



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Biotecnología

**Aproximaciones moleculares para la
identificación de nuevos biomarcadores y
dianas terapéuticas del cáncer de pulmón
no microcítico: células madre tumorales,
transición epitelial-mesenquimal y modelos
de xenoinjertos derivados de pacientes**

José Miguel Pardo Sánchez

Tesis Doctoral

Junio, 2021

Directora de Tesis:

Dra. Rosa Farràs Rivera

Tutor UPV:

Dr. José Ramón Murguía Ibáñez

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Laboratorio de Señalización Oncogénica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia, España). José Miguel Pardo Sánchez ha sido beneficiario de una ayuda predoctoral para Formación del Profesorado Universitario (FPU13/02755), del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Agradecimientos

El camino que me ha traído hasta aquí se ha alargado más de lo que esperaba. Ha sido un trayecto lleno de reveses, altibajos, incertidumbres y tiempos de espera, pero, por suerte, ha llegado a su fin. También por suerte, he contado con la ayuda de muchas personas maravillosas y grandes profesionales que han resultado imprescindibles en esta tarea.

La primera de todas, por supuesto, Rosa, que ha tenido mucha paciencia y que, además de toda la ciencia que me ha enseñado, me ha transmitido valores que van mucho más allá. El primero de ellos, el de apreciar la ciencia de calidad, la ciencia meditada y reflexionada por encima de esa *fast science* que hoy impera. Además de este espíritu crítico, también me ha inculcado algo que me ha demostrado ser mucho más importante y que me acompañará siempre: ayudar a construir un ambiente laboral en el que estar a gusto cada día. Investigar es tan estresante que damos por hecho que, para que funcione, tiene que contaminar todo lo que toca. Y no es así, gracias a Rosa y a todas mis compañeras tengo muy claro que, si tengo que trabajar de esto, quiero estar bien con las personas que lo hago. Las relaciones humanas por encima.

La segunda persona en esta jerarquía es Carol. Aunque no haya sido mi directora, muchas veces ha oficiado como tal en la sombra, y sus aportaciones han sido muy importantes en este trabajo. También ha tenido mucha paciencia conmigo y siempre ha estado ahí, infatigable, para dar ánimos o hacer un experimento de más si el tiempo lo permitía. El laboratorio posee mucha suerte de tener a la mejor técnico del universo.

Después de Carol y Rosa, la jerarquía se pierde un poco. Por su papel en este trabajo y también en mi bienestar, ahora le toca a Arantxa y Juan Diego. Desde que Arantxa llegó al lab todos ganamos mucho en felicidad con su carisma e implicación. Me alegra mucho que se convirtiese en amiga y que haya podido acabar haciendo la tesis con Rosa. Además de luchadora, nos contagió a todos de su optimismo y siempre nos hace ver el vaso de precipitados medio lleno. Por otro lado, cuando volví con la beca, tuve la suerte de coincidir con Juan Diego, quien se ha esforzado mucho con el proyecto de CSC. Su aportación ha sido esencial y fue un verdadero placer trabajar con él y tenerlo como compañero friki.

Por el lab de Señalización Oncogénica han pasado también personas excepcionales que me han enseñado mucho y me han ayudado a disfrutar de lo cotidiano. Me gustaría acordarme de ellos: Bea, Ali y Ana. También a los “peques” Esther, Alberto, Raúl y María.

El CIPF puede dar gracias de tener a grandes investigadoras. Yo tengo la suerte de que algunas de ellas sean mis amigas: María José, Fátima, Candela, Andrea y Espe. Ni con todas las bases de datos disponibles habría elegido un grupo mejor con el que compartir una tesis. Como Arantxa, también están un poco locas, porque de lo contrario no se habrían cruzado toda Europa para visitarme dos días. Siempre me acordaré de aquel y todos nuestros viajes. No me quiero olvidar de Jesús ni de los consortes. Con todas ellas y ellos hemos compartido demasiada empatía, demasiados síndromes del impostor y demasiados experimentos a deshoras. Con algunas también muchos minutos de audios de whatsapp. Este grupo no lo despega ni la tripsina. Os quiero.

También gracias a los compañeros del I-23, nuestro lab “hermano”, y con quienes he disfrutado de su sabiduría en muchas de sus charraetas de comidas y cenas: Aran, Luke, Amparo y Carlos. También gracias al personal del CIPF, siempre dispuesto a ayudarte. Especialmente a Alicia y Domingo de Citómica.

Gracias a nuestros colaboradores del Hospital General y del Hospital La Fe, con quien hemos podido sacar adelante ya dos publicaciones relacionadas con este trabajo. Parte de esta tesis se la debo a ellos también. Y al lab de patología molecular y al Dr. Jerónimo Forteza, recientemente fallecido, que me ilustró con sus conocimientos de inmunohistoquímica. También quiero agradecer a Borja y Alejandro, colaboradores del IBMCP, con quienes empezó eIF5A. Y, personalmente, quiero acordarme de Lynne, Ibo, Regina, Joserra y demás profesores de la UPV que me ayudaron a dar la docencia y de los que aprendí y disfruté mucho dando prácticas a aquellos magníficos alumnos.

Muchísimas gracias a la gente de Holanda, con quienes viví tres meses inolvidables en el Clevers lab. Tanto a Angelos por su confianza, como a los PhD que me hicieron parte de su grupo, sobre todo Jens, Caye y Joep. También a toda la peña española de Utrecht. Allí y también en otros sitios lejanos donde he podido ir a congresos me he encontrado a científicos espectaculares y personas espléndidas.

Mis amigos Biotec, especialmente los hackers (Paco, Guillem, Alfred, Elías, Nelson, Dani) también han participado de este camino. Algunos ya son flamantes doctores, otros están en proceso. Lo importante es saber que casi 15 años después todos están bien y felices.

Más allá de todas las personas que la ciencia me ha dado este tiempo, sería justo no acordarme de los que estuvieron, están y estarán. De mi familia y amigos. Respecto a mis amigos, hay muchos y no quiero dejarme a nadie. A los

de siempre de Villena. Aunque algunos de nuestros caminos cada vez divergen más, lo más bonito es saber que seguís creciendo y cumpliendo metas. A otros amigos y gente cercana de Valencia y Villena, especialmente a mis compañeros de comparsa y a Polimnia, y a otros que me han influido y estimulado tanto con su cultura, poesía, deporte, cine y teatro. Son bastiones que en los años de tesis me han ayudado a evadirme y a buscar la felicidad en otras realidades.

Tuve mucha suerte de convivir con dos personas maravillosas en los 4 años de beca: Miro y Diego. Quizá no lo crean, pero su madurez y visión rompedora de todo me ha marcado profundamente. Fueron compañeros y ahora son amigos; y yo feliz de ver que se hace justicia y van consiguiendo lo que perseguían. A mi otra compañera y conviviente, María, que más allá de todo me ha ayudado enormemente en este último año y medio tan duro, pandemia mediante. Escribir esto sé que no es muestra de gratitud suficiente para lo que ha hecho.

Último, pero no menos importante, mi familia. Me gustaría decir que las relaciones con mis padres siempre han sido perfectas, pero faltaría a la verdad. Ello no me priva de quererlos ni de apreciar todos sus esfuerzos. En primer lugar, me gustaría agradecer a mi madre por su confianza en mis posibilidades. Quizá me he dado cuenta tarde, pero ha sido mi mayor inspiración en la vida. Porque, con el tiempo, he visto cómo muchos valores que he visto en ella se han asentado en mí. Huir de lo superficial, saber resistir en los momentos más duros y con todo en contra, ser idealista y, sobre todo, atreverse a pensar de forma diferente. Yo lo he tenido fácil, he tenido la suerte de ver más mundo y de trabajar en un ámbito de personas inquietas y de debate y crecimiento permanente. Aunque ha sufrido mucho, espero esté orgullosa de verme culminar la tesis y de ver que, con resiliencia, el tiempo le ha dado la razón en muchos aspectos.

A mi hermano. La persona a la que más unida me siento por haber compartido vínculo, padecimientos, experiencias y, también, formas de ver el mundo. Nada me enorgullece más que ver que se ha atrevido a labrar su propio camino y que este sea el que él desea, no el más fácil. Nada me haría más feliz que verle triunfar con su esfuerzo y su inteligencia. Se lo merece. Él sabe que siempre me tendrá para apoyarle. Idealismo por encima de comodidades. Había que soñar, no ser hombres grises. Talento por encima de mediocridad. Pero talento de verdad, no ese de anuncio de escuelas de *business*. Esta tesis es en parte un acto de rebeldía. Va por él también.

A mi padre, que el año pasado nos dio un buen susto. Hemos tenido muchos altibajos, pero reconozco que aquel sobresalto me hizo valorar mucho que

todavía siguieses con nosotros. Quizá hay veces que no hemos coincidido, pero también tengo muchos valores de él. Saber disfrutar de todo cuando llega, fomentar la unión del grupo por encima de individualidades, y la importancia del sentido de pertenencia familiar y en otros ámbitos. Espero que sepa valorar esta tesis como lo que es, la culminación de un esfuerzo y trabajo intensos. Un logro complejo. También a Concha, a la que siempre agradeceré su entrega y por haber devuelto la felicidad a mi padre. También a Pablo y Andrés, que han sido parte de ello. Son muchos años ya y es muy bonito ver cómo abris vuestros caminos.

A mis yayos (no hay día que no los tenga presentes) y mi abuela, que se nos fue hace dos años. Tenía 96 y sabía decir y explicar orgullosamente lo que su nieto había estudiado mejor que nadie. Me gustaría que todos estuviesen para haber visto esto. Pero no es así. Por suerte, sí está una maravillosa familia detrás por la que siempre me he sentido muy respaldado y querido. A mi tía Ana, que sé que es muy sufridora, y se merece este reconocimiento. También a todos mis tíos, y a todas mis primas y primos. Son maravillosos y no lo digo por cumplir. En estos años hemos crecido mucho y me alegro de que sigamos unidos y compartiéndolo. Perdonadme que no os cite uno a uno.

No sería honesto, para quien me conozca, no dar las gracias a mis dos gatos, Néstor y Tintín. Ellos dos han sido los dos seres con quien más tiempo he compartido en mis años de tesis. También son familia. Gracias también a otros gatos y animales que me han dado felicidad pura en estos años. También a Asun, la persona más solidaria que he conocido y que más me ha transmitido ese valor. Saben más que nadie de esto.

Por último, agradecer también a Marcos, el abogado de la Casa del Alumno de la UPV que, gratuitamente y muy por encima de su responsabilidad, me ayudó a ganarle la batalla administrativa al Ministerio para obtener mi beca. Hace mucho de eso ya, pero, sin aquellos recursos de reposición, no estaría hoy aquí. También gracias a mi amigo Enrique, que me ha echado un buen cable con el diseño de portada. No es algo menor, sin su ayuda la tesis no luciría tan bien. Gracias por tu conocimiento.

Hay muchas otras personas que me han acompañado en el camino y que, por su cariño y ayuda, las tengo en mi corazón para siempre. Amigos de toda clase y gente de lo más valiosa. Que no se molesten si no ven plasmado aquí su nombre.

Muchas gracias.

Resumen

El cáncer de pulmón es el tumor más frecuente y también el que presenta mayor mortalidad en términos absolutos, suponiendo hasta más del 18% de los fallecimientos por cáncer en el mundo al año. El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) representa casi el 85% de todos los tumores de pulmón. Dentro de este, los subtipos predominantes son el adenocarcinoma pulmonar (ADC, supone el 40-45% de todos los casos de cáncer de pulmón), y el carcinoma de células escamosas de pulmón (CCEP, 25-30% de todos los casos de cáncer de pulmón). Además, el cáncer de pulmón tiene una supervivencia a 5 años inferior al 20%, en parte debido a su diagnóstico tardío y a la resistencia a los tratamientos. En los últimos años, gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación del genoma, el conocimiento acerca de las alteraciones moleculares del CPNM ha permitido identificar mutaciones genéticas en los tumores de pulmón entre las que destacamos las alteraciones en genes como *EGFR*, *BRAF*, *KRAS*, *ALK*, *PIK3CA*, *MET*, *AKT1*, *NRAS*, *ERBB2* y, en consecuencia, el desarrollo de fármacos específicos dirigidos contra algunas de ellas (e.g.: inhibidores del dominio tirosina quinasa de EGFR, o el inhibidor del receptor de la tirosina quinasa ALK). Muchas de estas mutaciones ocurren en la mayoría de casos de ADC. Sin embargo, incluso disponiendo de terapias individualizadas, la adquisición de resistencias a los tratamientos es una de las causas principales de la elevada mortalidad del cáncer de pulmón. Además de las alteraciones genéticas, se deben tener en cuenta la heterogeneidad y el microambiente tumoral. Un factor que contribuye a la heterogeneidad tumoral es la presencia de células madre tumorales (CSC, *Cancer Stem Cells*). La metástasis y recurrencia tumoral después del tratamiento han sido atribuidas al crecimiento y supervivencia de esta subpoblación celular dentro de la heterogeneidad tumoral. Estas células con propiedades de célula madre, que pueden autorrenovarse y diferenciarse, tienen la capacidad de producir tumores cuando son trasplantadas en ratón. La falta de marcadores específicos de CSC de pulmón representa una dificultad para identificarlas, y los marcadores de superficie conocidos hasta el momento no son válidos para separar poblaciones de CSC, por lo que se hace necesaria la generación de nuevos ensayos experimentales para identificar y aislar CSC de manera más robusta. Las CSC identificadas podrían ser la base para el diseño

de nuevas estrategias terapéuticas personalizadas, basadas en la selección de una combinación más racional de fármacos, que tendría como objetivo eliminar la población de CSC.

Los objetivos de esta tesis doctoral han sido el aislamiento y caracterización de CSC derivadas de tumores de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), y de líneas de cultivo establecidas de CPNM; la caracterización de proteínas involucradas en la transición epitelial mesenquimal (EMT) en CPNM que pueden ser relevantes para la adquisición y el mantenimiento de características de las células madre y para la progresión de la enfermedad; y el desarrollo de modelos experimentales de ratón a partir de xenoinjertos derivados de tumores de pacientes con CPNM (PDX) para la identificación de nuevos biomarcadores y para estudiar el fenotipo y evolución de los tumores de pacientes.

Para la identificación y caracterización de CSC se ha optimizado la obtención de una suspensión celular a partir de tejido tumoral de pacientes con CPNM y el posterior cultivo en 3D para la generación de tumoresferas (ESF) con propiedades de CSC y su posterior caracterización. Se han generado 8 cultivos primarios a partir de 20 biopsias de tumores de pacientes de CPNM procedentes del Hospital General Universitario de València. También se han generado ESF de líneas celulares establecidas de CPNM (A549, H1650, H1395, PC9, H441). Se optimizó el procesado de muestras de paciente para mejorar el porcentaje de células viables previo al cultivo en 3D para generar ESF, enriquecidas en propiedades de CSC. Se analizó la expresión de marcadores de superficie tradicionalmente propuestos en literatura científica como marcadores de CSC de las tumoresferas (CD326, CD166, CD44, CD133) mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. En los resultados obtenidos no se observaron diferencias significativas al analizar la expresión de CD326 y CD166 entre ESF y cultivo en adherencia (ADH). CD133 no pudo detectarse por citometría de flujo, sin embargo, el análisis mediante microscopía de fluorescencia mostró que había diferencias en la localización y expresión de CD133 entre ambas ESF y ADH, siendo mayor su expresión en ESF y la localización principalmente en la membrana plasmática. Lo mismo sucedía con CD44, pues tendía a aumentar su expresión en la membrana de las ESF. Los cultivos en ADH crecidos en medio

con suero bovino fetal promueven la diferenciación de las células, pero observamos que las células ADH siguen expresando los marcadores de CSC CD326 y CD166 de manera similar a las tumoresferas, sugiriendo que estas células siguen manteniendo características de CSC. Estas células también mantenían la capacidad de iniciar tumores en un modelo de ratón inmunodeprimido. Esta técnica se considera estándar para evaluar la presencia de CSC por su capacidad de iniciar tumores. Observamos que tanto ESF derivadas de tumores de pacientes con CPNM, como sus contrapartes crecidas en ADH generaron tumor *in vivo* al ser inyectadas en ratón inmunodeprimido. También, en la línea celular establecida H1650 se observó la relevancia de la proteína CD326 para la generación de tumoresferas. Por otro lado, en este trabajo se ha analizado el efecto de la señalización por TGF- β 1 para la formación de tumoresferas, y se ha observado que la adición de TGF- β 1 induce mayor esfericidad en el cultivo 3D de las líneas A549 y H441. Esto sugiere que la señalización mediada por TGF- β 1 podría estar contribuyendo a un aumento de la población CSC en estas líneas celulares, además sugiere que habría una relación entre el proceso de promoción de la EMT inducida por TGF- β 1 y las propiedades de CSC.

En colaboración con el grupo de Oncología Molecular de la Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de València (FIHGUV), dirigido por el Dr. Camps y la Dra. Jantus, se analizó la expresión de genes involucrados en la EMT y CSC en ESF y ADH derivadas de tumores de pacientes con CPNM y de líneas celulares establecidas para identificar una firma génica característica de CSC. Los resultados mostraron que la expresión de *CDKN1A*, *NOTCH3*, *CD44*, *NANOG*, *SNAI1* e *ITGA6* era mayor en las ESF, y por tanto la expresión combinada de estos genes podría ayudar a identificar la subpoblación de CSC. Al correlacionar la expresión de estos genes con la supervivencia de los pacientes, se obtuvo una firma con valor pronóstico en ADC basada en la expresión de los genes *CDKN1A*, *SNAI1* e *ITGA6*.

Otro de los objetivos abordados es el estudio del papel de proteínas involucradas en la EMT cuya expresión podría promover la migración e invasión celular en CPNM, como son el factor de transcripción JunB y el factor de traducción eIF5A2. JunB es miembro del complejo de transcripción AP-1. AP-1 es un regulador

fisiológico de las señales tempranas inmediatas esenciales para la proliferación celular, la supervivencia, la diferenciación y las respuestas al estrés ambiental. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio en células derivadas de osteosarcoma U2OS permitieron mostrar que JunB interviene en la regulación del ciclo celular, y se identificaron nuevas dianas putativas de JunB mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina y transcriptómica de interés en la EMT y la señalización por TGF- β 1. En este trabajo se empleó la línea celular A549 para analizar si el papel de JunB en la EMT inducida por TGF- β 1 también estaba conservado en CPNM. Hemos observado que JunB podría estar mediando el inicio de la EMT inducida por TGF- β 1 mediante la regulación de la expresión de sus dianas transcripcionales, y por tanto su actividad podría ser relevante en la progresión del cáncer.

Por otro lado, la actividad del factor de traducción eIF5A2 también es de interés porque su sobreexpresión se ha observado en varios cánceres, incluido el CPNM, y se asocia con progresión de la enfermedad y mal pronóstico. eIF5A2 podría participar en la traducción de proteínas con motivos poliprolina, entre las que se encuentran proteínas del citoesqueleto, clave en los cambios morfológicos que se dan en EMT (e.g.: FHOD1, Ezrina). Por ello, se estudió la expresión proteica en células A549 tratadas con TGF- β 1 para inducir la EMT y en las que se había silenciado eIF5A2. Además, se analizó el efecto de la sobreexpresión de eIF5A2 en células A549, H1395, PC9 y H441. Como resultado, se observó que TGF- β 1 induce la expresión de eIF5A2 y que eIF5A2 estimula la expresión de proteínas involucradas en la EMT y, por tanto, podría promover la progresión del CPNM.

Por último, se han establecido 9 modelos experimentales de ratón a partir de xenoinjertos derivados de tumores de pacientes con CPNM (PDX), en colaboración con el Hospital Universitario y Politécnico La Fe (València). Se implantaron 33 biopsias de CPNM y de ellas 9 generaron tumor en ratón. Los tumores generados (X0) se trasplantaron de nuevo en ratón y se hicieron 3 pases sucesivos (X0 a X2). La correlación del éxito de implantación con variables clínico-patológicas de los pacientes mostró que los tumores primarios que generaron PDX derivaban de pacientes con peor pronóstico. Esta agresividad también se observó en los tiempos medios de latencia (MLT) de crecimiento del

tumor en ratón, pues los tumores PDX implantados en ratón en pasajes más tardíos, ya adaptados al ambiente murino, se desarrollaban antes. También se empleó un panel de proteínas para caracterizar el CPNM por inmunohistoquímica: CK7+/CK20-/TTF1+. De los subtipos de CPNM implantados, los ADC sólidos preservaban mejor los rasgos originales a lo largo de los pasajes de PDX. También se analizó por inmunohistoquímica la expresión de Vimentina, Ezrina y Ki67 para evaluar el estatus EMT y proliferativo de los tumores primarios y PDX. Se observó que los tumores con mutación KRAS-G12C mostraban expresiones de estas proteínas más elevadas, y su aumento en cada pase de PDX mostró que los tumores PDX adquieren características mesenquimales y se vuelven más agresivos. La alta expresión de Vimentina, Ezrina y Ki67 en tumores sugiere una mayor agresividad y, por tanto, la evaluación de su expresión podría utilizarse en combinación como marcador de pronóstico para evaluar la progresión de la enfermedad.

En conclusión, en esta tesis doctoral se han generado modelos experimentales *in vitro* para estudiar las CSC y la EMT, procesos que están relacionados con la recurrencia, resistencia a los tratamientos convencionales y la progresión de la enfermedad. Se ha identificado una firma génica asociada con mal pronóstico en ADC y profundizado en el papel de TGF- β 1 en la regulación de la EMT a través de JunB y eIF5A2. Además, se ha generado una colección de modelos PDX de CPNM de interés para la identificación de biomarcadores y el estudio de la evolución de los tumores.

Resum

El càncer de pulmó és el tumor més freqüent i també el que presenta major mortalitat en termes absoluts, suposant fins més del 18% de les defuncions per càncer en el món a l'any. El càncer de pulmó no microcític (CPNM) representa quasi el 85% de tots els tumors de pulmó. Dins d'aquest, els subtipus predominants són l'adenocarcinoma pulmonar (ADC, suposa el 40-45% de tots els casos de càncer de pulmó), i el carcinoma de cèl·lules escatoses de pulmó (CCEP, 25-30% de tots els casos de càncer de pulmó). A més, el càncer de pulmó té una supervivència a 5 anys inferior al 20%, en part a causa del seu diagnòstic tardà i a la resistència als tractaments. En els últims anys, gràcies a les noves tecnologies de seqüenciació del genoma, el coneixement sobre les alteracions moleculars del CPNM ha permès identificar mutacions genètiques en els tumors de pulmó entre les quals destaquem les alteracions en gens com *EGFR*, *BRAF*, *KRAS*, *ALK*, *PIK3CA*, *MET*, *AKT1*, *NRAS*, *ERBB2* i, en conseqüència, el desenvolupament de fàrmacs específics dirigits contra algunes d'elles (e.g.: inhibidors del domini tirosina-cinasa de *EGFR*, o l'inhibidor del receptor de la tirosina-cinasa *ALK*). Moltes d'aquestes mutacions ocorren en la majoria de casos d'ADC. No obstant això, fins i tot disposant de teràpies individualitzades, l'adquisició de resistències als tractaments és una de les causes principals de l'elevada mortalitat del càncer de pulmó. A més de les alteracions genètiques, s'han de tindre en compte l'heterogeneïtat i el microambient tumoral. Un factor que contribueix a l'heterogeneïtat tumoral és la presència de cèl·lules mare tumorals (CSC, *Cancer Stem Cells*). La metastasi i recurrència tumoral després del tractament han sigut atribuïdes al creixement i supervivència d'aquesta subpoblació cel·lular dins de l'heterogeneïtat tumoral. Aquestes cèl·lules amb propietats de cèl·lula mare, que poden autorenovar-se i diferenciar-se, tenen la capacitat de produir tumors quan són trasplantades en ratolí. La falta de marcadors específics de CSC de pulmó representa una dificultat per a identificar-les, i els marcadors de superfície coneguts fins al moment no són vàlids per a separar poblacions de CSC, per la qual cosa es fa necessària la generació de nous assajos experimentals per a identificar i aïllar CSC de manera més robusta. Les CSC identificades podrien ser la base per al disseny de noves estratègies terapèutiques personalitzades, basades en la

selecció d'una combinació més racional de fàrmacs, que tindria com a objectiu eliminar la població de CSC.

Els objectius d'aquesta tesi doctoral han sigut l'aïllament i caracterització de CSC derivades de tumors de pacients amb càncer de pulmó no microcític (CPNM), i de línies de cultiu establides de CPNM; la caracterització de proteïnes involucrades en la transició epitelial mesenquimal (EMT) en CPNM que poden ser rellevants per a l'adquisició i el manteniment de característiques de les cèl·lules mare i per a la progressió de la malaltia; i el desenvolupament de models experimentals de ratolí a partir de xenotrasplantaments derivats de tumors de pacients amb CPNM (PDX) per a la identificació de nous biomarcadors i per a estudiar el fenotip i evolució dels tumors de pacients.

Per a la identificació i caracterització de CSC s'ha optimitzat l'obtenció d'una suspensió cel·lular a partir de teixit tumoral de pacients amb CPNM i el posterior cultiu en 3D per a la generació de tumoresferes (ESF) amb propietats de CSC i la seua posterior caracterització. S'han generat 8 cultius primaris a partir de 20 biòpsies de tumors de pacients de CPNM procedents de l'Hospital General Universitari de València. També s'han generat ESF de línies cel·lulars establides de CPNM (A549, H1650, H1395, PC9, H441). Es va optimitzar el processament de mostres de pacient per a millorar el percentatge de cèl·lules viables previ al cultiu en 3D per a generar ESF, enriquides en propietats de CSC. Es va analitzar l'expressió de marcadors de superfície tradicionalment proposats en literatura científica com a marcadors de CSC de les tumoresferes (CD326, CD166, CD44, CD133) mitjançant citometria de flux i microscòpia de fluorescència. En els resultats obtinguts no es van observar diferències significatives en analitzar l'expressió de CD326 i CD166 entre ESF i cultiu en adherència (ADH). CD133 no va poder detectar-se per citometria de flux, no obstant això, l'anàlisi mitjançant microscòpia de fluorescència va mostrar que hi havia diferències en la localització i expressió de CD133 entre totes dues ESF i ADH, sent major la seua expressió en ESF i la localització principalment a la membrana plasmàtica. El mateix succeïa amb CD44, perquè tendia a augmentar la seua expressió a la membrana de les ESF. Els cultius en ADH crescuts al medi amb sèrum boví fetal promouen la diferenciació de les cèl·lules, però observem que les cèl·lules ADH continuen expressant els marcadors de CSC CD326 i CD166 de manera similar

a les tumoresferes, suggerint que aquestes cèl·lules continuen mantenint característiques de CSC. Aquestes cèl·lules també mantenen la capacitat d'iniciar tumors en un model de ratolí immunodeprimit. Aquesta tècnica es considera estàndard per a avaluar la presència de CSC per la seua capacitat d'iniciar tumors. Observem que tant ESF derivades de tumors de pacients amb CPNM, com les seues contraparts crescudes en ADH van generar tumor *in vivo* en ser injectades en ratolí immunodeprimit. A més, en la línia cel·lular establida H1650 es va observar la rellevància de la proteïna CD326 per a la generació de tumoresferes. D'altra banda, en aquest treball s'ha analitzat l'efecte de la senyalització per TGF- β 1 per a la formació de tumoresferes, i s'ha observat que l'addició de TGF- β 1 induïx major esfericitat en el cultiu 3D de les línies A549 i H441. Això suggereix que la senyalització mediada per TGF- β 1 podria estar contribuint a un augment de la població CSC en aquestes línies cel·lulars, a més suggereix que hi hauria una relació entre el procés de promoció de l'EMT induïda per TGF- β 1 i les propietats de CSC.

En col·laboració amb el grup d'Oncologia Molecular de la Fundació d'Investigació de l'Hospital General Universitari de València (FIHGUV), dirigit pel Dr. Camps i la Dra. Jantus, es va analitzar l'expressió de gens involucrats en l'EMT i CSC en ESF i ADH derivades de tumors de pacients amb CPNM i de línies cel·lulars establides per a identificar una signatura gènica característica de CSC. Els resultats van mostrar que l'expressió de *CDKN1A*, *NOTCH3*, *CD44*, *NANOG*, *SNAI1* i *ITGA6* era major en les ESF, i per tant l'expressió combinada d'aquests gens podria ajudar a identificar la subpoblació de CSC. En correlacionar l'expressió d'aquests gens amb la supervivència dels pacients, es va obtenir una signatura amb valor pronòstic en ADC basada en l'expressió dels gens *CDKN1A*, *SNAI1* i *ITGA6*.

Un altre dels objectius abordats és l'estudi del paper de proteïnes involucrades en l'EMT que la seua expressió podria promoure la migració i invasió cel·lular en CPNM, com són el factor de transcripció JunB i el factor de traducció eIF5A2. JunB és membre del complex de transcripció AP-1. AP-1 és un regulador fisiològic dels senyals primerenques immediates essencials per a la proliferació cel·lular, la supervivència, la diferenciació i les respostes a l'estrès ambiental. Estudis previs al nostre laboratori en cèl·lules derivades d'osteosarcoma (U2OS)

van permetre mostrar que JunB intervé en la regulació del cicle cel·lular, i es van identificar noves dianes putatives de JunB mitjançant assajos d'immunoprecipitació de cromatina i transcriptòmica d'interés en l'EMT i la senyalització per TGF- β 1. En aquest treball es va emprar la línia cel·lular A549 per a analitzar si el paper de JunB en l'EMT induïda per TGF- β 1 també estava conservat en CPNM. Hem observat que JunB podria estar mediant l'inici de l'EMT induïda per TGF- β 1 mitjançant la regulació de l'expressió de les seues dianes transcripcionals, i per tant la seua activitat podria ser rellevant en la progressió del càncer.

D'altra banda, l'activitat del factor de traducció eIF5A2 també és d'interés perquè la seua sobreexpressió s'ha observat en diversos càncers, inclòs el CPNM, i s'associa amb la progressió de la malaltia i mal pronòstic. eIF5A2 podria participar en la traducció de proteïnes amb motius poliprolina, entre les quals es troben proteïnes del citoesquelet, clau en els canvis morfològics que es donen en EMT (e.g.: FHOD1, Ezrina). Per això, es va estudiar l'expressió proteica en cèl·lules A549 tractades amb TGF- β 1 per a induir l'EMT i en les quals s'havia silenciat eIF5A2. A més, es va analitzar l'efecte de la sobreexpressió d'eIF5A2 en cèl·lules A549, H1395, PC9 i H441. Com a resultat, es va observar que TGF- β 1 indueix l'expressió d'eIF5A2 i que eIF5A2 estimula l'expressió de proteïnes involucrades en l'EMT i, per tant, podria promoure la progressió del CPNM.

Finalment, s'han establert 9 models experimentals de ratolí a partir de xenotrasplantaments derivats de tumors de pacients amb CPNM (PDX), en col·laboració amb l'Hospital Universitari i Politècnic La Fe (València). Es van implantar 33 biòpsies de CPNM i d'elles 9 van generar tumor en ratolí. Els tumors generats (X0) es van trasplantar de nou en ratolí i es van fer 3 passes successius (X0 a X2). La correlació de l'èxit d'implantació amb variables clinicopatològiques dels pacients va mostrar que els tumors primaris que van generar PDX derivaven de pacients amb pitjor pronòstic. Aquesta agressivitat també es va observar en els temps mitjans de latència (MLT) de creixement del tumor en ratolí, perquè els tumors PDX implantats en ratolí en passades més tardanes, ja adaptats a l'ambient murí, es desenvolupaven abans. També es va emprar un panell de proteïnes per a caracteritzar el CPNM per immunohistoquímica: CK7+/CK20-/TTF1+. Dels subtipus de CPNM implantats, els ADC sòlids preservaven millor

els trets originals al llarg de les passades de PDX. També es va analitzar per immunohistoquímica l'expressió de Vimentina, Ezrina i Ki67 per a avaluar l'estatus EMT i proliferatiu dels tumors primaris i PDX. Es va observar que els tumors amb mutació KRAS-G12C mostraven expressions d'aquestes proteïnes més elevades, i el seu augment en cada passada de PDX va mostrar que els tumors PDX adquireixen característiques mesenquimals i es tornen més agressius. L'alta expressió de Vimentina, Ezrina i Ki67 en tumors suggereix una major agressivitat i, per tant, l'avaluació de la seua expressió podria utilitzar-se en combinació com a marcador de pronòstic per a avaluar la progressió de la malaltia.

En conclusió, en aquesta tesi doctoral s'han generat models experimentals *in vitro* per a estudiar les CSC i l'EMT, processos que estan relacionats amb la recurrència, resistència als tractaments convencionals i la progressió de la malaltia. S'ha identificat una signatura gènica associada amb mal pronòstic en ADC i s'ha aprofundit en el paper de TGF- β 1 en la regulació de l'EMT a través de JunB i eIF5A2. A més, s'ha generat una col·lecció de models PDX de CPNM d'interès per a la identificació de biomarcadors i l'estudi de l'evolució dels tumors.

Abstract

Lung cancer is the most frequent and the most mortal tumor in absolute terms, accounting for up to more than 18% of cancer deaths worldwide per year. Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for almost 85% of all lung tumors. The most predominant NSCLC subtypes are lung adenocarcinoma (ADC, 40-45% of all lung cancer cases), and squamous cell carcinoma of the lung (SCC, 25-30% of all lung cancer cases). In addition, lung cancer has a five-year survival rate of less than 20%, partly due to its late diagnosis and acquired resistance to treatments. In recent years, thanks to new genome sequencing technologies, genetic mutations in lung tumors have been identified, among which the most common alterations are present in *EGFR*, *BRAF*, *KRAS*, *ALK*, *PIK3CA*, *MET*, *AKT1*, *NRAS* and *ERBB2* genes. Consequently, specific drugs directed against some of them (e.g.: inhibitors of the tyrosine kinase domain of *EGFR*, or the inhibitor of the receptor tyrosine kinase *ALK*) have been developed. Many of these mutations occur in most cases of ADC. However, even with individualized therapies, the acquisition of resistance to treatment is one of the main causes of the high mortality of lung cancer. Apart from genetic alterations, tumor heterogeneity and tumor microenvironment must be considered. A factor that contributes to tumor heterogeneity is the presence of cancer stem cells (CSC). Tumor metastasis and recurrence after treatment have been attributed to the growth and survival of this cell subpopulation within tumor heterogeneity. These cells with stem cell properties can self-renew and differentiate, and develop tumors when transplanted into mice. The lack of specific markers for lung CSC represents a drawback for their identification. Thus, it is necessary to generate new experimental assays to identify and isolate CSC in a more robust way. The identified CSC could be the basis for the design of new personalized therapeutic strategies, based on the selection of a more rational combination of drugs, which would aim to eliminate the population of CSC.

The objectives of this doctoral thesis have been the isolation and characterization of CSC derived from tumors of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), and from established NSCLC cell lines; the characterization of proteins involved in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in NSCLC that may be relevant for the acquisition and maintenance of stem cell characteristics and for disease

progression; and the development of experimental mouse models from tumor-derived xenografts from patients with NSCLC (PDX) for the identification of new biomarkers and to study the phenotype and evolution of patient tumors.

For the identification and characterization of CSC, the protocol for the generation of a cell suspension of tumor tissue from patients with NSCLC has been optimized, and the subsequent 3D culture for the generation of NSCLC tumorspheres (SPH) with CSC properties and their subsequent characterization. In this way, eight primary cultures have been generated from 20 tumor biopsies from NSCLC patients from the General University Hospital of Valencia. SPH have also been generated from established NSCLC cell lines (A549, H1650, H1395, PC9, H441). The processing of patient samples was optimized to improve the percentage of viable cells prior to culturing in 3D to generate SPH, which are enriched in CSC features. The expression of surface markers traditionally proposed in the scientific literature as CSC surface markers (CD326, CD166, CD44, CD133) was analyzed by flow cytometry and fluorescence microscopy. Our results show no significant differences when analyzing the expression of CD326 and CD166 between SPH and the same cells grown in adherent cell culture (ADH), except for CD44 whose expression was higher in SPH compared to its counterpart grown in ADH. CD133 could not be detected by flow cytometry, however, analysis by fluorescence microscopy showed that there were differences in the cellular localization and expression of CD133 between both SPH and ADH. CD133 expression was higher in SPH and its localization was mainly in the plasma membrane. CD44 expression also tended to increase at the SPH plasma membrane. ADH cultures grown in medium supplemented with fetal bovine serum promote cell differentiation, but we observed that ADH cells expressed the CSC markers CD326 and CD166 similarly to tumorspheres, suggesting that these ADH cells maintain CSC features. Due to the ability of CSC to initiate tumors, their injection in immunodeficient mice is considered as a standard for evaluating the presence of CSC. We observed that both SPH and ADH cells derived from NSCLC patients' tumors generated tumors *in vivo* when injected into immunodeficient mice. Also, in the established NSCLC cell line H1650, the expression of CD326 was essential for the generation of tumorspheres since only the cell subpopulation CD326+ was able to form SPH.

On the other hand, the effect of TGF- β 1 treatment in tumorspheres formation was also analyzed. The results showed that TGF- β 1 induces sphericity in 3D culture derived from A549 and H441 cell lines. This suggests that TGF- β 1-mediated signaling could promote the CSC population in these cell lines. It also suggests that there is a relationship between the epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TGF- β 1 and CSC features.

In collaboration with the Molecular Oncology group of the Research Foundation of the General University Hospital of Valencia (FIHGUV), led by Dr. Camps and Dr. Jantus, the expression analysis of genes involved in EMT and CSC in SPH and ADH cells derived from tumors of NSCLC patients and cell lines was performed. As a result, a novel CSC gene signature was proposed. These analyses showed that the expression of *CDKN1A*, *NOTCH3*, *CD44*, *NANOG*, *SNAI1* and *ITGA6* were higher in SPH, and therefore the combined expression of these genes could help to identify the subpopulation of CSC in NSCLC tumors. By correlating the expression of these genes with the survival of the patients, a signature with prognostic value in ADC was obtained based on the expression of *CDKN1A*, *SNAI1* and *ITGA6*.

In this work, it has also been addressed the study of the role of several proteins involved in the EMT whose expression could promote cell migration and invasion in NSCLC, such as the JunB transcription factor and the eIF5A2 translation factor. JunB is a member of the AP-1 transcription complex. AP-1 is a physiological regulator of immediate early signals essential for cell proliferation, survival, differentiation, and responses to environmental stress. Previous studies carried out in our laboratory in U2OS osteosarcoma cells showed that JunB is involved in cell cycle regulation. In addition, new putative JunB targets involved in EMT were identified by chromatin immunoprecipitation and transcriptomic assays. In this work, the A549 cell line was used to analyze whether the role of JunB in TGF- β 1-induced EMT was also conserved in NSCLC. The results showed that JunB could be mediating the initiation of the EMT induced by TGF- β 1 by regulating the expression of its transcriptional targets, and therefore its activity could be relevant in cancer progression.

On the other hand, the translation factor eIF5A2 is also of interest because its overexpression has been observed in several cancers, including NSCLC, and is

associated with disease progression and poor prognosis. eIF5A2 may participate in the translation of proteins with polyproline motifs, among which are actin cytoskeleton proteins, key in the morphological changes that occur during EMT (e.g.: FHOD1, Ezrin). Therefore, eIF5A2 protein expression was studied in A549 cells treated with TGF- β 1 to induce EMT and in which eIF5A2 had been silenced. Furthermore, the effect of eIF5A2 overexpression in A549, H1395, PC9 and H441 cells was analyzed. As a result, it was observed that TGF- β 1 induces the expression of eIF5A2, and that eIF5A2 stimulates the expression of proteins involved in EMT. Therefore, eIF5A2 may promote NSCLC progression.

Finally, 9 experimental mice models have been established from tumor-derived xenografts of patients with NSCLC (PDX), in collaboration with the University and Polytechnic La Fe Hospital of Valencia. 33 NSCLC biopsies were implanted and 9 of them generated tumor in mice. When tumors had grown enough, they were transplanted back into a new mouse. Successive passages were performed (X0 to X2). The correlation of implantation success with the clinical-pathological variables of the patients showed that primary tumors that generated PDX were derived from patients with bad prognosis. Later passages tumors developed earlier, since this PDX were already adapted to the murine environment. This was observed in the lower mean latency times (MLT) in later passages, which correlate with higher aggressiveness. A protein panel was also used to characterize NSCLC by immunohistochemistry: CK7+/CK20-/ TTF1+. Among the implanted NSCLC subtypes, solid ADC preserved better the original tumor features across PDX passages. The expression of Vimentin, Ezrin and Ki67 was also analyzed by immunohistochemistry to evaluate the EMT and proliferative status of the primary tumors and PDX. Tumors with KRAS-G12C mutation exhibited higher expression of these proteins, and their increase in each PDX passage showed that PDX tumors acquire mesenchymal characteristics and become more aggressive. Higher expression of Vimentin, Ezrin and Ki67 in NSCLC tumors suggests higher aggressiveness and, therefore, the study of their expression could be used in combination as a prognostic marker to evaluate the progression of the disease.

In conclusion, in this doctoral thesis, *in vitro* experimental models have been generated to study CSC and EMT of NSCLC, processes that are related to

recurrence, resistance to conventional treatments, and disease progression. A gene signature associated with poor prognosis in ADC has been identified and the role of TGF- β 1-dependent EMT through the regulation of JunB and eIF5A2 has been explored. In addition, a collection of PDX models of NSCLC has been generated for the identification of biomarkers and the study of tumor evolution.

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. <i>Western blot</i>	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 <i>in vivo</i> 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

<u>CAPÍTULO 1</u>	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 <i>in vivo</i> 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
<u>CAPÍTULO 2</u>		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-β1.....	148
2.2.1.	TGF-β1 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
<u>CAPÍTULO 3</u>		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 Oncomine® 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
<u>Discusión del Capítulo 1:</u>		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
<u>Discusión del Capítulo 2:</u>		230
JunB en la señalización por TGF β y EMT en cáncer		230
eIF5A2 en la señalización por TGF β y EMT en cáncer		232
<u>Discusión del Capítulo 3:</u>		234
CONCLUSIONES.....		239
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		243

LISTA DE FIGURAS

Introducción

Figura 1. Rasgos distintivos o <i>hallmarks</i> 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

ABREVIATURAS

2D: cultivo *in vitro* en dos dimensiones. En este trabajo a menudo es sinónimo de cultivo en adherencia

3D: cultivo *in vitro* en tres dimensiones. En este trabajo a menudo es sinónimo de cultivo en baja adherencia o cultivo en suspensión

ACP: análisis de componentes principales (también PCA, *principal component analysis*)

ADC: adenocarcinoma. También puede referir directamente al ADC de pulmón

ADH: cultivo en adherencia, células crecidas en adherencia

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AJCC: Comité Conjunto Americano del Cáncer (*American Joint Committee on Cancer*)

ALCL: linfoma anaplásico de células grandes

ALCAM: molécula de adhesión de leucocitos activados (*Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule*). CD166

ALDH: aldehído deshidrogenasa

AML: leucemia aguda mieloide (*acute myeloid leukemia*)

ANOVA: análisis de la varianza (prueba estadística, *analysis of variance*)

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNt: ARN de transferencia

aSC: células madre adultas de los tejidos (*adult stem cells*)

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo (*American Type Culture Collection*)

ATP: adenosín trifosfato

BASC: células madre broncoalveolares (*bronchioalveolar stem cells*)

BSA: albúmina sérica bovina

bZIP: motivo de cremallera de leucina

CAF: fibroblastos asociados al cáncer (*cancer-associated fibroblasts*)

cap-5': caperuza 5'

CCEP: carcinoma de células escamosas de pulmón (también SCC, de *Squamous-Cell Carcinoma*)

CD: cúmulos de diferenciación (también llamados grupos o antígenos de diferenciación). Nomenclatura de proteínas de superficie (*cluster of differentiation*)

CDK: quinasa dependiente de ciclina

CEBA: Comité de Ética para el Bienestar Animal

CE-IVD: Comité Europeo para diagnóstico *in vitro*

ChIP-Seq: secuenciación de inmunoprecipitación de cromatina

CIPF: Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia, España)

CK7: citoqueratina 7

CK20: citoqueratina 20

CNECG: carcinoma neuroendocrino de células grandes (también LCNEC, de *Large-Cell Neuroendocrine Cancer*)

CNV: variaciones de número de copia

COSMIC: catálogo de mutaciones somáticas en cáncer

CPCG: carcinoma de pulmón de células grandes (también LCC, de *Large-Cell Carcinoma*)

CPCP: cáncer de pulmón de células pequeñas (también SCLC, *Small Cell Lung Cancer*)

CPNM: cáncer de pulmón no microcítico (también NSCLC, *Non-Small Cell Lung Cancer*)

CRBM-CNRS: Centro de Investigaciones en Bioquímica Molecular (Montpellier, Francia)

CSC: células madre tumorales (*cancer stem cells*)

CTBP: proteína de unión a C terminal (*C-terminal-binding protein*)

CTO: esferoides originados de tejido tumoral (*cancer tissue-originated spheroids*)

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

dbSNP: base de datos de polimorfismos de un solo nucleótido

DHH: Desert Hedgehog

DHS: desoxihipusina sintasa

dia: formina diaphanous

DLL: Delta-like (DLL 1, 3, 4)

DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DOHH: desoxihipusina hidroxilasa

ECACC: Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*)

ECL: quimioluminiscencia mejorada (*enhanced chemiluminescence*)

EGF: factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*)

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

eIF5A: factor de iniciación de la traducción eucariota 5A (eIF5A1, eIF5A2)

EpCAM: molécula de adhesión celular epitelial celular (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*). CD326

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

EpICD: dominio intracelular de EpCAM

EMT: transición epitelio-mesénquima, transición epitelial-mesénquimal (*Epithelial-Mesenchymal Transition*)

EMT-TF: factores de transcripción de EMT

ERM: familia de proteínas de membrana de unión a citoesqueleto ezrina, radixina y moesina

ESC: células madre embrionarias (*embryonic stem cells*)

ESF: cultivo de tumoresferas, tumoresferas (también SPH, *spheres*)

FACS: citometría de flujo activada por fluorescencia (*fluorescence activated cell sorting*)

FBS: suero bovino fetal (*fetal bovine serum*)

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast growth factor*)

FIGUV: Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia

GEMM: modelos de ratón con modificaciones genéticas (*genetically engineered mouse models*)

GLOBOCAN: Observatorio Global sobre el Cáncer

GTPasa: enzima guanosina trifosfatasa

h: horas

H&E: Hematoxilina-Eosina

hEGF: factor de crecimiento epidérmico humano (*human epidermal growth factor*)

HeLa: línea de cáncer de cérvix obtenida de la paciente Henrietta Lacks

hFGFb: factor de crecimiento de fibroblastos humano básico (*human fibroblastic growth factor-basic*)

HGNC-EBI: base de datos HUGO del Comité de Nomenclatura de Genes del Instituto Europeo de Bioinformática (*Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute*)

HGUV: Hospital General Universitario de Valencia

HH: Hedgehog

HIF1 α : factor de transcripción inducible por hipoxia

HR: Hazard Ratio (tasa de riesgo)

H-Score: Histoscore

IARC: Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (*International Agency for Research on Cancer*)

IC: intervalo de confianza (puede aparecer como CI, *Confidence Interval*)

IGV: Integrative Genomics Viewer

IHC: inmunohistoquímica (*immunohistochemistry*)

IHH: Indian Hedgehog

IND: tumor indiferenciado

ITQ: inhibidores de la tirosina quinasa

iPSC: células madre pluripotentes inducidas (*induced Pluripotent Stem Cells*)

ITS: insulina, transferrina y ácido selenoso (*Insulin-Transferrin-Selenious acid*)

Jag: Jagged (Jag 1, 2)

KEGG: Enciclopedia de Kyoto de Genes y Genomas (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

Ki67: clon 67 de 96, Kiel (Alemania). Marcador de proliferación

lncARN: ARN largo no codificante

logrank: rango logarítmico (prueba estadística)

LSC: células madre leucémicas (*leukemic stem cells*)

MAF: frecuencia de alelos minoritarios

MAM: macrófagos asociados a metástasis (*metastasis-associated macrophages*)

MAPK: MAP quinasas. MAP: proteínas activadas por mitógenos

MD: mínimamente diferenciado (referente a un tumor)

MET: transición mesenquimal-epitelial (*Mesenchymal-Epithelial Transition*)

MIA: adenocarcinoma mínimamente invasivo de pulmón

miARN: micro-ARN

min: minutos

MLT: tiempo medio de latencia (*Median Latency Time*)

MMP3: metaloproteinasas 3

MPM: mesotelioma pleural maligno

NaN₃: azida sódica

NCI: Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos

NEU: carcinoma neuroendocrino

NICD: dominio de Notch intracelular

NMBCU: N-nitroso-metil-biscloroetilurea

ns: no significativo

NSG®: ratón NOD scid gamma

NTCU: N-nitro-triscloroetilurea

OMS: Organización Mundial para la Salud (también *WHO, World Health Organization*)

OS: supervivencia total o global (*overall survival*)

p: p-valor

PBS: tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*)

PC: carcinoma pleomórfico de pulmón

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PD-1: proteína de muerte programada-1 (*Programmed Death-1*)

PDAC: adenocarcinoma ductal pancreático (*pancreatic ductal adenocarcinoma*)

PDB: banco de datos de proteínas (*Protein Data Bank*)

PDX: xenotrasplante derivado de paciente, xenoinjerto derivado de paciente (*Patient derived xenograft* o *Patient-derived xenograft*)

PD-L1: ligando de proteína de muerte programada PD-1

PFA: paraformaldehído

PGM®: plataforma Personal Genome Machine®

PLE: carcinoma pleomórfico con mínimo adenocarcinoma

PNEC: células pulmonares neuroendocrinas (*pulmonary neuroendocrine cells*)

PS: estatus funcional del paciente (*Performance Status*)

P/S: antibióticos penicilina/estreptomicina

PTCH: Patched Homolog (PTCH 1, 2)

PVDF: fluoruro de polivinilideno

RB1: gen retinoblastoma

RBPJ: proteína recombinante de unión supresora de calicie (*Recombining binding protein suppressor of hairless*)

ROS: especies reactivas de oxígeno

RTqPCR: PCR cuantitativa con transcripción reversa (*Reverse Transcription quantitative PCR*, también puede aparecer como RT-qPCR)

SCID: ratones con inmunodeficiencia severa combinada (*severed combined immunodeficient mice*)

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica

siARN: ARN pequeño interferente o ARN de silenciamiento (*small interfering RNA*)

SD: desviación estándar (*Standard Deviation*)

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante con dodecilsulfato sódico

SEM: error estándar de la media (*Standard Error of the Mean*)

SHH: Sonic Hedgehog

SLE: supervivencia libre de enfermedad

SMO: Smoothened

TCGA: atlas del genoma del cáncer (*The Cancer Genome Atlas*)

TDTS: esferas tumorales derivadas de tejido (*tissue-derived tumor spheres*)

TGF β , TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

TIC: células iniciadoras de tumores (*tumor-initiating cells*)

TMA: micromatrices de tejido (*tissue microarrays*)

TMS: teoría de la mutación somática

TOFT: teoría del campo de la organización tisular (*tissue organization field theory*)

TP: tumor primario (también puede aparecer como PT, *primary tumor*)

TP53: gen de la Proteína Tumoral 53

TRITC: tetrametilrodamina B isotiocianato

TSS: sitio de inicio de la transcripción (*Transcription Start Site*)

TTF1: factor de transcripción tiroideo-1 (*thyroid transcription factor-1*)

UCV: Universidad Católica de València

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

Wnt: Wingless-type protein

WT: tipo salvaje (no mutado, *wild type*)

X0: primer pase de PDX

X1: segundo pase de PDX

X2: tercer pase de PDX

YB-1: proteína de unión a Y-box (*Y-box binding protein-1*)

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

El *Diccionario de la lengua española* define el cáncer como una enfermedad que se caracteriza por la transformación de las células, que proliferan de manera anormal e incontrolada ¹. Esta definición del cáncer como enfermedad única contribuye a su estigma social. Realmente, el cáncer engloba un amplio número de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de células anormales que se dividen, crecen y se diseminan sin control en cualquier parte del cuerpo. Cada una de estas enfermedades muestra alteraciones moleculares y celulares específicas y por tanto podrían definirse tantos tipos de cánceres como enfermos, pero en general se agrupan por el tejido donde se originó ².

La homeostasis tisular se sustenta en un equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular, en función de la necesidad de generar nuevas células, normalmente porque estas han envejecido funcionalmente y muerto de manera programada. La perturbación de esta homeostasis debido a alteraciones genéticas en las células es habitualmente el origen del cáncer. Con la acumulación de daños a nivel génico y estrés molecular, las células evaden la muerte programada, se dividen y crecen descontroladamente llegando a formar masas de células o “tumores”, que cuando se expanden pueden sustituir a los tejidos normales y destruirlos ³. A pesar de las propiedades en común, las características específicas de cada cáncer multiplican la complejidad para la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes y, en última instancia, para diseñar terapias efectivas para erradicarlos.

1.1. Biología molecular del cáncer: *statu quo*, debate y rasgos comunes

Hanahan y Weinberg publicaron en el año 2000 ⁴ una influyente revisión sobre las propiedades que caracterizan a las células del cáncer y las enumeraron en seis *hallmarks* o sellos distintivos. También definieron la característica habilitante que llevaría a las células a desarrollar los diferentes *hallmarks*. En 2011 ampliarían esta revisión incluyendo dos sellos distintivos más y una nueva

característica habilitante ⁵. Estos trabajos son de especial relevancia y trascendencia en el campo de la oncología experimental básica. En el siguiente apartado se resumen brevemente:

1.1.1. *Hallmarks* o rasgos distintivos del cáncer

Los *hallmarks*, o rasgos distintivos, serían capacidades funcionales adquiridas que permiten a las células tumorales sobrevivir, proliferar y diseminarse (Figura 1). Estos sellos distintivos (o capacidades) originales del artículo publicado en el año 2000 ⁴ incluyen la resistencia a la muerte celular programada, el mantenimiento de las señales de proliferación, la evasión de supresores del crecimiento, la inmortalidad replicativa, la activación de la invasión y metástasis, y la inducción de angiogénesis. Los *hallmarks* incorporados en la revisión publicada en el año 2011 ⁵ son la desregulación del metabolismo celular y la evasión de la destrucción por parte del sistema inmunológico. A su vez, se sumaron como características habilitadoras de estos sellos distintivos la acumulación de mutaciones genéticas y eventos de inestabilidad genómica, y un entorno inflamatorio que favorece el crecimiento tumoral.



Figura 1. Rasgos distintivos o *hallmarks* del cáncer propuestos y ampliados por Hanahan y Weinberg. Adaptado de Hanahan y Weinberg, 2011 ⁵.

A continuación, se presenta una breve descripción de los rasgos distintivos de las células tumorales propuestos por Hanahan y Weinberg:

- La autosuficiencia basada en señales de proliferación es un rasgo esencial de las células tumorales para proliferar de manera crónica. Esto se consigue a través de la desregulación de la señalización celular que, en células normales, serían responsables de la homeostasis celular. Algunos mecanismos favorecidos en el cáncer son la activación constitutiva de rutas de señalización sin necesidad de la presencia de factores de crecimiento (por ejemplo, activación de la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas) ⁶); la disrupción de bucles de retroalimentación negativa que suelen amortiguar las señales de crecimiento (e.g. mTOR en la vía de PI3K ⁷); o la falta de respuesta a señales que induzcan la senescencia ⁸.
- La eliminación de señales supresoras del crecimiento es otra de las características de las células del cáncer. Estas, además de sostener una proliferación crónica, deben hacer frente a la actividad de los genes supresores de tumores, como Retinoblastoma (*RB1*) o Proteína Tumoral 53 (*TP53*), que transducen señales extracelulares inhibitorias o detienen el ciclo celular cuando se produce daño en el ADN, respectivamente ^{9,10}. También destacan, dentro de este *hallmark*, la evasión de la inhibición por contacto ¹¹ y la derivación de la vía del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) con actividad antiproliferativa a inductora de la progresión del cáncer ¹².
- La evasión de la muerte celular programada o apoptosis se desencadena frente a estreses fisiológicos como los que sufren las células tumorales. Estas son capaces de evadir la apoptosis e, incluso, adquirir resistencia a terapias dirigidas a inducirla ¹³. Un proceso celular muy relacionado con la apoptosis es la autofagia, que en condiciones normales se desarrolla con la finalidad de reciclar catabolitos de orgánulos y encauzar el metabolismo celular. En tumores, se ha descrito tanto la evasión de la autofagia como la preservación de la misma para la supervivencia tumoral en ambientes de estrés ¹⁴, o incluso el aumento de la autofagia para hacer

frente a citotóxicos o para entrar en una situación de latencia reversible ¹⁵. También aumentan los fenómenos de muerte celular por necrosis frente a los apoptóticos, pues la necrosis provoca la liberación de señales proinflamatorias que estimulan el microambiente tumoral ¹⁶.

- La inmortalidad replicativa es otra de las características de las células tumorales. El factor que provoca que, de manera distintiva, muchas células tumorales puedan replicarse sin entrar en senescencia o apoptosis es la activación anormal de la telomerasa, que previene el acortamiento de los telómeros en los extremos cromosómicos hasta el punto de comprometer la viabilidad celular ¹⁷. Nuevos abordajes experimentales han permitido observar que, en ocasiones, la propia telomerasa podría promover la señalización oncogénica ¹⁸ o que, además, es necesario un acortamiento de los telómeros hasta niveles subcríticos. En este nivel subcrítico la actividad telomerasa puede producir una inestabilidad genómica promoviendo la aparición del cáncer y sin llegar a la senescencia celular ¹⁹.
- La inducción de angiogénesis es otra capacidad que adquieren las células tumorales para promover la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de otros preexistentes, y que se utilizarán para satisfacer las necesidades nutritivas y de oxígeno de la masa tumoral, así como poder evacuar el dióxido de carbono y los residuos metabólicos. Factores como el de crecimiento vascular endotelial (VEGF) cobran relevancia a la hora de activar de manera permanente la angiogénesis en la expansión neoplásica ²⁰. La adaptación a las necesidades nutritivas y de oxígeno también se consigue a través de la modificación de la arquitectura del microambiente tumoral. En ella juega un papel esencial el factor inducible por hipoxia (*HIF1A*) ²¹.
- La invasión y metástasis son características de la progresión del cáncer, distinguiéndolo de los tumores benignos ²². En los últimos años se ha progresado en el conocimiento de la cascada de eventos que llevan a promover la metástasis, y se ha propuesto que uno de los programas funcionales que podrían gobernar durante el proceso invasivo es la

transición epitelio-mesénquima (EMT) ²³. La EMT es un proceso morfogénico mediante el cual las células con un fenotipo epitelial adquieren un fenotipo mesenquimal con capacidad migratoria e invasiva. Ha pasado de considerarse un programa irreversible a un fenómeno plástico y reversible. Por otro lado, también ha crecido el interés en los estudios sobre la influencia del estroma en la motilidad de las células tumorales ²⁴ y sobre otros modos de colonización celular como son la invasión colectiva ²⁵ y la ameboide ²⁶.

- La evasión inmunitaria es uno de los nuevos *hallmarks* incorporados en la revisión de Hanahan y Weinberg de 2011 ⁵. Las células tumorales son capaces de evadir la vigilancia inmunológica a través de la secreción de factores inmunosupresores ²⁷ o el reclutamiento de células inflamatorias que inactivan a los linfocitos citotóxicos ²⁸.
- Los cambios en el metabolismo energético es el segundo nuevo rasgo distintivo incorporado en la revisión de 2011. Integra no solo el hecho de que las células tumorales proliferen de manera desregulada, sino que en dicha progresión del cáncer también necesiten un reajuste metabólico centrado en favorecer el crecimiento y la división celular. Dentro de este rasgo se englobaría el efecto Warburg o glicólisis aeróbica ²⁹. El efecto Warburg consiste en una particular reorientación del metabolismo de las células tumorales con preferencia por la glicólisis en vez de la respiración celular, con la finalidad de promover el anabolismo y la proliferación a costa de sacrificar la generación eficiente de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP). En cualquier caso, la alteración del metabolismo energético sí está aceptada como una característica común a todo cáncer.

1.1.2. Características promotoras del cáncer

Si los *hallmarks* son las capacidades funcionales adquiridas por las células tumorales, las características promotoras para adquirir estos rasgos distintivos se resumen en dos según Hanahan y Weinberg ^{4,5}:

- **Inflamación:** una de las observaciones generalizadas desde hace décadas en cáncer es la detección de infiltración de células del sistema inmunológico en todos los tumores, en mayor o menor medida ³⁰. Aunque resulte paradójico, esta infiltración suele asociarse a una mayor oncogénesis, y se debe, al menos en parte, al papel de las células del sistema inmunológico innato en la secreción de moléculas promotoras del cáncer y factores de crecimiento al microambiente, así como factores proangiogénicos y enzimas que contribuyen a la invasión local ^{31,32}. Por otro lado, también liberan agentes químicos como especies reactivas de oxígeno (ROS), que son mutagénicos ³³.
- **Inestabilidad genómica:** la adquisición de los rasgos característicos de las células cancerosas depende principalmente de la acumulación de alteraciones en el genoma de las células neoplásicas, ya sea a nivel genético o epigenético ³⁴. Cuanta más inestabilidad genómica, más fenotipos posibles se generarán y, en última instancia, se favorecerá la expansión de los clones mejor adaptados al microambiente tumoral.

1.1.3. Teoría de la mutación somática, evolución clonal, y otras teorías no convencionales

Los rasgos característicos de las células tumorales o *hallmarks* descritos por Hanahan y Weinberg surgen de la teoría dominante en el campo de la oncología molecular durante las últimas décadas: la Teoría de la Mutación Somática (TMS). Según esta teoría, el origen del cáncer o carcinogénesis se produciría a partir de la adquisición de una mutación en el ácido desoxirribonucleico (ADN) nuclear de una célula somática. Este cambio genético en una célula individual se transmitiría a su progenie, generando un clon de células malignas ³⁵. La TMS enlaza con dos modelos propuestos para explicar el potencial heterogéneo de las células tumorales y el proceso de metástasis en general: el modelo estocástico y el modelo jerárquico.

En el modelo estocástico, o modelo de evolución clonal, se asume que el cáncer se origina en una célula somática que empieza a acumular mutaciones hasta

transformarse en tumoral. La célula transformada a través de un cambio genético o epigenético irreversible dará lugar a la aparición de nuevos clones que irán acumulando progresivamente más mutaciones. La presión selectiva favorecerá la proliferación de los clones más agresivos y dará lugar a la heterogeneidad tumoral y capacidad metastásica. Al contrario que el modelo jerárquico, en este caso todas las células serían potenciales orígenes del desarrollo de un cáncer ^{35,36}.

En el modelo jerárquico, una población de células madre tumorales (*cancer stem cells* en inglés, CSC) poco comunes serían el vértice de una pirámide de distintos tipos celulares, y serían las responsables del crecimiento y recidiva del tumor, al ser, teóricamente, la única población dentro del tumor capaz de autorrenovarse, pero también de dar lugar a los otros tipos celulares del cáncer ³⁷.

A pesar de las evidencias en la literatura que apoyan la teoría de la TMS, también se ha discutido si las mutaciones son, en todos los casos donde se detectan, la causa subyacente a la transformación oncogénica. Se estima que los cánceres hereditarios, es decir, los originados a partir de mutaciones germinales, son solo un 5-10% del total. Algunos autores bajan el porcentaje de cánceres con causa mutacional al 5% ^{38,39}. Además, otros autores también critican que los *hallmarks* originales, excepto el de poder invadir y metastatizar nuevos tejidos, son rasgos también presentes en los tumores benignos ^{40,41}. Esto ha dado lugar a la aparición de otras teorías no clásicas sobre el origen y evolución del cáncer que buscan aunar el vasto conocimiento generado en el campo de la oncología, pero con ciertas reinterpretaciones. Por ejemplo, un modelo alternativo a la TMS, o modelo a considerar conjuntamente, sería el propuesto por Brücher y Jamall ⁴². Según los autores, se produciría un evento patogénico (de origen químico o biológico) que desencadenaría una inflamación crónica a nivel local. El ambiente inflamatorio sostenido terminaría desarrollando una fibrosis, la cual supondría cambios en el microambiente celular. Este microambiente propiciaría la instauración, en su conjunto, de un nicho precanceroso. Procesos reiterativos de inflamación, fibrosis y estrés permanente llevan a un círculo de eventos que provocaría el despliegue de estrategias para escapar del estrés crónico. Cuando

fracasa este intento de evasión del estrés crónico local, se produce la transición de una célula normal a una célula tumoral (Figura 2).

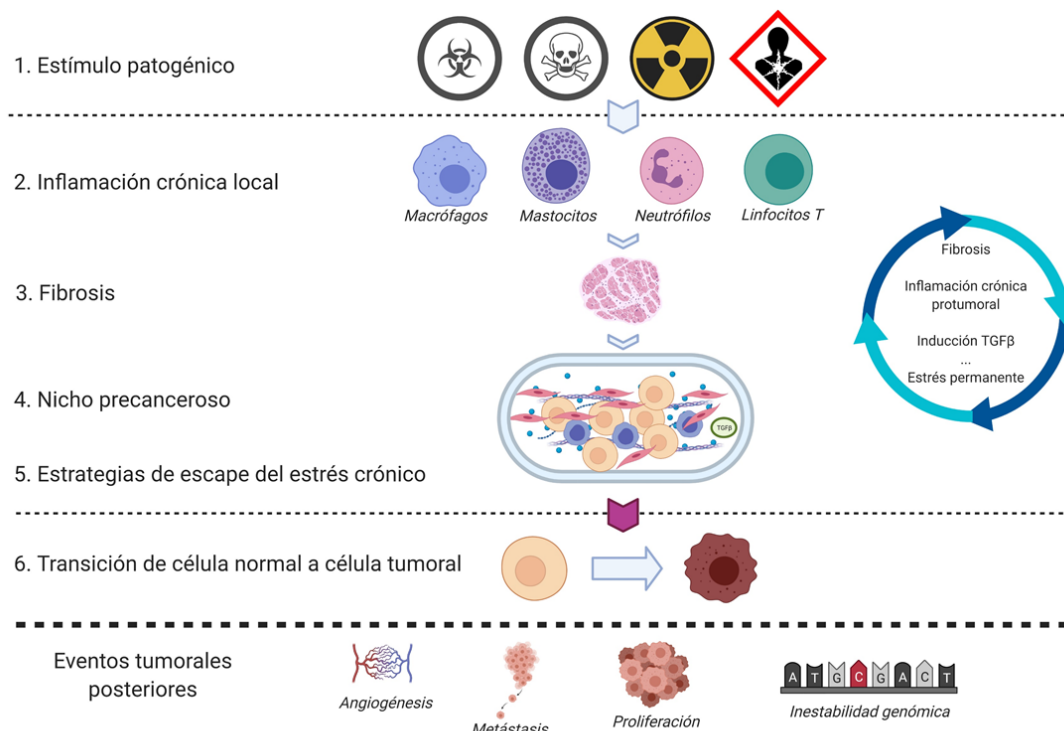


Figura 2. Esquema del paradigma alternativo propuesto por Brücher y Jamall en *Epistemology of the origin of cancer: a new paradigm*. Adaptado de Brücher y Jamall, 2014 ⁴². En la imagen se enumeran los eventos propuestos que llevan al desarrollo de un cáncer. Creado con Biorender.com.

A diferencia de Hanahan y Weinberg, que explican el cáncer basándose en la TMS y sus variantes centradas en células, otros expertos basan sus estudios del cáncer a nivel de organización tisular, y señalan la insuficiencia de la TMS para aportar más conocimiento al campo y para avanzar en la lucha contra esta patología. Esta teoría alternativa, compatible con la teoría de la evolución, denominada teoría del campo de la organización tisular (*tissue organization field theory*, TOFT) ^{43,44}, considera que el estado normal predeterminado de las células sería proliferar y moverse, y la carcinogénesis se entendería como la consecuencia de defectos en la arquitectura tisular. Los carcinógenos actuarían alterando las interacciones intercelulares y con la matriz extracelular normales en el tejido. Estos carcinógenos pueden ser agentes químicos, procesos de inflamación o infecciones víricas, por ejemplo. A diferencia del enfoque celular y subcelular de la TMS, la TOFT enuncia la neoplasia como un fenómeno

supracelular. Mientras que en la TMS las alteraciones genéticas serían la causa de la neoplasia, en la TOFT serían el efecto o consecuencia de los cambios tisulares ^{43,44}.

Las implicaciones de teorías alternativas o complementarias son múltiples, puesto que habría que reenfocar investigaciones realizadas en el campo, o reinterpretar algunos resultados. Por ejemplo, en el modelo de Brücher y Jamall, parcialmente basado en la TOFT, la mayoría de las mutaciones somáticas se generarían tras la instauración del nicho precanceroso ³⁹. Esto también afectaría al abordaje terapéutico de las enfermedades, puesto que habría que incidir más en evitar la aparición del nicho precanceroso a través de intervenir en la inflamación crónica, que en revertir fenotipos avanzados del cáncer.

Dada la complejidad de las distintas enfermedades, es posible que cada caso de cáncer se ajuste mejor a una teoría o a otra, y por tanto sería mejor partir de una visión no censurada, dando cabida a las diferentes teorías. Cuestionar el *statu quo* de la carcinogénesis o tener una visión abierta de la misma no implica que los *hallmarks* propuestos por Hanahan y Weinberg no sean ciertos. De hecho, a nivel celular, nos permiten comprender mejor el cáncer como un conjunto de patologías. También hay que considerar la influencia de otros factores no contemplados directamente en los modelos de origen y desarrollo del tumor. Una visión que contemple las diferentes posibilidades para cada caso sin duda ayudaría al progreso en la investigación del campo de la oncología.

2. Cáncer de pulmón

De acuerdo con el diccionario de términos asociados a estas enfermedades del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI), el cáncer de pulmón se forma en los tejidos del pulmón, usualmente en las células que revisten las vías respiratorias. Los dos principales tipos en que se clasifica son el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP o SCLC, siglas del inglés *Small Cell Lung Cancer*) y el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM o NSCLC, del inglés *Non-Small Cell Lung Cancer*). A su vez, el CPNM se clasifica por sus características histológicas en adenocarcinoma (ADC) de pulmón y carcinoma

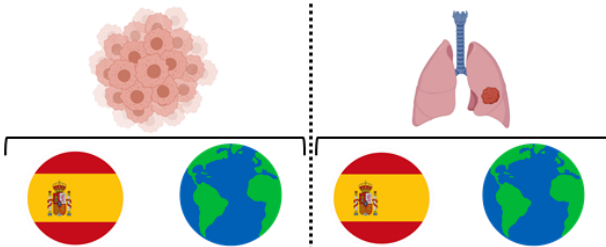
de células escamosas de pulmón (CCEP o SCC, de *squamous-cell carcinoma*), entre otros, siendo éste un diagnóstico empleado durante décadas y basado en la observación al microscopio ⁴⁵.

2.1. Estadísticas poblacionales del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es el tumor más frecuente en el mundo y el que presenta una mayor mortalidad global ⁴⁶. Se estima que en 2020 se han diagnosticado casi 30000 casos nuevos de cáncer de pulmón en España, siendo el cuarto más incidente tras el colorrectal, el de próstata y el de mama (Figura 3), y representa la primera causa de muerte por cáncer ⁴⁷. No obstante, el cáncer de pulmón no es muy prevalente, dada su alta mortalidad (Figura 3). De hecho, en términos absolutos es el que más fallecimientos causa en España al año (en torno a los 22000 por año). Aunque la frecuencia y la mortalidad han disminuido ligeramente en el sexo masculino, la mortalidad por cáncer de pulmón en el sexo femenino ha aumentado casi un 50 % en los últimos años como consecuencia de la posterior incorporación de la mujer al hábito de fumar, a su vez consecuencia de otros cambios sociales ⁴⁷. En España, la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) registra las cifras y elabora informes que publica anualmente. Los datos nacionales son muy parejos a los mundiales en el caso del cáncer de pulmón: incidencia del 10,71%; prevalencia del 3,73%; mortalidad del 19,6%; y supervivencia del 19% (Figura 3) ^{2,46}.

A escala global, el cáncer de pulmón supone el 18,4% de los decesos por cáncer al año, esto es, 1760000 muertes. Anualmente, el cáncer de pulmón suele ser el más incidente a nivel mundial, con unos 2100000 nuevos casos (el 11,6% de todos los nuevos tumores diagnosticados al año) (Figura 3). En esta cifra de incidencia hay una preponderancia de nuevos casos en hombres, siendo el 14,5% de los cánceres diagnosticados; mientras que en mujeres es del 8,4%, y sobresale el de mama, que supone el 24,2% de nuevos diagnósticos, es decir, uno de cada cuatro nuevos casos de cáncer. En el caso del cáncer de pulmón, a diferencia de otros tipos de tumores, no se apreciaba anualmente una brecha de la incidencia entre países con mayores índices de desarrollo y países en

desarrollo. En ambos casos fue el cáncer más incidente en hombres, mientras que en mujeres fue el cáncer de mama. La elevada mortalidad del cáncer de pulmón, derivada de su diagnóstico tardío, lo convierte en un cáncer poco prevalente y de muy baja supervivencia. En todo el mundo, la prevalencia del cáncer de pulmón a 5 años en el conjunto de todos los tipos de cáncer es del 4,86% (2130000 casos prevalecen). Tras 5 años, actualmente la supervivencia del cáncer de pulmón es del 19%, frente al 53% de todos los tumores (Figura 3). Para una mayor profundidad y contraste de datos, se recomienda recurrir a los informes anuales de las Estadísticas Globales sobre el Cáncer, del Observatorio Global sobre el Cáncer (GLOBOCAN) de la Organización Mundial para la Salud (OMS, WHO) ^{2,46}.



Incidencia <i>(nuevos diagnósticos/año)</i>	280000	18100000	30000 (10,71%)	2100000 (11,6%)
Prevalencia <i>(casos totales tras 5 años)</i>	772860	43840000	28830 (3,73%)	2130000 (4,86%)
Mortalidad <i>(muertes/año)</i>	112700	9600000	22100 (19,6%)	1760000 (18,4%)
Supervivencia <i>(5 años postdiagnóstico)</i>	53%		19%	

Figura 3. Estadísticas mundiales y nacionales (España) del cáncer de pulmón frente a todos los tumores en general. Cifras obtenidas de las bases de datos interactivas de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) de la Organización Mundial para la Salud (OMS, WHO), a través de GLOBOCAN, y de los informes de la SEOM para todos los tumores (columnas de la izquierda) y para cáncer de pulmón (columnas de la derecha), pertenecientes a los años 2018, 2019 y 2020.

Estas cifras convierten al cáncer de pulmón en un problema de salud de enorme magnitud donde cabe potenciar la prevención y diagnóstico temprano, ya que el éxito del tratamiento es altamente dependiente del estadio de diagnóstico.

2.2. Cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico

El cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP, o *small cell lung cancer*, SCLC), también conocido como cáncer de pulmón microcítico, supone el 13-15% de todos los tipos de cáncer de pulmón. El origen del CPCP se asocia a las células neuroendocrinas del pulmón, siendo un carcinoma diferenciado. Físicamente, su inicio suele situarse en los bronquiolos, y tiende a invadir regiones torácicas con cierta facilidad. Es por ello que, muchas veces, tras una primera respuesta positiva al tratamiento con quimioterapia/radioterapia, se produce una recidiva ⁴⁸. La primera línea de tratamiento es quimioterapia basada en cisplatino, con la posible aplicación local de radioterapia, seguida de una segunda línea de tratamiento basada en inhibidores de topoisomerasas como el topotecan, irinotecan o etopósido (en raras ocasiones se recurre a una tercera línea de tratamiento quimioterápico, la cual además no es específica ⁴⁹).

Su rápida proliferación y su pronta extensión aumentan su tasa de mortalidad al 95% ⁵⁰. Es un tipo de cáncer muy vinculado al consumo prolongado de tabaco ⁵¹. En conjunto, al contrario que en el del CPNM, el progreso en los tratamientos del CPCP ha avanzado poco en las últimas dos décadas.

2.3. Cáncer de pulmón no microcítico

El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM, o *non-small cell lung cancer*, NSCLC) engloba aproximadamente el 80-85% de todos los casos de cáncer de pulmón ⁵². A pesar de las mejoras recientes en las tasas de mortalidad gracias a la incorporación de líneas de inmunoterapia y terapias dirigidas, la supervivencia a los 5 años sigue siendo inferior al 20% ⁵³.

Ya se ha anticipado que un problema del cáncer de pulmón es su tardío diagnóstico, pues los síntomas se enmascaran con otros de problemas respiratorios como toses o dolor en el pecho. Más del 60% de los casos se diagnostican en estadio III-IV, ya muy avanzado o con metástasis. Pocos son los casos en los que todavía el diagnóstico se produce a tiempo de que el tumor sea extirpado quirúrgicamente (estadio I-II) ⁵⁴.

La clasificación morfológica tradicional de los subtipos de CPNM es la siguiente: adenocarcinoma de pulmón (ADC), carcinoma de células escamosas de pulmón (CCEP o SCC, de *squamous-cell carcinoma*) y carcinoma de pulmón de células grandes (CPCG o LCC, de *large-cell carcinoma*). Los dos subtipos mayoritarios en CPNM son el ADC y el CCEP. El ADC supone aproximadamente el 50% de todos los casos de CPNM (y el 43% de todos los casos de cáncer pulmón) ⁵⁵⁻⁵⁷, mientras que el CCEP engloba en torno al 33-40% de los CPNM (25-30% de todos los tumores de pulmón) ^{58,59}. El CPCG es minoritario, representando el 3-7% de todos los cánceres de pulmón. El CPCG, además, se trata como un grupo heterogéneo de neoplasias pulmonares que cursan con bastante indiferenciación (aspecto diferente al de las células de las cuales se originan), por lo que a menudo engloba a tumores que citológicamente no se pueden clasificar como ADC, CCEP o CPCP. Un subtipo de CPCG es el carcinoma neuroendocrino de células grandes (CNECG o LCNEC, de *large-cell neuroendocrine cancer*), distinguido del CPCP por el mayor tamaño de sus células ^{58,60}.

Cabe tener en consideración que, con el desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva y otras técnicas de alto rendimiento, se ha observado una amplia variabilidad y heterogeneidad en los subtipos genéticos y moleculares de CPNM, lo cual ha llevado a redefinir la enfermedad también a nivel genético, y a modificar las directrices de evaluación clínica y tratamiento en la última década ⁶¹.

2.3.1. Estadificación del CPNM

Acorde con los parámetros establecidos por el AJCC (Comité Conjunto Americano del Cáncer, *American Joint Committee on Cancer*), el CPNM (y otros tumores sólidos) se clasifica en estadios para abordar el volumen y su nivel de diseminación, lo cual se traduce en cuánto ha progresado la enfermedad. En función de este sistema se hace un pronóstico de la enfermedad y el abordaje clínico correspondiente.

La nomenclatura del sistema utiliza las letras T, N, M para referirse a tres variables de la enfermedad, y numeraciones crecientes (0-4) para evaluar la progresión dentro de cada variable. La T (tumor) se refiere al tamaño del tumor y su extensión a tejidos adyacentes; la N (nódulo, sinónimo de ganglio) hace referencia a la diseminación a ganglios linfáticos locales; y la M (metástasis) ya indica la existencia de metástasis, es decir, su diseminación a otras regiones del cuerpo ⁶².

Este sistema está en constante revisión, y hay autores que sugieren incluir también el estatus mutacional en alguno de sus parámetros. En CPNM, por ejemplo, se propone incluir la mutación en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) en el descriptor M dada la correlación entre esta mutación y la supervivencia de los pacientes en estadio avanzado de la enfermedad ⁶³.

2.3.2. Diferenciación de un carcinoma

Otra forma de clasificar un carcinoma es según su grado de diferenciación. Se considera diferenciado cuando las células que constituyen el tumor son semejantes al tipo celular a partir del cual se originó el cáncer. Cuando conserva algunas características se considera moderadamente diferenciado, mientras que si las células no conservan prácticamente el aspecto (morfología) del tipo original se denomina pobremente diferenciado ⁶⁴.

2.3.3. Adenocarcinoma de pulmón

El adenocarcinoma (ADC) se posiciona como el subtipo de cáncer de pulmón más común, dato consolidado desde hace un par de décadas, desde cuando el consumo de tabaco empezó a descender. Esto es debido a que, si bien el tabaco es un agente causante del mismo, la asociación tumor-agente no es tan estrecha como sí sucede con el cáncer de células escamosas ^{58,59}.

La morfología celular del adenocarcinoma es glandular, es decir, las células se asemejan a las células de las regiones glandulares secretoras de moco en los pulmones. Los adenocarcinomas suelen emerger en el pulmón distal, es decir, en los bronquiolos y alvéolos. Esto coincide con la expresión de proteínas específicas de esa región como la citoqueratina 7 (CK7) y el factor de transcripción tiroideo-1 (TTF1) ⁵⁸.

2.3.3.1. Clasificación clínico-morfológica del adenocarcinoma de pulmón

Distintos adenocarcinomas de pulmón pueden tener una morfología muy diferente a la hora del diagnóstico clínico. Una clasificación tradicional de éstos hace referencia a la histología del tumor diagnosticado, siendo los principales patrones histológicos acinar, lepidico, papilar, micropapilar y sólido. Así, se denomina “acinar” al tumor cuyo conjunto de células tienen forma de racimo, que es la forma en que suelen acabar las glándulas exocrinas, es decir, con un lumen central rodeado de células tumorales. En ocasiones, “acinar” se emplea como sinónimo de “alveolar” ⁶⁵. El patrón de tipo “lepidico” se considera menos invasivo que los tipos acinar, sólido y papilar. Este concepto es una adaptación del inglés *lepidic*, que fue acuñado por el médico inglés John George Adami de la Universidad McGill (Montreal, Canadá) en 1902, haciendo referencia a neoplasias derivadas de células que revisten superficies, en contraposición a los tumores derivados de tejidos conectivos. En el contexto del adenocarcinoma pulmonar, “lepidico” hace referencia a un patrón de células que se escaman en los confines alveolares ⁶⁶. Los tumores papilares son los que presentan una morfología digitiforme, es decir, parecen dedos por su aspecto fino y alargado. El carcinoma micropapilar de pulmón se distingue porque aparecen pequeños conjuntos de células glandulares y forma papilar flotando en los espacios aéreos o mucinosos del pulmón, sin estar rodeado de tejido fibrovascular (el papilar sí lo está) ⁶⁷. En el patrón sólido predominan las células con mucina intracitoplasmática y sin presencia (o escasa) de otros patrones. Otros patrones histológicos minoritarios son el invasivo mucinoso, el coloide, el fetal y el entérico. Para mayor profundidad, cabe recurrir a la clasificación más actualizada según la OMS ^{54,68}.

2.3.3.2. Genómica del adenocarcinoma de pulmón

Existen diferentes maneras en clínica para categorizar a un tipo de tumor. De cara a la toma de decisiones terapéuticas, se recurre a subtipos moleculares que, en función de mutaciones en ciertos genes, puedan mostrar sensibilidad o resistencia a quimioterapia, terapias dirigidas, terapia hormonal o inmunoterapia. El ADC de pulmón presenta mutaciones conductoras o *driver mutations* en genes como *KRAS* (mutado en el 25% de los casos), *EGFR* (17%) y *ALK* (7%). Otros genes cuyas alteraciones se han mostrado como relevantes en el desarrollo del ADC son *HER2* (2%), *BRAF* (3%), *ROS1* (2%), *RET* (2%), *NTRK1* (5%), *MET* (3%), *MAP2K1* (5%), *PIK3CA* (1%) y *NRAS* (5%). Se estima también que el 31% de los ADC presentan mutaciones relevantes no descritas todavía, y que el 3% de los casos presenta doble mutación o más de las ya conocidas, siendo algunas mutaciones excluyentes unas de otras ⁶⁹⁻⁷² (Figura 4).

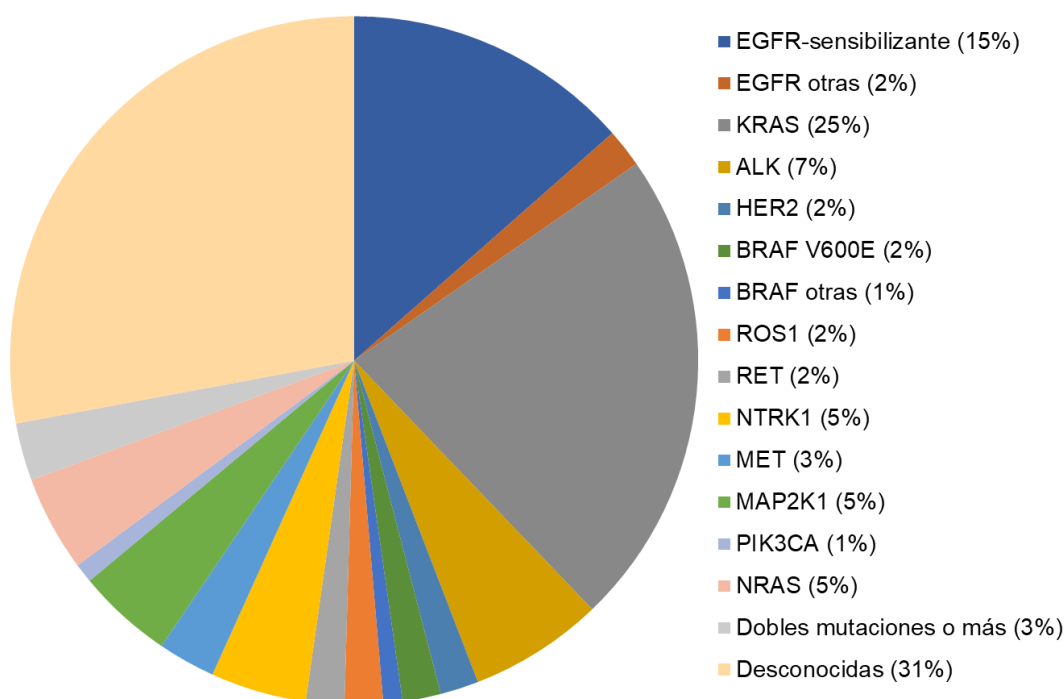


Figura 4. Principales mutaciones oncogénicas presentes en adenocarcinoma de pulmón (ADC) ⁶⁹⁻⁷³.

Como se observa en la Figura 4, son comunes las mutaciones en receptores tirosina-quinasa, como *EGFR*, *ALK*, *HER2*, *ROS1*, *RET*, *NTRK1* y *MET*. Pero también en proteínas de señalización como *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *MAP2K1* y

PIK3CA. Los genes que codifican receptores, guanosinas trifosfatasa (GTPasas) y quinasas son ampliamente estudiados en cáncer. No obstante, en ADC también cabe destacar la presencia de alteraciones en genes que codifican para factores epigenéticos como *MLL2* y *DNMT3A*; factores de transcripción como *MYC* y *SOX2*; E3-ubiquitín ligasas como *KEAP1*; proteínas del ciclo celular como *CDKN2A*; y genes supresores tumorales esenciales como *TP53*, *LKB1* y *PTEN* ⁷⁴. El avance en el conocimiento del estatus mutacional del ADC de pulmón ha promovido que para el diagnóstico se secuencie el ADN extraído del tumor primario para identificar algunas de las mutaciones que predicen si el paciente se puede beneficiar de un determinado tratamiento, ya que en algunos casos como la presencia de mutaciones en *EGFR* o *ALK* existen terapias asociadas como son los inhibidores de la tirosina quinasa (ITQ) ^{75,76}.

2.3.4. Carcinoma de pulmón de células escamosas

El carcinoma de células escamosas de pulmón (CCEP), también llamado carcinoma escamoso o epidermoide, es el segundo cáncer de pulmón más común. Hace más de dos décadas se situaba como el tumor de las vías aéreas más incidente a raíz de su fuerte vinculación al tabaquismo ⁵⁹.

En este caso, la morfología celular es semejante a la de las células planas o escamosas que revisten las vías respiratorias, de ahí la terminología para denominar a este tumor. Concretamente, al epitelio columnar pseudoestratificado que reviste la tráquea y vías más proximales ⁷⁷. Este origen en vías más altas correlaciona con el mayor impacto del tabaco en este subtipo como factor de riesgo. Al contrario que el ADC, presenta marcaje positivo para las citoqueratinas 5 y 6, y el factor de transcripción p63 ⁵⁹.

2.3.4.1. Genómica del carcinoma de pulmón de células escamosas

El CCEP, debido a su asociación con el tabaco, se caracteriza por su complejidad genómica y una alta carga mutacional general, es por ello que el progreso en la terapia personalizada de CCEP respecto a ADC ha sido más modesto. De hecho, al contrario que en ADC de pulmón, donde la detección de mutaciones y el perfil genómico son parte del abordaje diagnóstico y terapéutico, en CCEP la información de eficacia de nuevas terapias es más limitada. Las mutaciones más presentes en CCEP, algunas coincidentes con el ADC, son las siguientes: *PTEN* (mutado en el 18% de los CCEP de pulmón), *FGFR1* (17%), *PIK3CA* (14%), *PDGFRA* (9%), *MET* (6%), *EGFR* (5%), *DDR2* (4%) y *FGFR2* (3%). El 24% de casos poseen mutaciones desconocidas ⁷⁸⁻⁸¹ (Figura 5). El descubrimiento de estas mutaciones ha impulsado el desarrollo e investigación de agentes dirigidos que pueden mejorar la terapéutica de esta enfermedad.

