

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLÓGIA



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

*REPROGRAMACIÓN LIPIDÓMICA
EN LA ADQUISICIÓN DE
RESISTENCIA AL TRATAMIENTO
ANTI-EGFR ASOCIADA AL
FENOTIPO MESENQUIMAL EN
CÁNCER PULMONAR*

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

Adrián López Chamorro

DIRECTOR:

Dr. Agustín Lahoz Rodríguez

TUTOR:

Dr. Julián Carretero Asunción

VALENCIA, MARZO 2025



Instituto de
Investigación
Sanitaria La Fe

 Biomarkers and
Precision Medicine Unit
MEDICAL RESEARCH INSTITUTE HOSPITAL LA FE

Dr. AGUSTÍN LAHOZ RODRÍGUEZ, Investigador Principal de la Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión y director de la Unidad Analítica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia,

CERTIFICA QUE:

La presente memoria, titulada “**Reprogramación lipidómica en la adquisición de resistencia al tratamiento anti-EGFR asociada al fenotipo mesenquimal en cáncer pulmonar**” corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por **D. Adrián López Chamorro** para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universidad de Valencia.

Y para que conste firma el presente certificado en Valencia, 21 de Mayo de 2025.

Fdo: Dr. Agustín Lahoz Rodríguez

Esta tesis doctoral ha sido realizada en la Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión localizada en el Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia. **Adrián López Chamorro** ha sido beneficiario de la beca ACIF concedida por la Consellería de Educación, Universidades y Empleo [ACIF/2019/003].

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar este momento para expresar mi agradecimiento por el apoyo, la ayuda y la implicación que me han brindado mi familia, amigos y compañeros a lo largo de los años en los que he estado trabajando en mi tesis doctoral.

A mis padres. ¡Menos mal que os tengo! No tengo ninguna duda de que esto es posible gracias a vosotros. Mi agradecimiento a vosotros es el más especial. Sois el motor que me mueve cada día, me habéis inculcado el valor de luchar por aquello que realmente quiero y me gusta, de hacerlo todo mejor y mejor día tras día y a confiar en mí mismo cuando ni yo mismo lo hacía. Con vuestro cariño, apoyo y educación me habéis permitido disfrutar de grandes cosas con vuestros sacrificios. ¡Qué suerte teneros! Espero que estéis orgullosos porque yo no puedo ser más feliz de teneros conmigo. Me alegra terminar este camino con vosotros de la mano porque, aunque no os lo diga apenas, ¡Os quiero con locura! Ojalá estar siempre a vuestra altura. A mis abuelos, Miguel y Marisa, las personas más buenas, bellas y nobles que jamás he conocido. No hay día que no me acuerde de vosotros. Seguid cuidándome tan bien como lo habéis hecho siempre. En vosotros vi el gran ejemplo de trabajo duro, disciplina y esfuerzo que me ha dado la fuerza para perseguir mis sueños. A mi tía Marisa, la persona que más me ha empujado a estudiar y luchar para conseguirme un futuro y la que más ha confiado en mí. Imposible agradecerle con palabras el apoyo y el cariño que me das y me has dado siempre. Gracias por tanto, tu “peque” te quiere mucho. No podía faltar mi “tía buena”, mi tía Mamen, la que se desvive por el resto para que nunca les falte de nada. La vida ha sido injusta contigo y aun así nada consigue quitarte la sonrisa y las ganas de vivir que transmites. ¡Eres todo un ejemplo a seguir! También gracias a mi hermano David, porque a pesar de nuestras diferencias, nuestros enfados y discusiones, encuentro en tí el mejor amigo que se puede tener. Nos hemos criado juntos desde siempre y la verdad, la vida sin tí no habría sido la misma. Me has apoyado en los momentos difíciles y te doy las gracias por ello.

A mi director, Agus. Gracias por recibirme en tu grupo con los brazos abiertos y por apostar por mí. Te has preocupado de que aprendiera todo lo posible y de enseñarme como es la ciencia en realidad: sacrificada, pero a la vez bonita. Durante este tiempo, siempre has estado ahí para lo que me hiciera falta y realmente he disfrutado mucho este tiempo contigo y con el resto del laboratorio. Gracias por tu apoyo, tus consejos, tus ideas y, sobretodo, tu infinita paciencia conmigo. Gracias a mi grupo, la Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión, mis compañeros de aventura en este gran viaje. No podía haber encontrado mejor equipo con el que compartir mi día a día todo este tiempo. Sois realmente especiales. Mi Cora, qué descubrimiento, me lo enseñaste todo desde el principio. Gracias por cada risa, por cada ayuda, por tu apoyo, tu cariño y nuestra complicidad. Ahora ya eres doctora y no puedo estar más feliz por ti. Estoy seguro de que me llevo una amiga para toda la vida. Martita P, ¡Bendita la hora que apareciste! No puedo imaginar una compañera mejor que tú. Gracias por compartir todo conmigo y por hacerme la vida infinitamente más fácil a mí y al resto del grupo. Siempre dispuesta a ayudar con lo que sea, vales muchísimo y te he cogido mucho cariño. Estoy seguro de que te va a ir genial y conseguirás todo lo que te propongas. Contigo también sé que me llevo una amiga para toda la vida. Gracias a Marta Benet, mi “sanguanguí”. No puedo evitar pensar que estábamos destinados a conocernos. Eres mi gran descubrimiento, me lo has enseñado todo siempre con una sonrisa y un cariño increíble. Gracias por tu paciencia, por ayudarme tantísimo, por animarme en mis peores momentos, por siempre estar atenta y tener la puerta abierta para lo que necesitara... Me encanta quedarme contigo hasta las tantas, nuestras ideas, nuestras

locuras... La conexión contigo es increíble, ojalá trabajara siempre contigo. También quiero dar las gracias a tu madre, Inés Giménez, mi profesora de Biología en el instituto, la que me transmitió la pasión por la Biología y una de las personas más especiales en mi vida académica. Siempre me acuerdo de ti con mucho cariño, ¡COMENSÓN! Gracias a Vero, por enseñarme tanto desde el principio, por todas y cada una de las risas contigo. ¡Cuánto te echo de menos! Sin duda eres otro de mis grandes descubrimientos. A Juan y Diana, gracias por el buen trato que me habéis dado siempre, vuestros consejos y cariño. Me alegra mucho haberos conocido, sé que me llevo una gran amistad con vosotros. A Laia y Nuri, gracias por siempre estar dispuestas a ayudarme y por esos momentos de desconexión y risas. Andrea y Ester, llegasteis más tarde, pero me alegro mucho de haberos conocido también. Gracias por cada momento con vosotras y por vuestro apoyo. A mis compañeros de la Unidad Analítica: Sandra, Juan Carlos, Marta R. y especialmente Maribel, me habéis enseñado muchísimo y realmente ha sido todo un placer trabajar y aprender a vuestro lado. Sois todo un ejemplo de trabajo en equipo, me alegro mucho de haber pasado todo este tiempo con vosotros.

Gracias a Julián Carretero, mi tutor de la tesis, por el buen rollo siempre, por tu apoyo y por todo lo que me has aconsejado y enseñado. Gracias a Rosario Salvador, Coordinadora del programa de Doctorado en Fisiología de la UV, por siempre estar dispuesta a ofrecer su ayuda, su simpatía y su paciencia. Ojalá más personas como tú.

Gracias a mis amigos de toda la vida, los de siempre, mi segunda familia, con los que he vivido tantas locuras y tantos momentos. Habéis sido esa desconexión que tanta falta me hace siempre. Me acuerdo de todas las fiestas y aventuras a vuestro lado (que no son pocas), ¡No nos perdemos ni una! No sé qué sería de mí sin vosotros, espero que la vida nos tenga preparadas muchísimas locuras más. Mi amiga Patry, no sabes lo agradecido que estoy de seguir teniéndote conmigo después de tantos años. Eres mi amistad más fuerte, larga y duradera y una de las personas más especiales que conozco. Espero tenerte muchos más años a mi lado.

Vito, no podías falta aquí. Todavía no logro entender como un animal puede llegar a cambiarte tanto la vida. Mi vida mejoró en cuanto apareciste. Todas las noches de estudio que me has acompañado y el cariño que me das a diario no lo cambiaría por nada.

En definitiva, gracias a toda la gente que ha contribuido y aportado ese pequeño granito de arena que al final ha hecho posible este trabajo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABLAS.....	X
ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN	XVIII
INTRODUCCIÓN	1
1. Cáncer.....	3
1.1. Cáncer como enfermedad genética	3
1.2. Sellos funcionales del cáncer	4
2. Cáncer de pulmón	10
2.1. Descripción e incidencia global	10
2.2. Clasificación del cáncer de pulmón.....	12
2.3. Estadificación clínica del cáncer de pulmón.....	13
2.4. Etiología del cáncer de pulmón.....	16
2.5. Diagnóstico y síntomas.....	16
2.6. Tratamiento convencional del cáncer de pulmón	18
2.7. Genética del CPNM	20
2.7.1 Oncogenes frecuentemente mutados en CPNM	20
2.7.2 Terapias dirigidas en CPNM	22
2.7.3 EGFR: receptor para el factor de crecimiento epitelial en CPNM.....	26
2.7.3.1 Descripción del receptor	26
2.7.3.2 Mutaciones y terapias dirigidas frente a EGFR en CPNM	29
2.7.3.3 Resistencia a terapias dirigidas de EGFR	32
3. Transición epitelio-mesenquimal.....	36
3.1 EMT y cáncer	37
3.1.1 Regulación de la EMT	39
3.1.2 Inducción del programa EMT y vías asociadas.....	40
3.1.3 EMT y resistencia a terapias convencionales.....	41
3.1.4 EMT y resistencia a EGFR-ITQs en CPNM.....	42
3.2 Reprogramación metabólica durante la EMT	44
3.2.1 Conexión entre metabolismo de lípidos y EMT	44
3.2.2 Remodelación del metabolismo lipídico durante la EMT	47
3.2.2.1 Lipogénesis y metabolismo de ácidos grasos en la EMT.....	47

3.2.2.2	Metabolismo de Glicerolípidos y la EMT	50
3.2.2.3	Metabolismo de Fosfolípidos y la EMT	51
3.2.2.4	Metabolismo de Esfingolípidos y la EMT	52
3.2.2.5	Metabolismo de Esteroles y la EMT	54
3.2.2.6	Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroles.....	56
3.2.2.7	Enzimas asociadas a lípidos y transportadores vinculados a la EMT	56
4.	Metabolómica y lipidómica.....	62
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS		66
MATERIALES Y MÉTODOS		70
1.	Modelos celulares	72
2.	Condiciones de cultivo celular.....	72
3.	Estudios de proliferación y viabilidad celular.....	73
4.	Estudio de la citotoxicidad celular: método de la sulforodamina B.....	73
5.	Ensayos de formación de colonias	74
6.	Evaluación de la capacidad migratoria.....	74
6.1	Ensayo de migración por cierre de herida	74
6.2	Ensayo Transwell.....	75
7.	Detección de proteínas mediante Western Blot.....	75
7.1	Extracción de proteínas.....	75
7.2	Electroforesis y transferencia.....	76
7.3	Inmunodetección	76
8.	Análisis transcriptómicos	78
8.1	Extracción de ARN y cuantificación.....	78
8.2	RNA-seq.....	79
8.3	RT-qPCR.....	79
8.3.1	Síntesis de ADNc: reacción de retrotranscripción (RT)	79
8.3.2	Reacción de PCR cuantitativa (qPCR)	80
9.	Estudios de transducción génica mediante construcciones lentivirales.....	82
9.1	Obtención de plásmidos.....	82
9.2	Producción de partículas lentivirales	84
9.3	Transducción viral	84
9.4	Aislamiento, selección de clones y caracterización	85
10.	Análisis lipidómico.....	86
10.1	Reactivos	86
10.2	Procesado de las células y sueros para análisis lipidómico.....	86

10.3	Análisis “untargeted” por HPLC-MS/MS	87
10.4	Detección por MS/MS y procesamiento de datos.....	88
11.	Seahorse	89
12.	Análisis de ácidos grasos totales	90
12.1	Reactivos	90
12.2	Preparación de medio de cultivo con ¹³ C-Glc e incubación de líneas celulares (FAMetA)	90
12.3	Procesado de las células para análisis de FAs	91
12.4	Análisis “targeted” por HPLC-MS/MS	91
12.5	Detección por MS y procesamiento de datos	91
13.	Determinación de TGs por fluorescencia	92
14.	Análisis estadísticos y bioinformáticos.....	93
15.	Población de estudio	93
RESULTADOS y DISCUSIÓN.....		95
1.	Caracterización de líneas celulares de CPNM dirigidas por mutaciones en <i>EGFR</i>	97
1.1	Ensayo de citotoxicidad frente a osimertinib.....	97
1.2	Caracterización morfológica.....	99
1.3	Caracterización de marcadores EMT.....	100
1.4	Evaluación de la capacidad migratoria.....	101
1.4.1	Ensayo de cierre de herida.....	101
1.4.2	Ensayo Transwell.....	103
2.	Análisis transcriptómico de los modelos de CPNM-EGFR mutado sensibles y resistentes a osimertinib	104
2.1	Detección de genes diferencialmente expresados entre líneas sensibles y resistentes a osimertinib	104
2.2.	Análisis de enriquecimiento GO y pathways alteradas.....	107
3.	Análisis lipidómico de los modelos de CPNM-EGFR mutado sensibles y resistentes a osimertinib	111
3.1	Composición lipídica global.....	111
3.2	Análisis lipidómico de clases principales.....	113
3.3	Análisis lipidómico de especies individuales.....	118
3.4	Análisis de elongación e insaturación de fosfolípidos.....	122
3.5	Determinación de los niveles de TGs	125
3.6	Análisis de ácidos grasos totales	127
4.	Integración de datos transcriptómicos y lipidómicos	130
4.1	Integración de la firma de resistencia obtenida en el RNA-Seq con la EMT y el metabolismo de lípidos	130

4.2	Validación de genes clave relacionados con el metabolismo de lípidos.....	132
5.	Papel de FADS3 en la resistencia a osimertinib y su implicación en la EMT	138
5.1	Descripción del gen	138
5.2	Estudio de expresión de <i>FADS3</i> en respuesta a EGFR-ITQs	140
5.3	Estudio de expresión de FADS3 en respuesta a TGF- β	142
5.4	Análisis funcional de la relación entre la EMT y FADS3	142
5.4.1	Niveles de FADS3 a nivel proteico en las líneas con silenciamiento y sobreexpresión de FADS3	144
5.4.2	Relación de marcadores EMT y pluripotencia con FADS3	145
5.4.3	Evaluación del papel de FADS3 en la migración celular	147
5.4.4	Sensibilidad a osimertinib en función de la expresión de <i>FADS3</i>	148
5.4.5	Análisis de expresión de genes clave en el metabolismo de lípidos en relación a FADS3	150
5.4.6	Alteración de la respiración celular y estrés mitocondrial en relación a FADS3.....	152
5.4.7	Alteraciones lipídicas en relación a FADS3	154
5.4.8	Alteraciones de los ácidos grasos totales en relación a FADS3.....	157
5.4.9	Vías de señalización relacionadas con la modulación de FADS3	160
5.4.10	FADS3, EMT y cáncer	161
6.	Análisis lipídico de sueros de pacientes con CPNM-EGFR mutante	164
6.1	Análisis comparativo del perfil lipídico entre el estado basal y la progresión de la enfermedad.....	173
CONCLUSIONES		178
BIBLIOGRAFÍA		182

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características funcionales adquiridas por las células tumorales en la mayoría de los cánceres. Adaptado de Hanahan 2022 ²³ .	5
Figura 2. Epidemiología del cáncer de pulmón a nivel global. A) Número estimado de nuevos casos en 2022 para ambos sexos y todas las edades a nivel mundial. B) Número estimado de muertes en 2022 para ambos sexos y todas las edades a nivel mundial. Fuente: GLOBOCAN 2022 https://gco.iarc.fr/ ²⁹ .	10
Figura 3. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más frecuentes en España en el año 2022. Fuente: GLOBOCAN 2022 https://gco.iarc.fr/ ²⁹ .	11
Figura 4. Mapa de incidencia mundial de cáncer pulmonar para ambos sexos. La incidencia se concentra en países desarrollados. Fuente: GLOBOCAN 2022 https://gco.iarc.fr/ ²⁹ .	11
Figura 5. Representación gráfica de los tipos y subtipos de CP según la histología. El CP se divide en dos subtipos histológicos: CPM (15% de los casos) y CPNM (85% de los casos) constituyendo este último el subtipo más frecuente. El CPNM puede, a su vez, dividirse en 3 subtipos: AC (más prevalente) seguido por SCC, LCC y otros subtipos no clasificados.	13
Figura 6. A) Oncogenes frecuentemente mutados en CPNM. B) Tasa mutacional de TP53 en los diferentes subtipos de CPNM (AC, SCC y LCC). EGFR y KRAS constituyen los principales genes mutados en CPNM. Además, se ha identificado una alta carga mutacional en TP53 en los 3 subtipos histológicos de CPNM.	21
Figura 7. Principales fármacos dirigidos contra proteínas oncogénicas frecuentemente alteradas en CPNM. Adaptado de Wu y Lin 2022 ¹¹² .	25
Figura 8. Representación de las principales vías de señalización asociadas a EGFR. Destacan rutas de señalización implicadas en procesos celulares como proliferación, supervivencia, apoptosis y reordenamiento del citoesqueleto.	27
Figura 9. Principales mecanismos de resistencia adquirida a ITQs de EGFR en CPNM. El principal mecanismo genético de adquisición de resistencia es la aparición de la mutación T790M de EGFR (50%), seguido de otros como la amplificación de MET (15%) y la amplificación de HER2 (5-10%). Por otro lado, existen mecanismos epigenéticos como la transformación histológica a CPM (2-14%) o la activación de la EMT (~2%).	35
Figura 10. Representación de la cascada de invasión-metástasis. E: Epitelial; E/M1: híbrido epitelial/mesenquimal 1; E/M2-3: híbrido epitelial/mesenquimal 2 y 3; TAM: macrófagos asociados a tumor; CAF: fibroblastos asociados a cáncer.	38
Figura 11. Cambios producidos en las células durante el transcurso de la EMT. La activación de la EMT en células epiteliales a través de los múltiples mecanismos que la regulan induce una amplia variedad de cambios transcripcionales, así como cambios en la morfología y fisiología celulares.	40
Figura 12. Principales clases de lípidos que forman el lipidoma humano. Adaptado de Agrawal et al, 2022.	46
Figura 13. Representación esquemática del metabolismo y síntesis de ácidos grasos (lipogénesis).	47
Figura 14. Representación esquemática del metabolismo y síntesis de glicerolípidos.	50
Figura 15. Representación esquemática del metabolismo y síntesis de fosfolípidos.	51
Figura 16. Representación esquemática del metabolismo y síntesis de esfingolípidos.	53
Figura 17. Representación gráfica del metabolismo y síntesis de colesterol y ésteres de colesterol.	54

Figura 18. Representación gráfica de los cambios lipidómicos asociados a la activación del programa EMT.	55
Figura 19. Representación gráfica de la cascada de las ciencias -ómicas. El metabolismo constituye el final de la cascada ómica integrando información del resto de ómicas así como factores externos, proporcionando un reflejo más cercano del fenotipo.	62
Figura 20. Número de publicaciones anuales que emplean métodos analíticos basados en espectrometría de masas (MS) o resonancia magnética nuclear (NMR) en la última década, según datos extraídos de Web of Science. La cantidad de publicaciones utilizando MS (verde) es significativamente mayor en comparación con NMR (gris), reflejando una tendencia creciente en el uso de técnicas basadas en MS a lo largo del período 2015-2024.....	63
Figura 21. Representación del proceso de generación de líneas resistentes de CPNM resistentes a osimertinib. Las líneas de CPNM sensibles a ITQs se trataron con concentraciones crecientes del fármaco durante 6 meses hasta generar líneas estables con resistencia adquirida a osimertinib.	72
Figura 22. Representación de los diferentes pasos seguidos durante el ensayo Transwell...	75
Figura 23. Esquema de los plásmidos utilizados. A) Representación de la estructura general de los plásmidos de silenciamiento (shRNA) empleados. B) Representación de la estructura del plásmido de sobreexpresión empleado, conteniendo la región codificante del gen FADS3 humano.	83
Figura 24. Representación del proceso de diluciones sucesivas realizado para el aislamiento y selección de clones en placas de 96 pocillos. El objetivo de esta metodología es aislar una célula por pocillo para finalmente obtener una colonia de células con un único genotipo.	85
Figura 25. Sistema de separación cromatográfica Vanquish™ acoplado a espectrómetro de masas Orbitrap Q Exactive™ Plus.	87
Figura 26. Respuesta a osimertinib de las líneas de CPNM sensibles y resistentes con mutaciones en EGFR. A) Ensayo de citotoxicidad aguda mediante el método de la sulforodamina B tras 72h de incubación con dosis crecientes de osimertinib (0-10 μ M) en las líneas sensibles HCC4006, H1975 y HCC827 (líneas azules) y en sus parejas resistentes 4006AZDR, 1975AZDR y 827AZDR (líneas rojas). Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control $\pm$ desviación estándar (n =6). B) Ensayo de formación de colonias tras 15 días de incubación con diferentes concentraciones de osimertinib hasta 500 nM en las líneas mencionadas previamente.	98
Figura 27. Morfología de las líneas celulares sensibles 4006, 1975 y 827 y de las líneas resistentes 4006 AZDR, 1975 AZDR Y 827 AZDR tomadas con microscopio confocal (4X).	99
Figura 28. Expresión marcadores de EMT en las líneas celulares sensibles y en las líneas resistentes. A) Expresión relativa de los marcadores EMT medidos por RT-qPCR para cada par de líneas. Se empleó la β -actina (<i>ACTB</i>) como gen normalizador. Los datos se representan como Log_2 de $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$. El experimento es representativo de 3 réplicas biológicas (n=3). B) Niveles de proteína medidos por Western Blot de los marcadores EMT en las líneas sensibles y las líneas resistentes. Se utilizó GAPDH como normalizador.	100
Figura 29. Ensayo de cierre de herida para determinar la capacidad migratoria en los modelos sensibles y resistentes a osimertinib. Imágenes obtenidas con microscopio de contraste de fases (4X) a tiempo 0 (T0) y tras 24h de la realización de la herida. La cuantificación del porcentaje de cierre de herida se realizó con ImageJ ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$).....	102
Figura 30. Ensayo de Transwell para evaluar la capacidad migratoria de las líneas sensibles (1975, 4006, 827) y resistentes (1975 AZDR, 4006 AZDR y 827 AZDR) a osimertinib. El gráfico de barras representa la cuantificación de la absorbancia a 570 nm tras la solubilización de la sulforodamina B en las distintas líneas evaluadas. Los valores representan la media $\pm$ desviación	

estándar, y las diferencias estadísticas están indicadas sobre las barras ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$).....	103
Figura 31. Representación gráfica en forma de Volcano Plot de los genes diferencialmente expresados para cada par de líneas sensible/resistente obtenidos tras el análisis Deseq2. El eje X representa el $\log_2FC$ y el eje Y el $-\log_{10}FDR$ para todos los genes detectados entre la línea sensible y la línea resistente. En rojo aparecen los genes sobreexpresados en la línea resistente y en azul aquellos reprimidos con respecto a la línea sensible. Se consideraron significativos aquellos genes con $FC \leq -3$ / $FC \geq 3$ ($\log_2FC \leq -1.6$ / $\log_2FC \geq 1.6$) y $FDR < 0,01$ ($-\log_{10}FDR > 2$). 105	
Figura 32. Representación gráfica en forma de diagrama de Venn de los genes: A) Reprimidos en las líneas resistentes vs sensibles ("DN") B) Sobreexpresados en las líneas resistentes vs sensibles ("UP").	106
Figura 33. Análisis de componentes principales (PCA) con los valores de expresión de los genes que componen la firma de resistencia a osimertinib (Firma O-R). Los ejes representan las dos primeras componentes principales (PC1 y PC2), que explican el 60% y 17% de la variabilidad total, respectivamente.	107
Figura 34. Resultados del análisis de enriquecimiento GO para la categoría "Proceso biológico" (A), "Compartimento celular" (B) y "Función Molecular" (C). Los términos enriquecidos se representan en el eje vertical, mientras que el eje horizontal indica el valor de enriquecimiento normalizado para cada uno de ellos.....	108
Figura 35. Análisis de enriquecimiento de pathways en las bases de datos KEGG, Reactome y WikiPathways. Los pathways enriquecidos se representan en el eje vertical, mientras que el eje horizontal indica el valor de $-\log_{10}$ del p-valor ajustado (FDR).....	109
Figura 36. Representación gráfica de la conexión entre el metabolismo de glicoesfingolípidos y determinadas características de la EMT. La EMT altera la expresión de enzimas metabolizadoras de SL como Gg4S, GM3S, GD3S y CerS6S. Estas alteraciones del metabolismo de SL modulan características de la EMT como la regulación negativa de la E-cadherina, el aumento de la fluidez de la membrana plasmática y la motilidad celular. Las Cers exógenas Gg4 y C16:0 así como la sobreexpresión de Gg4S y CerS6 inhiben la motilidad celular, así como lo hace la eliminación de GM3S y GD3S ³⁷²	110
Figura 37. Representación gráfica en forma de diagrama circular de la composición de lípidos en cada línea celular.	112
Figura 38. Análisis de componentes principales (PCA) entre las líneas sensibles y resistentes a osimertinib utilizando los datos lipidómicos. Los ejes representan las dos primeras componentes principales (PC1 y PC2), que explican 20,1% y 17,2% de la variabilidad total, respectivamente. Se observa una clara separación entre cada línea sensible y su línea resistente, lo que indica diferencias significativas en su perfil lipidómico.	113
Figura 39. Diferencias en las proporciones relativas de las diferentes clases de lípidos entre la línea sensible 1975 (azul) y la línea resistente 1975 AZDR (rojo). En el eje Y se representan las proporciones relativas de las diferentes clases de lípidos en el lipidoma de ambas líneas celulares, expresadas como porcentaje respecto al total de lípidos detectados ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).....	114
Figura 40. Diferencias en las proporciones relativas de las diferentes clases de lípidos entre la línea sensible 4006 (azul) y la línea resistente 4006 AZDR (rojo). En el eje Y se representan las proporciones relativas de las diferentes clases de lípidos en el lipidoma de ambas líneas celulares, expresadas como porcentaje respecto al total de lípidos detectados. ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).....	115
Figura 41. Diferencias en las proporciones relativas de las diferentes clases de lípidos entre la línea 827 (azul) y la línea 827 AZDR (rojo). Se representan las proporciones relativas de las	

diferentes clases de lípidos en el lipidoma de ambas líneas celulares, expresadas como porcentaje respecto al total de lípidos detectados ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).....	116
Figura 42. Representación gráfica en forma de Volcano Plot de las especies de lípidos detectadas en el análisis lipidómico entre líneas sensible/resistente. En rojo aparecen los lípidos significativos con $\log_2FC$ (Sensible/Resistente) $\Rightarrow 1,5 / \log_2FC \leq -1,5$ y $FDR < 0,01$. En naranja aparecen los lípidos significativos con $1,5 < \log_2FC > 1 / -1,5 < \log_2FC > -1$ y $FDR < 0,01$. En gris aparecen los lípidos no significativos o con $\log_2FC < 1 / \log_2FC > -1$. El eje Y indica el valor de $-\log_{10}$ del p-valor ajustado (FDR).	119
Figura 43. Representación en forma de Box Plot de las intensidades relativas de las 10 especies de lípidos que muestran un incremento significativo en las líneas resistentes (rojo) en comparación con las sensibles (azul). Debajo de cada figura se muestra el p-valor ajustado (FDR) ($p < 0,01^*$, $p < 0,001^{**}$, $p < 0,0001^{***}$).....	120
Figura 44. Representación en forma de Box Plot de las intensidades relativas de las 10 especies de lípidos que muestran una disminución significativa en las líneas resistentes (rojo) en comparación con las sensibles (azul). Debajo de cada figura se muestra el p-valor ajustado (FDR) ($p < 0,01^*$, $p < 0,001^{**}$, $p < 0,0001^{***}$).....	121
Figura 45. Representación gráfica en forma de Box Plot de la distribución relativa al total de fosfolípidos de las especies de fosfolípidos agrupadas según la longitud de las cadenas que las componen. Se comparan los perfiles lipídicos entre las líneas celulares sensibles (azul) y resistentes (rojo) ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).	123
Figura 46. Representación gráfica en forma de Box Plot de la distribución relativa al total de fosfolípidos de las especies de fosfolípidos agrupadas según el grado de insaturación de los ácidos grasos que las componen. Se comparan los perfiles lipídicos entre las líneas celulares sensibles (azul) y resistentes (rojo) ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).	124
Figura 47. Tinción de lípidos neutros en líneas celulares sensibles y resistentes mediante sonda fluorescente Bodipy. A) Imágenes tomadas bajo microscopio de fluorescencia tras tinción de lípidos neutros con Bodipy en los modelos celulares de CPNM (4X). Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes. B) Cuantificación de la fluorescencia media de Bodipy mediante citometría de flujo en los modelos celulares de CPNM ($n=3$) ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).	126
Figura 48. Representación gráfica de los cambios en los niveles de FAs totales entre líneas sensibles y resistentes a osimertinib. A la izquierda se representan en forma de Heat Map los valores de $\log_2FC$ para la intensidad relativa de todos los FAs detectados en el análisis comparando las líneas celulares resistentes a osimertinib (1975 AZDR, 4006 AZDR y 827 AZDR) con sus correspondientes líneas sensibles (1975, 4006 y 827). Los colores indican aumentos (rojo) o disminuciones (azul) en los niveles relativos de cada FA. Las flechas señalan los FAs que muestran una tendencia común en los tres modelos celulares. A la derecha, se presentan los valores de intensidades relativas de seis FAs destacados en forma de box plots. Los tres FAs de la fila superior (16:1n9, 18:3n6, 20:5n3) muestran un aumento significativo en las líneas resistentes, mientras que los tres de la fila inferior (18:1n9, 20:0, 22:0) disminuyen significativamente ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).	128
Figura 49. Representación gráfica en forma de diagrama circular de la proporción relativa de SFA (azul), MUFA (naranja) y PUFA (rojo) respecto al total de FAs detectados para cada línea celular.	129
Figura 50. Metodología empleada durante la identificación y selección de genes relacionados con la resistencia a osimertinib y el metabolismo de lípidos. El diagrama de Venn en la parte superior muestra la intersección entre la firma génica de metabolismo de lípidos (4017 genes, en rojo) y la firma de resistencia a osimertinib (509 genes, en azul), resultando en 110 genes	

comunes. En la parte inferior, el heat map representa los 15 genes que mayor y menor correlación presentan con la firma EMT en líneas celulares de CPNM de la CCLE. Los colores indican la dirección de la correlación: rojo para correlación positiva, azul para negativa, y blanco para correlación neutra..... 131

Figura 51. Expresión relativa de 56 genes involucrados en el metabolismo de lípidos medidos por RT-qPCR. Los datos están expresados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de las líneas resistentes (AZDR) comparadas con sus correspondientes líneas parentales sensibles (n=3). La intensidad del color indica la magnitud del cambio en la expresión génica, con tonos rojos representando sobreexpresión y tonos azules representando represión..... 135

Figura 52. Expresión de FADS3 en células sensibles y resistentes a osimertinib. El gráfico de barras muestra los niveles de expresión (CPM normalizado) de **FADS3** en las líneas sensibles (barra azul) y resistentes (barra roja) a osimertinib. Las barras de error representan la desviación estándar. Se observa una mayor expresión de FADS3 en las células resistentes en comparación con las sensibles..... 136

Figura 53. Confirmación de los niveles de FADS3 en los modelos sensibles y resistentes. A) Niveles de expresión relativos de FADS3 medidos por RT-qPCR. Los datos están expresados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de las líneas resistentes (AZDR) comparadas con sus correspondientes líneas parentales sensibles (n=3). Se utilizó *ACTB* como gen normalizador. Ciclo umbral (Ct). B) Niveles de proteína de FADS3 medidos por WB en los extractos proteicos de las líneas celulares estudiadas. Se utilizó GAPDH como normalizador. El experimento es representativo de 3 réplicas independientes..... 137

Figura 54. Representación de la estructura de la proteína FADS3 humana..... 138

Figura 55. A) Representación gráfica de la supuesta reacción catalizada por FADS3. FADS3 sería la enzima responsable de la insaturación del ácido trans-vaccénico ($\Delta 11-18:1$) en el C13 para formar un conjugado del ácido linoleico: $\Delta 11,13-CLA$ B) **Nueva función de FADS3 en la síntesis de ceramidas y glicosfingolípidos.** La función de FADS3 es introducir un doble enlace en la posición 14 de la cadena esfingoide dando lugar a la formación de la esfingadienina (d18:2). Esta esfingadienina formada puede combinarse posteriormente con un FA (p. ej FA (18:1)) para formar Cer (Cer(d18:2/18:1). De forma alternativa, FADS3 puede introducir el doble enlace en la Cer(d18:1/18:1). Estas Cer presentan un doble enlace cis, provocando una curvatura de la cadena y afectando a la formación de microdominios de membrana. Estas Cer pueden unirse a carbohidratos para dar lugar a glucosilceramidas que constituyen la base de los glicosfingolípidos o pueden ser convertidas en SMs a través de la esfingomielina sintasa (SGMS1)..... 139

Figura 56. Expresión relativa de desaturasas medida por RT-qPCR tras exposición aguda a dos concentraciones de osimertinib: OSI1 = 100nM (azul); OSI2= 400 nM (rojo) durante 48H en las líneas parentales 4006, 1975 y 827. Los datos están expresados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de las líneas tratadas con osimertinib comparadas con sus correspondientes líneas control sin tratar (n=3). Se utilizó *ACTB* como gen normalizador. Ciclo umbral (Ct). 140

Figura 57. Expresión relativa de desaturasas medida por RT-qPCR tras exposición aguda de 48h a 400 nM de gefitinib en la línea 4006 y a 400 nM de erlotinib en la línea 827. Los datos están expresados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de las líneas tratadas con ITQ comparadas con sus correspondientes líneas control sin tratar (n=3). Se utilizó *ACTB* como gen normalizador. Ciclo umbral (Ct). 141

Figura 58. Expresión relativa de FADS3 y EMT-TFs en las líneas sensibles tratadas con 10 ng/ml de TGF- β durante 30 días. Los datos están expresados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de las líneas tratadas con TGF- β comparadas con sus correspondientes líneas control sin tratar (n=3). Se utilizó *ACTB* como gen normalizador. Ciclo umbral (Ct). 142

Figura 59. Expresión relativa de <i>FADS3</i> (rojo), <i>CDH1</i> (naranja) y <i>VIM</i> (verde) medida por RT-qPCR con respecto al sh-control en los clones de silenciamiento obtenidos en 1975 AZDR. Se utilizó <i>ACTB</i> como gen normalizador. Ciclo umbral (Ct).	143
Figura 60. Expresión relativa de <i>FADS3</i> (rojo), <i>CDH1</i> (naranja) y <i>VIM</i> (verde) medida por RT-qPCR con respecto al control en los clones de sobreexpresión obtenidos en 1975. Se utilizó <i>ACTB</i> como gen normalizador. Ciclo umbral (Ct).	143
Figura 61. Comparación morfológica entre la línea 1975 OE-CTRL y la línea 1975 OE-FADS3. Es posible observar un cambio hacia un fenotipo alargado y fusiforme, con aparente formación de focos celulares.	144
Figura 62. Niveles de proteína <i>FADS3</i> medidos en extractos proteicos mediante WB en las líneas control, silenciadas y sobreexpresadas. El experimento es representativo de tres réplicas independientes. Se utilizó GAPDH como normalizador.	145
Figura 63. Estudio de expresión de marcadores EMT y genes de pluripotencia en la línea con silenciamiento de <i>FADS3</i> (1975 AZDR SH-FADS3) y la línea con sobreexpresión de <i>FADS3</i> (1975 OE-FADS3) mediante RT-qPCR. Los datos están expresados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de: A) Línea 1975 AZDR SH-FADS3 frente a 1975 AZDR SH-CTRL (n=3). B) Línea 1975 OE-FADS3 frente a 1975 OE-CTRL (n=3). Se utilizó <i>ACTB</i> como gen normalizador. Ciclo umbral (Ct).	145
Figura 64. Niveles de proteína medidos por Western Blot de los marcadores EMT en las líneas con sobreexpresión de <i>FADS3</i> (1975 OE-FADS3) y la línea silenciada para <i>FADS3</i> (1975 AZDR SH-FADS3) junto a las líneas control. El experimento es representativo de tres réplicas independientes. Se utilizó GAPDH como normalizador.	146
Figura 65. Ensayo de Transwell para evaluar la capacidad migratoria de las líneas CTRL y las líneas OE-FADS3 y SH-FADS3 (n=3). El gráfico de barras representa la cuantificación de la absorbancia a 570nm tras la solubilización de la sulforodamina B en las distintas líneas evaluadas. Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar, y las diferencias estadísticas están indicadas sobre las barras ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$).	147
Figura 66. Respuesta a osimertinib de las líneas 1975 OE-FADS3 y 1975 AZDR SH-FADS3. A) Ensayo de citotoxicidad aguda mediante el método de la sulforodamina B tras 72h de incubación con dosis crecientes de osimertinib (0-10 μ M) en las líneas H1975, 1975 AZDR, 1975 OE-FADS3 y 1975 AZDR SH-FADS3. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control $\pm$ desviación estándar (n=6). B) Ensayo de formación de colonias tras 15 días de incubación con diferentes concentraciones de osimertinib hasta 500 nM en las líneas mencionadas previamente.	149
Figura 67. Análisis de expresión de genes del metabolismo lipídico en las líneas 1975 OE-FADS3 y 1975 AZDR SH-FADS3 mediante RT-qPCR. Los datos están expresados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de: A) Línea con silenciamiento de <i>FADS3</i> (1975 AZDR SH-FADS3) frente a 1975 AZDR SH-CTRL (n=3). B) Línea con sobreexpresión de <i>FADS3</i> (1975 OE-FADS3) frente a 1975 OE-CTRL (n=3). Se utilizó <i>ACTB</i> como gen normalizador. Ciclo umbral (Ct).	151
Figura 68. Resultados del MitoStress en las líneas 1975 OE-CTRL, 1975 AZDR SH-CTRL, 1975 OE-FADS3 y 1975 AZDR SH-FADS3 utilizando el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe96. A) Mapa energético; B) Gráficos de barras representando el consumo de oxígeno no mitocondrial y la producción de ATP acoplada a respiración (n=5). Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar, y las diferencias estadísticas están indicadas sobre las barras ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$).	153
Figura 69. Cambios en la composición lipídica tras el silenciamiento/sobreexpresión de <i>FADS3</i> . En la parte superior, se presentan los cambios en la línea con silenciamiento de <i>FADS3</i> (1975 AZDR SH-FADS3) frente a la línea parental resistente (1975 AZDR SH-CTRL). En la parte inferior, se muestran los cambios en la línea con sobreexpresión de <i>FADS3</i> (1975 OE-FADS3) en	

comparación con la línea parental sensible (1975 OE-CTRL). Los valores representan el cambio en la concentración (FC) para cada clase de lípidos calculada como la suma de todas las especies detectadas dentro de cada clase lipídica ($p < 0.05^*$).....	155
Figura 70. Cambios en los niveles relativos de ceramidas (Cer) y esfingomielinas (SM) con bases esfingoides d18:2 en diferentes líneas celulares. Los valores representan la suma total de todas las especies detectadas de Cer con (d18:1) y Cer/SM con d18:2 referenciadas al total de lípidos. La primera columna muestra el FC entre ambos controles 1975 AZDR SH-CTRL vs 1975 OE-CTRL, la segunda columna compara la línea 1975 OE-FADS3 vs 1975 OE-CTRL, y la tercera columna muestra el FC entre la línea 1975 AZDR SH-FADS3 vs 1975 AZDR SH-CTRL ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$).....	156
Figura 71. Abundancia relativa de la suma de Cer con d18:2 en sus cadenas (Cer(d18:2/X)) en las diferentes líneas celulares sensibles y resistentes. Las líneas sensibles (barras azules) se comparan con su correspondiente línea resistente (barras rojas) ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$).	157
Figura 72. Representación gráfica en forma de Heat Map del análisis de FAs totales sin marcaje y tras la incubación con ^{13}C-Glc (FAMetA) en las diferentes líneas celulares. A) Se representan los valores de $\log_2\text{FC}$ entre las líneas 1975 OE-FADS3 vs 1975 OE-CTRL y las líneas 1975 AZDR SH-FADS3 vs 1975 AZDR SH-CTRL para la intensidad relativa de todos los FAs detectados. B) Experimento FAMetA donde se representan los valores de $\log_2\text{FC}$ para los diferentes parámetros en el siguiente orden: parámetro de síntesis (S), Elongación 1 (E1), Elongación 2 (E2), Elongación 3 (E3) y Elongación 4 (E4). La columna 1 compara la línea resistente (1975 AZDR vs 1975), la columna 2 compara la línea con sobreexpresión de <i>FADS3</i> con la línea parental sensible control (1975 OE-FADS3 vs 1975 OE-CTRL), y la columna 3 compara la línea con silenciamiento de <i>FADS3</i> con la línea parental resistente control (1975 AZDR SH-FADS3 vs 1975 AZDR SH-CTRL). Los tonos azules representan una disminución y los tonos rojos una elevación en comparación con los controles correspondientes.	159
Figura 73. Niveles de EGFR, AKT, ERK, STAT3, P38 y S6, así como su grado de fosforilación en los modelos derivados de 1975 en condiciones control (-) y en respuesta a osimertinib (+) ("p", contra las formas fosforiladas, "t", contra la forma total). Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.	160
Figura 74. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier relacionando la expresión de <i>FADS3</i> con la probabilidad de supervivencia en pacientes con cáncer renal y HNSCC. La línea azul indica baja expresión mientras que la línea rosa muestra alta expresión A) Pacientes con cáncer renal que muestran una mayor expresión de <i>FADS3</i> presentan peores valores de supervivencia que aquellos con una menor expresión del gen. B) Pacientes con HNSCC que muestran una mayor expresión de <i>FADS3</i> presentan peores valores de supervivencia que aquellos con una menor expresión del gen.	162
Figura 75. Análisis de correlación entre la expresión de <i>FADS3</i>, genes epiteliales y mesenquimales en líneas de CPNM de pulmón de la CCLE (Briad Institute). El color rojo hace referencia a una elevada expresión y el color azul indica una expresión baja. El coeficiente de correlación de Pearson y el p-valor fueron ajustados mediante FDR.....	163
Figura 76. Curvas de Kaplan-Meier que representan la supervivencia libre de progresión (PFS) en función de los niveles basales de los cinco lípidos con mayor correlación positiva con la PFS. Cada curva está dividida en dos grupos según niveles altos "high"(rojo) y bajos "low"(azul). Debajo de cada curva se presenta el p-value (Mantel-Cox) y el HR obtenido en la Regresión de Cox.....	167
Figura 77. Curvas de Kaplan-Meier que representan la supervivencia libre de progresión (PFS) en función de los niveles basales de los cinco lípidos con mayor correlación negativa con la	

PFS. Cada curva está dividida en dos grupos según niveles altos "high" (rojo) y bajos "low" (azul). Debajo de cada curva se presenta el p-value (Mantel-Cox) y el HR obtenido en la Regresión de Cox.....	168
Figura 78. Curvas de Kaplan-Meier que representan la supervivencia global (OS) en función de los niveles basales de los cinco lípidos con mayor correlación positiva con la OS. Cada curva está dividida en dos grupos según niveles altos "high" (rojo) y bajos "low" (azul). Debajo de cada curva se presenta el p-value (Mantel-Cox) y el HR obtenido en la Regresión de Cox.	171
Figura 79. Curvas de Kaplan-Meier que representan la supervivencia global (OS) en función de los niveles basales de los cinco lípidos con mayor correlación negativa con la OS. Cada curva está dividida en dos grupos según niveles altos "high" (rojo) y bajos "low" (azul). Debajo de cada curva se presenta el p-value (Mantel-Cox) y el HR obtenido en la Regresión de Cox.	172
Figura 80. Representación de las 10 especies lipídicas con mayores diferencias entre el estado basal y la progresión de la enfermedad. El gráfico muestra los niveles de los 10 lípidos que presentaron las diferencias más destacadas ($FDR < 0,05$. Test de Wilcoxon) entre los grupos basal y progresión.	175

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estadificación del CP según la 8ª edición del TNM.	14
Tabla 2. Agrupación por estadios en CP según la 8ª edición del TNM.	15
Tabla 3. Ensayos clínicos en los que se comprueba la eficacia del tratamiento con ITQs de EGFR de 1ª, 2ª y 3ª generación en comparación con tratamientos convencionales de quimioterapia en pacientes con CPNM-EGFR mutado sin tratamiento previo.	31
Tabla 4. Líneas celulares de CPNM mutadas en EGFR utilizadas en el estudio.	72
Tabla 5. Lista de anticuerpos primarios empleados en Western Blot.	77
Tabla 6. Lista de anticuerpos primarios de vías de señalización empleados en WB.	77
Tabla 7. Lista de anticuerpos secundarios empleados en Western Blot.	78
Tabla 8. Reactivos empleados para la reacción de RT.	79
Tabla 9. Lista de primers utilizados para los ensayos de RT-qPCR.	80
Tabla 10. Reactivos empleados para la reacción de qPCR.	82
Tabla 11. Descripción de las secuencias empleadas para el experimento de silenciamiento y sobreexpresión de FADS3.	83
Tabla 12. Reactivos empleados para la transfección de las HEK293 LTV.	84
Tabla 13. Parámetros utilizados durante el procesamiento de datos con LipidMS 3.0.	89
Tabla 14. Información demográfica y clínica de la cohorte de estudio.	164
Tabla 15. Lista de los 30 lípidos con asociación estadísticamente significativa con la PFS. Se presentan el hazard ratio (HR) con su intervalo de confianza al 95% (IC-Lower – IC-Upper) y el p-valor ajustado por corrección de FDR (Benjamini-Hochberg).	166
Tabla 16. Lista de los 61 lípidos con asociación estadísticamente significativa con la OS según el análisis de regresión de Cox. Se presentan el hazard ratio (HR) con su intervalo de confianza al 95% (IC-Lower – IC-Upper) y el p-valor ajustado por corrección de FDR (Benjamini-Hochberg).	169
Tabla 17. Lista de los 59 lípidos con diferencias significativas entre el estado basal y la progresión según test de Wilcoxon. Al lado de cada variable se indica la diferencia en la pseudo mediana de progresión respecto a basal (Diff_Value) y el p-valor ajustado por corrección de FDR (Benjamini-Hochberg).	173

ABREVIATURAS

^{13}C	Carbono 13
AA	Ácido araquidónico
AC	Adenocarcinoma
ACACA/B	Acetil-CoA carboxilasas
ACLY	ATP citrato liasa
ACN	Acetonitrilo
ACSL	Acil-CoA sintetasas
ACSS1/2	Acetil-CoA sintetasas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
FA	Ácido graso
AGPAT	Acilglicerol aciltransferasa
AJCC	Comité Conjunto Americano del Cáncer
AKT1	AKT Serine/Threonine Kinase 1
ALK	Quinasa del linfoma anaplástico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	RNA de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
AXL	Receptor tirosina quinasa AXL
AZDR	Osimertinib resistente
BRAF	B-Raf Proto-Oncogén, Serina/Treonina Quinasa
BSA	Albúmina bovina sérica
CCLE	<i>Cancer Cell Line Encyclopedia</i>
CD36	Translocasa de ácidos grasos
CDH1	E-cadherina
CDH2	N-cadherina
ADNc	ADN complementario
CDP-Cho	Citidil difosfato-colina
CDS1	CDP-diacilglicerol sintasa 1
CE	Ésteres de colesterol
CER	Ceramidas
CERK	Ceramida quinasa
CerP	Ceramidas fosfato
CERS6	Ceramida sintasa 6
CL	Cardiolipinas
CP	Cáncer de pulmón
CpGs	Dinucleótidos de citosina y guanina unidos por un grupo fosfato
CPM	Cáncer de pulmón microcítico
CPNM	Cáncer de pulmón no microcítico
CSC	Célula madre tumoral
CTC	Células tumorales circulantes
CTLA4	Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos

CTP	Citidina trifosfato
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DDA	Adquisición dependiente de datos
DEGS1/2	Desaturasas de dihidroceramidas ½
DG	Diglicéridos
DGAT1/2	Diacilglicerol aciltransferasas ½
DHA	Ácido docosahexaenoico
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DIA	Adquisición independiente de datos
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Reprimidos
E/M	Híbrido epitelial-mesenquimal
ECM	<i>Extracellular matrix</i> (Matriz extracelular)
EGF	Factor de crecimiento epitelial
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epitelial 1
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
EML4	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4
EMT	Transición epitelio mesenquimal
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares
ESI	Electrospray
FADH2	Dinucleótido de dihidroflavina-adenina
FADS1/2/3	Desaturasa de ácido grasos 1/2/3
FAK	Quinasa de adhesión focal
FAMetA	Análisis metabólico de ácidos grasos
FASN	Ácido graso sintasa
FATP	Transportador de ácidos grasos
FCCP	Fenilhidrazona
FDA	Food and Drug Administration
FDR	False Discovery Rate (Tasa de falsos positivos)
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FGFR1	Receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos
FT	Factor de transcripción
FT-EMT	Factores de transcripción de la EMT
G3P	Glicerol 3 fosfato
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GDP	Guanosín difosfato
GK	Glicerol quinasa
GLS	Glutaminasa
GLUT	Transportador de glucosa
GPD1/2	Glicerol-3-fosfato dehidrogenasa
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
H ₂ O	Agua
HCC	Hepatocarcinoma

HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HER2	Receptor del factor de crecimiento epitelial 1
HER3	Receptor del factor de crecimiento epitelial 3
HER4	Receptor del factor de crecimiento epitelial 4
HGF	El factor de crecimiento de hepatocitos
HGFR	Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos
HMDB	Human Metabolome DataBase
HMG-CoA	Hidroximetilgluratil-CoA
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IC50	Concentración de inhibición al 50%
IGFR1	Receptor del factor de crecimiento tipo 1 similar a la insulina
IgG	Inmunoglobulina
IL-6	Interleukina 6
IP3	Inositol 1,4,5-trisfosfato
IPA	Isopropanol
ITQ	Inhibidor tirosina-quinasa
JAK	Janus kinase (Quinasa Janus)
KRAS	Kristen rat sacoma viral oncogene
LA	Ácido linoleico
LCC	Carcinoma de células grandes
LD	<i>Lipid droplets</i>
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDLR	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPC	Lisofosfatidilcolinas
LPIN1	Lipina 1
LXR	Receptor hepático X
m/z	Masa-carga
MAGL	Lipasa de monoglicéridos
MAPK	Proteínas quinasa activadas por mitógenos
MAT	Microambiente tumoral
MDSCs	Células supresoras de origen mieloide
MeOH	Metanol
MEK	Proteína quinasa quinasa activada por mitógenos
MET	Transición mesenquimal-epitelial
MET1	MET Protooncogén 1 (Receptor para el factor de crecimiento de hepatocitos)
MET1	Proteína quinasa 1 activada por mitógenos
MG	Monoglicéridos
miRNA	MicroRNA
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz
MS	Mass spectrometry (espectrometría de masas)
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
NADH	1,4-Dihidronicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCI	Instituto Nacional de Cáncer Americano

NFkB	Factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas
NGS	Next Generation Sequencing (Secuenciación de nueva generación)
NK	Natural killer cell
NRAS	Homólogo del oncogén viral RAS del neuroblastoma
OMS	Organización mundial de la salud
PA	Ácido fosfatídico
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Fosfatidilcolinas
PCp	Fosfatidilcolinas plasmalógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	Proteína 1 de muerte celular programada
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PD-L1	Ligando 1 de muerte celular programada 1
PE	Fosfatidiletanolaminas
PEp	Fosfatidiletanolaminas plasmalógeno
PET	Tomografía de emisión de positrones
PG	Fosfoglicéridos
PGp	Fosfatidilglicerol fosfato
PI	Fosfatidilinositoles
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PI3KCA	Subunidad catalítica alfa de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinasa
PIK3CB	Subunidad catalítica beta de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinasa
PIK3CD	Subunidad catalítica delta de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato
PIPKly	Fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinasa-l-gamma
PIPx	Fosfoinositoles-fosfato
PKC	Proteína quinasa C
PLC-γ	Fosfolipasa C gamma 1
PNPLA2	Triglicérido adiposo lipasa
PPP	Vía de las pentosas fosfato
PS	Fosfatidilserinas
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> (Homólogo de fosfatasa y tensina)
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
QC	Quality control
RAF	Raf-1 Protooncogen
RM	Resonancia magnética
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas del oxígeno
ROS1	ROS proto-oncogén 1
RP	Cromatografía reversa
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Retrotranscripción
RTKs	Receptores tirosina quinasa
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

S1P	Esfingosina-1-fosfato
SCAP	<i>SREBP cleavage-activating protein</i> (Proteína activadora de unión a SREBP)
SCC	Carcinoma de células escamosas o epidermoide
SCD1/5	Estearoil-coenzima A desaturasa 1/5
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante
SFA	Ácidos grasos saturados
SFK	Quinasas de la familia Src
SGLT1	Cotransportador de sodio/glucosa
SH2	Dominio de homología 2
shRNA	Secuencia silenciamiento RNA
SL	Esgingolípidos
SLC1A5	Solute carrier family 1 member 5
SM	Esfingomielinas
SMPD1	Esfingomielinasa
SNAIL1/2	Snail family zinc finger 1/2
Sph	Base esfingoide
SphK	Esfingosinas fosfato
SPHK	Esfingosina quinasa
SPT	Serina palmitoil transferasa
SREBPs	Elementos reguladores de esteroides
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TAC	Tomografía axial computerizada
TAM	Macrófagos asociados a tumor
TBS-T	Tampón tris salino- Tween 20
TCGA	El Atlas del Genoma del Cáncer
TGF- β	Factor de crecimiento transformante Beta
TG	Triglicéridos
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TP53	Proteína tumoral p53
TWIST1/2	Twist family bHLH transcription factor 1/2
UP	Inducidos
UPLC	Cromatografía líquida de alta presión
UV	Ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular A
VIM	Vimentina
VPA	Ácido valproico
ZEB1/2	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1/2

RESUMEN

El **cáncer de pulmón (CP)** es la neoplasia con **mayor mortalidad** en el mundo occidental, siendo el **carcinoma pulmonar no microcítico (CPNM)** el **subtipo más frecuente** con más del 80% de los casos registrados. En estos casos, la **supervivencia a los 5 años no supera el 15%**, esto es debido fundamentalmente al diagnóstico tardío del CPNM, a la falta de respuesta a las terapias existentes y/o a la aparición de resistencias al tratamiento. El diseño de terapias dirigidas contra el **receptor para el factor de crecimiento epitelial (EGFR)**, como los **inhibidores tirosina-quinasa (ITQs)** gefitinib, erlotinib y osimertinib, han supuesto un gran beneficio clínico para pacientes con CPNM dirigido por mutaciones en *EGFR* **mejorando notablemente las ratios de supervivencia**. Por ello, actualmente, son el **tratamiento de elección en primera línea** en este tipo de pacientes. Sin embargo, a pesar de que en un 70% de los casos hay respuesta inicial, la gran mayoría acaban progresando debido al **desarrollo de resistencias** por múltiples mecanismos, entre ellos la activación de la **transición epitelial-mesenquimal (EMT)**.

La EMT constituye un programa biológico de transdiferenciación en el que **células epiteliales polarizadas experimentan múltiples cambios moleculares y morfológicos que les acaban confiriendo un fenotipo mesenquimal**. Este proceso está orquestado por un complejo programa transcripcional regulado por un conjunto de factores de transcripción (EMT-FTs) que se activan secuencialmente de manera dependiente del contexto celular y caracterizado por la represión de marcadores epiteliales como E-cadherina (CDH1) y la sobreexpresión de marcadores mesenquimales como N-cadherina (CDH2) y Vimentina (VIM). En el contexto del cáncer, la EMT se ha asociado a la progresión tumoral, la diseminación metastásica y la aparición de resistencias a fármacos como los ITQs. Como en otros procesos de diferenciación celular, **la EMT implica una reprogramación metabólica** de las células tumorales, favoreciendo su adaptación dinámica al microambiente tumoral (MAT). A pesar de la importancia de los lípidos como componentes fundamentales de las membranas celulares, fuente de energía y su papel en distintos procesos de señalización celular, los cambios lipídicos asociados a la EMT han sido poco estudiados. Por ello, el **objetivo principal** de la presente tesis doctoral es **profundizar en el conocimiento de la reprogramación lipídica que acompaña a la EMT durante la adquisición de resistencia al tratamiento con ITQs del CPNM con mutaciones en EGFR**. Con ello, se pretende identificar alteraciones metabólicas que puedan constituir dianas terapéuticas que permitan revertir o retrasar la EMT y, por tanto, restaurar la sensibilidad a los ITQs. Para ello se utilizaron **líneas celulares de CPNM con mutaciones en EGFR** clínicamente relevantes sensibles al ITQ de 3ª generación osimertinib de las que se obtuvieron sus correspondientes **líneas resistentes**. En estos modelos la adquisición de resistencia se asoció inequívocamente a la activación del programa EMT, con una fuerte represión de marcadores epiteliales y un aumento de marcadores mesenquimales acompañado de un aumento en la capacidad de migración e invasión. **El análisis transcriptómico y lipídómico de estos modelos celulares reveló importantes cambios** tanto a nivel de expresión de genes relacionados con la homeostasis lipídica como en la composición del lipidoma celular. Un importante número de estos cambios son dependientes del modelo de resistencia utilizado, algo esperable dado el distinto origen y genotipo de las líneas celulares utilizadas. Aún así se identificaron **cambios comunes** en todos los modelos utilizados lo que sugiere la existencia de mecanismos compartidos susceptibles de ser intervenidos farmacológicamente.

El **análisis transcriptómico**, mediante RNA-seq, permitió identificar una firma de resistencia (Firma O-R) capaz de discriminar entre los fenotipos sensible/resistente y en la que están representadas de forma significativa familias de genes involucradas en el proceso de EMT, así como genes involucrados en el metabolismo lipídico. Por otro lado, el **análisis lipídómico** mediante HPLC-MS, permitió identificar un total de 35 lípidos con una diferencia significativa en

su abundancia entre líneas sensibles y resistentes. **Las clases de lípidos que mostraron los cambios más significativos** fueron los fosfolípidos plasmalógenos (PCp, PEp, PCo y PEO), que disminuyeron en las líneas resistentes, mientras que los lípidos neutros, como los triglicéridos y los ésteres de colesterol aumentaron. Además, se observó una preferencia de las líneas resistentes por fosfolípidos con cadenas de ácidos grasos de longitudes intermedias (C36-C38) y con una tendencia hacia la insaturación (1 o más dobles enlaces). Por su parte, las líneas sensibles presentan una preferencia por fosfolípidos con cadenas más largas (C40-C42) y con una tendencia hacia la saturación. El análisis de los ácidos grasos totales mostró, tras su liberación de los lípidos complejos, tendencias comunes para todos los modelos. Los ácidos grasos 16:1n9, 18:3n6 y 20:6n3 presentaron niveles superiores en las líneas resistentes en comparación con las sensibles. Por el contrario, los ácidos grasos saturados (SFA) de cadena larga 20:0, 22:0, 24:0 y 26:0 presentan una tendencia contraria y disminuyen significativamente en las líneas resistentes. Además, se observaron diferencias en el balance entre SFA, monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFAs) en las líneas resistentes en comparación con los modelos sensibles.

La integración de datos de expresión génica y de lipidómica evidenció conexiones entre cambios en expresión de genes y lípidos asociados a la EMT. Los genes *DGAT2*, *SCD5* y *FADS3* destacaron por sobreexpresarse en las líneas resistentes mientras que otros genes como *FOXA1*, *CDS1* y *GPD2* mostraron una profunda represión. De entre estas potenciales dianas **se seleccionó FADS3** para su posterior estudio debido a: i) su sobreexpresión en todos los modelos de CPNM resistentes a osimertinib; ii) su conexión con la EMT; iii) la oportunidad de descubrir nuevas funciones de esta enzima; y iv) el potencial desarrollo de nuevas terapias basadas en su inhibición. Para confirmar el papel de *FADS3* en la EMT se llevó a cabo **su validación funcional**. La sobreexpresión de *FADS3* en los modelos de CPNM resistentes a osimertinib por activación de la EMT, se confirmó mediante RT-qPCR y Western blot. La expresión de *FADS3* aumentó tras la exposición aguda a osimertinib en los modelos sensibles, sugiriendo un papel en la adaptación inicial al fármaco y en las etapas iniciales de la EMT. Por otro lado, también se observó aumento en los niveles de *FADS3* tras su exposición a TGF- β , un inductor canónico de la EMT, lo que sugiere una relación directa entre *FADS3* y la EMT. La **sobreexpresión ectópica de FADS3** en la línea celular sensible 1975 indujo la sobreexpresión de marcadores de EMT y pluripotencia, junto con una mayor capacidad migratoria y un aumento en la resistencia a osimertinib. A nivel metabólico, la sobreexpresión de *FADS3* modificó el perfil lipidómico general. Se observó un aumento en los productos de su reacción (i.e., Cer(d18:2/x)) y sus metabolitos asociados (i.e., SM(d18:2/x)), así como una reducción en la síntesis de ácidos grasos y una mayor captación de éstos del medio extracelular. Además, su sobreexpresión determinó cambios en vías de señalización relacionadas con EGFR, lo que sugiere una interacción con mecanismos clave en la resistencia a ITQs. Por el contrario, el **silenciamiento de FADS3** en la línea 1975 AZDR revirtió parcialmente estos efectos, reafirmando su papel en la resistencia a osimertinib y en la transición EMT. Estos hallazgos **subrayan el potencial de FADS3 como diana terapéutica** para retrasar o revertir la EMT y refuerzan la importancia del metabolismo lipídico en la plasticidad tumoral y la resistencia a fármacos.

Por último, se realizó un **análisis lipidómico de sueros de pacientes con CPNM portadores de mutaciones en EGFR** (n=65). En una etapa inicial, se identificaron asociaciones significativas entre los niveles de ciertas especies lipídicas antes del tratamiento y dos importantes variables clínicas como son la progresión libre de enfermedad (PFS) y la supervivencia global (OS). Los lípidos que se asociaron con un menor riesgo de exitus, así como de progresión de enfermedad corresponden a especies de lisofosfolípidos: **LPC(18:1), LPI(18:1), LPE(20:1) y LPC(18:3)**. Por otro

lado, también se encontraron lípidos cuyos niveles están asociados a un mayor riesgo de exitus, así como de progresión. Estos lípidos corresponden a especies de ceramidas y ácidos grasos: **Cer(d18:0/24:1), FA(18:2) y FA(22:2)**. Esta **firma lipídica** podría convertirse en una herramienta útil para predecir qué pacientes van a responder mejor o peor a los ITQs. En una segunda etapa, se analizaron muestras de suero en el momento de la progresión de la enfermedad, lo que permitió identificar alteraciones de lípidos asociadas a este evento. Cabe destacar que las alteraciones de determinados LPC y LPEs observadas a nivel basal se mantuvieron en el momento de la progresión lo que refuerza el potencial **de la firma lipídica como biomarcador de pronóstico y monitorización**. Aunque resultan prometedores, estos resultados necesitan ser validados en una cohorte de pacientes mayor y en un estudio prospectivo.

En resumen, esta tesis doctoral ha **permitido profundizar en el conocimiento de la reprogramación lipídica asociada a la aparición de resistencia a los ITQs mediante un mecanismo EMT en el tratamiento del CPNM-EGFR**. Se han identificado alteraciones clave en la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico que dirigen una importante reprogramación lipídica. En este contexto **se propone, por primera vez, a FADS3 como un actor relevante en la adquisición de resistencia a ITQs mediante un mecanismo EMT**. Además, se identifica una **firma lipídica** en sueros de pacientes que **podría predecir la progresión de la enfermedad** y guiar futuras estrategias terapéuticas. Estos hallazgos subrayan la importancia del metabolismo de lípidos en la resistencia a fármacos y abren nuevas vías para el desarrollo de terapias dirigidas a retrasar o revertir la EMT y de este modo, potenciar o restaurar la sensibilidad a los ITQs en el tratamiento del CPNM-EGFR.

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

El cáncer comprende un enorme grupo de enfermedades caracterizadas por la proliferación anormal y descontrolada de determinadas poblaciones celulares en cualquier zona del organismo, llegando a formar una masa de tejido irregular denominada tumor o neoplasia¹. Cuando estas células tumorales adquieren la capacidad de diseminar e invadir tejidos adyacentes, así como metastatizar órganos distantes, se denominan tumores malignos².

El cáncer puede originarse a partir de la mayoría de tipos celulares existentes; de hecho, existe una denominación para clasificar el cáncer según el tipo celular en el que se origina³:

- Carcinoma: tejidos epiteliales que recubren los órganos (90% de los cánceres humanos).
- Sarcoma: tejido conectivo o conjuntivo del que se originan huesos, músculos y cartílagos.
- Leucemia, linfoma y mieloma: células del sistema sanguíneo.
- Neuroblastomas y gliomas: células del sistema nervioso.

1.1. Cáncer como enfermedad genética

Durante la segunda mitad del siglo XIX, el cáncer se entendía como una enfermedad local contenida en tejidos y órganos particulares⁴ y la proliferación era una propiedad constitutiva de las células, existiendo diferentes etapas del ciclo celular que conducen a la división⁵. A comienzos del siglo XX, Theodor Boveri, en contraposición a la opinión predominante en ese momento, postuló que el cáncer era una enfermedad debido a cambios en la cromatina (mutaciones) que modificaban el programa de proliferación de las células, descrita como una cualidad primordial⁶. Esta fue la primera descripción del cáncer como una enfermedad genética. El desarrollo de la genética y los avances tecnológicos de finales del siglo XX han permitido comprender que las células tumorales se originan a partir de células que han adquirido alteraciones o mutaciones en su secuencia de ADN confiriéndoles una ventaja frente a las células normales al proveerlas de mayores capacidades de supervivencia y crecimiento, así como la capacidad de evadir el control homeostático del tejido en el que se origina. La primera evidencia de que el cáncer surge de alteraciones genéticas somáticas provino de estudios del linfoma de Burkitt, en los que una de tres translocaciones diferentes yuxtapone el gen *c-MYC*⁷. Sin embargo, no todas las mutaciones o alteraciones genéticas tienen la capacidad de generar un proceso carcinogénico. Las mutaciones somáticas del genoma tumoral, independientemente de su naturaleza (inserción, delección, translocación, etc), tienen consecuencias diferentes sobre el desarrollo. Identificar qué mutaciones contribuyen al desarrollo del cáncer es un paso clave para comprender la biología del tumor⁸. En este sentido, distinguimos entre mutaciones pasajeras o mutaciones conductoras (de su traducción del inglés, driver). Las mutaciones pasajeras tienen lugar en genes cuya alteración no proporciona una ventaja de crecimiento al tumor y, por tanto, no aporta ningún beneficio funcional a la célula. Por otro lado, las mutaciones conductoras confieren una ventaja selectiva para el crecimiento del tumor y tienen lugar en genes que, normalmente, presentan funciones clave como: crecimiento, angiogénesis, reparación, diferenciación y muerte celular, entre otros⁹. Aquellos genes susceptibles de sufrir mutaciones conductoras que los sobreactiven constitutivamente reciben el nombre de proto-oncogenes y, una vez mutados, reciben el nombre de oncogenes al favorecer la aparición de un proceso carcinogénico. En contraposición, la aparición de un tumor también puede darse si esta mutación conductora tiene

lugar en un gen encargado de regular negativamente los procesos protumorales, conocidos como genes supresores de tumores. Como resultado de la mutación, estos genes se inactivan, pierden su función y dejan de actuar como mecanismo de control de la aparición de tumores malignos^{10,11}. Un solo cambio genético rara vez es suficiente para el desarrollo de un tumor maligno. En definitiva, se trata de un proceso de múltiples pasos de alteraciones secuenciales que requiere la acumulación de mutaciones que activan los oncogenes o inactivan los supresores tumorales. En tumores sólidos de individuos adultos, las alteraciones en al menos tres genes “impulsores” parecen ser suficientes para que una célula evolucione hasta convertirse en un cáncer avanzado tal y como demuestran los datos de secuenciación, incidencia del cáncer a lo largo de la vida humana y tasas relativas de cáncer en poblaciones con diferentes tasas de mutación¹². Los factores causantes de estas alteraciones somáticas en oncogenes/genos supresores todavía son objeto de controversia. Por un lado, estas alteraciones pueden deberse a la herencia genética tal y como demuestran los estudios en gemelos¹³. Aunque el porcentaje es bajo, entre el 5 y el 10%, es posible heredar cambios en el ADN que aumentan la predisposición a desarrollar cáncer¹⁴. Por ejemplo, personas con ciertas mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* presentan un riesgo más elevado de lo normal de desarrollar cáncer de mama y ovario¹⁵. Por otro lado, el cáncer se ha asociado a múltiples factores ambientales tanto en estudios con animales de experimentación como en estudios epidemiológicos en la población humana. Aproximadamente, el 20%-30% de los cánceres se producen debido a agentes carcinogénicos presentes en el medioambiente^{16,17}. Estos agentes generan daño en el ADN e inducen mutaciones que, de producirse en genes clave, desencadenan una serie de eventos que llevan al desarrollo de cáncer. Entre ellos se encuentra: a) la radiación, como la radiación UV y el cáncer de piel¹⁸; b) compuestos químicos, como los presentes en el tabaco y el cáncer de pulmón (CP)¹⁹; c) agentes infecciosos como virus responsables de ciertos tipos de cáncer como cáncer de hígado y carcinoma cervical, entre otros²⁰. Por último, los errores en la replicación del ADN tienen un papel de gran importancia. Para mantener las funciones celulares normales, la estabilidad genética se controla estrictamente. Por lo tanto, defectos en la maquinaria que rige la replicación y la estabilidad genética facilitarán la tumorigénesis al impulsar el proceso reiterativo de mutación, selección y expansión clonal que promueve la progresión del cáncer. Se estima que este tipo de defectos suponen la causa del 66% de los cánceres que se originan¹⁷.

1.2. Sellos funcionales del cáncer

Hanahan y Weinberg describieron una serie de sellos (del inglés, hallmarks) que **debían adquirir las células preneoplásicas** durante los múltiples pasos de su desarrollo para acabar siendo tumorigénicas y, en último término, malignas y metastásicas. Esta lista incluía 6 en el año 2000²¹, posteriormente se completó hasta 10 en 2011²² y en la actualidad se encuentra en 14²³. A continuación, se describen brevemente estas características funcionales que diferencian las células cancerosas malignas de las células normales (**Figura 1**).

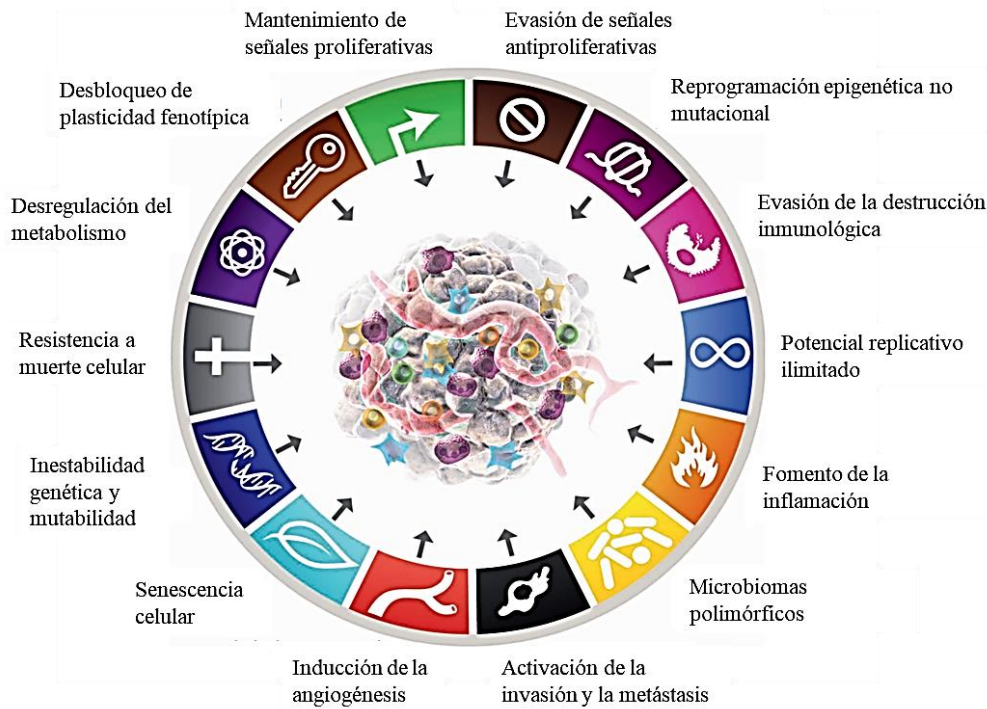


Figura 1. Características funcionales adquiridas por las células tumorales en la mayoría de los cánceres. Adaptado de Hanahan 2022²³.

1. **Evasión de señales antiproliferativas:** las células cancerígenas deben adquirir la capacidad de reprimir aquellos programas que regulan negativamente la proliferación con el objetivo de mantener activas las señales de crecimiento. Estos programas están controlados por los genes supresores de tumores. Con el paso del tiempo, cada vez son más los que se descubren y se validan. Entre ellos, destacan los genes *RB1* y *TP53* por ser los más conocidos y los más frecuentemente mutados en cáncer humano^{24,25}.
2. **Activación de señales de proliferación:** una de las principales características que define a una célula tumoral es su capacidad de mantener activas de forma constitutiva las señales de proliferación, evadiendo así el estricto control en la producción y transducción de señales promotoras del crecimiento al que están sometidas las células normales para garantizar la homeostasis tisular. Para ello, las células tumorales hacen uso de varios mecanismos: secreción de factores de crecimiento de manera autocrina o paracrina para reclutar células del estroma tumoral, aumentar los niveles de receptores para estos factores de crecimiento en la membrana celular o incluso mantener activos de forma constitutiva estos receptores y factores “aguas abajo” asociados a ellos mediante mutaciones. Un claro ejemplo serían las mutaciones en *EGFR* y su implicación en el desarrollo tumoral.
3. **Evasión de la vigilancia inmunológica:** en condiciones normales, tanto las células como los tejidos están en continua vigilancia por parte del sistema inmunológico, encargado de actuar a modo de barrera frente a la aparición de posibles agentes perjudiciales. En el contexto del cáncer, el sistema inmunológico juega un papel muy importante reconociendo y erradicando la formación de células cancerosas y la progresión de tumores en desarrollo. No obstante, las células tumorales han adquirido ciertas capacidades para evitar la detección por parte de los muchos componentes del sistema inmunitario o para limitar el alcance de los mecanismos de destrucción inmunológica.

Esta capacidad recibe el nombre de inmunoevasión y se logra a través de ciertos mecanismos como la secreción de factores inmunosupresores (TGF- β) o el reclutamiento de células inflamatorias con propiedades inmunosupresoras que comprometen la función de los linfocitos T citotóxicos, entre otros.

4. **Potencial replicativo ilimitado:** la gran mayoría de líneas celulares de nuestro organismo solo pueden pasar por un número limitado de ciclos sucesivos de crecimiento y división celular. Esta limitación en la multiplicación celular se atribuye a dos grandes barreras: la entrada en senescencia, un estado viable pero no proliferativo de las células, y una posterior fase de crisis que implica la muerte de prácticamente toda la población celular. Uno de los mecanismos que permite a las células tumorales superar ambas barreras y permitir la replicación infinita (inmortalización) es la activación de la telomerasa (90%), una enzima encargada de recomponer los extremos de los telómeros. Múltiples evidencias en este sentido, asocian la longitud de los extremos de los telómeros con el número de generaciones sucesivas por las que puede pasar una célula²⁶. El mantenimiento de los telómeros constituye, pues, una condición crítica para la entrada en un estado neoplásico al evitar la apoptosis asociada a la senescencia/crisis que caracteriza a las células somáticas normales.
5. **Inflamación:** a partir de los años 2000 se comenzó a estudiar el papel de la inflamación como promotora de la tumorigénesis y la progresión ayudando al inicio de lesiones neoplásicas y no como una consecuencia asociada a la infiltración de células inmunes en el tumor tal y como se pensaba. De esta forma se demostró que la inflamación contribuye a la carcinogénesis al proveer al tumor de moléculas bioactivas en el MAT como: factores de crecimiento que promueven la proliferación, factores que promueven la supervivencia limitando los mecanismos de muerte celular, factores proangiogénicos, moléculas extracelulares que permiten la adquisición de importantes propiedades como la invasión y metástasis y señales inductoras de programas que facilitan la supervivencia como la EMT.
6. **Microbiomas polimórficos:** estudios de asociación en humanos y en modelos experimentales de ratón con cáncer están desvelando a ciertos microorganismos, principalmente pero no exclusivamente bacterias, con capacidad de proteger o, por el contrario, tener efectos perjudiciales sobre el desarrollo del cáncer, su progresión e incluso su respuesta a terapia. Estos microorganismos pueden encontrarse residiendo en el colon, en las mucosas y órganos conectados o en los propios tumores (“tumor microbiome”) donde pueden influir de maneras muy diversas con el resto de las características funcionales que definen el cáncer. De esta forma, constituyen una variable a contemplar potencialmente a la hora de entender cómo se desarrollan los tumores y cómo responden a terapia pues están implicados en la modulación de los fenotipos tumorales.
7. **Activación de la invasión y metástasis:** carcinomas originados a partir de tejido epitelial son capaces de progresar a grados mayores de malignidad mediante cambios en su morfología, así como en sus propiedades de anclaje a otras células y la composición de la matriz extracelular (ECM). El proceso de la invasión y la metástasis, conocido como cascada de invasión-metástasis, constituye una sucesión de cambios biológicos que comienzan con la invasión local seguido de la extravasación de las células tumorales en el torrente sanguíneo y los vasos linfáticos cercanos a través de los que circulan para finalmente establecerse en tejidos distantes para formar pequeños nódulos

(micrometastasis) y proliferar generando tumores macroscópicos. El principal programa que gobierna este proceso es la transición epitelio-mesenquimal (EMT), un proceso morfogénico a través del cual células epiteliales adquieren un fenotipo mesenquimal con capacidades migratorias e invasivas.

8. **Inestabilidad genética y mutabilidad:** la evolución del tumor conlleva un aumento de la tasa de mutaciones debido a la inestabilidad genómica intrínseca de las propias células tumorales. Esta elevada mutabilidad es consecuencia de defectos en uno o varios de los componentes que forman la maquinaria de reparación/mantenimiento genómico, encargada de monitorizar la integridad del genoma y la entrada en senescencia o apoptosis de aquellas células con daños en el ADN. En este sentido, destaca TP53, también conocido como “guardián del genoma”, como principal encargado de la estabilidad y reparación del genoma. De esta forma, la inactivación genética o la represión epigenética de estos componentes, sumado a la mayor sensibilidad a agentes mutagénicos de las células cancerosas, aceleran el proceso de acumulación de mutaciones que favorece la adquisición de las características funcionales del cáncer que comentamos. Además de esto, la pérdida de ADN telomérico en muchos tumores genera inestabilidad cromosómica que se asocia con la amplificación y delección de fragmentos de material genético, y en definitiva con los reordenamientos cromosómicos.
9. **Angiogénesis:** los tumores, al igual que los tejidos normales, necesitan para su normal funcionamiento un aporte continuo de nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de eliminar desechos metabólicos y dióxido de carbono. Este proceso requiere del desarrollo de una vasculaturización asociada y el brote de nuevos vasos a partir de los existentes (angiogénesis). Normalmente, el proceso de angiogénesis se encuentra activo, pero de forma transitoria. Sin embargo, durante la progresión tumoral, la angiogénesis permanece activa de forma permanente y en la neovasculatura asociada al tumor brotan continuamente nuevos vasos sanguíneos que ayudan a mantener y expandir el crecimiento del tumor. Esta progresión hacia un proceso de angiogénesis activo de forma continua viene determinada por la secreción de factores reguladores a las células endoteliales vasculares, como el factor vascular derivado del endotelio (VEGF). Este principal inductor de la angiogénesis es secretado en el microambiente tumoral (MAT) y su expresión está regulada tanto por hipoxia como por señalización por oncogenes, favoreciendo la progresión neoplásica²⁷.
10. **Senescencia tumoral:** la senescencia constituye un programa de protección tisular en el que se detiene la proliferación celular y se impide la progresión a las sucesivas fases del ciclo celular de aquellas células innecesarias que han sufrido daños en el ADN, privación de nutrientes, daños en los orgánulos o desregulaciones en la señalización celular, entre otras. La entrada en senescencia constituye un mecanismo complementario a la muerte celular programada e implica una serie de cambios a nivel morfológico, metabólico y a nivel secretorio (citoquinas, proteasas, etc.). En el contexto del cáncer existe cierta controversia. Por un lado, la senescencia celular ha sido vista mucho tiempo como mecanismo de protección contra la neoplasia gracias a que las células cancerosas son inducidas a entrar en senescencia debido a las aberraciones que sufren y, por tanto, dejan de proliferar. Por otro lado, se ha observado cómo las células cancerosas senescentes pueden estimular de diversas formas el desarrollo tumoral y la progresión maligna, así como promover fenotipos tumorales mediante la secreción de

moléculas de señalización proliferativa, evitando la apoptosis, suprimiendo la respuesta inmunológica y estimulando la invasión y la metástasis, entre otras. Además, las células cancerosas parecen ser capaces de entrar en un estado de senescencia transitoria lo que se asocia con resistencias a fármacos.

11. **Desregulación del metabolismo energético:** el aumento de la proliferación celular asociada al tumor implica una profunda reprogramación metabólica capaz de suplir todas las necesidades energéticas que permitan mantener el crecimiento y la división celular. En este sentido, Otto Warburg describió a principios del siglo XX, una cualidad metabólica de los tumores que no presentaban las células normales y que se acuñó como el “efecto Warburg”²⁸. Las células tumorales, incluso en presencia de oxígeno, aumentan el consumo de glucosa y la metabolizan preferentemente por la vía de la glicólisis, una ruta mucho menos eficiente energéticamente si se compara con la fosforilación oxidativa. Esta adaptación metabólica permite que los intermediarios de la glicólisis puedan entrar en varias rutas biosintéticas, entre ellas las que generan nucleótidos, lípidos y aminoácidos. En consecuencia, se facilita la biosíntesis de las macromoléculas y las estructuras intracelulares necesarias para aumentar la biomasa celular y mantener la proliferación activa. El uso de la glutamina en reacciones anapleróticas también constituye una adaptación metabólica del tumor frente a células normales.
12. **Plasticidad fenotípica:** el proceso normal de diferenciación celular implica en muchos casos que las células progenitoras pierdan la capacidad replicativa para asumir su función en el tejido del que formaran parte. De esta forma, entran en un estado antiproliferativo, constituyendo así una barrera para la proliferación descontrolada necesaria para el inicio de la neoplasia y el desarrollo del tumor. No obstante, las células tumorales son capaces de desbloquear plasticidad fenotípica, de-diferenciarse y escapar del estado de diferenciación terminal, volviendo a convertirse en células progenitoras con capacidad de división. Asimismo, existen mecanismos como la transdiferenciación en los que células que inicialmente habían sido destinadas a una red de diferenciación cambian a otro programa completamente diferente adquiriendo características que no estaban definidas en las células de origen.
13. **Reprogramación epigenética:** Las alteraciones epigenéticas del genoma tumoral constituyen otra característica funcional del cáncer ya que integran estímulos genéticos, ambientales y metabólicos capaces de alterar el equilibrio homeostático de la cromatina y, por consiguiente, provocar patrones de expresión y de diferenciación aberrantes durante la progresión maligna del tumor. Estas alteraciones incluyen cambios en la metilación del ADN, fundamentalmente en las islas CpG, de modo que se tienden a hipometilar genes reguladores del crecimiento y a hipermetilar genes supresores de tumores promoviendo el desarrollo del tumor. También se incluyen modificaciones post-traduccionales como la acetilación y la metilación de las colas de las histonas lo que provoca la activación o represión, según en qué condiciones, de las regiones de cromatina afectadas. Todo ello, además contribuye en mayor o menor medida a la inestabilidad cromosómica favoreciendo fenómenos de translocación génica y deleciones.

14. **Resistencia a la muerte celular programada o apoptosis:** La apoptosis constituye un evento de muerte celular programado en respuesta a una gran variedad estímulos estresantes o daños genéticos asociados al desarrollo. Gracias a este proceso se eliminan aquellas células anormales que ya no son funcionales para garantizar la integridad y la homeostasis del tejido. De esta forma, la apoptosis actúa a modo de barrera natural frente al desarrollo tumoral, continuamente afectado por desequilibrios de señalización, daños en el ADN y falta de nutrientes. Sin embargo, las células tumorales presentan un amplio repertorio de estrategias para evadir o limitar la apoptosis. Uno de los principales mecanismos es la pérdida de función del supresor tumoral *TP53*, un gen clave en el circuito inductor de la apoptosis. Por otro lado, las células tumorales sobreexpresan reguladores antiapoptóticos (como BCL-2) a la vez que suprimen los proapoptóticos (como BAX) permitiéndoles la continua proliferación durante la evolución.

2. Cáncer de pulmón

2.1. Descripción e incidencia global

El CP es una enfermedad compleja y heterogénea resultante de la formación y crecimiento descontrolado de las células malignas que forman el tumor en el tracto respiratorio y en particular en el tejido pulmonar. El CP constituye un problema de salud pública de primera magnitud tanto por su elevada incidencia como por su alta mortalidad. Se trata del tipo de cáncer más frecuente a nivel mundial con un 12.4% de los nuevos casos de cáncer diagnosticados y ocupa el primer puesto en cuanto a índices de mortalidad oncológica a escala global siendo responsable de un 18.7% de las muertes asociadas a cáncer, según la OMS²⁹ (*Figura 2*).

