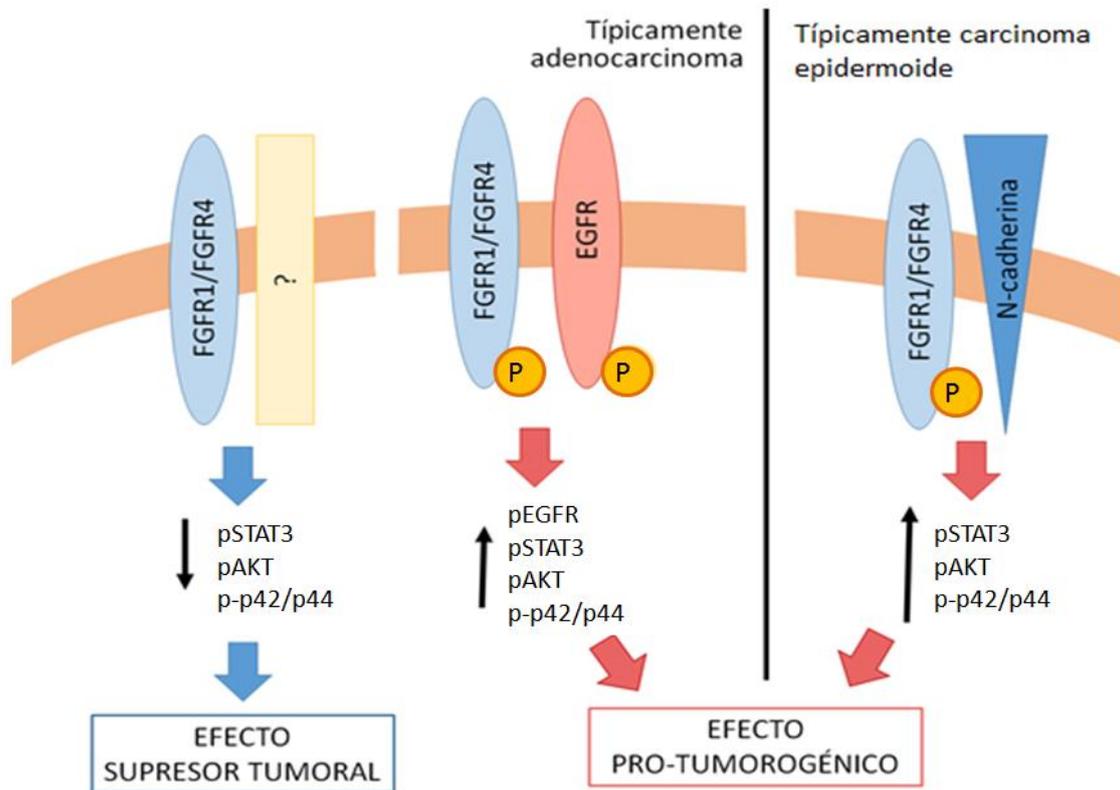


Figura 42. Modelo del papel dependiente de contexto molecular de FGFR1 y FGFR4 en la tumorigénesis pulmonar

Por ello, la determinación de los niveles de expresión o amplificación de FGFR1 o FGFR4 únicamente no sería un indicador fiable de la efectividad de terapias dirigidas frente a la señalización FGFR, ya que estos fármacos no podrían ser efectivos en tumores sin expresión de N-cadherina, ni en tumores no dependientes de EGFR. Este mecanismo podría dar explicación a los modestos resultados obtenidos por los inhibidores anti-FGFR en ensayos clínicos, donde no se han tenido en cuenta estos criterios<sup>54</sup>. De esta manera, proponemos que la determinación de la expresión de N-cadherina y de la activación de EGFR en paralelo a la expresión de FGFR1 y FGFR4 podría optimizar los criterios de elegibilidad de pacientes para recibir fármacos anti-FGFR. En conjunto, nuestros datos aportan una visión más amplia del papel de FGFR1 y FGFR4 en la biología del cáncer de pulmón. Estos hallazgos podrían mejorar los criterios de selección de pacientes candidatos a recibir terapia anti-FGFR.

# Conclusiones

---



1. La expresión de FGFR1 y FGFR4 en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón dependientes de EGFR tiene un efecto pro-oncogénico, debido a la cooperación entre EGFR y FGFR1 o FGFR4, que resulta en una mayor activación de ambos receptores, y consecuentemente en una mayor activación de STAT3 y AKT, y de ERK en algunos casos.
2. Los pacientes afectados de tumores con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4 y sobreactivación de EGFR presentan resistencia a la inhibición de EGFR y podrían beneficiarse de la terapia combinada anti-EGFR y anti-FGFR, anticipándose así a la aparición de uno de los mecanismos de resistencia potenciales en este contexto.
3. La expresión de FGFR1 y FGFR4 en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón no dependientes de EGFR y con baja o nula expresión de N-cadherina tiene un efecto supresor tumoral. Este efecto podría estar mediado por la disminución de la activación de las rutas de señalización de STAT3 y AKT, y de ERK en algunos casos.
4. La expresión de FGFR1 y FGFR4 en líneas celulares con alta expresión de N-cadherina tiene efectos pro-tumorigénicos *in vitro* e *in vivo*. Estos efectos podrían ser consecuencia de la activación del FGFR, dependiente de N-cadherina, que induce la señalización de las rutas de STAT3, AKT, y de ERK en algunos casos.
5. La determinación de la expresión de N-cadherina en pacientes con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4 tiene implicaciones pronósticas en cáncer de pulmón no microcítico.
6. La expresión de N-cadherina es predictiva de la eficacia de la inhibición de FGFR en pacientes con CPNM con alta expresión de FGFR1 y/o FGFR4. Los pacientes con tumores con alta expresión de ambos genes (30-40% de casos de cáncer de pulmón no microcítico) podrían beneficiarse de la terapia de inhibición de FGFR.