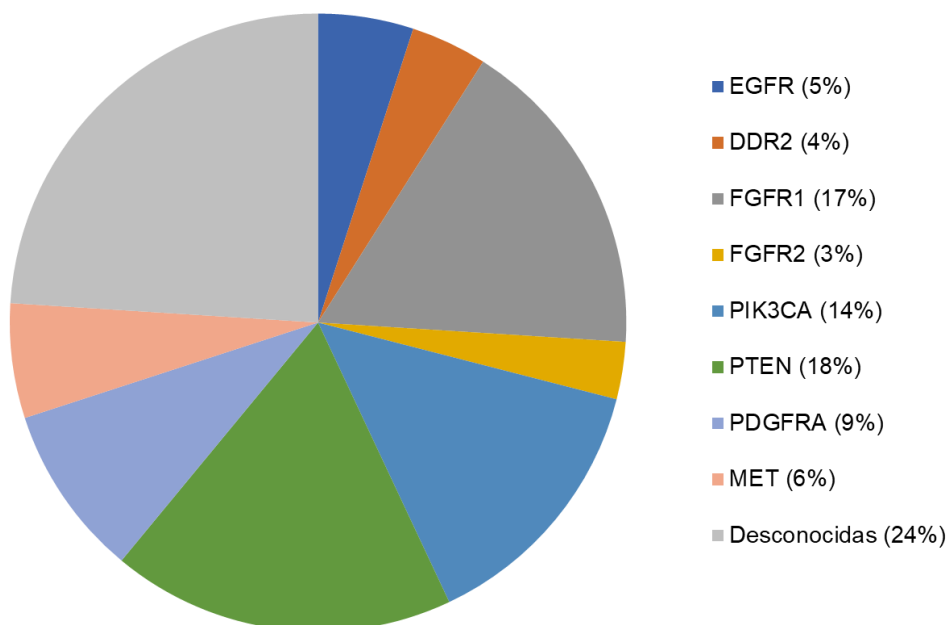


Figura 5. Principales mutaciones oncogénicas presentes en carcinoma de células escamosas de pulmón (CCEP) ^{73,82}.

2.3.5. Tratamiento y terapias personalizadas del CPNM

Una vez realizado el diagnóstico de estadio tumoral, clasificación anatomopatológica, estatus funcional del paciente (PS, o *Performance Status*) y perfil molecular, se opta por la terapia más conveniente. En los primeros estadios del CPNM se recurre a la cirugía para la extirpación de la masa tumoral, todavía localizada y sin extensión ⁸³. Esto sucede en el 20-30% de los casos, pues el cáncer de pulmón no suele presentar síntomas hasta estadios avanzados y, por tanto, la gran mayoría de pacientes son ya inoperables. La evolución tecnológica ha permitido que en algunos casos se utilice, incluso, la radiocirugía estereotáctica en estos estadios, que consiste en aplicar dosis elevadas de radiación en puntos espaciales muy precisos ⁸⁴. Además de la cirugía, o en casos donde esta no es aplicable, se emplean los abordajes terapéuticos tradicionales: radioterapia y quimioterapia. En ocasiones, cuando se ha aplicado la cirugía, se aplica quimioterapia adyuvante con cisplatino o derivados junto a vinorelbina, docetaxel y etopósido. En otros casos, se aplica quimioterapia o radioterapia neoadyuvante, es decir, antes de la intervención para reducir el tamaño tumoral y tener que recurrir a una cirugía menos extensiva ⁸⁵.

Para estadios más avanzados, también se utilizan cisplatino o derivados y quimioterápicos de tercera generación como gemcitabina, paclitaxel o vinorelbina ⁵⁹. La aplicación de radioterapia convencional se emplea también en estas fases, normalmente con fines paliativos. Suele prescribirse cuando no es posible la cirugía, pero el tumor está todavía localizado y el paciente presenta buen estado de salud ⁸⁶.

La determinación de las mutaciones en genes clave en cáncer en los últimos años ha abierto el campo de las terapias dirigidas ^{87,88}. En CPNM, desde principios del siglo XXI, se han utilizado diferentes terapias frente a dianas específicas, con menor toxicidad que la quimioterapia convencional. Sin embargo, a pesar de los progresos en el uso de las terapias dirigidas, el optimismo surgido de su aplicación ha sido atenuado por respuestas inconsistentes a estas terapias y la aparición de resistencia a las mismas en muchos pacientes ⁸⁹. Los mecanismos de resistencia pueden ser genéticos o epigenéticos ³⁴. Las terapias dirigidas más desarrolladas son los inhibidores de

tirosina quinasa (ITQ) y los anticuerpos monoclonales, que cuentan con varias generaciones de fármacos a su vez. En CPNM se han comercializado inhibidores de tirosina quinasa como el gefinitib, erlotinib, afatinib, osimertinib y necitumumab para pacientes con EGFR mutado (delección de 4 aminoácidos Δ LREA en el exón 19 y la mutación puntual L858R; y posterior adquisición de resistencia por mutación puntual T790M en exón 20) ^{88,90}; y los inhibidores de ALK como el crizotinib, alectinib y ceritinib para pacientes con mutaciones en este gen (en CPNM, especialmente reordenación de *ALK* con *EML4* formando el oncogén de fusión *EML4-ALK*) ⁹¹. También están en desarrollo fármacos dirigidos contra *MET*, *ERBB2* (HER2), *ROS1*, *BRAF*, *RET*, *NTRK1*, *MEK1* y *PIK3CA* ⁹². Además del estatus mutacional, se ha de tener en cuenta la histología del tumor. Por ejemplo, en adenocarcinoma de pulmón también se utiliza, en combinación con sales de platino, el bevacizumab, anticuerpo monoclonal que inhibe el VEGF actuando sobre la angiogénesis. Sin embargo, no se emplea en carcinoma escamoso de pulmón ⁹².

Por último, cabe citar el abordaje terapéutico más revolucionario en la última década: la inmunoterapia. Se basa en el uso de moduladores del sistema inmunológico para inhibir o estimular la respuesta de este frente a un tumor. Como se ha mostrado previamente, la evasión inmunitaria es uno de los *hallmarks* del cáncer. En CPNM se utiliza inmunoterapia cuando hay una recaída de la enfermedad después de las primeras líneas de tratamiento con quimioterapia o dirigidas, en casos en los que no se pueden aplicar las opciones ya comentadas de tratamiento o como terapia de consolidación para evitar la progresión tumoral. Los fármacos aprobados son anticuerpos monoclonales como nivolumab, atezolizumab y durvalumab. Estos fármacos tienen como diana la proteína de muerte programada-1 (PD-1) en linfocitos T y PD-L1 en las células tumorales. La interacción entre PD-1 y su ligando PD-L1 evita la destrucción de las células tumorales por parte de los linfocitos, por lo que bloquear receptor o ligando con anticuerpos monoclonales acaba estimulando al sistema inmunológico para atacar al cáncer ^{93,94}.

2.3.6. Factores de origen y factores de riesgo en CPNM

En relación a los rasgos generales del cáncer y factores que lo originan, y en relación a la teoría de la mutación somática y otros paradigmas, cabe destacar que tan solo el 8% de los cánceres de pulmón tienen una base hereditaria o emergen de una predisposición genética ⁹⁵, una cifra que ronda la media de 10% para otros tipos de cáncer. En general, el 15% de los cánceres se asocia a un origen infeccioso; denominándose la categoría restante “cánceres esporádicos”, es decir, de etiología desconocida o no precisada, y donde se incluirían el 70-80% de los casos. De estos últimos, un 15% acaba siendo asociado a alguna mutación somática, lo cual no quiere decir que el portarla sea la causa del origen del mismo de manera implícita (aunque el riesgo asociado para ese paciente sería mucho más elevado) ⁹⁶. En el caso concreto del cáncer de pulmón, más del 80% de los casos en los países occidentales se atribuye sobre todo a un factor de riesgo: el tabaco ^{57,97}.

La asociación del tabaco con el cáncer de células escamosas (CCEP) es superior a la del adenocarcinoma (ADC), por situarse el origen del tumor primario en regiones más proximales (tráquea y bronquios) ⁹⁷. El tabaco contiene múltiples sustancias carcinogénicas y tóxicas, que favorecen el entorno de inflamación crónica como nicho pretumoral y además fomentan la acumulación de mutaciones. De hecho, con la excepción del cáncer colorrectal, el cáncer de pulmón presenta un mayor número de mutaciones somáticas acumuladas que otros tipos de tumores. Y, particularmente, en fumadores hay diez veces más mutaciones que en no fumadores ⁹⁸. La elevada correlación entre el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón con la intensidad y la duración del hábito del tabaquismo muestra por qué éste es el principal factor de riesgo. También el riesgo de desarrollarlo en fumadores pasivos ⁹⁹.

Los agentes químicos y radiactivos son también factores de riesgo para desarrollar cáncer de pulmón. Existe una serie de carcinógenos presentes en el ambiente, sobre todo en algunas regiones con alta polución medioambiental y en ciertos entornos laborales, que también contribuyen a desarrollar tumores en pulmón. Los más señalados son amianto (o asbesto), sílice, hidrocarburos aromáticos, arsénico, radón, níquel, cromo, berilio, cadmio y silicio ^{100,101}.

Otro factor de riesgo es el factor genético. A pesar de que la etiología del cáncer de pulmón está altamente relacionada con el tabaco, el hecho de que no todas las personas fumadoras lo desarrollen y que otras personas que nunca han fumado sí lo hagan muestra la existencia de variables de predisposición genética ¹⁰². Un caso reseñable es la alta prevalencia de mutaciones *EGFR* en mujeres y en la población de Asia Oriental, y que predispone, en ese aspecto, a padecer cáncer de pulmón ¹⁰³.

Los malos hábitos alimenticios y otras rutinas cotidianas también se consideran factores de riesgo. La dieta es, al igual que para el desarrollo de otros tipos de tumores y enfermedades, el hábito diario que más puede influir en la aparición del cáncer de pulmón. En términos negativos, una dieta con elevada cantidad de grasa aumenta el riesgo de cáncer. También el fomentar un estilo de vida sedentario, con escaso ejercicio físico. Cabe destacar también en este apartado el alcohol, tóxico y promotor de múltiples patologías ^{104,105}.

Finalmente, padecer otras patologías, sobre todo relacionadas con el sistema respiratorio, también puede promover el desarrollo de cáncer de pulmón. Especialmente enfermedades con elevados componentes inflamatorios y fibróticos como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la fibrosis pulmonar idiopática ^{106,107}.

3. Células madre tumorales

Las células madre tumorales o *Cancer Stem Cells* (CSC), también conocidas como células iniciadoras de tumores o *tumor-initiating cells* (TIC), son células no diferenciadas con capacidad para iniciar tumores y con propiedades de células madre como son la capacidad de autorrenovarse, proliferar de manera indefinida y diferenciarse en múltiples tipos de células. Estas células, con mayor capacidad de resistencia a la quimioterapia y radioterapia, pueden entrar en quiescencia por un tiempo prolongado y colonizar otras partes del cuerpo. Por tanto, reúnen las características de células madre y al mismo tiempo son células tumorales ^{108,109}.

3.1. Breve historia de la teoría de las CSC

El campo de las CSC se inicia con el descubrimiento de las células madre hematopoyéticas por parte de Till y McCulloch en 1961 ¹¹⁰, aunque una serie de experimentos previos contribuyeron al nacimiento de dicho campo. En 1937, Furth y Kahn ¹¹¹ observaron que una célula única de tumor murino era capaz de iniciar un nuevo tumor en un nuevo ratón, experimento que posteriormente se convertiría en el referente para demostrar la presencia de CSC en un cáncer. También cabe destacar los ensayos de Belanger, Leblond y Clermont en los años 40 y 50 con autorradiografías de moléculas marcadas con isótopos radioactivos que desembocaron en la identificación de células madre en órganos adultos y a la enunciación de la teoría de la jerarquía y renovación de células madre. Las autorradiografías permitieron a estos autores observar que un tipo de espermatogonias entraban en quiescencia en vez de dar lugar a espermatogonia intermediaria. De esta manera, postularon que las células madre se dividían de manera asimétrica y que esto era necesario para mantener la proliferación de tejidos adultos ¹¹². En paralelo a Till y McCulloch, Pierce se encargó de llevar a cabo una serie de experimentos que mostraban que los teratomas contenían células muy tumorigénicas capaces además de diferenciarse en múltiples tipos celulares no tumorigénicos ¹¹³. En los años 60 y 70 se produjeron avances que mostraban que células sanguíneas malignas eran capaces de originar colonias en el bazo al implantarse en ratón ¹¹⁴ y también se observó que una pequeña fracción de células de tumores de distinto origen histopatológico (origen epitelial entre ellos) formaban colonias *in vitro* en agar suave ¹¹⁵. Como consecuencia de todo ello, la primera definición de célula madre tumoral ¹¹⁶ fue presentada por Pierce y Speers en 1988: células madre malignas con marcada capacidad para la proliferación y limitada capacidad para la diferenciación bajo condiciones homeostáticas normales que convierten al cáncer en un fenómeno de desequilibrio de la renovación tisular, y que forman el grueso del tumor junto a células diferenciadas potencialmente benignas. Esta definición se ha ido precisando a medida que se ha progresado en las investigaciones sobre las CSC en las últimas décadas.

En los años 90, el grupo de Pierce realizó estudios donde se implantaban subpoblaciones de células de leucemia aguda mieloide (*Acute Myeloid Leukemia*, AML) en ratones con inmunodeficiencia severa combinada (*Severed Combined Immunodeficient mice*, SCID). Gracias a avances en técnicas como la citometría de flujo activada por fluorescencia (*Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS), se observó que la subpoblación celular positiva para CD34 y negativa para CD38 (CD34⁺/CD38⁻) era la que iniciaba la leucemia, y que la proporción de estas células madre leucémicas (*Leukemic Stem Cells*, LSC) era de una entre un millón de células del tumor ¹¹⁷⁻¹¹⁹. Estos estudios demostraron la existencia de una subpoblación celular minoritaria con capacidad de iniciar tumores. La consolidación de la existencia de poblaciones CSC se produjo ya en 2003, cuando Al-Hajj, Clarke y colaboradores utilizaron la misma aproximación para identificar también una subpoblación celular (CD44⁺/CD24⁻) en cáncer de mama con capacidad de iniciar tumores al trasplantarla en ratón ¹²⁰. Este fue el inicio para la identificación de células madre tumorales también en tumores sólidos. Desde entonces se han aislado CSC de otros cánceres hematológicos y tumores sólidos y se postula que estas células formarían el núcleo clonogénico de estos tumores ¹²¹.

3.2. CSC: la teoría

Dos modelos teóricos de la evolución del cáncer han sido los predominantes en las últimas décadas: el modelo de la evolución clonal y el modelo jerárquico o de las CSC (ver apartado 1.1.3. *Teoría de la mutación somática, evolución clonal, y otras teorías no convencionales*). Este último, como ya se ha descrito, se inició en los años 60. No obstante, la enunciación por parte de Nowell ³⁵ del modelo de la evolución clonal en 1976 instaló este como el predominante en la investigación en cáncer hasta el siglo XXI. El éxito del modelo de la evolución clonal se debió a la fuerte correlación entre mutaciones en oncogenes/genes supresores de tumores y la carcinogénesis. A partir de 2003, el descubrimiento de poblaciones CSC en diferentes tumores sólidos reavivó el modelo jerárquico y ambas teorías siguen vigentes en la investigación en cáncer.

3.2.1. Aproximaciones recientes a la evolución del cáncer

Estudios en la última década han intentado aunar las características de los modelos de evolución clásicos del cáncer para aproximarse de manera veraz a la realidad del tumor, considerando todo el campo teórico generado previamente por ambos modelos. Cabe destacar, en este caso, el trabajo de Wang y colaboradores, que modelizaron a nivel matemático la evolución de las subpoblaciones de células de una línea de cáncer de colon, y observaron que se producían fenómenos parcialmente explicados por cada uno de los modelos: se precisan cambios como sugiere el modelo de evolución clonal para pasar de células tumorales no pluripotentes a CSC, pero también hay una población celular distintiva y una organización jerárquica como indica el modelo de las CSC¹²².

Otro modelo sugerido se sustenta en el hecho de que las células madre, tanto tumorales como normales, poseen propiedades inmunológicas distintivas, entre las que destaca el ser menos inmunogénicas y vigiladas por el sistema inmunológico. De esta manera, los nichos de CSC pueden experimentar la acumulación de mutaciones (referente al modelo de evolución clonal) evadiendo al sistema inmunológico. Este control inmunitario del cáncer sería, a su vez, más ineficaz con el paso del tiempo, puesto que las capacidades inmunológicas disminuyen de manera progresiva, y el tumor evolucionaría y se adaptaría a su propio crecimiento, bien porque la población CSC crece todavía más o porque las células tumorales normales adquieren más malignidad^{123,124}.

En cualquier caso, a pesar de las controversias pasadas en torno al modelo de las CSC, se acepta actualmente la existencia de estas subpoblaciones celulares y los fenómenos que dan lugar a una jerarquía intratumoral. Además, el microambiente tumoral está adquiriendo mayor relevancia porque explica también la complejidad de cada caso de cáncer en particular.

3.2.2. Teoría de las CSC

La teoría de las células madre tumorales (CSC) postula que las células se organizan de manera jerárquica en un tumor y que solo las células que conforman la cúspide de esa pirámide jerárquica son capaces de desarrollar un tumor con la heterogeneidad del cáncer original al implantarse en un ratón inmunocomprometido ¹²⁵. Estas CSC, además, tienen unos rasgos y origen característicos dentro de cada tipo de tumor.

El modelo de las CSC en tumores sólidos se construyó en base al conocimiento sobre las células madre hematopoyéticas, y con conceptos similares. El primero de ellos es que la heterogeneidad observada en un tumor deriva de su organización jerárquica y, a menudo, representa también la jerarquía del tejido de origen. En segundo lugar, esta jerarquía nace de las CSC, que se autorrenuevan y están presentes en baja proporción, ya que la mayor parte de la masa tumoral no son CSC. Otro rasgo es que la identidad como CSC está integrada innatamente en estas células, es intrínseca a ellas; y, parcialmente, prueba de ello es que las células no CSC rara vez originan tumores en ensayos de trasplante heterólogo o xenotrasplante. Por último, las CSC son quimiorresistentes y radiorresistentes, y se les atribuye la recaída en la enfermedad cuando se utilizan estas terapias. No obstante, no siempre se ha observado que las CSC estén determinadas de manera intrínseca, pues hay células tumorales normales que, tras adquirir plasticidad fenotípica por acumulación de mutaciones, dan lugar a CSC ¹²⁶.

3.2.3. Origen de las CSC

El origen de las CSC es ampliamente debatido, sobre todo por la probabilidad de que, dependiendo de contexto, éste sea diferente en cada caso. El origen de las CSC se relaciona con las células madre o progenitoras, ya sean células madre que sufren mutaciones durante el desarrollo temprano ¹²⁷ o células madre adultas de los tejidos (aSC, de *adult Stem Cells*) que adquieren mutaciones ¹²⁸. En este segundo caso, se asume que al menos algunos de los marcadores que permiten caracterizar a las aSC también permiten identificar

CSC. No necesariamente deben ser aSC, también puede tratarse de células progenitoras ¹²⁹. La posibilidad de que deriven de células progenitoras que han sufrido transformación oncogénica es plausible en tanto que esta población es más abundante en tejidos que las aSC ¹³⁰.

Por otro lado, se ha observado la posibilidad de que cualquier célula tumoral, con la acumulación de mutaciones, pueda llegar a adquirir rasgos de célula pluripotente y por desdiferenciación dar lugar a CSC, como sucede en algunos modelos de cáncer de próstata ¹³¹.

El microambiente tumoral también se observa cada vez más esencial para determinar el origen de las CSC. La propia población de CSC puede ser diversa y heterogénea dentro de un tumor, con una subpoblación de las mismas más adaptadas al ambiente original y otras potencialmente mejor adaptables a los tejidos a colonizar ^{132,133}.

3.3. CSC: características, rasgos oncogénicos diferenciales y abordajes terapéuticos

Como se ha comentado, las CSC se definen de una manera funcional por su capacidad de autorrenovación, de iniciar tumores y de diferenciarse en diversos tipos celulares, recapitulando la heterogeneidad tumoral. A nivel molecular, las CSC suelen expresar marcadores de las células madre normales del tejido adulto de origen ^{109,134}. Las vías de señalización de desarrollo, como son las vías de Notch, Wnt, Hedgehog (HH) e Hippo, están alteradas en las CSC y tienen funciones reguladoras clave que apoyan el mantenimiento y la supervivencia de estas células ¹³⁵. A diferencia de las células madre normales, las CSC no tienen un control homeostático que regule las propiedades de autorrenovación y diferenciación según estímulos externos, y por tanto no presentan una limitación de proliferación ¹³⁶.

Evidencias crecientes relacionan a estas células con la agresividad del cáncer, progresión tumoral, evasión del sistema inmunológico y resistencia a terapias convencionales ¹³². Algunas CSC muestran plasticidad intrínseca porque

expresan factores de transcripción de célula madre como Oct3/4, Sox2 y Nanog y, por tanto, son capaces de modificar su fenotipo para adaptarse mejor al microambiente tumoral y para resistir a terapias ¹³⁷. Pero la plasticidad intrínseca no es un rasgo universal a todas las CSC, pues ciertos estudios han mostrado que en algunos tipos de tumores (e.g.: cáncer de mama) las poblaciones no CSC son igual de plásticas que las CSC, pudiendo ambas dar lugar a la heterogeneidad tumoral ¹³⁸. De hecho, en ciertos casos como algunos modelos de cáncer colorrectal, la plasticidad intrínseca es contextual, y se asocia a señales del microambiente tumoral como, por ejemplo, mantener una cierta concentración de ligandos de Wnt en el nicho ¹³⁹. Otros modelos, como el glioblastoma, sí parecen ceñirse mejor a la estructura jerárquica donde la regeneración tumoral es muy dependiente de una subpoblación CSC ¹⁴⁰.

Las células tumorales también tienen el metabolismo alterado, lo que ha dado lugar a buscar estrategias terapéuticas frente a ello. El ejemplo más conocido es el uso preferencial en tumor de la vía glicolítica en vez de la respiración mitocondrial incluso en presencia de oxígeno, conocido como efecto Warburg. Todavía es motivo de debate si el metabolismo de las CSC y el de las células tumorales diferenciadas tienen rasgos distintivos o no. Mientras que algunos apuntan a que no se observan diferencias categóricas ^{141,142}, sí existen casos, como las células madre de glioma, que muestran plasticidad metabólica para variar de fosforilación oxidativa a glicólisis según disponibilidad de nutrientes ¹⁴³. El uso de la glicólisis para la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) se ha visto más acentuado en CSC que en células tumorales diferenciadas, donde la obtención del ATP depende más de la fosforilación oxidativa. No obstante, también se ha observado una complementariedad de la glicólisis y la fosforilación oxidativa en CSC, donde generalmente se han descrito mitocondrias más activas, un rasgo asociado a su plasticidad. Entre otros, el metabolismo de la glutamina y el de los ácidos grasos también se ha apuntado como diferente en CSC frente a las células tumorales diferenciadas ¹⁴⁴.

Todos estos rasgos son también una ventana para diseñar estrategias terapéuticas frente a las CSC, en tanto que éstas se postulan como las responsables de la recidiva. De hecho, también se asocia la resistencia a

terapias con la presencia de CSC, especialmente a quimio y radioterapia, por su habilidad para entrar en quiescencia o en un estado de proliferación lenta ¹⁴⁵. Las propuestas terapéuticas para atacar las CSC pasan por inhibir rutas de señalización alteradas como la vía de Wnt ¹⁴⁶, Notch ¹⁴⁷, Hedgehog (HH) ¹⁴⁷ e Hippo ¹⁴⁸; reducir la subpoblación celular con anticuerpos que se unan a marcadores de superficie de CSC y conjugados a otros fármacos ¹⁴⁹; terapia epigenética ¹⁵⁰; o atacar directamente a las CSC quiescentes para mantenerlas siempre en ese estado inactivo, para reactivarlas e incrementar su sensibilidad a fármacos antiproliferativos, para directamente erradicarlas u optar por una estrategia combinada ^{151,152}. Los avances en este campo han dado lugar a la realización de múltiples ensayos preclínicos y clínicos, y a la aprobación de compuestos como, por ejemplo, el Vismodegib y el Sonidegib como inhibidores de SMO (*Smoothened*, de la ruta de Hedgehog) ^{148,153}. También se ha producido la retirada por toxicidad de algunos compuestos aprobados y la posterior recomercialización de los mismos (e.g.: conjugados anticuerpo-fármaco frente a población CD33⁺ en leucemia ^{154,155}).

El poco éxito terapéutico para eliminar las subpoblaciones de CSC, y el distinto origen de éstas, ha provocado que se proponga actuar sobre el nicho donde se encuentran para eliminarlas de manera indirecta. Esta idea deriva de la necesidad de un entorno que favorezca el mantenimiento de la pluripotencia, como sucede en las regiones que albergan las células madre adultas en los tejidos ¹⁵⁶. No obstante, se ha observado que a medida que progresa el tumor, las células son menos dependientes de su nicho original, a través de cambios en la señalización celular que les proporcionan ventajas adaptativas en otros ambientes ¹⁵⁷. La población CSC crecería en proporción a las células tumorales diferenciadas. Este proceso es clave en la metástasis y colonización de nuevos tejidos. En este punto, la forma de atacar terapéuticamente las CSC volvería a ser a través de debilidades propias de la subpoblación de células en el proceso de migración e invasión ¹⁵⁸. En la Figura 6 se muestra un esquema del concepto más actual de las CSC (Figura 6A) y la progresión tumoral en torno al nicho (Figura 6B) ¹²⁶.

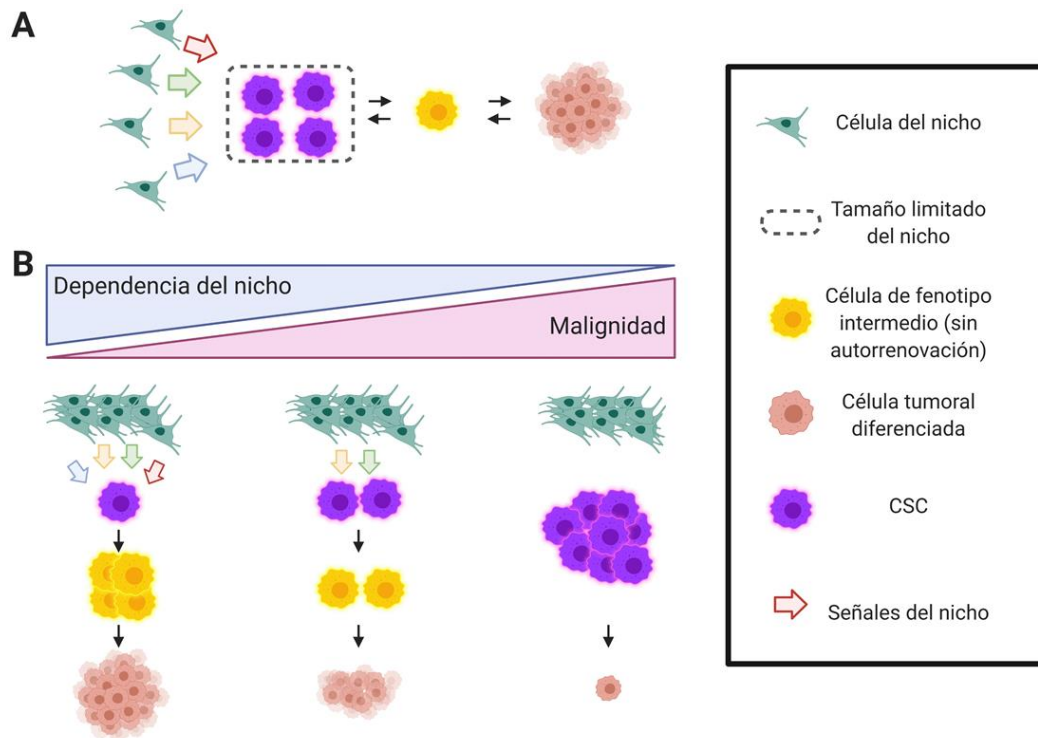


Figura 6. Conceptos vigentes en el campo de las CSC. A) Visión actualizada de la jerarquía de las CSC. Las CSC no son necesariamente una población rara o quiescente y su destino está muy determinado por las señales del nicho y por la dinámica de competición neutral, donde la progenie de las CSC también depende del nicho. Las células intermedias y las tumorales pueden reprogramarse en CSC por señales del nicho y gracias a cierta plasticidad. B) Dependencia de factores del nicho por parte de las CSC. A medida que el tumor evoluciona, las CSC se vuelven más agresivas y menos dependientes del propio nicho. En fases avanzadas, esta independencia dificulta la diferenciación, habiendo cada vez más CSC y menos células tumorales diferenciadas. Adaptada de Battle y Clevers ¹²⁶. Creado con Biorender.com.

3.4. CSC en cáncer de pulmón

Tras el descubrimiento de CSC en cáncer de mama en 2003 ¹²⁰, se empezaron a descubrir poblaciones de CSC en otros tumores sólidos como el cáncer cerebral ¹⁵⁹, de próstata ¹⁶⁰ y cáncer de pulmón ¹⁶¹.

En el pulmón, se ha propuesto que las CSC puedan derivar de las células madre adultas o progenitoras presentes en el órgano, tanto en regiones más proximales como distales. Entre los tipos celulares sugeridos para dar lugar a CSC destacan las células Club de los bronquiolos ¹⁶², los pneumocitos tipo II de los alvéolos y las células madre broncoalveolares (*Bronchioalveolar stem cells*, BASC) ¹⁶³. También se han descrito otros tipos celulares que actúan como progenitores en

presencia de daño tisular ¹⁶⁴. Los pneumocitos tipo II participan de ese rol, pero también las células pulmonares neuroendocrinas (*Pulmonary neuroendocrine cells*, PNEC) ¹⁶⁵. Las células madre broncoalveolares (BASC), por otro lado, también reparan el tejido pulmonar en rescate de las células Club, sobre todo en el epitelio distal ¹⁶⁶. No obstante, las CSC de pulmón, como se ha comentado en el apartado del origen de estas subpoblaciones, no tienen por qué derivar exclusivamente de células progenitoras o madre adultas, y pueden formarse a partir de células diferenciadas que se desdiferencian ¹⁶⁷. Todo ello es plausible en un órgano en estrés oxidativo permanente, exposición a mutágenos y con diversidad de tejidos (de los cuales, a su vez, y como se ha comentado en el apartado 2. *Cáncer de pulmón*, derivan distintos tipos de tumores pulmonares ⁶¹).

3.4.1. Características moleculares de las CSC en cáncer de pulmón

3.4.1.1. Proteínas de superficie

En las dos últimas décadas, con el descubrimiento de las CSC en diversos tumores sólidos, se ha realizado una búsqueda intensa para identificar a los biomarcadores que permitan describir estas subpoblaciones celulares en cada tipo de cáncer. Los marcadores más habituales son proteínas de la superficie y, más concretamente, moléculas de adhesión celular. Pero también se han estudiado las rutas de señalización alteradas en las CSC, factores de transcripción y enzimas que participan en la detoxificación como la aldehído deshidrogenasa (ALDH). En ocasiones, se han propuesto los mismos marcadores para diferentes tumores. Un ejemplo es la proteína CD44, identificada en CSC de cáncer de mama ¹⁶⁸, colon ¹⁶⁹, hígado ¹⁷⁰, ovario ¹⁷¹, páncreas ¹⁷², próstata ¹⁶⁰ y pulmón ¹⁷³.

Para identificar los marcadores de superficie y posteriormente detectar subpoblaciones de CSC mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen a estas proteínas de superficie, se ha utilizado especialmente la separación de poblaciones celulares por citometría de flujo (FACS), como ya se había hecho con tumores hematopoyéticos. En cáncer de pulmón, múltiples proteínas de superficie han sido estudiadas como potenciales marcadores CSC.

Algunas de estas proteínas, con resultados prometedores pero dispares son: CD44^{174,175}, CD133^{161,176–179}, CD90^{180–182}, CD166^{183–186}, CD326^{179,187–189}, CD34¹⁷⁹ y ALDH1^{190–193}. Algunas de estas proteínas han sido descritas con mejores resultados como marcadores de CSC o por su valor pronóstico en otros tipos de tumores. En la Tabla 1 se enumeran sus principales características.

Tabla 1. Principales marcadores de superficie de CSC identificados en cáncer de pulmón. El nombre de la proteína es su denominación como cúmulo de diferenciación (CD, *Cluster of Differentiation*), es decir, como marcador de reconocimiento en superficie. El nombre del gen se ha obtenido en las base de datos de HUGO (*HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute*, Comité de Nomenclatura de Genes del Instituto Europeo de Bioinformática, HGNC-EBI)¹⁹⁴ y Genecards¹⁹⁵.

Proteína	Gen	Función general	Observaciones en cáncer de pulmón
CD44	CD44	Glicoproteína de membrana. Uniones célula-célula, célula-matriz, adhesión celular y migración. Receptor de ácido hialurónico, colágeno, integrinas y metaloproteinasas de la matriz.	Células CD44+ poseen características de célula pluripotente. En la línea A549 se ha descrito como menos efectiva para detectar CSC.
CD133	PROM1	Glicoproteína transmembrana. Expresada en células madre adultas (aSC).	Células CD133+ son más tumorigénicas y se autorrenuevan. Resultados contradictorios, con CD133- también tumorigénicas. Células CD133+ propuestas como CSC en tumores primarios de CPNM junto a CD34+ y CD326+.
CD90	THY1	Glicoproteína de membrana. Adhesión celular. Señalización intercelular, especialmente en sistema inmunológico y nervioso. Expresada en células madre hematopoyéticas.	Células CD90- poseen características CSC en CPCP. Marcador mesenquimal en CPNM. Marcador CSC en la línea A549 de CPNM.
CD166	ALCAM	Proteína transmembrana perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas. Unión célula-célula en epitelio. En sistema inmune se une a CD6 de linfocitos en maduración durante la activación. En sistema nervioso tiene papel en el crecimiento axonal.	Resultados contradictorios como marcador CSC en CPNM. En tumores primarios, células CD166+ muestran pluripotencia. Otros autores cuestionan su asociación con CSC pero resaltan su valor pronóstico.
CD326	EPCAM	Glicoproteína transmembrana de adhesión epitelial. Señalización al citoesqueleto. Papel en diferenciación y proliferación.	En línea de CPNM H460 se ha propuesto como parte de una firma CSC. Otros autores sugieren que las células CD326+, junto a las CD133+ y CD34+, representan a la subpoblación CSC en CPNM (línea A549). Asociado a progresión en muchos carcinomas.
CD34	CD34	Unión de células madre a médula ósea y a células del estroma. Presencia en células hematopoyéticas especialmente. En tejido, asociada a células madre adultas.	En tumores primarios de CPNM las células CD34+ fueron propuestas como CSC junto a las células CD326+.
ALDH1	ALDH1A1	Enzima aldehído deshidrogenasa que participa en detoxificación. Presente en células madre en general. Papel citoprotector, en diferenciación y en proliferación.	Asociado a población CSC en tumores primarios de CPNM junto a poblaciones de células CD133+. También se ha observado que las células ALDH+ son más tumorigénicas, con capacidad de autorrenovación y responsables de quimiorresistencia en CPNM, junto a células CD44+. Un metaanálisis también ha mostrado su asociación a peor supervivencia.

3.4.1.2. Rutas de señalización alteradas en CSC de pulmón

Existen diferencias en el control de las principales vías de autorrenovación y diferenciación en células madre tumorales respecto a células madre normales. Las rutas de señalización más desreguladas en CSC, y que por otro lado están finamente reguladas en células madre normales, son la de Notch, Hedgehog y Wnt/ β -catenina ¹⁴⁷.

La vía de Notch, esencial durante el desarrollo embrionario, tiene importancia en el cáncer porque mutaciones en algunas de las proteínas de esta vía se asocian a la progresión tumoral. Los receptores Notch (Notch 1 a Notch 4) y los ligandos *Delta-like* (DLL 1, 3, 4) y *Jagged* (Jag 1 y 2) son los principales componentes de la ruta, y los que presentan las citadas mutaciones, sobre todo *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3* y *NOTCH4*. La unión del ligando activa la proteólisis del Notch y genera un péptido conocido como Notch intracelular (NICD). El fragmento NICD migra al núcleo donde forma un complejo con RBPJ (*Recombining binding protein suppressor of hairless*) y *Mastermind* para activar la transcripción de genes dianas. Las funciones de la ruta de Notch son muy dependientes de contexto. Por ejemplo, mantiene las células progenitoras del intestino, induce la diferenciación en la maduración de linfocitos en el timo, o es oncogénica en células de la médula ósea. En el caso del CPNM se ha descrito la activación de esta, y se relaciona con la metástasis y peor pronóstico. Experimentos *in vitro* e *in vivo* con CSC, que tienen esta vía sobreactivada, han mostrado su importancia en la formación de esferas tumorales, autorrenovación, heterogeneidad e iniciación del tumor en modelos de ratón ^{196–202}.

La ruta de Hedgehog es importante en la regulación del equilibrio proliferación-diferenciación de células madre embrionarias y adultas. Sus principales componentes son los ligandos *Sonic Hedgehog* (SHH), *Indian Hedgehog* (IHH) y *Desert Hedgehog* (DHH), los receptores transmembrana *Patched Homolog* (PTCH 1 y 2), el receptor acoplado a proteína G *Smoothed* (SMO) y el factor de transcripción Gli. La unión del ligando libera SMO del control por *Patched* y permite que Gli escape de su fragmentación. Gli intacto se acumula en el núcleo, donde actúa como activador transcripcional. Respecto a la relación entre la vía Hedgehog y cáncer, un buen ejemplo es el síndrome de Gorlin, que implica el

desarrollo de carcinomas esporádicos, y se origina por una mutación en *PTCH1*. En pulmón normal, se ha observado que la ruta está inactiva en todo el epitelio excepto en células progenitoras, facilitando la labor regeneradora de éstas. En CPNM, la relevancia de la ruta Hedgehog no está totalmente clarificada. Algunos ensayos muestran que su bloqueo aumenta la sensibilidad a inhibidores tirosina-quinasa en *EGFR* mutado ^{203–208}.

La ruta de Wnt/ β -catenina (*Wingless-type protein*), conservada evolutivamente, es esencial en el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la homeostasis tisular. Regula múltiples procesos de supervivencia, autorrenovación, proliferación, diferenciación, migración y polaridad. Está compuesta por, al menos, 19 ligandos Wnt y más de 15 receptores y correceptores que abarcan hasta siete familias proteicas. El complejo de degradación de β -catenina regula negativamente esta vía en ausencia de las proteínas Wnt. En cáncer, se han identificado mutaciones en proteínas de esta ruta y su prevalencia en determinados tumores, como son mutaciones en las proteínas APC y CTNNB1 en cáncer colorrectal. En CPNM, en general, se ha observado una activación constitutiva de la vía de Wnt, con estudios donde su inhibición con anticuerpo monoclonal (anti-Wnt-1) o ARN pequeño de interferencia (siARN) induce la apoptosis y reduce la proliferación y capacidad invasiva en xenotrasplantes. Por otro lado, la sobreexpresión de componentes de la ruta como *WNT3* contribuye a la metástasis y el crecimiento celular independiente de anclaje *in vitro*. En pacientes de CPNM se ha observado un incremento generalizado en la expresión de proteínas de Wnt y se ha relacionado con un peor pronóstico de la enfermedad. También se ha propuesto que esta ruta ayuda a mantener la población de CSC de pulmón ^{209–218}.

Además de estas tres rutas de señalización, otras también han sido relacionadas con las células madre tumorales. Una de ellas es la ruta de JAK/STAT, cuya activación apunta a un aumento de la expresión de moléculas de adhesión, crecimiento y supervivencia de células tumorales. La señalización del factor de transcripción STAT3 y NF κ B se encuentra activa en CSC de cáncer de mama y su inhibición correlaciona con un descenso de la población CD44⁺. En cáncer de pulmón, STAT3 activa múltiples genes diana relacionados con el progreso

tumoral y con la renovación de las CSC. En CPNM, se ha observado una correlación positiva entre CD133⁺/ALDH⁺ y STAT3 en pacientes ²¹⁹⁻²²². Otra ruta vinculada a CSC es Hippo, muy conservada evolutivamente y que, por tanto, regula procesos esenciales de homeostasis, diferenciación y regeneración como Notch, Wnt y Hedgehog. A través de metaanálisis transcriptómicos, se han asociado alteraciones en la vía de Hippo con distintos tipos de cáncer de pulmón y al fenotipo de CSC concretamente ^{223,224}.

Una caracterización molecular en profundidad de las poblaciones de CSC a medida que se vayan conociendo las alteraciones en estas rutas de señalización y se descubran nuevos marcadores ayudaría a desarrollar terapias dirigidas contra ellas para erradicar los tumores y evitar las recidivas y resistencias a las terapias. En este proceso también es esencial el avance de tecnologías y métodos que permitan su identificación certera y su papel en el contexto de un tumor completo.

3.5. Metodologías para el estudio de CSC

El campo de las células madre tumorales ha sido objeto de cuestión constante, incluso de controversia. Algunas de las razones son: la dificultad para encontrar marcadores universales incluso en los mismos tipos de tumor, la plasticidad fenotípica, la variabilidad con la que las poblaciones CSC se encuentran en unos tumores u otros, y la dificultad para evaluar su papel en la biología del tumor ¹⁰⁸. Las técnicas utilizadas para su estudio e identificación también han sido ampliamente discutidas. El campo de las CSC a nivel experimental se sustenta esencialmente en los modelos *in vivo*, los modelos tridimensionales (3D) *in vitro* y la citometría de flujo ²²⁵.

Respecto a los modelos *in vivo*, el ensayo de xenotrasplante en ratón es el estándar para identificar las CSC en un tumor. Consiste en la implantación de subpoblaciones de células tumorales (separadas por FACS en base a marcadores de superficie, y habitualmente en número bajo) en un ratón inmunodeficiente. Se considera que el desarrollo de un tumor, al partir de una población reducida o célula única, implica la presencia de CSC, cuya

pluripotencia permite desarrollar la heterogeneidad tumoral y cuya plasticidad permite la adaptación a un nuevo ambiente.

La citometría de flujo, más concretamente la separación por FACS, ha sido utilizada para seleccionar subpoblaciones que expresan proteínas de superficie relacionadas con CSC mediante el uso de anticuerpos específicos. Una vez seleccionadas las células, además de implantarse en ratón, también se pueden cultivar *in vitro* en condiciones de baja adherencia. Las CSC crecidas en suspensión forman tumoresferas, mientras que las poblaciones diferenciadas no prosperan en esas condiciones de cultivo. Esta metodología se emplea, por tanto, para enriquecer poblaciones de CSC que, más adelante, también pueden xenotrasplantarse en ratón para analizar su capacidad iniciadora de tumores, pueden diferenciarse *in vitro* o cuyas características génicas y proteicas pueden estudiarse mediante ensayos de biología molecular.

El debate generado en torno a las CSC se basa en el hecho de si los resultados obtenidos con estas metodologías demuestran la existencia de estas subpoblaciones, o si hay que avanzar experimentalmente. Por ejemplo, en el ensayo de xenotrasplante, estándar para la identificación de CSC, existe una barrera de especie entre el tumor humano a estudiar y el ratón, lo que puede alterar las funciones del nicho (como interacciones entre moléculas de adhesión o factores de crecimiento) en el estudio de estas subpoblaciones. El proceso mismo del xenotrasplante supone un estrés celular que puede afectar el destino de las células madre en las condiciones particulares de este ensayo, pero que no necesariamente indica el destino de la misma población en el tejido original. Por otro lado, la búsqueda insistente de marcadores específicos y universales puede no dar suficientes soluciones al tratarse de células pluripotentes y con mucha plasticidad. Nuevas metodologías de cultivo *in vitro* como los organoides, o trazar la subpoblación CSC humana una vez implantada en el modelo de ratón pueden ser útiles de cara al estudio de las células madre tumorales ^{108,225,226}.

4. Transición epitelio-mesénquima (EMT) en CPNM

La transición epitelio-mesénquima (EMT) se describe como el proceso mediante el cual una célula cambia de un fenotipo epitelial a otro mesenquimal. En este proceso se producen cambios a nivel morfológico y a nivel de señalización molecular que promueven la pérdida de la adhesión intercelular para adoptar un fenotipo mesenquimal que favorezca la motilidad. También existe el fenómeno inverso, la transición mesenquimal-epitelial (MET). La EMT, como otros procesos que implican grandes cambios a nivel celular, es dependiente de contexto biológico. La EMT es una transdiferenciación que ocurre en condiciones fisiológicas normales bajo un programa finamente organizado y regulado. Programas desregulados o aberrantes de EMT se dan en condiciones patológicas como el cáncer, incluido el cáncer de pulmón ²²⁷⁻²²⁹.

Las primeras descripciones de la EMT proceden del trabajo de Elizabeth Hay en los años 80, quien demostró la transformación epitelio-mesénquima utilizando un modelo de formación de línea primitiva en córnea de embrión de pollo. En este modelo *in vitro*, Hay observó que el epitelio corneal respondía a moléculas de la matriz extracelular aplanando su membrana basal, reorganizando la actina cortical y duplicando la producción de estroma de la córnea. También describió cómo estos cambios producían una diferenciación mesenquimal, con aparición de filopodios y proponiendo la existencia de un “gen mesenquimal maestro” ^{230,231}. El término “transición” se acuñaría con el paso del tiempo para reflejar mejor la reversibilidad de este proceso y para evitar confusiones con la transformación oncológica ²³².

4.1. EMT en condiciones fisiológicas normales

La EMT se produce en condiciones no patológicas en diversos procesos fisiológicos. Según el contexto biológico, se han descrito tres tipos de EMT. La primera de ellas es denominada EMT tipo 1, que se da en el desarrollo embrionario y formación de órganos ²³³. Durante la embriogénesis, la EMT participa en varias fases. Primero, en la implantación del blastocisto en el endometrio uterino gracias al trofoblasto y la formación de la placenta ²³⁴. En la

gastrulación, también se producen EMT parciales o completas en el epiblasto para dar lugar a la línea primitiva en amniotas, y más adelante para originar las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo ²³⁵. Adicionalmente, la cresta neural se desarrolla a partir de la zona dorsal del tubo neural. Las células de la cresta neural, a través de la EMT, migran del tubo neural y se diferencian en células óseas, de músculo liso, neuronas periféricas, células gliales y melanocitos ²³⁶. Por último, cabe destacar también que eventos de EMT tienen lugar durante la formación de la columna vertebral ²³² y el corazón ²³³. Aunque más adelante se explicará el control molecular de la EMT, la regulación básica de todo el proceso se produce por factores de transcripción como Snail, Twist y Zeb.

Además de la importancia de la EMT en el desarrollo, este proceso se da también en tejidos epiteliales de adultos en condiciones normales a través de la EMT tipo 2, que se produce en la regeneración tisular ^{237,238}. El caso más paradigmático es la curación y cierre de heridas, donde los queratinocitos migran al área dañada a través de una EMT y luego restablecen la homeostasis tisular con el proceso inverso, la MET, en un fenómeno conocido como reepitelización. En este fenómeno la EMT descrita es de tipo parcial y el programa llevado a cabo recae especialmente sobre el factor Snail2 (Slug) ²³⁹. El proceso de reepitelización acontece también en casos particulares como la superficie del ovario tras la ovulación en cada ciclo menstrual ²⁴⁰, o la reparación del epitelio pulmonar dañado. Respecto a esto último, el proceso se da en las células basales y en las células Club, para regenerar el epitelio bronquioalveolar ²⁴¹. La EMT tipo 2 también sucede en contextos patológicos relacionados con una anómala regeneración tisular. Es el caso de la fibrosis, donde esta EMT es esencial y que puede llevar al mal funcionamiento del órgano ²⁴².

4.2. EMT en cáncer

La EMT tipo 3 se ha asociado a procesos patológicos como el cáncer, donde la transición epitelio-mesénquima se ha postulado como un fenómeno relevante ²³⁸. Cada vez son mayores las evidencias de la implicación de este proceso en el progreso del tumor hacia la metástasis. Concretamente, se ha

sugerido que la EMT estaría implicada en la disociación del tumor primario y su intravasación vascular ²⁴³.

Inicialmente, se propuso que la EMT era un proceso que debía culminar por completo hasta alcanzarse un fenotipo mesenquimal total. Y que la MET era el proceso reversible que permitía el retorno al fenotipo epitelial original. No obstante, múltiples evidencias demuestran que la EMT en células cancerosas se produce generalmente a nivel parcial. Un proceso de EMT parcial contribuye a que exista todo un espectro de fenotipos intermedios, lo cual favorece la plasticidad celular y tiene implicaciones en la heterogeneidad intratumoral. La EMT en cáncer, por tanto, es una transición reversible y dinámica ²²⁹. En general, la mayoría de las células de un tumor sólido tienen un fenotipo epitelial y los fenotipos mesenquimales surgen en regiones como el frente invasivo. La EMT que se da en esta región más externa permite la motilidad que en última instancia llevará a la metástasis ²⁴⁴.

4.3. Activación y regulación de la EMT

Dependiendo del ambiente fisiológico, la EMT puede desencadenarse por diferentes motivos ^{238,245}. Una de las vías de señalización implicadas en la EMT es la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Los miembros de la superfamilia de TGF- β son citoquinas funcionalmente diversas, pero estructuralmente conservadas. Se han descrito 3 ligandos diferentes de TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. Estos ligandos están codificados a partir de genes individuales ubicados en diferentes cromosomas, activan el programa EMT, por señalización paracrina o autocrina, y promueven la progresión tumoral y la metástasis. Sin embargo, la señalización por TGF- β también puede detener el ciclo celular en fase G1 en células normales y premalignas. Debido a este doble papel de TGF- β dependiente de contexto celular, se considera a TGF- β como oncogén y supresor tumoral simultáneamente ^{246,247}. En cáncer, la citoquina TGF- β es producida por miofibroblastos del microambiente o las propias células del tumor. Al unirse al receptor TGFBR1 en membrana, ésta se une al correceptor TGFBR2 y activa la cascada de fosforilación de las proteínas de la familia SMAD (SMAD2, SMAD3, SMAD4), que en última instancia se

translocan al núcleo y cooperan con los factores de transcripción de EMT (EMT-TF) que activan la expresión de genes relacionados con la transición a un fenotipo mesenquimal. Se ha observado la activación exacerbada de esta vía en cáncer ^{248,249}. La vía de TGF- β también estimula la activación de las rutas de PI3K-AKT y RhoA, que durante la EMT regulan la traducción y los cambios en el citoesqueleto, respectivamente ^{250,251}. La influencia de TGF- β sobre el crecimiento tumoral también se ve afectada por la interacción entre la vía de señalización de TGF- β y una amplia variedad de vías de transducción de señales. Por ejemplo, la ruta Ras-MAP-quinasa (MAPK) regula la migración e invasión celular sinérgicamente con TGF- β ^{252,253}.

Además de la vía de TGF- β , las rutas de Wnt y Notch también contribuyen a estimular la EMT, o alternativamente la inducen en otros contextos celulares como la formación de la cresta neural o la formación de las válvulas cardíacas, o en el desarrollo tumoral ²⁵⁴. La EMT también puede ser activada por otras citoquinas como IL-6 y factores de crecimiento como EGF, FGF o VEGF. Se asume que la EMT se activa, normalmente, en respuesta a la combinación de las diversas rutas de señalización indicadas ²⁴³.

4.3.1. Programa morfológico de la EMT

La EMT se considera a menudo como un fenómeno dirigido por dos programas complementarios: uno morfológico y otro transcripcional ²⁵⁵. Dentro del programa morfológico, los principales cambios celulares y estructurales que se producen son los siguientes:

1. Paso de una polaridad apical-basal a una polaridad parte delantera-parte trasera: esencial para la migración direccional, pues se pierde el contacto con la membrana basal. Se inicia cuando se produce una distribución desigual de las proteínas presentes en membrana entre la región frontal y la región trasera de la célula. La delantera, definida por el borde direccional, y la trasera, donde empiezan a desestabilizarse los complejos de adhesión. Los complejos que se desensamblan al perder la polaridad apico-basal son los Crumb, PAR y SCRIB ²²⁸.

2. Pérdida de expresión de marcadores epiteliales y aumento de marcadores mesenquimales: afecta a la disociación de las uniones estrechas intercelulares o *zonula occludens*. Los marcadores epiteliales más representativos cuya expresión disminuye son E-cadherina, ocludinas, citoqueratinas, ZO1 y Desmoplaquina; los mesenquimales cuya expresión aumenta son Vimentina (componente de fibras de estrés), Fibronectina, Colágeno (I y III) y N-cadherina. También aumenta la expresión de metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular y que son clave en la motilidad adquirida con el fenotipo mesenquimal ²⁴³.

3. Reorganización del citoesqueleto de actina, perdiendo actina cortical y aumento de las fibras de estrés: se pierde actina cortical en beneficio de las fibras de estrés, que permiten una dinámica de elongación celular y motilidad direccional. Las Rho GTPasas son esenciales en estos cambios. Se forman estructuras invasivas como lamelipodios, filopodios e invadopodios ^{256,257}.

4.3.2. Programa transcripcional de la EMT

La EMT está mediada por un conjunto de factores de transcripción que incluyen Snail (Snai1), Slug (Snai2), Twist y ZEB, los cuales se activan secuencialmente de manera dependiente de contexto celular ²⁵⁸. Inicialmente, las vías inductivas como Wnt, Notch y TGF- β son las que activarían específicamente a estos factores de transcripción según el contexto celular e induciendo un tipo de EMT u otro ^{243,259,260}.

Una vez activados, Snail y Slug se unen a la región E-box del promotor del gen *CDH1*, que codifica E-cadherina, reprimiendo su expresión (a través de metilaciones y acetilaciones en histonas) e iniciando la EMT. También se unen a otros genes de uniones adherentes intercelulares, reprimiendo su expresión ²⁶¹. Twist (Twist1 y Twist2) también actúa reprimiendo la expresión de genes epiteliales y activando genes mesenquimales como el de la N-cadherina (*CDH2*) ²⁶². Twist también suele ser activado por el factor de transcripción inducible por

hipoxia HIF1 α en condiciones de hipoxia ²⁶³. Por último, Zeb1 y Zeb2 se unen directamente (como Snail y Slug) a secuencias reguladoras del gen *CDH1*, atrayendo a proteínas represoras como CTBP (proteína de unión a C terminal, *C-terminal-binding protein*) y proteínas que también lleven a cabo modificaciones epigenéticas para inhibir la expresión de E-cadherina (*CDH1*). Los factores Zeb, dentro del programa transcripcional, son los últimos en actuar, porque su expresión también está promovida por Snail y Twist1 ²⁶⁴. Un resumen del programa transcripcional de EMT en conjunción con los cambios morfológicos se muestra en la Figura 7 ²⁶⁵.

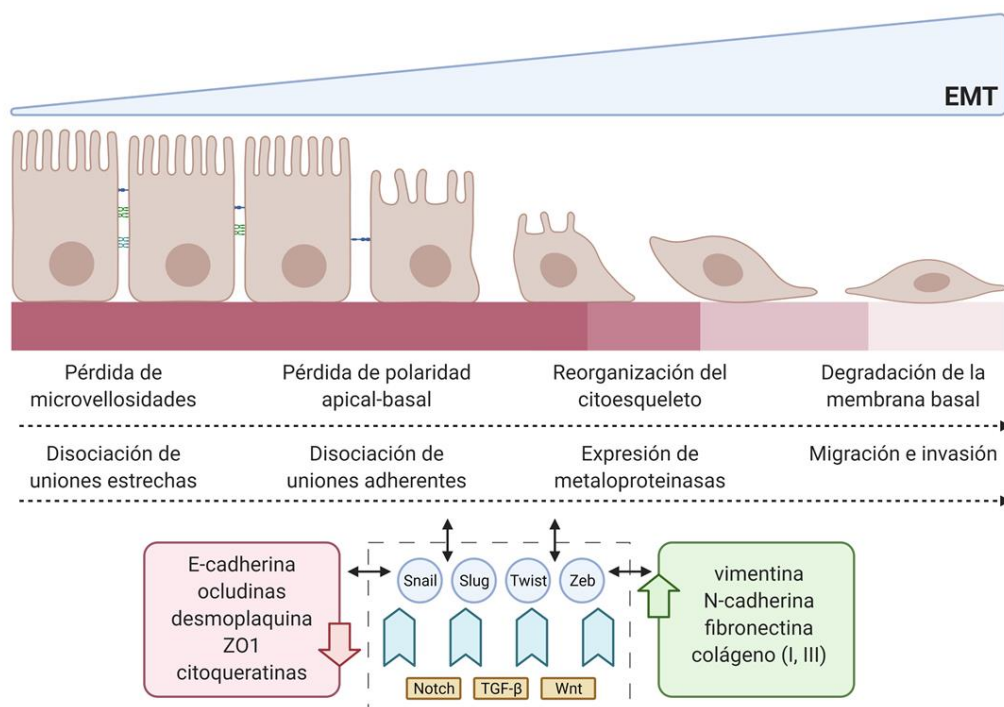


Figura 7. Principales eventos de los programas morfológico y transcripcional de la EMT. La señalización de las rutas de Notch, TGF- β y Wnt activa secuencialmente a los factores de transcripción que actúan como reguladores maestros de la EMT: Snail, Slug, Twist y Zeb. En paralelo y también como consecuencia de esta señalización, el programa morfológico regula los cambios a nivel celular que llevan de un fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal, con un aumento de la expresión de los marcadores mesenquimales. Adaptado de Dongre y Weinberg, 2019 ²⁶⁵, y de Tam y Weinberg, 2013 ²⁶⁶. Creado con Biorender.com.

4.3.2.1. El factor de transcripción AP-1 y la EMT

Además de los factores de transcripción específicos de la EMT, la actividad de otros factores como el complejo transcripcional AP-1 es necesaria para mediar la EMT. AP-1 está formado por diferentes combinaciones de

dímeros de factores de transcripción que contienen en su estructura el motivo de cremallera de leucina (bZIP) y un dominio de unión al ADN. Los componentes más conocidos del complejo AP-1 son miembros de las familias Jun (Jun, JunB y JunD) y Fos (FOS, FOSB, FRA1 y FRA2) ²⁶⁷. Algunos de los componentes de AP-1 como JunB, Jun y FRA1 actúan como factores de la transcripción junto con SMAD2/3 para regular positiva o negativamente genes diana de SMAD y mediar el programa transcripcional de la EMT, como es la activación de *SNAI1* y *ZEB1* en respuesta a la señalización por TGF- β ²⁶⁸.

Las proteínas que integran AP-1 se expresan rápidamente y de manera transitoria en respuesta a diferentes señales y estímulos ²⁶⁹. Algunos de estos estímulos son factores de crecimiento, citoquinas proinflamatorias o estrés genotóxico. El complejo AP-1 participa en la regulación de procesos celulares fundamentales como la proliferación, crecimiento, diferenciación, migración, respuesta inmunológica, muerte celular y respuesta a estrés ^{270,271}. Se ha asociado a la transformación neoplásica y al cáncer a través de varios mecanismos: modulando la matriz extracelular y afectando a las capacidades invasivas del tumor ^{269,272–274}; contribuyendo a la angiogénesis y mejorando la adaptación del tumor a la ausencia de oxígeno ^{275,276}; y regulando respuestas inflamatorias que contribuyen al cáncer ²⁶⁹.

El factor de transcripción JunB se expresa en múltiples tipos celulares y su abundancia varía en distintas fases del ciclo celular ^{277,278}. En células proliferativas, los niveles de JunB se mantienen bajos durante las fases M y G1, y aumentan a medida que la célula progresa a través de G1 y entra en la fase S, para luego descender drásticamente en la transición G2/M ²⁷⁹. En nuestro grupo observamos que la disminución de expresión en G2/M se lleva a cabo a través de la degradación mediada por el sistema ubiquitina-proteasoma y que la correcta proteólisis es necesaria para una división celular precisa ^{279,280}. La actividad de JunB durante el ciclo celular y su regulación son esenciales, puesto que controla la transcripción de varios genes reguladores del ciclo celular en este proceso ^{279,281–283}.

JunB se ha descrito como supresor tumoral u oncogén dependiendo del contexto celular. Por un lado, actúa como gen supresor de tumores al reprimir la

transcripción de Ciclina D1 y activar la transcripción del inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas CDKN2A, provocando un retraso del paso de la fase G1 a S cuando JunB está sobreexpresado ^{281,282,284}. Estudios en ratones transgénicos donde se ha inactivado JunB han mostrado su papel oncosupresor en neoplasias mieloproliferativas, y se ha visto que la disminución de su expresión está asociada a la evolución de estas enfermedades en humanos ^{285–290}. Por otro lado, algunos estudios también han mostrado su actividad oncogénica. Por ejemplo, reiniciando el ciclo celular desde la quiescencia, o como activador de la transcripción de la Ciclina A2 durante la progresión de la fase S a G2/M ^{278,283}. JunB también se sobreexpresa y contribuye al desarrollo neoplásico en tumores humanos como el linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), algunos linfomas de Hodgkin, cáncer de mama y cáncer de estómago ^{291–295}. En el mesotelioma pleural maligno (MPM), un tumor muy agresivo, una mayor actividad de JunB se asocia a quimiorresistencia ²⁹⁶. Por tanto, la actividad de JunB depende del contexto celular y del estatus proliferativo y de la fase del ciclo en la cual se encuentre la célula ²⁷³.

En el proceso de la EMT, se ha observado que la estimulación prolongada con TGF- β activa genes de fenotipo mesenquimal y asociados a invasión a través de la interacción entre proteínas SMAD y componentes del complejo AP-1, incluyendo a JunB ^{297–299}. En células de adenocarcinoma de pulmón se ha descrito que en la EMT inducida por TGF- β participan los factores de transcripción HNF4A, JunB y ETS2, actuando de manera sinérgica ²⁹⁹. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que en presencia de los ligandos de TGF- β 1 y TGF- β 2, JunB induce una mayor expresión proteica de TGF- β 2, promoviendo la EMT, y sugieren que la actividad de JunB es necesaria para la EMT, migración e invasión en células de CPNM y de osteosarcoma (manuscrito en preparación ³⁰⁰). La inducción con TGF- β exógeno a su vez activa la expresión de JunB transitoriamente, mediante un mecanismo de retroalimentación positiva. En conjunto, JunB estaría siendo sobreexpresado a su vez para promover el fenotipo de EMT, la migración y la invasión celular. En otro estudio también hemos observado que el gen JunB se encuentra sobreexpresado en subpoblaciones de células madre tumorales (CSC) en cáncer de pulmón no microcítico en comparación con las células crecidas en

adherencia, sugiriendo que la actividad de JunB puede ser relevante para la biología de las CSC de CPNM ³⁰¹.

4.3.3. Otras redes reguladoras de la EMT

Además del programa transcripcional y morfológico, el proceso de la EMT está controlado por otros mecanismos dependientes de ARN no codificante (control por micro-ARN, miARN; y ARN largo no codificante, lncARN por ejemplo), modificaciones epigenéticas, regulación postranscripcional (*splicing* alternativo), regulación de la traducción y regulación postraduccional ²⁵⁸.

Los micro-ARN (miARN) implicados en la EMT y cáncer son la familia miR-200, miR-205, miR-34, miR-101 y miR-9. Estos miARN están menos expresados en muchos tipos de cánceres y, por tanto, se les atribuye una función supresora de tumores. De los citados, miR-200 y miR-34 controlan algunos de los factores de transcripción de la EMT como SNAIL y ZEB través de un bucle de regulación negativa ^{258,302,303}.

El control epigenético de la EMT se basa en modificaciones que llevan a la represión y expresión de genes clave en esta transdiferenciación. Deacetilasas de histonas (HDAC1, HDAC2, HDAC3, SIRT1), metiltransferasas de histonas (SUV39H1, G9a) y otros modificadores epigenéticos participan en esta regulación. Modificaciones en los promotores de algunos de los miARN citados también son parte del control epigenético de la EMT ^{304–307}.

También existe un control postranscripcional que sirve como mecanismo regulador adicional en la EMT. El *splicing* (o empalme) de ARN específico de EMT es el proceso más estudiado de este nivel de control. Las proteínas de regulación de *splicing* epitelial (ESRP1, ESRP2) controlan el empalme de mensajeros transcritos de genes epiteliales a través del reconocimiento de ciertas secuencias de ARN (UGG, GGU). Estas secuencias determinan el salto o inclusión de determinados exones durante el empalme. La proteína RBFOX2, por otro lado, controla el *splicing* de transcritos de genes de fenotipo mesenquimal ^{308–311}.

4.3.4. Regulación de la traducción de la EMT

A nivel traduccional, la señalización por TGF β también regula la EMT a través de puntos de control (*checkpoints*) cruciales en la fase de elongación de la traducción de efectores de la EMT ³¹². Por otro lado, YB-1 (proteína de unión a Y-box, *Y-box binding protein-1*) es una proteína de unión a ARNm que, en altas concentraciones, estimula la traducción de Snai1 y otros factores de la transcripción y, en última instancia, reprime la síntesis de E-cadherina. Un aumento de su expresión se asocia a la progresión tumoral y, en líneas celulares de cáncer, se ha observado que participa regulando la traducción de Snail1, Zeb2 y Twist1 y, por tanto, es un inductor de la EMT ³¹³. También hay que tener en cuenta la regulación postraduccional de los propios factores de transcripción de la EMT, como Twist1 y Snail1, que tienen una tasa de recambio rápida en citoplasma y sufren modificaciones postraduccionales como fosforilación, oxidación de lisinas y ubiquitinación que influyen en su localización y nivel de expresión ^{314,315}. Existen también mecanismos de regulación que no implican a los factores de transcripción de la EMT inicialmente. Por ejemplo, el incremento en los niveles de proteasas puede inducir la EMT a través de la transducción de señales que modulan a su vez a los factores de la EMT. Un caso es el de la metaloproteinasa 3 (MMP3), que puede mediar el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y desencadenar un aumento de la expresión de *SNAI1* y marcadores mesenquimales ³¹⁶.

Uno de los factores de traducción mejor estudiados por su implicación en la EMT es eIF4E. Esta proteína forma parte de un complejo regulador de la traducción que reconoce la caperuza 5' (cap-5') de ARNm y permite la aproximación física de los ribosomas para iniciar la traducción. Se considera un protooncogén. La señalización por TGF- β media la fosforilación de eIF4E y, a través de ello, promueve la traducción de los ARNm de Snail1 y MMP3, induciendo la EMT ³¹⁷.

4.3.4.1. El factor de la traducción eIF5A2 y la EMT

Recientemente se ha relacionado al factor de la traducción no canónico eIF5A con la regulación de la EMT. eIF5A es una proteína pequeña de 17 kDa

(Figura 8A), descrita inicialmente como factor iniciador de la traducción^{318,319} pero posteriormente como factor de la elongación de la traducción^{320–322}. También se han sugerido otras funciones para eIF5A como factor de transcripción, recambio del ARNm y transporte entre núcleo y citoplasma^{323–327}.

Existen varias isoformas de eIF5A siendo las más estudiadas eIF5A1 y eIF5A2. eIF5A1 es una proteína abundante y muy conservada en eucariotas, se expresa constitutivamente en todos los tejidos y posee dominios de unión a ARN. El gen codificante se encuentra en el cromosoma 17 (*EIF5A1*). Un rasgo distintivo de este factor es que es la única proteína descrita hasta la fecha en sufrir una modificación postraducciona conocida como hipusinación³²⁸. La hipusina es un aminoácido a nivel molecular y recibe esta denominación de sus componentes: la hidroxiputrescina y la lisina. La modificación postraducciona se produce en la lisina 50 de eIF5A, como resultado de dos reacciones consecutivas catalizadas por la desoxihipusina sintasa (DHS) y la desoxihipusina hidroxilasa (DOHH) a partir de la espermidina, perteneciente al grupo de las poliaminas, que son metabolitos con creciente interés en cáncer^{328–331}. Se ha descrito la hipusinación como una modificación esencial para la funcionalidad del eIF5A, aunque eIF5A con desoxihipusina ya es parcialmente activo³³².

A nivel funcional, algunos estudios han revelado que eIF5A juega un papel crítico en la traducción de motivos con más de tres prolinas consecutivas. La prolina, aminoácido con cadena lateral cíclica, puede presentar problemas físicos en el ribosoma durante la traducción debido su rigidez estructural. Se postula que la hipusina de eIF5A es clave para evitar el estancamiento con los peptidil-ARNt que simultáneamente introducen prolinas en el sitio P y en el sitio A del ribosoma^{333–335} (Figura 8B). En cáncer, se ha observado mayor expresión de eIF5A1 en algunos tumores como adenocarcinoma de páncreas, modulando la actividad de las proteínas reguladoras del citoesqueleto RhoA y ROCK y, por tanto, pudiendo participar de la migración celular. También se ha observado que la actividad de eIF5A aumenta en células con KRAS oncogénico. A su vez, eIF5A regula la traducción de la tirosina quinasa asociada a citoesqueleto PEAK1, también estimulada por *KRAS* activado, y que contiene prolinas consecutivas en su secuencia y participa en la progresión del cáncer de páncreas. Como

consecuencia, se forma un bucle de retroalimentación positiva que controla la expresión de *KRAS* mediado por eIF5A y PEAK1 ^{336,337}.

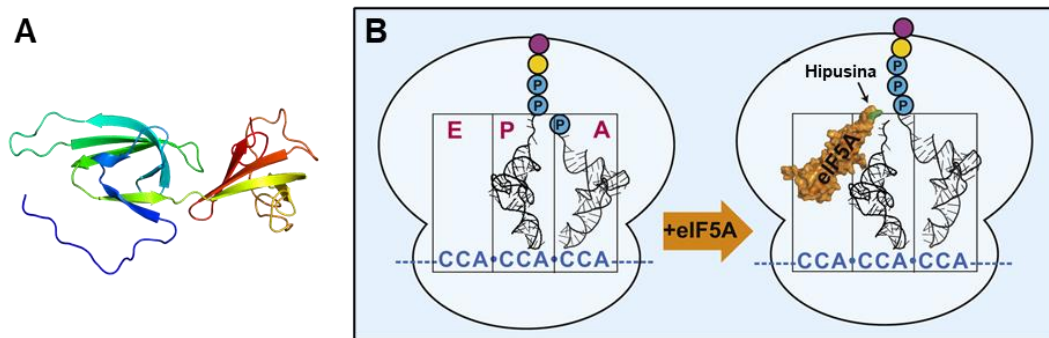


Figura 8. Estructura terciaria de eIF5A y su papel en la elongación de la traducción.

A) Estructura terciaria de eIF5A. Modelo tridimensional obtenido de *Protein Data Bank* (PDB). Adaptado de Tong et al, 2009 ³³⁸. B) Modelo del papel de eIF5A en la elongación de la traducción. Se produce un estancamiento del ribosoma ante secuencias codificantes de prolinas consecutivas, a causa de la estructura cíclica de este aminoácido. Dos prolinas del péptido en síntesis están en el ARNt del sitio P, mientras que el conjunto Pro-ARNt^{Pro} se encuentra en el sitio A del ribosoma. eIF5A accede al sitio E y físicamente facilita el enlace peptídico a través de la aproximación del péptido en síntesis con la prolina a incorporar. Adaptado de Gutierrez et al, 2013 ³³³.

A diferencia de eIF5A1, la expresión de la isoforma eIF5A2 es específica de testículo y cerebro. El gen codificante se encuentra en la región 3q26 (*EIF5A2*), una zona del cromosoma 3 descrita como inestable y habitualmente amplificada en cáncer ^{339,340}. eIF5A2 se encuentra sobreexpresada en algunos tipos de cáncer, entre ellos el de pulmón ^{341,342}. En cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) se ha descrito su sobreexpresión además de que se ha sugerido que altos niveles inducen la migración e invasión, mientras que la disminución de su expresión previene la EMT ³⁴³. También se ha descrito que la sobreexpresión de eIF5A2 en tumores de pacientes con CPNM se asocia a peor pronóstico incluso en estadios tempranos ³⁴¹.

La función de eIF5A2 todavía no está bien elucidada. Al igual que sucede con la eIF5A1, algunos autores sugieren que podría participar en la transcripción, en el procesado del ARNm y en el transporte núcleo-citoplasma. Tampoco se ha confirmado su función como factor de la traducción, aunque la similitud de secuencia de aminoácidos con eIF5A1 es del 84% ^{344,345}.

Las proteínas con motivos de prolina consecutivos no son muy abundantes en humanos. Solo 860 proteínas tienen 9 prolinas consecutivas o más, es decir, el 4,4% de todas las proteínas ³⁴⁶. Mediante estudios de ontología génica se ha observado que existe un enriquecimiento de proteínas ricas en motivos de prolinas consecutivas en la reorganización del citoesqueleto de actina ³⁴⁶, entre las que se encuentran las forminas y Ezrina. Las forminas son proteínas grandes que participan en la nucleación de la actina ³⁴⁷. Ezrina es una proteína de membrana que permite el anclaje del citoesqueleto a la misma y sirve de puente de señalización entre éste y la matriz extracelular ³⁴⁸. Recientemente se ha relacionado a eIF5A con la traducción de la formina BNI1 en levadura y la formina diaphanous (dia) en *Drosophila melanogaster* ³⁴⁹. Esto sugiere un papel de eIF5A en la regulación de procesos dependientes del citoesqueleto mediante la traducción de forminas en eucariotas ³⁵⁰.

La plasticidad del citoesqueleto es un fenómeno clave en la EMT. El trabajo de Rana y colaboradores muestra cómo las forminas FHOD1 y FMNL1 participan en el programa morfológico de la EMT en células de CPNM A549, aunque como vía alternativa a RhoA y ROCK, las cuales también tienen un motivo de tres prolinas consecutivas. En este trabajo, al silenciar la actividad de las forminas se observa un bloqueo de la EMT vía disminución de Smad2 fosforilado ²⁵⁵. El papel de las forminas es relevante, según el estudio, en la fosforilación de Smad2 a través de TGF- β y en la traslocación al núcleo para permitir los cambios a nivel de expresión génica ²⁶². Esto, a su vez, apunta a la confirmación de estudios previos donde Ezrina, Radixina y Moesina (familia ERM de proteínas de membrana de unión a citoesqueleto) anclan a los correceptores de TGF- β con el citoesqueleto de actina ³⁵¹⁻³⁵³. También hay autores que han estudiado la asociación entre Ezrina y el inicio de la traducción ³⁵⁴, así como la EMT y metástasis en diferentes tipos de tumores ³⁵⁵⁻³⁵⁷.

4.4. EMT y su relación con metástasis, CSC, pluripotencia y quimiorresistencia

A pesar de que algunos autores consideran que la EMT es un fenómeno imprescindible para la invasión de nuevos tejidos y el origen de tumores secundarios ^{358,359}, otros autores postulan que la EMT no es esencial para la colonización metastásica ^{360,361}. Los focos secundarios no están formados por células mesenquimales y, de hecho, para culminar la colonización el fenotipo se debe revertir a epitelial, estableciendo nuevas uniones intercelulares ^{362,363}.

La relación entre pluripotencia y EMT también ha sido ampliamente estudiada. Actualmente se considera que rutas de señalización paralelas explicarían el hecho de que las CSC sufran EMT para migrar, y luego MET para establecer un nuevo nicho metastásico ^{229,364}. Pero en dicho proceso, además de la EMT y las CSC, también tienen importancia para establecer un nicho metastásico los fibroblastos asociados al cáncer (CAF, *cancer-associated fibroblasts*), macrófagos asociados a metástasis (MAM, *metastasis-associated macrophages*) y otros mediadores inmunológicos y factores que ayudan a la angiogénesis ^{135,365}. La importancia del nicho para el mantenimiento de las CSC también se da en el tumor primario.

A nivel molecular, los factores de transcripción que favorecen la adquisición de un fenotipo mesenquimal, es decir, que forman parte del programa regulatorio de la EMT, también intensifican el potencial iniciador de tumores en algunos casos ^{366,367}. Por ejemplo, Oct4 y Nanog se han descrito como relevantes para el mantenimiento de las CSC y también para mantener el fenotipo mesenquimal en un proceso de EMT ³⁶⁸. La expresión de factores como ZEB1, Snail1, Six1 y LBX1, del programa transcripcional de la EMT, también se han vinculado a la pluripotencia ^{369,370}. Además, se ha propuesto el papel de la EMT en la reprogramación metabólica que se da en el tumor, especialmente en las CSC, con relevancia de la actividad de los factores de transcripción como Snail en cáncer de mama ³⁷¹ y ZEB1 en cáncer de páncreas ³⁷².

Otra asociación a menudo efectuada es que el programa EMT confiere también quimiorresistencia y resistencia a otras terapias antitumorales, evitando la

apoptosis ^{360,373,374}. En CPNM se ha descrito que, en casos de tumores con *EGFR* mutado (T790M), la EMT permite que EGFR se una al receptor tirosina-quinasa Axl y esto se relaciona con el desarrollo de resistencias a terapias anti-*EGFR* ³⁷⁵. Por otro lado, se ha observado que la EMT permite a las células de los carcinomas modificar la sinapsis inmunitaria a través del PD1 de los linfocitos T citotóxicos, evadiendo dicha citotoxicidad, y confiriendo resistencia contra inmunoterapias. Es por ello que, además de la inmunoterapia basada en anticuerpos monoclonales frente a PD1 para revertir la supresión inmunológica, también se podría actuar con terapias que afecten a la plasticidad fenotípica que confiere la EMT ³⁷⁶.

5. Modelos experimentales para el estudio del cáncer de pulmón

La investigación en cáncer de pulmón ha ido íntimamente ligada al desarrollo de metodologías que hiciesen posible su estudio. A lo largo del siglo XX se fueron desarrollando los principales modelos experimentales con células derivadas de tumores de pacientes con cáncer para mimetizar las características de las células tumorales en cultivo celular *in vitro* o bien generando tumores en organismos vivos. Para el desarrollo de estos modelos experimentales se utilizan numerosos protocolos, por ejemplo el cultivo de líneas celulares de cáncer en adherencia o dos dimensiones (2D) o en baja adherencia o tres dimensiones (3D) ³⁷⁷; carcinogénesis química en modelo animal ³⁷⁸; manipulación de genes en células cultivadas, como transfección de ADN e interferencia de ARN para la eliminación de genes ^{379,380}; cultivo de células madre tumorales ³⁸¹; generación de animales genéticamente modificados (ratones transgénicos y noqueados) ³⁸²; y xenotrasplante de células tumorales o biopsias de paciente en ratón inmunodeprimido ³⁸³. La importancia de los modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* para la investigación del cáncer radica en la posibilidad de proporcionar una mejor comprensión de la biología y el tratamiento del cáncer. En la última década, una nueva tecnología ha despertado especial interés: los organoides. Desde su primera descripción en 2009 ³⁸⁴, este nuevo modelo de cultivo celular en 3D todavía se está afianzando como referente en la investigación. Los

organoides se definen como un conjunto celular que crece *in vitro* de manera tridimensional y deriva de células de tejido primario, células madre embrionarias (ESC, *embryonic stem cells*) o células madre pluripotentes inducidas (iPSC, *induced pluripotent stem cells*). Su utilidad es de gran importancia para modelar enfermedades como el cáncer ³⁸⁵, ya que su funcionalidad se aproxima más a la realidad biológica. Actualmente se está trabajando en establecer modelos que representen el microambiente tumoral, pues además del tejido epitelial (base de cualquier organoide), se intenta emular la presencia de células inmunitarias, estroma y vascularización ³⁸⁶. Los organoides se están mostrando como una tecnología muy potente para estudios de biología tisular, desarrollo, regeneración, enfermedades, trasplante de órganos y descubrimiento de fármacos ³⁸⁷.

5.1. Modelos experimentales *in vitro* de CPNM

De manera general, los modelos celulares *in vitro* pueden dividirse en bidimensionales (2D) y tridimensionales (3D), en función de si las células crecen sobre una superficie y adheridas a ella, o si por el contrario crecen espacialmente en todas las direcciones.

5.1.1. Inicios de los cultivos *in vitro* y características generales de estos modelos en cáncer

El inicio del campo de los cultivos celulares se produjo a mediados del siglo XIX, con una serie de hitos científicos como la enunciación de la teoría celular por Schleiden y Schwann ³⁸⁸; la formulación de la solución de Ringer ³⁸⁹; el cultivo en solución salina de la placa neural de embriones de pollo en 1885 por parte de Roux, observando su supervivencia durante varios días ³⁹⁰; y los primeros cultivos celulares y tisulares de Harrison con tejido embrionario de rana, ya en la primera década del siglo XX. Cabe destacar que Harrison también contribuyó al avance del campo con el método de gota colgante (base para cultivos 3D) y la incorporación del ambiente y material estériles a los cultivos ³⁹¹.

Se considera que la primera línea celular la estableció Carrell en 1912, a partir de células cardíacas de embrión de pollo ³⁹². Esta línea fue cultivada durante más de tres décadas, y Carrell introdujo el concepto de la inmortalización celular en cultivo. Aun así, se considera que las primeras células que se consiguieron inmortalizar en cultivo fueron las HeLa, obtenidas de la paciente Henrietta Lacks en 1951. Procedentes de cáncer de cérvix, las HeLa son la primera línea celular tumoral establecida ³⁹³. El concepto de inmortalización implica que las células, a menudo a causa de la acumulación de mutaciones y de una activación constitutiva de la telomerasa, son capaces de proliferar en cultivo *in vitro* a través de los pases y durante periodos prolongados de tiempo, evadiendo los mecanismos de control celular y evitando en última instancia la senescencia ³⁹⁴.

En cuanto al CPNM, existe un número amplio de líneas celulares inmortalizadas en repositorios como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, de *American Type Culture Collection*). Cabe destacar líneas de CPNM empleadas en este trabajo de tesis como A549 (con mutación en *KRAS*), H441 (con mutación en *KRAS* y *TP53*), H1395 (con mutación en *BRAF*), H1650 (con mutación en *EGFR*, *CDKN2A* y *TP53*), H1993 (con mutación en *TP53*) y PC9 (con mutación en *EGFR* y *TP53*).

5.1.2. Modelos de cultivo celular bidimensional (2D) en cáncer

Los modelos celulares en 2D se consideran el modelo más extendido e históricamente utilizado en cáncer. En la actualidad, siguen siendo los más empleados por una serie de razones. Una de ellas es que siguen siendo el método de cultivo celular más económico y escalable. El conocimiento adquirido sobre el fenotipo y las características moleculares de las líneas celulares establecidas permite comparar datos obtenidos de tumores de pacientes con estudios en líneas celulares del mismo tipo de tumor. El conocimiento previo también permite una mayor facilidad a la hora de cultivar células en estas condiciones con éxito; y también facilita la obtención de datos y el análisis de los mismos ³⁹⁵.

En la actualidad, a pesar de seguir siendo el modelo de cultivo celular más utilizado, se está produciendo un cambio progresivo hacia el uso de otros modelos experimentales más avanzados para validar el conocimiento obtenido con los cultivos en 2D. Esto es debido a que los cultivos en 2D no son representativos de los entornos celulares reales, y todavía menos del complejo y diverso microambiente tumoral. Esta poca representatividad se traduce en falta de predictibilidad a la hora de testar fármacos ³⁹⁶. Las células tumorales se adaptan al crecimiento en el cultivo *in vitro* y su fenotipo es más bien el resultado de dicha adaptación, no del fenotipo real ³⁹⁷.

5.1.3. Modelos de cultivo celular tridimensional (3D) en cáncer

Para subsanar algunos de los inconvenientes de los cultivos 2D, sobre todo la representación más real del ambiente tumoral, se llevan a cabo cultivos en 3D de distinta índole. Los modelos 3D más utilizados en el estudio del cáncer son los siguientes ³⁹⁸.

- Esferoides multicelulares de tumor: suspensiones de células únicas derivadas de líneas previamente inmortalizadas. No se tiene en cuenta si hay un número elevado de células, las cuales forman esferoides por compactación ³⁹⁹ (Figura 9A).
- Tumoresferas: suspensiones de células únicas derivadas de líneas o tejido tumoral. Inicialmente se cultiva poca cantidad y se fomenta la proliferación clonal. Cuando se cultiva en medio mantenedor de pluripotencia se fomenta el enriquecimiento en células madre tumorales (CSC) ^{400,401} (Figura 9B).
- Esferas tumorales derivadas de tejido (TDTS): tras corte y disgregación parcial (enzimática o mecánica) del tumor, las células obtenidas se crecen en suspensión para fomentar su compactación nuevamente ^{402,403} (Figura 9C).

- Esferoides multicelulares organotípicos: se corta tejido tumoral sin disgregación, y al cultivarlo en condiciones no adherentes, se redondea y forma una esfera. Similar a los explantes clásicos ⁴⁰⁴ (Figura 9D).
- Organoides: cultivo de células epiteliales progenitoras o madre en 3D y, habitualmente, en presencia de matriz semisólida, que permite la formación de estructuras con diversos tipos celulares y que se aproximan más a la realidad biológica del tumor original. En el caso del pulmón, los organoides todavía no recapitulan la complejidad de ciertas regiones como los alvéolos, muy vascularizados ⁴⁰⁵ (Figura 9E).

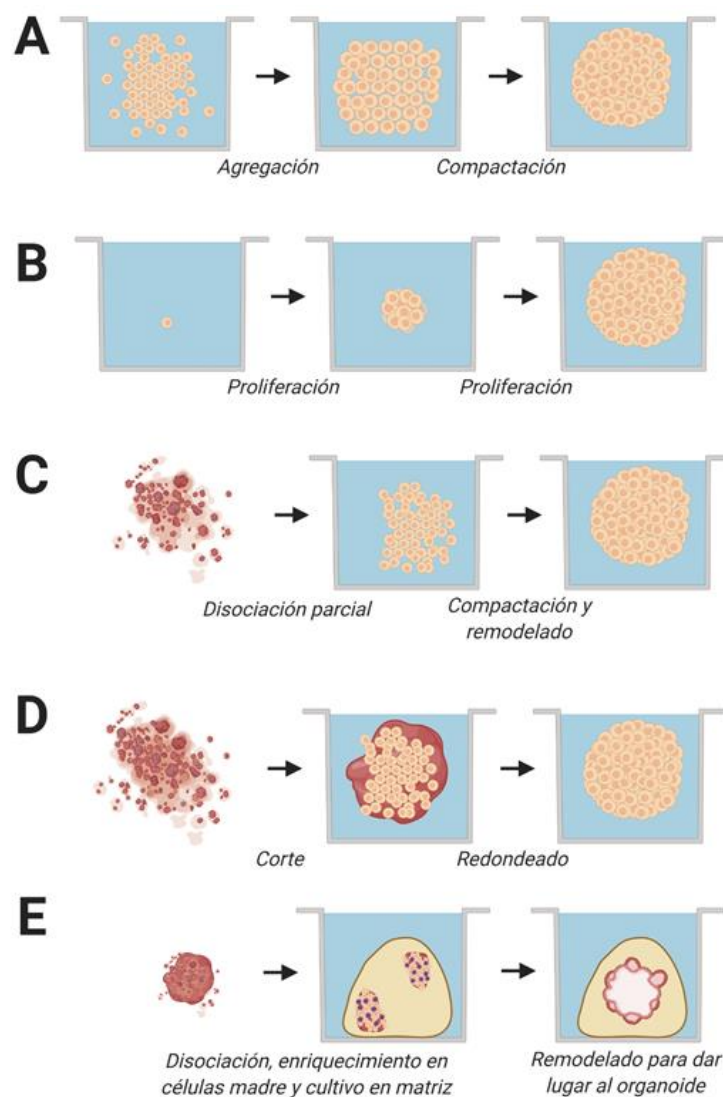


Figura 9. Modelos de cultivos celulares en 3D esféricos en cáncer. Adaptado de Weiswald et al (A-D) ³⁹⁸ y de Fatehullah et al (E) ³⁸⁶. A) Esferoides multicelulares de tumor. B) Tumoresferas. C) Esferas tumorales derivadas de tejido. D) Esferoides multicelulares organotípicos. E) Organoides. Creado con Biorender.com.

Las esferas o cuerpos redondeados de los cultivos en suspensión se forman cuando las fuerzas físicas que unen a las células entre sí son más intensas a las que se pueden producir entre las células y el soporte, es decir, la placa ⁴⁰⁶. De entre los arriba expuestos, cabe destacar las tumoresferas y las esferas tumorales derivadas de tejido (TDTS, de *tissue-derived tumor spheres*), que son las metodologías 3D empleadas en este proyecto de tesis. Las tumoresferas se derivan de líneas celulares inmortalizadas para favorecer la expansión clonal de una subpoblación de interés, a menudo la población de CSC ^{159,407,408}. Por otro lado, las TDTS se obtienen de tumores parcialmente disociados. A este tipo de cultivo pertenecen también los esferoides originados de tejido tumoral (CTO, de *cancer tissue-originated spheroids*). Es el tipo de cultivo que empleamos en nuestro laboratorio con muestras derivadas de tumores de CPNM ⁴⁰³.