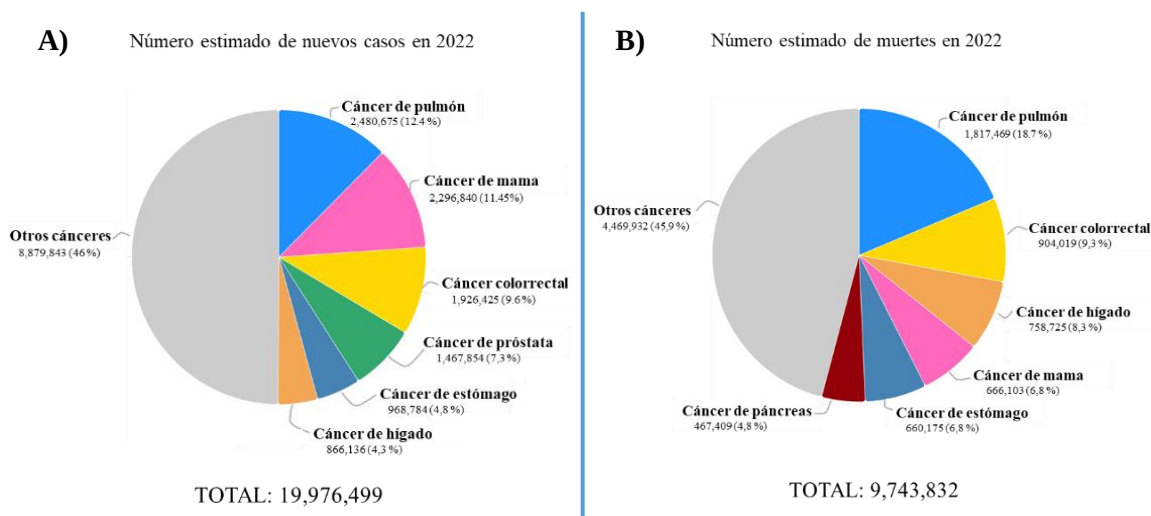


Figura 2. Epidemiología del cáncer de pulmón a nivel global. A) Número estimado de nuevos casos en 2022 para ambos sexos y todas las edades a nivel mundial. B) Número estimado de muertes en 2022 para ambos sexos y todas las edades a nivel mundial. Fuente: GLOBOCAN 2022 <https://gco.iarc.fr/>²⁹.

En España, el CP es el cuarto con mayor incidencia por detrás de otros como el de mama y el colorrectal y responsable de la muerte de más de 20.000 personas al año siendo el tumor más mortal en nuestro país (17.1 % de las muertes asociadas a cáncer). Como ejemplo, en España en el año 2022, se diagnosticaron 30.000 nuevos casos y produjo la muerte de 23.000 personas según datos de la OMS (*Figura 3*).

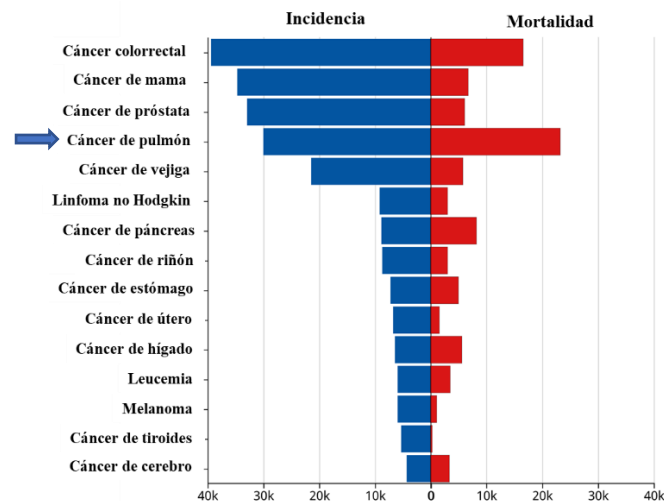


Figura 3. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más frecuentes en España en el año 2022. Fuente: GLOBOCAN 2022 <https://gco.iarc.fr/>²⁹.

La elevada mortalidad de esta enfermedad queda reflejada en los índices de supervivencia. La supervivencia a los 5 años no supera el 15% debido fundamentalmente a que la mayoría de los pacientes son diagnosticados en un estado avanzado de la enfermedad, donde las opciones terapéuticas son limitadas. Esto es consecuencia de la carencia de herramientas de detección temprana, a la mala prognosis y la frecuente aparición de resistencias a las terapias farmacológicas aplicadas en el tratamiento de la enfermedad. A pesar de ser la neoplasia con más casos diagnosticados en el mundo, su distribución geográfica no es uniforme y tiende a ser más común en países desarrollados (Estados Unidos, Europa y China principalmente) que en países subdesarrollados. No obstante, con el paso de los años, es posible observar un aumento en la tasa de incidencia en los países en vías de desarrollo²⁹ (**Figura 4**).

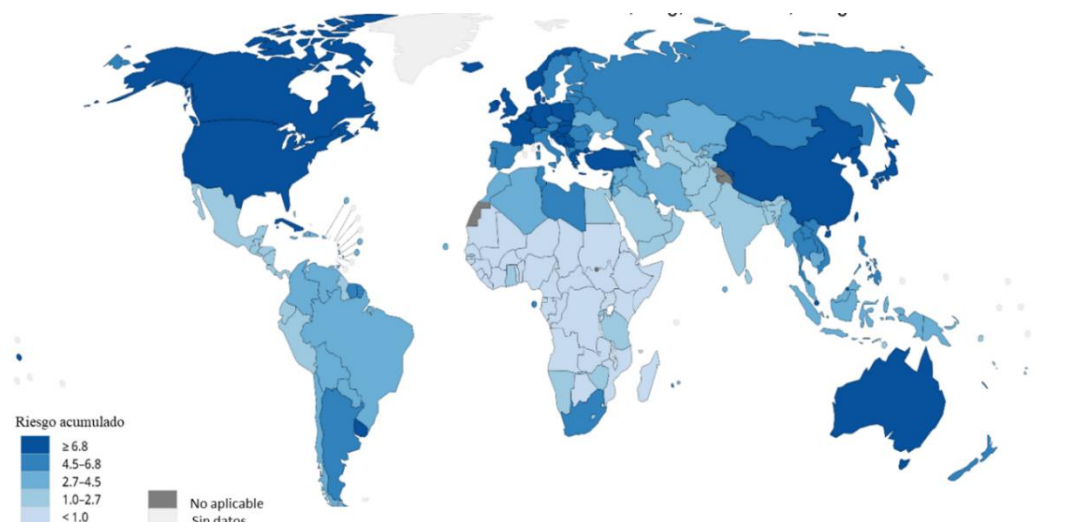


Figura 4. Mapa de incidencia mundial de cáncer pulmonar para ambos sexos. La incidencia se concentra en países desarrollados. Fuente: GLOBOCAN 2022 <https://gco.iarc.fr/>²⁹.

2.2 Clasificación del cáncer de pulmón

El CP es una enfermedad con una gran heterogeneidad con respecto a su histopatología, biología molecular y curso clínico. Tradicionalmente, se ha clasificado en base a criterios histológicos, lo cual ha resultado de gran utilidad clínica puesto que se relaciona con la evolución del tumor y con ciertas características fisiopatológicas que guían la decisión terapéutica. En este sentido, distinguimos dos grandes subtipos histológicos de CP (**Figura 5**):

- a) **Cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico (CPM):** constituye un carcinoma agresivo de rápido crecimiento, muy poco diferenciado y derivado de células neuroendocrinas del epitelio bronquial. El CPM supone aproximadamente el 15-20% de los casos de CP diagnosticados. Se observa con mayor frecuencia en fumadores como una enfermedad ya avanzada que se presenta clínicamente con diseminaciones metastásicas tempranas³⁰. A pesar de que existe una buena respuesta a la terapia inicial, en muchas ocasiones se produce una recaída debido a la adquisición de resistencia a quimioterapia, especialmente a los tratamientos basados en platino³¹. Su rápida proliferación y su pronta extensión aumentan su tasa de mortalidad al 95%³².
- b) **Cáncer de pulmón de células pequeñas o no microcítico (CPNM):** constituye el principal subtipo histológico representando el 80-85% de los casos de CP. El CPNM se puede subdividir a su vez en 3 subtipos diferentes³³:
 - a. Carcinoma de células escamosas o epidermoide (SCC): surge de las células que recubren los bronquios y suele desarrollarse en la parte central de los pulmones. Representa el 30% de los casos de CPNM y el principal causante de la transformación maligna es el tabaco. Estos tumores son más frecuentes en hombres que en mujeres y tienden a crecer lentamente³³.
 - b. Adenocarcinoma (AC): el AC es la forma más prevalente representando aproximadamente el 40% de los casos de CPNM y el 30% de todos los casos de CP³⁴. Estos adenocarcinomas presentan un fenotipo epitelial con una diferenciación glandular y se desarrollan en el pulmón distal, es decir, en los bronquios y alveolos pulmonares. Se trata del subtipo con menor relación con el tabaco y más frecuente en mujeres no fumadoras. Los principales problemas que presenta son la gran heterogeneidad histológica y una tendencia a diseminarse más rápidamente que otros subtipos³⁵.
 - c. Carcinoma de células grandes (LCC): es el subtipo menos frecuente representando entorno al 10-15 % de todos los casos de CPNM. Se trata de tumores que se localizan en la periferia y generalmente se origina en fumadores. Constituyen tumores heterogéneos con células grandes y altos niveles de indiferenciación³⁶.

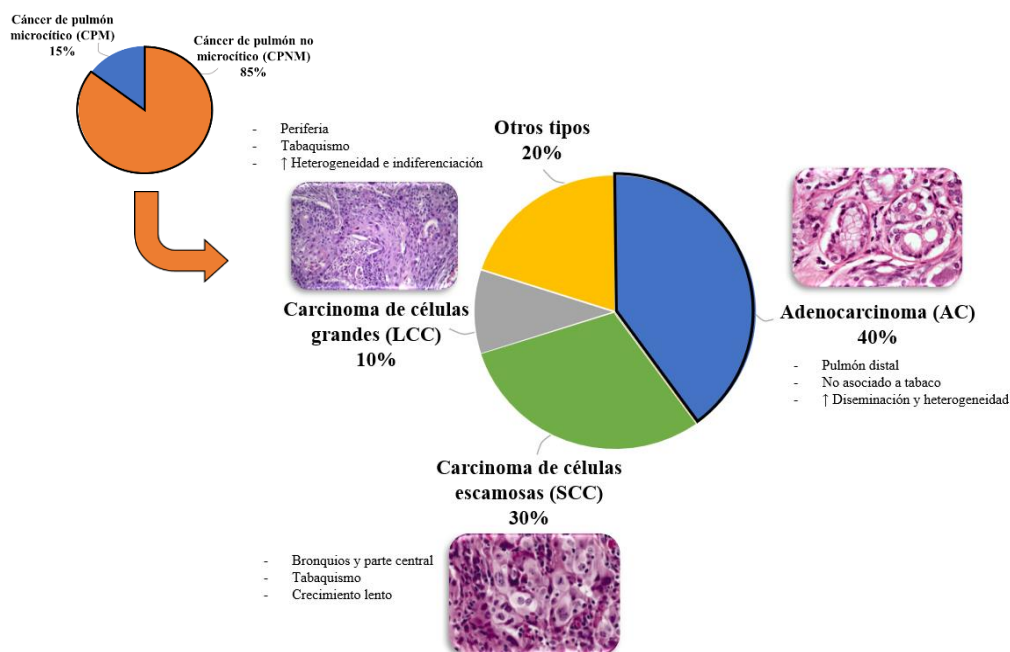


Figura 5. Representación gráfica de los tipos y subtipos de CP según la histología. El CP se divide en dos subtipos histológicos: CPM (15% de los casos) y CPNM (85% de los casos) constituyendo este último el subtipo más frecuente. El CPNM puede, a su vez, dividirse en 3 subtipos: AC (más prevalente) seguido por SCC, LCC y otros subtipos no clasificados.

En ciertos casos, en los que la mera observación de la morfología no permite una distinción clara entre subtipos histológicos, se recurre a marcadores inmunohistoquímicos como las citoqueratinas (KRT5, KRT6, KRT7), la napsina A o el factor de transcripción de tiroides (TTF1), entre otros. Estos marcadores presentan una expresión diferente en cada tipo de cáncer pulmonar facilitando el diagnóstico diferencial de los subtipos³⁷.

2.3 Estadificación clínica del cáncer de pulmón

El diseño de la estrategia terapéutica no depende únicamente de la morfología y la histología. Existe un sistema para clasificar los tumores sólidos en función de su malignidad y que se conoce como el sistema TNM. Este sistema estandarizado de jerarquización, desarrollado por el American Joint Committee on Cancer (AJCC), resulta de gran utilidad clínica a la hora de evaluar el pronóstico de la enfermedad y diseñar un plan terapéutico específico además de facilitar la comunicación entre el personal sanitario. Para ello, la clasificación TNM se basa en tres componentes:

- **Componente T** (tumor): hace referencia al tamaño y la extensión del tumor primario.
- **Componente N** (nodos): representa el grado de afectación de los ganglios linfáticos locales.
- **Componente M** (metástasis): describe la presencia de metástasis distales al tumor primario.

Para la clasificación TNM se ha empleado la octava versión por ser la actualmente disponible a la hora de realizar la tesis³⁸.

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

T-Tumor primario	
Tx	No es posible asegurar la presencia de tumor primario, pero se sospecha su presencia por la existencia de células malignas
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : - Tis (AIS): Adenocarcinoma - Tis (SCIS): Carcinoma de células escamosas
T1	Tumor ≤ 3 cm en su diámetro mayor rodeado por el pulmón o pleura. No hay invasión en bronquio principal
T1mi	Adenocarcinoma mínimamente invasivo
T1a	Tumor ≤ 1 cm en su diámetro mayor
T1b	Tumor > 1 cm, pero ≤ 3 cm en su diámetro mayor
T1c	Tumor > 2 cm, pero ≤ 3 cm en su diámetro mayor
T2	Tumor > 3 cm, pero ≤ 5 cm en su diámetro mayor. El tumor afecta bronquio principal, invade pleura visceral o se asocia con neumonitis obstructiva.
T2a	Tumor > 3 cm, pero ≤ 4 cm en su diámetro mayor. Características de T2.
T2b	Tumor > 4 cm, pero ≤ 5 cm en su diámetro mayor. Características de T2.
T3	Tumor > 5 cm, pero ≤ 7 cm o de cualquier tamaño que invade pleura parietal, pared torácica o nervio frénico. Nódulos en el mismo lóbulo que el primario
T4	Tumor < 7 cm o de cualquier tamaño que invada diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea o esófago. Nódulos en lugar diferente al tumor primario
N-Nodos linfáticos locales	
Nx	Los ganglios linfáticos locales no pueden ser evaluados
N0	Los ganglios linfáticos locales no están afectados
N1	Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales
N2	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos
N3	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales o supraclaviculares
M-Metástasis a distancia	
M0	No existen metástasis a distancia
M1	Existen metástasis a distancia
M1a	Nódulo(s) tumoral(es) separados del tumor primario, tumor con nódulos pleurales o derrame pleural
M1b	Existen metástasis extratorácica en un solo órgano y afectación de ganglio local
M1c	Metástasis extratorácicas múltiples en uno o diferentes órganos.

La información aportada por este sistema de tres factores se utiliza para definir el estadio general del tumor, lo cual es un reflejo de la extensión y gravedad del proceso carcinogénico. De esta forma, se establece el estadio del tumor asignándole un número del 0 al IV:

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

Estadio	Descripción	Clasificación TNM
-	Carcinoma oculto	Tx, N0, M0
0	Carcinoma in situ	Tis, N0, M0
I	Cáncer localizado	T1-T2, N0, M0
IA1		T1a(mi) N0 M0
IA2		T1b N0 M0
IA3		T1c N0 M0
IB		T2a N0 M0
II	Cáncer local avanzado en fase temprana	T2-T4, N0, M0
IIA		T2b N0 M0
IIB		T1(a-c) N1 M0 T2(a-b) N1 M0 T3 N0 M0
III	Cáncer local avanzado en fase tardía	T1-T4, N1-N3, M0
IIIA		T1(a-c) N2 M0 T2(a-b) N2 M0 T3 N1 M0 T4 N0 M0 T4 N1 M0
IIIB		T1(a-c) N3 M0 T2(a-b) N3 M0 T3 N2 M0 T4 N2 M0
IIIC		T3 N3 M0 T4 N3 M0
IV	Cáncer metastásico	T1-T4, N1-N3, M1
IVA		T1-T4, N1-N3 M1a T1-T4, N1-N3 M1b
IVB		T1-T4, N1-N3 M1c

2.4 Etiología del cáncer de pulmón

Pese a que la etiología del CP es multifactorial y cada vez se conoce más acerca de los agentes etiológicos que la causan, el tabaco continúa siendo el principal factor de riesgo para desarrollar CP (80-90% de los casos) desde hace más de 50 años. Según la *American Lung Association*, en el humo del tabaco se pueden encontrar más de 7000 compuestos de los cuales más de 70 han sido designados como carcinógenos como por ejemplo los hidrocarburos policíclicos aromáticos (benzopirenos), nitrosaminas, aldehídos y monóxido de carbono, entre otros^{39,40}. Estos agentes afectan al tejido bronquial al formar aductos de ADN que inducen mutaciones y provocan replicaciones erróneas en las células que lo forman⁴¹. En este sentido, el riesgo de padecer CP depende de la edad y de la intensidad y la duración del hábito tabáquico fundamentalmente. Por ejemplo, una persona de 55 años que ha fumado un paquete al día durante 25 años tiene un 1% de posibilidades de desarrollar CP en 10 años. Una persona de 75 años que fuma dos cajetillas al día durante 50 años tiene un 15% de posibilidades de desarrollar CP en 10 años⁴². El consumo de tabaco además está relacionado con la histología. Existe una mayor correlación entre el consumo de tabaco y la aparición de carcinomas CPM y SCC que en AC, siendo este último subtipo el más frecuente entre no fumadores⁴³.

Más allá del tabaco, el riesgo a padecer CP también aumenta con la exposición a agentes contaminantes presentes en el medio ambiente. Por ejemplo hidrocarburos policíclicos relacionados con el uso de combustibles fósiles (diesel) e industrias⁴⁴; el radón, un gas radioactivo presente en rocas y suelos responsable del 3-14% de muertes por CP⁴⁵; fibras de asbesto presentes en productos comerciales y edificios⁴⁶ y contaminación aérea por presencia de partículas en suspensión $< 10 \mu\text{m}$ ⁴⁷. Diversos estudios incluso consideran la influencia de factores dietéticos (excesos o deficiencias) sobre el desarrollo de CP tales como dietas ricas en colesterol y grasas saturadas así como deficiencias en determinadas vitaminas⁴⁸. Estos estudios no son definitivos y requieren una investigación más profunda. La exposición a radiación ionizante o antecedentes de tratamiento con radioterapia por otros tumores también puede aumentar el riesgo de sufrir cáncer pulmonar⁴⁹. Por último, un pequeño porcentaje se debe a otros factores entre los que se incluyen patologías inflamatorias y benignas de pulmón así como otros factores originados por la interacción genética-ambiente como la historia familiar: existen polimorfismos que predisponen y pueden aumentar el riesgo de desarrollar CP hasta 2.5 veces⁵⁰.

2.5 Diagnóstico y síntomas

El CP se puede presentar de muchas maneras y, a menudo, los síntomas no son específicos sino comunes a otras afecciones torácicas. Además, como se ha comentado, el CP es una patología que tarda en mostrar una sintomatología. Esto generalmente resulta en un diagnóstico tardío cuando la enfermedad ya se encuentra en un estado avanzado y el tratamiento es difícilmente aplicable⁵¹. Una forma sencilla de considerar los síntomas de cualquier cáncer, incluido el CP, es dividirlos en síntomas causados por el cáncer primario, por las metástasis y por las características generalizadas de malignidad⁵².

- Síntomas asociados al tumor primario: el tumor primario que crece en el pulmón suele causar tos y, debido a la obstrucción de las vías respiratorias, puede desencadenar infecciones torácicas. A medida que el tumor crece, puede presionar los nervios y causar dolor torácico local o voz ronca, y si se erosiona en los vasos sanguíneos, el paciente puede comenzar a toser sangre y tener dificultad para respirar⁵².

- Síntomas asociados a la diseminación intratorácica: los tumores torácicos pueden presionar el esófago y causar dificultad para tragar, elevación del hemidiafragma, síndrome de Horner, hinchazón facial y dolor en extremidades superiores y hombro⁵².
- Síntomas asociados a la metástasis: los síntomas de las metástasis dependen de su ubicación. Por ejemplo, las metástasis en los huesos causan dolor óseo, las del cerebro pueden provocar dolores de cabeza y convulsiones epilépticas, las hepáticas causan debilidad, anorexia...

Una vez aparecen los primeros síntomas y se establece el cuadro clínico, el siguiente paso suele ser la localización mediante imagen. Entre las diferentes pruebas de detección por imagen, la radiografía de tórax es la más comúnmente utilizada seguida de la tomografía axial computerizada (TAC). Estas técnicas aportan información sobre la localización, tamaño y número de lesiones⁵³. Otra técnica que permite detectar CP es la resonancia magnética (RM), la cual permite obtener imágenes muy detalladas similares al TAC además de una mejor visualización de determinadas metástasis⁵⁴. Otra de las técnicas comúnmente utilizadas para el diagnóstico es la tomografía de emisión de positrones (PET) en la que se detecta la acumulación del isótopo radioactivo ¹⁸F-FDG (fluorodesoxiglucosa) en tejidos neoplásicos debido a su elevada actividad metabólica. Esta técnica resulta especialmente útil para analizar la extensión de las lesiones así como la afectación de ganglios linfáticos⁵⁵. Actualmente, esta técnica en combinación con TAC (¹⁸F-FDG PET/TAC) es uno de los principales abordajes que se utilizan ya que constituye un método muy eficaz para el diagnóstico, estadificación, evaluación de la respuesta al tratamiento, seguimiento de la recurrencia y reestadificación del CP⁵⁶.

Estas técnicas no son invasivas y son especialmente útiles para determinar la localización y determinar el estadio del tumor; no obstante, la realización de una biopsia que confirme la presencia de células tumorales malignas en las preparaciones es completamente necesaria para el diagnóstico. Estas biopsias incluyen broncoscopias, biopsias quirúrgicas y citologías. La elección de la técnica de extracción de la muestra dependerá de características como el tamaño, la localización y el estadio del tumor⁵⁷. En las citologías, con el objetivo de mejorar la estrategia terapéutica a utilizar, existe la posibilidad de analizar el perfil molecular mediante técnicas de NGS y determinar la presencia de dianas terapéuticas alteradas como ALK, EGFR y MET, entre otros⁵⁸. Esta parte se describirá más adelante en la sección 2.7.2.

2.6 Tratamiento convencional del cáncer de pulmón

El tratamiento del CP ha experimentado un enorme avance en las últimas décadas hacia nuevas opciones terapéuticas. La **cirugía** continúa siendo la opción terapéutica más efectiva para el CPNM con la mayor probabilidad de lograr una cura a largo plazo a pesar de que se considera únicamente en aquellos casos en los que el tumor se detecta en estadios muy tempranos (T1-2, N0) y excepcionalmente en estadios III⁵⁹. Usualmente, se utilizan terapias adyuvantes tras la resección quirúrgica para aumentar las probabilidades de eliminar el tumor. A pesar de ser la opción más efectiva, como ya hemos visto, la mayoría de pacientes son diagnosticados cuando la enfermedad ya está avanzada y se consideran inoperables. En estos casos, los pacientes dependen de terapias no quirúrgicas. El tratamiento convencional en CPNM no operable quirúrgicamente se basa en la **radioterapia** administrada como monoterapia o en combinación con **quimioterapia** para potenciar el efecto terapéutico. Cuando la enfermedad está localmente avanzada se suele administrar radioterapia con quimioterapia de forma secuencial o en combinación; de hecho, la administración de radioterapia y quimioterapia en combinación constituye la terapia estándar para aquellos pacientes en estadios IIIA y IIIB irresecables⁶⁰. Mientras que en aquellos casos donde se produce metástasis y el tumor está muy avanzado, los pacientes reciben una combinación de agentes quimioterápicos como tratamiento en primera línea además de tenerse en cuenta el perfil molecular y la expresión del ligando 1 de muerte programada (PD-L1) para el posible tratamiento con **terapias dirigidas o inmunoterapia**, respectivamente³⁵.

La quimioterapia se basa en el empleo de agentes citotóxicos y citostáticos de forma sistémica para combatir o frenar el crecimiento de las células tumorales. Los principales fármacos utilizados son los siguientes:

- a) Compuestos derivados del platino, como el cisplatino y el carboplatino. Estos compuestos se vienen utilizando desde hace décadas como agentes quimioterápicos. Su efecto reside en la capacidad de entrecruzarse con bases púricas, interfiriendo con los mecanismos de reparación del ADN y producir apoptosis en las células afectadas. La combinación de estos agentes basados en platino en quimioterapia o radioterapia resulta en una notable mejora de los ratios de supervivencia en pacientes con CPNM localmente avanzado y constituyen la base de la gran mayoría de tratamientos quimioterápicos aplicados⁶¹. A pesar de las buenas respuestas, existen mecanismos de resistencia a estos compuestos que conducen a la recurrencia del tumor y a la progresión de la enfermedad. Los mecanismos subyacentes a esta resistencia son multifactoriales y se incluyen alteraciones epigenéticas y en micro-ARNs, supresión del sistema inmunológico o desregulaciones en vías reguladoras del crecimiento, entre otras⁶².
- b) Inhibidores de enzimas del metabolismo del folato como el metotrexato y el pemetrexed. Estos fármacos son capaces de inhibir ciertas enzimas de la ruta como la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la timidilato sintasa (TS) respectivamente, lo que impide la correcta síntesis de folato. En consecuencia, se dificulta la síntesis de purinas y pirimidinas resultando en un arresto en el ciclo celular en fase G1. Estos fármacos se emplean en primera línea de tratamiento en combinación con agentes basados en platino o en segunda línea de tratamiento en pacientes con CPNM avanzado. En el caso de pemetrexed, su uso está especialmente indicado en el tratamiento de tumores no escamosos⁶³.

- c) Inhibidores de la división celular: como la vinorelbina, docetaxel y paclitaxel. Estos agentes bloquean la formación de microtúbulos por unión a la β -tubulina lo que impide su polimerización durante la mitosis. La retención de las células tumorales en la fase G2/M del ciclo celular provoca apoptosis y muerte celular⁶⁴. Usualmente, se usa en monoterapia o en combinación con cisplatino en CPNM en estadios avanzados⁶⁵.
- d) Inhibidores de la síntesis de ADN: como la gemcitabina y capecitabina. Estos compuestos actúan como análogos de pirimidinas de modo que se incorporan al ADN y son capaces de irrumpir con el proceso de replicación al impedir el correcto funcionamiento de las enzimas implicadas en el proceso (p. ej la ADN polimerasa) y, por consiguiente, se produce un freno en la división celular. En combinación con cisplatino como primera línea de tratamiento se mejora la respuesta y los ratios de supervivencia global en CPNM avanzado⁶⁶.
- e) Inhibidores de la angiogénesis: como bevacizumab. El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra VEGF, que mejora las tasas de respuesta en casos de CPNM no escamosos al limitar la formación de la vasculatura asociada al tumor y reduciendo el aporte de nutrientes y oxígeno que recibe. Este tipo de terapia tiene una buena respuesta en combinación con cisplatino⁶⁷.

Por otro lado, cabe destacar el abordaje terapéutico más revolucionario de las últimas décadas en la lucha contra el cáncer: **la inmunoterapia**. Este tratamiento se basa en el uso de moduladores del sistema inmune para estimular la respuesta frente a un tumor. Las células tumorales son capaces de incorporar mecanismos de evasión sobre determinados puntos de control que inhiben el sistema inmune, afectando especialmente a la actividad de los linfocitos T, encargados de la detección y destrucción de las células tumorales. De esta forma, los tumores pueden regular aspectos del sistema inmune como la duración y la intensidad de la respuesta inmune⁶⁸. Los dos ejes de regulación negativa de linfocitos T más destacados son, en primer lugar, PD-1 y su ligando sobreexpresado en tumores PD-L1 y, en segundo lugar, el receptor CTLA-4. Durante la última década, se han desarrollado anticuerpos monoclonales con capacidad de reactivar los linfocitos T inhabilitados al bloquear la acción inhibitoria de las células tumorales sobre estos ejes de modulación inmunológica. Anticuerpos como pembrolizumab y nivolumab tienen como diana la proteína PD-1 en linfocitos T, mientras que otros como durvamulab y atezolizumab van dirigidos contra el ligando PD-L1. Por otro lado, ipilimumab va dirigido contra el receptor CTLA-4 de linfocitos T⁶⁹. Todos ellos están aprobados para su uso en segunda línea de tratamiento en casos de CPNM cuando hay una recaída de la enfermedad después de las primeras líneas de tratamiento con quimioterapia, en casos en los que no se pueden aplicar las opciones ya comentadas de tratamiento o como terapia de consolidación para evitar la progresión tumoral. Asimismo, pembrolizumab también ha sido aprobado para el tratamiento en primera línea en pacientes con CPNM metastásico cuyos tumores tienen una alta expresión de PD-L1⁷⁰. En la actualidad, la inmunoterapia está arrojando resultados muy prometedores en cuanto a respuesta, periodos libres de enfermedad y tiempos de supervivencia global. Pero tan solo un 20% de los pacientes responden a la inhibición de la señalización del eje PD-1/PD-L1. Además, gran parte de los respondedores tienen recesiones muy potentes debido a que los tumores desarrollan resistencias a este tipo de terapia^{71,72}.

2.7 Genética del CPNM

Los tumores a menudo poseen clones citogenéticamente diferentes que surgen de la célula transformada inicial a través de alteraciones genéticas secundarias o terciarias. Esta heterogeneidad contribuye a las diferencias en el comportamiento clínico y las respuestas al tratamiento de tumores del mismo tipo de diagnóstico. Aparte del clon y subclones iniciales, los tumores también pueden contener células cancerosas progenitoras, todas las cuales constituyen un espectro de células con diferentes alteraciones genéticas y estados de diferenciación. Estas poblaciones pueden diferir en la sensibilidad a la quimioterapia, la radioterapia y otros tratamientos, lo que dificulta el manejo clínico⁷³. Por estas razones, comprender los pasos iniciales en el desarrollo del cáncer tienen una importancia clínica considerable y son una prioridad en el desarrollo de un tratamiento racional del cáncer.

2.7.1 Oncogenes frecuentemente mutados en CPNM

En este sentido, los grandes avances en las tecnologías de secuenciación de ADN y el desarrollo de herramientas genómicas de los últimos años han permitido desarrollar y establecer con una resolución sin precedentes las bases de la genómica del cáncer⁷⁴. Hasta no hace mucho, la caracterización del tumor no aportaba información acerca de la oncogénesis y la biología subyacente a la enfermedad, dificultando el descubrimiento de factores relevantes a nivel pronóstico y predictivo. Tumores con idéntica patología pueden tener diferentes orígenes y responder de forma diferente al tratamiento⁷⁵. A día de hoy, la identificación de la biología subyacente al CP ha sido y es crucial para lograr nuevas estrategias personalizadas de diagnóstico, predicción, pronóstico y terapia. Además, la determinación de las características moleculares del CP tiene el potencial de incrementar las probabilidades de detección temprana utilizando múltiples abordajes⁷⁶. De este modo, los recientes avances de la última década en la determinación del perfil molecular del CP y, concretamente en CPNM, han determinado la presencia de una alta tasa mutacional y han descrito una serie de alteraciones moleculares recurrentes en múltiples oncogenes y/o genes supresores. Las alteraciones en los oncogenes **EGFR** y **KRAS** son las que se observan con mayor frecuencia en CPNM. Otros oncogenes “impulsores” implicados en la tumorigénesis del CPNM incluyen: *ALK*, *ROS1*, *HER2*, *BRAF*, *PTEN*, *MET*, *RET*, *AKT1*, *MEK1*, *NRAS* y *PIK3CA*, entre otros^{74,77–79} (**Figura 6**). Por otro lado, según datos del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA), mutaciones en el gen supresor tumoral **TP53** se han identificado en hasta en un 46% de los casos de CPNM, constituyendo así el gen más comúnmente mutado⁷⁴. No obstante, a pesar de los elevados porcentajes de incidencia, no se suele analizar con test genéticos puesto que actualmente no hay terapias contra este gen. Las alteraciones dentro de estos genes incluyen mutaciones puntuales, amplificaciones, reordenamientos cromosómicos o sobreexpresión de proteínas⁷⁷. Estos genes codifican proteínas que intervienen en el control del ciclo celular, señalización, metabolismo, regulación epigenética y diferenciación, entre otros. Mutaciones conductoras en estos genes provocan una activación constitutiva de estas proteínas que inducen y sostienen la tumorigénesis⁷⁹.

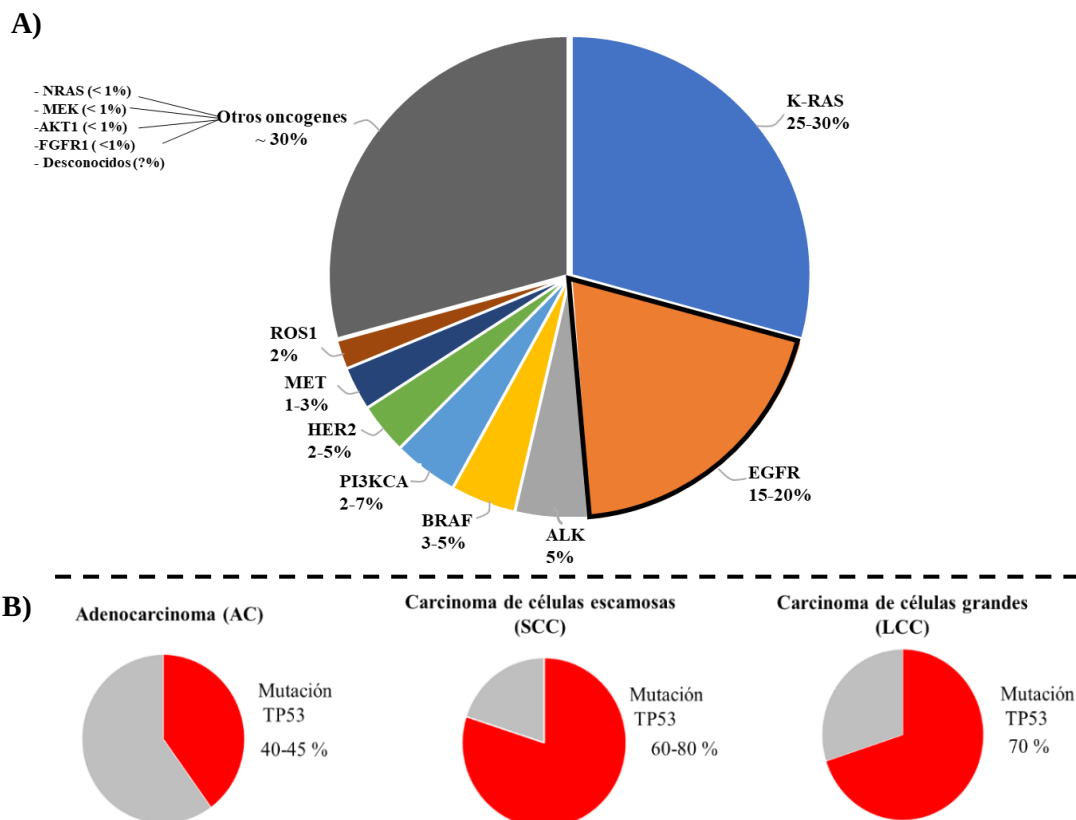


Figura 6. A) Oncogenes frecuentemente mutados en CPNM. B) Tasa mutacional de TP53 en los diferentes subtipos de CPNM (AC, SCC y LCC). EGFR y KRAS constituyen los principales genes mutados en CPNM. Además, se ha identificado una alta carga mutacional en TP53 en los 3 subtipos histológicos de CPNM.

La descripción a nivel molecular ofrece una mejor caracterización de la enfermedad además de ofrecer una visión interior de los mecanismos subyacentes al desarrollo de CPNM, posibilitando el desarrollo de terapias más efectivas. Las células tumorales presentan cierta dependencia por la vía o proteína oncogénica activada para mantener sus propiedades malignas, a pesar de la probable acumulación de múltiples mutaciones de ganancia y pérdida de función que contribuyen a la malignidad. Esto se conoce como **adicción oncogénica**: las células tumorales se vuelven “adictas” a la señalización mediada por el oncogén y en ausencia del estímulo estas células acaban muriendo⁸⁰. Por ello, el descubrimiento de estas alteraciones presenta un enorme potencial terapéutico y constituye el paradigma para el diseño de las terapias dirigidas contra dianas moleculares específicas, base conceptual de la nueva medicina personalizada o de precisión⁸¹. En el campo de la medicina personalizada, la caracterización fenotípica-molecular del tumor dirige la decisión terapéutica. De esta forma, los estudios basados en terapias dirigidas están guiados por biomarcadores, son más centrados, y sólo trata a aquellos pacientes que tienen la anormalidad molecular la cual es la diana del fármaco.

2.7.2 Terapias dirigidas en CPNM

Las terapias dirigidas son la parte de la medicina de precisión que se encarga de diseñar fármacos específicos contra aquellas proteínas resultantes de alteraciones genéticas específicas que dirigen el crecimiento tumoral. En los últimos años, se han desarrollado fármacos contra ciertas de estas proteínas mutadas (**Figura 7**) y en la actualidad, es el tratamiento de elección en primera línea para estadios avanzados y metastásicos en pacientes con mutaciones dirigidas contra las que existen inhibidores⁸². Dado su interés terapéutico, al constituir dianas directas de las nuevas terapias dirigidas contra dianas moleculares, nos centraremos en el estudio pormenorizado de los oncogenes y nos centraremos en *EGFR* por su importancia en este trabajo de tesis doctoral.

a) KRAS

Forma parte de la familia de proteínas de membrana RAS junto a H-Ras y N-Ras. Esta proteína con actividad GTPasa se encarga de regular el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis mediante su interacción con múltiples efectores, fundamentalmente componentes de la cascada de señalización de las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK), transductores y activadores de la transcripción (STAT) y la vía fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)⁸³. Las mutaciones en el gen *KRAS* se encuentran con frecuencia en diferentes tipos de cáncer como el de pulmón, colon y páncreas. De hecho, es considerado el oncogén más frecuentemente mutado en los cánceres humanos⁸⁴. En el caso del CPNM, las mutaciones en *KRAS* pueden observarse en un 20-30% de los casos aproximadamente (en mayor medida en los ACs) y dichas mutaciones se suelen producir en el 97% de los casos en los codones 12, 13 y 61 que corresponden al dominio de unión GTP/GDP de la proteína. De esta forma, las mutaciones evitan la hidrólisis del GTP, permitiendo que Ras se acumule en su estado activado y se promuevan las rutas de señalización RAF/MEK/ERK y AKT/PI3K/mTOR. La mutación más frecuente (hasta el 40% de los casos de mutación en *KRAS* y representando un 13% en ACs) es el cambio G12C que se asocia con exposición a tabaco, seguida por la mutación G12V (20%) y G12D (12%)^{83,85}. Pese a los grandes esfuerzos, hasta hace muy poco no existían comercializados fármacos específicos contra la forma mutada de *KRAS*, existían moléculas en investigación en ensayos clínicos en fase II y III. Recientemente, **sotorasib** y **adagrasib** se han comercializado como inhibidores directos dirigidos a la mutación G12C de *KRAS*. La unión de estos fármacos de forma irreversible a un residuo de cisteína produce un bloqueo de *KRAS* en su estado inactivo por lo que se detiene la señalización oncogénica y se detiene el crecimiento celular⁸⁵. No obstante, a pesar de las buenas respuestas y la mejora de los ratios de supervivencia en fases clínicas⁸⁶, la gran mayoría de pacientes no responde al tratamiento debido a resistencias intrínsecas y adquiridas a estos inhibidores⁸⁷.

b) ALK

ALK, también conocido como CD246, es una proteína de membrana con actividad tirosina-quinasa que pertenece a la superfamilia de receptores de insulina. Al unirse a sus ligandos, los factores de crecimiento pleiotrofina y midiquina, se activa el receptor y en consecuencia se activan las vías MAPK/ERK además de otras como la vía PI3K/AKT. La activación de estas vías estimula la proliferación celular, la supervivencia y la migración^{88,89}. Mutaciones activadoras y traslocaciones de *ALK* se han observado en numerosos tipos de cáncer entre los que se incluyen neuroblastomas, linfomas y CPNM⁹⁰. En algunos casos, se genera una proteína de fusión entre

los genes *EML4* y el gen *AXL* que permanece como una oncoproteína quimérica con actividad quinasa en el citoplasma. Esta fusión se observó en un 3-7% de los casos de CPNM^{91,92}. Los tumores con estos reordenamientos de *ALK* responden muy bien a inhibidores tirosina-quinasa específicos contra *ALK* como **crizotinib**, **ceritinib** y **alectinib** los cuales han demostrado su eficacia en el tratamiento de pacientes con CPNM *ALK*-mutante⁹³. De hecho, crizotinib ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento en primera línea en este tipo de pacientes⁹⁴.

c) **ROS1**

ROS1 es un receptor tirosina-quinasa perteneciente a la familia de receptores de la insulina, muy relacionado con las RTKs *ALK* y *LTK*. Se conoce con el nombre de “receptor huérfano” puesto que no se conoce la identidad de los ligandos que lo activan, dificultando la comprensión de su función específica. No obstante, debido a su estructura se piensa que está involucrado en la adhesión y las uniones celulares⁹⁵. Se han identificado translocaciones y reordenamientos de *ROS1* en el 0,9%-2,6% de los casos de CPNM (principalmente ACs) que dan lugar a proteínas de fusión que mantienen activa de forma constitutiva la actividad tirosina-quinasa del receptor, tales como *SLC34A2-ROS1* y *CD74-ROS1*. En consecuencia, aumenta la actividad de determinadas rutas de señalización como *PI3K/AKT/mTOR*, *JAK/STAT* y *MAPK/ERK*⁹⁶. En este sentido, se ha comprobado que los inhibidores de *ALK* son también efectivos contra las formas mutantes de *ROS1* tal y como demuestran las buenas respuestas clínicas en tumores que albergan fusiones de *ROS1*. Es por ello que **crizotinib** también ha sido aprobado y está indicado su uso para el tratamiento en este grupo de pacientes con CPNM dirigidos por fusiones de *ROS1*⁹⁷.

d) **BRAF**

El oncogén *BRAF* codifica para una serina/treonina quinasa implicada en la regulación de la supervivencia y proliferación celular mediante la activación de *MEK* y, por consiguiente, la vía de las *MAPK*. Se han identificado mutaciones en *BRAF* en varios tipos de cáncer incluyendo carcinomas colorrectales (~10 %), leucemias “hairy cell” (100%), melanomas (~40%) y carcinomas de pulmón (3%)⁹⁸. Las mutaciones de *BRAF* se han encontrado en el 3-5% de los CPNM, la mayoría ACs, y se producen en el dominio tirosina-quinasa provocando un aumento de la actividad quinasa, resultando en una enfermedad más agresiva y un peor pronóstico⁹⁹. La mutación que se suele encontrar con mayor frecuencia es la *V600E* (50%) aunque se han descrito otras como la *G469A*, la *D594G* y la *L597Q*¹⁰⁰. La mutación *BRAF-V600E* confiere sensibilidad a los inhibidores específicos de *BRAF* como el **vemurafenib** o **dabrafenib**, los cuales han demostrado una elevada actividad antitumoral mejorando los ratios de supervivencia libre de progresión en pacientes con CPNM albergando dicha mutación⁹⁸.

e) **PI3KCA**

La familia *PI3K* presenta una función clave en múltiples procesos relevantes para el desarrollo tumoral como el crecimiento celular y la supervivencia mediante la activación de la vía de señalización de *AKT*. *PI3K* consta de una subunidad reguladora (p85) y una subunidad catalítica (p110); esta última está codificada por 3 genes, incluidos *PIK3CA*, *PIK3CB* y *PIK3CD*. Se han observado mutaciones en *PI3KCA* en múltiples tipos de cáncer lo que resulta en un aumento de la actividad tirosina-quinasa y, por consiguiente, la activación constitutiva de la vía de señalización de *PI3K-AKT-mTOR*. En el caso del CPNM, las mutaciones en *PI3KCA* se han reportado en un 2-7% de los casos y pueden coexistir con otras mutaciones oncogénicas que

afectan a *EGFR*, *KRAS* y *ALK*^{101,102}. Las mutaciones en *PI3KCA* se encuentran con mayor frecuencia en carcinomas escamosos que en adenocarcinomas y la mutación E545K es la que se observa con mayor frecuencia¹⁰³. Actualmente, varios inhibidores específicos de PI3K, AKT y mTOR se encuentran en desarrollo y en diversas etapas de investigación preclínica para su uso en CPNM¹⁰⁴.

f) MET

El oncogén *MET* codifica para el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR), principalmente expresado en la superficie de células epiteliales. La unión a su ligando, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), resulta en la activación del dominio tirosina-quinasa y la autofosforilación del propio receptor. Esto provoca la activación de vías como Ras/ERK, PI3K/AKT y PLC-γ/PKC implicadas en crecimiento, motilidad, invasión celular y supervivencia, entre otras. Amplificaciones del gen *MET* se han reportado en un 1-3% de los casos de CPNM y también ciertas mutaciones aunque en menor medida¹⁰⁵. Estas aberraciones del gen *MET* pueden ocurrir *de novo* como un evento temprano en la tumorigénesis o como un mecanismo de resistencia adquirido debido al uso de inhibidores de tirosina quinasa de EGFR como reflejan numerosos estudios¹⁰⁶. Se han desarrollado inhibidores tirosina-quinasa dirigidos contra MET, como **capmatinib**, el cual ha demostrado una elevada actividad antitumoral frente a tumores con mutaciones en el exón 14 de *MET* de pacientes con CPNM sin tratamiento previo. Además, resulta especialmente eficaz contra tumores con un número de amplificaciones de *MET* elevado (> 10)¹⁰⁷.

g) HER2

HER2 es un receptor tirosina quinasa perteneciente a la familia de receptores de EGFR junto al propio EGFR (ErbB1), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4). Se ha encontrado que *HER2* está sobreexpresado en pacientes con CPNM (2-30%) y amplificaciones de este gen se han reportado en un 2-5% de los casos, asociándose con un mal pronóstico¹⁰⁸. Además de las amplificaciones, se han identificado varias mutaciones dentro de *HER2* en pacientes con CPNM (1-4%). La mayoría de estas mutaciones se encuentran dentro del dominio tirosina-quinasa¹⁰⁹. La mutación identificada con mayor frecuencia es G776 (YVMA), una inserción en marco en el exón 20. Esta mutación da como resultado un aumento en la actividad quinasa de HER2, iniciando una señalización aguas abajo que conduce a una mayor supervivencia celular, invasividad y tumorigenicidad debido a la activación de la señalización de diferentes vías como la vía de las MAPK, PI3K-AKT, PKC o STAT, entre otras¹¹⁰. Se han desarrollado y comercializado inhibidores frente a HER2 como **lapatinib**, **neratinib** y **pyrotinib**. Recientemente, se han desarrollado nuevos ITQs pan-HER2 selectivos y estructuralmente más avanzados con el objetivo de mejorar los resultados en el CPNM con mutaciones de *HER2*, como es el caso de poztotinib, actualmente en evaluación en ensayos clínicos¹¹¹.

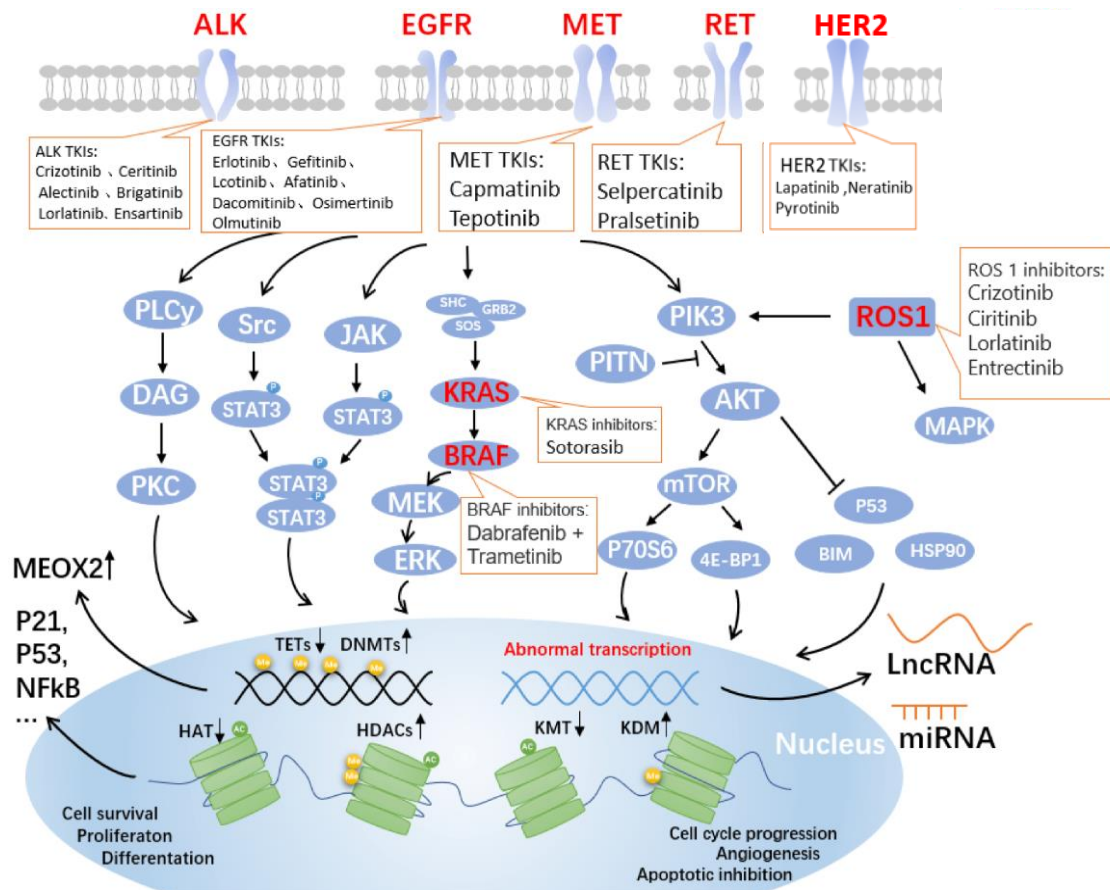


Figura 7. Principales fármacos dirigidos contra proteínas oncogénicas frecuentemente alteradas en CPNM. Adaptado de Wu y Lin 2022 ¹¹².

2.7.3 EGFR: receptor para el factor de crecimiento epitelial en CPNM

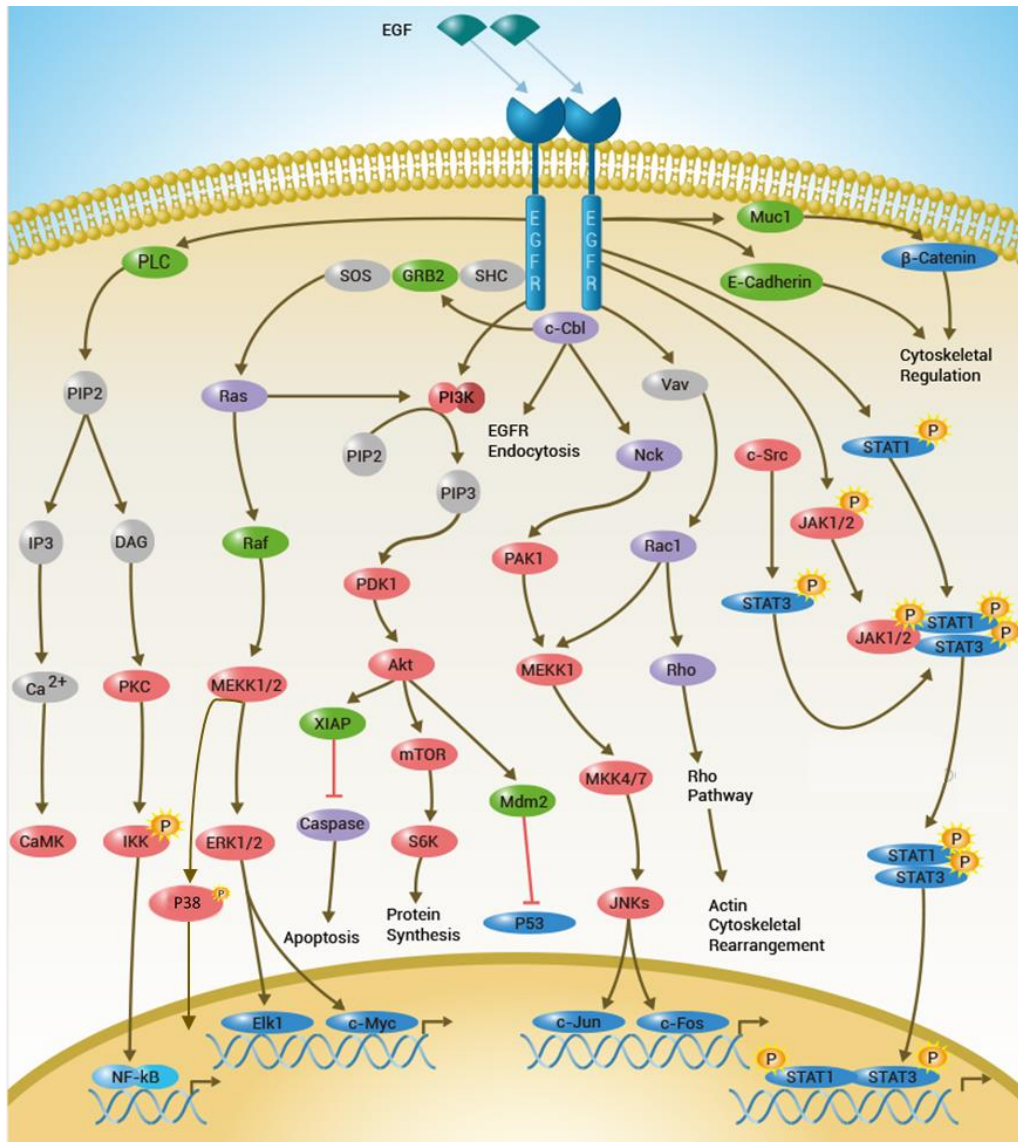
2.7.3.1 Descripción del receptor

Dado que EGFR es tan importante para el trabajo de esta tesis, presentaremos información básica sobre este receptor antes de describir su papel en el CP. Se trata de un **receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa** que forma parte de los miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico. Está formado por 4 dominios extracelulares donde se produce la unión con el ligando llamados L1, CR1, L2, CR2 (dominios I-IV respectivamente) y tres dominios intracelulares separados por una sola secuencia transmembrana¹¹³. Los dominios L1 y L2 son predominantemente dominios que facilitan la unión del ligando. Por otro lado, los dominios CR1 y CR2 son necesarios para la dimerización del receptor y parecen estar involucrados en la localización y la orientación de EGFR en la membrana previamente a su unión con el ligando^{113,114}. El dominio intracelular está constituido por 3 subdominios: un pequeño dominio juxtamembrana involucrado en la estabilización del receptor, el dominio tirosina-quinasa y el dominio de regulación C-terminal. En cuanto a los ligandos capaces de unirse a este receptor, se han descrito varios entre los que se incluyen EGF, TGF- β , epiregulina, anfiregulina o heparina, entre otros¹¹⁵. La unión del ligando a EGFR a través de su dominio extracelular promueve un aumento en la dimerización del receptor con receptores de su mismo tipo (homodímeros) o con otros miembros de la familia de receptores HER2, HER3 y HER4 (heterodímeros). Esta dimerización viene acompañada de una activación del dominio tirosina-quinasa intracelular¹¹⁶. Entonces, EGFR cataliza la transferencia del grupo γ -fosfato desde el ATP a los residuos de tirosina presentes en el dominio C-terminal (sitios de fosforilación) de EGFR, así como a residuos de tirosina en proteínas señalizadoras exógenas¹¹⁷. Después de la autofosforilación, las moléculas adaptadoras/señalizadoras identifican los residuos de tirosina fosforilados dentro del extremo C-terminal de EGFR, lo que da como resultado la activación de una serie de vías de señalización de diferentes tipos^{113,118}. Las interacciones de la proteína EGFR han sido el foco de muchos estudios y, hasta el momento, se han identificado más de 100 proteínas diferentes que interactúan con el receptor¹¹⁹. Estas proteínas pueden ser proteínas adaptadoras que pueden reclutar a otras proteínas transductoras, o bien directamente enzimas o factores efectores que tras unirse al receptor son fosforilados por éste, pasando de un estado inactivo a otro activo¹²⁰. De esta forma, mediante estos reclutamientos y/o fosforilaciones se producen cambios conformacionales y/o cambios en la localización intracelular de estas proteínas señalizadoras, siendo así capaces de transmitir sus mensajes a otros componentes de las diversas rutas intracelulares de transducción de señales¹²¹. Con todo ello, EGFR es capaz de transmitir una gran variedad de señales que pueden generar respuestas celulares de diferentes tipos como la proliferación celular, la angiogénesis, apoptosis, supervivencia, diferenciación e invasión celular entre otros. Esta variedad de respuestas ante un mismo estímulo dependerá de las diversas condiciones fisiológicas a las cuales estén sometidas las células¹²².

Dentro del amplio grupo de proteínas relacionadas con EGFR, existen proteínas adaptadoras/transductoras con el dominio de homología 2 de Src (SH2) que interactúan directamente con el receptor como PLC- γ , PI3K, Grb2 y Src. El papel del dominio SH2 es de vital importancia para la transducción de la señal de EGFR a través de su capacidad para unirse directamente y específicamente al residuo de tirosina fosforilado¹²³. De hecho, el dominio SH2 representa una de las clases más grandes de dominios de reconocimiento de tirosinas

fosforiladas. A través de este reconocimiento desempeñan un papel fundamental en la transducción y control de señales e interacciones intra e intermoleculares proteína-proteína¹²⁴.

En la **Figura 8** se muestra una descripción general de las vías de señalización de EGFR.



quinasas duales MEK1/2 y éstas finalmente fosforilan a la serina/treonina quinasas ERK1/2 (por extracelular-regulated kinases 1 y 2, también denominadas MAPKs). Una vez que las ERK1/2 son activadas, éstas pueden fosforilar a diferentes proteínas dianas localizadas en la membrana plasmática y en el citoplasma, dando lugar a la activación de otras vías de señalización¹²⁷ o trasladarse al núcleo y fosforilar diversos factores de transcripción diana como son, entre otros, c-MYC, c-JUN, c-FOS y ELK-1 involucrados en la proliferación celular¹²⁸. La activación de la vía Ras/MAPK parece ser imprescindible para la proliferación celular mediada por EGF.

- **PI3K/Akt/mTOR**

La activación de la vía PI3K/AKT/mTOR facilita el crecimiento celular, la supervivencia, la resistencia a la apoptosis, la regulación del metabolismo, la angiogénesis y la reorganización del citoesqueleto¹²⁹. Una vez que la subunidad p85 de la enzima interacciona con el EGFR, su subunidad catalítica p110 es activada y así es capaz de catalizar la fosforilación de la posición 3'-OH del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), dando como producto de esta reacción fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3). PIP3 es un potente efector que se une a proteínas que contienen dominios PH como es el caso de la serina/treonina quinasa PKB/AKT¹³⁰.

El complejo PKB/AKT activo es capaz de fosforilar multitud de proteínas sustrato generando un amplio abanico de respuestas funcionales en la célula. Este complejo es responsable de activar a mTOR, el regulador central del crecimiento celular el cual controla la traducción de proteínas por interacción con componentes de la maquinaria de síntesis regulando de forma positiva el crecimiento y la progresión en el ciclo celular¹³⁰.

- **PLC-gamma**

La interacción de EGFR con la fosfolipasa PLC-γ a través de los dominios SH2 produce la fosforilación del enzima y, en consecuencia, su activación. Una vez activada, la enzima cataliza la hidrólisis del PIP2 generando inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) y 1,2-diacilglicerol (DG) como productos de reacción. Tanto el IP3 como el DG son potentes segundos mensajeros que están implicados en la activación de ciertas isoformas de la proteína quinasa C (PKC), bien directamente como lo hace el DG, o bien aumentando transitoriamente la concentración de Ca²⁺ citosólico como lo hace el IP3, ya que éste es un efector de canales de calcio localizados en la membrana del retículo endoplasmático¹³¹. La activación de PKC tienen un papel fundamental en la modulación de la dinámica del citoesqueleto. De hecho, se ha demostrado que regula positivamente la migración e invasión *in vitro* e *in vivo*, incluida la regulación positiva de la metástasis en el cáncer¹³².

- **STAT**

EGFR puede interactuar con las proteínas STAT de forma directa a través del dominio SH2 o indirectamente a través de su interacción con Src o las proteínas JAK1/2¹³³. Una vez activadas, las proteínas STAT dimerizan y se translocan al núcleo activando la transcripción de genes diana entre los que se incluyen genes de apoptosis como *BCL2*, genes del ciclo celular como ciclinas D1 y D2, genes angiogénicos como *VEGFA* y genes relacionados con migración como MMPs. De esta forma, la familia de proteínas STAT regulan la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celular¹³³.

2.7.3.2 Mutaciones y terapias dirigidas frente a EGFR en CPNM

Las mutaciones del gen **EGFR** han sido muy estudiadas en los últimos años ya que se encuentra **frecuentemente mutado y activado en el CPNM**. De hecho, la frecuencia de mutaciones en *EGFR* de la población asiática con CPNM oscila entre el 40 y 60%, mientras que en la raza caucásica se sitúa entre el 10 y el 20%¹³⁴.

En este sentido, las cuatro mutaciones que se encuentran con mayor frecuencia en *EGFR* incluyen:

- Exón 18: Mutaciones E709 y G719(X).
- Exón 19: deleciones en los codones 746-753.
- Exón 20: inserciones en los codones 763-774; mutaciones puntuales (T790M).
- Exón 21: mutaciones puntuales como L858R, L861Q.

Las mutaciones del exón 19 representan el 45% de las mutaciones, las mutaciones del exón 21 representan el 40–45% de las mutaciones y el 10% restante de las mutaciones involucran el exón 18 y 20¹³⁵. La mayoría de mutaciones capaces de desarrollar un proceso carcinogénico recaen fundamentalmente en la **región catalítica del dominio tirosina-quinasa** del receptor, induciendo la dimerización y su activación incluso en ausencia de ligando¹³⁶. De este modo, pacientes con CPNM dirigidos por mutaciones en *EGFR* presentan una activación constitutiva e independiente de ligando del dominio tirosina-quinasa del receptor. Esta mutación sustenta el crecimiento de las células cancerosas y promueve fenómenos de tumorigénesis y carcinogénesis debido a la hiperactivación de rutas de señalización implicadas con la supervivencia^{135,136}. Además de mutaciones, se ha observado la sobreexpresión de *EGFR* en un alto porcentaje de los casos de CPNM y su expresión se relaciona con aumento de la proliferación tumoral, mala diferenciación, mayor incidencia de metástasis a ganglios linfáticos y peor pronóstico^{137,138}. Asimismo, análisis genómicos han documentado polisomías y la amplificación de *EGFR* en algunos casos de CPNM lo que se asocia con la sobreexpresión de la proteína EGFR¹³⁶.

a) Inhibidores dirigidos a EGFR

Tras el descubrimiento de estas mutaciones activadoras de *EGFR* y su implicación en el desarrollo tumoral, se desarrollaron inhibidores específicos contra este receptor. Estos compuestos son capaces de inhibir la actividad catalítica de forma reversible o irreversible, según el tipo de inhibidor, ocupando el sitio de unión del ATP en el receptor. Estos agentes terapéuticos reciben el nombre de **inhibidores tirosina-quinasa (ITQs) de EGFR** y han sido aprobados por la FDA y la EMA como **tratamiento de elección en primera línea** para pacientes con CPNM que presentan mutaciones en *EGFR*¹³⁵.

En la actualidad, las mutaciones en el gen *EGFR* representan un factor pronóstico favorable en cuanto a supervivencia y es factor predictivo de respuesta a estos ITQs. No obstante, no todas las mutaciones en *EGFR* confieren el mismo grado de sensibilidad a estos inhibidores. Se ha demostrado que el tipo de mutación está directamente asociada a la respuesta a ITQs. En líneas generales, las microdeleciones del exón 19 y la mutación puntual L858R en el exón 21 se asocian con sensibilidad a los fármacos. Por otro lado, las mutaciones del exón 20 se asocian con resistencia a ITQs de primera generación. Además, las diferentes respuestas observadas en pacientes *EGFR*-mutantes que reciben estos fármacos depende y se relacionan con otras alteraciones genéticas presentes¹³⁹.

Estos ITQs pueden ser de varios tipos:

➤ **1ª Generación**

Compuestos que se unen de forma reversible al dominio de unión de ATP del receptor compitiendo por el mismo. Lo más utilizados son **gefitinib** y **erlotinib**, ambos aprobados por la FDA como tratamiento en primera línea para el CPNM-EGFR mutado en estado avanzado, puesto que han demostrado mejores resultados que la quimioterapia convencional y un gran potencial antitumoral en este tipo de pacientes¹⁴⁰. No obstante, pese a la buena respuesta inicial de la mayoría de pacientes se acaban desarrollando resistencias adquiridas a estos ITQs tras 1 año después del inicio del tratamiento. El mecanismo molecular más frecuente responsable de la resistencia adquirida es el desarrollo de una segunda mutación en el exón 20 del gen *EGFR* y que afecta a una “sustitución de treonina (T) por metionina (M) en el codón 790” (T790M). Esta mutación secundaria aparece en el 50-60% de los casos y aumenta la afinidad por el ATP, haciendo que estos inhibidores reversibles pierdan su eficacia^{141,142}.

➤ **2ª Generación**

Para superar este problema se desarrollaron los inhibidores de segunda generación, como el **afatinib**, **dacomitinib** y **neratinib** los cuales han mostrado una inhibición más potente al unirse de forma covalente y, por tanto, irreversible a EGFR¹⁴¹. Asimismo, presentan una inhibición más amplia del resto de la familia de receptores de la familia (HER). En principio, se desarrollaron como principal estrategia terapéutica para tumores con resistencia adquirida a los ITQs de 1ª generación y como tratamiento frente a la mutación T790M¹⁴³. Sin embargo, a pesar de los buenos resultados *in vitro*, la eficacia clínica que demostraron fue muy baja con tasas de respuesta incluso por debajo del 10%^{144,145}.

➤ **3ª Generación**

Con el objetivo de mejorar la eficacia clínica de estos inhibidores, especialmente en los casos en los que se encuentra la mutación T790M, se comenzaron a desarrollar inhibidores irreversibles más selectivos. Como resultado, surgieron inhibidores como AZD9291 (**osimertinib**) y CO-1686 (rociletinib) los cuales se basan en una estructura de pirimidina capaz de unirse de forma covalente e irreversible al sitio C797 de unión del ATP del receptor y superar así la mayor afinidad por el ATP que confiere la mutación T790M¹⁴¹. En el ensayo clínico AURA3, donde se comparaba osimertinib frente a quimioterapia en pacientes que desarrollaron resistencia adquirida debido a la mutación T790M tras el tratamiento en primera línea con EGFR-ITQs, osimertinib mostró una supervivencia libre de progresión (PFS) significativamente superior a la quimioterapia (10,1 meses vs 4,4 meses)¹⁴⁶ (**Tabla 3**). En base a estos resultados, osimertinib se aprobó y recomendó en 2015 por la FDA para el tratamiento de la resistencia adquirida mediante T790M tras el tratamiento con gefitinib, erlotinib o afatinib. Más recientemente, en un nuevo ensayo fase 3 que compara osimertinib con un EGFR-ITQ de primera generación en primera línea para el tratamiento de pacientes con mutaciones activadoras de *EGFR* (ensayo FLAURA), osimertinib mostró valores de PFS significativamente mayores (18,9 meses vs 10,2 meses)¹⁴⁷. Por el gran beneficio clínico observado, **osimertinib ha sido recientemente aprobado** en 2018 por la FDA, como **tratamiento de elección en primera línea** en pacientes con CPNM cuyos tumores tienen mutaciones en *EGFR*^{148,149}.

Tabla 3. Ensayos clínicos en los que se comprueba la eficacia del tratamiento con ITQs de EGFR de 1ª, 2ª y 3ª generación en comparación con tratamientos convencionales de quimioterapia en pacientes con CPNM-EGFR mutado.

Estudio	EGFR-ITQ	Quimioterapia	PFS medio (meses)	ORR (%)
IPASS	Gefitinib	Carboplatino + paclitaxel	9.5 vs 6.3	71.2 vs 47.3
WJTOG	Gefitinib	Cisplatino + docetaxel	9.2 vs 6.3	62.1 vs 32.2
EURTAC	Erlotinib	Cisplatino + docetaxel	9.7 vs 5.2	64.0 vs 18.0
OPTIMAL	Erlotinib	Gemcitabina + carboplatino	13.1 vs 4.6	83.0 vs 36.0
Lux-Lung3	Afatinib	Cisplatino + pemetrexed	11.1 vs 6.9	56.1 vs 22.6
AURA3	Osimertinib	Cisplatino + Pemetrexed	10.1 vs 4.4	71.0 vs 31.0

b) Anticuerpos monoclonales contra EGFR

Una aproximación terapéutica diferente para bloquear a EGFR y la señalización “aguas abajo” se basa en el uso de anticuerpos monoclonales contra este receptor como cetuximab y necitumumab. Esta estrategia se basa en un doble mecanismo de acción: por un lado, la unión del anticuerpo al dominio de unión del ligando extracelular provoca una inhibición competitiva y además se induce la formación de complejos anticuerpo-receptor que son interiorizados por endocitosis y posteriormente degradados lo que resulta en la regulación negativa de EGFR en la superficie de las células tumorales¹⁵⁰. Se ha comprobado que la combinación de estos anticuerpos con tratamientos convencionales de quimioterapia (p ej. cisplatino) es capaz de mejorar los ratios de supervivencia y de respuesta en comparación con la quimioterapia única en CPNM^{151,152}.

2.7.3.3 Resistencia a terapias dirigidas de EGFR

Los grandes avances en el desarrollo de estos inhibidores dirigidos contra EGFR han supuesto un enorme beneficio clínico y una mejora en la supervivencia en el CPNM. No obstante, a pesar de la elevada sensibilidad de la proteína EGFR-mutada a estos agentes dirigidos y las prometedoras respuestas iniciales, existe un importante subgrupo de pacientes que no responden al tratamiento o responden durante un periodo de tiempo muy corto debido a la resistencia innata (~30%)¹⁵³. Esta resistencia innata se puede atribuir a mecanismos preexistentes dependientes o independientes de EGFR¹⁵⁴. Además, en el **70% de los casos** que hay respuesta, **los pacientes acaban inevitablemente desarrollando resistencias** por múltiples mecanismos, frenando la promesa de un tratamiento definitivo para el CPNM^{155,156}. En ocasiones, esta resistencia adquirida se trata de paliar con aumentos de dosis lo que suele aumentar los efectos adversos e incluso puede empeorar el pronóstico.

Los mecanismos moleculares que dirigen estas resistencias adquiridas se pueden dividir de la siguiente forma (**Figura 9**):

➤ Mecanismos genéticos

Los mecanismos genéticos de resistencia están relacionados con mutaciones secundarias del gen *EGFR* y con mutaciones de otros oncogenes y/o genes supresores de tumores. Como hemos mencionado previamente, cerca del **50 % de los casos** tratados con ITQs de primera y segunda generación presentan la **mutación T790M como principal mecanismo de resistencia**. En la gran mayoría de los casos aparece durante el tratamiento con los ITQs aunque con menos frecuencia, puede encontrarse en muestras de CPNM previo al inicio tratamiento, aportando una resistencia innata a los ITQs de primera y segunda generación. A pesar de que el 90% de las mutaciones secundarias de *EGFR* corresponden a esta mutación T790M¹⁵⁷, existen otras mutaciones de *EGFR* asociadas con la resistencia adquirida a los ITQs, como la L747S, y la D761Y, poco frecuentes y actualmente sin relevancia clínica^{158,159}.

En el caso de los ITQs de tercera generación, como el osimertinib, indicados para el tratamiento de la mutación T790M, el principal mecanismo de resistencia genético es el **desarrollo de una tercera mutación en EGFR, la sustitución C797S**¹⁶⁰. Se ha detectado hasta en el 10-26% de los pacientes con progresión a osimertinib en segunda línea y en el 7% de los pacientes tratados con osimertinib como tratamiento de primera línea^{154,160}. Esta mutación disminuye la habilidad del osimertinib y otros ITQs de formar un enlace covalente con la forma mutada de *EGFR*. La aparición de la mutación C797S tras el tratamiento con inhibidores de tercera generación ha llevado al desarrollo de inhibidores de cuarta generación como EAI045, un inhibidor selectivo de cuarta generación capaz de superar la mutación C797S en *EGFR*¹⁶¹. Actualmente estos ITQs de cuarta generación están en fases de investigación clínicas y preclínicas. Sin embargo, según lo observado en la práctica con los inhibidores de primera, segunda y tercera generación, es probable que pueden surgir nuevas mutaciones en el dominio tirosina quinasa de EGFR que podrían propiciar la aparición de resistencia a estos ITQs de cuarta generación. Otro mecanismo de adquisición de resistencia que concierne a EGFR se trata de la amplificación del propio receptor, mecanismo que además se asocia a un peor pronóstico^{162,163}.

En cuanto a mutaciones de otros oncogenes/genos supresores, se han reportado activaciones en ciertas rutas de proliferación y supervivencia celulares responsables de la aparición de resistencias a ITQs y especialmente a osimertinib.

1) Amplificación MET

La amplificación del gen *MET* se ha observado en numerosos estudios tras el tratamiento con EGFR-ITQs y constituye el segundo mecanismo más frecuente de resistencia adquirida a este tipo de inhibidores^{164,165}. En un estudio en el que se administró osimertinib como tratamiento en primera línea, la amplificación de *MET* fue el mecanismo de resistencia más común, encontrado en un 15% de los pacientes¹⁶⁶. Esta amplificación confiere resistencia mediante la activación persistente de la señalización “aguas abajo” de EGFR, incluyendo las vías MAPK, PI3K-AKT y STAT¹⁶⁴. Por todo ello, se ha propuesto que el tratamiento dual con inhibidores de EGFR y de MET, como osimertinib y crizotinib, puede ser una estrategia terapéutica efectiva y tiene el potencial de superar la resistencia en líneas celulares de CPNM con mutación en *EGFR* resistentes a osimertinib y con amplificación del gen *MET*¹⁶⁴.

2) Amplificación de HER2

La amplificación de *HER2* se ha reportado como mecanismo de resistencia en un 5-10% de los pacientes con resistencia a osimertinib en segunda línea¹⁶⁷ y en un 2% de los casos de resistencia a osimertinib en primera línea¹⁶⁶. Esta amplificación, igual que ocurre con la amplificación de *MET*, produce una activación alternativa de las vías de señalización intracelulares relacionadas con EGFR¹⁶⁴. La presencia de amplificaciones de *HER2* es mutuamente excluyente con la mutación T790M¹⁶⁸.

3) Mutaciones en PI3KCA y PTEN

Como hemos visto, la vía PI3K/AKT es una vía de señalización clave en la función de EGFR y conduce a un incremento del crecimiento y la supervivencia. Mutaciones en *PI3KCA* se han observado en pacientes con resistencia adquirida a EGFR-ITQs. En el análisis de secuenciación de próxima generación realizado dentro del estudio FLAURA, entre los pacientes tratados con osimertinib en primera línea, se identificaron las mutaciones *PIK3CA* E453K, E545K y H1047R en seis casos, siendo E545K la más representada (4%)¹⁶⁶. Por otro lado, PTEN es una molécula que regula negativamente esta vía de señalización. La pérdida de *PTEN*, aunque se ha observado en una proporción baja de pacientes, constituye uno de los mecanismos que contribuyen a la adquisición de resistencia^{169,170}.

4) Mutaciones en BRAF

Las mutaciones *BRAF* activan constitutivamente la señalización de ERK a través de la hiperactivación de la vía RAS-ERK, lo que resulta en mayor proliferación y supervivencia celular. Pese a que la proporción de casos en los que *BRAF* aparece mutado en respuesta al tratamiento con ITQs es baja (1%), es una opción a considerar ya que estudios *in vitro* han demostrado que la presencia de mutaciones en *BRAF* como la V660E y la G469A condicionaban resistencia a EGFR-ITQs¹⁷¹. Esto abre la posibilidad al uso combinado de EGFR-ITQ junto a inhibidores de BRAK/MEK para revertir este tipo de resistencias¹⁷⁰.

5) Otros mecanismos

Además de las vías relacionadas con EGFR antes mencionadas, otras señales pueden estar involucradas en la resistencia a EGFR-ITQ. Las quinasas de la familia Src (SFK) y la quinasa de adhesión focal (FAK) desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de las vías AKT y MAPK bajo la inhibición de EGFR en células sensibles a osimertinib¹⁷². Se ha reportado la amplificación de *YES1* como mecanismo de resistencia a osimertinib en líneas celulares de

CPNM y cómo su inhibición mejora los efectos de osimertinib *in vitro*¹⁷². Otro factor clave involucrado en la resistencia intrínseca a osimertinib es el receptor tirosina quinasa AXL. AXL puede interactuar con otros receptores tirosina quinasa, incluidos EGFR y HER3, y mantener la supervivencia de las células tumorales expuestas a osimertinib¹⁷³. La sobreexpresión de AXL se ha asociado con una mala respuesta a osimertinib y en un estudio el tratamiento combinado con un inhibidor de AXL y osimertinib previno el desarrollo de resistencia intrínseca a osimertinib¹⁷³.

➤ Mecanismos epigenéticos de resistencia

Los mecanismos epigenéticos de resistencia implican la activación de programas reversibles que regulan la expresión génica al modular el estado de la cromatina en ausencia de nuevas modificaciones genéticas. Dentro de este grupo, podemos destacar dos cambios fenotípicos fundamentales que dan lugar a resistencias frente a ITQs de EGFR durante la evolución de la enfermedad.

1. Transformación histológica de CPNM a CPM

La transformación histológica de tumores de CPNM *EGFR*-mutante al subtipo CPM se ha reportado en el 2-14% de los casos de adquisición de resistencia a ITQs de EGFR¹⁷⁴. Pese a que se desconocen los mecanismos que gobiernan dicha transformación, se ha podido comprobar que la mutación original en *EGFR* sigue estando presente y se mantiene en tumores que se transforman en CPM tras el tratamiento^{175,176}. A pesar del desconocimiento, la transformación a CPM y la consiguiente adquisición de resistencia a ITQs de EGFR se han asociado en diversos estudios *in vivo* e *in vitro* a un mecanismo no epigenético como es la pérdida del gen supresor RB1 en casos de AC *EGFR* mutantes¹⁷⁷. Por tanto, en algunos casos la transformación histológica no viene dada por un mecanismo epigenético.

2. Transición Epitelio-Mesenquimal

La EMT se ha reportado en un 1-2% de los casos de adquisición de resistencia adquirida a ITQs de EGFR¹⁷⁸. La EMT es un proceso mediante el cual una célula con fenotipo epitelial pierde sus características fenotípicas y adquiere rasgos de un fenotipo mesenquimal. En este proceso, se producen cambios a nivel morfológico y a nivel de señalización intracelular que promueven la pérdida de la adhesión intercelular para adquirir un fenotipo mesenquimal que promueve la motilidad.

La EMT, como otros procesos de diferenciación celular, implica grandes cambios en la maquinaria celular y se trata de un proceso dependiente del contexto biológico. En condiciones fisiológicas normales ocurre como un programa de transdiferenciación estrictamente organizado y regulado¹⁷⁹. Sin embargo, programas desregulados o aberrantes de EMT se han observado en diversas patologías como el cáncer, incluido el CP.

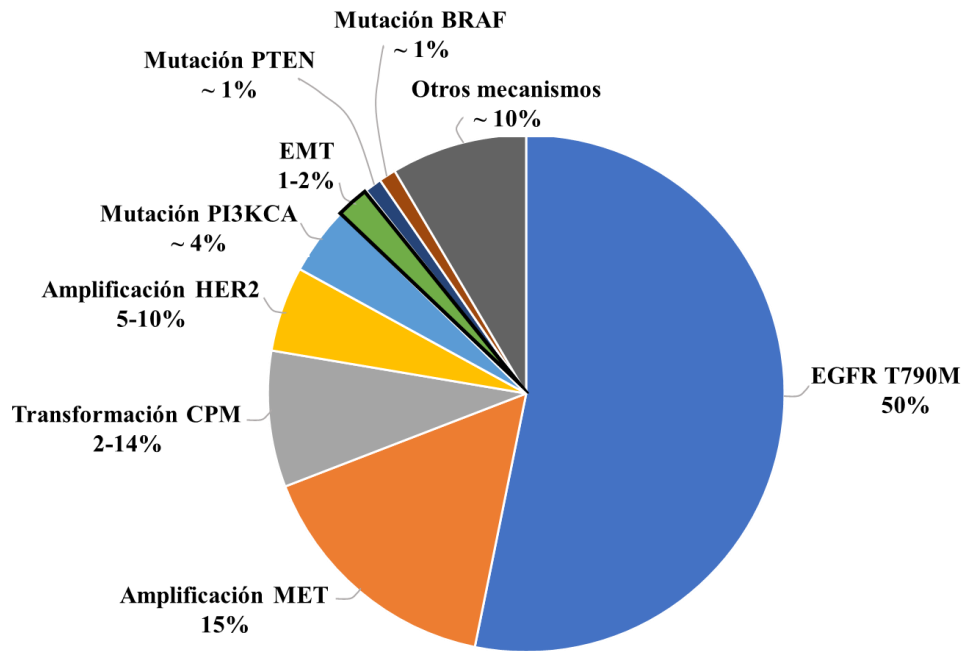


Figura 9. Principales mecanismos de resistencia adquirida a ITQs de EGFR en CPNM. El principal mecanismo genético de adquisición de resistencia es la aparición de la mutación T790M de *EGFR* (50%), seguido de otros como la amplificación de *MET* (15%) y la amplificación de *HER2* (5-10%). Por otro lado, existen mecanismos epigenéticos como la transformación histológica a CPM (2-14%) o la activación de la EMT (~2%).

A continuación, se procede a desarrollar de forma más detallada algunas de las características más importantes de la EMT, dada la importancia en este trabajo de tesis doctoral.

3. Transición epitelio-mesenquimal

La EMT constituye un **programa biológico de transdiferenciación** en el que células epiteliales polarizadas experimentan múltiples cambios bioquímicos y morfológicos que les **confieren un fenotipo mesenquimal**¹⁷⁹. Las células epiteliales normalmente están ancladas a una membrana basal a través de uniones basadas en integrinas y a sus células adyacentes por uniones de diferentes tipos incluyendo uniones adherentes, uniones estrechas, uniones de tipo “gap” y desmosomas, entre otras¹⁸⁰. Por tanto, las células epiteliales no son capaces de migrar individualmente desde su lugar de origen ni invadir y diseminarse a otras zonas más allá de la monocapa epitelial.

La EMT es un proceso fundamental conservado que ocurre principalmente durante el desarrollo embrionario, lo que permite que las células epiteliales inmóviles se muevan a diferentes destinos para formar una variedad de órganos en el embrión en desarrollo constituyendo un proceso crucial durante la morfogénesis. Como tal, **la EMT es un proceso dinámico y a menudo transitorio** mediante el cual las células pueden sufrir cambios fenotípicos hacia el fenotipo mesenquimal y luego, mediante el proceso inverso, revertir a través de una transición mesenquimal-epitelial (TME) para re-epitelizarse y cumplir su función^{181,182}.

De esta forma, la activación de la EMT en células epiteliales induce cambios en múltiples aspectos fundamentales de la morfología y fisiología celulares^{181,183,184}:

- a) **Modificaciones en la organización del citoesqueleto y la morfología celular**, de estructuras escamosas, poligonales o columnares a formas alargadas y fusiformes.
- b) **La pérdida de las uniones intercelulares epiteliales**, incluidas las uniones estrechas, adherentes e integrinas.
- c) **La disolución de la polaridad apical-basal** típica de las células epiteliales y ganancia concomitante de polaridad frontal-posterior.
- d) **La adquisición de capacidades de motilidad**, así como la habilidad de degradar y reorganizar la matriz extracelular (ECM), lo que permite la invasión celular.
- e) **El reordenamiento de los patrones de expresión génica** de gran cantidad de genes

Estas diferencias morfológicas y moleculares entre células epiteliales y mesenquimales están definidas por programas transcripcionales que regulan la expresión de genes que codifican para proteínas estructurales importantes, así como aquellas que están involucradas en mantener el citoesqueleto y las uniones intercelulares^{184,185}.

Como se ha comentado, la EMT ocurre naturalmente de forma fisiológica y juega un papel muy importante en procesos específicos del desarrollo. De hecho, se distinguen tres tipos de EMT¹⁷⁹:

- EMT Tipo I: esta EMT tiene lugar en varias fases durante la embriogénesis y la morfogénesis de los tejidos durante el desarrollo embrionario. En este proceso, se precisa que determinadas células adquieran capacidad de migración para continuar formando tejidos en diferentes localizaciones del embrión. Para ello, algunas células epiteliales diferenciadas y polarizadas se desdiferencian a células mesenquimales a través de esta EMT.

- EMT Tipo II: este tipo de EMT juega un papel muy importante en tejidos epiteliales de adultos en procesos fisiopatológicos como la regeneración de tejidos y órganos, la cicatrización y la fibrosis. Constituye un mecanismo de re-epitelización que restablece la homeostasis tisular.
- **EMT Tipo III (EMT y cáncer):** Es una forma anormal de EMT que se relaciona con el desarrollo y la progresión tumoral consecuencia de la adquisición de propiedades de CSC.

