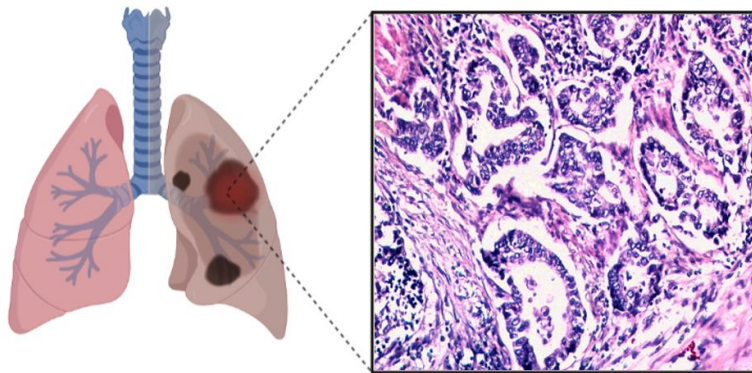




UNIVERSITAT  
ROVIRA i VIRGILI

*cnio* *stop cancer*

**Papel de CIC (Capicua) en el cáncer de pulmón y validación de dianas moleculares para su tratamiento**



LUCÍA FUENTES CANTOS

**TRABAJO FINAL DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA**

Tutor académico: Dr. Maria Teresa Blay Olivé, Departamento de Bioquímica y Biotecnología URV, [mteresa.blay@urv.cat](mailto:mteresa.blay@urv.cat)

Cooperación con: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

Supervisor: Dr. Matthias Drosten, Grupo Oncología Experimental, [mdrosten@cnio.es](mailto:mdrosten@cnio.es)

Junio 2021

Yo, Lucía Fuentes Cantos, con DNI 23905380P, soy conocedor de la guía de prevención del plagio a la URV *Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes* (aprobada en julio de 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 7 de junio de 2021

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a horizontal line extending to the right.

## **ÍNDICE:**

DATOS DEL CENTRO.....	1
AGRADECIMIENTOS .....	1
RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
1.Generalidades del cáncer .....	3
2.Contextualización.....	3
3.Clasificación CP .....	4
4.Factores de riesgo en el CP .....	5
5.Mutaciones frecuentes en el cáncer de pulmón.....	6
6.Proteínas Ras.....	6
• Activación proteínas Ras.....	7
7.Vía Ras/MAPK (Proteína quinasa activada por mitógenos) .....	8
8.Inhibición de <i>K-RAS</i> como terapia antitumoral.....	9
9.Gen supresor de tumores <i>CIC</i> (Capicua) .....	11
10.Cribado y búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para el CPCNP .....	12
• c-SRC .....	13
• PFKFB3.....	14
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
1.Líneas celulares empleadas en este trabajo .....	17
2.Transfecciones lentivirales .....	18
3.Infecciones lentivirales.....	21
4.Ensayos de proliferación celular .....	21
5.Curva dosis-respuesta.....	22
6.Análisis de proteínas .....	22
7.Extracción de ADN .....	23
8.PCR cuantitativa a tiempo real (q-RT-PCR) con SYBR Green I.....	24
9.Cribado de alto rendimiento .....	25
10.Estadística .....	25
RESULTADOS .....	26

DISCUSIÓN .....	33
BIBLIOGRAFÍA.....	38
AUTOEVALUACIÓN .....	44
ANEXOS.....	45

---

## **DATOS DEL CENTRO**

---

El Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) es una institución pública española dedicada a la investigación, diagnóstico y tratamiento del cáncer. Su sede está en el campus de Chamartín del Instituto de Salud Carlos III, en Madrid.

Actualmente el CNIO tiene 22 Grupos de Investigación, organizados en 8 Programas Científicos, más 4 Unidad(es) de Investigación Clínica dentro del Programa de Investigación Clínica. Estos científicos están apoyados por 17 Unidades de Apoyo a la Investigación dotadas de las más modernas instalaciones y conocimientos técnicos. También tiene un Programa de Terapias Experimentales con 4 Secciones, dedicadas exclusivamente al descubrimiento de fármacos.

Dentro del Programa de Oncología Molecular se encuentra el Grupo de Oncología Experimental liderado por el Dr. Mariano Barbacid. Este grupo de investigación se centra en la búsqueda y validación de dianas terapéuticas para tumores de pulmón y páncreas impulsados por el oncogén *K-RAS*. Para ello, han creado una nueva generación de modelos de tumores de ratón modificados genéticamente que permite la evaluación de las propiedades antitumorales, así como los posibles efectos tóxicos en el tumor, con el objetivo de trasladar los resultados a la clínica.

---

## **AGRADECIMIENTOS**

---

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, en especial a mis padres, por apoyarme, confiar en mí y proporcionarme la educación necesaria para poder llegar hasta aquí. A mis amigos y a todas las personas que me han acompañado, apoyado, aconsejado y ayudado durante estos cuatro años. A Mayte Blay por tutorizar el trabajo y aconsejarme durante su realización.

Por último, me gustaría agradecer al Dr. Mariano Barbacid, por brindarme la oportunidad de realizar las prácticas y el TFG en su grupo de investigación. También, a todos los integrantes del Grupo de Oncología Experimental por ayudarme en todas mis dudas y ser tan atentos conmigo.

Pero, en especial, a Matthias Drosten, por haberme guiado en la realización de este trabajo, por su gran implicación y dedicación desde el primer momento y, sobre todo, por lo que me ha enseñado durante estos meses.

¡Muchas gracias!

---

## RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

---

*CIC* (Capicua) es un gen que está directamente involucrado en el cáncer. Su importancia radica no solo en su implicación en diferentes tipos de cáncer y en metástasis, sino también por su papel como factor regulado negativamente a través de la vía *K-RAS/MAPK* (la ruta de señalización más frecuentemente alterada en cáncer). Varios estudios indicaron que la ausencia, la inactivación o las mutaciones en *CIC* causan resistencia a la inhibición de esta vía mediante la desregulación constitutiva de sus genes diana. En este proyecto se estudió el papel de *CIC* en el cáncer de pulmón, su relación con el oncogén *K-RAS* y su implicación en la resistencia a tratamientos antitumorales. Para su realización se compararon líneas celulares extraídas de ratones modificados genéticamente, impulsados por mutaciones en *K-RAS/p53* o *CIC/p53*. Ambas líneas fueron caracterizadas y no presentaron diferencias en la proliferación o activación de las vías de señalización. Tras la inhibición de *ETV4*, *ETV5*, las dianas más relevantes de *CIC*, no se detectaron diferencias significativas entre los dos tipos celulares. En cambio, las líneas con genotipo *CIC/p53* fueron más sensibles a la inhibición de *c-SRC* y *PFKFB3*, dianas previamente identificadas para superar la resistencia mediada por ausencia de *CIC*.

**Palabras clave:** *CIC* (Capicua), *K-RAS*, cáncer de pulmón, MAPK, resistencia tumoral

*CIC* (also known as Capicua) is a factor directly involved in cancer development. Its relevance not only stems from its involvement in different types of cancer and metastasis, but also from its role as a protein negatively regulated via the *K-RAS/MAPK* pathway (the most frequently altered signalling pathway in cancer). Several studies have indicated that the absence, inactivation or mutations in *CIC* cause resistance to inhibition of this pathway through constitutive deregulation of its target genes. In this project we studied the role of *CIC* in lung cancer, its relationship with the *K-RAS* oncogene and its involvement in resistance to anti-tumor treatments. Cell lines extracted from genetically modified mice, driven by mutations in *K-RAS/p53* or *CIC/p53*, were used in this study. Cell lines with each genotype were characterized and showed no differences in proliferation or activation of signalling pathways. After inhibition of *ETV4* or *ETV5*, the most relevant targets of *CIC*, no significant differences were detected between the two groups. In contrast, *CIC/p53* cell lines were more sensitive to the inhibition of *c-SRC* and *PFKFB3*, two targets previously identified to overcome resistance to MAPK pathway inhibitors due the absence of *CIC*.

**Key words:** *CIC* (Capicua), *K-RAS*, lung cancer, MAPK, tumor resistance

---

## INTRODUCCIÓN

---

### 1. Generalidades del cáncer

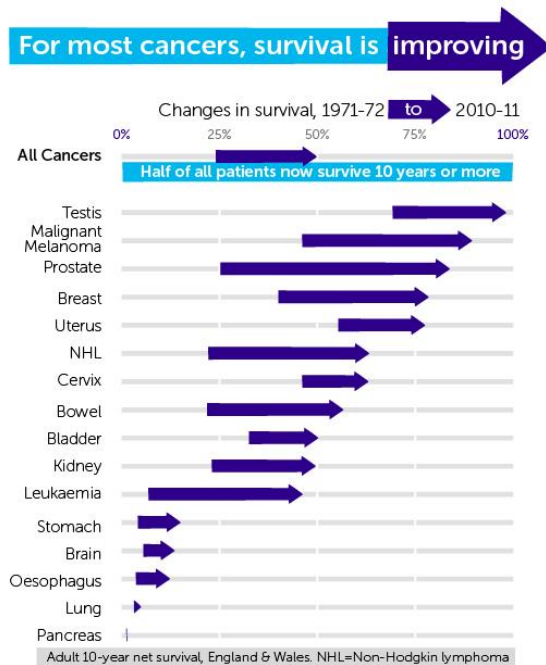
La proliferación celular consiste en el aumento del número de células como resultado del crecimiento y la división celular (*Definición de Proliferación Celular - Diccionario de Cáncer Del NCI - Instituto Nacional Del Cáncer*, n.d.). Por tanto, es un proceso muy controlado y regulado por una amplia red de vías de señalización que proporcionan señales tanto positivas como negativas para ajustar con precisión el resultado deseado.

En general, la proliferación y la muerte celular están bien equilibradas para mantener un número constante de células en tejidos y órganos (Schutte & Ramaekers, 2000). Sorprendentemente, cuando se desregula, la proliferación excesiva puede provocar diferentes patologías, como el cáncer. El término cáncer engloba un grupo numeroso de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de células anormales, que se dividen, crecen y se diseminan sin control en cualquier parte del cuerpo (Hanahan & Weinberg, 2011).

### 2. Contextualización

El cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de morbi-mortalidad del mundo con aproximadamente 19,3 millones de casos nuevos en el año 2020 (datos disponibles a nivel mundial estimados dentro del proyecto GLOBLOCAN de la International Agency for Research Cancer)(Sung et al., 2021). Sin embargo, la pandemia de la COVID-19 ha afectado el número de diagnósticos de cáncer por lo que probablemente el número real de cánceres diagnosticados en 2020 habrá sido menor. Las estimaciones poblacionales indican que el número de casos nuevos a nivel mundial aumentará en las dos próximas décadas hasta 30,2 millones al año en 2040 (SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica - SEOM: Sociedad Espa, n.d.).

La evaluación del progreso en el control del cáncer se ha vuelto crucial. Las tendencias de supervivencia al cáncer basadas en la población proporcionan una visión clave de la eficacia general del sistema de salud, junto con la incidencia y la mortalidad (Figura 1) (Quaresma et al., 2015).



**Figura 1.** Estudio de supervivencia basado en un grupo poblacional de 7176795 adultos (de 15 a 99 años) diagnosticados con una primera neoplasia maligna invasiva primaria en Inglaterra y Gales durante 1971-2011, y seguidos hasta el 31 de diciembre de 2012. Se analizaron las tendencias de supervivencia de los diferentes tipos de cáncer y se observó que la supervivencia en la mayoría de los cánceres está aumentando, pero no en el cáncer de pulmón, que aún sigue presentando un mal pronóstico. (Quaresma et al., 2015)

Durante la última década se han producido cambios notables en la epidemiología y la prevención del cáncer de pulmón debido a los avances revolucionarios en la comprensión de la genética, el papel del sistema inmunológico y las opciones de tratamiento de este tipo de cáncer. A pesar de estos avances, el cáncer de pulmón sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer (Bade & Dela Cruz, 2020). Su crecimiento ha sido exponencial en los últimos sesenta años, pasando a ser el cáncer con mayor incidencia y número de muertes a nivel mundial (Ferlay et al., 2021).

### 3. Clasificación CP

Hay dos formas de carcinoma pulmonar, categorizados por el tamaño y apariencia de las células malignas vistas histopatológicamente (Inamura, 2017):

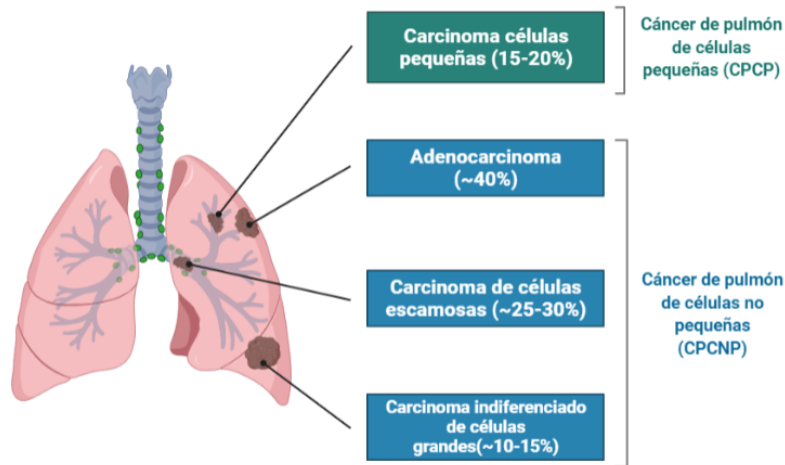
- **Cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) o microcítico:** constituye aproximadamente el 15-20% de las neoplasias pulmonares. Recibe su nombre por el pequeño tamaño de las células de las que se compone. Su diseminación es muy alta desde las primeras fases, al igual que su nivel de agresividad y en el 60-70% de los casos la enfermedad está diseminada en el momento del diagnóstico.
- **Cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) o no microcítico:** este es el tipo más común de CP y representa el 85-90% de todos los cánceres de pulmón (Majem et al., 2019). Son cánceres que se desarrollan en las células epiteliales del pulmón y, dependiendo de donde se origine, será de un subtipo u otro:

- **Adenocarcinoma (40 %):** Se origina en la periferia de los pulmones y bajo el revestimiento de los bronquios. Es un tipo de tumor epitelial maligno, que puede mostrar diferentes patrones de crecimiento.

El trabajo expuesto se basa en el uso de líneas celulares murinas de adenocarcinoma, el tipo de CPCNP más frecuente.

- **Carcinoma de células escamosas (25-30%):** También llamado carcinoma epidermoide. Por lo general se inicia en los bronquios y no suele extenderse tan rápido como otros tipos de CP.
- **Carcinoma indiferenciado de células grandes (15-20%):** Grupo de tumores malignos de células grandes de aspecto anormal. Por lo general se inician en los bordes exteriores de los pulmones. Es el tipo menos frecuente de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

El CPCNP suele ser relativamente insensible a la quimioterapia y la radioterapia en comparación con el CPCP. Se ha comprobado que, la extirpación de todo el lóbulo pulmonar (lobectomía) es el tipo de cirugía más eficaz, incluso en tumores muy pequeños. Muchas veces no es posible realizar esta cirugía y los esfuerzos en investigación para el tratamiento de este tipo de CP están cada vez más enfocados a las denominadas “terapias dirigidas”, unos nuevos fármacos que se dirigen específicamente frente a determinadas dianas celulares, que pueden localizarse en las propias células tumorales o en otras.



