

ÍNDICE

RESÚMENES

| | |
|----------------------------------|----------------|
| Resumen..... | x |
| Resum..... | xvi |
| Abstract..... | xxii |
| TABLA DE CONTENIDOS | xxviii |
| LISTA DE FIGURAS | xxxiv |
| LISTA DE TABLAS | xxxviii |
| ABREVIATURAS | xxxix |

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. Cáncer | 3 |
| 1.1. Biología molecular del cáncer: <i>statu quo</i> , debate y rasgos comunes..... | 3 |
| 1.1.1. <i>Hallmarks</i> o rasgos distintivos del cáncer..... | 4 |
| 1.1.2. Características promotoras del cáncer..... | 7 |
| 1.1.3. Teoría de la mutación somática, evolución clonal, y otras teorías no convencionales | 8 |
| 2. Cáncer de pulmón..... | 11 |
| 2.1. Estadísticas poblacionales del cáncer de pulmón | 12 |
| 2.2. Cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico..... | 14 |
| 2.3. Cáncer de pulmón no microcítico | 14 |
| 2.3.1. Estadificación del CPNM..... | 15 |
| 2.3.2. Diferenciación de un carcinoma | 16 |
| 2.3.3. Adenocarcinoma de pulmón..... | 16 |
| 2.3.3.1. <i>Clasificación clínico-morfológica del adenocarcinoma de pulmón...</i> | <i>17</i> |
| 2.3.3.2. <i>Genómica del adenocarcinoma de pulmón.....</i> | <i>18</i> |
| 2.3.4. Carcinoma de pulmón de células escamosas | 19 |
| 2.3.4.1. <i>Genómica del carcinoma de pulmón de células escamosas.....</i> | <i>20</i> |
| 2.3.5. Tratamiento y terapias personalizadas del CPNM..... | 21 |
| 2.3.6. Factores de origen y factores de riesgo en CPNM | 23 |
| 3. Células madre tumorales | 24 |
| 3.1. Breve historia de la teoría de las CSC..... | 25 |
| 3.2. CSC: la teoría | 26 |

| | | |
|------------------------------------|--|-----------|
| 3.2.1. | Aproximaciones recientes a la evolución del cáncer | 27 |
| 3.2.2. | Teoría de las CSC..... | 28 |
| 3.2.3. | Origen de las CSC | 28 |
| 3.3. | CSC: características, rasgos oncogénicos diferenciales y abordajes terapéuticos | 29 |
| 3.4. | CSC en cáncer de pulmón | 32 |
| 3.4.1. | Características moleculares de las CSC en cáncer de pulmón | 33 |
| 3.4.1.1. | <i>Proteínas de superficie</i> | 33 |
| 3.4.1.2. | <i>Rutas de señalización alteradas en CSC de pulmón</i> | 35 |
| 3.5. | Metodologías para el estudio de CSC | 37 |
| 4. | Transición epitelio-mesénquima (EMT) en CPNM..... | 39 |
| 4.1. | EMT en condiciones fisiológicas normales..... | 39 |
| 4.2. | EMT en cáncer..... | 40 |
| 4.3. | Activación y regulación de la EMT..... | 41 |
| 4.3.1. | Programa morfológico de la EMT | 42 |
| 4.3.2. | Programa transcripcional de la EMT | 43 |
| 4.3.2.1. | <i>El factor de transcripción AP-1 y la EMT</i> | 44 |
| 4.3.3. | Otras redes reguladoras de la EMT | 47 |
| 4.3.4. | Regulación de la traducción de la EMT | 48 |
| 4.3.4.1. | <i>El factor de la traducción eIF5A2 y la EMT</i> | 48 |
| 4.4. | EMT y su relación con metástasis, CSC, pluripotencia y quimiorresistencia | 52 |
| 5. | Modelos experimentales para el estudio del cáncer de pulmón..... | 53 |
| 5.1. | Modelos experimentales <i>in vitro</i> de CPNM..... | 54 |
| 5.1.1. | Inicios de los cultivos <i>in vitro</i> y características generales de estos modelos en cáncer | 54 |
| 5.1.2. | Modelos de cultivo celular bidimensional (2D) en cáncer | 55 |
| 5.1.3. | Modelos de cultivo celular tridimensional (3D) en cáncer | 56 |
| 5.2. | Modelos experimentales <i>in vivo</i> de CPNM | 60 |
| 5.2.1. | Xenotrasplantes derivados de tumores de paciente (PDX) | 60 |
| 5.2.2. | Alotrasplantes singénicos en modelo de ratón | 61 |
| 5.2.3. | Modelos de ratón modificados por ingeniería genética (GEMM) | 62 |
| 5.2.4. | Modelos de ratón inducibles por carcinógenos..... | 62 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | | 65 |