3.1 EMT y cáncer

Se ha observado la posibilidad de que cualquier célula diferenciada, debido a determinadas situaciones fisiopatológicas como la tumorigénesis, puede llegar a adquirir rasgos de célula pluripotente y por un proceso de EMT adquirir un fenotipo de CSC¹⁸⁶. La ganancia de características de célula madre conlleva la adquisición de un fenotipo multipotente con capacidad de diferenciación a otros tipos celulares, una mayor capacidad migratoria e invasiva, así como capacidad de autorenovación y una disminución en la sensibilidad a agentes antineoplásicos^{187,188}. El enriquecimiento de un tumor en CSCs se asocia con malignidad y un mal pronóstico. En este sentido, las células de los tumores primarios altamente agresivos muestran características mesenquimales, que incluyen motilidad e invasividad, esta última asociada con diseminación metastásica¹⁸⁴. Por todo ello, se ha sugerido que **este tipo de EMT está asociado con la progresión del cáncer** ya que las células tumorales pueden aprovechar este proceso para adquirir capacidades de invasión y metástasis en un proceso de varios pasos conocido como cascada de invasión-metástasis¹⁸⁹ (**Figura 10**). De esta forma, las células epiteliales que forman el tumor primario comienzan a activar el programa EMT y adquieren capacidades diseminativas, comenzando la invasión local seguido de la intravasación a vasos sanguíneos o linfáticos adyacentes al tejido. A través de estos vasos, circulan hacia tejidos y órganos distantes invadiéndolos y formando nichos micrometastásicos que en ocasiones crecen y forman lesiones clínicamente aparentes^{189,190}. En este último paso de crecimiento de focos microscópicos a la formación de tumores macroscópicos, se requiere del proceso inverso, la TME, para que las células recuperen las capacidades de anclaje del fenotipo epitelial y se diferencien y adapten a un nuevo tejido diferente al primario en el que se habían originado¹⁹¹. De hecho, se ha observado que las metástasis en pacientes con carcinoma frecuentemente exhiben rasgos epiteliales y, en algunos casos, una disposición que concuerda con el tejido de donde se originaron¹⁹².

El análisis de células tumorales circulantes (CTC) y tumores primarios en pacientes proporciona evidencia de la inducción de la EMT durante la progresión y diseminación de las células tumorales^{193,194}. Además, en varios modelos de ratón se ha demostrado que la activación de la EMT juega un papel esencial en el primer paso de la cascada metastásica, ya que, al eliminar factores de transcripción de EMT, como SNAIL, ZEB o TWIST, los tumores muestran potenciales metastásicos significativamente reducidos^{195,196}. De igual forma, la expresión ectópica de algunos de estos factores, como TWIST1, se ha visto que promueve fenómenos de invasión y metástasis in vivo¹⁹⁷.

En definitiva, la **activación del programa EMT en las células tumorales**, inicialmente no metastásicas, **potencia la capacidad de estas células para generar metástasis sin requerir modificaciones genéticas suplementarias**. Esto demuestra que la activación del programa EMT en células neoplásicas está estrechamente relacionada con la entrada en el estado CSC y la progresión tumoral.

La EMT se ha considerado durante mucho tiempo como un proceso binario con cambios entre dos estados opuestos, mesenquimal o epitelial. Sin embargo, investigaciones recientes apuntan a una mayor versatilidad en esta transición, y ya no se cree que las células oscilen entre fenotipos epiteliales o mesenquimales completos, sino que pasen a través de un **continuo de estados intermedios (E/M)** generando todo un espectro de fenotipos celulares que contribuyen a la heterogeneidad intratumoral¹⁹⁸. Estos **estados EMT híbridos y parciales** proporcionan plasticidad celular, diferentes capacidades de invasión y una localización espacial preferente dentro del tumor, aumentando la heterogeneidad y confiriendo a las células un mayor potencial tumoral y metastásico, además de una mayor resistencia a los tratamientos y capacidades de inmunoevasión^{199,200}. De esta forma, durante la progresión tumoral, las células neoplásicas entran en una transición dinámica y reversible entre múltiples estados fenotípicos definidos por la expresión de marcadores epiteliales y/o mesenquimales y controlado por la secreción, tanto paracrina como autocrina, de ligandos extracelulares, factores de crecimiento y demás moléculas inductoras que se detallan a continuación.

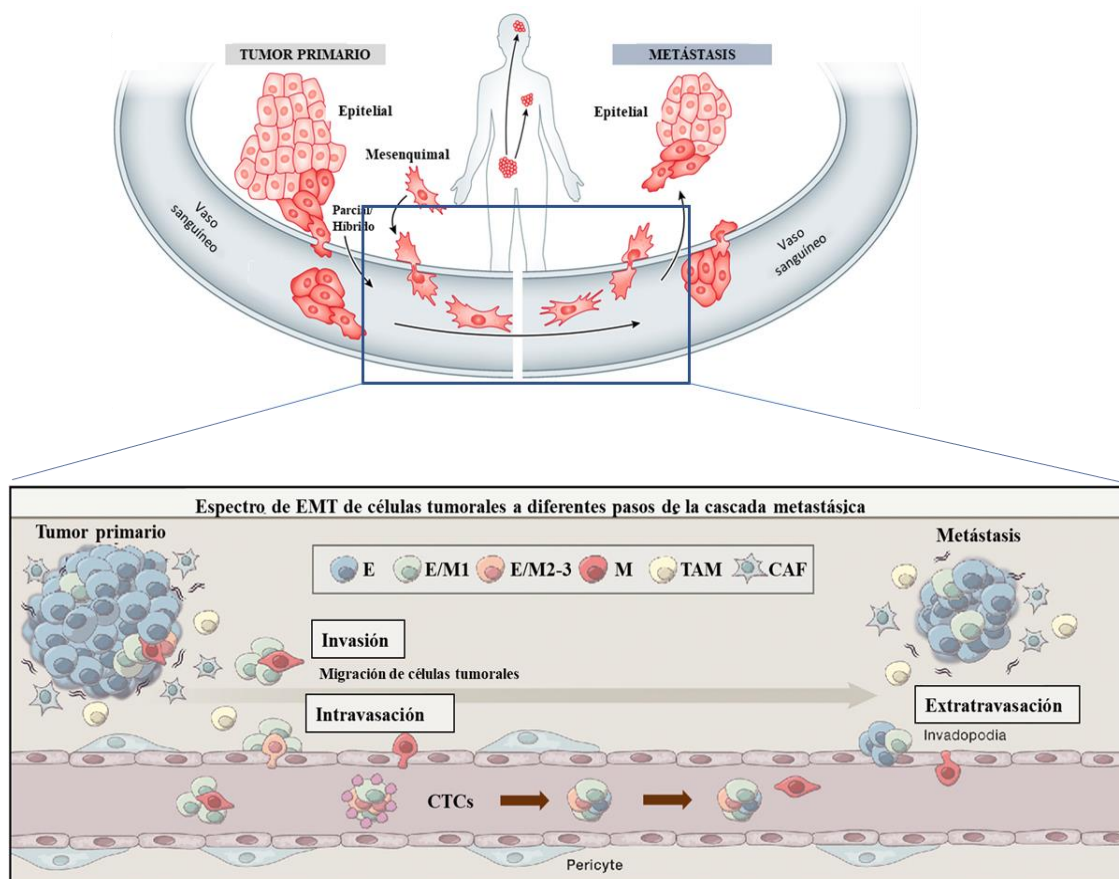


Figura 10. Representación de la cascada de invasión-metástasis. E: Epitelial; E/M1: híbrido epitelial/mesenquimal 1; E/M2-3: híbrido epitelial/mesenquimal 2 y 3; TAM: macrófagos asociados a tumor; CAF: fibroblastos asociados a cáncer.

3.1.1 Regulación de la EMT

La EMT ocurre como un **proceso transcripcional complejo y reversible** orquestado y perfectamente regulado por un conjunto de **factores de transcripción (FTs)** que se activan secuencialmente de manera dependiente del contexto celular formando una red de interacciones muy complejas. Los FTs más relevantes de la EMT pertenecen a las familias **SNAIL, SLUG, TWIST y ZEB** e inhiben la expresión de genes asociados con el estado epitelial junto con reguladores epigenéticos, postraduccionales y miRNA²⁰¹⁻²⁰³. La unión de estos FTs a las correspondientes regiones promotoras del ADN induce cambios en el patrón de expresión de biomoléculas asociadas a la firma EMT.

Se considera que una célula ha sufrido una transición EMT tras la pérdida de la expresión de marcadores epiteliales junto con la ganancia de marcadores mesenquimales²⁰³. En este sentido, uno de los cambios más relevantes que tienen lugar durante la transición a un fenotipo mesenquimal es la **represión de la E-cadherina (CDH1)** y la **expresión de N-cadherina (CDH2)**¹⁸⁰. La **CDH1** es una glicoproteína de adhesión célula-célula dependiente de calcio y constituye el **principal regulador del fenotipo epitelial en la célula**. La E-cadherina se une a las células adyacentes creando un complejo intercelular que forma las barreras epiteliales. La porción extracelular de E-cadherina se une a las cadherinas de una célula adyacente creando un puente entre los citoesqueletos de las células contiguas. El dominio intracelular de la E-cadherina interactúa con la β -catenina, que a su vez está unida a filamentos de actina dentro de las células²⁰³. De esta forma, la represión de CDH1 provoca una reorganización del citoesqueleto que hace que las uniones intercelulares se vuelvan débiles y se produzca un aumento en la capacidad de las células para invadir el tejido circundante. La inactivación de la E-cadherina se debe a la regulación positiva de los **EMT-TFs** que se han comentado. Los factores de transcripción como SNAIL1/2, SLUG, ZEB1 y ZEB2 se consideran represores directos de la E-cadherina ya que se unen directamente a secuencias de ADN en las “E-Box” presentes en el promotor del gen *CDH1*²⁰⁴. Los represores indirectos incluyen las proteínas TWIST1 y TWIST2 las cuales ejercen su función represora por asociación con otras proteínas y factores. No obstante, se ha observado que también pueden unirse directamente a las “E-Box” 2 y 3 presentes en el promotor de *CDH1* para reprimir su expresión²⁰⁵.

Además de la pérdida de la E-cadherina, durante la EMT se pierden otros marcadores epiteliales clave como otras cadherinas, filamentos intermedios formados por citoqueratinas (CK8, CK18 y CK19) así como claudinas, ocludinas y desmoplaquinas, entre otros. Además, las células comienzan a expresar el **filamento intermedio vimentina (VIM)**, marcador canónico del fenotipo EMT, así como fibronectina y vitronectina facilitando la migración, invasión y la metástasis¹⁷⁹ (**Figura 11**).

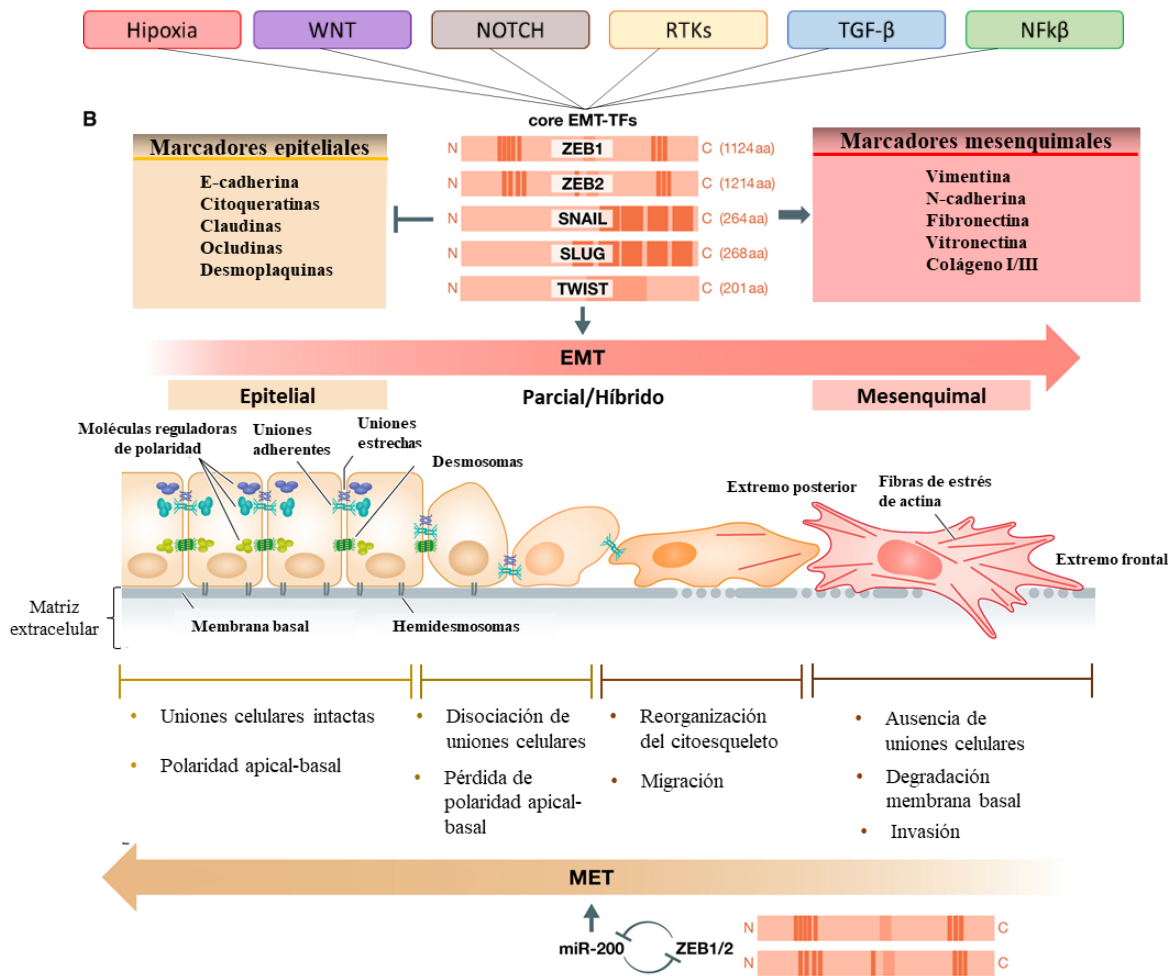


Figura 11. Cambios producidos en las células durante el transcurso de la EMT. La activación de la EMT en células epiteliales a través de los múltiples mecanismos que la regulan induce una amplia variedad de cambios transcripcionales, así como cambios en la morfología y fisiología celulares.

3.1.2 Inducción del programa EMT y vías asociadas

Dependiendo del ambiente fisiológico, la EMT puede desencadenarse por diferentes motivos. Una gran variedad de estímulos extracelulares junto con sus correspondientes vías de señalización intracelular son responsables de la activación y la regulación de la EMT. La señalización mediada por el **factor de crecimiento transformante beta (TGF-β)** ha sido la más estudiada en el contexto de la EMT durante el desarrollo embrionario y también en la progresión tumoral. Los miembros de la superfamilia de TGF-β son citoquinas funcionalmente diversas, pero estructuralmente conservadas. Se han descrito 3 ligandos diferentes de TGF-β: TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3. Estos ligandos están codificados a partir de genes individuales ubicados en diferentes cromosomas, activan el programa EMT, por señalización paracrina o autocrina, y promueven la progresión tumoral y la metástasis^{206,207}. Concretamente, **TGF-β1 es el principal inductor de la EMT**. En cáncer, la citoquina TGF-β1 es producida por miofibroblastos del MAT o por las propias células del tumor. Una vez liberado, la señal del TGF-β1 es transducida por dos receptores serín-treonin quinasa distintos: **TGF-βR1 y TGF-βR2** con lo que se activa la cascada

de fosforilación de las proteínas de la familia SMAD, SMAD2 y SMAD3^{206,208}. A continuación, estas proteínas forman complejos con SMAD4 que translocan al núcleo donde cooperan con diferentes EMT-TFs y activan la expresión de genes relacionados con la diferenciación y la transición a un fenotipo mesenquimal²⁰⁸. Por ejemplo, la activación de SMAD mediada por la señalización de **TGF-β es capaz de inducir la expresión de SNAIL1 y ZEB1** y, en consecuencia, activar genes mesenquimales como *VIM* y fibronectina^{209,210}. Esta vía de señalización del TGF-β1 se encuentra habitualmente sobreactivada en gran variedad de carcinomas donde promueve fenómenos de invasión y metástasis^{208,209}.

TGF-β 1 también es capaz de **inducir el programa EMT por una vía no canónica** mediante la activación de GTPasas semejantes a RhoA y activando las rutas de señalización de PI3K-AKT y MAPK. En este sentido, TGF-β regula la actividad de pequeñas proteínas GTPasa como Rho, Rac y Cdc42 que funcionan como mediadores de la señalización en procesos como la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de estructuras necesarias para la migración celular. En este contexto, TGF-β activa RhoA y sus posteriores proteínas diana ROCK y la quinasa LIM, mediadores de las fibras de estrés de actina²¹¹. Por otro lado, TGF-β es capaz de inducir la activación de AKT a través de PI3K durante la EMT. Una vez activado, AKT activa otras vías de señalización como mTOR, que como se ha comentado desempeña funciones clave en la supervivencia, crecimiento, migración e invasión celular^{211,212}.

Más allá del papel de TGF-β, existen vías alternativas y otros factores que también participan en la inducción de la EMT. Las **rutas WNT y NOTCH** contribuyen a activar la EMT mediante la señalización cruzada con la vía del TGF-β²⁰⁶ así como citoquinas como la **IL-6 y el TNFα**^{213,214} y **factores de crecimiento como EGF, FGF, HGF, PDGF y VEGF**²⁰⁰. La **ruta NFκβ** se activa rápidamente en respuesta a estímulos como estrés, inflamación e hipoxia entre otros, promoviendo la transcripción de los FTs de la EMT como Slug y TWIST1 lo que resulta en tumores con un fenotipo agresivo y metastásico²¹⁵. Además, la inducción de la EMT se ha asociado a **microRNAs como mir200 y mir205**, capaces de interactuar con FTs de la familia de ZEB²¹⁶. Por último, determinadas condiciones fisiológicas como la **hipoxia o ciertos cambios en el MAT** también son capaces de inducir la EMT por varios mecanismos²⁰⁰.

Por todo ello, se asume que **la EMT se activa en respuesta a una gran variedad de estímulos** y a la combinación de los diferentes factores que intervienen, de forma que deben cumplirse varias condiciones al mismo tiempo en la célula para que se produzca una activación completa del programa EMT.

3.1.3 EMT y resistencia a terapias convencionales

Como hemos visto, en el CP, la EMT se ha asociado con una mayor agresividad del tumor y un peor pronóstico para los pacientes. Pero, además, **la EMT también se ha relacionado con la resistencia a múltiples terapias y fármacos**²¹⁷, incluidos los inhibidores tirosina quinasa (ITQ). Los mecanismos por lo que la EMT produce resistencia a la muerte celular inducida por fármacos citotóxicos todavía son objeto de estudio y no se comprenden completamente. Es posible que los agentes quimioterápicos puedan enriquecer la población tumoral de células mesenquimales con características pluripotentes de CSC, minoritarias antes de que la quimioterapia elimine gran parte del tumor formado por células epiteliales. La propia activación del programa EMT también puede desencadenar la aparición de resistencias. Algunos inductores de la EMT, como factores de la familia SNAIL o ZEB, aumentan la supervivencia de las células al afectar a varias proteínas de señalización aguas abajo, incluyendo p53 y las vías de señalización ERK y PI3K^{201,218}. De esta forma, la inducción de la EMT puede dar como resultado la generación de células de tipo

mesenquimal que tienen una ventaja de crecimiento y supervivencia debido a la falta de expresión de E-cadherina y al efecto antiapoptótico de los factores de la EMT.

La inhibición de la muerte celular y la inducción de vías de supervivencia suceden junto con el bloqueo del ciclo celular, a través del cual los inductores de la EMT también confieren resistencia a la quimioterapia durante la progresión del cáncer^{217,219} probablemente porque los agentes quimioterápicos disponibles pueden dirigirse eficazmente a las células tumorales con ciclo celular activo, pero no a las células tumorales de naturaleza mesenquimal que no avanzan en el ciclo celular.

3.1.4 EMT y resistencia a EGFR-ITQs en CPNM

Al igual que sucede con la quimioterapia, **la EMT se asocia clínicamente con la resistencia adquirida a los ITQs de EGFR en CPNM** en múltiples evidencias experimentales. En varios estudios realizados en modelos celulares de CPNM, la adquisición de resistencia a gefitinib, erlotinib y osimertinib se asocia con una activación consistente de la EMT que da lugar a una represión de CDH1 y un incremento en los niveles de VIM y características de pluripotencia por diferentes mecanismos^{220–223}. En estudios realizados en pacientes, se ha observado cómo la EMT se asocia con una mayor resistencia a los ITQs y que aquellos pacientes con CPNM que experimentan una EMT tienen una menor tasa de respuesta a la terapia y un peor pronóstico²²⁴. En línea con estas evidencias, se ha descrito la sobreexpresión de *ZEB1* en rebiopsias de pacientes con resistencia adquirida a ITQs²²⁵. En un estudio realizado por Byers et al. en el que se analizó la expresión génica de líneas celulares y muestras clínicas de CPNM, se identificó una firma de 76 genes relacionados con la EMT con capacidad para predecir el desarrollo de resistencia a estos ITQs²²⁶.

Estos estudios y muchos más, sugieren que **la EMT juega un papel importante en la resistencia a los ITQs en CPNM** y que la inhibición de la EMT podría mejorar la respuesta a estos fármacos²²⁷. Los mecanismos por los cuales la EMT conduce a la resistencia a los ITQs aún no se comprenden completamente, pero se han propuesto varios mecanismos por los cuales la EMT puede generar resistencia a estos fármacos en CPNM:

1. Aumento en la producción de TGF- β durante el tratamiento con EGFR-ITQs. La inhibición de EGFR en el tratamiento de CPNM con mutaciones de *EGFR* establece un bucle autocrino de TGF- β ²²⁸. De esta forma, se induce la EMT por activación de las proteínas SMAD y posterior inducción de factores como SNAIL o ZEB1 que a su vez condicionan la expresión de proteínas relacionadas con una mayor supervivencia, dando lugar a una ventaja de crecimiento debido al efecto antiapoptótico de estos FTs. Por otro lado, el efecto del TGF- β produce una activación cruzada de las vías “aguas abajo” de EGFR como PI3K/AKT o las MAPK por lo que la inhibición de EGFR dejaría de ser efectiva al mantenerse activa la señalización posterior. En relación con esto, se ha observado cómo la inhibición combinada de EGFR y TGF- β es capaz de prevenir la EMT asociada a la exposición a gefitinib en modelos celulares de CPNM²²⁸.
2. Señalización cruzada mediada por la activación de otros RTKs²²⁹. Se han descrito algunas RTKs como MET, IGF1R o AXL capaces de inducir la fosforilación de la E-cadherina y otras cadherinas asociadas, resultando en su posterior degradación²²⁴. La EMT debida a la activación de IGF1R se ha propuesto como uno de los mecanismos de resistencia adquirida a estos ITQs, puesto que es capaz de evitar la señalización de EGFR y activar las vías PI3K/AKT y MAPK/ERK. Su inhibición es capaz de revertir la EMT en modelos

celulares de resistencia a erlotinib²³⁰. Por otro lado, la regulación positiva de AXL también se ha implicado en la resistencia adquirida a erlotinib *in vivo* e *in vitro* debido a que promueve la señalización de AKT, MAPK y la vía NOTCH. En este sentido, la inhibición de AXL constituye un objetivo prometedor para restaurar la sensibilidad a erlotinib^{231,232}.

3. Cambios en el MAT. La EMT también puede influir en el MAT, promoviendo la formación de nichos de CSC y promoviendo fenómenos de inmunosupresión, lo que puede dificultar la acción de los ITQs. La activación de la EMT podría enriquecer la población de CSC en el tumor e inducir pluripotencia en las células lo que se ha relacionado con resistencia a terapia como ya se comentó. En este sentido, el enriquecimiento en CSC causado por la EMT se ha asociado con la adquisición de resistencia a gefitinib en modelos celulares de CPNM²³³. Por otro lado, se ha visto cómo un MAT inmunosupresivo atenúa la eficacia de los ITQs de EGFR²³⁴. De esta forma, tumores con resistencia adquirida a EGFR-ITQ asociada con la EMT secretan citoquinas y otros factores como la IL-6 que suprimen la función de los linfocitos T y las células “natural killer” (NK) además de favorecer la infiltración y diferenciación de células con carácter invasivo e inmunosupresor como las células supresoras de origen mieloide (MDSC) y los macrófagos asociados a tumor (TAMs)^{235,236}. Los TAMs regulan la resistencia a ITQs de EGFR por varios mecanismos que incluyen: activación cruzada de vías de señalización como AKT/mTOR, STAT o NFκB; supresión de la acción de linfocitos T en el microambiente; modulación de fenotipos tumorales con diferentes propiedades o induciendo la polarización de macrófagos tipo M2²³⁷. Asimismo, los propios TAMs son capaces de promover la EMT a través de la señalización por TGF-β favoreciendo el resto de mecanismos que contribuyen a la resistencia²³⁷. La reprogramación de los TAMs para reducir la secreción de señales pro-EMT, como el TGF-β, puede representar una estrategia prometedora. De acuerdo con esta hipótesis, Jin et al. demostraron que apuntando al metabolismo de los lípidos se podía repolarizar estos TAMs, atenuando TGF-β y, en consecuencia, suprimir la resistencia a fármacos asociada a la EMT^{237,238}.

La relación entre la EMT y la adquisición de resistencia a EGFR-ITQs resulta un fenómeno evidente por los muchos trabajos que la describen. Lo más probable es que **la resistencia adquirida no se deba a un único mecanismo, sino la acción conjunta de varios de ellos**. Es por ello, que son necesarios más estudios para comprender completamente los mecanismos subyacentes y desarrollar estrategias terapéuticas efectivas para superar la resistencia a estos ITQs en pacientes con CPNM mutado para *EGFR*.

Mientras que la mayoría de los estudios se han centrado tradicionalmente en los aspectos genéticos, epigenéticos y moleculares que gobiernan todos los procesos relacionados con la EMT, **el metabolismo celular ha recibido menor atención y actualmente ha emergido como un factor crítico** que desencadena y promueve la adaptación de las células cancerosas a las diferentes condiciones y etapas que tienen lugar durante la progresión tumoral. Estas adaptaciones metabólicas están a la vanguardia de la investigación y pueden ser la clave para identificar nuevas moléculas para la orientación terapéutica con una amplia aplicación a la personalización de la medicina contra el CPNM.

3.2 Reprogramación metabólica durante la EMT

En los seres vivos, el metabolismo es la base energética y material de todas las actividades biológicas que tienen lugar en las células y, en definitiva, en el organismo. En circunstancias normales, el metabolismo se produce en el organismo de forma ordenada para garantizar las funciones fisiológicas. Sin embargo, la progresión tumoral es un proceso dinámico con múltiples factores y etapas y gran cantidad de estudios han demostrado que **el patrón metabólico de las células tumorales es diferente del de las células normales**²³⁹. De hecho, la reprogramación metabólica es uno de los sellos del cáncer propuestas por Hannahan (sección 1.2).

Con el objetivo de mantener la división celular activa de forma sostenida, las células tumorales deben poder generar todos los componentes necesarios para aumentar la biomasa (incluidos nucleótidos, aminoácidos, lípidos, energía, etc), mantener el estado redox y regular la transducción de señales intracelulares. Estos requerimientos implican una alta demanda metabólica²⁴⁰. En este sentido, **las células tumorales tienen la capacidad de “reprogramar” o “redirigir” su metabolismo** para respaldar los incrementos en la producción de intermediarios metabólicos necesarios para su adaptación y así garantizar la proliferación y promover la supervivencia. Los mecanismos de reprogramación metabólica son diversos y pueden estar mediados por efectos genéticos o epigenéticos^{240,241}. La reprogramación metabólica que ocurre durante la EMT desempeña un papel significativo en la resistencia a estos tratamientos y la identificación de alteraciones metabólicas asociadas a este proceso es capaz de proporcionar una visión más completa de los mecanismos de resistencia y abrir paso al desarrollo de terapias específicas que puedan revertir o prevenir dicha resistencia, mejorando así la eficacia de los tratamientos con ITQs para los pacientes con CPNM-EGFR mutante.

Durante **la transformación fenotípica que tiene lugar durante la EMT se producen adaptaciones metabólicas dinámicas**. Los cambios metabólicos principales incluyen: una mayor captación de glucosa, la activación de la vía de las pentosas fosfato para aumentar la síntesis de ácidos nucleicos y la acumulación de lactato^{242,243}. En el transcurso de la EMT, el ATP se produce principalmente a través de la glicólisis, lo que disminuye los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), que se producen principalmente a través de la fosforilación oxidativa²⁴⁴. El aumento en la actividad glicolítica potencia la tolerancia de las células cancerosas a las fluctuaciones de oxígeno y produce grandes cantidades de metabolitos intermedios que se desvían hacia diferentes vías de biosíntesis. Además, se produce una acumulación de lactato, lo que contribuye a la acidez del tumor y promueve así el crecimiento y la metástasis. El lactato activa SNAIL1 y la EMT a través de la remodelación de la matriz extracelular y la liberación de TGF- β , el principal inductor de la EMT²⁴⁵.

Entre los cambios metabólicos que ocurren en la EMT, **el metabolismo de lípidos ha recibido menos atención**, sin embargo, su interés ha aumentado considerablemente en los últimos años, no solo porque los lípidos son los principales componentes de la membrana celular y una fuente de energía, sino también porque desempeñan un papel relevante en la señalización celular²⁴⁵.

3.2.1 Conexión entre metabolismo de lípidos y EMT

Los lípidos constituyen un amplio grupo de biomoléculas relativamente insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos debido a la predominancia de cadenas de hidrocarburos (–CH₂–CH₂–CH₂–CH₂–) en sus estructuras. Su particular composición y estructura les aporta una naturaleza anfipática que les permite formar estructuras como vesículas, lisosomas o membranas

en un entorno acuoso. De ahí que sean los **principales constituyentes de las membranas celulares** aportando estabilidad, fluidez, flexibilidad y permitiendo la organización controlada de los diferentes elementos que forman la maquinaria celular. Los lípidos se organizan específicamente en cada compartimento y esta organización es esencial para regular funciones específicas en la célula. De esta forma, las membranas permiten el intercambio controlado de iones y pequeñas moléculas y sostienen los componentes de los diferentes orgánulos celulares previniendo su diseminación por el citoplasma. Además, existen microdominios lipídicos en la membrana plasmática, conocidos como “lipid rafts”, que sirven como plataformas para concentrar receptores de proteínas y pueden influir en la señalización intracelular²⁴⁶. Esta función compartimental y estructural es tan importante que las membranas y los lípidos que las forman debieron ser esenciales para el origen de la vida misma²⁴⁷.

Más allá de su papel estructural, los lípidos constituyen **una importante fuente y reserva de energía**. Las gotas lipídicas (LDs, del inglés “lipid droplet”) son orgánulos intracelulares especializados en el almacenamiento de energía en forma de lípidos neutros como triglicéridos (TGs) y ésteres de estero²⁴⁸. Durante la privación de nutrientes, las mitocondrias utilizan los ácidos grasos (FAs) liberados de los LDs mediante lipólisis para la producción de energía a través de la β -oxidación y el ciclo del ácido cítrico. De esta forma, mediante la β -oxidación de los FAs, se forma acetilcoenzima A (acetil-CoA), que alimenta el ciclo del ácido cítrico para la producción de ATP en la matriz de las mitocondrias²⁴⁹. Además, la β -oxidación de los FAs produce NADH y FADH₂, que median la producción de ATP a través de la vía de la fosforilación oxidativa (cadena respiratoria) dentro de las mitocondrias^{248,249}. Finalmente, hay que destacar el papel de los lípidos en la **regulación de la señalización intracelular**. La información que llega a la célula es reconocida principalmente por receptores inmersos en las membranas celulares. De esta forma, la heterogeneidad de dominios creada por las diferentes fases de lípidos en la membrana puede promover la segregación y fenómenos de difusión que afectan a la señalización al facilitar u obstaculizar las interacciones proteína-proteína y receptor-ligando, entre otras²⁵⁰. Por otro lado, la propia composición de lípidos afecta a la forma en que las proteínas de señalización se asocian con la membrana plasmática. Un estudio reciente ha descubierto que la función de KRAS puede verse afectada en gran medida por la composición de fosfolípidos en la membrana plasmática puesto que presentan una afinidad distinta por la proteína²⁵¹. Más allá de regular las interacciones en la membrana celular, ciertas especies de lípidos como eicosanoides, fosfoinosítidas, esfingolípidos (SLs) y FAs son capaces de actuar como segundos mensajeros durante la señalización celular²⁵². Por ejemplo, muchos receptores acoplados a proteína G activan la vía de señalización del fosfatidilinositol, mediante la cual la fosfolipasa C hidroliza el PIP₂ en dos mensajeros secundarios: IP₃ y DG²⁵³. Como se ha comentado, DG activa la proteína quinasa C e IP₃ aumenta los niveles de calcio intracelular promoviendo una gran cantidad de respuestas celulares, incluida la transcripción, el crecimiento celular y las respuestas inmunes²⁵³.

La diversidad en la función de los lípidos se refleja en una enorme variación en las estructuras de las moléculas que los forman. En este sentido, los lípidos se dividen en clases atendiendo a su estructura molecular (**Figura 12**)²⁵⁴.

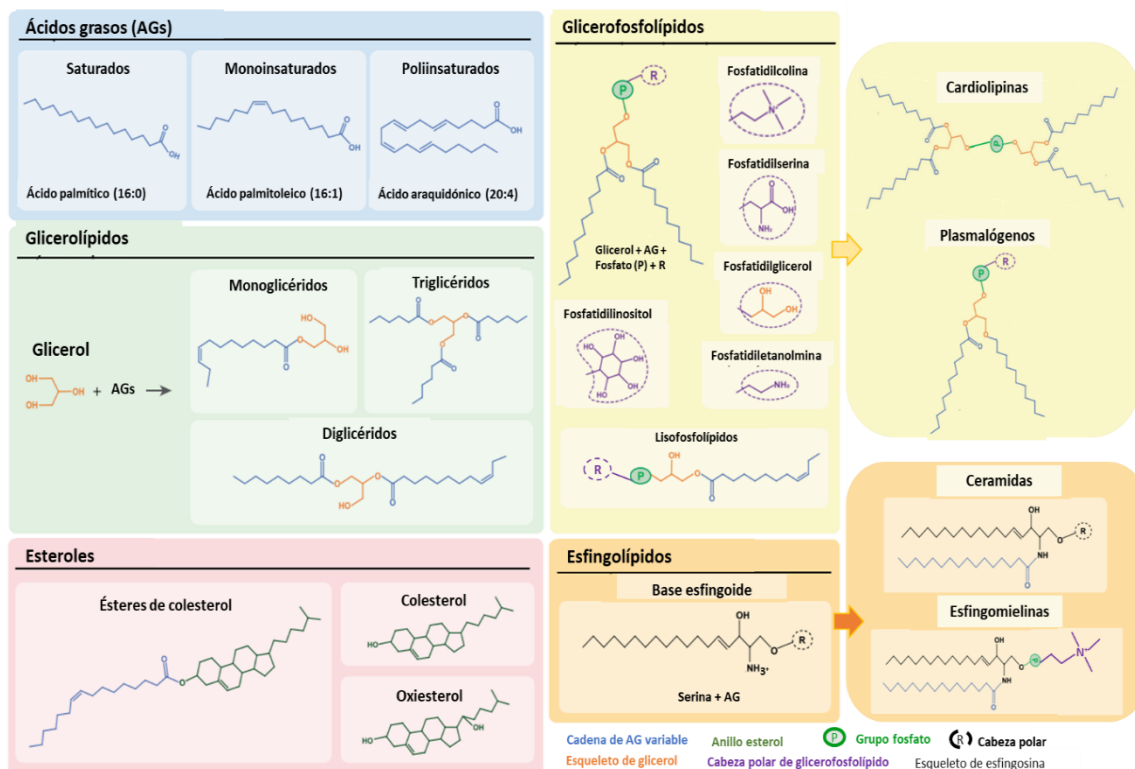


Figura 12. Principales clases de lípidos que forman el lipidoma humano. Adaptado de Agrawal et al, 2022.

El **metabolismo de lípidos** constituye un proceso que implica la síntesis de una gran variedad de clases de lípidos estructurales y funcionales, así como su posible captación, almacenamiento y uso dentro de la célula. Se encuentra en un constante estado de equilibrio dinámico: algunos lípidos están siendo constantemente oxidados para satisfacer las necesidades metabólicas del organismo (lipólisis), mientras que otros están siendo sintetizados (lipogénesis), almacenados o utilizados para formar lípidos complejos. El equilibrio entre estos procesos es crucial para mantener la homeostasis energética y la funcionalidad celular²⁵⁵. En este sentido, la síntesis de lípidos describe los procesos que convierten los C derivados de nutrientes en FAs. Los FAs son los componentes principales de varias especies de lípidos complejos y su biosíntesis, en el citoplasma y el retículo endoplasmático de la célula, es esencial para el correcto funcionamiento celular. El metabolismo de lípidos desempeña un papel clave en un amplio abanico de procesos biológicos y está regulado por numerosas proteínas señalizadoras, transportadores y reguladores.

Durante el **transcurso de la EMT** se requiere una mayor fluidez de la membrana plasmática y la desestabilización de los “lipid rafts”, así como cambios en el lipidoma de gran cantidad de especies de lípidos pertenecientes a diferentes clases²⁵⁶. De ahí la importancia de comprender cómo las células cancerosas **reprograman su metabolismo de lípidos para promover o mantener la EMT**. Especialmente aquellas enzimas y transportadores que finalmente delimitan los niveles intracelulares de las principales clases de lípidos, que a su vez dirigen la señalización lipídica y la disponibilidad de lípidos para sintetizar estructuras celulares o servir como fuente

de energía. **Estas dependencias metabólicas podrían ser una nueva vía terapéutica para prevenir, retrasar o revertir la EMT**, disminuyendo la migración celular y la resistencia a fármacos.

3.2.2 Remodelación del metabolismo lipídico durante la EMT

El programa transcripcional que subyace a la EMT es capaz de influir sobre una enorme variedad de vías de señalización que son activadas por diferentes estímulos dinámicos, como las citoquinas, la hipoxia y la matriz extracelular. **El metabolismo de los lípidos está vinculado a la EMT** mediante la regulación de múltiples vías de señalización que modifican la acción de transportadores de lípidos y enzimas encargadas de su síntesis/degradación y determinan las concentraciones finales de las diferentes clases de lípidos que pueden acompañar al programa EMT. A continuación, se revisa cómo estos cambios en el lipidoma pueden desempeñar un papel clave en el programa de EMT. Concretamente, se hará referencia a vías de señalización específicas y se las relacionará con cambios en enzimas y transportadores, así como cambios en las principales clases de lípidos. Además, debido al importante papel de las proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBPs) como reguladores maestros del metabolismo lipídico, resulta conveniente analizar en profundidad la conexión entre las SREBPs y la EMT.

3.2.2.1 Lipogénesis y metabolismo de ácidos grasos en la EMT

Los FAs son los componentes principales de varias especies de lípidos complejos, incluidos los fosfolípidos, los SLs y los TGs. El metabolismo alterado de los FAs está recibiendo un renovado interés en el cáncer ya que, además de su papel principal como componentes estructurales de la matriz de la membrana, los FAs también son importantes mensajeros y pueden servir como combustible para la producción de energía²⁵⁷. Los FAs pueden obtenerse mediante captación exógena o sintetizarse *de novo* mediante el uso de nutrientes, principalmente glucosa, pero también otros como la glutamina y el acetato, entre otros (**Figura 13**).

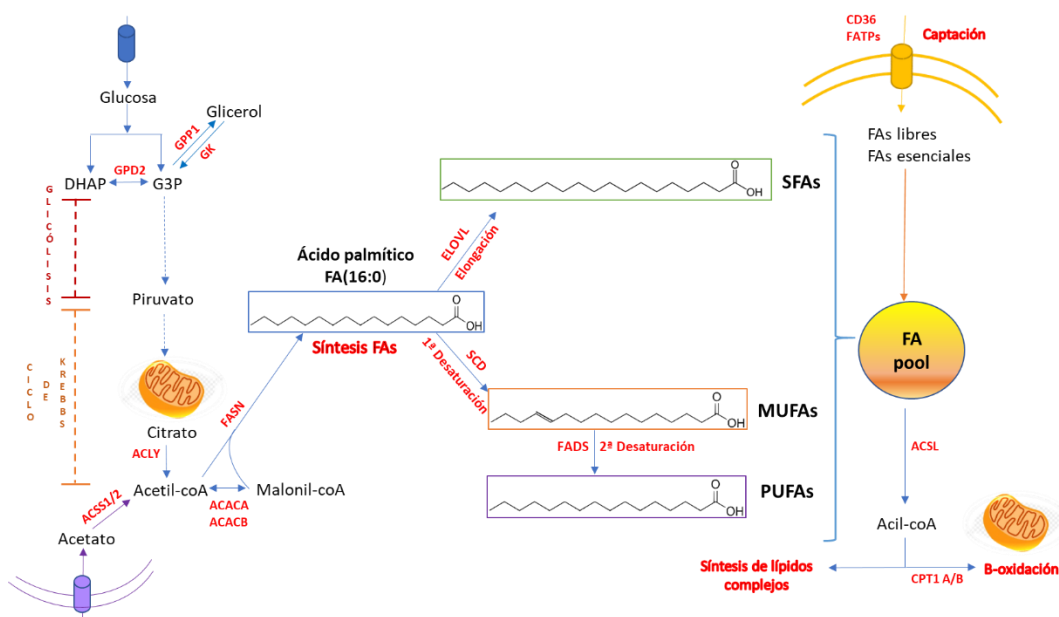


Figura 13. Representación esquemática del metabolismo y síntesis de ácidos grasos (lipogénesis).

El primer paso en la lipogénesis implica la entrada de glucosa en la célula, la principal fuente de carbono en la síntesis de FAs, a través de transportadores de la familia GLUT. Dentro del citoplasma, la glucosa se metaboliza a través de la glicólisis, convirtiéndose en dos moléculas de piruvato que son transportadas a la mitocondria donde tiene lugar la fosforilación oxidativa (ciclo de Krebs). Durante este proceso, se forma citrato que es transportado al citoplasma y convertido a acetil-CoA por acción de la ATP citrato liasa (ACLY). A continuación, se produce la conversión de acetil-CoA en malonil-CoA por las enzimas acetil-CoA carboxilasas (ACACA/B), seguida de la adición secuencial de unidades de 2C en forma de acetil-CoA que se condensan y reducen de forma iterativa en una serie de reacciones catalizadas por la enzima ácido graso sintasa (FASN). Este proceso tiene lugar hasta que la cadena de FAs madura dando lugar al primer ácido graso saturado: el ácido palmítico constituido por una cadena de 16C²⁵⁵. El acetil-CoA también puede generarse a partir del acetato por la enzima acetil-CoA sintetasa (ACSS1/2)²⁵⁸.

Una vez formado, el ácido palmítico puede sufrir dos procesos distintos:

- **Elongación:** consiste en la extensión de las cadenas de los FAs mediante la adición de unidades de 2 carbonos derivados de malonil-CoA a la cadena ya existente. Este proceso permite la formación de FAs de cadena larga y muy larga por acción de un conjunto de enzimas especializadas, principalmente las pertenecientes al complejo elongasa (ELOVL1-7).
- **Insaturación:** consiste en la introducción de dobles enlaces en las cadenas de ácidos grasos saturados (SFAs) dando lugar a ácidos grasos monoinsaturados con un solo doble enlace (MUFAs) o ácidos grasos poliinsaturados con más de 1 doble enlace (PUFAs). Las principales enzimas implicadas en la insaturación de FAs son las desaturasas. La formación de MUFAs implica la introducción del primer doble enlace por acción de la familia de estearoil-CoA desaturasas (SCD1/SCD5). A continuación, la formación de PUFAs implicaría la introducción de otro doble enlace en los MUFAs ya formados, en este caso mediado por la acción de la familia de desaturasas FADS (FADS1-6).

Los MUFAs y PUFAs generados también pueden sufrir procesos de elongación. Este pool de FAs generado sirve como sustrato para la síntesis de gran cantidad de lípidos complejos. Para ello, estos FAs deben ser convertidos previamente a su forma activada, acil-CoA, mediante la acción de la familia de enzimas acil-CoA sintetetas (ACSL)^{255,259}. Por otro lado, los FAs también pueden ser captados del medio de forma exógena por difusión pasiva o a través de transportadores como CD36 y proteínas de transporte de FAs (FATP1-6). Esto resulta de gran importancia puesto que existen FAs esenciales, como el linoleico (18:2n6) o el γ -linolénico (18:3n3), que el organismo es incapaz de sintetizar y deben adquirirse de forma exógena de esta manera. Una vez dentro de la célula, los FAs, pueden además de ayudar en la biosíntesis de otras moléculas, entrar en la mitocondria para, mediante una serie de reacciones secuenciales, oxidarse y obtener energía para otros procesos celulares²⁵⁵.

Estudios recientes han relacionado el **metabolismo de FAs con el proceso de EMT**. En células de cáncer de mama, las células epiteliales mostraron una mayor expresión de enzimas relacionadas con la síntesis de FAs *de novo* y acumulación de MUFA en comparación con las células mesenquimales. Por el contrario, las contrapartes mesenquimales mostraron una lipogénesis reducida, niveles más altos de PUFA, incorporación preferencial de FA exógenos en TGA y un aumento en la formación de LDs²⁵⁷ que se acompaña de una regulación negativa de la expresión de enzimas de síntesis de FA *de novo* como ACLY, ACC y FASN²⁶⁰. En este sentido, la

alteración del equilibrio entre MUFA y PUFA, resultado de la alteración de la expresión de las diferentes desaturasas por diferentes EMT-TF (p.ej. ZEB1), es de gran importancia durante el transcurso de la EMT ya que tiene un profundo impacto en las propiedades biofísicas de todos los lípidos y es capaz de regular aspectos críticos de las propiedades de las membranas celulares²⁶¹. En cuanto a transportadores, el aumento de las actividades de CD36 y FABP1/4 conduce a la acumulación de FAs, lo que a su vez puede promover la progresión metastásica, a través de la activación transcripcional de la EMT en algunos tipos de cáncer, como el HCC²⁶² y el cáncer colorrectal²⁶³.

Aparte del gran efecto del conjunto de FAs en la inducción de EMT, hay especies específicas que son particularmente relevantes, entre ellas, se ha demostrado que el ácido palmítico induce EMT en células HCC activando las vías de señalización Wnt/ β -catenina y TGF- β ²⁶². Los adipocitos co-cultivados con células cancerosas promueven la EMT y la invasión mediante la regulación de la oxidación de los FAs mitocondriales a través de MAPK²⁶⁴. En las células de cáncer de mama, el ácido linoleico (LA) induce una regulación negativa transitoria de la E-cadherina al aumentar los represores transcripcionales de la E-cadherina (SNAIL, SIP y TWIST) a través de una vía dependiente de NF- κ B, que también regula la VIM y la expresión de MMP-2 y MMP-9. La EMT inducida por LA también se promueve mediante la activación independiente de dos receptores acoplados a proteína G (FFAR1 y GPR120)²⁶⁵. En el cáncer de próstata, se observó el efecto opuesto: el LA suprime la migración inducida por TGF- β dependiente de ZEB1 y exhibe un efecto "anticancerígeno" al reducir la entrada de Ca^{2+} . Este efecto puede alterar el complejo de canales SK3- Ca^{2+} de los "lipid rafts", lo que puede conducir a una disminución en la entrada de Ca^{2+} dependiente de SK3 y en la migración celular²⁶⁶. Otros estudios sugieren que el ácido araquidónico (AA) o sus productos metabólicos, como las prostaglandinas y los leucotrienos, podrían estimular la migración y la EMT en algunos tumores y líneas celulares cancerosas²⁶⁷⁻²⁷⁰. Después de la exposición a AA, las células cancerosas disminuyen la expresión de E-cadherina mientras que aumentan la expresión de *CDH2* y *VIM*, la secreción de MMP-9 y la activación de NF- κ B²⁶⁹. Además, el AA también puede inducir la entrada de Ca^{2+} , lo que conduce a la migración celular y la metástasis²⁷¹. También se ha informado que los PUFA como el ácido docosahexaenoico (DHA) pueden conducir a la estabilización de los "lipid rafts" y cambios en la fluidez de la membrana, afectando así a la adquisición de características EMT, invasión y características similares en células colorrectales y leucémicas humanas²⁵⁶. En este sentido, se ha demostrado que otro PUFA, el ácido eicosapentaenoico, modula los efectos inflamatorios de la señalización de NOTCH1 durante la EMT^{272,273}. Estos hallazgos sugieren que algunos PUFA (dietéticos o no) pueden tener actividad anticancerígena y podrían convertirse en un adyuvante en la terapia contra el cáncer. El tratamiento de células tumorales epiteliales con ácido valproico (VPA), un ácido graso de cadena ramificada corta, puede inducir EMT en ciertas células cancerosas, con una regulación positiva de factores EMT como ZEB1, ZEB2 o SLUG (SNAIL2)²⁷⁴. El VPA aumenta la expresión de genes relacionados con la EMT, promueve la migración y aumenta el porcentaje de células CD24-/CD44+²⁷⁵. Recientemente se ha descubierto que el ácido graso insaturado sapienato (16:1n10), sintetizado a través de un proceso de insaturación alternativo de la enzima ácido graso desaturasa 2 (FADS2), desempeña un papel esencial en la migración del melanoma mediante la regulación de la fluidez de la membrana y composición de las LDs. En consecuencia, la inhibición de FADS2 suprime la migración del melanoma *in vitro* y la metástasis *in vivo*²⁷⁶.

3.2.2.2 Metabolismo de Glicerolípidos y la EMT

La síntesis de glicerolípidos tiene lugar mediante la adición de FAs, en forma de acil-CoAs, a un esqueleto de glicerol-3-fosfato (G3P), el cual procede del glicerol por acción de la glicerol quinasa (GK) o de una molécula de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) por acción de la glicerol-3-fosfato dehidrogenasa (GPD1/2). La primera adición de FAs es catalizada por la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) resultando en la formación de ácido lisofosfatídico (LPA) mientras que la segunda adición es catalizada por la acilglicerol aciltransferasa (AGPAT) dando lugar al ácido fosfatídico (PA). En este punto, el grupo fosfato es eliminado por acción de la lipina 1 (LPIN1) para generar DGs. Finalmente, un tercer FA es añadido por las enzimas diacilglicerol aciltransferasas (DGAT1/2) para formar TGs²⁵⁹. Estos TGs son almacenados en las llamadas LDs. La degradación de los TG intracelulares comienza por su hidrólisis para formar DG por la enzima triglicérido adiposo lipasa (PNPLA2). Estos DGs pueden hidrolizarse de nuevo dando lugar a monoglicéridos (MGs) por la diacilglicerol lipasa (DAGL). Finalmente estos MGs pueden ser hidrolizados liberando el esqueleto de glicerol y FAs libres por la lipasa de monoglicéridos (MGLL)²⁵⁹(**Figura 14**).

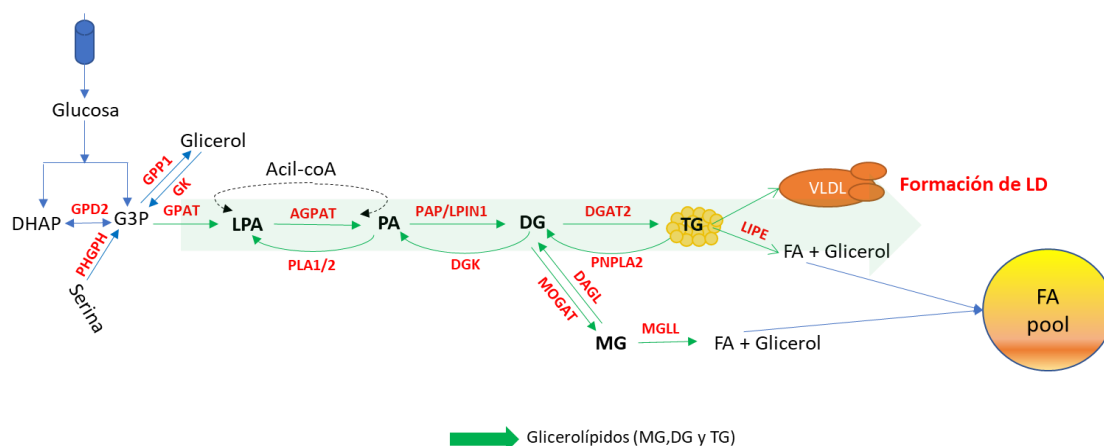


Figura 14. Representación esquemática del metabolismo y síntesis de glicerolípidos.

Los TGs son los principales constituyentes de la familia de los glicerolípidos y los FAs son los principales componentes básicos de la síntesis de TGs. Por tanto, los TGs contienen cadenas de acilo que pueden tener diferentes longitudes y grados de insaturación, lo que da lugar a cientos de especies químicamente distintas. Su función principal en las células es almacenar el exceso de FAs y se encuentran principalmente en las LDs. Se ha reportado una acumulación significativa de LDs ricas en TG en células cancerosas sometidas a un programa de EMT después del tratamiento con TNF α y TGF- β y que estaban enriquecidas en PUFAs²⁷⁷. Recientemente se observó que la señalización autocrina de TGF- β 2, que favorece la formación de LDs, representa uno de los mecanismos que respaldan la invasividad de las células cancerosas²⁷⁸. Además, se observó que, al prevenir la movilización de FAs de las LDs, se puede inhibir la propagación metastásica a distancia. En un estudio bastante detallado en células de cáncer de mama, las células mesenquimales incorporaban significativamente FA exógenos radiomarcados en lípidos neutros con una sobreexpresión significativa y una mayor actividad de un conjunto de enzimas involucradas en la formación de TG y LDs²⁶⁰. En esta línea, en otro trabajo realizado en cáncer de mama, antes de la inducción de EMT en células epiteliales, la síntesis de TG a partir de glucosa en LDs aumentó significativamente como lo demuestra la mayor incorporación de glucosa marcada en TGs. Además, la síntesis *de novo* de FA a partir de glucosa se reduce

significativamente, lo que puede deberse a su reducida tasa de proliferación²⁷⁹. Por lo tanto, estos dos resultados sugieren que la acumulación de LDs en las células mesenquimales es causada por ambos: un aumento en la absorción de FA exógenos que se emplean para la síntesis de TG y una mayor contribución de glucosa a la síntesis del esqueleto de TG²⁷⁹.

3.2.2.3 Metabolismo de Fosfolípidos y la EMT

Los glicerofosfolípidos (o fosfolípidos) son los principales constituyentes de las membranas y son sintetizados a partir de PA y DG. Las fosfatidilcolinas (PCs) pueden ser sintetizadas *de novo* a través de la “Kennedy pathway” condensando la colina con una molécula de citidina trifosfato (CTP) dando lugar a citidil difosfato-colina (CDP-Cho) que finalmente se condensa con un DG para formar el PC. De forma alternativa, estos PCs pueden ser sintetizados por metilación de las fosfatidiletanolaminas (PEs) por acción de la enzima fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT).

Estos PEs pueden ser sintetizados *de novo* por la “Kennedy pathway” en este caso por condensación con etanolamina y posterior condensación con un DG. En la misma línea, estos PEs pueden ser obtenidos de forma alternativa por descarboxilación de las fosfatidilserinas (PSs). Las PSs son sintetizadas a partir de PEs o PCs por diferentes fosfatidilserina sintasas. Por otro lado, los fosfatidilinositoles (PIs) y fosfoglicéridos (PGs) son sintetizados por la CDP-diacilglicerol sintasa 1 (CDS1) tras la activación de una molécula de PA con una molécula de CTP dando lugar a CDP-DG. Este CDP-DG se condensa con una molécula de inositol por la fosfoinositol sintasa (PIS) para formar PIs que son precursores de los fosfoinositoles-fosfato (PIPx), importantes lípidos involucrados en señalización celular. Por el contrario, este CDP-DG puede condensarse con una molécula de G3P para formar fosfatidilglicerol fosfato (PG-P) que posteriormente se defosforila por la acción de la fosfatasa de mitocondrias (PTPMT) para generar el PG. Un paso adicional es necesario para la síntesis de cardiolipinas (CLs) e implica la condensación de otra molécula de CDP-DG a los PGs formados²⁵⁵ (**Figura 15**).

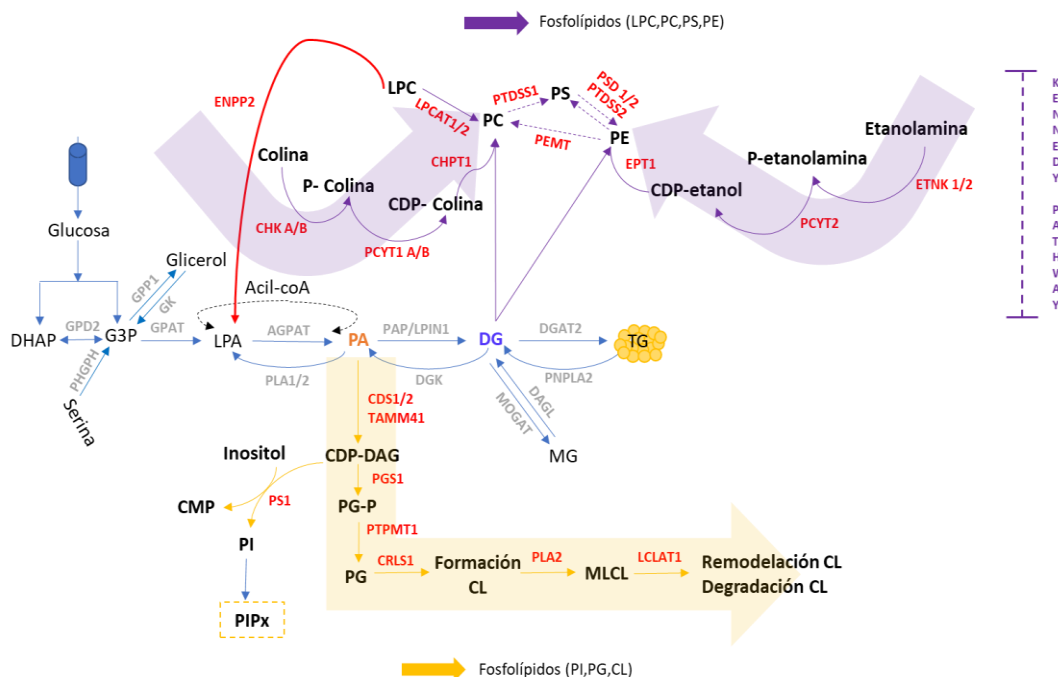


Figura 15. Representación esquemática del metabolismo y síntesis de fosfolípidos.

La estructura de los fosfolípidos se basa en un esqueleto de glicerol unido a dos colas de FAs y un grupo fosfato, que puede estar sustituido o no (ácido fosfatídico) con diferentes grupos polares (colina, etanolamina, serina, glicerol e inositol). Entre ellos, los fosfatidilinositoles (PI) pueden fosforilarse secuencialmente en el anillo de inositol para formar un conjunto de diferentes fosfoinositoles fosfato (PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(3,5)P₂, PI(3,4)P₂, PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₃). La desregulación del metabolismo del PI se ha relacionado con la activación del programa EMT. La falta de SAC1 en las células de cáncer de mama, una fosfatasa de PI(4)P, conduce a niveles elevados de PI(4)P en el aparato de Golgi, lo que se ha asociado con una disminución de las proteínas de adhesión célula-célula (E-cadherina y β -catenina), evento que podría ser compatible con las primeras etapas de la EMT. Sin embargo, la acumulación de PI(4)P parece ser una condición necesaria pero no suficiente para completar la EMT²⁸⁰. Otro PL que se ha relacionado con la EMT es el PI(4,5)P₂, que se encuentra principalmente en la membrana plasmática donde es producido por la enzima fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinasa-I-gamma (PIPKI γ). La generación espacial y temporal de PI(4,5)P₂ es crucial para la activación de EMT, ya que la migración celular, la formación de uniones adherentes y focales, así como el tráfico de E-cadherina y la endocitosis son mecanismos dependientes de PI(4,5)P₂^{281,282}. Además, PI(4,5)P₂ puede modular indirectamente la señalización de Ca²⁺ mediante la hidrólisis de su producto, IP₃, que es producido por PLC en respuesta a múltiples estímulos externos. La unión de IP₃ a IP₃R promueve la liberación de Ca²⁺ desde el retículo endoplasmático al citoplasma, lo que puede promover la EMT en ciertos tipos de cáncer como el cáncer de mama²⁸³. Paralelamente, los aumentos de DG, el otro subproducto de la hidrólisis de PI(4,5)P₂, pueden activar la señalización de PKC, que también se ha asociado con EMT, migración celular y metástasis²⁸⁴. A pesar de que estos hallazgos resaltan el papel de los PIs en la adquisición y el mantenimiento de rasgos mesenquimales en las células EMT, se necesita más trabajo para comprender completamente los mecanismos subyacentes.

En cuanto al resto de clases de fosfolípidos, su estudio en el contexto de la EMT y el cáncer es un campo relativamente poco explorado además de presentar una gran variabilidad y una fuerte dependencia del contexto celular. En células de cáncer de mama con propiedades mesenquimales caracterizadas por la sobreexpresión de *ZEB1*, se observó un aumento en las especies de PE (18:0/20:4) y PE (18:0/22:4) acompañado de una disminución en PI (18:1/18:1), lo que tiene implicaciones en la sensibilidad a ferroptosis. Finnue et al. estudió la reprogramación lipídica de líneas epiteliales de cáncer de mama tras haber experimentado una EMT. Las líneas mesenquimales se caracterizaron por presentar niveles significativamente mayores de PCs y PEs en comparación con el fenotipo epitelial, mientras que los niveles de los plasmalógenos asociados (PCp y PEp) estaban significativamente reducidos en el fenotipo mesenquimal.²⁸⁵

3.2.2.4 Metabolismo de Esfingolípidos y la EMT

La síntesis de SLs comienza con la condensación de una molécula de serina y un FA para formar 3-ketoesfingánina por la acción de la serina palmitoil transferasa (SPT). A continuación, esta molécula se reduce a esfingánina para dar lugar a diferentes bases esfingoides (Sph). Entonces, la adición de diferentes FAs a estas Sph por acción de la ceramida sintasa (CERS) genera dihidroceramidas, las cuales sufren procesos de insaturación por las desaturasas de dihidroceramidas (DEGS1/2) para generar diferentes especies de ceramidas (Cer). Alternativamente, estas Sph pueden ser fosforiladas para dar lugar a esfingosinas fosfato (SphK) por la esfingosina quinasa (SPHK)^{255,259} o pueden ser sometidas a procesos de insaturación para formar esfingéninas por acción de DEGS1/2. Recientemente, se ha reportado que estas

esfingeninas pueden sufrir un proceso de insaturación adicional para formar esfingadieninas. Este segundo paso de insaturación estaría mediado por la enzima ácido graso sintasa 3 (**FADS3**), una desaturasa perteneciente a la familia FADS de la que apenas se conoce su función específica.

A partir de estas Cer, se pueden obtener diferentes SLs como esfingomielinas (SM), ceramidas fosfato (CerP), esfingosinas o glicosfingolípidos. Para la generación de SM, es necesaria la transferencia del grupo P-Colina de un PC a la Cer por la acción de la SM sintasa (SMS). Por otro lado, estas Cer pueden ser fosforiladas para formar CerP por la ceramida quinasa (CERK). Además, las Cer también pueden ser hidrolizadas a esfingosinas por acción de ceramidasa (CDasa). Finalmente, estas Cer pueden ser glicosiladas para formar una amplia variedad de glicosfingolípidos²⁵⁵ (**Figura 16**).

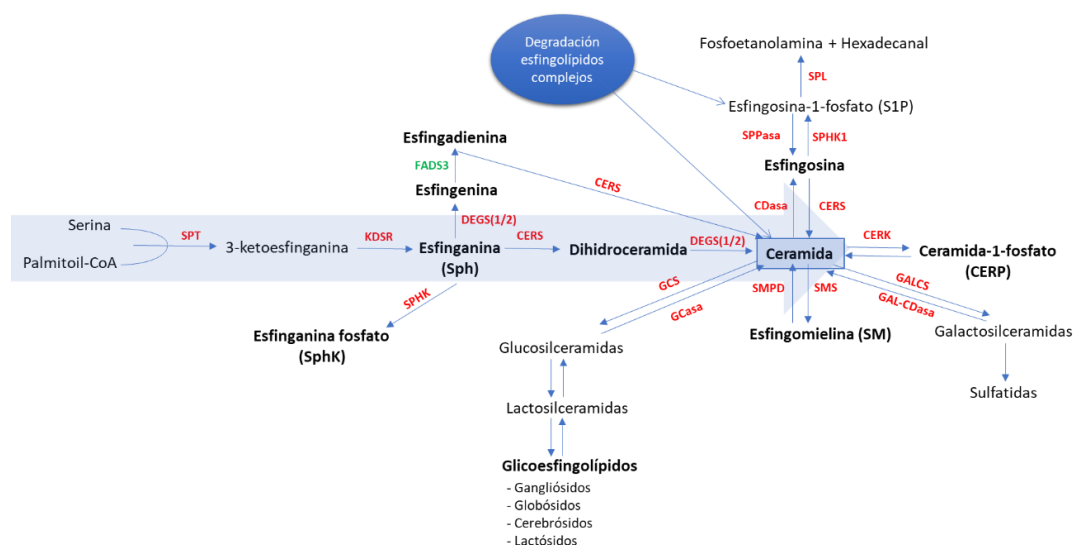


Figura 16. Representación esquemática del metabolismo y síntesis de esfingolípidos.

Los SLs son lípidos que contienen bases esfingoides en las que la base esfingoide es susceptible de ser modificada por enzimas específicas. En esta familia de lípidos, existen efectores importantes que incluyen las Cer y sus derivados Sph y SM. Los SL son un componente estructural de las membranas celulares con funciones importantes en el reconocimiento y la señalización celular²⁸⁶. Existe evidencia de que la maquinaria de los SLs juega un papel fundamental en el mecanismo básico del programa de EMT porque la desregulación del metabolismo de los SLs puede alterar la fluidez de la membrana y la motilidad celular junto a otros lípidos. En un enfoque integrador, una firma asociada a SLs/EMT fue capaz de diferenciar las células epiteliales de CP de aquellas sometidas a EMT que se caracterizaban por niveles reducidos de Cer celular acompañados de un aumento paralelo en la S1P celular²⁸⁷. Varios estudios apoyan la correlación entre niveles bajos de Cer y la activación de la EMT. La administración exógena de Cer puede restaurar los niveles de E-cadherina en células sometidas a inhibición de PKC²⁸⁸. En cuanto a las especies de Cer, la reducción de los niveles de Cer 16:0, debido a la regulación negativa de CerS6, se asocia con la EMT y con un aumento la fluidez de la membrana y la motilidad celular. Por tanto, la reducción de Cer, especialmente Cer 16:0, está asociada al proceso de EMT²⁸⁹. La Cer se puede metabolizar en varios otros lípidos como glucosilceramidas, esfingosinas, Cer-1-fosfato y SM, entre otros. La glucosilceramida (GlcCER) sintasa convierte la Cer en glucosilceramida y su inhibición disminuye la E-cadherina pero aumenta la VIM y la migración celular en células epiteliales²⁹⁰. TGF- β altera la composición de los glicosfingolípidos; en particular, reduce los niveles de gangliotetrasilceramida Gg4, lo que

sugiere una estrecha asociación de los glicosfingolípidos con el proceso de EMT²⁹⁰. Además, la adición de Gs4 es capaz de revertir el fenotipo EMT inducido por TGF- β , interactuando con moléculas epiteliales como E-cadherina y β -catenina para mantener la organización de la membrana celular epitelial²⁹¹.

Además del papel de las Cer y los gangliósidos, muchos estudios informan sobre la participación de la esfingosina-1-fosfato (S1P) en la EMT. S1P es un mediador lipídico bioactivo, generado por esfingosina quinasa (SPHK1 y SPHK2), que ejerce sus efectos principalmente uniéndose a los 5 receptores S1P1-S1P5. Se ha observado que células con un fenotipo mesenquimal tienen mayores niveles de S1P. En CPNM, se ha sugerido que la esfingosina se metabolizaría preferentemente a S1P debido a sobreexpresión de SPHK1 durante la EMT²⁸⁷ y su silenciamiento es capaz de disminuir los niveles de VIM y aumentar los de E-cadherina. S1P puede regular rápidamente la expresión de *SNAIL2* en células de cáncer de mama mediante la activación de receptores afines S1P2 y S1P3 que promueven la invasión celular mediada por EMT. Además, la acumulación de S1P en el carcinoma hepatocelular activa la vía de señalización PI3K/AKT, lo que da como resultado una regulación positiva de metaloproteasas, como MMP7, con el consiguiente aumento en la producción de TGF- β 1 y la inducción de EMT²⁹².

3.2.2.5 Metabolismo de Esteros y la EMT

Los esteroides son lípidos policíclicos derivados del esterano y constituyen importantes elementos estructurales tanto de membranas ("lipid rafts") como de otros componentes lípidos. En este sentido, el colesterol es el esteroide más común en tejidos animales y puede utilizarse para sintetizar hormonas y ácidos biliares²⁹³. Su síntesis comienza con la condensación de tres moléculas de acetil-CoA para formar hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) el cual se reduce para formar mevalonato. Entonces, a través de una serie de reacciones catalizadas por diferentes enzimas, el mevalonato es convertido finalmente en colesterol. Este colesterol puede ser esterificado con un FA procedente de la hidrólisis de un fosfolípido para formar ésteres de colesterol (CEs)^{255,259} y es transportado a lipoproteínas de alta y baja densidad (HDL y LDL) donde resulta clave en la formación de la estructura de estas vesículas lipídicas (**Figura 17**).

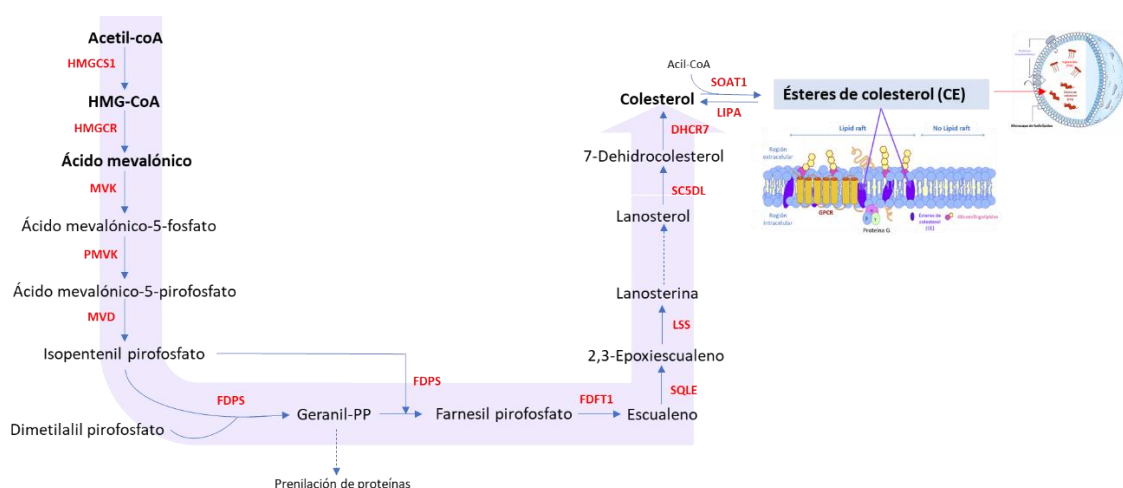


Figura 17. Representación gráfica del metabolismo y síntesis de colesterol y ésteres de colesterol.

La vía del mevalonato es una vía metabólica altamente conservada para producir esteroides e isoprenoides que son esenciales para el crecimiento tumoral. La expresión de los genes de la vía del mevalonato está controlada por el factor de transcripción SREBP, que es crucial para la producción de colesterol, uno de los principales componentes de la membrana plasmática de las células²⁹⁴. Dado que las células epiteliales sometidas a EMT aumentan los niveles de colesterol, se ha asociado una mayor actividad de la vía del mevalonato con la EMT^{295–297}. El colesterol puede promover la adquisición de rasgos mesenquimales a través de la desestabilización de los “lipid rafts” que, en última instancia, afecta la fluidez y contribuye a la diseminación metastásica²⁹⁸. Además, la estabilidad de los “lipid rafts” también juega un papel importante en la activación de la vía de las MAPK quinasas mediada por TGF- β y en la distribución de EGFR, que puede promover la EMT y la resistencia mediada por EMT²⁹⁹. En el cáncer de mama, se ha demostrado que la reducción del colesterol mitigó el fenotipo EMT, disminuyó la VIM y aumentó la E-cadherina, a través de la inhibición de la vía de señalización de TGF- β /Smad³⁰⁰. En consecuencia, las células mesenquimales son sensibles al tratamiento con estatinas, lo que también reduce la fluidez de la membrana y la capacidad migratoria, confirmando la importancia del metabolismo del mevalonato en la EMT²⁹⁷. Además, los metabolitos derivados del colesterol, como el 27-hidroxicolesterol, también se han asociado con la EMT mediante la activación del receptor X del hígado (LXR), que induce la expresión de *VIM* y cambios morfológicos similares a la EMT en las células de cáncer de mama³⁰¹.

En definitiva, la reprogramación lipidómica es un fenómeno intrincado y bien documentado que se asocia con la EMT en diferentes tipos de cáncer incluido el CPNM. A lo largo de los años, se han acumulado numerosas evidencias que respaldan la alteración en la composición y función de los lípidos en células que han experimentado la EMT, lo que contribuye a su capacidad invasiva y metastásica (**Figura 18**).

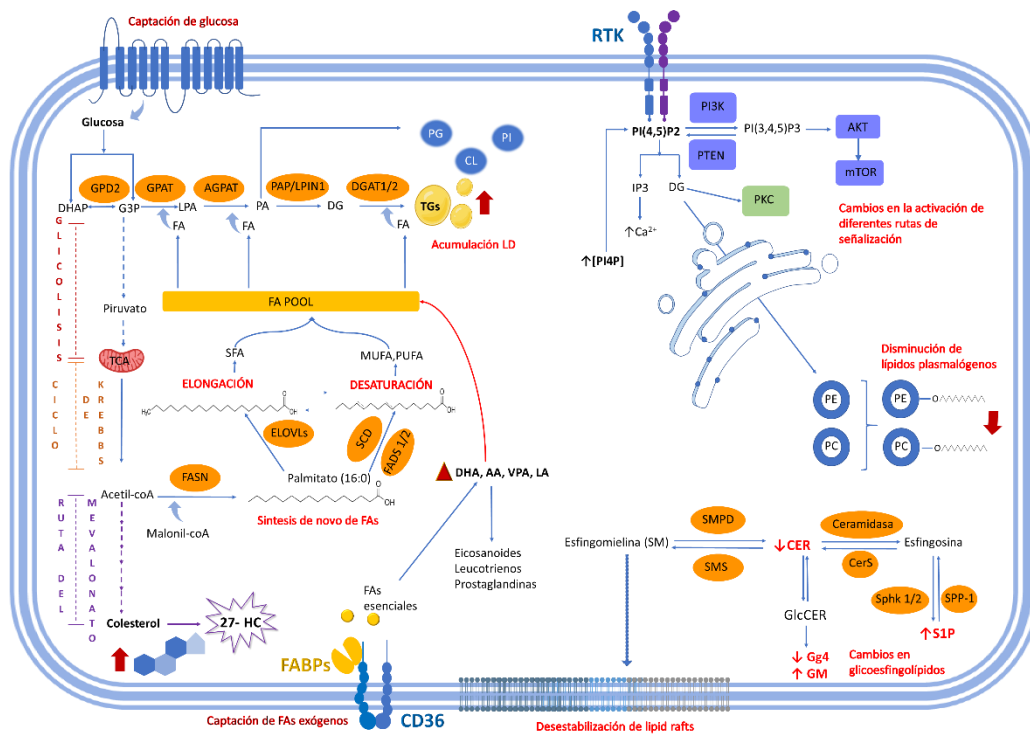


Figura 18. Representación gráfica de los cambios lipidómicos asociados a la activación del programa EMT.

3.2.2.6 Proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides

Las proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBPs), incluidas SREBP1a, SREBP1c y SREBP2, son reguladores maestros del metabolismo de lípidos. SREBP1 regula principalmente la síntesis de fosfolípidos, FAs y TGs, mientras que SREBP2 controla la expresión de genes implicados en la síntesis de colesterol³⁰². La actividad de las diferentes isoformas de SREBP está controlada por la “SREBP cleavage-activating protein” (SCAP). Cuando el colesterol es abundante, las SREBPs permanecen en el retículo endoplásmico asociadas a SCAP y a la proteína de retención del retículo endoplásmico, la proteína de señalización de la insulina (Insig). En un entorno relativamente pobre en colesterol, SCAP se disocia de Insig, dando lugar a la liberación del complejo SREBP-SCAP del retículo endoplásmico para ser activado por proteólisis³⁰³. Los SREBPs regulan los procesos lipogénicos mediante la unión de elementos reguladores SREBP (SREs) y secuencias E-box a los promotores de sus genes diana, incluyendo *ACLY*, *ACCA/B*, *FASN* y *SCD1*. La activación aberrante de los SREBPs y la inducción de sus genes diana se han implicado en el desarrollo del cáncer y la EMT³⁰⁴. La sobreexpresión de *PD-L1* es capaz de inducir un aumento de la vimentina y una disminución de la E-cadherina, potenciando el crecimiento del cáncer, la migración y la invasión de células de carcinoma renal mediada por la activación de SREBP1c³⁰⁵.

3.2.2.7 Enzimas asociadas a lípidos y transportadores vinculados a la EMT

Las concentraciones de lípidos intracelulares están determinadas por la acción combinada de enzimas relacionadas con los lípidos (síntesis y degradación) así como aquellas relacionadas de su captación y transporte. A continuación, se revisan en profundidad aquellas enzimas y transportadores más importantes en el metabolismo de lípidos que han mostrado una conexión directa con la EMT.

ATP citrato sintasa (ACLY)

La enzima ACLY vincula el metabolismo de la glucosa con la síntesis de lípidos mediante la conversión de citrato citoplasmático para producir oxaloacetato y acetil-CoA. *ACLY* se sobreexpresa y activa en varios tipos de cáncer, por lo que su abordaje terapéutico es cada vez más relevante^{306–309}. Se ha demostrado que las deficiencias de ACLY revierten la EMT tanto en células de cáncer de colon como de pulmón^{310,311}. ACLY estabiliza y transloca la β -catenina al núcleo, promoviendo la capacidad de migración e invasión de las células de cáncer de colon. En el caso de las células de CP, también se ha demostrado que una baja actividad de ACLY aumenta la E-cadherina y altera la vía PI3K/AKT al disminuir AKT. Además, la deficiencia de ACLY en combinación con el tratamiento con estatinas muestra efectos antitumorales y dicho efecto puede rescatarse parcialmente mediante la suplementación con acetato y tratamiento con citrato³¹¹. También se ha demostrado que la eliminación de ACLY reduce las propiedades de las células madre asociadas con la EMT en células de CP mutadas en *KRAS* y *EGFR* y en células de cáncer de mama con activación de H-Ras³¹². La conexión de ACLY con la EMT se ha confirmado mediante el uso de un inhibidor de ACLY (hidroxicitrato), que demostró que la actividad de ACLY es fundamental para mantener las propiedades de las células madre y la EMT³¹². La exposición a partículas finas ambientales (PM_{2.5}) se asocia tanto con una mayor incidencia de CP³¹³ como con la inducción de la EMT en las células epiteliales bronquiales humanas, lo que se acompaña

de un aumento en la expresión de *ACLY* y los niveles de citrato. Además, la eliminación de *ACLY* anula significativamente la capacidad de metástasis *in vivo* de estas células³¹⁴.

Acetil-CoA carboxilasa (ACACA/B)

Las ACACA/B catalizan la carboxilación de acetil-CoA a malonil-CoA que se utiliza para la síntesis *de novo* de FA. Hay dos isoformas de ACAC: ACACA, localizado en el citosol y ACACB, localizado en la superficie mitocondrial. Recientemente, se ha sugerido que ACAC es un objetivo prometedor para inhibir el crecimiento tumoral mediante la regulación de alteraciones en el metabolismo de las células cancerosas^{315,316}. En el contexto de la EMT, un estudio en células de cáncer de mama ha sugerido que la inactivación de ACACA mediante la señalización de leptina o TGF- β promovió la invasión y la metástasis³¹⁷. Además, la inactivación de ACACA da como resultado una acumulación de acetil-CoA que puede participar en la regulación epigenética mediante la acetilación de SMAD2, un mediador de la señalización de TGF- β , tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*³¹⁷. Un estudio realizado en células del túbulo proximal del riñón también reveló que, en condiciones altas de glucosa, la síntesis de malonil-coA y TGs aumentaba mientras que la oxidación de los FAs se ralentizaba, lo que provocaba lipotoxicidad y una disminución de los niveles de E-cadherina que eventualmente favorece la EMT. Dicho efecto se atenuó cuando se silenció *ACACB*, previniendo así la EMT y mostrando cómo la acumulación de lípidos puede impulsar la EMT³¹⁸.

Ácido graso sintasa (FASN)

FASN cataliza la síntesis de palmítico (FA 16:0) a partir de acetil-CoA, malonil-CoA y NADPH. Esta enzima fundamental en la síntesis *de novo* de FAs es, con diferencia, la más estudiada en el cáncer. Se han informado niveles elevados de FAs debido a la sobreexpresión de *FASN* en muchos cánceres, incluidos el de próstata, mama y otros tipos de cáncer³¹⁹, donde la elevada actividad de FASN se correlaciona con agresividad clínica, mal pronóstico y resistencia a la terapia³²⁰. También se ha informado que FASN mantiene la pluripotencia *in vivo* de las CSC mediante la modulación de la expresión de proteínas del citoesqueleto³²¹. Se han asociado roles opuestos de FASN con la EMT, probablemente debido a la naturaleza dinámica del programa de EMT. Por un lado, se ha demostrado que la sobreexpresión de *FASN* induce EMT al aumentar los marcadores mesenquimales y al mismo tiempo disminuir los epiteliales (p. ej., E-cadherina) en células de cáncer de mama y en células metastásicas de carcinomas de ovario^{322,323}. Además, FASN también aumentó la capacidad de formar colonias en un ensayo de crecimiento independiente de anclaje³²³. En consecuencia, en experimentos en los que FASN pierde su función, la EMT se atenúa. En las células de CP resistentes al cisplatino, la inhibición farmacológica de FASN con cerulenina altera la EMT mediante una regulación negativa de los marcadores mesenquimales³²⁴. El TGF- β reduce la expresión de *FASN* en células sensibles a los fármacos, mientras que, en las células resistentes al cisplatino, el TGF- β aumenta los niveles de FASN. Este interesante hallazgo sugiere que el circuito de retroalimentación FASN-TGF- β 1 desempeña un papel clave en la regulación de lípidos en el transcurso del proceso de EMT/metástasis³²⁴. El vínculo entre FASN y EMT se ha demostrado mediante la sobreexpresión transitoria de miR-195, que disminuye los niveles de FASN y atenúa la EMT, la proliferación celular, la migración y la invasión en células de cáncer de mama³²⁵. Además, el silenciamiento de *FASN* disminuyó la invasión celular al atenuar el programa EMT en varios tipos de cáncer^{321,326,327}. Por el contrario, la inducción de la EMT mediada por TGF- β también se ha asociado con la inhibición de FASN y un mayor potencial metastásico en CPNM, lo que podría atribuirse a un cambio del anabolismo a la producción de energía para apoyar la invasividad³²⁸.

Se descubrió que estos efectos pro-invasivos estaban impulsados por la caveolina-1, una proteína de los “lipid rafts” implicada en varios aspectos de la progresión tumoral, incluida la EMT³²⁹.

Acil-CoA ligasa de cadena larga (ACSL)

ACSL cataliza la oxidación de FAs de cadena larga para producir acil-CoA, que es fundamental para la síntesis de fosfolípidos y TGs, la modificación de lípidos de proteínas y β -oxidación de los FAs. Los miembros de la familia ACSL incluyen cinco isoformas de ACSL diferentes (ACSL1, ACSL3, ACSL4-6). Cada isoforma utiliza diferentes sustratos, por ejemplo, ACSL1 usa oleato y linoleato, ACSL3 usa miristato, palmitato, araquidonato y eicosapentaenoato y ACSL4 araquidonato³³⁰. La evidencia acumulada muestra que ACSL1 y ACSL4 podrían promover la invasión y migración en las células cancerosas^{331–333}. En el contexto de las células de cáncer de colon, la expresión simultánea de *ACSL1*, *ACSL4* y *SCD1* se ha asociado con la EMT, aumentando la migración e invasión celular³³⁴. Recientemente, se ha propuesto que ACSL1 y ACSL4 pueden actuar sinérgicamente pero a través de diferentes fenotipos metabólicos: mientras que ACSL1 estimularía la invasión a través de una disminución de la respiración celular, ACSL4 promovería la proliferación y migración a través de un fenotipo más glicolítico³³³. Además, se ha reportado la sobreexpresión de *ACSL4* debido a ZEB1, lo que genera una mayor incorporación de PUFA a la síntesis de fosfolípidos y contribuye a mantener el fenotipo mesenquimal en líneas de cáncer de mama³³⁵. El eje CDPC1/ACSL3 disminuyó la abundancia de LDs y aumentó la oxidación de FAs en células de cáncer de mama triple negativo, lo que condujo a una disminución de lípidos contribuyendo a la migración y la metástasis³³⁶. En general, se ha propuesto que la activación combinada de ACSL junto con SCD contribuye a la EMT, la invasión del cáncer y la mala supervivencia de los pacientes con cáncer de colon en estadio II³³³.