## Bibliografía

---



1. Siegel, R.L., Miller, K.D. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2017. *CA: a cancer journal for clinicians* **67**, 7-30 (2017).
2. Ferlay, J., et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer* **49**, 1374-1403 (2013).
3. Steliarova-Foucher, E., et al. The European Cancer Observatory: A new data resource. *European journal of cancer* **51**, 1131-1143 (2015).
4. Ferlay, J., et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer* **136**, E359-386 (2015).
5. Smith, C.J., Perfetti, T.A., Mullens, M.A., Rodgman, A. & Doolittle, D.J. "IARC group 2B Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **38**, 825-848 (2000).
6. Siegel, R.L., Miller, K.D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians* **66**, 7-30 (2016).
7. Turner, M.C., Chen, Y., Krewski, D., Calle, E.E. & Thun, M.J. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with lung cancer mortality in a prospective study of never smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine* **176**, 285-290 (2007).
8. Loganathan, R.S., Stover, D.E., Shi, W. & Venkatraman, E. Prevalence of COPD in women compared to men around the time of diagnosis of primary lung cancer. *Chest* **129**, 1305-1312 (2006).
9. Willett, W.C. & Trichopoulos, D. Nutrition and cancer: a summary of the evidence. *Cancer causes & control : CCC* **7**, 178-180 (1996).
10. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. *The New England journal of medicine* **330**, 1029-1035 (1994).
11. Dockery, D.W., et al. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *The New England journal of medicine* **329**, 1753-1759 (1993).
12. Pope, C.A., 3rd, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama* **287**, 1132-1141 (2002).
13. Hughes, J.M. & Weill, H. Potency versus importance in fiber pathogenicity. *American journal of industrial medicine* **25**, 609-610 (1994).
14. Ruano-Ravina, A., Fernandez-Villar, A. & Barros-Dios, J.M. Residential Radon and Risk of Lung Cancer in Never-Smokers. *Archivos de bronconeumologia* (2017).
15. Herbst, R.S., Heymach, J.V. & Lippman, S.M. Lung cancer. *The New England journal of medicine* **359**, 1367-1380 (2008).
16. Sugimura, H. & Yang, P. Long-term survivorship in lung cancer: a review. *Chest* **129**, 1088-1097 (2006).
17. Heist, R.S. & Engelman, J.A. SnapShot: non-small cell lung cancer. *Cancer Cell* **21**, 448 e442 (2012).
18. Cancer Genome Atlas Research, N. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* **489**, 519-525 (2012).
19. Govindan, R., et al. Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell* **150**, 1121-1134 (2012).

20. Cancer Genome Atlas Research, N. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* **511**, 543-550 (2014).
21. Moreira, A.L. & Eng, J. Personalized therapy for lung cancer. *Chest* **146**, 1649-1657 (2014).
22. Ding, L., *et al.* Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* **455**, 1069-1075 (2008).
23. Gupta, R., *et al.* Evaluation of EGFR abnormalities in patients with pulmonary adenocarcinoma: the need to test neoplasms with more than one method. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **22**, 128-133 (2009).
24. Langer, C.J. Epidermal growth factor receptor inhibition in mutation-positive non-small-cell lung cancer: is afatinib better or simply newer? *J Clin Oncol* **31**, 3303-3306 (2013).
25. Mitsudomi, T. & Yatabe, Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J* **277**, 301-308 (2010).
26. Paez, J.G., *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* **304**, 1497-1500 (2004).
27. Lynch, T.J., *et al.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine* **350**, 2129-2139 (2004).
28. Dungo, R.T. & Keating, G.M. Afatinib: first global approval. *Drugs* **73**, 1503-1515 (2013).
29. Chan, B.A. & Hughes, B.G. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Translational lung cancer research* **4**, 36-54 (2015).
30. Cappuzzo, F., *et al.* MET increased gene copy number and primary resistance to gefitinib therapy in non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* **20**, 298-304 (2009).
31. Wang, J., Wang, B., Chu, H. & Yao, Y. Intrinsic resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer with activating EGFR mutations. *OncoTargets and therapy* **9**, 3711-3726 (2016).
32. Yasuda, H., Kobayashi, S. & Costa, D.B. EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: preclinical data and clinical implications. *Lancet Oncol* **13**, e23-31 (2012).
33. Kobayashi, S., *et al.* EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine* **352**, 786-792 (2005).
34. Sequist, L.V., *et al.* Neratinib, an irreversible pan-ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor: results of a phase II trial in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **28**, 3076-3083 (2010).
35. Janne, P.A., *et al.* Phase I dose-escalation study of the pan-HER inhibitor, PF299804, in patients with advanced malignant solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 1131-1139 (2011).
36. Kwak, E.L., *et al.* Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7665-7670 (2005).