| | |
|--|-----------|
| MATERIAL Y MÉTODOS | 71 |
| 1. Cultivo celular..... | 73 |
| 1.1. Líneas celulares establecidas | 73 |
| 1.1.1. Cultivo en adherencia de líneas celulares establecidas | 74 |
| 1.1.2. Mantenimiento y pases de cultivo de líneas en adherencia..... | 75 |
| 1.1.3. Cultivo de tumoresferas de líneas celulares establecidas | 75 |
| 1.1.4. Disgregación de tumoresferas de líneas celulares establecidas..... | 76 |
| 1.2. Cultivos primarios a partir de tejido tumoral de CPNM | 76 |
| 1.2.1. Criterio de selección de muestras y recepción | 76 |
| 1.2.2. Generación de cultivo primario a partir de tumores de CPNM..... | 79 |
| 1.2.3. Establecimiento del cultivo primario de tumoresferas..... | 79 |
| 1.2.4. Cultivo en adherencia de muestras derivadas de pacientes..... | 80 |
| 2. Anticuerpos | 80 |
| 2.1. Anticuerpos para Western Blot..... | 80 |
| 2.2. Anticuerpos para citometría de flujo | 81 |
| 2.3. Anticuerpos para inmunocitoquímica de fluorescencia | 81 |
| 2.4. Anticuerpos para inmunohistoquímica de tejido normal pulmonar y CPNM | 82 |
| 3. Tratamientos y ensayos celulares | 82 |
| 3.1. Experimentos de lipofección para expresión transitoria o silenciamiento | |
| génico de proteínas | 82 |
| 3.1.1. Expresión transitoria de proteínas con plásmidos | 82 |
| 3.1.2. Silenciamiento génico mediado por ARN de interferencia de eIF5A2. | 82 |
| 3.2. Tratamiento con TGF- β 1 | 83 |
| 4. Técnicas de análisis celular..... | 83 |
| 4.1. Citometría de flujo | 83 |
| 4.2. Separación de subpoblaciones de líneas tumorales..... | 84 |
| 4.3. Microscopía óptica | 84 |
| 4.4. Contaje de tumoresferas | 85 |
| 4.5. Microscopia de fluorescencia | 85 |
| 4.5.1. Fijación de cultivos crecidos en adherencia | 85 |
| 4.5.2. Fijación de tumoresferas..... | 85 |
| 4.5.3. Inmunofluorescencia | 86 |
| 5. Técnicas de análisis molecular..... | 87 |
| 5.1. Western blot..... | 87 |
| 5.1.1. Lisis de células para extracción proteica | 87 |
| 5.1.2. Separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida y | |
| transferencia a membrana..... | 87 |

| | | |
|--------|---|----|
| 5.1.3. | Tinciones de comprobación de transferencia | 88 |
| 5.1.4. | Bloqueo de la membrana | 88 |
| 6. | Modelos experimentales in vivo de CPNM | 89 |
| 6.1. | Animales | 89 |
| 6.2. | Inyección Subcutánea de células de CPNM en ratón | 90 |
| 6.3. | Generación de xenoinjertos derivados de paciente con CPNM | 90 |
| 6.3.1. | Selección de pacientes y recogida de muestras..... | 90 |
| 6.3.2. | Implantación en ratón y pases de PDX | 93 |
| 7. | Técnicas de análisis histológico | 94 |
| 7.1. | Fijación | 94 |
| 7.2. | Inclusión en parafina | 94 |
| 7.3. | Seccionamiento del tejido | 94 |
| 7.4. | Micromatrices de tejido (<i>Tissue microarrays</i> , TMA)..... | 95 |
| 7.5. | Técnicas de tinción y marcaje histológico..... | 95 |
| 7.5.1. | Hematoxilina-Eosina | 95 |
| 7.5.2. | Inmunohistoquímica de tumores de CPNM, tejido pulmonar normal y PDX | 95 |
| 8. | Estadística general y otros análisis | 97 |
| 8.1. | Análisis mutacional | 97 |
| 8.2. | Análisis semicuantitativo de imágenes de inmunohistoquímica..... | 98 |
| 8.3. | Análisis y tratamiento de imágenes digitales | 98 |
| 8.4. | Análisis estadísticos de los experimentos con tumoresferas y células crecidas en adherencia..... | 98 |