Al margen de los cultivos 2D y 3D descritos aquí, existen también otros tipos o variantes de cultivos celulares no especificados como el cocultivo, los cultivos multicapa, el cultivo directo de secciones de tumor (explante), los modelos híbridos, cultivos tridimensionales dentro de membranas basales reconstruidas (a través de *scaffolds*), los modelos *transwell*, los modelos con microvasculatura o los *tumor-on-a-chip* ^{397,409,410}. La incorporación de otras disciplinas como la ciencia de biomateriales, ingeniería tisular, microfabricación y microfluidos está permitiendo un gran progreso en la generación de modelos experimentales avanzados de cáncer ⁴¹¹. En la Tabla 2 se muestra una comparativa de los cultivos 2D y los cultivos 3D, a través de la cual podemos inferir sus ventajas e inconvenientes según el estudio que se quiera llevar a cabo.

Tabla 2. Comparación de métodos de cultivo celular en 2D y 3D. Adaptado de Kapalczyńska et al ³⁹⁵ y de Hoarau-Véchet et al ⁴¹².

	2D	3D
Tiempo de formación de cultivo	De unos minutos a horas.	De unas horas a días.
Calidad del cultivo	Alto rendimiento, reproducibilidad entre cultivos, cultivo a largo plazo, fácil de interpretar, sencillez.	Peor rendimiento y reproducibilidad entre cultivos, difícil de interpretar, cultivos complejos de mantener.
Imitación <i>in vivo</i>	No imita la estructura natural de la masa tumoral.	Imitación parcial. Los tejidos y órganos son estructuras 3D.
Interacciones celulares	No representa las interacciones célula-célula ni célula-matriz extracelular. No existe un microambiente ni un nicho tumoral tipo <i>in vivo</i> .	Interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Se crean nichos.
Características celulares	Morfología y mecanismo de división alterados; pérdida de la diversidad fenotípica y la polaridad.	Morfología preservada y mecanismo de división preservados; diversidad fenotípica y polaridad.
Acceso a componentes esenciales	Acceso ilimitado a oxígeno, nutrientes, metabolitos y moléculas de señalización (al contrario que <i>in vivo</i>).	Acceso variable a oxígeno, nutrientes, metabolitos y moléculas de señalización (como sucede <i>in vivo</i>).
Mecanismos moleculares	Cambios en expresión génica, <i>splicing</i> de ARNm, topología y bioquímica celular.	Expresión génica, <i>splicing</i> , topología y bioquímica celular como <i>in vivo</i> .
Coste de mantenimiento	Barato, medio de cultivo comercial y ensayos comercializados.	Más caro, más costoso a nivel temporal, pocos ensayos comercialmente disponibles.
Morfología	Cambio de morfología. Pérdida de polarización.	Forma más real. Se preserva la polarización.
Perfil genético	Genes de adhesión celular, proliferación y supervivencia modificados.	Mejor representación de factores de crecimiento, proangiogénicos y genes de adhesión.
Diferenciación celular y morfogénesis	No espontánea.	Puede ser espontánea por contacto celular o factores solubles.
Angiogénesis	Solo observacional.	Puede ser funcional.
Heterogeneidad tumoral	Básica.	Mejor aproximación a la realidad por el gradiente de proliferación, penetración de fármacos y diferencia en la movilidad.
Modelado matemático	Posible.	Mejor geometría y relación entre estructura y función.
Reproducibilidad	A corto plazo.	Controvertida.

5.2. Modelos experimentales *in vivo* de CPNM

El uso del ratón como modelo para estudio en cáncer se ha dado desde mediados del siglo XX. Desde entonces este modelo experimental ha evolucionado desde las primeras tentativas, consistentes en el estudio de tumores murinos espontáneos o inducidos químicamente o con radiación, pasando por el trasplante de tumores de ratones de la misma cepa genética, o el avance adquirido con los xenotrasplantes de tumores humanos en ratones inmunodeficientes o inmunocomprometidos, es decir, con un sistema inmunológico funcionalmente limitado. Los xenotrasplantes derivados de pacientes (PDX por su siglas en inglés, *Patient derived xenograft*) se han mostrado hasta la fecha potencialmente útiles para predecir la respuesta a terapia, con la desventaja que al ser inmunodeficientes no permiten estudiar la respuesta inmunológica, al tiempo que se ha demostrado que resulta imprescindible utilizar técnicas punteras para caracterizar las poblaciones celulares, el microambiente, las interacciones y la señalización intracelular que se está produciendo en el PDX ⁴¹³.

Uno de los hándicaps de los modelos preclínicos para el estudio del cáncer es conseguir que éstos sean capaces de reproducir la heterogeneidad y complejidad del tumor original. De la dificultad de recapitular la naturaleza del tumor primario derivan otros problemas de los modelos preclínicos en cáncer como la falta de reproducibilidad y su variable valor predictivo ^{414,415}. Los modelos de ratón se utilizan como modelos preclínicos y se asume que son, a priori, mejor que los modelos *in vitro* para probar nuevas estrategias terapéuticas y para estudiar la susceptibilidad y resistencia a nuevos medicamentos.

5.2.1. Xenotrasplantes derivados de tumores de paciente (PDX)

En cáncer de pulmón, los PDX recapitulan el cáncer original en términos de estructura tisular, con la histología y características genéticas ^{416,417}. No obstante, las desventajas de los PDX son el bajo índice de éxito al establecerlos (30-40%), el requerimiento temporal (2-10 meses), el coste económico, el limitado poder estadístico y el limitado potencial como plataforma para ensayos

de alto rendimiento (*high throughput*)^{418,419}. Otro inconveniente es que, según muestran algunos estudios, la acumulación de mutaciones a través de los pases de PDX viene determinada por la presión selectiva del huésped, es decir, el ratón. Esto significa que la evolución tumoral en el ratón podría ser distinta a la evolución del tumor en el paciente, y por tanto tiene implicaciones a la hora de escoger esta plataforma como modelo de estudio del cáncer⁴²⁰. También se ha mencionado ya la desventaja de no poder estudiar la respuesta inmunológica frente al tumor al tratarse de animales inmunodeficientes o inmunocomprometidos⁴¹³.

La implantación de los PDX en ratón suele ser heterotópica (subcutánea en un flanco o en la espalda) u ortotópica (en el órgano equivalente)⁴²¹. En el caso del CPNM, el carcinoma de células escamosas suele presentar más éxito en la implantación que el adenocarcinoma^{422,423}. Como se ha indicado previamente, un número elevado de pases implica la acumulación de mutaciones sobre el tumor original que reflejan más la evolución en el huésped de lo que lo haría en el paciente. En este sentido, utilizar un menor número de pases implica preservar las mutaciones y frecuencias alélicas del tumor original⁴²³. También implica preservar la morfología, arquitectura e inmunohistoquímica, algo que sucede más en adenocarcinomas⁴²². Como sucede con otros tipos de tumor, en CPNM un número elevado de pases compromete al estroma y al componente inmunológico del tumor, los cuales acaban desapareciendo. De hecho, las células tumorales aumentan en porcentaje en el PDX a medida que se suceden los pases⁴²⁴. La presión selectiva también provoca la mejor preservación de patrones sólidos, un aumento de la expresión de Vimentina y un aumento en la expresión de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima (EMT). También se ha descrito una mejor implantación de tumores con mayor contenido en CSC⁴²⁵.

5.2.2. Alotrasplantes singénicos en modelo de ratón

Para superar algunos de los inconvenientes comentados de los xenotrasplantes se emplean los alotrasplantes singénicos, que consisten en el

trasplante de células de un ratón a otro de la misma cepa, es decir, con el mismo trasfondo o *background* genético. Así, se pueden estudiar tumores de ratón en un entorno con un sistema inmunológico nativo (el ratón es inmunocompetente) y con un estroma y microambiente tumoral de la misma especie. También se puede realizar un cultivo *in vitro* intermedio de esas células. Este modelo se ha demostrado útil para estudiar inmunoterapias. No obstante, presenta como principales limitaciones el no estudiar el tumor humano directamente (y el murino carece de la complejidad genética de éste). Para los estudios del cáncer de pulmón, un modelo muy utilizado de alotrasplante singénico es el carcinoma de Lewis, una línea tumoral obtenida de un carcinoma desarrollado espontáneamente en ratón ^{426–429}.

5.2.3. Modelos de ratón modificados por ingeniería genética (GEMM)

Además de los PDX, modelos de ratón con modificaciones genéticas (GEMM, de *genetically engineered mouse models*) han permitido múltiples estudios en CPNM, especialmente ensayos preclínicos con terapias dirigidas, el estudio de la metástasis y el estudio de las células que originan el tumor ⁴³⁰. Los GEMM son útiles para determinar efectos específicos *in vivo* de las mutaciones clave en la enfermedad. Los ratones con mutaciones en *KRAS*, *EGFR* y *ALK* muestran rasgos fenotípicos de similitud con subtipos de CPNM incluso sin el resto del trasfondo genético complejo de la enfermedad ^{431–435}.

Otras aplicaciones de los GEMM son la evaluación de inmunoterapias y el análisis del microambiente tumoral (y su efecto en la respuesta), o la activación selectiva de rutas de señalización ⁶¹.

5.2.4. Modelos de ratón inducibles por carcinógenos

A diferencia de los modelos descritos, estos sistemas se basan en el empleo de fármacos que inducen mutaciones específicas que, como consecuencia, llevan a eventos de transformación oncogénica. Los ratones empleados en este modelo suelen ser cepas consanguíneas como A/J y SWR,

con genotipos casi idénticos entre individuos debido a la endogamia. Estos modelos son más susceptibles de sufrir tumorigénesis espontánea. En cáncer de pulmón, el modelo inducible por uretano se basa en la inyección intraperitoneal de este compuesto químico, que origina una hiperplasia que posteriormente llevará a un adenoma y, finalmente, a un adenocarcinoma. Las mutaciones inducidas coinciden con eventos genéticos característicos del ADC de pulmón, como *KRAS* y *TP53*. Algunos sistemas empleados también en cáncer de pulmón son el inducido por α -benzopireno, 3-metilcolantreno, dietilnitrosamina, y derivados químicos de urea como el N-nitroso-metil-biscloroetilurea (NMBCU) y el N-nitro-triscloroetilurea (NTCU), entre otros. Algunas ventajas de estos modelos son que se muestran altamente reproducibles y que el proceso de tumorigénesis se da en función del tiempo, lo que permite al investigador controlar el proceso a través de la administración de los compuestos químicos y estudiar los distintos estadios tumorales. Además, se puede predecir mejor la eficacia clínica de quimioterapias. No obstante, la variabilidad a la hora de suministrar los carcinógenos y la consecuente diferencia en el resultado obtenido es una de las desventajas de este modelo. Otros inconvenientes son los largos tiempos de estudio y los eventos de letalidad que se dan en ratones en estos casos ^{426,436-440}.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El CPNM es un problema de salud pública de enorme magnitud por su alta tasa de mortalidad, debido principalmente al diagnóstico tardío, la aparición de recidivas, metástasis y resistencia a los tratamientos. El CPNM se caracteriza por ser una enfermedad heterogénea a nivel molecular y clínico. El paradigma de las CSC para la patobiología de los tumores sólidos supone un reconocimiento a su heterogeneidad, y explica la resistencia a los tratamientos convencionales y a las nuevas terapias aprobadas. Múltiples marcadores se han propuesto para detectar CSC en CPNM, con resultados dispares. El abordaje metodológico es esencial en la identificación y caracterización de las CSC. Por otro lado, la EMT es un proceso biológico que se relaciona con la progresión del cáncer. Una de las vías de señalización implicadas en la EMT es la vía de TGF- β . Niveles de TGF- β patológicos son capaces de promover la EMT y la pluripotencia, lo que lleva a un mayor crecimiento e invasión de células cancerosas, evasión de la vigilancia inmunológica, diseminación y metástasis tumoral.

Nuestra hipótesis es que es posible optimizar el cultivo *in vitro* 3D para estudiar la biología de las CSC, y enunciar una firma molecular relacionada con esta población celular con valor pronóstico en CPNM. Además, postulamos que la identificación de nuevos factores que regulan la vía de TGF- β en el CPNM abre la posibilidad a nuevas perspectivas terapéuticas contra la progresión del cáncer.

Por último, los modelos experimentales *in vivo* que simulan el tumor primario del paciente son herramientas clave en la investigación del cáncer para comprender su biología tumoral, y para la validación del descubrimiento de biomarcadores y fármacos, con el ratón como modelo principal. Dentro de ellos, los PDX de CPNM se utilizan con ventajas sobre el cultivo *in vitro* en la preservación del fenotipo original del tumor primario. Sus características sugieren mejor potencial para el cribado terapéutico y seguimiento de la evolución del tumor en estos modelos. Nuestra hipótesis es que, a través del uso de PDX de CPNM en ratón, se puede anticipar la evolución del tumor y su prognosis.

De esta manera, el objetivo general de este proyecto de tesis doctoral es:

- Desarrollar modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, y estudiar a nivel molecular y celular las CSC y la EMT en CPNM, para identificar nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas.

Los objetivos específicos son:

- Desarrollar un modelo experimental de cultivo 3D para optimizar el enriquecimiento de poblaciones CSC de muestras de CPNM y su caracterización.
- Profundizar en el papel del factor de transcripción JunB y en el factor de traducción eIF5A2 en la EMT mediada por TGF- β 1 en CPNM.
- Generar una colección de PDX de tumores de pacientes con CPNM y correlacionar la evolución de los tumores con variables clínico-patológicas de los pacientes.

El abordaje de estos objetivos queda resumido en la Figura 10.

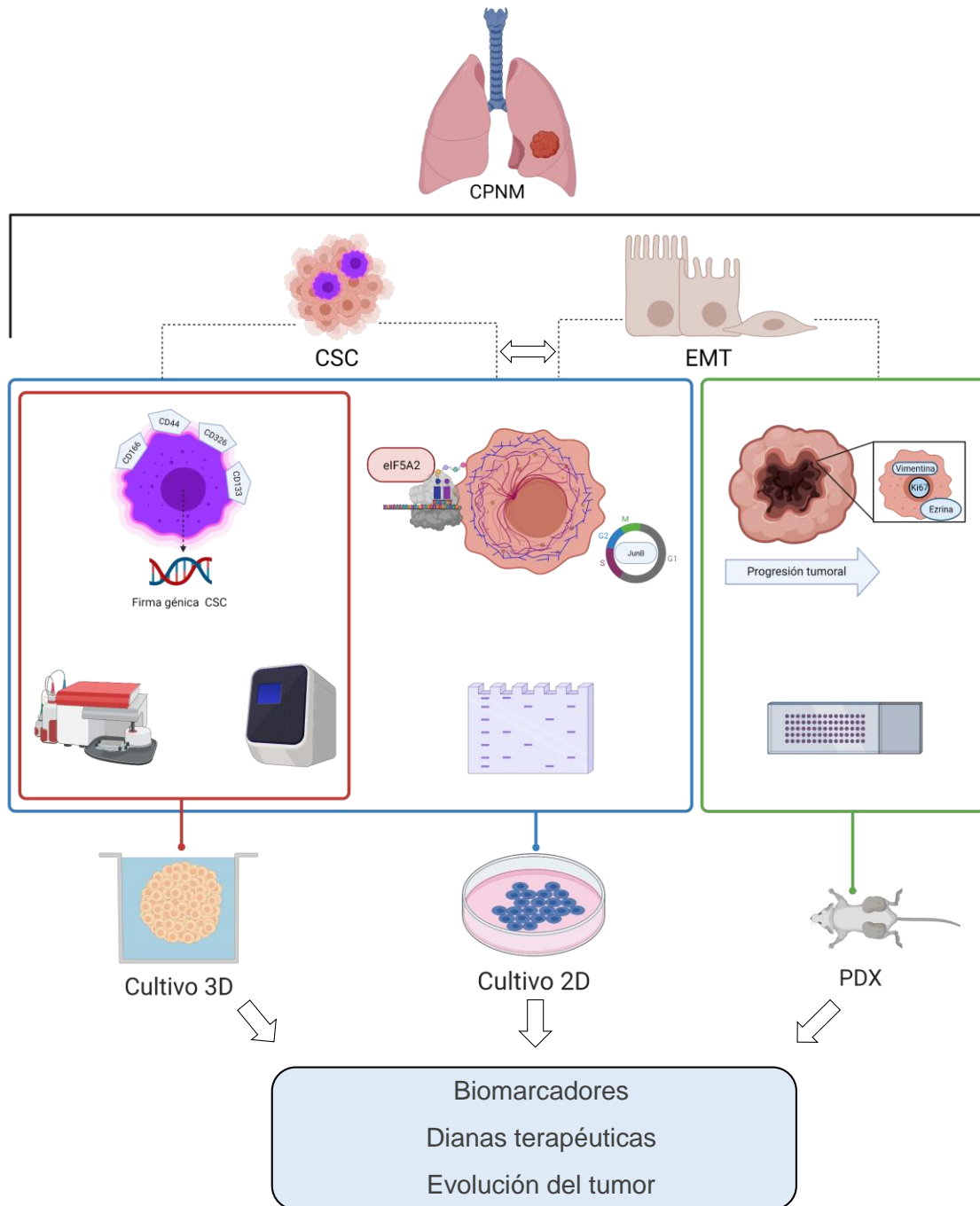


Figura 10. Resumen gráfico del proyecto de tesis. Teniendo como principal objeto de estudio el CPNM, en este trabajo se han empleado modelos *in vitro* (cultivos 2D y 3D) e *in vivo* (PDX) para profundizar en dos campos de la oncología molecular: las CSC y la EMT. Creado con Biorender.com

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivo celular

En este trabajo se han empleado las líneas celulares establecidas de adenocarcinoma de pulmón A549, H441, H1395, H1650, H1993 y PC9 y de osteosarcoma U2OS (Tabla 3), y cultivo primario derivado de tumores de pacientes con CPNM (Tabla 4). La manipulación de los cultivos celulares se realizó en una cabina de flujo laminar Telstar BIO-II-A (Telstar®, Terrassa, España). Las células se crecieron en un incubador (Steri-Cycle® CO₂ Incubador HEPA class 100, Hucoa Erlös, Madrid, España) a 37°C en una atmósfera con un 80% de humedad relativa y un 5% (v/v) de CO₂/aire. Para determinar las densidades y las viabilidades celulares se han utilizado, respectivamente, la cámara de recuento Neubauer (Ref: 8100103, Hirschmann®, Neckartenzlingen, Alemania) y la tinción con azul de tripano por métodos estándar (Trypan Blue solution, Ref: T8154, Sigma-Aldrich®, Merck®, Darmstadt, Alemania). Todos los experimentos se llevaron a cabo en condiciones de subconfluencia, lo cual se corresponde con una densidad celular de aproximadamente un 80% de confluencia.

1.1. Líneas celulares establecidas

Las líneas celulares establecidas A549, H441, H1395, H1650, H1993 y U2OS procedían de la Colección Americana de Cultivos Tipo (*American Type Culture Collection*, ATCC). PC9 procedía de la Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*, ECACC). La línea U2OS, de osteosarcoma, fue cedida por Veronique Baldin, del Centro de Investigaciones en Bioquímica Molecular CRBM-CNRS (Montpellier, Francia). Las principales características de estas líneas se especifican en la Tabla 3.

Tabla 3. Listado de las líneas celulares establecidas utilizadas en los diferentes experimentos realizados para esta tesis doctoral. Información obtenida de la base de datos de la colección comercial de líneas celulares de la *American Type Culture Collection (ATCC)*⁴⁴¹; de la base de datos de líneas *Cellosaurus* de la web de recursos bioinformáticos *ExPASy*⁴⁴²; y de la base de datos *CellLineNavigator*, de *Medical Genomics*⁴⁴³.

Línea celular	Sexo del paciente de origen	Edad	Histología	Estatus mutacional
A549	Masculino	58	ADC pulmón	KRAS (c.34G>A) STK11 (c.109C>T) CDKN2A (delección locus)
H441	Masculino	33	ADC pulmón	KRAS (c.35G>T) TP53 (c.473G>T)
H1395	Femenino	55	ADC pulmón	BRAF (c.1406G>C) ATM (c.7996A>G)
H1650	Masculino	27	ADC pulmón	EGFR (c.2235_2249del15) CDKN2A (c.1_471del471) TP53 (c.673-2A>G)
H1993	Femenino	47	ADC pulmón	TP53 (c.726C>G)
PC9	Masculino	45	ADC pulmón	EGFR (c.2235_2249del15) TP53 (c.743G>A)
U2OS	Femenino	15	Osteosarcoma	-

1.1.1. Cultivo en adherencia de líneas celulares establecidas

El cultivo celular se realizó en microplacas de poliestireno de 6 pocillos tratadas para cultivo en adherencia (*TC-treated*, Corning® Costar®, Ref: 153516, Corning Incorporated, Nueva York, Estados Unidos). El medio de cultivo para las líneas celulares A549, H441, H1395, H1650, H1993 y PC9 está compuesto por medio de Eagle modificado por Dulbecco con formulación F12 y suplementado con GlutaMAX® (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12*, DMEM/F12 + GlutaMAX®, Gibco®, Ref: 31331093, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos), suplementado con un 10% del volumen total de suero bovino fetal (*Fetal bovine serum*, FBS, Gibco®, Ref: 11573397, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos) y con antibióticos penicilina/estreptomina (*Penicilin/Streptomycin*, P/S, Gibco®, Ref: 15140122, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos) en concentraciones de 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Para la línea U2OS se utilizó DMEM alto en glucosa (*Dulbecco's*

Modified Eagle Medium, Merck®, Darmstadt, Alemania) suplementado con un 10% de FBS y P/S en las mismas concentraciones que en las otras líneas.

1.1.2. Mantenimiento y pases de cultivo de líneas en adherencia

Al llegar a condiciones de subconfluencia, el medio de cultivo es aspirado de los pocillos, se realiza un lavado con tampón fosfato salino atemperado a 37°C (*Phosphate buffered saline*, PBS, Ref: L0615-500, Biowest®, Nuaille, Francia). A continuación, se añaden 200 µL de Tripsina-EDTA al 0,05% (Tripsina-EDTA 0,5%, Ref: 10779413, Gibco®, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos) en PBS, y se incuba 5 minutos a 37°C. Seguidamente, se neutraliza la acción de la enzima con DMEM/F12 suplementado con suero y se centrifuga a 400g durante 5 min. El sedimento celular se resuspende en 1 mL de medio y se procede a valorar la viabilidad celular y contaje celular por métodos estándares. En función de la densidad celular deseada, se efectúa la resiembra en placa o pocillos nuevos.

1.1.3. Cultivo de tumoresferas de líneas celulares establecidas

Para establecer el cultivo celular de tumoresferas a partir de líneas celulares establecidas se sembraron 5000 células/mL de medio en placa de 6 pocillos (*Ultra Low Attachment Surface*, Ref: 153471, Corning® Costar®, Nueva York, Estados Unidos), que están tratadas con poli-2-hidroxietil-metacrilato, que permite el crecimiento de las células en suspensión o en baja adherencia. Las células se crecieron en medio DMEM/F12 suplementado con insulina 5 µg/mL, transferrina 5 µg/mL y ácido selenoso 5 ng/mL (*Insulin-Transferrin-Selenious acid*, ITS, Ref: 354351, Corning®, Estados Unidos), factor de crecimiento epidérmico humano 0,2 µg/mL (*human epidermal growth factor*, hEGF, Ref: 100-15, PeproTech®, Estados Unidos), factor de crecimiento de fibroblastos humano básico 0,1 µg/mL (*human Fibroblastic growth factor-basic*, hFGFb, Ref:100-18B, PeproTech®, Estados Unidos), albúmina sérica bovina fracción V 0,4% (BSA, Ref: 15260037, Gibco®, Thermo Fisher Scientific®), 50 µg/mL de ácido

ascórbico (Ref: A2218-25G, Merck), aminoácidos no esenciales del medio esencial mínimo 1X (Ref: 11140035, Gibco®, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos) y penicilina/estreptomicina (100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, P/S).

1.1.4. Disgregación de tumoresferas de líneas celulares establecidas

Para la individualización de las células de las esferas formadas, es decir, su disgregación en células individuales, estas se recogen en tubo cónico de 15 mL (Ref: 525-0401, VWR®, Avantor®, Radnor, Estados Unidos) y se centrifugan a 400g durante 5 minutos. A continuación, se lavan con PBS, se añaden 200 µL de Tripsina-EDTA al 0,05% (Tripsina-EDTA 0,5%, Ref: 10779413, Gibco®, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos) en PBS, y se incuba 5 minutos a 37°C. Seguidamente, se neutraliza la acción de la enzima con 2 mL de DMEM/F12 suplementado con un 1% de albúmina sérica bovina fracción V (BSA) y se centrifuga a 400g durante 5 min. El sedimento celular se resuspende en 1 mL del medio ya formulado para tumoresferas y se procede a valorar la viabilidad celular y conteo celular por métodos estándares, para pasar el cultivo de esferas.

1.2. Cultivos primarios a partir de tejido tumoral de CPNM

1.2.1. Criterio de selección de muestras y recepción

Las muestras de tejido tumoral y tejido pulmonar adyacente al tumor procedían de pacientes a los que se les ha extirpado un tumor de CPNM en el Hospital General Universitario de Valencia. El criterio de selección de pacientes fue el siguiente: pacientes que fueron intervenidos quirúrgicamente, con posibilidad de obtener biopsia, no tratados previamente, estadios I-III A (según estadificación del Comité Conjunto Americano del Cáncer (*American Joint Committee on Cancer, AJCC* ⁴⁴⁴) y con diagnóstico histológico de algún subtipo de CPNM. Las muestras seleccionadas por patólogo fueron enviadas del Laboratorio de Oncología Molecular de la Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUV, Valencia), dirigido por el Dr. Camps y la Dra. Eloisa Jantus, y al Laboratorio de Señalización Oncogénica

en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF, Valencia). Las secciones biopsiadas se recibieron sumergidas en DMEM/F12+GlutaMAX® (Ref: 31331093, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos) suplementado con antibióticos P/S (Ref: 15140122, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos). Las muestras fueron caracterizadas histológicamente en el hospital como se describe en ³⁰¹, donde también se determinó si contenían mutaciones en los genes *EGFR*, *TP53*, *ROS1*, *ALK*, y *KRAS*. En la Tabla 4 se recogen las características clínico-patológicas de los pacientes que se incluyeron en el estudio de CSC de CPNM.

Tabla 4. Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio de CSC. Muestras de pacientes del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUV), a partir de las cuales se obtuvieron tumoresferas para su cultivo *in vitro*. *CCEP*: carcinoma de células escamosas de pulmón; *ADC*: adenocarcinoma (página siguiente).

Número de muestra	Código paciente	Sexo paciente	Edad paciente (años)	Estadio TNM	Histología	Fumador	Progresión o Exitus	Estatus mutacional	Tiempo de seguimiento (meses)	Formación de tumoresferas
#1	FIS291	Masculino	66	IIA (T2aN0M0)	CCEP	Sí	Sí	KRAS G12C	25,77	No
#2	FIS299	Masculino	69	IIIA (T4N1M0)	CCEP	Sí	Sí	TP53 K132E	6,1	Sí
#3	FIS301	Masculino	71	IIB (T3N0M0)	CCEP	Sí	No	TP53 D259fs*84	30,77	Sí
#4	FIS302	Femenino	74	IIA (T2aN0M0)	ADC	No	No	KRAS G12D / TP53 E285K	33,23	Sí
#5	FIS303	Femenino	57	IB (T2aN0M0)	ADC	Sí	Sí	TP53 R175H	11,13	Sí
#6	FIS308	Masculino	72	IIB (T3N0M0)	CCEP	Sí	No	-	27,8	No
#7	FIS310	Masculino	68	IIIA (T3N2M0)	ADC	Sí	Sí	TP53 V157F / R123SNP	6,43	No
#8	FIS312	Masculino	62	IA (T1bN0M0)	ADC	Sí	No	-	24,8	No
#9	FIS315	Femenino	65	IA (T1aN0M0)	ADC	No	No	-	20,93	Sí
#10	FIS317	Masculino	76	IIB (T3N0M0)	CCEP	Sí	Sí	-	18,4	Sí
#11	FIS320	Masculino	65	IB (T2aN0M0)	ADC	Sí	No	TP53 P153fs*26	23,6	Sí
#12	FIS321	Masculino	83	IB (T2aN0M0)	CCEP	Sí	No	TP53 Q156*	22,5	No
#13	FIS325	Femenino	67	IB (T2aN0M0)	ADC	No	No	EGFR L858R	16,97	No
#14	FIS326	Femenino	64	IB (T2aN0M0)	ADC	Sí	Sí	EGFR L858R / TP53 G244C	6,97	No
#15	FIS330	Masculino	54	IA (T1aN0M0)	ADC	Sí	No	TP53 R283P	5,1	No
#16	FIS331	Masculino	75	IIA (T2aN1M0)	ADC	Sí	Sí	TP53 R175H	6,20	No
#17	FIS337	Masculino	73	IB (T2aN0M0)	ADC	Sí	No	KRAS G12S	8,27	No
#18	FIS343	Femenino	60	IB (T2aN0M0)	ADC	Sí	Sí	TP53 R158L	7,00	Sí
#19	FIS345	Masculino	74	IIIA (T1aN2M0)	CCEP	Sí	No	-	7,80	No
#20	FIS347	Femenino	68	IB (T2aN0M0)	ADC	No	No	-	17,67	No

1.2.2. Generación de cultivo primario a partir de tumores de CPNM

La optimización del procesado para la obtención de una suspensión celular para establecer cultivo primario a partir de tumores de CPNM se detalla en la sección *Generación de tumoresferas a partir de biopsias de tumores primarios de CPNM* del Capítulo 1 de los Resultados. Una vez recibido la biopsia recién resecada en medio DMEM, esta se lava con PBS frío, se disecciona mecánicamente con bisturí (en secciones $\geq 1 \text{ mm}^3$) y se somete a disgregación enzimática con colagenasa tipo IV 1 mg/mL (Gibco®, Ref: 17104-019, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos), dispasa 1 mg/mL (Gibco®, Ref: 17105-041, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos) y DNasa I 0,001% (10 $\mu\text{g/mL}$, Ref: DN25-1G, Sigma Aldrich®, Merck®, Darmstadt, Alemania) durante 1,5-2 horas a 37°C, con agitación suave. Tras ello, la suspensión celular obtenida se somete a un filtrado con tamizador celular en filtro de 70 μm (Ref: 352350, Falcon®, Estados Unidos). Tras recuperar las células por centrifugación y lavarlas con PBS, se realiza la lisis de eritrocitos de la muestra. Para ello, se resuspenden las células en 500 μL de DMEM y se añaden 10 mL de tampón de lisis de eritrocitos 1X (Ref: 555899, BD Biosciences®, Estados Unidos), y se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación media. Tras ello, de nuevo se lavan las células y se evalúa la viabilidad y el número de células por método estándar. El tejido previamente retenido en el filtro también se destina a siembra.

1.2.3. Establecimiento del cultivo primario de tumoresferas

Para establecer el cultivo celular de tumoresferas a partir de células de tumores de CPNM, las células obtenidas de la disgregación del tumor se sembraron a 10000 células/mL de medio en placa de 6 pocillos, siguiendo el protocolo indicado en el apartado 1.1.3. *Cultivo de tumoresferas de líneas celulares establecidas*. Para la disgregación de tumoresferas de muestras derivadas de paciente se siguió el protocolo indicado en 1.1.4. *Disgregación de tumoresferas de líneas celulares establecidas*.

1.2.4. Cultivo en adherencia de muestras derivadas de pacientes

Para establecer el cultivo celular en adherencia a partir de células de tumores de CPNM, las células obtenidas de la disgregación del tumor se sembraron en placa de 6 pocillos para cultivos en adherencia (*TC-treated*, Ref: 153516, Corning® Costar®) en DMEM/F12 suplementado con antibióticos P/S (100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina, P/S) y 10% FBS. La densidad celular sembrada depende del número de células obtenidas en el procesado.

2. Anticuerpos

Los anticuerpos empleados en este trabajo para detectar las proteínas indicadas y que aparecen en los Resultados se resumen a continuación en función de la técnica en la que han sido empleados:

2.1. Anticuerpos para *Western Blot*

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en *Western Blot*.

	Anticuerpo (proteínas detectadas)	Especie de producción	Fabricante y referencia comercial
Anticuerpos primarios	β-Actina	Monoclonal de ratón	Sigma Aldrich®, A5441
	Ciclina E	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology®, sc-481
	DRF1 (Dia1)	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology®, sc-373807
	E-cadherina	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology®, sc-8426
	eIF5A1	Monoclonal de ratón	Sigma Aldrich®, E1783
	eIF5A2	Policlonal de conejo	Proteintech®, 17069-1-AP
	Ezrina	Monoclonal de ratón	Thermo Fisher Scientific®, MA5-13862
	FHOD1	Policlonal de conejo	Merck Millipore®, ABS53
	FMNL1	Policlonal de conejo	Abcam®, ab97456
	Formin-2	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology®, sc-376787
	GAPDH	Monoclonal de ratón	Merck Millipore®, MAB374
	Hipusina	Policlonal de conejo	Merck Millipore®, ABS1064
	Jag1	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology®, sc-390177
	JunB	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology®, #3753
	Lin-28B	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology®, #11965
	Snai2	Policlonal de conejo	ABclonal®, A1057
	TGF-β2	Policlonal de conejo	ABclonal®, A3640
Vimentina	Monoclonal de ratón	Abcam®, ab8978	
Anticuerpos secundarios	Anti-conejo IgG-HRP	Policlonal de cabra	Sigma Aldrich®, A6154
	Anti-ratón IgG-HRP	Policlonal de conejo	Sigma Aldrich®, A9044

2.2. Anticuerpos para citometría de flujo

Tabla 6. Anticuerpos empleados en citometría de flujo.

	Anticuerpo y fluoróforo	Especie de producción	Fabricante y referencia comercial
Marcaje	CD326 (EpCAM)-FITC	Monoclonal de ratón	Miltenyi Biotec®, 130-080-301
	CD133/1-APC	Monoclonal de ratón	Miltenyi Biotec®, 130-090-826
	CD133/2-APC	Monoclonal de ratón	Miltenyi Biotec®, 130-090-854
	CD166 (ALCAM)-PerCP-eFluor 710	Monoclonal de ratón	eBioscience®, 46-1668-41
	CD44-PeCy7	Monoclonal de ratón	BD Biosciences®, 560533
	CD90-PE-CF594	Monoclonal de ratón	BD Biosciences®, 562385
Isotipos de control	Isotipo IgG1, FITC	Monoclonal de ratón	Miltenyi Biotec®, 130-092-213
	Isotipo IgG2b, APC	Monoclonal de ratón	R&D Systems®, IC0041A
	Isotipo IgG1 κ, PerCP-eFluor 710	Monoclonal de ratón	eBioscience®, 46-4714-80
	Isotipo IgG2b κ, PECy7	Monoclonal de ratón	BD Biosciences®, 560542
	Isotipo IgG2b, PE	Monoclonal de ratón	R&D Systems®, IC0041P

2.3. Anticuerpos para inmunocitoquímica de fluorescencia

Tabla 7. Anticuerpos empleados en inmunocitoquímica de fluorescencia.

	Anticuerpo	Especie de producción	Fabricante y referencia comercial
Anticuerpos primarios	CD326 (EpCAM, extracelular)-FITC	Monoclonal de ratón	Miltenyi Biotec®, 130-080-301
	CD166 (ALCAM)	Monoclonal de conejo	Abcam®, ab109215
	CD44	Monoclonal de ratón	Cell Signaling Technology®, #3570
	CD133	Policlonal de conejo	Novus Biologicals®, NB120-16518SS
Anticuerpos secundarios	Anti-ratón IgG (Alexa Fluor® 647)	Policlonal de cabra	Abcam®, ab150115
	Anti-conejo IgG (Alexa Fluor® 488)	Policlonal de asno	Abcam®, ab150073
	Anti-conejo IgG (Alexa Fluor® 647)	Policlonal de cabra	Invitrogen®, A-21244

2.4. Anticuerpos para inmunohistoquímica de tejido normal pulmonar y CPNM

Tabla 8. Anticuerpos empleados en inmunohistoquímica.

Proteína detectada	Concentración utilizada ($\mu\text{L}:\mu\text{L}$)	Fabricante y referencia comercial
Citoqueratina 7 (CK7)	Sin diluir	Agilent®, IR61961-2
Citoqueratina 20 (CK20)	Sin diluir	Agilent®, IR77761-2
TTF1	Sin diluir	Agilent®, IR05661-2
Ki67	Sin diluir	Agilent®, IR62661-2
Vimentina	1:9	Abcam®, ab8978
Ezrina	1:9	Thermo Fisher Scientific®, MA5-13862

3. Tratamientos y ensayos celulares

3.1. Experimentos de lipofección para expresión transitoria o silenciamiento génico de proteínas

3.1.1. Expresión transitoria de proteínas con plásmidos

Los plásmidos que se emplearon en este trabajo fueron pcDNA®3.1(+) (Ref: V79020, Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos); y pcDNA®3(-)-eIF5A2, derivado del vector pcDNA®3.1(-), contiene el ADNc de eIF5A2.

Para introducir los plásmidos en las células se realizó transfección por lipofección con Lipofectamina 2000® (Ref: 11668-030, Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos) según las instrucciones del fabricante.

3.1.2. Silenciamiento génico mediado por ARN de interferencia de eIF5A2

Para silenciar la expresión génica de eIF5A2 de forma específica, se utilizó la introducción de un ARN pequeño de interferencia (*small interfering RNA*,

siRNA, siARN). Las células crecidas a subconfluencia fueron transfectadas durante 48 horas con siARN frente a eIF5A2 (siEIF5A2, secuencia para silenciar EIF5A2: GACAGAAACUGGUGAAGUU) a una concentración de 100 pmol usando medio reducido en suero Opti-MEM® (Ref: 31985047, Gibco®, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos) y la lipofectamina con reactivo para transfección Lipofectamine®-RNAiMAX® (Ref: 13778030, Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos), según las instrucciones del fabricante. Como control se usó un siARN negativo (*Silencer® Negative Control #1*, Ref: AM4611, Ambion®, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos).

3.2. Tratamiento con TGF-β1

En este trabajo se ha utilizado la citoquina TGF-β1 para inducir la señalización por TGF-β en tumoresferas y en células crecidas en adherencia. Para ello, las células se sembraron a la densidad indicada o a subconfluencia en los cultivos de adherencia y se trataron con proteína humana recombinante TGF-β1 a 4 ng/mL (Ref: 100-21C, PeproTech®, Estados Unidos) durante el tiempo indicado. Esta proteína es inestable en cultivo, por lo que es renovada en el medio cada 48 horas.

4. Técnicas de análisis celular

4.1. Citometría de flujo

La citometría de flujo se emplea con la finalidad de estudiar el inmunofenotipo de superficie de una célula, esto es, caracterizar biomarcadores de membrana inmunológicamente activos, que se puedan detectar mediante reacciones específicas antígeno-anticuerpo. La caracterización de la expresión de las proteínas de membrana de los cultivos en adherencia y en suspensión se realizó mediante citometría de flujo. Las células de las tumoresferas individualizadas, se resuspendieron a razón de 1×10^6 células/mL en PBS. Para el marcaje se utilizaron 100 μL de la suspensión celular que se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con el anticuerpo correspondiente (Tabla 6). La viabilidad celular se midió empleando yoduro de

propidio (1 mg/mL, Ref: P4170, Sigma Aldrich®, Merck®, Alemania). Tras la incubación, se añadieron 2 mL de PBS, las células se centrifugaron a 400g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 300 µL de PBS. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo CytoFLEX S (Beckman Coulter®, Estados Unidos).

4.2. Separación de subpoblaciones de líneas tumorales

Para la separación de subpoblaciones celulares de líneas tumorales se empleó la separación de células activada por fluorescencia o citometría de flujo activada por fluorescencia (*Fluorescence-activated cell sorting*, FACS). Se emplearon los mismos anticuerpos que en citometría de flujo (Tabla 6) para separar por marcadores de interés las subpoblaciones. Para la separación de poblaciones se parte de un número elevado de células crecidas en adherencia ($>10^6$). En este trabajo este experimento se realizó sobre la línea H1650 para subpoblaciones CD326/CD166. Las células se recogen de la placa por tripsinización (como se describe en 1.1.2. *Mantenimiento y pases de cultivo de líneas en adherencia*), y el marcaje se efectuó como en citometría de flujo. Tras un lavado y filtrado de las células, se llevan al separador celular (*cell sorter*) de alta velocidad MoFlo XDP (Beckman-Coulter®, Estados Unidos). Posteriormente se cultivan en condiciones de baja adherencia con medio completo para tumoresferas, según las concentraciones celulares devueltas por el separador celular y en función de la densidad de siembra deseada (10000 cél/mL en el experimento de H1650).

4.3. Microscopía óptica

Las imágenes de microscopía óptica fueron tomadas en un microscopio Leica DM6000 (Leica Microsystems®, Wetzlar, Alemania) y un microscopio Leica DM IL (Leica Microsystems ®) con cámara incorporada DFC350FX (Leica Microsystems®). Se tomaron imágenes a diferentes magnificaciones (4x, 10x, 20x, 40x) y, según el caso, por contraste de fases o directas.

4.4. Contaje de tumoresferas

Para el contaje de las tumoresferas generadas, estas se recogen y se lavan con PBS. Seguidamente se resuspenden en 500 μL del medio de cultivo y se disponen en un pocillo de placa de 96 que previamente ha sido rotulado con cuadrantes en la parte inferior de la placa para facilitar el contaje y obtener la concentración de esferas/ μL .

4.5. Microscopía de fluorescencia

4.5.1. Fijación de cultivos crecidos en adherencia

Las células se sembraron en densidad de 30000 células/ cm^2 sobre cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro (Ref: 0513234, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos). 48 horas después de la siembra los cultivos en monocapa se fijaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído al 4% (PFA 4%) en PBS y se realizaron 5 lavados de 5 minutos con PBS. Las muestras se guardaron a 4°C hasta el momento de realizar la inmunocitoquímica.

4.5.2. Fijación de tumoresferas

Las tumoresferas generadas se recogieron en un tubo de 15 mL, se centrifugaron a 400g durante 5 minutos y se resuspendieron en 600 μL de PBS. Para poder tener las células en un soporte que nos permita hacer la inmunocitoquímica y tomar fotografías a grandes aumentos, las células se centrifugaron sobre un portaobjetos tratado con una solución de gelatina de alumbre, formada por 0,5% de gelatina (Gelatina tipo A, Ref: 9000-70-8, Sigma-Aldrich®, Merck®, Alemania) y 0,05% de alumbre de cromo y potasio (Ref: 101036, Merck®, Alemania), en agua destilada en una centrífuga Cytospin 4 (Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos). A continuación, las células se fijaron con 100 μL de paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura

ambiente y se realizaron 5 lavados de 5 minutos con PBS. Las preparaciones se conservaron en PBS a 4°C hasta realizar la inmunocitoquímica.

4.5.3. Inmunofluorescencia

Para analizar la expresión y localización de las proteínas de estudio, las células se permeabilizaron con PBS con 0,4% de Tritón X-100 (Ref: 1122980101, Sigma-Aldrich®, Merck®, Alemania) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se bloquearon con un 10% de albúmina sérica bovina (BSA), y 0,4% de Tritón X-100 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, y tras ello se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo durante 16 horas a 4°C. Tras este tiempo, se realizaron 5 lavados de 5 minutos con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en la solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 5 lavados de 5 minutos con PBS y las preparaciones se montaron con el medio de montaje antidecoloración ProLong® Gold Antifade (Ref: P36941, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos) que ya lleva DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), colorante para la tinción fluorescente del ADN. Los anticuerpos primarios empleados, así como los correspondientes anticuerpos secundarios aparecen indicados en la Tabla 7.

Para la tinción de los filamentos de actina se utilizó la faloidina conjugada a rodamina (*Phalloidin-TRITC*, faloidina-tetrametilrodamina B isotiocianato, Ref: P1951, Sigma-Aldrich®, Merck®, Alemania) en dilución 1:800. La faloidina es una micotoxina del grupo de las falotoxinas producida por el hongo *Amanita phalloides*. Las capacidades de la faloidina de unir específicamente microfilamentos y de estabilizarlos la facultan para ensayos de microscopía empleando una variante marcada fluorescentemente con un fluorocromo. Se tomaron imágenes en microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS (Leica Microsystems®, Alemania).

5. Técnicas de análisis molecular

5.1. *Western blot*

5.1.1. Lisis de células para extracción proteica

Las células se recogieron del cultivo y se lisaron a 4°C en tampón Triplex (50 mM Tris; HCl pH 8; 150 mM NaCl; 0,01% SDS; 1% Igepal; y 0,5% desoxicolato de sodio), conteniendo el cóctel de inhibidores de proteasas cOmplete® de Roche (Ref: 11697498001, Roche®). Las células se incubaron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron a 16000 g durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. Se realizó la cuantificación de la proteína total de cada muestra mediante el ensayo colorimétrico Bradford ⁴⁴⁵, que se basa en el desplazamiento del máximo de absorción desde 465 nm a 595 nm que experimenta el colorante Brilliant Blue G al formar un complejo con proteínas. La absorbancia a 595 nm es proporcional a la cantidad de proteína. Se mezclaron 200 µL del reactivo de Bradford (Sigma) con 5 µL de los extractos diluidos y se midió la absorbancia de las muestras a 595 nm. Se empleó una curva patrón con concentraciones conocidas de BSA para interpolar las concentraciones de las muestras. Una vez determinada la concentración de proteínas, se añadió tampón de muestra Laemmli 5X a los extractos, y se calentaron 5 minutos a 95°C.

5.1.2. Separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida y transferencia a membrana

Las proteínas de cada muestra se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), que permite la separación por tamaño de las proteínas, con tampón de electroforesis formado por *Running Buffer* 1X (formado por Tris base y glicina), agua tipo II (90% del volumen) y SDS 20% (5 mL/L de tampón), y en fuente de alimentación de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories®, Estados Unidos). Una vez realizada la electroforesis, se procedió a la transferencia en condiciones húmedas de las proteínas del gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (Immun-Blot® PVDF Membrane, Ref: 1620177, Bio-Rad Laboratories®, Estados

Unidos), utilizando el sistema Mini Trans-Blot® Cell” (Ref: 1703930, Bio-Rad Laboratories®, Estados Unidos). El tampón de transferencia empleado se compuso de Tris base 6 g/L y ácido bórico 3,1 g/L. Previamente a la transferencia, la membrana de PVDF se activó con metanol 100% siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se realizó durante toda la noche a temperatura ambiente con un voltaje fijo de 12 V.

5.1.3. Tinciones de comprobación de transferencia

Para comprobar que la transferencia de proteínas a la membrana se ha realizado satisfactoriamente se realiza una tinción de la membrana. La tinción se prepara como 0,1% (masa/volumen) de Ponceau S (Ref: P7170, Sigma-Aldrich®, Merck®, Alemania) en ácido acético al 1% (volumen/volumen agua tipo II). La membrana de PVDF es sumergida en la tinción durante 5 minutos; y seguidamente se destiñe el rojo inespecífico del fondo con tres lavados cortos con ácido acético al 1%. Tras un lavado rápido con agua tipo II se puede apreciar la tinción de las proteínas con un color rojo intenso. La tinción con Ponceau S no priva del posterior marcaje con anticuerpos y detección específica de proteínas. Alternativamente, cuando la concentración de proteínas es muy baja se utiliza la tinción con Amido Black. La preparación se realiza con 0,1% (m/v) de Amido Black (Ref: A8181, Sigma-Aldrich®, Merck®, Alemania), 25% de isopropanol (v/v) y 10% de ácido acético (v/v); todo en agua desionizada tipo II. Para teñir, se incuba 1 minuto la membrana de PVDF. El desteñido se lleva a cabo en una solución acuosa con 25% isopropanol y 10% ácido acético, y puede durar desde 30 minutos a horas, dependiendo cuánto se desee aclarar.

5.1.4. Bloqueo de la membrana

Para la detección inmunológica de las proteínas de interés, las membranas se bloquearon con solución de bloqueo (5% leche desnatada en TBS/Tween 0,05%) durante una hora a temperatura ambiente, en agitación. A continuación, se incubó la membrana con anticuerpo primario. Posteriormente,

se lavó la membrana tres veces durante 10 minutos con TBS/Tween 0,05% y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente. Las diluciones utilizadas de anticuerpos utilizadas para el estudio, así como la correspondencia entre primarios y secundarios se detallan en la Tabla 5. Los tiempos de incubación son dependientes de cada anticuerpo y experimento. Finalmente se detectó la unión antígeno-anticuerpo mediante el método de quimioluminiscencia, empleando un kit comercial de quimioluminiscencia mejorada (ECL, *Enhanced chemiluminescence*) de Pierce® (*Pierce® ECL Western Blotting Substrate*, Ref: 32109, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos). Este kit contiene dos soluciones: peróxido de hidrógeno y luminol en proporción 1:1. Se empleó una reveladora automática de películas AGFA® para detectar la señal en películas radiográficas (*Carestream Medical X-Ray Film*, Ref: 1463116, Kodak®, Nueva York, Estados Unidos).

6. Modelos experimentales *in vivo* de CPNM

6.1. Animales

El manejo de los animales y procedimientos experimentales se realizaron según los requisitos estipulados por el Real Decreto 53/2013 sobre la protección de los animales de experimentación y otros fines científicos. En todo momento se siguieron las normas y recomendaciones del Comité de Ética para el Bienestar Animal (CEBA) del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF, Valencia). Los procedimientos de PDX (2019/VSC/PEA/0156) fueron aprobados por la Conselleria de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalitat Valenciana (Valencia, España).

Un total de 26 ratones NOD SCID (Charles River Laboratories®, Estados Unidos) y 33 ratones NSG® (NOD scid gamma, Jackson Laboratory®, Estados Unidos) se incluyeron en el proyecto de tesis doctoral. Los primeros para la inyección subcutánea de células de CPNM y los segundos para la generación de xenoinjertos derivados de pacientes de CPNM (PDX).

6.2. Inyección subcutánea de células de CPNM en ratón

El ratón NOD SCID (NOD.CB17-*Prkdc^{scid}*/NCrCrI, Charles River Laboratories®, Estados Unidos) de 5-6 semanas se anestesió con isofluorano (dosis inicial al 5% y dosis de mantenimiento al 2,5%), se colocó en posición supina y se realizaron dos inyecciones subcutáneas (una en cada lado del abdomen, y el número es dependiente de cada caso) de 500, 2000, 5000, 20000, 50000 o 500000 células derivadas de tumoresferas de CPNM en un volumen de 200 µL de medio libre de suero y Matrigel® (Ref: 45356230, Falcon® Corning®, Estados Unidos) (1:1). Una vez realizadas las inyecciones, esperamos a que el ratón se despierte para volverlo a meter en la jaula. A partir de aquí se observa el crecimiento tumoral en el lugar de la inyección o alrededores, hasta alcanzar volumen de 1500 mm³. Las dimensiones tumorales se midieron con un pie de rey dos veces por semana y el volumen tumoral se calculó mediante la fórmula $VT \text{ (mm}^3\text{)} = d^2 \times D/2$, donde D es el diámetro mayor y d es el diámetro menor del tumor⁴⁴⁶. Una vez que el tumor ha alcanzado los 1500 mm³, el ratón se sacrificó con dióxido de carbono (<70%) y se aislaron los tumores para proceder a su estudio.

6.3. Generación de xenoinjertos derivados de paciente con CPNM

6.3.1. Selección de pacientes y recogida de muestras

En este estudio se incluyeron pacientes del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia, España) desde octubre de 2016 a junio de 2018. Durante ese tiempo se recogieron un total de 33 muestras, de pacientes intervenidos de acuerdo con los criterios: tumores resecables, diagnóstico histológico de cáncer de pulmón y no pretratado (Tabla 9). El seguimiento de los pacientes para los fines de esta investigación se realizó hasta febrero de 2021. El estudio se realizó de acuerdo con las directrices de la Declaración de Helsinki, y fue aprobado por el Comité de Ética Institucional del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (código de protocolo: CIPF 15/005 de 15 de julio de 2016). Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes involucrados en el

estudio. Las muestras se recogieron con un procedimiento estéril y se colocaron en medio básico (DMEM-F12, P/S 1%) hasta la llegada al CIPF (Valencia, España), donde fueron procesadas. Siempre se siguieron las pautas y la regulación de ambos institutos. En todos los casos, se recogió una biopsia de cáncer de pulmón (de 25 a 100 mm³ de tamaño) y una biopsia adyacente de pulmón normal con fines comparativos. Las muestras se lavaron con PBS frío y luego se trituraron en pequeñas porciones (5 mm³). Una porción de la muestra se conserva en hielo y de inmediato se implanta en el ratón.

Tabla 9. Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio de modelo *in vivo* de PDX. ADC: adenocarcinoma. CCEP: carcinoma de células escamosas de pulmón. CPCG: carcinoma de pulmón de células grandes. NEU: carcinoma neuroendocrino. PCP: cáncer de pulmón de células pequeñas. MD: mínimamente diferenciado. MIA: adenocarcinoma mínimamente invasivo de pulmón. PC: carcinoma pleomórfico pulmonar. PDX: xenoinjerto derivado de paciente. *EGFR*: receptor del factor de crecimiento epidérmico. WT: *wild type*, tipo salvaje (no mutado). ns: no significativo (página siguiente).

Número de muestra	Código paciente	Sexo paciente	Edad paciente (años)	Estadio TNM	Histología	Fumador	Progresión o Exitus	EGFR estatus	ALK estatus	Tiempo de seguimiento (meses)	Formación de PDX
#1	LF01	Masculino	57	IIb (T2aN1MX)	ADC predominantemente acinar	Sí	No	WT	ns	53,37	Sí
#2	LF02	Masculino	76	IIb (T3N0MX)	ADC invasivo mucinoso	No	Sí	ns	ns	0,60	No
#3	LF03	Masculino	79	Ia2 (T1bN0MX)	ADC predominantemente lepidico	No	No	WT	ns	52,57	No
#4	LF05	Femenino	67	IVa (T3N1M1b)	ADC predominantemente sólido	Sí	No	WT	WT	51,20	Sí
#5	LF06	Masculino	76	IIIa (T2aN2MX)	ADC predominantemente acinar	Sí	Sí	WT	WT	21,67	No
#6	LF07	Femenino	76	IIb (T3N0MX)	ADC mucinoso invasivo	No	Sí	WT	ns	44,70	No
#7	LF08	Masculino	71	IIb (T3N0M0)	ADC predominantemente acinar	Sí	No	WT	ns	49,97	No
#8	LF09	Masculino	75	Ib (T2aN0MX)	ADC mucinoso predominantemente lepidico	Sí	No	WT	ns	49,63	Sí
#9	LF11	Masculino	79	Ia3 (T1cN0M0)	ADC predominantemente sólido	Sí	Sí	WT	ns	16,17	No
#10	LF12	Masculino	55	IVa (T3N1M1b)	ADC predominantemente acinar	Sí	No	WT	ns	48,70	No
#11	LF14	Masculino	82	Ia2 (T1bN0M0)	ADC predominantemente acinar	No	No	WT	ns	46,97	No
#12	LF15	Masculino	54	IIb (T3N0M0)	ADC predominantemente sólido	Sí	Sí	WT	ns	14,27	Sí
#13	LF16	Masculino	67	Ia2 (T1bN0M0)	ADC predominantemente lepidico	Sí	No	WT	ns	46,47	No
#14	LF17	Femenino	50	IIb (T3N0M0)	CPCG	Sí	No	ns	ns	46,07	No
#15	LF18	Femenino	63	Ib (T2aN0M0)	Carcinoma adenoescamoso	Sí	Sí	WT	WT	1,67	No
#16	LF19	Masculino	76	Ia3 (T1cN0M0)	ADC acinar	Sí	No	WT	ns	45,83	Sí
#17	LF20	Masculino	61	IIIa (T2bN2M0)	ADC acinar	Sí	Sí	WT	ns	12,13	Sí
#18	LF21	Masculino	79	Ia3 (T1cN0M0)	CCEP	Sí	Sí	WT	ns	37,43	Sí
#19	LF22	Masculino	68	IIIb (T3N2M0)	Carcinoma neuroendocrino	Sí	Sí	ns	ns	4,67	Sí
#20	LF23	Masculino	77	Ib (T2aN0M0)	Carcinoma adenoescamoso	Sí	Sí	WT	ns	20,80	No
#21	LF24	Masculino	69	Ia1 (T1bN0M0)	Carcinoma adenoescamoso	Sí	No	WT	ns	44,40	No
#22	LF25	Femenino	72	IIIa (T4N0M0)	ADC mucinoso lepidico	No	No	WT	ns	41,80	No
#23	LF26	Femenino	42	IIIa (T2aN2M0)	ADC pobremente diferenciado sólido	No	No	WT	ns	40,63	No
#24	LF27	Masculino	73	Ia1 (T1aN0M0)	ADC mínimamente invasivo (MIA)	No	No	WT	ns	40,53	No
#25	LF28	Masculino	78	IIb (T2aN1M0)	ADC MD acinar	Sí	Sí	WT	ns	20,50	No
#26	LF29	Masculino	52	IVb (T2bN0M1b)	ADC sólido escasamente diferenciado	Sí	Sí	WT	WT	15,93	Sí
#27	LF30	Femenino	87	Ia3 (T1cN0M0)	ADC lepidico moderadamente diferenciado	No	No	Mutante	ns	10,53	No
#28	LF32	Masculino	76	IIb (T3N0M0)	Carcinoma pleomórfico con mínimo ADC	Sí	Sí	WT	WT	3,53	No
#29	LF33	Masculino	62	IIb (T2bN0M0)	ADC acinar	Sí	No	WT	ns	37,40	No
#30	LF34	Femenino	75	Ia3 (T1cN0M0)	ADC acinar	No	No	WT	ns	36,57	No
#31	LF36	Masculino	67	IIb (T3N0M0)	Tumor indiferenciado	Sí	No	ns	ns	36,27	No
#32	LF37	Femenino	45	IIIa (T4N0M0)	ADC lepidico	Sí	No	WT	ns	35,07	No
#33	LF40	Masculino	69	Ia3 (T1cN0M0)	ADC acinar	Sí	No	ns	ns	33	No

6.3.2. Implantación en ratón y pases de PDX

Al ratón inmunodeficiente NSG® (NOD scid gamma, Jackson Laboratory®, Estados Unidos) de 5-6 semanas se le proporcionó una única dosis de analgésico (buprenorfina hidrocloreuro, 0,6 mg/kg) antes de la cirugía. A continuación, se anestesió con isoflurano (con una dosis inicial al 5% y una dosis de mantenimiento al 2,5%), y se le realizó una incisión en la piel dorsal caudal de unos 3 mm (lo suficiente para introducir el trozo de tumor). La muestra, unos 5 mm³ de biopsia tumoral donde se había retirado el tejido necrótico, fue implantada subcutáneamente, y se selló la herida con un adhesivo tópico para la piel (Histoacryl®, B.Braun®, Alemania). A partir de aquí se observa el crecimiento tumoral, hasta alcanzar volumen de 1500 mm³. Las dimensiones tumorales se midieron con un pie de rey dos veces por semana y el volumen tumoral se calculó mediante la fórmula $VT \text{ (mm}^3\text{)} = d^2 \times D/2$, donde D es el diámetro mayor y d es el diámetro menor del tumor⁴⁴⁶. Una vez que el tumor ha alcanzado las condiciones óptimas descritas, el ratón se sacrificó con dióxido de carbono (<70%) y se aisló el tumor para proceder a su estudio histológico y morfológico, y al subimplante en 2 ratones para establecer el modelo de PDX. Los animales que no mostraron crecimiento tumoral tras 8 meses tras la implantación eran sacrificados con dióxido de carbono. Para confirmar la muerte respiratoria y cardíaca del animal se evaluó la palidez de las mucosas y la ausencia de reflejos. El manejo de los animales y los procedimientos al respecto se realizaron de acuerdo con el Real Decreto 53/2013 sobre protección y cuidado de los animales en experimentación y otros fines científicos. Se siguieron estrictamente las normas y recomendaciones del Comité de Ética en Bienestar Animal de CIPF (CEBA, CIPF, Valencia, España). Los procedimientos PDX (2019/VSC/PEA/0156) fueron aprobados por la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalitat Valenciana (Comunidad Valenciana, España). El crecimiento tumoral en ratón y la variabilidad entre tiempos medios de latencia (MLT) entre pases y pacientes fue comparado por test de Friedman (ya que no todas las muestras pasaron los test de normalidad).

7. Técnicas de análisis histológico

Las técnicas histológicas descritas a continuación y el marcaje con anticuerpos fueron realizadas con la ayuda de la Unidad Mixta de Patología Molecular CIPF-Universidad Católica de Valencia (UCV), dirigida por el Dr. Jerónimo Forteza.

7.1. Fijación

Al inicio de la disgregación mecánica de biopsias de tumor primario o PDX, se coge un trozo de unos 3 mm³ para su fijación y posterior análisis inmunohistoquímico. La fijación se lleva a cabo sumergiendo la muestra en 5 mL de paraformaldehído al 4% (PFA 4%) y dejando que el agente fijador actúe durante 16 horas a 4°C. Tras ello, se realizan 3 lavados de 10 minutos para eliminar los restos de fijador y la muestra se almacena a 4°C en PBS con 0,05% de azida sódica (NaN₃) hasta el momento de análisis.

7.2. Inclusión en parafina

La inclusión en parafina de las muestras se realizó con el procesador de tejidos Leica ASP300S (Leica® Biosystems, Alemania). La deshidratación previa a la inclusión se realiza con 2 lavados de 40 minutos con etanol al 70% a 45°C, seguidos de 2 lavados de 40 minutos con etanol al 95% a 45°C, 3 lavados de 1 hora con etanol al 100% a 45°C, y 3 lavados de 1 hora con xileno a 45°C. A continuación, la muestra se incluye en parafina con 2 lavados de 1 hora con parafina a 64°C y un último lavado de 16 horas con parafina a 64°C. Una vez finalizado el proceso de inclusión se generan los bloques con la estación de inclusión EC350 (Leica Biosystems®, Alemania).

7.3. Seccionamiento del tejido

Una vez obtenidos los bloques, se realizaron cortes de 7 µm con el micrótopo giratorio electrónico de parafina (Microm HM 340E, Thermo Fisher

Scientific®, Estados Unidos) para analizar las características morfológicas del tejido normal, tumoral y PDX.

7.4. Micromatrices de tejido (*Tissue microarrays*, TMA)

Un TMA (*Tissue microarrays*, Micromatrices de tejidos) es un bloque de parafina formado por cilindros tisulares representativos extraídos de los bloques de parafina donde los tejidos fueron inicialmente incluidos. Estos cilindros son reembebidos en un único bloque de parafina, lo que nos permite tener hasta 100 muestras tisulares en un único bloque.

La construcción del TMA se realizó con la ayuda del Dr. Cremades (Hospital Universitario de la Ribera, Alzira, España), quien nos indicó qué zona del bloque inicial era representativa del tejido. Se incluyeron dos cilindros por muestra, dejando espacios vacíos que nos permitiesen ubicar el corte en todo momento. Una vez construido el TMA se realizaron cortes de 7 μm con el micrótopo de parafina. En la bibliografía se detalla la construcción de los TMA , la cual fue consultada en este trabajo ⁴⁴⁷⁻⁴⁵⁰.

7.5. Técnicas de tinción y marcaje histológico

7.5.1. Hematoxilina-Eosina

La tinción con Hematoxilina-Eosina (H&E) se realizó con el preparador de muestras para esta tinción automatizado Dako CoverStainer® (Agilent®, Estados Unidos), que realiza de forma automatizada la rehidratación, tinción, deshidratación y montaje de las preparaciones.

7.5.2. Inmunohistoquímica de tumores de CPNM, tejido pulmonar normal y PDX

Para analizar la expresión de las proteínas de estudio se realizó una inmunohistoquímica de los cortes del TMA utilizando el *Autostainer* Link48 (Agilent®, Estados Unidos). Los anticuerpos utilizados se citan detallados en la

Tabla 8. Las preparaciones marcadas con anticuerpos y teñidas con H&E se fotografiaron utilizando el escáner PANNORAMIC 250 Flash III Scanner (3DHISTECH®, Hungría). Las imágenes mostradas fueron digitalmente capturadas con el *software* Pannoramic Viewer/Case Viewer (3DHISTECH®, Hungría).

7.5.3. Análisis estadístico de variables clínico-patológicas, crecimiento en ratón e imágenes inmunohistoquímicas

El análisis de supervivencia se realizó mediante la prueba de Mantel-Cox (rango logarítmico o *logrank*) y las curvas de supervivencia se estimaron mediante el método de Kaplan-Meier. Las curvas de incidencia acumulada para las variables clínico-patológicas también se compararon mediante la prueba de rango logarítmico. Con respecto al crecimiento tumoral en ratones y la variabilidad entre diferentes tiempos medios de latencia (MLT, entre pasajes y pacientes), esto fue evaluado por la prueba de Friedman ya que no todas las muestras pasaron las pruebas de normalidad. Las estadísticas llevadas a cabo a partir de los H-Score o Histoscore se analizaron mediante el coeficiente de correlación de rango de Spearman y se construyó una matriz de correlación cuando se evaluó la relación entre proteínas; y con la prueba de Mann-Whitney cuando se compararon las expresiones proteicas con variables clínico-patológicas categóricas y dicotomizadas como mutaciones, supervivencia, edad, estadio e histología. En términos generales, una probabilidad del 95% (p -valor < 0,05) fue considerada estadísticamente significativa para todos los análisis. Otras pruebas que se realizaron pero que no mostraron significación estadística en varios tipos de comparación fueron las pruebas de Kruskal-Wallis, ANOVA y Wilcoxon. Estas pruebas y análisis se desarrollaron utilizando el software de gráficos y estadísticas científicas GraphPad Prism 8® (GraphPad Software®, San Diego, Estados Unidos).

8. Estadística general y otros análisis

8.1. Análisis mutacional

La caracterización oncogénica de los subtipos moleculares de CPNM se realizó mediante secuenciación masiva utilizando el panel OncoPrint Focus Assay® (Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos) en la plataforma Personal Genome Machine® (PGM®, Life Technologies®, Thermo Fisher Scientific®) en la Unidad de Biología Molecular del Hospital La Fe (Valencia, España), utilizando kits y protocolos de trabajo aprobados por el Comité Europeo para diagnóstico *in vitro* (CE-IVD). Este panel permite la detección de mutaciones en 35 oncogenes (*AKT1*, *ALK*, *AR*, *BRAF*, *CDK4*, *CTNNB1*, *DDR2*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3*, *ERBB4*, *ESR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *GNA11*, *GNAQ*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, *KIT*, *KRAS*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *MET*, *MTOR*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *RAF1*, *RET*, *ROS1* y *SMO*), la variación en el número de copias en 19 genes (*ALK*, *AR*, *BRAF*, *CCND1*, *CDK4*, *CDK6*, *EGFR*, *ERBB2*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FGFR4*, *KIT*, *KRAS*, *MET*, *MYC*, *MYCN*, *PDGFRA* y *PIK3CA*), y la presencia de transcritos de fusión en 23 genes (*ABL1*, *AKT3*, *ALK*, *AXL*, *BRAF*, *ERG*, *ETV1*, *ETV4*, *ETV5*, *EGFR*, *ERBB2*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *MET*, *NTKR1*, *NTKR2*, *NTKR3*, *PDGFRA*, *PPARG*, *RAF1*, *RET* y *ROS1*).

La cobertura promedio del panel es >1200X, la uniformidad promedio es del 95% y el porcentaje de lecturas promedio en las secuencias de interés (*on target*, en el objetivo) es del 97%. La búsqueda de variantes se realizó por alineación con la secuencia de referencia *Human Genome Built 19* (hg 19) utilizando el algoritmo *Variant Caller*. Las variantes no patogénicas se filtran con el software *Ion Reporter*® (Thermo Fisher Scientific®), excluyendo las variantes intrónicas, variantes sinónimas y variantes polimórficas (MAF, frecuencia de alelos minoritarios $\geq 0,01$ y/o incluyendo dbSNP). Adicionalmente, todas las variantes identificadas han sido revisadas en paralelo utilizando el programa *Integrative Genomics Viewer* (IGV, Broad Institute, Universidad de California, Estados Unidos) y consultando diferentes bases de datos (COSMIC, TCGA, Pubmed) y predicción de programas *in silico* (Polyphen, Provean, Sift, SNPS & GO).

8.2. Análisis semicuantitativo de imágenes de inmunohistoquímica

Estos análisis fueron realizados con el *software* de código abierto de procesamiento de imágenes digitales Fiji ImageJ (ImageJ, Estados Unidos). La puntuación semicuantitativa H-Score o Histoscore fue obtenida por deconvolución de color (y con imágenes a magnificación 20x) utilizando el *plugin* para ImageJ llamado IHC Profiler, desarrollado por Varguese y colaboradores ⁴⁵¹. Para cada imagen inmunohistoquímica (para cada proteína, paciente y pase analizados), el H-Score se calculó mediante la fórmula ⁴⁵²⁻⁴⁵⁴: (1 x % Células ligeramente positivas) + (2 x % Células positivas) + (3 x % Células altamente positivas).

8.3. Análisis y tratamiento de imágenes digitales

Los análisis de imágenes de microscopio, *Western Blot*, inmunocitoquímica para cuantificación o incorporación de escala, mejora del visionado por correcciones de brillo y contraste, y otros tratamientos, se realizaron con el *software* de código abierto de procesamiento de imágenes digitales Fiji ImageJ (ImageJ, Estados Unidos). El enmascaramiento de imágenes para resaltar la morfología de tumoresferas en presencia de TGF- β 1 fue realizado con el *plugin* para ImageJ desarrollado por Choudhry y colaboradores ⁴⁵⁵.

8.4. Análisis estadísticos de los experimentos con tumoresferas y células crecidas en adherencia

Los resultados de citometría de flujo para marcadores de interés fueron comparados entre las condiciones de tumoresferas (ESF) y adherencia (ADH) para cada muestra (tanto en las de pacientes como de líneas establecidas) por t-test desapareado (análisis de t-test múltiples desapareados). Los resultados para cada marcador analizado por citometría y comparado en el conjunto de

muestras de cada experimento fue llevado a cabo por prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Los experimentos donde se contaban el número de esferas (H1650 subpoblaciones CD326/CD166; H441 control y adición de +TGF- β 1) se analizaron por t-test desapareados para cada comparación. En estos experimentos, todas las condiciones fueron comparadas entre sí por el test de Kruskal-Wallis, siendo significativos los resultados.

En términos generales, una probabilidad del 95% (p -valor $< 0,05$) fue considerada estadísticamente significativa para todos los análisis. Estas pruebas y análisis se desarrollaron utilizando el software de gráficos y estadísticas científicas GraphPad Prism 8® (GraphPad Software®).

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

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

Se ha postulado que las células madre tumorales (CSC) son las responsables de los mecanismos de recurrencia y resistencia de los tumores, por lo que una caracterización exhaustiva de estas células y sus alteraciones moleculares permitirá definir nuevos biomarcadores relacionados con el pronóstico, y a su vez diseñar terapias más racionales e innovadoras basadas en tratamientos que erradiquen a las CSC con el fin último de conseguir una mejora sustancial en la supervivencia global de los pacientes. Para identificar y caracterizar CSC de CPNM hemos establecido cultivos en 3D para la generación de esferas (ESF) a partir de líneas celulares de CPNM y de tumores de pacientes con CPNM. Este cultivo celular en suspensión se realiza sembrando las células a densidad clonal en placas de baja adherencia con un medio de crecimiento sintético definido suplementado con factores de crecimiento. De esta manera, se generan tumoresferas a partir de células madre tumorales. Las tumoresferas poseen las ventajas de las líneas celulares como son el crecimiento *in vitro*, la facilidad para ser expandidas y conservadas, y la posibilidad de ser manipuladas genéticamente.

Esta tecnología es técnicamente complicada y ha requerido la puesta a punto de los protocolos para el crecimiento en 3D de células de CPNM. El interés en generar tumoresferas reside en el enriquecimiento de éstas como población de CSC a partir de célula única. Las células que forman la población CSC tienen la capacidad de autorrenovarse y de dar lugar a células diferenciadas, lo que explicaría la heterogeneidad intracelular del tumor primario³⁸¹, e iniciar tumores cuando se inyectan en ratón inmunodeprimido.

1.1. Tumoresferas derivadas de tumores primarios de CPNM

1.1.1. Características clínicas

Para la generación de tumoresferas a partir de tumores primarios de CPNM hemos obtenido muestras frescas de tumores de 20 pacientes procedentes del Hospital General Universitario de Valencia (HGUV) atendiendo a los criterios de inclusión y exclusión detallados en 1.2.1. *Criterio de selección de muestras y recepción*, Material y métodos. En la Tabla 4 se resumen las características clínico-patológicas de los pacientes que han participado en este estudio.

La edad media de los pacientes que han participado en este estudio era de 68 años (rango: 54-83 años). El 65% de los pacientes eran hombres, el 65% eran casos de adenocarcinoma y el 55% fueron diagnosticados en estadio I. El tiempo de seguimiento medio fue de 17,32 meses (rango: 5,1-33,23 meses). De los participantes, 8 pacientes (40%) fallecieron o recayeron de la enfermedad durante el seguimiento del estudio.

1.1.2. Generación de tumoresferas a partir de biopsias de tumores primarios de CPNM

La disgregación del tumor primario con el fin de establecer cultivo celular en suspensión y generar esferas (ESF) se realizó inicialmente siguiendo la metodología descrita por Kondo *et al.* en cáncer colorrectal ⁴⁰³, y Eramo y Zhang en cáncer de pulmón ^{161,456}. De esta manera, la muestra previamente lavada con PBS frío se trocea con el bisturí en fragmentos inferiores a 1 mm³. Seguidamente, se realiza una disgregación enzimática con colagenasa, dispasa (disgrega fibronectina y colágeno tipo IV) y DNasa durante 3 horas a 37°C (Figura 11). Así, se favorece la individualización celular de la masa tumoral al hidrolizar uniones intercelulares y con la matriz extracelular. Posteriormente, la suspensión celular se pasa por un filtro de 70 µm y otro de 40 µm para obtener una

suspensión celular homogénea que se cultivará en una placa de baja adherencia. Con este procedimiento la viabilidad celular obtenida era inferior al 50%.

Durante este protocolo observamos que tanto la disgregación mecánica como la digestión enzimática exhaustivas y prolongadas disminuyen la viabilidad del cultivo primario sembrado. El doble filtrado también provoca que el material obtenido al final del proceso sea más reducido.

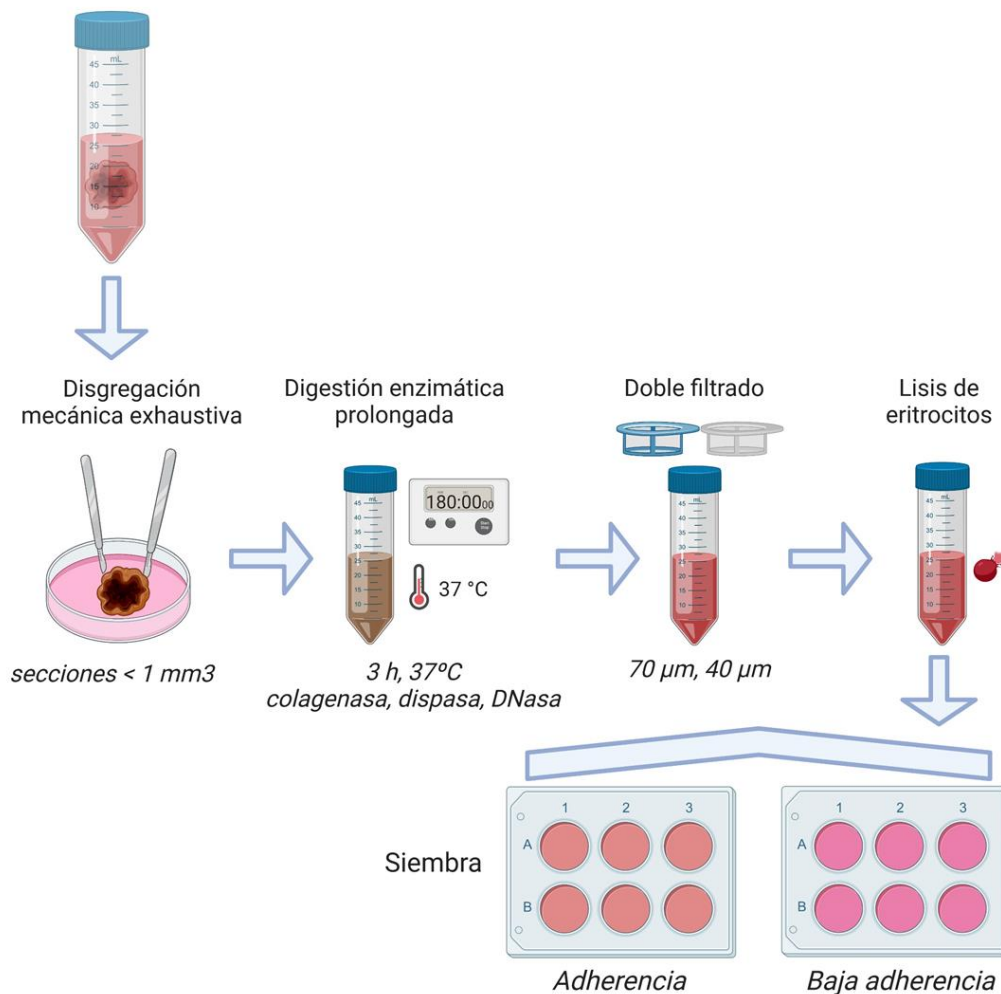


Figura 11. Diagrama de flujo de trabajo del procesamiento original de muestras de tumor primario. Tras recibir la muestra, ésta es disgregada mecánicamente en fragmentos de menos de 1 mm³ y, seguidamente, es sometida a una digestión enzimática durante 3 horas con colagenasa, dispasa y DNasa. La suspensión celular digerida se filtra con dos filtros sucesivos de 70 μm y 40 μm. Posteriormente, la suspensión restante es incubada con un tampón de lisis de eritrocitos y, finalmente, centrifugada y recuperada en el medio de cultivo correspondiente para su siembra en adherencia o baja adherencia. *Creado con Biorender.com.*

Las células obtenidas a partir de la disgregación del tumor se sembraron en una placa de baja adherencia en un medio sintético que, por la formulación de ingredientes utilizados (aminoácidos no esenciales; factores de crecimiento como EGF, FGF, ITS; ausencia de suero) evita la diferenciación del cultivo y permite el enriquecimiento en células indiferenciadas y pluripotentes, es decir, con características de célula madre tumoral (CSC). Se han identificado CSC de múltiples tumores sólidos en cultivos de tumoresferas, por ello se emplea este tipo de cultivo en baja adherencia para el estudio de CSC, en este caso de pulmón ^{161,381}. Las CSC muestran crecimiento independiente de anclaje en *soft agar* o medio libre de suero. La selección de la población de células CSC a lo largo de los pases, por tanto, se debe al uso de soportes de baja adherencia, ya que las placas evitan la adherencia de tipos celulares en su superficie.

Creer células en suspensión, además, supone crecerlas en condiciones de *anoikis*. La *anoikis* es un fenómeno de muerte celular programada que se da en tipos celulares cuya supervivencia depende del anclaje a una matriz extracelular o un soporte. Así, *in vitro* dependen del anclaje a la placa utilizada. En estos casos, la interacción célula-célula y célula-matriz/soporte es esencial para la proliferación del tejido o cultivo, pues se producen fenómenos de señalización asociados a crecimiento y supervivencia. En cáncer, las células del tumor primario responsables de la metástasis a focos secundarios son capaces de evadir la *anoikis* al perder sus contactos con células circundantes y la matriz, invadiendo otros tejidos. Además de la plasticidad necesaria para autorrenovar un cultivo *in vitro* en condiciones de baja adherencia, un rasgo habitualmente señalado en poblaciones CSC es su capacidad metastásica, y resistir a la *anoikis* es un rasgo a su vez de la metástasis del cáncer ^{457,458}. Las CSC, con mayor capacidad de autorrenovación y supervivencia a la *anoikis*, serán por tanto la población predominante en el cultivo en caso de que inicialmente hubiese viabilidad celular en el procesado, y la proporción de células con características CSC fuese suficiente.

Siguiendo el protocolo mencionado arriba, en colaboración con el laboratorio de Oncología Molecular de la FIHGUV, se han generado 8 cultivos de baja adherencia a partir de 20 muestras de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico procedentes del HGUV (FIS299, FIS301, FIS302, FIS303, FIS315,

FIS317, FIS320 y FIS343), siendo el porcentaje de éxito de un 40%. No se encontraron asociaciones significativas entre las variables clínico-patológicas analizadas y el establecimiento de cultivos primarios ³⁰¹. Se observó que estos cultivos proliferaban de manera diferente dependiendo de cada tumor de origen, a distinto ritmo, con distinta morfología y entrando en senescencia a distintos tiempos. La morfología celular condiciona las interacciones célula-célula, por ello algunas muestras generan tumoresferas más redondeadas y compactas y otras más irregulares. En nuestro laboratorio se caracterizaron las células FIS302, FIS303, FIS315, FIS317 y FIS320.

Las muestras FIS299 y FIS301 formaron esferas compactas y redondeadas ³⁰¹; por otro lado, las muestras FIS302, FIS303, FIS315, FIS317 y FIS320 formaron cuerpos multicelulares más irregulares, con forma de racimo incluso. Las esferas de FIS343 muestran un fenotipo mixto. Imágenes de cultivo en suspensión de algunas de estas muestras se exponen en la Figura 12. La formación como esfera arquetípica respecto al crecimiento como agregado irregular se asocia a la formación de uniones intercelulares y la presencia de marcadores epiteliales. En la esfera, por la fuerte unión entre células, se dejan de apreciar los límites individuales de las mismas; en el agregado amorfo, por otro lado, se puede distinguir cada célula y el contorno de su propia membrana.

Con respecto a la duración del cultivo de las esferas, los 8 cultivos primarios generados se pudieron mantener en condiciones favorables más de 60 días. Otras de las muestras no pudieron establecerse en cultivo, bien porque no formaron esferas ni agregados irregulares (no eran capaces de crecer en suspensión), o bien porque el número de células viables tras la disgregación inicial no era suficiente para el cultivo, y se congelaban o se destinaban para análisis de marcadores mediante citometría de flujo. Una vez establecido el cultivo, cada 3-4 días se llevaba a cabo el mantenimiento del cultivo celular basado en la suplementación del medio de cultivo con factores de crecimiento, o en la reposición de este. También, cuando las esferas crecían y aparecían regiones necróticas en su interior, se efectuaba un pase empleando tripsina para inactivar las uniones intercelulares y separar las células. Las células individualizadas se volvían a cultivar con medio fresco a baja densidad y formaban nuevas tumoresferas, confirmando su capacidad de autorrenovación.

El éxito en la duración del cultivo se vincula a la proporción de la población de CSC. Los resultados sobre el establecimiento de estos cultivos primarios para estudiar las propiedades de las CSC han sido publicados en colaboración con el grupo del Dr. Carlos Camps, del Hospital General de Valencia ³⁰¹.

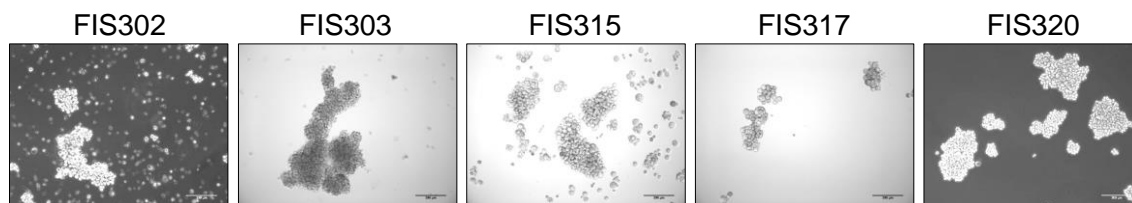


Figura 12. Tumoresferas derivadas de muestras de pacientes de CPNM. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases de muestras de tumor primario sembradas en condiciones de baja adherencia, tras procesado de muestra mostrado en Figura 11. Magnificación 10x. Las barras de escala indican 200 μm .

1.1.2.1. Método alternativo para la obtención de tumoresferas a partir de muestras de tumor primario de CPNM

Una de las dificultades que nos encontramos al disgregar los tumores era la baja viabilidad de las células obtenidas, inferior al 50%. Con el fin de mejorar el número de células tumorales viables cultivadas se introdujeron posteriormente modificaciones en el protocolo, y se maximizó la muestra recuperada. Las modificaciones incluyeron cortar con el bisturí la muestra primaria en fragmentos mayores de 1 mm^3 y menores de 3 mm^3 . Al reducir la agresividad de la disgregación mecánica se comprometía menos la viabilidad celular en fases iniciales del protocolo. Por otro lado, la digestión enzimática se redujo a 1,5 horas a 37°C y se utilizó liberasa® (mezcla comercial de colagenasas tipo I y tipo II) y DNasa. Otro cambio introducido fue el de incluir solo un paso de filtrado, en filtro de 70 μm , y la recuperación del tejido retenido en el mismo para su siembra directa en condiciones de baja adherencia.

Con estas modificaciones se obtuvo mayor número de células viables, siendo en todos los casos superior al 75%. La recuperación del tejido retenido en el filtro resultó un cambio favorable porque el tejido parcialmente digerido sembrado en las placas de baja adherencia provocaba la liberación progresiva, en algunos casos, de tumoresferas al medio, y por tanto se aumentaba el número de células viables iniciales. Estas tumoresferas podían ser a su vez disgregadas hasta

obtener una suspensión celular y resembradas a densidad clonal con el fin de establecer un cultivo enriquecido en células madre tumorales (CSC). Parte de la suspensión celular filtrada era sembrada también en placas adherentes en medio condicionado sin suero bovino fetal. El cultivo en adherencia favorecía la proliferación de la población de fibroblastos asociados al tumor (CAF, *Cancer-associated fibroblasts*), que en ausencia de suero bovino fetal crecían lentamente. Los cultivos crecidos en baja adherencia formaron tumoresferas también con longevidad, morfología y velocidad de crecimiento dispares, como sucedía con el método descrito previamente. En la primera semana de cultivo, de 3 a 5 días, en el caso de los cultivos del tejido retenido en el filtro de 70 μm , se observaban esferoides que, con el tiempo, parecían unirse entre sí y dar lugar a tumoresferas de mayor tamaño. En el caso de la suspensión celular filtrada, se formaba un menor número de esferas, pero éstas adquirían mayor tamaño y compactación (núcleo necrótico tras un tiempo en cultivo).

En comparación a los cultivos con las muestras indicadas en la Figura 12, con estas modificaciones en el protocolo se favorece la formación de esferas y estas, a su vez, alcanzan un mayor tamaño. Algunas esferas, como se puede observar en la Figura 13, alcanzan los 500 μm de diámetro.

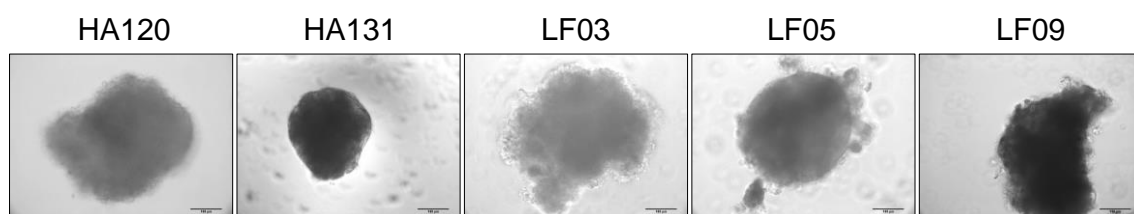


Figura 13. Tumoresferas derivadas de muestras de pacientes de CPNM tras procesado de muestra optimizado. El número de tumoresferas formadas es mayor al del procesado de tumor primario aplicado inicialmente. HA120 y HA131 proceden del Hospital La Ribera y LF03, LF05 y LF09 proceden del Hospital La Fe. Magnificación 20x. Las barras de escala indican 100 μm .

1.1.3. Establecimiento de cultivo primario en adherencia de muestras de pacientes de CPNM

Las tumoresferas obtenidas con las muestras FIS299, FIS301, FIS302, FIS303, FIS315, FIS317, FIS320 y FIS343 destinadas al estudio de las características de la población CSC³⁰¹, se disgregaron y se cultivaron en placas

adherentes en presencia de suero bovino fetal al 10%. Estas condiciones de cultivo promueven la diferenciación celular respecto al cultivo 3D con medio definido en ausencia de suero bovino fetal, el cual favorece el enriquecimiento en la población CSC. Al igual que sucedía con las esferas, la morfología celular en adherencia era heterogénea. En FIS299 y FIS301 crecen como multicapa y forman colonias celulares, con interacciones entre células a través de filopodios. FIS317 mostraba una forma más cúbica y en monocapa. Menos interacciones y una forma más alargada mostraban las células de FIS302, FIS303 y FIS315. Por último, FIS320 mostraba un crecimiento intermedio en comparación al resto (Figura 14).