Estearoil-CoA desaturasa (SCD) y ácido graso desaturasa (FADS)

Las enzimas SCD son acil-CoA desaturasas $\Delta 9$ localizadas en el retículo endoplásmico que catalizan la introducción de un doble enlace en la posición cis- $\Delta 9$ de las acil-CoA saturadas, convirtiendo SFA a MUFA³³⁷. En los tejidos humanos, existen dos isoformas de SCD: SCD1 y SCD5. La primera es la isoforma principal y prevalece en todos los tipos de células, con niveles más altos en el tejido adiposo, el cerebro, el corazón, el hígado y los pulmones. El silenciamiento de *SCD1* disminuye la fosforilación de GSK3, una quinasa involucrada en la EMT que tiene un efecto sobre la degradación de la β -catenina y altera la firma EMT a través de la regulación positiva de la E-cadherina y la regulación negativa de la VIM³³⁸. Como se mencionó anteriormente, la combinación de ACSL1, ACSL4 y SCD indujo EMT en células de cáncer de colon, donde el complejo ACSL/SCD promueve explícitamente procesos invasivos y de supervivencia sin tener efectos significativos sobre la proliferación celular³³⁴. Además, se ha demostrado que la alta absorción de glucosa aumenta la expresión de *SCD1*, lo que a su vez aumenta los niveles de MUFA y suprime PTEN promoviendo la EMT en las células de cáncer colorrectal³³⁹. Además, el aumento de la actividad de SCD1 también se ha asociado con la activación de la vía EGFR/PI3K/AKT en células de CP, lo que promueve la proliferación, la metástasis y el fenotipo EMT. Estos efectos se restablecen mediante la inhibición de SCD1³⁴⁰. No obstante, existen estudios contradictorios sobre el papel de SCD1 en la EMT, ya que, mientras algunas investigaciones sugieren que su actividad favorece la transición mesenquimal y la progresión tumoral, otros estudios indican que su inhibición puede, en ciertos contextos, promover la adaptación metabólica asociada a la EMT. En un estudio reciente, se relacionó la sobreexpresión de ZEB1 con una disminución de la expresión de *SCD1* y, por consiguiente, una reducción en los

niveles de MUFAs y aumento de PUFA, lo que favorece la plasticidad celular y la capacidad metastásica³³⁵. En cuanto a la otra isoforma, se ha visto como la expresión de *SCD5* es capaz de afectar al potencial metastásico de células de melanoma avanzado a través de la modulación de la expresión de *ZEB1* y *ZEB2*, dando lugar a una remodelación parcial de la EMT en modelos *in vitro* e *in vivo*³⁴¹. Los cambios en la expresión de *SCD5* también se han asociado con diferencias en el potencial metastásico de células de cáncer de mama mediante la alteración del balance de FAs y la homeostasis lipídica³⁴².

Por otra parte, las enzimas FADS (*FADS1-3*) participan en la síntesis de PUFAs de cadena larga, componentes esenciales de las membranas celulares y precursores de moléculas señalizadoras como los eicosanoides. La conexión entre *FADS1* y la EMT es prácticamente inexistente, ya que no se encuentran artículos en la bibliografía que las relacionen. Sin embargo, en el caso de *FADS2*, existe amplia evidencia que respalda su papel en la EMT y su impacto en la progresión del cáncer. La sobreexpresión de *FADS2* reprograma las propiedades biofísicas de las células al aumentar la síntesis de PUFA y la insaturación de los fosfolípidos, lo que no solo remodela la fluidez y composición de la membrana, sino que también activa múltiples vías de señalización intracelular relacionadas con la EMT como PPAR, VEGF y MAPK³⁴³. Su activación está mediada por diferentes EMT-TFs y diversas rutas pro-EMT, como *ZEB1*, la vía Wnt/ β -catenina y la vía de señalización de TGF- β 2, promoviendo un bucle de retroalimentación que mantiene la plasticidad celular y contribuye a la agresividad tumoral, la capacidad metastásica y el fenotipo mesenquimal en varios tipos de cánceres, tanto en muestras de pacientes como en líneas celulares²⁶¹. Su impacto es dependiente del contexto tumoral lo que sugiere una regulación específica según el tipo de tumor y su estado de progresión, no obstante, estos hallazgos posicionan a *FADS2* como un regulador clave en la EMT y la metástasis en distintos tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama donde su sobreexpresión reduce los niveles de E-cadherina y aumenta los niveles de N-cadherina y SNAIL promoviendo fenómenos de migración y metástasis *in vivo* e *in vitro*³⁴⁴.

Por último, el papel de *FADS3* en la EMT y la progresión tumoral ha sido durante mucho tiempo una incógnita, pero recientemente ha comenzado a describirse y su interés ha aumentado significativamente en los últimos años.

CD36

CD36 es una glicoproteína transmembrana expresada en la superficie celular de múltiples tipos de células, incluidas células tumorales, células estromales e inmunes. Este receptor glicosilado puede unirse a varios ligandos, incluidos FAs, fosfolípidos aniónicos y LDLs³⁴⁵. El aumento de la expresión de *CD36* se correlaciona con un mal pronóstico en glioblastoma, cáncer de células escamosas de pulmón, vejiga y mama^{262,346,347}. Un análisis de datos del TCGA reveló que *CD36* era uno de los principales genes asociados sistemáticamente con una fuerte activación de EMT en todos los cánceres³⁴⁸. Recientemente, se ha demostrado que la expresión de *CD36* se asocia con la diferenciación tumoral y la metástasis en ganglios linfáticos en el cáncer de cuello uterino, pero no con el estadio clínico a pesar de que los niveles altos de CD36 se han correlacionado con un mal pronóstico³⁴⁹. En este contexto, se ha propuesto que CD36 promueve parcialmente la invasión y migración a través de la EMT mediada por la vía TGF- β . En un modelo de carcinoma hepatocelular, *CD36* se correlacionó significativamente con la EMT, lo que sugiere que la expresión elevada de *CD36* puede ser indicativa de la activación del programa de EMT²⁶². Se ha comprobado cómo CD36 capta FA para promover la EMT a través de las vías de señalización de Wnt y TGF- β ²⁶². Además, la eliminación de CD36 en las células epiteliales

tubulares renales inhibe la generación de ROS inducida por glucosa y la expresión de TGF- β 1, lo que atenúa la EMT en estas células³⁵⁰. En modelos de cáncer de mama, la inhibición de la expresión de *CD36* se asocia con una reducción de la migración y aumento de la apoptosis³⁵¹. En este sentido, en una subpoblación de células escamosas orales humanas se asoció el potencial tumorigénico con una alta expresión de *CD36* y genes de metabolismo de lípidos que les proporcionan una capacidad única para iniciar metástasis, en ausencia de activación de genes mesenquimales³⁴⁷.

Proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs)

Las FABPs son acompañantes de lípidos intracelulares que coordinan las respuestas de los lípidos en las células y están fuertemente vinculadas a las vías metabólicas e inflamatorias. Hasta el momento, se han identificado y clasificado nueve miembros de la familia FABP según el tejido donde se expresa predominantemente (adipocitos, cerebro, epidérmico, corazón, intestinal, ileal, hígado, mielina y testículos). El dominio de las FABP unido a la membrana plasmática interactúa con el dominio transmembrana de *CD36* para facilitar la absorción de ligandos hidrófobos, como los FA de cadena larga saturados e insaturados, así como eicosanoides y otros lípidos del espacio extracelular. Una vez dentro de la célula, los FA permanecen unidos a la parte citosólica de las FABP hasta que son liberados donde se necesita que ejerzan su función, ya sea su almacenamiento en forma de TG y otros lípidos neutros en LDs, oxidación en las mitocondrias, síntesis de lípidos en la membrana o uso como reguladores transcripcionales en el núcleo³⁵². *FABP4* se expresa principalmente en adipocitos y macrófagos maduros y representa hasta el 6% del total de proteínas citosólicas. Sin embargo, *FABP4* también se ha encontrado en tumores humanos como los cánceres de células escamosas orales y de ovario^{353,354}. En el contexto de la EMT, la migración y proliferación de células de cáncer de ovario humano aumentan después del cocultivo, ya sea directamente con adipocitos de origen humano o con sus medios condicionados. En estos modelos, se demostró que los adipocitos permiten la lipólisis endógena de TGs para liberar FAs que posteriormente pueden ser secretados y absorbidos por células metastásicas que sobreexpresan *FABP4*³⁵³. Además, la deficiencia de *FABP4* afecta significativamente al crecimiento de tumores metastásicos en ratones, lo que indica que *FABP4* puede ser secretada por los adipocitos y transferida a las células tumorales, desempeñando un papel clave en la metástasis del cáncer de ovario. Sin embargo, no se ha encontrado sobreexpresión de *FABP4* en células de cáncer de ovario en la Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)³⁵⁵, lo que indica que *FABP4* puede estar regulado por el MAT. En un estudio reciente³⁵⁶ se sugirió que la inhibición de *FABP4* aumentaba la expresión de *CDH1* y, cuando *FABP4* era inducido por adipocitos en cocultivo con células tumorales, las células cancerosas eran más invasivas y metastásicas, según una firma de EMT. En las células de cáncer de ovario, el ARNm de *FABP4* está regulado por el microARN-409-3p³⁵⁷ y su inhibición altera la progresión tumoral en modelos de ratón. Una elevada expresión de *FABP4* se relacionó con una mayor insaturación y oxidación de FAs y lisofosfolípidos. Estas características se han relacionado con el crecimiento tumoral, el aumento de las metástasis y la promoción de la migración del cáncer, por lo que *FABP4* puede controlar metabolitos y proteínas que pueden contribuir a la metástasis. Sin embargo, en otro estudio se encontró una expresión reducida de *FABP4* en pacientes con cáncer colorrectal y en líneas celulares con propiedades invasivas³⁵⁸. En este caso, la sobreexpresión de microARN-211 inhibe *FABP4* a través de la vía PPAR γ y promueve la EMT y la invasión. Por tanto, parece que, dependiendo del contexto celular, *FABP4* puede realizar funciones divergentes y actuar como inductor o inhibidor de la EMT.

En definitiva, la EMT implica una reprogramación lipidómica que puede variar significativamente según el tipo de cáncer y el contexto en el que ocurre. A su vez está regulada por una amplia variedad de factores transcripcionales, señales del MAT y modificaciones epigenéticas, entre otras. Sin embargo, a pesar de la **complejidad** inherente de este proceso, resulta de gran importancia investigar a fondo la **reprogramación lipidómica asociada a la EMT**, ya que desempeña un papel crucial en la **resistencia** a los tratamientos con ITQs en CPNM. Comprender estos **cambios lipidómicos** puede abrir nuevas oportunidades terapéuticas y estrategias personalizadas para abordar de manera más efectiva esta enfermedad, mejorando las perspectivas de los pacientes.

4. Metabolómica y lipidómica

Se entiende por metabolito aquellas biomoléculas de bajo peso molecular (<1500 Da) que actúan como intermediarios o productos finales del metabolismo celular. El **metaboloma** se define como el conjunto completo de todos los metabolitos presentes en un sistema biológico (organismo, tejido, células...) bajo una condición particular e incluye un heterogéneo grupo de intermediarios y productos finales del metabolismo como lípidos, aminoácidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, entre otros. **Los metabolitos son el producto final de la cascada ómica** y sus niveles constituyen un reflejo directo no sólo del metabolismo del sistema bajo estudio sino que además es un reflejo de todos los niveles de regulación presentes “aguas arriba” de la metabolómica (genómica, epigenómica, transcriptómica, proteómica...) ³⁵⁹. En definitiva, el **metaboloma integra información tanto intrínseca (genoma) como extrínseca (p. ej. dieta, exposición a fármacos)** proporcionando una lectura más cercana al fenotipo que el resto de ciencias -ómicas ³⁶⁰ (**Figura 19**).

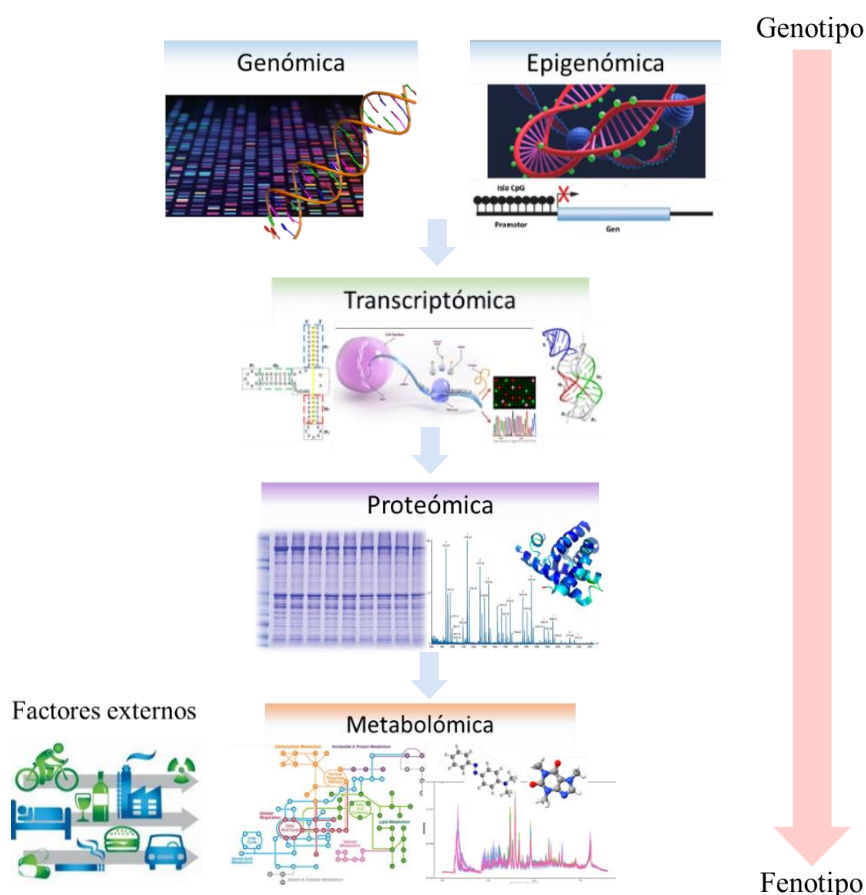


Figura 19. Representación gráfica de la cascada de las ciencias -ómicas. El metabolismo constituye el final de la cascada ómica integrando información del resto de ómicas así como factores externos, proporcionando un reflejo más cercano del fenotipo.

La comparación de diferentes perfiles metabólicos puede facilitar el descubrimiento de biomarcadores y aportar nueva información sobre los mecanismos bioquímicos que gobiernan determinados procesos fisiopatológicos³⁶¹ (p.ej. la resistencia a fármacos). En este sentido, la metabolómica, entendida como la determinación objetiva de todos los metabolitos presentes en una muestra³⁶², ha experimentado un enorme y continuo crecimiento a lo largo de las dos últimas décadas debido a las crecientes mejoras en las técnicas analíticas y el desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas. Se ha estimado que el metaboloma humano comprende desde varios miles hasta cientos de miles e incluso millones de metabolitos, no obstante solo unos cuantos son actualmente detectados y cuantificados^{363,364}.

Los lípidos constituyen una parte importante del metaboloma tanto a nivel cualitativo como a nivel cuantitativo, representando hasta el 80% de los metabolitos incluidos en la “Human Metabolome DataBase” (HMDB). El perfil completo de lípidos que forman una célula, tejido u organismo recibe el nombre de **lipidoma** y constituye un subconjunto del metaboloma³⁶⁵. Su particular naturaleza y relevancia han llevado a la aparición de una subdisciplina centrada en su determinación y análisis comprensivo conocida como lipidómica, un campo de investigación relativamente reciente que ha sido impulsado por el reconocimiento del papel de los lípidos en muchas enfermedades metabólicas como el cáncer³⁶⁵.

Actualmente, la resonancia magnética nuclear (RMN) y la **espectrometría de masas (MS)** son las plataformas analíticas más utilizadas en metabolómica y lipidómica. Por un lado, la RMN es una técnica altamente reproducible; no obstante, presenta una cobertura del metaboloma limitada a solo aquellos metabolitos más abundantes ($\geq 1\mu\text{M}$), dependiendo de la resolución espectral y la muestra biológica^{366,367}. Por el contrario, la MS **tiene el potencial de medir metabolitos en concentraciones muy bajas (fM a aM) dentro un amplio rango dinámico**. Además, la MS se puede acoplar a una gran variedad de técnicas de separación, lo que contribuye a aumentar la cantidad de metabolitos detectados. Esta tecnología proporciona un alto poder de resolución y sensibilidad que, sumado a una elevada precisión en la determinación de la masa, permite el estudio del metabolismo celular a un nivel sin precedentes. Estos avances técnicos **han establecido a la MS como la técnica analítica más importante utilizada en metabolómica**³⁶³ (*Figura 20*).

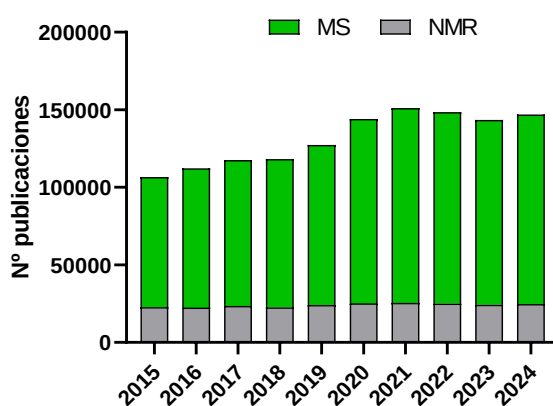


Figura 20. Número de publicaciones anuales que emplean métodos analíticos basados en espectrometría de masas (MS) o resonancia magnética nuclear (NMR) en la última década, según datos extraídos de Web of Science. La cantidad de publicaciones utilizando MS (verde) es significativamente mayor en comparación con NMR (gris), reflejando una tendencia creciente en el uso de técnicas basadas en MS a lo largo del período 2015-2024.

En el contexto de esta tesis, se ha elegido la **cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)** como técnica principal para los análisis lipídicos no solo por su elevada sensibilidad y resolución, sino también por su versatilidad y capacidad de adaptación a distintos enfoques analíticos. Esta técnica puede adaptarse a diferentes modos de ionización y estrategias de fragmentación, optimizando la detección de distintos tipos de lípidos. Además, el alto rendimiento en términos de reproducibilidad y robustez la convierten en la mejor opción para los análisis de esta tesis.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La identificación de mutaciones activadoras en determinados oncogenes en CPNM ha impulsado el desarrollo de inhibidores específicos como los ITQs para EGFR, mejorando la supervivencia de los pacientes y marcando un enorme avance en la medicina personalizada. Sin embargo, la efectividad de estos tratamientos se ve limitada por la aparición de resistencias debido a varios mecanismos, entre los que se incluyen la activación de la EMT, fenómeno que además contribuye a la progresión tumoral y a la adquisición de un fenotipo metastásico. La reprogramación metabólica asociada a la EMT, y concretamente, la reprogramación lipidómica parece tener un papel clave en el fenómeno de adquisición de resistencia. Por tanto, comprender cómo las células cancerosas reprograman su metabolismo lipídico para promover o mantener la EMT podría abrir una nueva vía terapéutica para limitar la aparición de resistencias en CPNM-EGFR y mejorar la efectividad de los ITQs.

En base a estas premisas, **el objetivo principal** de esta tesis doctoral consistió en estudiar de forma exhaustiva **la reprogramación lipidómica asociada a la EMT en la adquisición de resistencia a ITQs en el tratamiento del CPNM con mutaciones en EGFR**. Para ello planteamos los siguientes objetivos parciales:

1. Análisis transcriptómico y lipidómico de distintas líneas celulares de CPNM con mutaciones en *EGFR* clínicamente relevantes antes y después de adquirir resistencia al osimertinib mediante un mecanismo EMT contrastado.
2. Búsqueda de dianas moleculares que dirijan la reprogramación lipidómica que tiene lugar durante la EMT en la adquisición de resistencia a ITQs.
3. Estudio funcional de las dianas moleculares propuestas como estrategia terapéutica para retrasar y/o revertir la EMT y por tanto mejorar la eficacia de los ITQs en el tratamiento del CPNM-EGFR.
4. Búsqueda de biomarcadores lipidómicos de respuesta a ITQs en biopsias líquidas de pacientes con CPNM-EGFR.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelos celulares

En el desarrollo de esta tesis se utilizaron tres líneas celulares de CPNM procedentes de la American Type Culture Collection (ATCC) dirigidas por mutaciones en *EGFR* clínicamente relevantes y sensibles a los ITQs, de las que además disponemos de sus correspondientes líneas resistentes obtenidas por exposición prolongada (> 6 meses) a concentraciones crecientes de osimertinib hasta 10 mM (**Figura 21**).

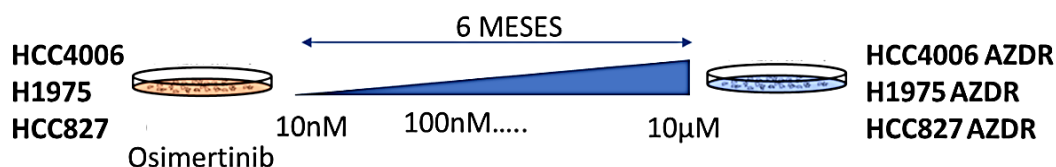


Figura 21. Representación del proceso de generación de líneas resistentes de CPNM resistentes a osimertinib. Las líneas de CPNM sensibles a ITQs se trataron con concentraciones crecientes del fármaco durante 6 meses hasta generar líneas estables con resistencia adquirida a osimertinib.

En la **Tabla 4** se muestra el resumen de las características de las líneas empleadas.

Tabla 4. Líneas celulares de CPNM mutadas en *EGFR* utilizadas en el estudio.

Línea	Mutación <i>EGFR</i>	ITQ	Línea resistente
HCC4006	Delección exón 19 (L747-A749/A750P)	Osimertinib	HCC4006 AZDR
H1975	L858R exón 21/ T790M Exón 20	Osimertinib	H1975 AZDR
HCC827	Delección exón 19 (E746-A750)	Osimertinib	HCC827 AZDR

Con el fin de simplificar la presentación de los datos, a partir de este momento los nombres de las líneas celulares se expresarán omitiendo los prefijos 'H' y 'HCC'.

Adicionalmente, se utilizó la línea HEK293-LTV, una línea embrionaria de riñón, para el empaquetamiento de partículas lentivirales en los experimentos de silenciamiento/sobreexpresión génica.

La identidad de todas las líneas celulares utilizadas se comprobó por secuenciación STR.

2. Condiciones de cultivo celular

Las líneas celulares de CPNM se cultivaron en medio completo constituido por un 90% de medio RPMI-1640 (Biowest, Nuaille, Francia) suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado (SBF) (Gibco®, Life Technologies) y con 100 U/ml de penicilina (Biowest, Nuaille, Francia), 100 μg/ml de estreptomina (Biowest, Nuaille, Francia) y 0.25 μg/ml de anfotericina B (Biowest, Nuaille, France).

Por otro lado, la línea celular HEK293-LTV se cultivó en medio completo compuesto por 90% DMEM con GlutaMAX™ y 4.5 g/L de glucosa (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Alemania) suplementado con 10% de SBF y con 100 U/ml de penicilina (Biowest, Nuaille, Francia), 100 μg/ml de estreptomina (Biowest, Nuaille, Francia) y 0.25 μg/ml de anfotericina B (Biowest, Nuaille, Francia). Todas las líneas se mantuvieron en cultivo en una estufa a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

Los medios de cultivo se cambiaron cada 3-4 días para renovar nutrientes y evitar la acumulación de metabolitos tóxicos, así como de células muertas. Todas las líneas fueron testadas periódicamente para la detección de posibles contaminaciones por micoplasma mediante el kit comercial “Mycoplasma Gel Detection Kit” (Biotools B&M Labs, Madrid, España). Todos los experimentos se realizaron con líneas celulares libres de micoplasma.

3. Estudios de proliferación y viabilidad celular

La determinación de los contajes celulares, así como la viabilidad de los cultivos celulares se ha realizado con un contador automático *Countess II* (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA). Este aparato se basa en el método de exclusión del colorante vital azul de tripán para determinar la viabilidad celular. El azul de tripán es capaz de introducirse en el interior de las células muertas o que presentan daños en su membrana adquiriendo por consiguiente un tono azul diferente al de las células íntegras que son redondeadas y transparentes.

Para llevar a cabo el contaje, una vez tripsinazadas las células, se mezcló una alícuota de la suspensión celular junto con una alícuota del mismo volumen de azul de tripán al 0.4 % (1:1) (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA). La mezcla se carga en una cámara de contaje específica y se introduce en el aparato.

4. Estudio de la citotoxicidad celular: método de la sulforodamina B

El método de la sulforodamina B se utiliza para determinar el número de células de manera indirecta. Este método se basa en la cuantificación de la tinción de las proteínas celulares con sulforodamina B, siendo la masa proteica celular proporcional al número de células. El uso de este método supone una gran ventaja puesto que permite realizar ensayos de citotoxicidad a gran escala en placas de 96 pocillos. En el protocolo empleado, se siguieron las pautas establecidas por el Instituto Nacional del Cáncer Americano (NCI) (www.cancer.gov). En cada pocillo de las placas de 96 pocillos, se sembraron 2500 células en 100 μ l de medio completo. Tras 24h, se agregaron los fármacos disueltos en medio completo en un volumen de 100 μ l/pocillo. Se realizaron 6 réplicas por condición, utilizando diluciones seriadas 1:2 a partir de 20 μ M (para que la concentración final en el pocillo sea de 10 μ M) en un volumen de 100 μ l. Los controles se trataron con el vehículo en el que está disuelto el fármaco, en este caso DMSO. Tras 72h de tratamiento, se aspiró el medio de cultivo y las células se fijaron con 50 μ l de paraformaldehído (PFA) al 4% (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA). Tras 20 min de fijación, las placas se lavaron con agua y se dejaron secar completamente. A continuación, las placas fijadas se tiñeron con 100 μ l de una solución de sulforodamina B al 0.4 % (p/v) (Merck, Darmstadt, Alemania) en ácido acético al 1% durante 20 min. Finalizado este tiempo, las placas se lavaron con ácido acético al 1% para eliminar el exceso de tinción y se dejaron secar. Finalmente, la solubilización del colorante fijado se llevó a cabo mediante la adición de 200 μ l de tampón Trizma® Base (Merck, Darmstadt, Alemania) a 10 mM. Por último, se utilizó un lector de microplacas *Synergy H1 Hybrid* (Agilent Technologies, California, USA) para medir la absorbancia a 570 nm, aplicando una corrección del ruido de fondo medido a 620 nm en cada pocillo.

Los datos obtenidos se expresan como porcentaje de viabilidad celular con respecto al control calculado mediante la siguiente expresión:

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

5. Ensayos de formación de colonias

Un ensayo de formación de colonias es una técnica *in vitro* utilizada para evaluar la eficacia de compuestos antitumorales al medir la capacidad de las células cancerosas aisladas para formar colonias en presencia de un fármaco, entendiendo colonia como un grupo de al menos 50 células. De esta forma, se evaluó la viabilidad de las células individuales al someterlas a diferentes concentraciones de osimertinib.

Para ello, se sembraron las líneas celulares en placas de 6 pocillos a una densidad muy baja (3000 células/pocillo). Tras 24h post-siembra, se renovó el medio de cultivo por uno conteniendo el fármaco a evaluar, en este caso osimertinib, a diferentes concentraciones en un rango de 50-500 nM, manteniendo uno de los pocillos como control sin fármaco. Cada 3 días se renovó el medio de las placas con medio fresco, renovando también el fármaco según cada condición. Transcurridos 10-15 días según cada línea celular, las células se fijaron con 500 µl de PFA al 4% durante 20 min a temperatura ambiente y, tras un lavado con agua, se tiñeron con una solución de sulforodamina B al 0.4 % (p/v) durante 30 min. Finalmente, una vez secas y limpias, las placas se escanearon y se digitalizaron para posteriormente analizar el nº de colonias y el efecto del fármaco.

6. Evaluación de la capacidad migratoria

6.1 Ensayo de migración por cierre de herida

Los estudios de migración o “wound healing” son ensayos en los que se evalúa la capacidad que tienen las células de cerrar una herida generada en la monocapa celular. De esta forma, las células en el nuevo borde van a migrar hacia la apertura para cerrarla hasta llegar a formar nuevos contactos célula-célula.

Para el ensayo, se sembraron placas de 6 pocillos para cada línea a una alta densidad (400.000 cel/pocillo). Una vez obtenida una monocapa celular de alta densidad (90-100 % confluencia) se realizaron dos incisiones verticales con puntas estériles. Una vez realizada la herida, se lavó la placa con PBS para eliminar las células despegadas debido a la herida y se renovó el medio de los pocillos con medio completo. Se tomaron fotos de la herida a tiempo 0 (tras realizar la herida) y a 24h para evaluar el cierre de la herida. Las imágenes se analizaron posteriormente con el software de código abierto de procesamiento de imágenes digitales Fiji ImageJ (ImageJ, USA) para cuantificar el área de la superficie cerrada durante la migración.

6.2 Ensayo Transwell

Para el ensayo Transwell se utilizaron placas Transwell® de 6,5 mm de diámetro exterior con inserto de membrana de policarbonato con tamaño de poro de 8,0 μm (Corning, Nueva York, USA). Previamente a la siembra en el inserto, las células se mantuvieron 24h en medio RPMI sin SBF. Transcurrido ese tiempo, en la zona superior del inserto se sembraron 90.000 células de cada línea en un volumen de 200 μl de RPMI sin SBF. En el pocillo conteniendo el inserto (zona inferior) se añadieron 600 μl de RPMI completo (10% SBF) de modo que el SBF actúa como factor quimiotáctico promoviendo la migración de las células hacia la zona inferior. Las células se incubaron en el inserto durante 24h a 37°C y 5% de CO_2 . Pasado este tiempo, se eliminaron las células de la zona superior del inserto (no migratorias) con ayuda de scrappers de algodón y las células que habían migrado a la base de la membrana se fijaron con PFA 4% durante 15 min. Se lavaron los insertos con PBS y se tiñeron con una solución de sulforrodamina B 0,4 % durante 20 min asegurando que se cubría la superficie del inserto. Tras esto, se retiró la solución de tinción y se lavaron los insertos con acético al 1% en agua. Finalmente, se tomaron fotos con el microscopio, se solubilizó el colorante fijado mediante la adición de 200 μl de tampón Trizma® Base a 10 mM y se cuantificó la absorbancia a 570 nm, aplicando una corrección del ruido de fondo medido a 620 nm en cada caso (**Figura 22**).

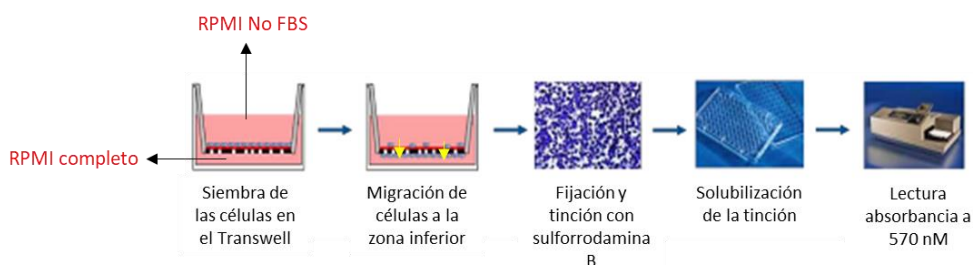


Figura 22. Representación de los diferentes pasos seguidos durante el ensayo Transwell.

7. Detección de proteínas mediante Western Blot

La técnica de Western Blot es una valiosa herramienta para investigar y cuantificar la presencia de una proteína particular en una muestra de extracto proteico. Esta técnica nos permite examinar los niveles de dicha proteína y realizar comparaciones con otras muestras. De esta forma, podemos obtener información detallada sobre la abundancia relativa y la variación de una proteína específica en diferentes condiciones experimentales o entre distintos grupos de muestras. A continuación, se detallan los pasos seguidos:

7.1 Extracción de proteínas

En primer lugar, se sembraron placas de 10 cm^2 de cada una de las líneas de interés y se dejó que alcanzarán la confluencia. A continuación, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS frío y se rascaron en hielo utilizando el tampón de lisis *CellLytic™ M* (Merck, Darmstadt, Alemania) suplementado con 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de una solución de proteasas y fosfatasa (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA). Tras recolectar el lisado celular, se llevó a cabo un proceso de sonicación basado en 3 ciclos de ultrasonidos de 5s cada uno intercalados con periodos de reposo de 15s en un sonicador *Omni Sonic Ruptor 4000* (DD BioLab, Barcelona, España). Con este paso de sonicación se mejora la homogenización del lisado, una extracción

más eficiente, una mejor accesibilidad de los anticuerpos y una mejor transferencia a la membrana posteriormente. Por último, la muestra se centrifugó 15000 g durante 15 min a 4°C y se recogió el sobrenadante conteniendo las proteínas disueltas.

Para la cuantificación de los niveles de proteína en las muestras obtenidas se utilizó el método colorimétrico de Bradford. Se empleó el reactivo *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Bio-Rad, California, USA), un colorante que reacciona ante la presencia de proteínas cambiando de color y se midió la absorbancia de las muestras a 595 nm. Los valores de absorbancia obtenidos fueron interpolados en una recta patrón de albúmina sérica bovina (BSA) (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) que abarcaba un rango de concentraciones desde 0.01 mg/ml hasta 2 mg/ml. De esta manera, se pudo establecer de manera precisa la concentración de proteínas en las muestras analizadas.

7.2 Electroforesis y transferencia

Las proteínas fueron sometidas a una separación basada en su peso molecular utilizando la técnica de electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE). Para ello, se tomaron 40 µg de proteína y se mezclaron con el tampón de carga *Laemmli Sample Buffer* (Bio-Rad, California, USA) para alcanzar una concentración de 1X. Posteriormente, se incubaron a 98°C durante 5 min para lograr la desnaturalización de las proteínas.

Una vez que las proteínas estaban desnaturalizadas, se cargaron las muestras en geles comerciales con un gradiente de poliacrilamida del 4-20% *Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gels* (Bio-Rad, California, USA). La electroforesis se llevó a cabo utilizando el sistema *Mini PROTEAN Tetra* (Bio-Rad, California, USA) en un tampón comercial conteniendo Tris/Glicine/SDS (Bio-Rad, California, USA). Se utilizó el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ Standards Dual Color* (Bio-Rad, California, USA). Las muestras se corrieron durante 1h a 100V y posteriormente se activó el gel en un transiluminador *ChemiDoc™ XRS+* (Bio-Rad, California, USA) para observar el patrón de bandas de cada muestra y confirmar la separación de proteínas. Esta metodología descrita permite una separación eficiente y precisa de las proteínas en función de su tamaño. Tras completar el proceso de electroforesis, las proteínas presentes en el gel fueron transferidas a membranas comerciales de difluoruro de polivinilideno (PVDF) presentes dentro del kit *Trans-Blot Turbo Transfer Pack* (Bio-Rad, California, USA) y utilizando el sistema *Trans-Blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad, California, USA). Esta transferencia se llevó a cabo durante 7 min a una intensidad de 25V y 1.3A. Previamente a la inmunodetección, la membrana se activó en el transiluminador para visualizar y asegurar la correcta transferencia de las proteínas.

7.3 Inmunodetección

En primer lugar, se realiza un bloqueo de la membrana con una solución de bloqueo compuesta por leche desnatada al 5% (p/v) en TBS-T (Tris-Cl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1%, pH 7.5) para evitar uniones inespecíficas y asegurar que los anticuerpos se unen únicamente a la región de interés. Este bloqueo se llevó a cabo durante 1h a temperatura ambiente con agitación suave. A continuación, se procedió a incubar la membrana con los anticuerpos primarios durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Los anticuerpos primarios, específicos para las proteínas mencionadas en la Tabla 5, fueron diluidos en leche desnatada al 5% en TBS-T:

Tabla 5. Lista de anticuerpos primarios empleados en Western Blot

Anticuerpos primarios				
Diana	PM (KDa)	Origen	Dilución	Casa comercial
GAPDH	36	Monoclonal de ratón	1:1000	Abcam
CDH1	135	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
CDH2	140	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
VIM	57	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
ZEB1	200	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
GRHL2	71	Policlonal de conejo	1:1000	Sigma Aldrich
FADS3	41-51	Policlonal de conejo	1:1000	Proteintech

Tabla 6. Lista de anticuerpos primarios de vías de señalización empleados en WB

Anticuerpos primarios vías de señalización					
Diana	PM (KDa)	Origen	Dilución	Casa comercial	Referencia
EGFR	175	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	#4267
pEGFR	175	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	#3777
AKT	60	Policlonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	#9272
pAKT	60	Policlonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	#9271
ERK	42	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	#4695
pERK	44	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	#4370
STAT3	80	Monoclonal de ratón	1:1000	Cell Signaling Technology	#9139
pSTAT3	80	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	#9145
P38	40	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	#8690
pP38	43	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	#4511
P70	70	Policlonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	#9202
pP70	70	Policlonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology	#9204

Tabla 7. Lista de anticuerpos secundarios empleados en Western Blot

Anticuerpos secundarios				
Diana	PM (KDa)	Origen	Dilución	Casa comercial
Anti IgG conejo	36	Monoclonal de ratón	1:1000	Abcam
Anti IgG ratón	135	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology

Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo primario no retenido en la membrana. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (diluido en leche desnatada al 5% en TBS-T) el cual lleva conjugado la peroxidasa de rábano picante (HRP). La incubación se realizó durante 45 min a temperatura ambiente en agitación suave. Para finalizar, tras realizar 3 lavados de 5 min con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, la membrana se incubó con el reactivo comercial *Clarity™ Western ECL Substrate* (Bio-Rad, California, USA) durante 5 min en oscuridad. Para la detección de proteínas poco abundantes se utilizó el *SuperSignal™ West Femto* (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA). La peroxidasa HRP presente en el anticuerpo secundario activa el luminol del ECL en presencia de peróxido de hidrógeno, lo que genera un dianión excitado capaz de emitir luz al volver a su estado fundamental y permitiendo la detección por quimioluminiscencia de los anticuerpos y, por consiguiente, de la proteína de interés. Esta señal luminosa es captada por el transiluminador y se procede a la visualización y análisis de las imágenes.

8. Análisis transcriptómicos

La transcriptómica se basa en el estudio sistemático y cuantitativo de los ARN mensajeros (ARNm) presentes en una muestra biológica, brindando información crucial sobre la expresión génica y permitiendo comprender mejor los procesos biológicos y patológicos. El enfoque principal es utilizar técnicas como la secuenciación de ARN (RNA-seq) para obtener una visión completa y detallada de los mRNA presentes. Por ello, se realizó un RNA-seq de las líneas de interés, tanto sensibles como resistentes y la expresión de los genes de interés obtenidos tras este análisis se confirmó mediante la técnica de RT-qPCR.

8.1 Extracción de ARN y cuantificación

El ARN total de todas las muestras se obtuvo mediante el kit de extracción *E.Z.N.A.® Total RNA Kit I* (Omega Biotek, Norcross, Georgia) de acuerdo a las indicaciones del protocolo de la casa comercial. En primer lugar, se sembraron placas para cada una de las líneas y se dejó que alcanzaran una confluencia del 80%. Se retiró el medio y se lavaron las células con PBS frío. A continuación, se rascaron en hielo con 350 µl *TRK Lysis Buffer* (Omega Biotek, Norcross, Georgia) suplementado con β-mercaptoetanol 0.02% (v/v). Las muestras se homogeneizaron con ayuda de una jeringa de 1 ml y se mezclaron con el mismo volumen de etanol 70% (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA). Las muestras se vortearon y se transfirió todo el contenido a columnas *HiBind® RNA Mini Column* presentes en el kit. A continuación, se centrifugaron durante 1 min a 10000g y se desechó el filtrado, quedándose en la columna el ARN retenido. Tras varios lavados y centrifugaciones para purificar la muestra, finalmente el ARN se eluyó de

la columna añadiendo 50 μ l de agua libre de RNAsas. La cantidad de ARN extraído se cuantificó en un *NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer* (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA).

8.2 RNA-seq

El ARN extraído se envió al servicio de secuenciación de la Universidad de Valencia para el análisis transcriptómico mediante RNA-seq. Allí se realizó la preparación de las librerías, convirtiendo el ARN en ADNc y añadiendo los adaptadores seguido de la secuenciación de las lecturas de ADNc. Una vez obtenidas las secuencias, se alinearon con el genoma de referencia y se obtuvo un resumen del número de lecturas alineadas en cada región. Tras la normalización de las muestras, se obtienen las cuentas por millón normalizadas (CPM) para realizar los posteriores análisis estadísticos de expresión diferencial. El análisis de expresión diferencial se llevó a cabo con el paquete DESeq2 en R, que modela los datos mediante una distribución binomial negativa. La identificación de genes diferencialmente expresados se realizó aplicando un criterio de significancia de $p\text{-adj} < 0.01$ (corregido por FDR de Benjamini-Hochberg) y un cambio en la expresión de $\log_2FC \geq 1,6$. El análisis de enriquecimiento GO y de pathways alteradas se realizó utilizando “WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit” (WebGestalt: <https://www.webgestalt.org/>), una herramienta en línea ampliamente utilizada para el análisis de enriquecimiento funcional de genes. Además, esta herramienta permite la exploración de vías metabólicas y de señalización mediante bases de datos como KEGG, Reactome y WikiPathways. Se seleccionaron aquellas categorías funcionales y vías con un ratio de enriquecimiento normalizado mayor y que fueran significativas según el criterio de FDR $< 0,05$ (Benjamini-Hotchber).

8.3 RT-qPCR

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa a tiempo real (RT-qPCR) permite la cuantificación precisa de la expresión génica mediante la retrotranscripción de ARN a ADN complementario (ADNc) y su posterior amplificación. Los pasos seguidos se describen a continuación:

8.3.1 Síntesis de ADNc: reacción de retrotranscripción (RT)

La retrotranscripción (RT) de ARN a ADNc se llevó a cabo utilizando el *PrimeScript™ RT Reagent Kit* (Takara Bio Inc., Nojihigashi, Japon) de acuerdo al protocolo de la casa comercial. Para la reacción de retrotranscripción, se utilizaron 500 ng de ARN total de cada una de las muestras y se mezclaron con los componentes de la **Tabla 8** siendo el volumen final de reacción de 10 μ l:

Tabla 8. Reactivos empleados para la reacción de RT

Reactivo	Cantidad
5X PrimeScript Buffer	2 μ l
Oligo dT Primer 50 μ M	0.5 μ l
Random Hexamers 100 μ M	0.5 μ l
PrimScript Enzyme Mix I	0.5 μ l
ARN	500 ng
Agua libre de RNAsas	Hasta 10 μ l

Tras la preparación de los componentes, se llevó a cabo la reacción de RT en un equipo *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, California, USA) ajustando las condiciones a 37°C durante 15 min y 85°C durante 5s. Finalmente, el ADNc obtenido se diluyó 1/10 en agua libre de RNAsas para la posterior reacción de qPCR.

8.3.2 Reacción de PCR cuantitativa (qPCR)

Para la reacción de qPCR, se empleó el kit TB Green™ Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc., Nojihigashi, Japon) que contiene la ADN Master Mix (2X) constituido por dNTPs, RNAsaH y SYBR Green además de la enzima Taq polimerasa. Los primers para cada uno de los genes analizados se diseñaron utilizando la herramienta Primer BLAST del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) y se obtuvieron de Metabion International AG (Planegg, Alemania). La lista con los genes analizados puede encontrarse en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Lista de primers utilizados para los ensayos de RT-qPCR.

Gen	Secuencia	Gen	Secuencia
ACACA-F	GGCCAGTGCTATGCTGAGATT	FASN-F	TTCTGGGACAACCTCATCGG
ACACA-R	CTTGCTGGGGTTGTCCAGTT	FASN-R	CCTCGGAGTGAATCTGGGTT
ACACB-F	TCTCCCGCTGAGTTTGTCAC	FATP1-F	CGTCTATGGGGTGGCTGTTC
ACACB-R	GGACGGGGACGTAATGATCC	FATP1-R	CTGGTATATCGCGTTGGGGT
ACLY-F	GATTTTGCGGGGTTCTGTCG	FATP2-F	CTTTGGCTATGCTGGGCCCTT
ACLY-R	ACCCGAGCATACTTGAACCG	FATP2-R	GTGGTTGCGACATTTTCTCCT
ACOT9-F	CCTAGCGCAATGAGGCG	FATP3-F	CCCCTTCTCCTTGATTCGCT
ACOT9-R	AGGCAGTCCATCCTGTGATT	FATP3-R	AATGGGGACTGCTGGCTTAC
ACOX1-F	GCATCGCTGACCCTGATGAA	FATP4-F	GCTAAACCCTGCTGAGACC
ACOX1-R	TGCCCAAGTGAAGATCCAGAG	FATP4-R	AGCACCAGCTTGGAGAACA
ACSL1_F	GCAACCCCAAAGGAGCAATG	FATP5-F	GTGATGGGACTTGTCGTTGGG
ACSL1_R	AGCTCCATGACACAGCATTA	FATP5-R	GCAGGAAGTAGAGAACTTGGGG
ACSL3-F	TGGATGATAGCTGCACAGGC	FOXA1-F	CAGCATGGCTATGCCAGACAAACCC
ACSL3-R	TCGGTGGCTTTCCATCAACA	FOXA1-R	CAGCATGGCTATGCCAGACAAACCC
ACSL4-F	CACTTATGGCTGCTGTTCCG	GPAT2-F	GCGCCTGAATTAGTGAAGAAAG
ACSL4-R	ATCATGCGGACATTCCCTCC	GPAT2-R	CATCTGTCCCTTGTGAAGTTGT
ACSS1-F	GTATGATCGCTCCTCCCTGC	GPAT4-F	TGCCGCTCAGGATAGCA
ACSS1-R	ACCTGTTTCTGTCTGCCACC	GPAT4-R	ACGCAGATCCGGAACACA
ACSS2-F	ACCACGAACGCTTTGAGACA	GRHL2-F	CCCACAGCGCCTATCTCAAA
ACSS2-R	TGCAACAGCCTCATGTTCCA	GRHL2-R	TACTCCTCAGCCCCAACTGA
ACTB-F	ACAGAGCCTCGCCTTTGC	LPCAT1-F	GTCCCCGTTTCTGACTTGCT
ACTB-R	CGCGGCGATATCATCATCCA	LPCAT1-R	TCTTGCGCTCCGTACATCTT
AGPAT1-F	ACTACCGTGGCATCCTGAAC	LPCAT2-F	TGTGCAACCTTCCAACACA
AGPAT1-R	GCCGCAATAACCAGGCA	LPCAT2-R	ATCAAGGTCAGGCACTCCAA
AGPAT2-F	CGTCTTCTTCATCAACCGGCA	LPIN1-F	GGAGGGGAAGAAACACCACA
AGPAT2-R	AGAGTACACCACGGGGACGA	LPIN1-R	GACATTAGGCAGAAGAGGGAG
AGPAT3-F	CTCCTGCTGCTCACAACTC	ME2-F	TGCACGGCTGAAGAAGCATA
AGPAT3-R	GACCACTCACCACGAAGACA	ME2-R	TCACTGGCCCAAATGGACTG

AGPAT4-F	GGCACGGAATGCACCATCTT	MGLL-F	CGGCATGGTACTCATTTTCGC
AGPAT4-R	GGACATAGGCCAGCTCTTTCTT	MGLL-R	CATTCAGCAGTTGGATGCCG
APOL2-F	AGGACCAAGTGAGCAGAGAG	NANOG- F	ACCTATGCCTGTGATTTGTGGG
APOL2-R	TGGTCTTTATCGTGGCGGTTT	NANOG-R	CCTTTGGGACTGGTGAAGA
CD36-F	TGTCTGGCTGTGTTTGGAG	OCT4-F	GGAGAAGCTGGAGCAAACC
CD36-R	TGTCTGTAACTTCTGTGCCTGT	OCT4-R	ACCTTCCCAAATAGAACCCCC
CDH1-F	GGCCTCCGTTTCTGGAAT	PDHA1-F	TCTGTCACTTGTGTGATGGTCA
CDH1-R	TGGCCAGTGATGCTGTAGAA	PDHA1-R	CGGGTGAAAGTAAAGCCGTG
CDH2-F	GCAGCTCTTACCCTGTTCTA	PLD1-F	GGACTTCGGCTACAGTGCTT
CDH2-R	CTCGCACACATAGCGGTG	PLD1-R	TGCTGTTGAAACCCACACCT
CDS1-F	GTGTTTGGATTCAATTGCTGCCT	PLD2-F	AGAGACGGAACCATCCCTCA
CDS1-R	TGGAAAGGGTACAAGCTCACTC	PLD2-R	CCAAGTCTGGCCGGGTATTT
CEPT1-F	CTTGTGCCTGTGGCCTTTTC	PLPP1-F	GCGGCCTCACTTCTTGAT
CEPT1-R	CCAATCAGGGTTTGTCCCCA	PLPP1-R	TGGAAAACGAAGAGTGGCCT
CHPT1-F	CGTGCTCATCTCCTACTGTCC	PLPP2-F	GGGGAAACCTGCTGATGTC
CHPT1-R	TGTTCTTCTGGCTTGTTTCCC	PLPP2-R	GAGTCGTGCCTGCACATACA
CPT1A-F	ATGTACGCCAAGATCGACCC	PNPLA2-F	ACGTGGAACATCTCGTTTCGC
CPT1A-R	TGACCACGTTCTTCGTCTGG	PNPLA2-R	CTCAATGAACTTGGCACCAGC
CPT1B-F	CCTGGTGCTCAAGTCATGGT	SCAP1-F	GAAGGATTACTCGCCCCAC
CPT1B-R	CGGTCCAGTTTACGGCGATA	SCAP1-R	CCGGGACAAAGGTGAACGAA
CRLS1-F	GTATGCCACAGTATGAAAACCC	SCAP2-F	AATCCTTCACAGGGGTGGTG
CRLS1-R	GGCCCAGTTTCGAGCAATAAAT	SCAP2-R	TGAACTGTCCTTCCAACGGG
DGAT2- F	TGGGGGCTGGTGCCCTACTC	SCD-F	TTCCCGACGTGGCTTTTTCT
DGAT2-R	AATTGGCCCCGAAGGCTGGC	SCD-R	AAATACCAGGGCACAAGCGT
ELOVL1-F	GTGACAGAAAGTCGGCCCAG	SCD5-F	CTCCCATATTGGGTGGCTGT
ELOVL1-R	ATCTGCGTGCTTCATCACCT	SCD5-R	ACCACAAAGCACATGAGCAC
ELOVL5-F	GTCAGCCCACGTTCTGATTG	SELENOI-F	CCCAGTCTTTGCCATCCTTG
ELOVL5-R	GGGCCTAGCAATGCCTTGAA	SELENOI-R	TGACATACAGAGAAAGTGGATTGG
ELOVL6-F	CGTAGCGACTCCGAAGATCA	SNAI1-F	CGTCATCCCCTTCCAGTTCG
ELOVL6-R	TAGGTGCCGACCACCGAATA	SNAI1-R	CCTCATTCGGGGTGGTATCG
ELOVL7-F	ATACCATCATGCCGTGGACC	SNAIL2- F	CGTCATCCCCTTCCAGTTCG
ELOVL7-R	TGCACGCAAAGACTGGAAAC	SNAIL2- R	CCTCATTCGGGGTGGTATCG
FABP1-F	GAGTTTCTCCGGCAAGTACCA	SREBP1c-F	TGACCGACATCGAAGGTGAAG
FABP1-R	TCCCATTCTGCACGATTTCC	SREBP1c-R	GGGTCAAATAGGCCAGGGAA
FABP4-F	AACCTTAGATGGGGGTGCCT	TAMM41-F	TGGTGCGACTAGGGCTTTC
FABP4-R	GTCCCTTGGCTTATGCTCTCT	TAMM41-R	GGATGTTTTCTCAGCCACC
FABP5-F	CGCCTGGTGGACAGCAAAG	TWIST2-F	TGGGCGGTGCTACAACCTG
FABP5-R	GTGCTCTCAGTTTTTATGGTGAG	TWIST2-R	TCTCCGATGTGTTGGAGAAGC
FABP7-F	GGAGGCTTTCTGTGCTACCT	VIM-F	CCGCACATTCGAGCAAAGAC
FABP7-R	GGTTTGGTCACATTTCCACC	VIM-R	AAGCGCACCTTGTGCGATGTA
FADS1-F	CCGCAAAGACCCAGACATCAA	ZEB1-F	GGGAGGATGACACAGGAAAG
FADS1-R	CTGGAAGTAGAGAGGCAGCAA	ZEB1-R	GGTGCCTCAGGAAAAATGAC
FADS2-F	TCTCCCGCCTTTTCATCCC	ZEB2-F	CCTACTGGCATTGCTGAACG

FADS2-R	GCCAGTTCACCAATCAGCA	ZEB2-R	GACAATTAGTGCAGCCAGGTC
FADS3-F	GGATGCCGAGACACAACACTACA		
FADS3-R	TGTCACCAGACTTCTTCAGGG		

La reacción de qPCR se realizó en una placa de 96 pocillos con 2 µl de ADNc (10 ng) a los que se le añadieron 8 µl del MIX conteniendo los reactivos de la **Tabla 10** resultando en un volumen final de reacción de 10 µl.

Tabla 10. Reactivos empleados para la reacción de qPCR

Reactivo	Cantidad
ROX Reference Dye (50X)	0.2 µl
Primer-UP (10 µM)	0.3 µl (0.3 µM)
Primer-DN (10 µM)	0.3 µl (0.3 µM)
ADN Master SYBR Premix (2X)	5 µl
Agua libre de RNAsas	Hasta 8 µl

La placa se llevó a un termociclador *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, California, USA) donde tuvo lugar la reacción de qPCR en las siguientes condiciones: calentamiento 2 min a 50°C, desnaturalización 1 min a 95°C y amplificación 40 ciclos de [15s a 95°C y 35s a 60°C]. El análisis se realizó en tres réplicas biológicas diferentes para confirmar los resultados.

9. Estudios de transducción génica mediante construcciones lentivirales

Los vectores lentivirales son sistemas altamente eficientes para transferir genes o ARN de interferencia (ARNi) a células diana. Estos vectores se unen a las células diana a través de proteínas de la envoltura, permitiendo la liberación del ARN que contiene el material genético deseado. Una vez dentro de la célula, el ARN es convertido en ADN complementario mediante una enzima llamada transcriptasa reversa. Finalmente, el complejo entra en el núcleo de la célula y el ADN de interés se integra en el genoma, lo que resulta en una integración estable que puede transmitirse a las células hijas durante la división celular.

En el desarrollo de este trabajo, se utilizaron estos vectores para aumentar la expresión de FADS3 y para reprimir su expresión mediante secuencias de shRNA complementarias. Las infecciones se realizaron en la línea H1975 así como en su variante resistente 1975 AZDR. La producción de lentivirus se lleva a cabo siguiendo un protocolo que consta de tres fases distintas: la primera fase implica la obtención de los plásmidos seguido de la producción de las partículas virales y finalmente la transducción viral en las líneas de CPNM de interés.

9.1 Obtención de plásmidos

Se diseñaron vectores conteniendo las secuencias correspondientes para el silenciamiento y la sobreexpresión del gen a estudiar. Los vectores fueron diseñados y sintetizados por la empresa VectorBuilder (Chicago, IL, United States). A continuación, se muestra en la **Figura 23**, el esquema de los plásmidos utilizados en cada caso.

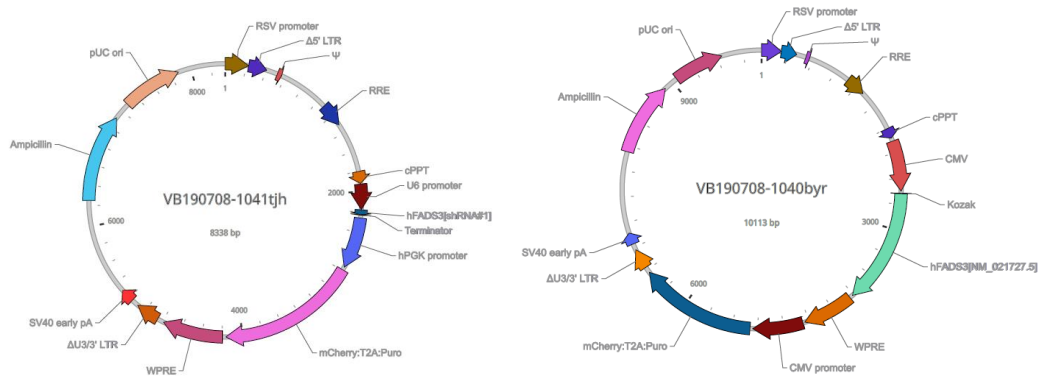


Figura 23. Esquema de los plásmidos utilizados. A) Representación de la estructura general de los plásmidos de silenciamiento (shRNA) empleados. B) Representación de la estructura del plásmido de sobreexpresión empleado, conteniendo la región codificante del gen FADS3 humano.

En el caso de los plásmidos de silenciamiento, se emplearon 2 vectores basados en el mismo plásmido, pero con secuencias de SH (short hairpin) diferentes (SH1 y SH2), para aumentar la probabilidad de silenciar el gen. Las secuencias de silenciamiento y sobreexpresión se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Descripción de las secuencias empleadas para el experimento de silenciamiento y sobreexpresión de FADS3

Silenciamiento	Tamaño	Secuencia	Reporter
hFADS3[shRNA#1]	8338 bp	CCTCCATCAAGATCTCAATT	mCherry:T2A:Puro
hFADS3[shRNA#2]	8338 bp	GGCAAGAAGAAACGCAGATAC	mCherry:T2A:Puro
Sobreexpresión	Tamaño	Secuencia de referencia NCBI	Reporter
hFADS3[NM_021727.5]	10113 bp	NM_021727.5	mCherry:T2A:Puro

Para este experimento, se empleó un sistema de construcciones lentivirales de tercera generación los cuales suponen una mejora al incluir componentes adicionales de seguridad y control de la expresión génica. De esta forma, se logra una mayor eficiencia en la producción de partículas virales infecciosas y una mayor seguridad al minimizar la posibilidad de replicación viral no deseada o descontrolada.

Este sistema consta de tres componentes principales:

- Plásmido viral de envoltura de la cápside pCMV-VSV-G (glycoprotein of vesicular stomatitis virus): este vector se utiliza para proporcionar el gen que codifica la proteína de la envoltura viral VSV-G. De esta forma, la proteína VSV-G se expresa en las células productoras de virus y se incorpora en la envoltura de los vectores lentivirales. Así, se facilita la transducción eficiente de las células puesto que esta proteína tiene la capacidad de mediar la entrada de partículas virales en una amplia variedad de células.

- Plásmido de empaquetamiento pCMV- Δ R8.2: incluye los genes que codifican para las proteínas estructurales del virus necesarias para la formación de partículas virales con capacidad de infección. En este plásmido, para minimizar la posibilidad de replicación viral no controlada (o generación de virus competentes), se han eliminado genes accesorios quedando sólo los genes *gag-pol*, *tat* y *rev* del HIV-1.
- Plásmido de transferencia o de interés: plásmido que contiene el transgén o gen de interés que se desea introducir en las células diana.

9.2 Producción de partículas lentivirales

De esta forma, para la producción de partículas lentivirales se realizó una co-transfección de los tres plásmidos descritos en las células productoras, en este caso la línea HEK293-LTV. Se combinaron los reactivos de la **Tabla 12** en un microtubo estéril de polipropileno y se incubaron durante 30 min:

Tabla 12. Reactivos empleados para la transfección de las HEK293 LTV.

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

En el tiempo de incubación se tripsinizaron las HEK 293-LTV, se resuspendieron en medio de transfección (DMEM + 10 %SBF sin antibióticos) y se sembraron en placas de alta adherencia tratadas con una solución de gelatina al 0,1% en PBS a razón de 1×10^6 células/placa. Finalizado el tiempo de incubación, la mezcla de reactivos se añadió lentamente gota a gota sobre la placa conteniendo las células HEK293-LTV productoras y se aseguró una correcta distribución moviendo la placa ligeramente. Las placas se guardaron en el incubador hasta el día siguiente. Transcurridas 24h post-transfección, se cambió el medio de cultivo por un medio que favorece la producción viral: “Harvesting media” (DMEM + 30% SBF sin antibióticos). Durante las 24-72h posteriores, comienza la producción de partículas virales en el interior de las células de manera que las células comienzan a lisarse a consecuencia de la producción masiva de virus y éstos se liberan al medio de cultivo. Tras 72h, se recogió el medio conteniendo las partículas virales formadas, se centrifugó durante 3 min a 400 g y se pasó la solución por un filtro de 0,45 μ m para eliminar los restos celulares presentes.

9.3 Transducción viral

Para la transducción viral, las líneas de interés se sometieron a dos ciclos consecutivos de infección para aumentar la probabilidad de éxito. En primer lugar, se añadió polibrene a una concentración de 10 μ g/ml al medio conteniendo las partículas virales para favorecer la infección. Esta mezcla se añadió al medio de cultivo de las células y transcurridas 24h se volvió a renovar con este medio (conteniendo los virus) hasta el día siguiente. Finalizado este tiempo (48h post-infección), se reemplazó el medio por medio RPMI completo conteniendo el antibiótico para selección, en este caso puomicina a 2.5 μ g/ml. De esta forma, sólo aquellas células que hayan incorporado el ADN viral en su genoma presentarán resistencia a puomicina

y crecerán de forma normal a diferencia de las células sin infectar que morirán completamente. Una vez realizada la selección, para comprobar que la infección se había producido correctamente, se extrajo ARN de las células para posterior confirmación por RT-qPCR, se extrajo proteína para validación por Western Blot y se visualizaron las células en microscopio de fluorescencia (el plásmido lleva proteína Cherry fluorescente).

9.4 Aislamiento, selección de clones y caracterización

Una vez que se comprobó que la transducción se había producido de forma adecuada, y, por tanto, la secuencia deseada se había insertado correctamente, se llevó a cabo una dilución límite con el objetivo de aislar clones individuales y, con ello, células puras donde todas poseen el mismo genotipo. Para ello, se realizaron una serie de diluciones sucesivas de la suspensión celular hasta la obtención de una célula o menos por pocillo (**Figura 24**).

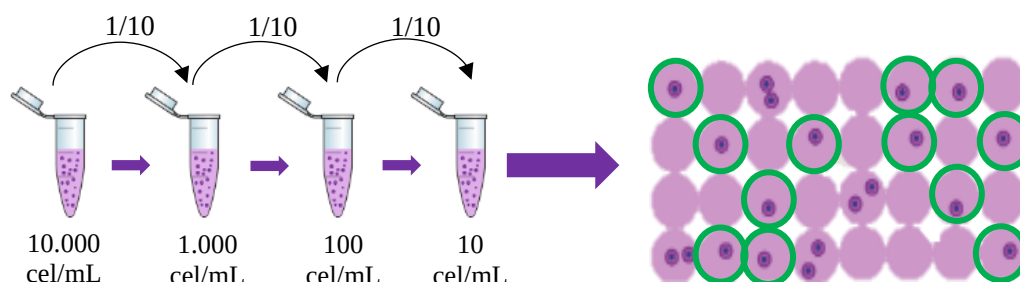


Figura 24. Representación del proceso de diluciones sucesivas realizado para el aislamiento y selección de clones en placas de 96 pocillos. El objetivo de esta metodología es aislar una célula por pocillo para finalmente obtener una colonia de células con un único genotipo.

La suspensión se plaqueó en una placa de 96 pocillos de modo que sólo aquellos pocillos en los que hubiera caído una única célula son los que nos interesaron. De entre todos los clones generados, se seleccionaron sólo aquellos con el fenotipo de interés y se establecieron como la línea silenciada o sobreexpresada, según cada caso (ver Resultados).

10. Análisis lipidómico

10.1 Reactivos

Los disolventes empleados fueron isopropanol (IPA), formiato amónico, acetato amónico y ácido fórmico obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania); y acetonitrilo (ACN) y metanol (MeOH) obtenidos de ThermoFisher Scientific (Massachusetts, USA).

Los estándares de lípidos utilizados como patrones internos, obtenidos de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA), Merck (Darmstadt, Alemania), Larodan (Solna, Suecia) y Caiman Chemicals (Ann Arbor, Michigan, USA), fueron: heptadecanoato de colest-5-en-3 β -ilo (CE(17:0)), diheptadecanoilglicerol (DG(17:0/17:0)), ácido nonadecanoico (FA(19:0)), heptadecanoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (LPC(17:0)), monoheptadecanoilglicerol (MG(17:0)), 1,2-diheptadecanoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina (PC(17:0/17:0)), 1,2-diheptadecanoil-sn-glicerol-3-fosfoletanolamina (PE(17:0/17:0)), 1,2-diheptadecanoil-sn-glicerol-3-fosfoglicerol (PG(17:0/17:0)), 1-heptadecanoil-2-(9Z-tetradecenoil)-sn-glicerol-3-fosfo-(1'-mio-inositol) (PI(17:0/14:1)), 1,2-diheptadecanoil-sn-glicerol-3-fosfoserina (PS(17:0/17:0)), N-palmitoil-D-esfingomielina (SM(18:1/16:0)), N-heptadecanoil-D-esfingomielina (SM(18:1/17:0)), 1,2,3-triheptadecanoilglicerol (TG(17:0/17:0/17:0)).

10.2 Procesado de las células y sueros para análisis lipidómico

Para el procesado de las células, se sembraron placas de 6 pocillos para cada línea celular y se dejó que alcanzaran la confluencia. Para el procesado, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS frío. A continuación, la monocapa celular se rasgó en hielo con 500 μ l de PBS frío y la suspensión se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se extrajo una alícuota de 200 μ l de la suspensión celular y se mezcló con 4 volúmenes de IPA. Tras vortear, las muestras se guardaron 20 min a -20°C y se centrifugaron (15 min, 15000 g, 4°C). Después, se cogieron 800 μ l del sobrenadante y se concentraron a sequedad en un concentrador *Savant Speed Vac SPD121P* (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA). Finalmente, el residuo se resuspendió en 100 μ l de una solución IPA:ACN:H₂O (2:1:1) conteniendo el mix de patrones internos (5 μ g/ml) y se transfirió a un vial para su análisis por HPLC-MS. El análisis de las muestras fue aleatorio. Además, se incluyeron tres blancos al inicio y se intercalaron muestras “quality control” (QC) cada 6 muestras a lo largo de la secuencia de análisis para facilitar la posterior identificación de lípidos y asegurar la reproducibilidad y robustez del análisis.

Para el procesado de sueros, se tomó una alícuota de 50 μ l de cada una de las muestras y se mezcló con 3 volúmenes de IPA. Tras vortear, las muestras se guardaron 20 min a -20°C y se centrifugaron (15 min, 15000 g, 4°C). A continuación, se recogió el sobrenadante y se concentró a sequedad. Finalmente, el residuo se resuspendió en 100 μ l de una solución IPA:ACN:H₂O (2:1:1) conteniendo el mix de patrones internos (5 μ g/ml) y se transfirió a un vial para su análisis por HPLC-MS. De igual forma, el análisis de las muestras fue aleatorio y, además, se incluyeron tres blancos al inicio y se intercalaron muestras “quality control” (QC) cada 6 muestras a lo largo de la secuencia de análisis.

10.3 Análisis “untargeted” por HPLC-MS/MS

El análisis lipidómico se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución en un sistema Vanquish™ (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) acoplada a detección por espectrometría de masas (HPLC-MS) en un equipo Orbitrap™ Q Exactive™ Plus (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) con una fuente de ionización por electrospray (ESI) **Figura 25**. La separación cromatográfica se realizó por cromatografía reversa (RP) en una columna Acquity UPLC CSH C18 (100 x 2.1 mm; 1.7 μ m) de Waters (Massachusetts, USA). La temperatura de la columna y la cámara del inyector automático se mantuvo a 65°C y 4°C, respectivamente.



Figura 25. Sistema de separación cromatográfica Vanquish™ acoplado a espectrómetro de masas Orbitrap Q Exactive™ Plus.

Para el análisis en modo de ionización positivo (ESI+), las fases móviles utilizadas fueron las siguientes: la fase móvil A estaba constituida por formiato amónico 0.01M en 60:40 (v/v) ACN:H₂O, mientras que la fase móvil B estaba compuesta por 0.01M de formiato amónico en 90:10 (v/v) IPA:ACN. Por otro lado, las fases móviles para modo de ionización negativo (ESI-) fueron: fase móvil A constituida por 0.01M de acetato amónico en 60:40 (v/v) ACN:H₂O y fase B constituida por 0.01M de acetato amónico en 90:10 (v/v) IPA:ACN. En este sentido, el método cromatográfico tanto para ESI+ como para ESI- se ajustó a 27.5 min con un flujo de inyección de 400 μ l/min de la siguiente forma: se estableció un gradiente de elución lineal donde la composición inicial era de 20% B e incrementó gradualmente hasta un 40% a los 2 min, 2-4 min 43 % B, 4-4.10 min 50% B, 4.1-14 min 54 % B, 14-14.1 min 70% B, 14.1-20 min 99% B, 20-24 min 99%B, 24-24.5 min 20% B, 24.5-27.5 min 20% B. El volumen de inyección se ajustó a 5 μ l.

10.4 Detección por MS/MS y procesamiento de datos

La adquisición de datos MS tanto en ESI+ como en ESI- se realizó siguiendo estos parámetros: caudal de gas envolvente 25 (0-14 min) y 80 (14-27 min) para ESI+ y 25 para ESI-; caudal de gas auxiliar 10 (0-14min) y 25 (14-27 min) para ESI+ y 25 para ESI-; voltaje de spray 3 kV para ESI+ y 2.5 Kv para ESI-, temperatura del capilar 215°C para ESI+ y 400°C para ESI-; Nivel de RF de lente S 95 para ESI+ y 65 para ESI-; temperatura de gas auxiliar 215°C para ESI+ y 350°C ESI-. Para las muestras QC, la adquisición de datos se realizó en modo Full-scan, mediante una adquisición dependiente de datos (DDA) y mediante una adquisición independiente de datos (DIA) mientras que las muestras individuales se adquirieron solo en modo MS. Para la adquisición en modo MS, la resolución se ajustó a 70000, el parámetro AGC a 1000000, la IT máxima a 100 ms, el rango de adquisición fue de 113-1700 m/z y se realizó en modo centroide. Para la adquisición en modo DDA, los parámetros MS se mantuvieron mientras que los parámetros MS² fueron: resolución 70000, parámetro AGC 1000000, IT máxima 200 ms, bucle de adquisición 5, recuento de MSX 1, ventana de 0.4 m/z, energías de colisión 30V y 40V, adquisición centroide y exclusión dinámica 5 sec. Por último, para la adquisición en DIA, los parámetros del MS se mantuvieron y los parámetros de MS² se ajustaron de la siguiente forma: resolución 70000, parámetro AGC 1000000, IT máxima 200 ms, energías de colisión 30V y 40V, rango de adquisición 80-1200 m/z y modo centroide.

La precisión en la determinación de la masa se aseguró calibrando el detector con una solución *ESI Ion Calibration Solution* (ThermoScientific, Massachusetts, USA). Los datos se obtuvieron con el *XCalibur™ Software* (ThermoScientific, Massachusetts, USA). Los archivos de datos “crudos” se convirtieron a ficheros mzXML a través del software *MSconvert* de Proteowizard 3.0.10800. Para el tratamiento de los datos lipidómicos e identificación de lípidos se utilizó LipidMS 3.0, un paquete basado en R desarrollado en nuestro laboratorio (<https://cran.r-project.org/web/packages/LipidMS/index.html>). Los parámetros utilizados durante el procesamiento de datos con LipidMS 3.0 se muestran en la **Tabla 13**. Los datos lipidómicos se corrigieron por la intensidad del patrón interno en todas las muestras y se normalizaron utilizando el método Loess (“Locally Estimated Scatterplot Smoothing”) para obtener una distribución más homogénea de los datos y una interpretación más precisa de los resultados.

Tabla 13. Parámetros utilizados durante el procesado de datos con LipidMS 3.0.

Parámetros Lipid MS 3.0		
Selección de picos	Dmzagglom	15
	Drtagglom	200
	Drtclust	25
	Minpeak	5
	Drtgap	5
	Drtminpeak	10
	Drtmaxpeak	200
	Recurs	5 para MS y 10 para MS ²
	Sb	3 para MS y 2 para MS ²
	Sn	3 para MS y 2 para MS ²
	Minint	1000 para MS y 100 para MS ²
	Weight	2 para MS y 3 para MS ²
	DmzIso	5
	drtIso	5
Alineamiento y agrupación	Dmzalign	10
	Drtalign	100
	Span	0.4
	Minsamplesfracalign	0.75
	Dmzgroup	10
	Drtagglomgroup	50
	Drtgroup	15
	Minsamplesfracgroup	0.30
Anotación	Dmz para precursores	5
	Dmz para productos	10
	Rttol	6
	CoelCutoff	0.6

11. Seahorse

La cuantificación en tiempo real de las tasas de producción de ATP celular se realizó utilizando el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe96 (Agilent Technologies, California, USA). Las líneas celulares se sembraron en microplacas de cultivo Seahorse XF96 a una densidad de 25.000 cel/pocillo por quintuplicado y se dejó que alcanzaran una confluencia del 80 %. Previo al ensayo, se hidrató un cartucho conteniendo los sensores con Seahorse XF Calibrant siguiendo las instrucciones del fabricante. El día del ensayo, las células se lavaron una vez y se incubaron en XF Seahorse Base Medium DMEM suplementado con 10 mM glucosa, 1 mM piruvato de sodio y 2 mM L-glutamina. Tras la calibración del analizador Seahorse XFe96, el cartucho con los sensores se retiró del instrumento y se insertó la microplaca de cultivo celular. Las lecturas de OCR y ECAR se tomaron a lo largo del tiempo en condiciones basales y tras la adición de los inhibidores mitocondriales: 1 μ M oligomicina, 1 μ M FCCP y 0,5 μ M rotenona/antimicina. Estos inhibidores son añadidos de forma secuencial para medir la producción de ATP, la respiración máxima y la respiración no mitocondrial, respectivamente. La duración total del ensayo fue de 1h y 24 min. Para la normalización de los datos, se añadió Hoescht 33342 (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) a una concentración de 1 μ g/mL en PBS a todos los pocillos y se

midió la fluorescencia (Ex/Em = 358/461 nm) en un lector Halo Led 96 (Livingston, Escocia, Reino Unido). Los resultados se exportaron utilizando el Seahorse Software Wave 2.4 XF-96.

12. Análisis de ácidos grasos totales

12.1 Reactivos

Los disolventes empleados para el procesamiento de la muestra y el análisis por LC-MS fueron: isopropanol (IPA), isooctano, hidróxido potásico, ácido fórmico y acetato amónico obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania); acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH) y heptano de ThermoFisher Scientific (Massachusetts, USA).

Los estándares de FAs y los patrones internos obtenidos de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA), Merck (Darmstadt, Alemania), Larodan (Solna, Suecia) y Caiman Chemicals (Ann Arbor, Michigan, USA) fueron los siguientes: ácido mirístico deuterado (FA(14:0)D27), ácido miristoleico (FA(14:0):1)n5), ácido pentadecanoico (FA(15:0)), ácido palmítico (FA(16:0)), ácido 11-hexadecanoico (FA(16:1)n5), ácido palmitoleico (FA(16:1) n7), ácido 7-hexadecenoico (FA(16:1)n9), ácido sapiénico (FA(16:1) n10), ácido margárico (FA(17:0)), ácido esteárico (FA(18:0)), ácido vaccénico (FA(18:1)n7), ácido oleico (FA(18:1)n9), ácido 6-octadecenoico (FA(18:1)n12), ácido 5-octadecenoico (FA(18:1)n n13), ácido linoleico (FA(18:2)n6), ácido 6,9-octadecadienoico (FA(18:2)n9), ácido 5,8-octadecadienoico (FA(18:2)n10), alfa- ácido linolénico (FA(18:3)n3), ácido gamma-linolénico (FA(18:3)n6), ácido nonadecanoico (FA(19:0)), ácido araquídico (FA(20:0)), 13- ácido eicosenoico (FA(20:1)n7), ácido gondoico (FA(20:1)n9), ácido 8-eicosenoico (FA(20:1)n12), ácido 11,14-eicosadienoico (FA(20:2) n6), ácido dihomó-alfa-linolénico (FA(20:3) n3), ácido dihomó-gamma-linolénico (FA(20:3)n6), ácido 5,8,11-eicosatrienoico (FA(20:2) n9), ácido 8,11,14,17-eicosatetraenoico (FA(20:4)n3), ácido araquidónico (FA(20:4)n6), ácido eicosapentaenoico (FA(20:5)n3), ácido behénico (FA(22:0)), ácido erúcico (FA(22:1)n9), ácido docosadienoico (FA(22:2)n6), ácido 10,13,16-docosatrienoico (FA(22:3)n6), ácido 10,13,16,19-docosatetraenoico (FA(22:4)n3), ácido adrenico (FA(22:4)n6), ácido cupanodónico (FA(22:5)n3), 4,7,10 Ácido ,13,16-docosapentaenoico (FA(22:5)n6), ácido cervónico (FA(22:6)n3), ácido lignocérico (FA(24:0)), ácido nervónico (FA(24:1)n9), ácido 9,12,15,18-tetracosatetraenoico (FA(24:4)n6), ácido 9,12,15,18,21-tetracosapentaenoico (FA(24:5)n3), ácido 6,9,12, 15,18-tetracosapentaenoico (FA(24:5)n6), ácido 6,9,12,15,18,21-tetracosahexaenoico (FA(24:6)n3), ácido cerótico (FA(26:0)), ácido 1,2-dipalmitoil-d62-sn-glicero-3-fosfocolina (PC(16:0/16:0)D62).

12.2 Preparación de medio de cultivo con ¹³C-Glc e incubación de líneas celulares (FAMetA)

Los medios marcados isotópicamente se prepararon a partir de RPMI sin glucosa, glutamina y sin aminoácidos (R9010-01, US Biological). La ¹³C-glucosa (CLM-1396 Cambridge Isotope Laboratories) y el resto de componentes se añadieron a la concentración normal encontrada en los medios RPMI. El medio se suplementó con un 10% de suero bovino fetal dializado (dSBF), con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 0.25 µg/ml de anfotericina B. Se sembraron placas de 6 pocillos para cada línea celular a razón de 1x10⁵ células/pocillo.

Transcurridas 24h, se retiró el medio y se incubaron las células durante 72h con el medio marcado.

12.3 Procesado de las células para análisis de FAs

Para el procesado de las células, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS frío. A continuación, la monocapa celular se rascó (con ayuda de “scrappers”) en hielo con 500 μ l de PBS frío y la suspensión se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Para el procesamiento, se transfirió una alícuota de 300 μ l a un vial de vidrio y se añadió el mismo volumen de MeOH:KOH (3M en H₂O) 9:1. La mezcla se incubó 1h a 80°C en un baño de agua para llevar a cabo la saponificación de los FAs y su liberación de los lípidos complejos. Transcurrido el tiempo, la reacción se neutralizó añadiendo 100 μ l de ácido fórmico y colocando los tubos en hielo. A continuación, se añadió un 1 ml de heptano y 1 ml de isooctano, se vortearon los tubos y se dejó que se separaran las fases. Tras esto, se transfirió la fase orgánica superior a un vial de HPLC de alta recuperación y se concentró a sequedad en un concentrador *Savant Speed Vac SPD121P* (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA). Finalmente, el residuo se resuspendió en 100 μ l de una solución 50:50 FmA:FmB conteniendo el mix de patrones internos (3 ppm) y se analizó por HPLC-MS. El análisis de las muestras fue aleatorio. Además, se incluyeron tres blancos al inicio y se intercalaron muestras “quality control” (QC) cada 6 muestras a lo largo de la secuencia de análisis para asegurar la reproducibilidad y robustez del análisis.

12.4 Análisis “targeted” por HPLC-MS/MS

El análisis de FAs totales se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución en un sistema Vanquish™ (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) acoplada a detección por espectrometría de masas (HPLC-MS) en un equipo Orbitrap™ Q Exactive™ Plus (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) con una fuente de ionización por electrospray (ESI). La separación cromatográfica se realizó por cromatografía reversa (RP) en una columna Cortecs C18 (150 x 2.1 mm; 1.6 μ m) de Waters (Massachusetts, USA). La temperatura de la columna y la cámara del inyector automático se mantuvo a 45 °C y 4°C, respectivamente. Las fases móviles utilizadas fueron las siguientes: la fase móvil A estaba constituida por acetato amónico 2.5 mM en 60:40 (v/v) H₂O:MeOH, mientras que la fase móvil B estaba compuesta por acetato amónico 2.5 mM en 95:5 (v/v) ACN:IPA. En este sentido, el método cromatográfico se ajustó a 34 min con un flujo de inyección de 300 μ l/min y se estableció un gradiente de elución lineal de la siguiente forma: 0 min, 45% B; 0.5 min, 45% B; 19 min, 55% B; 23 min, 99% B, 34 min, 99 % B. El volumen de inyección se ajustó a 5 μ l. La columna se lavó tras cada inyección con una solución 50:50 ACN:IPA durante 2 min antes de volver a equilibrarse con las condiciones iniciales.

12.5 Detección por MS y procesamiento de datos

La adquisición de datos se realizó en modo ESI- siguiendo estos parámetros: caudal de gas envolvente 60; caudal de gas auxiliar 20; voltaje de spray 1.5 kV; temperatura del capilar 300°C; Nivel de RF de lente S 75 y temperatura de gas auxiliar 300°C. Los datos se obtuvieron en modo centroide y en modo “Full-scan” con los siguientes parámetros establecidos: resolución 140000, parámetro AGC 1000000, IT máximo 100ms y rango de adquisición 100-450 m/z.

La precisión en la determinación de la masa se aseguró calibrando el detector con una solución *ESI Ion Calibration Solution* (ThermoFisher Scientific, Massachusetts USA). Los datos se obtuvieron con el *XCalibur™ Software* (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA). Los archivos de datos “crudos” se convirtieron a ficheros mzXML a través del *software MSconvert* de Proteowizard 3.0.10800. Para el procesamiento de datos de FAMetA, la obtención de perfiles isotopólogos ^{13}C y el cálculo de los parámetros para cada FA detectado se utilizó el paquete de R FAMetA desarrollado en el propio laboratorio (<https://CRAN.R-project.org/package=FAMetA>). El flujo de trabajo de FAMetA comienza con los archivos mzXML obtenidos junto a un archivo de metadatos en forma de .csv. El preprocesamiento se realiza en R mediante funciones de FAMetA y el paquete LipidMS, abarcando la detección de picos, alineamiento y agrupación. Posteriormente, se anotan los diferentes FAs, permitiendo la edición manual de compuestos, la corrección por patrones internos y la normalización por el método Loess. Tras la identificación de los FA, se extraen los isótopos y los datos se corrigen para la abundancia natural de ^{13}C . El análisis del metabolismo de FA se realiza en dos pasos: síntesis y elongación, modelando distribuciones isotópicas mediante regresión no lineal. Finalmente, se generan tablas resumidas para explorar los resultados obtenidos.

13. Determinación de TGs por fluorescencia

Para la visualización y cuantificación de los lípidos neutros dentro de la célula se utilizó una sonda fluorescente verde llamada BODIPY 493/503 (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA). Se realizó un marcaje para visualizar los lípidos neutros por microscopía de fluorescencia y otro para cuantificar la fluorescencia por citometría.

A) Marcaje con BODIPY para citometría

Se sembraron placas de 6 pocillos para cada línea celular y se dejó que alcanzan el 90% de confluencia. Se retiró el medio de cultivo de cada pocillo, se lavaron las placas con PBS y se añadieron 1,5 mL de medio RPMI completo conteniendo una concentración final de Bodipy de 2 μM . Las células se incubaron con la sonda fluorescente durante 30 min en oscuridad a 37 °C y 5% de CO_2 . A continuación, se retiró el medio conteniendo el Bodipy y se lavó cada pocillo dos veces con PBS. La monocapa celular se tripsinizó y se recogieron las células en tubos eppendorf de 1,5 mL. Después, se centrifugaron las células 300 g 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500 μL de RPMI completo. Las células se analizaron por citometría de flujo en un citómetro CytoFLEX (Pasadena, California, USA) utilizando un láser de excitación 488 nm y un filtro de emisión 515–545 nm. Se obtuvieron 10.000 eventos por muestra para el análisis de fluorescencia.

B) Marcaje con BODIPY para microscopía de fluorescencia

Se sembraron placas de 6 pocillos para cada línea celular y se dejó que alcanzan el 90% de confluencia. Se retiró el medio de cultivo de cada pocillo, se lavaron las placas con PBS y se añadieron 1,5 mL de medio RPMI completo conteniendo una concentración final de Bodipy de 2 μM . Las células se incubaron con la sonda fluorescente durante 30 min en oscuridad a 37 °C y 5% de CO_2 . A continuación, se retiró el medio conteniendo el Bodipy y se lavó cada pocillo dos veces con PBS. Las células se incubaron con 500 μL de PBS conteniendo una concentración final de 1 $\mu\text{g/mL}$ de Hoechst 33342 durante 5 min en oscuridad para la correcta visualización de los núcleos de las células. Transcurrido el tiempo, se lavaron los pocillos con PBS y se añadió medio

RPMI completo. Finalmente, se visualizó la fluorescencia y se adquirieron las imágenes en un microscopio confocal invertido (Leica, Wetzlar, Alemania) a 4X con un filtro 350/460 nm para el Hoescht 33342 y un filtro 488/510 para el Bodipy.

14. Análisis estadísticos y bioinformáticos

Todos los análisis estadísticos univariantes y multivariantes así como los gráficos representados se realizaron con el *software* libre R (<https://cran.r-project.org/>) y el *software* GraphPad Prism. La corrección para test múltiples mediante FDR se realizó según el método de Benjamini-Hotchber. Se consideraron significativas aquellas condiciones en las que el p-valor ajustado (FDR) < 0,05 o < 0,01 según el experimento. Los análisis de bases de datos del CCLE se realizaron mediante el CBioPortal (<https://www.cbioportal.org>) y analizados mediante correlación de Pearson y corrección por FDR.