37. Eberlein, C.A., *et al.* Acquired Resistance to the Mutant-Selective EGFR Inhibitor AZD9291 Is Associated with Increased Dependence on RAS Signaling in Preclinical Models. *Cancer research* **75**, 2489-2500 (2015).
38. Janne, P.A., *et al.* AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine* **372**, 1689-1699 (2015).
39. Sequist, L.V., *et al.* Rociletinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine* **372**, 1700-1709 (2015).
40. Suda, K., Mizuuchi, H., Maehara, Y. & Mitsudomi, T. Acquired resistance mechanisms to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer with activating epidermal growth factor receptor mutation--diversity, ductility, and destiny. *Cancer Metastasis Rev* **31**, 807-814 (2012).
41. Engelman, J.A., *et al.* MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* **316**, 1039-1043 (2007).
42. Oxnard, G.R. Strategies for overcoming acquired resistance to epidermal growth factor receptor: targeted therapies in lung cancer. *Arch Pathol Lab Med* **136**, 1205-1209 (2012).
43. Terai, H., *et al.* Activation of the FGF2-FGFR1 autocrine pathway: a novel mechanism of acquired resistance to gefitinib in NSCLC. *Molecular cancer research : MCR* **11**, 759-767 (2013).
44. Ware, K.E., *et al.* A mechanism of resistance to gefitinib mediated by cellular reprogramming and the acquisition of an FGF2-FGFR1 autocrine growth loop. *Oncogenesis* **2**, e39 (2013).
45. Azuma, K., *et al.* FGFR1 activation is an escape mechanism in human lung cancer cells resistant to afatinib, a pan-EGFR family kinase inhibitor. *Oncotarget* **5**, 5908-5919 (2014).
46. Sequist, L.V., *et al.* Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Science translational medicine* **3**, 75ra26 (2011).
47. Oser, M.G., Niederst, M.J., Sequist, L.V. & Engelman, J.A. Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. *Lancet Oncol* **16**, e165-172 (2015).
48. Gridelli, C., *et al.* ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer treatment reviews* **40**, 300-306 (2014).
49. Kwak, E.L., *et al.* Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine* **363**, 1693-1703 (2010).
50. First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK-Positive Lung Cancer. *The New England journal of medicine* **373**, 1582 (2015).
51. Katayama, R., *et al.* Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Science translational medicine* **4**, 120ra117 (2012).
52. Freier, K., *et al.* Recurrent FGFR1 amplification and high FGFR1 protein expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Oral oncology* **43**, 60-66 (2007).
53. Jiang, T., Gao, G., Fan, G., Li, M. & Zhou, C. FGFR1 amplification in lung squamous cell carcinoma: a systematic review with meta-analysis. *Lung Cancer* **87**, 1-7 (2015).

54. Lim, S.H., *et al.* Efficacy and safety of dovitinib in pretreated patients with advanced squamous non-small cell lung cancer with FGFR1 amplification: A single-arm, phase 2 study. *Cancer* (2016).
55. Hirahara, K., *et al.* Interleukin-27 priming of T cells controls IL-17 production in trans via induction of the ligand PD-L1. *Immunity* **36**, 1017-1030 (2012).
56. Wolfe, S.J., *et al.* PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. *European journal of immunology* **41**, 413-424 (2011).
57. Konishi, J., *et al.* B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**, 5094-5100 (2004).
58. Rizvi, N.A., *et al.* Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* **348**, 124-128 (2015).
59. Brahmer, J., *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine* **373**, 123-135 (2015).
60. Borghaei, H., *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine* **373**, 1627-1639 (2015).
61. Segaliny, A.I., Tellez-Gabriel, M., Heymann, M.F. & Heymann, D. Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers. *Journal of bone oncology* **4**, 1-12 (2015).
62. Arkin, I.T. Structural aspects of oligomerization taking place between the transmembrane alpha-helices of bitopic membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1565**, 347-363 (2002).
63. Moriki, T., Maruyama, H. & Maruyama, I.N. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *Journal of molecular biology* **311**, 1011-1026 (2001).
64. Hubbard, S.R. & Till, J.H. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual review of biochemistry* **69**, 373-398 (2000).
65. Lu, Z., Jiang, G., Blume-Jensen, P. & Hunter, T. Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Molecular and cellular biology* **21**, 4016-4031 (2001).
66. Jacquemier, J., *et al.* Expression of the FGFR1 gene in human breast-carcinoma cells. *International journal of cancer* **59**, 373-378 (1994).
67. Schildhaus, H.U., Nogova, L., Wolf, J. & Buettner, R. FGFR1 amplifications in squamous cell carcinomas of the lung: diagnostic and therapeutic implications. *Translational lung cancer research* **2**, 92-100 (2013).
68. Goke, F., *et al.* FGFR1 Expression Levels Predict BGJ398 Sensitivity of FGFR1-Dependent Head and Neck Squamous Cell Cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **21**, 4356-4364 (2015).
69. Chae, Y.K., *et al.* Inhibition of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) pathway: the current landscape and barriers to clinical application. *Oncotarget* **8**, 16052-16074 (2017).