RESULTADOS **101**

| | |
|---|-----|
| CAPÍTULO 1 | 103 |
| Cultivos celulares en 3D para el estudio de células madre tumorales (CSC) | 103 |
| 1.1. Tumoresferas derivadas de tumores primarios de CPNM | 104 |
| 1.1.1. Características clínicas | 104 |
| 1.1.2. Generación de tumoresferas a partir de biopsias de tumores primarios de CPNM | 104 |
| 1.1.2.1. <i>Método alternativo para la obtención de tumoresferas a partir muestras de tumor primario de CPNM.....</i> | 108 |
| 1.1.3. Establecimiento de cultivo primario en adherencia de muestras de pacientes de CPNM | 109 |
| 1.1.4. Las CSC tienen la capacidad de generar tumores en un modelo in vivo de xenotrasplante en ratón inmunodeprimido..... | 111 |

| | | |
|--|--|-----|
| 1.1.5. | Expresión de marcadores de CSC en tumoresferas derivadas de tumor primario | 112 |
| 1.1.5.1. | <i>Análisis de la expresión de marcadores de superficie mediante citometría de flujo</i> | 113 |
| 1.1.5.2. | <i>Análisis de la expresión de marcadores de superficie de CSC en tumoresferas mediante microscopía de fluorescencia</i> | 115 |
| 1.2. | Caracterización de tumoresferas derivadas de líneas celulares de CPNM | 117 |
| 1.2.1. | Generación de tumoresferas a partir de líneas establecidas de CPNM | 117 |
| 1.2.2. | Expresión de marcadores de CSC en tumoresferas derivadas de líneas celulares de CPNM | 119 |
| 1.2.2.1. | <i>Separación de subpoblaciones CD326/CD166 en la línea de CPNM H1650</i> | 122 |
| 1.2.2.2. | <i>Formación de tumoresferas en presencia de la citoquina TGF-β1</i> | 125 |
| 1.3. | Análisis de la expresión génica de marcadores de CSC mediante PCR a tiempo real (RTqPCR) | 132 |
| 1.3.1. | Análisis de supervivencia <i>in silico</i> de los genes sobreexpresados en tumoresferas | 134 |
| 1.3.2. | Firma génica como factor pronóstico de CPNM | 135 |
| CAPÍTULO 2 | | 138 |
| La transición epitelio-mesénquima (EMT) mediada por TGF- β : regulación y función de JunB y eIF5A2 | | 138 |
| 2.1. | JunB como mediador de la EMT inducida por TGF- β | 139 |
| 2.2. | El factor de traducción eIF5A en la EMT inducida por TGF- β 1 | 148 |
| 2.2.1. | TGF- β 1 induce la expresión de eIF5A en células de CPNM | 151 |
| 2.2.2. | La sobreexpresión transitoria de eIF5A2 induce la expresión de proteínas de citoesqueleto, invasión local y EMT | 154 |
| CAPÍTULO 3 | | 159 |
| Desarrollo de modelos <i>in vivo</i> de xenotrasplante en ratón derivado de tumores de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico | | 159 |
| 3.1. | Esquema del modelo experimental PDX de CPNM | 160 |
| 3.2. | Generación de una colección de xenotrasplantes derivados de pacientes con CPNM | 162 |
| 3.2.1. | Análisis de la supervivencia de los pacientes en función de las variables clínico-patológicas | 164 |
| 3.2.2. | Análisis del éxito de implantación de PDX y correlación con variables clínico-patológicas | 166 |
| 3.2.3. | Secuenciación de los PDX mediante panel OncoPrint® Focus Assay y análisis de mutaciones de interés | 170 |

