



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL
TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**Análisis genómico-funcional del
receptor hidrocarburos de arilos AhR
en el cáncer pulmonar: relación con
las terapias dirigidas contra el
oncogén *EGFR***

Curso académico 2021/2021

Alumno: Miguel Hernández Gamarra

Tutor: Julián Carretero Asunción

Tutora UPV: Eloisa Jantus Lewintre

Valencia, julio 2021



Esta obra está bajo una [Licencia creativa Commons Attribution 2.0 Generic](https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/).

Título: Análisis genómico-funcional del receptor hidrocarburos de arilos AhR en el cáncer pulmonar: relación con las terapias dirigidas contra el oncogén *EGFR*.

Resumen

El cáncer es la primera causa de muerte en los países desarrollados, y la segunda a nivel mundial, después de las enfermedades cardiovasculares. Dentro de los diferentes tipos de neoplasias, destaca la relevancia del cáncer de pulmón, al ser la segunda más frecuente en la población general y lo que es más importante, el que presenta una mayor mortalidad.

El gen *AHR* codifica para el *aryl hydrocarbon receptor* (AhR), un factor de transcripción implicado en la regulación de la expresión génica. Originalmente se pensaba que actuaba principalmente como sensor de xenobióticos y regulador de la expresión de enzimas implicadas en la metabolización de dichos compuestos químicos. Sin embargo, se ha demostrado que AhR también tiene un papel en la regulación de la inmunidad, el mantenimiento de las células madre, los procesos de diferenciación celular y la transición epitelio-mesenquimal, convirtiéndolo en una potencial diana terapéutica. El factor de transcripción AhR se encuentra normalmente en su estado inactivo localizado en el citosol, unido a varias co-chaperonas. Una vez activado por la unión con sus ligandos (exógenos o endógenos), se produce la disociación de las chaperonas y su translocación al núcleo celular, donde forma un dímero con ARNT (*AhR nuclear translocator*). Este dímero AhR-ARNT se une a los elementos de respuesta a AhR (AHRE) localizados en las regiones promotoras de múltiples genes, causando cambios en su tasa de transcripción.

Dada la creciente importancia de este factor en diferentes tipos de cáncer, este proyecto de investigación plantea un metaanálisis exhaustivo de las principales bases de datos de información genómica (TCGA, <https://tcgportal.org> y CCLE, <https://portals.broadinstitute.org/ccle>) y diferentes *pipelines* bioinformáticos online (CBIOPORTAL, <https://www.cbioportal.org>; GSEA, <https://www.gsea-msigdb.org>; etc.) para, por un lado, estudiar y cuantificar las principales alteraciones que afectan al gen *AHR* en el adenocarcinoma pulmonar (el subtipo histológico más relevante de cáncer de pulmón), y por otro, identificar las firmas transcripcionales que mejor correlacionan con la actividad de AhR, y su asociación con las mutaciones oncogénicas más frecuentes en esta histología, como *TP53*, *KRAS*, *STK11*, *KEAP1* y *EGFR*. La posible relación entre AhR y EGFR será estudiada con mayor profundidad dado su carácter de diana terapéutica para los inhibidores de tirosina quinasa (ITQs) actualmente primera línea de tratamiento para los tumores dirigidos por mutaciones en *EGFR*, y que la activación de AhR se ha postulado como un posible mecanismo de resistencia a los ITQs. Por último, validaremos la interacción AhR-EGFR mediante *western blotting*, y ensayos de citotoxicidad y muerte celular *in vitro* en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar con mutaciones en *EGFR* (H1975 y HCC4006) y sus equivalentes resistentes a los ITQs (H1975 AZDR y HCC4006 GeR) tratadas con el agonista de AhR 2-(1'*H*-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester (ITE) y el antagonista 2-methyl-N-[2-methyl-4-(2-methylphenyl)azophenyl]-3-pyrazolecarboxamide (CH223191) en combinación con el ITQ de EGFR osimertinib.

Palabras clave: análisis bioinformático, oncogén, terapia dirigida, *AHR*, adenocarcinoma de pulmón.

Alumno: Miguel Hernández Gamarra

Localidad y fecha: Valencia, julio 2021

Tutor académico: Prof. D. Julián Carretero Asunción

Tutora UPV: Dña. Eloisa Jantus Lewintre



Title: Genomic and functional analysis of the aryl hydrocarbon receptor AhR in lung cancer: relationship with targeted therapies against *EGFR* oncogene.

Abstract

Cancer is the leading cause of death in developed countries and the second leading cause worldwide, after cardiovascular diseases. Lung cancer is the second most frequent type of neoplasms in the global population and, more importantly, the one with the highest mortality.

The *AHR* gene codes for the aryl hydrocarbon receptor (AhR), a transcription factor involved in regulation of gene expression. At first, it was thought to act mainly as a sensor of xenobiotics and regulating expression of enzymes involved in the metabolization of these chemical compounds. However, AhR has also been shown to play a role in the immune system regulation, stem cell maintenance and cell differentiation processes, as well as epithelial-mesenchymal transition (EMT), showing its potential as a possible therapeutic target. The AhR transcription factor is usually found in its inactive state located in the cytosol, bound to several co-chaperones. Once activated by binding to its ligands (exogenous or endogenous), it dissociates from the chaperones and translocates to the cell nucleus, where it dimerizes with ARNT (AhR nuclear translocator). This AhR-ARNT dimer binds to AhR response elements (AHRE) located in promoter regions of multiple genes, causing changes in their transcription.

Due to the increasing importance of this factor in different types of cancer, this research project proposes a comprehensive meta-analysis of the main genomic information databases (TCGA, <https://tcgportal.org> and CCLE, <https://portals.broadinstitute.org/ccle>) and different bioinformatics pipelines available online (CBIOPORTAL, <https://www.cbiportal.org>; GSEA, <https://www.gsea-msigdb.org>; etc.) to study and quantify the main alterations affecting the *AHR* gene in lung adenocarcinoma (the most relevant histological subtype of lung cancer), and to identify the transcriptional signatures that best correlate with AhR activity, and their association with the most frequent oncogenic mutations in this histology, such as *TP53*, *KRAS*, *STK11*, *KEAP1* and *EGFR*. The possible relationship between AhR and EGFR will be studied in greater depth given its character as a therapeutic target for tyrosine kinase inhibitors (ITKs), currently the first line of treatment for tumors driven by *EGFR* mutations. Besides AhR activation has been postulated as a possible mechanism of resistance to ITKs. Finally, we will validate the AhR-EGFR interaction by western blotting, and *in vitro* cytotoxicity and cell death assays in *EGFR*-mutated lung adenocarcinoma cell lines (HCC827 and HCC4006) and their resistant form to ITKs (H1975 AZDR y HCC4006 GeR) treated with AhR agonist 2-(1^H-indole-3[']-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester (ITE) and antagonist 2-methyl-N-[2-methyl-4-(2-methylphenyl)azophenyl]-3-pyrazolecarboxamide (CH223191) in combination with the *EGFR* ITK osimertinib.

Key words: bioinformatic analysis, oncogen, targeted therapy, *AHR*, lung adenocarcinoma.

Author: Miguel Hernández Gamarra

Location and date: Valencia, July 2021

Academic supervisor: Prof. D. Julián Carretero Asunción

Institution supervisor: Dña. Eloisa Jantus Lewintre



Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutores Julián y Eloisa por todo el tiempo y esfuerzo que me han dedicado y darme la oportunidad de trabajar en este proyecto. A Eva Serna por su amabilidad y pasión por la investigación que tan bien sabe transmitir, y a mis profesores, en especial a Ada y Lynne por su amabilidad, apoyo y enseñarnos a razonar y pensar como un investigador.

Dar gracias a todos los miembros del laboratorio: Cris, Eva, Irene, Lourdes, Salva y Sonia por el buen ambiente, su simpatía y ayuda. En especial a Eva y a Sonia por dedicar tantas horas de su tiempo a enseñarme las distintas técnicas. Este trabajo no habría sido posible sin vosotros.

A todos mis amigos, tanto a los de Valencia como a los de mi pueblo, por soportarme en mis peores momentos y estar ahí siempre para apoyarme y darme consejo.

Por último, y como no podría ser de otra forma, dar las gracias a mis padres por su confianza en mí y apoyo constante. Gracias por estar ahí siempre y esforzaros tanto por ayudarme a alcanzar mis metas.

“You are never going to learn something as profoundly as when it is purely out of curiosity.”

CHRISTOPHER NOLAN –

“It took cancer to realize that being self-centered is not the way to live. The answer is to try and help others.”

TERRY FOX –

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Epidemiología. El cáncer como problema de salud pública	1
1.1.1. Epidemiología del cáncer de pulmón	1
1.2. Histología del cáncer de pulmón	2
1.2.1. Cáncer pulmonar no microcítico	2
1.3. Patogénesis del cáncer de pulmón. Principales genes alterados	2
1.3.1. Genes supresores de tumores	3
1.3.1.1. <i>TP53</i>	3
1.3.1.2. <i>STK11</i>	3
1.3.1.3. <i>KEAP1</i>	4
1.3.2. Oncogenes	4
1.3.2.1. <i>KRAS</i>	4
1.3.2.2. <i>EGFR</i>	5
1.4. Tratamientos del cáncer de pulmón	5
1.4.1. Terapias dirigidas	5
1.4.1.1. <i>EGFR</i>	5
1.4.1.2. <i>ALK</i>	6
1.4.1.3. <i>ROS1</i>	6
1.4.2. Mecanismos de resistencia adquiridos a los inhibidores de <i>EGFR</i>	6
1.4.2.1. Mutaciones secundarias y terciarias de <i>EGFR</i>	7
1.4.2.2. Transformaciones fenotípicas	7
1.4.2.3. Activación de vías alternativas	7
1.5. Receptor de hidrocarburos de arilo	7
1.5.1. Estructura y función fisiológica de AhR	8
1.5.2. Papel de AhR en el cáncer	9
1.5.2.1. Control del ciclo celular y proliferación	9
1.5.2.2. Señalización vía HIF-1 α	10
1.5.2.3. Migración y metástasis	10
1.5.2.4. Regulación inmune	10
1.5.2.5. Otras vías de señalización	11
1.5.3. Reguladores de la actividad de AhR	11
1.5.3.1. Agonistas	11
1.5.3.1.1. Exógenos	12
1.5.3.1.2. Endógenos	12
1.5.3.2. Antagonistas	12
1.5.3.2.1. CH223191	12
2. Objetivos	13
3. Materiales y métodos	14
3.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo	14
3.2. Reactivos	14
3.3. Metaanálisis	14
3.4. ssGSEA	15
3.5. Ensayo de citotoxicidad celular con sulforodamina B	15
3.6. Estudio de formación de colonias	16
3.7. Western blot	16
3.7.1. Preparación y cuantificación de las muestras	16
3.7.2. Electroforesis y transferencia	16
3.7.3. Inmunodetección	17
4. Resultados y discusión	18
4.1. Principales alteraciones de <i>AHR</i> en el cáncer y sus efectos	18
4.2. Asociación de la expresión de <i>AHR</i> con las principales mutaciones del adenocarcinoma de pulmón	20
4.3. Genes y firmas transcripcionales de la actividad de AhR	22
4.4. Implicación de AhR en la resistencia adquirida a los ITQs de <i>EGFR</i>	24
5. Conclusión	29
6. Referencias bibliográficas	30

Índice de tablas

1. Líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón empleadas y su perfil mutacional de EGFR.	14
2. Composición de las dos fases del gel de poliacrilamida.	16
3. Lista de anticuerpos primarios empleados en el <i>western blot</i>	17
4. Lista de anticuerpos secundarios empleados en el <i>western blot</i>	17
5. Predicción del efecto de las mutaciones localizadas en los dominios funcionales del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR). Realizado con la herramienta <i>online</i> PROVEAN (http://provean.jcvi.org).	18

Índice de figuras

- 1. Mecanismo de señalización de AhR.** El receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) en su forma inactiva se encuentra en el citoplasma formando un complejo con Src, la proteína 2 asociada a X (XAP2), la proteína de shock térmico HSP90 y p23. Una vez interacciona con su ligando el complejo se deshace y AhR se transloca al núcleo, donde dimeriza con el translocador nuclear de AhR (ARNT). El dímero AhR/ARNT puede unirse a secuencias consenso conocidas como Elementos de Respuesta a AhR (AHRE) localizadas en los promotores de ciertos genes y actúa como factor de transcripción. 8
- 2. Perfil mutacional del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) en pacientes de adenocarcinoma de pulmón.** Obtenido del cBioPortal (<http://www.cbioportal.org>). 18
- 3. Análisis de la expresión de AHR.** (A) Relación lineal entre el número de copias (CN) de *AHR* y su expresión en pacientes de adenocarcinoma de pulmón del TCGA (azul) y líneas celulares de la CCLE (rojo). (B) Relación lineal entre la expresión de *AHR* y sus niveles de proteína. (C) Expresión de *AHR* en todos los cánceres del TCGA comparado con la de tejido normal empleando TNMplot (<https://tnmplot.com>). Se muestran en rojo* los tipos histológicos de cáncer que presentan una diferencia significativa según la prueba U de Mann-Whitney. TCGA: *The Cancer Genome Atlas*; CCLE: *Cancer Cell Line Encyclopedia*. 19
- 4. Estudio de la relación de los niveles de ARNm de AHR con la supervivencia en pacientes de adenocarcinoma de pulmón.** (A) Asociación de la expresión de *AHR* con la supervivencia libre de progresión y (B) la supervivencia global a partir de los datos disponibles en la herramienta online KMplot (<https://kmplot.com/analysis>), donde “high” hace referencia a las muestras con niveles de ARNm de *AHR* por encima de la mediana y “low” por debajo de este valor. 20
- 5. Expresión de AHR en función del perfil mutacional de los principales genes implicados en el adenocarcinoma de pulmón.** (A) Diferencias significativas en la expresión de *AHR* entre las variedades *wild type* (WT) y mutada (MT) de los principales genes con potencial oncogénico en pacientes de adenocarcinoma de pulmón del TCGA (n=503), y (B) líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar de la CCLE (n=78). Los asteriscos (*), (**), (***) y (****) son indicativo de que existe una significancia estadística entre las muestras con el gen *wild type* y el mutado, con un p-valor < 0.05, p-valor < 0.01, p-valor < 0.005 y p-valor < 0.0001, respectivamente (t-test). 21
- 6. Análisis de correlación entre la expresión de AHR y posibles genes marcadores con firmas hallmark y actividad AhR.** (A) *Heatmap* de *AHR* con alguno de sus principales genes diana obtenidos de la bibliografía y firmas transcripcionales obtenidas del iLINC (<http://www.ilincs.org/ilincs/signatures>) y MSigDB (<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb>) en pacientes de adenocarcinoma de pulmón TCGA, y (B) líneas celulares de la CCLE. El perfil mutacional de las muestras (eje horizontal) está representado con marcas de color negro para los mutantes al lado del gen correspondiente. KD hace referencia a *knockdown* y los asteriscos (*) indican las firmas transcripcionales. 23
- 7. Correlación de los niveles de ARNm de AHR con la de los genes diana de AhR seleccionados.** (A) En pacientes de adenocarcinoma de pulmón (ADC) del *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) y (B) en líneas celulares de ADC de la *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE). 24
- 8. Niveles de expresión de AHR en líneas celulares sensibles y resistentes a ITQs de EGFR.** Las líneas resistentes empleadas fueron H1975-CLR (resistente a CL-387,785), HCC827-ER23 (resistente a erlotinib) y HCC4006-GeR (resistente a gefitinib). Los asteriscos (*) y (****) son indicativo de que existe una significancia estadística entre las muestras con el gen *wild type* y mutado, con un p-valor < 0.05 y < 0.0001, respectivamente. 24
- 9. Expresión diferencial de AhR y sus partners en líneas sensibles y resistentes a ITQs.** (A) Determinación de los niveles de las proteínas AhR, ARNT, HIF-1 α y α -tubulina (como control de carga) por *western blot* a partir de extractos proteicos de las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón H1975, HCC4006 y HCC827 sensible y resistentes a los ITQs (AZDR, GeR y ER23, respectivamente). (B) Cuantificación relativa de los niveles de AhR en el *western* respecto al control (α -tubulina). 25
- 10. Ensayo de citotoxicidad celular con sulforodamina B.** Estudio del efecto inhibitor o estimulador de la proliferación celular a las 96 horas del ITE, osimertinib, CH223191 y todas sus posibles combinaciones en (A) la línea celular H1975 y su equivalente resistentes a ITQs de EGFR: H1975-AZDR, y (B) HCC4006 y su variante resistente (HCC4006-GeR). El control tiene la concentración correspondiente de DMSO utilizado como vehículo. 27
- 11. Ensayo de formación de colonias.** Estudio del efecto inhibitor o estimulador de la proliferación celular a las 2 semanas del ITE, osimertinib (OSI) y CH223191 (CH), así como de todas sus posibles combinaciones en las líneas celulares H1975, HCC4006, y sus equivalentes resistentes a ITQs de EGFR (H1975-AZDR y HCC4006-GeR). Al control se le añadió DMSO al 0.1%, vehículo en el que estaban disueltos todos los compuestos empleados. 28

Lista de abreviaturas

- ABCC3: Transportador de aniones orgánico multiespecífico canalicular 2
- ADC: Adenocarcinoma pulmonar
- ADN-PK: Quinasa dependiente de ADN, del inglés *DNA-dependent protein kinase*
- AhR: Receptor de hidrocarburos de arilo, del inglés *Aryl hydrocarbon receptor*
- AHR: Gen del receptor de hidrocarburos de arilo
- AHRE: Elemento de respuesta a AhR, del inglés *AhR Response Element*
- AhRR: Represor de AhR, del inglés *AhR repressor*
- ALK: *Anaplastic lymphoma kinase*
- AMP: Adenosín monofosfato, del inglés *Adenosine monophosphate*
- AMPK: Proteína quinasa activada por AMP, del inglés *AMP-activated protein kinase*
- ARNT: *AhR nuclear translocator*
- ATP: Adenosín trifosfato, del inglés *Adenosin triphosphate*
- ATCC: *American Type Culture Collection*
- bHLH/PAS: *Basic helix-loop-helix/Per-ARNT-SIM*
- cAMP: *Cyclic adenosine monophosphate*
- CCLE: *Cancer Cell Line Encyclopedia*
- CDH1: E-cadherina
- CDK: Quinasa dependiente de ciclina, del inglés *Cyclin-dependent kinase*
- CH223191: *2-methyl-N-[2-methyl-4(2-methylphenyl)azophenyl]-3-pyrazolecarboxamide*
- CKII: Quinas de caseína II, del inglés *Casein Kinase II*
- CLR: Resistente a CL-387,785
- CN: Número de copias, del inglés *Copy Number*
- CPM: Cáncer de pulmón microcítico
- CPNM: Cáncer de pulmón no microcítico
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético, del inglés *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico, del inglés *Epidermal growth factor receptor*

EML4: *Echinoderm microtubule-associated protein-like 4*

EMT: Transición epitelio-mesénquima, del inglés *Epithelial–mesenchymal transition*

ER23: Resistentes a erlotinib

ERK: *Extracellular signal-regulated kinase*

ES: *Enrichment score*

FAS: Ácido graso sintasa, del inglés *Fatty acid synthase*

FICZ: *6-formilindolo[3,2- β]carbazole*

GeR: Resistentes a gefitinib

GDP: Guanosín difosfato, del inglés *Guanosin diphosphate*

GTP: Guanosín trifosfato, del inglés *Guanosin triphosphate*

HGF: Factor de crecimiento hepático, del inglés *Hepatocyte growth factor*

HIF-1 α : Subunidad α del factor 1 inducible por hipoxia, del inglés *Hypoxia-inducible factor 1 α*

HRE: Elementos de respuesta a hipoxia, del inglés *Hypoxia Response Element*

HRP: Peroxidasa de rábano picante, del inglés *Horseradish peroxidase*

HSP90: *Heat shock protein 90*

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

IDO: *Indole 2,3-dioxygenase*

IL: Interleucina

ITE: *2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester*

ITGA2: Subunidad $\alpha 2$ de la integrina, del inglés *Integrin Alpha 2*

ITQ: Inhibidor de tirosina quinasa

KD: *Knockdown*

KEAP1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*

MAPK: Proteína quinasas activadas por mitógenos, del inglés *Mitogen-activated protein kinase*

MDM2: *Murine doble minute 2*

MSigDB: *Molecular Signatures Database*

MT: Mutante

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero, del inglés *mammalian target of rapamycin*

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, del inglés *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NF κ B: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NRF2 (NFE2L2): *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés *Platelet derived growth factor*

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa, del inglés *Phosphoinositide 3-kinases*

RB1: Proteína del retinoblastoma

ROS: Especies reactivas de oxígeno, del inglés *Reactive Oxygen Species*

ROS1: *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS*

SLP: Supervivencia libre de progression

ssGSEA: *Single Sample Gene Set Enrichment Analysis*

STAT: *Signal transducer of activators of transcription*

STK11: *Serine/threonine kinase 11*

TBS-T: TBS-Tween

TCDD: *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

TDO: *Tryptophan 2,3-dioxygenase*

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β , del inglés *Tumor Growth Factor β*

TQ: Tirosina quinasas

Th17: Linfocitos *T helper 17*

Tr1: Células T reguladoras de tipo 1

Treg: Células T reguladoras

ULK1: *Unc-51 like autophagy activating kinase I*

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés *Vascular endotelial growth factor*

WT: Silvestre, del inglés *wild type*

XAP2: Proteína 2 asociada a X, del inglés *hepatitis B virus X-associated protein*

1 Introducción

El cáncer, definido como el conjunto de enfermedades en las que las células se dividen y crecen de manera incontrolable adquiriendo la capacidad de invadir otras partes del cuerpo, está entre las primeras causas de mortalidad en el mundo. Las neoplasias son patologías complejas con una base genética, y a pesar de los avances en el conocimiento de la biología de las células tumorales logrados en el siglo XXI con los proyectos de secuenciación masiva del cáncer como el TCGA (*The Cancer Genome Atlas*; <https://www.cancer.gov/tcga>) (Tomczak et al., 2015), el aumento de la supervivencia es todavía moderado.