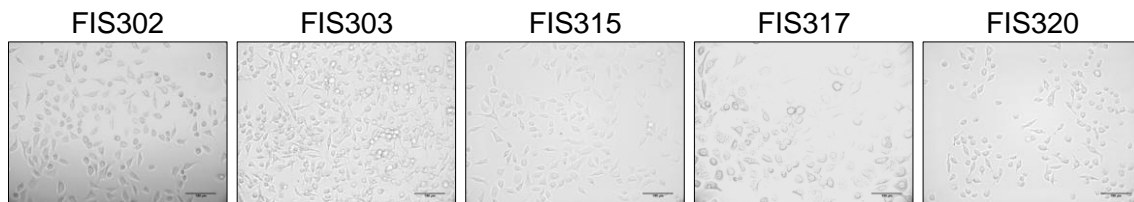


Figura 14. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases de muestras de tumor primario sembradas en condiciones de adherencia, tras procesado de muestra optimizado. Se muestran FIS302, FIS303, FIS315, FIS317 y FIS320. Magnificación 20x (barras de escala indican 100 μm) en todos los casos.

1.1.4. Las CSC tienen la capacidad de generar tumores en un modelo *in vivo* de xenotrasplante en ratón inmunodeprimido

Para demostrar la capacidad de iniciar tumores de las tumoresferas, estas se inyectaron en ratón inmunodeprimido *NOD scid gamma* (NSG). Se inyectaron 500, 2000, 5000, 20000, 50000, 500000 células derivadas de las tumoresferas de las muestras FIS302, FIS303, FIS315, FIS317 y FIS320. En paralelo, se inyectaron el mismo número de células crecidas en adherencia. Tanto las células crecidas en adherencia (ADH) como en baja adherencia (ESF) fueron capaces de generar tumor en ratón (Figura 15). Sin embargo, el crecimiento se iniciaba antes en células derivadas de tumoresferas. Dicho de otro modo, la latencia, o tiempo al cual el tumor empieza a ser apreciable y, por tanto, a ser medido su crecimiento, era mayor en los tumores inducidos por células adherentes. Las células crecidas como esferas formaron tumor en ratón en un tiempo medio de latencia (*Median latency time*, MLT) de 29,62 días. La MLT de las células crecidas en adherencia era de 44 días. La única excepción fue la muestra FIS320, donde la MLT es ligeramente superior en tumoresferas implantadas en ratón (30,33 días) que en células de adherencia xenoinjertadas (27,67 días). En cuanto al número de células introducidas, no hay diferencias significativas en la latencia en los diferentes órdenes de magnitud.

Este resultado indica la presencia de subpoblaciones de CSC en las distintas muestras de estudio (FIS302, FIS303, FIS315, FIS317, FIS320), también en las células crecidas en adherencia. Como se observa en la Figura 15, tanto las tumoresferas (ESF) como las mismas células crecidas en adherencia en presencia de suero previas a la inyección en ratón muestran diferencias en el tiempo para desarrollar el tumor, aunque todas tienen la capacidad para generar tumores.

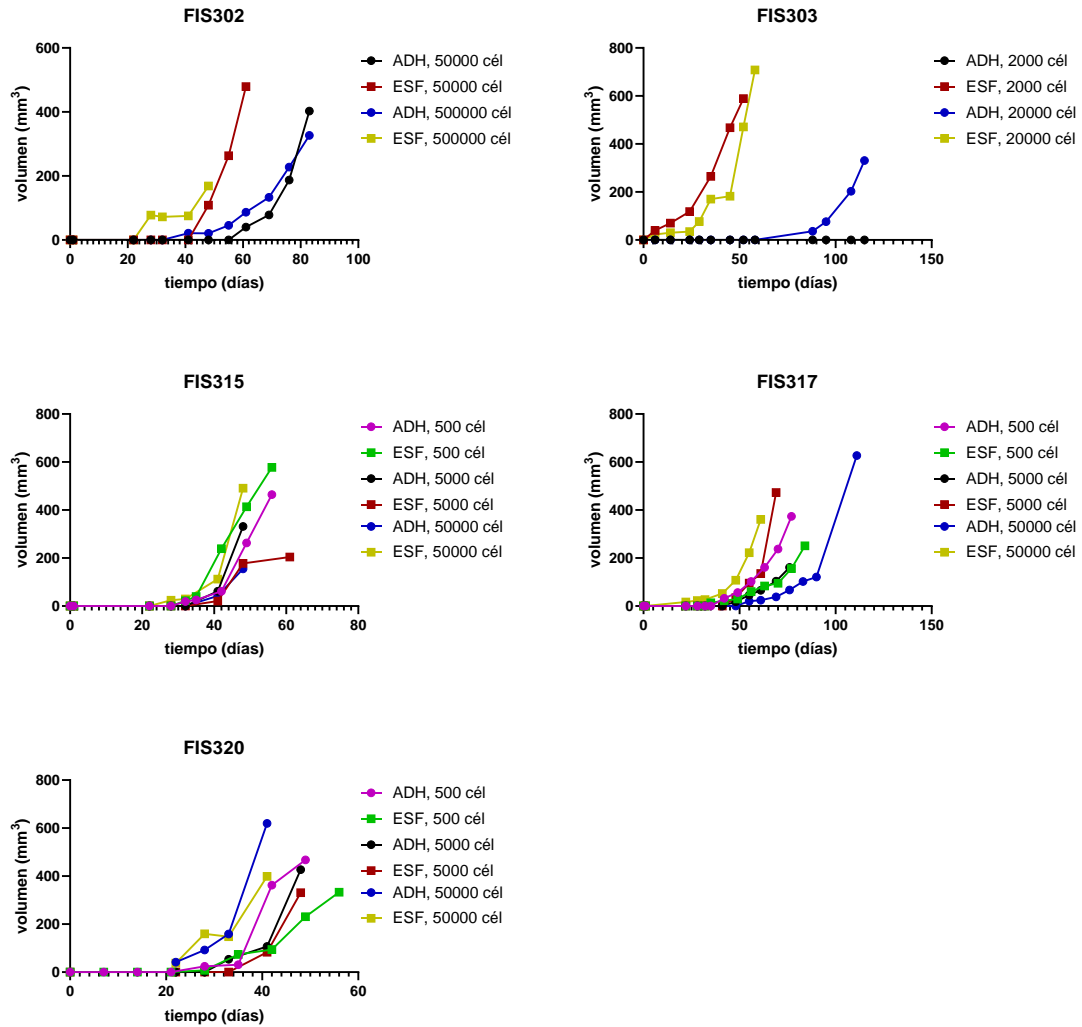


Figura 15. Capacidad iniciadora de tumores de las células FIS302, FIS303, FIS315, FIS317 y FIS320. Las gráficas muestran la curva de crecimiento de células crecidas en adherencia (ADH) y tumoresferas (ESF). Se inyectaron 500, 5000 y 50000 células en cada ratón. Para cada condición se empleó un ratón y se inyectó la misma condición en los dos flancos del ratón.

1.1.5. Expresión de marcadores de CSC en tumoresferas derivadas de tumor primario

Se evaluó la expresión de las proteínas de superficie CD326 (EpCAM), CD166 (ALCAM), CD44 y CD133, por su relevancia como marcadores de CSC en cáncer de pulmón ⁴⁵⁹ mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

1.1.5.1. Análisis de la expresión de marcadores de superficie mediante citometría de flujo

La citometría de flujo permite analizar y cuantificar la expresión de proteínas en la membrana plasmática dentro de una población celular y por tanto diferenciar entre subpoblaciones celulares según la expresión de proteínas específicas. Se han propuesto diferentes marcadores de superficie para poblaciones de CSC en diversos tipos de tumores, tanto sólidos como hematopoyéticos, con mayor robustez en estos segundos. En el caso del cáncer de pulmón, hay resultados contradictorios sobre la utilización de algunos de estos marcadores para identificar CSC ^{174,176-178}.

En este trabajo analizamos la expresión de los marcadores CD326 (EpCAM), CD166 (ALCAM) y CD44 en los cultivos celulares derivados de las muestras FIS302, FIS303, FIS315, FIS317 y FIS320, crecidos en adherencia en presencia de suero (ADH, 2D) y en baja adherencia con medio sintético sin suero (ESF, 3D) (Figura 16). El marcador CD133 no pudo utilizarse para los análisis de citometría de flujo puesto que los diferentes anticuerpos utilizados contra CD133 no permitían detectar la proteína mediante esta técnica. Algunos estudios indican que la glicosilación de la porción extracelular de CD133 podría dificultar el acceso del anticuerpo a los epítomos ⁴⁶⁰.

Se observó un porcentaje elevado de expresión de CD326 (98-100%) en todas las muestras en ambas condiciones de crecimiento (adherencia y esferas), sin diferencias significativas entre ellas. CD166 muestra algo de variabilidad, con expresión elevada (> 90%) en todos los casos, aunque en algunas muestras su expresión es ligeramente mayor en condiciones de adherencia (FIS303, FIS315, FIS317) y en otras mayor en las esferas (FIS302, FIS320). Las diferencias de expresión respecto a CD44 entre las células adherentes y esferas fueron más relevantes. En todas las muestras disminuye el porcentaje de población positiva para este marcador en tumoresferas (del 60,4% en FIS303 al 90,4% en FIS320) respecto a las células crecidas en adherencia (>96% en todos los casos). Las diferencias de expresión en CD44 entre ADH y ESF son estadísticamente significativas en las poblaciones FIS303 (p-valor: 0,032*), FIS315 (p-valor: 0,00022***) y FIS317 (p-valor: 0,0018**) tras efectuar t-test múltiples.

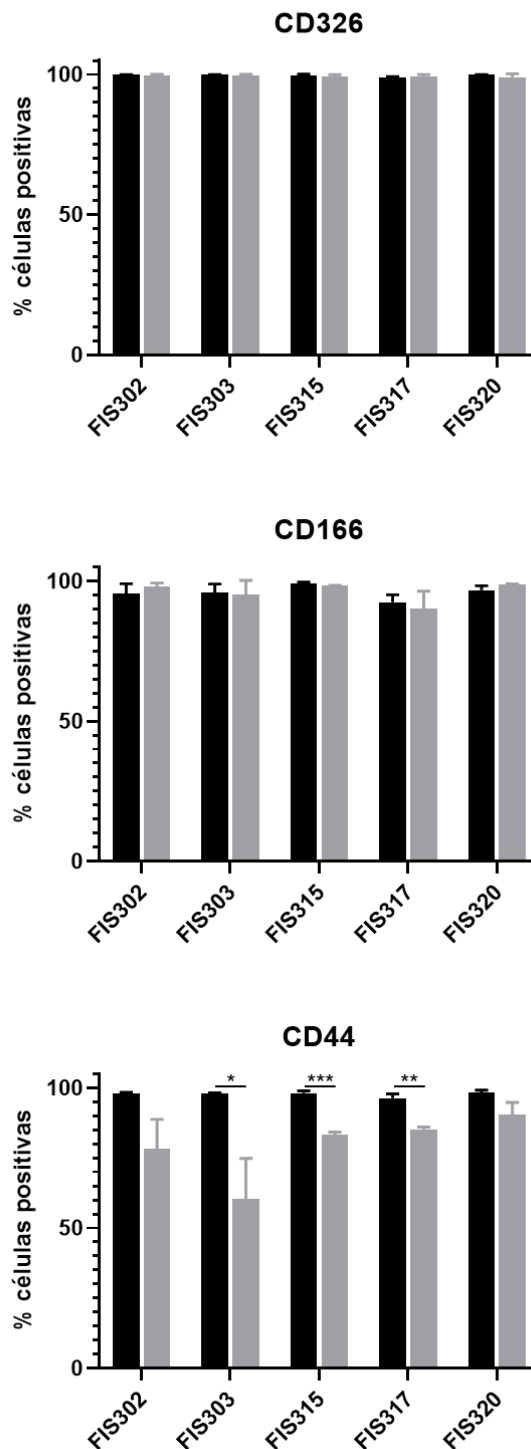


Figura 16. Porcentaje de células positivas para marcadores de superficie celular de CSC en muestras derivadas de pacientes de CPNM, crecidas en condiciones de adherencia (ADH, barras negras) y en suspensión (ESF, barras grises). Las células se analizaron mediante citometría de flujo con anticuerpos frente a CD326, CD166 y CD44. Las poblaciones celulares analizadas fueron FIS302, FIS303, FIS315, FIS317 y FIS320. Los pares ADH y ESF fueron comparados por t-test múltiples. *: p-valor < 0,05; **: p-valor < 0,005; *: p-valor < 0,0005.**

Estos resultados sugieren que los marcadores de proteínas de superficie, utilizados para la determinación de poblaciones CSC de cáncer de pulmón no microcítico se expresan en ambas condiciones de cultivo, es decir, en adherencia y en presencia de suero bovino fetal, y en esferas crecidas en suspensión con medio condicionado con factores de crecimiento y sin suero.

1.1.5.2. Análisis de la expresión de marcadores de superficie de CSC en tumoresferas mediante microscopía de fluorescencia

Analizamos la expresión de los marcadores de superficie de CSC indicados en el apartado anterior, mediante microscopía de fluorescencia para observar tanto la expresión de estos marcadores como su localización celular. Como se observa en la Figura 17, CD326 (EpCAM) se localiza sobre todo en membrana plasmática, aunque también hay expresión citoplasmática próxima a la membrana, que puede tratarse del dominio intracelular (EpICD, *intracellular domain of EpCAM*). En cualquier caso, no se aprecian diferencias de expresión entre las células crecidas en adherencia (ADH) y baja adherencia o tumoresferas (ESF). En el caso de CD166 (ALCAM), se observa menor expresión en las células crecidas en adherencia respecto a tumoresferas. De manera general, en las cinco poblaciones celulares analizadas, el marcaje en esferas es predominantemente citoplasmático, aunque también se observa expresión perinuclear. Por otro lado, se observa una expresión más intensa de CD44 en la membrana plasmática de las tumoresferas, mientras que en condiciones de crecimiento en adherencia parece haber acumulación citoplasmática (aunque la señal observada es débil). Por último, observamos mayor expresión de CD133 en el citoplasma y membrana plasmática de las tumoresferas, especialmente en FIS302 y FIS320.

En términos generales, la expresión de marcadores entre diferentes muestras dista de ser uniforme, como se ha referenciado en la literatura científica. Además, la combinación de la expresión de estas proteínas podría ser interesante para identificar subpoblaciones de CSC de CPNM. Podrían ser tomadas en consideración junto a otros marcadores de pluripotencia intracelulares (e.g.: Oct4, Nanog, Snail), y otras proteínas asociadas a otros procesos del cáncer como la EMT, para seleccionar estas subpoblaciones.

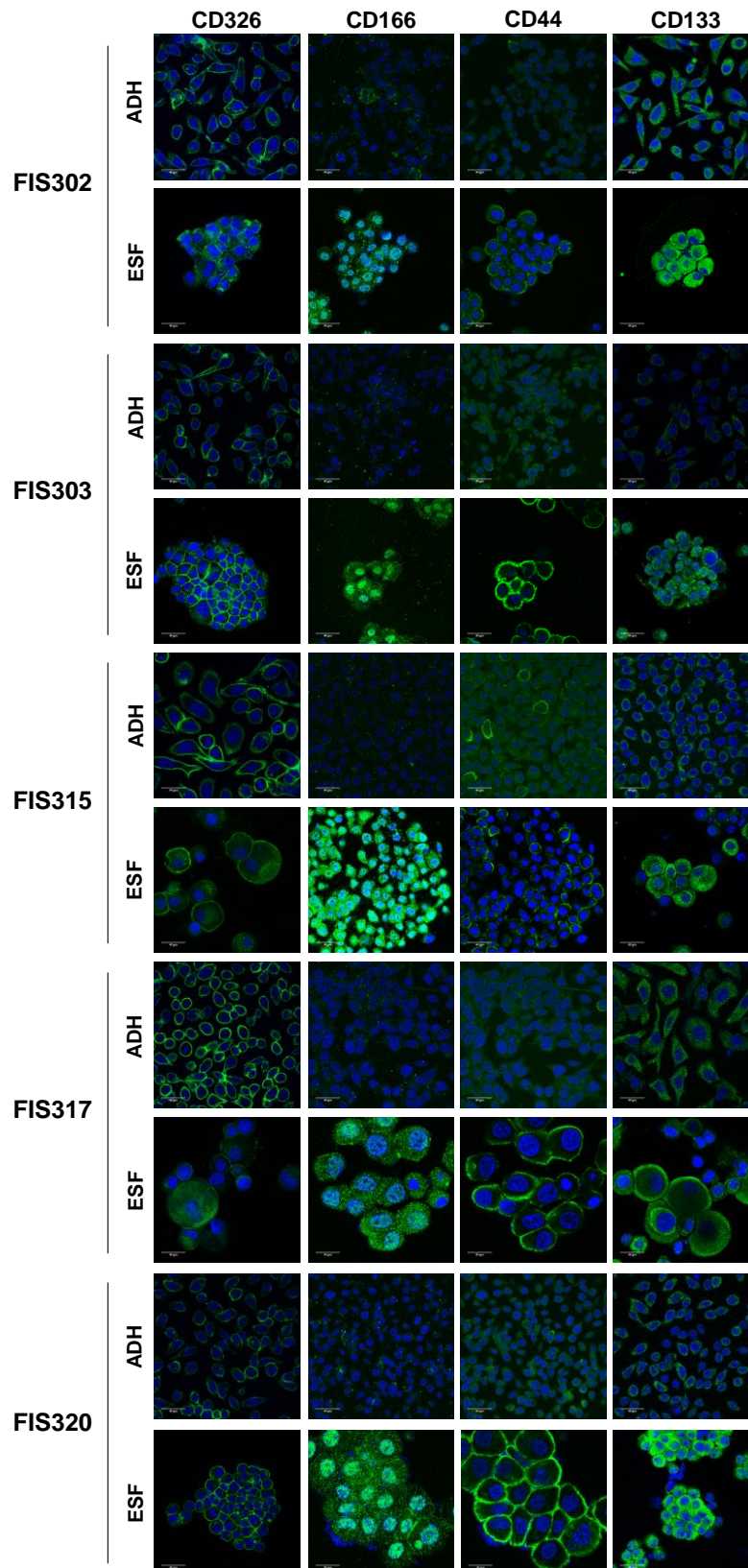


Figura 17. Expresión y localización de marcadores de CSC en células derivadas de tumores de pacientes con CPNM crecidas en condiciones de adherencia (ADH) y en suspensión (ESF). Se analizaron las muestras FIS302, FIS303, FIS315, FIS317 y FIS320 mediante microscopía de fluorescencia con anticuerpos contra CD326, CD166, CD44 y CD133 (verde en la imagen). En azul se observan los núcleos teñidos con DAPI. Las barras de escala indican 40 μ m.

1.2. Caracterización de tumoresferas derivadas de líneas celulares de CPNM

Además de cultivar muestras de tumor primario procedentes de tumores de pacientes con CPNM, en paralelo, también se llevó a cabo el cultivo en 3D a partir de líneas celulares establecidas de CPNM. En la Tabla 3 (Material y métodos) podemos observar sus principales características clínico-patológicas.

1.2.1. Generación de tumoresferas a partir de líneas establecidas de CPNM

Las líneas celulares indicadas en la Tabla 3 se crecieron en adherencia en medio con suero hasta adquirir una confluencia del 80%. Seguidamente, las células se despegaron de la placa con tripsina, se lavaron con PBS y se sembraron a baja densidad (5000 células/mL) en una placa de baja adherencia, en medio con formulación específica y sin suero (ver 1.1.3. *Cultivo de tumoresferas de líneas celulares establecidas*, Material y métodos). Al igual que sucedía con las células derivadas de los tumores primarios, el crecimiento de las líneas celulares establecidas en forma de esferoide era diferente según la línea celular utilizada por lo que respecta tanto a morfología como proliferación celular y longevidad en cultivo (Figura 18).

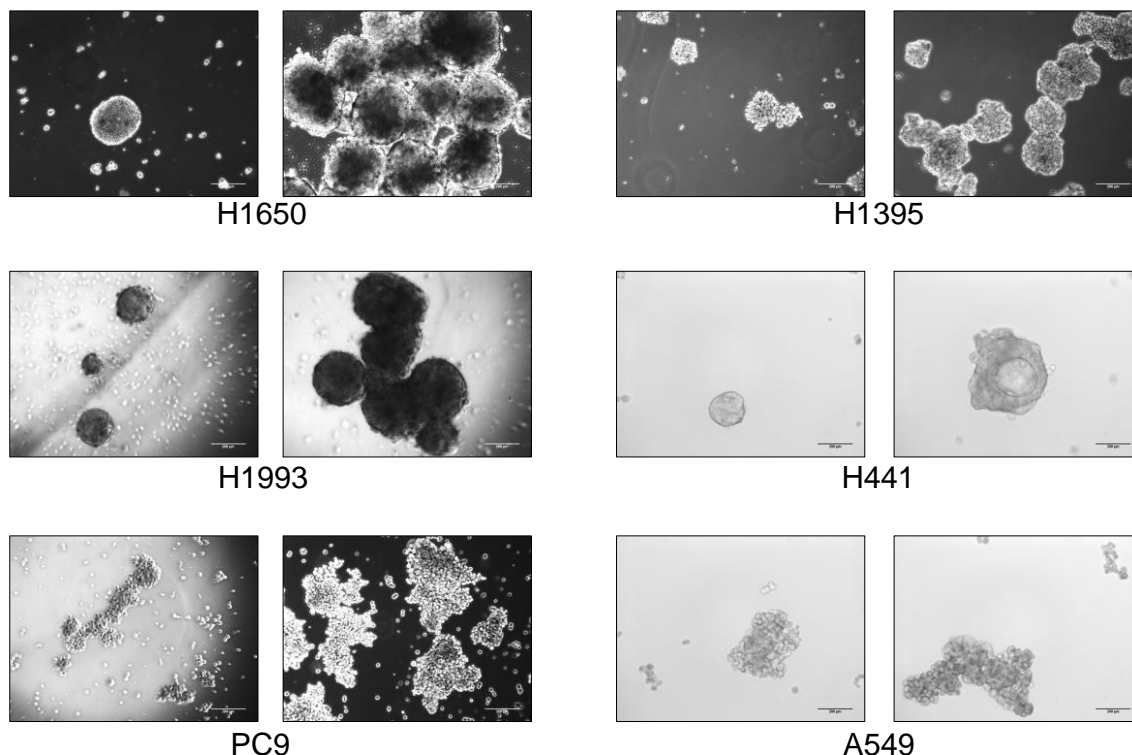


Figura 18. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases de cultivo en suspensión de diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico. En el panel de la izquierda de cada población celular se observan tumoresferas entre los 8-16 días de siembra. A la derecha, se observan tumoresferas de entre 16-20 días después de la siembra. Las fotografías se capturaron con magnificación 10x. Las barras de escala indican 200 µm.

H1650 y H1993 tienen un crecimiento similar en suspensión, formando esferas bien definidas, que incluso al agruparse con otras preservan su morfología individual. También se aprecian bastante compactas. H1395 presenta una morfología mixta en su crecimiento en suspensión, pues se originan esferas, pero de límite más difuso e irregular. De esta manera, al proliferar varias esferas separadas y agruparse, tienden a formar uniones intercelulares claras entre ellas y el conjunto resulta más cohesionado. H441, por otro lado, forma esferas bien redondeadas. Sin embargo, a diferencia de H1650 y H1993, estas no se muestran tan compactas o sólidas, puesto que en muchos casos se aprecia en la parte central un lumen, lo cual indica que las células de H441 se disponen como un epitelio de barrera. De hecho, esta línea se utiliza como modelo de epitelio distal de los pulmones en estudios de transporte e intercambio de gases, pues emula de manera consistente al cultivo primario de células alveolares humanas ⁴⁶¹. Por otro lado, PC9 y A549 crecen de manera diferente al resto de

líneas, ya que no forman esferas como tal, sino agregados de morfología irregular y mayor tamaño. Los distintos fenotipos obtenidos según la línea celular se deben a condiciones intrínsecas de cada línea, es decir, dependen en parte del estatus metabólico y mutaciones de cada una de ellas, entre otras razones ⁴⁶². Así, las consecuencias en cada caso serían un distinto ritmo de crecimiento, expresión de uniones intercelulares, síntesis de proteínas de matriz extracelular como colágeno y activación de vías de señalización.

En un esferoide en cultivo, independientemente de la morfología, suele haber una región central o núcleo de células muertas y/o quiescentes, en un gradiente hacia el exterior del volumen de dicho esferoide. Las regiones más externas del mismo, en contacto con el medio de cultivo, están formadas por células proliferativas. La dimensión de la región central y también el espesor de la capa externa de células proliferativas son factores clave para determinar la forma de los esferoides. A su vez, esto está parcialmente determinado por la viabilidad general de las esferas, consecuencia del estado metabólico y la viabilidad de las células individualizadas en la siembra original. Esta heterogeneidad en cuanto a forma y volumen de esferas de la misma línea es algo a considerar para estudios, por ejemplo, de citotoxicidad ⁴⁶³.

1.2.2. Expresión de marcadores de CSC en tumoresferas derivadas de líneas celulares de CPNM

En el laboratorio hemos analizado marcadores de superficie de CSC en las tumoresferas generadas a partir de las líneas celulares de CPNM, y también en estas líneas crecidas en adherencia mediante citometría de flujo.

Como se puede observar en la Figura 19, más del 90% (y del 99% en H1395, H1993 y PC9) de las células de las líneas celulares analizadas expresan CD326 (EpCAM), excepto en A549 donde su expresión fue del 56,8% en células adherentes y del 28,9% en tumoresferas. CD166 (ALCAM) también presenta elevada expresión en condiciones de adherencia en todas las líneas celulares, con un porcentaje de células positivas superior al 90% en todas las líneas

excepto en H1650, donde es del 82%. En tumoresferas su expresión tiende a disminuir, especialmente en A549 (87,7%), H1395 (72,8%) y H1650 (74,7%). La expresión de CD44 también fue elevada en todos los cultivos adherentes (más del 92%) y más baja en las esferas tumorales derivadas de H1395 (60%), H1650 (76%), PC9 (79%) y muy baja en las células H1993 (3,7%).

Al aplicar t-test múltiples a las comparaciones entre células crecidas en adherencia y tumoresferas para cada línea y para cada proteína, se observaron diferencias significativas en la expresión de CD326 en la línea A549 (p-valor: 0,019*); en la expresión de CD166 en la línea H1395 (p-valor: 0,017*); y en la expresión de CD44 en las líneas H1395 (p-valor: 0,031*), H1993 (p-valor: 0,000019***) y PC9 (p-valor: 0,0099). Al igual que sucedía con los cultivos derivados de muestras de pacientes, CD44 era el que mostraba mayores diferencias.

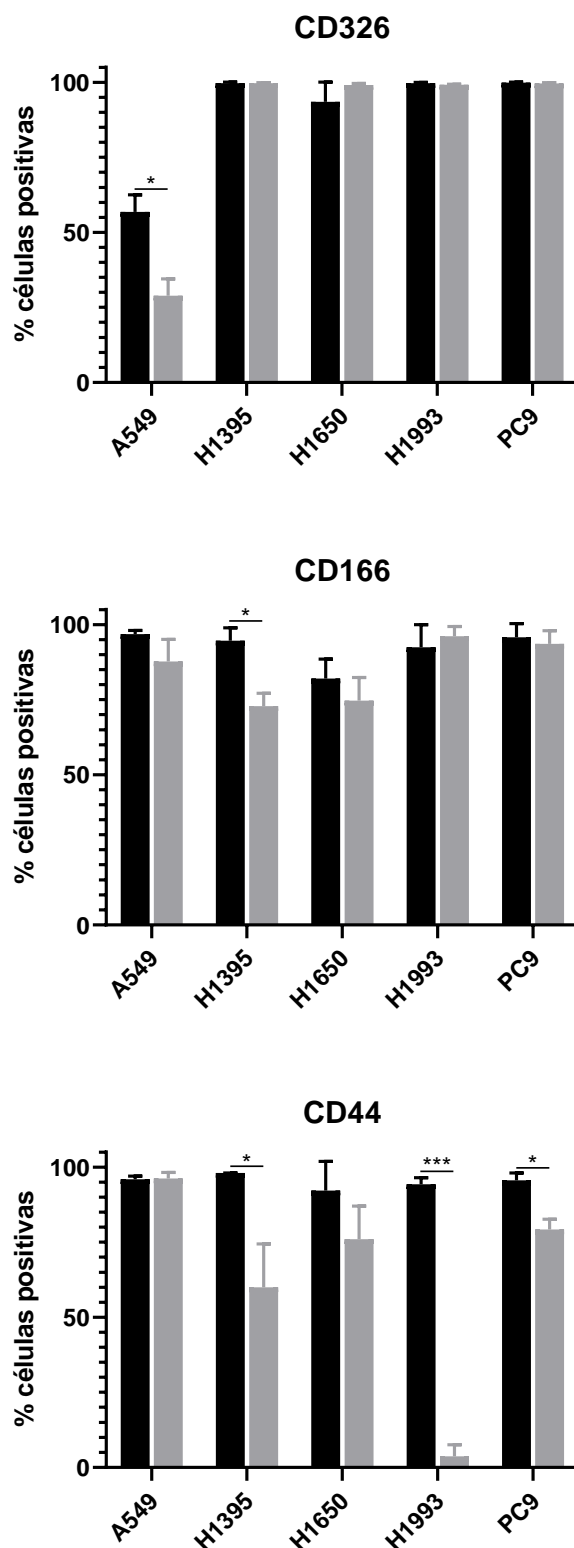


Figura 19. Porcentaje de células positivas para marcadores de superficie celular de CSC en líneas establecidas de CPNM, crecidas en condiciones de adherencia (ADH, barras negras) y en suspensión (ESF, barras grises). Resultados obtenidos por citometría de flujo con anticuerpos frente a CD326, CD166 y CD44. Las líneas comparadas son A549, H1395, H1650, H1993 y PC9. Los pares ADH y ESF fueron comparados por t-test múltiples. *: p-valor < 0,05; *: p-valor < 0,0005.**

1.2.2.1. Separación de subpoblaciones CD326/CD166 en la línea de CPNM H1650

Como hemos observado en el apartado anterior, el 99,1% de las esferas de H1650 expresan CD326, y el 74,7% expresan CD166. Para determinar qué subpoblación celular tiene la capacidad de formar tumoresferas se separaron subpoblaciones con anticuerpos específicos para CD326 y CD166 mediante la técnica de separación celular por citometría de flujo (*cell sorting*). Se obtuvieron las subpoblaciones celulares CD326+/CD166+, CD326+/CD166- y CD326-/CD166+. Seguidamente, se sembraron 5000 células/mL en cultivo de baja adherencia para generar esferas. Las subpoblaciones CD326+/CD166+ y CD326+/CD166- fueron capaces de formar tumoresferas, mientras que la población CD326-/CD166+ fue incapaz de formar estructuras multicelulares incluso tras 36 días en cultivo, por lo que CD326 parece resultar clave en la formación de uniones entre células (Figura 20). De hecho, por lo que respecta a la morfología, las esferas de la población CD326+/CD166- alcanzaban mayor tamaño que la población doble positiva. Esta mayor tasa de proliferación en CD326+/CD166- puede deberse a que, respecto al crecimiento, puede haber una interacción negativa entre ambos marcadores (entre las rutas activadas por ambos, ya sea por señalización excluyente o por uso de recursos simultáneamente para distintos procesos celulares).

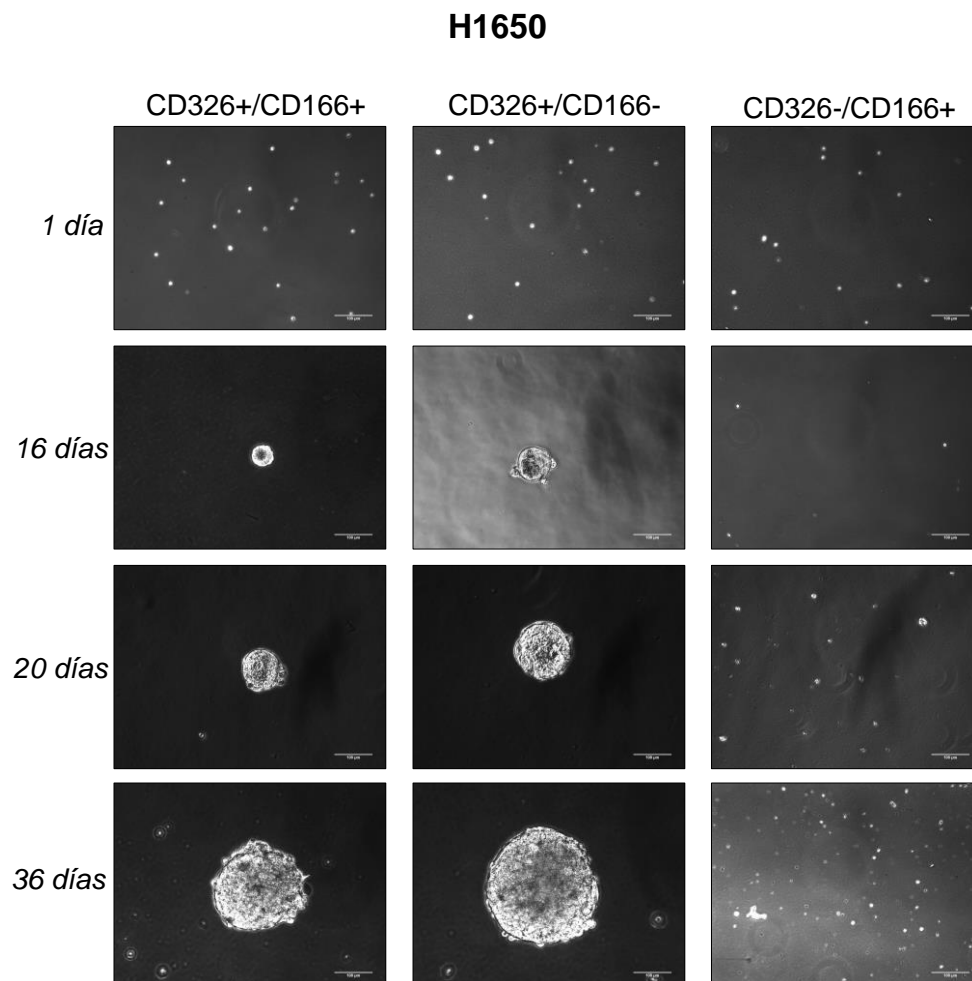


Figura 20. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases de subpoblaciones de la línea de cáncer de pulmón no microcítico H1650, sembrada en condiciones de baja adherencia. Las subpoblaciones se seleccionan en función de la expresión de los marcadores de superficie CD326 y CD166. Los días indicados son tras la siembra inicial. Se seleccionan imágenes representativas de cada subpoblación. Magnificación 20x. Las barras de escala indican 100 μ m.

Las diferencias entre subpoblaciones no solo se ciñen al tamaño de las tumoresferas formadas, sino también al número formado a los diez días de siembra y a la morfología de éstas. En la Figura 21 se aprecia cómo la subpoblación CD326+/CD166- forma más esferas (media: 29; desviación estándar (SD): 3,46) que la población doble positiva (media: 16; SD: 5,2). Además, la morfología de la población doble positiva solía ser, al menos en estos diez primeros días, más irregular; mientras que las CD326+/CD166- eran compactas y redondeadas. Al igual que se ha descrito en la Figura 20, la subpoblación CD326-/CD166+ no genera esferas (media: 1; SD: 1,73). Acorde al t-test despareado efectuado para comparación, existen diferencias

significativas entre las tres subpoblaciones en cuanto al número de esferas generadas. La diferencia más significativa es el número de esferas formadas entre CD326+/CD166- y CD326-/CD166+ (p-valor: 0,0002***).

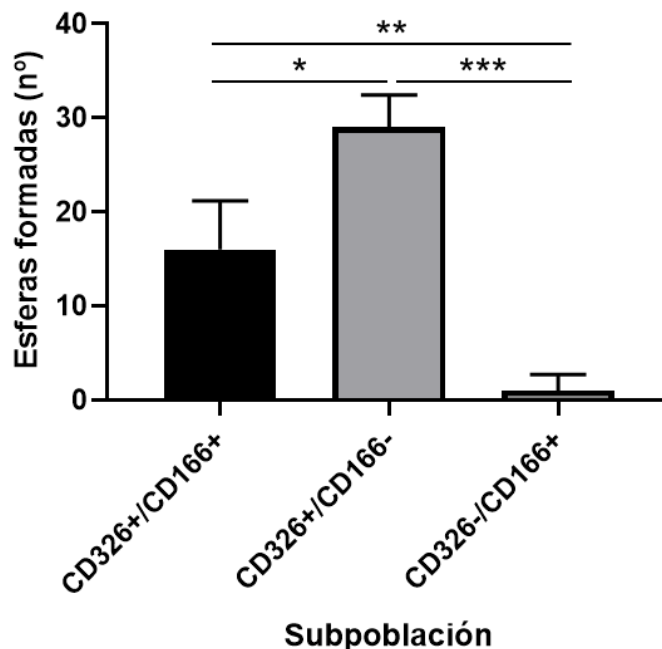


Figura 21. Tumoresferas formadas a los diez días de sembrar en cultivo 3D las tres subpoblaciones separadas de H1650. Las subpoblaciones se separan mediante citometría de flujo (*cell sorting*) con anticuerpos contra CD326 y CD166. Cada conteo se midió por triplicado. La significación estadística se extrae del t-test desapareado, por cada par de muestras. p-valor: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001.

La incapacidad de la población negativa para CD326 para generar esferas indica la importancia de esta glicoproteína de superficie en la proliferación de las células de H1650 y en la generación de uniones intercelulares. H1650 se caracteriza por pérdida de función para el gen de p53 y por poseer mutación activadora en *EGFR*. Se ha demostrado en algunos tipos de cáncer la regulación de la expresión de *EPCAM* (CD326) por parte de p53, reprimiendo p53 la expresión de *EPCAM* a nivel transcripcional⁴⁶⁴. La carencia de p53 en H1650 correlaciona con un aumento considerable de la expresión de CD326 (EpCAM). Esto podría explicar la capacidad de H1650 para originar esferas en suspensión, y de la misma incapacidad en ausencia de CD326^{464–466}. También puede tener implicaciones con la correlación inversa parcial entre CD326 y E-cadherina, donde la expresión del primero debilita las uniones homofílicas de las cadherinas y provoca cambios en el citoesqueleto⁴⁶⁷. La interacción directa entre ALCAM

(CD166) y EGFR (mutado con activación constitutiva en H1650) también puede estar afectando a la morfología y número de tumoresferas formadas en las subpoblaciones CD166 positivas y negativas ⁴⁶⁸. CD326 (EpCAM) y CD166 (ALCAM) parecen ser clave en la tumorigénesis en la línea de CPNM H1650 (mutada en *EGFR* y *TP53*). Por tanto, los resultados obtenidos refuerzan a CD326 como un buen marcador de CSC en H1650 y serviría para la identificación de esta subpoblación en esta línea celular.

1.2.2.2. Formación de tumoresferas en presencia de la citoquina TGF- β 1

Múltiples estudios han sugerido una relación entre las CSC y la transición epitelio-mesénquima (EMT) ^{374,469}. La citoquina TGF- β 1, a través de su unión al receptor de TGF- β tipo II, que a su vez heterodimeriza con el receptor TGF- β tipo I, desencadena la vía de señalización de TGF- β , que en última instancia provocaría cambios en el citoesqueleto que llevarían a la transición desde un fenotipo epitelial a otro mesenquimal ²⁴⁷. Esta vía de señalización, por otro lado, también aumentaría la expresión de marcadores de pluripotencia.

Para estudiar cómo afecta esta citoquina a la formación de las esferas tumorales, se realizó un ensayo de generación de tumoresferas en presencia de TGF β . En este ensayo se utilizaron dos líneas de adenocarcinoma de pulmón no microcítico (A549, H441) y una de osteosarcoma (U2OS). A549 se suele utilizar como modelo para investigar la EMT en CPNM, por su fenotipo intermedio epitelial-mesenquimal. H441, como ya se ha citado, se utiliza sobre todo como modelo de barrera epitelial de las vías aéreas más distales del pulmón. Ambas líneas están mutadas en *KRAS* (Tabla 3), y además H441 lo está en *TP53* y A549 en *STK11* y carece del locus de *CDKN2A*, gen que codifica hasta tres variantes transcripcionales que son distintos supresores tumorales: p16INK4a, p14ARF y p12 ⁴⁷⁰. Mutaciones en *KRAS* y *TP53* son las más incidentes en adenocarcinoma de pulmón. Por otro lado, la línea U2OS derivada de osteosarcoma se utiliza en nuestro laboratorio para estudio de reguladores de ciclo celular ⁴⁷¹. Se ha reportado la dificultad para formar esferas de este tipo de tumor (sarcosferas) en condiciones de baja adherencia, pero es posible generar

esferas si las células se crecen con una matriz que aporte cierta rigidez al microambiente celular.

Se analizó el crecimiento a distintas densidades de siembra en placa de baja adherencia de 96 pocillos (5, 50, 500, 5000 células), y en presencia o ausencia de la citoquina TGF- β 1. Esta citoquina se añadía a una concentración de 4 ng/mL, y se reponía en cultivo cada 48 horas, ya que es inestable en solución. También se analizó el crecimiento en suspensión de la línea celular A549 crecida en adherencia y expuesta de manera prolongada a TGF- β 1 (mayor a 45 días).

En la Figura 22 se puede observar el crecimiento de las tumoresferas a los 7, 11 y 14 días tras la siembra inicial, en los pocillos donde se sembraron 5000 células de cada línea, una densidad en exceso que permite mostrar la organización de las células en estas condiciones. Aparecen ciertas diferencias reseñables en la morfología, número y tamaño al adicionar TGF- β 1 frente a las condiciones control. En A549 que, como hemos observado previamente, tiende a formar agregados irregulares, los forma en condiciones control, pero con TGF- β 1 las células se agrupan formando agregados al menos de morfología más redondeada, incluso alguna esfera. A menor densidad inicial (500 células), sí forma esferas redondeas al añadir TGF- β 1 (resultado no mostrado). Para la misma línea, pero habiendo sido expuesta prolongadamente a TGF- β 1, la morfología es mixta entre las dos condiciones de la línea sin exponer, es decir, agregados más masivos como en el control, pero con morfología más suavizada, como en las expuestas a TGF- β 1. En la otra línea de adenocarcinoma pulmonar, H441, la morfología es la de tumoresfera clásica, muy circular. Además, como se describió previamente, al ser el origen de esta línea el epitelio de barrera de la zona más distal del pulmón, las uniones entre células tienen una disposición más ordenada, dejando espacio a un lumen central en condiciones control. No obstante, al añadir TGF- β 1, este lumen parece perderse y la esfera se torna más compacta, con un núcleo necrótico central, como sucede en otras líneas. La línea de osteosarcoma U2OS parece originar esferas en los primeros 7 días, sin llegar a alcanzar los volúmenes de las otras dos líneas, y perdiendo la esfericidad en los días sucesivos hasta el día 14. Esto se puede explicar por la necesidad de cierta rigidez en el microambiente para la generación de sarcosferas. No parece

haber diferencias notables entre los cultivos crecidos en presencia o ausencia de TGF- β 1.

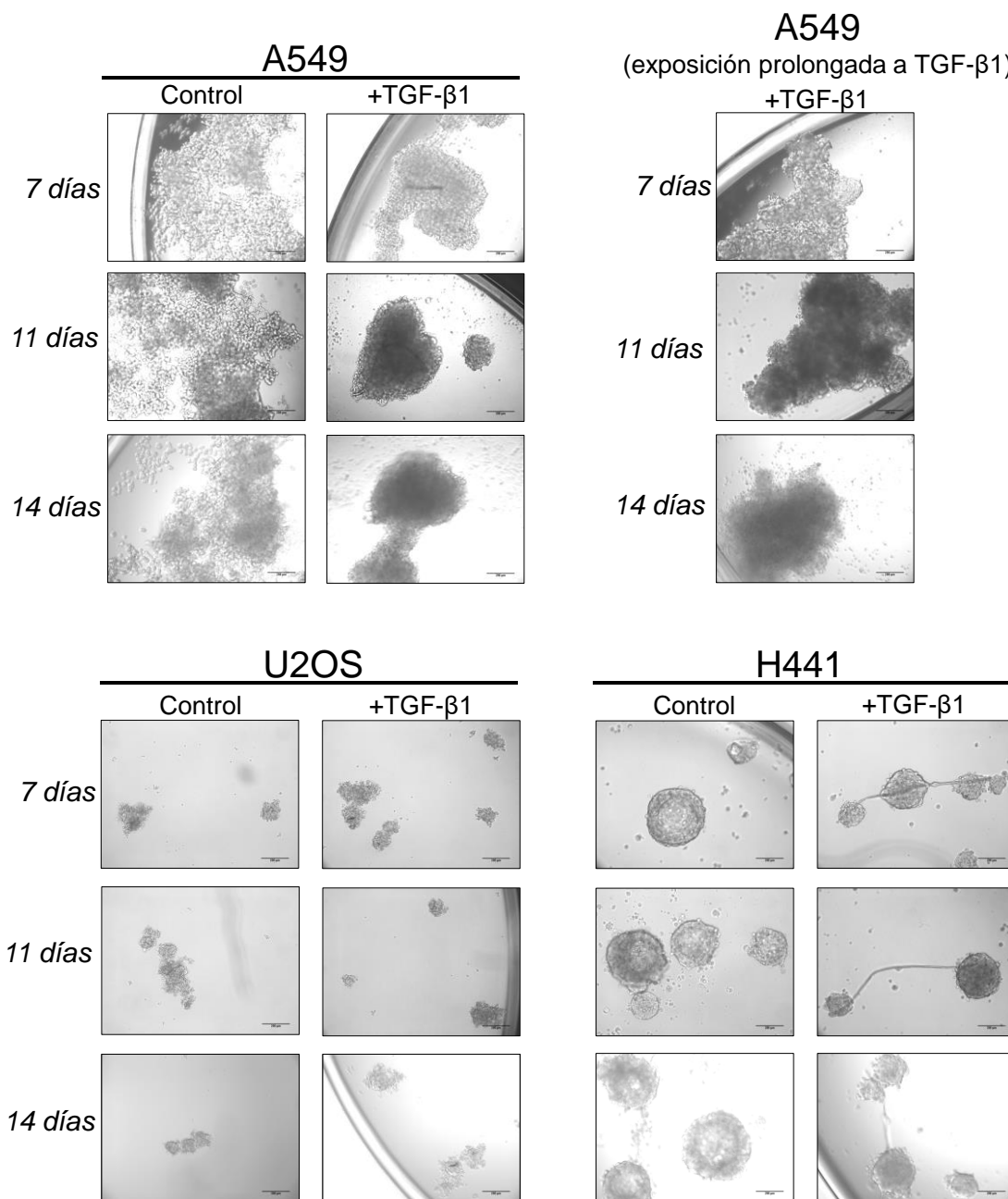


Figura 22. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases de tumoresferas formadas a los 7, 11 y 14 días de ser sembradas en condiciones de baja adherencia, en presencia o ausencia (control) de la citoquina TGF- β 1. El experimento se llevó a cabo en placa de 96 pocillos. Todas las imágenes están tomadas con magnificación 10x, y en los casos mostrados el número de células sembradas inicialmente era de 5000 por pocillo. Las barras de escala muestran 200 μ m. Las células A549 con exposición prolongada a TGF- β 1 se había mantenido previamente al experimento con esta citoquina más de 45 días. El tratamiento experimental en todos los casos donde se indica +TGF- β 1 es la adición (4 ng/mL) cada 48 horas para mantener la ruta de señalización de TGF- β activa.

Para resaltar las diferencias en la morfología en los casos más reseñables, se utilizó una herramienta de enmascaramiento de las imágenes originales de microscopía, desarrollada por Choudhry para el programa ImageJ ⁴⁵⁵. Como resultado, en la Figura 23 se puede observar cómo las esferas de A549 son más redondeadas y de menor tamaño con TGF- β 1 que sin él; también el fenotipo mixto de la línea A549 previamente expuesta a la citoquina; y la compactación y el menor tamaño de las tumoresferas en H441 también con TGF- β 1. En conjunto, la activación de la ruta de señalización por TGF- β , con una posible inducción de la EMT, puede estar afectando a la población de células pluripotentes de estas líneas, provocando cambios en la expresión de marcadores CSC y reorganizaciones en su citoesqueleto. Por otro lado, también se ha descrito la detención del ciclo celular por señalización por TGF β a través de inhibidores de CDK, lo cual afectaría a la proliferación. Por ello, TGF- β 1 es considerado supresor tumoral. Este estado de crecimiento lento también es una capacidad de las células madre ⁴⁷². Aunque esto no ha sido estudiado en profundidad en este ensayo, la ralentización del crecimiento, un posible aumento de la población CSC y la mayor esfericidad podrían explicar las diferencias morfológicas al añadir TGF- β 1.

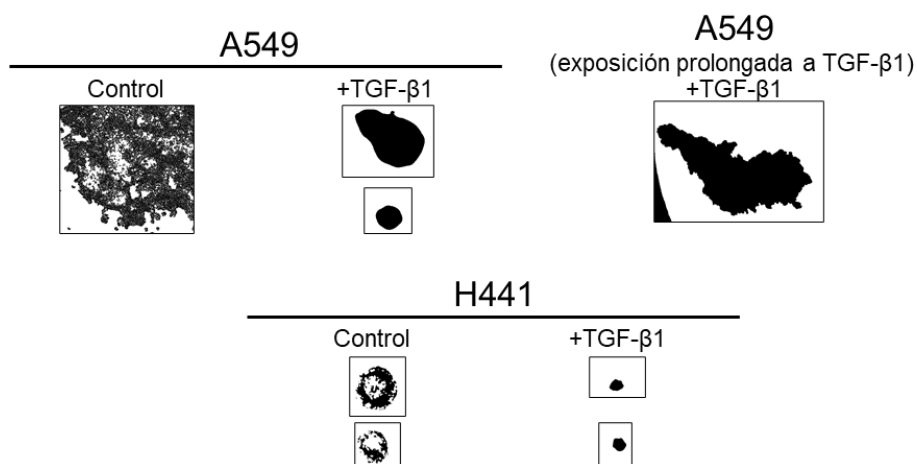


Figura 23. Morfología de tumoresferas y agregados tumorales formados a los 14 días de ser sembradas en condiciones de baja adherencia. Imágenes derivadas del tratamiento digital de imágenes de microscopía óptica de contraste de fases, con el fin de resaltar cómo el tratamiento (adición del inductor de la EMT TGF- β 1) afecta al tamaño, forma y número de esferas originadas en las líneas de cáncer de pulmón no microcítico A549 y H441. Para el análisis de morfologías se utilizó la herramienta macro *Cell Colony Edge* para el programa ImageJ, desarrollada por Priya Choudhry ⁴⁵⁵. Las células A549 con exposición prolongada a TGF- β 1 se habían mantenido previamente al experimento con esta citoquina más de 45 días. El tratamiento experimental en todos los casos donde se indica +TGF- β 1 es la adición (4 ng/mL) cada 48 horas para mantener la ruta de señalización de TGF- β activa.

En cuanto al número de esferas formadas, dado que en A549 se forman grandes agregados y en U2OS se pierde la viabilidad del cultivo tras dos semanas, fue comparable solamente en el caso de H441. En esta línea, como se ha observado en las Figuras 22 y 23, las esferas se aprecian de manera individual. El contaje se produjo tras quince días en cultivo (Figura 24). En condiciones control y sembrando 5000 células por pocillo es cuando mayor número de esferas se generan (media: 33,67; SD: 7,1), muy por encima a cuando se siembran 500 células inicialmente. Además, en este último caso, las que se generan (media: 4,33; SD: 1,53) son de pequeño tamaño (150-250 μm). Al añadir TGF- β 1, el número de esferas generadas se reduce drásticamente incluso sembrando 5000 células. Esto puede ser debido al efecto antiproliferativo en células epiteliales de esta citoquina ⁴⁷³. No hay mucha diferencia en el número de esferas formadas en presencia de TGF- β 1 al sembrar 500 (media: 10; SD: 0) o 5000 células (media: 7,33; SD: 2,31). La inhibición de la proliferación de las tumoresferas de H441 en presencia de TGF- β 1 se aprecia también por el tamaño de las esferas generadas, que nunca alcanza el de la condición control. En ellas, además, desaparece el lumen, como se ha descrito en las imágenes de microscopía de la Figura 22. TGF- β 1 induce cambios en el citoesqueleto relacionados con la EMT y favorece la migración en células epiteliales. Es por ello que, en H441, donde las células se disponen como una barrera epitelial con un espacio vacío central, esta citoquina podría estar favoreciendo la transición a un fenotipo donde las células adquieren motilidad, ocupando las regiones centrales donde se situaría el lumen, y compactando la esfera.

Al comparar condiciones por t-test despareado, se observan diferencias significativas al contrastar por pares ambas condiciones control (p-valor: 0,0022**); al contrastar la siembra de 500 células en condiciones control y añadiendo TGF- β 1 (p-valor: 0,003**); al contrastar la siembra de 5000 células en condiciones control y añadiendo TGF- β 1 (p-valor: 0,0036**); y al contrastar la condición control/5000 células y la condición +TGF- β 1/500 células (p-valor: 0,0045**).

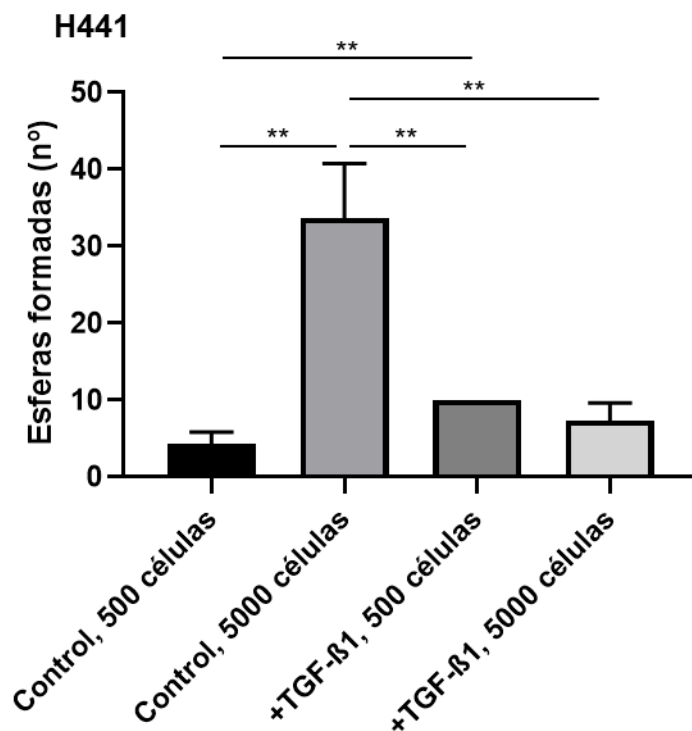


Figura 24. Tumoresferas formadas a los quince días de sembrar en condiciones de baja adherencia la línea H441. Se comparan distintas densidades iniciales de siembra (500 células, 5000 células) y distintas condiciones de tratamiento (control, adición del inductor de la EMT TGF-β1). Cada conteo se realizó por triplicado. La significancia estadística se extrae del t-test desapareado, por cada par de muestras. p-valor: ** < 0,01.

A raíz de las diferencias observadas en la formación de tumoresferas de la línea A549 en condiciones control o añadiendo TGF-β1, se sembraron células en condiciones de baja adherencia (15000 células en pocillo de placa de 6 pocillos) y, tras mantenimiento y pases intermedios para enriquecer las tumoresferas en población CSC, a los 50 días se llevó a cabo una citometría de flujo en las tratadas con TGF-β1 sobre las proteínas de superficie que se han estudiado como marcadores de CSC: CD326, CD166 y CD44. Aunque los resultados son preliminares (no mostrados), bajo tratamiento con TGF-β1 se observó que aproximadamente el 100% de las células expresaba CD44, mientras que el número de células que expresaba CD326 y CD166 era muy bajo o nulo. No obstante, en resultados previos mostrados sí se había observado expresión de CD326 (28,9%) y CD166 (87,7%) en condiciones control en tumoresferas de A549. CD44 también mostraba una expresión en casi la totalidad de células (96,2%). En condiciones de adherencia, la expresión de CD166 y CD44 se

observó también en la mayoría de las células (96,8 y 95,9% respectivamente), y la de CD326 era del 56,8% (Figura 19). Por tanto, el tratamiento prolongado con TGF- β 1 y el cultivo a largo plazo en baja adherencia reprimiría la expresión de estas proteínas de adhesión celular CD326 y CD166 en A549. En comparación, resulta de interés cómo la expresión de CD44 se preservaría en casi el 100% de la población celular.

CD44 es receptor de ácido hialurónico y por tanto modula relaciones célula-célula y célula-matriz. También interacciona con osteopontina, colágenos y metaloproteinasas de la matriz; así como con RhoA, proteína de reorganización de citoesqueleto, fibras de estrés y adhesiones focales ⁴⁷⁴. También se ha descrito correlación con Nanog ⁴⁷⁵. Este conjunto de interacciones para CD44, además de su consideración como marcador de pluripotencia ⁴⁷⁶, muestran que la activación de la ruta de TGF- β puede estar induciendo la EMT (cambios en citoesqueleto) y el fenotipo migratorio (interacción con matriz). Y que esta transición a su vez correlacionaría con las poblaciones CSC. En la Figura 25 se aprecia esa diferencia de crecimiento de la tumoresfera en placa de 6 pocillos en condiciones control (agregados amorfos) y con TGF- β 1 (esfera bien redondeada).

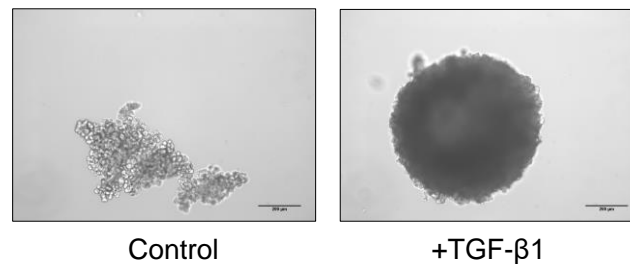


Figura 25. A549 sembradas en condiciones de baja adherencia. Condiciones control y tratadas con TGF- β 1. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases. La imagen Control se capturó a los 14 días tras la siembra inicial, la de adición de TGF- β 1 a los 21 días. Magnificación 10x. Las barras de escala indican 200 μ m.

Estudios previos han mostrado que la subpoblación de células de CPNM con elevada expresión de ALDH y CD44 muestra capacidad de autorrenovación, clonogenicidad, tumorigenicidad, capacidad invasiva y resistencia a quimioterapia. En conjunto, los rasgos de un fenotipo de pluripotencia aumentan en la subpoblación con elevada expresión de CD44 (y ALDH) ¹⁹². Estos

resultados preliminares sugieren que la activación de la vía de señalización de TGF β en A549 parece correlacionar con la expresión del marcador CD44. La asociación de la adición exógena de TGF- β 1 y la adquisición de los rasgos de pluripotencia podría conectar a la población CSC con la transición epitelio-mesénquima (EMT).

1.3. Análisis de la expresión génica de marcadores de CSC mediante PCR a tiempo real (RTqPCR)

Los cultivos celulares establecidos en ambas condiciones, adherencia y suspensión, derivados de tumores de CPNM y de las líneas celulares establecidas de CPNM se utilizaron para analizar la expresión génica de marcadores de CSC mediante RTqPCR. Estos análisis se realizaron en el laboratorio de Oncología Molecular de la Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUV) dirigido por el Dr. Carlos Camps y la Dra. Eloisa Jantus. Las muestras empleadas en este estudio se describen en la Tabla 4. Los resultados de este análisis se muestran en el artículo publicado en *Cell Death and Disease* ³⁰¹.

Se analizó la expresión a nivel de ARNm de 51 genes descritos como posibles marcadores de CSC de pulmón, reguladores de pluripotencia y ciclo celular, promotores de invasión y componentes de las vías de señalización de Notch, Wnt y Hedgehog en tumoresferas y células adherentes. Los niveles de expresión relativa de los genes *LIN28B*, *CD133*, *WNT1*, *WNT2*, *SHH* y *GLI1* estaban por debajo del límite de detección de la técnica en la mayoría de las muestras y fueron excluidos del análisis final. En el caso de *CD133*, no pudo detectarse expresión, aunque se utilizaron tres sondas diferentes.

Las tumoresferas mostraron una mayor expresión de 37 de 44 genes en comparación con las células cultivadas en adherencia, siendo un grupo de 17 genes los que se mostraron significativamente sobreexpresados (Figura 26): *ALDH1A1*, *KLF4*, *NANOG*, *CD44*, *THY1*, *CDKN1A*, *JUNB*, *MDM2*, *MMP9*, *SNAI1*, *ITGA6*, *NOTCH1*, *NOTCH3*, *DLL4*, *JAG1*, *CTNNB1* y *GSK3B*.

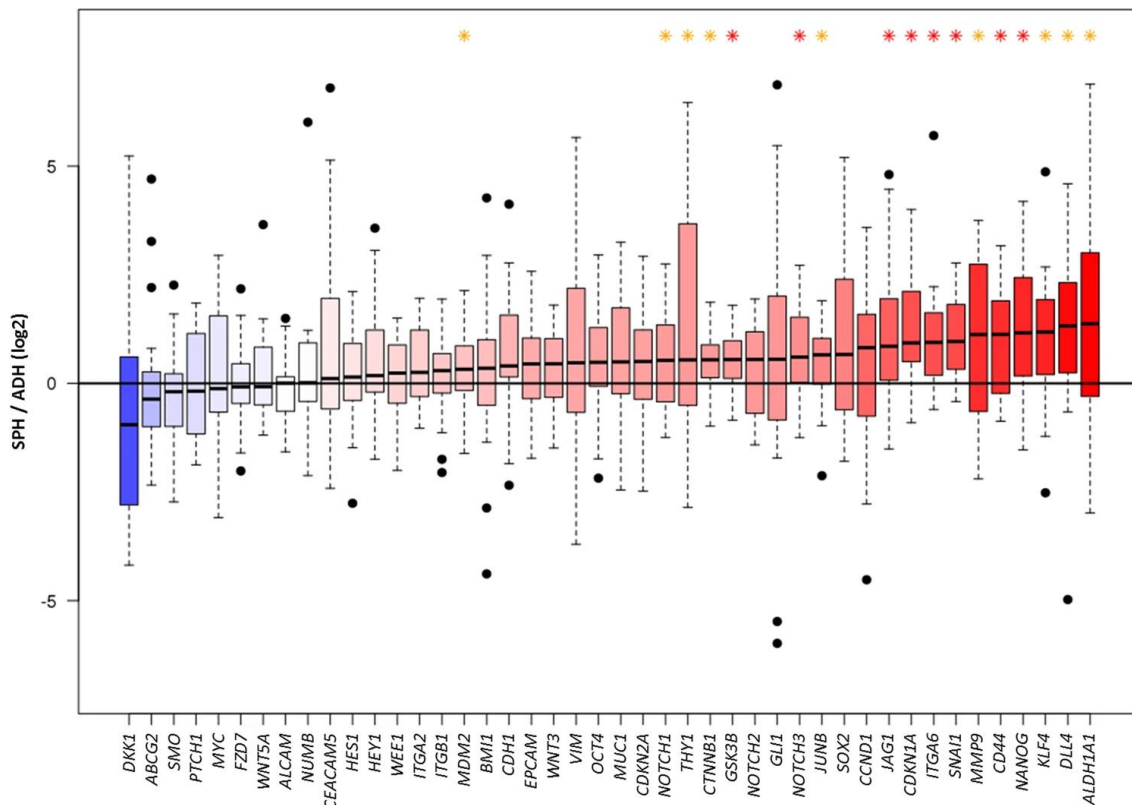


Figura 26. Expresión relativa (niveles de transcripción) de genes asociados a CSC (log 2 del ratio entre la expresión en tumoresferas, SPH, frente a cultivos adherentes, ADH). ARNm fue medido por RTqPCR. Las barras de error representan el SEM. SEM: error estándar de la media (Standard error of the mean). *: p -valor $< 0,01$. *amarillo: $p < 0,05$. *rojo: $p < 0,01$. Adaptado de Herreros-Pomares y colaboradores³⁰¹.

El test estadístico comparativo fue la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Con un análisis de componentes principales (ACP) se consiguió agrupar las muestras en base a su expresión génica, mostrándose que en los cultivos crecidos adherencia hay una expresión más homogénea. Estos resultados ACP se describen en el artículo publicado³⁰¹. Para discriminar entre ambas condiciones, se efectuó una regresión de mínimos cuadrados parciales sobre el ACP previo, mejorándose la discriminación entre tumoresferas (ESF) y cultivos en adherencia (ADH). En cuanto a la expresión de los genes, de los 17 antes citados el *loading plot* muestra cómo 7 de ellos, con expresión más elevada en tumoresferas, contribuyen a separar mejor las poblaciones de ESF de las ADH: *SNAI1*, *GSK3B*, *CD44*, *CDKN1A*, *NOTCH3*, *NANOG* y *CTNNB1*. Por parte de los cultivos adherentes, los genes más diferencialmente expresados respecto a las esferas son *DKK1*, *SMO*, *ALCAM*, *PTCH1* y *FZD7*.

En estos análisis se diferenció entre las condiciones de cultivo, pero no entre líneas establecidas y cultivos derivados de pacientes. Análisis de ACP subsiguientes también mostraron la variabilidad existente en la expresión génica entre ambos tipos de muestras, así como también entre muestras individuales dentro del mismo tipo. Los cultivos derivados de paciente reflejan mejor la realidad biológica del tumor que las líneas celulares establecidas, y reforzarían mejor los nuevos hallazgos en materia de genes marcadores de pluripotencia. Por ello, se decidió proseguir el análisis de expresión génica con los cultivos primarios. Además de esto, para reducir la dimensionalidad, es decir, minimizar el número de variables aleatorias, se construyó un modelo de regresión logística (prueba de los rangos con signo de Wilcoxon) a partir de los 17 genes indicados que primero se sobreexpresaron de manera significativa. En base al modelo, el análisis de ACP mostró que los genes *NANOG*, *ITGA6*, *CD44*, *NOTCH3*, *CDKN1A* y *SNAI1* eran los que mejor permitían distinguir las tumoresferas de los cultivos en monocapa. Los 6 genes diferencialmente expresados en las esferas frente a los cultivos crecidos en adherencia conforman una firma génica de la población CSC, y así lo confirmaron ensayos adicionales de expresión proteica y localización subcelular ³⁰¹.

1.3.1. Análisis de supervivencia *in silico* de los genes sobreexpresados en tumoresferas

Además de los ensayos de expresión génica que llevaron a la identificación de los 17 genes significativamente sobreexpresados en tumoresferas de CPNM, se evaluó su potencial en la prognosis de esta enfermedad mediante análisis de supervivencia (regresión de Cox y estimación de Kaplan-Meier) en con una cohorte de CPNM (N=661) obtenida del *The Cancer Genome Atlas (TCGA)* formada tanto por adenocarcinomas (ADC, N=345) como carcinomas escamosos de pulmón (CCEP o SCC, N=316). Este ensayo *in silico* mostró que los pacientes con elevada expresión de *THY1*, *SNAI1*, *ITGA6* y *CDKN1A* presentan menor supervivencia global (Figura 27A-D).

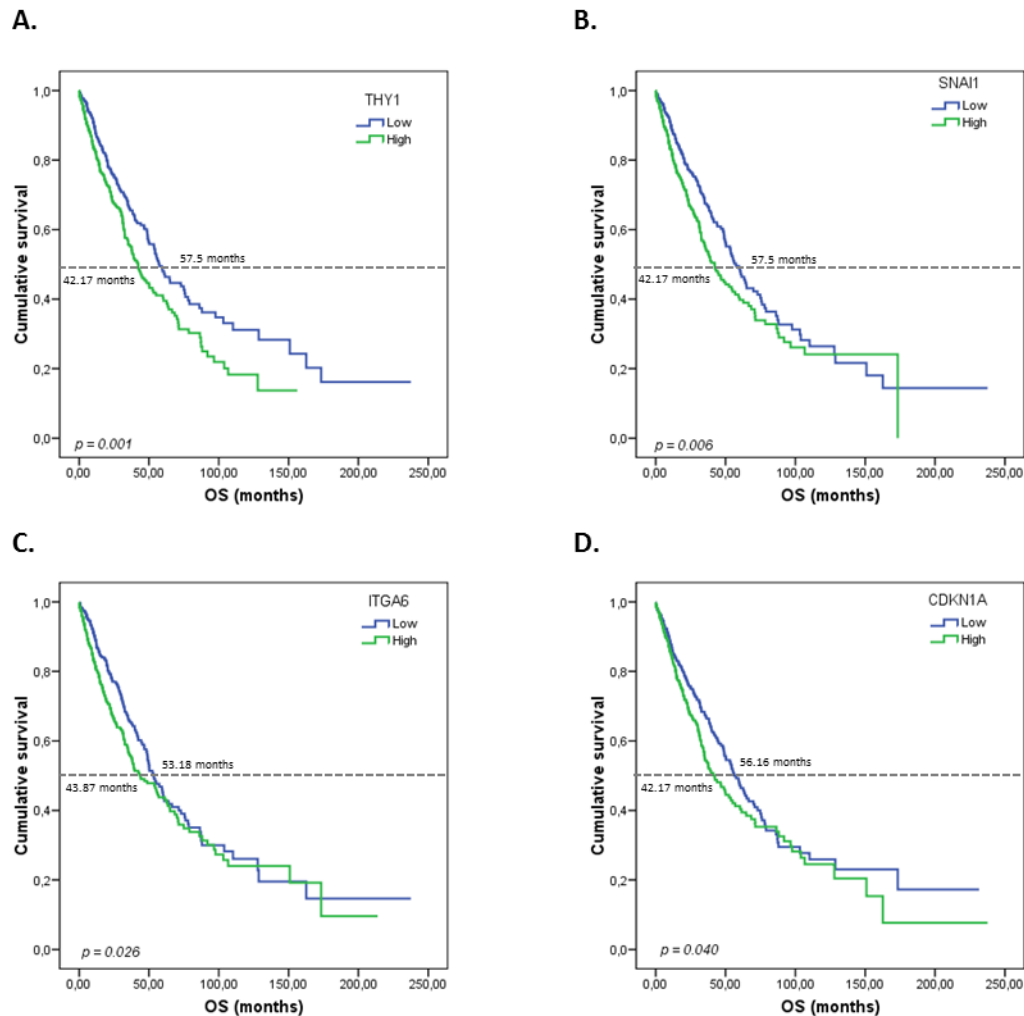


Figura 27. Diagramas de Kaplan-Meier para supervivencia global (OS, *overall survival*) resultado del análisis *in silico*. Se muestran los genes que mostraban peor supervivencia global en la cohorte total (N=661): *THY1* (A), *SNAI1* (B), *ITGA6* (C), *CDKN1A* (D). La dicotomía entre elevada expresión (*High*, línea verde) y baja expresión (*Low*, línea azul) se estableció a partir de la mediana de expresión de cada gen. *Adaptado de Herreros-Pomares y colaboradores* ³⁰¹.

1.3.2. Firma génica como factor pronóstico de CPNM

A partir de los ensayos de expresión génica y el análisis de supervivencia *in silico* se buscó desarrollar una fórmula de pronóstico. Mediante un análisis de regresión de Cox (univariante) donde se estableció la supervivencia global (OS) como variable dependiente se pudieron ordenar los 17 genes sobreexpresados en CSC en base a su poder pronóstico (Z-score univariante, Figura 28), y se observó que *CDKN1A*, *SNAI1* e *ITGA6* se asociaban a peor supervivencia (Z-

score < 1,5) y, por tanto, se construyó una firma de riesgo con ellos en base a su contribución relativa al análisis multivariante (coeficientes de regresión). La fórmula resultante fue la siguiente: $[(CDKN1A \times 0,123) + (ITGA6 \times 0,196) + (SNAI1 \times 0,255)]$.

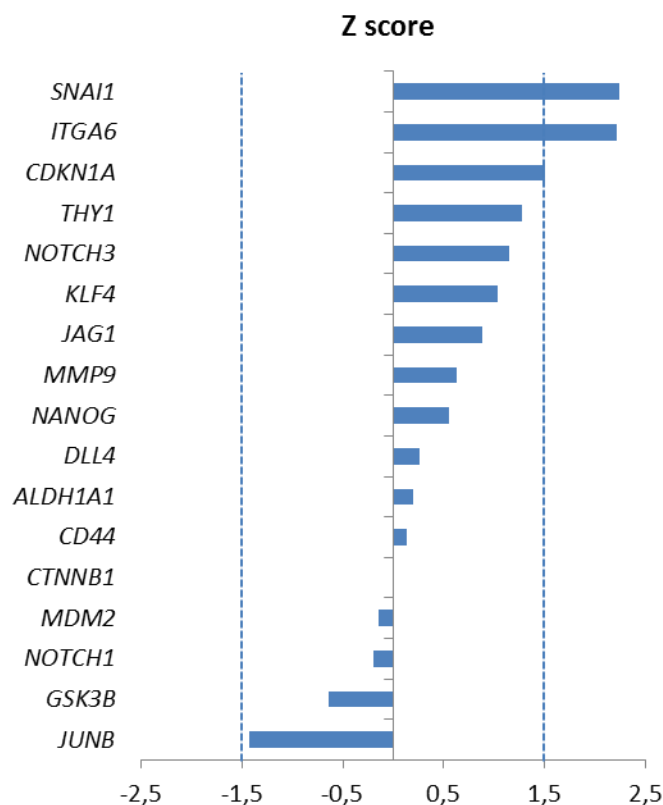


Figura 28. Poder pronóstico de los 17 genes sobreexpresados en tumoresferas de pulmón. Análisis univariante (modelo de regresión de Cox) de la expresión génica y su asociación con baja supervivencia. Los genes se ordenan en función de su poder pronóstico (Z-score). Las líneas discontinuas muestran (en valor absoluto) un Z-Score de 1,5. Este criterio permitió escoger a los tres genes incluidos en el modelo multivariante de Cox para desarrollar la *CSC score*. Adaptado de Herreros-Pomares y colaboradores³⁰¹.

Esta fórmula, llamada firma de CSC (*CSC score* o *CSC signature*), se contrastó realizando análisis de supervivencia con la cohorte de CPNM completa obtenida antes de TCGA (N=661), y con la cohorte parcial de ADC (N=345), observándose una menor supervivencia en los pacientes con altos valores (escogiéndose la mediana como punto de corte) de la firma CSC en ambos grupos. En la cohorte global, la supervivencia total (OS) de los pacientes con elevada firma de CSC era de 37,7 meses, frente a los 60,4 meses con valores de firma CSC bajo la mediana (p-valor=0,001**; Figura 29A). En los pacientes con ADC y elevado

valor en la firma de CSC su supervivencia era de 36,6 meses, frente a los 53,5 meses de pacientes con ADC y bajo valor de firma CSC (p -valor=0,003**; Figura 29B). Por último, se empleó una cohorte independiente de pacientes de ADC del Hospital General de Valencia (N=114) como grupo de validación de la firma CSC (CSC Score). La asociación entre elevados valores de esta firma CSC y un peor pronóstico se confirmaron con análisis de supervivencia en esta cohorte (42,9 meses para elevada firma CSC frente a una supervivencia superior al 50% en pacientes con baja firma CSC; p -valor=0,02*; Figura 29C).

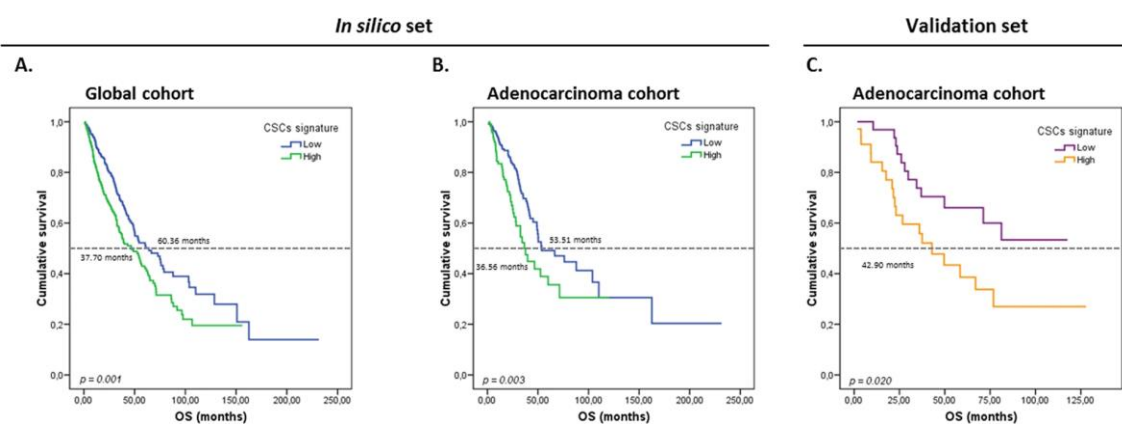


Figura 29. Valor pronóstico de la firma CSC (CSC score, CSC signature). Diagramas de Kaplan-Meier en base a la firma CSC que representan la supervivencia global (OS) en toda la cohorte del TCGA (A), en la subcohorte de adenocarcinomas (B); y en la cohorte de validación (C). La puntuación se dividió como alta (*high*, líneas verdes y naranjas) o baja (*low*, líneas azules y moradas) acorde a la mediana de la expresión. Adaptado de Herreros-Pomares y colaboradores³⁰¹.

CAPÍTULO 2

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

Una razón importante para la alta tasa de mortalidad es la naturaleza altamente metastásica de las células de cáncer de pulmón^{5,477}. El programa de desarrollo, conocido como transición epitelial-mesenquimal (EMT), se ha convertido en un posible mecanismo candidato para explicar la metástasis tumoral^{229,315,364,478}.

Una de las vías de señalización implicadas en la activación de la EMT es la del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). En epitelio normal y premaligno, esta activación provoca la detención del ciclo celular y, en última instancia, la apoptosis, dentro de la homeostasis tisular para prevenir la transformación y la aparición de neoplasias. En un microambiente tumoral, por otro lado, la activación de la vía de TGF- β promueve la EMT a la vez que favorece la metástasis y la adquisición de pluripotencia por parte de las células tumorales^{479,480}.

La ruta de TGF- β , en el contexto tumoral, interacciona con otras vías de señalización, como la ruta Ras-MAP-quinasa²⁶⁸. Se ha observado un aumento de la expresión de genes relacionados con fenotipo mesenquimal por estimulación prolongada con TGF- β , a través de la interacción entre los factores de transcripción SMAD y el complejo de transcripción AP-1, en particular JunB²⁶⁸. En cáncer de pulmón, concretamente en adenocarcinoma, se ha descrito a JunB, junto a otros factores de la transcripción como HNF4A y ETS2, como mediadores de la activación de la EMT vía TGF- β ²⁹⁹. En el estudio de transcriptómica realizado en tumoresferas de CPNM para identificar una firma molecular característica de estas, cuyos resultados se han expuesto en el anterior capítulo, también se mostró que la expresión del gen *JUNB* se incrementa en poblaciones CSC³⁰¹. El trabajo previo de nuestro grupo de investigación en torno a este factor de transcripción y su asociación con la EMT lo convierten en una proteína de interés y por ello hemos iniciado estudios para

analizar su papel en la EMT en cáncer de pulmón. En paralelo, también estudiamos el papel del factor de traducción eIF5A2 durante la EMT inducida por TGF- β y la invasión celular en CPNM. Se ha descrito recientemente que eIF5A2 está sobreexpresado en múltiples tipos de tumores, entre ellos cáncer de pulmón, siendo un marcador de mal pronóstico. Algunas evidencias sugieren que está implicado en la regulación de la EMT ⁴⁸¹⁻⁴⁸⁴. Por todo ello hemos querido profundizar en su papel en este proceso.

2.1. JunB como mediador de la EMT inducida por TGF- β

La amplificación y sobreexpresión de miembros de la familia AP-1 ocurre en varios tipos de cáncer y se asocia a mal pronóstico ^{285,289,290}. Se ha demostrado que la sobreexpresión de JUNB contribuye al desarrollo neoplásico en varios cánceres humanos como en el linfoma anaplásico de células grandes (ALCL) ²⁹³, ciertos linfomas de Hodgkin ²⁹² y en cánceres de mama y estómago ^{294,295}.

Además de regular el ciclo celular ²⁷³, JunB interactúa con proteínas Smad para mediar en el programa transcripcional de respuestas profibróticas e invasión celular en cáncer de mama y en CPNM ^{268,296}. Recientemente, la expresión de *JUNB* se ha identificado en las células circulantes del cáncer de mama como factor independiente de mal pronóstico ²⁹⁸. Resultados previos obtenidos en el laboratorio permitieron la identificación de dianas transcripcionales de JunB mediante ensayos de ChIP-Seq y transcriptómica (manuscrito en preparación). Primero, para obtener información sobre la red transcripcional regulada por JunB, se silenció *JUNB* mediante transfección con ARN de interferencia siJUNB-792, siJUNB-848 o siControl en células U2OS y se analizó la expresión génica global utilizando matrices *Affymetrix GeneChip Human Transcriptome 2.0* en 3 experimentos independientes. En segundo lugar, para detectar los sitios de unión de JunB al genoma e identificar así potenciales dianas transcripcionales directas de JunB implicadas en ciclo celular se realizó inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpo anti-JunB seguida de secuenciación masiva

(ChIP-seq) en células U2OS en crecimiento asincrónico. Se comparó la lista de los genes diferencialmente expresados al silenciar JUNB (con ambos ARN de interferencia) con los datos de ChIP-seq para identificar posibles dianas transcripcionales de JunB.

El análisis bioinformático de los resultados obtenidos en el análisis transcriptómico y de ChIP-Seq mediante la base de datos KEGG (Enciclopedia de Kyoto de Genes y Genomas, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) muestra múltiples rutas de señalización que podrían estar reguladas por JunB, entre ellas la regulación del citoesqueleto de actina, ciclo celular, señalización por TGF β y otras rutas implicadas en cáncer (Figura 30). También se identificaron otras posibles dianas de JunB implicadas en diferenciación y destino celular, entre ellas, algunos genes de la vía de Notch (*RBPJ*, *JAG1*, *LIN28B*). La ruta de Notch regula múltiples procesos celulares, dependiendo del tipo celular y estatus puntual, desde proliferación hasta diferenciación. En cáncer, Jag1 sería ligando del receptor Notch2. En CPNM, se han correlacionado elevados niveles de Jag1 entre otros ligandos de la ruta con progresión del tumor y peor prognosis ⁴⁸⁰; y también se ha observado altamente expresado en la fracción metastásica del tumor frente al primario ⁴⁸⁵. RBPJ es un regulador transcripcional de la ruta de Notch. Al asociarse a proteínas de esta vía, activa la transcripción de genes diana ⁴⁸⁶, mientras que cuando no se une a ellos es un represor transcripcional ⁴⁸⁷. Lin-28B localiza sobre todo en el nucléolo, y regula negativamente la síntesis de miARN. En CPNM se ha observado su elevada expresión en CSC ⁴⁵⁶, considerándolo incluso un factor oncogénico de célula pluripotente. En cáncer de páncreas (PDAC, *Pancreatic ductal adenocarcinoma*) se ha descrito un aumento de expresión de *LIN28B* en respuesta a TGF- β y un control de la progresión del tumor en relación al aumento de los miARN miR-100 y miR-25, que regulan pluripotencia y EMT ⁴⁸⁸.

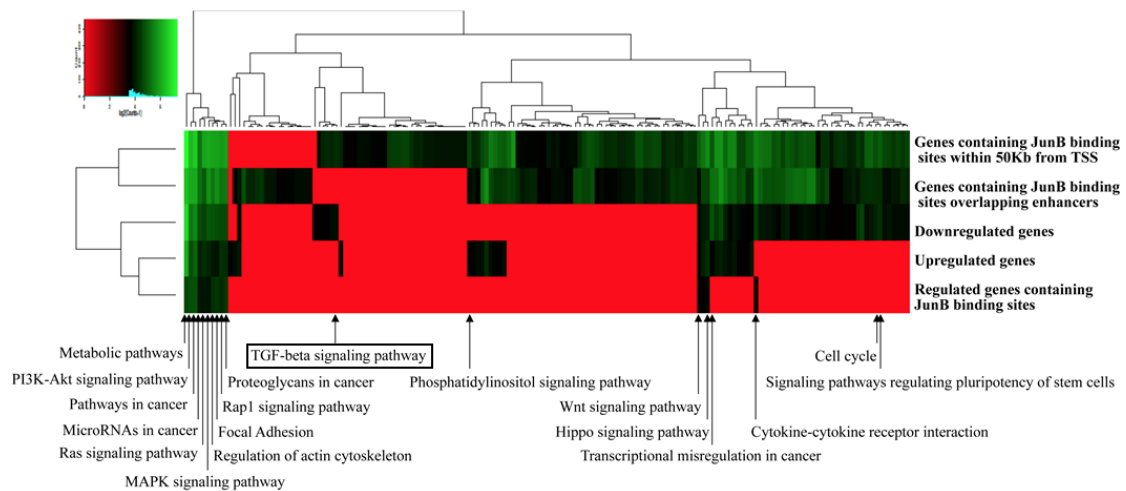


Figura 30. Análisis de enriquecimiento de rutas de señalización tras ChIP-seq y transcriptómica. Se destaca la vía de TGF- β .

Se identificaron 37 putativas dianas transcripcionales de JunB relacionadas con el proceso de EMT, de las cuales 19 eran genes que se expresaron por debajo del nivel basal y 18 eran genes que se sobreexpresaron tras silenciar *JUNB* en comparación con las células control. De ellos, también se estudiaron aquellos que poseen una región de unión de JunB a menos de 50 kb del sitio de inicio de la transcripción (TSS, *Transcription Start Site*), y que poseen motivos de unión del complejo transcripcional: AP-1/TRE y AP-1/CRE (Tabla 10).

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. Se observan los genes cuya expresión varía con ambas construcciones de silenciamiento de JUNB (siJUNB-792, siJUNB-848) tras análisis transcriptómico Chip-Seq en línea U2OS. Los resultados negativos son los expresados por debajo del nivel basal y los resultados positivos los sobreexpresados. También se indican el número de puntos de inicio de la transcripción (TSS) y los motivos de unión del complejo AP-1 detectados. Genes cuyo papel está bien estudiado en EMT y señalización TGF β se obtuvieron de las bases de datos y sistemas de clasificación y enriquecimiento de secuencias AmiGO⁴⁸⁹, PANTHER⁴⁹⁰, GSEA⁴⁹¹, dbEMT⁴⁹² y la publicación de Chang y colaboradores²⁹⁹.

Gen	Cambio expresión siJunB-792 vs siControl	Cambio expresión siJunB-848 vs siControl	Sitios de unión de JunB a 50 kb del TSS	Motivos AP-1/TRE	Motivos AP-1/CRE
<i>LIN28B</i>	-5,65	-1,45			
<i>JUNB</i>	-2,56	-1,66			
<i>IL8</i>	-1,95	-2,17	2	2	
<i>ETV4</i>	-1,91	-1,65	3	2	2
<i>CORO2B</i>	-1,8	-1,59	1		
<i>RELL1</i>	-1,8	-1,6	2	2	
<i>CTNNBIP1</i>	-1,74	-2,2			
<i>EFR3B</i>	-1,73	-3,44			
<i>FHOD3</i>	-1,66	-1,35	1	1	
<i>EDNRA</i>	-1,65	-1,52			
<i>SLFN5</i>	-1,57	-1,58			
<i>RAB8B</i>	-1,49	-1,51			
<i>MAML3</i>	-1,47	-1,35			
<i>DIRC2</i>	-1,46	-2,38			
<i>CITED1</i>	-1,43	-1,47			
<i>ZFYVE9</i>	-1,43	-1,62			
<i>ETV1</i>	-1,44	-1,4			
<i>VEGFC</i>	-1,35	-1,38			
<i>CDH4</i>	-1,34	-1,47	1	1	
<i>TAPT1</i>	1,3	1,37			
<i>ZNF451</i>	1,3	1,98			
<i>SNIP1</i>	1,31	1,31	1	1	
<i>PLS3</i>	1,31	1,47			
<i>LAMA5</i>	1,35	1,48			
<i>NTN1</i>	1,42	1,52	1	1	
<i>NEBL</i>	1,42	1,67			
<i>PGM2L1</i>	1,51	1,94			
<i>PTPN14</i>	1,51	1,66	1	1	
<i>TSPAN2</i>	1,52	2,39	1		
<i>TMEFF1</i>	1,54	1,47			
<i>RBPJ</i>	1,57	1,33	4	3	1
<i>JAG1</i>	1,66	2,45			
<i>TGFB2</i>	1,73	1,81	1	1	
<i>SNAI2</i>	1,76	1,92			
<i>CITED2</i>	2,1	1,77	2	2	
<i>CALU</i>	2,16	2,24			
<i>SLC2A3</i>	3,52	1,8			

Teniendo en cuenta estos resultados y el posible papel de JunB como mediador de la señalización por TGF- β en la regulación de la progresión del adenocarcinoma (ADC) de pulmón según la bibliografía ²⁹⁹, analizamos el papel de JunB en la EMT en células derivadas de adenocarcinoma de pulmón A549. Las células A549 han sido ampliamente utilizadas para estudiar la transición epitelio-mesénquima (EMT) en cáncer en general y en cáncer de pulmón no microcítico en particular ⁴⁹³⁻⁴⁹⁹. Por tanto, hemos utilizado esta línea celular como modelo para estudiar mecanismos moleculares implicados en la EMT inducida por TGF- β .