**Figura 2.** Clasificación del cáncer de pulmón.

#### 4. Factores de riesgo en el CP

Hay varios factores de riesgo que pueden hacer que aumenten las probabilidades de padecer cáncer de pulmón. En la actualidad, no solo son carcinógenos aquellos factores que favorecen la aparición de mutaciones, sino que también se sabe que compuestos no mutagénicos pueden promover la

aparición del cáncer al inducir una proliferación celular excesiva (Molina et al., 2008). Generalmente, pasa mucho tiempo desde la exposición a los carcinógenos hasta la aparición clínica del cáncer antes de que puedan ocurrir todas las etapas de la carcinogénesis.

En el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), el principal factor de riesgo es el tabaco, que es la causa principal, ya que está relacionado con el 80% de los casos existentes. El riesgo de CP en los fumadores es casi 20 veces mayor que en los no fumadores. Cuanto más fuman y durante más tiempo, mayor es el riesgo de cáncer de pulmón.

Otros factores de riesgo del CPCNP son la exposición a carcinógenos pulmonares, como asbesto, arsénico, berilio y otros metales, la radiación de alta frecuencia, la contaminación ambiental, radioterapia previa en los pulmones, antecedentes familiares con CP, ... Estos factores y otros motivos desconocidos pueden provocar cambios en las células madre del tejido pulmonar, lo que puede derivar en cáncer (Malhotra et al., 2016).

## **5. Mutaciones frecuentes en el cáncer de pulmón**

El conocimiento completo de los genes que subyacen a los cánceres humanos es una base fundamental para el diagnóstico del cáncer, tratamiento, diseño de ensayos clínicos y la selección de terapias de combinación racionales (Lawrence et al., 2014). El análisis genómico de más de 4700 tumores humanos ha identificado más de 200 genes que inducen tumoración. Entre ellos destacan el homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten (*K-RAS*), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), el supresor tumoral *TP53*, el gen del retinoblastoma (*RB*)... (Greulich, 2010). De todos ellos, el oncogén que muta con mayor frecuencia parece ser el homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten (*K-RAS*), un oncogén mutado en más de una cuarta parte de todos los tumores humanos (Drosten et al., 2018).

## **6. Proteínas Ras**

Como se ha mencionado, existe una importante relación entre los adenocarcinomas de pulmón y las mutaciones en el oncogén *K-RAS*. Este hecho ha producido un gran interés en inhibir dicha proteína como un posible tratamiento frente a este tipo de CPCNP. Para poder realizarlo se ha estudiado intensamente durante más de 40 años la señalización de *K-RAS*. Estos estudios han revelado que las principales vías de señalización que transmiten la actividad oncogénica de *K-RAS* son cascadas de quinasas que podrían ser susceptibles de interferencia con inhibidores selectivos (Drosten et al., 2018). Por lo tanto, es esencial comprender mejor la señalización de *K-RAS* y desarrollar sistemas

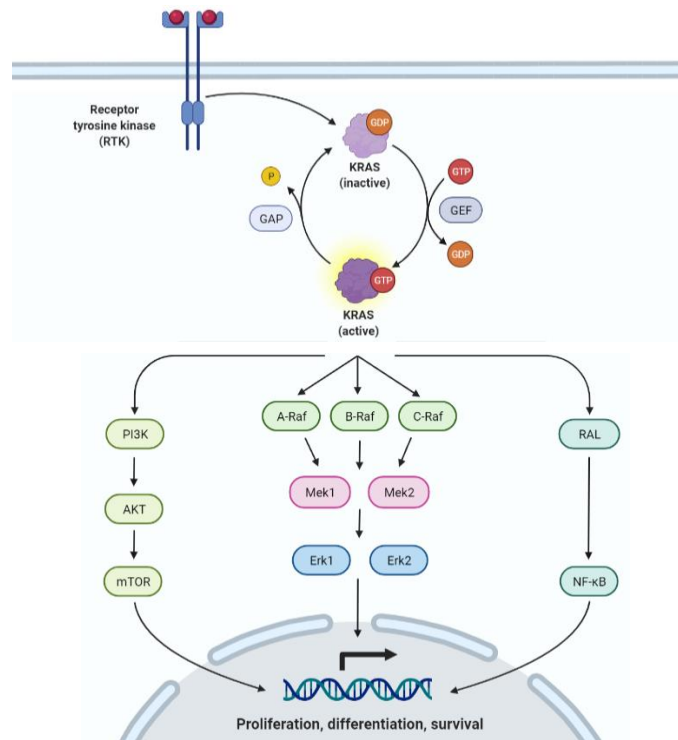
experimentales en los que los científicos puedan probar estrategias terapéuticas novedosas que eventualmente se puedan trasladar a la clínica.

Los tres miembros de la familia Ras que se han evaluado ampliamente en humanos son *K-RAS*, el homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata del neuroblastoma (*N-RAS*) y el homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Harvey (*H-RAS*). Curiosamente, en el cáncer humano, la frecuencia y distribución de mutaciones en las diferentes isoformas no son uniformes, *K-RAS* es la isoforma que se altera con mayor frecuencia en el 86% de los casos de cáncer con mutaciones en *Ras*, seguida de *N-RAS* en un 11% y *H-RAS* en un 3% (Uras et al., 2020). Hasta la fecha, las mutaciones de *K-RAS* más frecuentes en el CPCNP se han documentado en los codones 12 y 13. Entre ellos, la glicina 12 a cisteína (G12C) y la glicina 12 a valina (G12V) son los subtipos más comunes asociados con antecedentes de tabaquismo, mientras que la glicina 12 a ácido aspártico (G12D) se encuentra principalmente en personas que nunca han fumado. La mutación *K-RAS*<sup>G12C</sup> es muy prevalente en pacientes que padecen adenocarcinoma de pulmón (13% del adenocarcinoma pulmonar total) y representa más del 50% de todos los casos de mutantes *K-RAS* (Uras et al., 2020).

- **Activación proteínas Ras**

Los miembros de la familia de genes *Ras* codifican una pequeña GTPasa unida a la membrana y ciclan entre el estado unido al trifosfato de guanosina activo (GTP) y al difosfato de guanosina inactivo (GDP). La activación de la señalización *Ras* está estrictamente controlada por los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) que promueven el intercambio de GDP a GTP. Ras-GTP activo pasa a Ras-GDP inactivo mediante las proteínas activadoras de GTPasa (GAP) (Hennig et al., 2015). La familia Ras transmite señales mitogénicas que se transducen desde los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptores tirosina quinasa (RTK)... hasta diferentes vías de transducción de señales. La activación de estos receptores tras recibir una señal extracelular provoca su autofosforilación generando sitios de unión para proteínas adaptadoras como Grb2. La asociación de Grb2 con receptores activados recluta a SOS, uno de los GEF mejor caracterizados (Baltanás et al., 2020). Esta interacción, induce la activación de Ras con la formación del complejo activo RAS-GTP. En su estado unido a GTP, Ras interactúa directamente y activa varias vías efectoras aguas abajo, incluidas las vías de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), atribuida a señales mitogénicas, la vía fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), responsable de la supervivencia celular y finalmente la vía estimuladora de disociación de nucleótidos de guanina Ral (RALGDS) que activa la familia Ral de pequeñas GTPasas implicadas en la exocitosis y otros procesos (Figura 3). Las mutaciones oncogénicas en las proteínas Ras deterioran su capacidad para la hidrólisis de GTP, lo que da como resultado la acumulación de Ras activo unido a GTP y la

hiperactivación de cascadas de señalización aguas abajo que conducen a la proliferación y supervivencia celular descontroladas. (Uras et al., 2020).



**Figura 3.** Vía de señalización *K-RAS*

## 7. Vía Ras/MAPK (Proteína quinasa activada por mitógenos)

Como hemos visto anteriormente las proteínas Ras están implicadas en la activación de diversos efectores, entre ellos la vía de señalización Ras/MAPK, la mejor estudiada y más frecuentemente alterada en cáncer (Guo et al., 2020). Las vías de señalización Ras/MAPK se encuentran en todos los organismos eucariotas y regulan una multitud de procesos celulares importantes como la proliferación, diferenciación, supervivencia, metabolismo y control del ciclo celular.

El primer efector de la vía que es activado por Ras es la MAP-quinasa-quinasa-quinasa, conocida también como Raf. A su vez, Raf activa, mediante fosforilación, la MAP-quinasa-quinasa o Mek. Finalmente, Mek activa la MAP-quinasa o Erk. Por tanto, la estructura básica de la vía MAPK consiste en un módulo de tres quinasas (Raf, Mek y Erk) que se activan de manera secuencial al fosforilarse (Figura 3). Mientras que Raf y Mek son de localización citoplásmica, Erk tiene la

capacidad de translocarse al núcleo, y ahí puede fosforilar directamente un gran número de factores de transcripción (Degirmenci et al., 2020).

## **8. Inhibición de *K-RAS* como terapia antitumoral**

Aunque *K-RAS* fue uno de los primeros impulsores oncogénicos descubiertos, las terapias dirigidas efectivas a este oncogén siguen siendo difíciles de alcanzar. Los cánceres de pulmón inducidos por mutaciones en *K-RAS* tienen peores pronósticos tanto en la etapa inicial como en los entornos metastásicos avanzados, lo que ilustra la necesidad crítica de nuevos agentes que se dirijan al CPCNP impulsado por este oncogén (Uras et al., 2020).

Se han desarrollado numerosas estrategias terapéuticas, como el uso de oligonucleótidos antisentido que se unen al ARNm, e inhiben la expresión de Ras. Este enfoque presentaba diversos problemas ya que por un lado, los vectores virales usados no dirigían específicamente estas moléculas a las células diana y por otro, los oligonucleótidos tenían una vida media baja (Georges et al., 1993).

Tras estas dificultades, se intentó bloquear la asociación de *K-RAS* a la membrana, ya que se sabe que las proteínas Ras requieren la unión a la membrana para su activación biológica, lo que convierte este hecho en un objetivo para el desarrollo de fármacos anti-Ras. Por ello, se intentó bloquear la farnesil transferasa (FTasa), una enzima que participa en la modificación postraduccional de las proteínas Ras al unir covalentemente un grupo farnesilo (prenilación) a dicha proteína. Este hecho hace que la proteína Ras se transloque a la membrana permitiendo su activación (Johnson & Heymach, 2004). Sin embargo, tras una serie de estudios se vio que en ausencia de la farnesil transferasa (FTasa) no se impedía el desarrollo de tumores de pulmón impulsados por *K-RAS*. Esto se debía a que las proteínas *K-RAS* pueden ser geranilgeraniladas alternativamente por la geranilgeraniltransferasa I (GGTasa I), teniendo así un mecanismo de escape a la inhibición de la activación de Ras (Appels et al., 2005). También se pensó en bloquear el receptor EGFR para evitar la activación de las proteínas Ras con fármacos como Erlotinib o Gefitinib, pero estos demostraron poco o ningún beneficio para pacientes con mutaciones en *K-RAS* (Uras et al., 2020).

Por otro lado, se intentó inhibir directamente Ras pero las mutaciones más frecuentes en Ras (codones 12 y 13) son inactivantes y además presentan una elevada afinidad por GTP y, por lo tanto, señalizan de forma persistente necesitando una inhibición más potente que la otorgada por los inhibidores (Young et al., 2009). Estudios actuales han identificado inhibidores de *K-RAS*<sup>G12C</sup> que parece ser superan esa limitación al bloquear los alelos mutantes específicos. Este fármaco actúa selectivamente al formar una unión covalente con la cisteína mutante provocando así que Ras se mantenga en su

estado inactivo (Ras-GDP) (Bar-Sagi et al., 2020). Este inhibidor se denomina Sotorasib (AMG510) y fue aprobado el 28 de mayo de este año. Este avance ha sido muy relevante y se considera la primera terapia dirigida aprobada para pacientes con CPCNP inducido por la mutación *K-RAS*<sup>G12C</sup> (FDA Approves Amgen Drug for Lung Cancer with Specific Mutation, n.d.).

Paralelamente también se han estudiado biomarcadores para el uso en inmunoterapia. Se ha visto que los cánceres escapan a la vigilancia inmunológica al expresar de manera aberrante puntos de control inmunitarios que los enmascara del sistema inmunológico del huésped y por ello bloquear estos puntos de control y otras proteínas implicadas usando anticuerpos monoclonales está mejorando las opciones del tratamiento del CPCNP, aunque el único biomarcador aprobado por la FDA en pacientes con adenocarcinoma pulmonar tiene una modesta sensibilidad (Uras et al., 2020).

Los intentos fallidos de apuntar a los niveles de expresión de esta proteína, a su actividad y finalmente a la propia proteína han llevado a actuar directamente sobre las vías de señalización en las que actúan las proteínas Ras: MAPK, PI3K, RALGDS. Se ha visto que diferentes codones *K-RAS* muestran una preferencia por activar diferentes señales descendentes (Uras et al., 2020). La hiperactivación de la vía MAPK es una característica clave en el cáncer de pulmón provocado por *K-RAS*.

Los efectores directos de Ras aguas abajo en la vía MAPK son las quinasas Raf, estas presentan 3 isoformas: A-Raf, B-Raf y C-Raf, siendo B-Raf la isoforma mutada en un 8% de todos los cánceres (Drosten & Barbacid, 2020). Uno de los primeros objetivos terapéuticos fue bloquear estas proteínas mediante fármacos como Sorafenib, Dabrafenib y Vemurafenib y se vio que si era efectivo para aquellos cánceres impulsados por mutaciones en *B-Raf* pero no se mostró ningún beneficio en pacientes con mutaciones en *K-RAS*. Otros estudios han apuntado a la inhibición de Mek, unas quinasas que presentan dos isoformas: Mek 1 y Mek 2. Se han desarrollado varios inhibidores como el Trametinib y se ha visto que son muy específicos y menos propensos a causar toxicidad, sin embargo, la inhibición de Mek es susceptible a la retroalimentación adaptativa por la activación de proteínas o vías compensatorias que permiten la reactivación de la señalización de MAPK (B. Wang et al., 2017).