70. Liao, R.G., *et al.* Inhibitor-sensitive FGFR2 and FGFR3 mutations in lung squamous cell carcinoma. *Cancer research* **73**, 5195-5205 (2013).
71. Hagel, M., *et al.* First Selective Small Molecule Inhibitor of FGFR4 for the Treatment of Hepatocellular Carcinomas with an Activated FGFR4 Signaling Pathway. *Cancer discovery* **5**, 424-437 (2015).
72. Turkington, R.C., *et al.* Fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4): a targetable regulator of drug resistance in colorectal cancer. *Cell death & disease* **5**, e1046 (2014).
73. Huang, H.P., Feng, H., Qiao, H.B., Ren, Z.X. & Zhu, G.D. The prognostic significance of fibroblast growth factor receptor 4 in non-small-cell lung cancer. *OncoTargets and therapy* **8**, 1157-1164 (2015).
74. Ulaganathan, V.K., Sperl, B., Rapp, U.R. & Ullrich, A. Germline variant FGFR4 p.G388R exposes a membrane-proximal STAT3 binding site. *Nature* **528**, 570-574 (2015).
75. Turner, N. & Grose, R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature reviews. Cancer* **10**, 116-129 (2010).
76. Haugsten, E.M., Wiedlocha, A., Olsnes, S. & Wesche, J. Roles of fibroblast growth factor receptors in carcinogenesis. *Molecular cancer research : MCR* **8**, 1439-1452 (2010).
77. Kimelman, D. & Kirschner, M. Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF-beta and the identification of an mRNA coding for FGF in the early Xenopus embryo. *Cell* **51**, 869-877 (1987).
78. De Moerlooze, L., *et al.* An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development* **127**, 483-492 (2000).
79. Dillon, C., Spencer-Dene, B. & Dickson, C. A crucial role for fibroblast growth factor signaling in embryonic mammary gland development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **9**, 207-215 (2004).
80. Beenken, A. & Mohammadi, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature reviews. Drug discovery* **8**, 235-253 (2009).
81. Inagaki, T., *et al.* Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell metabolism* **2**, 217-225 (2005).
82. Kharitononkov, A., *et al.* FGF-21 as a novel metabolic regulator. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1627-1635 (2005).
83. White, K.E., *et al.* Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23. *Kidney international* **60**, 2079-2086 (2001).
84. Sleeman, M., *et al.* Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. *Gene* **271**, 171-182 (2001).
85. Olsen, S.K., *et al.* Insights into the molecular basis for fibroblast growth factor receptor autoinhibition and ligand-binding promiscuity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 935-940 (2004).
86. Ornitz, D.M., *et al.* Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *The Journal of biological chemistry* **271**, 15292-15297 (1996).
87. Zhang, X., *et al.* Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *The Journal of biological chemistry* **281**, 15694-15700 (2006).

88. Grose, R. & Dickson, C. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine & growth factor reviews* **16**, 179-186 (2005).
89. Ibrahimi, O.A., *et al.* Biochemical analysis of pathogenic ligand-dependent FGFR2 mutations suggests distinct pathophysiological mechanisms for craniofacial and limb abnormalities. *Human molecular genetics* **13**, 2313-2324 (2004).
90. MacArthur, C.A., *et al.* FGF-8 isoforms activate receptor splice forms that are expressed in mesenchymal regions of mouse development. *Development* **121**, 3603-3613 (1995).
91. Igarashi, M., Finch, P.W. & Aaronson, S.A. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF)-10 reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). *The Journal of biological chemistry* **273**, 13230-13235 (1998).
92. Hecht, D., Zimmerman, N., Bedford, M., Avivi, A. & Yayon, A. Identification of fibroblast growth factor 9 (FGF9) as a high affinity, heparin dependent ligand for FGF receptors 3 and 2 but not for FGF receptors 1 and 4. *Growth factors* **12**, 223-233 (1995).
93. Santos-Ocampo, S., Colvin, J.S., Chellaiah, A. & Ornitz, D.M. Expression and biological activity of mouse fibroblast growth factor-9. *The Journal of biological chemistry* **271**, 1726-1731 (1996).
94. Fortin, D., Rom, E., Sun, H., Yayon, A. & Bansal, R. Distinct fibroblast growth factor (FGF)/FGF receptor signaling pairs initiate diverse cellular responses in the oligodendrocyte lineage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 7470-7479 (2005).
95. Nezu, M., *et al.* Expression of the fetal-oncogenic fibroblast growth factor-8/17/18 subfamily in human hematopoietic tumors. *Biochemical and biophysical research communications* **335**, 843-849 (2005).
96. Xu, J., Lawshe, A., MacArthur, C.A. & Ornitz, D.M. Genomic structure, mapping, activity and expression of fibroblast growth factor 17. *Mechanisms of development* **83**, 165-178 (1999).
97. Ohmachi, S., Mikami, T., Konishi, M., Miyake, A. & Itoh, N. Preferential neurotrophic activity of fibroblast growth factor-20 for dopaminergic neurons through fibroblast growth factor receptor-1c. *Journal of neuroscience research* **72**, 436-443 (2003).
98. Ren, G., Yin, J., Wang, W., Li, L. & Li, D. Fibroblast growth factor (FGF)-21 signals through both FGF receptor-1 and 2. *Science China. Life sciences* **53**, 1000-1008 (2010).
99. Wu, A.L., *et al.* FGF19 regulates cell proliferation, glucose and bile acid metabolism via FGFR4-dependent and independent pathways. *PloS one* **6**, e17868 (2011).
100. Kurosu, H., *et al.* Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *The Journal of biological chemistry* **282**, 26687-26695 (2007).
101. Knights, V. & Cook, S.J. De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer. *Pharmacology & therapeutics* **125**, 105-117 (2010).
102. Mohammadi, M., *et al.* A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain

- of phospholipase C-gamma 1. *Molecular and cellular biology* **11**, 5068-5078 (1991).
103. Mohammadi, M., *et al.* Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Molecular and cellular biology* **16**, 977-989 (1996).
  104. Rand, V., *et al.* Sequence survey of receptor tyrosine kinases reveals mutations in glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14344-14349 (2005).
  105. Cseh, B., Doma, E. & Baccharini, M. "RAF" neighborhood: protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. *FEBS letters* **588**, 2398-2406 (2014).
  106. Roskoski, R., Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research* **66**, 105-143 (2012).
  107. Song, G., Ouyang, G. & Bao, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of cellular and molecular medicine* **9**, 59-71 (2005).
  108. Rafalski, V.A. & Brunet, A. Energy metabolism in adult neural stem cell fate. *Progress in neurobiology* **93**, 182-203 (2011).
  109. Eswarakumar, V.P., Lax, I. & Schlessinger, J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & growth factor reviews* **16**, 139-149 (2005).
  110. Hart, K.C., *et al.* Transformation and Stat activation by derivatives of FGFR1, FGFR3, and FGFR4. *Oncogene* **19**, 3309-3320 (2000).
  111. Dudka, A.A., Sweet, S.M. & Heath, J.K. Signal transducers and activators of transcription-3 binding to the fibroblast growth factor receptor is activated by receptor amplification. *Cancer research* **70**, 3391-3401 (2010).
  112. Trusolino, L., Bertotti, A. & Comoglio, P.M. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 834-848 (2010).
  113. Casci, T., Vinos, J. & Freeman, M. Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell* **96**, 655-665 (1999).
  114. Hacohen, N., Kramer, S., Sutherland, D., Hiromi, Y. & Krasnow, M.A. sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways. *Cell* **92**, 253-263 (1998).
  115. Furthauer, M., Lin, W., Ang, S.L., Thisse, B. & Thisse, C. Sef is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nature cell biology* **4**, 170-174 (2002).
  116. Mohapatra, B., *et al.* Protein tyrosine kinase regulation by ubiquitination: critical roles of Cbl-family ubiquitin ligases. *Biochimica et biophysica acta* **1833**, 122-139 (2013).
  117. Wesche, J., Haglund, K. & Haugsten, E.M. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *The Biochemical journal* **437**, 199-213 (2011).
  118. Chesi, M., *et al.* Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nature genetics* **16**, 260-264 (1997).
  119. Kwabi-Addo, B., Ozen, M. & Ittmann, M. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocrine-related cancer* **11**, 709-724 (2004).

120. Malchers, F., *et al.* Cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms of transformation by amplified FGFR1 in lung cancer. *Cancer discovery* **4**, 246-257 (2014).
121. Tomiguchi, M., *et al.* Fibroblast growth factor receptor-1 protein expression is associated with prognosis in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor-2-negative primary breast cancer. *Cancer science* **107**, 491-498 (2016).
122. von Loga, K., *et al.* FGFR1 Amplification Is Often Homogeneous and Strongly Linked to the Squamous Cell Carcinoma Subtype in Esophageal Carcinoma. *PLoS one* **10**, e0141867 (2015).
123. Schafer, M.H., *et al.* Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification in gastric adenocarcinoma. *Human pathology* **46**, 1488-1495 (2015).
124. Kwak, Y., *et al.* Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Gene Copy Number and mRNA Expression in Primary Colorectal Cancer and Its Clinicopathologic Correlation. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* **82**, 76-83 (2015).
125. Yao, T.J., *et al.* AZD-4547 exerts potent cytostatic and cytotoxic activities against fibroblast growth factor receptor (FGFR)-expressing colorectal cancer cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **36**, 5641-5648 (2015).
126. Marek, L.A., *et al.* Nonamplified FGFR1 is a growth driver in malignant pleural mesothelioma. *Molecular cancer research : MCR* **12**, 1460-1469 (2014).
127. Tiong, K.H., *et al.* Fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) and fibroblast growth factor 19 (FGF19) autocrine enhance breast cancer cells survival. *Oncotarget* (2016).
128. French, D.M., *et al.* Targeting FGFR4 inhibits hepatocellular carcinoma in preclinical mouse models. *PLoS one* **7**, e36713 (2012).
129. Yu, K., *et al.* Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth. *Development* **130**, 3063-3074 (2003).
130. Wilkie, A.O. Bad bones, absent smell, selfish testes: the pleiotropic consequences of human FGF receptor mutations. *Cytokine & growth factor reviews* **16**, 187-203 (2005).
131. Naski, M.C., Wang, Q., Xu, J. & Ornitz, D.M. Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nature genetics* **13**, 233-237 (1996).
132. Cho, J.Y., *et al.* Defective lysosomal targeting of activated fibroblast growth factor receptor 3 in achondroplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 609-614 (2004).
133. da Costa Andrade, V.C., *et al.* The fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) Arg388 allele correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Experimental and molecular pathology* **82**, 53-57 (2007).
134. Thusbas, C., *et al.* FGFR4 Arg388 allele is associated with resistance to adjuvant therapy in primary breast cancer. *J Clin Oncol* **24**, 3747-3755 (2006).
135. Sugiyama, S., Fukuta, M., Hirose, T., Ohtani, T. & Yoshino, T. A silanized mica substrate suitable for high-resolution fiber FISH analysis by scanning near-field optical/atomic force microscopy. *Scanning* **32**, 383-389 (2010).