Para analizar si la señalización por TGF β inducía cambios en la expresión de proteínas asociadas a la EMT, células A549 se trataron con 4 ng/mL de proteína recombinante TGF- β 1 durante 96 horas. Las células tratadas se observaron al microscopio y se recogieron para preparar extractos y aislar proteína para posteriores análisis. Mediante *western blot* (Figura 31B) observamos que los niveles de la proteína JunB aumentan en presencia del ligando TGF- β 1, con un pico de expresión a las 48 horas, concomitante a los niveles de Ciclina E1 y Vimentina. La Ciclina E1 es un regulador del ciclo celular, concretamente en la transición de la fase G1 a S ⁵⁰⁰. Sus niveles de expresión proteica también se han estudiado en cáncer de pulmón, y se relacionan con peor pronóstico de los pacientes cuando esta se encuentra sobreexpresada ⁵⁰¹. Se ha descrito como marcador epitelial en adenocarcinoma de pulmón ²⁹⁹. Su expresión, acorde a resultados obtenidos en nuestro grupo, está regulada de manera positiva por JunB (manuscrito en preparación ³⁰⁰). De acuerdo con esto, en las células A549 tratadas con TGF- β 1, la expresión proteica de Ciclina E1 muestra una tendencia parcialmente similar a la expresión de JunB.

También observamos un considerable incremento de los niveles de Vimentina durante el tratamiento con TGF- β 1. Esto indica que a las 24 horas de exposición a TGF- β 1, la señalización mediada por esta citoquina ha inducido cambios en el citoesqueleto de actina, y las células van adquiriendo un fenotipo más mesenquimal. La proteína recombinante TGF- β 1 es muy inestable en cultivo celular y, para que permanezca activa la ruta de TGF β y para que no se revierta la transición epitelio-mesénquima (EMT) parcial hay que añadir TGF- β 1 cada 48-72 horas en las placas de cultivo. En la Figura 31A se aprecia cómo células A549

en crecimiento exponencial crecidas en adherencia, con una forma más redondeada antes de añadir el TGF- β 1, adquieren progresivamente un fenotipo mesenquimal, esto incluye una morfología alargada, extensiones del citoesqueleto y bordes angulosos. Algunos artículos sugieren que estas características fenotípicas de EMT se alcanzan completamente a las 72 horas de tratamiento con TGF- β 1 en A549 ⁵⁰².

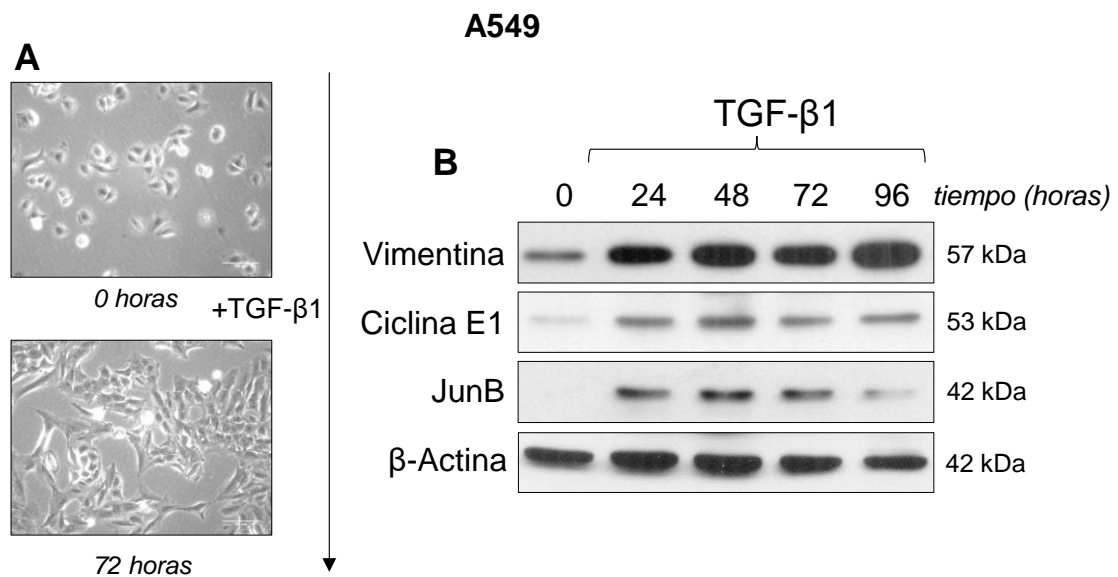


Figura 31. TGF- β 1 induce la expresión de JunB y de marcadores asociados a cambios en citoesqueleto en la línea de CPNM A549. A) Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases para observar el cambio de fenotipo de célula epitelial a mesenquimal por la adición de TGF- β 1. Las barras de escala indican 100 μ m. B) Los extractos proteicos se analizaron por *western blot* con anticuerpos contra Vimentina, Ciclina E1, JunB y β -actina. El tratamiento con TGF- β 1 para inducir la EMT se produjo tras la recogida del primer tiempo (0 h).

La activación de la EMT a través de la adición de TGF- β 1 al cultivo de células A549 induce la expresión proteica de JunB y Ciclina E1, además de provocar cambios en marcadores de fenotipo mesenquimal (Vimentina). Además de los estudios en los cambios moleculares y morfológicos de las células tratadas con TGF- β 1 durante 96 horas, analizamos los cambios producidos en las células tratadas con una exposición prolongada a esta citoquina en las células A549. La exposición se prolongó hasta 46 días (1104 horas). Extractos de las células

tratadas se utilizaron para analizar la expresión de proteínas mediante *western blot*.

En la figura 32B se puede observar la expresión progresivamente creciente de Vimentina en las células tratadas, indicando que se está adquiriendo un fenotipo mesenquimal. Análisis mediante microscopía confirman que las células están adquiriendo este fenotipo (Figura 32A), ya que observamos que las células son más alargadas y angulosas, con protrusiones de la membrana, escasas uniones intercelulares e incluso ralentización notable de la proliferación. Esto último se acentúa a medida que se prolonga la exposición a TGF- β 1.

Analizamos también los niveles de las proteínas Ciclina E1, JunB y TGF- β 2. En este caso, se observa un alto nivel de Ciclina E1 hasta los 11 días (264 horas) de exposición a TGF- β 1, luego disminuye su expresión. Esta disminución puede estar relacionada con la ralentización o casi detención del ciclo celular por la exposición prolongada a la citoquina, que se traduce en una proliferación muy lenta. Los niveles de JunB se correlacionan con los de Ciclina E1. JunB podría estar regulando también la progresión del ciclo celular inicialmente tras la activación de la vía de TGF- β además de mediar la señalización por TGF- β 1, en concordancia con resultados previos de nuestro grupo.

TGF- β 2 es una citoquina de la misma familia que TGF- β 1, siendo secuencias parálogas a nivel génico. Aunque menos estudiada que la primera isoforma, en cáncer se ha descrito cómo los niveles de TGF- β 2 aumentan tras activarse la vía de TGF β , y contribuyen a mantenerla en un bucle de retroalimentación positivo⁵⁰³. Estudios previos en inmunoprecipitación de cromatina con anti-JunB y secuenciación masiva (ChIP-seq) llevados a cabo en nuestro grupo (Tabla 10) sugieren que JunB es un represor de la transcripción de TGF- β 2.

En el ensayo de expresión proteica se observa que los niveles de TGF- β 2 disminuyen a las 24 horas de tratamiento con TGF- β 1 seguido de un aumento a las 96 horas. Esto correlaciona de manera inversa con la expresión de JunB. Posteriormente, su expresión cae y se eleva a los 28 días (672 horas) a niveles superiores a los de las primeras 96 horas. Estos niveles se mantienen (con un ligero descenso que correlaciona con un aumento de JunB).

Snai2 es un factor de la transcripción considerado regulador maestro de la EMT⁵⁰⁴. En este proceso actúa sobre todo reprimiendo la expresión de E-cadherina. La baja cantidad a la que está presente este factor hace difícil estudiar su expresión. Si analizamos la expresión de Jag1 y Lin-28B, potenciales dianas de JunB identificadas en el ensayo de transcriptómica, debido al rol promotor de la vía de Notch en EMT y CSC^{479,505}. Observamos que, al tratar las células con TGF- β 1, la expresión de Jag1 aumenta progresivamente hasta las 96 horas. En exposiciones más prolongadas su expresión disminuye (con un ligero aumento correlacionado con cambios en la expresión de Ciclina E1, TGF- β 2 y JunB). Se ha descrito que, durante la metástasis, las células tumorales que han realizado la EMT para poder invadir nuevos tejidos deben revertir este proceso (transición mesenquimal-epitelial, *mesenchymal-epithelial transition*, MET) para poder colonizar el foco secundario definitivamente. La aplicación sostenida de TGF- β 1 evita la reversión espontánea de la EMT a MET, también a nivel molecular.

Respecto a Lin-28B, observamos que su expresión aumenta hasta alcanzar un pico a las 96 horas, como sucede con Jag1 (lo cual acentúa la posible activación en las primeras 96 horas de la ruta Notch). Sus niveles descienden en tiempos prolongados. En cáncer de páncreas se ha observado que la expresión de Lin-28B se induce también vía TGF- β , y que a su vez regula la síntesis de miARN relevantes en la progresión de la EMT, en este caso inhibiendo los de la familia de let-7⁴⁸⁸.

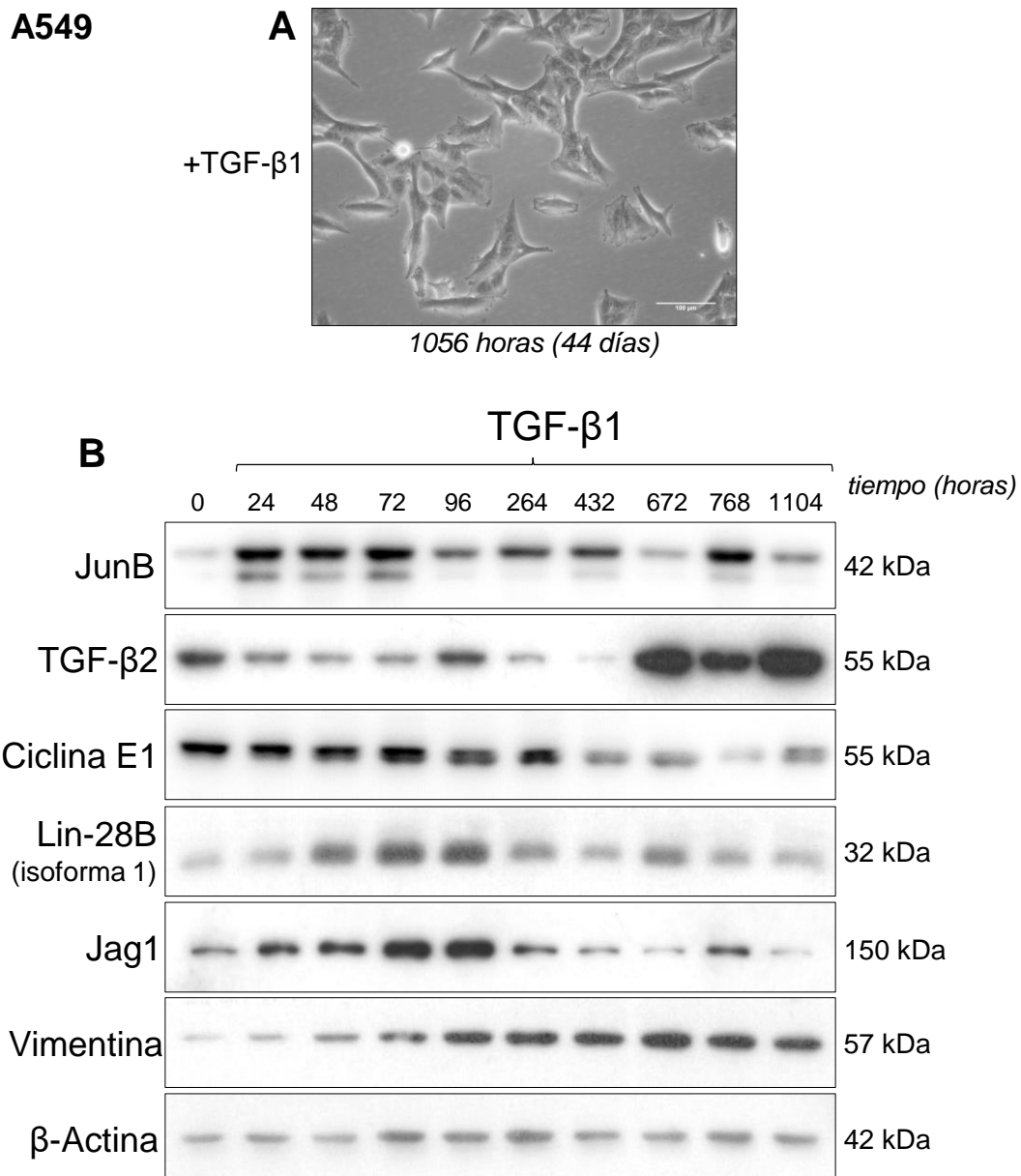


Figura 32. Expresión de marcadores asociados a cambios en citoesqueleto, EMT, señalización extracelular y regulación de ciclo celular en la línea de CPNM A549 cuando se induce la EMT con TGF- β 1 durante tiempos prolongados. A) Imagen de microscopía óptica de contraste de fases para observar el fenotipo mesenquimal consecuencia de la aplicación prolongada durante 44 días de TGF- β 1. La barra de escala indica 100 μ m. B) Los extractos proteicos se analizaron por *western blot*. El tratamiento con TGF- β 1 para inducir la EMT se produjo tras la recogida del primer tiempo (0 h). 264 horas equivalen a 11 días de ensayo; 432 horas a 18 días; 672 horas a 28 días; 768 horas a 32 días; y 1104 horas equivalen a 46 días de ensayo, en presencia de TGF- β 1.

El estudio de la inducción de la EMT vía exposición prolongada a TGF- β 1 sugiere que existe una regulación postraduccional de la proteína JunB, aumentando sus

niveles de manera transitoria en los primeros días de tratamiento con TGF- β 1. También sugiere que la actividad de JunB es importante en este período. Los resultados indican además que hay una regulación dependiente de TGF- β 1 de la expresión de proteínas de la ruta de Notch (Jag1, Lin-28B).

2.2. El factor de traducción eIF5A en la EMT inducida por TGF- β 1

Una proteína de interés reciente por su potencial rol en EMT es eIF5A, descrita inicialmente como factor de la traducción. En humanos se han identificado dos isoformas de esta proteína. eIF5A1, isoforma 1 de eIF5A, se expresa de manera constitutiva en todos los tejidos, su gen se localiza en el cromosoma 17 (EIF5A, 17p12-p13) y posee bajo peso molecular (17 kDa). eIF5A2, isoforma 2, se expresa en testículo y cerebro y su gen se localiza en una región inestable del cromosoma 3 (3q26, Figura 34), que frecuentemente se encuentra amplificada y que explica que esta proteína esté sobreexpresada en muchos tipos de tumores. Ambas isoformas sufren una modificación postraduccional única conocida como hipusinación³²⁸. La hipusina es un derivado de la ruta de las poliaminas, esencial en el metabolismo celular y de creciente interés en cáncer. Se ha descrito la importancia de eIF5A en la traducción de las proteínas con motivos poliprolina, es decir, con más de tres prolinas consecutivas. La presencia de prolinas consecutivas resulta en impedimentos físicos en el ribosoma, como consecuencia del ciclo de la cadena lateral de este aminoácido. En esta función de eIF5A, la hipusinación es esencial. Además de como factor de la traducción, su presencia en el núcleo y el contener dominios de unión a ARNm sugieren una función de transporte y/o regulatoria más allá de la traducción⁵⁰⁶. Todo ello ha suscitado el interés acerca del papel de esta proteína (sobre todo de eIF5A2) en cáncer.

El número de proteínas con dominios con múltiples prolinas consecutivas es minoritario en los organismos. En la Figura 33A se observa cómo en *Homo*

sapiens tan solo hay 182 proteínas con diez prolinas consecutivas (resultados *in silico*). Algunas familias funcionales de proteínas son más ricas en motivos poliprolina. En nuestro trabajo resulta de especial interés la familia de proteínas relacionadas con la organización del citoesqueleto (11% del total de proteínas con poliprolinas en humanos, Figura 33D), sobre todo por su papel en procesos del cáncer como la EMT. El trabajo previo llevado a cabo en nuestro grupo nos permitió identificar a Ezrina y a las forminas como potenciales dianas traduccionales de eIF5A ⁵⁰⁷. En la Figura 33B se observa cómo la adición de GC7, un inhibidor de una de las enzimas de la hipusinación (y que por tanto inhibe a la actividad eIF5A) disminuye la expresión de Ezrina y la formina FMNL1, sugiriendo que su traducción puede resultar inhibida ⁵⁰⁷. Ezrina, junto a radixina y moesina, pertenece a un grupo de proteínas de unión membrana-citoesqueleto (proteínas ERM, por las iniciales de cada una de ellas). También desempeña funciones en las reorganizaciones del citoesqueleto frente a estímulos. En A549 ya ha sido descrita su intervención como regulador de la EMT ⁵⁰⁸. Las forminas, por otro lado, son proteínas de elevado peso molecular que participan en la nucleación de las actinas en la formación del citoesqueleto y que, por tanto, también participan en su reorganización. También poseen motivos poliprolina. Una de nuestras hipótesis de trabajo es que la regulación de la traducción de Ezrina y diversas forminas puede estar mediada por eIF5A, puesto que se ha propuesto que este factor es clave en la traducción de proteínas con motivos poliprolina (Figura 33C), para lo cual la hipusinación sería determinante ³²².

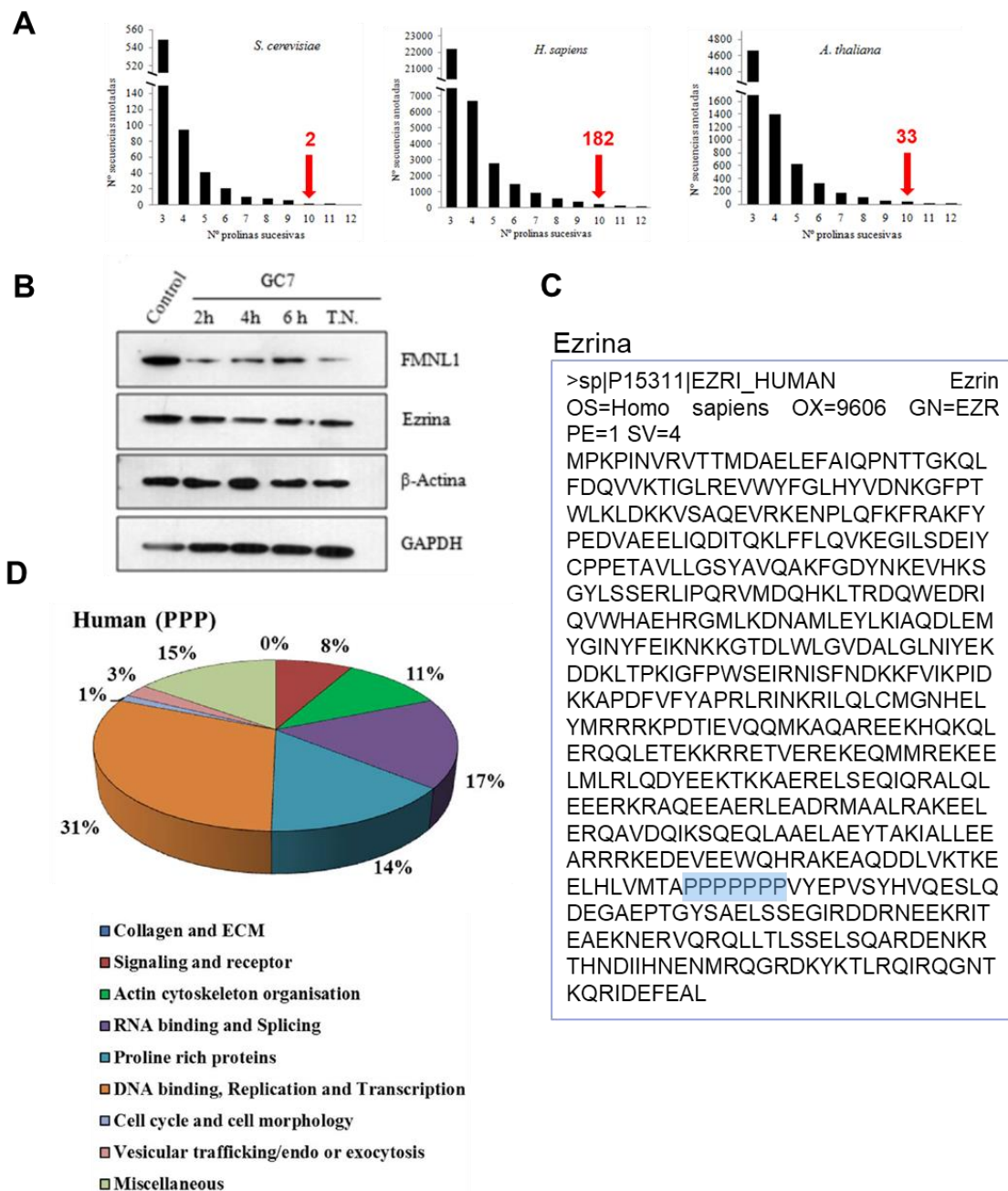


Figura 33. eIF5A, proteínas con motivos poliprolina y citoesqueleto. A) Búsqueda en tres bases de datos (“*Saccharomyces Genome Database*” para levadura ⁵⁰⁹; “*The Protein Information Resource*”, que rastrea la base de datos de UniProt para humano ⁵¹⁰; y “*The Arabidopsis Information Resource*” para Arabidopsis ⁵¹¹) de la cantidad de proteínas con motivos poliprolina en organismos modelo. B) *Western blot* utilizando GC7, que afecta a la hipusinación normal de eIF5A, en células de cáncer de cérvix HeLa, adaptado de Belda-Palazón ⁵⁰⁷. C) Secuencia de aminoácidos de la proteína Ezrina donde se destaca un motivo con 7 prolinas consecutivas. D) Diagrama adaptado de Mandal et al. ³⁴⁶, donde se muestran las familias funcionales de proteínas con motivos poliprolina. Se observa que un 11% son proteínas que participan en la organización del citoesqueleto de actina.

Dada su localización genómica, 3q26, (amplificación del cromosoma 3; Figura 34), una región inestable, y su sobreexpresión en muchos tumores, la isoforma eIF5A2 ha provocado mayor interés en cáncer ^{339,340}. Esta expresión específica de eIF5A2 en cáncer, a menudo asociada a la amplificación del cromosoma 3, y la hipusinación como modificación postraducciona exclusiva de esta proteína ^{328,332}, de la cual hay inhibidores específicos como el GC7 ⁵¹²⁻⁵¹⁵, despiertan el interés en esta proteína como potencial diana terapéutica en cáncer.

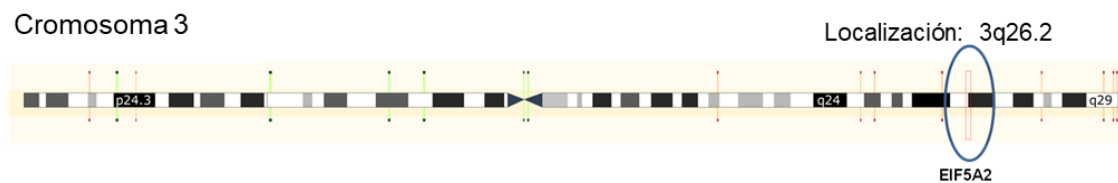


Figura 34. Localización genómica del factor de la traducción eIF5A2. Diagrama del cromosoma 3. Se señala la región 3q26.2, amplificada en muchos tipos de cáncer.

2.2.1. TGF- β induce la expresión de eIF5A en células de CPNM

Para analizar el papel de eIF5A2 en la EMT inducida por TGF- β , este se silenció mediante ARN de interferencia (siEIF5A2) en células A549 tratadas con TGF- β 1. Esperamos que el efecto del silenciamiento de eIF5A2 fuese similar al observado en ensayos preliminares al adicionar GC7 (silenciamiento farmacológico), donde se inhibía la hipusinación y por tanto su actividad.

En la Figura 35B se observa que al tratar las células con TGF- β 1 se induce la expresión de eIF5A2, por lo que podría estar observándose un papel de eIF5A2 en los cambios iniciales de la EMT como consecuencia de la activación de la vía de TGF- β . También se observa la disminución de la expresión de eIF5A2 en células transfectadas con siEIF5A2 y tratadas con TGF- β 1 durante 48 horas.

Además, se observa una disminución de la expresión de la forma FHOD1 y Ezrina, además de una ligera disminución de la expresión de Vimentina al silenciar eIF5A2 y añadir TGF- β 1. Este resultado puede sugerir que la expresión de FHOD1 y Ezrina parece afectada por la inhibición de eIF5A2. Tanto Ezrina

como FHOD1 se han descrito como proteínas importantes en el programa morfológico de la EMT ²⁵⁵.

La disminución con respecto a Vimentina podría estar indicando una relación cronológica de los sucesos en la EMT. Durante el silenciamiento de eIF5A2 estas proteínas podrían no estar sintetizándose apropiadamente, y su papel en los cambios de citoesqueleto que llevan a la formación de adhesiones focales, donde participa Vimentina, todavía no llega a sucederse.

Los cambios fenotípicos que se producen en estas condiciones experimentales se muestran en las imágenes de microscopía de la Figura 35A. Se observa menor número de células cuando se silencia eIF5A2, sugiriendo una menor proliferación celular. Al tratar las células con TGF- β 1, el fenotipo mesenquimal se adquiere más rápidamente en las condiciones control frente a las de silenciamiento. Esto también resulta de interés puesto que, si eIF5A2 es clave en la síntesis de proteínas de citoesqueleto, también podría ser esencial en la división celular y proliferación. De hecho, resultados obtenidos en el laboratorio muestran que el silenciamiento de eIF5A2 altera el citoesqueleto de actina (Figura 35C). Mientras que en las células control se observan las fibras de actina linealizadas, al silenciar eIF5A2 algunas fibras se desordenan y son incapaces de organizarse de manera lineal. Por tanto, la inactivación de eIF5A2 en células cancerosas podría estar inhibiendo la expresión de proteínas relacionadas con el citoesqueleto esenciales para la EMT.

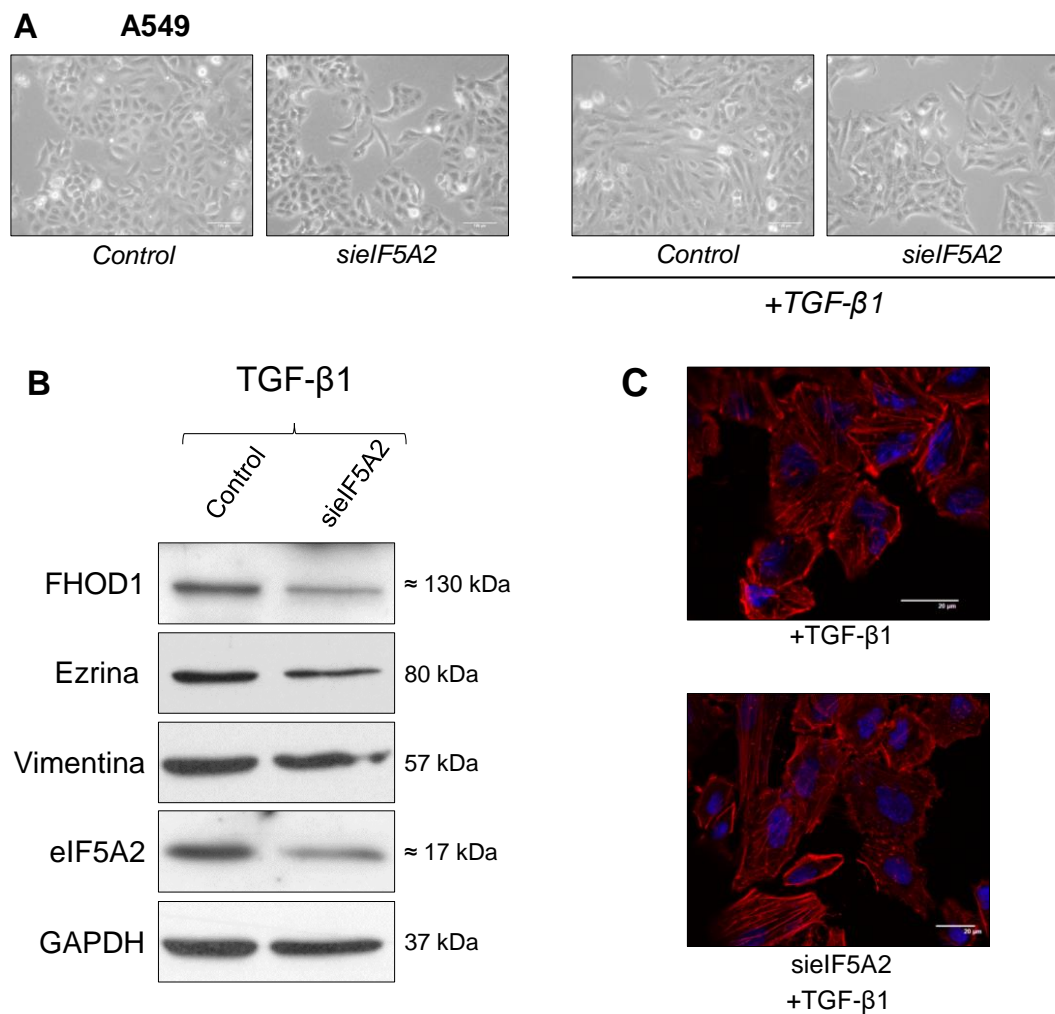


Figura 35. Expresión de marcadores asociados a cambios en citoesqueleto, EMT e invasión local en la línea de CPNM A549 cuando se silencia génicamente el factor eIF5A2, induciendo la EMT con TGF- β 1. A) Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases donde se observa la afectación de la proliferación y de la transición a fenotipo mesenquimal cuando se silencia eIF5A2. Las barras de escala indican 100 μ m. B) Los extractos proteicos de las células silenciadas con eIF5A2 se analizaron por *western blot* con anticuerpos contra FHOD1, Ezrina, Vimentina, eIF5A2 y GAPDH. El silenciamiento de eIF5A2 se mantuvo durante 48 horas. C) Imágenes de microscopía confocal de células tratadas con TGF- β 1 y con eIF5A2 silenciado o sin silenciar. Se observan los núcleos teñidos con DAPI (azul) y el citoesqueleto de actina con rodamina-faloidina (rojo). Las barras de escala indican 20 μ m.

2.2.2. La sobreexpresión transitoria de eIF5A2 induce la expresión de proteínas de citoesqueleto, invasión local y EMT

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de eIF5A2 en CPNM se realizaron ensayos de transfección transitoria de eIF5A2 en cuatro líneas de CPNM (A549, H1395, PC9 y H441) y se analizaron los extractos proteicos de las células a las 24 y 48 horas de la transfección.

En A549 (Figura 36B) se observa un aumento de la hipusina como consecuencia del aumento de eIF5A2. También se observa mayor expresión de Vimentina a las 48 horas de la transfección, por lo que el aumento de eIF5A2 podría estar induciendo la formación de adhesiones focales, y en parte promoviendo el programa morfológico de la EMT. La banda superior sería una forma acetilada de eIF5A2 que se acumula debido a su sobreexpresión. De hecho, también hay un ligero aumento de Ezrina y de la formina FHOD1 a las 48 horas de la transfección. La sobreexpresión de eIF5A2 también induce cambios fenotípicos que se aprecian al microscopio (Figura 36A). Se observa menor número de células y aparición de protrusiones citoplasmáticas en las células que sobreexpresan eIF5A2.

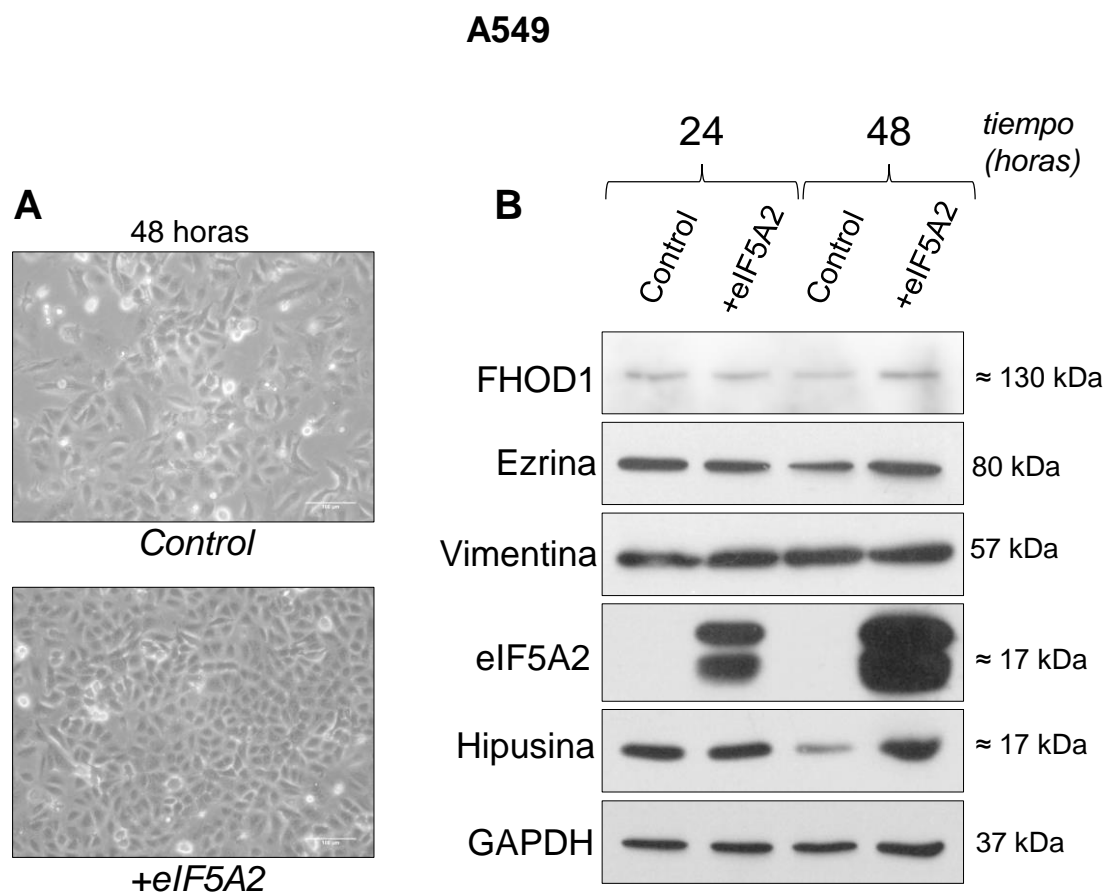


Figura 36. La sobreexpresión de eIF5A2 induce la expresión de proteínas relacionadas con la formación de citoesqueleto, invasión local y EMT en la línea de CPNM A549. A) Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases donde se observa la afectación morfológica al sobreexpresar eIF5A2. Las barras de escala indican 100 µm. B) Los extractos proteicos se analizaron por *western blot* con anticuerpos contra las proteínas indicadas. Los efectos de la sobreexpresión transitoria se evaluaron tras 24 y 48 horas de la transfección y tratamiento con TGF-β1. El anticuerpo empleado frente a eIF5A2 detectó dos bandas correspondientes a eIF5A2 exógeno.

Sin embargo, en la línea H1395 (Figura 37B), que posee un perfil más epitelial, la sobreexpresión de eIF5A2 no es capaz de inducir la expresión de Vimentina. No obstante, sí que hay un ligero aumento en la expresión de Ezrina e hipusina. No se aprecian cambios morfológicos al microscopio (Figura 37A). Esto sugiere que la sobreexpresión de eIF5A2 no sería suficiente para desencadenar los cambios morfológicos de una EMT en esta línea celular epitelial. Cabe destacar que la eficiencia de transfección en esta línea es menor que en otras de las líneas empleadas, como A549.

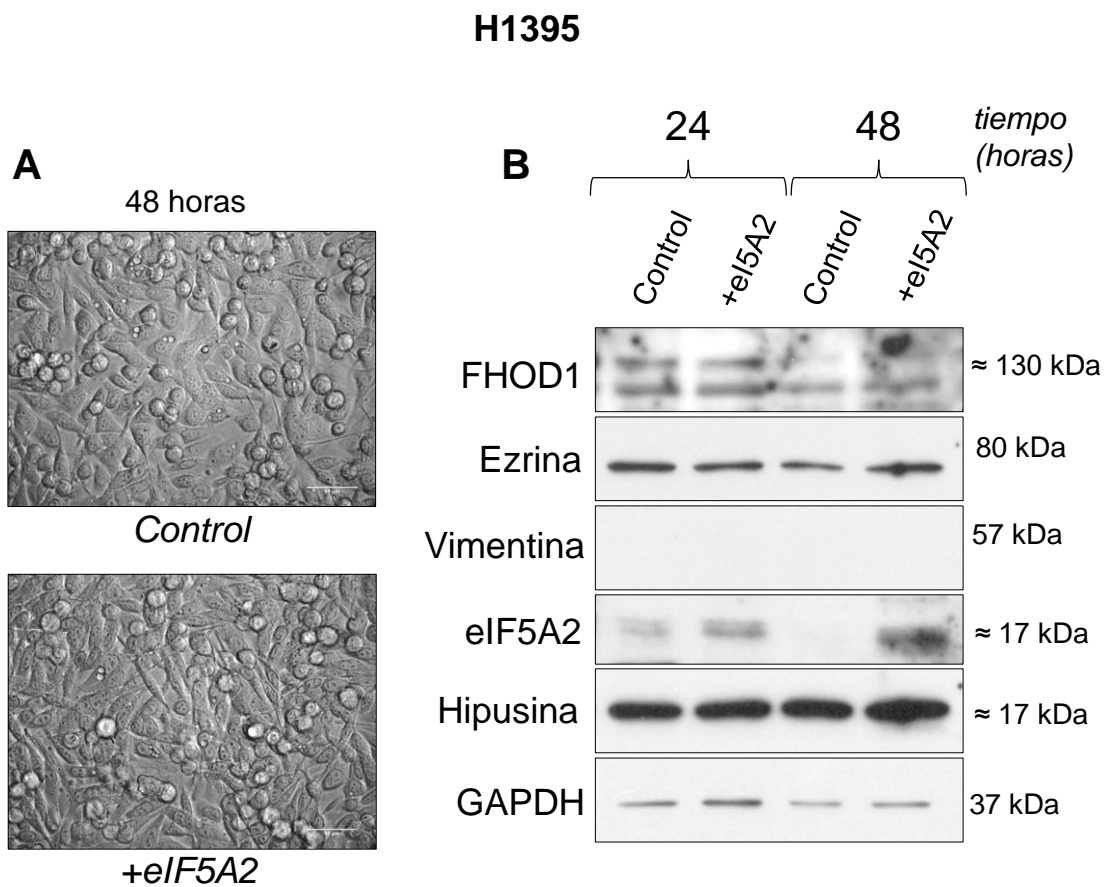


Figura 37. Expresión de marcadores asociados a cambios en citoesqueleto, invasión local y EMT en la línea de CPNM H1395 cuando se sobreexpresa el factor eIF5A2. A) Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases donde se observa la afectación morfológica al sobreexpresar eIF5A2. Magnificación 40x. Las barras de escala indican 50 µm. B) Los extractos proteicos se analizaron por *western blot*. Los efectos de la sobreexpresión transitoria se evalúan tras 24 y 48 horas de la transfección.

Similar a lo observado con H1395 sucede con las células PC9 (Figura 38B). Esta línea celular, al igual que H1395, no expresa Vimentina y se considera una línea con fenotipo epitelial. También hay aumento ligero de Ezrina. No obstante, al microscopio en este caso sí se observa una ligera aparición de protrusiones al sobreexpresar eIF5A2 (Figura 38A).

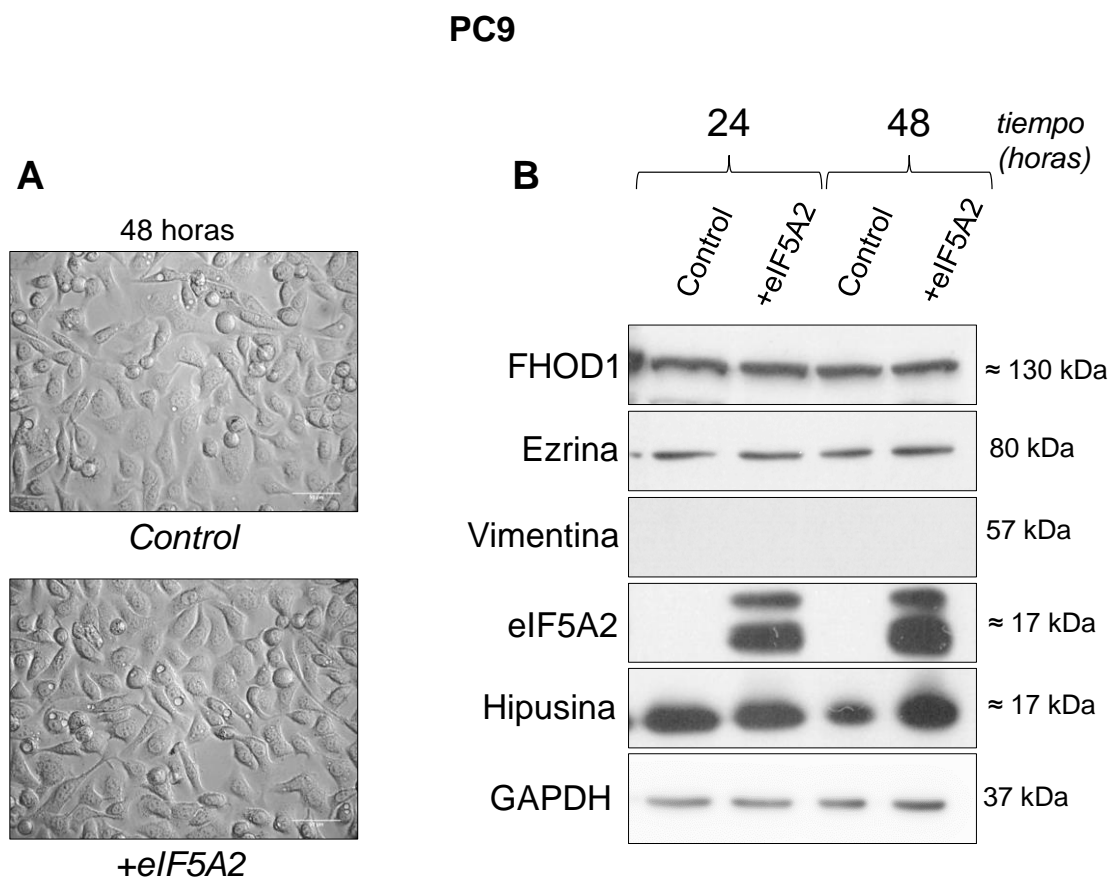


Figura 38. Expresión de marcadores asociados a cambios en citoesqueleto, invasión local y EMT en la línea de CPNM PC9 cuando se sobreexpresa el factor eIF5A2. A) Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases donde se observa la afectación morfológica al sobreexpresar eIF5A2. Magnificación 40x. Las barras de escala indican 50 μ m. B) Los extractos proteicos se analizaron por *western blot*. Los efectos de la sobreexpresión transitoria se evalúan tras 24 y 48 horas de la transfección.

Por último, la línea celular H441, también de fenotipo epitelial, no muestra expresión de Vimentina tampoco al sobreexpresar eIF5A2, aunque sí ligero aumento de FHOD1, Ezrina e Hipusina (Figura 39B). En la Figura 39A se aprecian ligeros cambios fenotípicos en las células con eIF5A2 sobreexpresado.

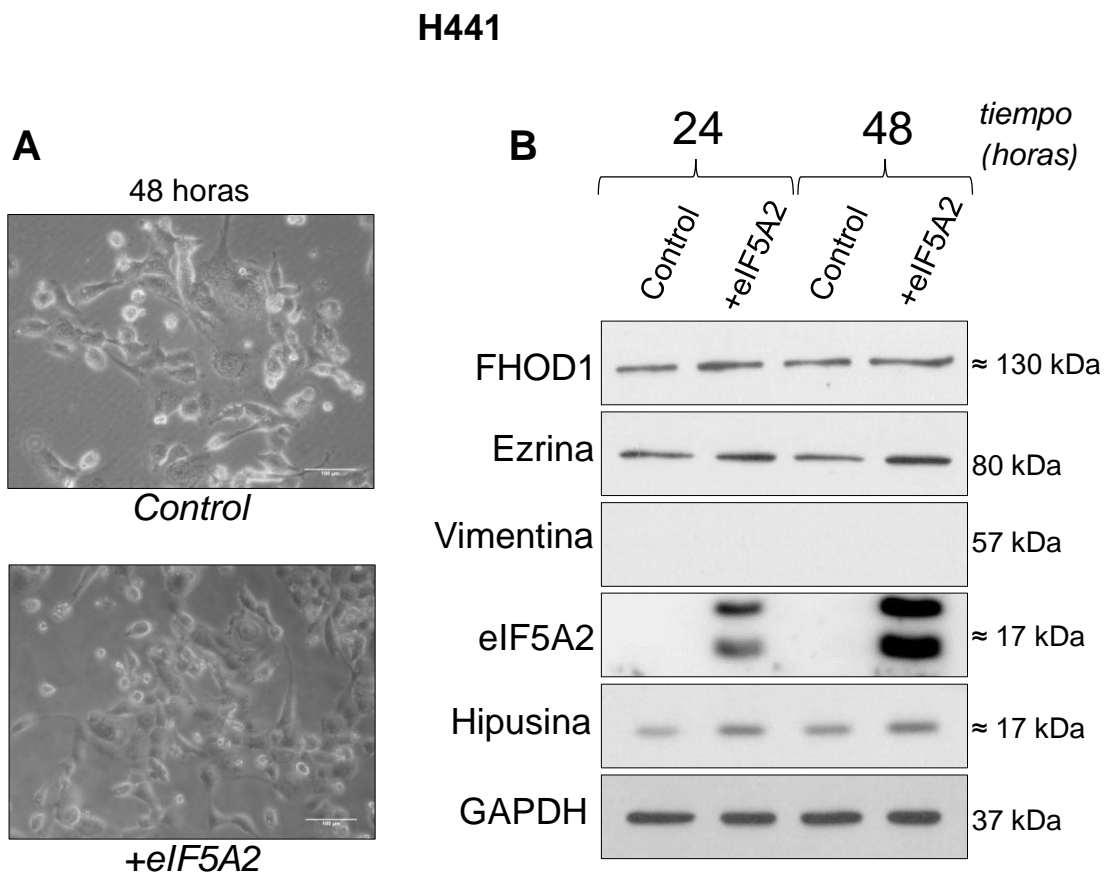


Figura 39. Expresión de marcadores asociados a cambios en citoesqueleto, invasión local y EMT en la línea de CPNM H441 cuando se sobreexpresa el factor eIF5A2. A) Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases donde se observa la afectación morfológica al sobreexpresar eIF5A2. Magnificación 20x. Las barras de escala indican 100 μ m. B) Los extractos proteicos se analizaron por *western blot*. Los efectos de la sobreexpresión transitoria se evalúan tras 24 y 48 horas de la transfección.

Como resumen a los resultados mostrados en este capítulo, observamos que la señalización por TGF- β induce la expresión de eIF5A2, así como sus formas hipusinadas. También se muestra que la sobreexpresión de eIF5A2 induce en algunos casos la expresión de Vimentina, FHOD1 y Ezrina. Esto sugiere que la actividad de eIF5A2 podría tener relevancia en la traducción de proteínas con motivos poliprolina que participan en la reorganización del citoesqueleto y, más concretamente, en la transición epitelio-mesénquima (EMT) en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). Ensayos para evaluar la tasa de síntesis proteicas en células que sobreexpresan estos factores de traducción serían necesarios para confirmar su papel en la traducción de proteínas específicas de EMT.

CAPÍTULO 3

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

El uso de modelos animales para el estudio de enfermedades humanas es esencial en la investigación biomédica, siendo de especial utilidad en el análisis patogénico y el diseño y validación preclínica de nuevas terapias. En los últimos años se ha desarrollado toda una tecnología de generación de ratones para la propagación de un tumor humano en ratón inmunodeficiente, conocido como modelo de xenotrasplantes derivados de paciente (*Patient-derived xenografts*, PDX). Estos modelos experimentales están adquiriendo gran relevancia como modelo preclínico y de desarrollo de nuevas terapias en cáncer, ya que retienen en gran medida las características histológicas y genéticas del tumor original y que éstas permanecen estables tras varios pases^{414,415,418,516}. El hecho de amplificar el tejido tumoral del paciente en varios ratones y analizarlo a diferentes tiempos, de manera relativamente rápida, permite una mejor comprensión de los cambios moleculares que impulsan la metástasis y la resistencia a las terapias. Por ello, este modelo puede utilizarse como un sistema *in vivo* para ensayos de eficacia de compuestos con actividad antitumoral, para orientar en el diseño de un tratamiento personalizado, o para la identificación de biomarcadores.

El uso de un ratón PDX permite también diseñar protocolos terapéuticos personalizados, y la identificación de biomarcadores de eficacia o resistencia a dichos tratamientos. Asimismo, la disponibilidad de un tumor humano creciendo en un modelo animal posibilita estudios adicionales sobre su caracterización genética, “ómica”, histológica, y su patología molecular, así como el tratamiento bioinformático de los resultados.

3.1. Esquema del modelo experimental PDX de CPNM

Esta aproximación experimental consiste en la generación de un modelo animal que funciona a modo de avatar del paciente. Para ello, una muestra fresca del tumor de CPNM, de entre 2-3 mm³, se trasplanta a un ratón inmunodeficiente, lo que permite la propagación del tumor sin necesidad de manipulación de las células en cultivo, y el estudio y caracterización de la evolución del tumor que se genera. Una vez implantado el tejido tumoral se realiza el seguimiento del crecimiento del tumor en el ratón dos veces por semana mediante medición de su tamaño con un pie de rey, hasta el momento del sacrificio. El ratón se sacrifica, según los criterios del Comité de Ética del CIPF, por pérdida de peso o por crecimiento del tumor superior a 15 mm de diámetro. Una vez llevado a cabo, se disecciona el ratón y se obtiene el tumor generado. Una porción del tumor se separa para implantación directa en un nuevo ratón inmunodeprimido, lo que supone un pase acumulado en el modelo de PDX. De esta manera, se puede estudiar cómo progresa el tumor en las condiciones fisiológicas del huésped.

Pequeñas porciones de cada tumor se congelan con nitrógeno líquido (para extracción de ADN genómico y para extracción de ARN) y también se fijan con formalina (para estudios histológicos). Con el resto de la muestra se procede a su disgregación para establecer cultivo celular (Figura 40).

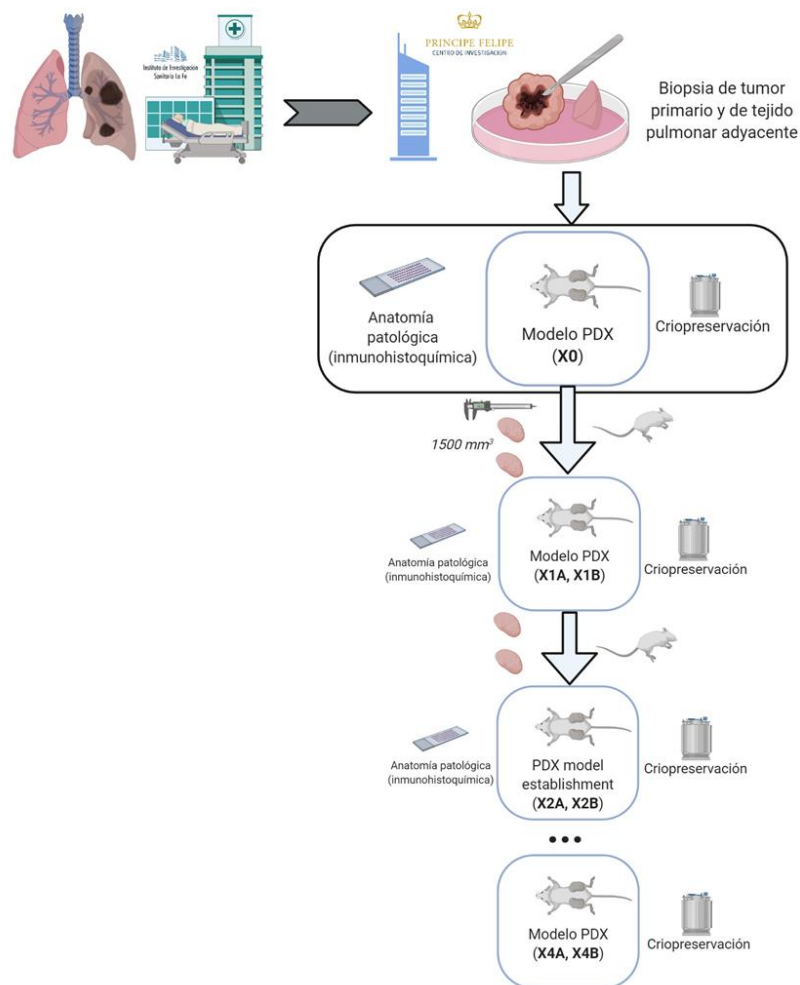


Figura 40. Diagrama de flujo de trabajo de la generación del modelo *in vivo* PDX. El análisis inmunohistoquímico es efectuado sobre tejido pulmonar normal adyacente al tumor, sobre el tumor primario y sobre los pasajes de PDX. La primera implantación de tumor se denomina X0 y los pasajes sucesivos son numerados (X1, X2...). *PDX: xenoinjerto derivado de paciente. Creado con Biorender.com.*

Es esencial conocer la anatomía patológica y las características moleculares del tumor primario y de los tumores PDX para corroborar que el modelo experimental preserva las características del tumor original, o si (como ocurre en algunos casos) se produce algún tipo de evolución.

3.2. Generación de una colección de xenotrasplantes derivados de pacientes con CPNM

En el laboratorio hemos establecido un protocolo de trabajo en colaboración con el Servicio de Cirugía Torácica y Anatomía Patológica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe para recibir muestras de tumor de CPNM recién resecado de pacientes *6.3.1. Selección de pacientes y recogida de muestras*, Material y métodos. Durante el período de este proyecto de investigación se han implantado 33 tumores de CPNM y 9 han generado tumor, siendo la tasa de éxito de un 27,3%. En la Tabla 9 (Material y métodos) se recogen las características clínico-patológicas de los pacientes: número de muestra, código de paciente, sexo, edad en momento de diagnóstico, estadio, histología del tumor, tabaquismo, progresión o recuperación de la enfermedad, estatus mutacional de *EGFR*, estatus mutacional de *ALK*, tiempo de seguimiento del paciente y si ha formado PDX el tumor al implantar en ratón.

La última fecha de control para el seguimiento de los pacientes fue el 27/2/2021. De esta manera, el tiempo medio de seguimiento fue de 32,15 meses, y la mediana de este seguimiento de 37,4 meses [rango: 0,6-53,37 meses]. La edad media de los pacientes participantes fue de 68,3 años y la mediana de 71 años [rango: 42-87 años]. De los 33 participantes, 24 eran hombres (73%) y 9 mujeres (27%). La amplia mayoría tenían algún subtipo de adenocarcinoma (ADC): 28 de 33 casos (el 85%). Esto coincide con la representatividad en la población total, donde el ADC es el tipo de CPNM más presente. Y casi la totalidad, 32 casos, fueron diagnosticados con algún tipo de CPNM, frente a solo uno que era un cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP). Dentro de los ADC, a su vez, hay diferentes subtipos como ADC sólido, acinar o mucinoso lepidico. Un 73% eran fumadores o exfumadores (24 de 33 pacientes). La mayoría de los pacientes fueron diagnosticados en estadio tempranos de la enfermedad (I, II), concretamente un 73%: 14 casos en estadio I y 10 casos en estadio II. De los 9 diagnosticados en estadios más avanzados, 6 lo fueron en estadio III y 3 en estadio IV. A pesar de que el CPNM es un tumor usualmente diagnosticado en estadios tardíos, en este estudio han participado pacientes que todavía pueden recibir cirugía y, por tanto, la mayoría todavía se encuentran en estadios I-II de

la enfermedad. Los pertenecientes a estadios no precoces (III-IV) fueron intervenidos por criterio médico, ya que solo había un foco de metástasis, o por hallazgo de nuevos ganglios linfáticos invadidos en el momento de la cirugía (N2 oculto). La supervivencia del conjunto es de un 60,6%, con 20 pacientes que han superado la enfermedad y 13 que recayeron o fallecieron durante el seguimiento. El porcentaje de éxito en la implantación fue del 27,3%, con 9 muestras que generaron PDX de las 33. Este porcentaje es similar a otras colecciones de PDX en cáncer de pulmón establecidas por otros investigadores, e inferior en algunos casos ^{425,517}. En la Figura 41 se muestran diagramas visuales de la distribución de las variables clínico-patológicas en el conjunto de pacientes de los que se procesaron muestras.

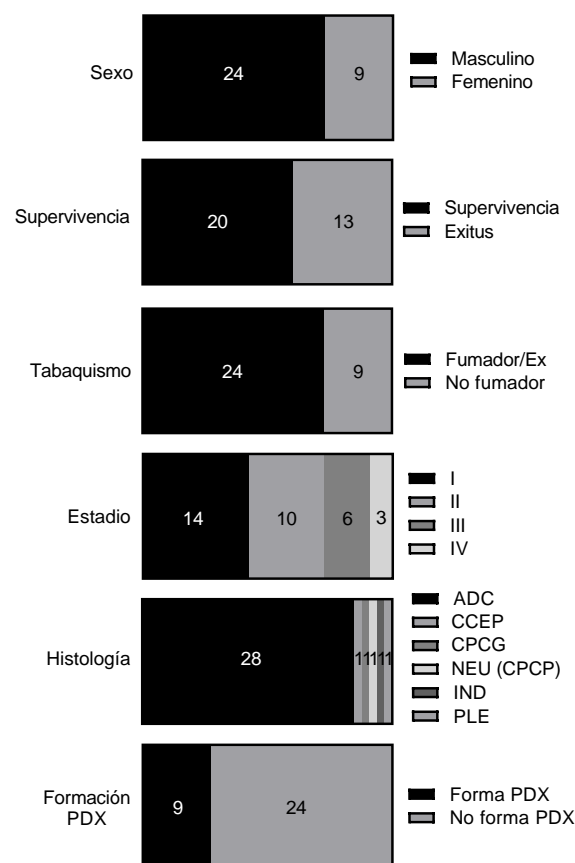
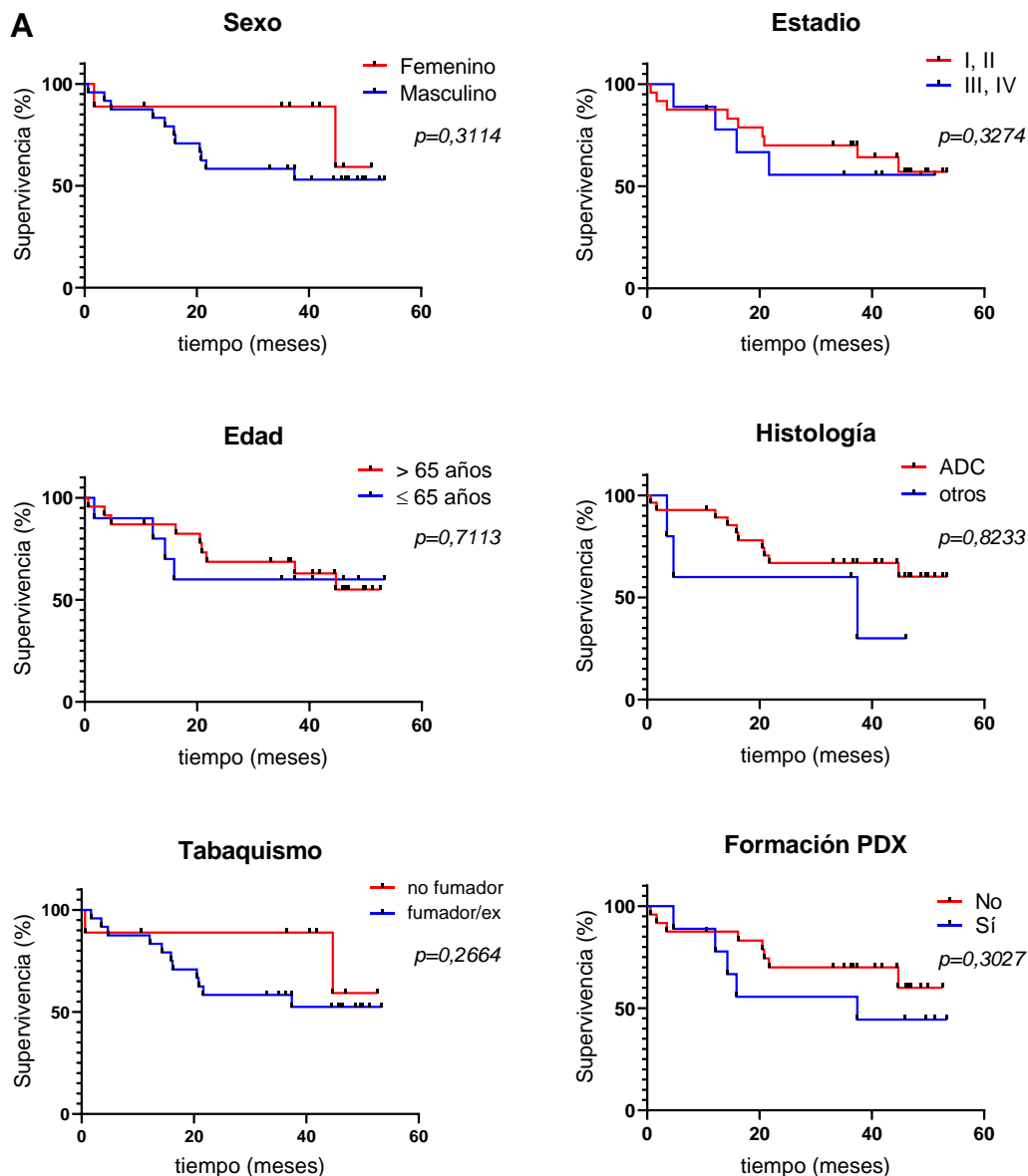


Figura 41. Características clínico-patológicas de los pacientes. ADC, fumadores/exfumadores y hombres están más representados en nuestro estudio. ADC: adenocarcinoma; CCEP: carcinoma escamoso; CPCG: carcinoma de células grandes; NEU: carcinoma neuroendocrino; CPCP: carcinoma de células pequeñas; IND: tumor indiferenciado; PLE: carcinoma pleomórfico con mínimo adenocarcinoma; PDX: xenoinjertos derivados de paciente.

3.2.1. Análisis de la supervivencia de los pacientes en función de las variables clínico-patológicas

De los 33 pacientes que participaron en el estudio, en la fecha de cierre para análisis, 20 habían sobrevivido, es decir, el 60,6%. Las variables clínico-patológicas introducidas en el apartado anterior deben evaluarse según su prognosis, es decir, la correlación entre ellas y una menor o mayor supervivencia de cada paciente. El método de regresión de Mantel-Cox para la supervivencia libre de enfermedad (SLE), también conocido como test logrank, permite analizar la función de supervivencia de dos poblaciones y trabajar con datos censurados (datos cuyo valor es una observación parcial, puesto que el estudio tiene una fecha final y no se prosigue el seguimiento con pacientes supervivientes). Las curvas de supervivencia o curvas de Kaplan-Meier permiten visualizar las diferencias en la supervivencia en función de cada variable (Figura 42A). No obstante, los resultados del test logrank no mostraron significación estadística entre las alternativas de cada variable y la supervivencia. En la Figura 42B se recogen estos resultados, en forma de Hazard Ratio (HR) o tasa de riesgo e intervalo de confianza (al 95%). El p-valor es incluido en cada gráfica de la Figura 42A. El HR indica la probabilidad de que se dé un evento de recaída del cáncer o exitus (frente a que no se dé) para cada caso, según la variable clínica del paciente correspondiente (sexo, estadio, edad, histología, tabaquismo y formación de PDX). La falta de significación estadística es debida probablemente al bajo número de muestras empleadas en la población. A pesar de ello, se observan tendencias en algunas variables, sugiriendo que los hombres y pacientes fumadores o exfumadores tienen peor supervivencia que el resto de los pacientes. Por otro lado, los pacientes con ADC parecen tener mejor pronóstico. También se evidencia una conexión entre la peor supervivencia y el éxito en la implantación de los PDX, algo que se observará mejor en el siguiente apartado.



B

	Supervivencia	
	Hazard Ratio	IC (95%)
Sexo (masculino vs femenino)	2,14	0,63-7,17
Estadio (I, II vs III, IV)	0,8	0,23-2,76
Edad (>65 años vs ≤65 años)	0,88	0,26-2,94
Histología (ADC vs otros)	0,49	0,1-2,49
Tabaquismo (fumador/ex vs no fumador)	2,16	0,65-7,23
Formación de PDX (sí vs no)	1,73	0,51-5,92

Figura 42. Curvas de supervivencia acorde a las variables clínico-patológicas de los pacientes. A) Curvas de Kaplan-Meier, donde se muestra la probabilidad de supervivencia (expresada en porcentaje) a lo largo del tiempo. Las variables contrastadas son sexo, estadio, edad, histología, tabaquismo y formación de PDX. B) Resultados del test logrank (prueba de Mantel-Cox) según la supervivencia para las diferentes variables. ADC: adenocarcinoma. IC: intervalo de confianza. p : p -valor.

3.2.2. Análisis del éxito de implantación de PDX y correlación con variables clínico-patológicas

Además de la supervivencia, con la intención de generar un modelo experimental *in vivo* de evolución del cáncer de pulmón, es decir, xenotrasplantar las muestras de los pacientes en ratón y observar cuáles se desarrollan, para reimplantarlas en sucesivos pases (PDX), también interesa evaluar la posible correlación de las distintas variables clínicas con el éxito en la implantación y crecimiento de los PDX.

Una primera aproximación es mostrar el porcentaje de PDX generados para cada una de las variables en función del número de muestras implantadas (Tabla 11). Cabe destacar el éxito de implantación de muestras de pacientes de 65 años o menos (40%), en consonancia con la plasticidad esperable de muestras de pacientes más jóvenes y con su adaptabilidad a un nuevo ambiente como es la fisiología murina. También se observa una aparente correlación entre lo avanzado del tumor en el momento del diagnóstico y su éxito en la implantación, con un 66,7% en estadio IV frente al 21,43% del estadio I. Tumores derivados de hombres implantan mejor (33,3%). Por otro lado, también se observa cómo el tamaño de las biopsias originales del tumor primario influyen en el éxito posterior al xenotrasplantar, con tamaños intermedios (25-100 mm³) con mejor porcentaje (37,5%). Las biopsias recibidas de tamaño inferior a 25 mm³ presentan un porcentaje de implantación menor, del 27,3% (solo hay una superior a 100 mm³ y no se puede tener en consideración). Este resultado parcial es razonable, ya que porciones más pequeñas pueden contener menos células tumorales viables suficientes para desarrollar un xenotrasplante.

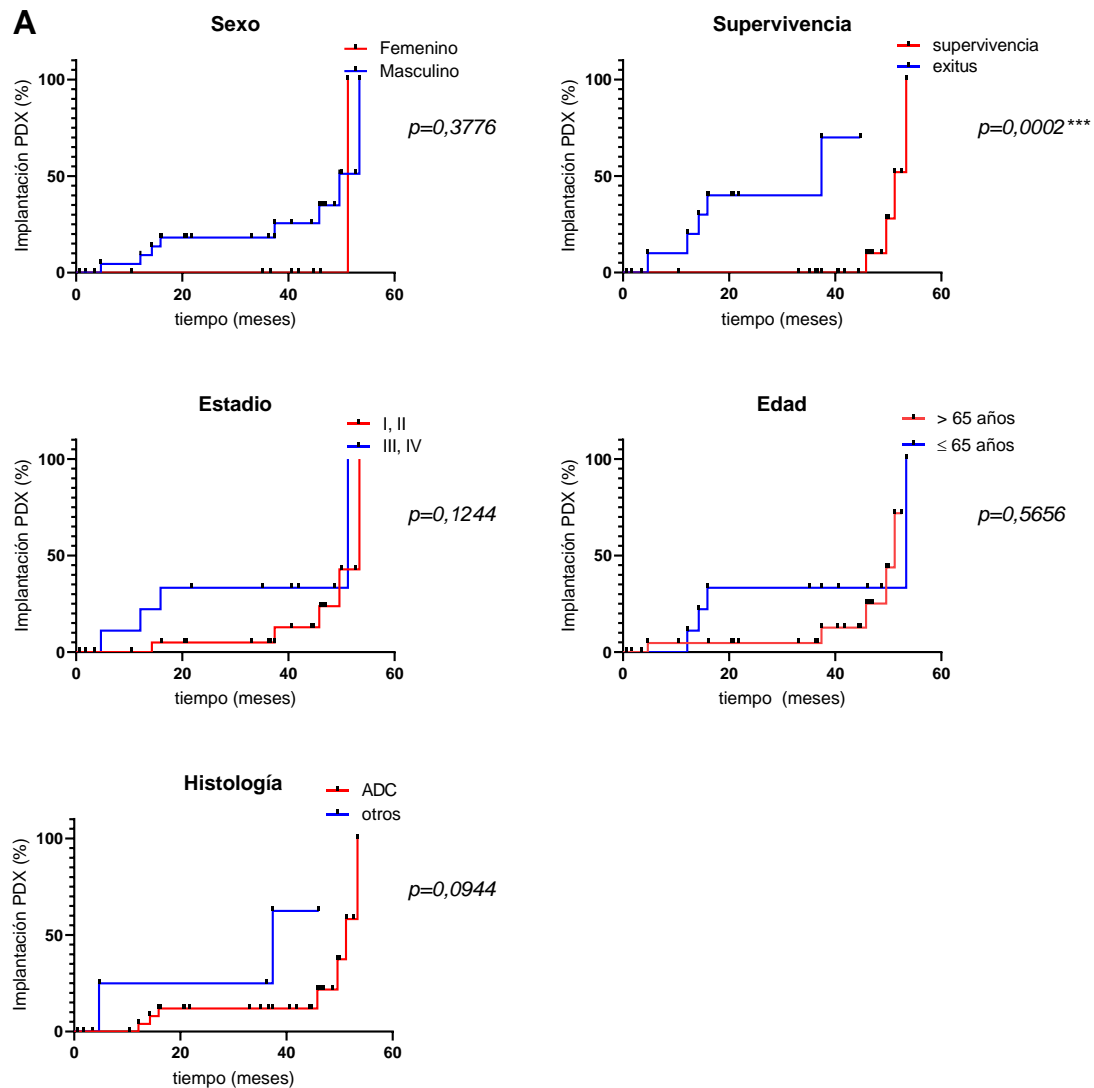
Tabla 11. Éxito en la implantación y desarrollo de PDX acorde a distintas variables clínico-patológicas de los pacientes. El éxito de implantación para cada caso se expresa en porcentaje. Para las variables Estadio e Histología se efectúan dos agrupaciones distintas de los datos. En estadio I, II, III, IV, y también temprano (I-II) frente a tardío (III-IV). En Histología, por un lado, se muestran todos los subtipos, mientras que en otro se comparan adenocarcinoma frente al resto. *PDX: xenoinjertos derivados de pacientes. ADC: adenocarcinoma. CPCP: carcinoma pulmonar de células pequeñas. CPCG: carcinoma pulmonar de células grandes. CCEP: carcinoma de células escamosas de pulmón.*

		Muestras implantadas (n°)	Formación PDX (n°)	Éxito formación PDX (%)
Edad (años)	≤ 65	10	4	40
	> 65	23	5	21,74
Sexo	Masculino	24	8	33,33
	Femenino	9	1	11,11
Estadio	I	14	3	21,43
	II	10	2	20
	III	6	2	33,33
	IV	3	2	66,67
	I, II	24	5	20,83
	III, IV	9	4	44,44
Histología	ADC, adenoescamoso	28	7	25
	CPCG	1	0	-
	CPCP (neuroendocrino)	1	1	100
	Carcinoma pleomórfico	1	0	-
	Tumor indiferenciado	1	0	-
	CCEP	1	1	100
	ADC, adenoescamoso	28	7	25
	Otros	5	2	40
Tamaño de la biopsia de tumor primario (mm³)	<25	5	0	-
	≥25<50	16	6	37,50
	≥50<100	11	3	27,27
	≥100	1	0	-

Al poner el foco en la generación de xenoinjertos derivados de paciente (PDX) como modelo *in vivo* para el estudio del pronóstico y evolución del CPNM, se ha de considerar el éxito en la implantación de los PDX como una variable independiente a comparar con el resto de los rasgos clínico-patológicos. Por ello, de igual manera a como se había efectuado con los análisis de supervivencia, se realizó un test logrank con respecto a los eventos de implantación de PDX. Las curvas de incidencia acumulada son inversas a las curvas de Kaplan-Meier, e indican el número de sucesos nuevos acontecidos para cada variable durante el periodo de seguimiento (Figura 43A). En el caso de la variable supervivencia/exitus, se puede observar cómo muestras derivadas de pacientes

que acabaron falleciendo proliferan en ratón, y además son casos que se asocian a un desarrollo más rápido de la enfermedad. De las 9 muestras que desarrollaron con éxito PDX, 4 proceden de pacientes que al concluir el tiempo de seguimiento habían superado la enfermedad (44,4%). Este porcentaje es notablemente inferior al de los pacientes supervivientes de las muestras que no implantaron PDX (66,7%, 16 muestras de 24). En la Figura 43B aparece el Hazard Ratio (tasa de riesgo) al efectuar el test logrank. En ella se confirman las diferencias observadas en cuanto a la supervivencia de pacientes que implantaron PDX (HR: 7,11; IC: 1,14-44,44; $p=0,0002^{***}$). Esto demuestra que existe una correlación entre los pacientes que fallecen a causa de la enfermedad y el éxito en la implantación en ratones de los tumores derivados de ellos, a su vez potencialmente asociado a la progresión y agresividad del tumor primario.

Aunque no se confirma con significación estadística (HR: 0,29; IC: 0,03-3,39; $p\text{-valor}=0,0944$), con respecto a la histología se observa que otros subtipos histológicos distintos al predominante, el adenocarcinoma (ADC, 28 de 32 muestras de CPNM), generan PDX con mayor probabilidad en este estudio a pesar de su poca representación en la colección. Así pues, el adenocarcinoma se desarrolla más lentamente que otros tipos como el escamoso o el neuroendocrino, y además estos, casi no representados en la colección, generan PDX con mayor probabilidad. De toda la colección, 7 ADC, 1 CCEP y 1 CPCP implantan con éxito en ratón. Por otro lado, todos los PDX crecidos proceden de muestras de fumadores o exfumadores, por ello no hay comparativa posible a este respecto.



B

	Implantación y desarrollo de PDX	
	Hazard Ratio	IC (95%)
Sexo (masculino vs femenino)	2,42	0,52-11,37
Supervivencia (exitus vs supervivencia)	7,11	1,14-44,44
Estadio (I, II vs III, IV)	0,38	0,08-1,78
Edad (>65 años vs ≤65 años)	0,71	0,18-2,78
Histología (ADC vs otros)	0,29	0,03-3,39

Figura 43. Curvas de incidencia acumulada del éxito en la implantación de los xenotrasplantes acorde a las variables clínico-patológicas de los pacientes. A) Curvas de Kaplan-Meier inversas. La incidencia acumulada se expresa en porcentaje, siendo la probabilidad de que se dé un evento de implantación de PDX a lo largo del tiempo. Las variables contrastadas son sexo, supervivencia, estadio, edad e histología. **B)** Resultados del test logrank según la implantación de PDX para las diferentes variables. ADC: adenocarcinoma. IC: intervalo de confianza. *p*: *p*-valor.

3.2.3. Secuenciación de los PDX mediante panel Oncomine® Focus Assay y análisis de mutaciones de interés

El panel de secuenciación Oncomine® Focus Assay (Thermo Fisher Scientific®) permite el análisis de ADN y ARN, secuenciando 35 genes *hotspot*, 19 genes asociados a variaciones de número de copia (CNV) y 23 genes de fusión. Se realizó este ensayo con los tumores primarios que se desarrollaron con éxito en el modelo *in vivo* generando PDX. Esto se suma al análisis de mutaciones y reordenamientos clave en cáncer de pulmón, *EGFR* y *ALK/ROS1*, mostradas en la Tabla 9 y efectuadas sobre todas las muestras en el Servicio de Anatomía Patológica del hospital. De ellas, solo se detectó LF30 como mutante *EGFR*, y esta muestra no está entre las que desarrollan PDX. El análisis de las alteraciones genéticas por secuenciación masiva de los tumores primarios que generaron PDX permitió identificar la mutación *KRAS* G12C (reemplazo de glicina por cisteína) en las muestras de ADC LF05, LF09 y LF15, asociando estas mutaciones al éxito en el injerto del PDX. Esta modificación frecuentemente es observada en distintos tipos de cáncer, y afecta a la funcionalidad de la región C terminal de *KRAS*⁵¹⁸, especialmente en cáncer de pulmón⁵¹⁹. En CPNM se ha asociado también a peor pronóstico y quimiorresistencia y, en el caso de estudios con PDX, se ha observado una mejor implantación y mayor crecimiento en mutantes *KRAS*^{520–522}. La muestra LF15 también albergaba la mutación V842I (reemplazo de valina por isoleucina) en *ERBB2*, que codifica para uno de los miembros de la familia de receptores de *EGFR*, receptores tirosina quinasa cuyas mutaciones suelen ser patogénicas. En este caso, esta no está descrita en cáncer de pulmón pero sí es considerada patogénica en tumores gástricos, de mama y colorrectales⁵²³. La muestra LF29, ADC sólido indiferenciado, portaba la mutación T1010I (reemplazo de treonina por isoleucina) en el gen de *MET*, receptor de tirosina quinasa considerado protooncogén. Esta mutación es asociada por algunos autores al cáncer de pulmón familiar⁵²⁴, mientras que otros cuestionan su patogenicidad^{525–527}. La única mutación detectada en LF01, ADC acinar, es *ERBB4*, otro de los receptores de *EGFR*, y consiste en una sustitución de leucina por fenilalanina (L713F). Este cambio aminoacídico no ha sido descrito como oncogénico, acorde a la base de datos COSMIC (*the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*)⁵²⁸. Dos mutaciones fueron detectadas en la

muestra de ADC acinar LF20. Una de ellas también en *ERBB2*, pero diferente a la detectada en LF15: reemplazo de isoleucina por metionina (I767M). I767M, aunque no se ha descrito como oncogénica, ha sido estudiada en cáncer de mama y parece sensible a fármacos anti-*ERBB2* convencionales^{529,530}. La otra mutación detectada en LF20 fue en *MYC*, fosfoproteína nuclear que actúa en ciclo celular y apoptosis. Este cambio de asparagina por serina (N26S), aunque también se ha asociado a cáncer de mama⁵³¹, se ha diagnosticado más en linfomas⁵³², cáncer de próstata⁵³³ y de pulmón⁵³⁴. Todas estas alteraciones podrían estar contribuyendo también al éxito en la implantación de los xenotrasplantes en ratón.

Tabla 12. Resultados del panel de secuenciación Oncomine® Focus Assay sobre los tumores que generaron PDX. La tabla muestra las mutaciones somáticas identificadas.

Número muestra	Código paciente	Panel secuenciación masiva (Oncomine™ Focus Assay)
#1	LF01	ERBB4 c.2139G>T; p.(L713F) 9% frecuencia alélica
#4	LF05	KRAS c.34G>T; p.(G12C) 67% frecuencia alélica
#8	LF09	KRAS c.34G>T; p.(G12C) 7% frecuencia alélica
#12	LF15	KRAS c.34G>T; p.(G12C) 32% frecuencia alélica ERBB2 c.2524G>A; p.(V842I) 4% frecuencia alélica
#17	LF20	ERBB2 c.2301C>G; p.(I767M) MYC c.77A>G; p.(N26S)
#26	LF29	MET c.3029 C>T; p.(T1010I)

3.2.4. Curvas de crecimiento de los tumores implantados en ratón

Los PDX de tumores fueron trasplantados en 4 pases secuenciales en ratón además del xenoinjerto original. Una primera evaluación de la agresividad y malignidad del tumor *in vivo* se realiza por la proliferación del mismo en el

modelo de ratón ⁵³⁵. El cálculo del volumen se efectúa a través de la fórmula $(D \times d^2)/2$, descrita en la literatura ⁵³⁶ donde D es el largo del implante tumoral y d el ancho del mismo, medidos utilizando un pie de rey. De acuerdo a la clasificación histológica de las muestras que desarrollaron tumores en ratón con éxito, LF22 no fue incluido en ensayos posteriores ya que no pertenecía a ningún subtipo de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), sino que se trataba de un carcinoma neuroendocrino, un tipo de cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP o SCLC, *small cell lung cancer*). De las 8 muestras de CPNM implantadas con éxito en ratón se analizó la tasa de crecimiento y el tiempo de latencia, es decir, el tiempo en el cual el crecimiento del tumor empieza a apreciarse (coincidente con la primera medida efectuada). En la Figura 44 se representan las curvas de crecimiento de los tumores de estos ocho PDX de CPNM generados y sus posteriores pases.

Se observó que el tiempo medio de latencia (MLT, *Median latency time*) del implante del tumor primario (X0) de 7 de las 8 era de muestras era de 50,14 días (SD: 25,95 días). El tumor restante, el ADC acinar LF19, mostraba un tiempo de latencia mucho mayor en X0: 321 días. En 5 de las 7 muestras de ADC (LF01, LF05, LF19, LF20, LF29), el pase con el mayor tiempo de latencia, es decir, el pase más lento, era el primero (X0). Esto sugiere que, dado que este pase corresponde al implante del tumor primario, necesita más tiempo para adaptarse al ambiente murino. Teniendo en consideración las 8 muestras, los MLT de los pases siguientes al X0 eran considerablemente menores: en X1 es 31,25 días (SD: 16,21); en X2 es 25,5 días (SD: 14,47); en X3 es 26,5 días (SD: 11,86); en X4 es 21,63 días (SD: 9,67). Esta disminución del MLT pase tras pase muestra la capacidad adquirida por los tumores de CPNM para colonizar nuevos tejidos, sugiriendo una progresiva adaptación de las células al modelo *in vivo* y mayor tumorigenicidad. Además, la muestra LF19, con el mayor MLT en el primer pase, también redujo considerablemente el tiempo de latencia en los siguientes pases, pasando de 321 días en X0 a 32 días en X1, 28 días en X2, 21 días en X3 y 18 días en X4. La muestra LF21, que es el único carcinoma escamoso de pulmón (CCEP), mostraba el tiempo de latencia más corto para X0: 19 días. La mayor velocidad en la primera implantación de los tumores escamosos de pulmón ya ha sido observada por otros autores. ^{422,423}.

Si se establece la comparativa por subtipos de adenocarcinoma, los ADC sólidos (LF05, LF15, LF29) muestran un MLT inferior en todos sus pases (28,53 días; SD: 18,36) al de los ADC acinares sin considerar a LF19 (LF01, LF20; 41,8 días; SD: 24,26). Esto correlaciona con la mayor capacidad de los tumores sólidos de adaptarse a la fisiología del ratón en comparación a otras arquitecturas tumorales no sólidas, como los ADC acinares. El único ADC mucinoso lepidico, LF09, posee un MLT para todos los pases de 23,4 días (SD: 8,85 días), y el único no ADC (LF21, carcinoma escamoso, CCEP) tiene un MLT de todos sus pases de 25,6 días (SD: 9,45). Estos valores son similares al MLT de los ADC sólidos arriba comentado: 28,53 días. Esto coincide con la mejor capacidad de los tumores sólidos para adaptarse a nuevos entornos frente la mayor dificultad de los tumores no sólidos ^{422,423}, y también se observa en los resultados de inmunohistoquímica descriptiva que serán mostrados más adelante.

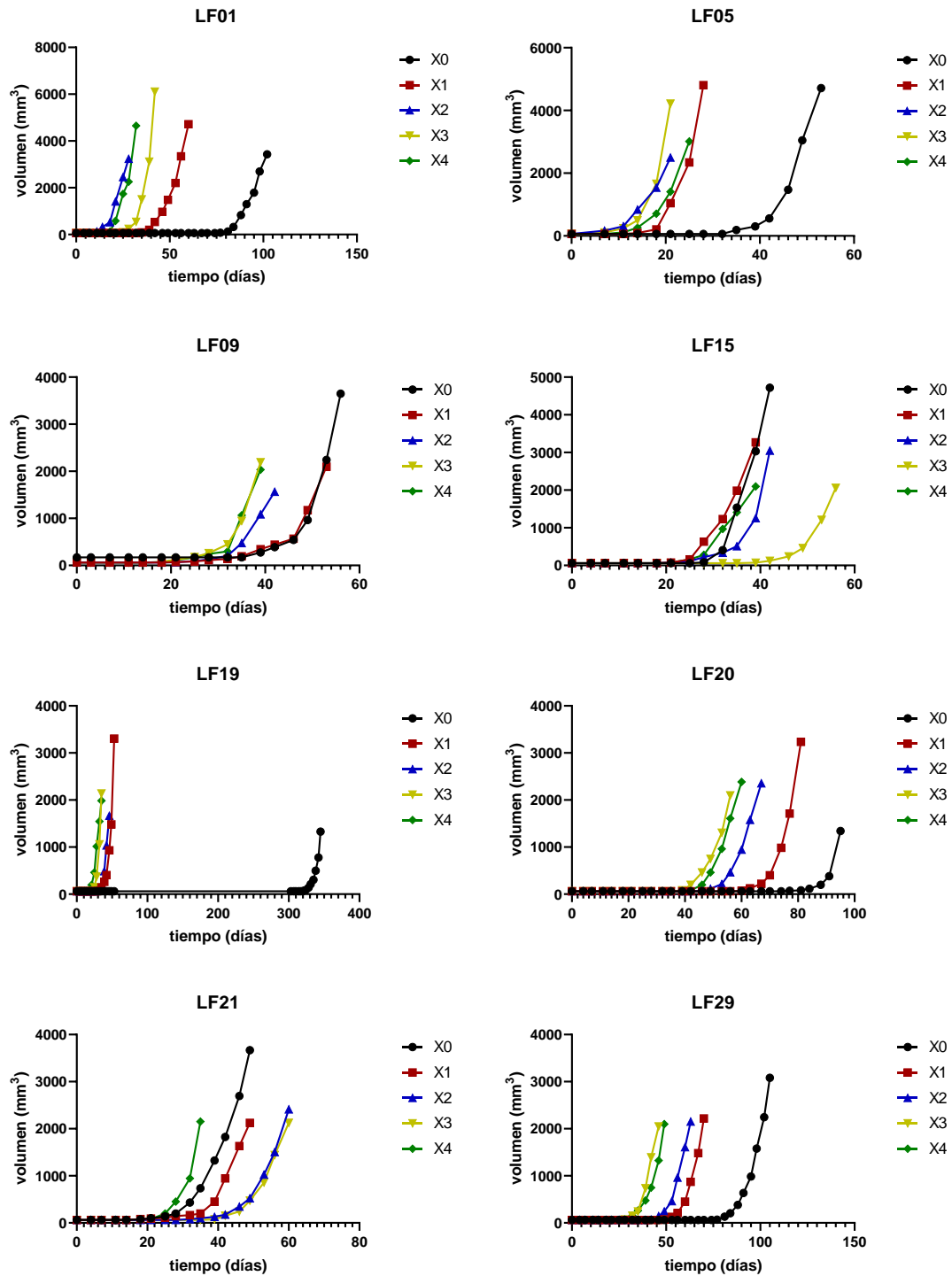


Figura 44. Curvas de crecimiento de los PDX en ratón. Se muestra el volumen (mm³) a lo largo del tiempo (días) de los pases X0 (implantación del tumor primario en ratón) a X4 (último pase de PDX). (representado como volumen (mm³) a lo largo del tiempo (días) de las muestras derivadas de LF01, LF05, LF09, LF15, LF19, LF20, LF21 y LF29.

Los datos de tiempos medios de latencia (MLT) fueron contrastados mediante test estadístico de Friedman, prueba no paramétrica para comparar la variabilidad entre países y entre muestras. Dichas comparaciones se efectuaron incorporando la muestra LF19 y también sin ella, a causa de su elevado MLT en X0, que afectaba más de lo deseado a las diferencias observadas. Incluyendo LF19 en la comparación, se observaron diferencias significativas en los MLT entre todas las muestras (Estadístico de Friedman: 20,07; p-valor: 0,0054**; Figura 45A) y entre todos los países (Estadístico de Friedman: 12; p-valor: 0,0174*, Figura 45B).

Cuando no se incluyó LF19 en la comparación, las diferencias entre países no fueron significativas (Estadístico de Friedman: 8,89; p-valor: 0,0640; Figura 45D), pero sí seguían siéndolo entre muestras (Estadístico de Friedman: 18,54; p-valor: 0,005**; Figura 45C).