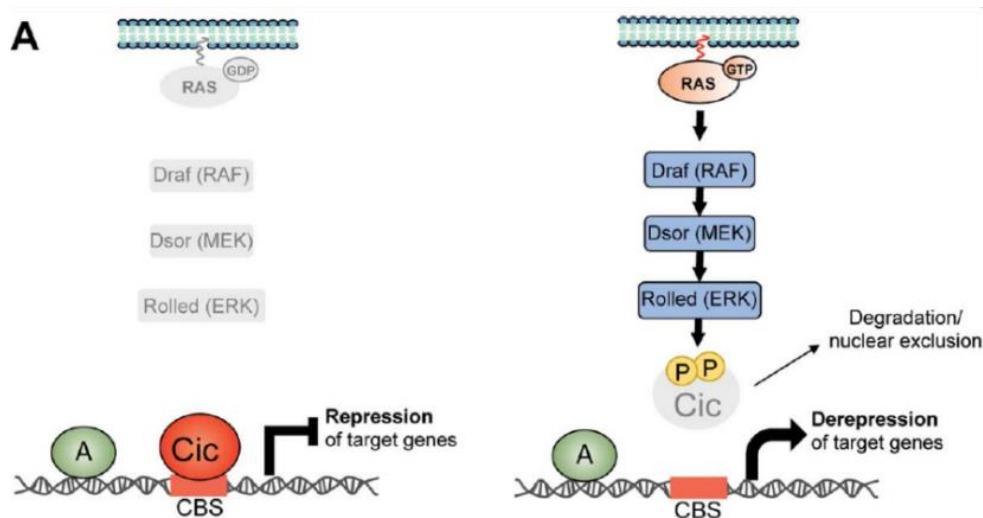
Tras los múltiples intentos de bloquear *K-RAS* por diversas vías se acaba presentando resistencia por parte de los tumores a los tratamientos anti-tumorigénicos. Principalmente en aquellos fármacos que inhiben las vías relacionadas con MAPK se ha visto como el tumor tiene la capacidad de sobrepasar la inhibición por diferentes mecanismos y uno de ellos es *CIC* (Capicua).

## 9. Gen supresor de tumores *CIC* (Capicua)

*CIC*, es un factor de transcripción codificado por el gen *CIC*, un represor transcripcional de la familia de la HMG-box, que se une a sitios de ADN específicos de sus genes diana. *CIC* se descubrió por primera vez en *Drosophila* como un regulador de patrones embrionarios y dos años más tarde se identificó en mamíferos (Jiménez et al., 2000). Los embriones de mosca desprovistos de *CIC* carecen de la mayor parte de su tronco y regiones abdominales mientras que mantienen la cabeza y cola (de ahí su nombre capicua, cabeza y cola en catalán).

Las proteínas *CIC* están altamente conservadas en mamíferos y, en los últimos años, este represor también ha surgido como un supresor de tumores cuya función está directamente controlada por la señalización Ras/MAPK (Simón-Carrasco et al., 2018). Tanto *Drosophila* como los mamíferos expresan al menos dos isoformas principales de *CIC* (*CIC-S* y *CIC-L*), que difieren en tamaño y en sus regiones N-terminales.

En ausencia de señalización Ras/MAPK, *CIC* actúa como un represor al unirse a sitios de unión a *CIC* específicos (CBS) en sus genes diana. Tras la activación de RTK, las proteínas Ras se unen a GTP e inician una cascada de fosforilación a través de las quinasas Raf, Mek y Erk que provocan la fosforilación de *CIC*, que a su vez da como resultado su degradación y / o exclusión nuclear (Figura 4). Como consecuencia, los genes diana de *CIC* son inducidos transcripcionalmente (desreprimidos) en momentos y lugares específicos durante el desarrollo (Simón-Carrasco et al., 2018).



**Figura 4.** Papel de *CIC* en la vía de señalización Ras/MAPK. (Simón-Carrasco et al., 2018)

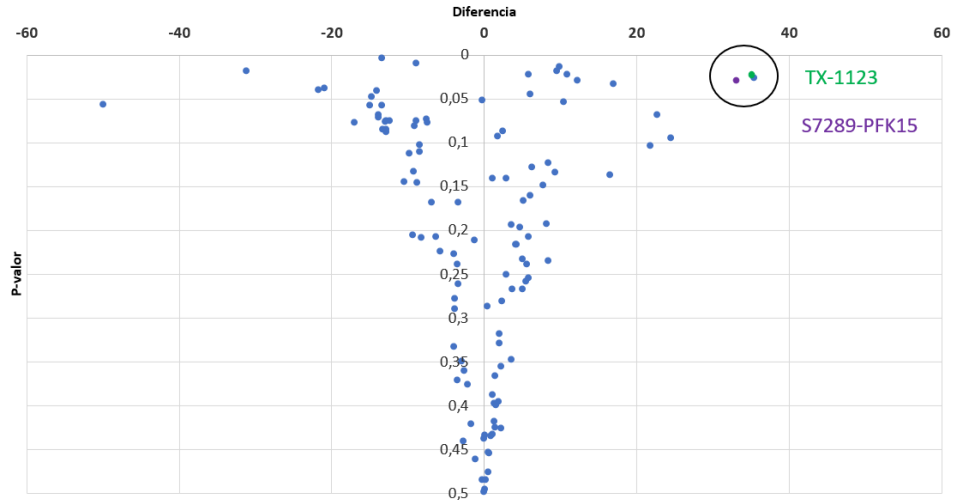
El grupo de genes reprimidos por *CIC* están relacionados con procesos de proliferación y diferenciación celular y este hecho refuerza la idea de que *CIC* es un punto clave en el control del crecimiento celular. Algunos de los genes diana más caracterizados que regula *CIC* son los genes *ETS* del subgrupo *PEA3*. Son una familia de factores de transcripción que contienen un dominio de unión al ADN de aproximadamente 85 aminoácidos. Las proteínas *ETS* se unen a secuencias específicas de ADN y regulan transcripcionalmente varios genes. Por lo tanto, las convierte en una familia importante de factores de transcripción que controlan la expresión de genes que son críticos para varios procesos biológicos, incluida la proliferación, diferenciación, desarrollo, transformación y apoptosis celular. (Lee et al., 2020)

Esta familia se divide en 12 subfamilias, entre ellas *PEA3*. Se ha descubierto que sus miembros, *ETV1* (Factor de transcripción variante de *ETS* 1), *ETV4* (Factor de transcripción variante de *ETS* 4) y *ETV5* (Factor de transcripción variante de *ETS* 5), están sobreexpresados en múltiples cánceres, siendo *ETV4* y *ETV5* los más presentes en el CPCNP. *ETV4* regula los genes implicados en la diferenciación celular, la señalización y la morfogénesis tisular (Yan Wang et al., 2020), mientras que *ETV5* es esencial para mantener la identidad de las células alveolares de tipo II (AT2), una población de células madre que contribuyen a la reparación del daño alveolar pero también dan lugar a adenocarcinoma de pulmón si hay presencia de mutaciones en *K-RAS* (Zhang et al., 2017). Por ello, la desregulación de *ETV4* y *ETV5* induce el crecimiento celular, la invasión y la migración en varias células tumorales, lo que conduce a la progresión del tumor, la metástasis (Qi et al., 2020).

Aunque, tanto las mutaciones como la pérdida de *CIC* pueden promover el desarrollo y la progresión del cáncer, estudios en células con *CIC* inactivado, fueron tratadas con Trametinib (inhibidor de Mek) y no se vieron diferencias respecto a su crecimiento, lo que indica que la inactivación de *CIC* ocurre más abajo en la vía de señalización de MAPK y que esta inactivación confiere resistencia a las células después del tratamiento con los inhibidores de la vía Ras/MAPK (Simón-Carrasco et al., 2017).

## **10. Cribado y búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para el CPCNP**

Debido a todas las limitaciones que se han comentado durante la memoria la búsqueda de nuevas dianas es un reto muy importante para poder avanzar en la búsqueda de tratamientos eficaces contra el CPCNP. En este ámbito se abren nuevas puertas tras los resultados de un cribado *in vitro* de una colección de 114 fármacos (Figura 5) en dos grupos celulares de adenocarcinoma pulmonar murino.



**Figura 5. Cribado in vitro de 114 fármacos en células de adenocarcinoma pulmonar murinas.** Se representa el *p-valor* respecto a la diferencia de las medias entre los valores de viabilidad de los dos grupos celulares. Se seleccionan los fármacos que presentan una diferencia más elevada y un *p-valor* menor a 0.05 después de realizar ensayos de viabilidad.

Tras estos resultados se seleccionan aquellos fármacos que obtuvieron una mejor inhibición de la proliferación celular para su validación y posible futuro tratamiento contra el adenocarcinoma pulmonar. Concretamente TX-1123, que va dirigido a la proteína tirosina quinasa c-SRC y S7289-PFK15, contra la proteína 6-fosfofructo-2-quinasa / fructosa-2,6-bifosfatasa 3 (PFKFB3) fueron los inhibidores más potentes.

- **c-SRC**

La proteína c-SRC esta codificada por el gen *SRC*, el primer oncogén en descubrirse. Fue descrito por primera vez en el sarcoma de Rous, un cáncer que desarrollaban los pollos y que estaba provocado por la infección de un retrovirus (RSV) que porta el gen que codifica para la proteína v-SRC. Este retrovirus infecta a células y luego inserta sus propios genes en el ADN celular, desarrollando rápidamente cáncer. Desde este descubrimiento se ha estudiado su homólogo en humanos, el gen *SRC* que codifica para la proteína c-SRC (Irby & Yeatman, 2000).

El protooncogén c-SRC es una tirosina quinasa no receptora que desempeña un papel clave en muchas vías de señalización celular. Como proteína citoplasmática, c-SRC regula las respuestas celulares a estímulos externos a través de la interacción con múltiples proteínas de adhesión, adaptadoras y factores de transcripción que apoyan el papel de c-SRC en la modulación directa e indirecta de la señalización mitogénica, la organización citoesquelética, la angiogénesis, la motilidad, la progresión del ciclo celular, la supervivencia y la proliferación (Bunda et al., 2020). Además, la activación de c-

SRC mediante el receptor EGFR permite la fosforilación de CIC por parte de dicha proteína y promueve su exportación nuclear, posibilitando así la expresión de sus genes diana (Belli et al., 2020).

La desregulación de c-SRC se ha observado en varios tipos de cáncer y se correlaciona con la progresión de la malignidad y el desarrollo de metástasis. Normalmente se encuentra a niveles bajos, pero se ha visto sobreexpresado en ciertos tipos de cáncer, lo que lo convierte en un objetivo atractivo para los esfuerzos del descubrimiento de fármacos. La evidencia reciente enfatiza su papel crucial no solo en la promoción de rasgos oncogénicos, sino también en la adquisición y el mantenimiento de la resistencia del cáncer a varios fármacos diana quimioterapéuticos o moleculares (Simatou et al., 2020).

- **PFKFB3**

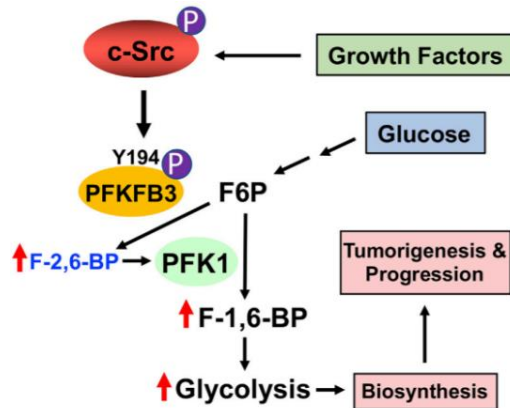
La proteína PFKFB3 está codificada por el gen *PFKFB3* (*6-fosfofructo-2-quinasa / fructosa-2,6-bisfosfatasa 3*). Fue identificada inicialmente en macrófagos humanos y pertenece a una familia de proteínas bifuncionales que participan tanto en la síntesis como en la degradación de fructosa-2,6-bisfosfato, una molécula reguladora que controla la glucólisis en eucariotas (Shi et al., 2017).

La glucólisis es un proceso enzimático esencial en el metabolismo celular humano, ya que participa en la producción de sustratos requeridos en múltiples vías bioquímicas, como el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la vía de las pentosas fosfato (PPP) y la síntesis de ácidos grasos y colesterol. Se ha visto que muchos tumores tienen una elevada demanda energética y, en consecuencia, mayores tasas de glucólisis para impulsar su rápida proliferación.

Esta ruta metabólica está regulada por la actividad de tres enzimas fisiológicamente irreversibles: hexoquinasa, fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) y piruvato cinasa. PFK-1 es la principal enzima limitante de la glucólisis y es responsable de la síntesis de fructosa-1,6-bisfosfato a partir de fructosa-6-fosfato (F-6-P). Su actividad está regulada por productos metabólicos localizados citoplasmáticamente, como el trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), F-6-P y fructosa-2,6-bisfosfato (F-2,6-BP). De estos compuestos, F-2,6-BP, un producto de la reacción catalizada por 6-fosfofructo-2-quinasa / fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK-2 / FBPase-2, PFKFB), es el más potente efector alostérico positivo de PFK-1.

En los seres humanos, la PFK-2 / FBPase-2, está codificada por cuatro genes diferentes: *PFKFB1*, *PFKFB2*, *PFKFB3* y *PFKFB4*. Hasta ahora, se han identificado cuatro isoenzimas PFK-2 / FBPase-2 diferentes (PFKFB1, PFKFB2, PFKFB3 y PFKFB4). Específicamente *PFKFB3* está sobreexpresado en numerosas neoplasias malignas y sus niveles de expresión están regulados por varias rutas moleculares incluida la ruta Ras/MAPK, ruta PI3K, ... Además, se ha visto que c-SRC

fosforila y activa PFKFB3 para producir más F-2,6-BP, que a su vez activa PFK1 y dirige más glucosa-6-fosfato (G6P) a la glucólisis permitiendo un aumento en la proliferación y metástasis de las células tumorales como se observa en la Figura 6 (Kotowski et al., 2021). Aparte de sus actividades glucolíticas, *PFKFB3* también juega un papel importante en la modulación de varios comportamientos celulares, incluyendo la migración direccional de vasos de células endoteliales tumorales, promoción de la progresión del ciclo celular en las fases G1 / S e inhibición de la apoptosis (Yinhu Wang et al., 2020).



**Figura 6. Interacción de c-SRC con PFKFB3.** c-SRC fosforila PKFB3 permitiendo un aumento de la glicolisis y como consecuencia la inducción de cáncer y metástasis (Bunda et al., 2020).

---

## HIPOTESIS Y OBJETIVOS

---

Muchas evidencias sugieren que CIC juega un papel clave como objetivo descendente de la señalización de las proteínas Ras en la proliferación celular. El objetivo general que se aborda en este proyecto es la determinación de las propiedades funcionales de CIC y los mecanismos moleculares responsables de su actividad para comprender el origen, progresión y tratamiento del cáncer de pulmón impulsado por mutaciones en *K-RAS* y *CIC*.

La hipótesis que se plantea en este proyecto es la siguiente:

El mecanismo global de *K-RAS* implicado en la capacidad de transformar una célula normal en una tumoral viene dado por el supresor de tumores *CIC*, al presentar ambos genes un efecto complementario.

Para validar o refutar la hipótesis se marcan una serie de objetivos específicos:

1. Caracterización de las líneas celulares tumorales de pulmón inducidas por mutaciones en *p53/K-RAS* y *p53/CIC*.
2. Comparación de las líneas tumorales al inhibir los genes *ETV4*, *ETV5* y *ETV4+ETV5* mediante el uso de vectores lentivirales que expresan shRNA.
3. Comparación de las líneas tumorales al inhibir los genes *SRC* y *PFKFB3* mediante el uso de vectores lentivirales que expresan shRNA.