1.1 Epidemiología. El cáncer como problema de salud pública

El cáncer es la primera causa de muerte en los países más desarrollados tras las enfermedades cardiovasculares, con 19.3 millones de nuevos casos y 10 millones de fallecidos en el 2020, como indica las estadísticas publicadas por la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) (FERLAY ET AL., 2020a; Sung et al., 2021).

La Organización Mundial de la Salud estima que a lo largo del año 2019 más del 17.2% de la mortalidad a nivel mundial fue consecuencia del cáncer (Ferlay et al., 2021; Sung et al., 2021). Se ha alertado del aumento continuo de la incidencia y mortalidad por cáncer, observándose que desde el 2018 se ha incrementado el número de nuevos casos anuales en un 6.6% y ha habido un aumento del 4.2% en su mortalidad (Sung et al., 2021). Las estimaciones poblacionales indican que el número de nuevos casos aumentará en las dos próximas décadas hasta 30.2 millones al año en 2040 y que la mortalidad alcanzará los 16.3 millones (FERLAY ET AL., 2020b).

En España, el número de nuevos casos diagnosticados ha ascendido a más de 282 mil en el año 2020 según los datos reportados por la IARC. En cuanto a la mortalidad se predijo para el 2020 una tasa de 297.8 y 186.7 fallecidos por cada cien mil habitantes en hombres y mujeres respectivamente, llegándose a alcanzar los 113 mil fallecidos. Las predicciones realizadas por la IARC para el año 2040 prevén un aumento hasta los 375 mil nuevos casos y 160 mil fallecidos.

1.1.1 Epidemiología del cáncer de pulmón

Los datos recogidos por la IARC indican que el cáncer de mama en mujeres ha superado al de pulmón respecto a los datos obtenidos en el 2018 (Sung et al., 2021). Sin embargo, el cáncer de pulmón es el más frecuente en hombres, suponiendo el 13% de los nuevos diagnósticos de cáncer y el principal responsable de causas de muerte por cáncer a nivel global, sumando más muertes que el cáncer de colon, mama y próstata juntos con aproximadamente 1.8 millones de fallecidos, el 18% de las defunciones consecuencia del cáncer (Siegel et al., 2013). Las previsiones realizadas por la misma Agencia para el año 2040 son de 3.63 millones de nuevos diagnósticos y una mortalidad que superará los 3 millones, lo que supondría un aumento del 57.8% y del 67.2 % en la tasa de incidencia y mortalidad respectivamente (FERLAY ET AL., 2020b).

En nuestro país, la Red Española de Registros de Cáncer recoge que el cáncer de pulmón es el cuarto más diagnosticado tras los de colon y recto, próstata y mama, así como que en los últimos años se ha notado una tendencia creciente en su incidencia. De hecho, GLOBOCAN predice que para el 2040 se diagnosticarán 10.3 mil casos más en España, un aumento del 35.3% respecto a los casi 29,200 diagnósticos del 2020 (FERLAY ET AL., 2020b). En lo referente a la mortalidad la cifra actual alcanza los 22,930 fallecidos en el 2020 y se prevé que para el 2040 haya un aumento de 9 mil muertes causadas por el cáncer de pulmón, suponiendo un aumento del 39.3%.

A pesar de la elevada tasa de incidencia, las neoplasias pulmonares presentan una baja tasa de prevalencia debido a su elevada mortalidad y reducida supervivencia, con tan sólo un 15% de supervivencia a los 5 años a nivel global (Siegel et al., 2017).

Todos los datos anteriormente recogidos ponen de manifiesto la gravedad del cáncer y en especial del cáncer de pulmón como una de las principales causas de defunción, justificando que cada vez se inviertan más esfuerzos en su investigación con el objetivo de mejorar su diagnóstico, tratamiento y pronóstico.

1.2 Histología del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón se caracteriza por su elevado número de mutaciones (Futreal et al., 2004), siendo el tabaco el principal, aunque no el único, agente causante (Thun et al., 2008), ya que existen otros factores, tanto genéticos como medioambientales, que influyen en su desarrollo y progresión (Wang et al., 2017). Se puede dividir en dos categorías histológicas en función del tamaño de las células afectadas: cáncer de pulmón microcítico (CPM) o no microcítico (CPNM). Es importante realizar esta distinción ya que difieren en el comportamiento clínico, tendencia a la diseminación metastásica y estrategias terapéuticas empleadas (Travis, 2002).

1.2.1 Cáncer pulmonar no microcítico

En el 2019 aproximadamente el 85% de los tumores pulmonares se corresponden con cáncer de pulmón no microcítico (Travis et al., 2004), compuestos por células de mayor tamaño, con abundancia de citoplasma y presencia de nucléolos. Por este motivo el CPNM es el principal tipo celular de elección a la hora de abordar estudios en cultivos celulares. A su vez, podemos encontrar 3 subtipos dentro de esta categoría: adenocarcinoma (ADC), carcinoma de células escamosas y carcinoma de pulmón de células grandes diferenciándose en su origen celular, localización dentro del pulmón y patrón de crecimiento. Hasta hace relativamente poco, todos los casos de CPNM se trataban como una única enfermedad (Langer et al., 2010). Sin embargo, tras la observación de que los distintos subtipos presentan diferentes patrones de anomalías genéticas, y las pruebas de ensayos clínicos que han demostrado la influencia de la histología del tumor en la tasa de respuesta y toxicidad a fármacos dirigidos, se ha puesto de manifiesto la importancia de la histología como factor determinantes a la hora de elegir un tratamiento.

Para el propósito de este estudio se ha optado por la utilización de datos y modelos celulares de adenocarcinoma de pulmón (ADC), al tratarse del subtipo histológico mayoritario en la actualidad (Molina et al., 2008). El adenocarcinoma se localiza en los bronquios, bronquiolos y células epiteliales alveolares de la periferia pulmonar y se caracteriza por su heterogeneidad histológica, estando formado por una mezcla de distintos subtipos histológicos (Travis, 2002).

1.3

1.4 Patogénesis del cáncer. Principales genes alterados

La base de la patogenia del cáncer son las alteraciones en los genes reguladores clave, ocasionando la división celular no programada, inhibición de la apoptosis y diferenciación e inestabilidad genética. Los genes mutados con mayor frecuencia en los pacientes de adenocarcinoma de pulmón en los que se centra este estudio son *TP53*, *KRAS*, *KEAP1*, *EGFR* y *STK11* (Herbst et al., 2018). Sin embargo, la alteración de un único gen no es suficiente para que se produzca la transformación de una célula normal a una tumoral, siendo necesarias al menos 3 mutaciones conductoras o *driver* (Tomasetti et al., 2015).

A lo largo de los años, y tras numerosos estudios en el campo, se han ido identificando diferentes mutaciones genéticas que contribuyen a la propagación y crecimiento del cáncer del CPNM. Actualmente es frecuente que tras ser diagnosticado con CPNM, el médico opte por realizar análisis moleculares con el fin de identificar las mutaciones genéticas responsables y obtener el perfil genético del tumor a través de biomarcadores o pruebas genéticas. Además del tipo y el estadio del cáncer, el conocimiento de la presencia de alguna de estas mutaciones puede orientar al médico a la hora de escoger el tratamiento más adecuado para cada paciente.

1.4.1 Genes supresores de tumores

La mayoría de los genes alterados se corresponden con genes supresores de tumores, encargados de frenar la progresión del ciclo celular y de asegurar la integridad genómica. Este grupo de genes, a diferencia de los oncogenes, tiene un carácter recesivo, siendo necesarias modificaciones causantes de la pérdida de función en ambos alelos. Su efecto protumoral es mayor que el de los oncogenes.

1.4.1.1 TP53

El gen *TP53* codifica a la proteína tumoral p53. Esta proteína nuclear con actividad reguladora de la transcripción de genes de muerte y supervivencia es uno de los principales supresores de tumores, ya que detecta daños en el ADN celular, actuando como punto de control del ciclo celular en las fases G1/S y G2/M, bloqueando la mitosis o iniciando la apoptosis para evitar el crecimiento descontrolado de las células dañadas (Bates y Vousden, 1999).

Su función reguladora depende de una vida media corta, que aumenta cuando la proteína p53 es fosforilada por la acción de la quinasa dependiente de ADN (ADN-PK) y de caseína II (CKII), activadas por los sensores de daño celular ATM y ATR respectivamente (Sakaguchi et al., 1998). Como resultado de la estabilización de p53 al ser fosforilado, se favorece su localización en el núcleo para activar la expresión de genes al no ser reconocida por MDM2 con actividad ubiquitinligasa, encargada de marcarla para su degradación en el proteasoma (Haupt et al., 1997).

Las mutaciones en *TP53* son las más comunes, encontrándose en más del 50% de los tumores invasivos. Consisten principalmente en mutaciones puntuales de cambio de sentido (*missense*), en las que el cambio de un único nucleótido da lugar a un codón que codifica un aminoácido diferente en base al código genético (Petitjean et al., 2007).

1.4.1.2 STK11

El gen *STK11/LKB1* codifica a la quinasa serina/treonina 11. Esta proteína participa en la regulación del metabolismo y polarización celular, de la apoptosis y la respuesta al daño en el ADN (Korsse et al., 2013). Se da en el 13% de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón (Laderian et al., 2020). Las mutaciones de pérdida de función en este gen supresor de tumores que actúa como punto de control de la fase G1 del ciclo celular tienen un efecto oncogénico (Tiainen et al., 1999).

STK11 se activa cuando los niveles de ATP son bajos (y los niveles de AMP altos), permitiendo la activación por fosforilación de la quinasa dependiente de AMP, AMPK (Zequiraj et al., 2009). La ausencia de nutrientes, y por tanto de ATP, es frecuentes en las regiones centrales de los tumores de gran tamaño, en cuyo caso AMPK conducirá a la fosforilación e inactivación de enzimas implicadas en los procesos que consumen ATP como la síntesis de lípidos (inhibiendo la actividad de la sintetasa de ácidos grasos (FAS) y proteínas (por inhibición del complejo mTOR), mientras que favorece los procesos catabólicos para mantener la homeostasis energética (Mograbí et al., 2021). Además, la pérdida de función de STK11 deriva en la activación aberrante de mTOR favoreciendo la tumorigénesis al aumentar la expresión del factor de transcripción inducible por hipoxia HIF-1 α que favorece la glicolisis aerobia (efecto Warburg) y el proceso de angiogénesis (Laplante y Sabatini, 2009; Masoud y Li, 2015).

Sin embargo, STK11 también tiene un papel pro-tumoral. La activación de la vía de señalización STK11/AMPK/mTOR en los lisosomas favorece la autofagia al inducir la fosforilación de la proteína ULK1 implicada en el inicio de este proceso (Saftig y Puertollano, 2021), y AMPK puede activar por fosforilación al factor de transcripción NRF2, responsable de la activación de la transcripción de genes antioxidantes implicados en la producción de NADPH, que junto a la autofagia, protege a los cánceres del estrés oxidativo y de las quimioterapias inductoras de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ciccarese et al., 2019).

1.4.1.3 KEAP1

KEAP1 es el tercer gen que presenta un mayor número de alteraciones en los pacientes ADC, estando mutado en el 20–30% de los cánceres de pulmón (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014), y es uno de los genes clave, junto a *NRF2* en la regulación del estrés oxidativo.

Este gen supresor de tumores codifica la subunidad de reconocimiento encargada de interaccionar con *NRF2* y reclutar a la ubiquitina ligasa *CUL3*, responsable de la degradación de *NRF2* en el proteasoma (Kobayashi et al., 2004). *NRF2* es un factor de transcripción encargado de la regulación de numerosos genes citoprotectores codificantes de enzimas detoxificadoras y antioxidantes (Itoh et al., 1997). No obstante, la presencia de estrés oxidativo altera la conformación de *KEAP1*, permitiendo la disociación de *NRF2* que, en lugar de ser degradado, se translocará al núcleo para actuar como factor de transcripción, favoreciendo la expresión de genes con propiedades antioxidantes (Sporn y Liby, 2012). A pesar de su efecto protector, elevadas concentraciones de *NRF2* confieren resistencia a las células tumorales ante los medicamentos anticáncer y ROS, mediando su reprogramación metabólica (Taguchi y Yamamoto, 2017).

Así pues, las células presentan bajos niveles de *NRF2* en condiciones normales, que se ven incrementados ante la presencia de electrófilos, capaces de modificar los residuos reactivos de cisteína en *KEAP1* (Itoh et al., 1997). Dichas modificaciones inactivan a *KEAP1*, aumentando la presencia de *NRF2*, al igual que las mutaciones de *KEAP1*, que impiden el reconocimiento y la degradación de *NRF2* y favoreciendo la tumorigénesis debido a su mayor actividad en las células tumorales (Ohta et al., 2008).

La regulación al alza de *NRF2* está asociada al desarrollo y la progresión del cáncer, ya que altos niveles de *NRF2* nuclear facilitan el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas como resultado de la transactivación de genes citoprotectores (Hayes y Dinkova-Kostova, 2014).

1.4.2 Oncogenes

El resto de los genes *drivers* implicados en la tumorigénesis son protooncogenes responsables de la codificación de proteínas promotoras de la proliferación celular, que se transforman en oncogenes como consecuencia de mutaciones hiperactivadoras, causando una división celular no regulada. Los oncogenes tienen un efecto dominante, por lo que es suficiente con que se produzcan mutaciones conductoras en una de las dos copias presente en el genoma.

1.4.2.1 KRAS

Las mutaciones somáticas en el gen *KRAS*, se encuentran aproximadamente en el 30% de pacientes de CPNM. Este gen es el responsable de la expresión de proteínas transductoras intracelulares involucradas en la transmisión de señales generadas por la unión de factores de crecimiento como EGF a sus receptores celulares (Rodenhuis, 1992). Cuando las proteínas *RAS* están unidas a GDP, se encuentran inactivas en estado de reposo. Su activación ocurre tras el intercambio de GDP por GTP, formándose un complejo que regula el crecimiento celular, diferenciación y apoptosis a través de la interacción con una gran variedad de moléculas efectoras, incluyendo aquellas involucradas en las cascadas de señalización de fosfoinositol 3-quinasa (*PI3K*), proteína quinasas activadas por mitógenos (*MAPK*) y transducción de señales y activación de transcripción (*STAT*) (Roberts y Der, 2007). La configuración de señalización de *RAS* es detenida por su actividad GTPasa intrínseca (Harvey, 1964). El principal efecto de los cambios producidos en las bases nitrogenadas del gen *KRAS* es el reemplazo de los aminoácidos de glicina en las posiciones 12 y 13 (G12 y G13) o de la glutamina en la posición 61 (Q61) (Brose et al., 2002). A causa de estas modificaciones se produce un deterioro de su actividad GTPasa, ocasionando la acumulación de *KRAS* en su estado activo de forma constitutiva, permitiendo el crecimiento y división descontrolada de las células (Trahey y McCormick, 1987).

1.4.2.2 EGFR

El gen *EGFR* codifica el receptor transmembrana del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*) con actividad tirosina quinasa (Yarden y Sliwkowski, 2001). Esta proteína se localiza en la superficie de las células y es la encargada de contribuir a su crecimiento y proliferación. Algunas células CPNM presentan cantidades superiores de este receptor, lo que origina un crecimiento más rápido de lo normal. Se ha visto que este gen presenta mutaciones en torno al 23% de los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas.

EGFR pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa HER/*erbB* constituidos por un dominio extracelular de unión a ligando rico en cisteína, un dominio transmembrana α -hélice, un dominio citoplasmático tirosina quinasa (TQ) y un dominio de señalización carboxi-terminal (Wells, 1999). Este receptor se activa ante la unión de su ligando específico, ocasionado que tenga lugar su homodimerización o que forme un heterodímero, y se active el dominio tirosina quinasa. Como consecuencia de este proceso, se produce la autofosforilación del dominio intracelular del receptor para permitir la interacción con moléculas adaptadoras implicadas en vías de señalización aguas abajo (Scagliotti et al., 2004). La ruta de señalización de EGFR conduce en última instancia a un incremento de la proliferación, angiogénesis, metástasis y reducción de la apoptosis (Woodburn, 1999).

Las principales mutaciones somáticas encontradas en el dominio TQ de EGFR consisten en pequeñas deleciones en el exón 19, mutaciones puntuales (G719S, L858R y L861Q) en los exones 19 y 21 (Paez et al., 2004) y con menor frecuencia duplicaciones que no alteran la pauta de lectura y/o inserciones, principalmente en el exón 20 (Shigematsu y Gazdar, 2006). Estas mutaciones en el dominio quinasa de EGFR ocasionan la desestabilización de su conformación y la activación constitutiva de la actividad quinasa al no poder adoptar la estructura característica de su forma inactiva que autoinhibe su actividad (Yun et al., 2007).

1.5 Tratamiento del cáncer de pulmón

Los tratamientos convencionales del cáncer consisten en la extirpación del tumor por cirugía y someter a los pacientes a quimio o radioterapia en caso de neoplasias más avanzadas que han metastatizado y no pueden ser operadas. No obstante, los proyectos de secuenciación del cáncer como el TCGA y los avances en el conocimiento de las bases moleculares del cáncer han permitido el desarrollo de terapias dirigidas a las alteraciones responsables de la carcinogénesis.

1.5.1 Terapias dirigidas

Las terapias dirigidas supusieron un gran avance en el campo de la medicina de precisión, permitiendo administrar a cada paciente el mejor tratamiento disponible en función de su perfil molecular. Estos tratamientos se dirigen a las proteínas que controlan el crecimiento, la división y la propagación de las células cancerosas. La introducción de las terapias dirigidas en la práctica clínica ha demostrado su gran efectividad frente a los tratamientos tradicionales, aumentando la supervivencia y reduciendo la toxicidad (Cleeland et al., 2012). Consisten principalmente en moléculas de pequeño tamaño y anticuerpos monoclonales con especificidad por las proteínas oncogénicas y que son capaces de evitar su actividad.

1.5.1.1 EGFR

EGFR es actualmente una de las dianas terapéuticas más importantes en el tratamiento del adenocarcinoma de pulmón, destacando el desarrollado de inhibidores dirigidos a alteraciones en su dominio catalítico de actividad quinasa (ITQs) ubicado en los exones 18-21, y los anticuerpos monoclonales que impiden que se lleve a cabo la autofosforilación.

Los anticuerpos monoclonales como el cetuximab actúan como antagonistas competitivos mediante la unión a la región extracelular del receptor, impidiendo la unión del ligando. Por otra parte, los ITQs son inhibidores competitivos del sitio de unión del ATP, capaces de bloquear el proceso de señalización y mejorar la respuesta terapéutica (Jiao et al., 2018). Las mutaciones activadoras de EGFR más comunes son las deleciones en el exón 19 (E746-A750del) y mutaciones *missense* en el exón 21 (L858R), representando conjuntamente más del 90% de sus alteraciones (Lynch et al., 2004). Precisamente estas dos mutaciones son las que confieren una mayor sensibilidad a la terapia con ITQs al aumentar su afinidad hacia el bolsillo de unión a ATP en comparación con el EGFR *wild type*.

Dentro de los ITQ de EGFR podemos distinguir entre los inhibidores reversibles de primera generación, destacando el gefitinib y el erlotinib (Giaccone, 2004; Perez-Soler, 2004) y los inhibidores de segunda generación como el afatinib, que bloquean EGFR de forma irreversible (Li et al., 2008). Sin embargo, en los últimos años ha cobrado una mayor importancia la investigación de inhibidores de tercera generación como el osimertinib (Cross et al., 2014), empleado en pacientes que adquieren resistencias secundarias a las generaciones anteriores debido a la mutación T790M en el exón 20, que impide la unión del ITQ al aumentar la afinidad por el ATP (Kobayashi et al., 2005).