15. Población de estudio

La población que se ha incluido en el estudio está constituida por pacientes diagnosticados de CPNM (estadios III-IV) portadores de mutaciones en EGFR susceptibles de tratamiento con ITQs reclutados en el Hospital Clínico y el Hospital General de Valencia entre enero de 2012 y febrero de 2021. Se recogieron un total de 65 muestras de sangre periférica en el momento basal antes de la primera administración del ITQ y 28 muestras en el momento de la progresión de la enfermedad, confirmada mediante Evaluation Criteria in Solid Tumours (RECIST). Los detalles demográficos y las características clinicopatológicas de la cohorte estudiada se muestran en la **Tabla 14**. Este estudio se llevó a cabo conforme a los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado para la obtención de muestras con fines de investigación antes del inicio del estudio.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

1. Caracterización de líneas celulares de CPNM dirigidas por mutaciones en *EGFR*

Los modelos celulares *in vitro* de CPNM constituyen potentes herramientas para reproducir diferentes aspectos de la biología tumoral incluida la resistencia adquirida a determinados fármacos. Con el fin de estudiar los mecanismos de resistencia adquirida a los ITQs de EGFR, se emplearon tres líneas celulares de CPNM procedentes de la American Type Culture Collection (ATCC) dirigidas por mutaciones en *EGFR* clínicamente relevantes y sensibles a los ITQs. La información de las líneas utilizadas puede verse en Materiales y Métodos (1).

Partiendo de las líneas parentales sensibles, se obtuvieron modelos de resistencia de cada una de ellas al inhibidor de EGFR de 3ª generación **osimertinib** (**Figura 21**). Una vez obtenidas las líneas celulares resistentes a osimertinib, se procedió a la caracterización de las mismas con la finalidad de comprobar si eran válidas para el objetivo que nos planteamos.

1.1 Ensayo de citotoxicidad frente a osimertinib

El primer paso de la caracterización consistió en determinar la sensibilidad de cada uno de los modelos a osimertinib mediante un ensayo de citotoxicidad a corto plazo (72h) y un ensayo de formación de colonias a largo plazo (15 días). En la **Figura 26 A** se representa la viabilidad celular relativa al control tratado con el vehículo DMSO (eje vertical) y el logaritmo de la concentración de osimertinib utilizada (eje horizontal). Como podemos observar, en las 3 parejas de modelos las variantes resistentes presentan un IC_{50} muy superior a los de las líneas parentales sensibles IC_{50} 4006 vs 4006 AZDR (< 0.004 vs $> 10 \mu M$); IC_{50} 1975 vs 1975AZDR (< 0.004 vs $> 10 \mu M$); IC_{50} 827 vs 827AZDR (< 0.004 vs $< 10 \mu M$). En las líneas sensibles existe una inhibición de la proliferación celular mucho más evidente que en las variantes resistentes, las cuales muestran valores de supervivencia significativamente mayores y son capaces de proliferar normalmente incluso a concentraciones de $10 \mu M$ de osimertinib. En la **Figura 26 B** se observa el mismo efecto, pero en un ensayo realizado durante 15 días. En las líneas resistentes tanto el tamaño como la densidad de las colonias formadas apenas varía en las células tratadas con respecto al control. Sin embargo, las líneas parentales sensibles son incapaces de formar colonias a la concentración utilizada durante el tiempo de duración del ensayo. Por tanto, se confirma la resistencia adquirida a osimertinib de los modelos de estudio.

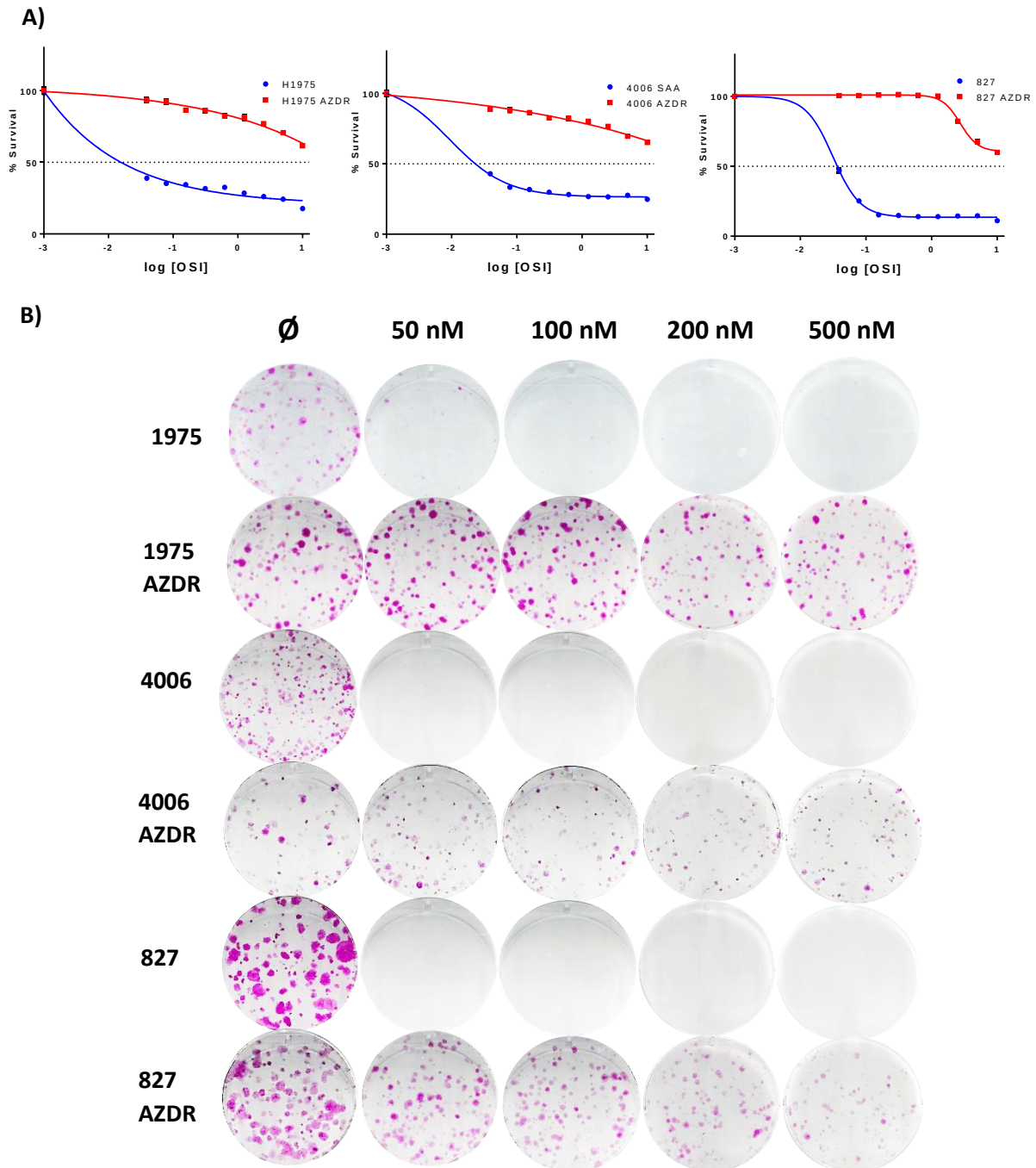


Figura 26. Respuesta a osimertinib de las líneas de CPNM sensibles y resistentes con mutaciones en *EGFR*. A) Ensayo de citotoxicidad aguda mediante el método de la sulforodamina B tras 72h de incubación con dosis crecientes de osimertinib (0-10 μ M) en las líneas sensibles 4006, 1975 y 827 (líneas azules) y en sus parejas resistentes 4006AZDR, 1975AZDR y 827AZDR (líneas rojas). Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control $\pm$ desviación estándar (n =6). B) Ensayo de formación de colonias tras 15 días de incubación con diferentes concentraciones de osimertinib hasta 500 nM en las líneas mencionadas previamente.

1.2 Caracterización morfológica

A continuación, se determinó si se habían producido cambios morfológicos en las células tras el proceso de adquisición de resistencia. Para ello, se tomaron fotografías bajo el microscopio confocal de cada una de ellas. Como se aprecia en las imágenes (**Figura 27**), las líneas resistentes presentan una morfología alargada y fusiforme además de un crecimiento espacial uniforme independiente de uniones célula-célula en contraposición a las líneas epiteliales sensibles que presentan un crecimiento en forma de isletas con uniones intercelulares.

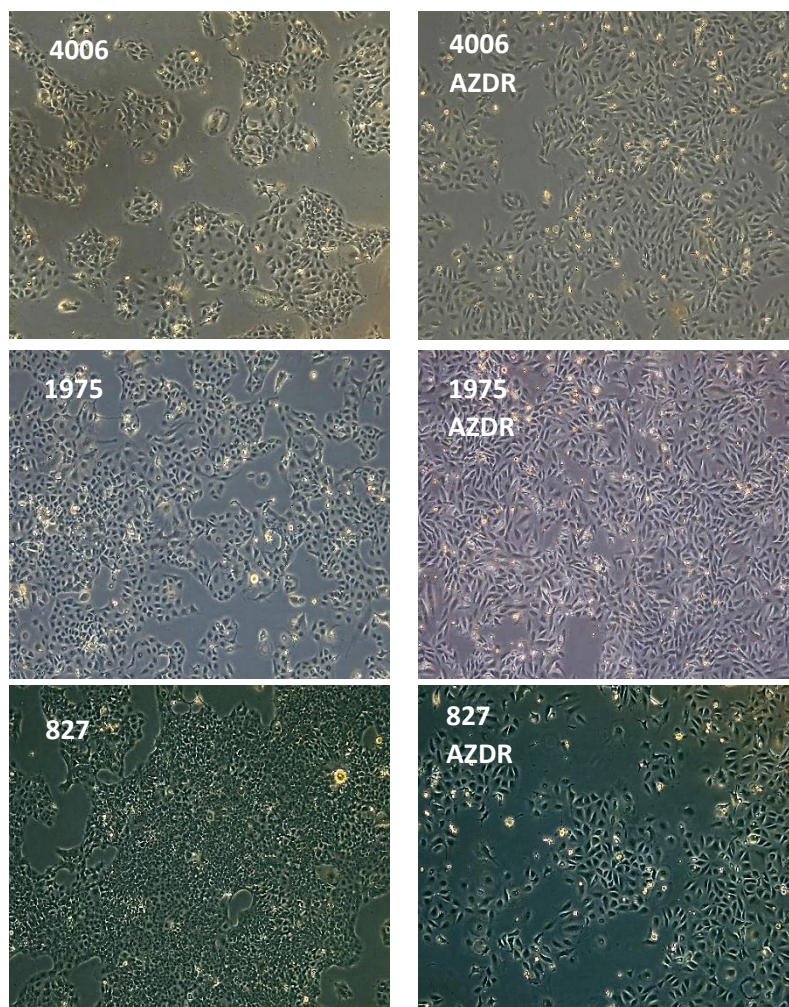


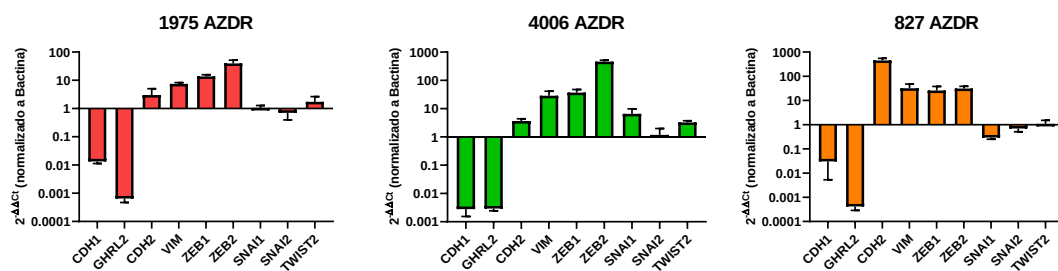
Figura 27. Morfología de las líneas celulares sensibles 4006, 1975 y 827 y de las líneas resistentes 4006 AZDR. 1975 AZDR Y 827 AZDR tomadas con microscopio confocal (4X).

1.3 Caracterización de marcadores EMT

Para relacionar la adquisición de resistencia y el cambio fenotípico con una posible activación del programa EMT, se cuantificó la expresión relativa de una serie de marcadores epiteliales y mesenquimales por RT-qPCR y mediante Western Blot.

En la **Figura 28 A** se observa cómo la expresión de los marcadores epiteliales **CDH1** y **GRHL2** en las líneas resistentes se ha reprimido drásticamente, mientras que los niveles de los marcadores mesenquimales **CDH2**, **VIM**, **ZEB1** y **ZEB2** han aumentado de forma significativa en comparación con los modelos sensibles. Los factores de transcripción **SNAIL1**, **SNAIL2** y **TWIST2** no presentan diferencias significativas. Esto podría ser debido a que ciertos marcadores mesenquimales no son regulados tan fácilmente como otros. Los resultados del Western Blot presentan concordancia con lo visto en el análisis de expresión por RT-qPCR como puede verse en la **Figura 28 B**. En las líneas resistentes se ha producido una represión de los marcadores epiteliales **CDH1** y **GRHL2** junto con una sobreexpresión de los marcadores mesenquimales **CDH2**, **VIM** y **ZEB1** con respecto a las líneas parentales sensibles.

A)



B)



Figura 28. Expresión marcadores de EMT en las líneas celulares sensibles y en las líneas resistentes. A) Expresión relativa de los marcadores EMT medidos por RT-qPCR para cada par de líneas. Se empleó la β -actina (*ACTB*) como gen normalizador. Los datos se representan como Log_2 de $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$. El experimento es representativo de 3 réplicas biológicas ($n=3$). B) Niveles de proteína medidos por Western Blot de los marcadores EMT en las líneas sensibles y las líneas resistentes. Se utilizó GAPDH como normalizador.

Los resultados indican que las líneas celulares resistentes a osimertinib han experimentado una transición epitelio-mesenquimal (EMT), evidenciada por la fuerte represión de los marcadores epiteliales CDH1 y GRHL2 y el aumento de los marcadores mesenquimales CDH2, VIM, ZEB1 y ZEB2. En conclusión, se puede afirmar que la adquisición de resistencia al ITQ de EGFR osimertinib, en los modelos utilizados va asociada a un cambio morfológico y fenotípico de tipo mesenquimal resultado de la activación del programa EMT. Como hemos mencionado anteriormente, la EMT no es un proceso binario, sino que puede ocurrir en diferentes grados y estados intermedios, conocidos como metaestados. Estos metaestados reflejan una serie de cambios graduales en las células que van desde un estado completamente epitelial hasta uno completamente mesenquimal con varios estados híbridos intermedios. Teniendo esto en cuenta, las diferentes líneas celulares podrían encontrarse en distintos metaestados EMT, lo cual explica la variabilidad observada en algunos marcadores. Por ejemplo, la línea parental 1975 ya parte de niveles muy elevados de VIM por lo que durante la transición no se ha visto afectada la proteína a diferencia de las 4006 AZDR y 827 AZDR (**Figura 28 B**). Algunas líneas pueden estar más avanzadas en la transición, mostrando una represión más fuerte de marcadores epiteliales y una mayor inducción de marcadores mesenquimales mientras que otras líneas pueden estar en un estado híbrido y experimentar cambios menos pronunciados o en diferentes marcadores EMT.

1.4 Evaluación de la capacidad migratoria

1.4.1 Ensayo de cierre de herida

La EMT se ha relacionado con la ganancia de capacidades migratorias e invasivas que caracterizan el fenotipo metastásico de los tumores. Por ello se estudió la capacidad migratoria de los modelos celulares mediante un experimento de cierre de herida o *wound healing*. Los resultados se muestran en la **Figura 29**. Las líneas sensibles a osimertinib muestran una capacidad limitada de cerrar la herida, cerrando aproximadamente un 50 % a las 24h. Esto es consistente con el fenotipo epitelial, donde las células presentan menor capacidad migratoria y tienden a mantener fuertes uniones intercelulares. En contraposición, las líneas resistentes a osimertinib muestran una capacidad mucho mayor de cierre de herida, cerrando casi completamente la herida a las 24h. Este comportamiento es característico de un fenotipo mesenquimal, donde las células tienen mayor capacidad de migración e invasión debido a la pérdida de uniones intercelulares. Esta mayor capacidad de migración observada en las líneas resistentes sugiere que estas células también pueden tener un mayor potencial metastásico y, por tanto, ser más propensas a diseminarse por otros tejidos. En definitiva, **la activación de la EMT en los modelos resistentes confiere una mayor capacidad migratoria** en comparación con los modelos sensibles.

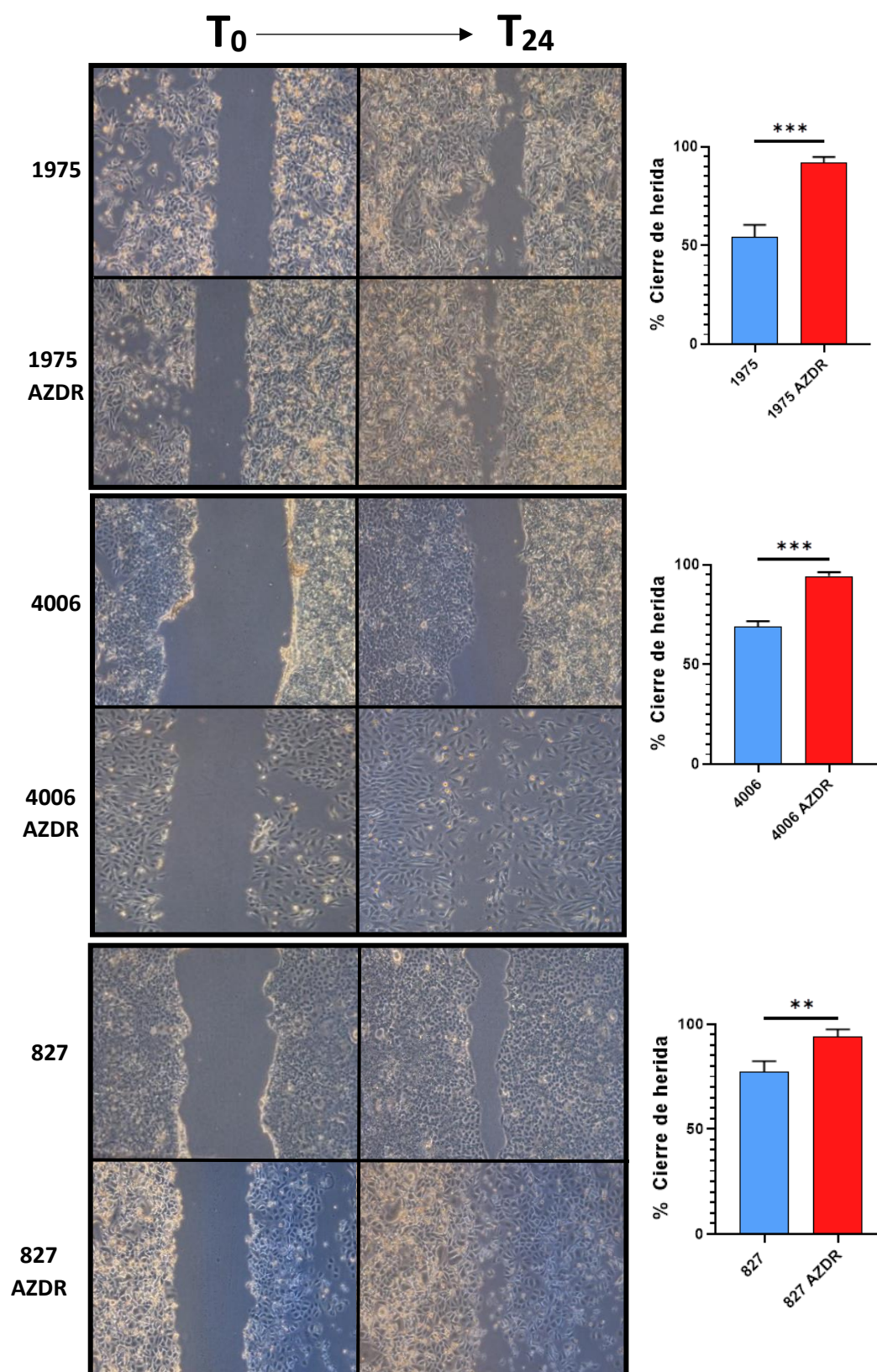


Figura 29. Ensayo de cierre de herida para determinar la capacidad migratoria en los modelos sensibles y resistentes a osimertinib. Imágenes obtenidas con microscopio de contraste de fases (4X) a tiempo 0 (T₀) y tras 24h de la realización de la herida. La cuantificación del porcentaje de cierre de herida se realizó con ImageJ ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$).

1.4.2 Ensayo Transwell

Como se ha comentado, las células que adquieren un fenotipo mesenquimal normalmente experimentan un aumento en la capacidad migratoria y de movimiento, permitiéndoles atravesar barreras tisulares y vasculares, un proceso esencial en la progresión y en la metástasis tumoral. El ensayo de Transwell evalúa la migración celular mediante el uso de un inserto con una membrana porosa de forma que las células se colocan en la cámara superior y factores quimiotácticos en la inferior, permitiendo observar y cuantificar cuántas células son capaces de migrar a través de la membrana transcurrido un tiempo. Al comparar las líneas celulares sensibles y resistentes se observa que el número de células que migran a través de la membrana es superior en las líneas resistentes en los tres casos evaluados (**Figura 30**). De esta forma, **líneas resistentes que presentan características EMT muestran una capacidad significativamente mayor para migrar** a través de la membrana en comparación con las líneas sensibles epiteliales, sugiriendo que las células resistentes tienen propiedades invasivas y migratorias más pronunciadas. Estos resultados corroboran lo observado en el ensayo de cierre de herida y reflejan la relación entre la activación de la EMT y la adquisición de mayores habilidades de migración debido a la pérdida de las uniones intercelulares.

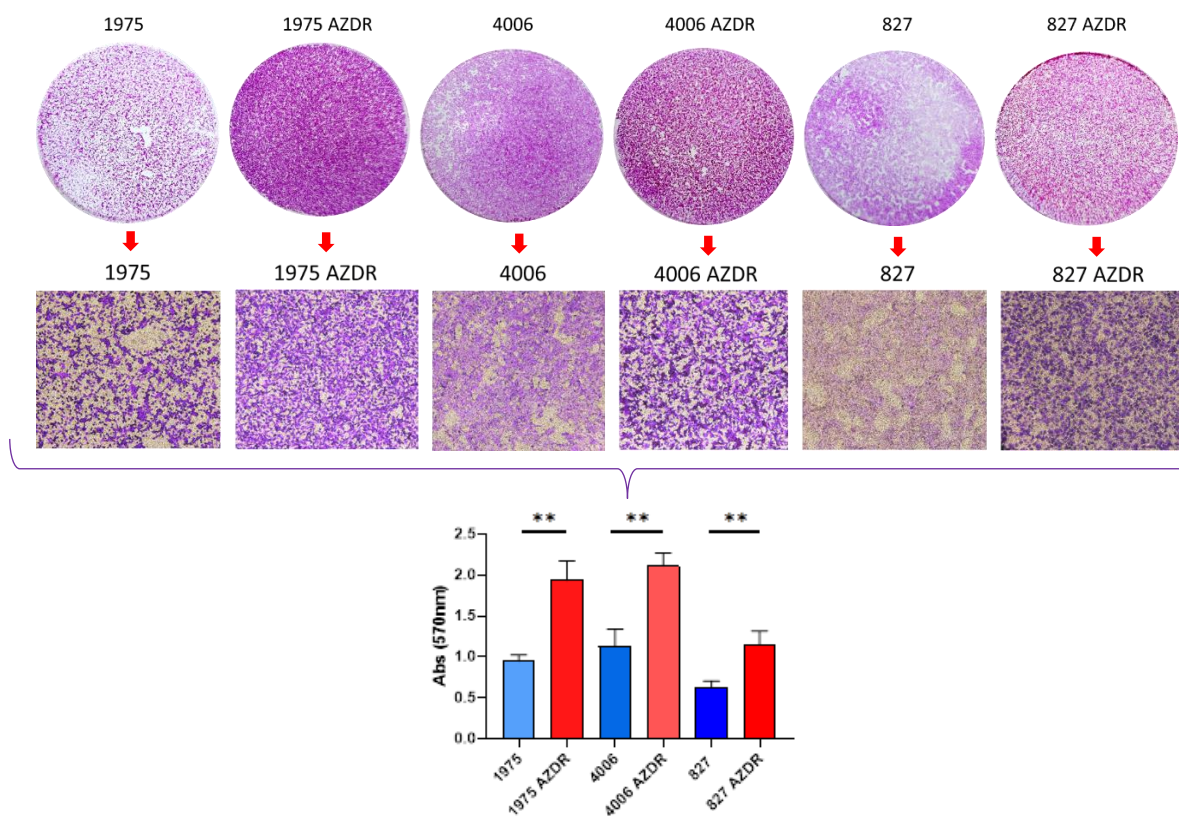


Figura 30. Ensayo de Transwell para evaluar la capacidad migratoria de las líneas sensibles (1975, 4006, 827) y resistentes (1975 AZDR, 4006 AZDR y 827 AZDR) a osimertinib. El gráfico de barras representa la cuantificación de la absorbancia a 570 nm tras la solubilización de la sulforrodamina B en las distintas líneas evaluadas. Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar, y las diferencias estadísticas están indicadas sobre las barras ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$).

2. Análisis transcriptómico de los modelos de CPNM-EGFR mutado sensibles y resistentes a osimertinib

En primer lugar, planteamos una aproximación basada en RNA-seq para elucidar los cambios globales a nivel transcriptómico que diferencian las líneas sensibles de las líneas resistentes a osimertinib. Esta tecnología constituye una herramienta rápida y precisa de obtener una medida cuantitativa de la expresión génica.

A nivel molecular, el fenotipo EMT es consecuencia de la expresión diferencial de un complejo programa transcripcional regulado por gran cantidad de factores tanto genéticos como epigenéticos y controlado por complejas redes de señalización intracelular^{201–203}. La integración de los datos de expresión obtenidos para los modelos experimentales permitirá la identificación de alteraciones comunes en determinados genes que dirigen la activación de la EMT y pueden estar implicados en la resistencia a osimertinib.

De esta forma, se obtuvo el ARN de cada una de las líneas por triplicado y se envió al servicio de secuenciación de la Universidad de Valencia. Una vez obtenida la lista de genes identificados y las cuentas por millón (CPM) normalizadas para cada muestra, se procedió al análisis de los datos.

2.1 Detección de genes diferencialmente expresados entre líneas sensibles y resistentes a osimertinib

En total se identificaron los transcritos correspondientes a 25318 genes. Se realizó un análisis de expresión diferencial para cada par de líneas con el paquete estadístico Deseq2, ajustando un valor mínimo para $FC = |3|$ y $FDR < 0,01$. Los genes diferencialmente expresados para cada par de líneas se representaron en forma de Volcano Plot (**Figura 31**). De forma general, tras el análisis se observa **una alta heterogeneidad** en los genes que cambian en cada par de líneas celulares reflejando diferencias intrínsecas y adaptaciones específicas de cada línea celular. Existen varios factores que contribuyen significativamente a esta variabilidad. Por un lado, las líneas celulares empleadas tienen diferentes orígenes lo que contribuye a la variabilidad genética y epigenética entre ellas. Estas diferencias intrínsecas pueden influir en cómo cada línea responde a osimertinib y otros estímulos, resultando en patrones de expresión génica distintos. Del mismo modo, la presencia de diferentes mutaciones en *EGFR* (T790M y deleciones en el exón 19) y otras alteraciones genéticas en las líneas celulares puede causar variabilidad en la expresión de determinados genes. Por otro lado, las líneas celulares se encuentran en diferentes metaestados EMT lo que también puede originar diferencias en la expresión de genes implicados en determinadas funciones celulares y contribuir a la heterogeneidad observada. Por último, los efectos del propio microambiente celular de cada línea también podrían generar diferencias en los patrones de expresión génica.

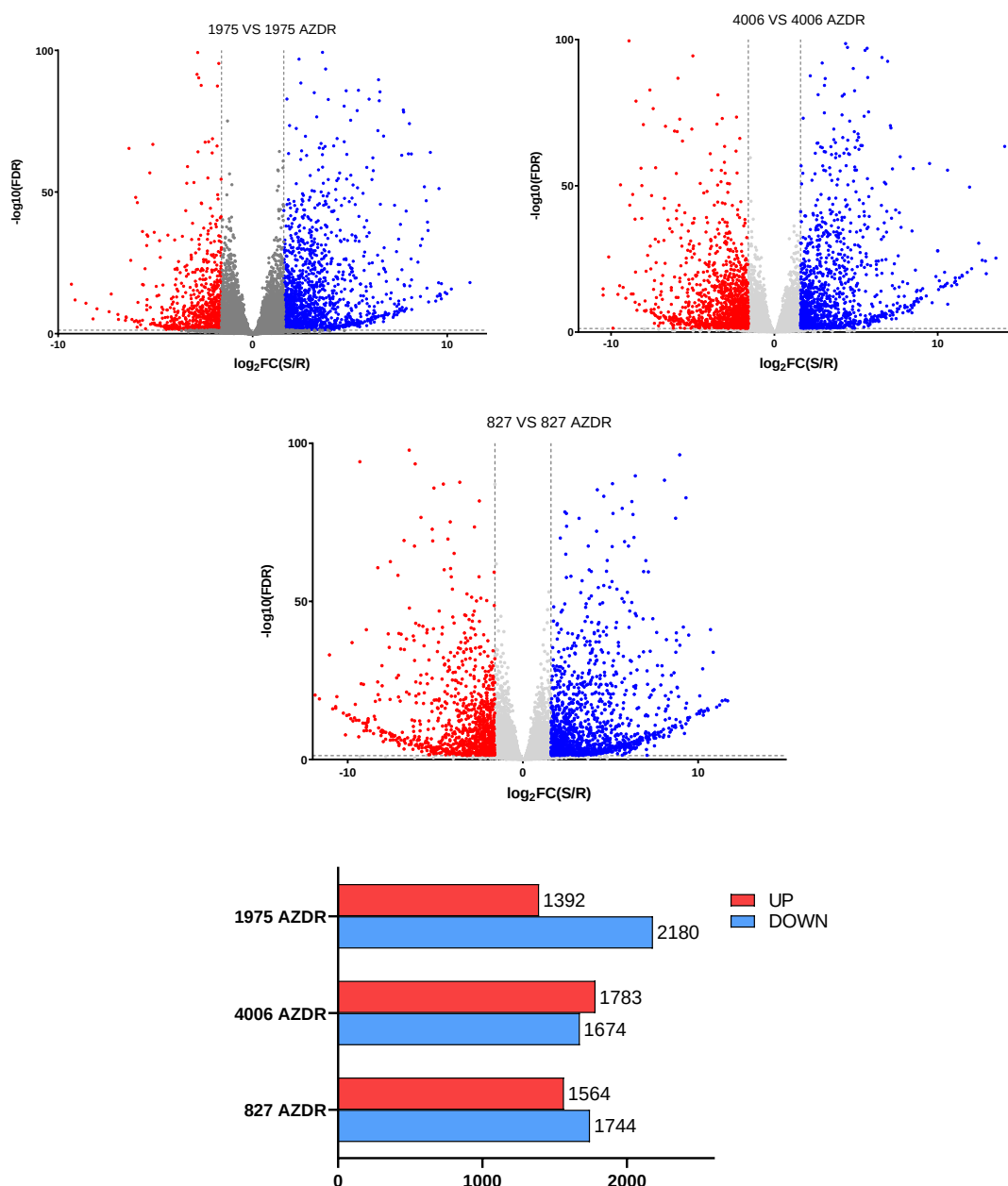


Figura 31. Representación gráfica en forma de Volcano Plot de los genes diferencialmente expresados para cada par de líneas sensible/resistente obtenidos tras el análisis Deseq2. El eje X representa el $\log_2FC$ y el eje Y el $-\log_{10}FDR$ para todos los genes detectados entre la línea sensible y la línea resistente. En rojo aparecen los genes sobreexpresados en la línea resistente y en azul aquellos reprimidos con respecto a la línea sensible. Se consideraron significativos aquellos genes con $FC \leq -3$ / $FC \geq 3$ ($\log_2FC \leq -1.6$ / $\log_2FC \geq 1.6$) y $FDR < 0,01$ ($-\log_{10}FDR > 2$).

A pesar de la variabilidad entre las líneas celulares, probablemente existan genes cuya expresión está consistentemente alterada en todas las líneas resistentes en comparación con las sensibles. Estos genes comunes son particularmente importantes porque pueden representar mecanismos conservados en la resistencia a osimertinib y su identificación es crucial para comprender los elementos centrales que dirigen este proceso. De esta forma, con el objetivo de observar la relación entre los transcritos diferencialmente expresados de las tres líneas y así poder identificar alteraciones comunes a los modelos empleados se construyó un diagrama de Venn con los datos del análisis de expresión diferencial (**Figura 32**).

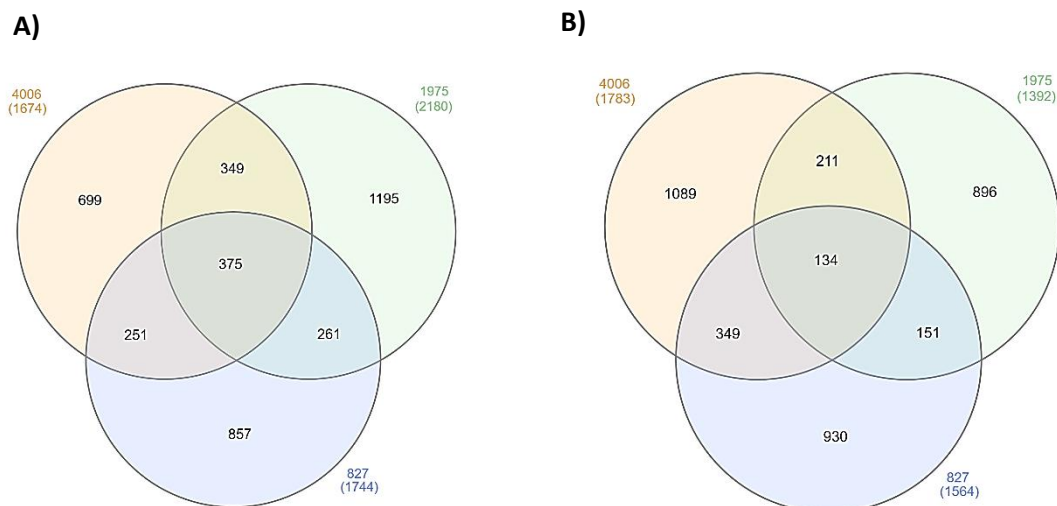


Figura 32. Representación gráfica en forma de diagrama de Venn de los genes: **A)** Reprimidos en las líneas resistentes vs sensibles ("DN") **B)** Sobreexpresados en las líneas resistentes vs sensibles ("UP").

De esta forma, se obtuvo una firma de genes asociada a la resistencia a osimertinib (**Firma O-R**) de **375 genes reprimidos y 134 genes sobreexpresados** (509 genes) en las líneas mesenquimales-resistentes con respecto a las líneas epiteliales-sensibles:

- 1) En el grupo de genes reprimidos "DN", podemos encontrar típicos genes que caracterizan el fenotipo epitelial según la bibliografía como *CDH1*, *EPCAM*, *GRHL1/2/3*, *OVOL1/2*, *ESRP1*, *CLDN4/7/9*, *AGR2*, *EGFR*, *HER3*, y *MARVELD2/3*^{179,368–370}.
- 2) En el grupo de genes sobreexpresados "UP" se encuentran genes conocidos por activar la EMT y regular el mantenimiento del fenotipo mesenquimal en la célula como *ZEB1/2*, *VIM* y *TGF- β* ^{179,206,369}.

Tras identificar una firma de 509 genes potencialmente implicados en la resistencia a osimertinib mediante los datos del RNA-seq, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) utilizando exclusivamente estos genes para evaluar si los genes de la firma son suficientes para separar claramente las líneas celulares sensibles a osimertinib de las resistentes. Los resultados del PCA se muestran en la **Figura 33**. La componente principal 1 (PC1) explica el 60% de la variabilidad observada y separa claramente las líneas celulares sensibles de las resistentes sugiriendo que **los genes incluidos en la firma de resistencia reflejan diferencias de expresión críticas** entre estos dos estados y, por tanto, son representativos de un perfil de expresión génica distintivo.

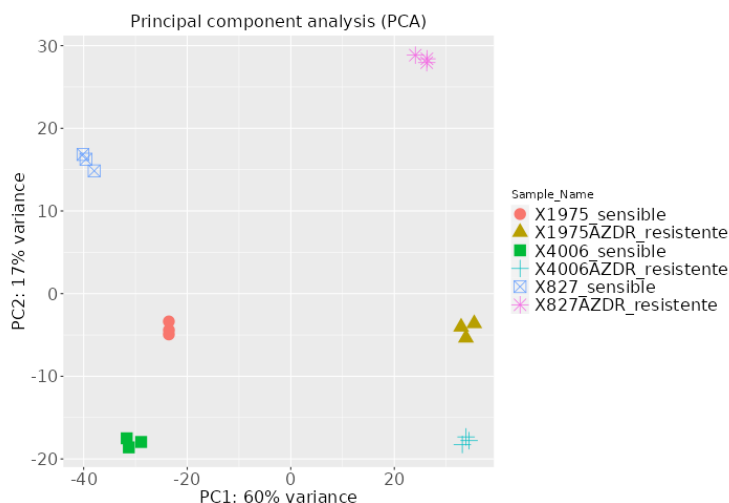


Figura 33. Análisis de componentes principales (PCA) con los valores de expresión de los genes que componen la firma de resistencia a osimertinib (Firma O-R). Los ejes representan las dos primeras componentes principales (PC1 y PC2), que explican el 60% y 17% de la variabilidad total, respectivamente.

2.2. Análisis de enriquecimiento GO y pathways alteradas

La naturaleza de los genes seleccionados se investigó mediante un “Over Representation Analysis” (ORA) para grupos de genes que integran las 3 categorías “Gene Ontology” (GO) y para grupos de genes que integran las rutas de tres bases de datos: KEGG, Reactome y WikiPathways. De esta forma, es posible profundizar en el conocimiento de las vías y procesos biológicos en los que están implicados estos genes, proporcionando un contexto funcional a los cambios observados. De esta forma, los genes diferencialmente expresados identificados y comunes a los 3 modelos se sometieron a un análisis de enriquecimiento GO y un análisis de pathways, tomando un valor de FDR < 0,05 por el método de Benjamini-Hotchber. Los resultados para las 3 categorías de términos GO se muestran en la **Figura 34**. De forma general, el análisis muestra que las familias de genes diferencialmente expresadas entre líneas sensibles y resistentes se relacionan con procesos de desarrollo y diferenciación epitelial, así como con la organización de las uniones celulares. Esto concuerda con la desorganización de las uniones celulares y la pérdida de adhesión observada. A nivel celular, los genes diferencialmente expresados codifican proteínas localizadas en la membrana, impactando en la estructura y comunicación celular. Funcionalmente, estos genes están vinculados a moléculas que participan en la unión de componentes estructurales y en la dinámica de receptores celulares.

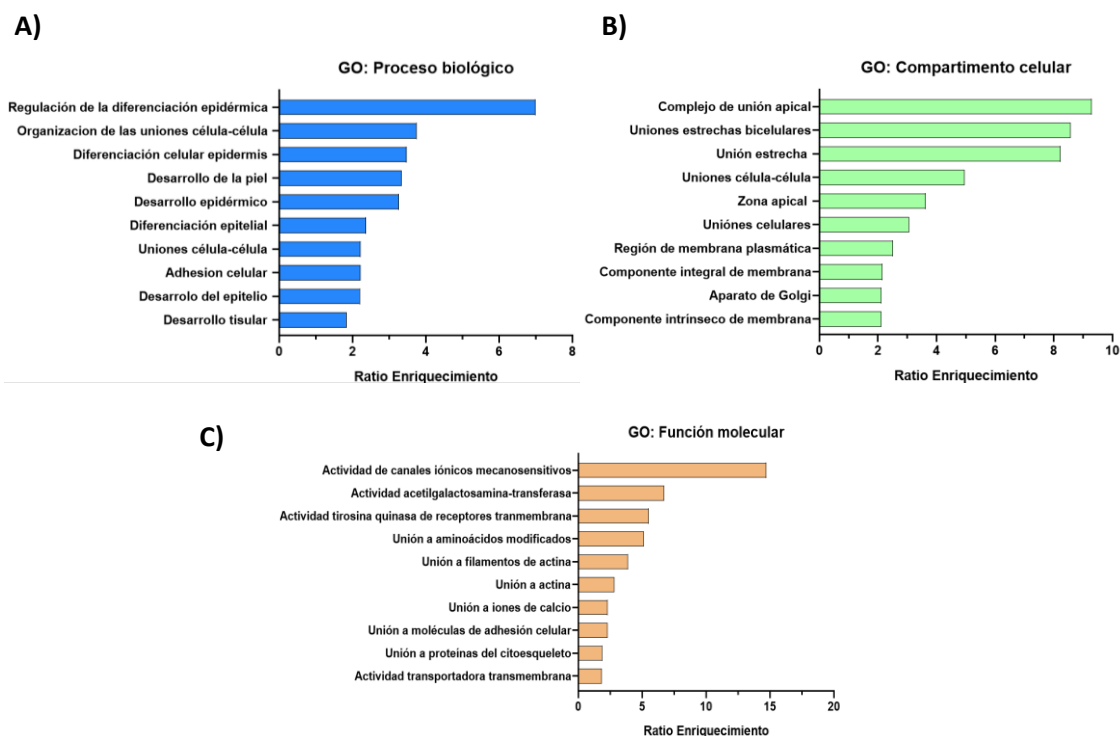


Figura 34. Resultados del análisis de enriquecimiento GO para la categoría “Proceso biológico” (A), “Compartimento celular” (B) y “Función Molecular” (C). Los términos enriquecidos se representan en el eje vertical, mientras que el eje horizontal indica el valor de enriquecimiento normalizado para cada uno de ellos.

Como cabría esperar dado el mecanismo de adquisición de resistencia a osimertinib que ha tenido lugar en las líneas, **están sobrerrepresentadas de forma significativa familias de genes involucradas en el proceso de EMT¹⁷⁹** tales como:

- Proteínas involucradas en las uniones intercelulares.
- Moléculas de adhesión y proteínas reguladoras de la diferenciación epitelial.
- Proteínas relacionadas con la remodelación del citoesqueleto.
- Proteínas vinculadas a la alteración en la composición de las membranas y mayor actividad transportadora.

A continuación, para complementar la información proporcionada por el análisis de enriquecimiento de términos GO y obtener una comprensión más profunda de cómo se organizan y coordinan los diferentes elementos en vías biológicas, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional de pathways. Este análisis se realizó utilizando 3 bases de datos diferentes: KEGG, Reactome y WikiPathways. Se representaron sólo aquellas rutas significativas con un FDR < 0,05. Los resultados del análisis pueden verse en la **Figura 35**. De forma general, están sobrerrepresentados pathways relacionados con las uniones celulares, lo que concuerda con lo visto en el análisis de términos GO realizado previamente y reflejan la activación del proceso de EMT que ha tenido lugar durante la adquisición de resistencia a osimertinib.

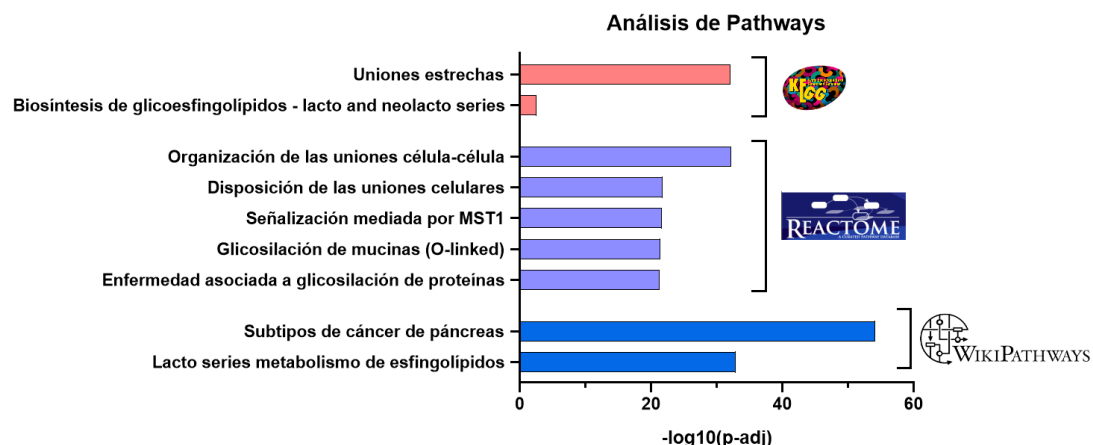


Figura 35. Análisis de enriquecimiento de pathways en las bases de datos KEGG, Reactome y WikiPathways. Los pathways enriquecidos se representan en el eje vertical, mientras que el eje horizontal indica el valor de $-\log_{10}$ del p-valor ajustado (FDR).

Por otro lado, llama la atención la presencia de genes relacionados con el metabolismo de SLs y concretamente, con el metabolismo de glicosfingolípidos. Los cambios en la glicosilación asociados al cáncer son responsables de varios aspectos de la malignidad, incluida la proliferación, la invasión y la metástasis³⁷¹. En este sentido, la EMT se ha asociado también a cambios en la glicosilación de determinadas especies de lípidos como los SLs, componentes esenciales de las membranas celulares y efectores importantes en la señalización celular y la adhesión celular. Estos glicosfingolípidos pueden modular la actividad y la señalización de los receptores tirosina quinasa e influir en la EMT (**Figura 36**)³⁷². Se ha descrito que en cáncer de ovario, ciertas especies de glicosfingolípidos, especialmente las series globo y ganglio, juegan un papel importante en la transición entre células epiteliales y mesenquimales³⁷³. La inducción de la EMT mediada por la eliminación de la E-cadherina, es capaz de generar un aumento de gangliósidos y una disminución de globósidos promoviendo cambios en la fosforilación de mTOR, ERK y AKT que mantienen el fenotipo mesenquimal de las células. De esta forma, estos cambios en el metabolismo de los lípidos, concretamente los glicosfingolípidos, pueden promover características de EMT y facilitar la adaptación de las células cancerosas a entornos cambiantes, como el MAT o durante el proceso de metástasis.

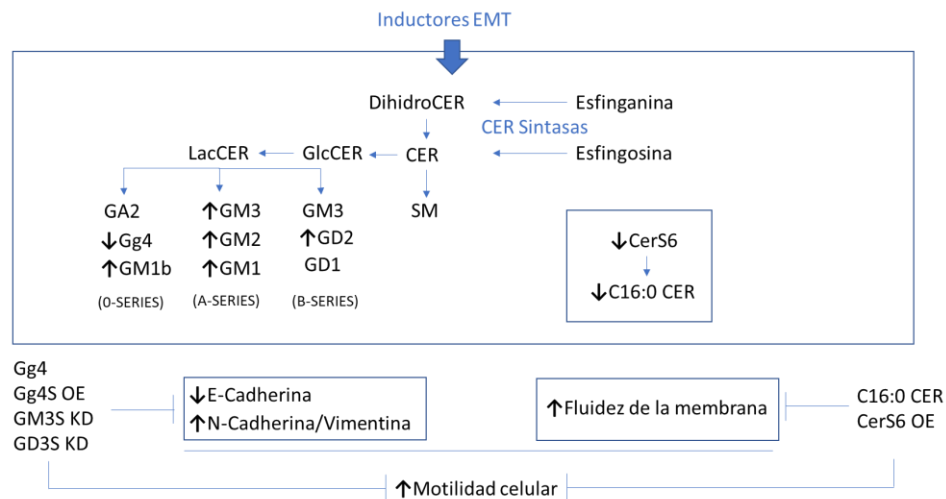


Figura 36. Representación gráfica de la conexión entre el metabolismo de glicosfingolípidos y determinadas características de la EMT. La EMT altera la expresión de enzimas metabolizadoras de SL como Gg4S, GM3S, GD3S y CerS6S. Estas alteraciones del metabolismo de SL modulan características de la EMT como la regulación negativa de la E-cadherina, el aumento de la fluidez de la membrana plasmática y la motilidad celular. Las Cers exógenas Gg4 y C16:0 así como la sobreexpresión de Gg4S y CerS6 inhiben la motilidad celular, así como lo hace la eliminación de GM3S y GD3S³⁷².

3. Análisis lipidómico de los modelos de CPNM-EGFR mutado sensibles y resistentes a osimertinib

Como se ha comentado anteriormente, la activación del programa EMT dirige adaptaciones metabólicas dinámicas necesarias para promover y mantener el fenotipo mesenquimal de las células²⁴⁴. De entre todas ellas, la reprogramación del metabolismo de lípidos constituye un punto clave de regulación ya que este tipo de moléculas está involucrado en múltiples funciones biológicas de gran importancia. En base a esto, es razonable pensar que en los modelos resistentes a osimertinib por activación de la EMT se hayan producido alteraciones en el lipidoma. Los estudios de lipidómica en modelos celulares ofrecen algunas ventajas sobre los estudios en animales o en humanos como variables experimentales fácilmente controlables, mayor reproducibilidad debido a que no se tienen en cuenta factores como edad y género de los sujetos y menor costo. Por ello, se realizó un estudio lipidómico exhaustivo de las líneas de CPNM-EGFR mutado sensibles y resistentes a osimertinib mediante una aproximación basada en cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS). La metodología empleada para llevar a cabo el estudio se describe en Materiales y Métodos (10).

3.1 Composición lipídica global

Se realizaron aproximadamente **1000 identificaciones** de las que se obtuvieron **626 especies** en total pertenecientes a **18 clases** diferentes de lípidos. Los resultados que se presentan a continuación son representativos de 3 experimentos diferentes. Este análisis lipidómico proporciona una visión detallada de la composición lipídica de las diferentes líneas de CPNM utilizadas (**Figura 37**).

De forma general, la mayor parte del lipidoma en estas células está compuesto por:

- Fosfatidilcolinas (PC): Representan alrededor del 18-20% del lipidoma.
- Triglicéridos (TG): Constituyen aproximadamente un 16-18% del lipidoma.
- Fosfatidilcolina plasmalógeno (PCp): Aproximadamente 10-14% del lipidoma.
- Fosfatidiletanolaminas (PE): Componen aproximadamente un 8-10% del lipidoma.
- Fosfatidilinositoles (PI): Aproximadamente 5-8% del lipidoma
- Esfingomielinas (SM): Aproximadamente 4-7% del lipidoma.

El resto de clases corresponden a clases minoritarias que, aunque representan una porción menor del lipidoma total en las células estudiadas, son importantes y pueden desempeñar roles fundamentales en la estructura y la función celular.

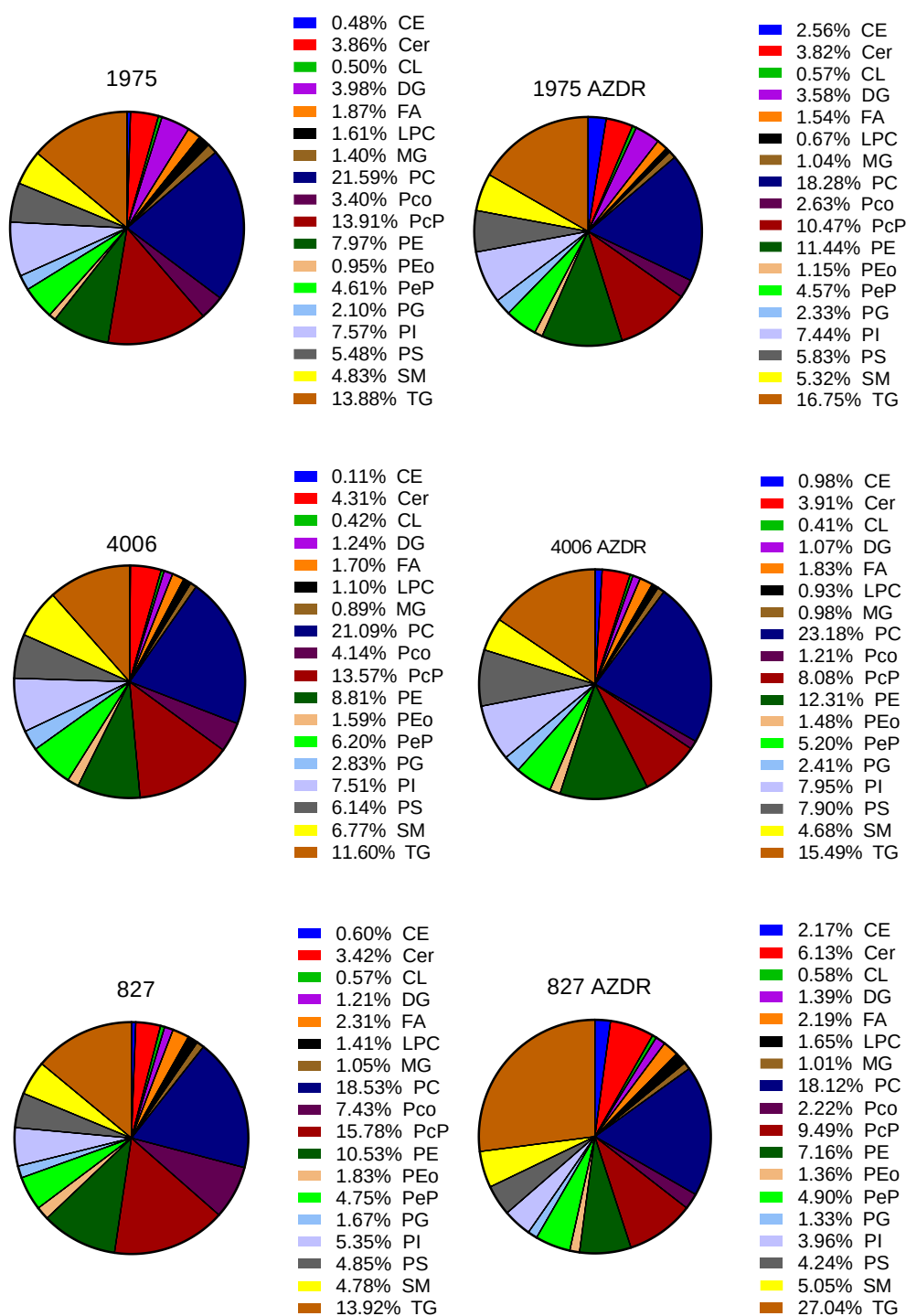


Figura 37. Representación gráfica en forma de diagrama circular de la composición de lípidos en cada línea celular.

Con el objetivo de evaluar la correcta agrupación de las muestras en función de su tipo (Sensible-Resistente) se llevó a cabo un PCA con los datos lipídomicos. Este análisis permite visualizar tendencias generales y agrupaciones intrínsecas de las muestras. El PCA revela una clara separación entre cada línea celular sensible y su correspondiente línea resistente, reflejando la **existencia de una firma lipídómica subyacente a la resistencia a osimertinib capaz de discriminar entre líneas sensibles y aquellas que han adquirido resistencia mediante la activación de la EMT (Figura 38).**

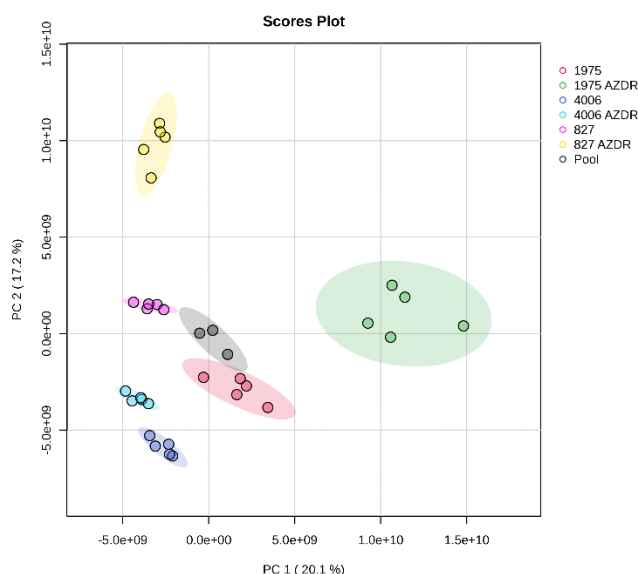


Figura 38. Análisis de componentes principales (PCA) entre las líneas sensibles y resistentes a osimertinib utilizando los datos lipidómicos. Los ejes representan las dos primeras componentes principales (PC1 y PC2), que explican 20,1% y 17,2% de la variabilidad total, respectivamente. Se observa una clara separación entre cada línea sensible y su línea resistente, lo que indica diferencias significativas en su perfil lipidómico.

Aunque se observa una clara separación entre cada línea sensible y su línea resistente, no hay un agrupamiento completo separado de todas las líneas sensibles y todas las líneas resistentes. Esto sugiere que, aunque la resistencia induce cambios en los perfiles lipidómicos, cada línea celular responde de manera única.

3.2 Análisis lipidómico de clases principales

A continuación, se describen las clases de lípidos responsables de las diferencias entre los fenotipos sensible y resistente para cada modelo empleado:

I) 1975 vs 1975 AZDR

Al comparar la línea 1975 y 1975 AZDR (**Figura 39**), se observan cambios significativos en determinadas clases de lípidos apuntando a que ha tenido lugar una reprogramación lipidómica en la línea 1975 AZDR resultado del proceso de adquisición de resistencia a osimertinib a través de la EMT. Se observa un patrón de aumento de lípidos neutros como TGs y CEs, así como incrementos en otros tipos de lípidos como SMs y PEs. Por otro lado, se observa una reducción en ciertas clases de fosfolípidos, como PCs, PCo y PCp. Esto podría ser indicativo de una posible remodelación de las membranas celulares y un cambio hacia una mayor acumulación de lípidos a modo de reserva energética.

1975 vs 1975 AZDR

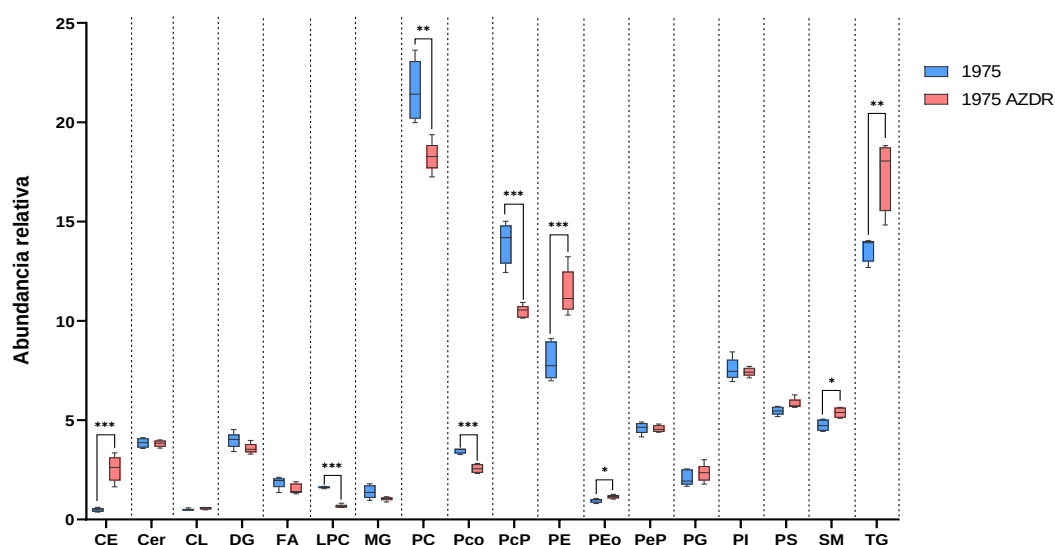


Figura 39. Diferencias en las proporciones relativas de las diferentes clases de lípidos entre la línea sensible 1975 (azul) y la línea resistente 1975 AZDR (rojo). En el eje Y se representan las proporciones relativas de las diferentes clases de lípidos en el lipidoma de ambas líneas celulares, expresadas como porcentaje respecto al total de lípidos detectados ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

II) 4006 vs 4006 AZDR

Al comparar la línea 4006 y 4006 AZDR (**Figura 40**), también se observan cambios significativos en determinadas clases de lípidos que sugieren que en esta línea también ha tenido lugar una reprogramación del metabolismo de lípidos asociada al proceso de resistencia adquirida a osimertinib. En la línea 4006 AZDR, se observa un aumento marcado en los TGs y CEs, lo que indica una tendencia hacia una mayor acumulación de lípidos neutros y componentes estructurales esenciales para la célula. En esta línea, se ha producido además un aumento significativo en ciertas clases de fosfolípidos como PEs y PSs. En contraste, existe una disminución notable en PCo y PCp así como en SMs. Igual que sucedía en el caso anterior, el patrón observado podría sugerir una tendencia a acumular lípidos neutros como reserva y una reestructuración de las membranas celulares.

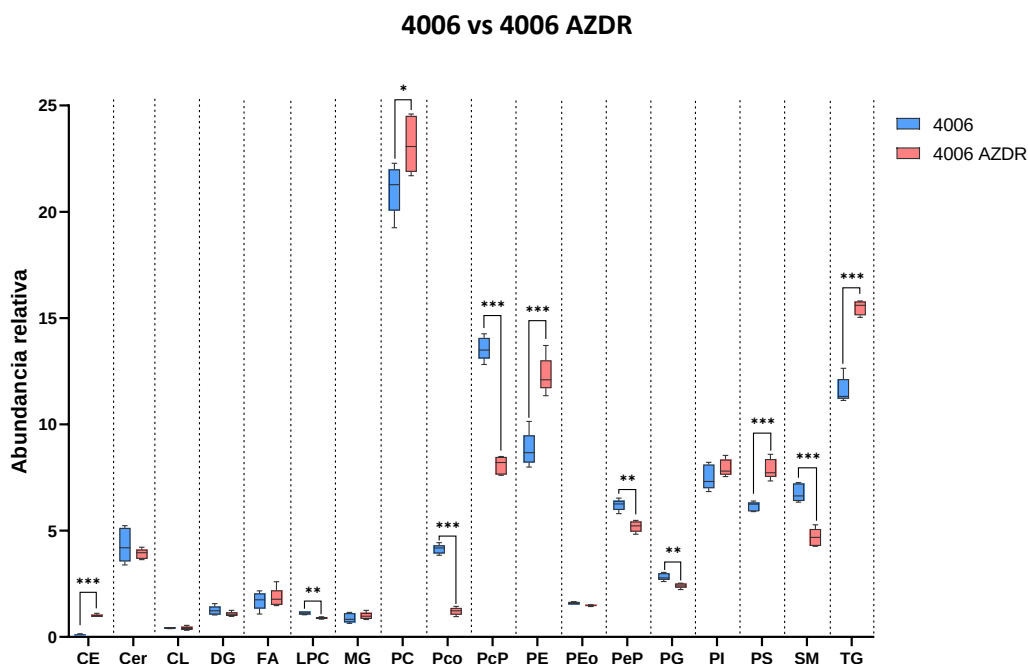


Figura 40. Diferencias en las proporciones relativas de las diferentes clases de lípidos entre la línea sensible 4006 (azul) y la línea resistente 4006 AZDR (rojo). En el eje Y se representan las proporciones relativas de las diferentes clases de lípidos en el lipidoma de ambas líneas celulares, expresadas como porcentaje respecto al total de lípidos detectados. ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

III) 827 vs 827 AZDR

Por último, al comparar la línea 827 y 827 AZDR (**Figura 41**), los cambios observados son más acusados en comparación con los otros dos modelos celulares estudiados. En la línea 827 AZDR, la reprogramación lipidómica tiene un impacto mucho más marcado, con diferencias significativas respecto a su línea parental. Esta remodelación del metabolismo se refleja en un aumento significativo de TGs, CEs y Cer, junto con una reducción en múltiples clases de fosfolípidos como PCo, PCp, PEs y PIs. La magnitud de estas alteraciones sugiere una remodelación más profunda de la composición y estructura de las membranas celulares en esta línea.

827 y 827 AZDR

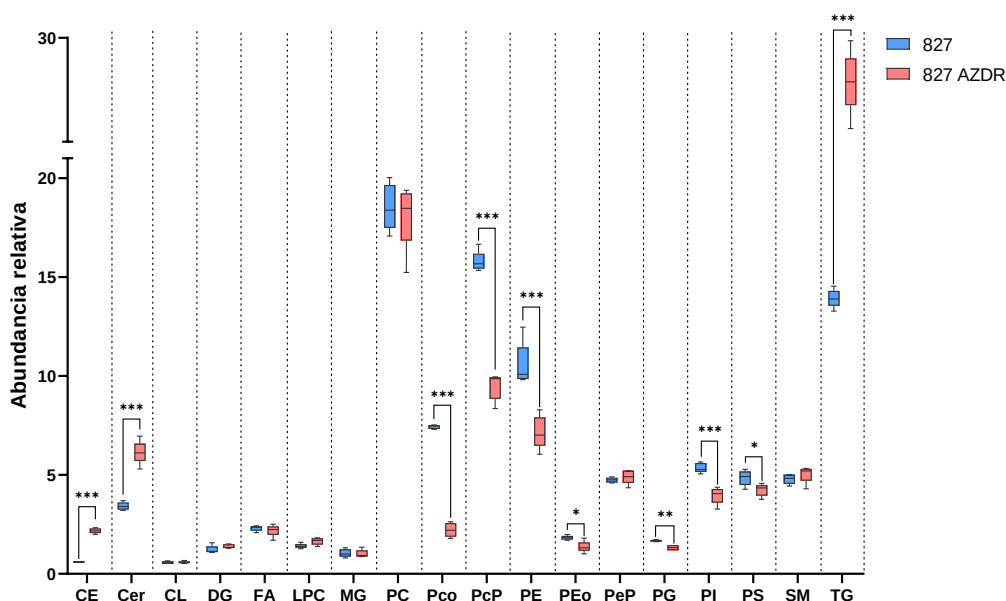


Figura 41. Diferencias en las proporciones relativas de las diferentes clases de lípidos entre la línea 827 (azul) y la línea 827 AZDR (rojo). Se representan las proporciones relativas de las diferentes clases de lípidos en el lipidoma de ambas líneas celulares, expresadas como porcentaje respecto al total de lípidos detectados ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

En términos generales, la reprogramación parece manifestarse de manera sutil y afectar a determinadas clases de lípidos de modo que no se evidencian diferencias drásticas en la gran mayoría de las clases analizadas. El metabolismo de lípidos es un proceso biológico que involucra numerosas enzimas responsables de la síntesis, modificación, transporte y degradación de los lípidos. Para observar cambios de lípidos significativos, se requerirían variaciones drásticas en la actividad de estas enzimas. Durante la EMT, pese a que hay una reprogramación metabólica, esta no necesariamente implica cambios drásticos en todas las enzimas del metabolismo lipídico. Los cambios pueden ser más sutiles y específicos a ciertas vías metabólicas y pueden afectar a determinadas clases únicamente. En definitiva, la reprogramación metabólica durante la EMT no necesariamente implica reestructuración completa de su metabolismo lipídico. Por otro lado, se observan clases de lípidos que presentan niveles específicos en cada línea celular, reflejando posiblemente alteraciones metabólicas y características fenotípicas que diferencian las diferentes líneas utilizadas. Esta variabilidad, igual que sucedía en el RNA-seq, puede atribuirse a varias razones biológicas como el origen y la diversidad genética, adaptaciones específicas de cada línea celular en respuesta a la presión selectiva ejercida por el osimertinib y la propia heterogeneidad de las diferentes subpoblaciones celulares, así como la existencia de diferentes metaestados EMT. Sin embargo, también **existen características comunes** a los tres modelos de resistencia empleados, como:

- **Una acumulación de triglicéridos (TGs) en las líneas celulares resistentes** en comparación con las líneas sensibles correspondientes. En la bibliografía, se ha relacionado la EMT con una tendencia a acumular TGs en forma de LDs^{277,278}. Esta acumulación está relacionada con un aumento en la invasividad probablemente al servir como reservas de energía que pueden ser utilizadas durante la migración y la invasión.

- **Una reducción en fosfatidilcolinas plasmalógeno (PCp) en las líneas resistentes** en comparación con las líneas sensibles correspondientes. Los lípidos plasmalógenos son un tipo especial de glicerofosfolípido caracterizado por la presencia de un enlace éter-vinílico en la posición sn-1 del glicerol en lugar del enlace éster típico y constituyen moléculas con capacidad antioxidante que protegen a los lípidos y las lipoproteínas del estrés oxidativo y las ROS generadas³⁷⁴. Como se ha comentado previamente (3.2.2.3), se han observado alteraciones en estos lípidos que acompañan a la morfogénesis epitelial y la EMT²⁸⁵. En esta línea, Sampaio et al. analizaron células epiteliales derivadas de riñón canino (MDCK) antes y después del tratamiento con TGF- β y observaron un cambio significativo en el lipidoma, caracterizado por una disminución en plasmalógenos, PEs y CEs²⁹⁶. Por otro lado, Katz-Brull et al. compararon los perfiles lipídicos de las líneas celulares mesenquimales de cáncer de mama T-47D y MCF7 con células epiteliales mamarias primarias, observando como principal diferencia una disminución significativa de plasmalógenos de colina y etanolamina en las líneas tumorales³⁷⁵. En este sentido, puesto que durante la EMT el ATP se produce mayoritariamente durante la glicólisis y no a través de la fosforilación oxidativa, disminuyen los niveles de ROS y este tipo de lípidos pueden no ser necesarios en cantidades abundantes por lo que sus niveles se ven reducidos en las células resistentes con fenotipo mesenquimal.
- **Disminución de fosfatidilcolinas unidas a éter (PCo) en las líneas resistentes** con respecto a las sensibles correspondientes. Los PCo son fosfolípidos en los que una de las cadenas acilo está unida en la posición sn-1 del glicerol con un enlace éter simple en lugar del enlace éster. Se ha observado una disminución de estas especies en células de cáncer de mama cultivadas en forma de esferoides con consiguiente activación de la EMT³⁷⁶. Este tipo de lípidos son capaces de alterar las propiedades físicas de la membrana celular afectando a la dinámica de la misma y, por consiguiente, afectar a la señalización por cambios en la composición de “lipid rafts”. Concretamente, la naturaleza de esta clase de lípidos permite un empaquetamiento más compacto de los fosfolípidos en la membrana, lo que resulta en una disminución de la fluidez de la membrana y una mayor rigidez³⁷⁷. Su disminución tendría el efecto contrario: aumentaría la fluidez y disminuiría la rigidez, cambios consistentes con el fenotipo mesenquimal. Estos lípidos también se relacionan con el estrés oxidativo.
- **Un aumento en ésteres de colesterol (CE) en las líneas resistentes** con respecto a las sensibles correspondientes. Como se ha comentado en la Introducción (3.2.2.5), esta clase de lípidos puede promover la adquisición de rasgos mesenquimales regulando aspectos como la fluidez de la membrana, la formación de LDs, la expresión de marcadores epiteliales como la CDH1 y mesenquimales como la VIM, así como regulando aspectos de la señalización intracelular. Recientemente, se ha reportado un aumento de CEs y LDs acompañando el proceso de EMT en HCC, resultado de la sobreexpresión de la enzima esteroil O-aciltransferasa 1 (SOAT1), una enzima clave de esterificación del colesterol. Esto provoca una disminución de la E-cadherina y un aumento de N-cadherina, VIM y SNAI1 que promueve la invasión y la migración de las células de HCC³⁷⁸. Del mismo modo, Li. J et al identificaron una acumulación anómala de CEs en las LDs de células de cáncer de páncreas con alta capacidad metastásica y

comprobaron que la inhibición de la esterificación de las especies de colesterol reducía el crecimiento del tumor y la metástasis³⁷⁹.

Como se ha indicado a lo largo de esta sección, existen estudios previos sobre células cancerosas epiteliales que experimentan la transición EMT consistentes con los hallazgos encontrados. A nivel de clases, los modelos estudiados muestran cambios en el lipidoma comparables con otros estudios similares realizados en el contexto de la reprogramación lipidómica tras la activación de la EMT en diferentes tipos de cáncer. Esto refuerza la hipótesis de que la reprogramación lipidómica es un componente esencial durante este proceso. Otros cambios descritos no siguen la misma tendencia en nuestros modelos celulares reflejando la heterogeneidad intrínseca de cada sistema y la complejidad de la regulación del metabolismo de lípidos en distintos modelos experimentales.

3.3 Análisis lipidómico de especies individuales

Dentro de cada clase de lípidos existe una gran variedad de especies individuales con diferentes longitudes de cadena, grados de insaturación y composición de FAs que pueden afectar de diferente forma las propiedades físicas y funciones biológicas de las células^{294,380}. Por ello, es importante considerar que puede haber especies lipídicas individuales dentro de cada clase que cambien significativamente y jueguen un papel crucial en la resistencia al fármaco y otros fenómenos biológicos. Para profundizar e identificar las principales diferencias entre los grupos sensible y resistente y resaltar los lípidos que contribuyen significativamente a esta diferenciación, se realizó un Volcano Plot con los datos lipidómicos. Para ello, se analizaron las proporciones relativas de cada especie para las líneas resistentes (1975 AZDR, 4006 AZDR y 827 AZDR) y se compararon con las líneas sensibles (1975, 4006 y 827). Los Volcano Plot revelan **diferencias significativas en gran cantidad de especies de lípidos entre cada línea sensible y su correspondiente línea resistente** que podrían estar implicadas en los mecanismos de resistencia regulando diferentes propiedades como la estabilización/desestabilización de membranas celulares, regulación de receptores de membrana o la generación de metabolitos secundarios implicados en la señalización celular, entre otros²⁹⁴ (**Figura 42**). Las especies lipídicas representadas en **rojo** corresponden a aquellas que muestran **cambios de abundancia marcados (alta FC) y una significancia estadística elevada** ($FDR < 0.01$), lo que indica una alteración robusta en la condición analizada. En cambio, las especies en **naranja** también presentan significancia estadística, pero con **cambios de menor magnitud**, reflejando alteraciones más **moderadas** en su perfil de abundancia. En este sentido, en la comparación 1975 vs 1975 AZDR se producen cambios drásticos y significativos en la abundancia de 68 especies de lípidos, en la comparación 4006 vs 4006 AZDR se producen cambios en 67 especies de lípidos y en el caso de 827 vs 827 AZDR cambian 48 especies, representados como puntos rojos en los Volcano Plots. De entre todas las especies significativas en las tres comparaciones (representadas como puntos rojos y naranjas), se identificaron un total de **35 especies de lípidos** que muestran una **diferencia significativa y común** en su abundancia entre **líneas sensibles y resistentes**.

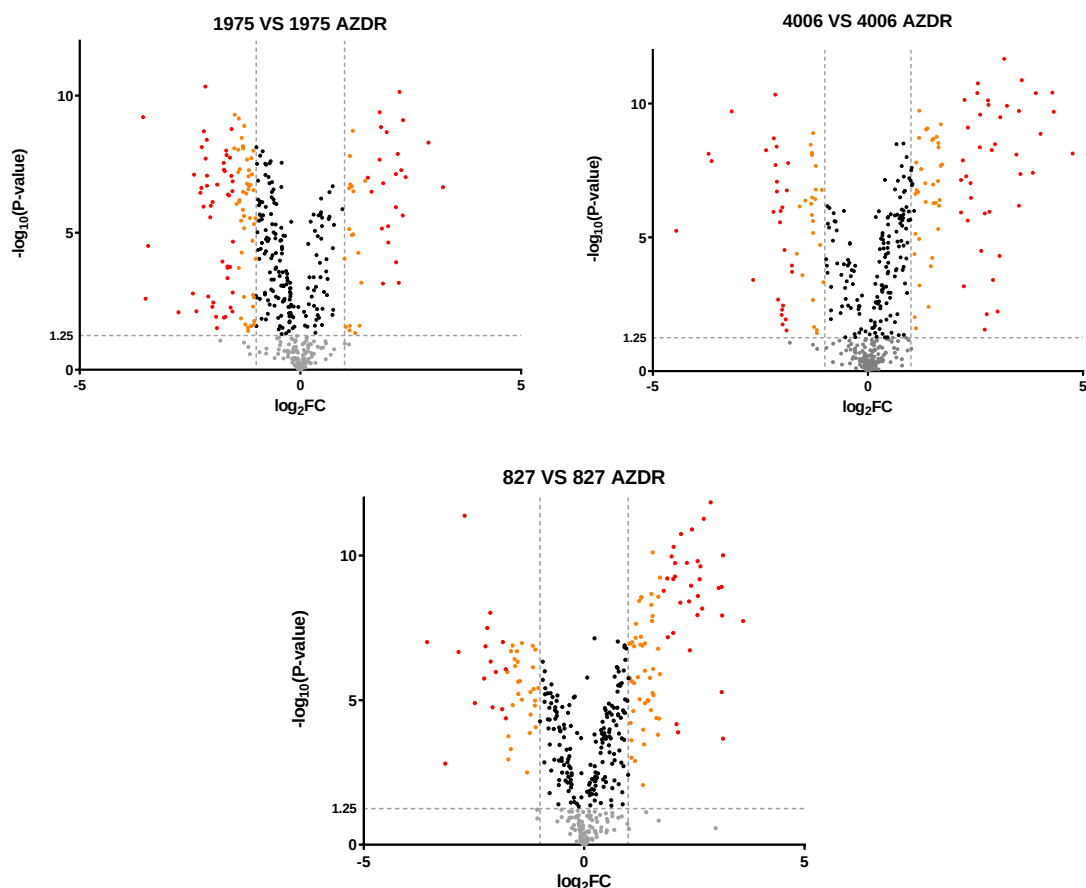


Figura 42. Representación gráfica en forma de Volcano Plot de las especies de lípidos detectadas en el análisis lipidómico entre líneas sensible/resistente. En rojo aparecen los lípidos significativos con $\log_2FC$ (Sensible/Resistente) $\Rightarrow 1,5$ / $\log_2FC \leq -1,5$ y $FDR < 0,01$. En naranja aparecen los lípidos significativos con $1,5 < \log_2FC < 1$ / $-1,5 < \log_2FC < -1$ y $FDR < 0,01$. En gris aparecen los lípidos no significativos o con $\log_2FC < 1$ / $\log_2FC > -1$. El eje Y indica el valor de $-\log_{10}$ del p-valor ajustado (FDR).

A continuación, se representan en forma de Boxplot las intensidades relativas de **los lípidos comunes que generan las principales diferencias entre el fenotipo sensible/resistente** en los modelos empleados. Para facilitar la representación, se obtuvo la media de las proporciones relativas para las tres líneas sensibles y para las tres líneas resistentes. En la **Figura 43** se han representado las diez especies lipídicas que presentan un aumento significativo en la media de la proporción relativa en las líneas resistentes en comparación con las líneas sensibles, lo que indica un incremento relativo de estas especies dentro del perfil lipídico total del fenotipo resistente. Entre las especies de lípidos representadas, destacan los CEs con FAs de larga cadena insaturados (CE 22:5, CE 22:4 y CE 22:6). También se observan incrementos significativos en ciertas especies de TGs (TG 16:0/22:6/18:1, TG 18:0/22:6/16:0, TG 18:0/22:5/18:1 y TG 18:0/20:4/18:1). Dentro de los fosfolípidos, especies como el fosfatidilinositol (PI 32:0), la fosfatidilserina (PS 38:6) y la fosfatidilcolina (PC 36:5) también muestran incrementos marcados en las líneas resistentes.

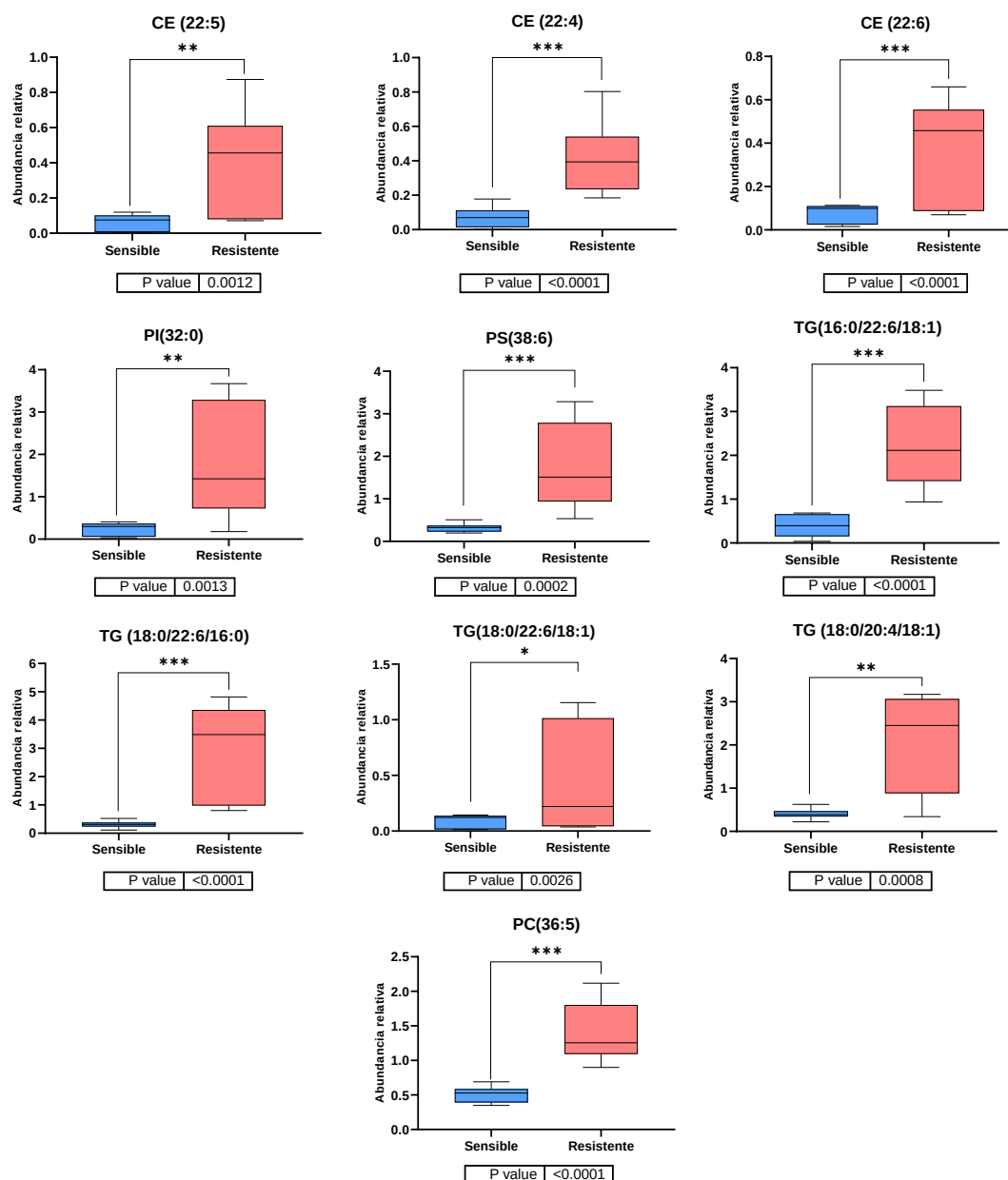


Figura 43. Representación en forma de Box Plot de las intensidades relativas de las 10 especies de lípidos que muestran un incremento significativo en las líneas resistentes (rojo) en comparación con las sensibles (azul). Debajo de cada figura se muestra el p-valor ajustado (FDR) ($p < 0,01^*$, $p < 0,001^{**}$, $p < 0,0001^{***}$).

Por el contrario, la **Figura 44** refleja las diez especies lipídicas que presentan una disminución significativa de la media de la proporción relativa en las líneas resistentes con respecto a las líneas sensibles, lo que indica una reducción relativa de estas especies dentro del perfil lipídico total del fenotipo resistente. En este caso, todas las especies representadas que presentan una disminución significativa en las líneas resistentes corresponden a PCo y PCp reflejando una menor síntesis o mayor degradación de estos lípidos debido a diferencias en las demandas celulares relacionadas con la resistencia. Las especies de PCo que disminuyen significativamente en las líneas resistentes (e.g., PCo (16:0/16:0), PCo (40:0), PCo (36:0)) contienen predominantemente SFAs en sus cadenas. La disminución de los PCo con SFAs resalta una posible preferencia de las células resistentes por evitar la acumulación de lípidos más

propensos a oxidarse. Asimismo, como se ha comentado previamente, los plasmalógenos son bien conocidos por su capacidad antioxidante²⁸⁵ y su disminución en las células resistentes podría indicar que estas células dependen de mecanismos alternativos de protección frente al estrés oxidativo.