| | | |
|--|---|------------|
| 3.2.4. | Curvas de crecimiento de los tumores implantados en ratón | 171 |
| 3.3. | Análisis inmunohistoquímico de la colección de PDX basada en micromatrices de tejido (TMA)..... | 176 |
| 3.3.1. | LF01: Adenocarcinoma acinar | 178 |
| 3.3.2. | LF05: Adenocarcinoma sólido | 183 |
| 3.3.3. | LF09: Adenocarcinoma mucinoso lepidico | 187 |
| 3.3.4. | LF15: Adenocarcinoma sólido | 190 |
| 3.3.5. | LF19: Adenocarcinoma acinar | 193 |
| 3.3.6. | LF20: Adenocarcinoma acinar | 196 |
| 3.3.7. | LF21: Carcinoma escamoso | 199 |
| 3.3.8. | LF29: Adenocarcinoma sólido escasamente diferenciado | 203 |
| 3.4. | Análisis comparativo semicuantitativo de imágenes de inmunohistoquímica y correlación clínica..... | 206 |
| 3.4.1. | Comparación de CK7/CK20/TTF1 entre diferentes subtipos de la colección de PDX | 206 |
| 3.4.2. | Análisis semicuantitativo de imágenes de inmunohistoquímica de los PDX | 209 |
| 3.4.2.1. | Comparación del análisis semicuantitativo de la inmunohistoquímica con las variables clínicas de los pacientes | 211 |
| 3.4.2.2. | Comparación de la expresión de Vimentina, Ezrina y Ki67 por subtipos de ADC de pulmón..... | 212 |
| 3.4.2.3. | Ki67 como marcador de proliferación. Correlación con mutación KRAS, supervivencia e implantación en ADC sólidos | 216 |
| DISCUSIÓN..... | | 221 |
| Discusión del Capítulo 1:..... | | 222 |
| Marcadores de CSC de CPNM y su potencia para caracterizar esta subpoblación celular. Metodologías rutinarias | | 223 |
| Influencia de la citoquina TGF- β 1 en el crecimiento de tumoresferas. La relación CSC-EMT | | 226 |
| Una firma génica de CSC en CPNM con valor pronóstico | | 228 |
| Discusión del Capítulo 2:..... | | 231 |
| JunB en la señalización por TGF β y EMT en cáncer | | 231 |
| eIF5A2 en la señalización por TGF β y EMT en cáncer | | 233 |
| Discusión del Capítulo 3:..... | | 235 |
| CONCLUSIONES | | 241 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | | 245 |

LISTA DE FIGURAS

Introducción

| | |
|---|----|
| Figura 1. Rasgos distintivos o hallmarks del cáncer propuestos y ampliados por Hanahan y Weinberg | 4 |
| Figura 2. Esquema del paradigma alternativo propuesto por Brücher y Jamall en <i>Epistemology of the origin of cancer: a new paradigm</i> | 10 |
| Figura 3. Estadísticas mundiales y nacionales (España) del cáncer de pulmón frente a todos los tumores en general..... | 13 |
| Figura 4. Principales mutaciones oncogénicas presentes en adenocarcinoma de pulmón (ADC)..... | 18 |
| Figura 5. Principales mutaciones oncogénicas presentes en carcinoma de células escamosas de pulmón (CCEP)..... | 20 |
| Figura 6. Conceptos vigentes en el campo de las CSC | 32 |
| Figura 7. Principales eventos de los programas morfológico y transcripcional de la EMT..... | 44 |
| Figura 8. Estructura terciaria de eIF5A y su papel en la elongación de la traducción.. | 50 |
| Figura 9. Modelos de cultivos celulares en 3D esféricos en cáncer | 57 |

Hipótesis y objetivos

| | |
|--|----|
| Figura 10. Resumen gráfico del proyecto de tesis | 69 |
|--|----|

Resultados

Capítulo 1: Cultivos celulares en 3D para el estudio de células madre tumorales (CSC)

| | |
|---|------------|
| Figura 11. Diagrama de flujo de trabajo del procesado de muestras de tumor primario | 105 |
| Figura 12. Tumoresferas derivadas de muestras de pacientes de CPNM..... | 108 |
| Figura 13. Tumoresferas derivadas de muestras de pacientes de CPNM tras procesado de muestra optimizado | 109 |
| Figura 14. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases de muestras de tumor primario sembradas en condiciones de adherencia, tras procesado de muestra optimizado | 110 |
| Figura 15. Capacidad iniciadora de tumores de las células FIS302, FIS303, FIS315, FIS317 y FIS320..... | 112 |
| Figura 16. Porcentaje de células positivas para marcadores de superficie celular de CSC en muestras derivadas de pacientes de CPNM, crecidas en condiciones de adherencia (ADH, barras negras) y en suspensión (ESF, barras grises) | 114 |