1.5.1.2 ALK

Alrededor del 5% de los tumores CPNM presentan mutaciones en el gen del receptor tirosina quinasa del linfoma anaplásico (*ALK*), responsables de la fusión con la oncoquinasa asociada al microtúbulo de equinodermo tipo 4 (*EML4*) (Soda et al., 2007). La formación del oncogén de fusión tipo tirosina quinasa *EML4-ALK* es posible como resultado de una pequeña inversión en el cromosoma 2, generando una proteína quimérica con actividad *ALK* constitutiva y oncogénica.

Debido al papel esencial de la actividad tirosina quinasa *ALK* en el proceso de transformación y oncogenicidad, varios inhibidores con potencial terapéutico de estas quinasas han sido evaluados en modelos preclínicos *in vitro* e *in vivo*, ocasionando la apoptosis y reducción tumoral respectivamente (McDermott et al., 2008).

1.5.1.3 ROS1

Otra de las dianas terapéuticas para el tratamiento del cáncer de pulmón son los reordenamientos cromosómicos que involucran al gen *ROS1* (Rikova et al., 2007). Este oncogén codifica un receptor tirosina quinasa. La fusión de este gen con parte de otro gen causa su hiperactivación, de forma que ocasiona un crecimiento celular descontrolado. Los genes con los cuales puede tener lugar la fusión son muy diversos (*CD74*, *TMP3*, *FIG*, etc.), aunque el tratamiento recomendado es el mismo para todos los pacientes que presentan un reordenamiento de *ROS1*, independientemente del gen con el que se ha producido la fusión (Lin y Shaw, 2017). La estrategia terapéutica consiste en el uso de ITQs entre los que destaca el crizotinib.

La homología que *ROS1* presenta con *ALK* ha sido determinante en el desarrollo de terapias dirigidas a *ROS1*, ya que varios ITQs dirigidos a *ALK* presentan una actividad inhibitoria doble siendo también eficientes contra *ROS1* (Ou et al., 2012).

1.5.2 Mecanismos de resistencia adquirida a los inhibidores de EGFR

Las resistencias adquiridas o secundarias son aquellas que se desarrollan tras un tratamiento prolongado, aproximadamente a los 9-14 meses, a diferencia de la resistencia intrínseca o primaria que están presentes antes de empezar el tratamiento haciendo que sea inefectivo.

1.5.2.1 Mutaciones secundarias y terciarias de EGFR

La principal vía de resistencia adquirida a los ITQs de primera y segunda generación dirigidos a EGFR se debe a la adquisición de mutaciones secundarias en el dominio hidrofóbico de unión a ATP, destacando T790M por estar presente en más del 50% de los pacientes con resistencia clínica (Huang y Fu, 2015). Este residuo de treonina está implicado en la formación de un puente de hidrógeno crucial con el fármaco, por lo que su sustitución por un residuo de metionina de mayor tamaño da como resultado un impedimento estérico, además de un incremento de la afinidad de EGFR por el ATP superior al de los ITQs (Yun et al., 2008). No fue hasta el 2015 que la FDA aprobó la aplicación clínica de osimertinib, suponiendo el primer ITQ dirigido a la mutación de resistencia T790M y que no afecta a los receptores *wild type*, reduciendo los efectos adversos. Sin embargo, ya han surgido nuevas alteraciones genéticas como la mutación terciaria C797S en el sitio de unión que confiere resistencia cruzada a los ITQs de tercera generación y para las cuales aún no se ha hallado un nuevo tratamiento (Niederst et al., 2015).

1.5.2.2 Transformaciones fenotípicas

Existen también varios procesos de alteraciones fenotípicas que contribuyen al desarrollo de resistencia de los ITQs dirigidos a EGFR. Entre ellos destaca la transición epitelio-mesénquima (EMT) caracterizada por la pérdida de polaridad celular, interacciones celulares y marcadores epiteliales (como la E-cadherina, CDH1) a favor de marcadores mesenquimales debidos a la reprogramación transcriptómica activada por la ruta de señalización WNT modulada por la β -catenina (Thiery, 2002). Este cambio fenotípico implica un aumento de expresión del receptor tirosina quinasa AXL o de su ligando GAS6 como consecuencia de la mayor expresión del marcador mesenquimal vimentina, y que es el responsable de la resistencia a los ITQs en cáncer de pulmón con EGFR mutante (Zhang et al., 2012). Por otra parte, se ha descrito que la activación de la vía de señalización *Hedgehog* (Hh), que también está implicada en la transición EMT, disminuye la sensibilidad a los ITQs, aumentando la resistencia.

1.5.2.3 Activación de vías alternativas

La segunda causa más común de resistencia adquirida consiste en la amplificación o mutación de rutas de *bypass*, activando rutas de señalización aguas abajo. Se debe principalmente a amplificaciones del oncogén *MET* que codifica un receptor tirosina quinasa transmembrana (20-30% de los casos) que se activa al interactuar con el factor de crecimiento hepático (HGF). La activación de MET desencadena la activación de la ruta AKT que favorece la proliferación y supervivencia celular, inhibiendo la apoptosis (Ercan et al., 2010).

La amplificación del receptor HER2/ErbB2 es otro de los mecanismos de resistencia debido a que favorece la formación de heterodímeros con EGFR y la transmisión de señales de supervivencia a través de la activación de otras vías como AKT o MAPK (Takezawa et al., 2012).

Otras vías menos frecuentes consisten en las perturbaciones de la maquinaria apoptótica (Ware et al., 2010) y la activación constitutiva de transductores aguas abajo del EGFR (PI3K, AKT, RAF y MEK entre otros). Ye et al. (2018) encontraron evidencias que señalan que el receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) puede incluirse dentro de este último grupo, dado que promueve la aparición de resistencia a los ITQs de EGFR como consecuencia de la activación de la tirosina quinasa SRC. Como veremos más adelante, nuestro trabajo de investigación plantea extender esta hipótesis en un escenario diferente, una vez la resistencia a los ITQs ya ha sido adquirida.

1.6 Receptor de hidrocarburos de arilo

El gen *AHR* codifica para el receptor de hidrocarburos de arilo (AhR), un factor de transcripción citosólico implicado en la regulación de la expresión génica y que se activa ante la interacción con sus ligandos.

1.6.1 Estructura y mecanismo de activación de AhR

El AhR pertenece a la familia hélice-bucle-hélice básica/Per-Arnt-Sim (bHLH/PAS) de factores de transcripción (Fukunaga et al., 1995), caracterizada por la presencia de dos dominios funcionales distintos y altamente conservados. El dominio básico localizado en el extremo N-terminal es el responsable de la unión del factor de transcripción con las regiones promotoras del ADN, mientras que el dominio hélice-bucle-hélice facilita las interacciones entre proteínas. Adicionalmente, esta proteína presenta dos dominios PAS (PAS-A y PAS-B) implicados en la percepción de señales e interacción con los dominios PAS de otras proteínas, como es el caso de la dimerización de AhR con ARNT (*AhR nuclear translocator*). La interacción con el ligando tiene lugar con el dominio PAS-B. El último dominio que presenta es el rico en glutamina (Q-rich) en el extremo C-terminal, encargado del reclutamiento de coactivadores y de la transactivación.

AhR se encuentra en su estado inactivo en el citoplasma de forma constitutiva, unido a la tirosina quinasa SRC, la proteína 2 asociada a X (XAP2), dos proteínas de shock térmico de 90 kD (HSP90) y su co-chaperona p23. La unión de HSP90 es esencial, ya que además de proteger a AhR de ser degradado, junto con p23, también impide la translocación nuclear de la proteína y su interacción con el ADN (Pappas et al., 2018).

La unión con sus ligandos en el dominio PAS-B expone una diana de la proteína quinasa C, cuya fosforilación causa cambios conformacionales responsables del desprendimiento de SRC y XAP2, así como de la translocación del resto del complejo al núcleo celular. Una vez en el núcleo se produce la disociación de las dos moléculas de HSP90 y p23, y la dimerización de AhR con ARNT, también conocido como HIF-1 β (Reyes et al., 1992). El heterodímero AhR/ARNT es capaz de alterar el proceso de transcripción de ciertos genes con elementos de respuesta a AhR (AHRE) (Figura 1). Este factor de transcripción se puede unir a dichos elementos en el promotor de genes como el citocromo P450 (CYP), que metaboliza sustancias pro-carcinogénicas a intermediarios que pueden interactuar con el ADN formando aductos y la consecuente mutagénesis; el represor de AhR (AhRR), favoreciendo el reclutamiento de coactivadores; o el sensor del estrés oxidativo NRF2 (Beischlag et al., 2002; Miao et al., 2005). Por lo general, se ha descrito que AhR se une generalmente a la secuencia consenso 5'-(C)GCGTG-3'. No obstante, se han descrito otros sitios de unión alternativos del complejo AhR/ARNT con el ADN que parecen estar involucrados en las funciones fisiológicas de AhR.

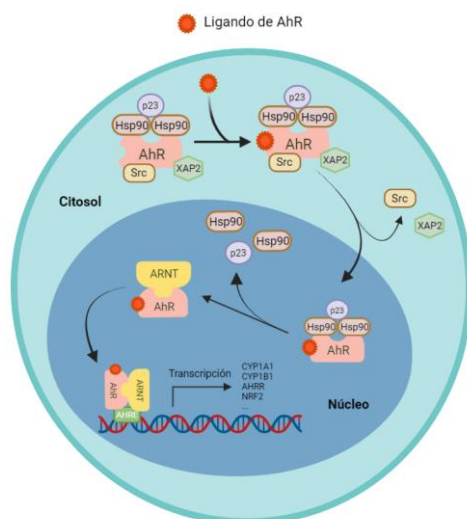


Figura 1: Mecanismo de señalización de AhR. El receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) en su forma inactiva se encuentra en el citoplasma formando un complejo con Src, la proteína 2 asociada a X (XAP2), la proteína de shock térmico HSP90 y p23. Una vez interacciona con su ligando el complejo se deshace y AhR se transloca al núcleo, donde dimeriza con el translocador nuclear de AhR (ARNT). El dímero AhR/ARNT puede unirse a secuencias consenso conocidas como Elementos de Respuesta a AhR (AHRE) localizadas en los promotores de ciertos genes y actúa como factor de transcripción.

1.6.2 Papel de AhR en el cáncer

Originalmente, AhR se identificó como un sensor de xenobióticos y regulador de enzimas como el citocromo P450, implicadas en la metabolización y detoxificación de las sustancias carcinogénicas ambientales capaces de interactuar con este receptor (Murray et al., 2014). Sin embargo, distintos estudios han demostrado que AhR está implicado en la regulación de genes relacionados con una gran variedad de rutas bioquímicas y procesos celulares diferentes al metabolismo de xenobióticos, entre las que se incluyen la regulación del ciclo celular, migración, diferenciación, transformación maligna, y la función inmune (Tripathi y Lee, 2020).

Cada vez hay más evidencias de que el desarrollo de moduladores selectivos de AhR tiene un gran potencial para el tratamiento de ciertas enfermedades, especialmente en la quimioterapia, modulando muchos de los *hallmarks* del cáncer. El papel que desempeña AhR en el cáncer presenta un elevado grado de complejidad debido a discrepancias entre su actividad pro y anti-tumoral, y a los diferentes resultados obtenidos en estudios con cultivos celulares *in vitro* y pacientes o modelos *in vivo* tumorales. Además, se ha descrito que diferentes clases de ligandos, e incluso entre miembros de una misma clase, modulan a AhR de distinta forma influyendo en el resultado tumorigénico. En el caso del cáncer de pulmón no microcítico se ha observado una correlación negativa entre los niveles de AhR en pacientes con carcinoma de células escamosas y su prognosis y supervivencia, aunque los niveles de AhR en el núcleo no han mostrado tener ningún efecto en la supervivencia de los pacientes de adenocarcinoma de pulmón (Su et al., 2013).

1.6.2.1 Control del ciclo celular y proliferación

Diversos estudios han mostrado el impacto de AhR en la proliferación celular a través de diversos mecanismos, lo que convierte a este factor de transcripción en una potencial diana para suprimir el crecimiento tumoral (Puga et al., 2002; Yin et al., 2016). Se ha observado que la expresión de varios factores de crecimiento como la epirregulina, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) dependen de AhR, y que algunos de los promotores de estos genes contienen AHRE y experimentan un incremento de su expresión tras la exposición a agonistas de AhR (Murray et al., 2014).

El principal mecanismo por el cual los ligandos de AhR regulan el ciclo celular es a través de la interacción con la proteína del retinoblastoma (RB1). La forma inactiva de AhR forma un complejo con la forma hipofosforilada de RB1, impidiendo el reconocimiento del factor de elongación E2F. Como resultado se produce la activación transcripcional dependiente de E2F de los genes involucrados en la transición de la fase G1 a la fase S, causando la progresión del ciclo celular. No obstante, la interacción de AhR con sus ligandos impide esta interacción, contribuyendo al arresto del ciclo celular (Puga et al., 2002). Además, se ha visto que los ligandos exógenos como el 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) también son capaces de inhibir la proliferación como consecuencia de la unión de la forma activa de AhR al promotor de p27 aumentando su expresión. p27 actúa como inhibidor de la actividad de quinasas dependientes de ciclinas encargada de inactivar por fosforilación a RB1 para liberar al factor de elongación E2F (Pang et al., 2008). Por el contrario, AhR puede interrumpir el ciclo celular en ausencia de ligandos, formando un complejo con la ciclina D y las quinasas dependientes de ciclinas CDK4/6, impidiendo la fosforilación de RB1 y consiguiente expresión de genes mediada por E2F (Barhoover et al., 2010). En presencia de sus ligandos, AhR se disocia de este complejo permitiendo la progresión del ciclo celular y proliferación de las células neoplásicas.

Sin embargo, el mecanismo más relevante para este estudio es el de la comunicación cruzada mediada por SRC entre AhR y EGFR, resultando en la activación de las quinasas ERK1/2, y por lo tanto, en la estimulación de la proliferación celular (Xie et al., 2012; Ye et al., 2018).

La gran variedad de mecanismos específicos de actuación del AhR en la regulación del ciclo celular evidencian el complejo papel de este factor de transcripción, que se comporta de forma diferente en función del tipo celular.

1.6.2.2 Señalización vía HIF-1 α

Otro miembro de la familia de factores de transcripción PAS es el factor inducido por hipoxia HIF-1 α , que se activa en condiciones de hipoxia, con bajos niveles de oxígeno (Schito y Semenza, 2016). HIF-1 α desempeña un papel fundamental en la detección de señales ambientales y en la coordinación del control transcripcional de las vías metabólicas que impulsan la glucólisis (Semenza, 2012).

HIF-1 α , al igual que AhR, actúa como sensor ambiental capaz de formar dímeros con HIF-1 β (ARNT). En condiciones de hipoxia, HIF-1 α no puede ser hidroxilado ni degradado por el proteasoma, translocándose al núcleo celular donde forma un dímero con HIF-1 β (Huang et al., 1998) para regular la expresión de genes involucrados en la glucólisis (Kim et al., 2006) o la angiogénesis, como VEGF, mediante la unión a elementos de respuesta a hipoxia (HRE) (Krock et al., 2011).

Diversos estudios han descrito la interacción entre las vías de HIF1- α y AhR en las células T reguladoras de tipo 1 (Tr1) implicadas en la inmunidad periférica, donde HIF-1 α controla la reprogramación metabólica al principio, y posteriormente AhR contribuye a la degradación de HIF-1 α tomando el control del metabolismo durante las etapas tardías de la diferenciación de las células Tr1. Así pues, se ha descrito que la hipoxia desencadena la inactivación de AhR a través de HIF-1 α , inhibiendo las últimas fases de diferenciación de las células Tr1, mientras que AhR favorece la degradación de HIF-1 α a través de la expresión de proteínas con dominios prolil-hidroxilasa (Mascanfroni et al., 2015).

1.6.2.3 Migración y metástasis

Se han recabado datos que sugieren que AhR juega un papel importante en la modulación de la adhesión y migración celular (Fernandez-Salguero, 2010). Algunos estudios han identificado un aumento de la translocación nuclear transitoria y actividad de AhR a causa de la pérdida de las interacciones intercelulares (Cho et al., 2004). De esta forma, la activación de AhR, ya sea debida a la pérdida de adhesión celular o a la estimulación con agonistas parece promover la metástasis.

Por otra parte, parece que la activación de AhR también está implicada en la iniciación de la transición epitelio-mesenquimal (EMT), promoviendo la migración e invasividad de las células tumorales in vivo (Dietrich y Kaina, 2010). La elevada actividad de este factor de transcripción promueve la expresión de SLUG, que inhibe la expresión de E-cadherina (CDH1) disminuyendo la adhesión celular (Ikuta y Kawajiri, 2006). Se han identificado AHRE en los promotores de los genes codificantes de SNAIL, TWIST1, TWIST2 y vimentina, todos ellos asociados a adquisición de un fenotipo mesenquimal (Stanford et al., 2016).

No obstante, en este proceso también se han encontrado resultados contradictorios en ciertas líneas celulares como el cáncer de mama, donde la activación de AhR disminuye la producción de la quimiocina CXCR4 involucrada en el proceso metastásico (Jin et al., 2014). Ante estos resultados se hace evidente la necesidad de realizar estudios in vivo para ver los efectos metastásicos de AhR en el microambiente tumoral.

1.6.2.4 Regulación inmune

Numerosas evidencias inciden en el papel de AhR sobre la regulación de la inmunidad innata y adaptativa. En lo referente a la inmunidad innata, se han obtenido indicios a partir del análisis de sus promotores de que AhR regula la transcripción directa de las citoquinas IL-10 e IL-21 (Apetoh et al., 2010). Además, la presencia de ligandos de AhR, junto con señales inflamatorias, parece tener un efecto sinérgico en la producción de IL-6 debido a que la unión del heterodímero AhR/ARNT a AHRE desplaza a la histona deacetilasa 1 de su promotor (DiNatale et al., 2010). Otro mecanismo por el cual la activación de AhR contribuye a la señalización de inflamación en los tumores es a través de la interacción con los miembros de la familia de factores de

transcripción NFκB. La unión de AhR con RelA y RelB puede tener un efecto represor o inductor de su actividad transcripcional en función del contexto (Kim et al., 2000; Vogel et al., 2007).

Por otra parte, AhR participa en la inmunidad adaptativa, al tratarse de un importante regulador de la diferenciación de las células T, responsable de hacer frente a las infecciones y erradicar a las células tumorales (Apetoh et al., 2010). Su actuación conjunta con c-Maf para favorecer la expresión de IL-10 e IL-21 da lugar a la inducción local de células Tr1 y algunos agonista de AhR, como el TCDD o el 2-(1'-H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester (ITE), que favorecen la producción de células T reguladoras (Treg) implicadas en el mantenimiento de la tolerancia a los antígenos propios, limitando la supresión inmune del ambiente tumoral y promoviendo su expansión (Gutiérrez-Vázquez y Quintana, 2018). No obstante, otros agonistas como el 6-formilindolo[3,2-β]carbazole (FICZ) impulsan la producción de linfocitos TH17, inductoras de la autoinmunidad e inflamación (Quintana et al., 2008). Acorde con estos resultados, AhR se expresa en la mayoría de células T colaboradoras (CD4+), siendo mayor su expresión en las subpoblaciones de Th17, Tr1 y Treg (Veldhoen et al., 2008). Esta molécula es crítica para modular el equilibrio entre Th17 y Treg, al demostrarse que AhR controla la generación de células Treg (FOXP3+) al unirse a elementos de respuesta a AhR localizados en el gen Foxp3 (Quintana et al., 2008). También contribuye a la expresión de la proteína de muerte celular programada PD1 en las células T citotóxicas (CD8+) y al reclutamiento de macrófagos M2 inmunosupresores asociados a tumores (Liu et al., 2018; Takenaka et al., 2019). Además, se ha observado que AhR es altamente inducido tras la activación de los linfocitos B, evitando la diferenciación de estas células en plasmablastos y células plasmática secretoras de anticuerpos, al regular negativamente la recombinación de cambio de isotipo (Vaidyanathan et al., 2017).

1.6.2.5 Otras vías de señalización

Además de las vías anteriores, AhR puede modular la vía de señalización de NFκB implicada en la proliferación, inflamación e inmunidad; activar la vía moduladora de la respuesta inflamatoria STAT a través de la inducción de IL-6; e inhibir la acción del receptor de estrógenos, que promueve la proliferación y producción de residuos genotóxicos (Tripathi y Lee, 2020).

1.6.3 Reguladores de la actividad de AhR

Entre los compuestos químicos xenobióticos que actúan como ligando de AhR, los más importantes son los hidrocarburos aromáticos, de los cuales deriva el nombre del receptor. Sin embargo, se ha demostrado que AhR interacciona con más ligandos, como distintos derivados endógenos del triptófano producidos por la dioxigenasa de triptófano (TDO) y la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), entre los que destaca la kineurina (Rannug et al., 1987). Los ligandos de AhR pueden ser exógenos o endógenos y tener un efecto agonista o antagonista. El hecho de que una gran cantidad de químicos puedan unirse a AhR con una gran afinidad, alterando su actividad dependiente de ligando, lo convierte en una atractiva molécula pequeña diana.