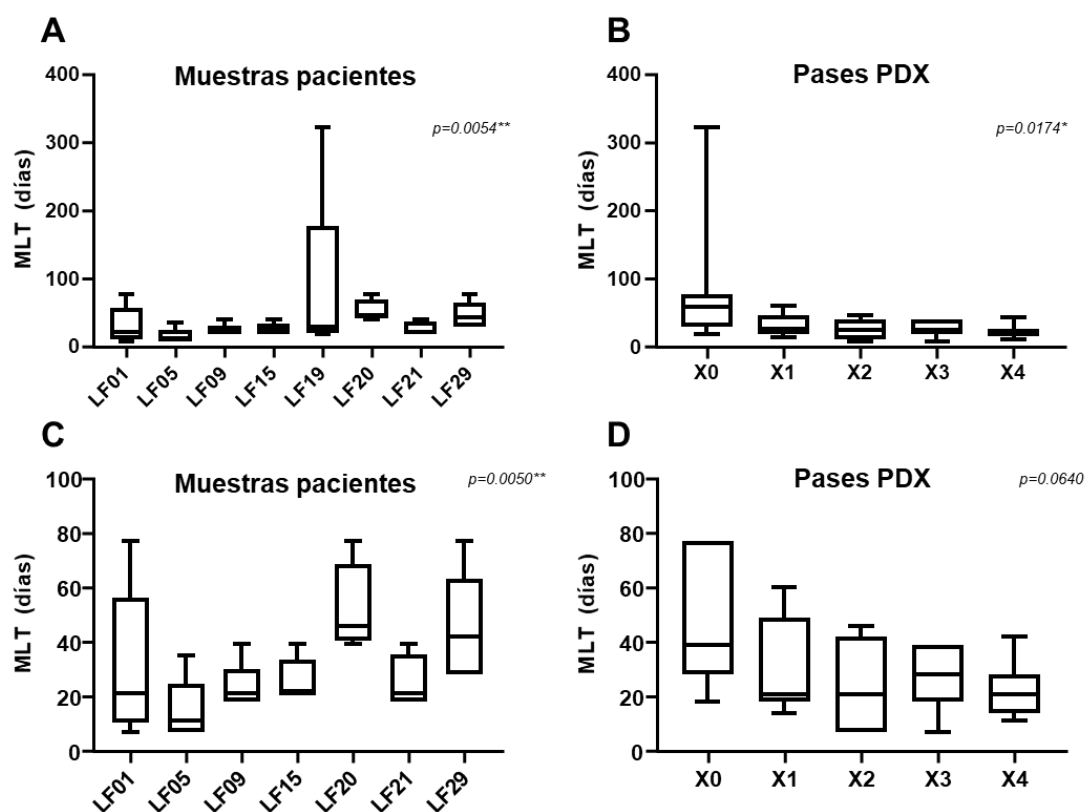


Figura 45. MLT de los distintos conjuntos de países y muestras. Se indica en cada caso el p-valor derivado de aplicar el test estadístico de Friedman. A) MLT de todas las muestras. B) MLT de todos los países. C) MLT de todas las muestras con excepción de LF19. D) MLT de todos los países con excepción de LF19. *MLT*: tiempo medio de latencia. *PDX*: xenoinjertos derivados de paciente.

3.3. Análisis inmunohistoquímico de la colección de PDX basada en micromatrices de tejido (TMA)

El análisis inmunohistoquímico de los cortes de tejido normal adyacente al tumor primario, también denominado tejido paracanceroso, y del propio tumor primario, es prácticamente rutinario para el diagnóstico del subtipo histológico en cáncer de pulmón no microcítico. La técnica de micromatrices de tejido (TMA, *Tissue MicroArray*) permite analizar de manera masiva múltiples marcadores inmunohistoquímicos en diversas muestras al mismo tiempo. Extender el análisis con los mismos marcadores a las muestras de los tumores crecidos en ratón, es decir, a los PDX, permite estudiar la evolución del tumor en cada pase de xenotrasplante a través de la variación en la expresión de marcadores descriptivos y otros marcajes de interés. La elucidación de la histología del tumor primario había sido determinada en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital La Fe. El uso de marcadores descriptivos en este contexto, además de los resultados de la anatomía patológica del hospital, es necesario para observar posibles transformaciones del subtipo histológico de tumor, o eventos de interés al utilizar el modelo de xenotrasplante en ratón.

Hematoxilina y eosina

Una porción de todas las muestras provenientes del hospital se utilizó para fijarla en un bloque de parafina para estudios posteriores. Cortes parafinados se tiñeron con hematoxilina y eosina, de naturaleza básica y ácida, respectivamente. En base a ello, se une a biomoléculas y componentes subcelulares, permitiendo una primera visión de lo que se observa en el corte. Un rango de colores rojos, rosáceos, púrpuras y azules permiten distinguir ácidos nucleicos, proteínas, núcleo, mitocondria y filamentos citoplasmáticos, entre otros. La tinción con hematoxilina y eosina también permite distinguir células tumorales en un nicho de tejido funcional.

Marcadores descriptivos

Las citoqueratinas son una familia de proteínas que forman parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto en el tejido epitelial, y tienen una expresión específica dependiente de tejido o tipo celular ⁵³⁷. En consecuencia, también permiten diferenciar carcinomas según su origen histológico. En cáncer de pulmón, es habitual utilizar las citoqueratinas 7 y 20, expresada la primera y ausente la segunda en adenocarcinomas, el subtipo más común. La citoqueratina 7 (CK7), de manera más concreta, se expresa en tejido epitelial de pulmón y mama; mientras que la citoqueratina 20 (CK20) se expresa en el epitelio gastrointestinal ⁵³⁸.

Por otro lado, TTF1 (Factor de Transcripción Tiroideo-1, *Thyroid Transcription Factor-1*), es un miembro de la familia de factores transcripcionales NKX2. Se localiza en el núcleo de pneumocitos tipo II y células Club del pulmón, pero también en regiones del cerebro y en tiroides. Se expresa en un número elevado (> 70%) de adenocarcinomas de pulmón ⁵³⁹⁻⁵⁴².

En conjunto, se puede resumir que la combinación de un marcaje CK7 positivo (+) y CK20 negativo (-), estaría indicando un carcinoma de origen pulmonar, no proveniente del tracto gastrointestinal como foco primario. La expresión de TTF1 (+) sirve para distinguir mayoritariamente adenocarcinomas de otros tipos de cáncer de pulmón no microcítico, especialmente el escamoso.

Marcador de proliferación

Ki67 es el marcador de proliferación utilizado rutinariamente en múltiples tipos de cánceres ⁵⁴³. En cáncer de pulmón no microcítico, se ha descrito su valor como indicador de mal pronóstico ⁵⁴⁴. A nivel molecular, Ki67 es una proteína no histona que se une al ADN en células proliferativas (en cualquier fase del ciclo) pero no en células quiescentes ⁵⁴⁵. En el escenario de un cáncer, por tanto, marca los núcleos de las células del tumor frente al resto de células del tejido; o al menos los de las células con mayor índice de proliferación ^{421,546,547}.

Ezrina y Vimentina como marcadores en CPNM

En este proyecto se utilizaron Ezrina y Vimentina como marcadores de interés en cáncer (ya descritos en los capítulos anteriores de resultados). A nivel inmunohistoquímico, el marcaje de Ezrina y de Vimentina se localiza en el citoplasma (Ezrina también en membrana plasmática).

En comparación a marcadores descriptivos que permiten acotar mejor las regiones del tumor, estos marcadores de interés arrojan información sobre el estatus funcional de las células tumorales. Su variación de expresión en los sucesivos pases de PDX también correlaciona con la evolución del tumor en el modelo animal.

Vimentina es un marcador mesenquimal canónico y puede indicar diferenciación o el estado EMT⁵⁴⁸, y ser asociado a migración celular y un incremento del potencial metastásico del tumor^{549,550}. Ezrina es una proteína relacionada con actina que conecta el citoesqueleto a la membrana plasmática, y es asociada con invasión local³⁴⁸ y metástasis³⁵⁵.

A continuación, se muestran los resultados del marcaje inmunohistoquímico mediante el uso de micromatrices de tejido (TMA) para cada una de las muestras que se implantaron con éxito en modelo de ratón, y que pudieron ser reimplantadas en sucesivos pases de PDX. Para cada muestra se presentan dos figuras: un panel con la tinción hematoxilina-eosina, marcadores descriptivos (CK7, CK20 y TTF1); y otro panel con marcadores de EMT y de proliferación (Vimentina, Ezrina y Ki67).

3.3.1. LF01: Adenocarcinoma acinar

Esta muestra es descrita como adenocarcinoma acinar, en estadio IIb, procedente de un varón fumador (Tabla 9). Como se indica en la Tabla 12, posee mutación en ERBB4 (L713F). En la Figura 46 se observan diferentes marcajes que permiten precisar esta clasificación. En el tejido normal o paracanceroso se observan los espacios vacíos de intercambio aéreo y las paredes alveolares. La

tinción de hematoxilina-eosina del tumor primario revela las regiones tumorales como aquellas más oscurecidas, con un tono más morado. Estas regiones coinciden con las que se observan positivas para citoqueratina 7 (CK7), aunque este marcaje no es tan intenso como en otros subtipos de adenocarcinoma. Este marcaje no tan claramente positivo de la CK7 podría mostrar una cierta indiferenciación del adenocarcinoma, y podría correlacionarse con la pérdida de expresión tras tres pases de PDX, pues en X2 observamos que el marcaje es negativo. La hematoxilina-eosina de los pases X0, X1 y X2 muestra cortes claramente diferentes, con un proceso de necrosis central en X0 y una intensificación del tono, que puede relacionarse con la indiferenciación citada y la malignización; seguido de una cierta fibrosis por las características del corte empleado en X1; y una combinación de estos ambos procesos en X2: una posible transición a fenotipo mesenquimal más estabilizado. Esta descripción coincide con la pérdida de CK7 en X2, pues las citoqueratinas están ausentes en los tejidos no epiteliales. La citoqueratina 20 (CK20) se mantiene negativa en todos los cortes, desde el tumor primario hasta X2, por tanto, el adenocarcinoma es primario de pulmón según el diagnóstico original. TTF1 es un marcador más específico para determinar regiones de adenocarcinoma de pulmón y tiroideo (la CK7 también es positiva en amplias regiones del tejido normal pulmonar). En este caso, precisamente, ayuda a la delimitación de las regiones tumorales en el tumor primario, que se caracterizan por esa disposición acinar o de racimo. En X0 hay regiones positivas. En el X1 el TTF1 no se observa en el corte mostrado, que parece fibrótico, como sucedía con hematoxilina-eosina, salvo en dos pequeños focos. En X2 no se puede considerar que haya marcaje positivo nuclear. Este resultado corroboraría que el fenotipo originalmente diagnosticado del tumor se ha perdido tras tres pases de PDX (como se observaba en CK7).

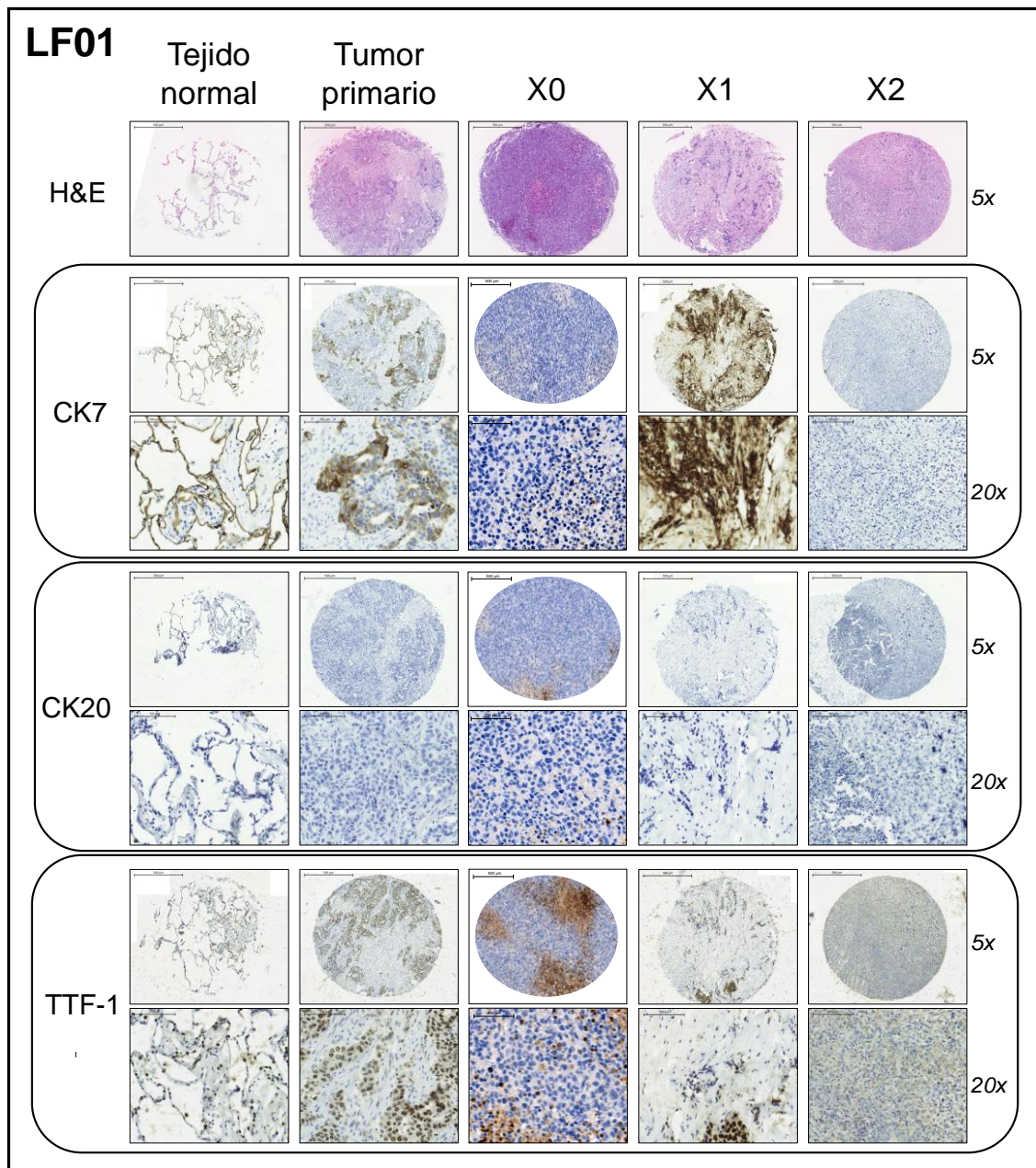


Figura 46. TMA de la muestra LF01 con tinción de H&E e inmunohistoquímica de CK7, CK20 y TTF1. Se muestra el tejido pulmonar adyacente al tumor (tejido normal), tumor primario, PDX tras implantar el tumor primario (X0), y los dos primeros pases de PDX (X1 y X2). TMA: micromatriz de tejido. X0: PDX derivado del implante del tumor primario. X1: primer pase de PDX. X2: segundo pase de PDX. H&E: hematoxilina y eosina; CK7: citoqueratina 7; CK20: citoqueratina 20; TTF1: factor de transcripción tiroideo-1.

La Figura 47, por otra parte, muestra el marcaje de Vimentina, Ezrina y Ki67. En el tumor primario, la Vimentina marca las fibras del estroma del cáncer, cuyas células tienen un aspecto alargado y engloban las estructuras epiteliales (acinares) del tumor. De hecho, el marcaje, citoplasmático, es excluyente con

respecto a TTF1, por lo que este adenocarcinoma acinar no expresa originalmente Vimentina. En X0 hay una expresión de Vimentina intensa y extendida por todo el corte, similar a lo que sucede en X1 y X2. Por otro lado, Ezrina, proteína que se encuentra en la membrana de las células interactuando con el citoesqueleto, muestra una intensidad media, menor a la de Vimentina. Su expresión en el tumor primario es excluyente respecto a Vimentina, y coincidente con TTF1. En X0, no obstante, está extendidamente expresada, como sucedía con Vimentina. En X1 y X2 no se expresa de una manera específica.

El marcador de proliferación Ki67 correlaciona su expresión nuclear con la de TTF1, y también ampliamente con CK7. En el tumor primario se marcan núcleos de células de las estructuras acinares, en X0 las regiones de marcaje más intenso coinciden con las positivas para TTF1, y en X1 este marcaje se circunscribe solo a algunos casos, que son los focos ya citados para TTF1. En X2 no se observa marcaje.

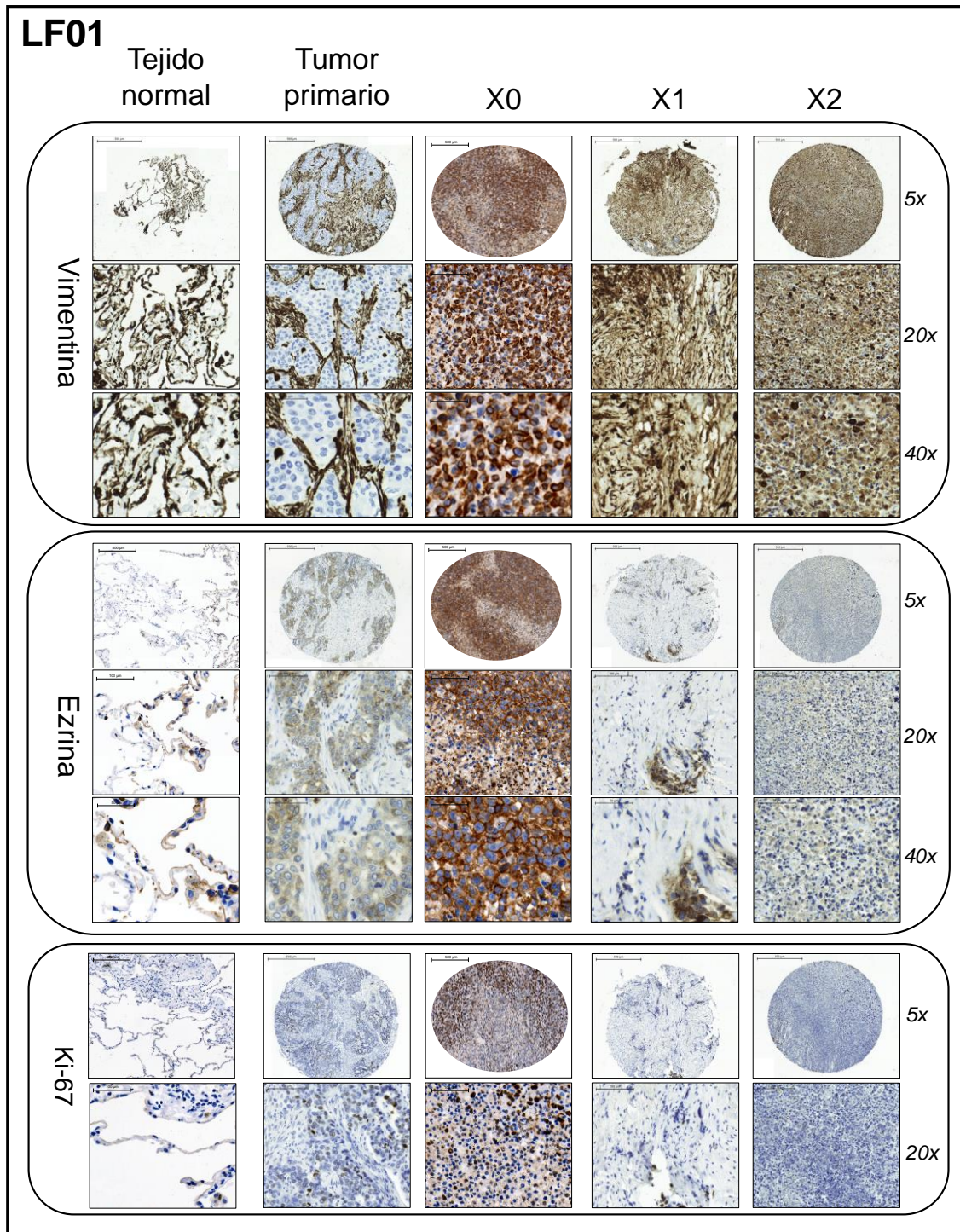


Figura 47. TMA de la muestra LF01 con inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67. Se muestra el tejido pulmonar adyacente al tumor (tejido normal), tumor primario, PDX tras implantar el tumor primario (X0), y los dos primeros pases de PDX (X1 y X2). TMA: micromatriz de tejido. X0: PDX derivado del implante del tumor primario. X1: primer pase de PDX. X2: segundo pase de PDX. Ki67: clon 67 de 96, Kiel (Alemania).

3.3.2. LF05: Adenocarcinoma sólido

LF05 es un adenocarcinoma sólido, y fue diagnosticado en estadio IVa, considerado avanzado. Procede de una mujer de 67 años fumadora y posee la mutación G12C en KRAS (Tablas 9 y 12). La tinción de hematoxilina-eosina (Figura 48) muestra las regiones de adenocarcinoma en el tumor primario, de morado intenso, y con cierta disposición glandular. Las regiones tumorales son positivas para CK7, y negativas las fibras intercaladas. Hay una correlación entre la hematoxilina-eosina y la CK7 a lo largo de los pases de PDX. En X0 se observa una región necrótica (color rosado), síntoma de la agresividad del tumor o de que el corte pertenece a una región más interna del mismo. En X1 el marcaje de la CK7 es más intenso y expandido, por lo que el adenocarcinoma parece haberse reproducido favorablemente en su fenotipo. En X2 esto se confirma, aunque algunas regiones parecen perder la CK7 positiva, quizá debido a un proceso de transdiferenciación (EMT), y también hay fibrosis intercalada. Las observaciones con CK7 se confirman con el marcaje absolutamente negativo para CK20 en todos los pases, y con el positivo de TTF1 (además concordante con las mismas regiones y en cada pase) en los núcleos de las células del ADC. En conjunto, cabe destacar que se ha descrito que, dentro de los subtipos histológicos del adenocarcinoma de pulmón ⁵⁴, los adenocarcinomas sólidos preservan mejor sus características en los modelos PDX, debido a su arquitectura y compactación inicial ^{422,423}, y que la mutación KRAS contribuye al éxito y evolución con progresión tumoral en estos modelos ⁵²⁰⁻⁵²². Esto quizá explique la mejor preservación de los rasgos tumorales, y se observa en otros casos de nuestra colección de PDX como LF15.

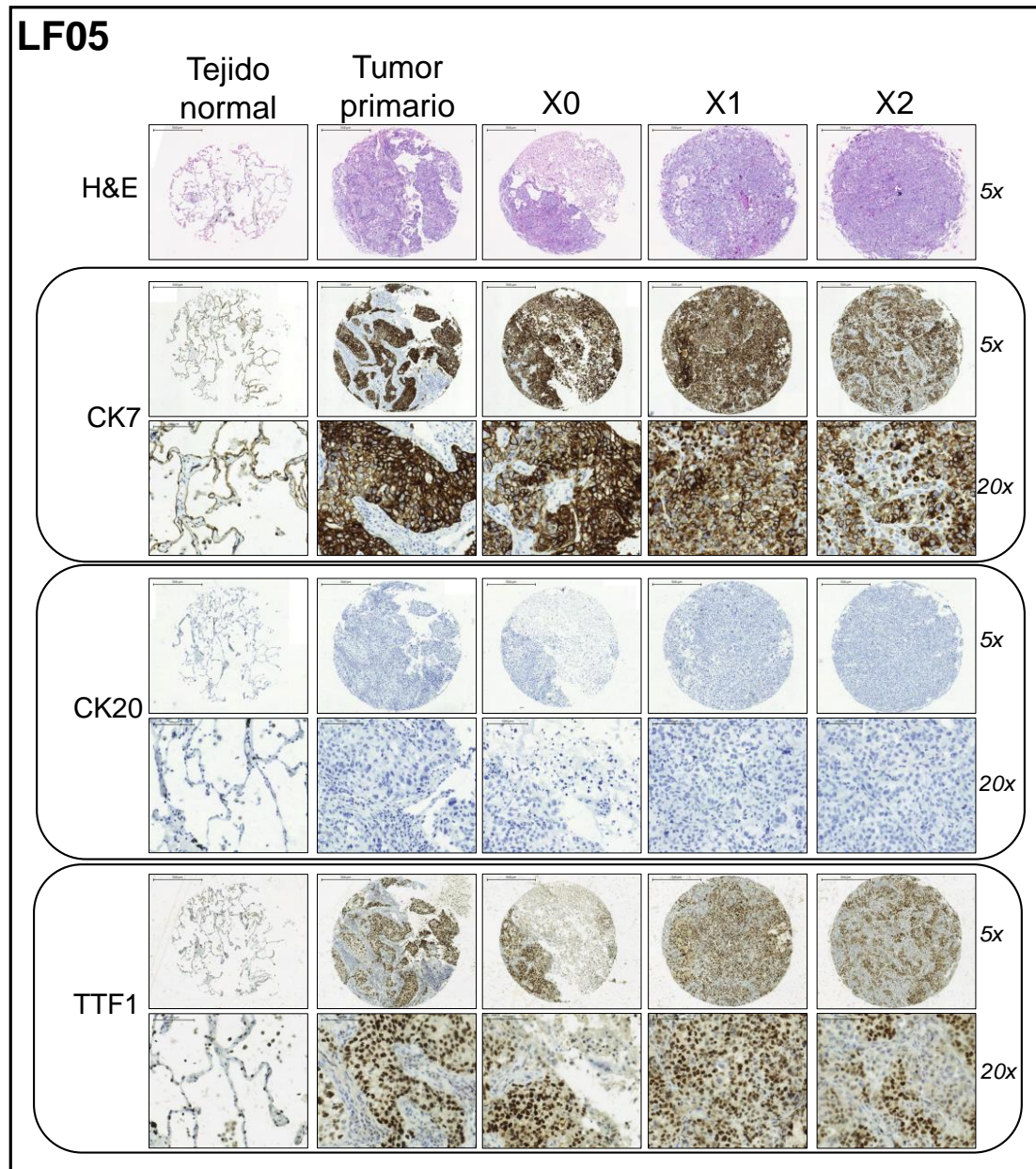


Figura 48. TMA de la muestra LF05 con tinción de H&E e inmunohistoquímica de CK7, CK20 y TTF1. Se muestra el tejido pulmonar adyacente al tumor (tejido normal), tumor primario, PDX tras implantar el tumor primario (X0), y los dos primeros pases de PDX (X1 y X2). TMA: micromatriz de tejido. X0: PDX derivado del implante del tumor primario. X1: primer pase de PDX. X2: segundo pase de PDX. H&E: hematoxilina y eosina; CK7: citoqueratina 7; CK20: citoqueratina 20; TTF1: factor de transcripción tiroideo-1.

Los marcadores de interés en nuestro estudio se muestran en el panel de la Figura 49. La Vimentina se expresa en fibras del estroma, pero también en células del ADC. El marcaje se intensifica en cada pase, siendo muy alto y extendido en X1 y X2. Observando la evolución de la Vimentina en los diferentes

pases, hay una presencia preponderante al inicio en el estroma tumoral, y la expresión se va extendiendo a todo el ADC. Se ha relacionado la evolución del tumor con la adquisición de un fenotipo mesenquimal y la mayor acumulación de Vimentina en fibras de estrés, lo cual a su vez correlaciona con una mayor capacidad invasiva y, por tanto, agresividad ^{551,552}. Los eventos observados podrían también estar asociados a una señalización en el microambiente tumoral, donde el estroma colabora en la transformación y transdiferenciación de las células del ADC ⁵⁵³. Concordante con la expresión de Vimentina es la expresión de Ezrina, aunque ésta no se expresa en las fibras estromales. La expresión de Ezrina es coincidente con la expresión de CK7. De X0 a X2 Ezrina aumenta su expresión, se extiende en todo el corte conforme progresa el tumor y ésta pasa de ser más citoplasmática a más membranosa. Este incremento también puede asociarse a un fenotipo más agresivo, pues Ezrina es un marcador de invasión local ⁵⁵⁴. Respecto a Ki67, también hay una correlación parcial con las regiones de ADC. Concretamente, las zonas más intensas para TTF1 expresan Ki67. Además, las células con Ki67 positivo aumentan en número y extensión en cada pase sucesivo, siendo mayor en X2, lo cual se asocia a la evolución del tumor en el modelo PDX

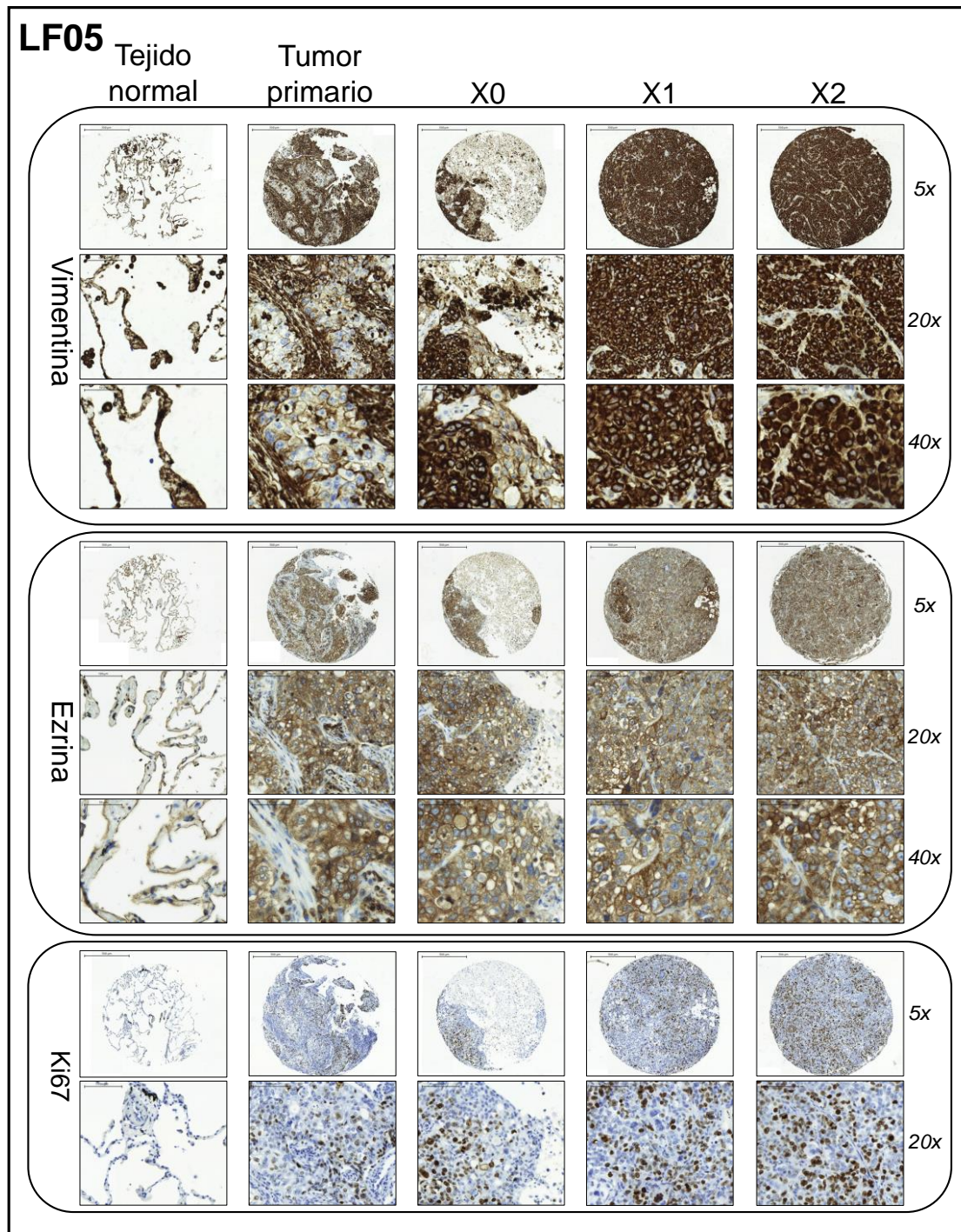


Figura 49. TMA de la muestra LF05 con inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67. Se muestra el tejido pulmonar adyacente al tumor (tejido normal), tumor primario, PDX tras implantar el tumor primario (X0), y los dos primeros pases de PDX (X1 y X2). TMA: micromatriz de tejido. X0: PDX derivado del implante del tumor primario. X1: primer pase de PDX. X2: segundo pase de PDX. Ki67: clon 67 de 96, Kiel (Alemania).

3.3.3. LF09: Adenocarcinoma mucinoso lepidico

LF09 se describió como adenocarcinoma mucinoso lepidico. Diagnosticado en estadio Ib, temprano, de un paciente varón fumador/exfumador de 75 años (Tabla 9). LF09 alberga la misma mutación en KRAS detectada en LF05: G12C (Tabla 12). La clasificación de la OMS de los subtipos de cáncer de pulmón describe al ADC lepidico como un subtipo menos invasivo que los subtipos de adenocarcinoma acinar, sólido y papilar. El término fue acuñado por el médico inglés John George Adami en 1902, refiriéndose a neoplasias derivadas de células que revisten superficies; siendo en el contexto del adenocarcinoma pulmonar una referencia a patrón de las células que se escaman en los términos de los alvéolos, con morfología columnar y moco en el citoplasma⁶⁶. Durante los pases en ratón el tumor evolucionó y se dio un suceso de transformación fenotípica (Figura 50). La hematoxilina-eosina muestra ya en el tejido paracanceroso una región fibrótica. En el tumor primario también hay muchas células con moco (compartimento blanquecino en citoplasma), inflamación en el estroma (linfocitos acumulados en zonas de fibras) y fibrosis marcada. También región hemorrágica (eritrocitos en región derecha del corte). De X0 a X2 se observa cómo progresivamente se incrementan los eventos inflamatorios, fibróticos y necróticos sin que ya se observe la presencia de un tumor de origen epitelial. La CK7 desaparece ya en el primer pase de PDX (X0), habiéndola expresado en el tumor primario. A esto se suma el hecho de que la muestra LF09 produjese metástasis en ratón del flanco del xenotrasplante a ganglio axilar, pulmón, bazo y tiroides. Al contrario de lo que sucede con otras muestras, el tumor primario también es CK20+ y, al igual que sucede con la CK7, desaparece en X0. Prosiguiendo con la caracterización tumoral, TTF1 es positivo en el núcleo de algunas células del tumor primario. De X0 a X2 el marcaje no parece específico de núcleo, y por tanto también podría haberse perdido este marcador, como sucede con CK7 y CK20.

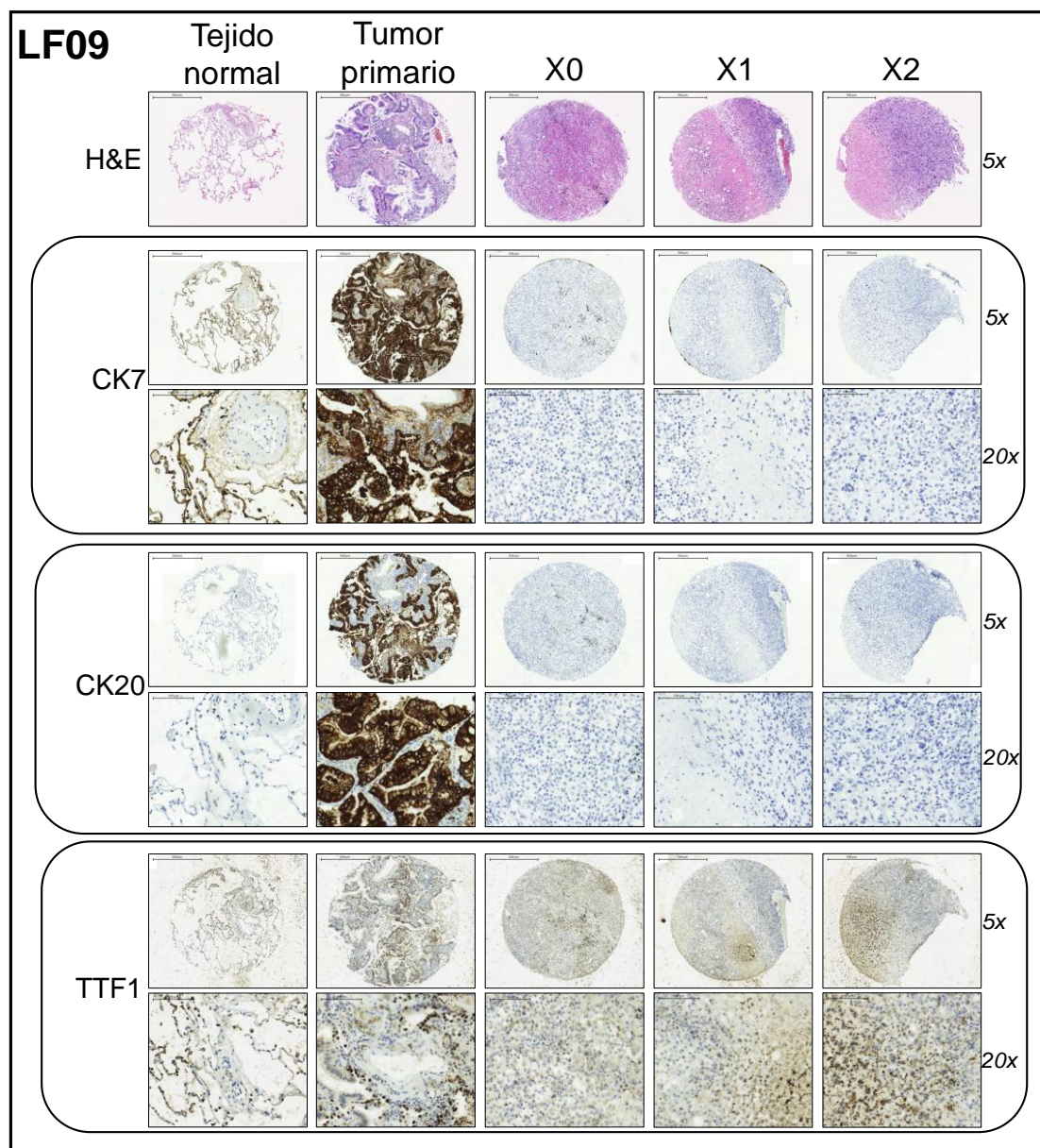


Figura 50. TMA de la muestra LF09 con tinción de H&E e inmunohistoquímica de CK7, CK20 y TTF1.

La Figura 51 muestra los marcajes para Vimentina, Ezrina y Ki67. En tumor primario, la Vimentina no parece expresarse en el adenocarcinoma, sí en el estroma. No obstante, en X0 la expresión aumenta radicalmente y se extiende por todo el corte. Lo mismo ocurre en X1 y X2. La expresión de Ezrina, como marcador asociado al tejido epitelial, sucede igual que con las citoqueratinas. En el tumor primario tiene expresión media-alta en regiones epiteliales, mayor en zonas de interacción con el estroma. De manera radical, el marcaje se pierde en X0 y reaparece con expresión media en X1 y X2 aunque dependiente de región.

En contraste, el Ki67 sí parece aumentar de expresión en cada pase de PDX. Muestra un marcaje medio-bajo en el tumor primario, y pasa a ser medio-alto en X0, X1 y X2.

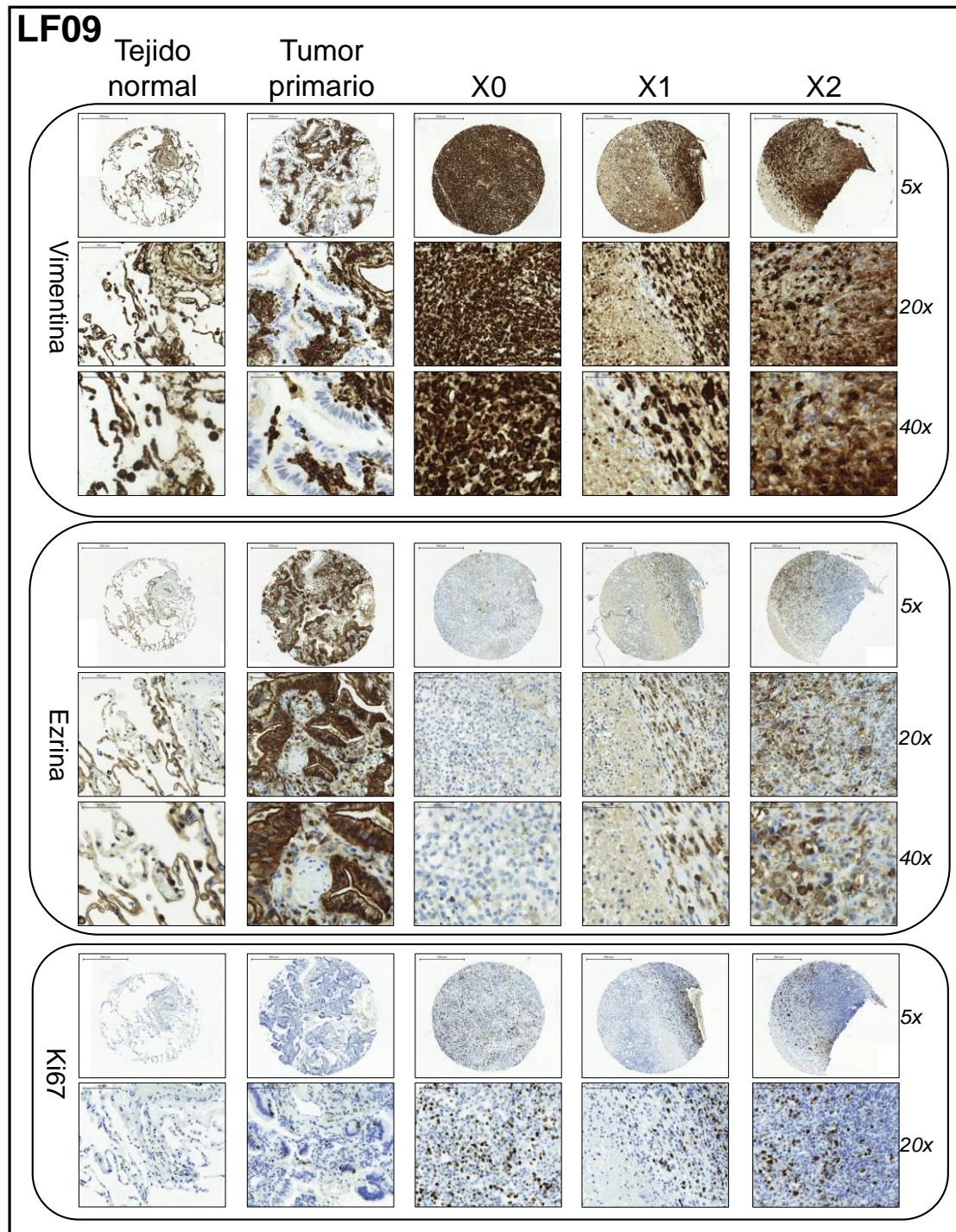


Figura 51. TMA de la muestra LF09 con inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67.

3.3.4. LF15: Adenocarcinoma sólido

LF15 se diagnosticó como adenocarcinoma sólido, como en el caso de LF05. El estadio en el momento de detección fue IIb, perteneciente a un varón fumador de 54 años (Tabla 9). Como sucedía con LF05 también y con LF09, posee la mutación G12C en KRAS; además de mutación en ERBB2 (V842I) (Tabla 12). A causa de la mejor adaptación y reproducibilidad de los ADC sólidos de pulmón en modelo *in vivo* de PDX, los marcajes CK7+/CK20-/TTF1+ para adenocarcinoma se mantienen del tumor primario al X2, intensificándose incluso la expresión de CK7 y TTF1 (Figura 52). La hematoxilina-eosina también muestra regiones de adenocarcinoma indiferenciado en el tumor primario, que forma luces vasculares (estructuras redondeadas blancas) en el propio tumor.

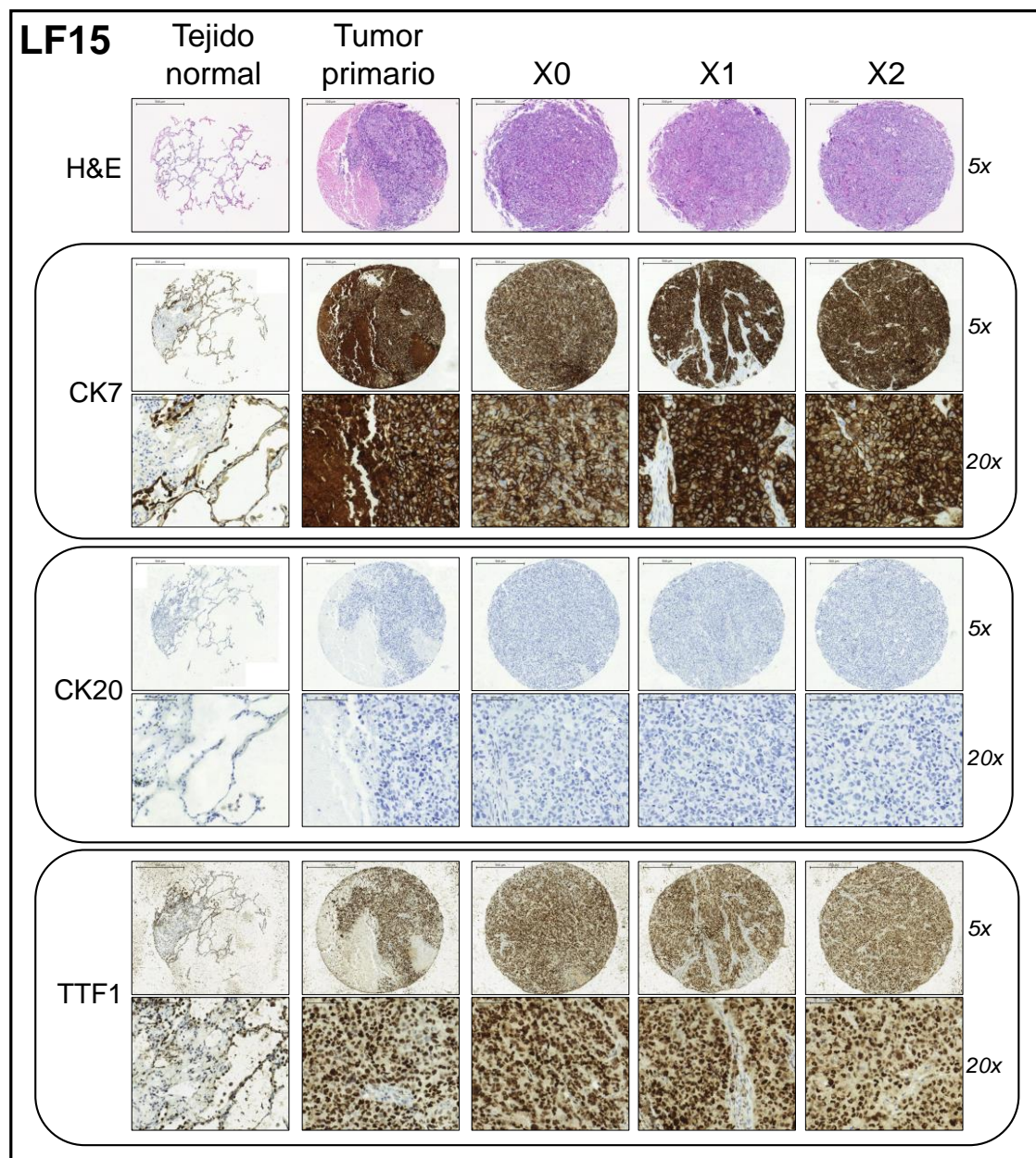


Figura 52. TMA de la muestra LF15 con tinción de H&E e inmunohistoquímica de CK7, CK20 y TTF1.

En la Figura 53, por otro lado, se observa un claro aumento de la expresión de Vimentina en cada pase, siendo ya alta en el tumor primario. La intensidad de las regiones para Vimentina correlaciona con las zonas más intensas para TTF1 y Ki67. De hecho, las células proliferativas (marcadas con Ki67) aumentan en número en cada pase, lo que indica que el crecimiento del tumor cada vez se acelera más conforme avanzan los pases de PDX; lo que correlaciona con las gráficas de crecimiento en ratón (Figuras 44 y 45). Respecto a Ezrina, la

expresión es también alta y extendida, y coincidente con el resto de proteínas marcadas positivamente.

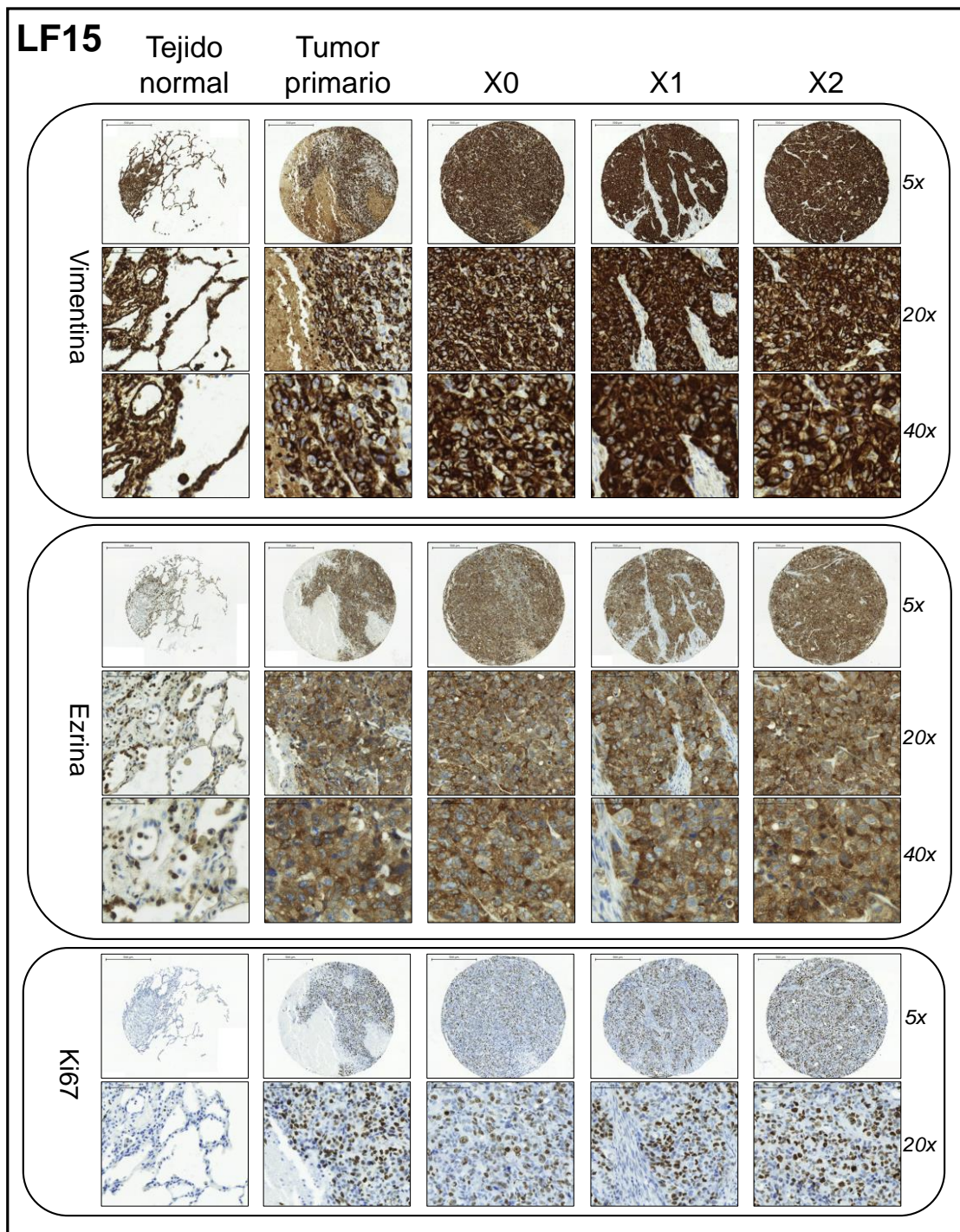


Figura 53. TMA de la muestra LF15 con inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67.

3.3.5. LF19: Adenocarcinoma acinar

La muestra LF19 se describe como adenocarcinoma acinar diagnosticado en estadio Ia3, perteneciente a un varón de 76 años (Tabla 9). De la colección de 9 muestras que generaron PDX, 3 de ellas habían sido descritas como este subtipo histológico (ADC acinar): LF01, LF19 y LF20. En la Figura 54 se muestra el marcaje CK7+/CK20-/TTF1+ del tumor primario, X0 y X1. No obstante, X2 es negativo para CK7 y TTF1. La hematoxilina-eosina refleja también la preservación, al menos parcialmente, de la arquitectura acinar o en racimos del tumor primario (en X1 los racimos muestran bordes más perfilados y menos redondeados). En el pase X2 se observa ya el ADC más extendido por todo el corte.

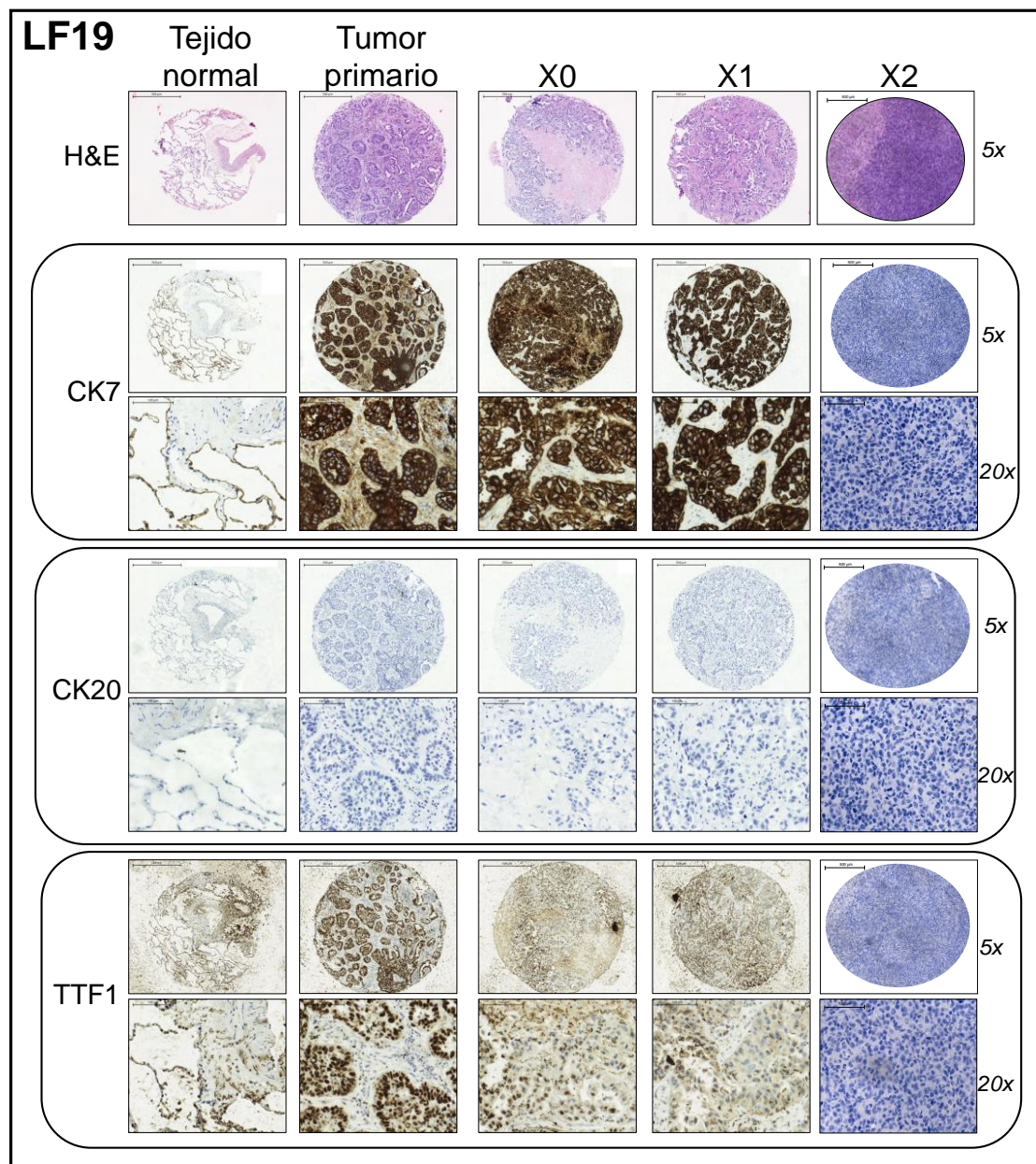


Figura 54. TMA de la muestra LF19 con tinción de H&E e inmunohistoquímica de CK7, CK20 y TTF1.

La Vimentina, en este caso en particular, no se expresa en el adenocarcinoma en el tumor primario (Figura 55). Quizá esto sea debido a que este tipo de tumores acinares preservan bastante las características de las células de las que derivan (cáncer diferenciado), y el fenotipo es todavía muy epitelial incluso a nivel molecular. De hecho, en el tumor primario excluye absolutamente con la expresión de la CK7 y de Ezrina. En X0 y X1 la expresión de Vimentina se reduce a algunas células tumorales en su citoplasma (y también algunas del estroma). En X2, por el contrario, hay una expresión casi absoluta en todo el corte. Ezrina,

por otro lado, inicialmente excluye con Vimentina, y en el tumor primario se expresa en el adenocarcinoma. Esta expresión se mantiene en X0, aunque más extendida, y en X1 se intensifica y vuelve a estar focalizada en las regiones asociadas a células tumorales. En X2 sí coexpresa con Vimentina, pues se extiende a todo el corte. El marcador de proliferación Ki67 no aumenta en X0 y X1 respecto al tumor primario (algo similar se refleja en TTF1), aunque sí hay más células positivas en X2. En el tumor primario cabe destacar que es positivo en las células del adenocarcinoma más externas de cada conjunto acinar, es decir, las que están en contacto con el estroma tumoral.

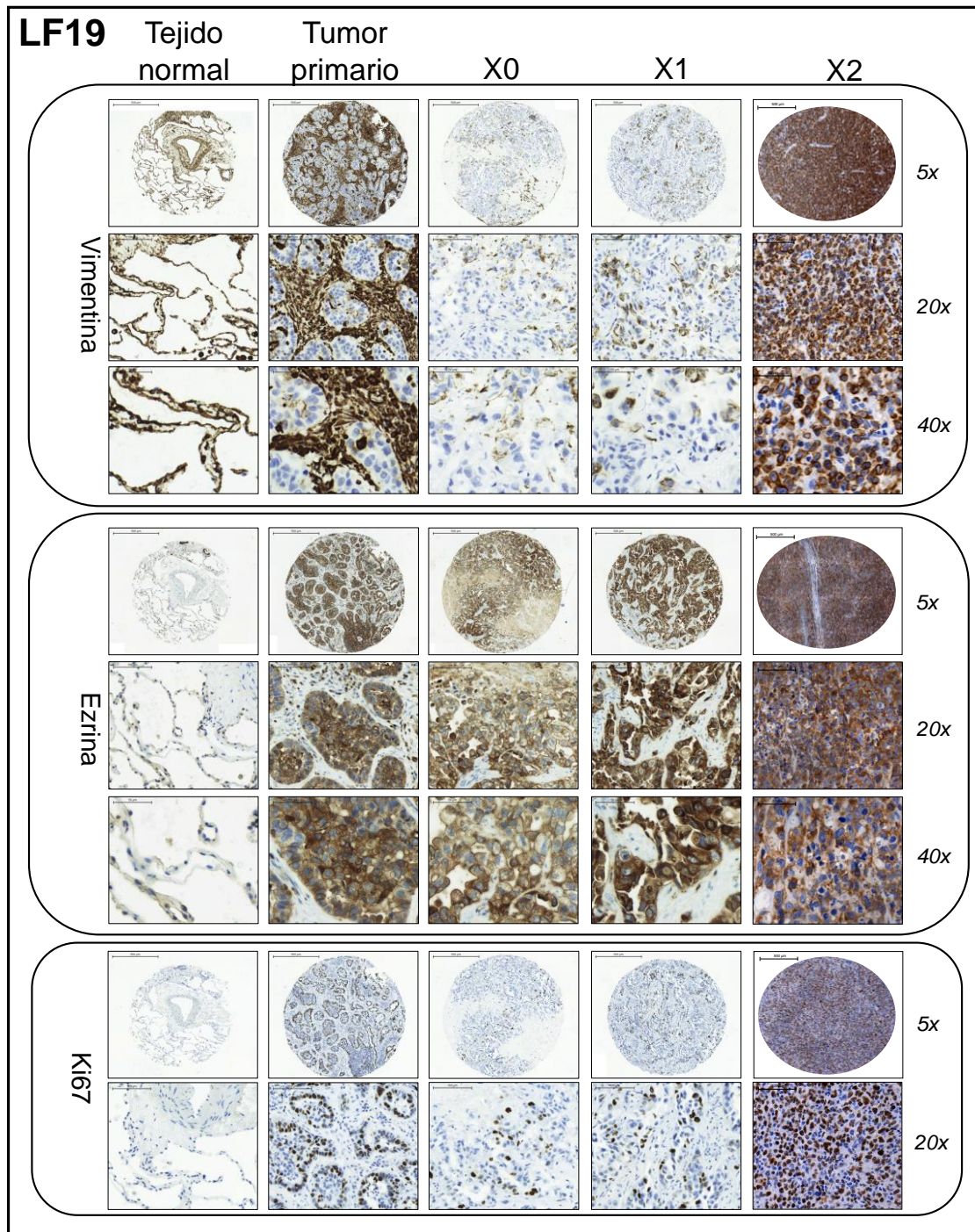


Figura 55. TMA de la muestra LF19 con inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67.

3.3.6. LF20: Adenocarcinoma acinar

Al igual que LF01 y LF19, la muestra LF20 también fue descrita originalmente como adenocarcinoma acinar. Ésta fue obtenida de un varón de 61 años diagnosticado en estadio IIIa (Tabla 9). El panel de secuenciación

Oncomine® (Tabla 12) mostró alteraciones en ERBB2 (I767M) y MYC (N26S). En la Figura 56, la hematoxilina-eosina muestra la morfología glandular de las células tumorales en el tumor primario. Morfología que se preserva y extiende en el X0. Como sucedía en LF19 con X2, en este caso ya en X1 se aprecia una extensión del carcinoma por todo el corte que se mantiene en X2. En el tumor primario también se observa bastante necrosis y moco intracelular en ciertas regiones (color ligeramente azulado). El marcaje es claramente CK7+/CK20- en todos los cortes. Respecto al TTF1, se observan células con núcleos positivos, en mayor número en X0 respecto al primario. No obstante, en X2 ya se observan como positivas la mayoría de las células.

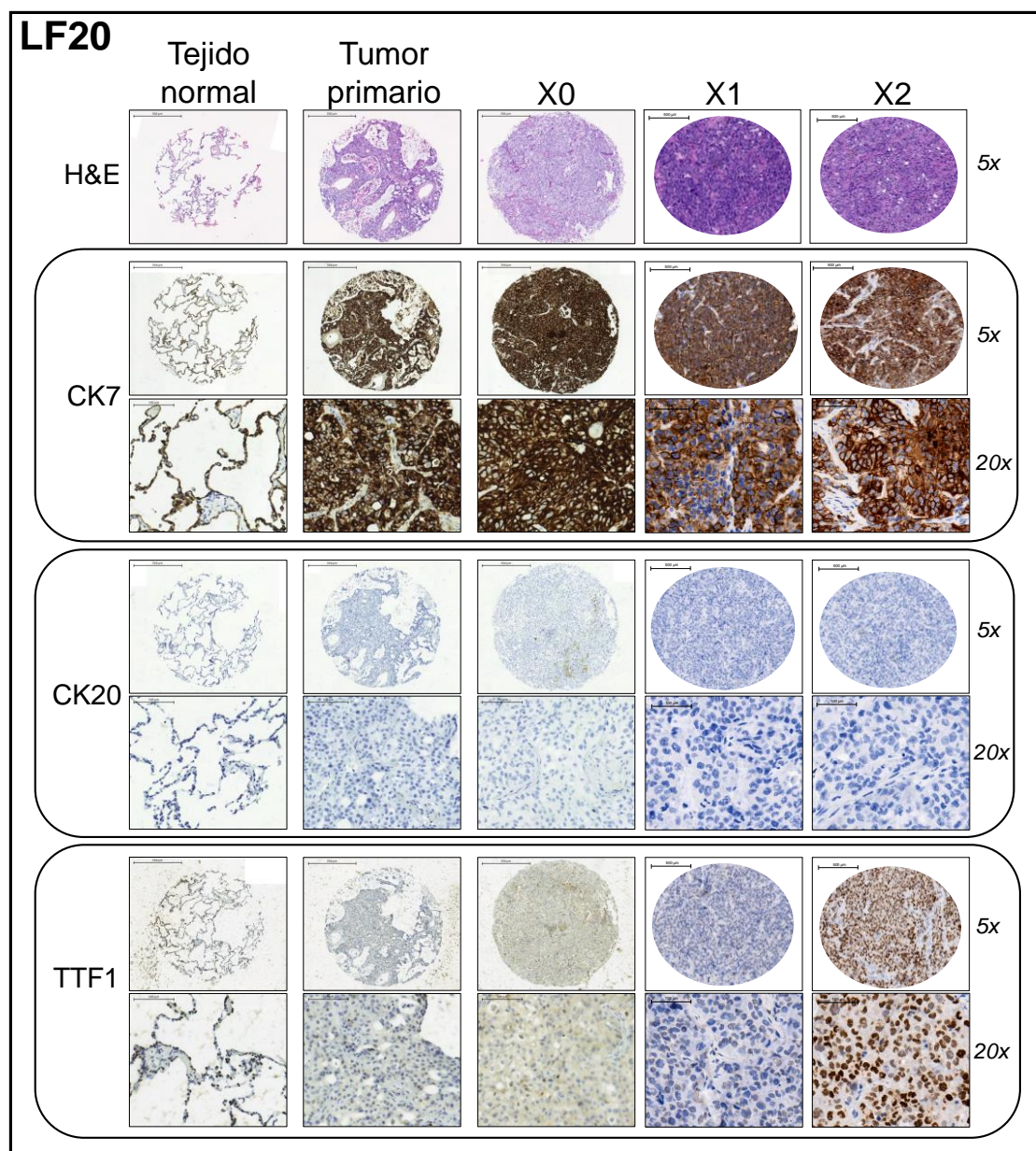


Figura 56. TMA de la muestra LF20 con tinción de H&E e inmunohistoquímica de CK7, CK20 y TTF1.

Tal y como sucedía con LF19, no hay expresión de Vimentina en el adenocarcinoma acinar (Figura 57), y sí en el estroma intercalado (tanto en tumor primario como en X0). De igual manera, en sucesivos pases la intensidad de la Vimentina y la extensión crece por todo el corte (X1 y X2). De manera opuesta en el tumor primario y en X0, Ezrina se expresa mucho en citoplasma y membrana de células del adenocarcinoma. En X0, aunque la expresión quizá es algo menos intensa, está más extendida y parece ser más de membrana. En X1 y X2 también se expresa por todo el corte como la Vimentina. El aumento del carácter proliferativo del tumor se incrementa del tumor primario a X1 con Ki67 cada vez presente en más núcleos y más intensos. El número de células positivas en X2 disminuye respecto a X1, pero aun así es elevado y mayor que en el primer pase (X0).

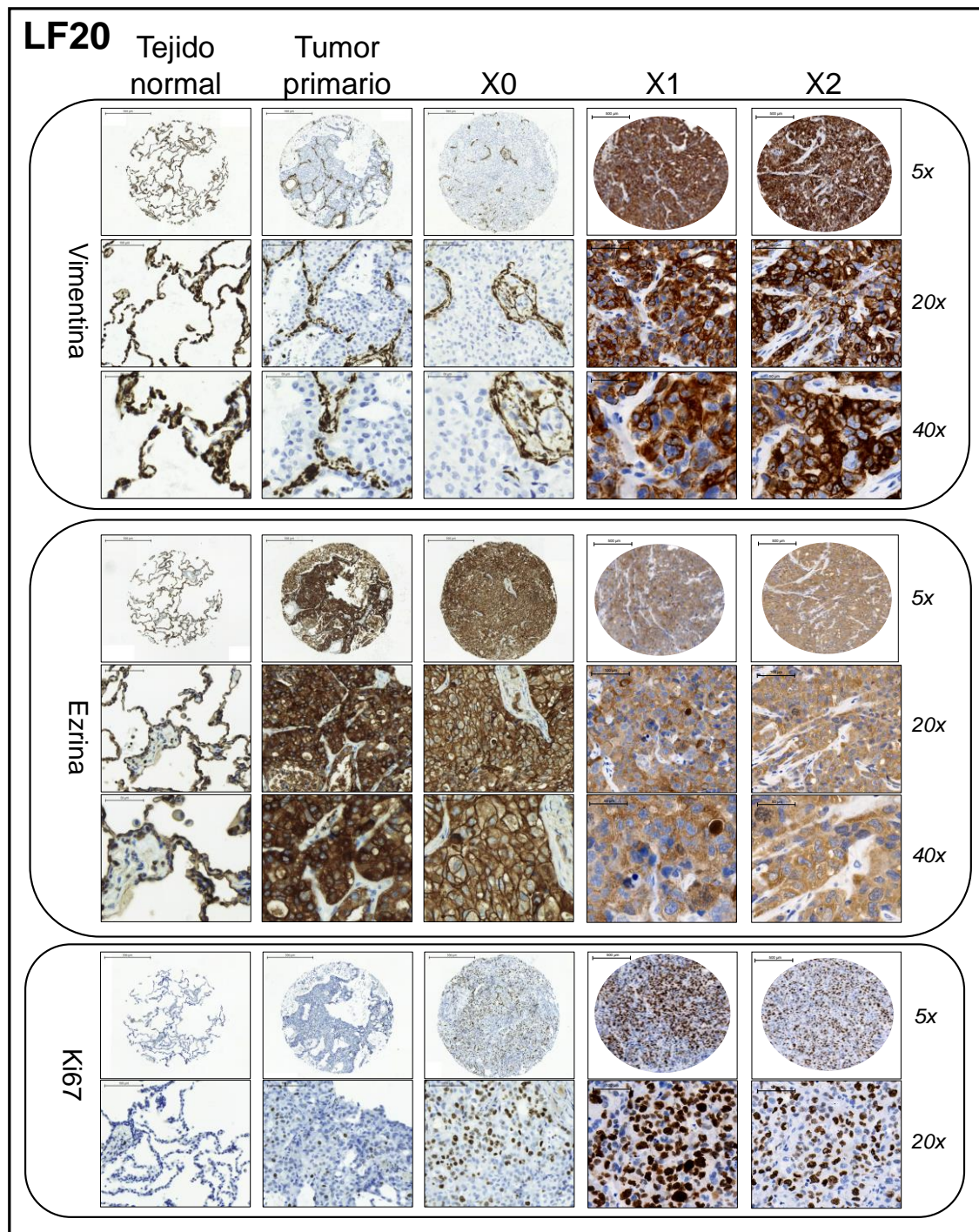


Figura 57. TMA de la muestra LF20 con inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67.

3.3.7. LF21: Carcinoma escamoso

LF21 es la única muestra que originó PDX que no es un adenocarcinoma. Se trata de un carcinoma escamoso (CCEP) de un varón de 79 años

diagnosticado en la3 (Tabla 9). El carcinoma escamoso de pulmón es en ocasiones positivo para CK7, pero suele ser negativo para TTF1. Es negativo para CK20, por otro lado. Este patrón es el observado en la Figura 58, con cierto marcaje de TTF1 que se atenúa pase a pase, y siendo CK7+/CK20- en el tumor primario, X1 y X2. En el X0 se pierde el marcaje para estas tres proteínas (CK7, CK20, TTF1), y se vuelve negativo para los tres. La hematoxilina-eosina también delimita las regiones del escamoso en el tumor primario, mientras que en X0 no se observa ninguna región especialmente acotada con una arquitectura específica, y en X1 y X2 ya se observa extendido.

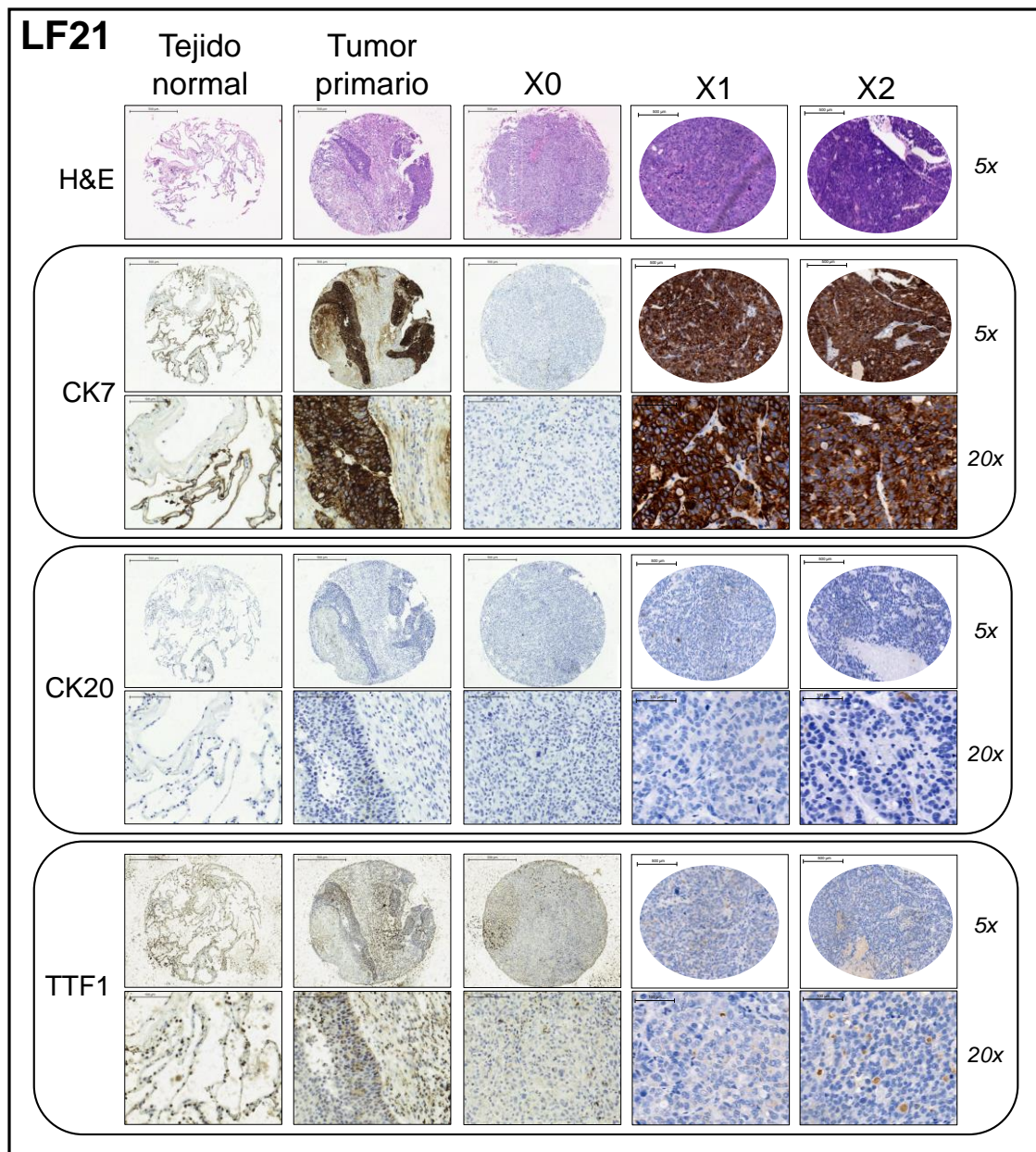


Figura 58. TMA de la muestra LF21 con tinción de H&E e inmunohistoquímica de CK7, CK20 y TTF1.

La Vimentina, aunque algunos estudios apuntan a que no se expresa en carcinomas escamosos de pulmón ⁵⁵⁵, otros sí la detectan. De hecho, suele correlacionarse más su expresión con subtipos intermedios como tumores adenoescamosos o neuroendocrinos, y diferenciados, que con ADC o CCEP ⁵⁴⁸. La expresión de Vimentina en el caso de LF21 (Figura 59) se extiende a todo el corte en el tumor primario, aunque destaca sobre todo su amplia expresión en el estroma. En X0, como sucedía con marcadores previos, sí se extiende realmente. En X1 y X2 la expresión de Vimentina desaparece por completo. Ezrina, a diferencia de la Vimentina, solo se expresa en las células tumorales en el primario, pasando luego a estar extendido por todo el corte del X0, X1 y X2. En el caso de Ki67, como se ha observado en algunos adenocarcinomas, las células del tumor cuyo núcleo expresa Ki67 son las que suelen contactar con el estroma, en el tumor primario. En X0 se extienden a todo el corte las células positivas (en torno al 30%) para este marcador de proliferación, aumentando el número y manteniendo la extensión en X1 y X2.

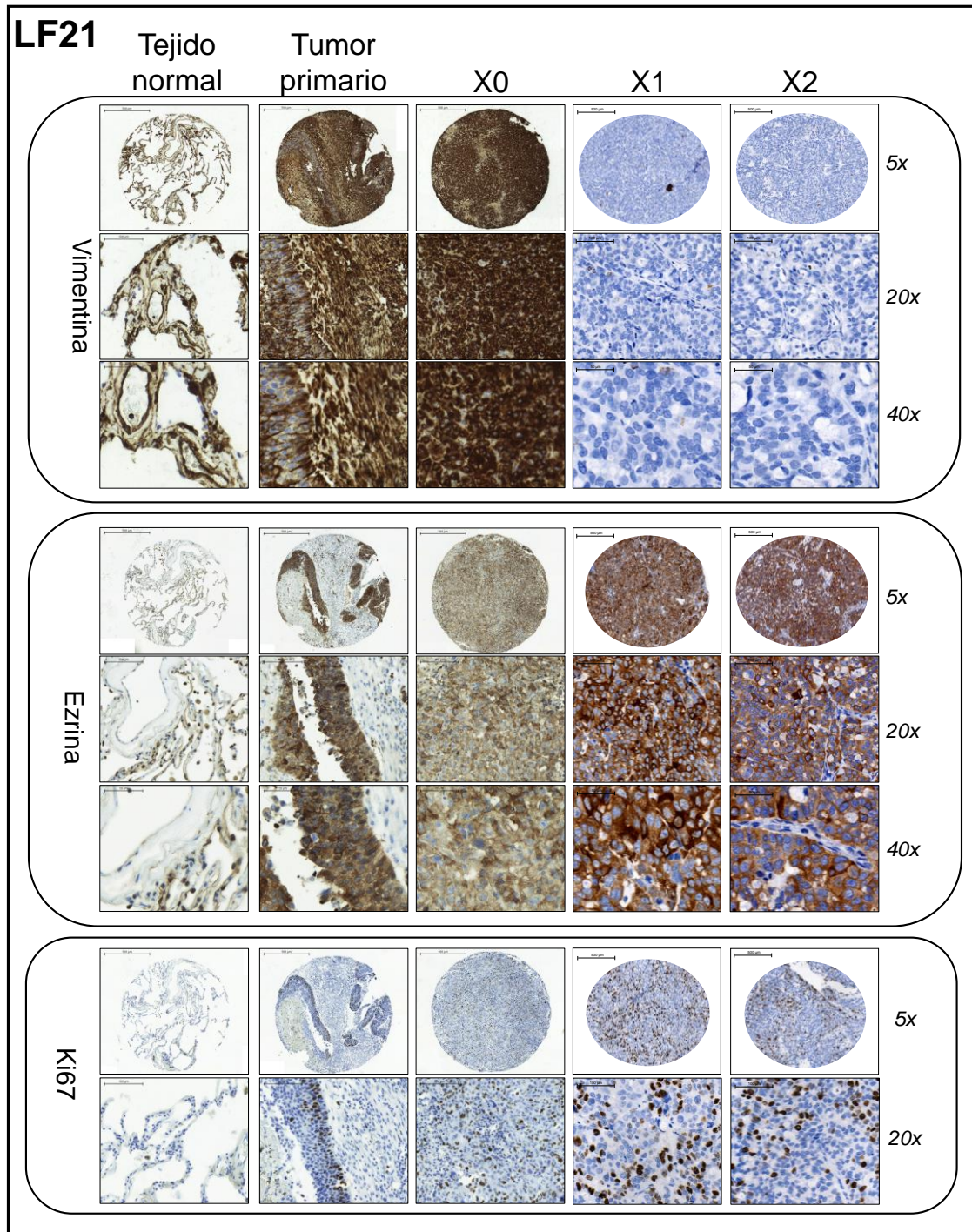


Figura 59. TMA de la muestra LF21 con inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67.

3.3.8. LF29: Adenocarcinoma sólido escasamente diferenciado

La muestra LF29 fue descrita como adenocarcinoma sólido, como sucedía con LF05 y LF15, pero en este caso con la observación de que está escasamente diferenciado. Es decir, que preserva en menor medida el fenotipo de las células de las cuales se origina. LF29 pertenece a un varón de 52 años ya diagnosticado en estadio IVb (Tabla 9). Posee mutación en el gen MET (T1010I) (Tabla 12). La fase tan avanzada de la enfermedad explicaría en parte la indiferenciación del tumor.

Los marcadores descriptivos se ajustan a los de otros adenocarcinomas sólidos: CK7+/CK20-/TTF1+ (Figura 60). La hematoxilina-eosina muestra cómo las regiones del adenocarcinoma en el primario están más circunscritas y rodeadas de fibras de estroma bastante gruesas. Estas regiones son muchos más extensas y hay menor presencia de fibrosis en X0 y X1, estando ya extendido el ADC en X2. La CK7 ya se expresa en todo el corte en el tumor primario, aumentando su intensidad y extensión en X0, X1 y X2, cada vez con menor presencia de estroma. La CK20 es negativa en todos los casos; TTF1 presenta expresión media en el tumor primario, y aumenta aparentemente en X0 y X1, aunque no parece un marcaje específico. En X2 no se expresa TTF1.

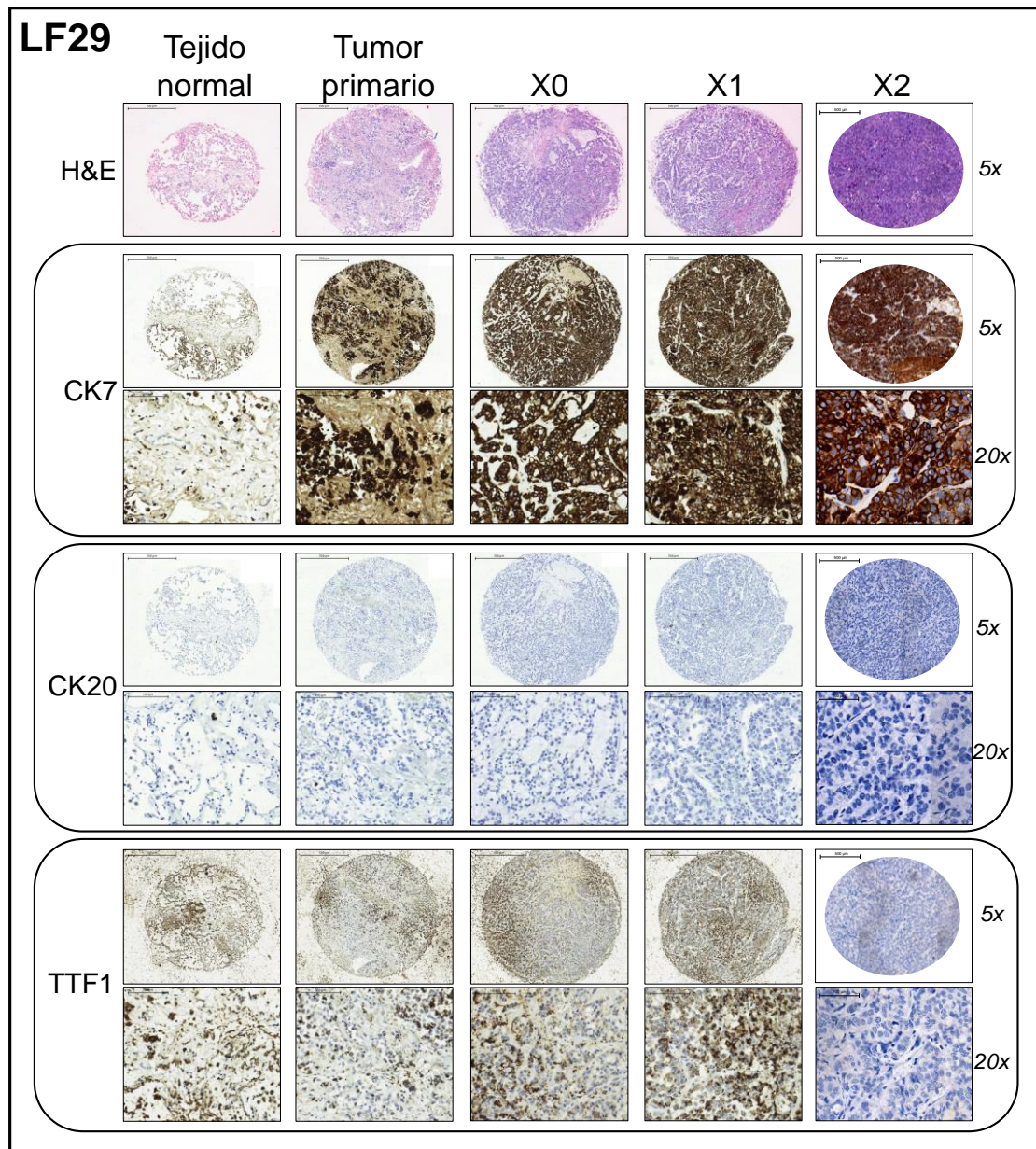


Figura 60. TMA de la muestra LF29 con tinción de H&E e inmunohistoquímica de CK7, CK20 y TTF1.

La Figura 61 muestra, con respecto a la Vimentina, un patrón similar al observado en LF19 y LF20 (adenocarcinomas acinares): ninguna expresión en el adenocarcinoma en ninguno de los pases y sí en las fibras de estroma del tumor primario, y perfecta exclusión con respecto a la CK7. Al desaparecer las fibras de estroma con los pases, desaparece la expresión de Vimentina. Ezrina, tal y como sucede con otros casos de la colección, sí está presente en el ADC original y su expresión también se incrementa progresivamente en intensidad y

extensión en X0, X1 y X2. Ki67 no se expresa en el tumor primario, pero sí lo hace en X0, X1 y X2 (aunque en general no muy extendidamente).

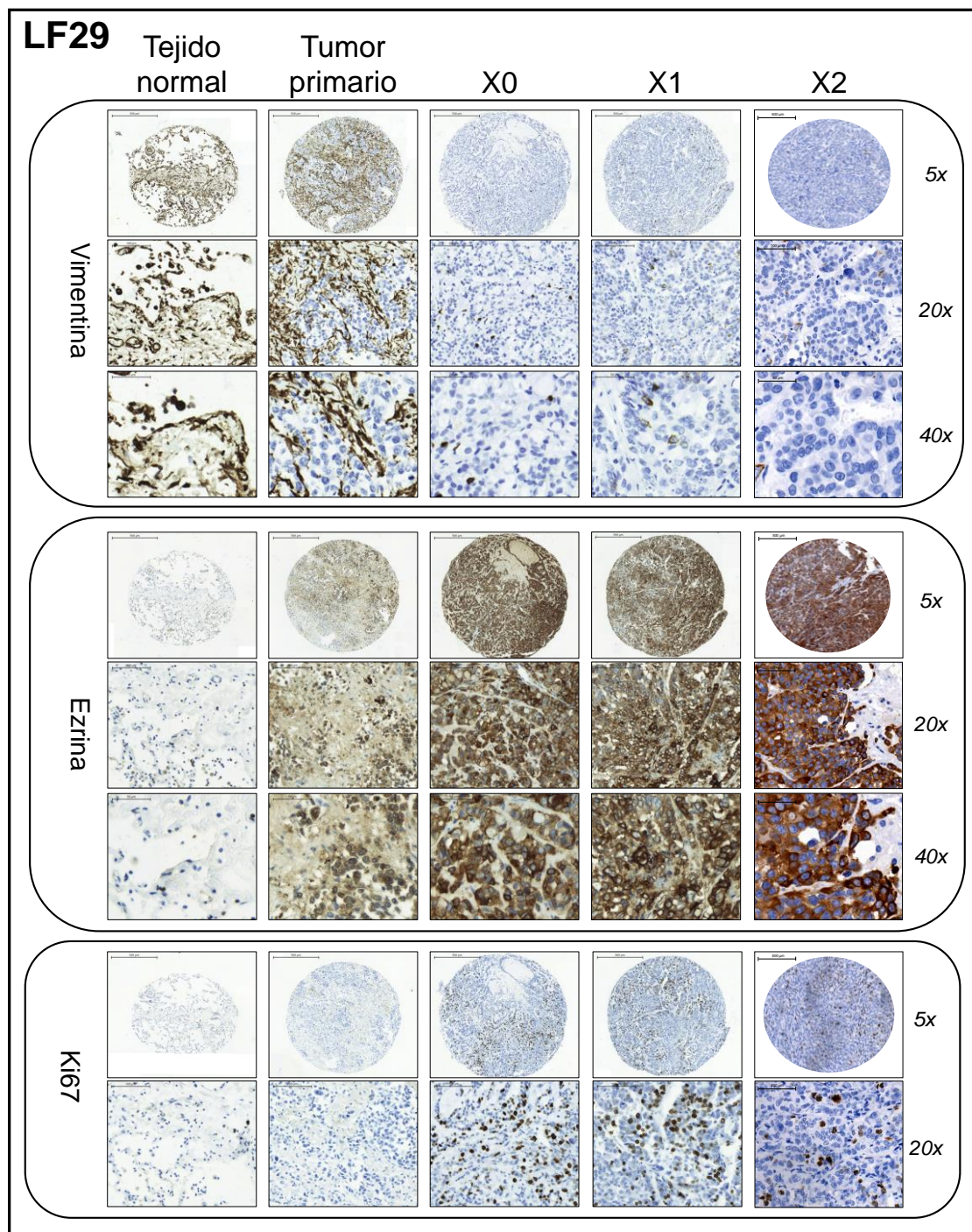


Figura 61. TMA de la muestra LF29 con inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67.