| | |
|---|-----|
| Figura 17. Expresión y localización de marcadores de CSC en células derivadas de tumores de pacientes con CPNM crecidas en condiciones de adherencia (ADH) y en suspensión (ESF) | 116 |
| Figura 18. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases de cultivo en suspensión de diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico | 118 |
| Figura 19. Porcentaje de células positivas para marcadores de superficie celular de CSC en líneas establecidas de CPNM, crecidas en condiciones de adherencia (ADH, barras negras) y en suspensión (ESF, barras grises) | 121 |
| Figura 20. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases de subpoblaciones de la línea de cáncer de pulmón no microcítico H1650 (NCI-H1650 en el ATCC), sembrada en condiciones de baja adherencia | 123 |
| Figura 21. Tumoresferas formadas a los diez días de sembrar en cultivo 3D las tres subpoblaciones separadas de H1650 | 124 |
| Figura 22. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases de tumoresferas formadas a los 7, 11 y 14 días de ser sembradas en condiciones de baja adherencia, en presencia o ausencia (control) de la citoquina TGF- β 1 | 127 |
| Figura 23. Morfología de tumoresferas y agregados tumorales formados a los 14 días de ser sembradas en condiciones de baja adherencia..... | 128 |
| Figura 24. Tumoresferas formadas a los quince días de sembrar en condiciones de baja adherencia la línea H441 | 130 |
| Figura 25. A549 sembradas en condiciones de baja adherencia. Condiciones control y tratadas con TGF- β 1..... | 131 |
| Figura 26. Expresión relativa (niveles de transcripción) de genes asociados a CSC (log 2 del ratio entre la expresión en tumoresferas, SPH, frente a cultivos adherentes, ADH) | 133 |
| Figura 27. Diagramas de Kaplan-Meier para supervivencia global (OS, <i>overall survival</i>) resultado del análisis <i>in silico</i> | 135 |
| Figura 28. Poder pronóstico de los 17 genes sobreexpresados en tumoresferas de pulmón..... | 136 |
| Figura 29. Valor pronóstico de la firma CSC (<i>CSC score</i> , <i>CSC signature</i>). Diagramas de Kaplan-Meier en base a la firma CSC que representan la supervivencia global (OS) en toda la cohorte del TCGA (A), en la subcohorte de adenocarcinomas (B); y en la cohorte de validación (C)..... | 137 |

Capítulo 2: La transición epitelio-mesénquima (EMT) mediada por TGF- β : regulación y función de JunB y eIF5A2

| | |
|---|-----|
| Figura 30. Análisis de enriquecimiento de rutas de señalización tras ChIP-seq y transcriptómica | 141 |
| Figura 31. TGF- β 1 induce la expresión de JunB y de marcadores asociados a cambios en citoesqueleto en la línea de CPNM A549..... | 144 |
| Figura 32. Expresión de marcadores asociados a cambios en citoesqueleto, EMT, señalización extracelular y regulación de ciclo celular en la línea de CPNM A549 cuando se induce la EMT con TGF- β 1 durante tiempos prolongados | 147 |

| | |
|--|------------|
| Figura 33. eIF5A, proteínas con motivos poliprolina y citoesqueleto | 150 |
| Figura 34. Localización genómica del factor de la traducción eIF5A2 | 151 |
| Figura 35. Expresión de marcadores asociados a cambios en citoesqueleto, EMT e invasión local en la línea de CPNM A549 cuando se silencia génicamente el factor eIF5A2, induciendo la EMT con TGF- β 1 | 153 |
| Figura 36. La sobreexpresión de eIF5A2 induce la expresión de proteínas relacionadas con la formación de citoesqueleto, invasión local y EMT en la línea de CPNM A549 | 155 |
| Figura 37. Expresión de marcadores asociados a cambios en citoesqueleto, invasión local y EMT en la línea de CPNM H1395 cuando se sobreexpresa el factor eIF5A2 | 156 |
| Figura 38. Expresión de marcadores asociados a cambios en citoesqueleto, invasión local y EMT en la línea de CPNM PC9 cuando se sobreexpresa el factor eIF5A2 | 157 |
| Figura 39. Expresión de marcadores asociados a cambios en citoesqueleto, invasión local y EMT en la línea de CPNM H441 cuando se sobreexpresa el factor eIF5A2 .. | 158 |