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 1. Líneas celulares empleadas en este trabajo

**MEF** (Células Embrionarias de Fibroblastos de Ratón), establecidas en el laboratorio del CNIO.

**HEK293T** (Células Embrionarias de riñón Humanas), comerciales (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)

Las líneas celulares tumorales provienen de tumores de pulmón extraídos de ratones que han sido modificados genéticamente:

**KP: *K-RAS*<sup>+/LSLG12V</sup>; *p53*<sup>lox/lox</sup>**

Para la obtención de esta línea tumoral los ratones se infectaron por vía intratraqueal con Adeno-FLPo (un vector adenoviral que expresa la recombinasa FLP optimizada). Esta recombinasa FLPo elimina el cassette FSF (*flr*-flanked STOP), permitiendo la expresión de *K-RAS* mutante y la eliminación de *p53* (Genotipo *K-RAS*<sup>+/*G12V*</sup>; *p53*<sup>-/-</sup>). En esta línea celular CIC permanece activo.

1. MDM 95-T1: células de adenocarcinoma pulmonar, extraídas del tumor 1, del ratón número 95 del estabulario.
2. MDM 220-T1: células de adenocarcinoma pulmonar, extraídas del tumor 1, del ratón número 220 del estabulario.
3. MDM 604-T1: células de adenocarcinoma pulmonar, extraídas del tumor 1, del ratón número 604 del estabulario.

**PCIC: *p53*<sup>lox/lox</sup>; *CIC*<sup>lox/lox</sup>**

Para la obtención de esta línea tumoral los ratones se infectaron por vía intratraqueal con Adeno-Cre (un vector adenoviral que expresa la recombinasa Cre). Esta recombinasa Cre elimina *p53* e inactiva *CIC* (Genotipo *p53*<sup>-/-</sup>; *CIC* <sup>$\Delta 2-6/\Delta 2-6$</sup> ). En este caso CIC es inactivo, ya que se introducen secuencias loxP que flanquean los exones 2-6. Estos exones codifican la región de la HMG-box de CIC, y al eliminarlos se sintetiza una forma truncada de dicha proteína sin HMG-box, haciendo que CIC no se pueda unir al ADN.

1. MVW 1139-T1-A: células de adenocarcinoma pulmonar, extraídas del tumor 1 zona A, del ratón número 1139 del estabulario.
2. MVW 1139-T1-B: células de adenocarcinoma pulmonar, extraídas del tumor 1 zona B, del ratón número 1139 del estabulario.

3. MVW 1145-T1: células de adenocarcinoma pulmonar, extraídas del tumor 1, del ratón número 1145 del estabulario.

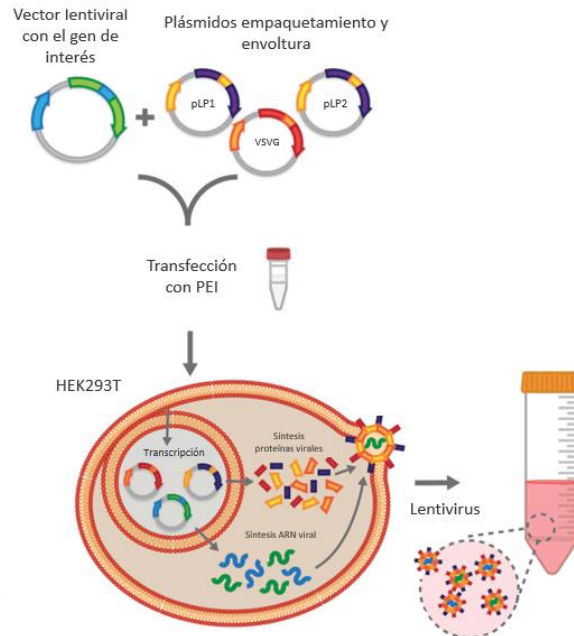
### **Reactivos y otros compuestos utilizados en cultivos celulares**

- Medio DMEM (Medio esencial mínimo de Dulbecco) suplementado con un 10% FBS (Suero fetal bovino)
- Medio DMEM suplementado con un 10% FBS + Puromicina 2x (InvivoGen, Estados Unidos)
- Medio DMEM suplementado con un 10% FBS + Blastidina 2x (Merk Millipore, Estados Unidos)
- PBS (Tampón fosfato salino)
- Tripsina 0,25%
- Dimetilsulfóxido (DMSO)

### **2. Transfecciones lentivirales**

Con el objetivo de validar las dianas moleculares, se inhiben las proteínas codificadas por dichas dianas mediante shRNA (short hairpin RNA). Los shRNA silencian los ARN mensajeros (mRNA) de las proteínas y por tanto impiden la traducción de estas. Para la inhibición, se generan lentivirus mediante la cotransfección en células HEK293T sembradas al 75% de confluencia con: 5 µg del vector lentiviral de interés y tres plásmidos [pLP1 (1.3 µg) codifica para *Rev*, pLP2 (1.9 µg) codifica para *Gag* y *Pol*, pLPVSV-G (1.65 µg) codifica para *VSV-G*] que proporcionan los genes de empaquetamiento y envoltura. Se usa además PEI, una poliamina ramificada con muchos grupos amino libres, que interaccionan con los grupos fosfatos del ADN permitiendo una transfección más eficiente.

Las células transfectadas se incuban a 37 °C y al día siguiente se pasan a incubadores de 32°C para favorecer la estabilidad de los lentivirus en el medio de cultivo. Pasadas 48 horas desde que se realiza la transfección se recoge el sobrenadante de las células HEK293T que contiene los virus y se pasa a través de filtros de 0.45 µm para eliminar contaminaciones de células empaquetadoras. Una vez filtrado el sobrenadante se puede congelar a -80°C hasta su utilización o utilizarlo directamente para infectar las células (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema producción partículas lentivirales

Para los experimentos de inhibición de la expresión de los diferentes genes en estudio se emplearon los siguientes plásmidos lentivirales que expresan los shRNAs de interés, desarrollados por Sigma-Aldrich:

MISSION® pLKO.1-puro Non-Mammalian shRNA Control Plasmid DNA:

- Plásmido pLKO.1-puro con shRNA control (SHC002), se usa como control ya que no va dirigido contra ningún gen.

ETV4 MISSION® pLKO.1-puro shRNA Lentiviral Transduction Particles:

- Plásmido pLKO.1-puro con shRNA dirigida a ETV4 (Clone ID: NM\_008815.2-1137s21c1)  
Número TRC: TRCN0000306806  
Secuencia:CCGGGTGATGGGTTATGGCTATGAACTCGAGTTCATAGCCATAACCC  
ATCACTTTTTTG

ETV5 MISSION® pLKO.1-puro shRNA Lentiviral Transduction Particles:

- Plásmido pLKO.1-puro con shRNA dirigida a ETV5 (Clone ID: NM\_023794.2-1762s21c1)  
Número TRC: TRCN0000312867  
Secuencia:CCGGAGCTTGCCCTTTGAGTATTATCTCGAGATAATACTCAAAGGGC  
AAGCTTTTTTG

*SRC* MISSION® pLKO.1-puro shRNA Lentiviral Transduction Particles: en este caso se usan 5 clones del shRNA que tienen la misma función, pero cada uno va dirigido a una zona diferente de la secuencia de *SRC*.

- Plásmido pLKO.1-puro con shRNA dirigida a c-SRC (Clone ID: NM\_009271.1-324s1c1)  
Número TRC: TRCN0000023596  
Secuencia:CCGGGCGGCTGCAGATTGTCAATAACTCGAGTTATTGACAATCTGCAGCCGCTTTTT
- Plásmido pLKO.1-puro con shRNA dirigida a c-SRC (Clone ID: NM\_009271.1-476s1c1)  
Número TRC: TRCN0000023594  
Secuencia:CCGGGCAAGATCACTAGACGGGAATCTCGAGATTCCCGTCTAGTGATCTTGCTTTTT
- Plásmido pLKO.1-puro con shRNA dirigida a c-SRC (Clone ID: NM\_009271.1-612s1c1)  
Número TRC: TRCN0000023595  
Secuencia: CCGGCCTAAATGTGAAACACTACAACACTCGAGTTGTAGTGTTCACATTTAGGTTTT
- Plásmido pLKO.1-puro con shRNA dirigida a c-SRC (Clone ID: NM\_009271.1-703s1c1)  
Número TRC: TRCN0000023597  
Secuencia:CCGGGTGGCTTACTACTCCAAACATCTCGAGATGTTTGGAGTAGTAA GCCACTTTTT
- Plásmido pLKO.1-puro con shRNA dirigida a c-SRC (Clone ID: NM\_009271.1-1186s1c1)  
Número TRC: TRCN0000023598  
Secuencia:CCGGCGAGCCGCAATATCCTAGTACTCGAGTACTAGGATATTGGCGGCTCGTTTTT

PFKFB3 MISSION® pLKO.1-puro shRNA Lentiviral Transduction Particles: en este caso se usan 5 clones del shRNA que tienen la misma función, pero cada uno va dirigido a una zona diferente de la secuencia de *PFKFB3*.

- Plásmido pLKO.1-puro con shRNA dirigida a PFKFB3 (Clone ID: NM\_133232.2-558s21c1)  
Número TRC: TRCN0000361975  
Secuencia:CCGGTTCCAACGAAAGTGTTCAATGCTCGAGCATTGAACACTTTCGTTGGAATTTTTG
- Plásmido pLKO.1-puro con shRNA dirigida a PFKFB3 (Clone ID: NM\_133232.2-1053s21c1)  
Número TRC: TRCN0000322299  
Secuencia:CCGGACCACATCCAGAGCCGAATTGCTCGAGCAATTCGGCTCTGGATGTGGTTTTTTG
- Plásmido pLKO.1-puro con shRNA dirigida a PFKFB3 (Clone ID: NM\_133232.2-1478s21c1)  
Número TRC: TRCN0000361974  
Secuencia:CCGGGAGCCTGTGATCATGGAATTACTCGAGTAATTCATGATCACAGGCTCTTTTTG

- Plásmido pLKO.1-puro con shRNA dirigida a PFKFB3 (Clone ID: NM\_133232.2-1581s21c1)  
Número TRC: TRCN0000361967  
Secuencia:CCGGAGGAGATGCCATACCTGAAATCTCGAGATTTTCAGGTATGGCATCTCCTTTTTTG
- Plásmido pLKO.1-puro con shRNA dirigida a PFKFB3 (Clone ID: NM\_133232.2-2378s21c1)  
Número TRC: TRCN0000322296  
Secuencia:CCGGTCAGGGACAAGTTGCACATTCCTCGAGGAATGTGCAACTTGTCCTGATTTTTG

En el caso de *SRC* y *PFKFB3*, de los 5 clones de shRNA se seleccionaron los que mejor inhiben la expresión de los genes de interés mediante la infección con lentivirus en células MEF y el posterior análisis por Western Blot y q-RT-PCR. Esta primera infección en fibroblastos de ratón se realizó para seleccionar las mejores secuencias y de estos infectar las diferentes líneas tumorales de ratón.

### **3. Infecciones lentivirales**

Para la infección con los lentivirus generados se retira el medio de cultivo de las células a infectar. El sobrenadante viral se añade junto con polibrenos (8 mg/ml, Sigma, Estados Unidos), para aumentar la unión de la cápside viral a la membrana celular y se incuba durante 1 día a 32°C.

Después de la incubación se pasan las placas a un incubador de 37°C y transcurridas 48h desde la infección se cambia el medio de cultivo. El nuevo medio contiene puromicina permitiendo la selección de aquellas células que han sido infectadas y que expresan por tanto los shRNAs, ya que el vector lentiviral presenta resistencia a ese antibiótico. En el caso del plásmido pLKO.1-puro con shRNA dirigida a *ETV4* se usa medio con blasticidina, este gen de resistencia se incluye al vector, para poder seleccionar las células de una doble infección (*ETV4+ETV5*). Así, en presencia del antibiótico las células que no infectadas, y que por tanto no presentan resistencia a ese antibiótico mueren, sobreviviendo solamente aquellas que se han infectado.

### **4. Ensayos de proliferación celular**

Se usa el método MTT para medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad, proliferación y citotoxicidad celular. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT1) (Sigma) en formazán, realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Por tanto, la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Las células tumorales de ratón se siembran en placas de 96 pocillos a una confluencia de 300 células/pocillo. Para la realización del ensayo de proliferación, cada tres días, se elimina el medio de cultivo y se incuba durante tres horas a 37°C con 100µl de la solución MTT1. Después, se añade 100µl del reactivo MTT2, cuya función es disolver los cristales de formazán y la placa se mantiene a 37°C hasta el día siguiente, en el que se procede a la lectura de la placa a 544 nm mediante un lector EnVision 2104 (Multilabel Reader, Perkin Elmer, Waltham, USA). Los resultados se normalizan respecto al día 0 (día siguiente de la siembra) y se representan como unidades de absorbancia.

## **5. Curva dosis-respuesta**

Son representaciones gráficas de la relación entre la dosis del fármaco administrado y el efecto farmacológico que logra. Para realizar el ensayo las líneas tumorales se siembran en placas de 96 pocillos a una confluencia de 4000 células/pocillo.

Los inhibidores que se usaron fueron:

- Trametinib (Merk Millipore, Estados Unidos), inhibidor de Mek.
- TX-1123 (Merk Millipore, Estados Unidos), inhibidor de c-SRC.
- S7289-PFK15 (Sigma Aldrich, Estados Unidos), inhibidor de PFKFB3.

Se prepara una mezcla concentrada del fármaco en medio de cultivo DMEM y a partir de esta se hace un banco de diluciones seriadas 1/3. Como control se usa la misma cantidad de DMSO utilizada con el inhibidor. Una vez tratadas se incuban a 37°C durante 72 horas y se evalúa la proliferación celular mediante el método MTT.

## **6. Análisis de proteínas**

### **6.1. Extracción y cuantificación de proteínas**

Para obtener los lisados celulares, se retira el medio de las células cultivadas, se lavan con PBS frío y se añade el tampón de lisis de proteínas que consta de: 50 mM TrisHCl pH7.4, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, inhibidores de proteasas (cocktail de inhibidores, Complete Mini, Roche) y de fosfatasas. Los extractos celulares se recogen con una espátula y se colocan en un tubo de ensayo. Posteriormente, se centrifuga a 18928 g a 4 ° C durante 25 minutos. El sobrenadante se conserva a -80 °C hasta su utilización.