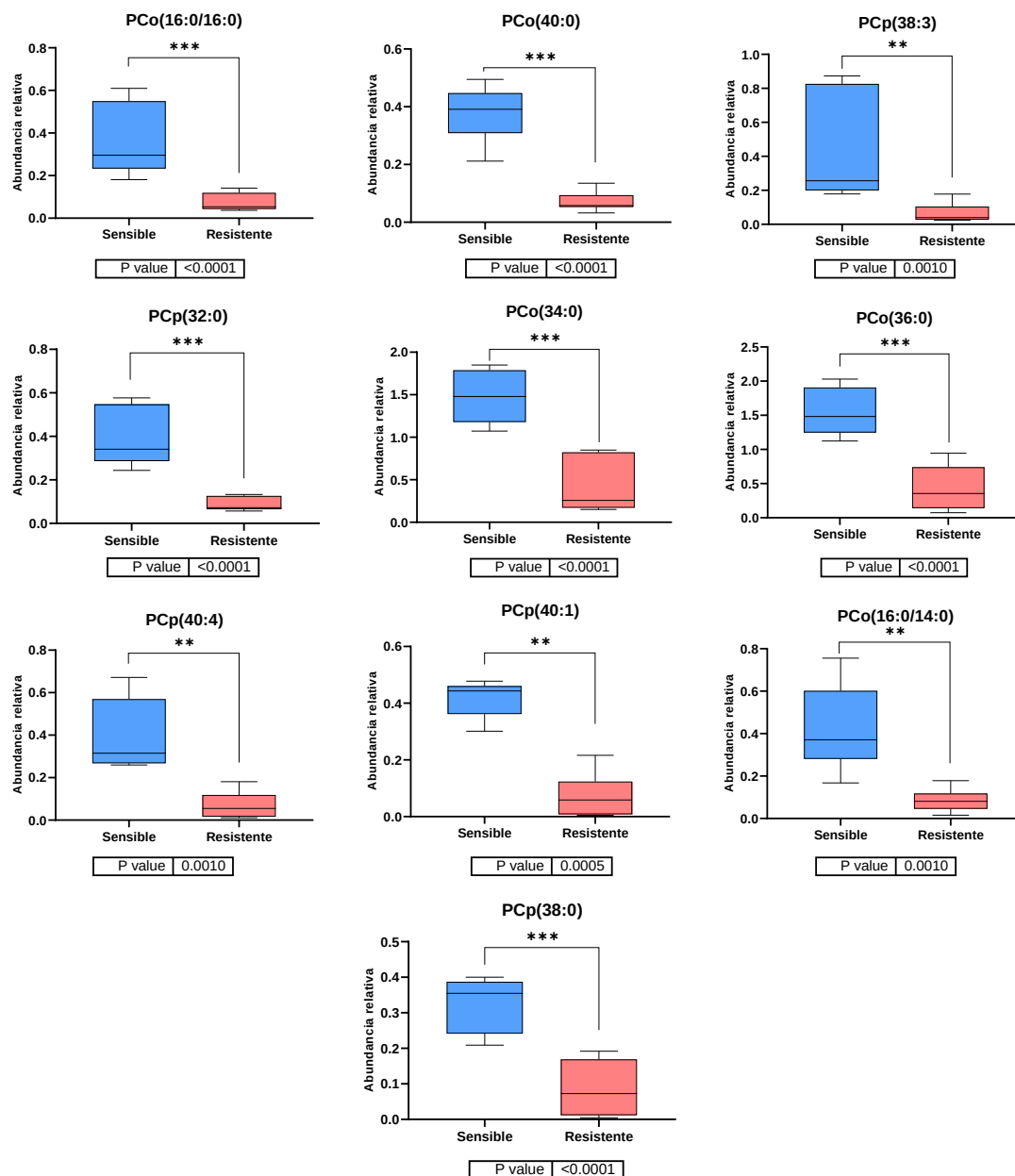


Figura 44. Representación en forma de Box Plot de las intensidades relativas de las 10 especies de lípidos que muestran una disminución significativa en las líneas resistentes (rojo) en comparación con las sensibles (azul). Debajo de cada figura se muestra el p-valor ajustado (FDR) ($p < 0,01^*$, $p < 0,001^{**}$, $p < 0,0001^{***}$).

De forma general, las principales especies de lípidos involucradas en la separación de los fenotipos sensible-resistentes incluyen especies de TGs, CEs y fosfolípidos, en su mayoría PCp y PCo junto a algunas especies específicas de otras clases de lípidos.

3.4 Análisis de elongación e insaturación de fosfolípidos

La longitud y la insaturación de las cadenas de FAs que constituyen los fosfolípidos puede influir en la fluidez de la membrana celular, la organización de dominios de membrana y la actividad de proteínas asociadas a la señalización celular³⁸⁰, todas ellas cruciales durante procesos de cambio morfológico como la EMT. La valoración de la longitud de la cadena de FAs para todas las clases de fosfolípidos se realizó agrupando las áreas de todos los picos con el mismo número de carbono en las cadenas y normalizándolas al contenido total de fosfolípidos. Los resultados se presentan en la **Figura 45**. Las especies de fosfolípidos más abundantes en ambas líneas (sensibles y resistentes) son aquellas con FAs de longitud intermedia, particularmente entre C34 y C40, lo que sugiere que estas longitudes son metabólicamente preferidas o funcionalmente más relevantes en ambos contextos celulares. Las especies con FAs de cadenas mas cortas (C28-C30) o muy largas (C42-C48) tienen una representación relativamente baja, lo que podría reflejar limitaciones en las vías de elongación o menor funcionalidad de estos fosfolípidos en comparación con los de longitud intermedia. Aunque se observan diferencias en la longitud de las cadenas entre las distintas líneas, algunos de estos cambios son específicos de cada modelo sensible/resistente. Sin embargo, también es posible identificar **características comunes que se conservan entre diferentes modelos**. Las líneas resistentes muestran un ligero aumento en la proporción relativa de fosfolípidos con FAs de longitud intermedia entre C36 y C38, lo que podría indicar una preferencia por estas longitudes en procesos adaptativos o relacionados con la resistencia. En este sentido, los fosfolípidos con FAs de longitud intermedia (C36-C38) podrían contribuir a una mayor fluidez o estabilidad de membrana, características importantes en el proceso de EMT. Contrariamente, en las líneas sensibles se produce un aumento de la proporción relativa de fosfolípidos de cadena larga (C40-C42). Estos hallazgos podrían tener implicaciones en la reprogramación de las células resistentes y estar asociados a cambios en las enzimas implicadas en la elongación, como ciertas elongasas o a una redistribución de FAs hacia otras clases lipídicas.

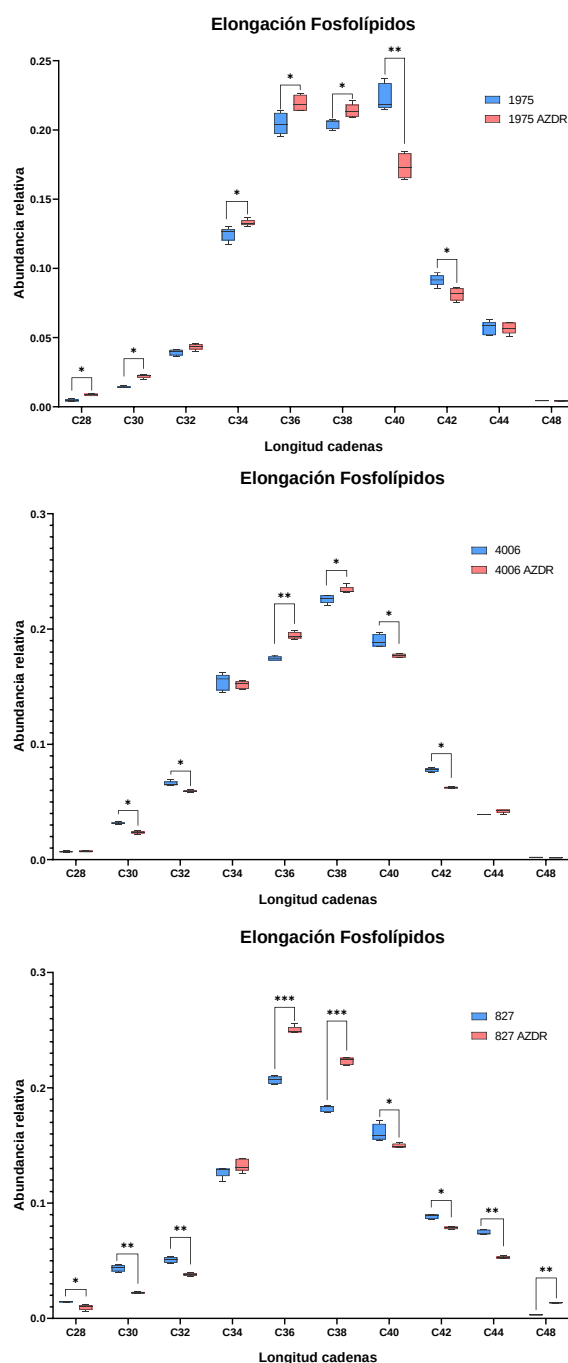


Figura 45. Representación gráfica en forma de Box Plot de la distribución relativa al total de fosfolípidos de las especies de fosfolípidos agrupadas según la longitud de las cadenas que las componen. Se comparan los perfiles lipídicos entre las líneas celulares sensibles (azul) y resistentes (rojo) ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

Por otro lado, se realizó un análisis similar evaluando el grado de insaturación de los fosfolípidos entre células epiteliales y mesenquimales. Para la evaluación de la insaturación de FAs, las áreas de los picos de fosfolípidos se combinaron según el mismo número de dobles enlaces y se normalizaron con respecto al contenido total de fosfolípidos (**Figura 46**). En todas las líneas, los fosfolípidos con MUFAs son los que mayores niveles presentan (~25%) en comparación con el resto de fosfolípidos conteniendo SFA y PUFA. En los tres modelos de

resistencia se produce una disminución generalizada y significativa de los fosfolípidos con cadenas de SFA. Por otro lado, se observan diferencias en la insaturación de las cadenas de fosfolípidos entre las distintas líneas, pero algunos de estos cambios son específicos de cada par sensible-resistente. En la línea 1975 AZDR se produce una mayor incorporación de MUFAs a la síntesis de fosfolípidos en comparación con la 1975 y los fosfolípidos conteniendo PUFAs en su estructura no presentan diferencias significativas. Por otro lado, en los modelos 4006 vs 4006 AZDR y 827 vs 827 AZDR no se observa este aumento de MUFAs, sino que se produce un aumento de PUFAs, especialmente aquellos con alto grado de insaturación en sus cadenas (4, 5 y 6).

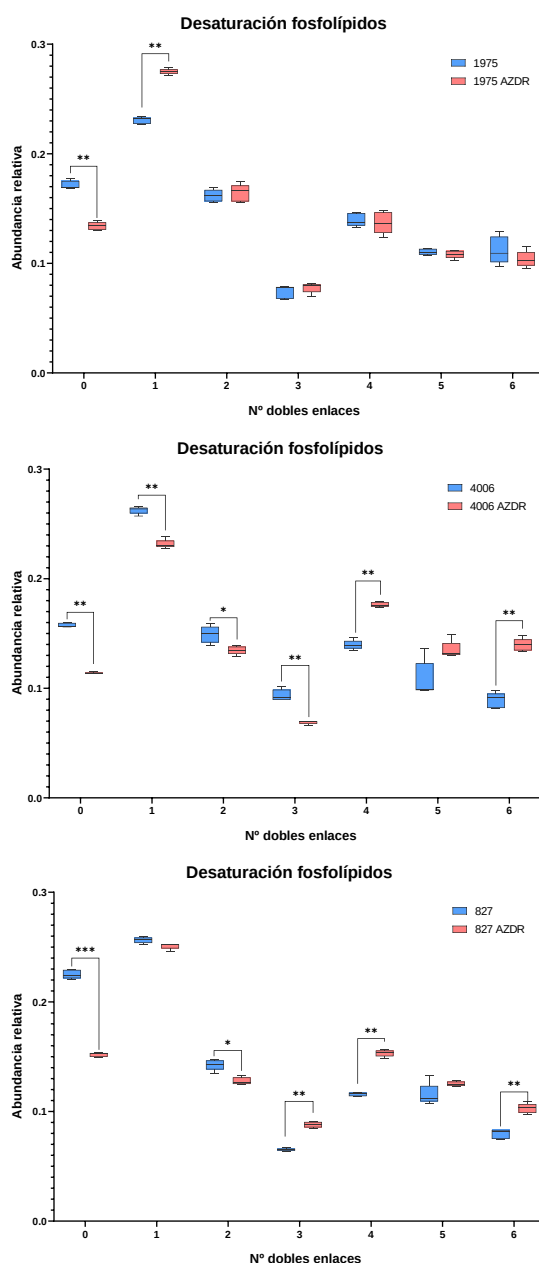


Figura 46. Representación gráfica en forma de Box Plot de la distribución relativa al total de fosfolípidos de las especies de fosfolípidos agrupadas según el grado de insaturación de los ácidos grasos que las componen. Se comparan los perfiles lipídicos entre las líneas celulares sensibles (azul) y resistentes (rojo) ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

Estos resultados **en conjunto** reflejan una preferencia de las líneas resistentes por fosfolípidos con cadenas de FAs de longitudes intermedias (C36 y C38) y con una tendencia hacia la insaturación que, en el caso de las 1975 AZDR es hacia un aumento de MUFAs, mientras que en las otras dos líneas resistentes la tendencia es hacia mayores niveles de PUFAs con altos grados de insaturación. Esto sugiere diferencias en la reprogramación lipídica entre los distintos modelos, aunque con un patrón común de incremento en la insaturación. Por su parte, las líneas sensibles parecen presentar una preferencia por fosfolípidos con cadenas más largas, especialmente de C40 y C42 y con una tendencia hacia la saturación. Estas preferencias podrían resultar determinantes en los mecanismos de resistencia ya que las diferentes composiciones tienen efectos diferentes sobre la rigidez, fluidez y dinámica de las membranas celulares afectando así a su capacidad de adaptación en la estructura y funcionalidad frente a condiciones de estrés^{294,380}.

3.5 Determinación de los niveles de TGs

Para investigar la posible acumulación de TGs en las líneas celulares resistentes en comparación con las sensibles, se utilizó una sonda fluorescente llamada Bodipy. Esta sonda tiñe específicamente los lípidos neutros, permitiendo la visualización y cuantificación de los LDs dentro de las células. En la **Figura 47 A** se muestran las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia para las líneas sensibles y resistentes. Las imágenes han sido tomadas únicamente para la visualización cualitativa de los lípidos neutros en el interior de las células. La cuantificación de los lípidos neutros se realizó mediante citometría de flujo, obteniéndose la media para 10.000 eventos. Los resultados de la citometría de flujo muestran que **las líneas celulares resistentes a osimertinib presentan una media de fluorescencia significativamente mayor** en comparación con las líneas sensibles (**Figura 47 B**). Esto indica una **mayor acumulación de TGs en las células resistentes**, lo cual concuerda con los hallazgos previos observados en el análisis lipídico, transcriptómico y con la bibliografía existente.

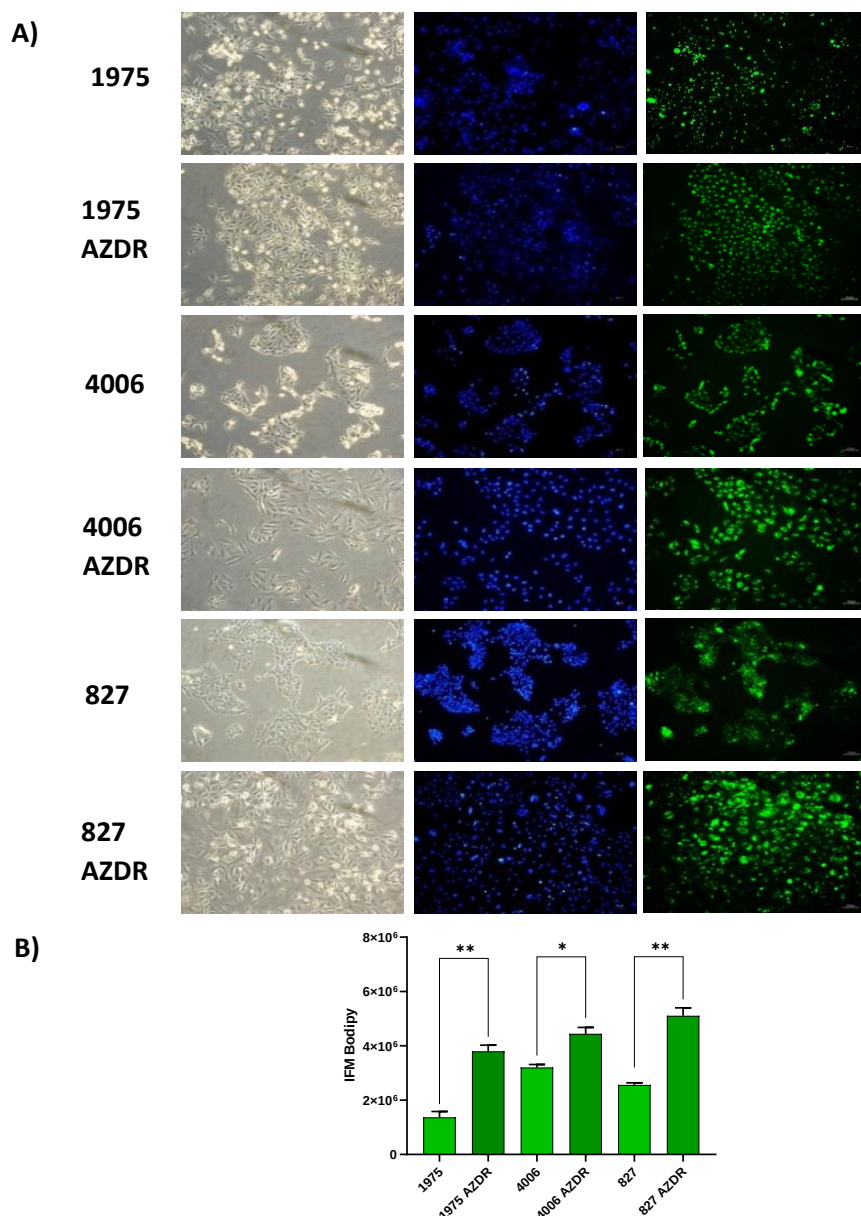


Figura 47. Tinción de lípidos neutros en líneas celulares sensibles y resistentes mediante sonda fluorescente Bodipy. A) Imágenes tomadas bajo microscopio de fluorescencia tras tinción de lípidos neutros con Bodipy en los modelos celulares de CPNM (4X). Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes. B) Cuantificación de la fluorescencia media de Bodipy mediante citometría de flujo en los modelos celulares de CPNM (n=3) ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

3.6 Análisis de ácidos grasos totales

Las diferentes especies que forman los lípidos complejos contienen combinaciones específicas de FAs que difieren en su longitud de cadena y grado de insaturación afectando a sus propiedades físicas, químicas y biológicas dentro de la célula. Por ejemplo, las insaturaciones introducen "codos" en las cadenas de FAs de los lípidos complejos, impidiendo un empaquetamiento denso y aumentando la fluidez de la membrana. En cambio, los SFAs permiten un empaquetamiento más denso. La fluidez de la membrana, influenciada por la proporción de SFA, MUFA y PUFA de los lípidos que la forman, juega un papel crucial en la migración e invasividad celular, características de la EMT^{257,334}. Los cambios en la composición de FAs y su incorporación diferencial a lípidos complejos pueden tener efectos muy diversos no sólo en las propiedades de las membranas sino también sobre la proliferación celular y la apoptosis, la expresión génica, la producción de eicosanoides y hormonas, la obtención y almacenamiento de energía dentro de la célula y el potencial antioxidante, entre otros³⁸¹. Conocer de forma precisa la composición total FAs de todas las especies de lípidos es esencial ya que al descomponer los lípidos complejos en sus componentes fundamentales podemos obtener una visión más completa y precisa de cómo incorporan a su estructura los FAs en el proceso de formación y esto puede revelar diferencias en la síntesis, transporte o uso de ciertos FAs por parte de las células resistentes. Por ello, se realizó en las líneas celulares sensibles y resistentes a osimertinib, un análisis completo de FAs totales mediante su liberación de las estructuras que forman los lípidos complejos por un proceso de saponificación. En la saponificación, los lípidos complejos se tratan con una solución alcalina que rompe los enlaces éster de los lípidos liberando los FAs. Una vez liberados, se estudió el perfil completo mediante un método analítico basado en LC-MS desarrollado en el propio laboratorio que proporciona una amplia cobertura y precisión en la detección de los FAs. La metodología empleada se describe en Materiales y Métodos (12). Además de los FAs más abundantes, el método tiene la capacidad de detectar y cuantificar especies menos comunes, pero potencialmente importantes. En total, **se detectaron 54 FAs diferentes** y se obtuvieron los ratios totales para cada uno de ellos. Los resultados se muestran en la **Figura 48**. Algunos FAs han sido etiquetados como nx, ny o nz lo que indica que no se ha podido determinar con precisión la posición del doble enlace ni la identidad exacta de esos compuestos. Esta nomenclatura se utiliza cuando los métodos de detección solo permiten identificar la presencia de un pico correspondiente a un FA sin resolver su estructura completa.

El análisis de FAs totales revela que existen múltiples FAs con cambios específicos para cada modelo celular, reflejando de nuevo la diversidad existente en la reprogramación lipídica de las células resistentes en función de su genotipo. No obstante, se han **identificado FAs con tendencias comunes** en los tres modelos resistentes (**Figura 48**). Los FAs 16:1n9, 18:3n6 y 20:6n3 presentan niveles superiores en las líneas resistentes en comparación con las sensibles lo que indica que las células resistentes parecen mostrar una preferencia a la hora de sintetizar o mantener estos FAs específicos e incorporarlos a la formación de lípidos complejos. El FA 16:1n9 constituye un FA poco común resultado de la β -oxidación del FA 18:1n9.

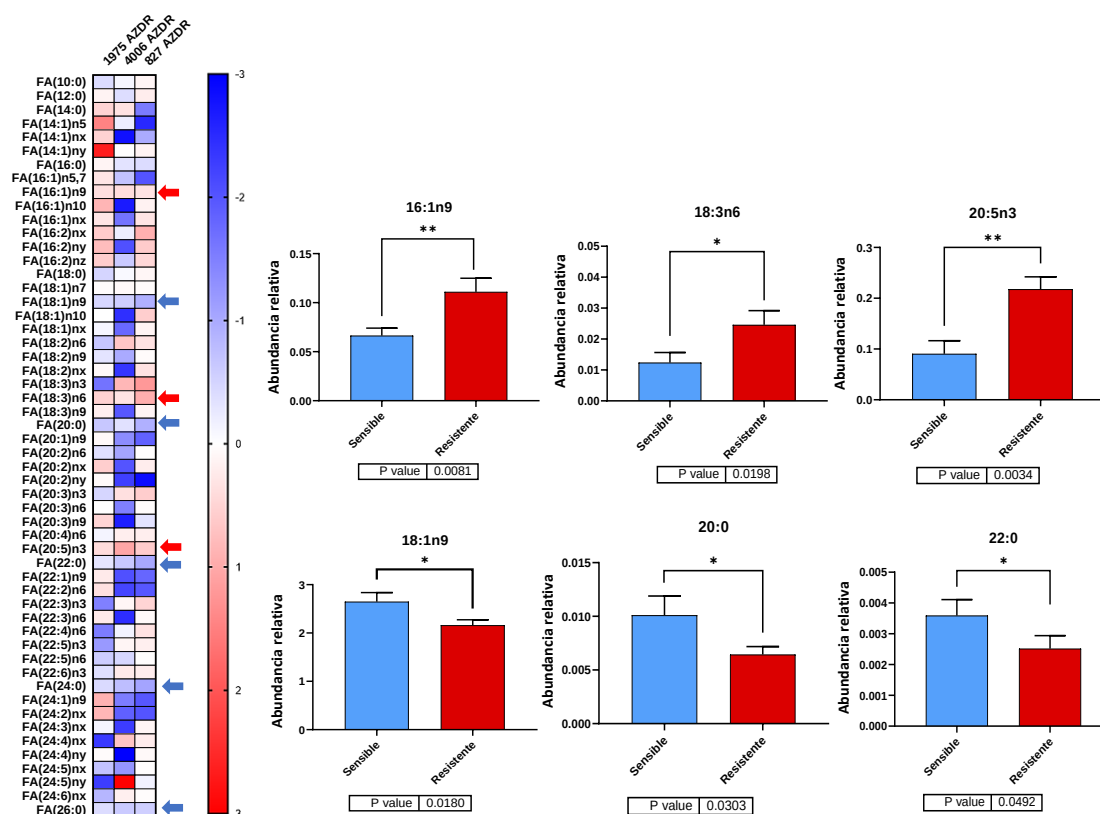


Figura 48. Representación gráfica de los cambios en los niveles de FAs totales entre líneas sensibles y resistentes a osimertinib. A la izquierda se representan en forma de Heat Map los valores de log₂FC para la intensidad relativa de todos los FAs detectados en el análisis comparando las líneas celulares resistentes a osimertinib (1975 AZDR, 4006 AZDR y 827 AZDR) con sus correspondientes líneas sensibles (1975, 4006 y 827). Los colores indican aumentos (rojo) o disminuciones (azul) en los niveles relativos de cada FA. Las flechas señalan los FAs que muestran una tendencia común en los tres modelos celulares. A la derecha, se presentan los valores de intensidades relativas de seis FAs destacados en forma de box plots. Los tres FAs de la fila superior (16:1n9, 18:3n6, 20:5n3) muestran un aumento significativo en las líneas resistentes, mientras que los tres de la fila inferior (18:1n9, 20:0, 22:0) disminuyen significativamente ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

Teniendo en cuenta esta información, resulta interesante que en los modelos resistentes parece existir una disminución de 18:1n9 acompañado de un aumento en el 16:1n9, indicativo de que **las células resistentes son capaces de oxidar el 18:1n9 con mayor eficiencia hacia 16:1n9** que las sensibles e incorporarlo a la síntesis de lípidos complejos, proporcionándoles algún tipo de ventaja metabólica. Esta mayor capacidad de oxidación de FAs en las células resistentes podría contribuir a una mejor regulación de los niveles de ciertos lípidos intracelulares, evitando la acumulación excesiva de derivados que podrían interferir con aspectos como la señalización y funcionamiento de las membranas celulares. Por otro lado, llama la atención que en la línea resistente se produce un aumento de los FAs 18:3n6 y 20:5n3 los cuales no son capaces de ser sintetizados y deben ser captados del medio, sugiriendo que en las líneas resistentes deben existir receptores y mecanismos de transporte que favorecen la captación de estos FAs del ambiente extracelular. Por el contrario, los **SFA de cadena larga (20:0, 22:0, 24:0 y 26:0)** presentan una tendencia contraria y **disminuyen significativamente en las líneas resistentes** comparadas con sus líneas parentales sensibles. Esto indica que las células

resistentes parecen no incorporar SFA a la síntesis de lípidos complejos de forma general tal y como refleja la disminución observada. Esto concuerda con la disminución observada en los fosfolípidos con cadenas de FAs saturadas (0.3.4).

Finalmente, para complementar esta información y obtener una visión global de la composición de FAs, se agruparon todos los FAs según el grado de insaturación de sus cadenas SFA, MUFA y PUFA. Los resultados se muestran en la **Figura 49**. En los tres modelos de resistencia, se observa una disminución en la proporción relativa de SFAs que se incorporan a la síntesis de lípidos complejos. Por otro lado, aunque los cambios no son muy drásticos, la línea resistente 1975 AZDR presenta un porcentaje mayor de MUFAs en relación al total de FAs, mientras que los PUFAs disminuyen, lo que sugiere que en esta línea la resistencia a osimertinib podría estar favoreciendo la acumulación de MUFAs en lugar de PUFAs. Sin embargo, en los otros dos modelos celulares (4006 AZDR y 827 AZDR), se observa una menor proporción de MUFAs acompañado de un aumento significativo en la proporción de PUFAs lo que concuerda con la tendencia general descrita en la literatura, donde se observa un aumento de PUFAs tras el proceso de EMT^{261,335}. El metabolismo de FAs responde a diferentes adaptaciones metabólicas de modo que cada línea puede emplear estrategias distintas para responder a la activación de la EMT tras la presión ejercida por el osimertinib. Estas diferencias en el balance SFA/MUFA/PUFA, pese a ser un reflejo de la composición en todas las clases de lípidos, se han observado en gran medida en el análisis de la insaturación de fosfolípidos realizado previamente, reforzando la idea de que los cambios en la composición de FAs tienen un reflejo directo en la estructura y función de las membranas celulares compuestas fundamentalmente por fosfolípidos.

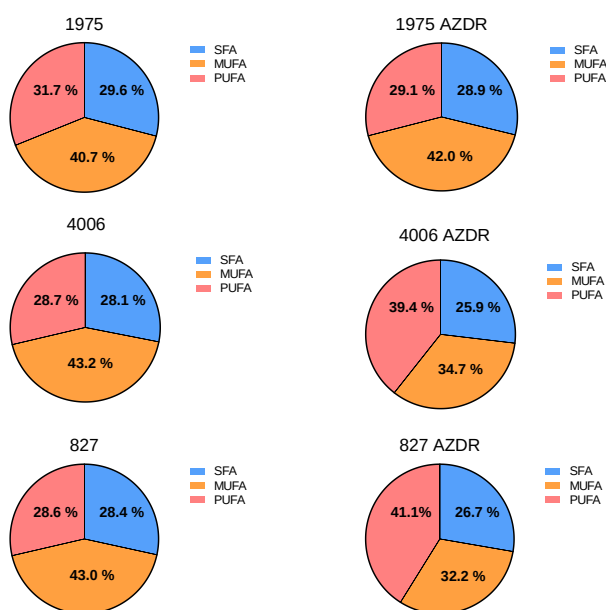


Figura 49. Representación gráfica en forma de diagrama circular de la proporción relativa de SFA (azul), MUFA (naranja) y PUFA (rojo) respecto al total de FAs detectados para cada línea celular.

4. Integración de datos transcriptómicos y lipidómicos

Como se ha demostrado en los apartados anteriores, la activación de la EMT en células resistentes a osimertinib induce alteraciones en el transcriptoma que generan una profunda reprogramación lipidómica de las células resistentes. Mientras que en el análisis de RNA-Seq se identificaron cambios en la expresión génica asociados con la EMT y la resistencia a osimertinib, el estudio lipidómico ha revelado alteraciones en varios aspectos de la composición y metabolismo de los lípidos que también se asocian con la EMT y la resistencia. El objetivo principal de esta tesis era profundizar en el conocimiento de la **reprogramación lipidómica asociada a la EMT**, por lo que **integrar ambas capas de información** es clave para comprender en profundidad las bases moleculares de la resistencia y explorar nuevas estrategias terapéuticas. En esta sección exploramos cómo las variaciones en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos se correlacionan con los cambios en la composición lipídica observados en los modelos celulares estudiados. Para ello, se realiza un análisis de intersección entre una firma de 4017 genes involucrados en el metabolismo de lípidos y la firma de resistencia de 509 genes identificada en el análisis transcriptómico. Los genes identificados se correlacionaron con la EMT con el objetivo de identificar vías clave que puedan estar impulsando el fenotipo resistente a través de este mecanismo.

4.1 Integración de la firma de resistencia obtenida en el RNA-Seq con la EMT y el metabolismo de lípidos

Para determinar si la reprogramación observada en las células resistentes está respaldada por modificaciones en la expresión de genes involucrados en el metabolismo, se trató de identificar genes del metabolismo de lípidos dentro de la firma de resistencia descrita previamente en el RNA-Seq con conexiones con la EMT en CPNM. Para ello, se seleccionaron 4017 genes implicados en el metabolismo de lípidos (**Firma LIPIDS**) de entre los que se incluyen enzimas de síntesis, degradación, transporte y reguladores. La firma de 4017 genes se obtuvo a partir del análisis de la base de datos GSEA MsigDB, específicamente utilizando los conjuntos de genes incluidos en la categoría "Gene Ontology". Se seleccionaron todos los conjuntos de genes cuyo nombre contenía la palabra "lipid" y se agruparon, lo que permitió obtener una lista de genes que refleja de manera integral el metabolismo de lípidos. Con esta lista de genes como referencia, se identificaron **110 genes** de la firma de resistencia a osimertinib (**Firma O-R**) relacionados con el metabolismo de lípidos y seleccionaron para un estudio más en profundidad. Para filtrar aquellos genes de mayor interés, se aplicó **un filtro de correlación con la EMT** a partir de datos de expresión génica de líneas de CPNM disponibles públicamente en la CCLE. Los resultados se muestran en la **Figura 50**. De esta forma es posible reducir la lista de genes a aquellos que, además de estar **implicados en la resistencia y participar en el metabolismo de lípidos, tienen una relación directa con la adquisición de un fenotipo mesenquimal en las células** y, por tanto, resultan objetivos prometedores para futuros tratamientos dirigidos.

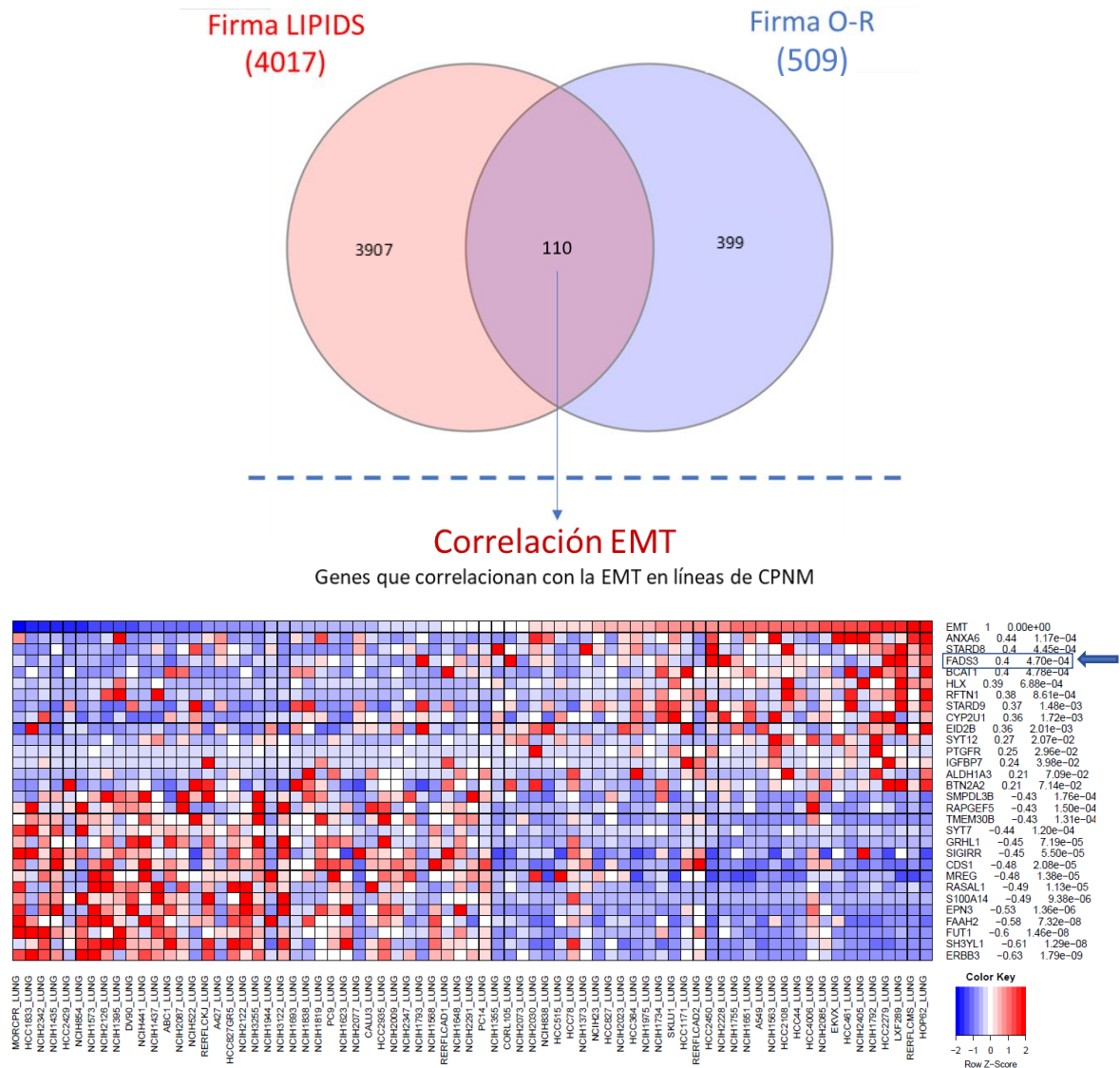


Figura 50. Metodología empleada durante la identificación y selección de genes relacionados con la resistencia a osimertinib y el metabolismo de lípidos. El diagrama de Venn en la parte superior muestra la intersección entre la firma génica de metabolismo de lípidos (4017 genes, en rojo) y la firma de resistencia a osimertinib (509 genes, en azul), resultando en 110 genes comunes. En la parte inferior, el heat map representa los 15 genes que mayor y menor correlación presentan con la firma EMT en líneas celulares de CPNM de la CCLE. Los colores indican la dirección de la correlación: rojo para correlación positiva, azul para negativa, y blanco para correlación neutra.

4.2 Validación de genes clave relacionados con el metabolismo de lípidos

El análisis previo reveló alteraciones significativas en la expresión de 509 genes relacionados con la resistencia, algunos de los cuales se asocian con el metabolismo de lípidos, lo que sugirió un posible papel clave de estas vías en la resistencia. En base a estos hallazgos, se realizó una selección manual **de 56 genes clave involucrados en las principales vías del metabolismo** de lípidos como la biosíntesis, el transporte, la degradación y la señalización lipídica. Esta selección se basó en su relevancia biológica y su posible papel en la EMT y en los procesos celulares críticos que podrían haberse alterado en los modelos resistentes. Una vez seleccionados estos genes, se llevó a cabo un análisis de expresión génica mediante RT-qPCR. Los resultados se muestran en la **Figura 51**. De forma general se observa una notable **heterogeneidad en la regulación de los genes asociados al metabolismo lipídico** entre las distintas líneas celulares. Muchos de los cambios en la expresión génica parecen ser **específicos de determinadas líneas resistentes**, en lugar de seguir un patrón uniforme en todas ellas. Esta variabilidad ya observada previamente en el RNA-seq y en el análisis lipidómico sugiere que, aunque el metabolismo lipídico está alterado en los modelos resistentes, **los mecanismos específicos de reprogramación pueden diferir entre líneas**. En definitiva, la adaptación metabólica en la adquisición de resistencia es un proceso dinámico y heterogéneo, en el que diferentes células pueden activar o reprimir vías particulares según sus necesidades funcionales. A continuación, se analiza la expresión de genes funcionalmente relevantes, así como aquellos que muestran **cambios uniformes en los tres modelos de resistencia**.

- **FASN.** La enzima clave en la biosíntesis *de novo* de FAs **no muestra cambios significativos** en su expresión entre las líneas resistentes y sensibles. Su expresión estable sugiere que la resistencia en estos modelos celulares no está asociada con una mayor síntesis endógena de FAs. Esto contrasta con otros modelos donde FASN suele estar sobreexpresado en contextos de resistencia y progresión tumoral, promoviendo el crecimiento celular y la adaptación metabólica^{319,322}. Sin embargo, la estabilidad en la expresión de FASN no descarta posibles modificaciones en su actividad enzimática o en la disponibilidad de sus sustratos, lo que podría afectar la homeostasis lipídica sin cambios transcripcionales evidentes.
- **GPD2.** El gen **GPD2** codifica la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2, localizada en la superficie externa de la membrana mitocondrial interna y aparece **reprimida en los modelos resistentes (Figura 51)**. Esta enzima tiene un papel clave en la interconexión entre la glucólisis, la fosforilación oxidativa y el metabolismo de FAs. No se ha descrito en el contexto de la EMT y la resistencia ITQs de EGFR. Su disminución podría estar relacionada con una menor necesidad de acoplar el metabolismo del glicerol a la producción de energía o con un redireccionamiento de los lípidos hacia otros procesos celulares en las células mesenquimales.
- **CDS1.** La expresión de **CDS1 se reprime drásticamente en los modelos resistentes** tal y como se observa en la **Figura 51**. El CDP-DAG producido por CDS1 es un precursor esencial para la síntesis de varios fosfolípidos importantes como PIs/PIPXs, PGs y CLs además de regular la distribución de PA en diferentes vías. Este gen se ha correlacionado negativamente con la expresión de ZEB1 en CPNM³⁸² y positivamente con genes

epiteliales (p. ej CDH1) en diferentes tipos de cáncer³⁸³. No obstante, los mecanismos a través del cual interviene en el proceso EMT no se comprenden. Pese a que *CDS1* aparece reprimido, esta reducción en la expresión no se traduce en cambios significativos en las clases de fosfolípidos que teóricamente deberían verse afectadas. Esto puede deberse a la existencia de vías alternativas y efectos compensatorios en el metabolismo de lípidos que permiten mantener niveles estables de esos fosfolípidos incluso cuando la síntesis *de novo* está comprometida.

- **DGAT2.** La enzima responsable de la síntesis de TGs, **DGAT2**, aparece **sobreexpresada en las líneas resistentes (Figura 51)** por lo que estos resultados reflejan consistencia con los datos lipidómicos y apuntan a un aumento en la síntesis y almacenamiento de TGs, lo que podría estar contribuyendo a la adaptación metabólica de las células resistentes²⁷⁸.
- **SCD1 y SCD5.** Como puede verse en la **Figura 51**, **SCD1 no muestra una regulación diferencial clara** en las líneas resistentes en comparación con las sensibles, ya que sus valores de expresión parecen mantenerse relativamente neutros. En contraste, **SCD5 aparece notablemente sobreexpresado en los tres modelos resistentes**, lo que sugiere un posible papel en la reprogramación del metabolismo lipídico asociado a la resistencia. La sobreexpresión de **SCD5**, en particular, podría indicar una mayor necesidad de MUFAs específicos en estas condiciones. Aunque **SCD5** y **SCD1** comparten una función similar en la conversión de SFA en MUFA, la función específica y distintiva de **SCD5** aún no está completamente caracterizada³⁸⁴. Sin embargo, algunos estudios sugieren que podría desempeñar un papel en contextos celulares más especializados³⁸⁴, lo que abre la posibilidad de que su sobreexpresión en líneas resistentes esté relacionada con mecanismos aún por explorar en la adaptación metabólica.
- **ELOVLs.** En la **Figura 51**, **las enzimas ELOVL no muestran cambios significativos** en su expresión en las líneas resistentes en comparación con las sensibles. En general, las elongasas analizadas presentan valores de expresión relativamente estables, sin una tendencia clara hacia la sobreexpresión o represión. Esto sugiere que, a diferencia de otras enzimas del metabolismo lipídico, las ELOVL podrían no estar desempeñando un papel central en la reprogramación metabólica asociada a la resistencia en estos modelos celulares. Sin embargo, no se puede descartar que cambios en su actividad o en la regulación postranscripcional puedan influir en la homeostasis de los FAs de cadena larga en estas células.
- **FOXA1.** El gen “Forkhead Box A1”(*FOXA1*) codifica para un FT que se une a regiones específicas del ADN regulando la expresión de genes concretos que participan en el desarrollo, el metabolismo de lípidos y la diferenciación. En la **Figura 51**, **FOXA1 aparece reprimido en las líneas resistentes** mostrando una disminución clara de su expresión. Wang, H. et al. demostraron que FOXA1 es un regulador negativo potencialmente importante en el proceso EMT en AC pulmonar regulando una serie de genes críticos relacionados con la adhesión celular y la comunicación celular necesarios para mantener los rasgos epiteliales que se reprimen durante la EMT y afectando al potencial metastásico del CP³⁸⁵. Por su parte, Moya, M. et al. describieron a FOXA1 como un potente inhibidor de la síntesis, acumulación y secreción de TGs en hepatocitos

mediante la represión de la expresión de múltiples genes diana de estas vías, incluido *DGAT2*³⁸⁶. Esto encajaría con las observaciones previas que se han comentado, sin embargo, se requieren estudios funcionales y mecanísticos más detallados para revelar completamente la importancia de FOXA1 en la remodelación del metabolismo lipídico durante la EMT y la progresión del CPNM.

- **FADS1/2/3.** Las enzimas **FADS1 y FADS2 no muestran cambios significativos** en los modelos resistentes en comparación con las líneas sensibles, a excepción de la línea 1975 AZDR donde se observa una ligera sobreexpresión. En cambio, **la enzima FADS3 muestra una sobreexpresión significativa y consistente en los 3 modelos de resistencia (Figura 51).** Esto demuestra que FADS3 presenta funciones no relacionadas con el resto de desaturasas y que presenta un papel único dentro de la familia de desaturasas regulando aspectos específicos del metabolismo de lípidos que requieren estudios más en profundidad.
- **SREBP1C y SCAP.** Las enzimas **SCAP (SCAP1 y SCAP2) no muestran cambios significativos** en su expresión en las líneas resistentes, ya que sus colores se mantienen mayormente neutros. Por otro lado, parece que **SREBP1C no se regula de manera uniforme en las líneas resistentes** mostrando una represión en los modelos 4006 AZDR y 827 AZDR y un ligero aumento en la línea 1975 AZDR en comparación con las líneas sensibles. Esto significa que su expresión no sigue un patrón uniforme y podría depender de factores específicos de cada línea celular.
- **CD36.** El principal transportador de FAs al interior de la célula, *CD36*, **no muestra cambios significativos en la expresión entre líneas sensibles y resistentes**, pero muestra una tendencia a sobreexpresarse especialmente en la línea 827 AZDR. La captación de FAs exógenos a través de CD36 en estas líneas podría no tener un papel revelante durante la reprogramación.

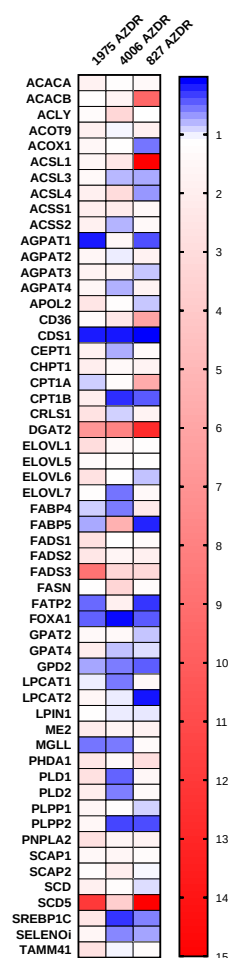


Figura 51. Expresión relativa de 56 genes involucrados en el metabolismo de lípidos medidos por RT-qPCR. Los datos están expresados como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de las líneas resistentes (AZDR) comparadas con sus correspondientes líneas parentales sensibles (n=3). La intensidad del color indica la magnitud del cambio en la expresión génica, con tonos rojos representando sobreexpresión y tonos azules representando represión.

De todos los genes destacados, se seleccionó **FADS3** para un estudio más en profundidad por varios motivos:

- Su **sobreexpresión** en todos los modelos resistentes a osimertinib (**Figura 52**).
- Su **posible conexión con la EMT**.
- La **disponibilidad de tecnología avanzada** (lipidómica basada en espectrometría de masas) para investigar de forma exhaustiva su impacto en el metabolismo lipídico.
- La **oportunidad de descubrir** nuevas funciones de esta enzima.
- El **potencial desarrollo de nuevas terapias** basadas en la inhibición de **FADS3**, lo que podría mejorar los tratamientos existentes para tumores resistentes a osimertinib.

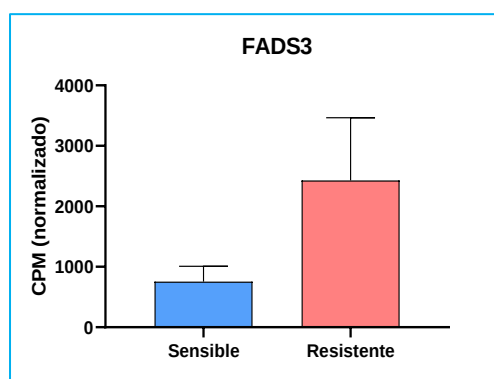


Figura 52. Expresión de FADS3 en células sensibles y resistentes a osimertinib. El gráfico de barras muestra los niveles de expresión (CPM normalizado) de **FADS3** en las líneas sensibles (barra azul) y resistentes (barra roja) a osimertinib. Las barras de error representan la desviación estándar. Se observa una mayor expresión de FADS3 en las células resistentes en comparación con las sensibles.

Para confirmar la sobreexpresión del gen observada en los modelos resistentes a osimertinib mediante RNA-seq, se midió la expresión relativa de *FADS3* por RT-qPCR y a nivel de proteína por WB en los modelos sensibles y resistentes. En la línea celular 4006 AZDR, *FADS3* está sobreexpresado aproximadamente 3,5 veces en comparación con la línea 4006. En la línea celular 1975 AZDR, la sobreexpresión es considerablemente mayor, con *FADS3* mostrando una sobreexpresión de aproximadamente 8,6 veces en comparación con la línea 1975. Por último, en la línea celular 827AZDR, también se observa una sobreexpresión de *FADS3*, que es aproximadamente 3,1 veces mayor en comparación con la línea 827 (**Figura 53 A**). En la **Figura 53 B** se muestran los resultados del Western Blot frente a FADS3. En los modelos sensibles apenas es posible observar una banda correspondiente a la proteína de FADS3. Sin embargo, en los tres modelos de resistencia se produce una sobreexpresión significativa de la proteína de FADS3 tal y como indica la presencia y tamaño de la banda. Esto sugiere que FADS3 podría tener una función específica que confiere una ventaja de supervivencia y que está relacionada con la resistencia a osimertinib.

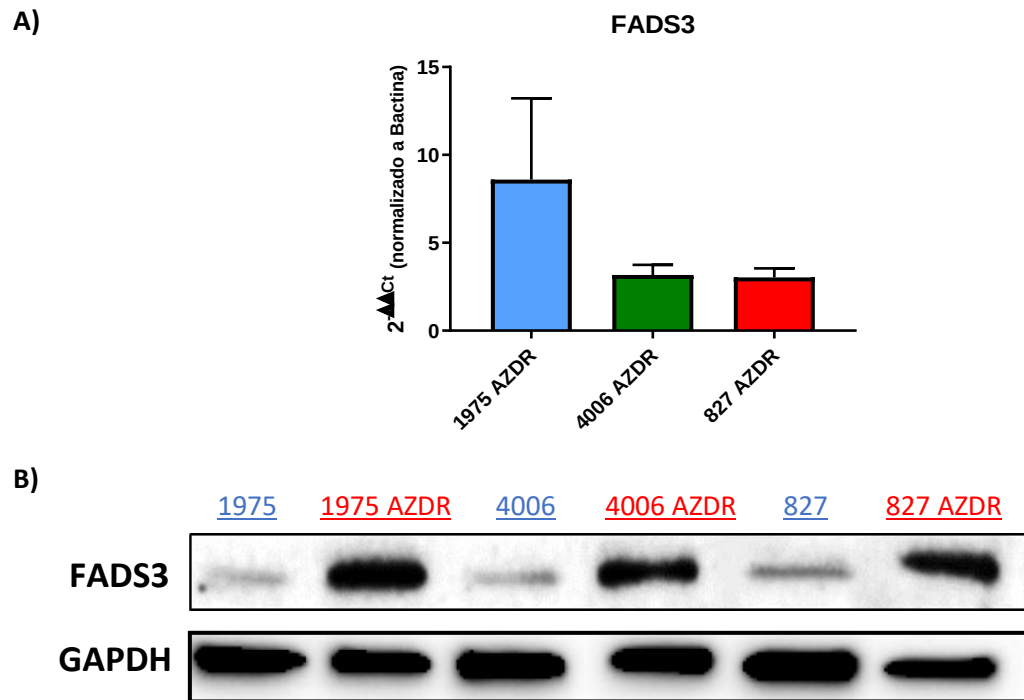


Figura 53. Confirmación de los niveles de FADS3 en los modelos sensibles y resistentes. A) Niveles de expresión relativos de FADS3 medidos por RT-qPCR. Los datos están expresados como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de las líneas resistentes (AZDR) comparadas con sus correspondientes líneas parentales sensibles (n=3). Se utilizó *ACTB* como gen normalizador. Ciclo umbral (C_t). B) Niveles de proteína de FADS3 medidos por WB en los extractos proteicos de las líneas celulares estudiadas. Se utilizó GAPDH como normalizador. El experimento es representativo de 3 réplicas independientes.

Mediante estos resultados, se confirma la sobreexpresión de *FADS3* en los modelos resistentes con un fenotipo mesenquimal tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína.

5. Papel de FADS3 en la resistencia a osimertinib y su implicación en la EMT

5.1 Descripción del gen

FADS3 es el tercer miembro conocido de la familia de desaturasas FADS junto a *FADS1* y *FADS2*, con los que comparte un 52% y un 62% de homología en su secuencia, respectivamente³⁸⁷. Estos genes homólogos comparten una organización y estructura similares, con 12 exones y 11 intrones, ya que surgieron por eventos de duplicación génica y se localizan en la región cromosómica humana 11q13, conocida como “cancer hotspot locus”. En esta región, *FADS3* abarca 17.9 Kb de ADN genómico y está ubicado a 6.0 kb de la región 3’ de *FADS2*³⁸⁷.

FADS3 se transcribe y es sometido a un extenso proceso de splicing alternativo dando lugar a variantes que se conservan filogenéticamente en gran cantidad de mamíferos. Estos transcritos se distribuyen de forma dependiente del sexo y de manera específica del tejido, expresándose principalmente en pulmón, bazo, corazón y riñón³⁸⁸. La proteína codificada por *FADS3* está compuesta por un dominio citocromo b5 en la región N-terminal y tres motivos de histidina en los extremos C-terminales, característicos de todas las desaturasas unidas a la membrana (**Figura 54**)³⁸⁸.



Figura 54. Representación de la estructura de la proteína FADS3 humana.

A pesar de su estructura y similitud con las otras desaturasas, **la función de FADS3 es compleja y controvertida**. Los genes *FADS1* y *FADS2* codifican para desaturasas $\Delta 5$ y $\Delta 6$, respectivamente, enzimas cruciales involucradas en la biosíntesis de PUFAs a partir de SFA o MUFAs. En el caso de *FADS1* y *FADS2*, la función de estos genes en la insaturación de FAs es un área bien definida y conocida³⁸⁹. Sin embargo, en el caso de *FADS3* todavía **se carece de un conocimiento detallado sobre su función**. Durante mucho tiempo se ha hipotetizado que *FADS3* era la primera desaturasa en mamíferos capaz de introducir dobles enlaces en el carbono 13 de la cadena de FAs (desaturasa $\Delta 13$). De esta forma, *FADS3* sería responsable de la insaturación del ácido trans-vaccénico ($\Delta 11$ -18:1) en el C13 para formar un conjugado del ácido linoleico: $\Delta 11,13$ -CLA (18:2)³⁹⁰. Esto contradecía el dogma de que mamíferos carecen de desaturasas que insertan dobles enlaces en el extremo metilo de los FAs, por lo que la atribución de dicha función resultaba de gran relevancia científica. Sin embargo, a pesar de haber observado esto *in vitro* e *in vivo*, existen estudios contradictorios y una controversia respecto a este tema³⁹⁰. Los nuevos avances han comenzado a hipotetizar una nueva función para *FADS3*. Actualmente, se ha reconocido a **FADS3** como una **desaturasa $\Delta 14Z$ de bases esfingoides**³⁹¹. Como hemos visto anteriormente, los SLs son una clase diversa de lípidos que comparten una base esfingoide de cadena larga (LCB) como elemento estructural común (**Figura 12**). Normalmente, los LCB se presentan con un doble enlace $\Delta 4E$ canónico. Sin embargo, la esfingadienina o base esfingoide -diénica (d18:2) que se forma aguas abajo de la esfingosina (d18:1) tiene un doble enlace adicional en la posición $\Delta 14Z$. Mientras que el $\Delta 4E$ es introducido por la ceramida desaturasa 1

(DEGS1), hasta hace muy poco se desconocía la enzima responsable de la **introducción del $\Delta 14Z$** y, por tanto, de la síntesis de la **esfingadienina $\Delta 4E$, $\Delta 14Z$ d18:2 (Figura 55)**. Finalmente, varios estudios han concluido que **la enzima responsable es FADS3**^{392,393}. Según estos estudios, la estructura de este tipo de moléculas sintetizadas por FADS3 hacen que tenga un rol negativo en la formación de microdominios de lípidos en la membrana en contraposición a las Cers normales.

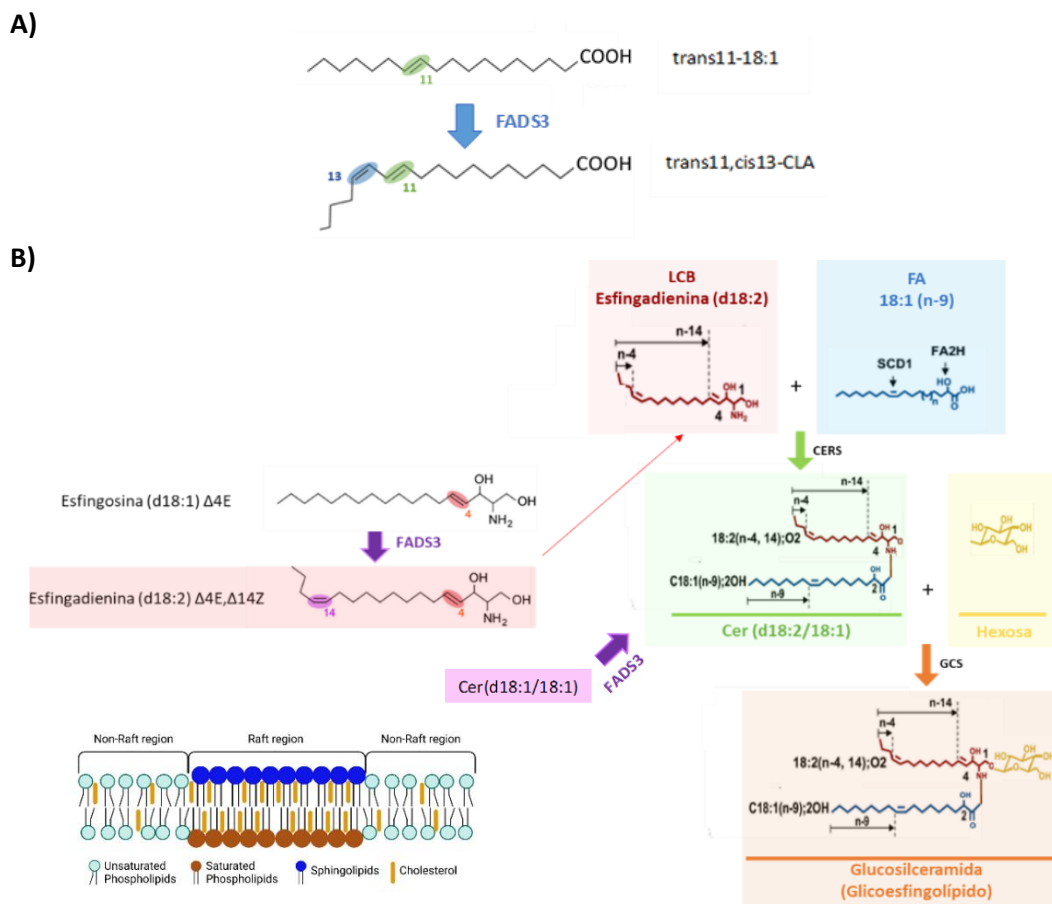


Figura 55. A) Representación gráfica de la supuesta reacción catalizada por FADS3. FADS3 sería la enzima responsable de la insaturación del ácido trans-vaccénico ($\Delta 11-18:1$) en el C13 para formar un conjugado del ácido linoleico: $\Delta 11,13-CLA$ **B) Nueva función de FADS3 en la síntesis de ceramidas y glicosfingolípidos.** La función de FADS3 es introducir un doble enlace en la posición 14 de la cadena esfingoide dando lugar a la formación de la esfingadienina (d18:2). Esta esfingadienina formada puede combinarse posteriormente con un FA (p. ej FA (18:1)) para formar Cer (Cer(d18:2/18:1)). De forma alternativa, FADS3 puede introducir el doble enlace en la Cer(d18:1/18:1). Estas Cer presentan un doble enlace cis, provocando una curvatura de la cadena y afectando a la formación de microdominios de membrana. Estas Cer pueden unirse a carbohidratos para dar lugar a glucosilceramidas que constituyen la base de los glicosfingolípidos o pueden ser convertidas en SMs a través de la esfingomielina sintasa (SGMS1).

Además de sus efectos sobre las membranas celulares debido a su particular estructura, las esfingadieninas constituyen lípidos bioactivos y han demostrado tener efectos significativos sobre diversas vías de señalización celular como la señalización de AKT y GSK3 β y la señalización a través de la vía WNT. Además, las esfingadieninas modulan los niveles de esfingosina-1-fosfato

(S1P), otra importante molécula bioactiva, afectando a la señalización de STAT3. Este conjunto de **efectos sobre múltiples vías** sugiere que las esfingadieninas pueden actuar como moduladores pleiotrópicos en la oncogénesis, afectando diversas rutas que controlan la proliferación celular, la apoptosis, la inflamación y la respuesta al estrés celular³⁹⁴.

Más allá de la producción de esfingadieninas, en la bibliografía se han descrito varias conexiones de FADS3 con el metabolismo de lípidos. Un análisis de polimorfismos reveló la posible implicación de FADS3 en la homeostasis de lípidos modulando los niveles de colesterol y TGs en plasma³⁸⁷. FADS3 también modula la cantidad de ácido docosahexanoico (22:6n-3) en hígado y cerebro donde parece tener un papel fundamental a la hora de mantener los niveles de 22:6n-3 cuando el omega-3 procedente de la dieta es limitante. Por otro lado, se ha visto como la expresión de *FADS3* aumenta con la ingesta de PUFAs a través de la dieta por un mecanismo no relacionado con la regulación de otras desaturasas y dependiente de PPAR- γ ³⁸⁷. Finalmente, en un análisis KEGG de FADS3, se observó que el metabolismo del ácido araquidónico, el metabolismo del ácido linoleico, el metabolismo del retinol, el metabolismo de los xenobióticos por el citocromo P450 y el metabolismo de los fármacos por el citocromo P450 presentaban una fuerte correlación con la expresión de FADS3, sugiriendo que el metabolismo celular se correlaciona fuertemente con la expresión del gen³⁹⁵.

5.2 Estudio de expresión de *FADS3* en respuesta a EGFR-ITQs

Para analizar si la expresión de *FADS3* se ve afectada por la exposición a osimertinib se realizó una incubación aguda (48h) de las células sensibles parentales 4006, 1975 y 827 a dos concentraciones (OSI1 = 100nM, OSI2= 400 nM). Tras la exposición, se midió la expresión relativa de las desaturasas *SCD1*, *SCD5*, *FADS1* y *FADS2* además de *FADS3*. Como se observa en la **Figura 56**, la expresión de *FADS3* aumenta en las tres líneas sensibles en respuesta a una exposición aguda de 48h a las dos concentraciones de osimertinib utilizadas, siendo este aumento más pronunciado cuando se utiliza la concentración más alta (400nM). El aumento en la expresión observado podría ser parte de una respuesta celular inicial al estrés inducido por el tratamiento con el ITQ y, por tanto, indicativo de que FADS3 tiene un papel clave en los mecanismos de adaptación o resistencia temprana al tratamiento. Es posible que exposiciones prolongadas al fármaco terminen provocando una sobreexpresión sostenida de *FADS3*.

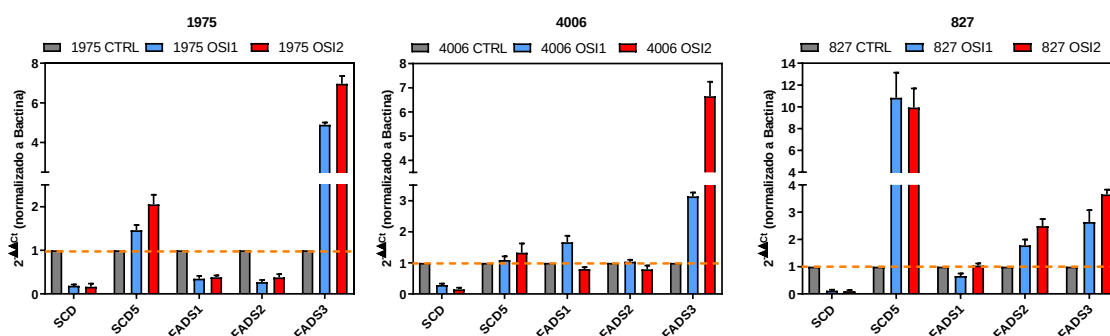


Figura 56. Expresión relativa de desaturasas medida por RT-qPCR tras exposición aguda a dos concentraciones de osimertinib: OSI1 = 100nM (azul); OSI2= 400 nM (rojo) durante 48H en las líneas parentales 4006, 1975 y 827. Los datos están expresados como 2^{-ΔΔCt} de las líneas tratadas con osimertinib comparadas con sus correspondientes líneas control sin tratar (n=3). Se utilizó *ACTB* como gen normalizador. Ciclo umbral (Ct).

Cabe destacar que la exposición aguda a osimertinib, a la vez que provoca un aumento en la expresión de *FADS3*, provoca una represión de *SCD1* en los tres modelos utilizados. Además, la exposición aguda provoca un aumento de expresión de *SCD5* en los tres modelos utilizados, pese a que el aumento en el modelo 4006 es muy débil. La exposición a osimertinib podría estar induciendo un cambio en el metabolismo lipídico, favoreciendo el desvío de FAs hacia rutas que involucran a *SCD5* y *FADS3* en lugar de *SCD1*. La expresión compensatoria de *SCD1* y *SCD5* junto con el aumento de *FADS3* sugiere una regulación coordinada de estas enzimas en respuesta a al osimertinib. Esta regulación podría estar mediada por diferentes factores de transcripción o vías de señalización, como SREBP o PPAR γ , que regulan la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los lípidos y podrían tener un papel importante en la regulación de las dos isoformas, *SCD1* y *SCD5*, así como *FADS3* en respuesta a cambios en el entorno celular. A pesar de estas observaciones, la expresión de *SCD1* en los modelos resistentes no varía apenas (**Figura 51**). Esto podría deberse a que otras enzimas o vías metabólicas estén compensando la función de *SCD1*, de modo que en los modelos resistentes ha tenido lugar una reprogramación lipídica para no depender de *SCD1*.

Finalmente, identificar si los efectos observados son compartidos entre los ITQs de distintas generaciones o son específicos para osimertinib puede resultar de interés y proporcionar información sobre si el mecanismo de actuación del ITQ influye o no en los niveles de expresión de *FADS3*. Por ello, se realizó una exposición aguda a 400 nM a gefitinib (1ª generación) en el modelo sensible 4006 y una exposición aguda a erlotinib (1ª generación) en el modelo parental 827 durante 48h. La exposición aguda a gefitinib y erlotinib muestra los mismos efectos en la expresión de los genes analizados que con osimertinib, esto es: disminución de *SCD1* acompañada de aumento de *FADS3* y *SCD5* (**Figura 57**). La consistencia de estos cambios en los diferentes ITQs sugiere un mecanismo común independiente del modo de inhibición de EGFR.

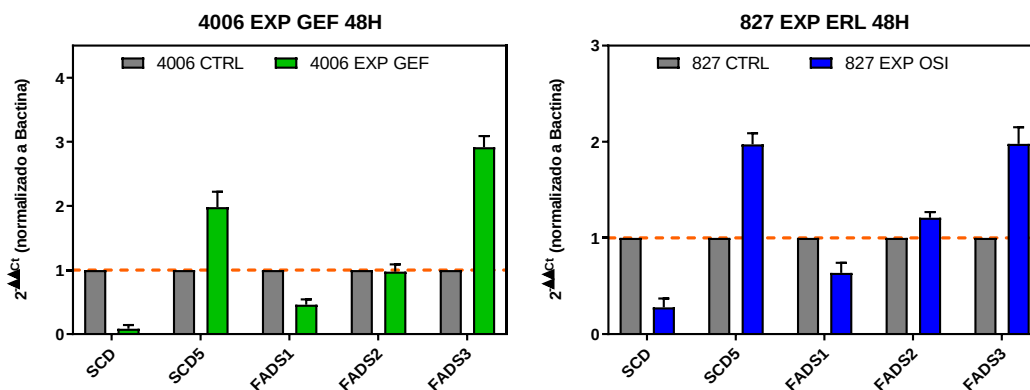


Figura 57. Expresión relativa de desaturasas medida por RT-qPCR tras exposición aguda de 48h a 400 nM de gefitinib en la línea 4006 y a 400 nM de erlotinib en la línea 827. Los datos están expresados como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de las líneas tratadas con ITQ comparadas con sus correspondientes líneas control sin tratar (n=3). Se utilizó *ACTB* como gen normalizador. Ciclo umbral (Ct).

En definitiva, la sobreexpresión de *FADS3* tras la exposición a los tres ITQs (osimertinib, gefitinib, y erlotinib) indica que *FADS3* puede tener un papel clave en la respuesta adaptativa de las células cancerosas a la inhibición de EGFR.

5.3 Estudio de expresión de FADS3 en respuesta a TGF- β

El TGF- β es el inductor canónico de la EMT en células epiteliales. Por tanto, quisimos estudiar su potencial papel en la expresión de *FADS3*. Para ello las células parentales fueron tratadas con TGF- β durante 30 días a una concentración de 10 ng/ml. Se sabe que en estas condiciones TGF- β induce la EMT en las líneas celulares epiteliales 1975, 4006 y 827 (**Figura 58**). Interesantemente el tratamiento con TGF- β provoca una sobreexpresión de *FADS3* (**Figura 58**). El aumento de *FADS3* en los tres modelos celulares indica que su expresión está relacionada con TGF- β y el proceso de EMT. Sin embargo, este incremento no es muy pronunciado, sugiriendo que su expresión está modulada de manera más sutil en comparación con otros genes. Es posible que *FADS3* participe en funciones específicas del metabolismo de lípidos relacionadas con la EMT, pero su papel exacto podría estar condicionado por factores adicionales.

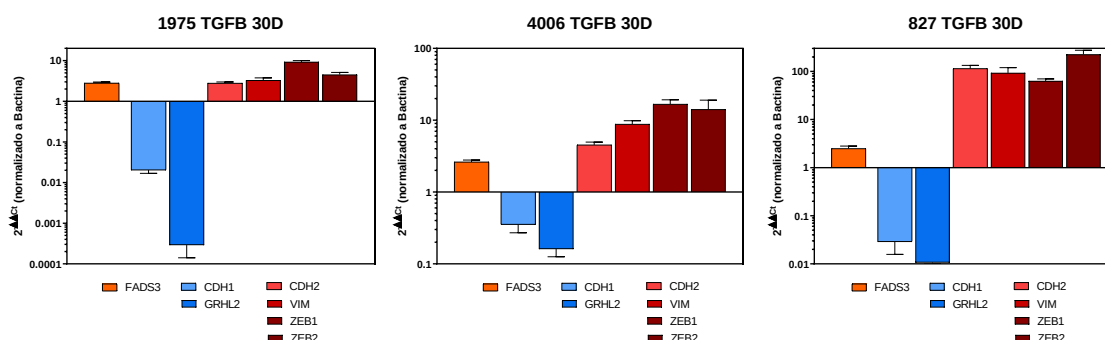


Figura 58. Expresión relativa de *FADS3* y EMT-TFs en las líneas sensibles tratadas con 10 ng/ml de TGF- β durante 30 días. Los datos están expresados como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de las líneas tratadas con TGF- β comparadas con sus correspondientes líneas control sin tratar (n=3). Se utilizó *ACTB* como gen normalizador. Ciclo umbral (C_t).

5.4 Análisis funcional de la relación entre la EMT y FADS3

Por medio de varias aproximaciones, hemos encontrado una asociación entre la sobreexpresión de *FADS3*, la adquisición de resistencia y el fenotipo EMT. Para tratar de profundizar más en esa asociación, nos planteamos generar líneas estables donde:

- 1) Se **silenció la proteína FADS3 endógena** en las líneas resistentes a osimertinib mediante la infección con vectores lentivirales conteniendo secuencias de silenciamiento shRNA.
- 2) Se **sobreexpresó ectópicamente la proteína FADS3** infectando las líneas parentales sensibles a osimertinib con vectores lentivirales donde se clonó la región codificante de *FADS3*.

Para llevar a cabo estos experimentos se seleccionó el modelo 1975/1975 AZDR puesto que la expresión de *FADS3* es más relevante que en el resto de modelos. Tanto para el silenciamiento como para la sobreexpresión, las células se infectaron con un vector control. La metodología empleada se describe en Materiales y métodos (9). Para el **silenciamiento de FADS3** en 1975 AZDR, se emplearon 2 secuencias diferentes de shRNA diseñadas contra diferentes regiones del ARNm de *FADS3*. Tras el aislamiento y expansión de clones se obtuvieron 11 clones para la secuencia shRNA1 y 13 clones para la secuencia shRNA2. En la **Figura 59** se midió la expresión relativa de *FADS3*, *CDH1* y *VIM* en los clones con respecto a la línea 1975

AZDR CTRL. Se seleccionaron aquellos clones en los que la expresión de *FADS3* fuera baja, *CDH1* alta y *VIM* baja. En base a ese criterio, se seleccionó el clon **C1SH1** como la línea silenciada para *FADS3* (**1975 AZDR SH-FADS3**). La eficiencia del silenciamiento fue del 50% aproximadamente. Es posible que si *FADS3* se expresa a niveles muy altos en las células resulte difícil lograr un silenciamiento completo. Incluso una reducción del 50% puede representar una disminución significativa de su expresión, pero la proteína residual puede seguir siendo funcional y cumplir con su rol biológico.

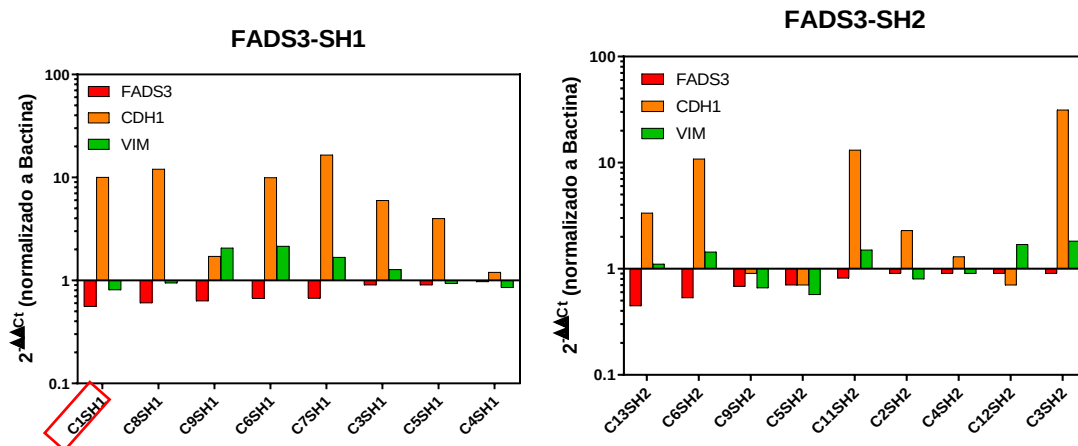


Figura 59. Expresión relativa de *FADS3* (rojo), *CDH1* (naranja) y *VIM* (verde) medida por RT-qPCR con respecto al sh-control en los clones de silenciamiento obtenidos en 1975 AZDR. Se utilizó *ACTB* como gen normalizador. Ciclo umbral (Ct).

Para la **sobreexpresión de *FADS3*** se siguió la misma metodología de aislamiento de clones y finalmente se obtuvieron 5 clones de sobreexpresión. Se midió la expresión relativa de *FADS3*, *CDH1* y *VIM* en los clones con respecto al CTRL y se seleccionaron, en este caso, aquellos clones en los que la expresión de *FADS3* fuera alta, *CDH1* baja y *VIM* alta (**Figura 60**). En base a este criterio, se seleccionó el clon **C5FADS3** como la línea con sobreexpresión de *FADS3* (**1975 OE-FADS3**). Se consiguió aumentar la expresión de *FADS3* 5 veces con respecto a la línea 1975 CTRL.

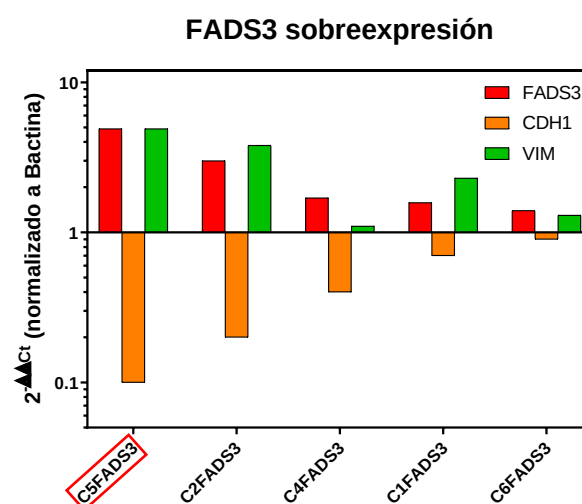


Figura 60. Expresión relativa de *FADS3* (rojo), *CDH1* (naranja) y *VIM* (verde) medida por RT-qPCR con respecto al control en los clones de sobreexpresión obtenidos en 1975. Se utilizó *ACTB* como gen normalizador. Ciclo umbral (Ct).

En base a la expresión de los marcadores EMT analizados (CDH1 y VIM), es posible observar que la línea silenciada para *FADS3* (1975 AZDR SH-*FADS3*) ha adquirido ciertas características epiteliales mientras que la línea con sobreexpresión de *FADS3* (1975 OE-*FADS3*) ha adquirido características mesenquimales. De hecho, en el caso de ésta última, es posible apreciar un cambio morfológico significativo hacia una morfología alargada y fusiforme, fenotipo característico de las células mesenquimales (**Figura 61**). Esta observación sugiere que *FADS3* no solo está asociado con la EMT a nivel molecular, sino que también puede influir directamente en el comportamiento celular y en las características fenotípicas de las células tumorales. La **formación de focos celulares es un indicador clásico de la transformación maligna *in vitro***. En este sentido, la sobreexpresión de *FADS3* hace que las células crezcan formando focos por lo que *FADS3* podría contribuir a la transformación maligna de las células epiteliales facilitando características como la pérdida de la inhibición por contacto.

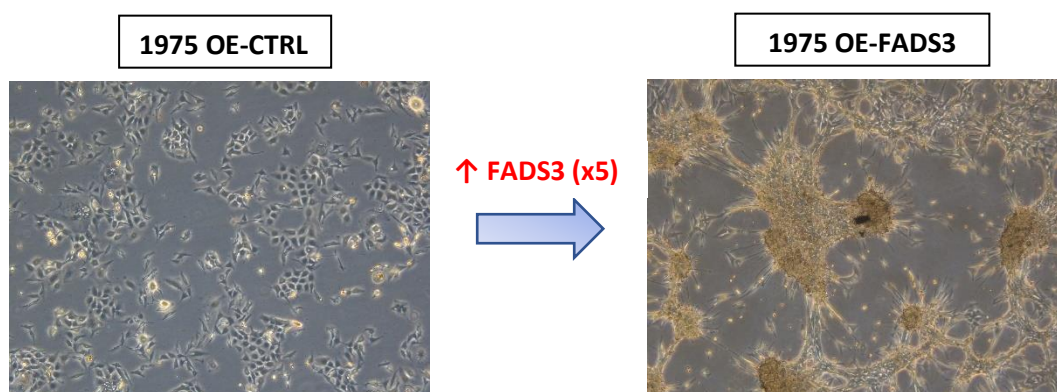


Figura 61. Comparación morfológica entre la línea 1975 OE-CTRL y la línea 1975 OE-*FADS3*. Es posible observar un cambio hacia un fenotipo alargado y fusiforme, con aparente formación de focos celulares.

5.4.1 Niveles de *FADS3* a nivel proteico en las líneas con silenciamiento y sobreexpresión de *FADS3*

A continuación, se realizó un WB frente a *FADS3* para comprobar si tanto el silenciamiento como la sobreexpresión habían tenido lugar a nivel de proteína en la línea 1975 AZDR SH-*FADS3* y 1975 OE-*FADS3*, respectivamente. Los resultados se muestran en la **Figura 62**.

Tras el silenciamiento de *FADS3*, se observó una disminución notable en la intensidad de la banda correspondiente a la proteína de *FADS3* en la línea 1975 AZDR SH-*FADS3* con respecto a su línea control 1975 AZDR SH-CTRL. Por otro lado, la sobreexpresión de *FADS3* resultó en un aumento significativo en la intensidad de la banda de la línea 1975 OE-*FADS3* con respecto a su línea control 1975 OE-CTRL. Estos resultados siguen la misma tendencia que las observaciones realizadas en los experimentos de RT-qPCR y evidencian que los cambios observados han tenido lugar también a nivel de proteína.

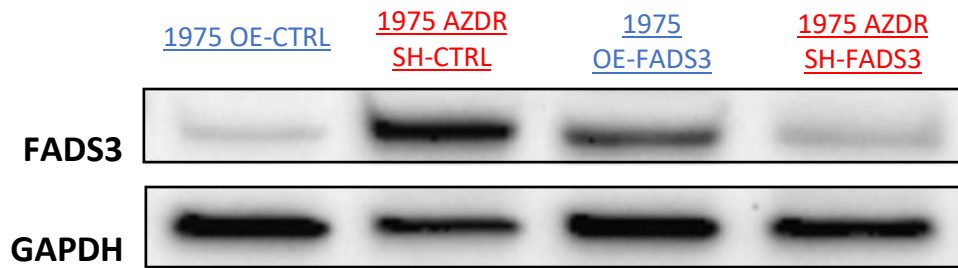


Figura 62. Niveles de proteína FADS3 medidos en extractos proteicos mediante WB en las líneas control, silenciadas y sobreexpresadas. El experimento es representativo de tres réplicas independientes. Se utilizó GAPDH como normalizador.

5.4.2 Relación de marcadores EMT y pluripotencia con FADS3

En un primer paso se estudió la expresión de marcadores canónicos EMT cuando se modula la expresión de *FADS3*.

El silenciamiento de *FADS3* en la línea resistente 1975 AZDR genera cambios en la expresión de los marcadores EMT. En cuanto a la expresión de marcadores epiteliales, la expresión de **CDH1** aumenta; no obstante, los niveles de **GRHL2** permanecen invariables y no se ven afectados. Por otro lado, la expresión de los marcadores mesenquimales **CDH2**, **VIM**, **ZEB1** y **ZEB2** disminuye tras el silenciamiento de *FADS3* lo que podría implicar una MET parcial y una transición a un fenotipo más epitelial en estas células (**Figura 63 A**). La sobreexpresión de *FADS3* en la línea celular 1975 induce una transición EMT como puede observarse por la represión de los genes epiteliales **CDH1** y **GRHL2**, y la sobreexpresión de los genes mesenquimales **CDH2**, **VIM**, **ZEB1** y **ZEB2**. Dicha transición no es total sino parcial, puesto que no se alcanzan los niveles de la línea resistente 1975 AZDR (**Figura 63 B**).

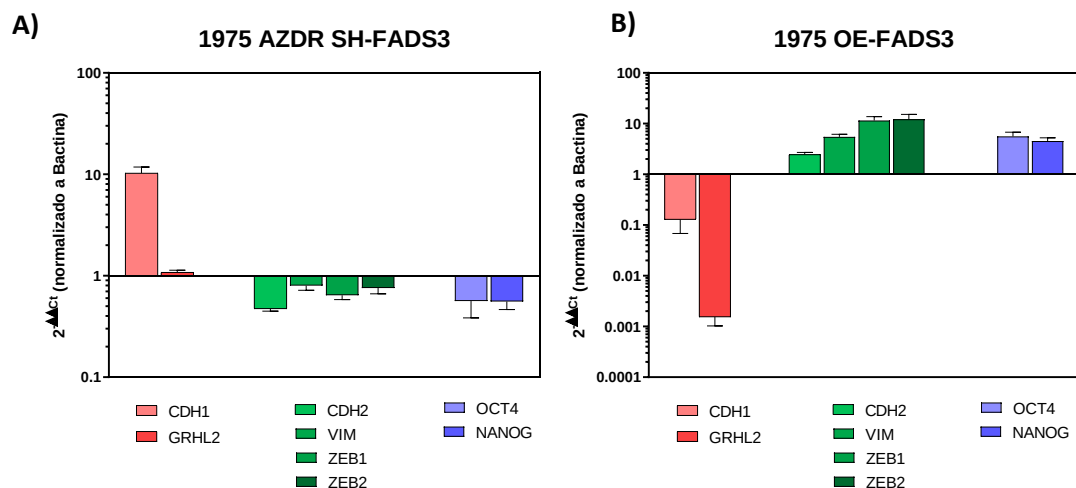


Figura 63. Estudio de expresión de marcadores EMT y genes de pluripotencia en la línea con silenciamiento de *FADS3* (1975 AZDR SH-FADS3) y la línea con sobreexpresión de *FADS3* (1975 OE-FADS3) mediante RT-qPCR. Los datos están expresados como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de: A) Línea 1975 AZDR SH-FADS3 frente a 1975 AZDR SH-CTRL (n=3). B) Línea 1975 OE-FADS3 frente a 1975 OE-CTRL (n=3). Se utilizó *ACTB* como gen normalizador. Ciclo umbral (C_t).

La EMT también se ha vinculado con la adquisición de propiedades similares a las de las células madre incluyendo la pluripotencia tal y como se comenta en la Introducción. Las células

que experimentan la EMT a menudo adquieren características de CSC, como capacidad de autorrenovación, diferenciación y resistencia a terapias. Los marcadores de pluripotencia incluyen genes como *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *KLF4* y *c-MYC*. Estos genes son fundamentales en el mantenimiento de la pluripotencia y la autorrenovación en células madre³⁹⁶. Por ello, se midió la expresión relativa de algunos de ellos por RT-qPCR. En el silenciamiento de *FADS3* se produce una represión de genes de pluripotencia como ***OCT4*** y ***NANOG*** mientras que en la sobreexpresión de *FADS3* se produce el efecto contrario y aumenta la expresión de estos genes. Los genes *SOX2*, *KLF4* y *c-MYC* no se expresan apenas en estas células. Estos resultados podrían indicar que *FADS3* puede estar actuando como un regulador en la intersección entre la EMT y la adquisición de propiedades de CSC.

Una vez observados los cambios en los marcadores EMT a nivel de ARN por RT-qPCR, se procedió a validar estos hallazgos a nivel de proteína. A continuación, se muestra en la **Figura 64**, los resultados del Western Blot para los marcadores epiteliales GRHL2 y CDH1 y para los marcadores mesenquimales VIM y ZEB1. En el silenciamiento se observa una concordancia con los resultados de expresión por RT-qPCR, aunque las diferencias no son tan drásticas. En cuanto a los marcadores epiteliales, los niveles de **GRHL2** no varían como ya se había comprobado por qPCR mientras que la banda correspondiente a **CDH1** es ligeramente más intensa en comparación con la línea 1975 AZDR SH-CTRL. Por otro lado, los marcadores mesenquimales **VIM** y **ZEB1** disminuyen tras silenciar *FADS3* como cabría esperar. Por otro lado, en la línea 1975 OE-*FADS3* se observa disminución de los marcadores epiteliales **CDH1** y **GRHL2**, junto con un ligero aumento de **ZEB1** y ningún cambio significativo en la expresión de **VIM**. **Los resultados concuerdan con lo visto en el análisis de expresión por RT-qPCR excepto para los valores de VIM los cuales no aumentan a nivel de proteína**. La discrepancia entre los niveles de ARN y proteína de VIM puede deberse a mecanismos de regulación postranscripcional, a diferencias en la estabilidad del ARNm y la proteína, a mecanismos de la regulación traduccional o a condiciones específicas del ambiente celular en la línea 1975.