Con todo, se debe considerar que hay indicios de que es posible la activación independiente de ligando de esta molécula como consecuencia de elevados niveles de cAMP, o que en caso de una gran cantidad de AhR se produzca su desplazamiento nucleocitoplasmático y heterodimerización con ARNT en ausencia de ligando (Murray et al., 2014).

1.6.3.1 Agonistas

A continuación, se exponen los principales compuestos agonistas que se unen a AhR favoreciendo su activación y translocación al núcleo. Estos ligandos pueden tener un origen tanto exógeno como endógeno, si son producidos por el propio organismo.

1.6.3.1.1 Exógenos

Los agonistas exógenos fueron los primeros en ser identificados y comprenden a los hidrocarburos aromáticos, como el benzo[a]pireno o el TCDD, el más estudiado de todos los ligandos de AhR. El TCDD es un hidrocarburo aromático polihalogenado que pertenece a la familia de las dioxinas (Birnbaum, 1994). Este contaminante ambiental es un potente agonista de AhR y el que presenta una mayor afinidad de unión. Por este motivo es el más empleado para estudiar el impacto en las funciones fisiológicas e inmunes de la activación de este factor de transcripción. La interacción de TCDD con el receptor da lugar a la inducción de enzimas metabolizadoras de xenobióticos y la alteración de la expresión de diferentes micro-ARNs dirigidos a citoquinas y factores de transcripción en los linfocitos T, que regulan de forma diferencial la expresión de Foxp3 e IL-17 para favorecer la producción de células Treg y reducir el número de Th17 (Quintana et al., 2010). Más recientemente se ha descrito que el TCDD también favorece los tumores de pulmón al atenuar los mecanismos de apoptosis como consecuencia de la activación de las rutas de señalización AKT y ERK1/2 (Chen et al., 2014).

1.6.3.1.2 Endógenos

Entre los ligandos endógenos descritos del receptor AhR destacan los metabolitos derivados del triptófano (Denison y Nagy, 2003), como la kineurina, el ITE y el FICZ. Este último presenta una gran afinidad hacia el AhR, comparable a la del TCDD (Rannug et al., 1987).

De todos ellos, el de mayor interés para este estudio es el ITE, un ligando basado en el indol derivado de la dieta, debido a que fue identificado por primera vez en pulmón porcino, a que presenta una potente actividad como agonista *in vitro* e *in vivo*, y a que a diferencia del TCDD, no induce toxicidad (Song et al., 2002). Se ha señalado que el ITE actúa como inhibidor de la proliferación y migración celular en el cáncer de endometrio a través de la señalización de AhR, demostrando un gran potencial terapéutico (Bian et al., 2019). El mismo estudio demostró que el ITE favorece la unión de AhR al promotor del factor de pluripotencia Oct4, suprimiendo su transcripción e induciendo la diferenciación de las células madre tumorales, reduciendo así el potencial tumorigénico. Además, favorece la activación de las células Treg Foxp3+ y disminuye la diferenciación hacia las células Th17, al ser capaz de reducir la activación de STAT1 (Quintana et al., 2008). Así pues, presenta un efecto inmunosupresor similar al TCDD, pero con la ventaja de no ser un compuesto tóxico, convirtiéndose así en un posible agente inmunosupresor para el tratamiento de ciertas enfermedades autoinmunes (Zhang et al., 2010).

1.6.3.2 Antagonistas

Los compuestos antagonistas compiten por los sitios de unión con el ligando, evitando así la activación de AhR y su translocación al núcleo. Cada vez se están estudiando más antagonistas de AhR como potenciales agentes terapéuticos, dado que su inhibición puede aumentar la efectividad de las terapias inmunes al disminuir la inmunosupresión (Soshilov y Denison, 2014). Dentro de esta categoría se incluye a la α -naftoflavona y el resveratrol. No obstante, el más descrito y estudiado en las últimas décadas es el *2-methyl-N-[2-methyl-4-(2-methylphenyl) azophenyl]-3-pyrazolecarboxamide* (CH223191).

1.6.3.2.1 CH223191

El CH223191 fue identificado como un potente antagonista de AhR a partir de una librería química de cribado (Kim et al., 2006). Este parece antagonizar de forma preferencial a los hidrocarburos aromáticos halogenados, lo cual parece estar relacionado con su posible unión en un sitio alostérico distinto al del ligando, o a un mecanismo de interacción que ocasiona un cambio conformacional del receptor, de forma que sólo excluya la unión de un subgrupo de agonistas de AhR (Zhao et al., 2010).

2 *Objetivos*

En el presente Trabajo Fin de Grado planteamos estudiar el papel del AhR en el adenocarcinoma de pulmón, y su potencial aplicación como diana terapéutica en el contexto de la resistencia adquirida a los ITQs de EGFR. Para ello, se han abordado los siguientes objetivos:

- I. Metaanálisis de las principales bases de datos de información genómica en el que se estudian y cuantifican las principales alteraciones que afectan al gen *AHR* en el adenocarcinoma pulmonar.
- II. Estudio de la asociación de la expresión de *AHR* con las mutaciones tumorales más frecuentes en el adenocarcinoma de pulmón.
- III. Identificación de las firmas transcripcionales que correlacionan con la expresión y actividad de AhR.
- IV. Estudio del AhR como mecanismo de resistencia a los ITQs de EGFR y su potencial como diana terapéutica para revertir la resistencia adquirida.

3 Materiales y métodos

3.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo

Para los procedimientos experimentales se emplearon las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón H1975 y HCC4006, procedentes de la *American Type Culture Collection* (ATCC), así como sus correspondientes resistentes a los ITQs, H1975-AZDR (resistente a osimertinib) y HCC4006-GeR (resistente a gefitinib) (Tabla 1). Estas líneas celulares fueron cultivadas en cámaras con aire humidificado a 37°C y 5% CO₂ medio RPMI-1640 (Biowest®) suplementado con 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 0.25 µg/mL de fungizona, 5 µg/mL de Plasmocin™ (InvivoGen) y suero fetal bovino (Gibco®, Life Technologies) inactivado por calor al 10%. Antes de realizar los experimentos las células eran levantadas con tripsina-EDTA al 0.05% (Gibco®, Life Technologies) y resuspendidas en 1 mL de medio completo con el fin de realizar el recuento celular con cámaras de Neubauer y azul tripán (Invitrogen) para calcular el volumen necesario para tener el número de células requeridas por el experimento.

Tabla 1: Líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón empleadas y su perfil mutacional de EGFR.

Línea celular	Mutación EGFR	Línea resistente
HCC4006	Delección del exón 19 (E747-A749), A750P	HCC4006-GeR (gefitinib)
H1975	L858/T790M	H1975-AZDR (osimertinib)

3.2 Reactivos

Los reactivos osimertinib (OSI o AZD-9291), ITE y CH223191 fueron adquiridos a la empresa MedChemExpress® y se preparó un stock a 10 mM disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) de cada uno de ellos. Los reactivos empleados se mantuvieron en el congelador a -20°C.

3.3 Metaanálisis

Con el fin de analizar los datos genéticos de pacientes con adenocarcinoma de pulmón se emplearon los datos de ADC del TCGA, PanCancer Atlas (*The Cancer Genome Atlas*) disponibles en cBioPortal (<https://www.cbioportal.org>) (Weinstein et al., 2013). Para la manipulación de los datos de líneas celulares de ADC se descargaron los datos de la *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) desde el Depmap portal (<https://depmap.org/portal>). Se descargaron los datos de supervivencia, expresión (ARNm) y mutaciones de ambas bases de datos, así como los datos proteómicos de la CCLE (Nusinow et al., 2020), para analizar las alteraciones del gen *AHR*, comparar su expresión entre los distintos pacientes/líneas celulares y observar posibles copatrones con alguno de los principales genes supresores de tumores y oncogenes mutados en adenocarcinoma de pulmón.

Se consultó la página de libre acceso TNMplot (<https://tnmplot.com>) para comparar la expresión de *AHR* entre muestras de distintos tipos de cáncer y tejido sano (Bartha y Györffy, 2021). Las curvas de supervivencia global y supervivencia libre de progresión (SLP) fueron representadas en Kaplan-Meier *plots* generados a partir de los datos de RNA-seq (ARNm) de *AHR* en pacientes con adenocarcinoma de pulmón (n = 513) disponibles en la herramienta *online* KMplot (Pan-cancer RNA-seq, https://kmplot.com/analysis/index.php?p=service&cancer=pancancer_rnaseq) (Nagy et al., 2021).

Todos los gráficos obtenidos a partir de estos datos se obtuvieron empleando el software GraphPad PRISM 8.0., con excepción de los *heatmaps* que fueron realizados con el software gratuito del Broad Institute, Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>).

3.4 ssGSEA

Con el fin de obtener un *score* de las firmas transcripcionales de interés para cada una de las muestras de pacientes y líneas celulares de adenocarcinoma se realizó un *Single Sample Gene Set Enrichment Analysis*. Las firmas transcripcionales empleadas fueron la firma de represión (*knockdown*) LINCSKD_3757 de AhR de la línea celular de ADC A549 disponible en plataforma web iLINCS para el análisis de datos ómicos y firmas de perturbaciones celulares (<http://www.ilincs.org/ilincs/signatures>) (Pilarczyk et al., 2020), que se separó en aquellos genes que estaban sobreexpresados o reprimidos, y las firmas *hallmark* de hipoxia, transición epitelio-mesénquima y señalización TGF- β disponibles en la *Molecular Signatures Database* (MSigDB, <http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb>) (Subramanian et al., 2005), así como una firma de actividad pan-tisular de AhR publicada recientemente (Sadik et al., 2020).

Para la realización del análisis ssGSEA se recurrió a la herramienta GenePattern (Universidad de California y Broad Institute, <https://cloud.genepattern.org>), donde se subió un archivo GCT con los datos de expresión de todos los genes de pacientes de adenocarcinoma (TCGA) y un archivo GMX que incluye las firmas transcripcionales previamente seleccionadas. Este programa compara ambos archivos para analizar si los genes de las distintas firmas se encuentran sobreexpresados o reprimidos de forma general en su conjunto. Se repitió el mismo procedimiento empleando el archivo GCT de expresión de las líneas celulares (CCLE).

El parámetro de enriquecimiento (ES, *enrichment score*) obtenida para cada una de las muestras, indica la correlación que presenta con la sobreexpresión/represión de todos los genes incluidos en la firma transcripcional, siendo mayor cuantas más coincidencias haya. El resultado fue empleado para poder introducir estas firmas en el *heatmap* junto al gen *AHR* y algunos de sus genes diana.

3.5 Ensayo de citotoxicidad celular con sulforodamina B

Este método colorimétrico se emplea para la cuantificación indirecta de las células por tinción de sus proteínas con sulforodamina B con el fin de evaluar el posible efecto inhibitorio o estimulador de la proliferación de los ligandos de AhR estudiados a corto plazo. Se sembraron 3000 células por pocillo en placas de cultivos de 96 pocillos en 100 μ L de medio completo. Las células fueron tratadas a las 24 horas post-siembra con diferentes concentraciones (diluciones 1:3) de ITE, osimertinib (OSI), CH223191 y todas sus posibles combinaciones disueltos en medio RPMI-1640. Se realizaron 6 réplicas por condición (concentración del fármaco), empleando diluciones seriadas 1:3. Las concentraciones iniciales fueron de 10 μ M para OSI y CH223191, mientras que para el caso de ITE se empleó una dosis inicial de 50 μ M. Una de las condiciones se correspondía siempre con el control, empleándose la cantidad de DMSO correspondiente, al ser este el vehículo en el que los fármacos estaban disueltos. Tras 96 horas de tratamiento, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos, lavadas con agua y teñidas con 50 μ L de sulforodamina B (Sigma-Aldrich) al 0.4% (p/v) en ácido acético al 1% durante 20 minutos. Finalmente, se lavaron las placas 3 veces con una mezcla de agua y ácido acético al 1% para eliminar el exceso de tinción y se dejaron secar. Finalmente se añadieron 200 μ L de Trizma® Base (Sigma-Aldrich) 10 mM por pocillo para solubilizar el colorante fijado y obtener las lecturas de absorbancia a 510 nm de cada pocillo con el lector de placas Multiskan Spectrum (Thermo Scientific), restando el ruido de fondo detectado a 620 nm.

Las curvas de viabilidad celular fueron generadas con los datos obtenidos a través del software GraphPad PRISM 8.0., expresando los datos como porcentaje de viabilidad celular según la siguiente fórmula:

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

3.6 Estudio de formación de colonias

Con el fin de evaluar el posible efecto inhibitorio o estimulador de la proliferación de los ligandos de AhR a largo plazo se sembraron 2000 células por pocillo en placas de cultivos de 6 pocillos. Las células fueron tratadas a las 24 horas post-siembra con ITE, osimertinib, CH223191 y todas sus posibles combinaciones, con un pocillo control con DMSO al 0.1%. Las concentraciones empleadas fueron: osimertinib al 2 y 10 nM, ITE al 10 μ M y CH2243191 al 1 y 10 μ M. Tras 14 días de tratamiento en los que se realizaba un cambio del medio con su correspondiente tratamiento 2 veces a la semana, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos y teñidas con cristal violeta 0.4% (v/v) durante 20 minutos para lograr su visualización. Por último, las placas se lavaron con agua y una vez secas fueron digitalizadas.

3.7 Western blot

3.7.1 Preparación y cuantificación de las muestras

Para determinar la cantidad de proteína AhR, HIF-1 α y ARNT en las líneas celulares H1975, HCC4006, HCC827 y sus equivalentes resistentes a ITQs (H1975-AZDR, HCC4006-GeR y HCC827-ER23), se partió de muestras ya preparadas. Las muestras de lisado de proteínas fueron descongeladas y centrifugadas durante 10 minutos a 4°C y 15,000 g. La concentración de proteínas de los sobrenadantes se determinó mediante el ensayo BCA, para el cual fue necesario realizar diluciones 1:3 de las muestras con tampón de dilución 1X y a poner 5 μ L de la dilución de cada muestra y de la recta patrón en una placa de 96 pocillos. Finalmente, se añadieron 200 μ L de mezcla BCA (1:50) a todos los pocillos y se dejó incubar a 75° durante 30 minutos antes de medir los resultados de absorbancia a 562 nm con el lector de placas Multiskan Spectrum (Thermo Scientific). La concentración de proteína de cada muestra se pudo calcular a partir de la recta patrón por interpolación.

Se prepararon 25 μ L de cada muestra y de marcador, empleando 5 μ L de marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ Standards Dual Color* (Bio-Rad) y 20 μ g de proteína de las distintas muestras con el volumen restante de tampón de carga (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v), 0.005% azul de bromofenol (p/v)). Se incubaron a 98°C durante 5 minutos en el termobloque con el fin de desnaturalizar las proteínas.

3.7.2 Electroforesis y transferencia

Las muestras se cargaron en un gel SDS-PAGE al 8% (w/v) de acrilamida compuesto por geles *resolving* y *stacking* (Tabla 2). Las burbujas se eliminaron del gel de separación (*resolving*) antes de su polimerización con 200 μ L de butanol. Posteriormente se añadió la mezcla del gel concentrador (*stacking*) sobre el gel de separación y se puso un peine de 10 pocillos antes de la polimerización del gel.

Tabla 2: Composición de las dos fases del gel de poliacrilamida.

<i>Resolving gel</i>	<i>Stacking gel</i>
1.345 mL de agua Mili-Q	3.791 mL de agua Mili-Q
1 mL de acrilamida-bisacrilamida (29:1) al 40% (p/v)	625 μ L de stock acrilamida/bisacrilamida (29:1) al 40% (w/v)
2.5 mL de 1.5 M Tris-HCl a pH 8.8	500 μ L de 0.5 M Tris-HCl a pH 6.8
100 μ L SDS 10% (p/v)	40 μ L SDS 10% (p/v)
50 μ L de APS 10% (p/v)	40 μ L de APS 10% (p/v)
50 μ L de TEMED	4 μ L de TEMED

Finalmente, el gel se corrió en un *Running Buffer* compuesto por Tris 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0.1% (p/v) de pH 8.3 y se dejaron correr a 90 V durante 10 minutos y luego a 130 V hasta la separación apropiada de las proteínas en función de su peso molecular.

Una vez completada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare Life Sciences) en húmedo a 90V durante 90 minutos.

3.7.3 Inmunodetección

Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con solución BSA 5% durante 1 hora en agitación suave a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 3 lavados con TBS-Tween (TBS-T) de 5 minutos y la membrana se incubó overnight a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en BSA al 5% en TBS-T, dirigidos a las proteínas diana (Tabla 3).

Tabla 3: Lista de anticuerpos primarios empleados en el *western blot*.

Diana	PM (KDa)	Origen	Dilución	Casa comercial
AhR	100	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
ARNT	87	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
HIF-1 α	120	Monoclonal de conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
α -Tubulina	50	Monoclonal de ratón	1:10000	Sigma Aldrich

Al día siguiente se llevaron a cabo 3 lavados de 5 minutos con TBS-T antes de incubar con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 4) conjugados a la peroxidasa de rábano picante (HRP).

Tabla 4: Lista de anticuerpos secundarios empleados en el *western blot*.

Diana	Conjugado	Dilución	Casa comercial
Anti-Conejo IgG	HRP	1:5000	Cell Signaling Technology
Anti-Ratón IgG	HRP	1:5000	Cell Signaling Technology

Tras lavar 3 veces durante 5 minutos en agitación con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, las membranas fueron incubadas con el reactivo comercial ECL (Pierce, Thermo Scientific) para permitir la detección de los anticuerpos conjugados con la peroxidasa por quimioluminiscencia. Las bandas fueron observadas y fotografiadas con una cámara de quimioluminiscencia, empleando el sistema ChemiDocTM XRS+ de Bio-Rad, y la señal obtenida se analizó por densitometría utilizando el software *Image Lab 2.0.1* (BioRad).

4 Resultados y discusión

4.1 Principales alteraciones de AHR en el cáncer y sus efectos

En este trabajo se realizó un estudio del perfil de alteraciones del gen *AHR* en pacientes de ADC a partir de las bases de datos TCGA. Se obtuvo que el porcentaje alterado de este gen era relativamente bajo tanto en pacientes como en líneas celulares, siendo menos del 6% de los casos. Dentro de las alteraciones encontradas, la mayoría se corresponden con amplificaciones de *AHR*, y sólo un reducido porcentaje es debido a mutaciones o deleciones.

En relación a las mutaciones, de las 12 encontradas 10 son de cambio de sentido (*missense*), provocando un cambio de aminoácido, y algunas de ellas se localizan en los dominios PAS y sus proximidades, que actúan como sensor molecular implicado en las interacciones proteína-proteína, o en el dominio HLH encargado de la formación de dímeros y de permitir la unión del factor de transcripción con el ADN (Figura 2). Tras analizar el posible efecto de las mutaciones con la herramienta *online* PROVEAN (J. Craig Venter Institute, <http://provean.jcvi.org>) (Choi y Chan, 2015) se ha observado que todas las mutaciones encontradas en estos dominios parecen tener un efecto deletéreo, con la excepción de D132N que se haya en el límite del punto de corte establecido (Tabla 5). Estas alteraciones podrían ser responsables de inhibir la unión de *AHR* con su ligando y, por lo tanto, la respuesta que este debe generar ante amenazas externas, favoreciendo el desarrollo de un cáncer.

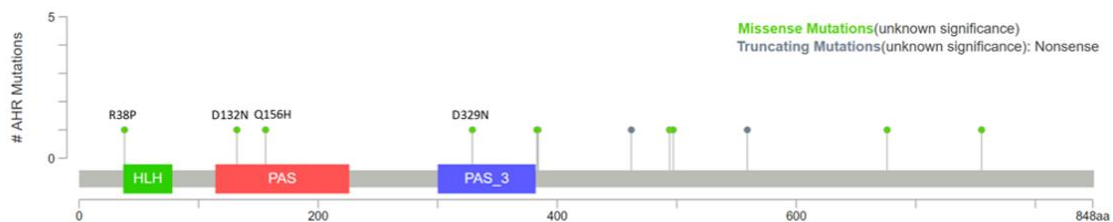


Figura 2: Perfil mutacional del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) en pacientes de adenocarcinoma de pulmón. Obtenido del cBioPortal (<http://www.cbioportal.org>).

Tabla 5: Predicción del efecto de las mutaciones localizadas en los dominios funcionales del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR). Realizado con la herramienta *online* PROVEAN (<http://provean.jcvi.org>).