Para la cuantificación se usa el método de Bradford (Bio-Rad DC Protein Assay). Se mide la absorbancia del blanco y de cada muestra en un espectrofotómetro a 595 nm. La cantidad de proteína de la muestra se calcula mediante la Ley de Lambert-Beer:  $A = \epsilon \cdot c \cdot l$

## 6.2. Western Blot

Se usan 35-40 µg de extracto de proteínas, que se mezclan con el tampón de carga (Loading Buffer, Bio Rad) y el tampón reductor (Reduction Buffer, Bio Rad). Las muestras con la mezcla se calientan a 95°C durante 5 minutos, para que se desnaturalicen las proteínas. La electroforesis (SDS-PAGE), se realiza en geles comerciales de poliacrilamida NuPAGE™ 4 to 12%, Bis-Tris, Midi Gel y se conecta a una fuente permitiendo separar las proteínas presentes en las muestras según su peso molecular.

La transferencia a membranas de nitrocelulosa (Bio Rad) se hace mediante un sistema semihúmedo durante 55 minutos a corriente constante de 0.45 A. Acabada la transferencia la membrana se tiñó para comprobar la eficacia de la transferencia con la solución Ponceau S (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Tras el lavado con H<sub>2</sub>O y TBST (Tampón TBS y 0,1% Tween) la membrana se bloquea con leche en polvo al 5% en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas se incuban con el anticuerpo primario correspondiente: ERK (Santa Cruz Biotechnology; sc-93) diluido 1:500, pERK (Santa Cruz Biotechnology; sc-7383) diluido 1:250, SRC (Cell Signaling Technology; 2108) diluido 1:10000, PFKFB3 (Cell Signaling Technology; 9645) diluido 1:10000, ETV4 (Epitomics; T1541) diluido 1:10000, ETV5 (Thermo Scientific; MA5-15646) diluido 1:10000 y GAPDH (Sigma-Aldrich, G8795), utilizada como control de carga diluido 1:10000, en una solución al 5% de leche en TBS-T, a 4°C, durante toda la noche.

Después de la incubación se realizan tres lavados con TBST durante 10 minutos a temperatura ambiente y se incuban las membranas con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a un fluoróforo ( $\lambda = 700\text{nm}$ ,  $\lambda = 800\text{nm}$ ). La visualización de las proteínas se realiza con Odyssey® CLx.

## 7. Extracción de ADN

Necesario para la obtención de los plásmidos de interés que llevaban cada una de las secuencias de shRNA específica en *Escherichia coli*. Primeramente los plásmidos se tienen que amplificar y para ello, se cultivan las *E.coli* transformadas con cada vector pLKO.1-puro de interés en 200 ml de caldo de cultivo Luria Broth (LB) suplementado con 200µl Ampicilina y se deja en agitación a 37 °C toda la noche en un incubador con control de temperatura. (New Brunswick™ Innova® 44/44R Shaker).

Después, para la extracción del plásmido se usa el kit “QIAGEN® Plasmid Midi Kit”(Kits de Plásmidos de QIAGEN, n.d.)

## **8. PCR cuantitativa a tiempo real (q-RT-PCR) con SYBR Green I**

### **8.1. Extracción de ARN**

Para la extracción de ARN a las células en cultivo se les retira el medio, se lavan con PBS frío y se añade en la misma placa el buffer de lisis RLT, proporcionado por el kit “QIAGEN® RNeasy Mini Kit” (*RNeasy Mini Handbook - (EN) - QIAGEN, n.d.*), el cual también se usa para la extracción del ARN.

### **8.2. Síntesis ADN complementario (ADNc)**

El ADNc se sintetiza a partir del ARN mediante el proceso de transcripción reversa. Las moléculas de ARNm actúan como molde y es necesario la presencia de dNTP's que actúan como sustrato de la transcriptasa reversa. Para obtener el ADNc se usó el kit SuperScript II de Invitrogen (*Invitrogen™ SuperScript™ II Reverse Transcriptase Invitrogen™ SuperScript™ II Fisher Scientific, n.d.*). Primeramente, para cada muestra se añade 1 µg de RNA en 6µl de H2O libre de ARNasa, la mezcla se calienta a 55°C durante 2 minutos y posteriormente se enfría en hielo para evitar la renaturalización. A esta mezcla se añade 4 µl de Buffer Super Script 5x, 2 µl de DTT (0.1M), 2 µl dNTP's 10 mM, 0.5µl de inhibidores de ARNasa (400U/µl), 1µl primers (dilución 1/30), 0.5µl transcriptasa reversa (200u/µl) y 4µl H2O libre de ARNasa. La mezcla se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se calienta a 42°C durante 45 minutos y transcurrido este tiempo 5 minutos a 95°C. Finalmente se resuspende en 180 µl de H2O y se congela a -20°C.

Una vez obtenido el ADNc se llevan a cabo las reacciones de PCR a tiempo real con SYBR Green I utilizando los cebadores específicos:

- PFKFB3Fw: 5'AGAAGCTGACTCGCTACCTC3'
- PFKFB3Rv: 5'CATTGTCAGGGCGGAAGAAG3'
- SRCFw: 5'CTCGTGAGGGAGAGTGAGAC3'
- SRCRv: 5'GCCATCAGCATGTTTGGAGT3'

Para la normalización de los datos se usa como gen de referencia la β-actina:

- β-actinaFw: 5'GACGGCCAGGTCATCACTATTG3'
- β-actinaRv: 5'AGGAAGGCTGGAAAAGAGAGC3'

Las reacciones de PCR se realizan en un termociclador a tiempo real “QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System” utilizando la mezcla “SYBR™ Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, Estados Unidos). Esta mezcla incluye, la enzima “AmpliAq Gold(R) ADN Polymerase”, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y el tampón de PCR e incorpora, el colorante SYBR Green I, que detecta ADN de doble hélice. Las muestras se amplificaron por triplicado en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems, Estados Unidos).

Cada reacción se lleva a cabo en un volumen de 10µl con los siguientes elementos: 5µl de “SYBR Green PCR Master Mix”, 0.5µl de cada cebador, 2.5µl de H<sub>2</sub>O y 2µl de ADNc. Las condiciones térmicas de la amplificación son las siguientes: un ciclo inicial de 10 minutos a 95°C (activación enzimática), seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C (desnaturalización y extensión) (*Power SYBR® Green PCR Master Mix and Power SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit (Master Mix) and 4368711 (RT-PCR Reagents Kit)*, 2011).

## **9. Cribado de alto rendimiento**

Se hizo un cribado *in vitro* en las dos líneas celulares tumorales pulmonares de ratón; KP y PCIC. Ambas líneas celulares fueron tratadas con 114 fármacos durante 72 horas, mientras que el control fue tratado con DMSO.

Tras el tratamiento, se evaluó la viabilidad celular y con los datos obtenidos se representó gráficamente la diferencia de la media de ambos grupos respecto al *p-value* y se observó que, entre todos ellos solamente TX-1123 (i), S7289-PFK15 y Quizartinib presentaban una respuesta positiva en la primera ronda de cribaje.

Tras una nueva ronda de cribaje, mediante curvas dosis respuesta, se observó que solamente TX-1123 y S7289-PFK15 presentaban un efecto potencial en la inhibición tumoral, por lo que estos compuestos se plantean como posibles fármacos prometedores para el tratamiento de CPCNP. Pero antes deben ser sometidos a varias rondas de validación y cribaje biológico para poder pasar a los ensayos de fase clínica.

## **10. Estadística**

Para el análisis de los datos obtenidos tras el cribado de los fármacos se usó la prueba *t* de Student o test-T, para comparar los dos grupos (KP y PCIC). Los valores de *p-valor* menores a 0.05 son considerados estadísticamente significativos. El resto de los datos muestran la media ± desviación estándar (DE) de las diferentes condiciones por triplicado o cuadruplicado.

---

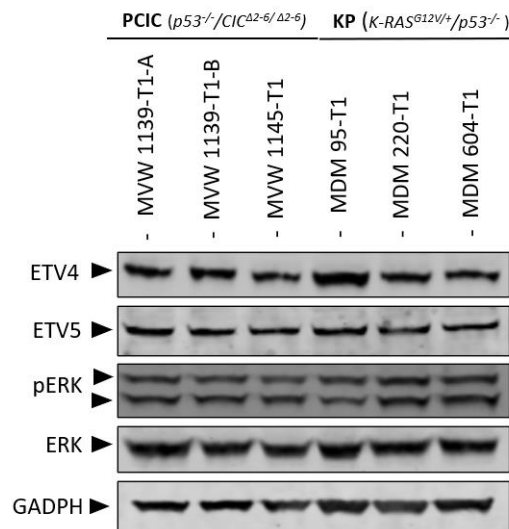
## RESULTADOS

---

### 1. Caracterización de las líneas celulares tumorales de pulmón inducidas por mutaciones en p53/K-RAS y p53/CIC.

Debido a la importancia que parece tener *CIC* en el desarrollo de tumores y en la resistencia a ciertos fármacos es importante la caracterización de las líneas celulares con las cuales se va a trabajar. Partiendo de esta base se realizan una serie de ensayos para el análisis de las 6 líneas de adenocarcinoma pulmonar impulsadas por p53/*K-RAS* (KP) y p53/*CIC* (PCIC) para observar si hay diferencias entre ellas.

Para ello, se realiza un Western Blot de los lisados celulares de cada una de las líneas tumorales con el objetivo de visualizar si hay expresión o no de efectores implicados en la vía MAPK (ERK y pERK) y de los genes diana de *CIC*.

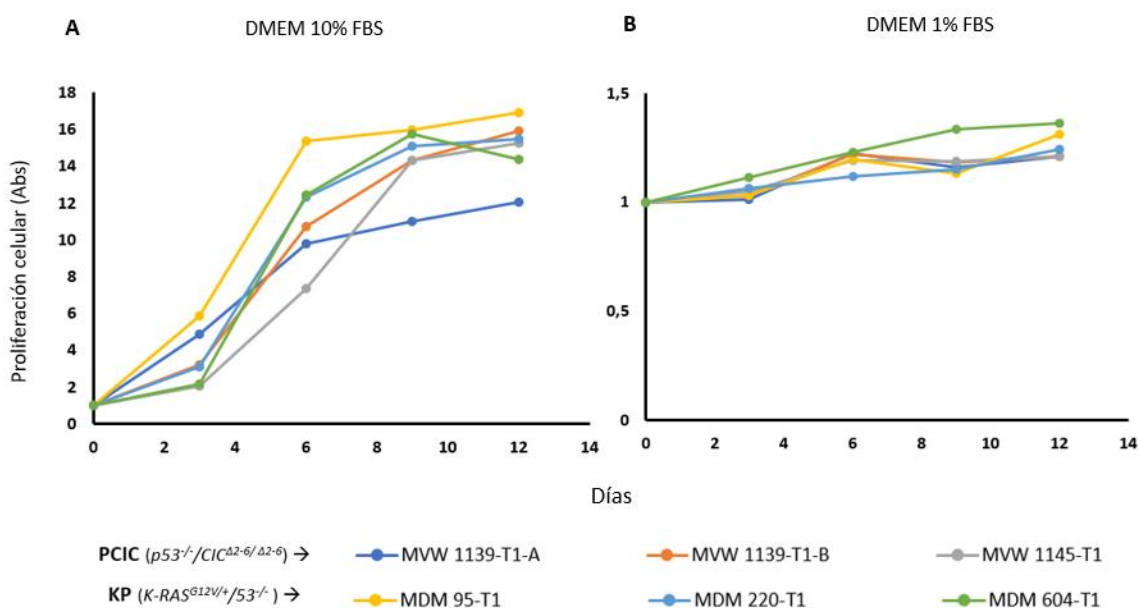


**Figura 8. Caracterización líneas celulares.** Western Blot de la expresión de: ETV4, ETV5, ERK fosforilado (pERK) y ERK total en lisados celulares procedentes de líneas celulares tumorales murinas inducidas por p53/*CIC* (PCIC) y p53/*K-RAS* (KP). GAPDH es el control de carga. La migración de las proteínas en estudio se señala por los triángulos negros.

Los resultados obtenidos en la Figura 8 indican que no hay ninguna diferencia en la expresión de ETV4, ETV5, pERK y ERK entre las células con genotipo PCIC y las KP, ya que todas las bandas presentan prácticamente la misma intensidad.

Después del análisis de estos resultados se realizó una curva de proliferación celular en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de FBS y con 1% de FBS. Este ensayo se hizo para observar si había diferencias en el crecimiento de las diferentes líneas celulares al variar el porcentaje de suero,

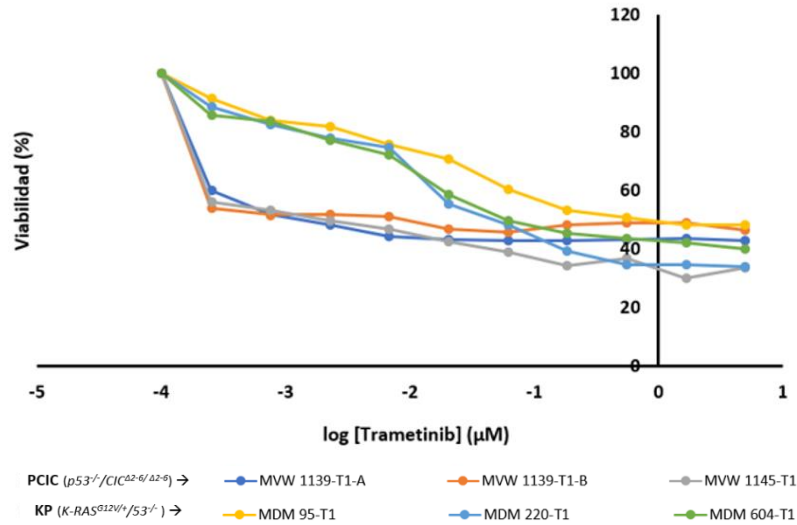
ya que el FBS contiene múltiples nutrientes, proteínas y hormonas que favorecen al crecimiento y la proliferación celular (Ackermann & Tardito, 2019).



**Figura 9. Comparación de la proliferación celular en las seis líneas celulares al ser cultivadas con medio DMEM suplementado con 10% y 1% de FBS. A)** Se siembran cada una de las líneas celulares en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero para realizar un ensayo de proliferación celular. **B)** Se siembran cada una de las líneas celulares en medio de cultivo DMEM suplementado con 1% de suero para realizar un ensayo de proliferación celular. En **A)** y **B)** para medir el crecimiento se usa el método MTT. Cada gráfico representa la media de las absorbancias de cada una de las 6 líneas (cada condición se realiza por cuadruplicado) respecto al tiempo.

En la Figura 9, se observa claramente como las líneas celulares cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de FBS proliferan mucho mejor que aquellas con medio suplementado con 1% de suero. Cabe remarcar que el grupo celular KP presenta un mayor crecimiento comparado con el grupo PCIC.

Estudios anteriores con líneas celulares impulsadas por *K-RAS* y tratadas con Trametinib (inhibidor de MEK) han mostrado un bloqueo eficaz de la señalización de la vía MAPK en contraposición a las líneas celulares impulsadas por *CIC* en las cuales este inhibidor no tuvo ningún efecto sobre la proliferación de las células tumorales (Simón-Carrasco et al., 2017). Por ello, se decidió comprobar el efecto de este fármaco en las líneas celulares de estudio mediante una curva dosis respuesta.