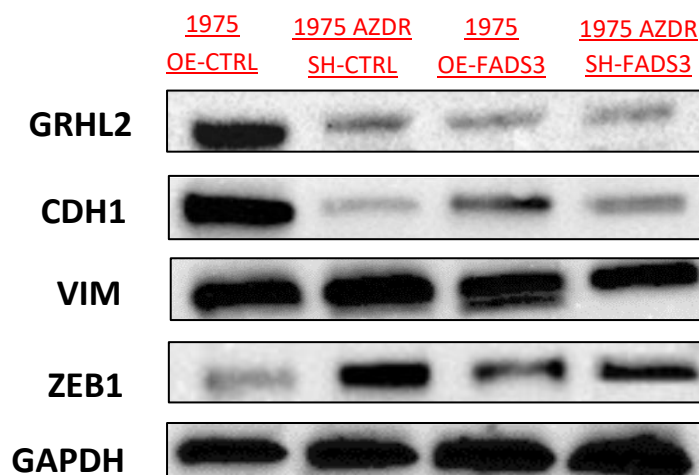


Figura 64. Niveles de proteína medidos por Western Blot de los marcadores EMT en las líneas con sobreexpresión de *FADS3* (1975 OE-*FADS3*) y la línea silenciada para *FADS3* (1975 AZDR SH-*FADS3*) junto a las líneas control. El experimento es representativo de tres réplicas independientes. Se utilizó GAPDH como normalizador.

5.4.3 Evaluación del papel de FADS3 en la migración celular

Para estudiar y cuantificar la capacidad migratoria y la movilidad celular en relación a la expresión de *FADS3* se realizó un ensayo de Transwell para los modelos de silenciamiento y sobreexpresión. Como cabría esperar, **el silenciamiento de *FADS3* genera una disminución en la capacidad migratoria** en comparación con la línea control tal y como puede observarse por la menor cantidad de células que han conseguido atravesar la membrana del inserto. Por otro lado, la **sobreexpresión de *FADS3* tiene el efecto contrario y aumenta la migración celular** con respecto al control (**Figura 65**). Esto sugiere que ***FADS3* puede jugar un papel en los mecanismos que regulan la migración de células cancerosas de origen pulmonar**. Puesto que la migración celular es un paso clave en la metástasis del cáncer, la sobreexpresión de *FADS3* podría estar implicada también en procesos metastásicos. Esto abre la posibilidad de que *FADS3* sea un factor que contribuye a la invasividad y diseminación de las células tumorales en CPNM.

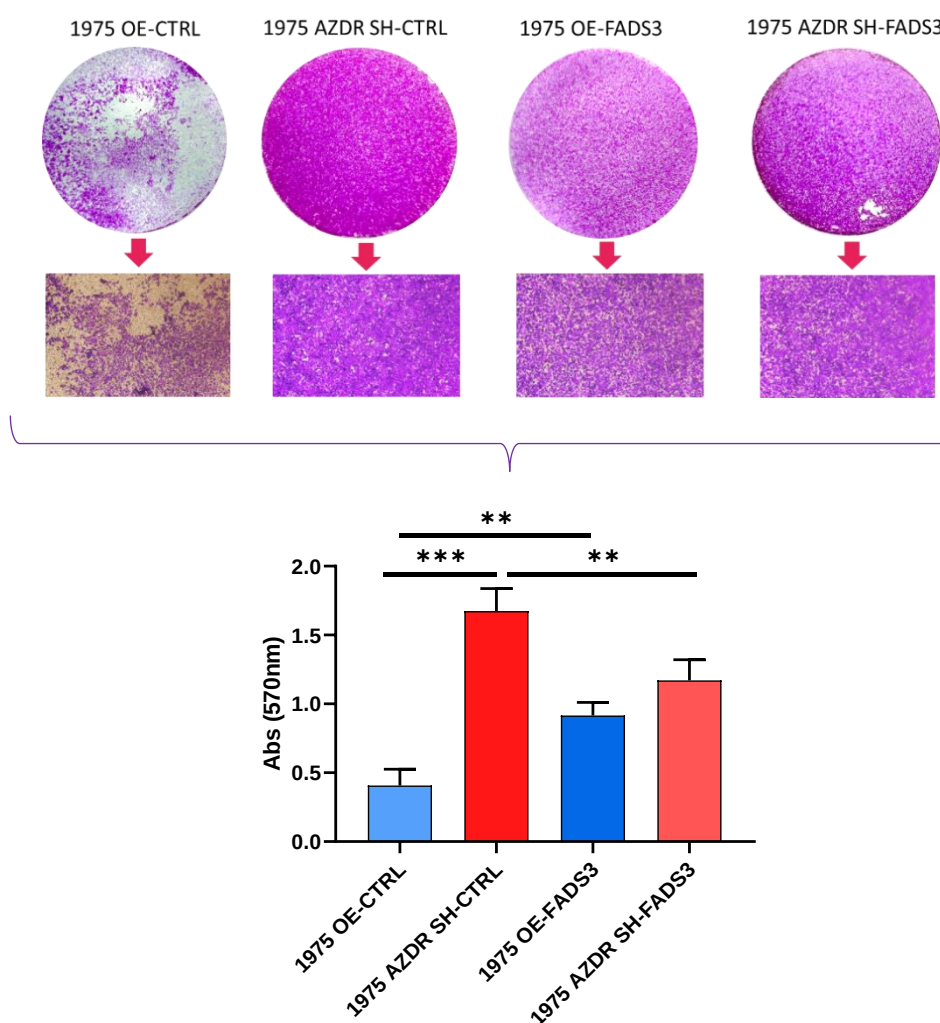


Figura 65. Ensayo de Transwell para evaluar la capacidad migratoria de las líneas CTRL y las líneas OE-FADS3 y SH-FADS3 (n=3). El gráfico de barras representa la cuantificación de la absorbancia a 570nm tras la solubilización de la sulforrodamina B en las distintas líneas evaluadas. Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar, y las diferencias estadísticas están indicadas sobre las barras ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$).

5.4.4 Sensibilidad a osimertinib en función de la expresión de *FADS3*

El siguiente paso consistió en determinar la sensibilidad a osimertinib en las líneas 1975 OE-FADS3 y 1975 AZDR SH-FADS3 con respecto a las líneas control tras la modificación en la expresión de *FADS3* y la transición parcial EMT que habían experimentado. Evaluar cómo estos cambios en la expresión de *FADS3* impactan la viabilidad celular permitirá evaluar si *FADS3* es un mediador clave en la resistencia a osimertinib. Para ello se realizó un ensayo de citotoxicidad a corto plazo (72h) y un ensayo de formación de colonias a largo plazo (14 días).

Como podemos observar en en la **Figura 66 A**, en el caso del silenciamiento, la línea 1975 AZDR SH-FADS3 muestra cierta resensibilización a osimertinib con un valor de IC_{50} inferior a la línea control: IC_{50} 1975 AZDR SH-CTRL vs 1975 AZDR SH-FADS3 ($< 3,6$ vs $> 10 \mu M$) y valores de supervivencia reducidos. En línea con estos resultados, **la línea 1975 AZDR SH-FADS3 muestra cierta resensibilización a osimertinib** en el ensayo a largo plazo como puede apreciarse por el número de colonias formadas con respecto a la condición control ($\emptyset$) en comparación con la línea 1975 AZDR SH-CTRL (**Figura 66 B**). No se alcanzan los valores de la línea 1975, es decir, la resensibilización al fármaco no es completa sino parcial. Asimismo, en la **Figura 66 A**, la línea con sobreexpresión de *FADS3* presentan un IC_{50} muy superior al de la línea parental control: IC_{50} 1975 OE-CTRL vs 1975 OE-FADS3 (< 0.004 vs $> 10 \mu M$) mostrando valores de supervivencia significativamente mayores a las diferentes concentraciones de osimertinib utilizadas. En la **Figura 66 B** observamos el mismo fenómeno, pero en un ensayo de colonias a largo plazo: la línea 1975 OE-CTRL no es capaz de formar colonias a partir de 25 nM de osimertinib mientras que la línea 1975 OE-FADS3 es capaz de proliferar a todas las concentraciones utilizadas como evidencia la densidad de colonias formada. A pesar de no alcanzarse los valores de supervivencia de la línea resistente, 1975 AZDR, **la sobreexpresión de *FADS3* en la línea 1975 confiere resistencia parcial a osimertinib** tanto en exposiciones agudas (72h) como en exposiciones prolongadas (14 días).

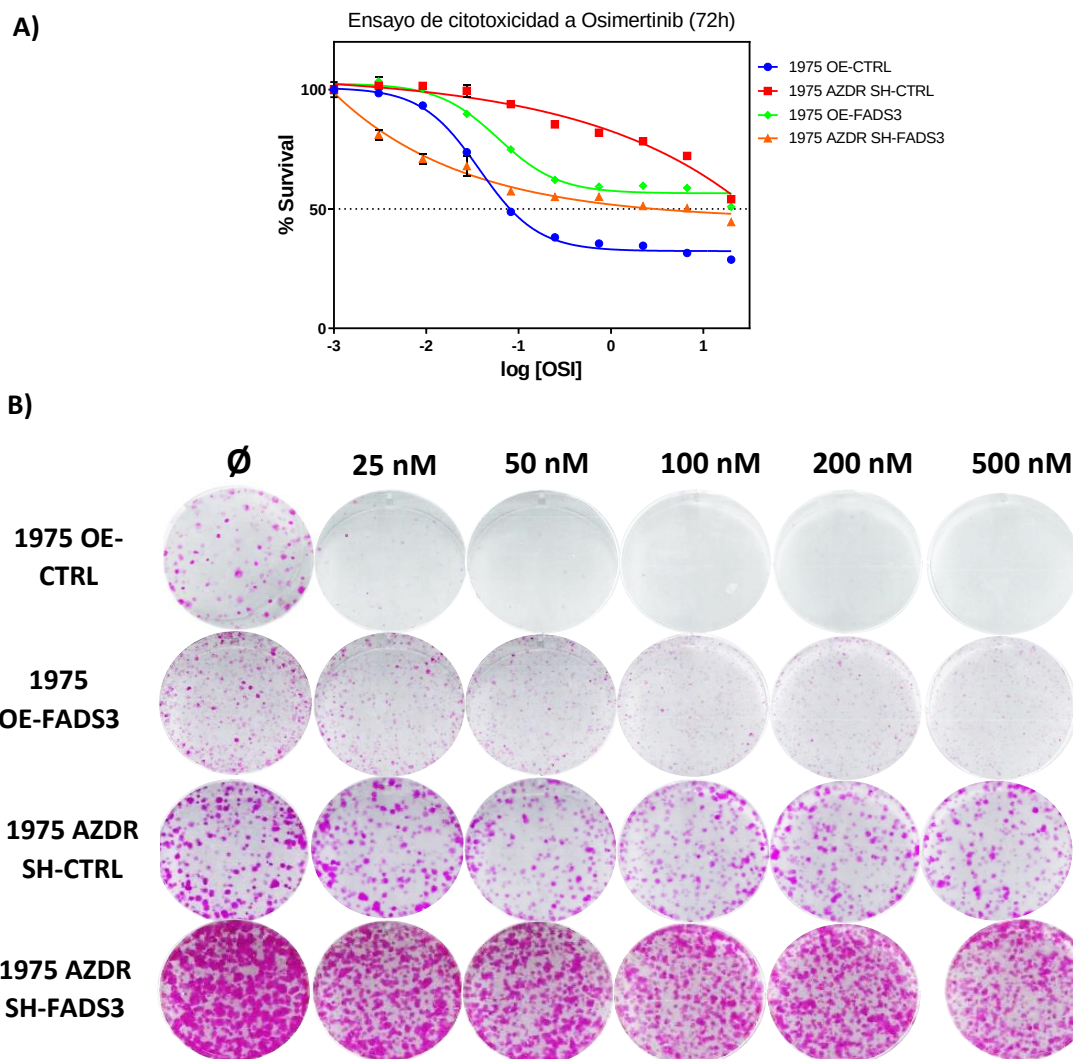


Figura 66. Respuesta a osimertinib de las líneas 1975 OE-FADS3 y 1975 AZDR SH-FADS3. A) Ensayo de citotoxicidad aguda mediante el método de la sulforodamina B tras 72h de incubación con dosis crecientes de osimertinib (0-10 μ M) en las líneas H1975, 1975 AZDR, 1975 OE-FADS3 y 1975 AZDR SH-FADS3. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control $\pm$ desviación estándar (n =6). B) Ensayo de formación de colonias tras 15 días de incubación con diferentes concentraciones de osimertinib hasta 500 nM en las líneas mencionadas previamente.

Estos experimentos sugirieron un papel importante de FADS3 en la modulación de la sensibilidad a este inhibidor y apuntan a que su función está relacionada con mecanismos celulares que protegen a las células cancerosas de su efecto citotóxico. La adquisición parcial de resistencia y la resensibilización parcial observadas en los experimentos anteriores pueden explicarse por la presencia de una transición EMT parcial en las células infectadas. La EMT es un proceso biológico en el que las células epiteliales adquieren características mesenquimales, sin embargo, como se ha comentado anteriormente, este proceso puede ser parcial de forma que las células solo adquieren algunas características mesenquimales mientras retienen algunas propiedades epiteliales. **La sobreexpresión de FADS3 parece promover características mesenquimales**, pero sin inducir una EMT completa de modo que aún se mantienen algunas propiedades epiteliales que limitan la resistencia total. En definitiva, aunque FADS3 juega un papel importante en la resistencia a osimertinib, otras vías de señalización pueden estar

contribuyendo a la resistencia residual. La observación de una transición EMT parcial sugiere que **la sobreexpresión de *FADS3* induce cambios fenotípicos que son característicos de la EMT**. Del mismo modo, el silenciamiento de *FADS3* puede revertir algunos aspectos de la EMT de forma parcial, haciendo que las células sean más sensibles a osimertinib, pero no revirtiendo completamente la transición a un estado epitelial puro. La existencia de inhibidores farmacológicos de *FADS3* podría resultar de gran utilidad para potenciar la eficacia de los ITQs y mejorar la respuesta terapéutica en pacientes con resistencia adquirida mediada por la activación EMT. Esto pone de manifiesto la importancia de desarrollar estrategias dirigidas a modular la actividad de *FADS3*, ya que su inhibición podría representar una vía efectiva para revertir la resistencia y resensibilizar las células tumorales a los tratamientos con ITQs.

5.4.5 Análisis de expresión de genes clave en el metabolismo de lípidos en relación a *FADS3*

La desregulación de *FADS3* podría influir en la expresión de otros genes involucrados en el metabolismo de los lípidos, sugiriendo un posible papel regulador de esta desaturasa en diversas rutas relacionadas con lípidos. Para evaluar estos efectos, se analizó la expresión de genes clave relacionados con síntesis, transporte, regulación y insaturación mediante RT-qPCR en los clones con silenciamiento y sobreexpresión de *FADS3* (1975 AZDR SH-*FADS3* y 1975 OE-*FADS3* respectivamente). Este análisis proporciona información relevante sobre el impacto funcional de *FADS3* en ambos contextos celulares. Los resultados se muestran en la **Figura 67**.

En el caso del **silenciamiento de *FADS3***, en la línea **1975 AZDR SH-*FADS3*** se han producido cambios de expresión en determinados genes del metabolismo de lípidos (**Figura 67 A**). Algunos de estos cambios **siguen tendencias opuestas a la sobreexpresión**, sugiriendo que estos genes se regulan de forma considerable debido a la actividad de *FADS3* independientemente del contexto celular. Entre estos genes destacan ***ACACA*, *CDS1*, *FOXA1* y *GPD2*** por sobreexpresarse en la línea 1975 AZDR SH-*FADS3* y ***FABP7*** por reprimirse. Por otro lado, existen cambios específicos en la expresión de determinados genes en la línea 1975 AZDR SH-*FADS3* como el aumento de ***FASN* y *ELOVL7*** junto a la represión de ***FATP5***. Los cambios en estos genes sugieren que el silenciamiento de *FADS3* podría estar promoviendo un aumento en la síntesis endógena de FAs. Por último, se midió la expresión del resto de la familia de desaturasas: ***SCD1*, *SCD5*, *FADS1* y *FADS2***. Si una desaturasa es inhibida o sobreexpresada, otras desaturasas podrían compensar su función para mantener el equilibrio lipídico y metabólico. Además, las desaturasas pueden estar reguladas por FTs comunes o vías de señalización compartidas reflejando patrones de co-regulación. En la línea 1975 AZDR SH-*FADS3* no se producen cambios notables en la expresión de ninguna de ellas como podría esperarse. Un silenciamiento del 50% de *FADS3* puede no ser suficiente para inducir cambios observables en la expresión del resto de desaturasas. Las respuestas celulares a cambios en la expresión de genes podrían requerir superar un umbral para activar la regulación de otros genes. De esta forma, un silenciamiento del 50% puede no alcanzar este umbral necesario para inducir cambios. Además, las funciones de *FADS3* podrían ser **distintas según el estado celular** y la red reguladora ya existente en cada línea. De esta forma, en la línea 1975 AZDR, la regulación transcripcional podría haber cambiado debido a la EMT y esto podría hacer que algunos genes ya no respondan de la misma manera ya que su expresión está controlada por otros factores transcripcionales en este nuevo estado.

La sobreexpresión de *FADS3* (1975 OE-*FADS3*) también tiene un impacto en la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico, como puede verse en la **Figura 67 B**. En particular, se observa una marcada sobreexpresión de genes (resaltados en rojo), como ***CD36***, ***FABP7*** y ***FATP2*** los cuales están implicados en el transporte y captación de FAs. Este incremento en la expresión sugiere que la sobreexpresión de ***FADS3*** podría estar favoreciendo una mayor entrada de FAs al interior celular y un posible cambio en la fuente de FAs utilizada por la célula, pasando a una mayor dependencia de la captación exógena. En línea con esto, pese a que la expresión de *FASN* no cambia, se produce una fuerte represión de ***GPD2*** junto a una represión de las enzimas ***ACACA/B***. Dado que estos genes desempeñan un papel clave en la disponibilidad de **acetil-CoA**, el precursor esencial para la síntesis y elongación de FAs, su represión sugiere un mecanismo alternativo para reducir la síntesis *de novo* de FAs sin modificar directamente la expresión de *FASN* ni las elongasas *ELOVL*. Esto refuerza la hipótesis de que las células con **sobreexpresión de *FADS3*** podrían estar disminuyendo la síntesis endógena y favoreciendo la captación de FAs exógenos siguiendo un efecto opuesto al observado en el silenciamiento. Por otro lado, se observan cambios en línea con los observados en los modelos de resistencia como una sobreexpresión de ***DGAT2*** y una represión de ***CDS1*** y ***FOXA1*** (resaltados en azul). La sobreexpresión de *DGAT2* junto con la represión de *FOXA1* concuerda con el aumento en los niveles de **TGs** detectado en el análisis lipidómico y refleja la adaptación metabólica de las células que adquieren resistencia, facilitando el almacenamiento y disponibilidad de energía. En cuanto al resto de desaturasas, la **sobreexpresión de *FADS3*** parece ir acompañada de una **disminución de *SCD1*** y un **aumento de *SCD5***. Este efecto ya se observó en el experimento de exposición aguda a osimertinib (**Figura 56**) y TGF- β (**Figura 57**), en el que el aumento en la expresión de *FADS3* venía acompañado por una disminución de *SCD1* y un aumento de *SCD5*. En este sentido, la sobreexpresión de *FADS3* podría estar alterando el balance de FAs, lo que desencadena una respuesta compensatoria. La célula podría reducir la producción de MUFAs por *SCD1* para evitar una acumulación excesiva de ciertos FAs y, al mismo tiempo, aumentar la expresión de *SCD5* para producir FAs específicos necesarios en las nuevas condiciones metabólicas impuestas por la alta actividad de *FADS3*.

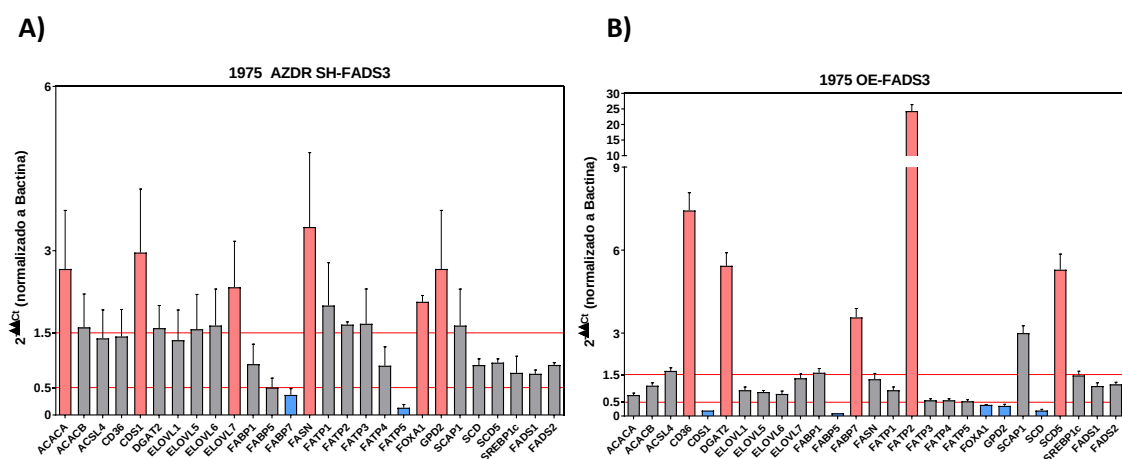


Figura 67. Análisis de expresión de genes del metabolismo lipídico en las líneas 1975 OE-*FADS3* y 1975 AZDR SH-*FADS3* mediante RT-qPCR. Los datos están expresados como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de: A) Línea con silenciamiento de *FADS3* (1975 AZDR SH-*FADS3*) frente a 1975 AZDR SH-CTRL (n=3). B) Línea con sobreexpresión de *FADS3* (1975 OE-*FADS3*) frente a 1975 OE-CTRL (n=3). Se utilizó *ACTB* como gen normalizador. Ciclo umbral (Ct).

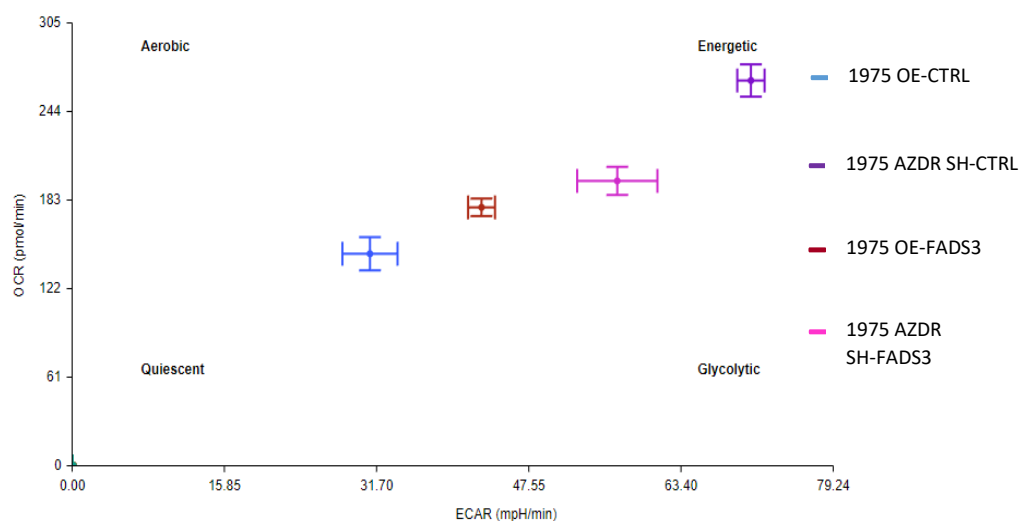
5.4.6 Alteración de la respiración celular y estrés mitocondrial en relación a FADS3

Como hemos comentado, la EMT no solo implica cambios en la capacidad migratoria y la invasión celular, sino también en el metabolismo celular. Aquellas células que experimentan una EMT a menudo exhiben cambios en su metabolismo, adaptándose para satisfacer las demandas energéticas y biosintéticas necesarias para su nuevo fenotipo. Comprender los cambios metabólicos asociados con la modulación de FADS3 en el contexto de la EMT puede revelar vulnerabilidades metabólicas específicas de las células que han sufrido esta transición. Para tratar de comprender estos cambios se realizó un ensayo MitoStress en el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe96 (**Figura 68**). Este análisis permite medir dos parámetros cruciales del metabolismo celular: la tasa de consumo de oxígeno (OCR), que refleja la actividad mitocondrial y la fosforilación oxidativa, y la tasa de acidificación extracelular (ECAR), que indica la actividad glicolítica. Esto puede proporcionar información detallada sobre cómo la EMT afecta el metabolismo energético de las células y si la EMT ha inducido un cambio hacia un metabolismo más glicolítico o un aumento en la dependencia de la fosforilación oxidativa.

En la **Figura 68 A**, se utilizan los valores de OCR y ECAR para representar los fenotipos energéticos de las diferentes líneas. En la línea con silenciamiento de FADS3 (1975 AZDR SH-FADS3) podemos observar cómo el fenotipo epitelial parcial adquirido por esta línea se caracteriza por presentar un estado menos energético, con menor actividad glicolítica y aeróbica que el fenotipo mesenquimal de la línea control. En el caso de la sobreexpresión, podemos observar el mismo fenómeno, pero en dirección opuesta: la línea sobreexpresada (1975 OE FADS3) y con características más mesenquimales presenta un fenotipo más energético que la línea control. En la **Figura 68 B**, se representan los parámetros clave de la función mitocondrial. La respiración no mitocondrial es el consumo de oxígeno debido a enzimas celulares distintas de las mitocondrias. En este caso, la línea 1975 AZDR SH-FADS3 presenta menores niveles de oxígeno no mitocondrial que la línea control, aunque la diferencia no resulta estadísticamente significativa. Por otro lado, la sobreexpresión de FADS3 (1975 OE-FADS3) parece producir el efecto contrario y presenta mayores niveles de oxígeno no mitocondrial que la línea control de forma significativa. Por último, la producción de ATP acoplada a respiración es un reflejo de la disminución del OCR tras la inyección de oligomicina, un inhibidor de la ATP sintasa. En el caso del silenciamiento, se aprecia una disminución significativa en este parámetro. Sin embargo, la sobreexpresión de FADS3 aumenta ligeramente la producción de ATP en comparación con la línea control siguiendo una tendencia contraria a la sobreexpresión, no obstante, dicho cambio no es significativo.

En resumen, la sobreexpresión de FADS3 genera un fenotipo más energético caracterizado por un aumento en el consumo de oxígeno mitocondrial y un ligero aumento del ATP producido a través de la respiración. Por otro lado, el silenciamiento de FADS3 genera un fenotipo menos energético con una disminución en el consumo de oxígeno no mitocondrial y una reducción del ATP producido asociado a respiración. Todo ello sugiere que **FADS3 y su función podría estar afectando a la respiración mitocondrial y a cómo la célula obtiene energía para llevar a cabo otros procesos celulares.**

A)



B)

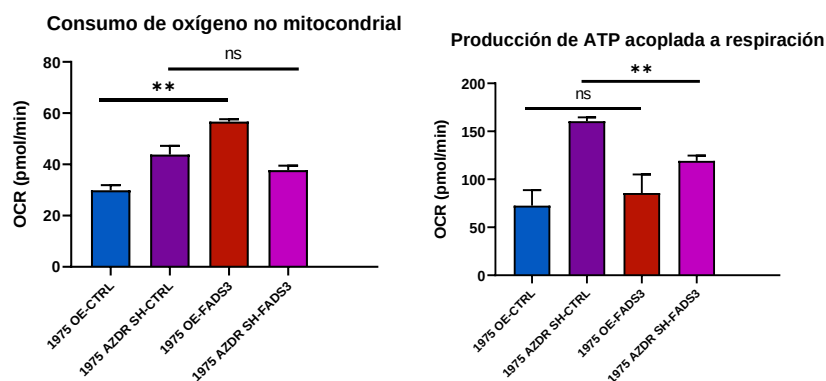


Figura 68. Resultados del MitoStress en las líneas 1975 OE-CTRL, 1975 AZDR SH-CTRL, 1975 OE-FADS3 y 1975 AZDR SH-FADS3 utilizando el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe96. A) Mapa energético; B) Gráficos de barras representando el consumo de oxígeno no mitocondrial y la producción de ATP acoplada a respiración (n=5). Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar, y las diferencias estadísticas están indicadas sobre las barras ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$).

5.4.7 Alteraciones lipidómicas en relación a *FADS3*

Para estudiar en profundidad la reprogramación lipidómica que ha tenido lugar tras la modulación de la expresión de *FADS3*, se realizó un análisis lipidómico de las líneas 1975 OE-CTRL, 1975 OE-*FADS3*, 1975 AZDR SH-CTRL y 1975 AZDR. La metodología empleada para llevar a cabo el estudio fue la misma que para el análisis de las líneas AZDR (Materiales y Métodos 10). A continuación, se describen las clases de lípidos responsables de las diferencias entre la línea con silenciamiento de *FADS3* y la línea con sobreexpresión de *FADS3*. Como puede verse en la **Figura 69**, la modulación de la expresión de *FADS3* tiene un impacto en el lipidoma de las líneas celulares estudiadas:

- **El silenciamiento de *FADS3* en la línea 1975 AZDR (1975 AZDR SH-*FADS3*)** provoca cambios sutiles en la composición de la mayoría de clases analizadas. Dentro de los lípidos neutros, los niveles de TGs se reducen significativamente. En contraste, los niveles de CEs permanecen prácticamente constantes. En cuanto a los fosfolípidos, el silenciamiento de *FADS3* promueve un aumento significativo en diversas clases, especialmente en los plasmalógenos (PCo, PCp y PEp). Este incremento generalizado, pese a que no es muy marcado, contrasta con el patrón observado en la sobreexpresión, donde estas clases tienden a disminuir. También se produce un aumento marcado de LPCs y PIs junto a una disminución de CLs y PSs a diferencia de lo que ocurre en la sobreexpresión.
- **La sobreexpresión de *FADS3* en la línea 1975 (1975 OE-*FADS3*)** genera cambios significativos en el perfil lipidómico. Entre los lípidos neutros, destaca un aumento notable en los TGs y los CEs, lo que sugiere una posible reorientación metabólica hacia el almacenamiento lipídico o modificaciones estructurales específicas. En el caso de los fosfolípidos, se observa una disminución generalizada en la mayoría de las clases incluyendo una reducción significativa de los lípidos plasmalógenos (PCp y PEp) así como en PEs, LPCs y PIs, clases clave en la señalización y la estructura membranal. Este patrón podría indicar que la sobreexpresión de *FADS3* tienen un impacto negativo en la síntesis o el mantenimiento de estas clases específicas de fosfolípidos. Curiosamente, dentro de los fosfolípidos, los niveles de PGs aumentan, mostrando una tendencia opuesta al resto. Este incremento apunta a un posible desvío metabólico hacia la síntesis de PG, lo cual podría estar relacionado con funciones específicas que requieren esta clase de lípidos.

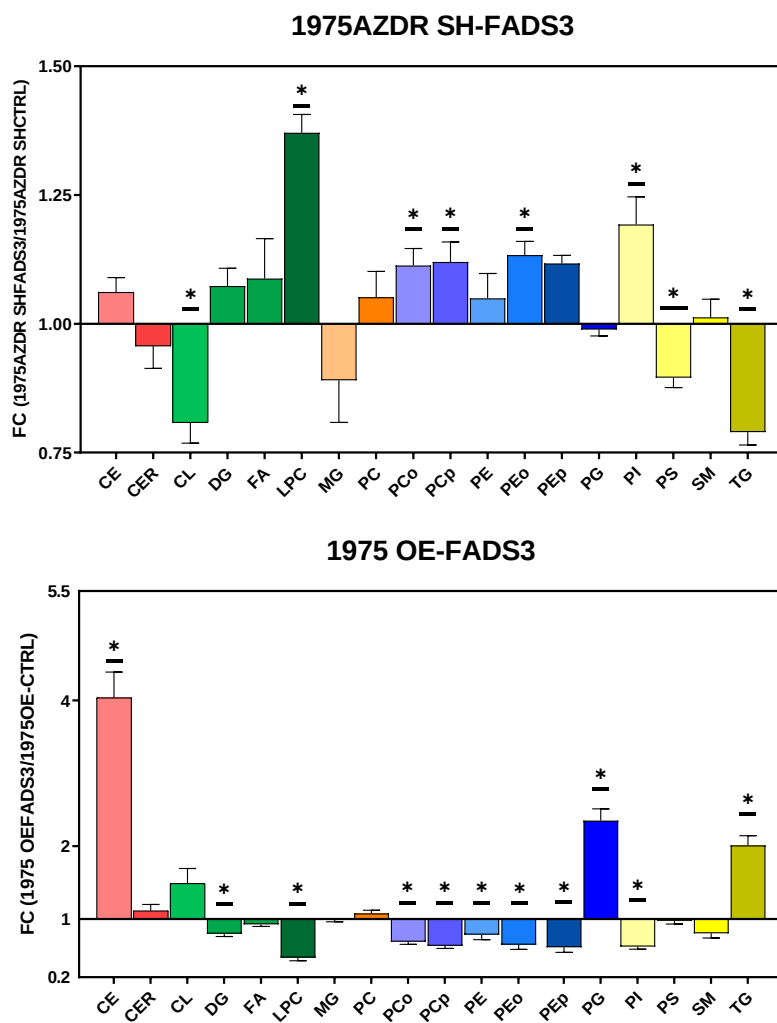


Figura 69. Cambios en la composición lipídica tras el silenciamiento/sobreexpresión de *FADS3*. En la parte superior, se presentan los cambios en la línea con silenciamiento de *FADS3* (1975 AZDR SH-FADS3) frente a la línea parental resistente (1975 AZDR SH-CTRL). En la parte inferior, se muestran los cambios en la línea con sobreexpresión de *FADS3* (1975 OE-FADS3) en comparación con la línea parental sensible (1975 OE-CTRL). Los valores representan el cambio en la concentración (FC) para cada clase de lípidos calculada como la suma de todas las especies detectadas dentro de cada clase lipídica ($p < 0.05^*$).

De forma general se observa una tendencia en el patrón lipidómico de la sobreexpresión que en el caso del silenciamiento sigue una dirección opuesta. Además, la tendencia observada guarda relación con los cambios observados en los modelos resistentes que han activado la EMT. Estos resultados sugieren que la modulación de *FADS3* induce cambios en el perfil lipidómico que se asocian con la activación de la EMT. En este sentido, las alteraciones en la composición lipídica observadas tras la sobreexpresión de *FADS3* reflejan características de las células resistentes que han adquirido un fenotipo mesenquimal y que se revierten en el caso del silenciamiento donde se adquiere un fenotipo más epitelial, reforzando la conexión entre la reprogramación lipidómica y la EMT en los modelos resistentes. Más allá de estos cambios a nivel de clases, puesto que *FADS3* está involucrado en la producción de bases esfingoides d18:2, que son componentes esenciales de Cer(d18:2) y SM(d18:2), analizar estas especies de lípidos

específicamente resulta de gran interés puesto que proporciona información directa sobre la actividad funcional de *FADS3*. Para ello, se agruparon todas las diferentes especies detectadas que comparten la característica común de tener una base esfingoide d18:2 tanto en el caso de las Cers como en el caso de las SM. Los resultados se muestran en la **Figura 70**. Como hemos visto, la línea 1975 AZDR tiene una sobreexpresión natural de *FADS3* en comparación con la línea parental 1975. En el caso de las **Cer (d18:2/X) se observa un aumento en la línea resistente** en comparación con la línea parental (FC=1,98), posible indicativo de que **la sobreexpresión de *FADS3* favorece la producción** de estas Cer en 1975 AZDR. También se observa un aumento significativo de las SM d18:2 (FC=2,28) sugiriendo que el exceso de Cer está siendo convertido activamente a SMs en estas líneas. En la línea **1975 AZDR SH-*FADS3***, resultado de silenciar el gen en la línea resistente 1975 AZDR, se observa una ligera **disminución de las especies de Cer (d18:2/X)** (FC= 0,78) y los niveles de las SM (d18:2/X) se mantienen prácticamente invariables (FC=0,90). Este último efecto podría explicarse por la inhibición incompleta de *FADS3*, lo que permite que una parte del gen siga activo y continúe contribuyendo a la síntesis de estos lípidos, aunque en menor medida. En el caso de la línea 1975 OE-*FADS3*, la cual presenta la sobreexpresión inducida del gen, se aprecia el mismo efecto que en la línea 1975 AZDR tal y como cabría esperar. Se produce un aumento de Cer d18:2 (FC= 1,74) acompañado de un incremento en las SM d18:2 (FC=2,47), destacando el papel de *FADS3* en la síntesis tanto de Cer como de SM en estas líneas.

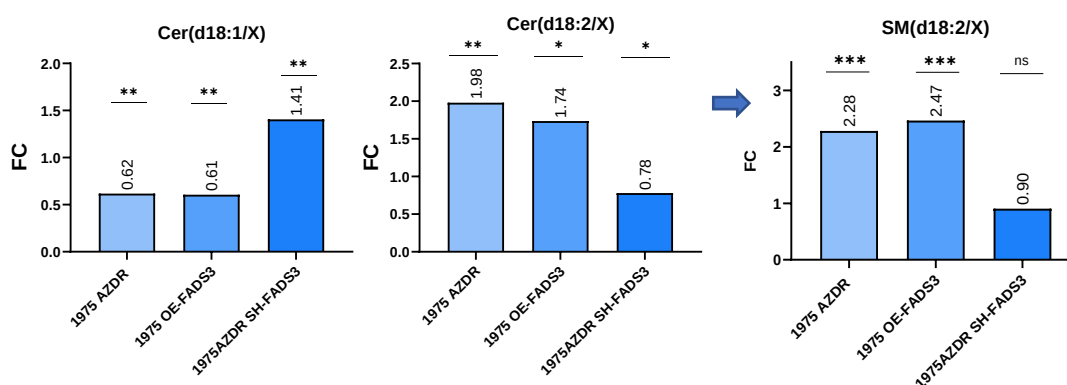


Figura 70. Cambios en los niveles relativos de ceramidas (Cer) y esfingomielinas (SM) con bases esfingoides d18:2 en diferentes líneas celulares. Los valores representan la suma total de todas las especies detectadas de Cer con (d18:1) y Cer/SM con d18:2 referenciadas al total de lípidos. La primera columna muestra el FC entre ambos controles 1975 AZDR SH-CTRL vs 1975 OE-CTRL, la segunda columna compara la línea 1975 OE-*FADS3* vs 1975 OE-CTRL, y la tercera columna muestra el FC entre la línea 1975 AZDR SH-*FADS3* vs 1975 AZDR SH-CTRL ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$).

Puesto que la sobreexpresión de *FADS3* en la línea celular 1975 resultó en un aumento de Cer(d18:2/X), un metabolito que se presume es producto directo de la actividad enzimática de *FADS3*, se analizaron los niveles relativos en todas las líneas celulares resistentes a osimertinib en comparación con las sensibles. Los resultados se muestran en la **Figura 71**. Comparando entre líneas sensibles y resistentes a osimertinib, **la sobreexpresión de *FADS3* en las líneas resistentes genera un aumento en la proporción relativa de especies de Cer que contienen d18:2 en sus cadenas (Cer(d18:2/X))**. Este aumento viene acompañado de una disminución del precursor asociado (Cer(d18:1/X)) en dos de los tres modelos: 1975 AZDR y 4006 AZDR lo que indica que la actividad de *FADS3* está favoreciendo la conversión de Cer(d18:1) a Cer(d18:2),

consumiendo el precursor de manera más eficiente en estos modelos. Esta disminución sugiere que la tasa de conversión supera la tasa de producción o reposición de Cer(d18:1/X), lo que podría deberse a una regulación diferencial enzimática o a una alteración en las vías de síntesis y degradación de ceramidas. En la línea 827 AZDR, pese a que se observa el aumento en la proporción relativa de Cer(d18:2/X), los niveles relativos de Cer(d18:1/X) aumentan también a diferencia de los otros dos modelos. En este modelo hay un aumento global en la biosíntesis de ceramidas lo que podría explicar la acumulación simultánea del precursor y del producto de forma que en esta línea existe una mayor disponibilidad de precursores metabólicos o una activación compensatoria de rutas alternativas que aumentan la producción de Cer(d18:1/X). Esto podría explicar por qué, a pesar de que *FADS3* está sobreexpresado y convierte parte del Cer(d18:1) en Cer(d18:2), los niveles del precursor siguen siendo altos en 827 AZDR. Por último, en la línea 1975 AZDR, la Cer(d18:2/X) no solo se acumula, sino que además se convierte a SM(d18:2/X), mientras que en 4006 AZDR y 827 AZDR no se observa esta conversión. Es posible que en la línea 1975 AZDR, la maquinaria celular involucrada en la conversión de Cer a SM esté activa, facilitando la transformación de Cer(d18:2/X) en SM(d18:2/X). En contraste, en 4006 AZDR y 827 AZDR, la acumulación de Cer(d18:2) sin conversión a SM(d18:2) podría deberse a una menor actividad de esfingomielina sintasas (SMS) o a diferencias en la disponibilidad de otros precursores necesarios para la síntesis de esfingomielina. Esto sugiere que, aunque *FADS3* favorece la producción de Cer(d18:2/X) en todos los modelos, su destino metabólico varía según el contexto celular.

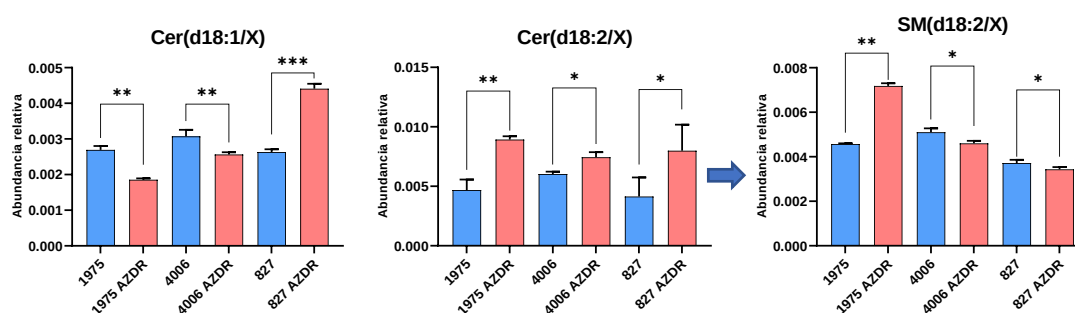


Figura 71. Abundancia relativa de la suma de Cer con d18:2 en sus cadenas (Cer(d18:2/X)) en las diferentes líneas celulares sensibles y resistentes. Las líneas sensibles (barras azules) se comparan con su correspondiente línea resistente (barras rojas) ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$).

5.4.8 Alteraciones de los ácidos grasos totales en relación a *FADS3*

Con el objetivo de investigar en profundidad cómo *FADS3* es capaz de modular e influir el metabolismo de lípidos y, concretamente, el de FAs dada su posible implicación en los mecanismos de insaturación, se analizaron los ácidos grasos totales y se realizó un experimento de FAMetA en las líneas 1975 OE-CTRL, 1975 OE-*FADS3*, 1975 AZDR SH-CTRL y 1975 AZDR. FAMetA se basa en el uso de ^{13}C -Glucosa para estimar la procedencia de los distintos FAs (importación, síntesis *de novo*, elongación...) mediante el análisis de los perfiles de distribución isotópologos. (Ver Materiales y métodos). Los resultados se muestran en la **Figura 72**.

En la **Figura 72 A** se analizan diferencias en la intensidad relativa de todos los FAs detectados entre la línea 1975 OE-*FADS3* vs 1975 OE-CTRL y 1975 AZDR SH-*FADS3* vs 1975 SH-

CTRL. Cuando se silencia *FADS3* (**1975 AZDR SH-FADS3**) de forma general **no se producen cambios muy marcados**. Sin embargo, es posible observar una **disminución de PUFAs de cadena larga** como el FA(24:4)_{nx}, FA(24:4)_{ny}, FA(24:5)_{nx}, FA(24:5)_{ny} y FA(24:6)_{nx} lo que puede indicar una menor síntesis o menor captación de FAs de cadena larga en la línea 1975 AZDR SH-FADS3. Por otro lado, en la línea con sobreexpresión de *FADS3* (**1975 OE-FADS3**) **se observa un aumento de PUFAs de cadena media**: FA(16:2)_{nx}, FA(16:2)_{ny}, FA(18:2)_{n6}, FA(18:2)_{nx}, FA(18:3)_{n3}, FA(18:3)_{n6} y FA(18:3)_{n9} **junto a alguno de cadena larga** como el FA(22:4)_{n6}, FA(24:4)_{nx} y el FA(24:4)_{ny}. A su vez, se produce una **disminución de algunos MUFAs** importantes como los FA(14:1), FA(16:1)_{n5-7}, FA(18:1)_{n7} y FA(18:1)_{n9} junto con SFAs de cadena corta. Estos resultados sugieren que el aumento en la expresión de *FADS3* en el modelo 1975 provoca una mayor conversión de FAs precursores a formas más insaturadas o una posible mayor captación exógena de las especies que tienden a aumentar. Llama la atención **dos FAs que siguen una tendencia contraria en la sobreexpresión y el silenciamiento** sugiriendo que la actividad de *FADS3* podría tener un papel clave en la regulación de estos FAs en este modelo. El **FA(24:4)_{nx}** y **FA(24:4)_{ny}** muestran un aumento notable en la sobreexpresión de *FADS3* (FC = 2,01 y 2,03, respectivamente), mientras que en el silenciamiento sus niveles disminuyen drásticamente (FC=0,20 y 0,17). Esto sugiere que *FADS3* participa directa o indirectamente en la insaturación o elongación de estos PUFAs de cadena larga y que su regulación puede ser determinante para su disponibilidad en la célula.

Por otro lado, en la **Figura 72 B** se presentan los resultados del análisis FAMetA. El primer parámetro de síntesis no pudo determinarse en gran parte de los FAs debido a limitaciones en el método. Para detectar una marca consistente en ciertos FAs, se requiere un porcentaje mínimo de reemplazo, lo que sugiere la necesidad de mayores tiempos de incubación o el uso de otros trazadores, como la glutamina, que también contribuye a la síntesis de FAs. Por otro lado, los FAs de las familias n-3 y n-6 no presentan parámetros de síntesis, ya que la única forma en que las células pueden obtenerlos es a través de su captación desde el medio extracelular. De forma general, los resultados de FAMetA, muestran que en la condición de **silenciamiento de *FADS3*** se produce un aumento en la síntesis *de novo* y en los FAs que requieren uno o dos pasos de elongación (E1 y E2) ya que los parámetros correspondientes aumentan. No obstante, en E3 ocurre lo contrario: se observa una disminución generalizada de este parámetro. Esto sugiere que **la célula está sintetizando FAs activamente** y podría estar obteniendo estos FAs que resultarían de 3 pasos de elongación con mayor eficiencia del medio extracelular o que, al no necesitarlos en la misma medida, no requiere elongar los precursores previamente sintetizados. Esto sugiere que sin *FADS3*, las células sintetizan más FAs internamente en lugar de captarlos del medio, lo que indica un papel clave de esta enzima en la regulación de la captación y el metabolismo de FAs. Por el contrario, en la **sobreexpresión de *FADS3*** se observa un efecto opuesto: se **reduce la síntesis de FAs** en general, como se evidencia en la **disminución de los parámetros de síntesis *de novo* (S) y de las primeras elongaciones (E1 y E2)**. Esto sugiere que, los FAs que normalmente se producirían por síntesis *de novo* y aquellos que resultarían de uno o dos pasos de elongación, se están produciendo en menor cantidad internamente y podrían estar siendo captados del medio extracelular, lo que hace innecesarios estos procesos y explica la reducción observada en los parámetros. De esta forma, **la sobreexpresión de *FADS3* induce un fenotipo dependiente de la captación extracelular de FAs** y reduce la síntesis a partir de Glc. Por otro lado, se observa un aumento en la elongación 3 (E3) en la sobreexpresión de *FADS3*, lo que sugiere que la célula necesita los FAs que normalmente se obtienen tras un tercer paso de elongación, pero, dado que no está sintetizando los precursores en las etapas previas, utiliza los FAs captados como sustrato y los elonga hacia formas más largas tal y como refleja el

aumento en E3. Dicho de otro modo, ante la falta de FAs sintetizados internamente, las células captan precursores del medio y los procesan hasta formas más largas obligando a las células a completar la biosíntesis internamente a partir de lo que captan.

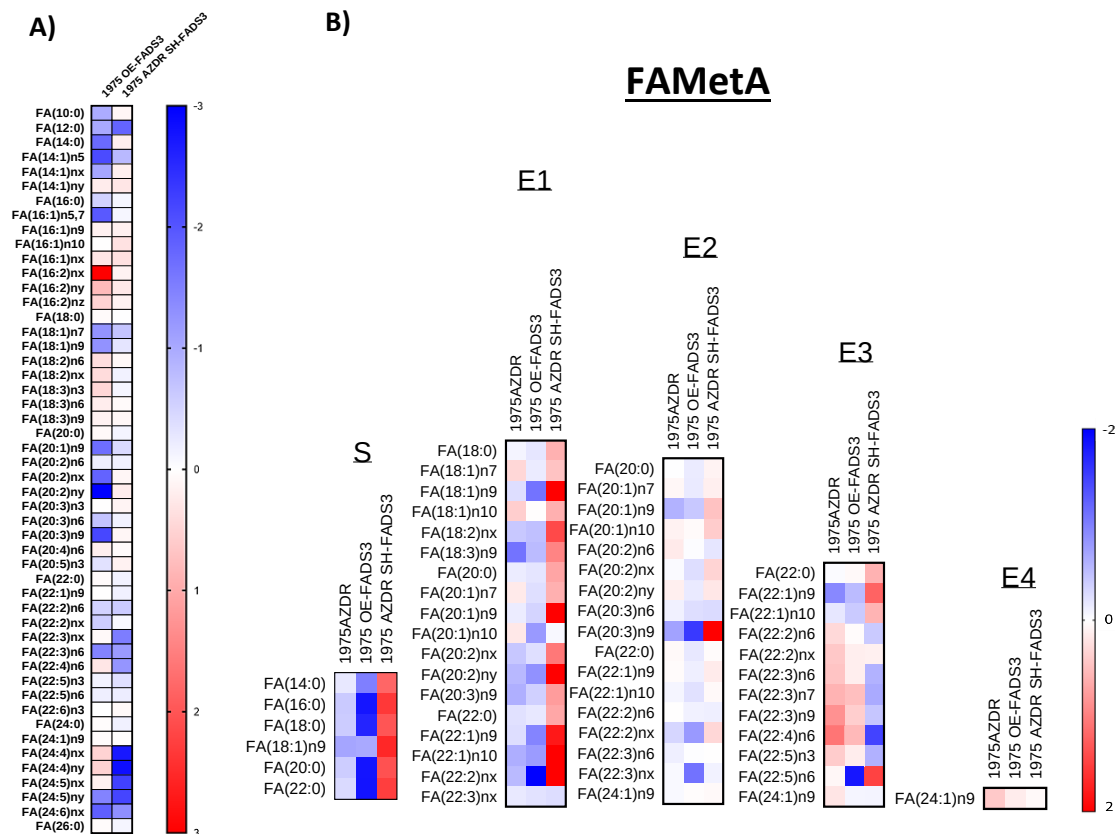


Figura 72. Representación gráfica en forma de Heat Map del análisis de FAs totales sin marcaje y tras la incubación con ¹³C-Glc (FAMetA) en las diferentes líneas celulares. A) Se representan los valores de log₂FC entre las líneas 1975 OE-FADS3 vs 1975 OE-CTRL y las líneas 1975 AZDR SH-FADS3 vs 1975 AZDR SH-CTRL para la intensidad relativa de todos los FAs detectados. **B)** Experimento FAMetA donde se representan los valores de log₂FC para los diferentes parámetros en el siguiente orden: parámetro de síntesis (S), Elongación 1 (E1), Elongación 2 (E2), Elongación 3 (E3) y Elongación 4 (E4). La columna 1 compara la línea resistente (1975 AZDR vs 1975), la columna 2 compara la línea con sobreexpresión de *FADS3* con la línea parental sensible control (1975 OE-FADS3 vs 1975 OE-CTRL), y la columna 3 compara la línea con silenciamiento de *FADS3* con la línea parental resistente control (1975 AZDR SH-FADS3 vs 1975 AZDR SH-CTRL). Los tonos azules representan una disminución y los tonos rojos una elevación en comparación con los controles correspondientes.

De esta forma, *FADS3* podría regular la captación de FAs, promoviendo la utilización de fuentes externas en lugar de la síntesis *de novo*. Cuando *FADS3* está sobreexpresado, las células captan más FAs en lugar de sintetizarlos, mientras que su silenciamiento favorece la producción interna lo que **concuera con la tendencia observada en los análisis de expresión génica**.

5.4.9 Vías de señalización relacionadas con la modulación de FADS3

Una de las principales diferencias entre las líneas celulares sensibles y resistentes radica en la alteración de las rutas de señalización que dependen de EGFR tanto en condiciones fisiológicas como en respuesta a los ITQs. Estas rutas como las vías PI3K/mTOR/S6K/S6 y RAS/MEK/ERK entre otras, son cruciales para la proliferación y supervivencia celular, y, por lo tanto, para el crecimiento del tumor. En las líneas celulares sensibles, que dependen de la actividad elevada de la forma mutada de *EGFR*, la unión del inhibidor al dominio tirosina quinasa interrumpe la señalización a través de EGFR, deteniendo la progresión tumoral. Por el contrario, en las líneas celulares resistentes, estas rutas de señalización permanecen activas incluso cuando se administran los ITQs. Por ello, nos propusimos determinar las posibles diferencias en el grado de activación de las rutas de señalización relacionadas con EGFR en función de los niveles de FADS3 en las líneas derivadas del modelo 1975 mediante WB. Para ello, las líneas celulares se sembraron en placas Petri de 6 cm a razón de 500.000 células y tras 24h se cambió el medio por medio fresco con el vehículo (-) o con 500 nM de osimertinib (+). Tras 30 min de incubación se lisaron para la obtención de los extractos proteicos, que fueron analizados mediante WB utilizando anticuerpos específicos. Los resultados pueden verse en la **Figura 73**.

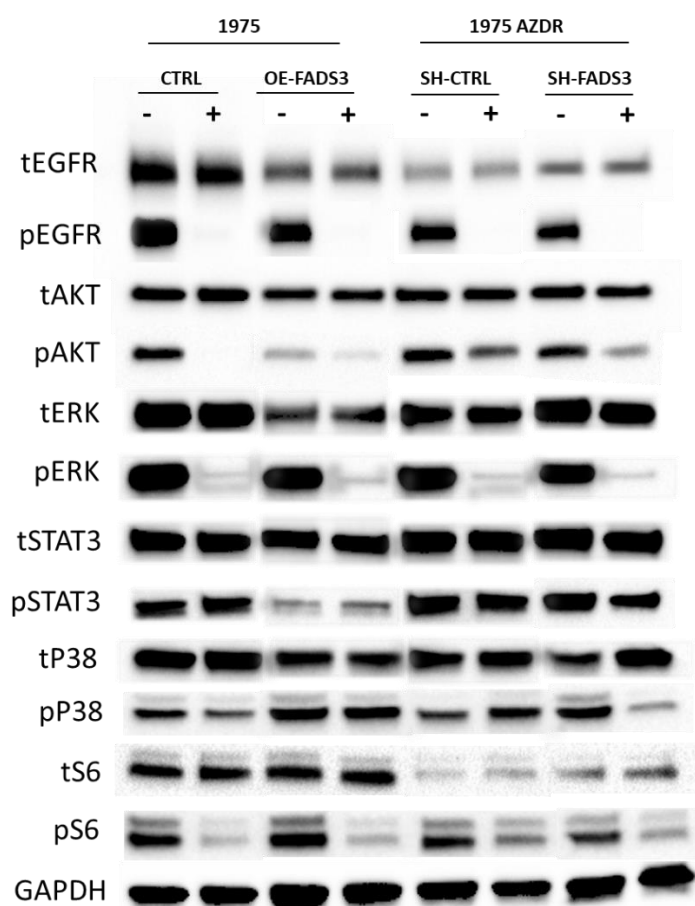


Figura 73. Niveles de EGFR, AKT, ERK, STAT3, P38 y S6, así como su grado de fosforilación en los modelos derivados de 1975 en condiciones control (-) y en respuesta a osimertinib (+) ("p", contra las formas fosforiladas, "t", contra la forma total). Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

En cuanto a EGFR, los niveles totales (tEGFR) disminuyen en la línea resistente a osimertinib 1975 AZDR en comparación con la 1975 sensible independientemente del tratamiento. Al sobreexpresar *FADS3* en la línea sensible, los niveles de tEGFR disminuyen siguiendo la misma tendencia que en la línea resistente pese a que no se alcanzan los mismos niveles de represión. Por otro lado, el silenciamiento de *FADS3* en la línea resistente tiene el efecto contrario y como cabría esperar aumenta los niveles de tEGFR, pese a que dicho aumento no llega a los niveles de la 1975. Los niveles de fosforilación de EGFR son menores en la línea resistente que en la sensible y desaparecen con el tratamiento completamente en todas las líneas. En ausencia de tratamiento, cuando se sobreexpresa *FADS3* se reduce la intensidad de la banda similar a lo que ocurre con el modelo 1975 AZDR. El silenciamiento no produce ningún cambio significativo en los niveles de pEGFR en comparación con la línea control. En el caso de tERK y pERK sucede exactamente lo mismo que en el caso de tEGFR y pEGFR, respectivamente. Cabe destacar que para ERK deberían verse dos bandas diferenciadas una correspondiente a ERK1 y otra a ERK2. Sin embargo, los geles utilizados en el laboratorio no permiten separar ERK1 de ERK2, ya que ambos presentan pesos moleculares muy similares (~44 kDa para ERK1 y ~42 kDa para ERK2). Sería necesario optimizar los geles para mejorar la separación de proteínas de pesos moleculares cercanos.

Los niveles de fosforilación de AKT, marcador de actividad de la ruta PI3K/mTOR/S6K/S6, se mantienen relativamente elevados en respuesta a osimertinib en la línea resistente 1975 AZDR mientras que disminuyen significativamente en la línea 1975 sensible como cabría esperar. Al introducir el gen en la línea 1975 (1975 OE-*FADS3*) se observa como la banda correspondiente a pAKT en ausencia de tratamiento disminuye y, tras el tratamiento con osimertinib, la banda correspondiente a pAKT se reduce, pero todavía es visible y se mantiene en mayor medida en comparación con la línea parental 1975, siguiendo la tendencia de la línea resistente. Por otro lado, en la línea 1975 AZDR SH-*FADS3*, el silenciamiento de *FADS3* hace que la banda correspondiente a pAKT en presencia de osimertinib disminuya en mayor medida en comparación con la línea parental resistente. No hay diferencias en cuanto a AKT total (tAKT). Con respecto a STAT3, tanto los niveles totales (tSTAT3) como los niveles de la forma fosforilada (pSTAT3) se mantienen invariables en todas las condiciones excepto en el caso de la línea con sobreexpresión de *FADS3* donde se observa una disminución en la intensidad de la banda. Esto podría implicar una posible regulación negativa de la señalización dependiente de STAT3 por parte de *FADS3*. En el silenciamiento no se produce un aumento de la intensidad de la banda como podría esperarse.

Los resultados obtenidos sugieren que **FADS3** es capaz de influir en la actividad de vías relacionadas con **EGFR**, influyendo en procesos clave de señalización celular. Algunos de estos cambios coinciden con el fenotipo observado en el modelo de resistencia, reafirmando que **FADS3** está contribuyendo a la adquisición de características EMT relacionadas con la resistencia a ITQs por diferentes mecanismos.

5.4.10 FADS3, EMT y cáncer

Pese a que *FADS3* es un gen relativamente poco conocido y hasta hace poco su función no había sido claramente identificada, se han descrito conexiones entre *FADS3* y diversas características asociadas a la progresión y el desarrollo tumoral. Se ha demostrado que *FADS3* es un gen diana para los factores de transcripción NF- κ B, MYCN o p63 y, en consecuencia, podría estar implicado en los mecanismos de supervivencia celular³⁸⁹. Según datos del Protein Atlas, *FADS3* sería un factor predictivo de mal pronóstico en cáncer renal y en carcinoma escamoso de

cabeza y cuello (HNSCC) tal y como puede observarse en las curvas de supervivencia Kaplan-Meier en la **Figura 74**. En HNSCC, la expresión de *FADS3* actúa como un factor predictivo en el pronóstico de la enfermedad y su sobreexpresión se asocia con la progresión del HNSCC, un peor pronóstico y mayores niveles de metástasis a los ganglios linfáticos, invasión linfocelular y estadio histológico avanzado³⁹⁵. En este sentido, la actividad de *FADS3* es capaz de influir en las capacidades de migración e invasión de las células tumorales en HNSCC. Además, *FADS3* parece influir en el microambiente inmunitario del HNSCC, promoviendo la infiltración de células inmunes como células NK, eosinófilos, células citotóxicas y Tgd además de reducir la cantidad de linfocitos B³⁹⁵.

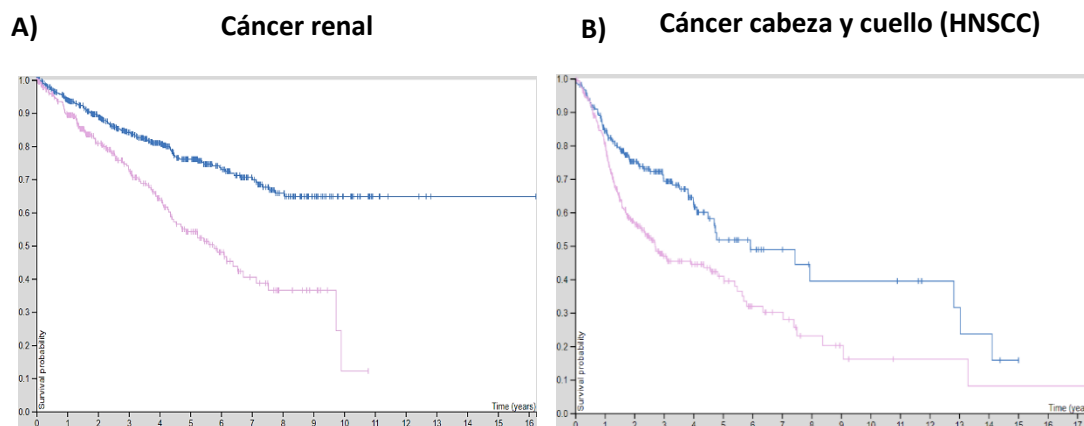


Figura 74. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier relacionando la expresión de *FADS3* con la probabilidad de supervivencia en pacientes con cáncer renal y HNSCC. La línea azul indica baja expresión mientras que la línea rosa muestra alta expresión A) Pacientes con cáncer renal que muestran una mayor expresión de *FADS3* presentan peores valores de supervivencia que aquellos con una menor expresión del gen. B) Pacientes con HNSCC que muestran una mayor expresión de *FADS3* presentan peores valores de supervivencia que aquellos con una menor expresión del gen.

En un estudio de CTCs en cáncer de mama, *FADS3* aparece sobreexpresado y se relaciona con un aumento en la fluidez de la membrana y en la motilidad, así como una mayor capacidad de diseminación hematológica y capacidad de colonización pulmonar, confirmando el papel de *FADS3* durante la fase final de la cascada metastásica³⁹⁷. En otro estudio en cáncer de mama, la expresión de *FADS3* muestra correlaciones con subtipos clínicos de cáncer de mama, estadios clínicos y estado de metástasis en ganglios linfáticos. Además, se observa una correlación negativa significativa entre los niveles de expresión de *FADS3* y la metilación del ADN en este tipo de cáncer³⁴⁴. En un estudio en pacientes con AC de pulmón, la expresión de *FADS3* se relacionó significativamente con la infiltración de células B inmunes y el pronóstico³⁹⁸.

Para explorar el papel de *FADS3* en el contexto de la EMT y tratar de comprender mejor su función biológica en CPNM, se estudió su posible correlación con marcadores canónicos de la EMT en bases de datos disponibles públicamente. Para ello, se extrajeron los datos de la CCLE y se calculó un coeficiente de correlación de Pearson entre la expresión de *FADS3* y genes epiteliales/mesenquimales, así como un p-valor ajustado en todas las líneas disponibles de CPNM (**Figura 75**). Como puede verse en la **Figura 75**, a pesar de existir una elevada heterogeneidad en la expresión de los diferentes genes en las líneas de AC, existe una correlación: a) positiva entre la expresión de *FADS3* y la expresión de marcadores mesenquimales como *VIM* y *ZEB1/2*; b) negativa con genes epiteliales como *GRHL2*, *CDH1* y

[illegible]

En resumen, el análisis de RNA-Seq reveló la sobreexpresión de **FADS3** en modelos celulares de CPNM resistentes a **osimertinib** por activación de la **EMT**, lo que se confirmó posteriormente mediante **RT-qPCR y Western blot**. Su expresión aumentó tras la **exposición aguda a osimertinib** en los modelos sensibles, sugiriendo un papel en la adaptación inicial al fármaco. Además, su sobreexpresión tras el tratamiento con **TGF- β** indica que su regulación está influenciada por el tratamiento con TGF- β y el proceso de EMT. La sobreexpresión inducida de **FADS3** en la línea celular **sensible 1975** promovió un **fenotipo mesenquimal**, acompañado de cambios en la morfología celular, una **mayor capacidad migratoria** y un aumento en la **resistencia a osimertinib**, tanto a corto como a largo plazo. Este cambio se asoció con la **sobreexpresión de marcadores de EMT y pluripotencia**, reforzando su papel en la plasticidad celular. A nivel metabólico, la sobreexpresión de **FADS3** alteró la expresión de **genes implicados en el metabolismo lipídico** y modificó el **perfil lipídico general**. Se observó un aumento en los productos de su reacción (**Cer(d18:2/x)**) y sus metabolitos asociados (**SM(d18:2/x)**), así como una reducción en la **síntesis de FAs** y una **posible mayor capacidad de captación del medio extracelular**. Además, su sobreexpresión determinó **cambios en vías de señalización relacionadas con EGFR**, lo que sugiere una interacción con mecanismos clave en la resistencia a ITQs de EGFR. Por el contrario, el **silenciamiento parcial de FADS3 en la línea 1975 AZDR** revirtió estos efectos, confirmando su **papel clave en la resistencia a osimertinib y en la transición EMT**. Estos hallazgos subrayan la relevancia de **FADS3** como posible diana terapéutica y refuerzan la importancia del metabolismo lipídico en la plasticidad tumoral y la resistencia a fármacos.

6. Análisis lipidómico de sueros de pacientes con CPNM-EGFR mutante

Como se ha comentado en apartados anteriores, existe la necesidad médica no resuelta de encontrar biomarcadores capaces de anticipar la respuesta al tratamiento con ITQs de pacientes con CPNM con mutaciones en *EGFR*. Habiendo comprobado que a nivel tumoral existe una reprogramación lipidómica importante, al menos en el proceso de adquisición de resistencia a ITQs mediante la transformación EMT y disponiendo de la tecnología para un análisis lipidómico completo, quisimos comprobar, por un lado, si estos cambios a nivel tumoral tenían un reflejo en sangre de pacientes y por otro, si el análisis lipidómico no dirigido de biopsias líquidas nos permitiría encontrar una firma lipidómica de respuesta al tratamiento con ITQs. Para ello se llevó a cabo un estudio lipidómico de una colección de sueros (n=65) disponible en la Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precision para los que también disponíamos de información clínica relevante incluyendo edad, sexo, fumador, estadio tumoral, tipo de mutación en *EGFR*, tratamiento recibido y distintas variables de valor clínico (**Tabla 14**).

Tabla 14. Información demográfica y clínica de la cohorte de estudio

Características	65	T790M (N=29)	T790M WT (N=36)
Edad, años			
Media		69	65
Rango		44-91	33-90
Sexo (no., %)			
Hombre	20 (30)	7 (23)	13 (36)
Mujer	45 (70)	22 (77)	23 (64)
Estadio (no., %)			
III	14 (22)	3 (10)	11 (31)
IV	51 (78)	25 (90)	26 (69)
Fumador (no., %)			
Nunca	36 (57)	16 (57)	20 (56)
Fumador o exfumador	29 (43)	13 (43)	16 (44)
Estado EGFR (no., %)			
L858R	22 (33)	7 (23)	15 (41)
Exon-19-del	39 (61)	20 (70)	19 (54)
L861Q	2 (3)	0 (0)	2 (5)
G719X	2 (3)	2 (7)	0 (0)
Tratamiento EGFR-ITQs (no., %)			
Gefitinib	22 (35)	13 (47)	9 (26)
Erlotinib	29 (45)	12 (43)	17 (46)
Afatinib	6 (9)	3 (10)	3 (7)
Osimertinib	7 (10)	0 (0)	7 (18)
Gefitinib+Osimertinib	1 (1)	0 (0)	1 (3)
Respuesta EGFR-ITQs (no., %)			
Respuesta completa	1 (1)	0 (0)	1 (3)
Respuesta parcial	46 (70)	21 (73)	25 (69)
Enfermedad estable	12 (19)	6 (23)	6 (15)
Progresión enfermedad	6 (10)	1 (4)	5 (13)

En un primer paso, quisimos comprobar si los niveles de los metabolitos asociados a la función de *FADS3*, es decir las Cer(d18:2/X), se asociaban o no con los valores de supervivencia libre de progresión (PFS), la supervivencia global (OS) encontrados en esta cohorte. Como se ha comentado en apartados anteriores estas Cer(d18:2/X) son reflejo de una mayor actividad de *FADS3*, que a su vez está asociada con la resistencia a los ITQs en los modelos celulares estudiados, por lo que era importante comprobar si este proceso de sobreexpresión de *FADS3*, durante la adquisición de resistencia, tenía un reflejo en sangre periférica de pacientes. Sin embargo, ninguna de las especies detectadas presentó una asociación estadística significativa (Mantel-Cox $p < 0.05$) con las variables de interés (i.e., PFS y OS). Esto hecho puede deberse a la probable baja representación de pacientes con este fenotipo EMT en la cohorte de estudio, recordemos que este mecanismo se produce en un porcentaje muy bajo de pacientes y la cohorte de estudio es limitada.

En una segunda etapa evaluamos la asociación entre los perfiles lipidómicos obtenidos a partir de las muestras séricas basales y los desenlaces clínicos de los pacientes, para ello, se llevó a cabo un análisis de regresión de Cox, considerando los valores de PFS y OS. La regresión de Cox es un modelo estadístico utilizado en análisis de supervivencia para evaluar la relación entre una o más variables predictoras y el tiempo hasta la ocurrencia de un evento de interés, como la progresión de la enfermedad o la muerte. En este análisis, la regresión de Cox permite estimar el impacto de los perfiles lipidómicos en la PFS y la OS, proporcionando información clave sobre su relación con los desenlaces clínicos. Tras realizar del análisis por regresión de Cox, se obtiene un “Hazard Ratio” (HR) para cada lípido, que indica el riesgo relativo asociado al desenlace clínico (HR > 1 aumenta el riesgo, HR < 1 lo reduce, HR = 1 indica ausencia de asociación). Además, se reporta el intervalo de confianza (IC 95%), que muestra la precisión del HR, y el p-valor, que indica si la asociación es estadísticamente significativa. Una vez obtenidos estos valores para cada lípido identificado, se aplicó una corrección de los mismos por FDR utilizando el método de Benjamini-Hochberg, con el objetivo de controlar el porcentaje de falsos positivos y garantizar la robustez estadística de los hallazgos.

En primer lugar, se presentan los resultados del análisis de **regresión de Cox para la PFS**. La **Tabla 15** recoge los treinta lípidos más significativos (FDR $< 0,05$) que han mostrado una mayor asociación estadística con la PFS y por tanto con el riesgo de progresión de la enfermedad.

Tabla 15. Lista de los 30 lípidos con asociación estadísticamente significativa con la PFS. Se presentan el hazard ratio (HR) con su intervalo de confianza al 95% (IC-Lower – IC-Upper) y el p-valor ajustado por corrección de FDR (Benjamini-Hochberg).

Variable	HR	IC_Lower	IC_Upper	FDR
LPC(18:1)	0,841	0,772	0,916	1,25E-03
SM(d36:0)	1,638	1,297	2,069	1,28E-03
LPE(20:1)	0,433	0,281	0,666	1,31E-03
Cer(d18:0/18:0)	1,228	1,107	1,362	1,34E-03
LPC(14:0)	0,907	0,857	0,960	2,09E-03
LPC(18:3)	0,730	0,616	0,865	2,13E-03
LPI(18:1)	0,553	0,392	0,782	2,24E-03
PC(36:5)	0,779	0,674	0,901	2,40E-03
PC(38:6)	0,294	0,145	0,598	2,46E-03
FA(22:2)	1,495	1,187	1,884	2,68E-03
PCo(18:0)	0,322	0,168	0,616	2,85E-03
LPC(20:3)	0,869	0,803	0,940	3,02E-03
Cer(d18:0/24:1)	1,186	1,076	1,307	3,08E-03
PC(36:6)	0,773	0,659	0,907	3,66E-03
PC(36:2)	0,577	0,409	0,814	3,73E-03
LPE(18:3)	0,839	0,751	0,937	3,76E-03
PI(18:1/18:1)	0,631	0,466	0,855	3,76E-03
PCo(26:1)	0,509	0,333	0,779	3,81E-03
LPE(18:1)	0,728	0,590	0,897	3,87E-03
LPC(16:1)	0,834	0,743	0,936	3,91E-03
LPC(24:1)	0,546	0,367	0,811	3,91E-03
FA(18:2)	1,578	1,165	2,137	3,97E-03
LPE(20:3)	0,750	0,619	0,909	3,97E-03
FA(20:2)	1,381	1,119	1,705	3,98E-03
PC(38:7)	0,748	0,618	0,906	3,99E-03
PEp(18:1/22:6)	0,774	0,657	0,913	4,08E-03
FA(20:1)	1,465	1,143	1,877	4,11E-03
PC(42:1)	0,617	0,451	0,844	4,22E-03
LPE(20:5)	0,879	0,805	0,961	4,61E-03
PEo(18:2/18:2)	0,696	0,542	0,893	4,82E-03

De entre todos los lípidos con correlación significativa con la PFS obtenidos mediante regresión de Cox (**Tabla 15**), se seleccionaron los cinco más significativos asociados con menor riesgo de progresión (HR < 1, verde) y los cinco más significativos asociados con mayor riesgo de progresión (HR > 1, rojo) para un análisis utilizando curvas Kaplan-Meier, análisis que permite establecer puntos de corte (i.e., mediana, media, cuartiles...) mas fácilmente adaptables a la rutina clínica. Los resultados de los cinco lípidos asociados con menor riesgo de progresión se muestran en la **Figura 76**. En el grupo “high”, como era de esperar, la separación de las curvas muestra valores de PFS más elevados que en el grupo “low” y los valores de HR están por debajo de 1 en todos los casos por lo que **niveles altos de los lípidos seleccionados se asocian**

significativamente con un riesgo reducido de progresión de la enfermedad y, por tanto, podrían tener un papel protector frente a la progresión tumoral.

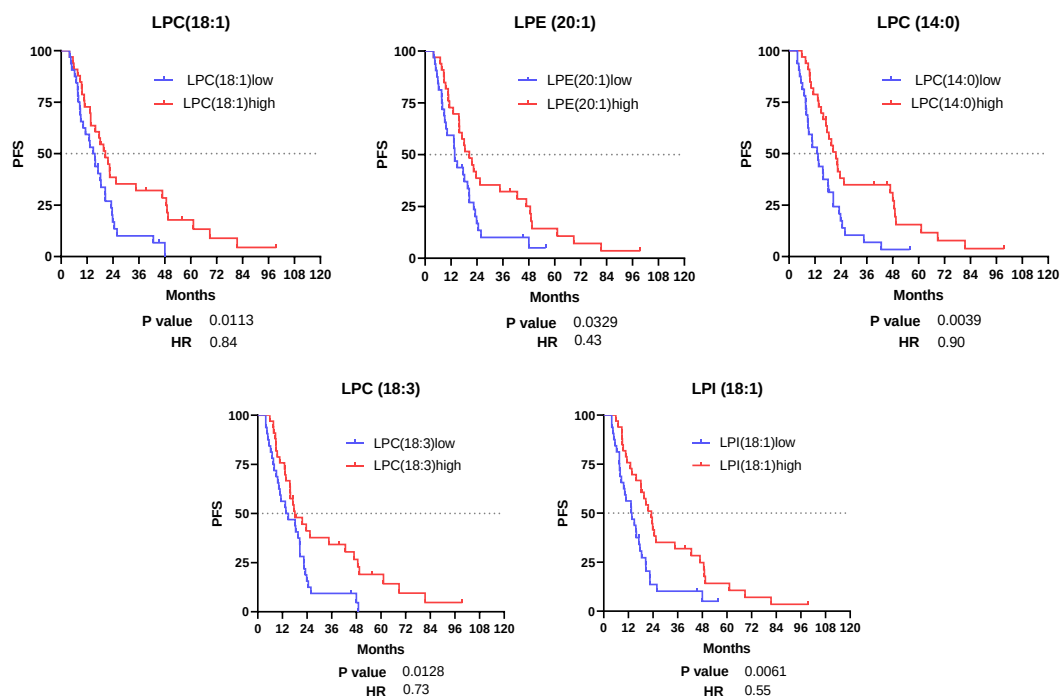


Figura 76. Curvas de Kaplan-Meier que representan la supervivencia libre de progresión (PFS) en función de los niveles basales de los cinco lípidos con mayor correlación positiva con la PFS. Cada curva está dividida en dos grupos según niveles altos "high"(rojo) y bajos "low"(azul). Debajo de cada curva se presenta el p-value (Mantel-Cox) y el HR obtenido en la Regresión de Cox.

Por otro lado, en la **Figura 77**, se muestran los cinco lípidos más significativamente asociados a un mayor riesgo de progresión. Como era de esperar, el grupo "low" presenta niveles más elevados de PFS en comparación con el grupo "high" y los valores de HR > 1 implican que los **niveles altos** de estos lípidos **aumentan el riesgo de progresión de la enfermedad**. De esta forma, los cinco lípidos seleccionados tienen un impacto negativo en la PFS y, por tanto, serían indicativos de mal desenlace clínico en este tipo de pacientes.

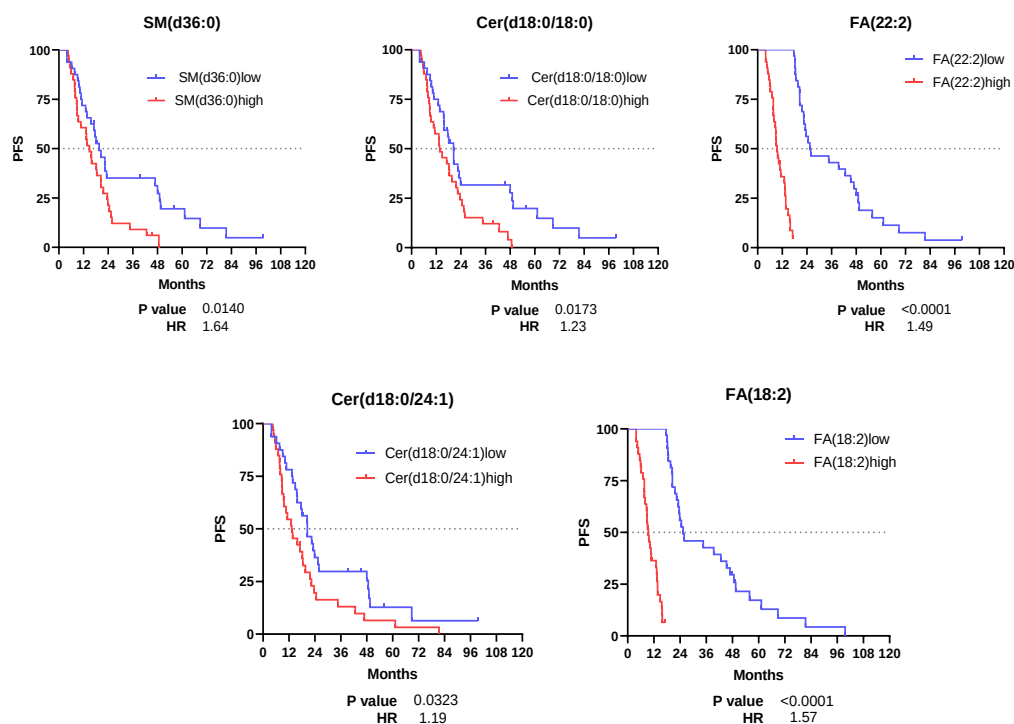


Figura 77. Curvas de Kaplan-Meier que representan la supervivencia libre de progresión (PFS) en función de los niveles basales de los cinco lípidos con mayor correlación negativa con la PFS. Cada curva está dividida en dos grupos según niveles altos "high" (rojo) y bajos "low" (azul). Debajo de cada curva se presenta el p-value (Mantel-Cox) y el HR obtenido en la Regresión de Cox.

A continuación, se presentan los resultados del **análisis de regresión de Cox para la OS** y el riesgo relativo de muerte. La **Tabla 16** recoge los 61 lípidos significativos (FDR < 0,05) que han mostrado una mayor asociación estadística con la OS y el riesgo de muerte.

Tabla 16. Lista de los 61 lípidos con asociación estadísticamente significativa con la OS según el análisis de regresión de Cox. Se presentan el hazard ratio (HR) con su intervalo de confianza al 95% (IC-Lower – IC-Upper) y el p-valor ajustado por corrección de FDR (Benjamini-Hochberg).

Variable	HR	IC_Lower	IC_Upper	p-adj (FDR)
FA(22:2)	1,613	1,267	2,053	4,98E-03
FA(18:2)	1,825	1,322	2,520	6,14E-03
PC(38:6)	0,203	0,088	0,469	6,14E-03
FA(20:2)	1,597	1,268	2,012	6,71E-03
FA(20:1)	1,632	1,247	2,136	7,06E-03
LPC(18:1)	0,850	0,772	0,936	1,16E-02
LPE(20:1)	0,434	0,263	0,717	1,22E-02
LPI(18:1)	0,523	0,351	0,780	1,45E-02
LPC(18:3)	0,771	0,645	0,923	1,87E-02
PI(18:0/18:1)	0,612	0,437	0,857	1,89E-02
PC(40:1)	0,551	0,362	0,838	1,90E-02
PS(40:3)	0,711	0,559	0,905	1,95E-02
PC(36:2)	0,592	0,407	0,861	1,96E-02
Cer(d18:0/24:1)	1,178	1,053	1,318	1,97E-02
FA(18:0)	2,272	1,342	3,847	1,99E-02
SM(d36:0)	1,464	1,127	1,902	2,06E-02
LPE(24:0)	0,777	0,654	0,923	2,12E-02
PC(36:5)	0,807	0,697	0,934	2,19E-02
LPC(20:0)	0,534	0,349	0,816	2,25E-02
LPC(18:2)	0,892	0,825	0,964	2,28E-02
FA(22:3)	1,159	1,051	1,278	2,29E-02
LPC(14:0)	0,919	0,864	0,978	2,35E-02
PC(18:1/18:2)	0,651	0,475	0,893	2,35E-02
FA(16:1)	1,355	1,104	1,663	2,39E-02
PI(18:1/18:1)	0,599	0,427	0,841	2,47E-02
FA(18:1)	1,054	1,017	1,092	2,47E-02
LPC(24:1)	0,551	0,353	0,860	2,54E-02
TG(18:0/20:2/18:0)	0,829	0,719	0,955	2,57E-02
PC(38:7)	0,775	0,639	0,939	2,59E-02
FA(22:5)	1,244	1,053	1,469	2,64E-02
Cer(d18:0/18:0)	1,169	1,036	1,319	2,83E-02
LPC(20:3)	0,899	0,827	0,977	2,95E-02
FA(14:0)	1,228	1,044	1,445	3,01E-02
LPC(24:0)	0,463	0,253	0,847	3,02E-02
LPC(22:0)	0,616	0,417	0,910	3,34E-02
LPE(18:1)	0,739	0,578	0,944	3,38E-02
PC(18:1/18:1)	0,087	0,012	0,628	3,39E-02
PC(42:1)	0,666	0,478	0,927	3,41E-02
LPC(18:0)	0,861	0,761	0,974	3,50E-02
LPE(18:0)	0,651	0,452	0,937	3,57E-02

PCo(18:0)	0,435	0,214	0,882	3,64E-02
SM(d38:0)	1,909	1,090	3,342	3,64E-02
LPC(20:2)	0,613	0,400	0,939	3,65E-02
LPE(22:1)	0,879	0,784	0,984	3,67E-02
LPE(18:3)	0,879	0,786	0,983	3,67E-02
PC(18:2/18:2)	0,721	0,544	0,957	3,68E-02
PI(38:3)	0,565	0,348	0,917	3,68E-02
PC(36:6)	0,828	0,706	0,971	3,69E-02
LPC(20:5)	0,725	0,550	0,956	3,69E-02
LPE(20:5)	0,893	0,808	0,986	3,70E-02
SM(d32:2)	0,793	0,649	0,969	3,72E-02
LPC(16:1)	0,861	0,758	0,977	3,73E-02
TG(18:0/18:1/18:0)	0,823	0,696	0,974	3,73E-02
LPC(20:4)	0,921	0,856	0,990	3,75E-02
SM(d30:1)	0,666	0,473	0,937	3,76E-02
PEp(18:1/22:6)	0,817	0,683	0,978	3,84E-02
PE(18:0/20:5)	0,691	0,496	0,965	3,97E-02
SM(d42:2)	0,837	0,710	0,986	4,31E-02
PC(16:0/20:5)	0,697	0,500	0,971	4,53E-02
PEo(18:0/18:2)	2,071	1,050	4,084	4,77E-02
PC(14:0/20:4)	0,699	0,501	0,976	4,89E-02

De entre todos los lípidos con correlación significativa con el OS obtenidos mediante regresión de Cox (**Tabla 16**), a modo representativo, se seleccionaron los cinco más significativos asociados con mayor supervivencia ($HR < 1$, verde) y los cinco más significativos asociados con menor supervivencia ($HR > 1$, rojo) para un análisis utilizando curvas Kaplan-Meier y un potencial uso de puntos de corte. Los resultados de los cinco lípidos asociados con mayor supervivencia se muestran en la **Figura 78**. Como era de esperar, estos lípidos muestran una relación significativa con la OS, donde concentraciones más altas están asociadas con una mejor supervivencia. Es por ello que en el grupo “high”, la separación de las curvas muestra una OS más prolongada que en el grupo “low”. Asimismo, los valores de $HR < 1$ obtenidos de la regresión de Cox, indican que **niveles elevados** del lípido están asociados con un **menor riesgo de muerte** y, por ende, una mayor supervivencia. De esta forma, estos lípidos podrían estar jugando un papel protector o regulador en los procesos biológicos relacionados con la supervivencia en pacientes con CPNM-EGFR.