3.4. Análisis comparativo semicuantitativo de imágenes de inmunohistoquímica y correlación clínica

3.4.1. Comparación de CK7/CK20/TTF1 entre diferentes subtipos de la colección de PDX

Estudios previos han mostrado que los PDX derivados de CPNM conservan los rasgos morfológicos y moleculares del tumor primario correspondiente ^{421,423,546,547}. Sin embargo, algunos autores también han apuntado que, en PDX de CPNM, menos del 60% de los xenoinjertos preservan las características del tumor original ⁴²². Una vez mostrados en el apartado anterior los paneles de inmunohistoquímica descriptiva y de interés de todos los pacientes y pases de la colección de PDX, cabe comparar estos.

El patrón esperado de tinción CK7+/CK20-/TTF1+ se observó y preservó a través de los pases de PDX (desde X0 a X2) en los ADC sólidos diferenciados: LF05 y LF15 (Figura 62A). Sin embargo, el ADC sólido restante de la colección, LF29, preservaba los marcajes del tumor primario hasta el pase X1 y perdía la expresión de TTF1 en el pase X2. La expresión de CK7 en los ADC sólidos aumentaba en los sucesivos pases, así como el número aparente de células positivas para este marcaje.

El patrón de los ADC acinares (LF01, LF19, LF20) y el ADC mucinoso lepidico (LF09) mostraba más variabilidad pase a pase. LF20 mantenía el patrón de tinción CK7+/CK20-/TTF1+ en todos los pases (Figura 62B), mientras que LF19 preservaba los rasgos del tumor primario hasta el pase X1, perdiendo la expresión de CK7 y TTF1 en el pase X2. LF01 perdía la expresión de CK7. Por otro lado, LF09 expresaba CK7 en el tumor primario, pero esta se perdía en sucesivos pases desde el mismo X0, aunque mantenía la expresión de TTF1 en todos.

Bajo estas observaciones, los PDX de tumores derivados de ADC sólidos diferenciados preservaban mejor la histología del tumor primario a través de los

pases y mostraban signos de desdiferenciación por aumento de la intensidad y número de células positivas para CK7. Además, la morfología de ADC sólido se conservaba de manera más evidente, mientras que otras arquitecturas tisulares como los tumores acinares o lepidicos, además de perder la expresión de marcadores descriptivos, no se mantenían con los pases.

La única muestra de carcinoma escamoso, LF21, mostraba un patrón de expresión CK7+/TTF1-, característico de los CCEP, en X0, X1 y X2 (Figura 62 C).

Al margen de las células tumorales, en la mayoría de la colección se observó la pérdida de prácticamente todo el estroma y las células inmunitarias en el pase X2 (en algunos casos ya en X1), de acuerdo a lo observado por otros autores ^{421,556,557}. Los resultados sugieren, por tanto, que la preservación de las características del tumor primario en PDX dependen del subtipo de CPNM. Esta es una de las grandes limitaciones de este modelo *in vivo*. De acuerdo a otros autores ^{421,424}, esta limitación se extiende a las diferencias en la preservación de la expresión, macroestructura, tiempos de latencia y agresividad del tumor primario. De igual manera, el éxito en la implantación del tumor primario parece depender también de la adaptabilidad de las células tumorales, mientras que otros elementos que participan en el microambiente tumoral pierden protagonismo en este modelo.

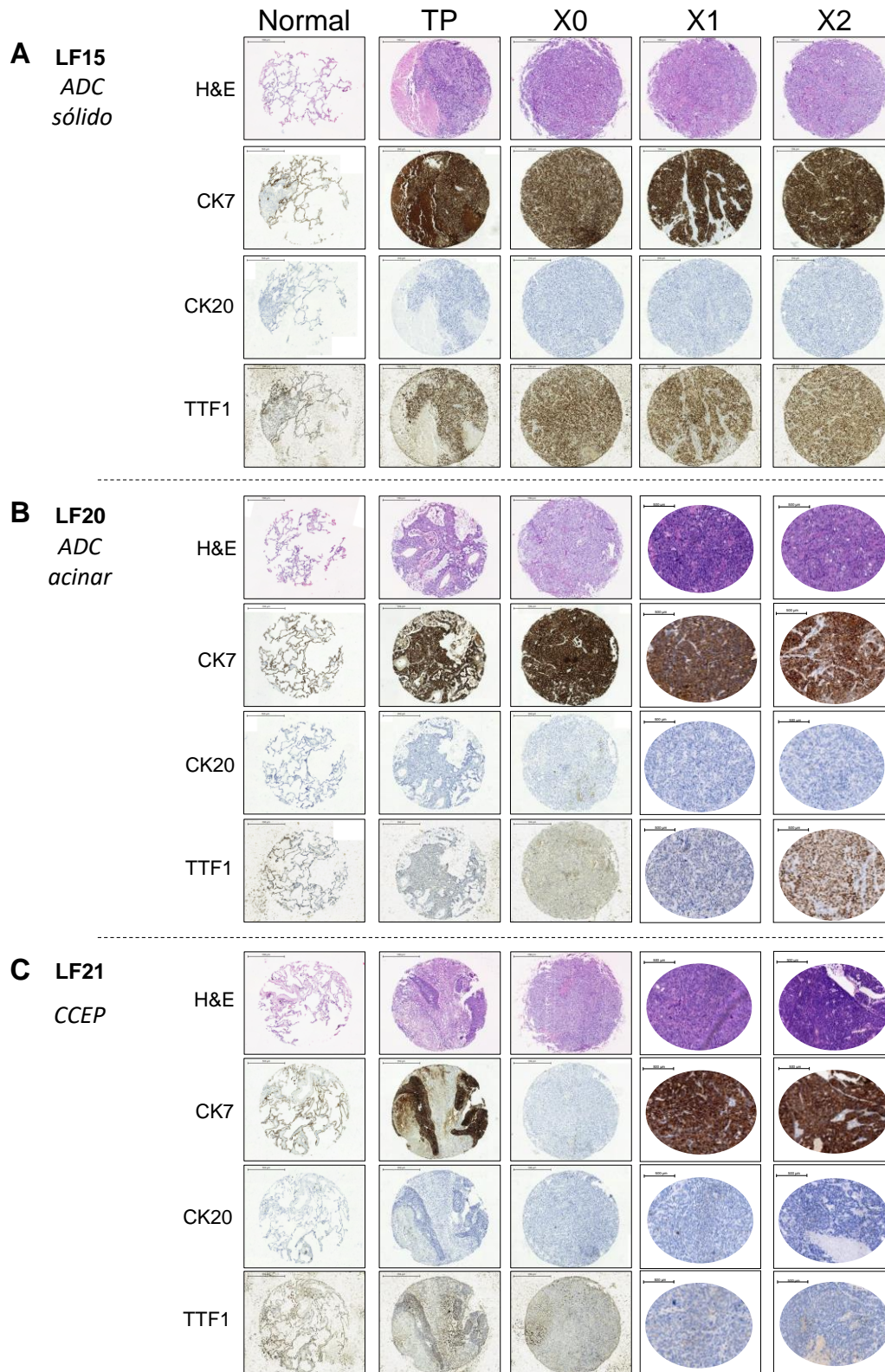


Figura 62. Inmunohistoquímica descriptiva de tejido pulmonar (normal), tumor primario (TP) y PDX (X0, X1, X2) de tres muestras representativas de tres subtipos de CPNM en nuestra colección. A) LF05 es un ADC sólido. B) LF20 es un ADC acinar. C) LF21 es un CCEP.

3.4.2. Análisis semicuantitativo de imágenes de inmunohistoquímica de los PDX

Además de la inmunohistoquímica descriptiva y la visualización de los marcadores de interés en este proyecto de tesis, las imágenes obtenidas por micromatrices de tejido (TMA) se analizaron de manera semicuantitativa. En nuestro caso empleamos el H-Score o Histoscore ⁴⁵²⁻⁴⁵⁴, una puntuación basada a su vez en otros métodos de evaluación semicuantitativa, y a partir de la cual Varghese y otros autores ⁴⁵¹ han desarrollado la herramienta *IHC profiler*, que se utiliza con el programa de análisis de imagen ImageJ y emplea la siguiente fórmula:

$$H - Score = (1 \times \% \text{ células ligeramente positivas}) + (2 \times \% \text{ células positivas}) + (3 \times \% \text{ células muy positivas})$$

El valor que adquiere el H-Score varía de 0 a 300 ⁴⁵¹, y su utilización automática en ImageJ se basa en el aprendizaje previo de la herramienta con múltiples imágenes previas que categorizan la expresión en los tres niveles de la fórmula y también la expresión negativa. Se pueden analizar proteínas de expresión citoplásmica o nuclear.

Habiendo observado previamente que la propagación secuencial con éxito de los PDX correlacionaba con menores tiempos de latencia y mayores tasas de crecimiento, se decidió analizar la expresión de marcadores asociados con la invasión celular y con rasgos metastásicos (Ezrina y Vimentina), así como la proliferación celular (Ki67).

Acorde a lo observado en la inmunohistoquímica descriptiva, Vimentina y Ezrina están altamente expresadas en el citoplasma de la mayoría de las muestras (y son tratadas como tal en el análisis semicuantitativo). Ezrina también se expresa en membrana, pero se calcula mediante esta herramienta como proteína citoplasmática igualmente. Se ha descrito que, mientras que en tejido normal la Ezrina se correlaciona con una expresión en membrana, su presencia o acumulación en citoplasma aumenta en cáncer ⁵⁵⁸. Esto se observa en nuestra colección de PDX. Ki67 es una proteína de expresión exclusivamente nuclear.

Respecto a los cambios de expresión pase a pase, de manera general la expresión de las tres proteínas se mantiene estable o aumenta en X2 en todas las muestras. Sin embargo, se observó que LF21 y LF29 perdieron la expresión de Vimentina en pases sucesivos. Esto coincide con el hecho de que, en los tumores primarios de esas muestras, las células que expresaban Vimentina eran las del estroma y, por tanto, a medida que éste se perdía con los pases también desaparecía la expresión de esta proteína en el corte.

Un análisis de los H-Score en todos los pacientes y pases arroja gran variabilidad entre las diferentes proteínas (Figura 63A): Vimentina una media de 146,2 y desviación estándar (SD) de 83,81; Ezrina una media de 115,1 y SD de 58,26; y Ki67 una media de 78,53 y SD de 29,75. Estos datos exponen la variabilidad en la expresión acorde a los rasgos de cada tumor. Al intentar asociar las distintas expresiones, se observa una correlación positiva en las expresiones de Ezrina y Ki67 (coeficiente de Spearman (Sc): 0,279), y Vimentina y Ki67 (Sc: 0,275) (Figura 63B). Ninguna correlación mostró significación estadística.

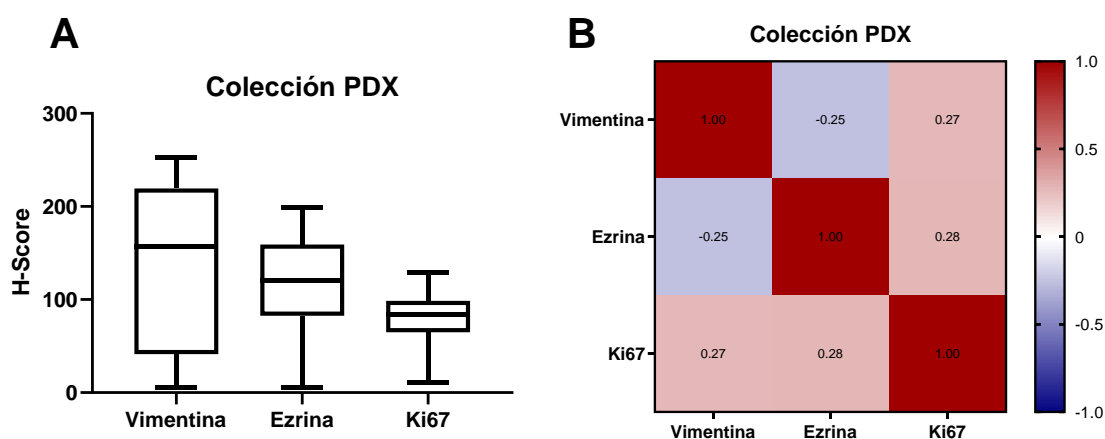


Figura 63. Expresión de Vimentina, Ezrina y Ki67 en los tumores PDX. Se empleó el H-Score para comparar la expresión A) Diagramas *box-whisker* de los H-Scores totales de cada proteína en todos los tumores primarios y PDX de la colección. B) Matriz de correlación obtenida de aplicar el coeficiente de correlación de Spearman a todos los H-Scores, por pares de proteínas. Los coeficientes de correlación son mostrados en cada casilla de comparación. *PDX: xenotrasplante derivado de paciente.*

3.4.2.1. Comparación del análisis semicuantitativo de la inmunohistoquímica con las variables clínicas de los pacientes

Mediante test estadísticos se compararon los H-Scores de las proteínas de interés con las variables clínico-patológicas de los pacientes de donde se obtuvieron las muestras que derivaron en los PDX. Se halló significación estadística entre la expresión de Vimentina y el estatus *KRAS*. LF05, LF09 y LF15 poseen la mutación G12C para este gen. Por tanto, hay una mayor presencia de esta proteína del citoesqueleto en muestras con *KRAS*-G12C (p-valor: 0,0357* tras test de Mann-Whitney). Para dicotomizar las variables entre expresión alta o expresión baja se empleó la mediana del H-Score para cada caso, en consonancia a otros autores ⁴⁵³. La mutación *KRAS* en CPNM se asocia a progresión tumoral y agresividad y, por tanto, este aumento de la Vimentina en muestras que albergan esta mutación podría correlacionarse con ello. En la Figura 64 se muestra cómo, aunque no es significativo, también hay mayor expresión de Ki67 en mutantes *KRAS* respecto a los tipo salvaje (WT).

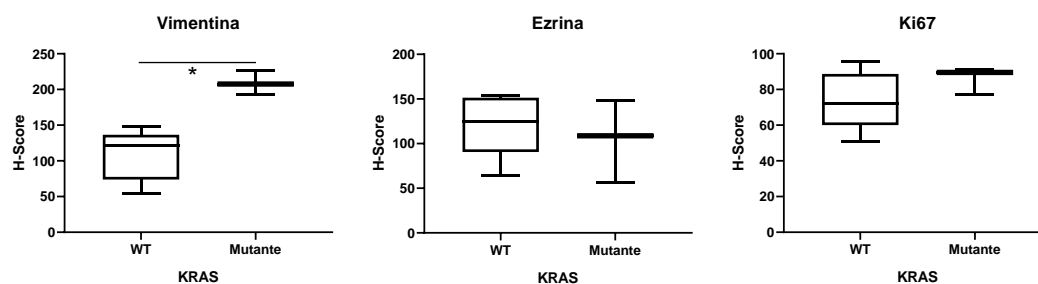


Figura 64. Comparación de la expresión de Vimentina, Ezrina y Ki67 en muestras con mutación *KRAS*-G12C frente a las no mutadas. WT: tipo salvaje (no mutadas). Mutante: *KRAS*-G12C. *p-valor < 0,05.

3.4.2.2. Comparación de la expresión de Vimentina, Ezrina y Ki67 por subtipos de ADC de pulmón

Además de analizar los H-Score de las proteínas de interés en la colección completa de PDX derivada de los 8 pacientes, se compararon también según los dos principales subtipos de adenocarcinoma (ADC): acinar (LF01, LF19, LF20) y sólido (LF05, LF15, LF29). Los carcinomas son tumores de origen epitelial que, en ocasiones, no expresan Vimentina por su agudo estatus epitelial. Esto se puede observar en algunas de las muestras, como LF01 (Figura 65A), donde la Vimentina se expresa en las fibras de estroma, pero no en las células tumorales en el cáncer primario. Sin embargo, en sucesivos pases la Vimentina se expresa en todas las células tumorales de manera más intensa y sin localización específica en el corte. Lo mismo sucede con LF19 (Figura 55) y LF20 (Figura 57), los otros ADC acinares de la colección, con una baja expresión en X0 de Vimentina, pero alta expresión y extendida en X1 y X2. Este resultado concuerda con las observaciones de algunos autores, que indican que los tumores en PDX a menudo se desdiferencian a través de los pases y, en un cierto punto, desarrollan un programa de EMT ⁴⁶⁹.

Los valores medios de expresión en base a los H-Score en los ADC acinares son más bajos respecto a la colección total de PDX (Figura 65B): Vimentina (media: 122,3; SD: 66,02), Ezrina (media: 114; SD: 66,35) y Ki67 (media: 76,12; SD: 36,72). Al correlacionar las proteínas en ADC acinares, hay una relación significativa entre la expresión de Ezrina y Ki67 (Sc: 0,601; p-valor: 0,043*) (Figura 65C). Se requerirían más análisis para observar si la señalización de estas proteínas en ADC acinares es distinta a la de otros subtipos de cáncer de pulmón

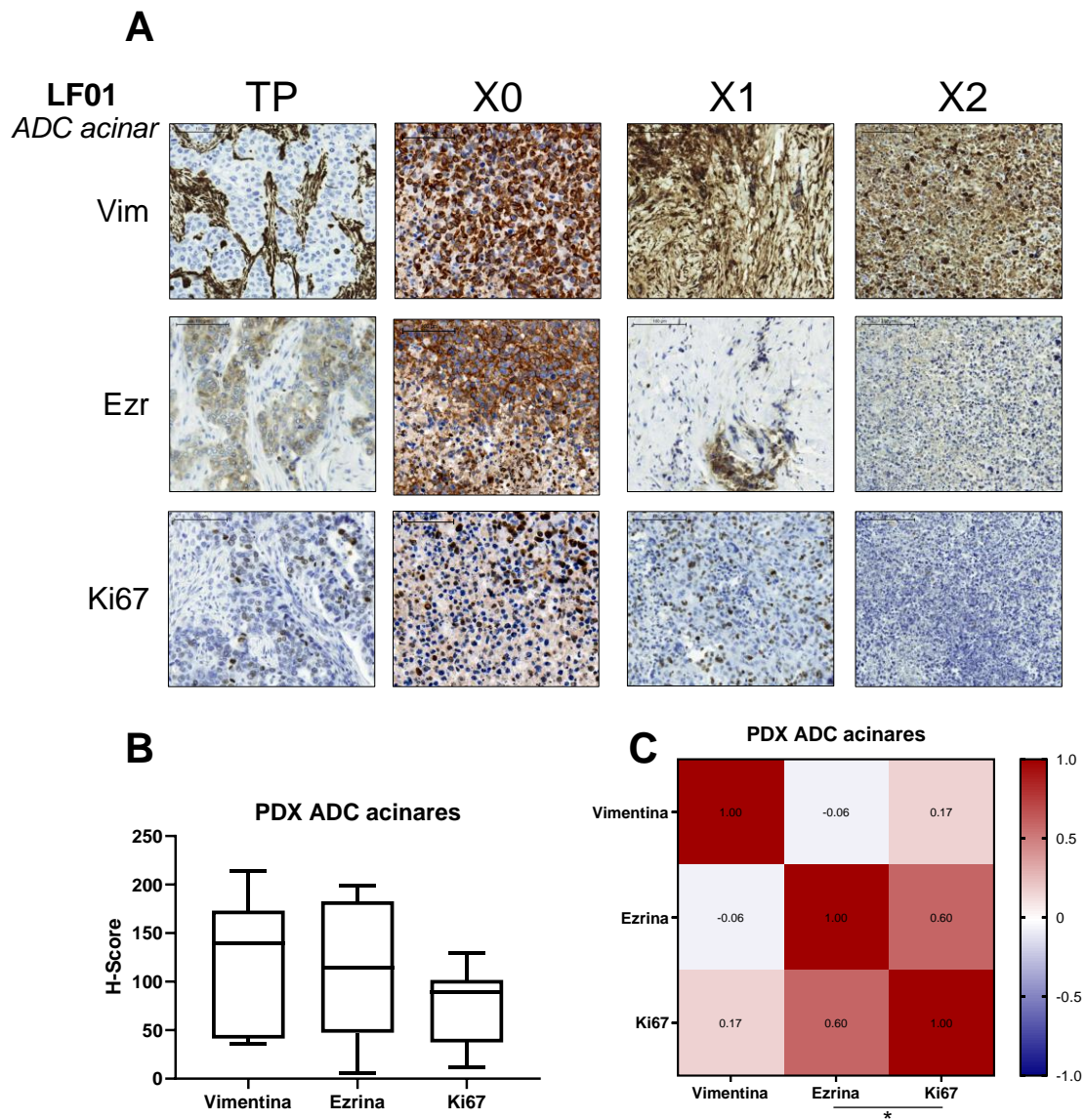


Figura 65. ADC acinares: inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67. A) Inmunohistoquímica de las proteínas indicadas en LF01. Magnificación 20x. B) Diagramas *box-whisker* de los H-Scores totales de cada proteína en muestras de ADC acinar (LF01, LF19, LF20). C) Matriz de correlación obtenida de aplicar el coeficiente de correlación de Spearman a todos los H-Scores de muestras de ADC acinar, por pares de proteínas. Los coeficientes son mostrados en cada casilla de comparación. *: *p*-valor < 0,05. ADC: adenocarcinoma. PDX: xenoinjertos derivados de paciente.

Por otro lado, los ADC sólidos (LF05, LF15, LF29) muestran una expresión variable de Vimentina. Para estas comparaciones, solo se tuvieron en consideración los datos de LF05 y LF15, ya que LF29 muestra un fenotipo distinto al ser clasificado como tumor indiferenciado. Por ejemplo, en LF05 (Figura 49) y LF15 (Figura 53, Figura 66A) Vimentina se expresa en las células

tumorales y en el estroma, mientras que en LF29 (Figura 61) solo aparece en el estroma y desaparece totalmente en los pases X1 y X2. Ezrina se expresa más específicamente en las células del carcinoma, y en los tres casos de ADC sólido se observa un aumento en su expresión, tanto en términos de intensidad como de localización. En los ADC acinares la expresión de Ezrina era más variable, con cambios de localización subcelular e intensidad entre pases. En conjunto, en los ADC sólidos diferenciados (LF05, LF15) se observa una mayor expresión de Vimentina (media: 217,4; mediana: 237,1; SD: 34,37) y expresión ligeramente superior de Ezrina (media: 128,3; mediana: 128,4; SD: 31,01). Ki67 también tiene una expresión media mayor (media: 90,50; mediana: 92,69; SD: 15,71) en LF05 y LF15 (Figura 66B).

Estos resultados sugieren una potencial conexión entre la expresión de Vimentina y Ezrina, y los ADC sólidos de pulmón. De hecho, esto se refuerza con el estudio de correlación de H-Scores de ambas proteínas en este subtipo (Figura 66C), donde se observa un vínculo de expresión significativo entre Vimentina y Ezrina (Sc: 0,905, p-valor: 0,005**). También se observa correlación positiva (sin significación estadística) entre Vimentina y Ki67 (Sc: 0,714), y Ezrina y Ki67 (Sc: 0,452). Aunque un mayor número de muestras y otros ensayos serían necesarios para profundizar en estas correlaciones, puede haber una conexión entre las proteínas estudiadas y la progresión de los ADC sólidos en CPNM. LF05 y LF15 eran muestras mutadas en *KRAS*, lo cual también podría correlacionar a Vimentina y Ezrina con un fenotipo más proliferativo. Los tiempos medios de latencia (MLT) de estos tumores en ratón también muestran una implantación más rápida en estos casos. Por tanto, la adquisición de un fenotipo más agresivo en pases sucesivos puede depender de una señalización oncogénica por *KRAS* y puede reflejar la evolución de la enfermedad en el paciente.

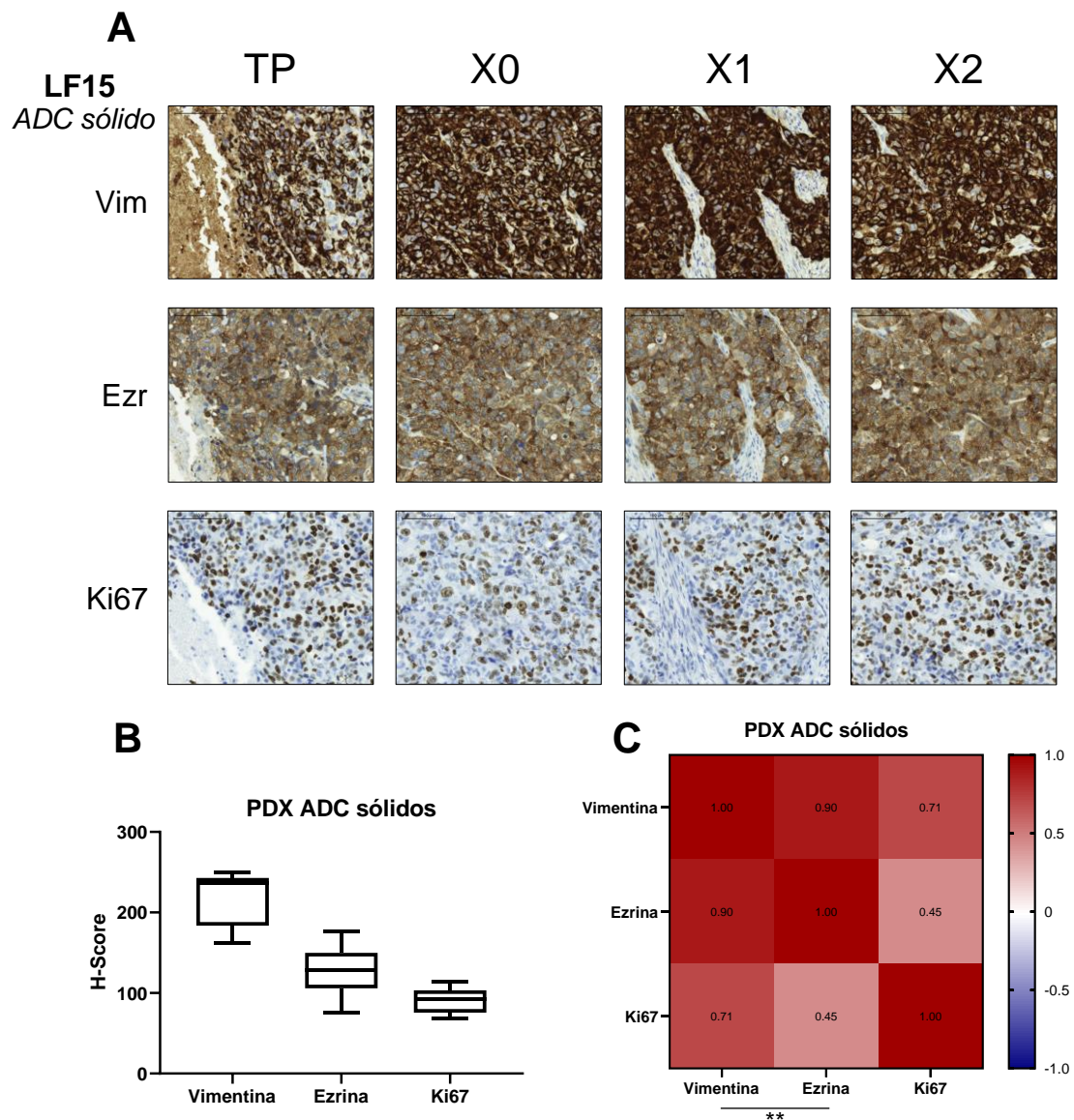


Figura 66. ADC sólidos: inmunohistoquímica de Vimentina, Ezrina y Ki67. A) Inmunohistoquímica de las proteínas indicadas en LF15. Magnificación 20x. B) Diagramas *box-whisker* de los H-Scores totales de cada proteína en muestras de ADC sólido diferenciado (LF05, LF15). C) Matriz de correlación obtenida de aplicar el coeficiente de correlación de Spearman a todos los H-Scores de muestras de ADC sólido diferenciado, por pares de proteínas. Los coeficientes son mostrados en cada casilla de comparación. **: p -valor < 0,005. ADC: adenocarcinoma. PDX: xenoinjertos derivados de paciente.

Las muestras LF21 (carcinoma escamoso) y LF09 (ADC mucinoso lepidico) no se incluyeron en estos análisis comparativos porque sus subtipos son casos únicos en nuestra colección de PDX, además de mostrar expresiones variables de las proteínas de interés, especialmente Vimentina. En el caso de LF21, la expresión de Vimentina desaparecía tras el X0 mientras que Ezrina se

incrementó con los pases. En LF09 se observaba un incremento de Vimentina y Ezrina en X2.

3.4.2.3. Ki67 como marcador de proliferación. Correlación con mutación *KRAS*, supervivencia e implantación en ADC sólidos

De la colección de 8 pacientes que desarrollaron PDX de CPNM, dos de ellos mostraron una clara progresión en la expresión de Ki67 desde el primer pase (X0) hasta el tercero (X2): LF05 y LF15 (Figura 67A, Figura 67B). En resultados mostrados previamente de LF05 y LF15, se indicó también que en estas muestras se producía un incremento de Vimentina en los sucesivos pases; y que la expresión de Ki67 (media: 90,5; SD: 15,71) era superior a la media de la colección completa de PDX (media: 78,53; SD: 29,75). Estas muestras son ADC sólidos mutados en *KRAS* (G12C), fenotipo que otros autores han observado como más proliferativo en CPNM. Además, pacientes con ADC de pulmón en estadio I, mutación en *KRAS* y alta expresión de Ki67 se asocian a un mayor riesgo de recurrencia en comparación a aquellos con *KRAS* WT y con baja expresión de Ki67⁵⁵⁹. Todo esto es consistente con la adaptación del tumor al ambiente murino en cada pase y, como consecuencia, con el aumento de células tumorales^{383,424}. Esta presión selectiva también beneficia a los subtipos sólidos⁴²⁵, como LF05 y LF15.

Por otro lado, cabe destacar que los PDX derivados de LF09, muestra catalogada como ADC mucinoso lepidico, el cual es considerado un subtipo menos agresivo de cáncer de pulmón, también poseen la mutación G12C en *KRAS* y, al igual que sucedía con las otras muestras mutadas (LF05, LF15), mantenía una elevada expresión de Ki67 a partir de X0 y por tanto su agresividad también podría verse incrementada por dicha mutación (Figura 67B).

A pesar del bajo número de muestras en la colección, se llevó a cabo un análisis de supervivencia con Vimentina, Ezrina y Ki67 (para ello se dicotomizó entre expresión elevada y expresión baja de cada proteína en función de la mediana del H-Score en cada caso). Las curvas de Kaplan-Meier (Figura 67C) muestran

que una mayor expresión de Ezrina se asocia a baja supervivencia de manera significativa (p -valor: 0,0144*). Ezrina ya ha sido postulada como marcador de mal pronóstico en diferentes tipos de cáncer, entre ellos el CPNM^{560,561}. Aunque no de manera significativa, en nuestra colección de PDX una mayor expresión de Ki67 también correlacionaba con peor supervivencia de los pacientes de origen. Este resultado sugiere que, en adelante, podría ser interesante evaluar los niveles de expresión de ambas proteínas de manera combinada como factor pronóstico.

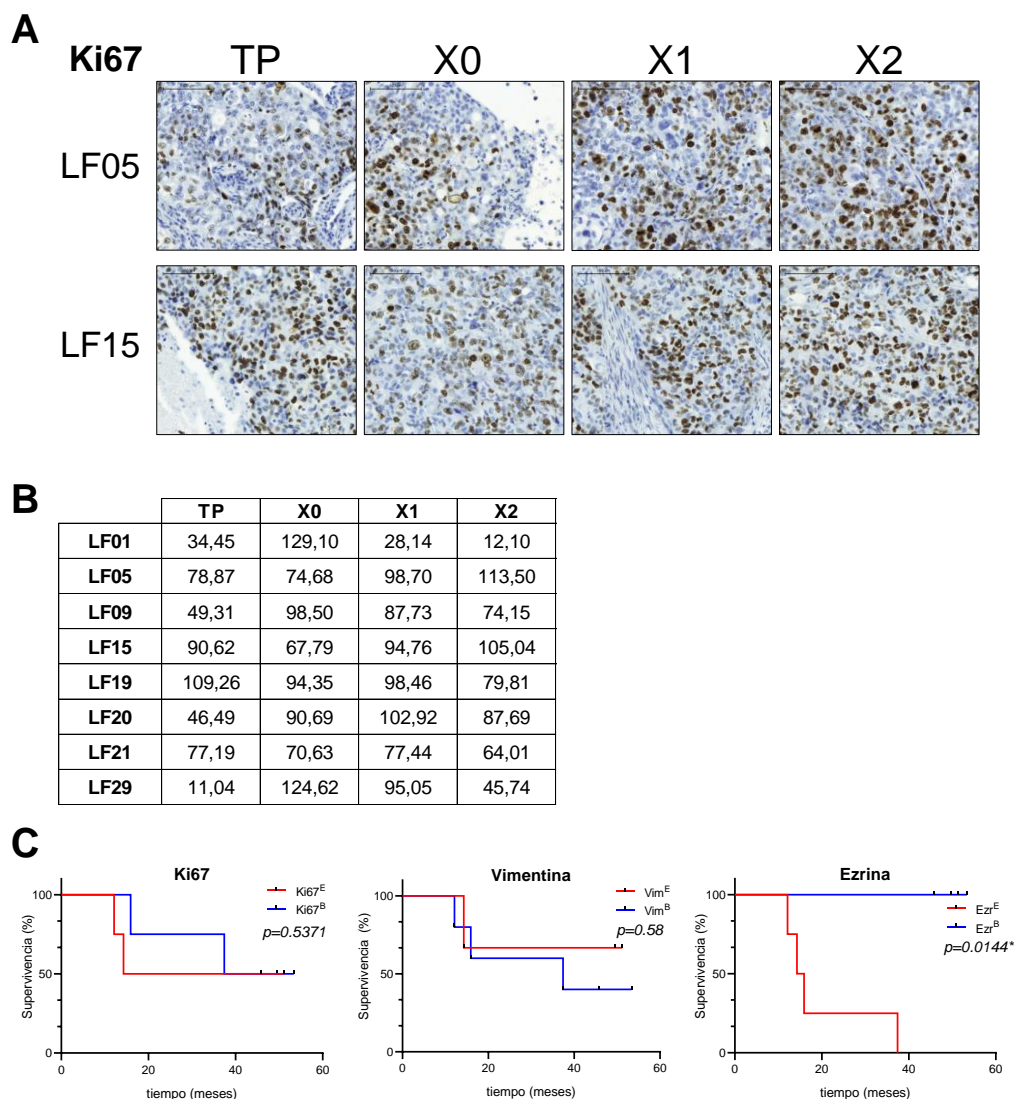


Figura 67. Incremento de Ki67 a través de los pases y evaluación de la supervivencia asociada a Ki67, Vimentina y Ezrina. A) Inmunohistoquímica de la progresión de la expresión de Ki67 a través de los pases en LF05 y LF15. Las barras de escala indican 100 μ m. Magnificación 20x. B) H-Scores medios de Ki67 en cada tumor primario y pase de PDX de cada muestra. C) Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de los pacientes que desarrollaron PDX en relación con la expresión mediana de Ki67, Vimentina y Ezrina. *En curvas de supervivencia, E: elevada expresión. B: baja expresión.*

Los resultados mostrados en este capítulo han sido publicados en la revista *Cancers* en un artículo original de investigación titulado “*Increased tumor growth rate and mesenchymal properties of NSCLC-Patient-Derived Xenograft models during serial transplantation*”⁵⁶². Estos se centran en el potencial del modelo *in vivo* de xenotrasplante derivado de paciente en ratón (PDX) para conocer la evolución del tumor, para entender a nivel molecular posibles cambios fenotípicos y el comportamiento de diferentes subtipos de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), así como su utilidad para profundizar en dinámicas de expresión de proteínas de interés en cáncer. En concordancia con el resto del trabajo mostrado en la tesis doctoral donde se ha estudiado la transición epitelio-mesénquima (EMT) y las células madre tumorales (CSC), en nuestro caso estas proteínas eran Vimentina y Ezrina. La plataforma de PDX también pone en valor el empleo de las micromatrices de tejido (TMA) para el análisis masivo de la expresión proteica *in situ*, actualizando una técnica clásica como es la inmunohistoquímica. La colección de PDX se encuentra en crecimiento, lo que ayudaría a validar estadísticamente algunos de los resultados preliminares mostrados. Ensayos de expresión génica y de citometría de flujo con las muestras de PDX serán implementados próximamente para completar la caracterización de los tumores PDX y dar robustez a esta plataforma para su uso en investigación básica y traslacional.

DISCUSIÓN

Discusión del Capítulo 1:

Cultivos celulares en 3D para el estudio de CSC

El CPNM es una enfermedad heterogénea a nivel molecular y clínico. La histopatología de un tumor puede diferir significativamente entre los pacientes y la heterogeneidad entre tumores es muy frecuente. La heterogeneidad intertumoral e intratumoral hace necesario identificar las poblaciones celulares presentes en cada caso y sus rasgos moleculares. Entre estas poblaciones, las CSC resultan de interés por su pluripotencia, agresividad y asociación a estadios avanzados del cáncer y resistencias a tratamientos ^{563,564}.

El estudio de las CSC en tumores sólidos se ha basado sobre todo en dos tipos de ensayos experimentales: la formación de tumoresferas *in vitro* en cultivos en suspensión o sin adherencia, y la generación de tumores *in vivo* al implantar células cancerosas en un modelo de ratón inmunodeprimido. La formación de esferas en placas de baja adherencia (cultivo 3D) es un método bien descrito para aislar, identificar y enriquecer células madre de diferentes tejidos ^{565,566}. Además de en tumores sólidos, las líneas celulares inmortalizadas se han utilizado ampliamente para estudiar las CSC, pero el uso de tumores primarios derivados de paciente refleja mejor las condiciones del tumor original. Además, el uso de cultivos primarios permite correlacionar los resultados obtenidos con variables clínico-patológicas de los pacientes de origen, siendo esta información más limitada en las líneas celulares. Por ello, aunque establecer cultivos primarios es costoso y tiene más dificultades técnicas, los resultados derivados de ellos permiten reforzar los descubrimientos en el campo de las CSC. La formulación del medio de cultivo, sin suero y con factores que mantengan la población CSC, es esencial ⁵⁶⁷.

Los cultivos en 3D preservan las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, por lo que se aproximan más fielmente a la realidad biológica del tumor o los tejidos respecto a los tradicionales cultivos 2D ³⁹⁷. Por tanto, se asume que las tumoresferas generadas a partir de estos cultivos son modelos apropiados para estudiar la migración celular, diferenciación, supervivencia, proliferación y resistencia a fármacos ⁵⁶⁸. La organización tridimensional de estos

cultivos también implica una mejor representación de la polarización celular ³⁹⁷. Por otro lado, aunque a menudo se cita la preservación de la arquitectura intercelular y respecto a la matriz, el crecimiento en 3D preserva mejor la mecánica del tejido que, a su vez, es esencial para la señalización de cada célula individualmente a través del citoesqueleto ⁵⁶⁹.

Marcadores de CSC de CPNM y su potencia para caracterizar esta subpoblación celular. Metodologías rutinarias

Los marcadores CSC habitualmente utilizados en CPNM coinciden con aquellos que se venían empleando en tumores sólidos o en cánceres hematopoyéticos, donde primero se identificaron las células madre tumorales y donde realmente se estableció el paradigma de las CSC. Estos suelen ser proteínas de superficie y enzimas detoxificadoras: CD44, CD133, CD90, CD166, CD326, CD90, ALDH1. Actualmente, después de la investigación realizada en las últimas dos décadas, no se ha esclarecido la existencia de un conjunto de marcadores universales para todos los tumores. Además, alteraciones en las vías de señalización de Notch, Wnt y Hedgehog se han descrito como importantes para favorecer la proliferación de esta población de células tumorales pluripotentes y su autorrenovación ¹⁴⁷.

Con el objetivo de aislar y caracterizar CSC de CPNM en el laboratorio hemos establecido un protocolo para la disgregación de biopsias frescas de tumores de pacientes con CPNM que nos permite obtener una suspensión de células con una viabilidad del 75% y su posterior caracterización por citometría de flujo. Hemos optimizado también el análisis multiparamétrico por citometría de flujo para la caracterización de los marcadores específicos de superficie y subpoblaciones celulares. Para demostrar la capacidad de autorrenovación y de inducir tumores de las CSC, hemos establecido el ensayo de generación de esferas tumorales *in vitro* a partir de tejido tumoral de pacientes y la generación de modelos de tumores *in vivo* en ratón a partir de la inyección de estas células.

En el transcurso de este proyecto hemos obtenido muestras de 20 pacientes con CPNM, en estadio resecable y que no han recibido tratamiento previamente. El

análisis por citometría de flujo muestra que la expresión de las proteínas de superficie CD326 (EpCAM) y CD166 (ALCAM) en tumoresferas derivadas de pacientes (ESF) no se diferencia significativamente de la expresión en las contrapartes cultivadas en adherencia (ADH) y que, por tanto, son células más diferenciadas. Sin embargo, sí que hay diferencias en la expresión de CD44, con más células positivas en muestras cultivadas en adherencia que en tumoresferas. En tres de las muestras analizadas la diferencia fue estadísticamente significativa (FIS303, FIS315, FIS317). No obstante, el análisis por microscopía de fluorescencia de los mismos marcadores junto a CD133 (que no fue posible analizar por citometría de flujo) mostró que la expresión de CD166 y CD44, así como CD133, fue más elevada en tumoresferas. Concretamente, para CD133 se observó una expresión muy baja en ADH (se aprecia una señal débil en el citoplasma de FIS303, FIS315 FIS317, FIS320), pero que aumenta considerablemente en las ESF con una mayor presencia en la membrana plasmática (sobre todo en FIS303, FIS317, FIS320). CD133 ha sido considerado un marcador relevante en CSC de CPNM, pero su dificultad para detectarlo siempre ha sido un hándicap para su estudio sistemático. Algunos autores han observado que en cáncer de pulmón las células CD133+ se corresponden con la población más tumorigénica *in vivo* y con mayor presencia en tumoresferas *in vitro* ¹⁶¹.

La presencia intracelular de CD326 y CD166, y ciertas diferencias en la localización entre ADH y ESF podrían estar indicado eventos de señalización específica en cada tipo de cultivo celular. Al utilizar líneas celulares establecidas de CPNM (A549, H1650, H1395, PC9, H441), los resultados de citometría de flujo de nuevo mostraron que no había diferencias entre ADH y ESF en la expresión de CD326, con la excepción de A549, en la que se observaba que un 58,6% de las células en ADH lo expresaban frente a un 28,9% en ESF. Esto pone en duda a CD326 como marcador único para detectar poblaciones de CSC de CPNM enriquecidas en las tumoresferas. Por otro lado, el porcentaje de células que expresaban CD166 y CD44 era mayor en los cultivos ADH que en las ESF en términos generales, con ciertas diferencias significativas. Al igual que en las muestras derivadas de pacientes, CD44 era el marcador más dispar entre ambas condiciones de cultivo. Estos resultados sugieren que es necesario la

combinación de varios marcadores de CSC para identificar estas poblaciones celulares.

Las pocas diferencias observadas en la expresión de estas proteínas entre células crecidas en ADH y ESF pueden deberse a que las células crecidas en ADH mantienen características de CSC, al ser cultivos que no están totalmente diferenciados. Por ello, algunas de estas células crecidas en ADH serían las responsables del éxito en generar tumor al ser implantadas en un modelo de ratón inmunodeprimido (igual que también tienen éxito las ESF), es decir que tendrían capacidad iniciadora de tumores al igual que las ESF.

Aunque CD326, CD166 y CD44 no sean marcadores definitivos para identificar CSC en CPNM, de manera individual, podrían estar contribuyendo a rutas de señalización clave en la progresión del cáncer y podrían participar en el enriquecimiento de estas poblaciones por el sistema de cultivo 3D. La línea celular H1650 de ADC de pulmón alberga mutaciones en los genes *EGFR* y *TP53*, prevalentes en cáncer de pulmón. Nuestro experimento de separación de subpoblaciones CD326/CD166 y su posterior cultivo en suspensión mostró que las poblaciones CD326+ forman tumoresferas, pero las CD326- no, por lo que este marcador es clave en el crecimiento como esferas de las células de esta línea celular. Respecto a CD166, la población CD326+/CD166+ formaba esferas, pero la población CD326+/CD166- también. De hecho, las CD326+/CD166- formaban mayor número de esferas y de mayor tamaño. La incapacidad de la población CD326- para generar esferas indica la importancia de esta glicoproteína de superficie en la proliferación de las células de H1650 y en la generación de uniones intercelulares. Se ha demostrado en algunos tipos de cáncer la regulación de la expresión de *EPCAM* (CD326) por parte de p53, reprimiendo p53 la expresión de *EPCAM* a nivel transcripcional⁴⁶⁴. La carencia de p53 en H1650 correlaciona con un aumento considerable de la expresión de CD326 (EpCAM). Esto podría explicar la capacidad de H1650 para originar esferas en suspensión y de la misma incapacidad en ausencia de CD326^{464–466}. La interacción directa entre *ALCAM* (CD166) y *EGFR* (mutado con activación constitutiva en H1650) también puede estar afectando a la morfología y número de tumoresferas formadas en las subpoblaciones CD166 positivas y negativas

⁴⁶⁸. CD326 (EpCAM) y CD166 (ALCAM) parecen ser clave en la tumorigénesis en la línea de CPNM H1650 (mutada en *EGFR* y *TP53*).

Influencia de la citoquina TGF- β 1 en el crecimiento de tumoresferas. La relación CSC-EMT

Múltiples estudios han sugerido una relación entre las CSC y la transición epitelio-mesénquima (EMT) ^{374,469}. La citoquina TGF- β 1, a través de su unión al receptor de TGF- β tipo II, que a su vez heterodimeriza con el receptor TGF- β tipo I, desencadena la vía de señalización de TGF- β , que en última instancia provocaría cambios en el citoesqueleto que llevarían a la transición desde un fenotipo epitelial a otro mesenquimal (EMT) ²⁴⁷. Esta vía de señalización, por otro lado, también aumentaría la expresión de marcadores de pluripotencia.

En este trabajo se trataron tumoresferas derivadas de dos líneas de adenocarcinoma de pulmón no microcítico (A549, H441) y una de osteosarcoma (U2OS). A549 y H441 contienen mutaciones en *KRAS* (Tabla 3), y además H441 tiene mutaciones en *TP53* y A549 en *STK11* y carece del locus de *CDKN2A*, gen que codifica hasta tres variantes transcripcionales que son supresores tumorales: p16INK4a, p14ARF y p12 ⁴⁷⁰. En A549, al añadir TGF- β 1, el crecimiento pasa de una morfología irregular a una cierta esfericidad. En H441 se observa una mayor compactación de las esferas (ya esféricas en condiciones control en esta línea) también con TGF- β 1, aunque menor número y tamaño. En conjunto, la activación de la ruta de señalización por TGF β , con una posible inducción de la EMT, puede estar afectando a la población de células pluripotentes de estas líneas, provocando cambios en la expresión de marcadores CSC y reorganizaciones en su citoesqueleto, y aumentando las uniones intercelulares. Por otro lado, también se ha descrito la detención del ciclo celular por señalización por TGF β a través de inhibidores de CDK, lo cual afectaría a la proliferación. Por ello, TGF- β 1 es considerado supresor tumoral. Este estado de crecimiento lento también es una capacidad de las células madre ⁴⁷². Aunque esto no ha sido estudiado en profundidad en este trabajo, la ralentización del crecimiento, un posible aumento de la población CSC y la mayor

esfericidad podrían explicar las diferencias morfológicas al añadir TGF- β 1. La desaparición del lumen en H441 al añadir TGF- β 1 frente a las esferas control puede deberse a cambios en el citoesqueleto relacionados con la EMT. En H441, donde las células se disponen como una barrera epitelial con un espacio vacío central, esta citoquina podría estar favoreciendo la transición a un fenotipo donde las células adquieren motilidad, ocupando las regiones centrales donde se situaría el lumen, y compactando la esfera. Un resultado preliminar de citometría para marcadores CSC en las esferas de A549 al añadir TGF- β 1 muestra una muy elevada expresión de CD44 y baja expresión de CD326 y CD166. En esta línea celular, al contrario que en H1650, CD326 y CD166 parecen no ser relevantes en la adquisición de una morfología más esférica. Por otro lado, CD44 modula relaciones célula-célula y célula-matriz. También con RhoA, proteína de reorganización de citoesqueleto, fibras de estrés y adhesiones focales ⁴⁷⁴. También se ha descrito su correlación con Nanog ⁴⁷⁵. Este conjunto de interacciones para CD44, además de su consideración como marcador de pluripotencia ⁴⁷⁶, muestran que la activación de la ruta de TGF- β puede estar induciendo la EMT (cambios en citoesqueleto) y el fenotipo migratorio (interacción con matriz) en A549. Estudios previos han mostrado que la subpoblación de células de CPNM con elevada expresión de ALDH y CD44 muestra capacidad de autorrenovación, clonogenicidad, tumorigenicidad, capacidad invasiva y resistencia a quimioterapia. En conjunto, los rasgos de un fenotipo de pluripotencia aumentan en la subpoblación con elevada expresión de CD44 (y ALDH) ¹⁹². Estos resultados preliminares sugieren que la activación de la vía de señalización de TGF β en A549 parece correlacionar con la expresión del marcador CD44. La asociación de la adición exógena de TGF- β 1 y la adquisición de los rasgos de pluripotencia podría conectar a la población CSC con la transición epitelio-mesénquima (EMT).

Una firma génica de CSC en CPNM con valor pronóstico

Para la identificación y caracterización de las CSC en CPNM, evaluar los perfiles de expresión génica de muestras de líneas establecidas y muestras derivadas de pacientes de CPNM es esencial como un primer paso para identificar nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas. Múltiples marcadores se han propuesto en CPNM, con resultados ambiguos. En este sentido, el uso de líneas celulares ha llevado incluso a resultados contradictorios empleando las mismas líneas y analizando los mismos marcadores ^{174,176,177}. Por ello, para la obtención de una firma génica de CSC en CPNM se emplearon células de tumores primarios para generar tumoresferas y, sin separar subpoblaciones en base a ciertos marcadores, estudiar sus propiedades CSC. El éxito obtenido en el establecimiento de cultivos primarios de cáncer de pulmón fue del 40%, concordante con resultados obtenidos por otros autores ^{161,570}. No se observaron correlaciones entre el estatus mutacional de las muestras (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *KRAS*, *TP53*) ni otras variables clínico-patológicas y el éxito en el establecimiento de dichos cultivos.

Se llevaron a cabo diversos análisis para asegurar que las tumoresferas de cáncer de pulmón estaban enriquecidas en células con propiedades CSC: crecimiento exponencial *in vitro*, autorrenovación y tumorigenicidad *in vivo*. Esto concuerda con otros estudios de CSC de cáncer de pulmón y corrobora esta aproximación para enriquecer muestras en poblaciones CSC ^{174,178}. Además de estas propiedades, las CSC tienen otras propiedades que comparten con otras poblaciones de células pluripotentes, como son la sobreexpresión de rutas de pluripotencia, y enzimas y otras proteínas que detoxifican y protegen la integridad celular ^{147,571,572}.

Como se ha comentado, en la literatura científica hay multitud de ejemplos de genes y moléculas propuestos como biomarcadores de CSC. Muchos de ellos emplean una línea celular o se centran en grupos concretos de genes o proteínas, lo que dificulta reconocer cuáles realmente tienen implicación en las CSC de cáncer de pulmón. En este trabajo, las tumoresferas generadas mostraban mayor expresión en genes que codifican para enzimas citoprotectoras (*ALDH1A1*), inductores de pluripotencia (*KLF4*, *NANOG*),

reguladores del ciclo celular (*CDKN1A*, *JUNB*, *MDM2*), genes relacionados con metástasis (*CD44*, *THY1*, *MMP9*, *SNAI1*, *ITGA6*) y componentes de la ruta de Notch (*NOTCH1*, *NOTCH3*, *DLL4*, *JAG1*) y de la de Wnt (*CTNNB1*, *GSK3B*). El análisis *in silico* posterior derivó en la obtención de una firma génica que permitía diferenciar las tumoresferas de las células adherentes diferenciadas derivadas de los mismos tumores primarios. Los genes que conforman dicha firma son *CDKN1A*, *NOTCH3*, *CD44*, *NANOG*, *SNAI1* e *ITGA6*. Las proteínas expresadas a partir de estos genes se vinculan a rasgos CSC y son potenciales dianas terapéuticas. *CDKN1A* codifica para p21, un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina que, igual que sucede con Notch3, han sido asociados a autorrenovación y tumorigenicidad ^{573–575}. Snail además regula Nanog, induciendo pluripotencia en cancer de pulmón. Integrina $\alpha 6$, Snail y CD44 han sido asociados con migración celular, invasión y metástasis ^{576–579}.

De manera similar a otros estudios, se correlacionó la firma génica con el pronóstico de la enfermedad en los pacientes ^{580–584}. Muchos de estos estudios se centran en marcadores individuales específicos de una ruta de señalización o en proteínas directamente relacionadas. El empleo de una firma génica más compleja permite identificar subtipos moleculares de la enfermedad y predecir mejor el desarrollo en el paciente ^{581,584}. En nuestro caso, el empleo de una firma génica basada en la expresión de *CDKN1A*, *ITGA6* y *SNAI1* permitió identificar subtipos moleculares de la enfermedad y proporcionar información de pronóstico relevante para pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Esta se validó con una cohorte independiente de pacientes con adenocarcinoma, pudiéndose observar cómo en los casos donde había mayor expresión de estos genes, menor era la supervivencia. Esta firma génica puede emplearse junto con otras caracterizaciones clínicas tradicionales como los estadios tumorales, como así se ha hecho en otros casos donde se han estudiado valores de expresión génica ⁵⁸², o para poder tomar decisiones terapéuticas.

Discusión del Capítulo 2:

La EMT mediada por TGF- β : regulación y función de JunB y eIF5A2

La EMT es un proceso importante para la fisiología normal, como la embriogénesis y la reparación de tejidos, pero tiene implicaciones en la enfermedad como la metástasis tumoral. Durante la EMT se producen cambios en la morfología celular y los programas de expresión génica que promueven la transición de una célula sedentaria a una célula móvil. Una de las vías de señalización implicadas en la EMT es la del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). En células epiteliales normales y premalignas, la activación de la señalización de TGF- β puede promover la detención del ciclo celular y la apoptosis para mantener la homeostasis de los tejidos y suprimir el crecimiento celular aberrante, previniendo así la transformación celular incontrolable y la progresión tumoral. Sin embargo, se observa que la expresión elevada de TGF- β y la activación de la señalización intracelular iniciada por el receptor de TGF- β en microambientes tumorales facilitan la metástasis tumoral en muchos tipos de cáncer. Durante la diferenciación celular mediada por TGF- β , la conversión fenotípica se combina con la reorganización dinámica de las redes transcripcionales centrales que involucran al complejo Smad, factores de transcripción específicos de EMT y superamplificadores (*super-enhancers*), entre ellos JunB.

JunB en la señalización por TGF β y EMT en cáncer

En el laboratorio se realizó un análisis de transcriptómica comparativa con células de osteosarcoma donde se había inactivado a JunB, y ChIP-seq con anticuerpo anti-JunB. Los resultados obtenidos mostraron que JunB, como otros factores de transcripción de la familia AP-1, está implicado en múltiples procesos biológicos⁵⁸⁵. Los resultados revelaron que JunB es clave en la regulación de ciclo celular, señalización por TGF β , EMT e invasión celular. Una de las dianas transcripcionales de JunB identificadas es *CCNE1*, que codifica para Ciclina E1, que regula la progresión del ciclo celular y tumorigénesis en algunos casos como

hepatocarcinoma ⁵⁸⁶, y cuya sobreexpresión se ha observado en muchos tumores ⁵⁸⁷. Uno de los genes más sobreexpresados al silenciar JunB era *TGFB2*. Además, se identificó a *TGFB2* como diana transcripcional directa de JunB en el ensayo de ChIP-seq. Estos resultados sugieren que JunB podría ser un represor transcripcional directo de *TGFB2*. También se identificaron otras dianas putativas de JunB relacionadas con la ruta Notch, como *RBPJ*, *JAG1*, *SNAI2* y *LIN28B*.

Recientemente se ha descrito que JunB es un mediador de la EMT inducida por TGF- β 1 en CPNM ²⁹⁹. Así, nos enfrentamos a una situación paradójica donde, por un lado, observamos que JunB reprime la expresión del ARNm de *TGFB2* y, por otro lado, promueve la señalización de TGF- β 1 y EMT. Para establecer si JunB pudiera ejercer un papel positivo en EMT tras una exposición prolongada a la concentración de ligando TGF- β 1 (4 ng/ml durante 96 horas), se midió el nivel de expresión de JunB y varias de las dianas identificadas en los ensayos de transcriptómica y ChIP-seq en células de CPNM A549. Observamos que el ligando TGF- β 1 indujo la expresión de JunB transitoriamente concomitante con Ciclina E1. Los niveles de Vimentina aumentaron tras 96 horas de tratamiento, y la expresión de TGF- β 2 coincidió con la desaparición de JunB, a las 672 horas de tratamiento (con un aumento previo a las 96 horas al disminuir el nivel de JunB). Estos resultados indican que JunB podría mediar el inicio de la EMT dependiente de TGF- β 1, y que una vez iniciada, la desaparición de JunB permitiría la expresión de otras proteínas como TGF- β 2 para promover la transición hacia el fenotipo mesenquimal. Uno de los desafíos futuros será dilucidar el mecanismo por el cual, tras la estimulación del ligando TGF- β 1 exógeno, se regula la homeostasis de la proteína JunB y analizar si la inhibición de la actividad de JunB solo o en combinación con inhibidores de TGF- β 1 afectarían al proceso de la EMT en CPNM. La vía de señalización de TGF- β se considera una diana terapéutica en varios cánceres, y los inhibidores de TGF- β 1 se encuentran actualmente en desarrollo clínico ⁴⁷². Es importante predecir qué pacientes pueden beneficiarse de los inhibidores de la vía TGF- β para una terapia personalizada.

eIF5A2 en la señalización por TGF β y EMT en cáncer

En la última década, la introducción de los métodos de secuenciación masiva de nueva generación y la creación de portales con repositorios de los datos de secuenciación de los genomas de pacientes con cáncer ha permitido averiguar el perfil de mutaciones en los distintos tumores e identificar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento del cáncer. Un análisis realizado en *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) para buscar alteraciones genéticas en CPNM ha revelado que la región del cromosoma 3q26.2 está amplificada en un 48% de CCEP. En esta región se encuentra el gen que codifica el factor de elongación de traducción eIF5A2⁵⁸⁸. En un 19% de ADC eIF5A2 se encuentra amplificado y con el ARNm regulado positivamente. eIF5A2 se ha propuesto como un oncogén que podría contribuir a la carcinogénesis y la progresión tumoral, incluido el CPNM. Sin embargo, el papel patogénico de eIF5A2 está todavía poco estudiado, lo que sugiere realizar una mayor investigación sobre las funciones de eIF5A2 en cáncer para validar esta ruta como una posible diana terapéutica. La proteína eIF5A2 es específica de testículo y cerebro^{339,340}. Esta proteína sufre una modificación postraduccional que genera un residuo inusual conocido como hipusina. Esta modificación (hipusinación) es necesaria para su actividad³³². Niveles elevados de eIF5A2 se correlacionan con mal pronóstico en pacientes con cáncer gástrico, CPNM en estadio avanzado y cáncer de ovario^{341,342}. Apoyando un papel importante en la metástasis, la sobreexpresión de eIF5A2 promueve la transición epitelial-mesenquimal (EMT)³⁴³. Por lo tanto, eIF5A2 podría utilizarse como marcador de mal pronóstico en algunos tipos de tumores. Teniendo en cuenta el papel emergente de la hipusinación de eIF5A en enfermedades humanas incluyendo cáncer, se han desarrollado inhibidores de enzimas biosintéticas involucradas en la hipusinación, como GC7. Este inhibidor ha mostrado resultados prometedores en modelos de cáncer preclínico^{514,589}.

En nuestro laboratorio estudiamos funciones de eIF5A2, como su papel como oncogén y promotor de la EMT, la migración y la invasión. Los resultados obtenidos al silenciar eIF5A2 en presencia de la citoquina TGF- β 1 en A549 (en cultivos en adherencia) muestran que proteínas relacionadas con cambios en el citoesqueleto y EMT (Vimentina, FHOD1, Ezrina) se expresan en menor medida que en condiciones de no silenciamiento. La adición de TGF- β 1 promueve la

EMT y, por tanto, debería estimular la síntesis de estas tres proteínas como parte de su programa morfológico ²⁵⁵. Este resultado puede sugerir que la expresión de FHOD1 y Ezrina (la disminución en Vimentina no es tan apreciable) parece afectada por la inhibición de eIF5A2.

También se estudió la sobreexpresión de eIF5A2 en las líneas A549, H1395, PC9 y H441. La ganancia de función de eIF5A2 parece que puede participar en la inducción de la transición epitelio-mesénquima, o al menos en la estimulación de la expresión de proteínas que puedan participar en los cambios morfológicos de esta. Aunque no se observó una estimulación de la expresión de Vimentina al sobreexpresar eIF5A2, este factor sí estimula la expresión de proteínas ricas en dominios poliprolina como la proteína Ezrina y la formina FHOD1 en CPNM. Las forminas están involucradas en el proceso de polimerización de actina y están vinculadas a la progresión del cáncer y otras enfermedades ^{347,590,591}. Por otro lado, Ezrina es una proteína implicada en la EMT y metástasis, que conecta el citoesqueleto de actina con la membrana celular ³⁴⁸. Estas proteínas podrían ser dianas potenciales de eIF5A2 durante la traducción. En conjunto, estas observaciones sugieren que la sobreexpresión aberrante de eIF5A2 estimularía la progresión tumoral mediante la inducción de la traducción de proteínas involucradas en la organización del citoesqueleto de actina y la EMT.

Por último, cabe destacar que un vínculo en el que sería interesante profundizar en futuros estudios es el de CD44 y Ezrina. Las proteínas ERM (Ezrina-Radixina-Moesina) trabajan en la unión del citoesqueleto de actina a la matriz extracelular y a múltiples proteínas asociadas a membranas, entre ellas CD44. CD44 y Ezrina trabajan como correceptores, siendo CD44 receptor de moléculas de la matriz extracelular como el ácido hialurónico. Como algunos autores indican, esta unión parece ser importante en eventos de invasión ^{592,593}. De esta manera, se investigaría la conexión entre EMT y CSC mediada por estas proteínas.

Discusión del Capítulo 3:

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

El uso de modelos animales en el estudio del cáncer es esencial, y es de especial utilidad en análisis de patogenicidad y en el diseño de nuevas terapias y su validación preclínica. De los múltiples modelos, los xenoinjertos derivados de paciente (PDX) en ratón se han utilizado como avatares de pacientes de cáncer para predecir respuestas a terapias personalizadas y en la prognosis a tiempo real ^{422,424}. La amplificación del tejido tumoral del paciente en varios ratones durante sucesivos pases permite una mejor comprensión de la evolución molecular que puede regular la metástasis y resistencia a terapias. Por tanto, los PDX se pueden emplear para el testeo de la eficacia de compuestos antitumorales, para guiar el diseño de un tratamiento personalizado y para la identificación de biomarcadores. Sin embargo, mientras que algunas de las ventajas de los PDX son su robustez en términos de preservar la heterogeneidad, la genética y la estructura del tumor original ⁴¹⁷, algunos autores destacan que el tumor evoluciona a nivel genético y fenotípico de manera divergente en el ratón respecto a como lo hace en el paciente ^{420,594}.

En el trabajo mostrado en este último capítulo de resultados, establecimos 9 PDX (8 CPNM, 1 CPCP) en ratones NSG a partir de las muestras de 33 pacientes de cáncer de pulmón procedentes de pacientes del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia). Las 33 muestras se trasplantaron en ratón inmunodeprimido, analizamos la eficiencia de éxito del injerto en ratón y correlacionamos esta con otras variables clínicas de los pacientes. El porcentaje de éxito de los injertos fue del 27,3%, similar a otras colecciones, con porcentajes del 35% ⁵³⁵ y del 37,2% ⁵⁹⁵; pero inferior al obtenido por otros autores con colecciones de PDX de pulmón: 39,2% ⁴²⁵ y 67,7% ⁵¹⁷. El tamaño de la biopsia de tumor primario afectaba al éxito en la implantación posterior en ratón, con tamaños intermedios (25-100 mm³) como responsables de todas las implantaciones. La causa es que en tamaños pequeños de la biopsia las células

viables se encuentran en menor número y esto puede ser crítico para el éxito en la implantación. En relación con las variables clínico-patológicas de los pacientes, los test aplicados estaban condicionados por el relativamente bajo número de muestras, que limitaban la potencia estadística. Es por ello que los resultados obtenidos deberían ser evaluados en el futuro con una muestra más grande con tal de poner a prueba su aplicabilidad. La supervivencia global de los 9 pacientes cuyas muestras desarrollaron PDX era inferior en comparación al resto de los pacientes (Figura 42, Figura 43), un 40,4% frente a 66,7%, observándose por tanto una relación entre el éxito del implante heterotípico y la agresividad del tumor primario.

El análisis de secuenciación masiva efectuado sobre los tumores primarios que se habían implantado con éxito permitió detectar mutaciones oncogénicas que refuerzan esta menor supervivencia y la mayor agresividad. De hecho, de los 7 ADC, 3 poseían la mutación KRAS-G12C. Las mutaciones en *KRAS* en ADC pulmonares se estiman entre un 25-35% de todas las mutaciones y, de estas, KRAS-G12C es la predominante (46%)⁶⁹⁻⁷². Avances recientes han permitido el desarrollo de inhibidores para el tratamiento de ADC con esta mutación⁵⁹⁶, por lo que nuestra colección de PDX puede resultar de utilidad para testar su efecto en el crecimiento tumoral y para predecir la respuesta terapéutica. Este análisis también se puede extender a los PDX de pases sucesivos, con la finalidad de observar si la evolución en estos PDX se asocia también a la adquisición de resistencia.

Junto a la correlación con variables clínicas, efectuamos pases sucesivos de los tumores generados en los PDX que nos permitieron analizar la arquitectura tumoral y patrones histológicos. En términos generales, el aspecto histológico era similar a los tumores parentales, aunque se perdía el estroma y células inmunitarias. Así, este modelo presentaría limitaciones en el estudio de las interacciones del microambiente tumoral. También observamos que, en general, la latencia tumoral en el primer pase era mayor que en el resto de pases, donde los tumores crecían más rápido, indicando la adquisición de rasgos de agresividad con la evolución de los PDX y una mejor adaptación al ambiente murino.

Además, gracias a los TMA, que permiten realizar inmunohistoquímica masiva de los tumores primarios, tejido pulmonar normal y PDX, se pudieron analizar de manera semicuantitativa imágenes de las muestras para corroborar la evolución de la histología original. Para ello, se recurrió a una combinación de marcadores que, en clínica, sirve para el diagnóstico del CPNM: tinción de hematoxilina y eosina, CK7, CK20 y TTF1. También analizamos la expresión del marcador de proliferación canónico Ki67, y marcadores de EMT Vimentina y Ezrina ³⁴⁸. Muchos estudios apoyan la relación entre la EMT y la progresión de muchos tipos de tumores, incluido el CPNM ⁵⁹⁷. Además, tanto Vimentina como Ki67 se asocian a peor pronóstico ^{544,548,598}. Ezrina, por otro lado, se asocia a invasión local y metástasis ^{554,560,599}, se ha descrito su papel en la EMT inducida por TGF- β 1 en líneas celulares de CPNM ⁵⁰⁸, y se ha asociado también a peor pronóstico en CPNM ^{560,561}. Al igual que otros autores han descrito previamente ^{422,423,425}, nosotros observamos que los ADC sólidos se adaptan mejor al modelo y generan PDX con más facilidad que otros subtipos de CPNM como el ADC acinar, puesto que las características histoquímicas del tumor primario se preservan mejor en los subsiguientes pases (X0-X2). En nuestro trabajo, las muestras LF05 y LF15 (ADC sólidos) mantienen mejor la firma CK7+/CK20-/TTF1+. Además, los MLT de los ADC sólidos eran más cortos en comparación a los PDX de ADC acinares. Dentro de los ADC acinares, las muestras LF01 y LF19 perdían la expresión de CK7 en alguno de los pases, y además aumentaban la expresión de Vimentina. El cambio cruzado en la expresión de CK7 por Vimentina puede asociarse a EMT, ya que la Vimentina confiere a las células de carcinoma más flexibilidad para variar su morfología y adaptarse mejor a procesos de migración ⁶⁰⁰. Una de las muestras de ADC lepidico, LF09, perdió la expresión de CK7 y CK20 durante los pases, pero preservaba la expresión de Vimentina y Ki67. Este tumor poseía la mutación KRAS-G12C, que podría estar influyendo en estos cambios que se dan en los PDX.

Algunas características del tumor primario, como la diferenciación y el estatus EMT, pueden afectar a la evolución del tumor en sucesivos pases en los PDX. Además, estos procesos oncogénicos pueden tener un impacto diferente según el subtipo de cáncer ^{601,602}. Cuando se evalúa la expresión de Vimentina y Ezrina, se observa una correlación entre ambas proteínas en todas nuestras muestras

excepto en LF21 (único carcinoma escamoso de la colección). En esta muestra, la expresión de Vimentina se circunscribía al estroma del tumor primario. Como dicho estroma se perdía con los pases, la expresión de esta proteína también disminuía o desaparecía. Por otro lado, resulta de interés observar cómo la expresión de Vimentina y Ezrina era mayor en muestras mutadas en *KRAS*-G12C. Las mutaciones oncogénicas en *KRAS* se asocian a peor pronóstico, mayor proliferación celular, invasión y EMT⁶⁰³. Mientras que Vimentina y *KRAS* han sido ya estudiadas conjuntamente en ADC de pulmón⁶⁰⁴, no se ha establecido todavía un vínculo entre mutaciones oncogénicas de *KRAS* y Ezrina. Sin embargo, sí se ha descrito que la actividad de varias rutas de señalización, como la de EGFR, Src, Akt-PI3K y PKA, afecta a la expresión de Ezrina y que, a su vez, Ezrina regula la señalización de estas vías⁶⁰⁵. Además, una elevada expresión de Ezrina se asocia a la mutación oncogénica *BRAF* en cáncer colorrectal⁶⁰⁶.

En consonancia con los resultados clínicos antes discutidos, los PDX derivados de tumores poseedores de la mutación en *KRAS* también correlacionaban con fenotipos más proliferativos: aumento progresivo de la expresión de Ki67 y tiempos de latencia más cortos. Este fenotipo proliferativo también se observaba en muestras con elevada expresión de Ezrina, y un aumento de esta proteína, además de una mayor localización en el citoplasma durante los pases X0-X2.

En conclusión, nuestros datos indican que los tumores más agresivos tienen una mayor capacidad de implantación en ratones y, por tanto, el éxito de esta implantación puede ser indicativo de un mal pronóstico. Por otro lado, los tumores en los PDX, al estar en un microambiente diferente, y como se va perdiendo el estroma y las células inmunitarias, pueden evolucionar durante sucesivos pases y sufrir una presión selectiva hacia células más proliferativas y mesenquimales asociadas a expresiones más elevadas de proteínas como Vimentina, Ezrina y Ki67. Por lo tanto, los estudios preclínicos sobre PDX pueden realizarse preferentemente en pasajes tempranos en los que aún se mantienen las características del tumor primario y el microambiente tumoral. La alta expresión de estas tres proteínas en tumores sugiere una mayor agresividad y, por tanto, la evaluación de su expresión podría utilizarse en combinación como marcador pronóstico de CPNM.

CONCLUSIONES

1. Se ha optimizado un protocolo para la disgregación de tumores de CPNM para la obtención de una suspensión celular con aplicación para el aislamiento de CSC y la generación de cultivos primarios.
2. Se han generado 8 cultivos primarios a partir de tumores de CPNM y generado tumoresferas a partir de ellos. Las tumoresferas tienen capacidad de autorrenovación, diferenciación y de desarrollar tumor al ser implantadas en ratón, mostrando características de población CSC.
3. Las tumoresferas y cultivos crecidos en adherencia derivados de tumores de CPNM y de líneas celulares establecidas expresan las proteínas de membrana plasmática CD326, CD166, CD44 y CD133, habituales marcadores de CSC de CPNM.
4. En la línea celular establecida H1650, la proteína CD326 es esencial para la formación de tumoresferas.
5. La adición de TGF- β 1 en tumoresferas derivadas de las líneas celulares de CPNM establecidas A549 y H441 aumenta la esfericidad y la compactación de estas. La señalización por TGF- β 1 podría estar relacionada con la EMT y el aumento de la población CSC.
6. Los análisis de expresión génica diferenciales entre tumoresferas de CPNM y las mismas células crecidas en adherencia permitieron identificar una firma génica característica de CSC, basada en la expresión de los genes *NANOG*, *ITGA6*, *CD44*, *NOTCH3*, *CDKN1A* y *SNAI1*. Además, la expresión de *ITGA6*, *CDKN1A* y *SNAI1* tiene valor pronóstico en ADC de pulmón. La traslación de esta firma puede resultar de interés en la clínica.
7. El factor de transcripción JunB, perteneciente a la familia de proteínas AP-1, participa en la regulación inicial de la EMT inducida por TGF- β 1 en la línea celular de CPNM A549. Su actividad podría ser relevante para la regulación de la expresión de Ciclina E1, Jag1, Lin-28B y TGF- β 2.

8. La sobreexpresión transitoria de eIF5A2 estimula la expresión de Ezrina y FHOD1 en líneas de CPNM (A549, H1395, PC9, H441). Estas proteínas contienen motivos ricos en prolina y se han asociado a la EMT. Esto sugiere que eIF5A2 podría estar participando en la regulación de la expresión de estas proteínas para promover la EMT.
9. La hipusinación, modificación postraduccional que sufre eIF5A2, y la existencia de inhibidores específicos frente a esta modificación, potencian el interés de eIF5A2 en cáncer, y abren la puerta al estudio de dianas terapéuticas asociadas a este factor.
10. Se ha generado una colección de 9 modelos PDX de CPNM con interés para cribado terapéutico, y para analizar la evolución del tumor *in vivo* y profundizar en la biología molecular de la progresión tumoral.
11. Los análisis mediante inmunohistoquímica en los tumores primarios y tumores PDX de Vimentina, Ezrina y Ki67 muestran que el análisis de la expresión de estas proteínas podría ser de utilidad para evaluar el estatus EMT, la proliferación y la capacidad invasiva de los tumores de CPNM.
12. Los ADC sólidos son el subtipo de CPNM que mejor implanta en ratón y que mejor preserva su fenotipo original a lo largo de los pases de PDX. La mutación KRAS-G12C tiene relevancia en el éxito en la implantación de tumores y nuestros resultados sugieren que los tumores que la albergan son más agresivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Real Academia Española. Diccionario de la lengua española, 23.^a ed., [versión 23.3 en línea]. <https://dle.rae.es/cáncer>. Accessed November 20, 2019.
2. SEOM. Informe SEOM: las cifras del cáncer en España 2019. <https://seom.org/dmccancer/wp-content/uploads/2019/Informe-SEOM-cifras-cancer-2019.pdf>. Published 2019. Accessed November 25, 2019.
3. Weinberg RA. *The Biology of Cancer*; 2014.
4. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
6. Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*. 2010;29(41):5545-5555. doi:10.1038/onc.2010.323
7. Sudarsanam S, Johnson DE. Functional consequences of mTOR inhibition. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2010;13(1):31-40.
8. Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. *N Engl J Med*. 2006;355(10):1037-1046. doi:10.1056/NEJMra062285
9. Lipinski MM, Jacks T. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene*. 1999;18(55):7873-7882. doi:10.1038/sj.onc.1203244
10. Ghebranious N, Donehower LA. Mouse models in tumor suppression. *Oncogene*. 1998;17(25):3385-3400. doi:10.1038/sj.onc.1202573
11. Okada T, Lopez-Lago M, Giancotti FG. Merlin/NF-2 mediates contact inhibition of growth by suppressing recruitment of Rac to the plasma membrane. *J Cell Biol*. 2005;171(2):361-371. doi:10.1083/jcb.200503165
12. Massagué J. TGFbeta in Cancer. *Cell*. 2008;134(2):215-230. doi:10.1016/j.cell.2008.07.001
13. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science*. 1998;281(5381):1317-1322. doi:10.1126/science.281.5381.1317
14. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev*. 2007;21(22):2861-2873. doi:10.1101/gad.1599207
15. Lu Z, Luo RZ, Lu Y, et al. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J Clin Invest*. 2008;118(12):3917-3929. doi:10.1172/JCI35512
16. Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*. 2008;135(7):1161-1163. doi:10.1016/j.cell.2008.12.004
17. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005;6(8):611-622. doi:10.1038/nrg1656
18. Leão R, Apolónio JD, Lee D, Figueiredo A, Tabori U, Castelo-Branco P. Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer. *J Biomed Sci*. 2018;25(1):22. doi:10.1186/s12929-018-0422-8
19. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):9-18. doi:10.1093/carcin/bgp268
20. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86(3):353-364. doi:10.1016/s0092-8674(00)80108-7
21. Lv X, Li J, Zhang C, et al. The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism. *Genes Dis*. 2017;4(1):19-24. doi:10.1016/j.gendis.2016.11.003
22. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(2):118-132.

- doi:10.1038/nrc1276
23. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*. 2005;132(14):3151-3161. doi:10.1242/dev.01907
 24. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(5):392-401. doi:10.1038/nrc1877
 25. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol*. 2010;188(1):11-19. doi:10.1083/jcb.200909003
 26. Sabeh F, Shimizu-Hirota R, Weiss SJ. Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J Cell Biol*. 2009;185(1):11-19. doi:10.1083/jcb.200807195
 27. Shields JD, Kourtis IC, Tomei AA, Roberts JM, Swartz MA. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science*. 2010;328(5979):749-752. doi:10.1126/science.1185837
 28. Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC. Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res*. 2010;107:57-117. doi:10.1016/S0065-230X(10)07003-X
 29. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 1956;124(3215):269-270. doi:10.1126/science.124.3215.267
 30. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal-redux. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(1):1-11. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0209
 31. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1073-1081. doi:10.1093/carcin/bgp127
 32. Qian B-Z, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51. doi:10.1016/j.cell.2010.03.014
 33. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-899. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025
 34. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*. 2007;8(4):286-298. doi:10.1038/nrg2005
 35. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194(4260):23-28. doi:10.1126/science.959840
 36. Scott J, Marusyk A. Somatic clonal evolution: A selection-centric perspective. *Biochim Biophys Acta Rev cancer*. 2017;1867(2):139-150. doi:10.1016/j.bbcan.2017.01.006
 37. Vlashi E, Pajonk F. Cancer stem cells, cancer cell plasticity and radiation therapy. *Semin Cancer Biol*. 2015;31:28-35. doi:10.1016/j.semcancer.2014.07.001
 38. Tomlinson IP, Novelli MR, Bodmer WF. The mutation rate and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(25):14800-14803. doi:10.1073/pnas.93.25.14800
 39. Brücher BLD, Jamall IS. Somatic Mutation Theory - Why it's Wrong for Most Cancers. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38(5):1663-1680. doi:10.1159/000443106
 40. Lazebnik Y. What are the hallmarks of cancer? *Nat Rev Cancer*. 2010;10(4):232-233. doi:10.1038/nrc2827
 41. Sonnenschein C, Soto AM. The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: a critique. *J Biosci*. 2013;38(3):651-663. doi:10.1007/s12038-013-9335-6
 42. Brücher BLD, Jamall IS. Epistemology of the origin of cancer: a new paradigm. *BMC Cancer*. 2014;14(1):331. doi:10.1186/1471-2407-14-331
 43. Sonnenschein C, Soto AM. Somatic

- mutation theory of carcinogenesis: why it should be dropped and replaced. *Mol Carcinog.* 2000;29(4):205-211. doi:10.1002/1098-2744(200012)29:4<205::aid-mc1002>3.0.co;2-w
44. Rosenfeld S. Are the somatic mutation and tissue organization field theories of carcinogenesis incompatible? *Cancer Inform.* 2013;12:221-229. doi:10.4137/CIN.S13013
 45. National Cancer Institute Web Site. Dictionary of cancer terms. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>. Accessed October 15, 2019.
 46. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
 47. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España 2020. *Soc Española Oncol Médica.* 2020:36.
 48. Giangreco A, Groot KR, Janes SM. Lung cancer and lung stem cells: strange bedfellows? *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(6):547-553. doi:10.1164/rccm.200607-984PP
 49. Waqar SN, Morgensztern D. Treatment advances in small cell lung cancer (SCLC). *Pharmacol Ther.* 2017;180:16-23. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.06.002
 50. Meuwissen R, Linn SC, Linnoila RI, Zevenhoven J, Mooi WJ, Berns A. Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. *Cancer Cell.* 2003;4(3):181-189. doi:10.1016/s1535-6108(03)00220-4
 51. Radzikowska E, Głaz P, Roszkowski K. Lung cancer in women: age, smoking, histology, performance status, stage, initial treatment and survival. Population-based study of 20 561 cases. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2002;13(7):1087-1093. doi:10.1093/annonc/mdf187
 52. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2019. 2019.
 53. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(1):7-30. doi:10.3322/caac.21387
 54. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol.* 2015;10(9):1243-1260. doi:10.1097/JTO.0000000000000630
 55. Zugazagoitia J, Enguita AB, Nuñez JA, Iglesias L, Ponce S. The new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification from a clinical perspective: Current concepts and future prospects. *J Thorac Dis.* 2014;6:S526-S536. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2014.01.27
 56. Minna JD, Roth JA, Gazdar AF. Focus on lung cancer. *Cancer Cell.* 2002;1(1):49-52. doi:10.1016/S1535-6108(02)00027-2
 57. International Agency for Research on Cancer (IARC). Latest global cancer data, 2018. *World Heal Organ.* 2018;(September):13-15. <http://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>.
 58. Davidson MR, Gazdar AF, Clarke BE. The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. *J Thorac Dis.* 2013;5(SUPPL.5). doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.43
 59. Langer CJ, Besse B, Gualberto A, Brambilla E, Soria J-C. The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2010;28(36):5311-5320. doi:10.1200/JCO.2010.28.8126
 60. Fernandez FG, Battafarano RJ. Large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Cancer Control.* 2006;13(4):270-275.

- doi:10.1177/107327480601300404
61. Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, Kim CF, Wong K-K. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(8):535-546. doi:10.1038/nrc3775
62. Kay FU, Kandathil A, Batra K, Saboo SS, Abbara S, Rajiah P. Revisions to the Tumor, Node, Metastasis staging of lung cancer (8(th) edition): Rationale, radiologic findings and clinical implications. *World J Radiol*. 2017;9(6):269-279. doi:10.4329/wjr.v9.i6.269
63. Stanic K, Turnsek N, Vrankar M. Incorporation of EGFR mutation status into M descriptor of new TNM classification influences survival curves in non-small cell lung cancer patients. *Radiol Oncol*. 2019;53(4):453-458. doi:10.2478/raon-2019-0053
64. Cheung WKC, Nguyen DX. Lineage factors and differentiation states in lung cancer progression. *Oncogene*. 2015;34(47):5771-5780. doi:10.1038/onc.2015.85
65. Hochegger B, Langer FW, Irion K, et al. Pulmonary Acinus: Understanding the Computed Tomography Findings from an Acinar Perspective. *Lung*. 2019;197(3):259-265. doi:10.1007/s00408-019-00214-7
66. Jones KD. Whence lepidic?: The history of a Canadian neologism. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(12):1822-1824. doi:10.5858/arpa.2013-0144-HP
67. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary. *Proc Am Thorac Soc*. 2011;8(5):381-385. doi:10.1513/pats.201107-042ST
68. Inamura K. Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Front Oncol*. 2017;7(AUG):1-7.
- doi:10.3389/fonc.2017.00193
69. Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma: The cancer genome atlas research network. *Nature*. 2014;511(7511):543-550. doi:10.1038/nature13385
70. Imielinski M, Berger AH, Hammerman PS, et al. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell*. 2012;150(6):1107-1120. doi:10.1016/j.cell.2012.08.029
71. Ding L, Getz G, Wheeler DA, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2008;455(7216):1069-1075. doi:10.1038/nature07423
72. Heist RS, Engelman JA. SnapShot: non-small cell lung cancer. *Cancer Cell*. 2012;21(3):448.e2. doi:10.1016/j.ccr.2012.03.007
73. Pikor LA, Ramnarine VR, Lam S, Lam WL. Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer*. 2013;82(2):179-189. doi:10.1016/j.lungcan.2013.07.025
74. Calvayrac O, Pradines A, Pons E, Mazières J, Guibert N. Molecular biomarkers for lung adenocarcinoma. *Eur Respir J*. 2017;49(4). doi:10.1183/13993003.01734-2016
75. Zhao Z-R, Lin Y-B, Ng CSH, et al. Mutation Profile of Resected EGFR-Mutated Lung Adenocarcinoma by Next-Generation Sequencing. *Oncologist*. 2019;24(10):1368-1374. doi:10.1634/theoncologist.2018-0567
76. Saito M, Suzuki H, Kono K, Takenoshita S, Kohno T. Treatment of lung adenocarcinoma by molecular-targeted therapy and immunotherapy. *Surg Today*. 2018;48(1):1-8. doi:10.1007/s00595-017-1497-7
77. Rock JR, Randell SH, Hogan BLM. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech*. 2010;3(9-10):545-556.