136. Sasaki, H., *et al.* Fibroblast growth factor receptor 4 mutation and polymorphism in Japanese lung cancer. *Oncology reports* **20**, 1125-1130 (2008).
137. Quintanal-Villalonga, A., *et al.* Prognostic Role of the FGFR4-388Arg Variant in Lung Squamous-Cell Carcinoma Patients With Lymph Node Involvement. *Clinical lung cancer* (2017).
138. Wu, Y.M., *et al.* Identification of targetable FGFR gene fusions in diverse cancers. *Cancer discovery* **3**, 636-647 (2013).
139. Williams, S.V., Hurst, C.D. & Knowles, M.A. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Human molecular genetics* **22**, 795-803 (2013).
140. Sabnis, A.J. & Bivona, T.G. FGFR fusions in the driver's seat. *Cancer discovery* **3**, 607-609 (2013).
141. Mosesson, Y., Mills, G.B. & Yarden, Y. Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nature reviews. Cancer* **8**, 835-850 (2008).
142. Perez-Moreno, P., Brambilla, E., Thomas, R. & Soria, J.C. Squamous cell carcinoma of the lung: molecular subtypes and therapeutic opportunities. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 2443-2451 (2012).
143. Weiss, J., *et al.* Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Science translational medicine* **2**, 62ra93 (2010).
144. Dutt, A., *et al.* Inhibitor-sensitive FGFR1 amplification in human non-small cell lung cancer. *PLoS one* **6**, e20351 (2011).
145. Ren, M., *et al.* Novel FGFR inhibitor ponatinib suppresses the growth of non-small cell lung cancer cells overexpressing FGFR1. *Oncology reports* **29**, 2181-2190 (2013).
146. Wynes, M.W., *et al.* FGFR1 mRNA and protein expression, not gene copy number, predict FGFR TKI sensitivity across all lung cancer histologies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**, 3299-3309 (2014).
147. Kim, H.R., *et al.* Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification is associated with poor survival and cigarette smoking dosage in patients with resected squamous cell lung cancer. *J Clin Oncol* **31**, 731-737 (2013).
148. Seo, A.N., *et al.* FGFR1 amplification is associated with poor prognosis and smoking in non-small-cell lung cancer. *Virchows Arch* **465**, 547-558 (2014).
149. Wang, R., *et al.* FGFR1/3 tyrosine kinase fusions define a unique molecular subtype of non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**, 4107-4114 (2014).
150. Spinola, M., *et al.* Functional FGFR4 Gly388Arg polymorphism predicts prognosis in lung adenocarcinoma patients. *J Clin Oncol* **23**, 7307-7311 (2005).
151. Falvella, F.S., *et al.* FGFR4 Gly388Arg polymorphism may affect the clinical stage of patients with lung cancer by modulating the transcriptional profile of normal lung. *International journal of cancer* **124**, 2880-2885 (2009).
152. Matakidou, A., *et al.* Further observations on the relationship between the FGFR4 Gly388Arg polymorphism and lung cancer prognosis. *British journal of cancer* **96**, 1904-1907 (2007).
153. Pearson, A., *et al.* High-Level Clonal FGFR Amplification and Response to FGFR Inhibition in a Translational Clinical Trial. *Cancer discovery* **6**, 838-851 (2016).