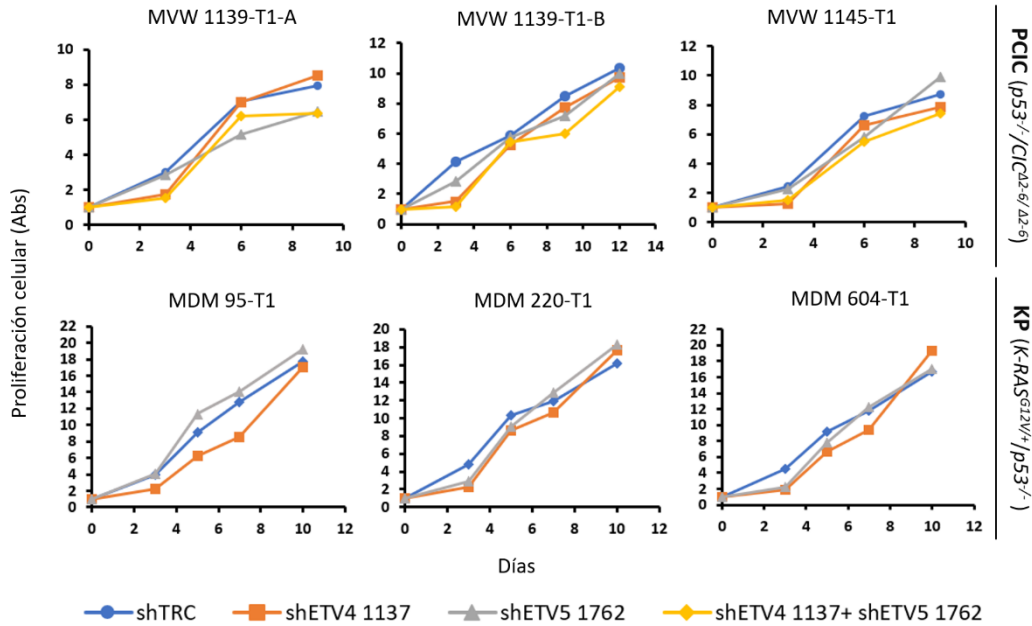
**Figura 10. Proliferación de las líneas celulares KP Y PCic al tratarlas con Trametinib.** Curva dosis respuesta para la evaluación del efecto del Trametinib en el crecimiento de los dos grupos de células tumorales. La máxima concentración de fármaco utilizada fue 5 µM y a partir de esta se hicieron diluciones seriadas 1/3. Tras la incubación durante 72 horas y posterior análisis de la proliferación celular por el método MTT se representó la media de las absorbancias para cada línea celular respecto a la concentración del inhibidor.

El resultado reflejado en la Figura 10, fue sorprendentemente inesperado, debido a que el grupo celular impulsado por mutaciones en *CIC* resultó presentar más sensibilidad al fármaco que las líneas inducidas por *K-RAS*, justamente el resultado contrario a los estudios publicados previamente. Este hecho se observa porque a una concentración muy baja del fármaco las células PCic presentan una gran sensibilidad al Trametinib, comparado con las KP a las que casi no les afecta.

## 2. Comparación de las líneas tumorales al inhibir los genes *ETV4*, *ETV5* y *ETV4+ETV5*

Después del análisis de las líneas celulares en estudio, nos preguntamos si al inhibir los genes diana más caracterizados sobre los que actúa *CIC* (*ETV4* y *ETV5*) veríamos un efecto positivo al bloquear su actividad. A su vez, con este experimento se conseguirá identificar si las dianas más conocidas de *CIC* pueden estar implicadas en la promoción de la tumorigénesis.

Para la inhibición de ambos genes y su combinación (en el caso de PCIC), se usan las secuencias de shRNA que mejor inhiben los respectivos genes (seleccionadas en un estudio anterior), se producen partículas lentivirales como se describe en el apartado 2 de la metodología y finalmente se infectan células tumorales KP y PCIC. Estos fueron los resultados tras el ensayo de proliferación celular por el método MTT.



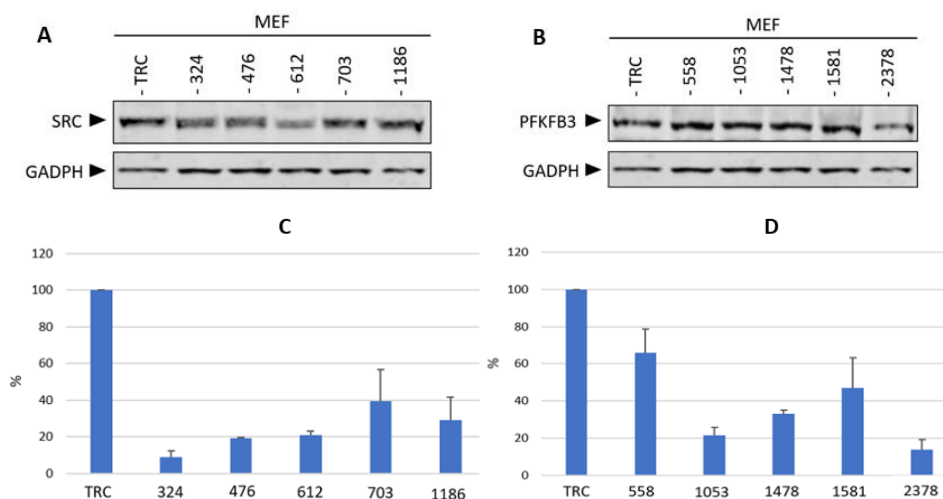
**Figura 11. Estudio de la inhibición de *ETV4*, *ETV5* y su combinación (*ETV4+ETV5*) en las líneas tumorales *PCIC* ( $p53^{-/-}/CIC^{A2-6/A2-6}$ ) y *KP* ( $K-RAS^{G12V+/+}/p53^{-/-}$ ) a lo largo del tiempo.** Las líneas celulares MVW 1139-T1-A, MVW 1139-T1-B y MVW 1145-T1 fueron infectadas con vectores lentivirales que expresan shRNA dirigidas a *ETV4* (cuadrados naranjas), *ETV5* (rombos grises) y la combinación (*ETV4+ETV5*). Las líneas celulares MDM 95-T1, MDM 220-T1 y MDM 604-T1 fueron infectadas con vectores lentivirales que expresan shRNA dirigidas a *ETV4* (cuadrados naranjas) y *ETV5* (rombos grises). En ambos grupos celulares se infectó con vectores lentivirales portadores del shRNA control (TRC) (círculos azul oscuro). Tras la infección se siembran cada una de las líneas celulares y se realiza un ensayo de proliferación celular usando el método MTT. Cada gráfico representa la media de las absorbancias de cada una de las 5 condiciones (cada condición se realiza por cuadruplicado) respecto al tiempo.

Los resultados de la Figura 11 no muestran muchas diferencias entre ambos grupos celulares después de la infección. Pero cabe destacar que se observa una mejor inhibición de la proliferación celular el tercer día en aquellas células infectadas con shETV4 tanto para el grupo celular PCIC como KP. Además, en el caso de las células con genotipo PCIC se observa una disminución del crecimiento celular con shETV4+shETV5, a diferencia de KP donde shETV5 presenta una mejor inhibición.

### 3. Comparación de las líneas tumorales al inhibir los genes *c-SRC* y *PFKFB3*

Debido a la ausencia de diferencias significativas en la proliferación celular después de la inhibición con vectores lentivirales portadores de shRNA dirigidos a *ETV4* y *ETV5*, se intentan buscar otras dianas moleculares específicas para CP con mutación en *CIC*. Para realizarlo se parte de los resultados proporcionados por un proyecto anterior del CNIO (Figura 5) y se seleccionan los fármacos TX-1123 y S7289-PFK15, dirigidos a los genes *c-SRC* y *PFKFB3*, respectivamente.

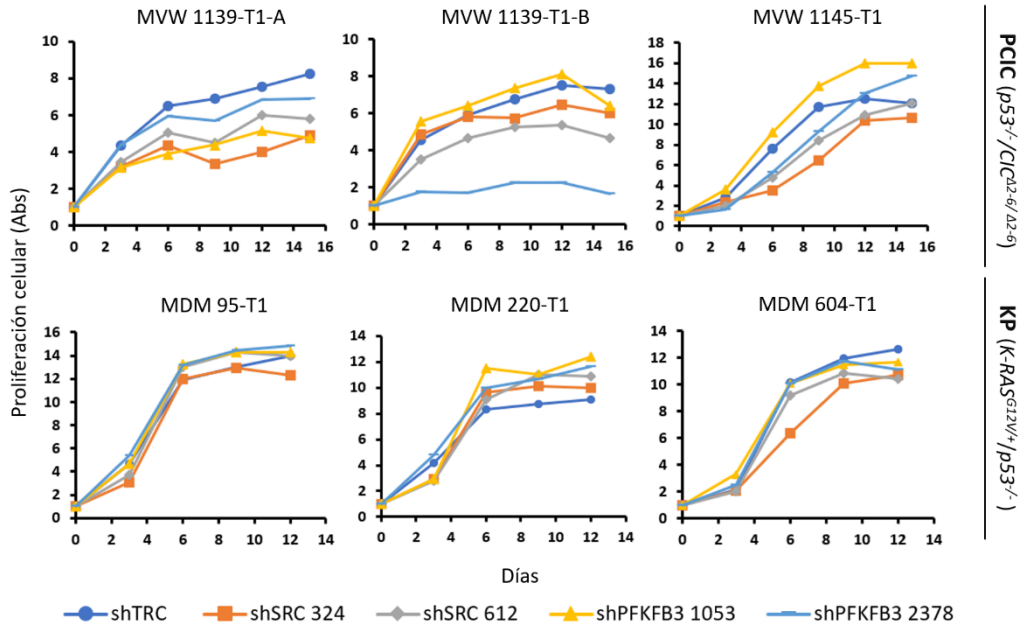
Para validarlos se seleccionan aquellas secuencias de shRNA que presentan una mayor inhibición del gen. Esto se hizo infectando células MEF con partículas lentivirales portadoras de cada shRNA específico y su posterior análisis mediante Western Blot y q-RT-PCR:



**Figura 12. Análisis y cuantificación de la inhibición de *c-SRC* y *PFKFB3* en células MEF.** **A)** Western Blot de la expresión de *c-SRC* en lisados celulares de fibroblastos de ratón. Las células MEF fueron infectadas con vectores lentivirales portadores del shRNA control (TRC) y de los 5 clones específicos contra la secuencia murina *c-SRC* (324, 476, 612, y 1186 **B)** Western Blot de la expresión de *PFKFB3* en lisados celulares de fibroblastos de ratón. Las células MEF fueron infectadas con vectores lentivirales portadores del shRNA control (TRC) y de los 5 clones específicos contra la secuencia murina *PFKFB3* (558, 1053, 1478, 1581 y 2378. En A y B GAPDH es el control de carga. La migración de las proteínas en estudio se señala por los triángulos negros. **C)** Cuantificación del nivel de expresión de *c-SRC* mediante q-RT-PCR en lisados celulares de fibroblastos de ratón, para la validación de los resultados obtenidos en el Western Blot del apartado A. **D)** Cuantificación del nivel de expresión de *PFKFB3* mediante q-RT-PCR en lisados celulares de fibroblastos de ratón, para la validación de los resultados obtenidos en el Western Blot del apartado B. En C y D cada gráfico representa el control (TRC) y los 5 clones de cada gen respecto al porcentaje de amplificación de dichos genes, normalizados respecto a la  $\beta$ -actina. Los resultados son la media de la repetición por triplicado de la q-RT-PCR con las mismas condiciones  $\pm$  DE.

Basándose en los resultados de la Figura 12 se selecciona en el caso de *c-SRC* la secuencia 612 ya que en el Western Blot fue el que menor expresión de la proteína presenta y la 324 debido a que se observó la mínima amplificación de dicho gen mediante q-RT-PCR. Por otro lado, para *PFKFB3* se selecciona el clon 1053 y 2378 solamente basándose en los resultados de la q-RT-PCR ya que en el resultado obtenido tras el Western Blot no se observan diferencias significativas entre los 5 clones.

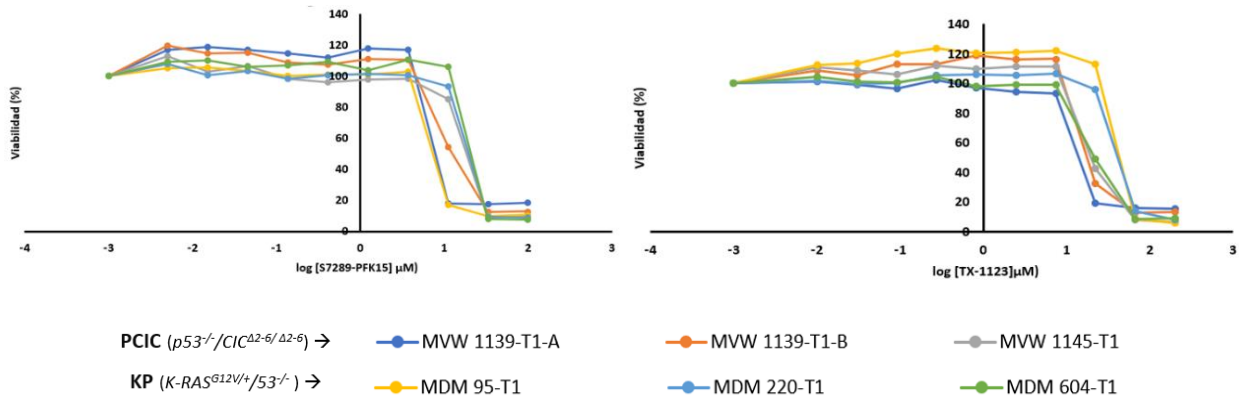
Una vez seleccionados los clones que mejor inhiben ambos genes, se sigue la misma metodología para la producción de las partículas lentivirales, pero se infectan las líneas celulares KP y PCIC. Estos fueron los resultados tras el ensayo de proliferación celular por el método MTT:



**Figura 13. Estudio de la inhibición de *c-SRC* y *PFKFB3* en las líneas tumorales *PCIC* ( $p53^{-/-}/CIC^{A2-6/A2-6}$ ) y *KP* ( $K-RAS^{G12V/+}/p53^{-/-}$ ) a lo largo del tiempo.** Las líneas celulares MVW 1139-T1-A, MVW 1139-T1-B, MVW 1145-T1, MDM 95-T1, MDM 220-T1 y MDM 604-T1 fueron infectadas con vectores lentivirales que expresan las dos mejores secuencias de shRNA para cada gen. En el caso de *c-SRC* se transfecta el clon 324 (cuadrados naranjas) y el 612 (rombos grises). En el caso de *PFKFB3* se transfecta el clon 1053 (triángulos amarillos) y 2378 (líneas azul claro). En ambos grupos celulares se infectó con vectores lentivirales portadores del shRNA control (TRC) (círculos azul oscuro). Tras la infección se siembran cada una de las líneas celulares y se realiza un ensayo de proliferación celular usando el método MTT. Cada gráfico representa la media de las absorbancias de cada una de las 5 condiciones (cada condición se realiza por cuadruplicado) respecto al tiempo.