Mutación	PROVEAN score	Predicción (umbral = - 2.5)
R38P	- 6.419	Deletérea
D132N	- 2.433	Neutral
Q156H	- 4.722	Deletérea
D329N	- 4.960	Deletérea

En base a la observación de que las alteraciones mayoritarias se corresponden con la amplificación del gen *AHR*, se procedió a verificar si el aumento del número de copias se relacionaba con una mayor expresión de este gen en pacientes y líneas celulares, y la posible implicación de la expresión de AhR en el cáncer comparando los niveles de ARNm de *AHR* en muestras de ADC con las de tejido sano a partir de los datos disponibles en TNMplot. Los resultados obtenidos en esta búsqueda confirman que existe una relación lineal entre el número de copias y la expresión de *AHR*, siendo especialmente significativa en los pacientes (Figura 3A), y que los niveles de expresión de *AHR* son más elevados en el tejido tumoral, y no sólo en el caso del adenocarcinoma de pulmón, ya que se ha encontrado diferencias significativas en la gran mayoría de neoplasias (Paris et al., 2021) (Figura 3C).

Para verificar que los niveles de ARNm de *AHR* se correlacionan con los de proteína AhR se realizó el mismo análisis que para el número de copias, en este caso sólo con los datos de las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar disponibles en la base de datos de la CCLE, al no estar disponibles los niveles de AhR en pacientes TCGA. Se obtuvo una relación con un p-valor significativo (p-valor < 0.0001) (Figura 3B). Por lo tanto, cabría esperar que la mayoría de tumores o líneas celulares que muestran un incremento de la transcripción del gen *AHR* también tendrán mayores niveles de proteína, si bien no podemos afirmar que ésta se encuentre activa en el núcleo interaccionando con las regiones promotoras de sus genes diana.

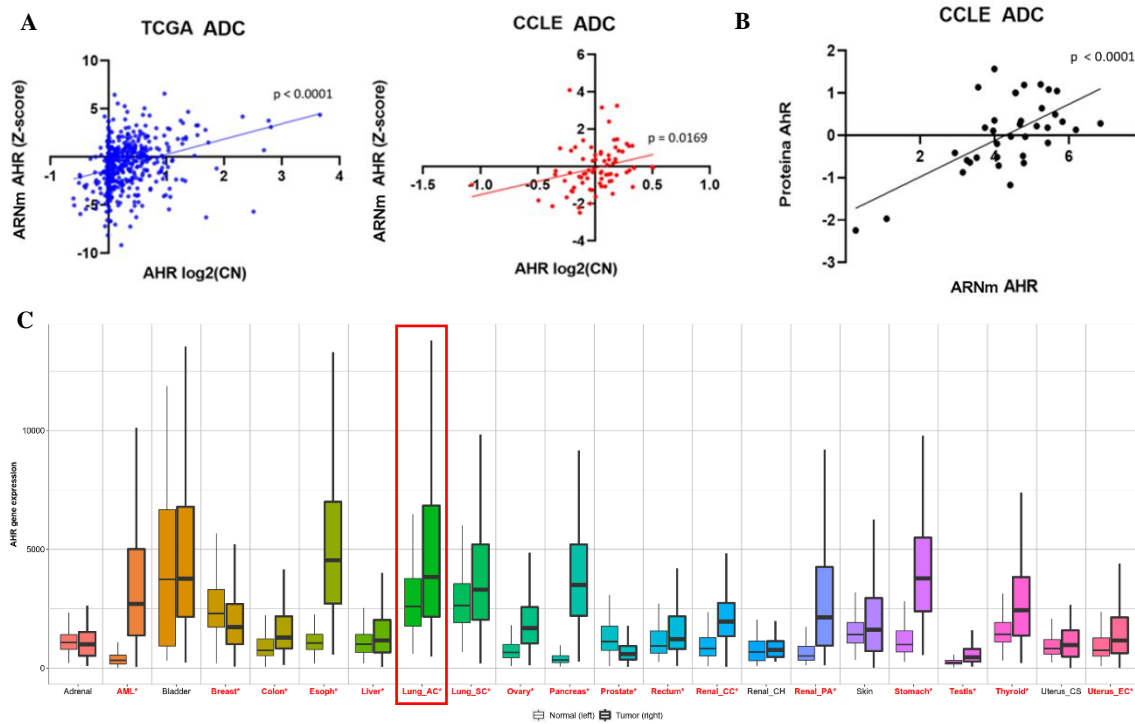


Figura 3: Análisis de la expresión de *AHR*. (A) Relación lineal entre el número de copias (CN) de *AHR* y su expresión en pacientes de adenocarcinoma de pulmón del TCGA (azul) y líneas celulares de la CCLE (rojo). (B) Relación lineal entre la expresión de *AHR* y sus niveles de proteína. (C) Expresión de *AHR* en todos los cánceres del TCGA comparado con la de tejido normal empleando TNMplot (<https://tnmplot.com>). Se muestran en rojo* los tipos histológicos de cáncer que presentan una diferencia significativa según la prueba U de Mann-Whitney. TCGA: *The Cancer Genome Atlas*; CCLE: *Cancer Cell Line Encyclopedia*.

A continuación, nos planteamos estudiar la posible correlación entre la expresión de *AHR* y la evolución clínica de los pacientes incluidos en el estudio del TCGA (en su mayoría estadios resecables I y II), clasificándolos como de expresión alta o baja tomando como punto de corte la mediana de la serie de datos. Tal y como muestran las curvas de *Kaplan-Meier* de la Figura 4A, no encontramos correlación significativa entre los niveles de ARNm de *AHR* y la supervivencia global. Sin embargo, sí se aprecia una relación significativa con la supervivencia libre de progresión, y por lo tanto con el pronóstico de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón (Figura 4B). Algunos estudios en cáncer de pulmón y de páncreas sí que han encontrado correlaciones significativas entre la expresión de *AHR* y la supervivencia global, mostrando una aparente contradicción entre la asociación de los niveles de ARNm y proteína con la supervivencia, ya que la expresión elevada de *AHR* a nivel de ARNm podría prevenir la carcinogénesis, mientras que la activación de AhR, esto es, la presencia de la proteína activa en el núcleo, la promueve (Jin et al., 2014; Murray et al., 2014). En este sentido, algunos estudios sugieren que los niveles de proteína AhR también indican una mayor agresividad del tumor y peor pronóstico en estos pacientes, encontrándose que dicha proteína está sobreexpresada en el 40-50% de los casos de CPNM y que se localiza predominantemente en el núcleo en su forma activa (Ye et al., 2018). Por lo tanto, son necesarios estudios más exhaustivos que tengan en cuenta la tasa de transcripción génica, los niveles de proteína, y lo que es más importante, si está activada y regulando la transcripción de sus genes diana, y su correlación con las covariables clínicas.

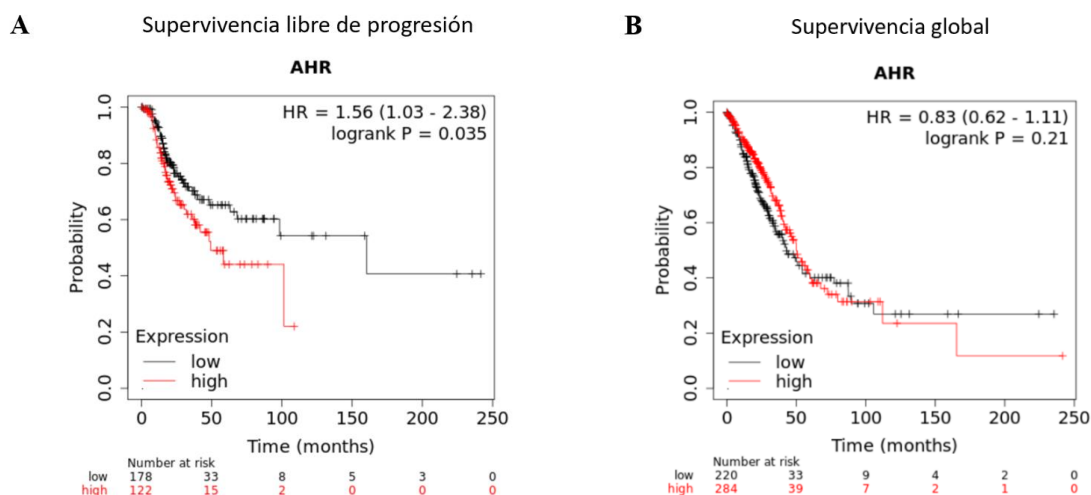


Figura 4: Estudio de la relación de los niveles de ARNm de *AHR* con la supervivencia en pacientes de adenocarcinoma de pulmón. (A) Asociación de la expresión de *AHR* con la supervivencia libre de progresión y (B) la supervivencia global a partir de los datos disponibles en la herramienta *online* KMplot (<https://kmplot.com/analysis>), donde “*high*” hace referencia a las muestras con niveles de ARNm de *AHR* por encima de la mediana y “*low*” por debajo de este valor.

4.2 Asociación de la expresión de *AHR* con las principales mutaciones del adenocarcinoma de pulmón

En esta sección analizamos la relación entre la expresión de *AHR* y el estado mutacional de los 10 genes con mayor frecuencia de alteraciones genómicas en el adenocarcinoma de pulmón, tanto en pacientes del estudio TCGA como en las líneas celulares de la CCL: *TP53*, *KRAS*, *KEAP1*, *EGFR*, *STK11*, *NF1*, *SMARCA4*, *BRAF*, *CDKN2A* y *MET*. En lo referente a los pacientes (Figura 5A), encontramos diferencias significativas en los 5 primeros, mientras que en las líneas celulares (Figura 5B) tan solo dos (*EGFR* y *KRAS*), probablemente debido al reducido tamaño de la muestra ($n = 78$) en comparación con la disponible en el TCGA ($n = 503$).

Destacaremos la asociación con las mutaciones que afectan a *STK11* y *KEAP1*, donde se produce una reducción en los niveles de ARNm de *AHR* con un p -valor < 0.0001 , hecho que sugiere una relación funcional entre *AHR* y estos dos genes supresores tumorales que como hemos visto en la Introducción, tienen un papel esencial en el control del metabolismo tumoral. No obstante, la pérdida de *KEAP1* provoca la acumulación en el núcleo del factor de transcripción NRF2 (dado que las mutaciones en *KEAP1* impiden la degradación de NRF2), y por lo tanto la expresión de *AHR* debería aumentar en pacientes con *KEAP1* mutado y no al contrario. Por otro lado, la proteína quinasa *STK11* fosforila y activa a la quinasa AMPK, que a su vez hace lo propio con NRF2, induciendo su translocación nuclear (Ciccarese et al., 2019). Dado que las mutaciones en *STK11* son inactivadoras y bloquean la actividad de AMPK, el consiguiente descenso de NRF2 activo en el núcleo podría explicar los bajos niveles de expresión de *AHR*. Otro hecho a tener en cuenta es la existencia de pacientes donde estos dos supresores tumorales se encuentran mutados e inactivados (Papillon-Cavanagh et al., 2020), un factor que no hemos tenido en cuenta en nuestro análisis. Dado que no hemos encontrado diferencias significativas en las líneas celulares de adenocarcinoma mutantes y *wild type* para *STK11* o *KEAP1*, no podemos descartar que se trate de una adaptación del microambiente tumoral, compuesto no solo por células tumorales, sino también por fibroblastos, células endoteliales e inmunitarias. En conclusión, nuestros resultados necesitarían de un estudio funcional más detallado para extraer conclusiones relevantes.

El gen supresor de tumores *TP53* se encuentra mutado en más del 50% de los tumores humanos, lo que lo convierte en uno de los genes del cáncer más importantes. En nuestro análisis de expresión diferencial hemos encontrado un aumento estadísticamente significativo en la expresión de *AHR* en los tumores de pacientes con *TP53* mutado (pero que tan solo una tendencia

en las líneas celulares). Estas mutaciones dan lugar a la forma inactiva de la proteína p53, responsable del arresto del ciclo celular en presencia de daños en el ADN. Es por esto que podríamos hipotetizar que los cambios en los niveles de expresión de *AHR* observados se deben al papel que desempeña en el control del ciclo celular (Bates y Vousden, 1999). Siguiendo esta línea argumental, cabría esperar que el aumento de expresión de *AHR* actuase como un mecanismo de control alternativo del ciclo celular capaz de impedir su progresión. En este contexto se podrían dar dos situaciones en base a los diferentes mecanismos de actuación de AhR: 1) que AhR interrumpiese el ciclo celular en ausencia de ligandos al formar un complejo con la ciclina D y las quinasas dependientes de ciclinas CDK4/6, impidiendo por lo tanto la fosforilación de RB1 para reprimir la expresión de genes mediada por E2F (Barhooover et al., 2010); o 2) que hubiese un aumento de expresión conjunto de *AHR* y de los ligandos endógenos de este receptor, y que como consecuencia de la activación de este receptor se impidiese su interacción con RB1, y este pueda disminuir la viabilidad de E2F implicado en el inicio de la fase S del ciclo celular (Puga et al., 2002).

A continuación, nos centraremos en discutir la posible relación entre la expresión de *AHR* y los dos oncogenes más importantes en el cáncer pulmonar, como son *EGFR* y *KRAS*, y que muestran diferencias estadísticamente significativas tanto en pacientes como en líneas celulares, lo cual indica que la estrecha relación entre AhR y EGFR que se plantea en el presente trabajo es replicable tanto *in vitro* como *in vivo*.

La disminución de los niveles de ARNm de *AHR* en presencia de mutaciones activadoras de *KRAS* podría estar relacionada con la premisa principal de este estudio de que los niveles de *AHR* aumentan para conferir resistencia a los inhibidores de EGFR. Las mutaciones en *KRAS* son responsables de la activación constitutiva de esta proteína localizada aguas debajo de EGFR (Trahey y McCormick, 1987). De esta forma las mutaciones de *KRAS* confieren resistencia a los ITQs de EGFR, al permitir la activación de esta proteína implicada en la ruta de señalización de la proliferación celular independientemente de la interacción de EGFR con sus ligandos y de su actividad tirosina quinasa (resistencia por *bypass*). De hecho, se considera que las mutaciones en estos dos genes son mutuamente excluyentes, debido a la reducida coocurrencia de estas dos mutaciones en pacientes (Benesova et al., 2010). Por lo tanto, ya no sería necesario un aumento de expresión de *AHR* para alcanzar dicha resistencia.

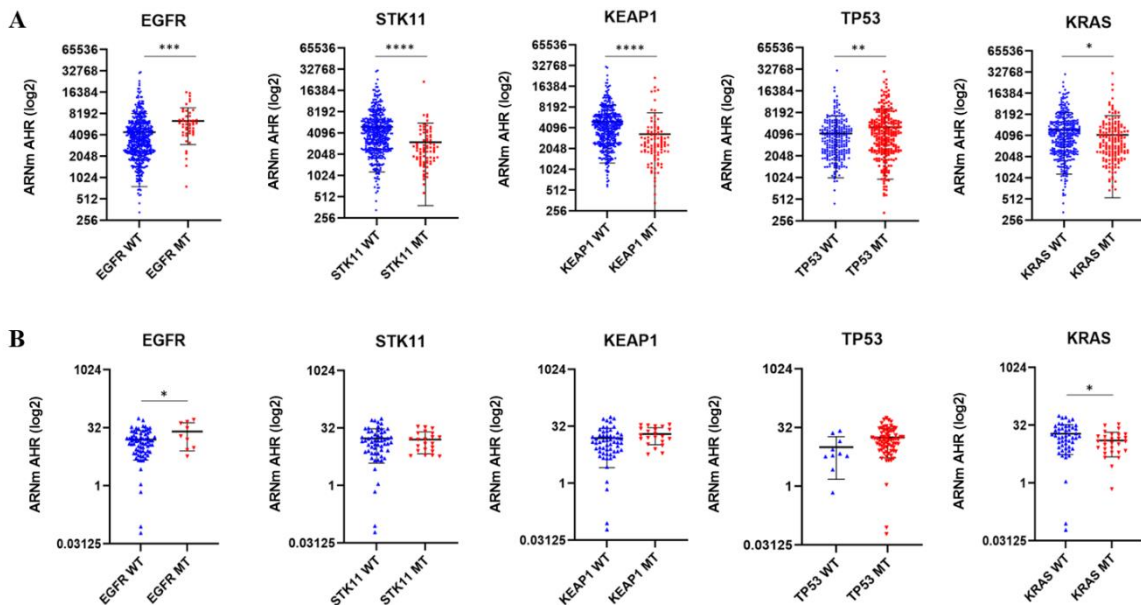


Figura 5: Expresión de *AHR* en función del perfil mutacional de los principales genes implicados en el adenocarcinoma de pulmón. (A) Diferencias significativas en la expresión de *AHR* entre las variedades *wild type* (WT) y mutada (MT) de los principales genes con potencial oncogénico en pacientes de adenocarcinoma de pulmón del TCGA (n=503), y (B) líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar de la CCL (n=78). Los asteriscos (*), (**), (***) y (****) son indicativo de que existe una significancia estadística entre las muestras con el gen *wild type* y el mutado, con un p-valor < 0.05, p-valor < 0.01, p-valor < 0.005 y p-valor < 0.0001, respectivamente (t-test).

Apoyando la hipótesis planteada del rol de AhR en la adquisición de resistencia a los inhibidores de EGFR se ha obtenido que los pacientes y líneas celulares portadoras de mutaciones en el gen *EGFR* presentan un aumento de los niveles de ARNm de *AHR*. Los ITQs de EGFR van dirigidos a las mutaciones de este receptor, que confieren una activación intrínseca del dominio tirosina quinasa, independientemente de la activación del receptor por interacción con sus ligandos. Por lo tanto, estos resultados muestran que los niveles de AhR aumentan en estos pacientes, cuyo tratamiento de primera línea son los ITQs. Esto parece indicar que, efectivamente, el uso de ITQs podría promover la adquisición de resistencia a partir del incremento de los niveles de este receptor, que como hemos visto en la Introducción, es capaz de lograr el *bypass* a través de la activación de SRC, capaz de activar por fosforilación las vías MAPK y PI3K (Ye et al., 2018)

Ante estos resultados, podemos concluir que efectivamente la expresión de *AHR* se ve alterada significativamente en función del estatus mutacional de algunos de los principales oncogenes y genes supresores tumorales en el contexto del adenocarcinoma pulmonar, aunque son necesarios estudios adicionales para comprender la causa de estas relaciones y los mecanismos implicados.

4.3 Genes y firmas transcripcionales de la actividad de AhR

Se seleccionaron los genes que presentaban una mayor correlación con la actividad de AhR, a partir de una búsqueda bibliográfica de los principales genes diana de AhR, haciendo hincapié en los más importantes en el pulmón. De entre todos ellos seleccionamos *ABCC3*, *CYP1B1*, *ITGA2* y *NRF2* como candidatos para la predicción de la actividad de AhR, al ser los únicos que mostraban una correlación significativa (Pearson < 0.1, p valor < 0.05) con la expresión de este factor de transcripción. Paralelamente se llevó a cabo una búsqueda de firmas de genes que presentasen variaciones de su expresión en correlación con la actividad de AhR, conocidos como firmas transcripcionales. De las distintas firmas encontradas se seleccionó la firma de represión o *knockdown* LINCSD_3757 de AhR de la línea celular de ADC A549 disponible en iLINCS, que se separó en aquellos genes que estaban sobreexpresados o reprimidos (indicado como UP y DOWN respectivamente). Adicionalmente se introdujeron en el estudio las firmas *hallmark* de hipoxia, transición epitelio-mesénquima y señalización TGF- β disponibles en MSigDB, así como una firma de actividad pan-tisular de AhR publicada recientemente (Sadik et al., 2020). Para cada una de estas firmas se obtuvo un *enrichment score* (ES) calculado con la herramienta ssGSEA (*single sample Gene set enrichment analysis*) (<https://cloud.genepattern.org>), valor indicativo de la correlación que presenta con la sobreexpresión/represión de todos los genes incluidos en la firma transcripcional en cada una de las muestras (tumores o líneas celulares), siendo mayor cuantas más coincidencias hay. Por tanto, el ES es un indicador del nivel de expresión de las firmas transcripcionales en su conjunto, y en el caso de AhR, un marcador indirecto de su actividad como factor de transcripción.

En los pacientes de adenocarcinoma de pulmón del TCGA (Figura 6A), el gen que mejor correlaciona con la expresión de *AHR* es *NRF2*, seguida de *CYP1B1*. La correlación con *NRF2* parece consistente con los cambios en los niveles de ARNm de *AHR* observados en los pacientes con *STK11* y *KEAP1* mutantes, ya que estos dos genes están implicados en la regulación de dicha proteína. Por otro lado, el gen que presenta un patrón de expresión más similar a la firma de genes sobreexpresados en la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549 con *AHR* reprimido (genes sobre los cuales el factor de transcripción AhR tiene un efecto represor) es la subunidad $\alpha 2$ de la integrina (*ITGA2*), implicada en la adhesión celular con la matriz extracelular, y que a su vez presenta una correlación con el *cluster* que incluye a las firmas *hallmark* de la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la activación de TGF- β (el principal inductor de EMT). El aumento de expresión de *ITGA2* asociado a bajos niveles de AhR es consistente evidencias anteriores que relacionan la actividad de AhR con el aumento de la migración celular como consecuencia de la pérdida de interacciones (Fernandez-Salguero, 2010). Mediante la realización de este estudio también hemos podido evidenciar una posible correlación entre la actividad transcripcional de AhR y la hipoxia. Como se ha comentado anteriormente, varios estudios han identificado la represión recíproca entre AhR y HIF-1 α , probablemente debido a que compiten por la dimerización con ARNT/HIF-1 β (Nie et al., 2001).