154. Soria, J.C., *et al.* Phase I/IIa study evaluating the safety, efficacy, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of lucitanib in advanced solid tumors. *Ann Oncol* **25**, 2244-2251 (2014).
155. Andre, F., *et al.* Targeting FGFR with dovitinib (TKI258): preclinical and clinical data in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**, 3693-3702 (2013).
156. Di Stefano, A.L., *et al.* Detection, Characterization, and Inhibition of FGFR-TACC Fusions in IDH Wild-type Glioma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **21**, 3307-3317 (2015).
157. Weeden, C.E., Solomon, B. & Asselin-Labat, M.L. FGFR1 inhibition in lung squamous cell carcinoma: questions and controversies. *Cell death discovery* **1**, 15049 (2015).
158. Escudier, B., *et al.* Phase II results of Dovitinib (TKI258) in patients with metastatic renal cell cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**, 3012-3022 (2014).
159. Taberero, J., *et al.* Phase I Dose-Escalation Study of JNJ-42756493, an Oral Pan-Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Tumors. *J Clin Oncol* **33**, 3401-3408 (2015).
160. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
161. Schmittgen, T.D. & Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* **3**, 1101-1108 (2008).
162. Helfrich, B.A., *et al.* Antitumor activity of the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839, Iressa) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with gene copy number and EGFR mutations but not EGFR protein levels. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**, 7117-7125 (2006).
163. Blanco, R., *et al.* A gene-alteration profile of human lung cancer cell lines. *Human mutation* **30**, 1199-1206 (2009).
164. Chou, T.C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer research* **70**, 440-446 (2010).
165. Lafitte, M., *et al.* FGFR3 has tumor suppressor properties in cells with epithelial phenotype. *Molecular cancer* **12**, 83 (2013).
166. Gheldof, A. & Berx, G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Progress in molecular biology and translational science* **116**, 317-336 (2013).
167. Qian, X., *et al.* N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor cell-like properties. *Oncogene* **33**, 3411-3421 (2014).
168. Pecina-Slaus, N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer cell international* **3**, 17 (2003).
169. Lee, H.J., *et al.* Drug resistance via feedback activation of Stat3 in oncogene-addicted cancer cells. *Cancer Cell* **26**, 207-221 (2014).
170. Manchado, E., *et al.* A combinatorial strategy for treating KRAS-mutant lung cancer. *Nature* **534**, 647-651 (2016).
171. Crystal, A.S., *et al.* Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer. *Science* **346**, 1480-1486 (2014).

172. Ware, K.E., *et al.* Rapidly acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in NSCLC cell lines through de-repression of FGFR2 and FGFR3 expression. *PLoS one* **5**, e14117 (2010).
173. Kim, J.G., *et al.* Heterodimerization of glycosylated insulin-like growth factor-1 receptors and insulin receptors in cancer cells sensitive to anti-IGF1R antibody. *PLoS one* **7**, e33322 (2012).
174. Black, P.C., *et al.* Receptor heterodimerization: a new mechanism for platelet-derived growth factor induced resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy for bladder cancer. *The Journal of urology* **185**, 693-700 (2011).
175. Morgillo, F., Woo, J.K., Kim, E.S., Hong, W.K. & Lee, H.Y. Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer research* **66**, 10100-10111 (2006).
176. Koole, K., *et al.* FGFR1 Is a Potential Prognostic Biomarker and Therapeutic Target in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **22**, 3884-3893 (2016).
177. Padda, S., Neal, J.W. & Wakelee, H.A. MET inhibitors in combination with other therapies in non-small cell lung cancer. *Translational lung cancer research* **1**, 238-253 (2012).
178. Tebbutt, N., Pedersen, M.W. & Johns, T.G. Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy. *Nature reviews. Cancer* **13**, 663-673 (2013).
179. Giaccone, G., *et al.* Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J Clin Oncol* **22**, 777-784 (2004).
180. Azad, N.S., *et al.* Combination targeted therapy with sorafenib and bevacizumab results in enhanced toxicity and antitumor activity. *J Clin Oncol* **26**, 3709-3714 (2008).
181. Maione, P., Gridelli, C., Troiani, T. & Ciardiello, F. Combining targeted therapies and drugs with multiple targets in the treatment of NSCLC. *The oncologist* **11**, 274-284 (2006).
182. Das, M., *et al.* Dovitinib and erlotinib in patients with metastatic non-small cell lung cancer: A drug-drug interaction. *Lung Cancer* **89**, 280-286 (2015).
183. Sarabipour, S. & Hristova, K. Mechanism of FGF receptor dimerization and activation. *Nature communications* **7**, 10262 (2016).
184. Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M. & Ford, H.L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **15**, 117-134 (2010).
185. Chiasson-MacKenzie, C., *et al.* NF2/Merlin mediates contact-dependent inhibition of EGFR mobility and internalization via cortical actomyosin. *The Journal of cell biology* **211**, 391-405 (2015).
186. Muhamed, I., *et al.* E-cadherin-mediated force transduction signals regulate global cell mechanics. *Journal of cell science* **129**, 1843-1854 (2016).
187. Williams, E.J., *et al.* Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth. *The Journal of biological chemistry* **276**, 43879-43886 (2001).