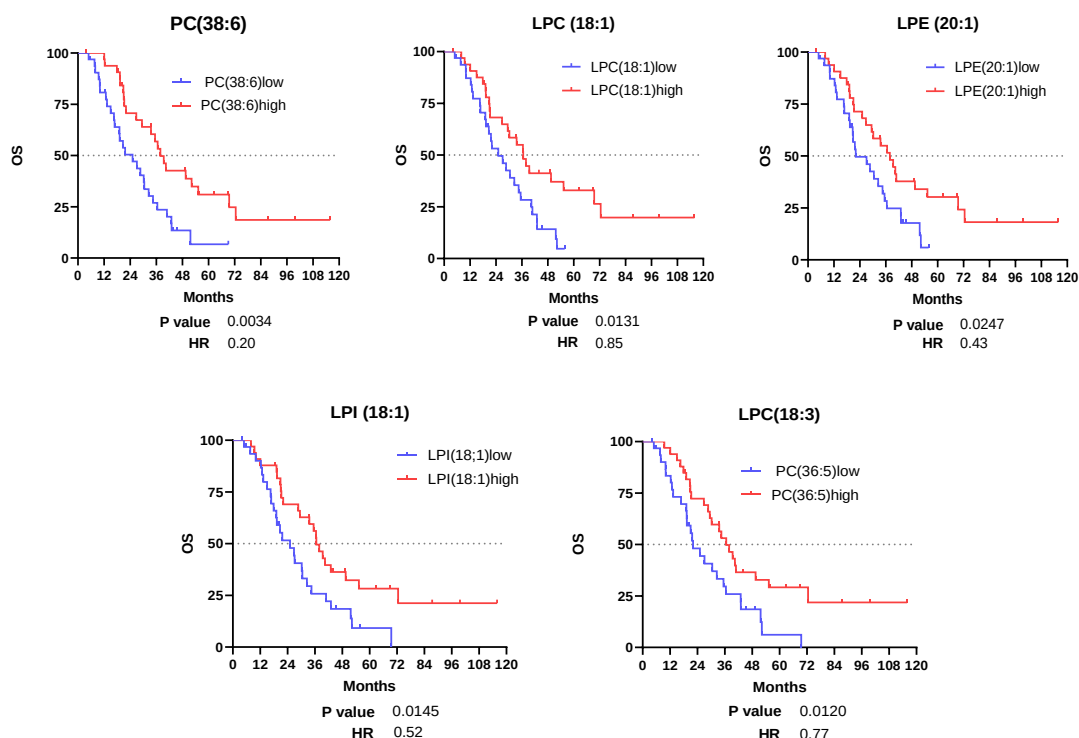


Figura 78. Curvas de Kaplan-Meier que representan la supervivencia global (OS) en función de los niveles basales de los cinco lípidos con mayor correlación positiva con la OS. Cada curva está dividida en dos grupos según niveles altos “high” (rojo) y bajos “low” (azul). Debajo de cada curva se presenta el p-value (Mantel-Cox) y el HR obtenido en la Regresión de Cox.

Por otro lado, en la **Figura 79**, se muestran los cinco lípidos más significativos asociados con menor supervivencia. Como era de esperar, el grupo “low” presenta niveles más elevados de OS en comparación con el grupo “high” y los valores de $HR > 1$ implican que los **niveles altos** de estos lípidos **aumentan el riesgo de muerte**. De esta forma, los cinco lípidos seleccionados tienen un impacto negativo en la supervivencia global de modo que mayores niveles de estas especies se asocian con una mayor mortalidad y, por tanto, serían indicativos de mal pronóstico en este tipo de pacientes.

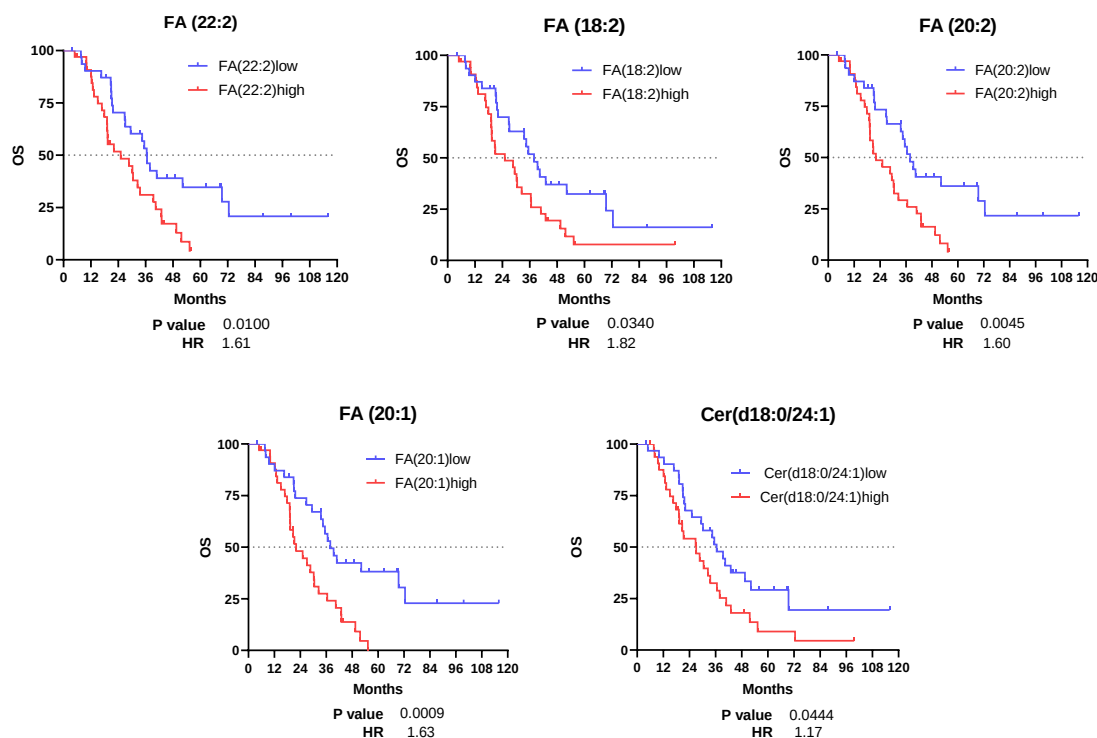


Figura 79. Curvas de Kaplan-Meier que representan la supervivencia global (OS) en función de los niveles basales de los cinco lípidos con mayor correlación negativa con la OS. Cada curva está dividida en dos grupos según niveles altos “high” (rojo) y bajos “low” (azul). Debajo de cada curva se presenta el p-value (Mantel-Cox) y el HR obtenido en la Regresión de Cox.

Una observación interesante en estos resultados es que **algunos lípidos identificados como relevantes para la PFS coinciden con los asociados a la OS** sugiriendo que estos lípidos tienen un impacto en la evolución de la enfermedad y el pronóstico general de los pacientes. Los lípidos que representan un menor riesgo de progresión, así como de muerte y coinciden en su asociación con los valores de PFS y OS corresponden a especies de lisofosfolípidos: **LPC(18:1)**, **LPI(18:1)**, **LPE(20:1)** y **LPC(18:3)**. En particular, los lisofosfolípidos destacan por estar implicados en estabilidad celular y MAT: protegen contra procesos que aceleran la progresión tumoral y controlan del estrés oxidativo e inflamación, factores clave en la progresión y la supervivencia general³⁹⁹. Actuarían como marcadores positivos en CPNM. Por otro lado, se observan lípidos que coinciden en su asociación con la PFS y la OS y representan un mayor riesgo de muerte, así como de progresión. Estos lípidos que coinciden en ambos análisis, reforzando su importancia en la progresión tumoral y constituyendo factores asociados a un peor pronóstico, corresponden a especies de FAs y de Cer: **Cer(d18:0/24:1)** **FA(18:2)** y **FA(22:2)**. Actuarían como marcadores negativos en CPNM.

Esta firma identificada podría servir para predecir qué pacientes van a presentar un mejor o peor pronóstico en base a los niveles de estos lípidos. Los estudios similares a éste son muy limitados, y la literatura publicada al respecto es escasa. Sin embargo, un estudio previo que evaluó el potencial predictivo de determinadas especies lipídicas para predecir la respuesta a EGFR-ITQs en sueros de pacientes con CPNM, encontró diferencias significativas en determinados lípidos entre los grupos de respondedores (PFS > 11 meses) y no respondedores (PFS < 11 meses)⁴⁰⁰. Los lípidos que muestran diferencias significativas en el estudio previo incluyen especies de Cers, LPCs, LPEs y FAs libres y siguen la misma tendencia que los cambios observados en nuestro estudio. A pesar de esta coincidencia, el reducido tamaño de la cohorte

analizada y la gran cantidad de cambios encontrados hacen imperativa una validación prospectiva de la firma lipidómica encontrada.

6.1 Análisis comparativo del perfil lipidómico entre el estado basal y la progresión de la enfermedad

Con el objetivo de evaluar si los niveles de determinados lípidos se mantenían a lo largo de la enfermedad o cambiaban en el momento de la progresión decidimos comparar el perfil lipidómico basal con aquel presente en el momento de la progresión. Para ello se realizó el análisis lipidómico de 28 muestras para las que se disponía de muestra basal y de progresión. El análisis de los lípidos comunes identificados mediante el test Wilcoxon para muestras pareadas permitió identificar 59 lípidos con diferencias estadísticamente significativas ($FDR < 0,05$) entre los dos grupos distintos “Basal” y “Progresión”. En la **Tabla 17**, se recogen las 59 variables identificadas.

Tabla 17. Lista de los 59 lípidos con diferencias significativas entre el estado basal y la progresión según test de Wilcoxon. Al lado de cada variable se indica la diferencia en la pseudo mediana de progresión respecto a basal (Diff_Value) y el p-valor ajustado por corrección de FDR (Benjamini-Hochberg).

Variable	Diff_Value	p-adj (FDR)
PE(34:0)	2,3126	2,98E-08
PEp(40:1)	-0,9126	6,41E-07
PEo(42:3)	-1,6047	3,08E-06
LPC(18:0)	-2,2220	5,53E-06
PEp(40:2)	-0,6079	9,54E-06
TG(16:0/16:0/16:0)	0,3823	9,54E-06
TG(16:0/16:0/18:0)	0,5856	1,14E-05
PE(18:0/20:4)	-0,4799	4,09E-05
PCp(28:3)	-1,7832	5,49E-05
LPE(18:0)	-0,6041	6,33E-05
PEp(22:0/20:3)	-0,4885	9,60E-05
LPC(16:0)	-2,2161	1,84E-04
MG(18:0)	3,060	3,39E-04
LPC(20:1)	-0,3670	3,81E-04
TG(14:0/16:0/14:0)	1,116	4,27E-04
LPC(20:2)	-0,5641	4,39E-04
PEp(40:4)	-1,8742	5,98E-04
LPE(20:1)	-0,3003	6,68E-04
TG(16:0/16:0/18:1)	0,1309	6,68E-04
PI(18:0/20:4)	-0,2685	7,20E-04
LPC(20:3)	-1,9078	7,44E-04
PI(18:0/20:3)	-0,7584	8,28E-04
PS(36:4)	-0,5796	9,11E-04
PCp(42:5)	0,4706	9,20E-04
TG(18:0/18:1/18:0)	3,1923	9,20E-04

LPC(20:0)	-0,4485	9,73E-04
TG(18:0/16:0/18:0)	0,3543	1,02E-03
Cer(d18:1/26:0)	2,7060	1,25E-03
PE(18:0/22:6)	-0,6999	1,25E-03
SM(d42:2)	-1,1662	1,37E-03
PC(42:1)	-0,4537	1,52E-03
PEp(44:4)	-3,8036	1,69E-03
PS(42:4)	-2,3025	1,71E-03
DG(18:0/20:4)	-0,6599	1,86E-03
TG(14:0/14:0/14:0)	0,1416	1,86E-03
Cer(42:0)	0,9829	2,05E-03
Cer(d36:2)	-2,4695	2,05E-03
PEp(20:0/22:6)	-0,4188	2,05E-03
PI(18:0/22:4)	-0,5321	2,05E-03
PC(18:0/20:4)	-0,6355	2,05E-03
DG(18:0/20:0)	6,5064	2,25E-03
PCp(42:3)	-0,2320	2,32E-03
FA(18:0)	-0,3675	2,71E-03
PCo(18:0)	-0,2291	2,71E-03
PI(40:5)	-0,5744	2,97E-03
Carnitine(18:1)	-0,3307	3,20E-03
LPC(18:1)	-1,4417	3,31E-03
PE(38:3)	-0,7756	3,55E-03
PEp(46:6)	-0,7073	3,88E-03
LPC(22:4)	-0,5749	4,00E-03
LPC(22:6)	-2,9752	4,23E-03
SM(d16:1/22:0)	-0,1401	4,42E-03
PCp(32:1)	0,2613	4,44E-03
PCp(40:3)	-0,3361	4,51E-03
FA(20:3)	-0,6238	4,61E-03
PC(18:0/18:2)	-0,5248	4,81E-03
PE(18:1/22:6)	-0,5859	5,02E-03
TG(18:0/18:0/18:0)	0,1732	5,02E-03
Cer(d38:2)	-1,7301	5,57E-03

La **Figura 80** representa los cambios en la concentración sanguínea relativa de los 10 lípidos más diferenciales en ambos momentos. Estos cambios reflejan alteraciones metabólicas significativas y asociadas a la progresión de la enfermedad, sugiriendo su potencial aplicación como biomarcadores de respuesta y monitorización del CPNM-EGFR una vez llevada a cabo su validación en un estudio prospectivo con un mayor número de muestras.

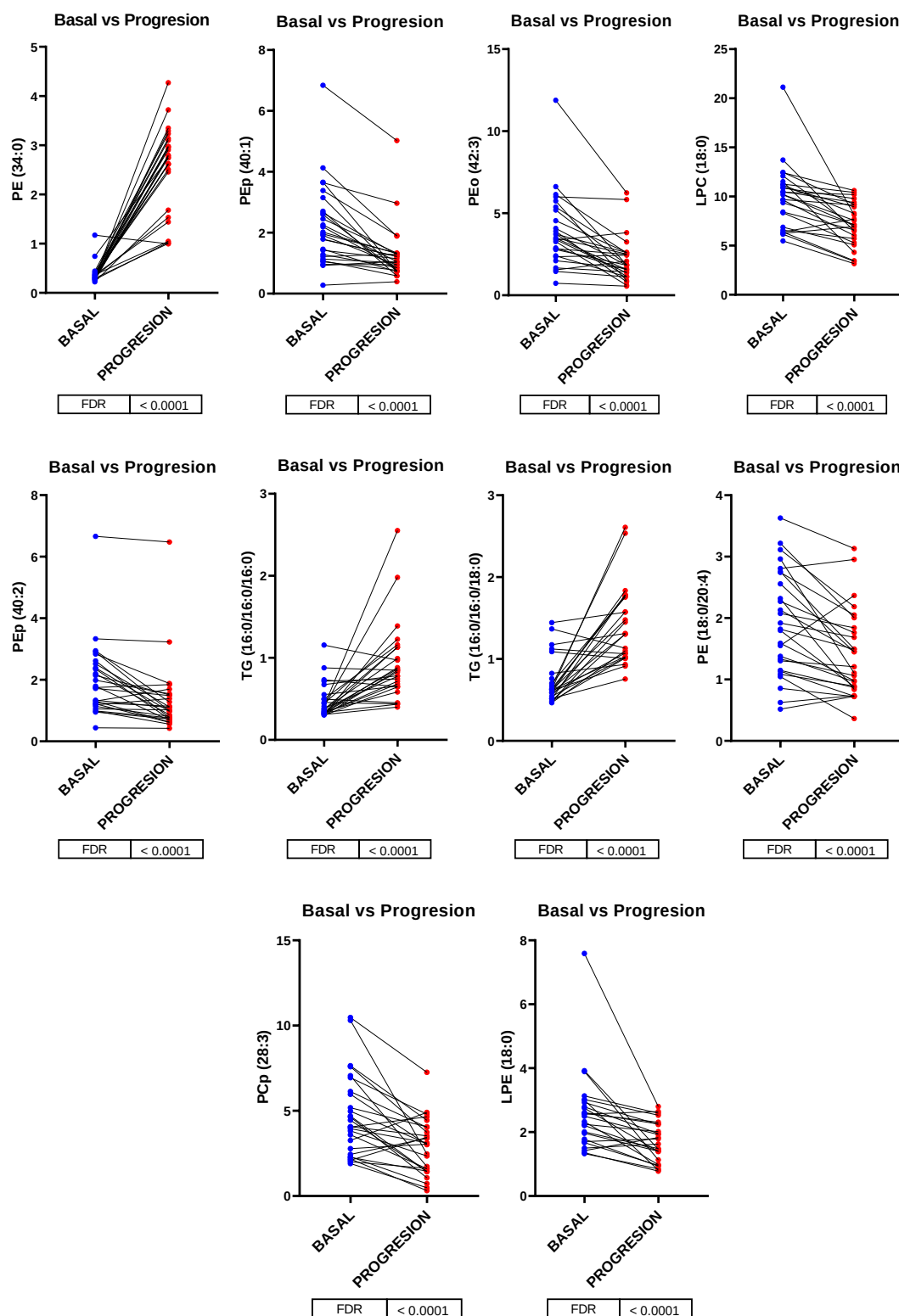


Figura 80. Representación de las 10 especies lipídicas con mayores diferencias entre el estado basal y la progresión de la enfermedad. El gráfico muestra los niveles de los 10 lípidos que presentaron las diferencias más destacadas (FDR < 0,05. Test de Wilcoxon) entre los grupos basal y progresión.

El PE(34:0) es una de las variables más destacadas en el análisis, ya que es la más significativa con un valor de $p\text{-adj (FDR)} = 2,98\text{E-}08$ (**Tabla 17**) y presenta niveles muy elevados en las muestras de progresión (**Figura 80**), lo que sugiere que podría estar asociado con la agresividad o la evolución de la enfermedad. Aunque el PE(34:0) es altamente significativo y está elevado en la progresión, sería necesario realizar estudios adicionales para determinar si su aumento es causal o una consecuencia de la enfermedad. Además, sería importante validar estos hallazgos en cohortes independientes y explorar su relación con otras variables clínicas o moleculares. Por otro lado, llama la atención la disminución generalizada de especies de fosfolípidos plasmalógenos (**Figura 80**) en la progresión de la enfermedad y un aumento de la mayoría de especies de TGs. Estos cambios lipidómicos guardan relación con lo observado previamente en los modelos celulares de resistencia lo que sugiere que podrían ser un sello distintivo de la adaptación celular a condiciones de estrés, resistencia al tratamiento o progresión de la enfermedad. En este sentido, aunque los resultados sugieren una relación entre la disminución de fosfolípidos plasmalógenos, los TGs y la progresión de la enfermedad, se requieren investigaciones adicionales que corroboren esta relación.

Por otro lado, existen **alteraciones lipidómicas compartidas entre el análisis de supervivencia en las muestras basales y el análisis de las muestras en progresión**. Estas alteraciones comunes podrían constituir mecanismos biológicos subyacentes que correlacionan tanto en las etapas iniciales como durante la progresión de la enfermedad. Las variables comunes incluyen: LPC(18:0), LPC(18:1), LPC(20:0), LPC(20:3), LPE(18:0), LPE(20:1), PCo(18:0), SM(d42:2). Este hallazgo es interesante ya que los lisofosfolípidos (LPC y LPE), que previamente se asociaban con una mayor probabilidad de supervivencia, ahora también aparecen como significativos en la progresión de la enfermedad. En este sentido, en la progresión de la enfermedad estos lisofosfolípidos tienden a disminuir (**Figura 80**) como se espera reflejando un agotamiento de estos lípidos que tendrían un papel “protector” y un cambio hacia un entorno celular más agresivo y pro-tumoral.

CONCLUSIONES

- El **análisis lipidómico de líneas celulares de CPNM con mutaciones en *EGFR*** clínicamente relevantes antes y después de adquirir resistencia a osimertinib mediante un mecanismo EMT contrastado, revela una **profunda reprogramación del lipidoma** asociada a este proceso. Un total de 35 especies de lípidos presentan diferencias significativas comunes en la composición lipídica entre las líneas sensibles y las resistentes. De forma general, los fosfolípidos plasmalógenos (PCp, PEP, PCo y PEO) disminuyeron en el modelo resistente, mientras que lípidos neutros, como los triglicéridos y los ésteres de colesterol aumentaron. Además, se encontraron diferencias en la abundancia relativa de determinados ácidos grasos, así como en el balance SFA/MUFA/PUFA, lo que provoca un cambio en la longitud e insaturación de las cadenas de los ácidos grasos que forman parte de lípidos complejos como los fosfolípidos, componentes fundamentales de las membranas celulares, afectando a sus propiedades físicas y biológicas.
- El **análisis transcriptómico y lipidómico de los modelos celulares desarrollados demostró la existencia de importantes cambios** tanto a nivel de expresión de genes relacionados con la homeostasis lipídica como en la composición lipídica celular. Los genes *DGAT2*, *SCD5* y *FADS3* destacaron por estar sobreexpresados en las líneas resistentes mientras que otros genes como *FOXA1*, *CDS1* y *GPD2* mostraron una profunda represión. De entre todas estas potenciales dianas **seleccionamos *FADS3*** para su estudio en mayor profundidad por varios motivos: i) su sobreexpresión en todos los modelos de CPNM resistentes a osimertinib; ii) su conexión con la EMT; iii) la oportunidad de descubrir nuevas funciones de esta enzima; y iv) el potencial desarrollo de nuevas terapias basadas en su inhibición.
- La **validación funcional de *FADS3*** permitió establecer su **relación con la EMT y la adquisición de resistencia a ITQs** en el tratamiento del CPNM-*EGFR* mutante. La sobreexpresión de *FADS3* en células sensibles a osimertinib, indujo sobreexpresión de marcadores de EMT y pluripotencia, una mayor migración celular y resistencia a osimertinib. A nivel metabólico, en la sobreexpresión de *FADS3* se vió alterada la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico y el perfil lipidómico general, siguiendo una tendencia similar a los modelos resistentes. Se observó un aumento en los productos de su reacción (Cer(d18:2/x)) y metabolitos asociados (SM(d18:2/x)), así como una reducción en la síntesis de ácidos grasos y una mayor captación de éstos del medio extracelular. Por el contrario, el silenciamiento de *FADS3* revirtió parcialmente estos efectos. Estos resultados muestran **la relación existente entre *FADS3* y la EMT** y propone a ***FADS3* como una diana molecular** a considerar en futuras estrategias terapéuticas destinadas a prevenir o retrasar la EMT, así como resensibilizar las células resistentes a los ITQs.
- El **análisis lipidómico de biopsias líquidas de pacientes con CPNM portadores de mutaciones en *EGFR*** nos permitió identificar una **firma lipidómica** pretratamiento que muestra una asociación significativa con la PFS y la OS. Además, algunas de las especies lipídicas de esta firma basal se identificaron también en muestras en el momento de la progresión de la enfermedad, lo que refuerza el potencial de esta firma como biomarcador de respuesta a ITQs. Aunque resultan prometedores, estos resultados deben ser validados en un estudio prospectivo utilizando una cohorte mayor de pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Health (US), N. I. of & Study, B. S. C. Understanding Cancer. in *NIH Curriculum Supplement Series [Internet]* (National Institutes of Health (US), 2007).
2. Cooper, G. M. The Development and Causes of Cancer. in *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition* (Sinauer Associates, 2000).
3. Carbone, A. Cancer Classification at the Crossroads. *Cancers* **12**, 980 (2020).
4. Moscucci, O. Gender and cancer in Britain, 1860-1910: the emergence of cancer as a public health concern. *Am. J. Public Health* **95**, 1312–1321 (2005).
5. Uzbekov, R. & Prigent, C. A Journey through Time on the Discovery of Cell Cycle Regulation. *Cells* **11**, 704 (2022).
6. Boveri, T. Uber mehrpolige mitosen als mittle zur analyse des zellkerns. *Verhandl Phys-Med Ges Wulzburg NF* **35**, 67–90 (1902).
7. Croce, C. M. *et al.* Transcriptional activation of an unrearranged and untranslocated c-myc oncogene by translocation of a C lambda locus in Burkitt. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 6922–6926 (1983).
8. Pon, J. R. & Marra, M. A. Driver and passenger mutations in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **10**, 25–50 (2015).
9. Stratton, M. R., Campbell, P. J. & Futreal, P. A. The cancer genome. *Nature* **458**, 719–724 (2009).
10. Lee, E. Y. H. P. & Muller, W. J. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a003236 (2010).
11. Chow, A. Cell Cycle Control by Oncogenes and Tumor Suppressors: Driving the Transformation of Normal Cells into Cancerous Cells. in (2010).
12. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. The Path to Cancer — Three Strikes and You’re Out. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1895–1898 (2015).
13. Mucci, L. A. *et al.* Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. *JAMA* **315**, 68 (2016).
14. Hart, S. N. *et al.* Mutation prevalence tables for hereditary cancer derived from multigene panel testing. *Hum. Mutat.* **41**, (2020).
15. Delgado, L. *et al.* Hereditary breast cancer associated with a germline BRCA2 mutation in identical female twins with similar disease expression. *Cancer Genet. Cytogenet.* **133**, 24–28 (2002).
16. Gatto, N. M. Environmental Carcinogens and Cancer Risk. *Cancers* **13**, 622 (2021).
17. Tomasetti, C., Li, L. & Vogelstein, B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science* **355**, 1330–1334 (2017).
18. Narayanan, D. L., Saladi, R. N. & Fox, J. L. Review: Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int. J. Dermatol.* **49**, 978–986 (2010).
19. Barnes, J. L., Zubair, M., John, K., Poirier, M. C. & Martin, F. L. Carcinogens and DNA damage. *Biochem. Soc. Trans.* **46**, 1213–1224 (2018).
20. De Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J. & Clifford, G. M. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob. Health* **8**, e180–e190 (2020).
21. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
22. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
23. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **12**, 31–46 (2022).

24. Burkhart, D. L. & Sage, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 671–682 (2008).
25. Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M. & Harris, C. C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* **54**, 4855–4878 (1994).
26. Raynaud, C. M. *et al.* DNA damage repair and telomere length in normal breast, preneoplastic lesions, and invasive cancer. *Am. J. Clin. Oncol.* **33**, 341–345 (2010).
27. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 789–791 (2009).
28. Warburg, O., Wind, F. & Negelein, E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J. Gen. Physiol.* **8**, 519–530 (1927).
29. Cancer (IARC), T. I. A. for R. on. Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/>.
30. Raso, M. G., Bota-Rabasedas, N. & Wistuba, I. I. Pathology and Classification of SCLC. *Cancers* **13**, 820 (2021).
31. Waqar, S. N. & Morgensztern, D. Treatment advances in small cell lung cancer (SCLC). *Pharmacol. Ther.* **180**, 16–23 (2017).
32. Meuwissen, R. *et al.* Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. *Cancer Cell* **4**, 181–189 (2003).
33. Bender, E. Epidemiology: The dominant malignancy. *Nature* **513**, S2–S3 (2014).
34. Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T. & Matthay, R. A. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin. Chest Med.* **32**, 605–644 (2011).
35. Non-Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ®) - NCI. <https://www.cancer.gov/types/lung/hp/non-small-cell-lung-treatment-pdq> (2023).
36. WD, T., E, B., HK, M.-H. & CC, H. *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*.
37. Travis, W. D. *et al.* The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J. Thorac. Oncol.* **10**, 1243–1260 (2015).
38. Mongil Poce, R. Diagnóstico y estadificación [IV]: 8ª edición de la clasificación TNM del cáncer de pulmón. *Rev. Esp. Patol. Torácica* **29**, 63–65 (2017).
39. Soleimani, F., Dobaradaran, S., De-la-Torre, G. E., Schmidt, T. C. & Saeedi, R. Content of toxic components of cigarette, cigarette smoke vs cigarette butts: A comprehensive systematic review. *Sci. Total Environ.* **813**, 152667 (2022).
40. Association, A. L. What's In a Cigarette? <https://www.lung.org/quit-smoking/smoking-facts/whats-in-a-cigarette>.
41. Hecht, S. S. & DeMarini, D. M. Tobacco smoke and its constituents. in *Tumour Site Concordance and Mechanisms of Carcinogenesis* (eds. Baan, R. A., Stewart, B. W. & Straif, K.) (International Agency for Research on Cancer, Lyon (FR), 2019).
42. Alberg, A. J. & Nonemaker, J. Who is at high risk for lung cancer? Population-level and individual-level perspectives. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **29**, 223–232 (2008).
43. Pesch, B. *et al.* Cigarette smoking and lung cancer—relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case–control studies. *Int. J. Cancer* **131**, 1210–1219 (2012).
44. Moorthy, B., Chu, C. & Carlin, D. J. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: From Metabolism to Lung Cancer. *Toxicol. Sci.* **145**, 5–15 (2015).

45. Riudavets, M., Garcia de Herreros, M., Besse, B. & Mezquita, L. Radon and Lung Cancer: Current Trends and Future Perspectives. *Cancers* **14**, 3142 (2022).
46. Uguen, M. *et al.* Asbestos-related lung cancers: A retrospective clinical and pathological study. *Mol. Clin. Oncol.* **7**, 135–139 (2017).
47. Pope, C. A. *et al.* Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* **287**, 1132–1141 (2002).
48. Ruano-Ravina, A., Figueiras, A. & Barros-Dios, J. M. Diet and lung cancer: a new approach. *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP* **9**, 395–400 (2000).
49. Wennstig, A.-K. *et al.* Risk of primary lung cancer after adjuvant radiotherapy in breast cancer—a large population-based study. *Npj Breast Cancer* **7**, 71 (2021).
50. Matakidou, A., Eisen, T. & Houlston, R. S. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br. J. Cancer* **93**, 825–833 (2005).
51. Wood, D. E. *et al.* Lung cancer screening. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* **10**, 240–265 (2012).
52. Latimer, K. M. & Mott, T. F. Lung cancer: diagnosis, treatment principles, and screening. *Am. Fam. Physician* **91**, 250–256 (2015).
53. Panunzio, A. & Sartori, P. Lung Cancer and Radiological Imaging. *Curr. Radiopharm.* **13**, 238–242 (2020).
54. Hochegger, B. *et al.* MRI in lung cancer: a pictorial essay. *Br. J. Radiol.* **84**, 661–668 (2011).
55. Acker, M. R. & Burrell, S. C. Utility of 18F-FDG PET in evaluating cancers of lung. *J. Nucl. Med. Technol.* **33**, 69–74; quiz 75–77 (2005).
56. Budak, E., Çok, G. & Akgün, A. The Contribution of Fluorine 18F-FDG PET/CT to Lung Cancer Diagnosis, Staging and Treatment Planning. *Mol. Imaging Radionucl. Ther.* **27**, 73–80 (2018).
57. Ofiara, L. M., Navasakulpong, A., Ezer, N. & Gonzalez, A. V. The importance of a satisfactory biopsy for the diagnosis of lung cancer in the era of personalized treatment. *Curr. Oncol. Tor. Ont* **19**, S16–23 (2012).
58. Alexander, M., Kim, S. Y. & Cheng, H. Update 2020: Management of Non-Small Cell Lung Cancer. *Lung* **198**, 897–907 (2020).
59. Ito, H. *et al.* Long-term survival outcome after lobectomy in patients with clinical T1 N0 lung cancer. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **161**, 281–290 (2021).
60. Yoon, S. M., Shaikh, T. & Hallman, M. Therapeutic management options for stage III non-small cell lung cancer. *World J. Clin. Oncol.* **8**, 1–20 (2017).
61. Sanborn, R. E. Cisplatin Versus Carboplatin in NSCLC: Is There One “Best” Answer? *Curr. Treat. Options Oncol.* **9**, 326–342 (2008).
62. Kryczka, J., Kryczka, J., Czarnecka-Chrebelska, K. H. & Brzezińska-Lasota, E. Molecular Mechanisms of Chemoresistance Induced by Cisplatin in NSCLC Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 8885 (2021).
63. Al-Saleh, K., Quinton, C. & Ellis, P. M. Role of pemetrexed in advanced non-small-cell lung cancer: meta-analysis of randomized controlled trials, with histology subgroup analysis. *Curr. Oncol. Tor. Ont* **19**, e9–e15 (2012).
64. Zhu, Z. *et al.* Modulation of alternative splicing induced by paclitaxel in human lung cancer. *Cell Death Dis.* **9**, 491 (2018).

65. Ramalingam, S. & Belani, C. P. Paclitaxel for non-small cell lung cancer. *Expert Opin. Pharmacother.* **5**, 1771–1780 (2004).
66. Lee, N.-S. *et al.* Combination of gemcitabine and cisplatin as first-line therapy in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Res. Treat.* **36**, 173–177 (2004).
67. Kurzrock, R. & Stewart, D. J. Exploring the Benefit/Risk Associated with Antiangiogenic Agents for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**, 1137–1148 (2017).
68. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–264 (2012).
69. Onoi, K. *et al.* Immune Checkpoint Inhibitors for Lung Cancer Treatment: A Review. *J. Clin. Med.* **9**, 1362 (2020).
70. Malhotra, J., Jabbour, S. K. & Aisner, J. Current state of immunotherapy for non-small cell lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* **6**, 196–211 (2007).
71. Mamdani, H., Matosevic, S., Khalid, A. B., Durm, G. & Jalal, S. I. Immunotherapy in Lung Cancer: Current Landscape and Future Directions. *Front. Immunol.* **13**, 823618 (2022).
72. Cascone, T., Fradette, J., Pradhan, M. & Gibbons, D. L. Tumor Immunology and Immunotherapy of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **12**, a037895 (2022).
73. Croce, C. M. Oncogenes and Cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 502–511 (2008).
74. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* **511**, 543–550 (2014).
75. Cross, D. & Burmester, J. K. The promise of molecular profiling for cancer identification and treatment. *Clin. Med. Res.* **2**, 147–150 (2004).
76. Chabon, J. J. *et al.* Integrating genomic features for non-invasive early lung cancer detection. *Nature* **580**, 245–251 (2020).
77. Grodzka, A. *et al.* Molecular alterations of driver genes in non-small cell lung cancer: from diagnostics to targeted therapy. *EXCLI J.* **22**, 415–432 (2023).
78. Skoulidis, F. & Heymach, J. V. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **19**, 495–509 (2019).
79. Chevallier, M., Borgeaud, M., Addeo, A. & Friedlaender, A. Oncogenic driver mutations in non-small cell lung cancer: Past, present and future. *World J. Clin. Oncol.* **12**, 217–237 (2021).
80. Weinstein, I. B. & Joe, A. K. Mechanisms of Disease: oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **3**, 448–457 (2006).
81. Politi, K. & Herbst, R. S. Lung cancer in the era of precision medicine. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**, 2213–2220 (2015).
82. Yuan, M., Huang, L.-L., Chen, J.-H., Wu, J. & Xu, Q. The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **4**, 61 (2019).
83. Riely, G. J., Marks, J. & Pao, W. KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **6**, 201–205 (2009).
84. Prior, I. A., Lewis, P. D. & Mattos, C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* **72**, 2457–2467 (2012).
85. Huang, L., Guo, Z., Wang, F. & Fu, L. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 386 (2021).

86. Skoulidis, F. *et al.* Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *N. Engl. J. Med.* **384**, 2371–2381 (2021).
87. Lee, A. Sotorasib: A Review in KRAS G12C Mutation-Positive Non-small Cell Lung Cancer. *Target. Oncol.* **17**, 727–733 (2022).
88. Wellstein, A. ALK receptor activation, ligands and therapeutic targeting in glioblastoma and in other cancers. *Front. Oncol.* **2**, 192 (2012).
89. Holla, V. R. *et al.* ALK: a tyrosine kinase target for cancer therapy. *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.* **3**, a001115 (2017).
90. Webb, T. R. *et al.* Anaplastic lymphoma kinase: role in cancer pathogenesis and small-molecule inhibitor development for therapy. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **9**, 331–356 (2009).
91. Choi, Y. L. *et al.* Identification of Novel Isoforms of the *EML4-ALK* Transforming Gene in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* **68**, 4971–4976 (2008).
92. Koivunen, J. P. *et al.* EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 4275–4283 (2008).
93. Khan, M. *et al.* ALK Inhibitors in the Treatment of ALK Positive NSCLC. *Front. Oncol.* **8**, 557 (2018).
94. Chuang, J. C. & Neal, J. W. Crizotinib as first line therapy for advanced ALK-positive non-small cell lung cancers. *Transl. Lung Cancer Res.* **4**, 639–641 (2015).
95. Acquaviva, J., Wong, R. & Charest, A. The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1795**, 37–52 (2009).
96. Gendarme, S., Bylicki, O., Chouaid, C. & Guisier, F. ROS-1 Fusions in Non-Small-Cell Lung Cancer: Evidence to Date. *Curr. Oncol. Tor. Ont* **29**, 641–658 (2022).
97. Mazières, J. *et al.* Crizotinib Therapy for Advanced Lung Adenocarcinoma and a *ROS1* Rearrangement: Results From the EUROS1 Cohort. *J. Clin. Oncol.* **33**, 992–999 (2015).
98. Yan, N. *et al.* BRAF-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: Current Treatment Status and Future Perspective. *Front. Oncol.* **12**, 863043 (2022).
99. Guaitoli, G. *et al.* Non-small-cell lung cancer: how to manage BRAF-mutated disease. *Drugs Context* **12**, 2022-11–3 (2023).
100. Luk, P. P. *et al.* BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* **4**, 142–148 (2015).
101. Wang, Y., Wang, Y., Li, J., Li, J. & Che, G. Clinical Significance of PIK3CA Gene in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Res. Int.* **2020**, 3608241 (2020).
102. Wang, L. *et al.* PIK3CA mutations frequently coexist with EGFR/KRAS mutations in non-small cell lung cancer and suggest poor prognosis in EGFR/KRAS wildtype subgroup. *PLoS One* **9**, e88291 (2014).
103. Scheffler, M. *et al.* PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies. *Oncotarget* **6**, 1315–1326 (2015).
104. Tan, A. C. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Thorac. Cancer* **11**, 511–518 (2020).

105. Schubart, C. *et al.* MET Amplification in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)-A Consecutive Evaluation Using Next-Generation Sequencing (NGS) in a Real-World Setting. *Cancers* **13**, 5023 (2021).
106. Engelman, J. A. *et al.* MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* **316**, 1039–1043 (2007).
107. Wolf, J. *et al.* Capmatinib in MET Exon 14-Mutated or MET-Amplified Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **383**, 944–957 (2020).
108. Hirsch, F. R. *et al.* Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. *Br. J. Cancer* **86**, 1449–1456 (2002).
109. Shigematsu, H. *et al.* Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res.* **65**, 1642–1646 (2005).
110. Wang, S. E. *et al.* HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Cell* **10**, 25–38 (2006).
111. Riudavets, M., Sullivan, I., Abdayem, P. & Planchard, D. Targeting HER2 in non-small-cell lung cancer (NSCLC): a glimpse of hope? An updated review on therapeutic strategies in NSCLC harbouring HER2 alterations. *ESMO Open* **6**, 100260 (2021).
112. Wu, J. & Lin, Z. Non-Small Cell Lung Cancer Targeted Therapy: Drugs and Mechanisms of Drug Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 15056 (2022).
113. Wieduwilt, M. J. & Moasser, M. M. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **65**, 1566–1584 (2008).
114. Ferguson, K. M. Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 353–373 (2008).
115. Harris, R. C., Chung, E. & Coffey, R. J. EGF receptor ligands. *Exp. Cell Res.* **284**, 2–13 (2003).
116. Kovacs, E., Zorn, J. A., Huang, Y., Barros, T. & Kuriyan, J. A structural perspective on the regulation of the epidermal growth factor receptor. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 739–764 (2015).
117. Schlessinger, J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* **110**, 669–672 (2002).
118. Hackel, P. O., Zwick, E., Prenzel, N. & Ullrich, A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 184–189 (1999).
119. Morandell, S., Stasyk, T., Skvortsov, S., Ascher, S. & Huber, L. A. Quantitative proteomics and phosphoproteomics reveal novel insights into complexity and dynamics of the EGFR signaling network. *Proteomics* **8**, 4383–4401 (2008).
120. Uribe, M. L., Marrocco, I. & Yarden, Y. EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance. *Cancers* **13**, 2748 (2021).
121. Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A. & Kitano, H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol. Syst. Biol.* **1**, 2005.0010 (2005).
122. Wells, A. EGF receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 637–643 (1999).
123. Pawson, T., Gish, G. D. & Nash, P. SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol.* **11**, 504–511 (2001).
124. Huang, H. *et al.* Defining the Specificity Space of the Human Src Homology 2 Domain. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 768–784 (2008).

125. Lowenstein, E. J. *et al.* The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* **70**, 431–442 (1992).
126. Batzer, A. G., Rotin, D., Ureña, J. M., Skolnik, E. Y. & Schlessinger, J. Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5192–5201 (1994).
127. Degirmenci, U., Wang, M. & Hu, J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells* **9**, 198 (2020).
128. Zhang, W. & Liu, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* **12**, 9–18 (2002).
129. Vivanco, I. & Sawyers, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 489–501 (2002).
130. Shaw, R. J. & Cantley, L. C. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **441**, 424–430 (2006).
131. Wee, P. & Wang, Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers* **9**, 52 (2017).
132. Lattanzio, R., Piantelli, M. & Falasca, M. Role of phospholipase C in cell invasion and metastasis. *Adv. Biol. Regul.* **53**, 309–318 (2013).
133. Quesnelle, K. M., Boehm, A. L. & Grandis, J. R. STAT-mediated EGFR signaling in cancer. *J. Cell. Biochem.* **102**, 311–319 (2007).
134. Hsu, W.-H., Yang, J. C.-H., Mok, T. S. & Loong, H. H. Overview of current systemic management of EGFR-mutant NSCLC. *Ann. Oncol.* **29**, i3–i9 (2018).
135. Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J. & Haber, D. A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 169–181 (2007).
136. Normanno, N. *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* **366**, 2–16 (2006).
137. Hirsch, F. R. *et al.* Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 3798–3807 (2003).
138. Selvaggi, G. *et al.* Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **15**, 28–32 (2004).
139. Pirker, R. *et al.* Consensus for EGFR Mutation Testing in Non-small Cell Lung Cancer: Results from a European Workshop. *J. Thorac. Oncol.* **5**, 1706–1713 (2010).
140. O’Leary, C. *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC). *Pharm. Basel Switz.* **13**, 273 (2020).
141. Yoneda, K., Imanishi, N., Ichiki, Y. & Tanaka, F. Treatment of Non-small Cell Lung Cancer with EGFR-mutations. *J. UOEH* **41**, 153–163 (2019).
142. Zhou, C. & Yao, L. D. Strategies to Improve Outcomes of Patients with EGRF-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Review of the Literature. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **11**, 174–186 (2016).
143. Li, D. *et al.* BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* **27**, 4702–4711 (2008).
144. Miller, V. A. *et al.* Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of

- chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol.* **13**, 528–538 (2012).
145. Katakami, N. *et al.* LUX-Lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, 3335–3341 (2013).
 146. Mok, T. S. *et al.* Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **376**, 629–640 (2017).
 147. Nan, X., Xie, C., Yu, X. & Liu, J. EGFR TKI as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* **8**, 75712–75726 (2017).
 148. Soria, J.-C. *et al.* Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **378**, 113–125 (2018).
 149. Research, C. for D. E. and. Osimertinib (TAGRISSO). *FDA* (2019).
 150. Pirker, R. & Filipits, M. Cetuximab in non-small-cell lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* **1**, 54–60 (2012).
 151. Rosell, R. *et al.* Randomized phase II study of cetuximab plus cisplatin/vinorelbine compared with cisplatin/vinorelbine alone as first-line therapy in EGFR-expressing advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **19**, 362–369 (2008).
 152. Pirker, R. *et al.* Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet Lond. Engl.* **373**, 1525–1531 (2009).
 153. Santoni-Rugiu, E. *et al.* Intrinsic resistance to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Differences and Similarities with Acquired Resistance. *Cancers* **11**, 923 (2019).
 154. Koulouris, A., Tsagkaris, C., Corriero, A. C., Metro, G. & Mountzios, G. Resistance to TKIs in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: From Mechanisms to New Therapeutic Strategies. *Cancers* **14**, 3337 (2022).
 155. Du, X. *et al.* Acquired resistance to third-generation EGFR-TKIs and emerging next-generation EGFR inhibitors. *Innov. Camb. Mass* **2**, 100103 (2021).
 156. Lin, Y., Wang, X. & Jin, H. EGFR-TKI resistance in NSCLC patients: mechanisms and strategies. *Am. J. Cancer Res.* **4**, 411–435 (2014).
 157. Bean, J. *et al.* MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 20932–20937 (2007).
 158. Balak, M. N. *et al.* Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12**, 6494–6501 (2006).
 159. Costa, D. B. *et al.* BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. *PLoS Med.* **4**, 1669–1679; discussion 1680 (2007).
 160. Enrico, D. *et al.* Overcoming Resistance to Osimertinib by T790M Loss and C797S Acquisition Using Gefitinib in a Patient With EGFR-Mutant NSCLC: A Case Report. *JTO Clin. Res. Rep.* **4**, 100456 (2023).
 161. Jia, Y. *et al.* Overcoming EGFR(T790M) and EGFR(C797S) resistance with mutant-selective allosteric inhibitors. *Nature* **534**, 129–132 (2016).

162. Yang, H. *et al.* EGFR amplification is a putative resistance mechanism for NSCLC-LM patients with TKI therapy and is associated with poor outcome. *Front. Oncol.* **12**, 902664 (2022).
163. Nukaga, S. *et al.* Amplification of EGFR Wild-Type Alleles in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Confers Acquired Resistance to Mutation-Selective EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Res.* **77**, 2078–2089 (2017).
164. Leonetti, A. *et al.* Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* **121**, 725–737 (2019).
165. Yu, H. A. *et al.* Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **19**, 2240–2247 (2013).
166. Ramalingam, S. S. *et al.* Mechanisms of acquired resistance to first-line osimertinib: Preliminary data from the phase III FLAURA study. *Ann. Oncol.* **29**, viii740 (2018).
167. Papadimitrakopoulou, V. A. *et al.* Analysis of resistance mechanisms to osimertinib in patients with EGFR T790M advanced NSCLC from the AURA3 study. *Ann. Oncol.* **29**, viii741 (2018).
168. Planchard, D. *et al.* EGFR-independent mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC patients. *Ann. Oncol.* **26**, 2073–2078 (2015).
169. Kim, T. M. *et al.* Mechanisms of Acquired Resistance to AZD9291. *J. Thorac. Oncol.* **10**, 1736–1744 (2015).
170. Tomasello, C. *et al.* Resistance to EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer: Clinical management and future perspectives. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **123**, 149–161 (2018).
171. Ohashi, K. *et al.* Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E2127–2133 (2012).
172. Ichihara, E. *et al.* SFK/FAK Signaling Attenuates Osimertinib Efficacy in Both Drug-Sensitive and Drug-Resistant Models of EGFR-Mutant Lung Cancer. *Cancer Res.* **77**, 2990–3000 (2017).
173. Taniguchi, H. *et al.* AXL confers intrinsic resistance to osimertinib and advances the emergence of tolerant cells. *Nat. Commun.* **10**, 259 (2019).
174. Sequist, L. V. *et al.* Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci. Transl. Med.* **3**, 75ra26 (2011).
175. Morinaga, R. *et al.* Sequential occurrence of non-small cell and small cell lung cancer with the same EGFR mutation. *Lung Cancer* **58**, 411–413 (2007).
176. Van Riel, S., Thunnissen, E., Heideman, D., Smit, E. F. & Biesma, B. A patient with simultaneously appearing adenocarcinoma and small-cell lung carcinoma harbouring an identical EGFR exon 19 mutation. *Ann. Oncol.* **23**, 3188–3189 (2012).
177. Niederst, M. J. *et al.* RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer. *Nat. Commun.* **6**, 6377 (2015).
178. Westover, D., Zugazagoitia, J., Cho, B. C., Lovly, C. M. & Paz-Ares, L. Mechanisms of acquired resistance to first- and second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **29**, i10–i19 (2018).
179. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428 (2009).

180. Ribatti, D., Tamma, R. & Annese, T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl. Oncol.* **13**, 100773 (2020).
181. Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R. & Thompson, E. W. The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J. Cell Biol.* **172**, 973–981 (2006).
182. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871–890 (2009).
183. Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J. Clin. Invest.* **119**, 1438–1449 (2009).
184. Ye, X. & Weinberg, R. A. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol.* **25**, 675–686 (2015).
185. Nieto, M. A. The Ins and Outs of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Health and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 347–376 (2011).
186. Singh, A. & Settleman, J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* **29**, 4741–4751 (2010).
187. Radisky, D. C. & LaBarge, M. A. Epithelial-Mesenchymal Transition and the Stem Cell Phenotype. *Cell Stem Cell* **2**, 511–512 (2008).
188. Yadav, A. K. & Desai, N. S. Cancer Stem Cells: Acquisition, Characteristics, Therapeutic Implications, Targeting Strategies and Future Prospects. *Stem Cell Rev. Rep.* **15**, 331–355 (2019).
189. Talmadge, J. E. & Fidler, I. J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* **70**, 5649–5669 (2010).
190. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 453–458 (2003).
191. Aiello, N. M. & Kang, Y. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *J. Exp. Med.* **216**, 1016–1026 (2019).
192. Klein, C. A. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 302–312 (2009).
193. Yu, M. *et al.* Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* **339**, 580–584 (2013).
194. Armstrong, A. J. *et al.* Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Mol. Cancer Res. MCR* **9**, 997–1007 (2011).
195. Ye, X. *et al.* Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature* **525**, 256–260 (2015).
196. Krebs, A. M. *et al.* The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nat. Cell Biol.* **19**, 518–529 (2017).
197. Tsai, J. H., Donaher, J. L., Murphy, D. A., Chau, S. & Yang, J. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* **22**, 725–736 (2012).
198. Pastushenko, I. & Blanpain, C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol.* **29**, 212–226 (2019).
199. Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A. & Thiery, J. P. EMT: 2016. *Cell* **166**, 21–45 (2016).

200. Dongre, A. & Weinberg, R. A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 69–84 (2019).
201. Peinado, H., Olmeda, D. & Cano, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* **7**, 415–428 (2007).
202. Zhang, J. & Ma, L. MicroRNA control of epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **31**, 653–662 (2012).
203. Serrano-Gomez, S. J., Maziveyi, M. & Alahari, S. K. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Mol. Cancer* **15**, 18 (2016).
204. Puisieux, A., Brabletz, T. & Caramel, J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat. Cell Biol.* **16**, 488–494 (2014).
205. Vesuna, F., van Diest, P., Chen, J. H. & Raman, V. Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367**, 235–241 (2008).
206. Xu, J., Lamouille, S. & Derynck, R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* **19**, 156–172 (2009).
207. Zavadil, J. & Böttinger, E. P. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* **24**, 5764–5774 (2005).
208. Massagué, J. TGF β signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 616–630 (2012).
209. Kaimori, A. *et al.* Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J. Biol. Chem.* **282**, 22089–22101 (2007).
210. Miyazono, K. Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **85**, 314–323 (2009).
211. Lamouille, S. & Derynck, R. Emergence of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin axis in transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition. *Cells Tissues Organs* **193**, 8–22 (2011).
212. Lamouille, S. & Derynck, R. Cell size and invasion in TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J. Cell Biol.* **178**, 437–451 (2007).
213. Abaurrea, A., Araujo, A. M. & Caffarel, M. M. The Role of the IL-6 Cytokine Family in Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 8334 (2021).
214. Wang, H. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TNF- α requires AKT/GSK-3 β -mediated stabilization of snail in colorectal cancer. *PLoS One* **8**, e56664 (2013).
215. Pires, B. R. B. *et al.* NF-kappaB Is Involved in the Regulation of EMT Genes in Breast Cancer Cells. *PLoS One* **12**, e0169622 (2017).
216. Gregory, P. A. *et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat. Cell Biol.* **10**, 593–601 (2008).
217. Fischer, K. R. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* **527**, 472–476 (2015).

218. Barrallo-Gimeno, A. & Nieto, M. A. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Dev. Camb. Engl.* **132**, 3151–3161 (2005).
219. Zheng, X. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* **527**, 525–530 (2015).
220. Chung, J.-H. *et al.* Clinical and molecular evidences of epithelial to mesenchymal transition in acquired resistance to EGFR-TKIs. *Lung Cancer Amst. Neth.* **73**, 176–182 (2011).
221. Lee, A.-F. *et al.* Reverse epithelial-mesenchymal transition contributes to the regain of drug sensitivity in tyrosine kinase inhibitor-resistant non-small cell lung cancer cells. *PLoS One* **12**, e0180383 (2017).
222. Suda, K. *et al.* Epithelial to mesenchymal transition in an epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **6**, 1152–1161 (2011).
223. Witta, S. E. *et al.* Restoring E-Cadherin Expression Increases Sensitivity to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Lung Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* **66**, 944–950 (2006).
224. Jakobsen, K. R., Demuth, C., Sorensen, B. S. & Nielsen, A. L. The role of epithelial to mesenchymal transition in resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* **5**, 172–182 (2016).
225. Yoshida, T. *et al.* ZEB1 Mediates Acquired Resistance to the Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One* **11**, e0147344 (2016).
226. Byers, L. A. *et al.* An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **19**, 279–290 (2013).
227. Zhu, X., Chen, L., Liu, L. & Niu, X. EMT-Mediated Acquired EGFR-TKI Resistance in NSCLC: Mechanisms and Strategies. *Front. Oncol.* **9**, 1044 (2019).
228. Soucheray, M. *et al.* Intratumoral Heterogeneity in EGFR -Mutant NSCLC Results in Divergent Resistance Mechanisms in Response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibition. *Cancer Res.* **75**, 4372–4383 (2015).
229. Gainor, J. F. & Shaw, A. T. Emerging Paradigms in the Development of Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **31**, 3987–3996 (2013).
230. Kim, H.-J. *et al.* Constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF-kappaB and snail. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3165–3175 (2007).
231. Byers, L. A. *et al.* An Epithelial–Mesenchymal Transition Gene Signature Predicts Resistance to EGFR and PI3K Inhibitors and Identifies Axl as a Therapeutic Target for Overcoming EGFR Inhibitor Resistance. *Clin. Cancer Res.* **19**, 279–290 (2013).
232. Zhang, Z. *et al.* Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat. Genet.* **44**, 852–860 (2012).

233. Weng, C.-H. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition (EMT) beyond EGFR mutations per se is a common mechanism for acquired resistance to EGFR TKI. *Oncogene* **38**, 455–468 (2019).
234. Lin, Z., Wang, Q., Jiang, T., Wang, W. & Zhao, J. J. Targeting tumor-associated macrophages with STING agonism improves the antitumor efficacy of osimertinib in a mouse model of EGFR-mutant lung cancer. *Front. Immunol.* **14**, 1077203 (2023).
235. Patel, S. A. *et al.* IL6 Mediates Suppression of T- and NK-cell Function in EMT-associated TKI-resistant EGFR-mutant NSCLC. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **29**, 1292–1304 (2023).
236. Cho, H. *et al.* Cancer-Stimulated CAFs Enhance Monocyte Differentiation and Protumoral TAM Activation via IL6 and GM-CSF Secretion. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **24**, 5407–5421 (2018).
237. Cheng, D. *et al.* Tumor-associated macrophages mediate resistance of EGFR-TKIs in non-small cell lung cancer: mechanisms and prospects. *Front. Immunol.* **14**, 1209947 (2023).
238. Jin, H. *et al.* Targeting lipid metabolism to overcome EMT-associated drug resistance via integrin β 3/FAK pathway and tumor-associated macrophage repolarization using legumain-activatable delivery. *Theranostics* **9**, 265–278 (2019).
239. Pavlova, N. N. & Thompson, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* **23**, 27–47 (2016).
240. Faubert, B., Solmonson, A. & DeBerardinis, R. J. Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science* **368**, eaaw5473 (2020).
241. DeBerardinis, R. J. & Chandel, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* **2**, e1600200 (2016).
242. Schieber, M. S. & Chandel, N. S. ROS Links Glucose Metabolism to Breast Cancer Stem Cell and EMT Phenotype. *Cancer Cell* **23**, 265–267 (2013).
243. Liu, M., Quek, L.-E., Sultani, G. & Turner, N. Epithelial-mesenchymal transition induction is associated with augmented glucose uptake and lactate production in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Metab.* **4**, 19 (2016).
244. Li, M. *et al.* Biological role of metabolic reprogramming of cancer cells during epithelial-mesenchymal transition (Review). *Oncol. Rep.* (2018) doi:10.3892/or.2018.6882.
245. Hua, W., Ten Dijke, P., Kostidis, S., Giera, M. & Hornsvelde, M. TGF β -induced metabolic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 2103–2123 (2020).
246. Santos, A. L. & Preta, G. Lipids in the cell: organisation regulates function. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 1909–1927 (2018).
247. Deamer, D. The Role of Lipid Membranes in Life's Origin. *Life Basel Switz.* **7**, 5 (2017).
248. Welte, M. A. & Gould, A. P. Lipid droplet functions beyond energy storage. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1862**, 1260–1272 (2017).
249. Olzmann, J. A. & Carvalho, P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 137–155 (2019).
250. Sunshine, H. & Iruela-Arispe, M. L. Membrane lipids and cell signaling. *Curr. Opin. Lipidol.* **28**, 408–413 (2017).

251. Li, Z.-L. & Buck, M. Computational Modeling Reveals that Signaling Lipids Modulate the Orientation of K-Ras4A at the Membrane Reflecting Protein Topology. *Struct. Lond. Engl.* 1993 **25**, 679-689.e2 (2017).
252. Wymann, M. P. & Schreiner, R. Lipid signalling in disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 162–176 (2008).
253. Bae, Y. S. *et al.* Activation of Phospholipase C- γ by Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **273**, 4465–4469 (1998).
254. Agrawal, I., Lim, Y. S., Ng, S.-Y. & Ling, S.-C. Deciphering lipid dysregulation in ALS: from mechanisms to translational medicine. *Transl. Neurodegener.* **11**, 48 (2022).
255. Gyamfi, D., Ofori Awuah, E. & Owusu, S. Lipid Metabolism. in *The Molecular Nutrition of Fats* 17–32 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-811297-7.00002-0.
256. Tisza, M. J. *et al.* Motility and stem cell properties induced by the epithelial-mesenchymal transition require destabilization of lipid rafts. *Oncotarget* **7**, 51553–51568 (2016).
257. Koundouros, N. & Poulogiannis, G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br. J. Cancer* **122**, 4–22 (2020).
258. Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Madeo, F. & Kroemer, G. Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell Metab.* **21**, 805–821 (2015).
259. Broadfield, L. A., Pane, A. A., Talebi, A., Swinnen, J. V. & Fendt, S.-M. Lipid metabolism in cancer: New perspectives and emerging mechanisms. *Dev. Cell* **56**, 1363–1393 (2021).
260. Giudetti, A. M. *et al.* A specific lipid metabolic profile is associated with the epithelial mesenchymal transition program. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1864**, 344–357 (2019).
261. Orchestrated desaturation reprogramming from stearoyl-CoA desaturase to fatty acid desaturase 2 in cancer epithelial-mesenchymal transition and metastasis - Chen - Cancer Communications - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cac2.12644>.
262. Nath, A., Li, I., Roberts, L. R. & Chan, C. Elevated free fatty acid uptake via CD36 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Sci. Rep.* **5**, 14752 (2015).
263. Kawaguchi, K. *et al.* High expression of Fatty Acid-Binding Protein 5 promotes cell growth and metastatic potential of colorectal cancer cells. *FEBS Open Bio* **6**, 190–199 (2016).
264. Wen, Y.-A. *et al.* Adipocytes activate mitochondrial fatty acid oxidation and autophagy to promote tumor growth in colon cancer. *Cell Death Dis.* **8**, e2593–e2593 (2017).
265. Espinosa-Neira, R., Mejia-Rangel, J., Cortes-Reynosa, P. & Salazar, E. P. Linoleic acid induces an EMT-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 1782–1791 (2011).
266. Figiel *et al.* A Novel Calcium-Mediated EMT Pathway Controlled by Lipids: An Opportunity for Prostate Cancer Adjuvant Therapy. *Cancers* **11**, 1814 (2019).
267. Navarro-Tito, N., Robledo, T. & Salazar, E. P. Arachidonic acid promotes FAK activation and migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Exp. Cell Res.* **314**, 3340–3355 (2008).
268. Kim, J. I., Lakshmikanthan, V., Frilot, N. & Daaka, Y. Prostaglandin E2 Promotes Lung Cancer Cell Migration via EP4- β Arrestin1-c-Src Signosome. *Mol. Cancer Res.* **8**, 569–577 (2010).

269. Martinez-Orozco, R., Navarro-Tito, N., Soto-Guzman, A., Castro-Sanchez, L. & Perez Salazar, E. Arachidonic acid promotes epithelial-to-mesenchymal-like transition in mammary epithelial cells MCF10A. *Eur. J. Cell Biol.* **89**, 476–488 (2010).
270. Moraes, J., Assreuy, J., Canetti, C. & Barja-Fidalgo, C. Leukotriene B4 mediates vascular smooth muscle cell migration through $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin transactivation. *Atherosclerosis* **212**, 406–413 (2010).
271. Goswamee, P., Pounardjian, T. & Giovannucci, D. R. Arachidonic acid-induced Ca^{2+} entry and migration in a neuroendocrine cancer cell line. *Cancer Cell Int.* **18**, 30 (2018).
272. D'Eliseo, D. *et al.* Epitelial-to-mesenchimal transition and invasion are upmodulated by tumor-expressed granzyme B and inhibited by docosahexaenoic acid in human colorectal cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **35**, 24 (2016).
273. Levental, K. R. *et al.* Polyunsaturated Lipids Regulate Membrane Domain Stability by Tuning Membrane Order. *Biophys. J.* **110**, 1800–1810 (2016).
274. Thomson, T. M., Balcells, C. & Cascante, M. Metabolic Plasticity and Epithelial-Mesenchymal Transition. *J. Clin. Med.* **8**, 967 (2019).
275. Zhang, Y. *et al.* Combination of SB431542, CHIR99021 and PD0325901 has a synergic effect on abrogating valproic acid-induced epithelial-mesenchymal transition and stemness in HeLa, 5637 and SCC-15 cells. *Oncol. Rep.* (2019) doi:10.3892/or.2019.7088.
276. Lee, H. J. *et al.* Multimodal Metabolic Imaging Reveals Pigment Reduction and Lipid Accumulation in Metastatic Melanoma. *BME Front.* **2021**, 9860123 (2021).
277. Dalmau, N., Jaumot, J., Tauler, R. & Bedia, C. Epithelial-to-mesenchymal transition involves triacylglycerol accumulation in DU145 prostate cancer cells. *Mol. Biosyst.* **11**, 3397–3406 (2015).
278. Corbet, C. *et al.* TGF β 2-induced formation of lipid droplets supports acidosis-driven EMT and the metastatic spreading of cancer cells. *Nat. Commun.* **11**, 454 (2020).
279. Zhang, L. & Min, W. Bioorthogonal chemical imaging of metabolic changes during epithelial–mesenchymal transition of cancer cells by stimulated Raman scattering microscopy. *J. Biomed. Opt.* **22**, 1 (2017).
280. Tokuda, E. *et al.* Phosphatidylinositol 4-Phosphate in the Golgi Apparatus Regulates Cell–Cell Adhesion and Invasive Cell Migration in Human Breast Cancer. *Cancer Res.* **74**, 3054–3066 (2014).
281. Thapa, N. *et al.* The Hidden Conundrum of Phosphoinositide Signaling in Cancer. *Trends Cancer* **2**, 378–390 (2016).
282. Thapa, N., Tan, X., Choi, S., Wise, T. & Anderson, R. A. PIPKly and talin couple phosphoinositide and adhesion signaling to control the epithelial to mesenchymal transition. *Oncogene* **36**, 899–911 (2017).
283. Davis, F. M. *et al.* Induction of epithelial–mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene* **33**, 2307–2316 (2014).
284. Davis, F. M. *et al.* Assessment of gene expression of intracellular calcium channels, pumps and exchangers with epidermal growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition in a breast cancer cell line. *Cancer Cell Int.* **13**, 76 (2013).
285. Eiriksson, F. F. *et al.* Altered plasmalogen content and fatty acid saturation following epithelial to mesenchymal transition in breast epithelial cell lines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **103**, 99–104 (2018).

286. Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 175–191 (2018).
287. Meshcheryakova, A. *et al.* Exploring the role of sphingolipid machinery during the epithelial to mesenchymal transition program using an integrative approach. *Oncotarget* **7**, 22295–22323 (2016).
288. Wang, G., Krishnamurthy, K., Umapathy, N. S., Verin, A. D. & Bieberich, E. The Carboxyl-terminal Domain of Atypical Protein Kinase C ζ Binds to Ceramide and Regulates Junction Formation in Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 14469–14475 (2009).
289. Edmond, V. *et al.* Downregulation of ceramide synthase-6 during epithelial-to-mesenchymal transition reduces plasma membrane fluidity and cancer cell motility. *Oncogene* **34**, 996–1005 (2015).
290. Guan, F., Handa, K. & Hakomori, S. Specific glycosphingolipids mediate epithelial-to-mesenchymal transition of human and mouse epithelial cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 7461–7466 (2009).
291. Guan, F., Schaffer, L., Handa, K. & Hakomori, S. Functional role of gangliotetraosylceramide in epithelial-to-mesenchymal transition process induced by hypoxia and by TGF- β . *FASEB J.* **24**, 4889–4903 (2010).
292. Wang, W., Hind, T., Lam, B. W. S. & Herr, D. R. Sphingosine 1-phosphate signaling induces SNAI2 expression to promote cell invasion in breast cancer cells. *FASEB J.* **33**, 7180–7191 (2019).
293. Mouritsen, O. G. & Zuckermann, M. J. What's so special about cholesterol? *Lipids* **39**, 1101–1113 (2004).
294. Morandi, A., Taddei, M. L., Chiarugi, P. & Giannoni, E. Targeting the Metabolic Reprogramming That Controls Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Aggressive Tumors. *Front. Oncol.* **7**, (2017).
295. Sciacovelli, M. & Frezza, C. Metabolic reprogramming and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *FEBS J.* **284**, 3132–3144 (2017).
296. Sampaio, J. L. *et al.* Membrane lipidome of an epithelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 1903–1907 (2011).
297. Gruenbacher, G. & Thurnher, M. Mevalonate Metabolism in Cancer Stemness and Trained Immunity. *Front. Oncol.* **8**, 394 (2018).
298. Gu, L., Saha, S. T., Thomas, J. & Kaur, M. Targeting cellular cholesterol for anticancer therapy. *FEBS J.* **286**, 4192–4208 (2019).
299. Jiang, S. *et al.* Cholesterol Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Prostate Cancer Cells by Suppressing Degradation of EGFR through APMAP. *Cancer Res.* **79**, 3063–3075 (2019).
300. Wu, Y. *et al.* Hydroxypropyl- β -cyclodextrin attenuates the epithelial-to-mesenchymal transition via endoplasmic reticulum stress in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Mol. Med. Rep.* (2019) doi:10.3892/mmr.2019.10802.
301. Nelson, E. R. *et al.* 27-Hydroxycholesterol Links Hypercholesterolemia and Breast Cancer Pathophysiology. *Science* **342**, 1094–1098 (2013).
302. Shimano, H. & Sato, R. SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology — divergent pathophysiology. *Nat. Rev. Endocrinol.* **13**, 710–730 (2017).
303. Edwards, P. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1529**, 103–113 (2000).

304. Sun, Y. *et al.* SREBP1 regulates tumorigenesis and prognosis of pancreatic cancer through targeting lipid metabolism. *Tumor Biol.* **36**, 4133–4141 (2015).
305. Wang, Y. *et al.* PD-L1 induces epithelial-to-mesenchymal transition via activating SREBP-1c in renal cell carcinoma. *Med. Oncol.* **32**, 212 (2015).
306. Bauer, D. E., Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Andreadis, C. & Thompson, C. B. ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene* **24**, 6314–6322 (2005).
307. Hatzivassiliou, G. *et al.* ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* **8**, 311–321 (2005).
308. Migita, T. *et al.* ATP Citrate Lyase: Activation and Therapeutic Implications in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* **68**, 8547–8554 (2008).
309. Zaidi, N., Swinnen, J. V. & Smans, K. ATP-Citrate Lyase: A Key Player in Cancer Metabolism. *Cancer Res.* **72**, 3709–3714 (2012).
310. Wen, J. *et al.* ACLY facilitates colon cancer cell metastasis by CTNNB1. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **38**, 401 (2019).
311. Hanai, J. *et al.* Inhibition of lung cancer growth: ATP citrate lyase knockdown and statin treatment leads to dual blockade of mitogen-activated protein Kinase (MAPK) and Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT pathways. *J. Cell. Physiol.* **227**, 1709–1720 (2012).
312. Hanai, J., Doro, N., Seth, P. & Sukhatme, V. P. ATP citrate lyase knockdown impacts cancer stem cells in vitro. *Cell Death Dis.* **4**, e696–e696 (2013).
313. Loomis, D. *et al.* The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol.* **14**, 1262–1263 (2013).
314. Fu, Y. *et al.* Inhibition of ATP citrate lyase (ACLY) protects airway epithelia from PM2.5-induced epithelial-mesenchymal transition. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **167**, 309–316 (2019).
315. Svensson, R. U. *et al.* Inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses fatty acid synthesis and tumor growth of non-small-cell lung cancer in preclinical models. *Nat. Med.* **22**, 1108–1119 (2016).
316. Luo, X. *et al.* Emerging roles of lipid metabolism in cancer metastasis. *Mol. Cancer* **16**, 76 (2017).
317. Rios Garcia, M. *et al.* Acetyl-CoA Carboxylase 1-Dependent Protein Acetylation Controls Breast Cancer Metastasis and Recurrence. *Cell Metab.* **26**, 842-855.e5 (2017).
318. Xu, Y. *et al.* Lipid accumulation is ahead of epithelial-to-mesenchymal transition and therapeutic intervention by acetyl-CoA carboxylase 2 silence in diabetic nephropathy. *Metabolism* **63**, 716–726 (2014).
319. Menendez, J. A. & Lupu, R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 763–777 (2007).
320. Kuhajda, F. P. Fatty Acid Synthase and Cancer: New Application of an Old Pathway. *Cancer Res.* **66**, 5977–5980 (2006).
321. Gonzalez-Guerrico, A. M. *et al.* Suppression of endogenous lipogenesis induces reversion of the malignant phenotype and normalized differentiation in breast cancer. *Oncotarget* **7**, 71151–71168 (2016).
322. Li, J. *et al.* Fatty Acid Synthase Mediates the Epithelial-Mesenchymal Transition of Breast Cancer Cells. *Int. J. Biol. Sci.* **10**, 171–180 (2014).

323. Jiang, L. *et al.* Up-Regulated FASN Expression Promotes Transcoelomic Metastasis of Ovarian Cancer Cell through Epithelial-Mesenchymal Transition. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 11539–11554 (2014).
324. Yang, L. *et al.* A FASN-TGF- β 1-FASN regulatory loop contributes to high EMT/metastatic potential of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **7**, 55543–55554 (2016).
325. Singh, R., Yadav, V., Kumar, S. & Saini, N. MicroRNA-195 inhibits proliferation, invasion and metastasis in breast cancer cells by targeting FASN, HMGCR, ACACA and CYP27B1. *Sci. Rep.* **5**, 17454 (2015).
326. Gong, J. *et al.* Inhibition of FASN suppresses migration, invasion and growth in hepatoma carcinoma cells by deregulating the HIF-1 α /IGFBP1 pathway. *Int. J. Oncol.* **50**, 883–892 (2017).
327. Sun, L. *et al.* Small interfering RNA-mediated knockdown of fatty acid synthase attenuates the proliferation and metastasis of human gastric cancer cells via the mTOR/Gli1 signaling pathway. *Oncol. Lett.* (2018) doi:10.3892/ol.2018.8648.
328. Jiang, L. *et al.* Metabolic reprogramming during TGF β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene* **34**, 3908–3916 (2015).
329. Zielinska, H. A., Holly, J. M. P., Bahl, A. & Perks, C. M. Inhibition of FASN and ER α signalling during hyperglycaemia-induced matrix-specific EMT promotes breast cancer cell invasion via a caveolin-1-dependent mechanism. *Cancer Lett.* **419**, 187–202 (2018).
330. Rossi Sebastiano, M. & Konstantinidou, G. Targeting Long Chain Acyl-CoA Synthetases for Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3624 (2019).
331. Chen, W.-C. *et al.* Systematic Analysis of Gene Expression Alterations and Clinical Outcomes for Long-Chain Acyl-Coenzyme A Synthetase Family in Cancer. *PLOS ONE* **11**, e0155660 (2016).
332. Belkaid, A., Ouellette, R. J. & Surette, M. E. 17 β -estradiol-induced ACSL4 protein expression promotes an invasive phenotype in estrogen receptor positive mammary carcinoma cells. *Carcinogenesis* **38**, 402–410 (2017).
333. Sánchez-Martínez, R., Cruz-Gil, S., García-Álvarez, M. S., Reglero, G. & Ramírez De Molina, A. Complementary ACSL isoforms contribute to a non-Warburg advantageous energetic status characterizing invasive colon cancer cells. *Sci. Rep.* **7**, 11143 (2017).
334. Sánchez-Martínez, R. *et al.* A link between lipid metabolism and epithelial-mesenchymal transition provides a target for colon cancer therapy. *Oncotarget* **6**, 38719–38736 (2015).
335. Schwab, A. *et al.* Zeb1 mediates EMT/plasticity-associated ferroptosis sensitivity in cancer cells by regulating lipogenic enzyme expression and phospholipid composition. *Nat. Cell Biol.* **26**, 1470–1481 (2024).
336. Wright, H. J. *et al.* CDCP1 drives triple-negative breast cancer metastasis through reduction of lipid-droplet abundance and stimulation of fatty acid oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, (2017).
337. Tracz-Gaszewska, Z. & Dobrzyn, P. Stearoyl-CoA Desaturase 1 as a Therapeutic Target for the Treatment of Cancer. *Cancers* **11**, 948 (2019).
338. Mauvoisin, D., Charfi, C., Lounis, A. M., Rassart, E. & Mounier, C. Decreasing stearoyl-CoA desaturase-1 expression inhibits β -catenin signaling in breast cancer cells. *Cancer Sci.* **104**, 36–42 (2013).

339. Ran, H. *et al.* Stearoyl-CoA desaturase-1 promotes colorectal cancer metastasis in response to glucose by suppressing PTEN. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**, 54 (2018).
340. She, K. *et al.* SCD1 is required for EGFR-targeting cancer therapy of lung cancer via re-activation of EGFR/PI3K/AKT signals. *Cancer Cell Int.* **19**, 103 (2019).
341. Puglisi, R. *et al.* SCD5 restored expression favors differentiation and epithelial-mesenchymal reversion in advanced melanoma. *Oncotarget* **9**, 7567–7581 (2018).
342. Ganner, A. *et al.* SCD5 Regulation by VHL Affects Cell Proliferation and Lipid Homeostasis in ccRCC. *Cells* **12**, 835 (2023).
343. Chen, E., Wang, C., Lv, H. & Yu, J. The role of fatty acid desaturase 2 in multiple tumor types revealed by bulk and single-cell transcriptomes. *Lipids Health Dis.* **22**, 25 (2023).
344. Frontiers | Investigating the role of FADS family members in breast cancer based on bioinformatic analysis and experimental validation.
<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1074242/full>.
345. Febbraio, M., Hajjar, D. P. & Silverstein, R. L. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* **108**, 785–791 (2001).
346. Hale, J. S. *et al.* Cancer Stem Cell-Specific Scavenger Receptor CD36 Drives Glioblastoma Progression. *Stem Cells* **32**, 1746–1758 (2014).
347. Pascual, G. *et al.* Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature* **541**, 41–45 (2017).
348. Nath, A. & Chan, C. Genetic alterations in fatty acid transport and metabolism genes are associated with metastatic progression and poor prognosis of human cancers. *Sci. Rep.* **6**, 18669 (2016).
349. Deng, M. *et al.* CD36 promotes the epithelial–mesenchymal transition and metastasis in cervical cancer by interacting with TGF- β . *J. Transl. Med.* **17**, 352 (2019).
350. Hou, Y. *et al.* CD36 is involved in high glucose-induced epithelial to mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **468**, 281–286 (2015).
351. Liang, Y. *et al.* CD36 plays a critical role in proliferation, migration and tamoxifen-inhibited growth of ER-positive breast cancer cells. *Oncogenesis* **7**, 98 (2018).
352. Furuhashi, M. & Hotamisligil, G. S. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 489–503 (2008).
353. Nieman, K. M. *et al.* Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat. Med.* **17**, 1498–1503 (2011).
354. Lee, D. *et al.* Expression of fatty acid binding protein 4 is involved in the cell growth of oral squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* **31**, 1116–1120 (2014).
355. Barretina, J. *et al.* The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* **483**, 603–607 (2012).
356. Mukherjee, A. *et al.* Adipocyte-Induced FABP4 Expression in Ovarian Cancer Cells Promotes Metastasis and Mediates Carboplatin Resistance. *Cancer Res.* **80**, 1748–1761 (2020).
357. Gharpure, K. M. *et al.* FABP4 as a key determinant of metastatic potential of ovarian cancer. *Nat. Commun.* **9**, 2923 (2018).

358. Zhao, D., Ma, Y., Li, X. & Lu, X. microRNA-211 promotes invasion and migration of colorectal cancer cells by targeting FABP4 via PPAR γ . *J. Cell. Physiol.* **234**, 15429–15437 (2019).
359. Dettmer, K., Aronov, P. A. & Hammock, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* **26**, 51–78 (2007).
360. Jacob, M., Lopata, A. L., Dasouki, M. & Abdel Rahman, A. M. Metabolomics toward personalized medicine. *Mass Spectrom. Rev.* **38**, 221–238 (2019).
361. Johnson, C. H., Ivanisevic, J. & Siuzdak, G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 451–459 (2016).
362. Kuehnbaum, N. L. & Britz-McKibbin, P. New advances in separation science for metabolomics: resolving chemical diversity in a post-genomic era. *Chem. Rev.* **113**, 2437–2468 (2013).
363. Roca, M., Alcoriza, M. I., Garcia-Cañaveras, J. C. & Lahoz, A. Reviewing the metabolome coverage provided by LC-MS: Focus on sample preparation and chromatography-A tutorial. *Anal. Chim. Acta* **1147**, 38–55 (2021).
364. Wishart, D. S. *et al.* HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Res.* **50**, D622–D631 (2022).
365. Wenk, M. R. The emerging field of lipidomics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 594–610 (2005).
366. Alonso, A., Marsal, S. & Julià, A. Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3**, 23 (2015).
367. Emwas, A.-H. M. The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1277**, 161–193 (2015).
368. Gasperoni, J. G., Fuller, J. N., Darido, C., Wilanowski, T. & Dworkin, S. Grainyhead-like (Grhl) Target Genes in Development and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 2735 (2022).
369. Smit, M. M., Feller, K. J., You, L. & Chien, M.-P. Protocol for profiling *in vitro* intratumor heterogeneity using spatially annotated single-cell sequencing. *STAR Protoc.* **4**, 102447 (2023).
370. Huang, K. *et al.* High expression of MARVELD3 as a potential prognostic biomarker for oral squamous cell carcinoma. *Front. Genet.* **13**, 1050402 (2022).
371. Pucci, M., Malagolini, N. & Dall’Olio, F. Glycobiology of the Epithelial to Mesenchymal Transition. *Biomedicines* **9**, 770 (2021).
372. Levade, T., Andrieu-Abadie, N., Micheau, O., Legembre, P. & Ségui, B. Sphingolipids modulate the epithelial–mesenchymal transition in cancer. *Cell Death Discov.* **1**, 1–2 (2015).
373. Cumin, C. *et al.* Glycosphingolipids are mediators of cancer plasticity through independent signaling pathways. *Cell Rep.* **40**, (2022).
374. Dragonas, C., Bertsch, T., Sieber, C. C. & Brosche, T. Plasmalogens as a marker of elevated systemic oxidative stress in Parkinson’s disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* **47**, 894–897 (2009).
375. Katz-Brull, R., Seger, D., Rivenson-Segal, D., Rushkin, E. & Degani, H. Metabolic markers of breast cancer: enhanced choline metabolism and reduced choline-ether-phospholipid synthesis. *Cancer Res.* **62**, 1966–1970 (2002).

376. Kang, Y. P. *et al.* Spheroid-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Provokes Global Alterations of Breast Cancer Lipidome: A Multi-Layered Omics Analysis. *Front. Oncol.* **9**, (2019).
377. Dean, J. M. & Lodhi, I. J. Structural and functional roles of ether lipids. *Protein Cell* **9**, 196–206 (2018).
378. Fu, R. *et al.* SOAT1 regulates cholesterol metabolism to induce EMT in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis.* **15**, 1–14 (2024).
379. Li, J. *et al.* Abrogating cholesterol esterification suppresses growth and metastasis of pancreatic cancer. *Oncogene* **35**, 6378–6388 (2016).
380. Ali, O. & Szabó, A. Review of Eukaryote Cellular Membrane Lipid Composition, with Special Attention to the Fatty Acids. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 15693 (2023).
381. Ferreri, C., Sansone, A., Ferreri, R., Amézaga, J. & Tueros, I. Fatty Acids and Membrane Lipidomics in Oncology: A Cross-Road of Nutritional, Signaling and Metabolic Pathways. *Metabolites* **10**, 345 (2020).
382. Gemmill, R. M. *et al.* ZEB1-Responsive Genes in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Lett.* **300**, 66–78 (2011).
383. Parsana, P., Amend, S. R., Hernandez, J., Pienta, K. J. & Battle, A. Identifying global expression patterns and key regulators in epithelial to mesenchymal transition through multi-study integration. *BMC Cancer* **17**, 447 (2017).
384. Igal, R. A. & Sinner, D. I. Stearoyl-CoA desaturase 5 (SCD5), a Δ -9 fatty acyl desaturase in search of a function. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1866**, 158840 (2021).
385. Wang, H. *et al.* A systematic approach identifies FOXA1 as a key factor in the loss of epithelial traits during the epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer. *BMC Genomics* **14**, 680 (2013).
386. Moya, M. *et al.* Foxa1 reduces lipid accumulation in human hepatocytes and is down-regulated in nonalcoholic fatty liver. *PloS One* **7**, e30014 (2012).
387. Zhang, J. Y. *et al.* Fads3 modulates docosahexaenoic acid in liver and brain. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **123**, 25–32 (2017).
388. Pédrone, F. *et al.* The fatty acid desaturase 3 gene encodes for different FADS3 protein isoforms in mammalian tissues. *J. Lipid Res.* **51**, 472–479 (2010).
389. Blanchard, H., Legrand, P. & Pédrone, F. Fatty Acid Desaturase 3 (Fads3) is a singular member of the Fads cluster. *Biochimie* **93**, 87–90 (2011).
390. Rioux, V. & Legrand, P. Fatty Acid Desaturase 3 (FADS3) Is a Specific Δ 13-Desaturase of Ruminant trans-Vaccenic Acid. *Lifestyle Genomics* **12**, 18–24 (2019).
391. Jojima, K., Edagawa, M., Sawai, M., Ohno, Y. & Kihara, A. Biosynthesis of the anti-lipid-microdomain sphingoid base 4,14-sphingadiene by the ceramide desaturase FADS3. *FASEB J.* **34**, 3318–3335 (2020).
392. Jojima, K. & Kihara, A. Metabolism of sphingadiene and characterization of the sphingadiene-producing enzyme FADS3. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1868**, 159335 (2023).
393. Karsai, G. *et al.* FADS3 is a Δ 14Z sphingoid base desaturase that contributes to gender differences in the human plasma sphingolipidome. *J. Biol. Chem.* **295**, 1889–1897 (2020).
394. Adams, D. R., Pyne, S. & Pyne, N. J. Structure-function analysis of lipid substrates and inhibitors of sphingosine kinases. *Cell. Signal.* **76**, 109806 (2020).

-
395. Su, K., Wang, Y., Gu, H., Ma, L. & Xuan, G. Overexpression of fatty acid desaturase 3 predicts poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Medicine (Baltimore)* **101**, e32119 (2022).
 396. Chambers, I. & Tomlinson, S. R. The transcriptional foundation of pluripotency. *Dev. Camb. Engl.* **136**, 2311–2322 (2009).
 397. Fina, E. *et al.* Gene signatures of circulating breast cancer cell models are a source of novel molecular determinants of metastasis and improve circulating tumor cell detection in patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **41**, 78 (2022).
 398. Han, L. *et al.* Gene signature based on B cell predicts clinical outcome of radiotherapy and immunotherapy for patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Med.* **9**, 9581–9594 (2020).
 399. Tan, S. T., Ramesh, T., Toh, X. R. & Nguyen, L. N. Emerging roles of lysophospholipids in health and disease. *Prog. Lipid Res.* **80**, 101068 (2020).
 400. Han, X. *et al.* Potential predictive value of serum targeted metabolites and concurrently mutated genes for EGFR-TKI therapeutic efficacy in lung adenocarcinoma patients with EGFR sensitizing mutations. *Am. J. Cancer Res.* **10**, 4266–4286 (2020).