La Figura 13 muestra como en las líneas celulares PCIC la proliferación celular se ha inhibido mucho mejor que en el caso de KP. Centrándose en las líneas celulares impulsadas por *CIC* observamos bastante variabilidad, predominando shSRC 324 como la secuencia que mejor inhibe el crecimiento celular a día 3. Sorprendentemente y como excepción a esta tendencia, la línea celular MVW 1139-T1-B presenta una fuerte inhibición celular al ser infectada con shPFKFB3 2378. En el grupo celular KP, se observa bastante variabilidad el tercer día al presentar una ligera inhibición por todas las secuencias a excepción de shPFKFB3 2378.

Después de intentar inhibir mediante vectores lentivirales dichos genes, para comprobar el efecto de ambos fármacos se trataron las líneas celulares con los inhibidores y se realizó una curva dosis respuesta para observar la sensibilidad de KP y PCIC.



**Figura 14. Proliferación de las líneas celulares KP y PCIC al tratarlas con S7289-PFK15 y TX-1123.** Curva dosis respuesta para la evaluación del efecto del crecimiento en los dos grupos de células tumorales. La máxima concentración de fármaco utilizada fue  $200\mu\text{M}$  y  $100\mu\text{M}$ , respectivamente. A partir de esta se hicieron diluciones seriadas 1/3. Tras la incubación durante 72 horas y posterior análisis de la proliferación celular por el método MTT se representó la media de las absorbancias para cada línea celular respecto a la concentración del inhibidor.

Los resultados obtenidos en la Figura 14 tras el tratamiento de los dos grupos celulares no muestran muchas diferencias entre las 6 líneas celulares, aunque parece que con el fármaco TX-1123 las células impulsadas por *CIC* son más sensibles comparado con las tratadas con el inhibidor S7289-PFK15.

---

## DISCUSIÓN

---

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo. La capacidad de personalizar la terapia del cáncer dirigiéndose a las mutaciones impulsoras es uno de los retos más codiciados en el tratamiento del CP. Casi el 30% de los adenocarcinomas de pulmón son provocados por una mutación activante de *K-RAS* (Uras et al., 2020). Este oncogén es considerado como el impulsor central de la tumorigénesis y el supresor de tumores *CIC* (Capicua) está implicado en los mecanismos de resistencia clínica a diferentes inhibidores.

### **1. Caracterización de las líneas celulares tumorales de pulmón inducidas por mutaciones en *p53/K-RAS* y *p53/CIC***

Tras los resultados de la Figura 8 se observó que las 6 líneas celulares en estudio no presentaban diferencias significativas en cuanto a la expresión de ETV4, ETV5, pERK y ERK. Esto muestra que tanto el grupo celular impulsado por *CIC* como el inducido por *K-RAS* tiene activa la vía MAPK, ya que los niveles del último efector de dicha vía, ERK y su conformación activa fosfo ERK, se expresan por igual en ambos grupos. Se esperaba que aquellas líneas impulsadas por *K-RAS* presentaran una mayor sobreexpresión de la vía debido a que las proteínas Ras son la primera línea de intermediarios que activan la cascada de fosforilación de la vía MAPK. Por ello, una mutación en dichas proteínas provoca una expresión constitutiva de esta vía de señalización (Braicu et al., 2019). En las líneas impulsadas por *CIC* por el contrario, no se esperaba tanta activación de dicha vía como en *K-RAS*, debido a que en este caso este grupo celular no presenta ninguna mutación en los efectores de MAPK, sino que *CIC* activa una parte más específica aguas abajo de la vía (Simón-Carrasco et al., 2017).

La expresión de los factores de transcripción ETV4 y ETV5 regulados por *CIC* también se observan constantes en ambos grupos. Este resultado es lógico ya que se obtiene el mismo efecto en la expresión de los genes dianas de *CIC* tanto si hay mutaciones en *K-RAS* o directamente en *CIC*, ya que en ambos casos la proteína está inactiva y desreprime la expresión de sus genes diana por igual.

Por otro lado, si se observan cambios en la proliferación de dichas líneas celulares cuando son cultivadas en medio DMEM suplementado con un 10% de FBS como se observa en la Figura 9. Las KP tienen un mayor crecimiento en comparación con las PCIC, esto en parte es debido a que *K-RAS* no solamente regula la vía MAPK sino que está implicado en múltiples vías de señalización celular, sin embargo la actividad de *CIC* depende exclusivamente de la activación de la vía MAPK lo que limita mucho su actuación (Zhu et al., 2014). En cambio, al cultivarlas con DMEM al 1% FBS, los resultados obtenidos han sido los esperados, ya que las células tumorales se someten a una

reprogramación metabólica, que implica cambios en los flujos metabólicos, entre ellos mayores niveles de glucólisis para satisfacer grandes demandas de ATP, NADPH, NADH y esqueletos de carbono y por este motivo requieren más energía y nutrientes para el mantenimiento, el crecimiento y la proliferación celular (Romero-García et al., 2011). Estos requisitos son aportados, en este caso, por el suero y por ello al suplementar el medio con tan poca cantidad de suero, las células no proliferan tanto.

Los resultados del Trametinib (Figura 10) indican mayor resistencia a la inhibición por parte de las líneas KP. Un resultado sorprendentemente inesperado ya que estudios anteriores afirman que células tumorales que presentan *CIC* inactivo son resistentes a la inhibición de Mek (Simón-Carrasco et al., 2017). Esto se debe posiblemente a que al inactivar la proteína Mek se retroalimentan otras vías que permiten el bloqueo de genes oncogénicos regulados por *CIC* o incluso genes regulados aguas abajo implicados en el ciclo celular, replicación del ADN...Esto haría más sensibles a las células con mutaciones en *CIC* (Lake et al., 2016). Otra opción, podría ser que esta retroalimentación permita la reactivación de la vía MAPK lo que explicaría el aumento de la resistencia de las células con mutaciones en *K-RAS*. Además, hay que tener en cuenta que los mecanismos de regulación pueden ser distintos entre diferentes tipos de tumores.

## **2. Comparación de las líneas tumorales al inhibir los genes *ETV4*, *ETV5* y *ETV4+ETV5***

En un primer momento se pensó que al inhibir los genes diana más caracterizados sobre los que actúa *CIC* observaríamos cambios en el nivel de proliferación de ambos grupos celulares, ya que *ETV4* y *ETV5* son factores de transcripción implicados en procesos de proliferación y diferenciación celular. Los resultados obtenidos en la Figura 11 no mostraron mucha inhibición posiblemente porque la infección o generación de lentivirus no funcionó como se esperaba.

Cabe destacar que en ambos grupos celulares se observa una mejor inhibición de la proliferación celular con sh*ETV4*. Este resultado es interesante ya que estudios transcriptómicos muestran una sobreexpresión de esta proteína en comparación con tejidos pulmonares normales. A su vez, dichos análisis permitieron demostrar que la caída de la expresión de *ETV4* inhibió el crecimiento y la metástasis en CPCNP (Yan Wang et al., 2020). Por tanto, aunque la inhibición sea muy baja en un futuro se podría apuntar hacia este factor de transcripción como posible diana terapéutica, sin embargo, al ser un factor de transcripción es difícil poder bloquearlo sin causar una alta toxicidad. Por ello, se necesitarían más estudios para poder buscar nuevas dianas moleculares por debajo de este factor de transcripción que tengan implicación en la proliferación celular. Por otro lado, el efecto nulo después de la inhibición de *ETV5* podría indicar que este factor de transcripción presenta un papel

clave en el desarrollo tumoral, ya que, aunque se intenta bloquear no se ve afectada la proliferación celular.

### **3. Comparación de las líneas tumorales al inhibir los genes *c-SRC* y *PFKFB3***

Con el bloqueo del gen *c-SRC* se espera una disminución de la proliferación celular ya que esta proteína modula directa e indirectamente vías de señalización mitogénicas, la progresión del ciclo celular y además su activación está implicada en la fosforilación de CIC y con ello la inactivación de este y la expresión constitutiva de sus genes diana (Belli et al., 2020). Al igual ocurre con el bloqueo de *PFKFB3*, al inhibir un punto tan crítico del ciclo celular como es la glucólisis no es difícil de imaginar que se verá reducido el crecimiento tumoral.

La inhibición de la proliferación celular en la Figura 13 fue mucho más representativa en las células infectadas con lentivirus que portan los shRNA específicos contra *c-SRC* y *PFKFB3* en comparación con los shRNA contra *ETV4* y *ETV5* (Figura 11). Esto muestra resultados bastante esperanzadores para el futuro tratamiento con estos fármacos en aquellos CP impulsados por mutaciones en *CIC* donde se ve una mejor inhibición. Que este grupo celular presente una mejor inhibición del crecimiento era de esperar tras los resultados previos del cribado de fármacos. Esto puede ser debido a que la alteración del metabolismo celular en las líneas celulares con mutaciones en *CIC* las haga más sensibles a las alteraciones en las señales mitogénicas, proliferación celular y en la glicólisis. En comparación con las KP, que, aunque presenten también su metabolismo alterado al tener *K-RAS* mutado es más difícil inhibir la proliferación celular al bloquear la expresión de *c-SRC* y *PFKFB3*, ya que otras vías que regula este oncogén pueden inhibir o retroalimentar otras moléculas que no permiten causar el efecto deseado.

Después del tratamiento directo de las 6 líneas celulares con los fármacos que se pretenden validar (Figura 14), observamos como es necesario una concentración muy elevada de los inhibidores para observar un efecto potente. Este hecho indica que no tienen una acción muy efectiva sobre la capacidad de proliferación de los grupos celulares. Esto puede deberse a la gran variedad de regulaciones y vías implicadas entre los distintos tipos celulares. Además, se puede pensar que dichos fármacos actúan de forma inespecífica llegando a inhibir vías de señalización auxiliares que implican a *CIC* y que posiblemente aún no se han caracterizado y no se conocen. Sin embargo, se han desarrollado inhibidores selectivos de *c-SRC* que han permitido conducir a una disminución de la proliferación celular, aunque se necesitan más estudios para mejorar la comprensión de la señalización de *c-SRC* en cáncer (Brandvold et al., 2012). También, se han descrito numerosos inhibidores de *PFKFB3*, incluidos productos naturales y pequeñas moléculas sintéticas, como PFK-

158, un derivado del fármaco en estudio S7289-PFK15, que actualmente se encuentra en ensayos clínicos de fase I como un nuevo agente anticanceroso (Yinhu Wang et al., 2020).

A la vista de los resultados obtenidos, aunque algunos han sido muy inesperados, se podría pensar que la combinación con los dos fármacos produciría un efecto más eficaz. Además, para acabar de validar las dianas se podrían usar otros modelos celulares impulsados tanto por *K-RAS* como por *CIC* para ver si en este caso los inhibidores son eficaces para el tratamiento del CP. Finalmente, un mayor conocimiento en el mecanismo de actuación de *CIC* podría ser muy útil para definir si el efecto de mutaciones en *K-RAS* tiene relación directa con *CIC* para la inducción de cáncer en células sanas.

---

## CONCLUSIÓN

---

Con los resultados presentados durante la memoria, se han podido obtener datos valiosos sobre *CIC*, remarcando su papel clave en el cáncer y un acercamiento más próximo a su tratamiento.

1. Tras la caracterización de las líneas celulares se concluye que no hay cambios significativos en la activación de la vía MAPK, ni en los niveles de *ETV4* y *ETV5* entre los dos grupos celulares. En contraposición, si se observa una diferencia en el crecimiento celular entre ellos, siendo el grupo impulsado por *K-RAS* y *p53* el más proliferativo. En cuanto a las resistencias a medicamentos antitumorales en este estudio se han obtenido resultados inesperados, pero contrastando diferentes fuentes se puede ver una clara relación entre la inactivación de *CIC* y la resistencia a inhibidores de la vía MAPK, aunque cabe remarcar que los efectos de los fármacos dependen del tipo del tumor y del grupo celular con el que se trabaja.
2. La inhibición de *ETV4*, *ETV5* y su combinación no muestra una inhibición de la proliferación celular significativa en ninguna de las seis líneas celulares. Aunque destaca *ETV4* como el mejor candidato para objetivos futuros de inhibición en el tratamiento del CP.
3. El bloqueo de *c-SRC* y *PFKFB3* permite la obtención de una mejor inhibición celular por parte de las líneas celulares que tienen *CIC* inactivo, lo que permite obtener una visión esperanzadora de ambos fármacos como posibles candidatos para el tratamiento del CP.

Después de analizar todos los objetivos específicos se valida la hipótesis al demostrar que tanto mutaciones en *K-RAS* como en *CIC* tienen un papel complementario, es decir producen el mismo efecto de inducir tumorigénesis. Aunque es cierto, que *CIC* sigue siendo desconocido en muchos aspectos y se necesitan más estudios para acabar de entender en profundidad su regulación y función en las células tumorales.