No obstante, en el caso de las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón (Figura 6B), el gen diana que presenta una mayor correlación con su regulador AhR es el transportador de aniones orgánico multiespecífico canalicular 2 (*ABCC3*), y en este caso, a diferencia de en los pacientes sí que hay una gran correlación entre la expresión de *AHR* y la firma de actividad pantisular de este factor de transcripción (*AHR_pantissues_activation*). Así pues, estos resultados apoyan que en líneas celulares *ABCC3* es un buen biomarcador para predecir los niveles y la actividad de AhR simultáneamente. *ABCC3* es un transportador de la familia ABC implicado en el transporte al exterior celular de xenobióticos conjugados al S-glutatión. Por lo tanto, este transportador es uno de los posibles efectores que median en la función detoxificadora de AhR. A pesar de que *ABCC3* es inducido por *NRF2*, el factor de transcripción capaz de unirse a su promotor en respuesta al estrés oxidativo, no hay ninguna correlación entre ellos y precisamente es *NRF2* el primer gen que se separa del resto de los *clusters*. Por otra parte, estos resultados en las líneas celulares son consistentes con la relación entre las tres firmas transcripcionales de los *hallmarks* del cáncer y la firma de genes sobreexpresados en la línea celular A549 con *AHR* reprimido, así como con el patrón de expresión de *ITGA2*, confirmando el papel inductor de *AHR* en este proceso y validando a *ITGA2* como un potencial biomarcador de los niveles de este factor de transcripción, tanto en pacientes como en líneas celulares.

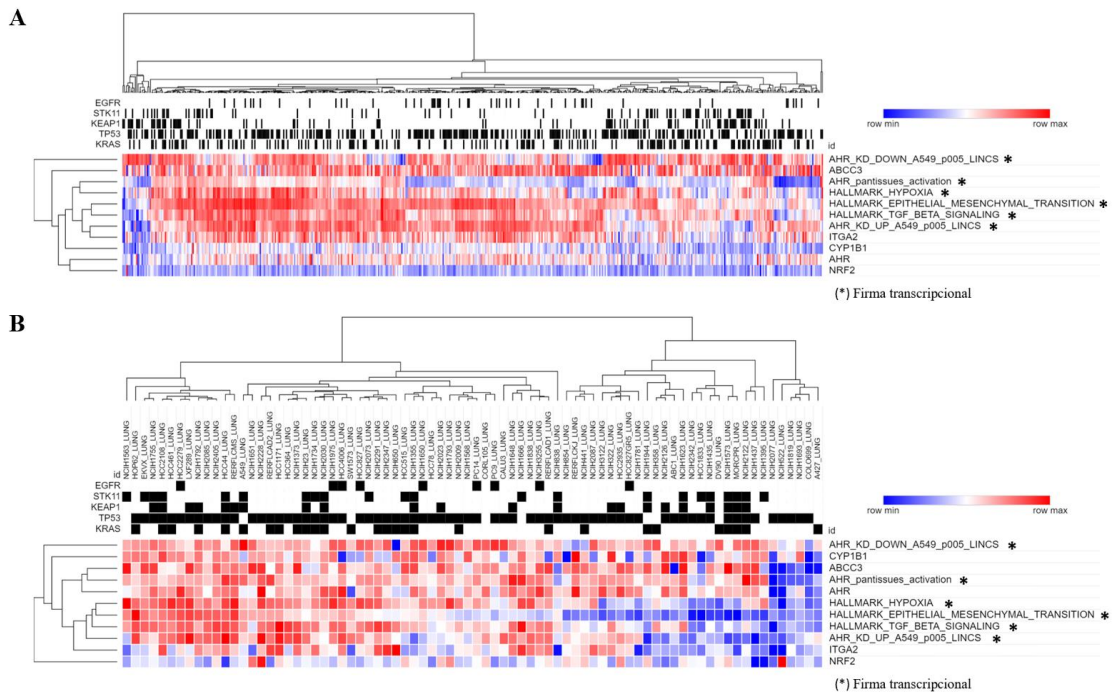


Figura 6: Análisis de correlación entre la expresión de *AHR* y posibles genes marcadores con firmas *hallmark* y actividad AhR. (A) *Heatmap* de *AHR* con alguno de sus principales genes diana obtenidos de la bibliografía y firmas transcripcionales obtenidas del iLINC (http://www.ilincs.org/ilincs/signatures) y MSigDB (http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb) en pacientes de adenocarcinoma de pulmón TCGA, y (B) líneas celulares de la CCLE. El perfil mutacional de las muestras (eje horizontal) está representado con marcas de color negro para los mutantes al lado del gen correspondiente. KD hace referencia a *knokdown* y los asteriscos (*) indican las firmas transcripcionales.

Las correlaciones observadas en el *heatmap* fueron evaluadas a partir de los datos de ARNm para pacientes del TCGA y líneas celulares de la CCLE (Figura 7) obteniéndose una asociación significativa para todos ellos salvo el *NRF2* en las líneas celulares (p-valor = 0.3796). Estos resultados confirman que los genes que presentan una mayor correlación con la expresión de *AHR* son *NRF2*, *CYP1B1* e *ITGA2* en los pacientes del TCGA, y *ABCC3* e *ITGA2* en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón de la CCLE, como se ha expuesto anteriormente.

Cabe destacar grandes diferencias entre pacientes y líneas celulares en relación a los genes que mejor correlacionan con la expresión de *AHR* y las distintas firmas transcripcionales, especialmente en relación a *NRF2* y *CYP1B1* que son los que mejor correlacionan con *AHR* en pacientes y *ABCC3* que tiene un patrón de expresión muy similar al de este gen en las líneas celulares. Sin embargo, ambos genes presentan una baja relación con *AHR* en el otro grupo.

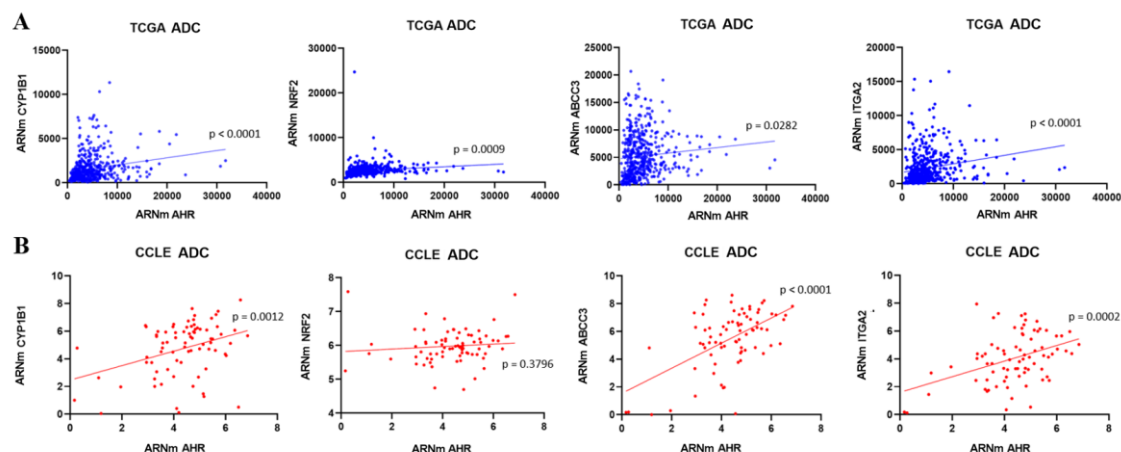


Figura 7: Correlación de los niveles de ARNm de *AHR* con la de los genes diana de AhR seleccionados. (A) En pacientes de adenocarcinoma de pulmón (ADC) del *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) y (B) en líneas celulares de ADC de la *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE).

Esto permite extraer la conclusión de que los posibles marcadores de predicción de la actividad de AhR no son los mismos para pacientes y líneas celulares, probablemente como consecuencia del carácter multicelular del microambiente tumoral, y del cual carecen las líneas celulares.

4.4 Implicación de AhR en la resistencia adquirida a los ITQs de EGFR

En base a los datos anteriormente presentados que evidencian la sobreexpresión de *AHR* en pacientes y líneas celulares con mutaciones de EGFR decidimos profundizar más en el papel que desempeña AhR en la adquisición de resistencia secundaria a los ITQs de EGFR, abordado anteriormente por Ye et al., (2018).

En primer lugar, se estudió la relación entre los niveles de ARNm de *AHR* comparando las líneas celulares parentales H1975 (mutaciones puntuales L858 y T790M en EGFR), HCC4006 (deleción de E747-A749 y mutación puntual A750P en EGFR) y HCC827 (deleción de E746-A750 en EGFR) con sus equivalentes resistentes a los ITQs: CLR (resistente a CL- 387,785, un ITQ irreversible), GeR (resistente al gefitinib) y ER23 (resistente al erlotinib), respectivamente. Estas líneas resistentes fueron generadas anteriormente por otros miembros del laboratorio mediante el tratamiento crónico de la línea parental con concentraciones crecientes de ITQs hasta que adquirieron resistencia y crecían normalmente a una concentración de 10 μ M, además de desarrollar un fenotipo mesenquimal caracterizado por niveles elevados de vimentina y represión de la E-cadherina epitelial (Soucheray et al., 2015). Como podemos observar en la Figura 8, los niveles de ARNm de *AHR* aumentan significativamente tras la adquisición del fenotipo resistente a los ITQs de EGFR, observándose un aumento significativo de estos en la variedad resistente de las tres líneas celulares empleadas en el análisis, y que parece ser especialmente significativa en H1975 y HCC4006, ya que en condiciones basales muestran unos mayores niveles de expresión.

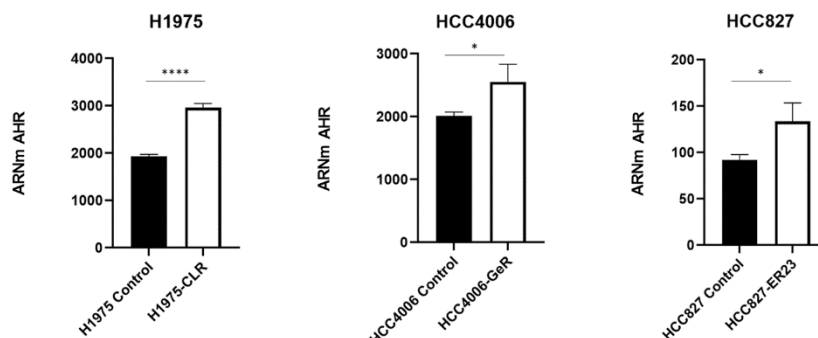


Figura 8: Niveles de expresión de *AHR* en líneas celulares sensibles y resistentes a ITQs de EGFR. Las líneas resistentes empleadas fueron H1975-CLR (resistente a CL-387,785), HCC827-ER23 (resistente a erlotinib) y HCC4006-GeR (resistente a gefitinib). Los asteriscos (*) y (***) son indicativo de que existe una significancia estadística entre las muestras con el gen *wild type* y mutado, con un p-valor < 0.05 y < 0.0001, respectivamente.

Con el fin de validar estos resultados a nivel de proteína, se realizó un *western blot* con lisados proteicos obtenidos de las parejas sensibles/resistentes de ADC H1975/AZDR (resistentes al osimertinib, anteriormente denominado AZD9291), HCC4006/GeR (resistentes al gefitinib) y HCC827/ER23 (resistentes al erlotinib). Los resultados obtenidos y mostrados en la Figura 9 no sólo demuestran que las líneas celulares H1975 y HCC4006 son las que presentan mayores niveles de proteína AhR, coincidiendo con los resultados obtenidos a nivel de ARNm, sino que además se puede apreciar claramente un incremento de los niveles de AhR en las variantes resistentes a los ITQs. Además, también observamos un aumento de los niveles de ARNT y HIF-1 α . Sin embargo, estos niveles se ven reducidos en el caso de la línea HCC827, aunque la diferencia es tan pequeña que es probable que no sea estadísticamente significativa, como se puede verificar con los datos de cuantificación por densitometría de la imagen (Figura 9B).

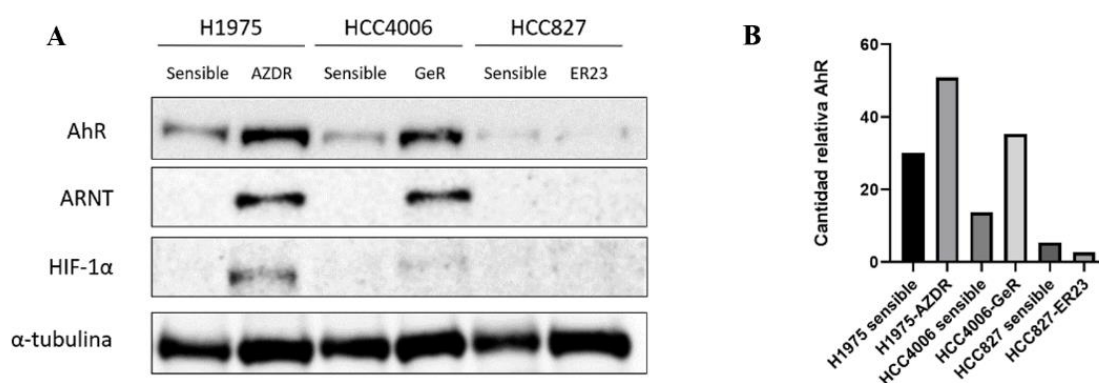


Figura 9: Expresión diferencial de AhR y sus *partners* en líneas sensibles y resistentes a ITQs. (A) Determinación de los niveles de las proteínas AhR, ARNT, HIF-1 α y α -tubulina (como control de carga) por *western blot* a partir de extractos proteicos de las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón H1975, HCC4006 y HCC827 sensible y resistentes a los ITQs (AZDR, GeR y ER23, respectivamente). (B) Cuantificación relativa de los niveles de AhR en el *western* respecto al control (α -tubulina).

Estos resultados están en línea con los obtenidos por Yen y colaboradores, que postulan que los niveles elevados de esta proteína podrían determinar la sensibilidad o resistencia a los ITQs de EGFR (Ye et al., 2018). Concretamente, la activación de AhR en aquellas líneas celulares EGFR mutantes con una elevada expresión constitutiva contribuye a la resistencia frente a los ITQs al estimular las vías de proliferación celular PI3K/AKT y MAPK a través de la activación de la tirosina quinasa SRC. Así, y en presencia del ITQ, AhR puede unirse a SRC, y este complejo se transloca a la membrana celular, donde AhR se convierte en una molécula adaptadora gracias al dominio SH2, permitiendo la interacción con la quinasa JAK2, capaz de activar a SRC por fosforilación. Además, este mismo estudio describe que los antagonistas de AhR tienen un efecto antitumoral al inhibir la señalización PI3K/AKT y MAPK e inducir la apoptosis. Del mismo modo, indican que la activación de AhR por ligandos agonistas promueve la proliferación celular. De esta forma, AhR tendría una función independiente de la transcripción en el reclutamiento de quinasas, responsable, al menos en parte, del *bypass* de EGFR y de la resistencia a los ITQs, y emerge como una diana farmacológica potencialmente útil para evitar el desarrollo de resistencias.

En base a estas observaciones nos planteamos estudiar el efecto de los agonistas y antagonistas de AhR sobre la resistencia a ITQs de EGFR una vez adquirida, empleando ITE y CH223191, respectivamente. Estos experimentos se realizaron a corto (4 días) y largo plazo (14 días) empleando las líneas celulares sensibles a los ITQs (HCC4006 y H1975) y sus versiones con resistencia adquirida por exposición crónica a los ITQs (HCC4006-GeR y H1975-AZDR). La elección de estas líneas celulares se debe a que son los dos modelos que presentaron un mayor nivel de variación en los niveles de ARNm y proteína del gen *AHR* en los análisis realizados.

La evaluación a corto plazo se realizó mediante ensayos de citotoxicidad celular con sulforodamina B durante 4 días (Figura 10). Como cabe esperar el osimertinib reduce la proliferación celular en mayor medida en las células sensibles a ITQs que en las resistentes, a pesar de que en estas también se aprecia una reducción de la viabilidad. Por otro lado, el agonista de AhR ITE presenta una actividad antitumoral en todas las líneas celulares empleadas, si bien podría tener más efecto en las líneas resistentes a ITQs que en su equivalente sensible. El AhR en su forma inactiva puede interactuar directamente con RB1 formando un complejo que previene la unión de E2F con esta proteína supresora de tumores, y por lo tanto favorece la transcripción dependiente de E2F de genes implicados en la fase S del ciclo celular. La unión de AhR con sus ligandos evita esta interacción para que RB1 pueda secuestrar a E2F, logrando la parada del ciclo celular en la fase G1. El efecto inhibitorio de la proliferación de los agonistas de AhR también se ha visto en otras neoplasias como el carcinoma hepatocelular o el cáncer de ovarios y próstata, siendo consistente con los resultados del potencial antitumoral del ITE obtenidos en este estudio, y en los que se demuestra que actúa induciendo la parada del ciclo celular G0/G1 al reducir la expresión de CDK4 y ciclina D1, y aumentar los niveles de p27 y p21 (Pang et al., 2008; Zhang et al., 2021).

En cuanto al antagonista CH223191, nuestros resultados indican que tiene un efecto positivo sobre la proliferación celular, excepto a las máximas concentraciones (10 μ M), en el caso de las células H1975, tanto sensibles como resistentes al osimertinib. Estos resultados coinciden con estudios anteriores, donde se postula que este efecto es, al menos en parte, independiente de AhR (Choi et al., 2012). Sin embargo, dado el efecto opuesto de los agonistas de AhR todo parece indicar que estos resultados son plausibles con la hipótesis de que la actividad de AhR reduce la proliferación celular al causar el arresto del ciclo celular. Por lo tanto, sería necesario evaluar el efecto proliferativo con otros antagonistas de AhR, como el *6,2',4'-trimethoxyflavone* (TMF), para verificar si efectivamente parte del efecto estimulador de la proliferación es resultado de la interacción con AhR.

En lo referente a las distintas combinaciones de los fármacos, se puede apreciar que el ITE podría resensibilizar a las líneas resistentes junto al osimertinib reduciendo la viabilidad celular, mientras que el antagonista CH223191 muestra un efecto mucho menor, e incluso parece llegar a reducir el efecto antitumoral del ITQ en el caso de la línea celular HCC4006. Por otra parte, la combinación de CH223191 con el ITE, disminuye la proliferación. Aunque se esperaba que el efecto del ITE predominase sobre el del CH223191 debido a su mayor afinidad hacia el AhR, resulta contradictorio este efecto sinérgico, que debería ser estudiado con más detalle. Finalmente, la combinación de las tres moléculas presenta el mayor efecto citotóxico de todos. En conclusión, nuestros resultados sugieren que la activación de AHR con agonistas farmacológicos podría revertir, al menos parcialmente, la resistencia adquirida a los ITQs de EGFR.