188. Hansen, S.M., Berezin, V. & Bock, E. Signaling mechanisms of neurite outgrowth induced by the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**, 3809-3821 (2008).
189. Williams, E.J., Furness, J., Walsh, F.S. & Doherty, P. Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron* **13**, 583-594 (1994).
190. Suyama, K., Shapiro, I., Guttman, M. & Hazan, R.B. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell* **2**, 301-314 (2002).
191. Cavallaro, U., Niedermeyer, J., Fuxa, M. & Christofori, G. N-CAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling. *Nature cell biology* **3**, 650-657 (2001).
192. Pećina-Šlaus, N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell International* **3**, 1-7 (2003).
193. Schiller, J.H. & Bittner, G. Loss of the tumorigenic phenotype with in vitro, but not in vivo, passaging of a novel series of human bronchial epithelial cell lines: possible role of an alpha 5/beta 1-integrin-fibronectin interaction. *Cancer research* **55**, 6215-6221 (1995).
194. Ahuja, D., Saenz-Robles, M.T. & Pipas, J.M. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* **24**, 7729-7745 (2005).
195. Pu, D., Liu, J., Li, Z., Zhu, J. & Hou, M. Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1), Partly Related to Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2) and Microvessel Density, is an Independent Prognostic Factor for Non-Small Cell Lung Cancer. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* **23**, 247-257 (2017).
196. ElMoneim, H.M. & Zaghloul, N.M. Expression of E-cadherin, N-cadherin and snail and their correlation with clinicopathological variants: an immunohistochemical study of 132 invasive ductal breast carcinomas in Egypt. *Clinics* **66**, 1765-1771 (2011).
197. Yan, X., *et al.* N-cadherin, a novel prognostic biomarker, drives malignant progression of colorectal cancer. *Molecular medicine reports* **12**, 2999-3006 (2015).
198. Xiao, D. & He, J. Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. *Journal of thoracic disease* **2**, 154-159 (2010).
199. Hui, L., *et al.* Prognostic significance of twist and N-cadherin expression in NSCLC. *PloS one* **8**, e62171 (2013).
200. Reilly, J.F., Mizukoshi, E. & Maher, P.A. Ligand dependent and independent internalization and nuclear translocation of fibroblast growth factor (FGF) receptor 1. *DNA and cell biology* **23**, 538-548 (2004).
201. Bryant, D.M. & Stow, J.L. Nuclear translocation of cell-surface receptors: lessons from fibroblast growth factor. *Traffic* **6**, 947-954 (2005).
202. Zhao, C., *et al.* Rational combination of MEK inhibitor and the STAT3 pathway modulator for the therapy in K-Ras mutated pancreatic and colon cancer cells. *Oncotarget* **6**, 14472-14487 (2015).

203. Yoon, Y.K., *et al.* KRAS mutant lung cancer cells are differentially responsive to MEK inhibitor due to AKT or STAT3 activation: implication for combinatorial approach. *Molecular carcinogenesis* **49**, 353-362 (2010).
204. Zhang, C., Guo, F., Xu, G., Ma, J. & Shao, F. STAT3 cooperates with Twist to mediate epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncology reports* **33**, 1872-1882 (2015).
205. Xiong, H., *et al.* Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of biological chemistry* **287**, 5819-5832 (2012).
206. Huang, Q., *et al.* IL-17 induces EMT via Stat3 in lung adenocarcinoma. *American journal of cancer research* **6**, 440-451 (2016).
207. Nogova, L., *et al.* Evaluation of BGJ398, a Fibroblast Growth Factor Receptor 1-3 Kinase Inhibitor, in Patients With Advanced Solid Tumors Harboring Genetic Alterations in Fibroblast Growth Factor Receptors: Results of a Global Phase I, Dose-Escalation and Dose-Expansion Study. *J Clin Oncol* **35**, 157-165 (2017).



**ANEXO: PUBLICACIONES**

*Tyrosine Kinase Receptor Landscape in Lung Cancer: Therapeutical Implications.* Álvaro Quintanal-Villalonga et al. *Dis Markers* 2016 (Revisión).

*N-cadherin is responsible for FGFR1 and FGFR4 oncogenicity and predicts anti-FGFR therapy efficacy.* Alvaro Quintanal-Villalonga et al. Enviado.

*FGFR1 and FGFR4 cooperate with EGFR with oncogenic implications, and their combined inhibition shows high efficacy.* Alvaro Quintanal-Villalonga et al. Enviado.

*Prognostic Role of the FGFR4-388Arg Variant in Lung Squamous-Cell Carcinoma Patients With Lymph Node Involvement.* Álvaro Quintanal-Villalonga et al. *Clinical Lung Cancer* 2017.

*The Fgfr4-388Arg variant promotes lung cancer progression by n-cadherin induction.* Álvaro Quintanal-Villalonga et al. *Sci Rep* 2017 (En segunda revisión)

**Contribuciones a congresos:**

*FGFR1 can act as an oncogene or a tumor suppressor depending on the molecular context.* Álvaro Quintanal-Villalonga et al. *AACR 2016 (Nueva Orleans, EEUU).*

*The oncogenic role of FGFR1 depends on the molecular context.* Álvaro Quintanal-Villalonga et al. *ESMO 2016 International Congress (Copenague, Dinamarca).*

*FGFR4 exerts differential roles in tumorigenesis through a mechanism of cooperation.* Álvaro Quintanal-Villalonga et al. *ESMO 2016 International Congress (Copenague, Dinamarca).*

*Context-dependent role of FGFR4 in lung tumorigenesis.* Álvaro Quintanal-Villalonga et al. *International ASEICA Congress (Sevilla, España).*

*The FGFR4-388Arg variant exerts pro-tumorigenic effects in lung cancer by inducing an EMT phenotype.* Álvaro Quintanal-Villalonga et al. *AACR 2017 (Washington D.C., EEUU)*