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Ackermann, T., & Tardito, S. (2019). Cell Culture Medium Formulation and Its Implications in Cancer Metabolism. In *Trends in Cancer* (Vol. 5, Issue 6, pp. 329–332). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.05.004>
- Appels, N. M. G. M., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. M. (2005). Development of Farnesyl Transferase Inhibitors: A Review. *The Oncologist*, 10(8), 565–578. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.10-8-565>
- Bade, B. C., & Dela Cruz, C. S. (2020). Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. In *Clinics in Chest Medicine* (Vol. 41, Issue 1, pp. 1–24). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>
- Baltanás, F. C., Zarich, N., Rojas-Cabañeros, J. M., & Santos, E. (2020). SOS GEFs in health and disease. In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1874, Issue 2, p. 188445). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188445>
- Bar-Sagi, D., Knelson, E. H., & Sequist, L. V. (2020). A bright future for KRAS inhibitors. *Nature Cancer*, 1(1), 25–27. <https://doi.org/10.1038/s43018-019-0016-8>
- Belli, S., Esposito, D., Servetto, A., Pesapane, A., Formisano, L., & Bianco, R. (2020). C-Src and EGFR inhibition in molecular cancer therapy: What else can we improve? In *Cancers* (Vol. 12, Issue 6, pp. 1–16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers12061489>
- Braicu, C., Buse, M., Busuioc, C., Drula, R., Gulei, D., Raduly, L., Rusu, A., Irimie, A., Atanasov, A. G., Slaby, O., Ionescu, C., & Berindan-Neagoe, I. (2019). A comprehensive review on MAPK: A promising therapeutic target in cancer. In *Cancers* (Vol. 11, Issue 10, p. 1618). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers11101618>
- Brandvold, K. R., Steffey, M. E., Fox, C. C., & Soellner, M. B. (2012). Development of a highly selective c-Src kinase inhibitor. *ACS Chemical Biology*, 7(8), 1393–1398. <https://doi.org/10.1021/cb300172e>
- Bunda, S., Heir, P., Li, A. S. C., Mamatjan, Y., Zadeh, G., & Aldape, K. (2020). c-Src Phosphorylates and Inhibits the Function of the CIC Tumor Suppressor Protein. *Molecular Cancer Research : MCR*, 18(5), 774–786. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-1370>
- Definición de proliferación celular - Diccionario de cáncer del NCI - Instituto Nacional del Cáncer.*

- (n.d.). Retrieved May 1, 2021, from <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/proliferacion-celular>
- Degirmenci, U., Wang, M., & Hu, J. (2020). Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. In *Cells* (Vol. 9, Issue 1). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9010198>
- Drosten, M., & Barbacid, M. (2020). Targeting the MAPK Pathway in KRAS-Driven Tumors. In *Cancer Cell* (Vol. 37, Issue 4, pp. 543–550). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.013>
- Drosten, M., Guerra, C., & Barbacid, M. (2018). Genetically engineered mouse models of K-Ras-driven lung and pancreatic tumors: Validation of therapeutic targets. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031542>
- FDA approves Amgen drug for lung cancer with specific mutation.* (n.d.). Retrieved May 31, 2021, from <https://www.nbcnews.com/health/cancer/fda-approves-amgen-drug-lung-cancer-specific-mutation-n1269004>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, ijc.33588. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Georges, R. N., Mukhopadhyay, T., Zhang, Y., Yen, N., & Roth, J. A. (1993). Prevention of Orthotopic Human Lung Cancer Growth by Intratracheal Instillation of a Retroviral Antisense K-ras Construct1. In *CANCER RESEARCH* (Vol. 53).
- Greulich, H. (2010). The genomics of lung adenocarcinoma: Opportunities for targeted therapies. *Genes and Cancer*, 1(12), 1200–1210. <https://doi.org/10.1177/1947601911407324>
- Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., & Hu, L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(3), 1997–2007. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hennig, A., Markwart, R., Esparza-Franco, M. A., Ladds, G., & Rubio, I. (2015). Ras activation revisited: Role of GEF and GAP systems. In *Biological Chemistry* (Vol. 396, Issue 8, pp. 831–

848). Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0257>

Inamura, K. (2017). Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Frontiers in Oncology*, 7(AUG), 193. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00193>

*Invitrogen™ SuperScript™ II Reverse Transcriptase 200 Reactions; 4 x 10,000 units*  
*Invitrogen™ SuperScript™ II Reverse Transcriptase | Fisher Scientific*. (n.d.). Retrieved June 1, 2021, from <https://www.fishersci.fi/shop/products/invitrogen-superscript-ii-reverse-transcriptase-1/11553117>

Irby, R. B., & Yeatman, T. J. (2000). Role of Src expression and activation in human cancer. In *Oncogene* (Vol. 19, Issue 49, pp. 5636–5642). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203912>

Jiménez, G., Guichet, A., Ephrussi, A., & Casanova, J. (2000). Relief of gene repression by Torso RTK signaling: Role of capicua in Drosophila terminal and dorsoventral patterning. *Genes and Development*, 14(2), 224–231. <https://doi.org/10.1101/gad.14.2.224>

Johnson, B. E., & Heymach, J. V. (2004). Farnesyl transferase inhibitors for patients with lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 10(12 II), 4254s–4257s. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-040016>

*Kits de plásmidos de QIAGEN*. (n.d.). Retrieved May 15, 2021, from <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/plasmid-dna/qiagen-plasmid-kits/>

Kotowski, K., Rosik, J., Machaj, F., Supplitt, S., Wiczew, D., Jabłońska, K., Wiechec, E., Ghavami, S., & Dzięgiel, P. (2021). Role of pfkfb3 and pfkfb4 in cancer: Genetic basis, impact on disease development/progression, and potential as therapeutic targets. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 4, pp. 1–29). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers13040909>

Lake, D., Corrêa, S. A. L., & Müller, J. (2016). Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 73, Issue 23, pp. 4397–4413). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2297-8>

Lawrence, M. S., Stojanov, P., Mermel, C. H., Robinson, J. T., Garraway, L. A., Golub, T. R., Meyerson, M., Gabriel, S. B., Lander, E. S., & Getz, G. (2014). Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*, 505(7484), 495–501. <https://doi.org/10.1038/nature12912>

- Lee, J. S., Kim, E., Lee, J., Kim, D., Kim, H., Kim, C. J., Kim, S., Jeong, D., & Lee, Y. (2020). Capicua suppresses colorectal cancer progression via repression of ETV4 expression. *Cancer Cell International*, 20(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-1111-8>
- Majem, M., Juan, O., Insa, A., Reguart, N., Trigo, J. M., Carcereny, E., García-Campelo, R., García, Y., Guirado, M., & Provencio, M. (2019). SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clinical and Translational Oncology*, 21(1), 3–17. <https://doi.org/10.1007/s12094-018-1978-1>
- Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C., & Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *European Respiratory Journal*, 48(3), 889–902. <https://doi.org/10.1183/13993003.00359-2016>
- Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., & Adjei, A. A. (2008). Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinic Proceedings*, 83(5), 584–594. <https://doi.org/10.4065/83.5.584>
- Power SYBR® Green PCR Master Mix and Power SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit (Master Mix) and 4368711 (RT-PCR Reagents Kit)*. (2011).
- Qi, T., Qu, Q., Li, G., Wang, J., Zhu, H., Yang, Z., Sun, Y., Lu, Q., & Qu, J. (2020). Function and regulation of the PEA3 subfamily of ETS transcription factors in cancer. *American Journal of Cancer Research*, 10(10), 3083–3105. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33163259>
- Quaresma, M., Coleman, M. P., & Rachet, B. (2015). 40-year trends in an index of survival for all cancers combined and survival adjusted for age and sex for each cancer in England and Wales, 1971-2011: A population-based study. *The Lancet*, 385(9974), 1206–1218. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61396-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61396-9)
- RNeasy Mini Handbook - (EN) - QIAGEN*. (n.d.). Retrieved May 18, 2021, from <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>
- Romero-Garcia, S., Lopez-Gonzalez, J. S., Báez-Viveros, J. L., Aguilar-Cazares, D., & Prado-Garcia, H. (2011). Tumor cell metabolism: An integral view. In *Cancer Biology and Therapy* (Vol. 12, Issue 11, pp. 939–948). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.4161/cbt.12.11.18140>
- Schutte, B., & Ramaekers, F. C. (2000). Molecular switches that govern the balance between proliferation and apoptosis. In *Progress in cell cycle research* (Vol. 4, pp. 207–217). Springer,

Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4253-7\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4253-7_18)

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica - SEOM: Sociedad Espa. (n.d.). Retrieved May 23, 2021, from <https://seom.org/>

Shi, L., Pan, H., Liu, Z., Xie, J., & Han, W. (2017). Roles of PFKFB3 in cancer. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 2, Issue 1, pp. 1–10). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.44>

Simatou, A., Simatos, G., Goulielmaki, M., Spandidos, D. A., Baliou, S., & Zoumpourlis, V. (2020). Historical retrospective of the SRC oncogene and new perspectives. In *Molecular and Clinical Oncology* (Vol. 13, Issue 4, pp. 1–10). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/mco.2020.2091>

Simón-Carrasco, L., Graña, O., Salmón, M., Jacob, H. K. C., Gutierrez, A., Jiménez, G., Drosten, M., & Barbacid, M. (2017). Inactivation of Capicua in adult mice causes T-cell lymphoblastic lymphoma. *Genes and Development*, 31(14), 1456–1468. <https://doi.org/10.1101/gad.300244.117>

Simón-Carrasco, L., Jiménez, G., Barbacid, M., & Drosten, M. (2018). The Capicua tumor suppressor: a gatekeeper of Ras signaling in development and cancer. In *Cell Cycle* (Vol. 17, Issue 6, pp. 702–711). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1450029>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Uras, I. Z., Moll, H. P., & Casanova, E. (2020). Targeting KRAS mutant non-small-cell lung cancer: Past, present and future. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 12, pp. 1–30). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21124325>

Wang, B., Krall, E. B., Aguirre, A. J., Kim, M., Widlund, H. R., Doshi, M. B., Sicinska, E., Sulahian, R., Goodale, A., Cowley, G. S., Piccioni, F., Doench, J. G., Root, D. E., & Hahn, W. C. (2017). ATXN1L, CIC, and ETS Transcription Factors Modulate Sensitivity to MAPK Pathway Inhibition. *Cell Reports*, 18(6), 1543–1557. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.031>

Wang, Yan, Ding, X., Liu, B., Li, M., Chang, Y., Shen, H., Xie, S. M., Xing, L., & Li, Y. (2020). ETV4 overexpression promotes progression of non-small cell lung cancer by upregulating PXN

and MMP1 transcriptionally. *Molecular Carcinogenesis*, 59(1), 73–86.  
<https://doi.org/10.1002/mc.23130>

Wang, Yinhu, Qu, C., Liu, T., & Wang, C. (2020). PFKFB3 inhibitors as potential anticancer agents: Mechanisms of action, current developments, and structure-activity relationships. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 203, p. 112612). Elsevier Masson SAS.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112612>

Young, A., Lyons, J., Miller, A. L., Phan, V. T., Alarcón, I. R., & McCormick, F. (2009). Chapter 1 Ras Signaling and Therapies. In *Advances in Cancer Research* (Vol. 102, pp. 1–17). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(09\)02001-6](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(09)02001-6)

Zhang, Z., Newton, K., Kummerfeld, S. K., Webster, J., Kirkpatrick, D. S., Phu, L., Eastham-Anderson, J., Liu, J., Lee, W. P., Wu, J., Li, H., Junttila, M. R., & Dixit, V. M. (2017). Transcription factor Etv5 is essential for the maintenance of alveolar type II cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(15), 3903–3908.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1621177114>

Zhu, Z., Golay, H. G., & Barbie, D. A. (2014). Targeting pathways downstream of KRAS in lung adenocarcinoma. In *Pharmacogenomics* (Vol. 15, Issue 11, pp. 1507–1518). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/pgs.14.108>

---

## AUTOEVALUACIÓN

---

La realización de este trabajo me ha permitido adentrarme mucho más en un laboratorio y darme cuenta de todo lo que hay detrás de la investigación científica. Tras horas de esfuerzo y dedicación en el laboratorio, también es necesario la lectura intensiva de publicaciones científicas para poder desarrollar correctamente tus experimentos, así como adquirir conocimiento en tu tema a tratar.

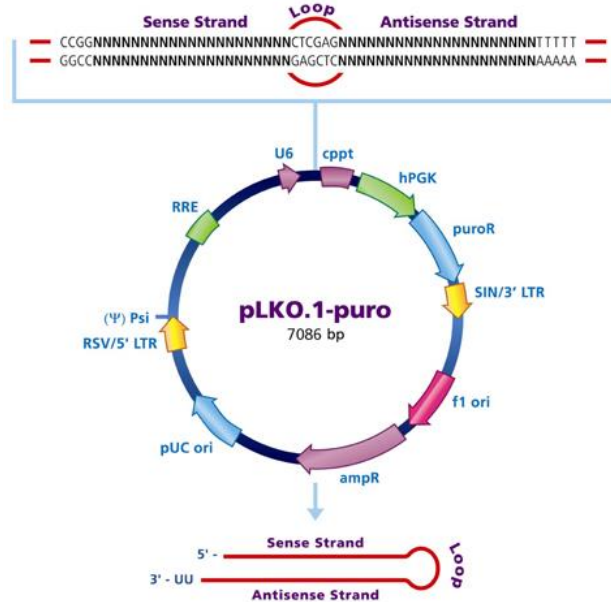
El cáncer es un tema que siempre me ha llamado la atención, aunque muchas veces se trata como un concepto global, cada tipo de cáncer es muy diferente y por ello se necesita mucha investigación en este ámbito para poder abordarlos correctamente. Además, debido a su gran dificultad de interrelaciones y retroalimentaciones de vías y múltiples mecanismos conocidos y aun por conocer, hace que resulte un trabajo muy interesante, pero a la vez complicado.

El trabajo expuesto ha supuesto un gran reto para mí, ya que cada vez que iban avanzando los meses y los experimentos, mi motivación por el tema y el conocimiento de este iban en aumento. Escribirlo no ha sido una tarea fácil, pero me ha servido para reconocer mis puntos débiles y fortalezas a la hora de expresarme en un registro científico.

Por todo ello, agradezco el haber podido tener la oportunidad de trabajar con personas tan implicadas y con tanto conocimiento en este tema. He aprendido muchas cosas durante la realización de las prácticas y en el transcurso de estos cuatro años de carrera. Todo esto me ha permitido formarme tanto personalmente como profesionalmente.

## ANEXOS

### 1. Mapa del vector de clonación pLKO.1-puro



**2. Tabla Excel de los datos obtenidos tras el cribado de los fármacos.** Solamente se muestran 25 de los 114 para observar los cálculos que se realizaron. Los marcados en azul son aquellos que se quieren validar.

DRUG	MVW viability	MDM viability	p-Value	Difference
Roscovitine	106,3316667	95,97875	0,00689504	-10,35291667
CNIO-TRIPLE	4,645	12,92375	0,00897663	8,27875
Tamoxifen (ER antagonist)	26,14	13,08125	0,01162415	-13,05875
CNIO-DUAL	5,435	21,43375	0,01226076	15,99875
<b>TX-1123 (src i)</b>	46,11333333	88,5975	0,01660832	42,48416667
GLEEVEC, IMATINIB	105,6433333	116,055	0,02630365	10,41166667
QUIZARTINIB	63,26833333	97,14625	0,02755762	33,87791667
4-PB (SODIUM 4-PHENYLBUTYRATE)	103,955	114,94	0,02789376	10,985
MK-2206	76,79166667	87,80125	0,02880887	11,00958333
<b>S7289, PFK15</b>	52,21333333	88,34625	0,02943837	36,13291667
SEMAGACESTAT	110,8133333	94,77375	0,03082542	-16,03958333
BARDOXOLONE METHYL	102,6216667	36,00625	0,03243818	-66,61541667
P-0956- Vemurafenib	116,8733333	95,29375	0,03449986	-21,57958333
AT7519	76,045	51,2225	0,04512469	-24,8225
CRIZOTINIB, PF-02341066	1,345	1,10375	0,0455037	-0,24125
AICAR	114,8316667	98,05	0,04594683	-16,78166667
TEMOZOLOMIDE	113,2983333	98,33375	0,04690215	-14,96458333
CAL-101, IDELALISIB	99,59666667	90,24375	0,04936188	-9,352916667
TRAMETINIB	52,44166667	33,04875	0,05261125	-19,39291667
EFLORNITHINE	112,85	97,92375	0,05930042	-14,92625
Mitomycin C	58,665	74,35	0,06062087	15,685
Deshydroxy LY-411575	110,225	95,45875	0,06079616	-14,76625
VALPROIC ACID SODIUM SALT	113,4216667	98,29875	0,06123846	-15,12291667
OLAPARIB	112,4633333	98,67625	0,06135174	-13,78708333