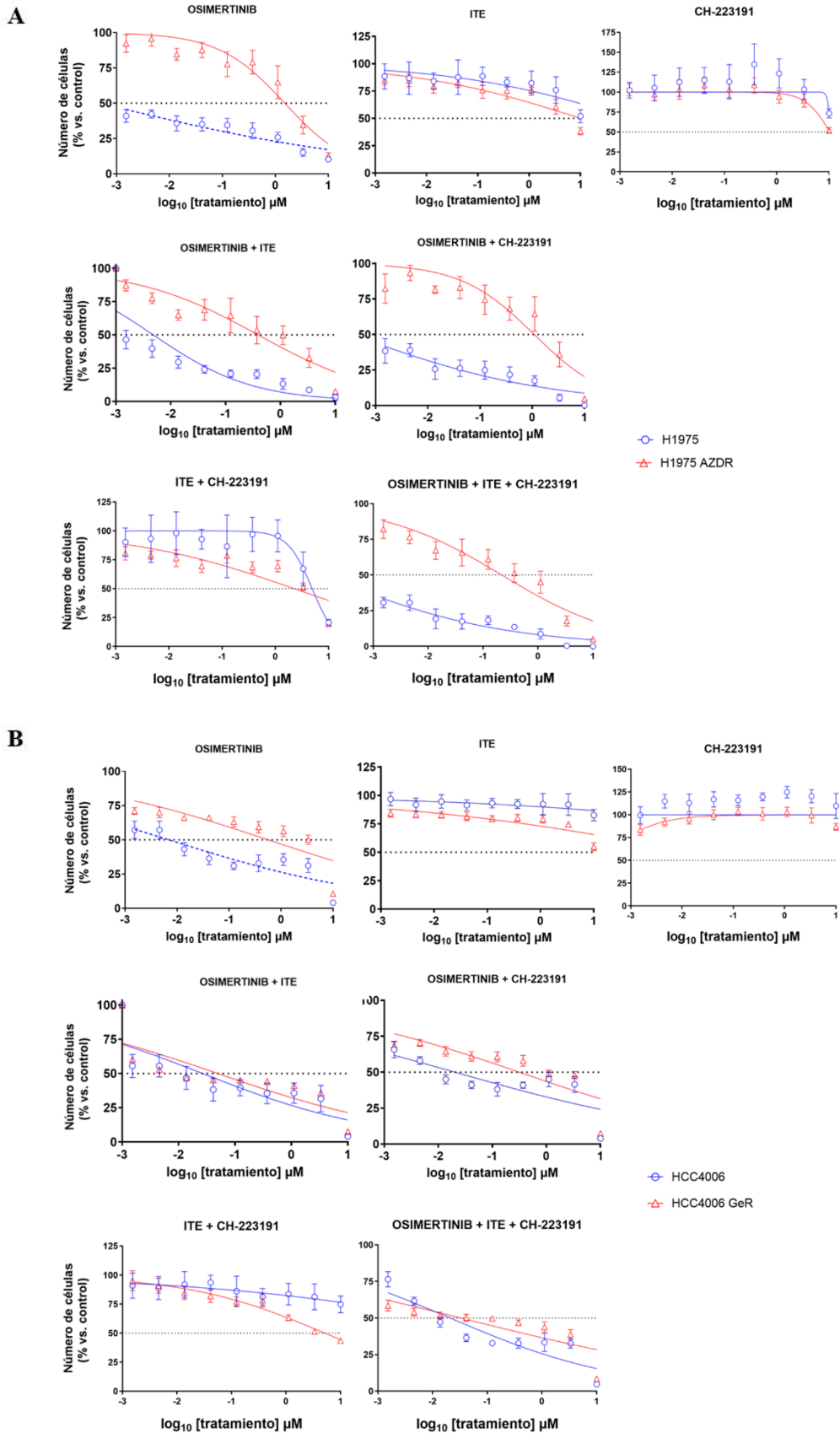


Figura 10: Ensayo de citotoxicidad celular con sulforodamina B. Estudio del efecto inhibitor o estimulador de la proliferación celular a las 96 horas del ITE, osimertinib, CH223191 y todas sus posibles combinaciones en (A) la línea celular H1975 y su equivalente resistentes a ITQs de EGFR: H1975-AZDR, y (B) HCC4006 y su variante resistente (HCC4006-GeR). El control tiene la concentración correspondiente de DMSO utilizado como vehículo.

Para evaluar los efectos de estos mismos compuestos y sus combinaciones en un escenario más a largo plazo, se llevó a cabo un ensayo de formación de colonias durante 14 días (Figura 11). Los resultados obtenidos coinciden con lo observado en el ensayo de citotoxicidad, empezando por el osimertinib, que no tiene ningún efecto sobre las líneas celulares resistentes a los ITQs a las dosis empleadas (2 y 10 nM). Del mismo modo se ha replicado el efecto inhibitor de la proliferación del ITE, coincidiendo con que parece tener un mayor efecto en las líneas celulares H1975, tanto sensible como resistentes (H1975-AZDR), que en las HCC4006. Además, el CH223191 podría tener un efecto positivo sobre la proliferación en la línea celular H1975 a concentraciones bajas (1 μ M), de manera consistente con el efecto antitumoral de las dosis más altas en las curvas de citotoxicidad. Finalmente, el tratamiento con la triple combinación (osimertinib, ITE y CH223191) replica el efecto sinérgico de los ensayos de citotoxicidad a corto plazo, siendo el que muestra un mayor efecto anticarcinogénico, especialmente a dosis altas de CH223191 (10 μ M), llegando a conseguir una toxicidad prácticamente total en el caso de las líneas celulares sensibles al osimertinib.

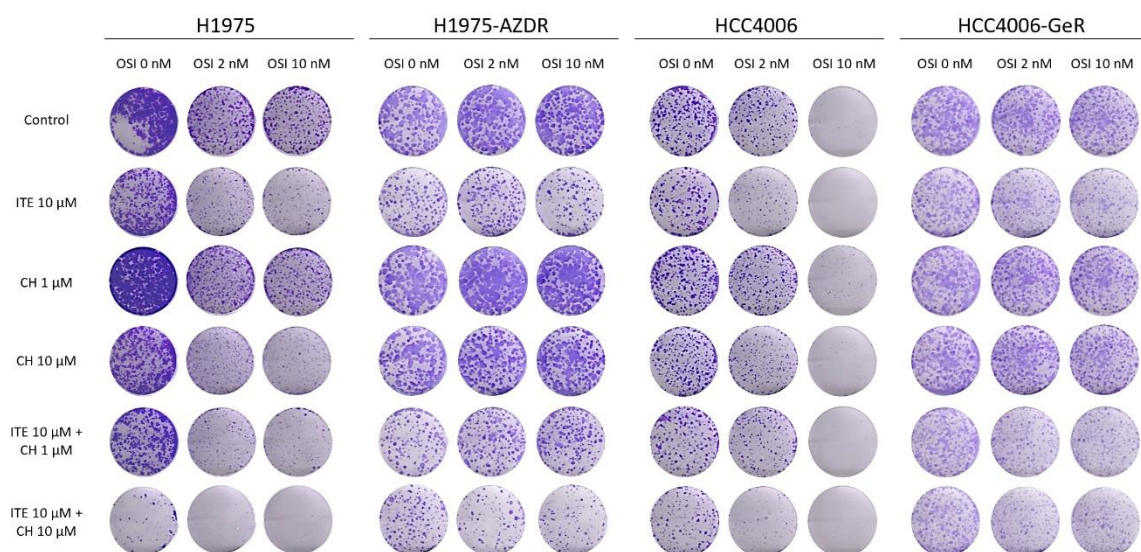


Figura 11: Ensayo de formación de colonias. Estudio del efecto inhibitor o estimulador de la proliferación celular a las 2 semanas del ITE, osimertinib (OSI) y CH223191 (CH), así como de todas sus posibles combinaciones en las líneas celulares H1975, HCC4006, y sus equivalentes resistentes a ITQs de EGFR (H1975-AZDR y HCC4006-GeR). Al control se le añadió DMSO al 0.1%, vehículo en el que estaban disueltos todos los compuestos empleados.

Ante estos resultados, queda a la vista el potencial terapéutico de AhR y sus ligandos, destacando el efecto citotóxico del agonista endógeno ITE, especialmente significativo en las líneas celulares resistentes al ITQ de EGFR osimertinib. También se ha observado que el efecto del agonista CH223191 parece ser variable en función de la dosis, ya que los resultados apuntan que a elevadas concentraciones tienen un efecto inhibitor de la proliferación, pero estimulador a concentraciones más bajas. Finalmente, la combinación de los diferentes tratamiento muestran prometedores indicios de un gran efecto antitumoral, aunque son necesarios estudios más detallados utilizando otros agonistas y antagonistas de AhR, herramientas de modulación de la expresión génica (shRNA o CRISPR, vectores de sobreexpresión) y estudios farmacológicos in vivo en ratones para validar estos potenciales efectos beneficiosos de la modulación de AhR a la hora de revertir la resistencia a los ITQs de EGFR en pacientes de adenocarcinoma pulmonar”.

5 Conclusiones

- I.A. La expresión de *AHR* está aumentada en los tumores dirigidos por mutaciones activadoras del oncogén EGFR.
- I.B. Los beneficios obtenidos por tratamiento dirigido contra esta diana dependerían de los niveles de expresión y actividad de la proteína AhR.
- I.C. La expresión de *AHR* (y posiblemente su actividad) varía en función de los oncogenes y genes supresores que dirigen el adenocarcinoma pulmonar, y correlaciona con la progresión de la enfermedad.
- II. Los genes que correlacionan con la expresión y actividad de AhR difieren en líneas celulares y pacientes, pero este gen parece estar implicado en los procesos de hipoxia y transición epitelio-mesenquimal.
- III. Las líneas celulares con resistencia adquirida a los ITQs de EGFR sobreexpresan la proteína AhR.
- IV.A. La activación de AhR, como consecuencia de la interacción con su ligando agonista ITE, resulta en un efecto antitumoral *in vitro*, especialmente en las líneas celulares con resistencia adquirida a los ITQs de EGFR.
- IV.B. Las terapias farmacológicas para revertir la resistencia a los ITQs de EGFR basadas en la modulación de la actividad AhR con agonistas podrían tener un potencial efecto antitumoral.
- IV.C. Son necesarios estudios más detallados y modelos animales para validar si los resultados *in vitro* son reproducibles *in vivo* y comprobar que el efecto citotóxico es selectivo frente a las células tumorales.

6 Referencias bibliográficas

- APETOH, L., QUINTANA, F.J., POT, C., JOLLER, N., XIAO, S., KUMAR, D., BURNS, E.J., SHERR, D.H., WEINER, H.L., KUCHROO, V.K., 2010. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat. Immunol.* 11, 854–861.
- BARHOOVER, M.A., HALL, J.M., GREENLEE, W.F., THOMAS, R.S., 2010. Aryl hydrocarbon receptor regulates cell cycle progression in human breast cancer cells via a functional interaction with cyclin-dependent kinase 4. *Mol. Pharmacol.* 77, 195–201.
- BARTHA, Á., GYÖRFFY, B., 2021. TNMplot.com: A Web Tool for the Comparison of Gene Expression in Normal, Tumor and Metastatic Tissues. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2622.
- BATES, S., VOUSDEN, K.H., 1999. Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 55, 28–37.
- BEISCHLAG, T., WANG, S., ROSE, D., TORCHIA, J., REISZ-PORSZASZ, R.-P., MUHAMMAD, K., NELSON, W., PROBST, M., ROSENFELD, M., HANKINSON, O., 2002. Recruitment of the NCoA/SRC-1/p160 family of transcriptional coactivators by the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator complex. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4319–4333.
- BENESOVA, L., MINARIK, M., JANCARIKOVA, D., BELSANOVA, B., PESEK, M., 2010. Multiplicity of EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with tyrosine kinase inhibitors. *Anticancer Res.* 30, 1667–1671.
- BIAN, Y., LI, Y., SHRESTHA, G., WEN, X., CAI, B., WANG, K., WAN, X., 2019. ITE, an endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand, suppresses endometrial cancer cell proliferation and migration. *Toxicology* 421, 1–8.
- BIRNBAUM, L.S., 1994. The mechanism of dioxin toxicity: relationship to risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 102 Suppl 9, 157–167.
- BROSE, M.S., VOLPE, P., FELDMAN, M., KUMAR, M., RISHI, I., GERRERO, R., EINHORN, E., HERLYN, M., MINNA, J., NICHOLSON, A., ROTH, J.A., ALBELDA, S.M., DAVIES, H., COX, C., BRIGNELL, G., STEPHENS, P., FUTREAL, P.A., WOOSTER, R., STRATTON, M.R., WEBER, B.L., 2002. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res.* 62, 6997–7000.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2014. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 511, 543–550.
- CHEN, R.-J., SIAO, S.-H., HSU, C.-H., CHANG, C.-Y., CHANG, L.W., WU, C.-H., LIN, P., WANG, Y.-J., 2014. TCDD Promotes Lung Tumors via Attenuation of Apoptosis through Activation of the Akt and ERK1/2 Signaling Pathways. *PLOS ONE* 9, e99586.
- CHO, Y.C., ZHENG, W., JEFCOATE, C.R., 2004. Disruption of cell-cell contact maximally but transiently activates AhR-mediated transcription in 10T1/2 fibroblasts. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 199, 220–238.
- CHOI, E.-Y., LEE, H., DINGLE, R.W.C., KIM, K.B., SWANSON, H.I., 2012. Development of novel CH223191-based antagonists of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol. Pharmacol.* 81, 3–11.
- CHOI, Y., CHAN, A.P., 2015. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 31, 2745–2747.

- CICCARESE, F., ZULATO, E., INDRACCOLO, S., 2019. LKB1/AMPK Pathway and Drug Response in Cancer: A Therapeutic Perspective. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019, 1–16.
- CLEELAND, C.S., ALLEN, J.D., ROBERTS, S.A., BRELL, J.M., GIRALT, S.A., KHAKOO, A.Y., KIRCH, R.A., KWITKOWSKI, V.E., LIAO, Z., SKILLINGS, J., 2012. Reducing the toxicity of cancer therapy: recognizing needs, taking action. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9, 471–478.
- CROSS, D.A.E., ASHTON, S.E., GHIORGHIU, S., EBERLEIN, C., NEBHAN, C.A., SPITZLER, P.J., ORME, J.P., FINLAY, M.R.V., WARD, R.A., MELLOR, M.J., HUGHES, G., RAHI, A., JACOBS, V.N., RED BREWER, M., ICHIHARA, E., SUN, J., JIN, H., BALLARD, P., AL-KADHIMI, K., ROWLINSON, R., KLINOWSKA, T., RICHMOND, G.H.P., CANTARINI, M., KIM, D.-W., RANSON, M.R., PAO, W., 2014. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov.* 4, 1046–1061.
- DENISON, M.S., NAGY, S.R., 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 309–334.
- DIETRICH, C., KAINA, B., 2010. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell–cell contact and tumor growth. *Carcinogenesis* 31, 1319–1328.
- DINATALE, B.C., SCHROEDER, J.C., FRANCEY, L.J., KUSNADI, A., PERDEW, G.H., 2010. Mechanistic Insights into the Events That Lead to Synergistic Induction of Interleukin 6 Transcription upon Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor and Inflammatory Signaling. *J. Biol. Chem.* 285, 24388–24397.
- ERCAN, D., ZEJNULLAHU, K., YONESAKA, K., XIAO, Y., CAPELLETTI, M., ROGERS, A., LIFSHITS, E., BROWN, A., LEE, C., CHRISTENSEN, J.G., KWIATKOWSKI, D.J., ENGELMAN, J.A., JÄNNE, P.A., 2010. Amplification of EGFR T790M causes resistance to an irreversible EGFR inhibitor. *Oncogene* 29, 2346–2356.
- FERLAY, J., COLOMBET, M., SOERJOMATARAM, I., PARKIN, D.M., PIÑEROS, M., ZNAOR, A., BRAY, F., 2021. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int. J. Cancer* 1–12.
- FERLAY, J., ERVIK, M., LAM, F., COLOMBET, M., MERY, L., PIÑEROS, M., ZNAOR, A., SOERJOMATARAM, I., BRAY, F., 2020a. Global Cancer Observatory: Cancer Today. URL <https://gco.iarc.fr/today> (visto el 13 de Junio de 2021).
- FERLAY, J., LAVERSANNE, M., ERVIK, M., LAM, F., COLOMBET, M., MERY, L., PIÑEROS, M., ZNAOR, A., SOERJOMATARAM, I., BRAY, F., 2020b. Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. URL <https://gco.iarc.fr/tomorrow> (visto el 13 de Junio de 2021).
- FERNANDEZ-SALGUERO, P.M., 2010. A remarkable new target gene for the dioxin receptor. *Cell Adhes. Migr.* 4, 172–175.
- FUKUNAGA, B.N., PROBST, M.R., REISZ-PORSZASZ, S., HANKINSON, O., 1995. Identification of Functional Domains of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 29270–29278.
- FUTREAL, P.A., COIN, L., MARSHALL, M., DOWN, T., HUBBARD, T., WOOSTER, R., RAHMAN, N., STRATTON, M.R., 2004. A census of human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer* 4, 177–183.
- GIACCONE, G., 2004. The Role of Gefitinib in Lung Cancer Treatment. *Clin. Cancer Res.* 10, 4233s–4237s.
- GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C., QUINTANA, F.J., 2018. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity* 48, 19–33.
- HARVEY, J.J., 1964. An Unidentified Virus which causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature* 204, 1104–1105.

- HAUPT, Y., MAYA, R., KAZAZ, A., OREN, M., 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296–299.
- HAYES, J.D., DINKOVA-KOSTOVA, A.T., 2014. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 39, 199–218.
- HERBST, R.S., MORGENZTERN, D., BOSHOFF, C., 2018. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* 553, 446–454.
- HUANG, L., FU, L., 2015. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharm. Sin. B* 5, 390–401.
- HUANG, L.E., GU, J., SCHAU, M., BUNN, H.F., 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 7987–7992.
- IKUTA, T., KAWAJIRI, K., 2006. Zinc finger transcription factor Slug is a novel target gene of aryl hydrocarbon receptor. *Exp. Cell Res.* 312, 3585–3594.
- ITOH, K., CHIBA, T., TAKAHASHI, S., ISHII, T., IGARASHI, K., KATOH, Y., OYAKE, T., HAYASHI, N., SATOH, K., HATAYAMA, I., YAMAMOTO, M., NABESHIMA, Y., 1997. An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 313–322.
- JIAO, Q., BI, L., REN, Y., SONG, S., WANG, Q., WANG, Y., 2018. Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Mol. Cancer* 17, 36.
- JIN, U.-H., LEE, S.-O., PFENT, C., SAFE, S., 2014. The aryl hydrocarbon receptor ligand omeprazole inhibits breast cancer cell invasion and metastasis. *BMC Cancer* 14, 498.
- KIM, D.W., GAZOURIAN, L., QUADRI, S.A., RAPHAËLLE, SHERR, D.H., SONENSHEIN, G.E., 2000. The RelA NF- κ B subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene* 19, 5498–5506.
- KIM, J., TCHERNYSHYOV, I., SEMENZA, G.L., DANG, C.V., 2006. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 3, 177–185.
- KIM, S.-H., HENRY, E.C., KIM, D.-K., KIM, Y.-H., SHIN, K.J., HAN, M.S., LEE, T.G., KANG, J.-K., GASIEWICZ, T.A., RYU, S.H., 2006. Novel compound 2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) prevents 2,3,7,8-TCDD-induced toxicity by antagonizing the aryl hydrocarbon receptor. *Mol. Pharmacol.* 69, 1871–1878.
- KOBAYASHI, A., KANG, M.-I., OKAWA, H., OHTSUJI, M., ZENKE, Y., CHIBA, T., IGARASHI, K., YAMAMOTO, M., 2004. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7130–7139.
- KOBAYASHI, S., BOGGON, T.J., DAYARAM, T., JÄNNE, P.A., KOCHER, O., MEYERSON, M., JOHNSON, B.E., ECK, M.J., TENEN, D.G., HALMOS, B., 2005. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 352, 786–792.
- KORSSE, S.E., PEPPELENBOSCH, M.P., VAN VEELLEN, W., 2013. Targeting LKB1 signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1835, 194–210.
- KROCK, B.L., SKULI, N., SIMON, M.C., 2011. Hypoxia-Induced Angiogenesis. *Genes Cancer* 2, 1117–1133.

- LADERIAN, B., MUNDI, P., FOJO, T., E. BATES, S., 2020. Emerging Therapeutic Implications of STK11 Mutation: Case Series. *The Oncologist* 25, 733–737.
- LANGER, C.J., BESSE, B., GUALBERTO, A., BRAMBILLA, E., SORIA, J.-C., 2010. The Evolving Role of Histology in the Management of Advanced Non–Small–Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* 28, 5311–5320.
- LAPLANTE, M., SABATINI, D.M., 2009. mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 3589–3594.
- LI, D., AMBROGIO, L., SHIMAMURA, T., KUBO, S., TAKAHASHI, M., CHIRIEAC, L.R., PADERA, R.F., SHAPIRO, G.I., BAUM, A., HIMMELSBACH, F., RETTIG, W.J., MEYERSON, M., SOLCA, F., GREULICH, H., WONG, K.-K., 2008. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* 27, 4702–4711.
- LIN, J.J., SHAW, A.T., 2017. Recent Advances in Targeting ROS1 in Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* 12, 1611–1625.
- LIU, Y., LIANG, X., DONG, W., FANG, Y., LV, J., ZHANG, T., FISKESUND, R., XIE, J., LIU, J., YIN, X., JIN, X., CHEN, D., TANG, K., MA, J., ZHANG, HUAFENG, YU, J., YAN, J., LIANG, H., MO, S., CHENG, F., ZHOU, Y., ZHANG, HAIZENG, WANG, J., LI, J., CHEN, Y., CUI, B., HU, Z.-W., CAO, X., QIN, F.X.-F., HUANG, B., 2018. Tumor-Repopulating Cells Induce PD-1 Expression in CD8+ T Cells by Transferring Kynurenine and AhR Activation. *Cancer Cell* 33, 480-494.e7.
- LYNCH, T.J., BELL, D.W., SORDELLA, R., GURUBHAGAVATULA, S., OKIMOTO, R.A., BRANNIGAN, B.W., HARRIS, P.L., HASERLAT, S.M., SUPKO, J.G., HALUSKA, F.G., LOUIS, D.N., CHRISTIANI, D.C., SETTLEMAN, J., HABER, D.A., 2004. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 350, 2129–2139.
- MASCANFRONI, I.D., TAKENAKA, M.C., YESTE, A., PATEL, B., WU, Y., KENISON, J.E., SIDDIQUI, S., BASSO, A.S., OTTERBEIN, L.E., PARDOLL, D.M., PAN, F., PRIEL, A., CLISH, C.B., ROBSON, S.C., QUINTANA, F.J., 2015. Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1- α . *Nat. Med.* 21, 638–646.
- MASOUD, G.N., LI, W., 2015. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm. Sin.* B 5, 378–389.
- MCDERMOTT, U., IAFRATE, A.J., GRAY, N.S., SHIODA, T., CLASSON, M., MAHESWARAN, S., ZHOU, W., CHOI, H.G., SMITH, S.L., DOWELL, L., ULKUS, L.E., KUHLMANN, G., GRENINGER, P., CHRISTENSEN, J.G., HABER, D.A., SETTLEMAN, J., 2008. Genomic alterations of anaplastic lymphoma kinase may sensitize tumors to anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *Cancer Res.* 68, 3389–3395.
- MIAO, W., HU, L., SCRIVENS, P.J., BATIST, G., 2005. Transcriptional Regulation of NF-E2 p45-related Factor (NRF2) Expression by the Aryl Hydrocarbon Receptor-Xenobiotic Response Element Signaling Pathway: DIRECT CROSS-TALK BETWEEN PHASE I AND II DRUG-METABOLIZING ENZYMES. *J. Biol. Chem.* 280, 20340–20348.
- MOGRABI, B., HEEKE, S., HOFMAN, P., 2021. The Importance of STK11/LKB1 Assessment in Non-Small Cell Lung Carcinomas. *Diagn. Basel Switz.* 11, 196.
- 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 Clin. Proc.* 83, 584–594.
- MURRAY, I.A., PATTERSON, A.D., PERDEW, G.H., 2014. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat. Rev. Cancer* 14, 801–814.