Capítulo 3: Desarrollo de modelos *in vivo* de xenotrasplante en ratón derivado de tumores de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico

| | |
|--|------------|
| Figura 40. Diagrama de flujo de trabajo de la generación del modelo <i>in vivo</i> PDX.... | 161 |
| Figura 41. Características clínico-patológicas de los pacientes | 163 |
| Figura 42. Curvas de supervivencia acorde a las variables clínico-patológicas de los pacientes | 165 |
| Figura 43. Curvas de incidencia acumulada del éxito en la implantación de los xenotrasplantes acorde a las variables clínico-patológicas de los pacientes..... | 169 |
| Figura 44. Curvas de crecimiento de los PDX en ratón..... | 174 |
| Figura 45. MLT de los distintos conjuntos de pases y muestras | 175 |
| Figura 46. TMA de la muestra LF01 con tinción de H&E e inmunohistoquímica de CK7, CK20 y TTF1 | 180 |
| Figura 47. TMA de la muestra LF01 con inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67 | 182 |
| Figura 48. TMA de la muestra LF05 con tinción de H&E e inmunohistoquímica de CK7, CK20 y TTF1 | 184 |
| Figura 49. TMA de la muestra LF05 con inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67 | 186 |
| Figura 50. TMA de la muestra LF09 con tinción de H&E e inmunohistoquímica de CK7, CK20 y TTF1 | 188 |
| Figura 51. TMA de la muestra LF09 con inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67 | 189 |
| Figura 52. TMA de la muestra LF15 con tinción de H&E e inmunohistoquímica de CK7, CK20 y TTF1 | 191 |
| Figura 53. TMA de la muestra LF15 con inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67 | 192 |

| | |
|---|------------|
| Figura 54. TMA de la muestra LF19 con tinción de H&E e inmunohistoquímica de CK7, CK20 y TTF1 | 194 |
| Figura 55. TMA de la muestra LF19 con inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67 | 196 |
| Figura 56. TMA de la muestra LF20 con tinción de H&E e inmunohistoquímica de CK7, CK20 y TTF1 | 197 |
| Figura 57. TMA de la muestra LF20 con inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67 | 199 |
| Figura 58. TMA de la muestra LF21 con tinción de H&E e inmunohistoquímica de CK7, CK20 y TTF1 | 200 |
| Figura 59. TMA de la muestra LF21 con inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67 | 202 |
| Figura 60. TMA de la muestra LF29 con tinción de H&E e inmunohistoquímica de CK7, CK20 y TTF1 | 204 |
| Figura 61. TMA de la muestra LF29 con inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67. | 205 |
| Figura 62. Inmunohistoquímica descriptiva de tejido pulmonar (normal), tumor primario (TP) y PDX (X0, X1, X2) de tres muestras representativas de tres subtipos de CPNM en nuestra colección..... | 208 |
| Figura 63. Expresión de Vimentina, Ezrina y Ki67 en los tumores PDX | 210 |
| Figura 64. Comparación de la expresión de Vimentina, Ezrina y Ki67 en muestras con mutación KRAS-G12C frente a las no mutadas | 211 |
| Figura 65. ADC acinares: inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67 | 213 |
| Figura 66. ADC sólidos: inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67 | 215 |
| Figura 67. Incremento de Ki67 a través de los países y evaluación de la supervivencia asociada a Ki67, Vimentina y Ezrina..... | 217 |

LISTA DE TABLAS

Introducción

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Principales marcadores de superficie de CSC identificados en cáncer de pulmón..... | 34 |
| Tabla 2. Comparación de métodos de cultivo celular en 2D y 3D. | 59 |

Material y métodos

| | |
|--|----|
| Tabla 3. Listado de las líneas celulares establecidas utilizadas en los diferentes experimentos realizados para esta tesis doctoral..... | 74 |
| Tabla 4. Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio de CSC..... | 77 |
| Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en Western Blot | 80 |
| Tabla 6. Anticuerpos empleados en citometría de flujo..... | 81 |
| Tabla 7. Anticuerpos empleados en inmunocitoquímica de fluorescencia..... | 81 |
| Tabla 8. Anticuerpos empleados en inmunohistoquímica | 82 |
| Tabla 9. Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio de modelo in vivo de PDX..... | 91 |

Resultados

Capítulo 2: La transición epitelio-mesénquima (EMT) mediada por TGF- β : regulación y función de JunB y eIF5A2

| | |
|--|-----|
| Tabla 10. Genes diana candidatos del factor de transcripción JunB involucrados en la EMT y señalización por TGF β . Cambios de expresión de ARNm al silenciar JUNB . | 142 |
|--|-----|

Capítulo 3: Desarrollo de modelos *in vivo* de xenotrasplante en ratón derivado de tumores de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico

| | |
|---|-----|
| Tabla 11. Éxito en la implantación y desarrollo de PDX acorde a distintas variables clínico-patológicas de los pacientes..... | 167 |
| Tabla 12. Resultados del panel de secuenciación OncoPrint® Focus Assay sobre los tumores que generaron PDX | 171 |