- NAGY, Á., MUNKÁCSY, G., GYÖRFFY, B., 2021. Pancancer survival analysis of cancer hallmark genes. *Sci. Rep.* 11, 6047.
- NIE, M., BLANKENSHIP, A.L., GIESY, J.P., 2001. Interactions between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and hypoxia signaling pathways. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10, 17–27.
- NIEDERST, M.J., HU, H., MULVEY, H.E., LOCKERMAN, E.L., GARCIA, A.R., PIOTROWSKA, Z., SEQUIST, L.V., ENGELMAN, J.A., 2015. The Allelic Context of the C797S Mutation Acquired upon Treatment with Third-Generation EGFR Inhibitors Impacts Sensitivity to Subsequent Treatment Strategies. *Clin. Cancer Res.* 21, 3924–3933.
- NUSINOW, D.P., SZPYT, J., GHANDI, M., ROSE, C.M., McDONALD, E.R., KALOCSAY, M., JANÉ-VALBUENA, J., GELFAND, E., SCHWEPPE, D.K., JEDRYCHOWSKI, M., GOLJI, J., PORTER, D.A., REJTAR, T., WANG, Y.K., KRYUKOV, G.V., STEGMEIER, F., ERICKSON, B.K., GARRAWAY, L.A., SELLERS, W.R., GYGI, S.P., 2020. Quantitative Proteomics of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Cell* 180, 387-402.e16.
- OHTA, T., IJIMA, K., MIYAMOTO, M., NAKAHARA, I., TANAKA, H., OHTSUJI, M., SUZUKI, T., KOBAYASHI, A., YOKOTA, J., SAKIYAMA, T., SHIBATA, T., YAMAMOTO, M., HIROHASHI, S., 2008. Loss of Keap1 Function Activates Nrf2 and Provides Advantages for Lung Cancer Cell Growth. *Cancer Res.* 68, 1303–1309.
- OU, S.-H.I., TAN, J., YEN, Y., SOO, R.A., 2012. ROS1 as a “druggable” receptor tyrosine kinase: lessons learned from inhibiting the ALK pathway. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 12, 447–456.
- PAEZ, J.G., JÄNNE, P.A., LEE, J.C., TRACY, S., GREULICH, H., GABRIEL, S., HERMAN, P., KAYE, F.J., LINDEMAN, N., BOGGON, T.J., NAOKI, K., SASAKI, H., FUJII, Y., ECK, M.J., SELLERS, W.R., JOHNSON, B.E., MEYERSON, M., 2004. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497–1500.
- PANG, P.-H., LIN, Y.-H., LEE, Y.-H., HOU, H.-H., HSU, S.-P., JUAN, S.-H., 2008. Molecular mechanisms of p21 and p27 induction by 3-methylcholanthrene, an aryl-hydrocarbon receptor agonist, involved in antiproliferation of human umbilical vascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 215, 161–171.
- PAPILLON-CAVANAGH, S., DOSHI, P., DOBRIN, R., SZUSTAKOWSKI, J., WALSH, A.M., 2020. STK11 and KEAP1 mutations as prognostic biomarkers in an observational real-world lung adenocarcinoma cohort. *ESMO Open* 5, e000706.
- PAPPAS, B., YANG, Y., WANG, Y., KIM, K., CHUNG, H.J., CHEUNG, M., NGO, K., SHINN, A., CHAN, W.K., 2018. p23 protects the human aryl hydrocarbon receptor from degradation via a heat shock protein 90-independent mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 152, 34–44.
- PARIS, A., TARDIF, N., GALIBERT, M.-D., CORRE, S., 2021. AhR and Cancer: From Gene Profiling to Targeted Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 752.
- PEREZ-SOLER, R., 2004. The Role of Erlotinib (Tarceva, OSI 774) in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 4238s–4240s.
- PETITJEAN, A., MATHE, E., KATO, S., ISHIOKA, C., TAVTIGIAN, S.V., HAINAUT, P., OLIVIER, M., 2007. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat.* 28, 622–629.

- PILARCZYK, M., KOURIL, M., SHAMSAEI, B., VASILIAUSKAS, J., NIU, W., MAHI, N., ZHANG, L., CLARK, N., REN, Y., WHITE, S., KARIM, R., XU, H., BIESIADA, J., BENNETT, M.F., DAVIDSON, S., REICHARD, J.F., ROBERTS, K., STATHIAS, V., KOLETI, A., VIDOVIC, D., CLARKE, D.J.B., SCHURER, S.C., MA'AYAN, A., MELLER, J., MEDVEDOVIC, M., 2020. Connecting omics signatures of diseases, drugs, and mechanisms of actions with iLINCS. *bioRxiv* 826271.
- PUGA, A., XIA, Y., ELFERINK, C., 2002. Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Chem. Biol. Interact.* 141, 117–130.
- QUINTANA, F.J., BASSO, A.S., IGLESIAS, A.H., KORN, T., FAREZ, M.F., BETTELLI, E., CACCAMO, M., OUKKA, M., WEINER, H.L., 2008. Control of T reg and T H 17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453, 65–71.
- QUINTANA, F.J., MURUGAIYAN, G., FAREZ, M.F., MITSDOERFFER, M., TUKPAH, A.-M., BURNS, E.J., WEINER, H.L., 2010. An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20768–20773.
- RANNUG, A., RANNUG, U., ROSENKRANZ, H.S., WINQVIST, L., WESTERHOLM, R., AGURELL, E., GRAFSTRÖM, A.K., 1987. Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J. Biol. Chem.* 262, 15422–15427.
- REYES, H., REISZ-PORSZASZ, S., HANKINSON, O., 1992. Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* 256, 1193–1195.
- RIKOVA, K., GUO, A., ZENG, Q., POSSEMATO, A., YU, J., HAACK, H., NARDONE, J., LEE, K., REEVES, C., LI, Y., HU, Y., TAN, Z., STOKES, M., SULLIVAN, L., MITCHELL, J., WETZEL, R., MACNEILL, J., REN, J.M., YUAN, J., BAKALARSKI, C.E., VILLEN, J., KORNHAUSER, J.M., SMITH, B., LI, D., ZHOU, X., GYGI, S.P., GU, T.-L., POLAKIEWICZ, R.D., RUSH, J., COMB, M.J., 2007. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 131, 1190–1203.
- ROBERTS, P.J., DER, C.J., 2007. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26, 3291–3310.
- RODENHUIS, S., 1992. Ras and human tumors. *Semin. Cancer Biol.* 3, 241–247.
- SADIK, A., PATTERSON, L.F.S., ÖZTÜRK, S., MOHAPATRA, S.R., PANITZ, V., SECKER, P.F., PFÄNDER, P., LOTH, S., SALEM, H., PRENTZELL, M.T., BERDEL, B., ISKAR, M., FAESSLER, E., REUTER, F., KIRST, I., KALTER, V., FOERSTER, K.I., JÄGER, E., GUEVARA, C.R., SOBEH, M., HIELSCHER, T., POSCHET, G., REINHARDT, A., HASSEL, J.C., ZAPATKA, M., HAHN, U., DEIMLING, A. VON, HOPF, C., SCHLICHTING, R., ESCHER, B.I., BURHENNE, J., HAEFELI, W.E., ISHAQUE, N., BÖHME, A., SCHÄUBLE, S., THEDIECK, K., TRUMP, S., SEIFFERT, M., OPITZ, C.A., 2020. IL4I1 Is a Metabolic Immune Checkpoint that Activates the AHR and Promotes Tumor Progression. *Cell* 182, 1252-1270.e34.
- SAFTIG, P., PUERTOLLANO, R., 2021. How Lysosomes Sense, Integrate, and Cope with Stress. *Trends Biochem. Sci.* 46, 97–112.
- SAKAGUCHI, K., HERRERA, J., SAITO, S., MIKI, T., BUSTIN, M., VASSILEV, A., ANDERSON, C., APPELLA, E., 1998. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Amp Dev.* 12, 2831–2841.
- SCAGLIOTTI, G.V., SELVAGGI, G., NOVELLO, S., HIRSCH, F.R., 2004. The Biology of Epidermal Growth Factor Receptor in Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 4227s–4232s.
- SCHITO, L., SEMENZA, G.L., 2016. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends Cancer* 2, 758–770.

- SEMENZA, G.L., 2012. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell* 148, 399–408.
- SHIGEMATSU, H., GAZDAR, A.F., 2006. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int. J. Cancer* 118, 257–262.
- SIEGEL, R., NAISHADHAM, D., JEMAL, A., 2013. Cancer statistics, 2013. *CA. Cancer J. Clin.* 63, 11–30.
- SIEGEL, R.L., MILLER, K.D., JEMAL, A., 2017. Cancer statistics, 2017. *CA. Cancer J. Clin.* 67, 7–30.
- SODA, M., CHOI, Y.L., ENOMOTO, M., TAKADA, S., YAMASHITA, Y., ISHIKAWA, S., FUJIWARA, S., WATANABE, H., KURASHINA, K., HATANAKA, H., BANDO, M., OHNO, S., ISHIKAWA, Y., ABURATANI, H., NIKI, T., SOHARA, Y., SUGIYAMA, Y., MANO, H., 2007. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448, 561–566.
- SONG, J., CLAGETT-DAME, M., PETERSON, R.E., HAHN, M.E., WESTLER, W.M., SICINSKI, R.R., DELUCA, H.F., 2002. A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 14694–14699.
- SOSHILOV, A.A., DENISON, M.S., 2014. Ligand Promiscuity of Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists and Antagonists Revealed by Site-Directed Mutagenesis. *Mol. Cell. Biol.* 34, 1707–1719.
- SOUCHERAY, M., CAPELLETTI, M., PULIDO, I., KUANG, Y., PAWELETZ, C.P., BECKER, J.H., KIKUCHI, E., XU, C., PATEL, T.B., AL-SHAHROUR, F., CARRETERO, J., WONG, K.-K., JÄNNE, P.A., SHAPIRO, G.I., SHIMAMURA, T., 2015. Intratumoral Heterogeneity in EGFR-Mutant NSCLC Results in Divergent Resistance Mechanisms in Response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibition. *Cancer Res.* 75, 4372–4383.
- SPORN, M.B., LIBY, K.T., 2012. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat. Rev. Cancer* 12, 564–571.
- STANFORD, E.A., WANG, Z., NOVIKOV, O., MULAS, F., LANDESMAN-BOLLAG, E., MONTI, S., SMITH, B.W., SELDIN, D.C., MURPHY, G.J., SHERR, D.H., 2016. The role of the aryl hydrocarbon receptor in the development of cells with the molecular and functional characteristics of cancer stem-like cells. *BMC Biol.* 14.
- SU, J.-M., LIN, P., CHANG, H., 2013. Prognostic value of nuclear translocation of aryl hydrocarbon receptor for non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 33, 3953–3961.
- SUBRAMANIAN, A., TAMAYO, P., MOOTHA, V.K., MUKHERJEE, S., EBERT, B.L., GILLETTE, M.A., PAULOVICH, A., POMEROY, S.L., GOLUB, T.R., LANDER, E.S., MESIROV, J.P., 2005. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 15545–15550.
- 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. Cancer J. Clin.* 71, 209–249.
- TAGUCHI, K., YAMAMOTO, M., 2017. The KEAP1–NRF2 System in Cancer. *Front. Oncol.* 7.
- TAKENAKA, M.C., GABRIELY, G., ROTHHAMMER, V., MASCANFRONI, I.D., WHEELER, M.A., CHAO, C.-C., GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C., KENISON, J., TJON, E.C., BARROSO, A., VANDEVENTER, T., DE LIMA, K.A., ROTHWEILER, S., MAYO, L., GHANNAM, S., ZANDEE, S., HEALY, L., SHERR, D., FAREZ, M.F., PRAT, A., ANTEL, J., REARDON, D.A., ZHANG, H., ROBSON, S.C., GETZ, G., WEINER, H.L., QUINTANA, F.J., 2019. Control of tumor-associated macrophages and T cells in glioblastoma via AHR and CD39. *Nat. Neurosci.* 22, 729–740.

- TAKEZAWA, K., PIRAZZOLI, V., ARCILA, M.E., NEBHAN, C.A., SONG, X., DE STANCHINA, E., OHASHI, K., JANJIGIAN, Y.Y., SPITZLER, P.J., MELNICK, M.A., RIELY, G.J., KRIS, M.G., MILLER, V.A., LADANYI, M., POLITI, K., PAO, W., 2012. HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation. *Cancer Discov.* 2, 922–933.
- THIERY, J.P., 2002. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442–454.
- THUN, M.J., HANNAN, L.M., ADAMS-CAMPBELL, L.L., BOFFETTA, P., BURING, J.E., FESKANICH, D., FLANDERS, W.D., SUN, H.J., KATANODA, K., KOLONEL, L.N., LEE, I.M., MARUGAME, T., PALMER, J.R., RIBOLI, E., SOBUE, T., AVILA-TANG, E., WILKENS, L.R., SAMET, J.M., 2008. Lung cancer occurrence in never-smokers: An analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies. *PLoS Med.* 5, 1357–1371.
- TIAINEN, M., YLIKORKALA, A., MÄKELÄ, T.P., 1999. Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G1 cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 9248–9251.
- TOMASETTI, C., MARCHIONNI, L., NOWAK, M.A., PARMIGIANI, G., VOGELSTEIN, B., 2015. Only three driver gene mutations are required for the development of lung and colorectal cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 118–123.
- TOMCZAK, K., CZERWIŃSKA, P., WIZNEROWICZ, M., 2015. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp. Oncol.* 19, A68–A77.
- TRAHEY, M., MCCORMICK, F., 1987. A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* 238, 542–545.
- TRAVIS, W.D., 2002. Pathology of lung cancer. *Clin. Chest Med.* 23, 65–81, viii.
- TRAVIS, W.D., BRAMBILLA, E., MÜLLER-HERMELINK, H., HARRIS, C., 2004. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. *IARC WHO Classification of Tumours Series, Volumen 7*
- TRIKHA, P., LEE, D.A., 2020. The role of AhR in transcriptional regulation of immune cell development and function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1873, 188335.
- VAIDYANATHAN, B., CHAUDHRY, A., YEWDELL, W.T., ANGELETTI, D., YEN, W.-F., WHEATLEY, A.K., BRADFIELD, C.A., MCDERMOTT, A.B., YEWDELL, J.W., RUDENSKY, A.Y., CHAUDHURI, J., 2017. The aryl hydrocarbon receptor controls cell-fate decisions in B cells. *J. Exp. Med.* 214, 197–208.
- VELDHOEN, M., HIROTA, K., WESTENDORF, A.M., BUER, J., DUMOUTIER, L., RENAULD, J.-C., STOCKINGER, B., 2008. The aryl hydrocarbon receptor links T H 17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453, 106–109.
- VOGEL, C.F.A., SCIULLO, E., LI, W., WONG, P., LAZENNEC, G., MATSUMURA, F., 2007. RelB, a New Partner of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Transcription. *Mol. Endocrinol.* 21, 2941–2955.
- WANG, J., LIU, Q., YUAN, S., XIE, W., LIU, Y., XIANG, Y., WU, N., WU, L., MA, X., CAI, T., ZHANG, Y., SUN, Z., LI, Y., 2017. Genetic predisposition to lung cancer: comprehensive literature integration, meta-analysis, and multiple evidence assessment of candidate-gene association studies. *Sci. Rep.* 7, 8371.
- WARE, K.E., MARSHALL, M.E., HEASLEY, L.R., MAREK, L., HINZ, T.K., HERCULE, P., HELFRICH, B.A., DOEBELE, R.C., HEASLEY, L.E., 2010. Rapidly acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in NSCLC cell lines through de-repression of FGFR2 and FGFR3 expression. *PLoS One* 5, e14117.

- WEINSTEIN, J.N., COLLISSON, E.A., MILLS, G.B., SHAW, K.R.M., OZENBERGER, B.A., ELLROTT, K., SHMULEVICH, I., SANDER, C., STUART, J.M., 2013. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat. Genet.* 45, 1113–1120.
- WELLS, A., 1999. EGF receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 637–643.
- WOODBURN, J.R., 1999. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 82, 241–250.
- XIE, G., PENG, Z., RAUFMAN, J.-P., 2012. Src-mediated aryl hydrocarbon and epidermal growth factor receptor cross talk stimulates colon cancer cell proliferation. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 302, G1006–G1015.
- YARDEN, Y., SLIWKOWSKI, M.X., 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127–137.
- YE, M., ZHANG, Y., GAO, H., XU, Y., JING, P., WU, J., ZHANG, X., XIONG, J., DONG, C., YAO, L., ZHANG, J., ZHANG, J., 2018. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Leads to Resistance to EGFR TKIs in Non-Small Cell Lung Cancer by Activating Src-mediated Bypass Signaling. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 24, 1227–1239.
- YIN, J., SHENG, B., QIU, Y., YANG, K., XIAO, W., YANG, H., 2016. Role of AhR in positive regulation of cell proliferation and survival. *Cell Prolif.* 49, 554–560.
- YUN, C.-H., BOGGON, T.J., LI, Y., WOO, M.S., GREULICH, H., MEYERSON, M., ECK, M.J., 2007. Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell* 11, 217–227.
- YUN, C.-H., MENGWASSER, K.E., TOMS, A.V., WOO, M.S., GREULICH, H., WONG, K.-K., MEYERSON, M., ECK, M.J., 2008. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2070–2075.
- ZEQIRAJ, E., FILIPPI, B.M., DEAK, M., ALESSI, D.R., VAN AALTEN, D.M.F., 2009. Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science* 326, 1707–1711.
- ZHANG, L., MA, J., TAKEUCHI, M., USUI, Y., HATTORI, T., OKUNUKI, Y., YAMAKAWA, N., KEZUKA, T., KURODA, M., GOTO, H., 2010. Suppression of experimental autoimmune uveoretinitis by inducing differentiation of regulatory T cells via activation of aryl hydrocarbon receptor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 2109–2117.
- ZHANG, X., HE, B., CHEN, E., LU, J., WANG, J., CAO, H., LI, L., 2021. The aryl hydrocarbon receptor ligand ITE inhibits cell proliferation and migration and enhances sensitivity to drug-resistance in hepatocellular carcinoma. *J. Cell. Physiol.* 236, 178–192.
- ZHANG, Z., LEE, J.C., LIN, L., OLIVAS, V., AU, V., LAFRAMBOISE, T., ABDEL-RAHMAN, M., WANG, X., LEVINE, A.D., RHO, J.K., CHOI, Y.J., CHOI, C.-M., KIM, S.-W., JANG, S.J., PARK, Y.S., KIM, W.S., LEE, D.H., LEE, J.-S., MILLER, V.A., ARCILA, M., LADANYI, M., MOONSAMY, P., SAWYERS, C., BOGGON, T.J., MA, P.C., COSTA, C., TARON, M., ROSELL, R., HALMOS, B., BIVONA, T.G., 2012. Activation of the AXL kinase causes resistance to EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Nat. Genet.* 44, 852–860.
- ZHAO, B., DEGROOT, D.E., HAYASHI, A., HE, G., DENISON, M.S., 2010. CH223191 Is a Ligand-Selective Antagonist of the Ah (Dioxin) Receptor. *Toxicol. Sci.* 117, 393–403.