- doi:10.1242/dmm.006031
78. Weiss J, Sos ML, Seidel D, et al. Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci Transl Med.* 2010;2(62):62ra93. doi:10.1126/scitranslmed.3001451
 79. Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH, et al. Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discov.* 2011;1(1):78-89. doi:10.1158/2159-8274.CD-11-0005
 80. Guagnano V, Kauffmann A, Wöhrle S, et al. FGFR genetic alterations predict for sensitivity to NVP-BGJ398, a selective pan-FGFR inhibitor. *Cancer Discov.* 2012;2(12):1118-1133. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0210
 81. Stewart PA, Welsh EA, Slebos RJC, et al. Proteogenomic landscape of squamous cell lung cancer. *Nat Commun.* 2019;10(1):3578. doi:10.1038/s41467-019-11452-x
 82. Heist RS, Sequist L V, Engelman JA. Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2012;7(5):924-933. doi:10.1097/JTO.0b013e31824cc334
 83. Myrdal G, Gustafsson G, Lambe M, Hörte LG, Ståhle E. Outcome after lung cancer surgery. Factors predicting early mortality and major morbidity. *Eur J cardio-thoracic Surg Off J Eur Assoc Cardio-thoracic Surg.* 2001;20(4):694-699. doi:10.1016/s1010-7940(01)00875-2
 84. Robinson CG, DeWees TA, El Naqa IM, et al. Patterns of failure after stereotactic body radiation therapy or lobar resection for clinical stage I non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2013;8(2):192-201. doi:10.1097/JTO.0b013e31827ce361
 85. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(5):584-594. doi:10.4065/83.5.584
 86. Goldstraw P, Ball D, Jett JR, et al. Non-small-cell lung cancer. *Lancet (London, England).* 2011;378(9804):1727-1740. doi:10.1016/S0140-6736(10)62101-0
 87. Osmani L, Askin F, Gabrielson E, Li QK. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy. *Semin Cancer Biol.* 2018;52(Pt 1):103-109. doi:10.1016/j.semcancer.2017.11.019
 88. Naylor EC, Desani JK, Chung PK. Targeted Therapy and Immunotherapy for Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2016;25(3):601-609. doi:10.1016/j.soc.2016.02.011
 89. Peters S, Taron M, Bubendorf L, Blackhall F, Stahel R. Treatment and detection of ALK-rearranged NSCLC. *Lung Cancer.* 2013;81(2):145-154. doi:10.1016/j.lungcan.2013.03.017
 90. Yoneda K, Imanishi N, Ichiki Y, Tanaka F. Treatment of Non-small Cell Lung Cancer with EGFR-mutations. *J UOEH.* 2019;41(2):153-163. doi:10.7888/juoe.41.153
 91. Du X, Shao Y, Qin H-F, Tai Y-H, Gao H-J. ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Thorac cancer.* 2018;9(4):423-430. doi:10.1111/1759-7714.12613
 92. Hirsch FR, Scagliotti G V., Mulshine JL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet.* 2017;389(10066):299-311. doi:10.1016/S0140-6736(16)30958-8
 93. Kerr KM, Hirsch FR. Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemistry: Friend or Foe? *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140(4):326-331. doi:10.5858/arpa.2015-0522-SA

94. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2015;33(17):1974-1982. doi:10.1200/JCO.2014.59.4358
95. Hemminki K, Li X. Familial risk for lung cancer by histology and age of onset: evidence for recessive inheritance. *Exp Lung Res*. 2005;31(2):205-215. doi:10.1080/01902140490495606
96. Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet*. 1995;9(1):48-55. doi:10.1038/ng0195-48
97. Freedman ND, Leitzmann MF, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Cigarette smoking and subsequent risk of lung cancer in men and women: analysis of a prospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2008;9(7):649-656. doi:10.1016/S1470-2045(08)70154-2
98. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LAJ, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-1558. doi:10.1126/science.1235122
99. Gan WQ, Mannino DM, Jemal A. Socioeconomic disparities in secondhand smoke exposure among US never-smoking adults: the National Health and Nutrition Examination Survey 1988-2010. *Tob Control*. 2015;24(6):568-573. doi:10.1136/tobaccocontrol-2014-051660
100. Tyczynski JE, Bray F, Parkin DM. Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection. *Lancet Oncol*. 2003;4(1):45-55. doi:10.1016/s1470-2045(03)00960-4
101. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW. Cancer research for cancer prevention. World Cancer Report. 2019. https://www.iarc.fr/cards_page/world-cancer-report/.
102. Gorlova OY, Zhang Y, Schabath MB, et al. Never smokers and lung cancer risk: a case-control study of epidemiological factors. *Int J cancer*. 2006;118(7):1798-1804. doi:10.1002/ijc.21561
103. Bell DW, Brannigan BW, Matsuo K, et al. Increased prevalence of EGFR-mutant lung cancer in women and in East Asian populations: analysis of estrogen-related polymorphisms. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008;14(13):4079-4084. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5030
104. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J*. 2016;48(3):889-902. doi:10.1183/13993003.00359-2016
105. Vieira AR, Abar L, Vingeliene S, et al. Fruits, vegetables and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016;27(1):81-96. doi:10.1093/annonc/mdv381
106. Bilello KS, Murin S, Matthay RA. Epidemiology, etiology, and prevention of lung cancer. *Clin Chest Med*. 2002;23(1):1-25. doi:10.1016/s0272-5231(03)00057-1
107. Hubbard R, Venn A, Lewis S, Britton J. Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(1):5-8. doi:10.1164/ajrccm.161.1.9906062
108. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med*. 2011. doi:10.1038/nm.2304
109. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:675-699. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154
110. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961;14:213-222. doi:10.2307/3570892
111. Furth J, Kahn MC, Breedis C. The Transmission of Leukemia of Mice

- with a Single Cell. *Am J Cancer*. 1937;31(2):276 LP - 282. doi:10.1158/ajc.1937.276
112. Clermont Y, Leblond CP. Renewal of spermatogonia in the rat. *Am J Anat*. 1953;93(3):475-501. doi:10.1002/aja.1000930308
113. Kleinsmith LJ, Pierce GBJ. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res*. 1964;24:1544-1551.
114. Bruce WR, Van der Gaag H. A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature*. 1963;199:79-80. doi:10.1038/199079a0
115. Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*. 1977;197(4302):461-463. doi:10.1126/science.560061
116. Pierce GB, Speers WC. Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation. *Cancer Res*. 1988;48(8):1996-2004.
117. Uckun FM, Sather H, Reaman G, et al. Leukemic cell growth in SCID mice as a predictor of relapse in high-risk B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1995;85(4):873-878. doi:10.1182/blood.V85.4.873.bloodjournal854873
118. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367(6464):645-648. doi:10.1038/367645a0
119. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3(7):730-737. doi:10.1038/nm0797-730
120. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983-3988. doi:10.1073/pnas.0530291100
121. Vermeulen L, Sprick MR, Kemper K, Stassi G, Medema JP. Cancer stem cells--old concepts, new insights. *Cell Death Differ*. 2008;15(6):947-958. doi:10.1038/cdd.2008.20
122. Wang W, Quan Y, Fu Q, et al. Dynamics between Cancer Cell Subpopulations Reveals a Model Coordinating with Both Hierarchical and Stochastic Concepts. *PLoS One*. 2014;9(1):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0084654
123. Maccalli C, Volonte A, Cimminiello C, Parmiani G. Immunology of cancer stem cells in solid tumours. A review. *Eur J Cancer*. 2014;50(3):649-655. doi:10.1016/j.ejca.2013.11.014
124. Bruttel VS, Wischhusen J. Cancer stem cell immunology: key to understanding tumorigenesis and tumor immune escape? *Front Immunol*. 2014;5:360. doi:10.3389/fimmu.2014.00360
125. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-111. doi:10.1038/35102167
126. Battle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med*. 2017;23(10):1124-1134. doi:10.1038/nm.4409
127. Wang Y, Yang J, Zheng H, et al. Expression of mutant p53 proteins implicates a lineage relationship between neural stem cells and malignant astrocytic glioma in a murine model. *Cancer Cell*. 2009;15(6):514-526. doi:10.1016/j.ccr.2009.04.001
128. López-Lázaro M. The migration ability of stem cells can explain the existence of cancer of unknown primary site. Rethinking metastasis. *Oncoscience*. 2015;2(5):467-475. doi:10.18632/oncoscience.159
129. Lopez-Lazaro M. The stem cell division theory of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;123:95-113. doi:10.1016/j.critrevonc.2018.01.010
130. Morrison BJ, Morris JC, Steel JC. Lung cancer-initiating cells: A novel target for cancer therapy. *Target Oncol*. 2013;8(3):159-172.

- doi:10.1007/s11523-012-0247-4
131. Marjanovic ND, Weinberg RA, Chaffer CL. Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clin Chem*. 2013;59(1):168-179. doi:10.1373/clinchem.2012.184655
132. Prager BC, Xie Q, Bao S, Rich JN. Cancer Stem Cells: The Architects of the Tumor Ecosystem. *Cell Stem Cell*. 2019;24(1):41-53. doi:10.1016/j.stem.2018.12.009
133. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*. 2013;501(7467):328-337. doi:10.1038/nature12624
134. Cho RW, Clarke MF. Recent advances in cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2008;18(1):48-53. doi:10.1016/j.gde.2008.01.017
135. Plaks V, Kong N, Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*. 2015;16(3):225-238. doi:10.1016/j.stem.2015.02.015
136. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med*. 2007;58:267-284. doi:10.1146/annurev.med.58.062105.204854
137. Thankamony AP, Saxena K, Murali R, Jolly MK, Nair R. Cancer Stem Cell Plasticity - A Deadly Deal. *Front Mol Biosci*. 2020;7:79. doi:10.3389/fmolb.2020.00079
138. Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell*. 2011;146(4):633-644. doi:10.1016/j.cell.2011.07.026
139. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*. 2002;111(2):241-250. doi:10.1016/s0092-8674(02)01014-0
140. Chen J, Li Y, Yu T-S, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*. 2012;488(7412):522-526. doi:10.1038/nature11287
141. Peiris-Pagès M, Martínez-Outschoorn UE, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer stem cell metabolism. *Breast Cancer Res*. 2016;18(1):55. doi:10.1186/s13058-016-0712-6
142. Dupuy F, Tabariès S, Andrzejewski S, et al. PDK1-Dependent Metabolic Reprogramming Dictates Metastatic Potential in Breast Cancer. *Cell Metab*. 2015;22(4):577-589. doi:10.1016/j.cmet.2015.08.007
143. Vlashi E, Lagadec C, Vergnes L, et al. Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(38):16062-16067. doi:10.1073/pnas.1106704108
144. Peixoto J, Lima J. Metabolic traits of cancer stem cells. *DMM Dis Model Mech*. 2018;11(8). doi:10.1242/dmm.033464
145. Liao BB, Sievers C, Donohue LK, et al. Adaptive Chromatin Remodeling Drives Glioblastoma Stem Cell Plasticity and Drug Tolerance. *Cell Stem Cell*. 2017;20(2):233-246.e7. doi:10.1016/j.stem.2016.11.003
146. Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(7):513-532. doi:10.1038/nrd4233
147. Takebe N, Miele L, Harris PJ, et al. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(8):445-464. doi:10.1038/nrclinonc.2015.61
148. Espinosa-Sánchez A, Suárez-Martínez E, Sánchez-Díaz L, Carnero A. Therapeutic Targeting of Signaling Pathways Related to Cancer Stemness. *Front Oncol*. 2020;10:1533. doi:10.3389/fonc.2020.01533
149. de Goeij BE, Lambert JM. New developments for antibody-drug conjugate-based therapeutic approaches. *Curr Opin Immunol*. 2016;40:14-23. doi:10.1016/j.coi.2016.02.008

150. Stahl M, Kohrman N, Gore SD, Kim TK, Zeidan AM, Prebet T. Epigenetics in Cancer: A Hematological Perspective. *PLoS Genet.* 2016;12(10):e1006193. doi:10.1371/journal.pgen.1006193
151. Viale A, Pettazzoni P, Lyssiotis CA, et al. Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature.* 2014;514(7524):628-632. doi:10.1038/nature13611
152. Zhang J, Si J, Gan L, et al. Research progress on therapeutic targeting of quiescent cancer cells. *Artif cells, nanomedicine, Biotechnol.* 2019;47(1):2810-2820. doi:10.1080/21691401.2019.1638793
153. Clara JA, Monge C, Yang Y, Takebe N. Targeting signalling pathways and the immune microenvironment of cancer stem cells - a clinical update. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(4):204-232. doi:10.1038/s41571-019-0293-2
154. Laszlo GS, Estey EH, Walter RB. The past and future of CD33 as therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood Rev.* 2014;28(4):143-153. doi:10.1016/j.blre.2014.04.001
155. Bazinet A, Assouline S. A review of FDA-approved acute myeloid leukemia therapies beyond "7 + 3". *Expert Rev Hematol.* January 2021:1-13. doi:10.1080/17474086.2021.1875814
156. Clevers H. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell.* 2013;154(2):274-284. doi:10.1016/j.cell.2013.07.004
157. Driessens G, Beck B, Caauwe A, Simons BD, Blanpain C. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature.* 2012;488(7412):527-530. doi:10.1038/nature11344
158. Oskarsson T, Acharyya S, Zhang XH-F, et al. Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med.* 2011;17(7):867-874. doi:10.1038/nm.2379
159. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003;63(18):5821-5828.
160. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005;65(23):10946-10951. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2018
161. Eramo A, Lotti F, Sette G, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 2008;15(3):504-514. doi:10.1038/sj.cdd.4402283
162. Atkinson JJ, Adair-Kirk TL, Kelley DG, Demello D, Senior RM. Clara cell adhesion and migration to extracellular matrix. *Respir Res.* 2008;9(1):1. doi:10.1186/1465-9921-9-1
163. Lenssen J, Stolk J. Pulmonary stem cells and the induction of tissue regeneration in the treatment of emphysema. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2007;2(2):131-139.
164. Reynolds SD, Malkinson AM. Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(1):1-4. doi:10.1016/j.biocel.2009.09.002
165. Stevens TP, McBride JT, Peake JL, Pinkerton KE, Stripp BR. Cell proliferation contributes to PNEC hyperplasia after acute airway injury. *Am J Physiol.* 1997;272(3 Pt 1):L486-93. doi:10.1152/ajplung.1997.272.3.L486
166. Giangreco A, Reynolds SD, Stripp BR. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *Am J Pathol.* 2002;161(1):173-182. doi:10.1016/S0002-9440(10)64169-7
167. Chaffer CL, Brueckmann I, Scheel C, et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(19):7950-7955. doi:10.1073/pnas.1102454108

168. Reuben JM, Lee B-N, Gao H, et al. Primary breast cancer patients with high risk clinicopathologic features have high percentages of bone marrow epithelial cells with ALDH activity and CD44⁺CD24^{lo} cancer stem cell phenotype. *Eur J Cancer*. 2011;47(10):1527-1536. doi:10.1016/j.ejca.2011.01.011
169. Todaro M, Gaggianesi M, Catalano V, et al. CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell Stem Cell*. 2014;14(3):342-356. doi:10.1016/j.stem.2014.01.009
170. Qiu L, Li H, Fu S, Chen X, Lu L. Surface markers of liver cancer stem cells and innovative targeted-therapy strategies for HCC. *Oncol Lett*. 2018;15(2):2039-2048. doi:10.3892/ol.2017.7568
171. Klemba A, Purzycka-Olewiecka JK, Wcisło G, et al. Surface markers of cancer stem-like cells of ovarian cancer and their clinical relevance. *Contemp Oncol (Poznan, Poland)*. 2018;22(1A):48-55. doi:10.5114/wo.2018.73885
172. Li C, Wu J-J, Hynes M, et al. c-Met is a marker of pancreatic cancer stem cells and therapeutic target. *Gastroenterology*. 2011;141(6):2218-2227.e5. doi:10.1053/j.gastro.2011.08.009
173. Wang C-Y, Huang C-S, Yang Y-P, et al. The subpopulation of CD44-positive cells promoted tumorigenicity and metastatic ability in lung adenocarcinoma. *J Chin Med Assoc*. 2019;82(3):196-201. doi:10.1097/JCMA.000000000000056
174. Roudi R, Madjd Z, Ebrahimi M, Samani FS, Samadikuchaksaraei A. CD44 and CD24 cannot act as cancer stem cell markers in human lung adenocarcinoma cell line A549. *Cell Mol Biol Lett*. 2014;19(1):23-36. doi:10.2478/s11658-013-0112-1
175. Leung EL-H, Fiscus RR, Tung JW, et al. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLoS One*. 2010;5(11):e14062. doi:10.1371/journal.pone.0014062
176. Bertolini G, Roz L, Perego P, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133⁺ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(38):16281-16286. doi:10.1073/pnas.0905653106
177. Qiu X, Wang Z, Li Y, Miao Y, Ren Y, Luan Y. Characterization of sphere-forming cells with stem-like properties from the small cell lung cancer cell line H446. *Cancer Lett*. 2012;323(2):161-170. doi:10.1016/j.canlet.2012.04.004
178. Meng X, Li M, Wang X, Wang Y, Ma D. Both CD133⁺ and CD133⁻ subpopulations of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells. *Cancer Sci*. 2009;100(6):1040-1046. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01144.x
179. Tirino V, Camerlingo R, Franco R, et al. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur J cardiothoracic Surg Off J Eur Assoc Cardio-thoracic Surg*. 2009;36(3):446-453. doi:10.1016/j.ejcts.2009.03.063
180. Salcido CD, Larochelle A, Taylor BJ, Dunbar CE, Varticovski L. Molecular characterisation of side population cells with cancer stem cell-like characteristics in small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2010;102(11):1636-1644. doi:10.1038/sj.bjc.6605668
181. Pirozzi G, Tirino V, Camerlingo R, et al. Prognostic value of cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition and circulating tumor cells in lung cancer. *Oncol Rep*. 2013;29(5):1763-1768. doi:10.3892/or.2013.2294
182. Yan X, Luo H, Zhou X, Zhu B, Wang Y, Bian X. Identification of CD90 as a marker for lung cancer stem cells in A549 and H446 cell lines. *Oncol Rep*. 2013;30(6):2733-2740. doi:10.3892/or.2013.2784
183. Tachezy M, Zander H, Wolters-Eisfeld G, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166): an "inert" cancer stem cell marker for non-small cell lung cancer? *Stem*

- Cells*. 2014;32(6):1429-1436. doi:10.1002/stem.1665
184. Su J, Wu S, Tang W, Qian H, Zhou H, Guo T. Reduced SLC27A2 induces cisplatin resistance in lung cancer stem cells by negatively regulating Bmi1-ABCG2 signaling. *Mol Carcinog*. 2016;55(11):1822-1832. doi:10.1002/mc.22430
185. Jiang Z, Hao Y, Ding X, et al. The effects and mechanisms of SLC34A2 on tumorigenicity in human non-small cell lung cancer stem cells. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2016;37(8):10383-10392. doi:10.1007/s13277-016-4928-y
186. Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, et al. Membranous expression of activated leukocyte cell adhesion molecule contributes to poor prognosis and malignant phenotypes of non-small-cell lung cancer. *J Surg Res*. 2013;179(1):24-32. doi:10.1016/j.jss.2012.08.044
187. Maetzel D, Denzel S, Mack B, et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol*. 2009;11(2):162-171. doi:10.1038/ncb1824
188. Karimi-Busheri F, Zadorozhny V, Li T, Lin H, Shawler DL, Fakhrai H. Pivotal role of CD38 biomarker in combination with CD24, EpCAM, and ALDH for identification of H460 derived lung cancer stem cells. *J Stem Cells*. 2011;6(1):9-20.
189. Lin S, Sun J-G, Wu J-B, et al. Aberrant microRNAs expression in CD133⁺/CD326⁺ human lung adenocarcinoma initiating cells from A549. *Mol Cells*. 2012;33(3):277-283. doi:10.1007/s10059-012-2252-y
190. Shien K, Toyooka S, Ichimura K, et al. Prognostic impact of cancer stem cell-related markers in non-small cell lung cancer patients treated with induction chemoradiotherapy. *Lung Cancer*. 2012;77(1):162-167. doi:10.1016/j.lungcan.2012.02.006
191. Huang C-P, Tsai M-F, Chang T-H, et al. ALDH-positive lung cancer stem cells confer resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Lett*. 2013;328(1):144-151. doi:10.1016/j.canlet.2012.08.021
192. Liu J, Xiao Z, Wong SK-M, et al. Lung cancer tumorigenicity and drug resistance are maintained through ALDH(hi)CD44(hi) tumor initiating cells. *Oncotarget*. 2013;4(10):1698-1711. doi:10.18632/oncotarget.1246
193. Huo W, Du M, Pan X, Zhu X, Li Z. Prognostic value of ALDH1 expression in lung cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(2):2045-2051.
194. European Bioinformatics Institute. HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute. www.genenames.org.
195. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr Protoc Bioinforma*. 2016;54:1.30.1-1.30.33. doi:10.1002/cpbi.5
196. Peacock CD, Watkins DN. Cancer stem cells and the ontogeny of lung cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(17):2883-2889. doi:10.1200/JCO.2007.15.2702
197. Westhoff B, Colaluca IN, D'Ario G, et al. Alterations of the Notch pathway in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(52):22293-22298. doi:10.1073/pnas.0907781106
198. Kushwah R, Guezguez B, Lee JB, Hopkins CI, Bhatia M. Pleiotropic roles of Notch signaling in normal, malignant, and developmental hematopoiesis in the human. *EMBO Rep*. 2014;15(11):1128-1138. doi:10.15252/embr.201438842
199. Yuan R, Ke J, Sun L, et al. HES1 promotes metastasis and predicts poor survival in patients with colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2015;32(2):169-179. doi:10.1007/s10585-015-9700-y
200. Xiao M-J, Han Z, Shao B, Jin K. Notch signaling and neurogenesis in normal and stroke brain. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2009;1(2):192-202.
201. Zhou L, Wu S, Yu L, Gong X, Song

- W, Cheng Z. [Expression of CD133 and Notch1 in non-small cell lung cancer and the clinicopathological significance]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2015;35(2):196-201.
202. Hassan KA, Wang L, Korkaya H, et al. Notch pathway activity identifies cells with cancer stem cell-like properties and correlates with worse survival in lung adenocarcinoma. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2013;19(8):1972-1980. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0370
203. Bai X-Y, Zhang X-C, Yang S-Q, et al. Blockade of Hedgehog Signaling Synergistically Increases Sensitivity to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Lines. *PLoS One*. 2016;11(3):e0149370. doi:10.1371/journal.pone.0149370
204. Giroux Leprieur E, Antoine M, Vieira T, et al. [Role of the Sonic Hedgehog pathway in thoracic cancers]. *Rev Mal Respir*. 2015;32(8):800-808. doi:10.1016/j.rmr.2014.11.069
205. Peng T, Frank DB, Kadzik RS, et al. Hedgehog actively maintains adult lung quiescence and regulates repair and regeneration. *Nature*. 2015;526(7574):578-582. doi:10.1038/nature14984
206. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, et al. Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*. 1996;85(6):841-851. doi:10.1016/s0092-8674(00)81268-4
207. Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(2):97-106. doi:10.1038/nrclinonc.2010.196
208. Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K. Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer: beyond Smoothed. *Oncotarget*. 2015;6(16):13899-13913. doi:10.18632/oncotarget.4224
209. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 2012;149(6):1192-1205. doi:10.1016/j.cell.2012.05.012
210. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(12):767-779. doi:10.1038/nrm3470
211. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(1):11-26. doi:10.1038/nrc3419
212. Tanaka K, Kumano K, Ueno H. Intracellular signals of lung cancer cells as possible therapeutic targets. *Cancer Sci*. 2015;106(5):489-496. doi:10.1111/cas.12643
213. Vaughan AE, Halbert CL, Wootton SK, Miller AD. Lung cancer in mice induced by the jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein is not maintained by rare cancer stem cells, but tumorigenicity does correlate with Wnt pathway activation. *Mol Cancer Res*. 2012;10(1):86-95. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0285
214. Akiri G, Cherian MM, Vijayakumar S, Liu G, Bafico A, Aaronson SA. Wnt pathway aberrations including autocrine Wnt activation occur at high frequency in human non-small-cell lung carcinoma. *Oncogene*. 2009;28(21):2163-2172. doi:10.1038/onc.2009.82
215. Lee J-S, Hur M-W, Lee SK, Choi W-I, Kwon Y-G, Yun C-O. A novel sLRP6E1E2 inhibits canonical Wnt signaling, epithelial-to-mesenchymal transition, and induces mitochondria-dependent apoptosis in lung cancer. *PLoS One*. 2012;7(5):e36520. doi:10.1371/journal.pone.0036520
216. Xu X, Sun P-L, Li J-Z, Jheon S, Lee C-T, Chung J-H. Aberrant Wnt1/ β -catenin expression is an independent poor prognostic marker of non-small cell lung cancer after surgery. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2011;6(4):716-724. doi:10.1097/JTO.0b013e31820c5189
217. Jiang H-L, Jiang L-M, Han W-D. Wnt/ β -catenin signaling pathway in lung cancer stem cells is a potential

- target for the development of novel anticancer drugs. *J BUON*. 2015;20(4):1094-1100.
218. Li C, Song G, Zhang S, Wang E, Cui Z. Wnt3a increases the metastatic potential of non-small cell lung cancer cells in vitro in part via its upregulation of Notch3. *Oncol Rep*. 2015;33(3):1207-1214. doi:10.3892/or.2014.3700
219. Dutta P, Sabri N, Li J, Li WX. Role of STAT3 in lung cancer. *JAK-STAT*. 2014;3(4):e999503. doi:10.1080/21623996.2014.999503
220. Chung SS, Vadgama J V. Curcumin and epigallocatechin gallate inhibit the cancer stem cell phenotype via down-regulation of STAT3-NFκB signaling. *Anticancer Res*. 2015;35(1):39-46.
221. Shao C, Sullivan JP, Girard L, et al. Essential role of aldehyde dehydrogenase 1A3 for the maintenance of non-small cell lung cancer stem cells is associated with the STAT3 pathway. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014;20(15):4154-4166. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3292
222. Duzagac F, Inan S, Ela Simsek F, et al. JAK/STAT pathway interacts with intercellular cell adhesion molecule (ICAM) and vascular cell adhesion molecule (VCAM) while prostate cancer stem cells form tumor spheroids. *J BUON*. 2015;20(5):1250-1257.
223. Yuan Y, Zhong W, Ma G, Zhang B, Tian H. Yes-associated protein regulates the growth of human non-small cell lung cancer in response to matrix stiffness. *Mol Med Rep*. 2015;11(6):4267-4272. doi:10.3892/mmr.2015.3231
224. Dhanasekaran SM, Balbin OA, Chen G, et al. Transcriptome meta-analysis of lung cancer reveals recurrent aberrations in NRG1 and Hippo pathway genes. *Nat Commun*. 2014;5:5893. doi:10.1038/ncomms6893
225. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci*. 2017;108(3). doi:10.1111/cas.13155
226. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*. 2009;138(5):822-829. doi:10.1016/j.cell.2009.08.017
227. Thiery JP. [Epithelial-mesenchymal transitions in cancer onset and progression]. *Bull Acad Natl Med*. 2009;193(9):1969.
228. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial – mesenchymal transition. *Nat Publ Gr*. 2014;15(3):178-196. doi:10.1038/nrm3758
229. Nieto MA, Huang RYYJ, Jackson RAA, Thiery JPP. EMT: 2016. *Cell*. 2016;166(1):21-45. doi:10.1016/j.cell.2016.06.028
230. Hay ED. Matrix-cytoskeletal interactions in the developing eye. *J Cell Biochem*. 1985;27(2):143-156. doi:10.1002/jcb.240270208
231. Hay ED. Theory for epithelial-mesenchymal transformation based on the “fixed cortex” cell motility model. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1989;14(4):455-457. doi:10.1002/cm.970140403
232. Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn*. 2005;233(3):706-720. doi:10.1002/dvdy.20345
233. Lim J, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development*. 2012;139(19):3471-3486. doi:10.1242/dev.071209
234. Kokkinos MI, Murthi P, Wafai R, Thompson EW, Newgreen DF. Cadherins in the human placenta--epithelial-mesenchymal transition (EMT) and placental development. *Placenta*. 2010;31(9):747-755. doi:10.1016/j.placenta.2010.06.017
235. Williams M, Burdsal C, Periasamy A, Lewandoski M, Sutherland A. Mouse primitive streak forms in situ by

- initiation of epithelial to mesenchymal transition without migration of a cell population. *Dev Dyn*. 2012;241(2):270-283. doi:10.1002/dvdy.23711
236. Huang X, Saint-Jeannet J-P. Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. *Dev Biol*. 2004;275(1):1-11. doi:10.1016/j.ydbio.2004.07.033
237. Zeisberg M, Kalluri R. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;304(3):C216-25. doi:10.1152/ajpcell.00328.2012
238. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-1428. doi:10.1172/JCI39104
239. Arnoux V, Nassour M, L'Helgoualc'h A, Hipskind RA, Savagner P. Erk5 controls Slug expression and keratinocyte activation during wound healing. *Mol Biol Cell*. 2008;19(11):4738-4749. doi:10.1091/mbc.e07-10-1078
240. Ahmed N, Maines-Bandiera S, Quinn MA, Unger WG, Dedhar S, Auersperg N. Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290(6):C1532-42. doi:10.1152/ajpcell.00478.2005
241. Vaughan AE, Chapman HA. Regenerative activity of the lung after epithelial injury. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(7):922-930. doi:10.1016/j.bbadis.2012.11.020
242. Hutchinson J, Fogarty A, Hubbard R, McKeever T. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *Eur Respir J*. 2015;46(3):795-806. doi:10.1183/09031936.00185114
243. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*. 2009;139(5):871-890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007
244. Brabletz T, Jung A, Reu S, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(18):10356-10361. doi:10.1073/pnas.171610498
245. Huang RY-J, Guilford P, Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 19):4417-4422. doi:10.1242/jcs.099697
246. Peinado H, Quintanilla M, Cano A. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem*. 2003;278(23):21113-21123. doi:10.1074/jbc.M211304200
247. Zhang Y, Alexander PB, Wang X-F. TGF- β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(4). doi:10.1101/cshperspect.a022145
248. Massagué J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(10):616-630. doi:10.1038/nrm3434
249. Kaimori A, Potter J, Kaimori J-Y, Wang C, Mezey E, Koteish A. Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem*. 2007;282(30):22089-22101. doi:10.1074/jbc.M700998200
250. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003;425(6958):577-584. doi:10.1038/nature02006
251. Lamouille S, Derynck R. Emergence of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin axis in transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition. *Cells Tissues Organs*. 2011;193(1-2):8-22. doi:10.1159/000320172
252. Grünert S, Jechlinger M, Beug H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev*

- Mol Cell Biol.* 2003;4(8):657-665.
doi:10.1038/nrm1175
253. Doehn U, Hauge C, Frank SR, et al. RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells. *Mol Cell.* 2009;35(4):511-522.
doi:10.1016/j.molcel.2009.08.002
254. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell.* 2008;14(6):818-829.
doi:10.1016/j.devcel.2008.05.009
255. Rana MK, Aloisio FM, Choi C, Barber DL. Formin-dependent TGF- β signaling for epithelial to mesenchymal transition. *Mol Biol Cell.* 2018;29(12):1465-1475.
doi:10.1091/mbc.e17-05-0325
256. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(2):131-142.
doi:10.1038/nrm1835
257. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28(1-2):15-33.
doi:10.1007/s10555-008-9169-0
258. De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(2):97-110.
doi:10.1038/nrc3447
259. Pérez-Pomares JM, de la Pompa JL. Signaling during epicardium and coronary vessel development. *Circ Res.* 2011;109(12):1429-1442.
doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.245589
260. Coelho BP, Fernandes CF de L, Boccacino JM, et al. Multifaceted WNT Signaling at the Crossroads Between Epithelial-Mesenchymal Transition and Autophagy in Glioblastoma. *Front Oncol.* 2020;10:597743.
doi:10.3389/fonc.2020.597743
261. Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2009;5(3):237-241.
doi:10.1016/j.stem.2009.08.001
262. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 2009;19(2):156-172.
doi:10.1038/cr.2009.5
263. Yang M-H, Wu K-J. TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): implications in metastasis and development. *Cell Cycle.* 2008;7(14):2090-2096.
doi:10.4161/cc.7.14.6324
264. Dave N, Guaita-Esteruelas S, Gutarra S, et al. Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 2011;286(14):12024-12032.
doi:10.1074/jbc.M110.168625
265. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(2):69-84.
doi:10.1038/s41580-018-0080-4
266. Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med.* 2013;19(11):1438-1449.
doi:10.1038/nm.3336
267. Chinenov Y, Kerppola TK. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene.* 2001;20(19):2438-2452.
doi:10.1038/sj.onc.1204385
268. Sundqvist A, Zieba A, Vasilaki E, et al. Specific interactions between Smad proteins and AP-1 components determine TGFbeta-induced breast cancer cell invasion. *Oncogene.* 2013;32(31):3606-3615.
doi:10.1038/onc.2012.370
269. Shaulian E. AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal.* 2010;22(6):894-899.
doi:10.1016/j.cellsig.2009.12.008
270. Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol.* 2002;4(5):E131-6.
doi:10.1038/ncb0502-e131

271. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(11):859-868. doi:10.1038/nrc1209
272. Lopez-Bergami P, Lau E, Ronai Z. Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(1):65-76. doi:10.1038/nrc2681
273. Piechaczyk M, Farràs R. Regulation and function of JunB in cell proliferation. *Biochem Soc Trans*. 2008;36(Pt 5):864-867. doi:10.1042/BST0360864
274. Ozanne BW, Spence HJ, McGarry LC, Hennigan RF. Transcription factors control invasion: AP-1 the first among equals. *Oncogene*. 2007;26(1):1-10. doi:10.1038/sj.onc.1209759
275. Laderoute KR. The interaction between HIF-1 and AP-1 transcription factors in response to low oxygen. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16(4-5):502-513. doi:10.1016/j.semcdb.2005.03.005
276. Folkman J. Angiogenesis and c-Jun. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(9):644. doi:10.1093/jnci/djh148
277. Lallemand D, Spyrou G, Yaniv M, Pfarr CM. Variations in Jun and Fos protein expression and AP-1 activity in cycling, resting and stimulated fibroblasts. *Oncogene*. 1997;14(7):819-830. doi:10.1038/sj.onc.1200901
278. Kovary K, Bravo R. The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 1991;11(9):4466-4472. doi:10.1128/mcb.11.9.4466
279. Farràs R, Baldin V, Gallach S, et al. JunB breakdown in mid-/late G2 is required for down-regulation of cyclin A2 levels and proper mitosis. *Mol Cell Biol*. 2008;28(12):4173-4187. doi:10.1128/MCB.01620-07
280. Pérez-Benavente B, García JL, Rodríguez MS, et al. GSK3-SCF(FBXW7) targets JunB for degradation in G2 to preserve chromatid cohesion before anaphase. *Oncogene*. 2013;32(17):2189-2199. doi:10.1038/onc.2012.235
281. Passequé E, Wagner EF. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J*. 2000;19(12):2969-2979. doi:10.1093/emboj/19.12.2969
282. Bakiri L, Lallemand D, Bossy-Wetzell E, Yaniv M. Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J*. 2000;19(9):2056-2068. doi:10.1093/emboj/19.9.2056
283. Andrecht S, Kolbus A, Hartenstein B, Angel P, Schorpp-Kistner M. Cell cycle promoting activity of JunB through cyclin A activation. *J Biol Chem*. 2002;277(39):35961-35968. doi:10.1074/jbc.M202847200
284. Schütte J, Viallet J, Nau M, Segal S, Fedorko J, Minna J. jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun. *Cell*. 1989;59(6):987-997. doi:10.1016/0092-8674(89)90755-1
285. Passequé E, Jochum W, Schorpp-Kistner M, Möhle-Steinlein U, Wagner EF. Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking junB expression in the myeloid lineage. *Cell*. 2001;104(1):21-32. doi:10.1016/s0092-8674(01)00188-x
286. Santaguida M, Schepers K, King B, et al. JunB protects against myeloid malignancies by limiting hematopoietic stem cell proliferation and differentiation without affecting self-renewal. *Cancer Cell*. 2009;15(4):341-352. doi:10.1016/j.ccr.2009.02.016
287. Passequé E, Wagner EF, Weissman IL. JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell*. 2004;119(3):431-443. doi:10.1016/j.cell.2004.10.010
288. Yang M-Y, Liu T-C, Chang J-G, Lin P-M, Lin S-F. JunB gene expression is inactivated by methylation in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2003;101(8):3205-3211. doi:10.1182/blood-2002-05-1598

289. Steidl U, Rosenbauer F, Verhaak RGW, et al. Essential role of Jun family transcription factors in PU.1 knockdown-induced leukemic stem cells. *Nat Genet.* 2006;38(11):1269-1277. doi:10.1038/ng1898
290. Hoshino K, Quintás-Cardama A, Radich J, Dai H, Yang H, Garcia-Manero G. Downregulation of JUNB mRNA expression in advanced phase chronic myelogenous leukemia. *Leuk Res.* 2009;33(10):1361-1366. doi:10.1016/j.leukres.2009.03.044
291. Li B, Tournier C, Davis RJ, Flavell RA. Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *EMBO J.* 1999;18(2):420-432. doi:10.1093/emboj/18.2.420
292. Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I, et al. Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *EMBO J.* 2002;21(15):4104-4113. doi:10.1093/emboj/cdf389
293. Rassidakis GZ, Thomaidis A, Atwell C, et al. JunB expression is a common feature of CD30+ lymphomas and lymphomatoid papulosis. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc.* 2005;18(10):1365-1370. doi:10.1038/modpathol.3800419
294. Kharman-Biz A, Gao H, Ghiasvand R, Zhao C, Zendejdel K, Dahlman-Wright K. Expression of activator protein-1 (AP-1) family members in breast cancer. *BMC Cancer.* 2013;13:441. doi:10.1186/1471-2407-13-441
295. Lee KH, Kim J-R. Regulation of HGF-mediated cell proliferation and invasion through NF- κ B, JunB, and MMP-9 cascades in stomach cancer cells. *Clin Exp Metastasis.* 2012;29(3):263-272. doi:10.1007/s10585-011-9449-x
296. Melaiu O, Cristaudo A, Melissari E, et al. A review of transcriptome studies combined with data mining reveals novel potential markers of malignant pleural mesothelioma. *Mutat Res.* 2012;750(2):132-140. doi:10.1016/j.mrrev.2011.12.003
297. Sundqvist A, Morikawa M, Ren J, et al. JUNB governs a feed-forward network of TGF β signaling that aggravates breast cancer invasion. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(3):1180-1195. doi:10.1093/nar/gkx1190
298. Gervasi M, Bianchi-Smiraglia A, Cummings M, et al. JunB contributes to Id2 repression and the epithelial-mesenchymal transition in response to transforming growth factor- β . *J Cell Biol.* 2012;196(5):589-603. doi:10.1083/jcb.201109045
299. Chang H, Liu Y, Xue M, et al. Synergistic action of master transcription factors controls epithelial-to-mesenchymal transition. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(6):2514-2527. doi:10.1093/nar/gkw126
300. Pérez-Benavente B, Fathinajafabadi Nasresfahani A, de la Fuente L, et al. Genome-wide profiling analysis of JUNB reveals its roles in cell cycle progression and cell invasion through regulation of cyclin E1 and TGFB2 expression. *Manuscr Prep.* 2021.
301. Herreros-Pomares A, de-Maya-Girones JD, Calabuig-Fariñas S, et al. Lung tumorspheres reveal cancer stem cell-like properties and a score with prognostic impact in resected non-small-cell lung cancer. *Cell Death Dis.* 2019;10(9):660. doi:10.1038/s41419-019-1898-1
302. Siemens H, Jackstadt R, Hüntten S, et al. miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell Cycle.* 2011;10(24):4256-4271. doi:10.4161/cc.10.24.18552
303. Burk U, Schubert J, Wellner U, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.* 2008;9(6):582-589. doi:10.1038/embor.2008.74
304. Vrba L, Jensen TJ, Garbe JC, et al. Role for DNA methylation in the regulation of miR-200c and miR-141 expression in normal and cancer cells. *PLoS One.* 2010;5(1):e8697. doi:10.1371/journal.pone.0008697

305. Tellez CS, Juri DE, Do K, et al. EMT and stem cell-like properties associated with miR-205 and miR-200 epigenetic silencing are early manifestations during carcinogen-induced transformation of human lung epithelial cells. *Cancer Res.* 2011;71(8):3087-3097. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3035
306. Davalos V, Moutinho C, Villanueva A, et al. Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. *Oncogene.* 2012;31(16):2062-2074. doi:10.1038/onc.2011.383
307. Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, et al. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut.* 2013;62(9):1315-1326. doi:10.1136/gutjnl-2011-301846
308. Horiguchi K, Sakamoto K, Koinuma D, et al. TGF- β drives epithelial-mesenchymal transition through δ EF1-mediated downregulation of ESRP. *Oncogene.* 2012;31(26):3190-3201. doi:10.1038/onc.2011.493
309. Reinke LM, Xu Y, Cheng C. Snail represses the splicing regulator epithelial splicing regulatory protein 1 to promote epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 2012;287(43):36435-36442. doi:10.1074/jbc.M112.397125
310. Shapiro IM, Cheng AW, Flytzanis NC, et al. An EMT-driven alternative splicing program occurs in human breast cancer and modulates cellular phenotype. *PLoS Genet.* 2011;7(8):e1002218. doi:10.1371/journal.pgen.1002218
311. Lapuk A, Marr H, Jakkula L, et al. Exon-level microarray analyses identify alternative splicing programs in breast cancer. *Mol Cancer Res.* 2010;8(7):961-974. doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0528
312. Hussey GS, Chaudhury A, Dawson AE, et al. Identification of an mRNP complex regulating tumorigenesis at the translational elongation step. *Mol Cell.* 2011;41(4):419-431. doi:10.1016/j.molcel.2011.02.003
313. Evdokimova V, Tognon C, Ng T, et al. Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Cell.* 2009;15(5):402-415. doi:10.1016/j.ccr.2009.03.017
314. Zhou BP, Deng J, Xia W, et al. Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol.* 2004;6(10):931-940. doi:10.1038/ncb1173
315. Nieto MA. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:347-376. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154036
316. Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, et al. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature.* 2005;436(7047):123-127. doi:10.1038/nature03688
317. Robichaud N, del Rincon S V, Huor B, et al. Phosphorylation of eIF4E promotes EMT and metastasis via translational control of SNAIL and MMP-3. *Oncogene.* 2015;34(16):2032-2042. doi:10.1038/onc.2014.146
318. Benne R, Brown-Luedi ML, Hershey JW. Purification and characterization of protein synthesis initiation factors eIF-1, eIF-4C, eIF-4D, and eIF-5 from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem.* 1978;253(9):3070-3077. doi:10.1016/S0021-9258(17)40804-0
319. Schreier MH, Erni B, Staehelin T. Initiation of mammalian protein synthesis. I. Purification and characterization of seven initiation factors. *J Mol Biol.* 1977;116(4):727-753. doi:10.1016/0022-2836(77)90268-6
320. Benne R, Hershey JW. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem.* 1978;253(9):3078-3087.

- doi:10.1016/S0021-9258(17)40805-2
321. Schuller AP, Wu CC-C, Dever TE, Buskirk AR, Green R. eIF5A Functions Globally in Translation Elongation and Termination. *Mol Cell*. 2017;66(2):194-205.e5. doi:10.1016/j.molcel.2017.03.003
322. Pelechano V, Alepuz P. eIF5A facilitates translation termination globally and promotes the elongation of many non polyproline-specific tripeptide sequences. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(12):7326-7338. doi:10.1093/nar/gkx479
323. Hoque M, Hanauske-Abel HM, Palumbo P, et al. Inhibition of HIV-1 gene expression by Ciclopirox and Deferiprone, drugs that prevent hypusination of eukaryotic initiation factor 5A. *Retrovirology*. 2009;6:90. doi:10.1186/1742-4690-6-90
324. Li Y, Fu L, Li J-B, et al. Increased expression of EIF5A2, via hypoxia or gene amplification, contributes to metastasis and angiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. *Gastroenterology*. 2014;146(7):1701-13.e9. doi:10.1053/j.gastro.2014.02.029
325. Zuk D, Jacobson A. A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. *EMBO J*. 1998;17(10):2914-2925. doi:10.1093/emboj/17.10.2914
326. Schrader R, Young C, Kozian D, Hoffmann R, Lottspeich F. Temperature-sensitive eIF5A mutant accumulates transcripts targeted to the nonsense-mediated decay pathway. *J Biol Chem*. 2006;281(46):35336-35346. doi:10.1074/jbc.M601460200
327. Hofmann W, Reichart B, Ewald A, et al. Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J Cell Biol*. 2001;152(5):895-910. doi:10.1083/jcb.152.5.895
328. Mathews MB, Hershey JWB. The translation factor eIF5A and human cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1849(7):836-844. doi:10.1016/j.bbagr.2015.05.002
329. Park MH, Wolff EC. Hypusine, a polyamine-derived amino acid critical for eukaryotic translation. *J Biol Chem*. 2018;293(48):18710-18718. doi:10.1074/jbc.TM118.003341
330. Shiba T, Mizote H, Kaneko T, Nakajima T, Kakimoto Y. Hypusine, a new amino acid occurring in bovine brain. Isolation and structural determination. *Biochim Biophys Acta*. 1971;244(3):523-531. doi:10.1016/0304-4165(71)90069-9
331. Arruabarrena-Aristorena A, Zabala-Letona A, Carracedo A. Oil for the cancer engine: The cross-talk between oncogenic signaling and polyamine metabolism. *Sci Adv*. 2018;4(1):eaar2606. doi:10.1126/sciadv.aar2606
332. Smit-McBride Z, Schnier J, Kaufman RJ, Hershey JW. Protein synthesis initiation factor eIF-4D. Functional comparison of native and unhyposinated forms of the protein. *J Biol Chem*. 1989;264(31):18527-18530. doi:10.1016/S0021-9258(18)51499-X
333. Gutierrez E, Shin B-S, Woolstenhulme CJ, et al. eIF5A promotes translation of polyproline motifs. *Mol Cell*. 2013;51(1):35-45. doi:10.1016/j.molcel.2013.04.021
334. Woolstenhulme CJ, Parajuli S, Healey DW, et al. Nascent peptides that block protein synthesis in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(10):E878-87. doi:10.1073/pnas.1219536110
335. Schmidt C, Becker T, Heuer A, et al. Structure of the hypusinylated eukaryotic translation factor eIF-5A bound to the ribosome. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(4):1944-1951. doi:10.1093/nar/gkv1517
336. Fujimura K, Wang H, Watson F, Klemke RL. KRAS Oncoprotein Expression Is Regulated by a Self-Governing eIF5A-PEAK1 Feed-Forward Regulatory Loop. *Cancer Res*. 2018;78(6):1444-1456. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2873
337. Fujimura K, Choi S, Wyse M,

- Strnadel J, Wright T, Klemke R. Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (EIF5A) Regulates Pancreatic Cancer Metastasis by Modulating RhoA and Rho-associated Kinase (ROCK) Protein Expression Levels. *J Biol Chem.* 2015;290(50):29907-29919. doi:10.1074/jbc.M115.687418
338. Tong Y, Park I, Hong B-S, Nedyalkova L, Tempel W, Park H-W. Crystal structure of human eIF5A1: insight into functional similarity of human eIF5A1 and eIF5A2. *Proteins.* 2009;75(4):1040-1045. doi:10.1002/prot.22378
339. Kettunen E, el-Rifai W, Björkqvist AM, et al. A broad amplification pattern at 3q in squamous cell lung cancer--a fluorescence in situ hybridization study. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000;117(1):66-70. doi:10.1016/s0165-4608(99)00146-6
340. Caraglia M, Park MH, Wolff EC, Marra M, Abbruzzese A. eIF5A isoforms and cancer: two brothers for two functions? *Amino Acids.* 2013;44(1):103-109. doi:10.1007/s00726-011-1182-x
341. He L-R, Zhao H-Y, Li B-K, et al. Overexpression of eIF5A-2 is an adverse prognostic marker of survival in stage I non-small cell lung cancer patients. *Int J cancer.* 2011;129(1):143-150. doi:10.1002/ijc.25669
342. Xu G, Yu H, Shi X, et al. Cisplatin sensitivity is enhanced in non-small cell lung cancer cells by regulating epithelial-mesenchymal transition through inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5A2. *BMC Pulm Med.* 2014;14:174. doi:10.1186/1471-2466-14-174
343. Xu G, Shi X, Sun L, et al. Down-regulation of eIF5A-2 prevents epithelial-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer cells. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2013;14(6):460-467. doi:10.1631/jzus.B1200200
344. Koettnitz K, Wöhl T, Kappel B, Lottspeich F, Hauber J, Bevec D. Identification of a new member of the human eIF-5A gene family. *Gene.* 1995;159(2):283-284. doi:10.1016/0378-1119(95)00136-t
345. Clement PMJ, Henderson CA, Jenkins ZA, et al. Identification and characterization of eukaryotic initiation factor 5A-2. 2003;4263:4254-4263. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03806.x
346. Mandal A, Mandal S, Park MH. Genome-wide analyses and functional classification of proline repeat-rich proteins: potential role of eIF5A in eukaryotic evolution. *PLoS One.* 2014;9(11):e111800. doi:10.1371/journal.pone.0111800
347. Chesarone MA, DuPage AG, Goode BL. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(1):62-74. doi:10.1038/nrm2816
348. Clucas J, Valderrama F. ERM proteins in cancer progression. *J Cell Sci.* 2015;128(6):1253. doi:10.1242/jcs.170027
349. Muñoz-Soriano V, Domingo-Muelas A, Li T, et al. Evolutionary conserved role of eukaryotic translation factor eIF5A in the regulation of actin-nucleating formins. *Sci Rep.* 2017;7(1):9580. doi:10.1038/s41598-017-10057-y
350. Li T, Belda-Palazón B, Ferrando A, Alepuz P. Fertility and polarized cell growth depends on eIF5A for translation of polyproline-rich formins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2014;197(4):1191-1200. doi:10.1534/genetics.114.166926
351. Maudsley S, Zamah AM, Rahman N, et al. Platelet-derived growth factor receptor association with Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor potentiates receptor activity. *Mol Cell Biol.* 2000;20(22):8352-8363. doi:10.1128/mcb.20.22.8352-8363.2000
352. Karthikeyan S, Leung T, Ladas JAA. Structural determinants of the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor interaction with the beta 2 adrenergic and platelet-derived growth factor receptors. *J Biol Chem.* 2002;277(21):18973-18978. doi:10.1074/jbc.M201507200

353. Demoulin J-B, Seo JK, Ekman S, et al. Ligand-induced recruitment of Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to the PDGF (platelet-derived growth factor) receptor regulates actin cytoskeleton reorganization by PDGF. *Biochem J.* 2003;376(Pt 2):505-510. doi:10.1042/BJ20030385
354. Briggs JW, Ren L, Nguyen R, et al. The ezrin metastatic phenotype is associated with the initiation of protein translation. *Neoplasia.* 2012;14(4):297-310. doi:10.1593/neo.11518
355. Song Y, Ma X, Zhang M, et al. Ezrin Mediates Invasion and Metastasis in Tumorigenesis: A Review. *Front cell Dev Biol.* 2020;8:588801. doi:10.3389/fcell.2020.588801
356. Huang L, Qin Y, Zuo Q, et al. Ezrin mediates both HGF/Met autocrine and non-autocrine signaling-induced metastasis in melanoma. *Int J cancer.* 2018;142(8):1652-1663. doi:10.1002/ijc.31196
357. Xi M, Tang W. Knockdown of Ezrin inhibited migration and invasion of cervical cancer cells in vitro. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2020;34:2058738420930899. doi:10.1177/2058738420930899
358. Tran HD, Luitel K, Kim M, Zhang K, Longmore GD, Tran DD. Transient SNAIL1 expression is necessary for metastatic competence in breast cancer. *Cancer Res.* 2014;74(21):6330-6340. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0923
359. Ye X, Weinberg RA. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol.* 2015;25(11). doi:10.1016/j.tcb.2015.07.012
360. Fischer KR, Durrans A, Lee S, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature.* 2015;527(7579):472-476. doi:10.1038/nature15748
361. Zheng X, Carstens JL, Kim J, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature.* 2015;527(7579):525-530. doi:10.1038/nature16064
362. Ocaña OH, Córcoles R, Fabra A, et al. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell.* 2012;22(6):709-724. doi:10.1016/j.ccr.2012.10.012
363. Beerling E, Seinstra D, de Wit E, et al. Plasticity between Epithelial and Mesenchymal States Unlinks EMT from Metastasis-Enhancing Stem Cell Capacity. *Cell Rep.* 2016;14(10):2281-2288. doi:10.1016/j.celrep.2016.02.034
364. Nieto MA. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science.* 2013;342(6159):1234850. doi:10.1126/science.1234850
365. Qian B-Z, Zhang H, Li J, et al. FLT1 signaling in metastasis-associated macrophages activates an inflammatory signature that promotes breast cancer metastasis. *J Exp Med.* 2015;212(9):1433-1448. doi:10.1084/jem.20141555
366. Mani SA, Guo W, Liao M-J, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133(4):704-715. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027
367. Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol.* 2014;16(6). doi:10.1038/ncb2976
368. Kong D, Banerjee S, Ahmad A, et al. Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells. *PLoS One.* 2010;5(8):e12445. doi:10.1371/journal.pone.0012445
369. Wellner U, Schubert J, Burk UC, et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol.* 2009;11(12):1487-1495. doi:10.1038/ncb1998
370. Hwang W-L, Jiang J-K, Yang S-H, et al. MicroRNA-146a directs the symmetric division of Snail-dominant colorectal cancer stem cells. *Nat Cell*

- Biol.* 2014;16(3):268-280.
doi:10.1038/ncb2910
371. Dong C, Yuan T, Wu Y, et al. Loss of FBP1 by Snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer. *Cancer Cell.* 2013;23(3):316-331. doi:10.1016/j.ccr.2013.01.022
372. Krebs AM, Mitschke J, Lasierra Losada M, et al. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nat Cell Biol.* 2017;19(5):518-529. doi:10.1038/ncb3513
373. Vega S, Morales A V, Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I, Nieto MA. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* 2004;18(10):1131-1143. doi:10.1101/gad.294104
374. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene.* 2010;29(34):4741-4751. doi:10.1038/onc.2010.215
375. Byers LA, Diao L, Wang J, et al. An Epithelial–Mesenchymal Transition Gene Signature Predicts Resistance to EGFR and PI3K Inhibitors and Identifies Axl as a Therapeutic Target for Overcoming EGFR Inhibitor Resistance. *Clin Cancer Res.* 2013;19(1):279 LP - 290. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1558
376. Chouaib S, Janji B, Tittarelli A, Eggermont A, Thiery JP. Tumor plasticity interferes with anti-tumor immunity. *Crit Rev Immunol.* 2014;34(2):91-102. doi:10.1615/critrevimmunol.2014010183
377. Searson PC. In Vitro Tumor Models : Advantages , Disadvantages , variables , and Selecting the Right Platform. 2016;4(February). doi:10.3389/fbioe.2016.00012
378. Vikis HG, Rymaszewski AL, Tichelaar JW. Mouse models of chemically-induced lung carcinogenesis. *Front Biosci (Elite Ed).* 2013;5:939-946. doi:10.2741/e673
379. Salimzadeh L, Jaberipour M, Hosseini A, Ghaderi A. Non-viral transfection methods optimized for gene delivery to a lung cancer cell line. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2013;5(2):68-77.
380. Makowiecki C, Nolte A, Sutaj B, et al. New basic approach to treat non-small cell lung cancer based on RNA-interference. *Thorac cancer.* 2014;5(2):112-120. doi:10.1111/1759-7714.12065
381. Eramo A, Haas TL, De Maria R. Lung cancer stem cells: Tools and targets to fight lung cancer. *Oncogene.* 2010;29(33):4625-4635. doi:10.1038/onc.2010.207
382. Gopinathan A, Tuveson DA. The use of GEM models for experimental cancer therapeutics. *Dis Model Mech.* 2008;1(2-3):83-86. doi:10.1242/dmm.000570
383. Morgan KM, Riedlinger GM, Rosenfeld J, Ganesan S, Pine SR. Patient-derived xenograft models of non-small cell lung cancer and their potential utility in personalized medicine. *Front Oncol.* 2017;7(JAN):1-6. doi:10.3389/fonc.2017.00002
384. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 2009;459(7244):262-265. doi:10.1038/nature07935
385. Artegiani B, Clevers H. Use and application of 3D-organoid technology. *Hum Mol Genet.* 2018;27(August):99-107. doi:10.1093/hmg/ddy187
386. Fatehullah A, Tan SH, Barker N. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat Cell Biol.* 2016;18(3):246-254. doi:10.1038/ncb3312
387. An update on organoid research. *Nat Cell Biol.* 2018;20(6):633. doi:10.1038/s41556-018-0119-y
388. Mazzeo P. A unifying concept: the history of cell theory. *Nat Cell Biol.* 1999;1(1):E13-5. doi:10.1038/8964
389. Sade RM. Transplantation at 100

- years: Alexis Carrel, pioneer surgeon. *Ann Thorac Surg.* 2005;80(6):2415-2418. doi:10.1016/j.athoracsur.2005.08.074
390. Rodríguez-Hernández CO, Torres-García SE, Olvera-Sandoval C, et al. Cell Culture: History, Development and Prospects. *Int J Curr Res Acad Rev.* 2014;2(12):188-200.
391. Souza A, Izabella C, Ferreira, Marangoni K, Bastos V, Alonso Goulart V. Advances in Cell Culture: More than a Century after Cultivating Cells. *J Biotechnol Biomater.* 2016;6:221. doi:10.4172/2155-952X.1000221
392. Malinin TI. Remembering Alexis Carrel and Charles A. Lindbergh. *Texas Hear Inst J.* 1996;23(1):28-35.
393. Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(9):1463-1467. doi:10.1043/1543-2165-133.9.1463
394. Kaur G, Dufour JM. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis.* 2012;2(1):1-5. doi:10.4161/spmg.19885
395. Kapalczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, et al. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci.* 2018;14(4):910-919. doi:10.5114/aoms.2016.63743
396. Fischbach C, Chen R, Matsumoto T, et al. Engineering tumors with 3D scaffolds. *Nat Methods.* 2007;4(10):855-860. doi:10.1038/nmeth1085
397. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(10):839-845. doi:10.1038/nrm2236
398. Weiswald L-B, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia.* 2015;17(1):1-15. doi:10.1016/j.neo.2014.12.004
399. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc.* 2009;4(3):309-324. doi:10.1038/nprot.2008.226
400. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 2005;65(13):5506-5511. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0626
401. Smart CE, Morrison BJ, Saunus JM, et al. In vitro analysis of breast cancer cell line tumourspheres and primary human breast epithelia mammospheres demonstrates inter- and intrasphere heterogeneity. *PLoS One.* 2013;8(6):e64388. doi:10.1371/journal.pone.0064388
402. Weiswald L-B, Richon S, Validire P, et al. Newly characterised ex vivo colospheres as a three-dimensional colon cancer cell model of tumour aggressiveness. *Br J Cancer.* 2009;101(3):473-482. doi:10.1038/sj.bjc.6605173
403. Kondo J, Endo H, Okuyama H, et al. Retaining cell-cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(15):6235-6240. doi:10.1073/pnas.1015938108
404. Fjellbirkeland L, Bjerkvig R, Laerum OD. Tumour fragment spheroids from human non-small-cell lung cancer maintained in organ culture. *Virchows Arch.* 1995;426(2):169-178. doi:10.1007/BF00192639
405. Barkauskas CE, Chung M-I, Fioret B, Gao X, Katsura H, Hogan BLM. Lung organoids: current uses and future promise. *Development.* 2017;144(6):986-997. doi:10.1242/dev.140103
406. Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? *Int J Radiat Biol.* 2007;83(11-12):849-871. doi:10.1080/09553000701727531
407. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated

- cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992;255(5052):1707-1710. doi:10.1126/science.1553558
408. Uchida N, Buck DW, He D, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(26):14720-14725. doi:10.1073/pnas.97.26.14720
409. Thoma CR, Zimmermann M, Agarkova I, Kelm JM, Krek W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;69-70:29-41. doi:10.1016/j.addr.2014.03.001
410. Katt ME, Placone AL, Wong AD, Xu ZS, Searson PC. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Front Bioeng Biotechnol*. 2016;4:12. doi:10.3389/fbioe.2016.00012
411. Gu L, Mooney DJ. Biomaterials and emerging anticancer therapeutics: engineering the microenvironment. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(1):56-66. doi:10.1038/nrc.2015.3
412. Hoarau-Véchet J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *Int J Mol Sci*. 2018;19(1). doi:10.3390/ijms19010181
413. Uthamanthil R, Tinkey P, Stanchina E de. Patient Derived Tumor Xenograft Models. *Acad Press*. 2016:xxv-xxvi. doi:10.1016/B978-0-12-804010-2.05001-3
414. DeRose YS, Wang G, Lin Y-C, et al. Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nat Med*. 2011;17(11):1514-1520. doi:10.1038/nm.2454
415. Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(6):338-350. doi:10.1038/nrclinonc.2012.61
416. Siolas D, Hannon GJ. Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. *Cancer Res*. 2013;73(17):5315-5319. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1069
417. Guenot D, Guérin E, Aguilon-Romain S, et al. Primary tumour genetic alterations and intra-tumoral heterogeneity are maintained in xenografts of human colon cancers showing chromosome instability. *J Pathol*. 2006;208(5):643-652. doi:10.1002/path.1936
418. Kim M, Mun H, Sung CO, et al. Patient-derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening. *Nat Commun*. 2019;10(1):3991. doi:10.1038/s41467-019-11867-6
419. Dong X, Guan J, English JC, et al. Patient-derived first generation xenografts of non-small cell lung cancers: promising tools for predicting drug responses for personalized chemotherapy. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2010;16(5):1442-1451. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2878
420. Ben-David U, Ha G, Tseng YY, et al. Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution. *Nat Genet*. 2017;49(11). doi:10.1038/ng.3967
421. Fichtner I, Rolff J, Soong R, et al. Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenografts as models for the identification of predictive biomarkers. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008;14(20):6456-6468. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0138
422. Russo MV, Favarsani A, Gatti S, et al. A new mouse avatar model of non-small cell lung cancer. *Front Oncol*. 2015;5:52. doi:10.3389/fonc.2015.00052
423. Hao C, Wang L, Peng S, et al. Gene mutations in primary tumors and corresponding patient-derived xenografts derived from non-small cell lung cancer. *Cancer Lett*. 2015;357(1):179-185.

- doi:10.1016/j.canlet.2014.11.024
424. Hidalgo M, Amant F, Biankin A V, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov.* 2014;4(9):998-1013. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0001
425. Moro M, Bertolini G, Caserini R, et al. Establishment of patient derived xenografts as functional testing of lung cancer aggressiveness. *Sci Rep.* 2017;(June):1-12. doi:10.1038/s41598-017-06912-7
426. Kellar A, Egan C, Morris D. Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical Trial Applications. *Biomed Res Int.* 2015;2015:621324. doi:10.1155/2015/621324
427. Marty M, Fumoleau P, Adenis A, et al. Oral vinorelbine pharmacokinetics and absolute bioavailability study in patients with solid tumors. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2001;12(11):1643-1649. doi:10.1023/a:1013180903805
428. Papageorgiou A, Stravoravdi P, Sahpazidou D, Natsis K, Chrysogelou E, Toliou T. Effect of navelbine on inhibition of tumor growth, cellular differentiation and estrogen receptor status on Lewis lung carcinoma. *Chemotherapy.* 2000;46(3):188-194. doi:10.1159/000007277
429. Sakai Y, Sasahira T, Ohmori H, Yoshida K, Kuniyasu H. Conjugated linoleic acid reduced metastasized LL2 tumors in mouse peritoneum. *Virchows Arch.* 2006;449(3):341-347. doi:10.1007/s00428-006-0249-7
430. Hayes SA, Hudson AL, Clarke SJ, Molloy MP, Howell VM. From mice to men: GEMMs as trial patients for new NSCLC therapies. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;27:118-127. doi:10.1016/j.semcdb.2014.04.002
431. Drosten M, Barbacid M. Targeting the MAPK Pathway in KRAS-Driven Tumors. *Cancer Cell.* 2020;37(4):543-550. doi:10.1016/j.ccell.2020.03.013
432. Chen Z, Cheng K, Walton Z, et al. A murine lung cancer co-clinical trial identifies genetic modifiers of therapeutic response. *Nature.* 2012;483(7391):613-617. doi:10.1038/nature10937
433. Chen Z, Sasaki T, Tan X, et al. Inhibition of ALK, PI3K/MEK, and HSP90 in murine lung adenocarcinoma induced by EML4-ALK fusion oncogene. *Cancer Res.* 2010;70(23):9827-9836. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1671
434. Chen Z, Akbay E, Mikse O, et al. Co-clinical trials demonstrate superiority of crizotinib to chemotherapy in ALK-rearranged non-small cell lung cancer and predict strategies to overcome resistance. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2014;20(5):1204-1211. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1733
435. Ji H, Li D, Chen L, et al. The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies. *Cancer Cell.* 2006;9(6):485-495. doi:10.1016/j.ccr.2006.04.022
436. Horio Y, Chen A, Rice P, Roth JA, Malkinson AM, Schrumph DS. Ki-ras and p53 mutations are early and late events, respectively, in urethane-induced pulmonary carcinogenesis in A/J mice. *Mol Carcinog.* 1996;17(4):217-223. doi:10.1002/(SICI)1098-2744(199612)17:4<217::AID-MC5>3.0.CO;2-A
437. Ohno J, Horio Y, Sekido Y, et al. Telomerase activation and p53 mutations in urethane-induced A/J mouse lung tumor development. *Carcinogenesis.* 2001;22(5):751-756. doi:10.1093/carcin/22.5.751
438. de Seranno S, Meuwissen R. Progress and applications of mouse models for human lung cancer. *Eur Respir J.* 2010;35(2):426-443. doi:10.1183/09031936.00124709
439. Rehm S, Lijinsky W, Singh G, Katyal SL. Mouse bronchiolar cell carcinogenesis. Histologic characterization and expression of Clara cell antigen in lesions induced by N-nitrosobis-(2-chloroethyl)

- ureas. *Am J Pathol.* 1991;139(2):413-422.
440. Gunning WT, Kramer PM, Lubet RA, et al. Chemoprevention of benzo(a)pyrene-induced lung tumors in mice by the farnesyltransferase inhibitor R115777. *Clin Cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2003;9(5):1927-1930.
441. Rogers LA. The American Type-Culture Collection. *Science.* 1925;62(1603):267. doi:10.1126/science.62.1603.267
442. Bairoch A. The Cellosaurus, a Cell-Line Knowledge Resource. *J Biomol Tech.* 2018;29(2):25-38. doi:10.7171/jbt.18-2902-002
443. Krupp M, Itzel T, Maass T, Hildebrandt A, Galle PR, Teufel A. CellLineNavigator: a workbench for cancer cell line analysis. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D942-D948. doi:10.1093/nar/gks1012
444. Amin MB, Greene FL, Edge SB, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(2):93-99. doi:10.3322/caac.21388
445. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
446. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989;24(3):148-154. doi:10.1007/BF00300234
447. Shebl AM, Zalata KR, Amin MM, El-Hawary AK. An inexpensive method of small paraffin tissue microarrays using mechanical pencil tips. *Diagn Pathol.* 2011;6(1):1-5. doi:10.1186/1746-1596-6-117
448. Choi CH, Kim KH, Song JY, et al. Construction of high-density tissue microarrays at low cost by using self-made manual microarray kits and recipient paraffin blocks. *Korean J Pathol.* 2012;46(6):562-568. doi:10.4132/KoreanJPathol.2012.46.6.562
449. Parsons M, Grabsch H. How to make tissue microarrays. *Diagnostic Histopathol.* 2009;15(3):142-150. doi:10.1016/j.mpdhp.2009.01.010
450. Vogel UF, Bueltmann BD. Simple, inexpensive, and precise paraffin tissue microarrays constructed with a conventional microcompound table and a drill grinder. *Am J Clin Pathol.* 2006;126(3):342-348. doi:10.1309/F2Q38DXN1V1V4GQM
451. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC profiler: An open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One.* 2014;9(5). doi:10.1371/journal.pone.0096801
452. Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Moriya T, Kaneko C, Sasano H. Sex Steroid Hormone Receptors in Human Thymoma. 2003;88(5):2309-2317. doi:10.1210/jc.2002-021353
453. Koopman LA, Terp MG, Zom GG, et al. Enapotamab vedotin, an AXL-specific antibody-drug conjugate, shows preclinical antitumor activity in non-small cell lung cancer. *JCI Insight.* 2019;4(21):1-19. doi:10.1172/jci.insight.128199
454. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PAJ, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2003;21(20):3798-3807. doi:10.1200/JCO.2003.11.069
455. Choudhry P. High-Throughput Method for Automated Colony and Cell Counting by Digital Image Analysis Based on Edge Detection. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148469. doi:10.1371/journal.pone.0148469
456. Zhang WC, Shyh-chang N, Yang H, et al. Glycine Decarboxylase Activity Drives Non-Small Cell Lung Cancer Tumor-Initiating Cells and Tumorigenesis. *Cell.* 2012;148(1-

- 2):259-272.
doi:10.1016/j.cell.2011.11.050
457. Buchheit CL, Weigel KJ, Schafer ZT. Cancer cell survival during detachment from the ECM: Multiple barriers to tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(9):632-641. doi:10.1038/nrc3789
458. Kai FB, Drain AP, Weaver VM. The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey. *Dev Cell*. 2019;49(3):332-346. doi:10.1016/j.devcel.2019.03.026
459. Leon G, MacDonagh L, Finn SP, Cuffe S, Barr MP. Cancer stem cells in drug resistant lung cancer: Targeting cell surface markers and signaling pathways. *Pharmacol Ther*. 2016;158:71-90. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.12.001
460. Kemper K, Sprick MR, de Bree M, et al. The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res*. 2010;70(2):719-729. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1820
461. Salomon JJ, Muchitsch VE, Gausterer JC, et al. The Cell Line NCI-H441 Is a Useful in Vitro Model for Transport Studies of Human Distal Lung Epithelial Barrier. *Mol Pharm*. 2014;11(3):995-1006. doi:10.1021/mp4006535
462. Calvet CY, André FM, Mir LM. The culture of cancer cell lines as tumorspheres does not systematically result in cancer stem cell enrichment. *PLoS One*. 2014;9(2). doi:10.1371/journal.pone.0089644
463. Zaroni M, Piccinini F, Arienti C, et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci Rep*. 2016;6:19103. doi:10.1038/srep19103
464. Sankpal N V, Willman MW, Fleming TP, Mayfield JD, Gillanders WE. Transcriptional repression of epithelial cell adhesion molecule contributes to p53 control of breast cancer invasion. *Cancer Res*. 2009;69(3):753-757. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2708
465. Hoh J, Jin S, Parrado T, Edington J, Levine AJ, Ott J. The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(13):8467-8472. doi:10.1073/pnas.132268899
466. Mirza A, Wu Q, Wang L, et al. Global transcriptional program of p53 target genes during the process of apoptosis and cell cycle progression. *Oncogene*. 2003;22(23):3645-3654. doi:10.1038/sj.onc.1206477
467. Winter MJ, Nagelkerken B, Mertens AEE, Rees-Bakker HAM, Briaire-de Bruijn IH, Litvinov S V. Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res*. 2003;285(1):50-58. doi:10.1016/s0014-4827(02)00045-9
468. Jia G, Wang X, Yan M, Chen W, Zhang P. CD166-mediated epidermal growth factor receptor phosphorylation promotes the growth of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2016;59:1-11. doi:10.1016/j.oraloncology.2016.05.010
469. Shibue T, Robert A. Weinberg. EMT, CSCs and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(10):611-629. doi:10.1016/j.celrep.2018.06.092
470. Zhang W, Zhu J, Bai J, et al. Comparison of the inhibitory effects of three transcriptional variants of CDKN2A in human lung cancer cell line A549. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29(1):74. doi:10.1186/1756-9966-29-74
471. Pérez-Benavente B, Farràs R. Cell Synchronization Techniques to Study the Action of CDK Inhibitors. *Methods Mol Biol*. 2016;1336:85-93. doi:10.1007/978-1-4939-2926-9_8
472. Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*. 2019;50(4):924-940. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.024

473. Li J, Ballim D, Rodriguez M, et al. The anti-proliferative function of the TGF- β 1 signaling pathway involves the repression of the oncogenic TBX2 by its homologue TBX3. *J Biol Chem.* 2014;289(51):35633-35643. doi:10.1074/jbc.M114.596411
474. Zhang Y, Xia H, Ge X, et al. CD44 acts through RhoA to regulate YAP signaling. *Cell Signal.* 2014;26(11):2504-2513. doi:https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.07.031
475. Rodrigues MFSD, Xavier FC de A, Andrade NP, et al. Prognostic implications of CD44, NANOG, OCT4, and BMI1 expression in tongue squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2018;40(8):1759-1773. doi:10.1002/hed.25158
476. Nishino M, Ozaki M, Hegab AE, et al. Variant CD44 expression is enriching for a cell population with cancer stem cell-like characteristics in human lung adenocarcinoma. *J Cancer.* 2017;8(10):1774-1785. doi:10.7150/jca.19732
477. Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell.* 2006;127(4):679-695. doi:10.1016/j.cell.2006.11.001
478. Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(2):128-134. doi:10.1038/nrc.2017.118
479. Yuan X, Wu H, Han N, et al. Notch signaling and EMT in non-small cell lung cancer: biological significance and therapeutic application. *J Hematol Oncol.* 2014;7(1):87. doi:10.1186/s13045-014-0087-z
480. Donnem T, Andersen S, Al-Shibli K, Al-Saad S, Busund L-T, Bremnes RM. Prognostic impact of Notch ligands and receptors in nonsmall cell lung cancer: coexpression of Notch-1 and vascular endothelial growth factor-A predicts poor survival. *Cancer.* 2010;116(24):5676-5685. doi:10.1002/cncr.25551
481. Tang D-J, Dong S-S, Ma N-F, et al. Overexpression of eukaryotic initiation factor 5A2 enhances cell motility and promotes tumor metastasis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2010;51(4):1255-1263. doi:10.1002/hep.23451
482. Zhu W, Cai M-Y, Tong Z-T, et al. Overexpression of EIF5A2 promotes colorectal carcinoma cell aggressiveness by upregulating MTA1 through C-myc to induce epithelial-mesenchymal transition. *Gut.* 2012;61(4):562-575. doi:10.1136/gutjnl-2011-300207
483. Sun J, Xu Z, Lv H, et al. eIF5A2 regulates the resistance of gastric cancer cells to cisplatin via induction of EMT. *Am J Transl Res.* 2018;10(12):4269-4279.
484. Zhu Q, Lu L, Sun S, et al. EIF5A2 is highly expressed in anaplastic thyroid carcinoma and is associated with tumor growth by modulating TGF- β signals. *Oncol Res.* 2020;(16):1-25. doi:10.3727/096504020X15834065061807
485. Ye Y, Zhang Z, Fan X, et al. Notch3 overexpression associates with poor prognosis in human non-small-cell lung cancer. *Med Oncol.* 2013;30(2):595. doi:10.1007/s12032-013-0595-7
486. Wang H, Zang C, Liu XS, Aster JC. The role of Notch receptors in transcriptional regulation. *J Cell Physiol.* 2015;230(5):982-988. doi:10.1002/jcp.24872
487. Borggreffe T, Oswald F. Keeping notch target genes off: a CSL corepressor caught in the act. *Structure.* 2014;22(1):3-5. doi:10.1016/j.str.2013.12.007
488. Ottaviani S, Stebbing J, Frampton AE, et al. TGF- β induces miR-100 and miR-125b but blocks let-7a through LIN28B controlling PDAC progression. *Nat Commun.* 2018;9(1):1845. doi:10.1038/s41467-018-03962-x
489. Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S. AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics.* 2009;25(2):288-289. doi:10.1093/bioinformatics/btn615

490. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res.* 2003;13(9):2129-2141. doi:10.1101/gr.772403
491. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(43):15545-15550. doi:10.1073/pnas.0506580102
492. Zhao M, Kong L, Liu Y, Qu H. dbEMT: an epithelial-mesenchymal transition associated gene resource. *Sci Rep.* 2015;5:11459. doi:10.1038/srep11459
493. Xi Y, Tan K, Brumwell AN, et al. Inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis by methacycline. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;50(1):51-60. doi:10.1165/rcmb.2013-0099OC
494. Song J, Wang W, Wang Y, et al. Epithelial-mesenchymal transition markers screened in a cell-based model and validated in lung adenocarcinoma. *BMC Cancer.* 2019;19(1):680. doi:10.1186/s12885-019-5885-9
495. Gao L-M, Xu S-F, Zheng Y, et al. Long non-coding RNA H19 is responsible for the progression of lung adenocarcinoma by mediating methylation-dependent repression of CDH1 promoter. *J Cell Mol Med.* July 2019. doi:10.1111/jcmm.14533
496. Cai Z-G, Wu H-B, Xu X-P, Li W. Down-regulation of miR-26 plays essential roles in TGF β -induced EMT. *Cell Biol Int.* July 2018. doi:10.1002/cbin.11029
497. Camerlingo R, Miceli R, Marra L, et al. Conditioned medium of primary lung cancer cells induces EMT in A549 lung cancer cell line by TGF- β 1 and miRNA21 cooperation. *PLoS One.* 2019;14(7):e0219597. doi:10.1371/journal.pone.0219597
498. Han M-L, Zhao Y-F, Tan C-H, et al. Cathepsin L upregulation-induced EMT phenotype is associated with the acquisition of cisplatin or paclitaxel resistance in A549 cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2016;37(12):1606-1622. doi:10.1038/aps.2016.93
499. Su C, Cheng X, Li Y, et al. MiR-21 improves invasion and migration of drug-resistant lung adenocarcinoma cancer cell and transformation of EMT through targeting HBP1. *Cancer Med.* 2018;7(6):2485-2503. doi:10.1002/cam4.1294
500. Sauer K, Lehner CF. The role of cyclin E in the regulation of entry into S phase. *Prog Cell Cycle Res.* 1995;1:125-139. doi:10.1007/978-1-4615-1809-9_10
501. Huang L, Wang D, Chen Y, et al. Meta-analysis for cyclin E in lung cancer survival. *Clin Chim Acta.* 2012;413(7):663-668. doi:https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.12.020
502. Rho JK, Choi YJ, Lee JK, et al. Epithelial to mesenchymal transition derived from repeated exposure to gefitinib determines the sensitivity to EGFR inhibitors in A549, a non-small cell lung cancer cell line. *Lung Cancer.* 2009;63(2):219-226. doi:10.1016/j.lungcan.2008.05.017
503. Rodón L, González-Juncà A, del Mar Inda M, Sala-Hojman A, Martínez-Sáez E, Seoane J. Active CREB1 Promotes a Malignant TGF β 2 Autocrine Loop in Glioblastoma. *Cancer Discov.* 2014;4(10):1230 LP - 1241. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0275
504. Burger GA, Danen EHJ, Beltman JB. Deciphering epithelial – Mesenchymal Transition Regulatory Networks in Cancer through Computational Approaches. *Front Oncol.* 2017;7(August). doi:10.3389/fonc.2017.00162
505. Venkatesh V, Nataraj R, Thangaraj GS, et al. Targeting notch signalling pathway of cancer stem cells. *Stem Cell Investig.* 2018;5(2). doi:10.21037/sci.2018.02.02
506. Chen G, Gharib TG, Thomas DG, et al. Proteomic analysis of eIF-5A in lung adenocarcinomas. *Proteomics.* 2003;3(4):496-504.

- doi:10.1002/pmic.200390063
507. Belda-Palazón B. Hipusinación del factor de traducción eIF5A dependiente de poliaminas. 2014. doi:10.4995/Thesis/10251/48474
508. Chen MJ, Gao XJ, Xu LN, Liu TF, Liu XH, Liu LX. Ezrin is required for epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 in A549 cells. *Int J Oncol*. 2014;45(4):1515-1522. doi:10.3892/ijo.2014.2554
509. Cherry JM, Hong EL, Amundsen C, et al. Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Database issue):D700-5. doi:10.1093/nar/gkr1029
510. Wu CH, Yeh L-SL, Huang H, et al. The Protein Information Resource. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(1):345-347. doi:10.1093/nar/gkg040
511. Berardini TZ, Reiser L, Li D, et al. The Arabidopsis information resource: Making and mining the "gold standard" annotated reference plant genome. *Genesis*. 2015;53(8):474-485. doi:10.1002/dvg.22877
512. Turpaev KT. Translation Factor eIF5A, Modification with Hypusine and Role in Regulation of Gene Expression. eIF5A as a Target for Pharmacological Interventions. *Biochemistry (Mosc)*. 2018;83(8):863-873. doi:10.1134/S0006297918080011
513. Nakanishi S, Cleveland JL. Targeting the polyamine-hypusine circuit for the prevention and treatment of cancer. *Amino Acids*. 2016;48(10):2353-2362. doi:10.1007/s00726-016-2275-3
514. Schultz CR, Geerts D, Mooney M, El-Khawaja R, Koster J, Bachmann AS. Synergistic drug combination GC7/DFMO suppresses hypusine/spermidine-dependent eIF5A activation and induces apoptotic cell death in neuroblastoma. *Biochem J*. 2018;475(2):531-545. doi:10.1042/BCJ20170597
515. Olsen ME, Connor JH. Hypusination of eIF5A as a Target for Antiviral Therapy. *DNA Cell Biol*. 2017;36(3):198-201. doi:10.1089/dna.2016.3611
516. Herbst RS, Heymach J V, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1367-1380. doi:10.1056/NEJMra0802714
517. Jiang Y, Zhao J, Zhang Y, et al. Establishment of lung cancer patient-derived xenograft models and primary cell lines for lung cancer study. *J Transl Med*. 2018;16(1):1-18. doi:10.1186/s12967-018-1516-5
518. Prieto-Potin I, Carvajal N, Plaza-Sánchez J, et al. Validation and clinical application of a targeted next-generation sequencing gene panel for solid and hematologic malignancies. *PeerJ*. 2020;8:e10069. doi:10.7717/peerj.10069
519. Taya Y, Hosogai K, Hirohashi S, et al. A novel combination of K-ras and myc amplification accompanied by point mutational activation of K-ras in a human lung cancer. *EMBO J*. 1984;3(12):2943-2946. doi:10.1002/j.1460-2075.1984.tb02236.x
520. Zhang X, Zhang J, Li M, et al. Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenograft models with genetic aberrations within EGFR, KRAS and FGFR1: useful tools for preclinical studies of targeted therapies. *J Transl Med*. 2013;11:168. doi:10.1186/1479-5876-11-168
521. Bahcall M, Awad MM, Sholl LM, et al. Amplification of Wild-type KRAS Imparts Resistance to Crizotinib in MET Exon 14 Mutant Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2018;24(23):5963-5976. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0876
522. Moro M, Bertolini G, Tortoreto M, Pastorino U, Sozzi G, Roz L. Patient-derived xenografts of non small cell lung cancer: resurgence of an old model for investigation of modern concepts of tailored therapy and cancer stem cells. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:568567. doi:10.1155/2012/568567

523. Lee JW, Soung YH, Seo SH, et al. Somatic mutations of ERBB2 kinase domain in gastric, colorectal, and breast carcinomas. *Clin Cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2006;12(1):57-61. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0976
524. Grenda A, Krawczyk P, Chmielewska I, Nicoś M, Milanowski J. Questions around mutation T1010I in MET gene: results of next generation sequencing in Polish patient with suspected hereditary adenoid cystic carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(17):8889-8892. doi:10.26355/eurrev_202009_22829
525. Ma PC, Kijima T, Maulik G, et al. c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Res.* 2003;63(19):6272-6281.
526. Johnston JJ, Rubinstein WS, Facio FM, et al. Secondary variants in individuals undergoing exome sequencing: screening of 572 individuals identifies high-penetrance mutations in cancer-susceptibility genes. *Am J Hum Genet.* 2012;91(1):97-108. doi:10.1016/j.ajhg.2012.05.021
527. Bean LJH, Tinker SW, da Silva C, Hegde MR. Free the data: one laboratory's approach to knowledge-based genomic variant classification and preparation for EMR integration of genomic data. *Hum Mutat.* 2013;34(9):1183-1188. doi:10.1002/humu.22364
528. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D941-D947. doi:10.1093/nar/gky1015
529. Shah SP, Morin RD, Khattra J, et al. Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature.* 2009;461(7265):809-813. doi:10.1038/nature08489
530. Deniziaut G, Tille JC, Bidard F-C, et al. ERBB2 mutations associated with solid variant of high-grade invasive lobular breast carcinomas. *Oncotarget.* 2016;7(45):73337-73346. doi:10.18632/oncotarget.11819
531. Wirtenberger M, Hemminki K, Försti A, et al. c-MYC Asn11Ser is associated with increased risk for familial breast cancer. *Int J cancer.* 2005;117(4):638-642. doi:10.1002/ijc.21225
532. Clark HM, Yano T, Otsuki T, Jaffe ES, Shibata D, Raffeld M. Mutations in the coding region of c-MYC in AIDS-associated and other aggressive lymphomas. *Cancer Res.* 1994;54(13):3383-3386.
533. Mateo J, Seed G, Bertan C, et al. Genomics of lethal prostate cancer at diagnosis and castration resistance. *J Clin Invest.* 2020;130(4):1743-1751. doi:10.1172/JCI132031
534. Majewski IJ, Mittempergher L, Davidson NM, et al. Identification of recurrent FGFR3 fusion genes in lung cancer through kinome-centred RNA sequencing. *J Pathol.* 2013;230(3):270-276. doi:10.1002/path.4209
535. Ilie M, Nunes M, Blot L, et al. Setting up a wide panel of patient-derived tumor xenografts of non-small cell lung cancer by improving the preanalytical steps. *Cancer Med.* 2015;4(2):201-211. doi:10.1002/cam4.357
536. Bertolini G, D'Amico L, Moro M, et al. Microenvironment-modulated metastatic CD133+/CXCR4+/EpCAM-lung cancer-initiating cells sustain tumor dissemination and correlate with poor prognosis. *Cancer Res.* 2015;75(17):3636-3649. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3781
537. Herrmann H, Bär H, Kreplak L, Strelkov S V, Aebi U. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(7):562-573. doi:10.1038/nrm2197
538. Cai YC, Banner B, Glickman J, Odze RD. Cytokeratin 7 and 20 and thyroid transcription factor 1 can help distinguish pulmonary from gastrointestinal carcinoid and pancreatic endocrine tumors. *Hum Pathol.* 2001;32(10):1087-1093.

- doi:10.1053/hupa.2001.28245
539. Moldvay J, Jackel M, Bogos K, et al. The role of TTF-1 in differentiating primary and metastatic lung adenocarcinomas. *Pathol Oncol Res.* 2004;10(2):85-88. doi:10.1007/BF02893461
540. Bingle CD. Thyroid transcription factor-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29(12):1471-1473. doi:10.1016/s1357-2725(97)00007-1
541. Khor A, Whitsett JA, Stahlman MT, Olson SJ, Cagle PT. Utility of surfactant protein B precursor and thyroid transcription factor 1 in differentiating adenocarcinoma of the lung from malignant mesothelioma. *Hum Pathol.* 1999;30(6):695-700. doi:10.1016/s0046-8177(99)90096-5
542. Lazzaro D, Price M, de Felice M, Di Lauro R. The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development.* 1991;113(4):1093-1104. doi:10.1242/dev.113.4.1093
543. Hitchcock CL. Ki-67 staining as a means to simplify analysis of tumor cell proliferation. *Am J Clin Pathol.* 1991;96(4):444-446. doi:10.1093/ajcp/96.4.444
544. Martin B, Paesmans M, Mascaux C, et al. Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer.* 2004;91(12):2018-2025. doi:10.1038/sj.bjc.6602233
545. Seigneurin D, Guillaud P. [Ki-67 antigen, a cell cycle and tumor growth marker]. *Pathol Biol (Paris).* 1991;39(10):1020-1028.
546. Lee HW, Lee J-I, Lee SJ, et al. Patient-derived xenografts from non-small cell lung cancer brain metastases are valuable translational platforms for the development of personalized targeted therapy. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2015;21(5):1172-1182. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1589
547. Cuenca RE, Takita H, Bankert R. Orthotopic engraftment of human lung tumours in SCID mice for the study of metastasis. *Surg Oncol.* 1996;5(2):85-91. doi:10.1016/s0960-7404(96)80005-3
548. Dauphin M, Barbe C, Lemaire S, et al. Vimentin expression predicts the occurrence of metastases in non small cell lung carcinomas. *Lung Cancer.* 2013;81(1):117-122. doi:10.1016/j.lungcan.2013.03.011
549. Battaglia RA, Delic S, Herrmann H, Snider NT. Vimentin on the move: new developments in cell migration. *F1000Research.* 2018;7. doi:10.12688/f1000research.15967.1
550. Liu S, Liu L, Ye W, et al. High Vimentin Expression Associated with Lymph Node Metastasis and Predicated a Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Sci Rep.* 2016;6:38834. doi:10.1038/srep38834
551. Tsoukalas N, Aravantinou-Fatorou E, Tolia M, et al. Epithelial-Mesenchymal Transition in Non Small-cell Lung Cancer. *Anticancer Res.* 2017;37(4):1773-1778. doi:10.21873/anticancer.11510
552. Mahmood MQ, Ward C, Muller HK, Sohal SS, Walters EH. Epithelial mesenchymal transition (EMT) and non-small cell lung cancer (NSCLC): a mutual association with airway disease. *Med Oncol.* 2017;34(3):45. doi:10.1007/s12032-017-0900-y
553. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell.* 2012;21(3):309-322. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022
554. Zhang X, Li G, Guo Y, et al. Regulation of ezrin tension by S-nitrosylation mediates non-small cell lung cancer invasion and metastasis. *Theranostics.* 2019;9(9):2555-2571. doi:10.7150/thno.32479
555. Upton MP, Hirohashi S, Tome Y, Miyazawa N, Suemasu K, Shimosato Y. Expression of vimentin in surgically resected

- adenocarcinomas and large cell carcinomas of lung. *Am J Surg Pathol.* 1986;10(8):560-567. doi:10.1097/0000478-198608000-00006
556. Byrne AT, Alférez DG, Amant F, et al. Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(4):254-268. doi:10.1038/nrc.2016.140
557. Whittle JR, Lewis MT, Lindeman GJ, Visvader JE. Patient-derived xenograft models of breast cancer and their predictive power. *Breast Cancer Res.* 2015;17(1):17. doi:10.1186/s13058-015-0523-1
558. Madan R, Brandwein-Gensler M, Schlecht NF, et al. Differential tissue and subcellular expression of ERM proteins in normal and malignant tissues: cytoplasmic ezrin expression has prognostic significance for head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2006;28(11):1018-1027. doi:10.1002/hed.20435
559. Woo T, Okudela K, Yazawa T, et al. Prognostic value of KRAS mutations and Ki-67 expression in stage I lung adenocarcinomas. *Lung Cancer.* 2009;65(3):355-362. doi:10.1016/j.lungcan.2008.11.020
560. Lee HW, Kim EH, Oh M-H. Clinicopathologic implication of ezrin expression in non-small cell lung cancer. *Korean J Pathol.* 2012;46(5):470-477. doi:10.4132/KoreanJPathol.2012.46.5.470
561. Jin T, Jin J, Li X, et al. Prognostic implications of ezrin and phosphorylated ezrin expression in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 2014;14:191. doi:10.1186/1471-2407-14-191
562. Pardo-Sánchez JM, Mancheño N, Cerón J, et al. Increased Tumor Growth Rate and Mesenchymal Properties of NSCLC-Patient-Derived Xenograft Models during Serial Transplantation. *Cancers (Basel).* 2021;13(12). doi:10.3390/cancers13122980
563. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(4):275-284. doi:10.1038/nrc1590
564. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1253-1261. doi:10.1056/NEJMra061808
565. Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007;67(3):1030-1037. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2030
566. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 2007;445(7123):111-115. doi:10.1038/nature05384
567. Rajendran V, Jain MV. In Vitro Tumorigenic Assay: Colony Forming Assay for Cancer Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 2018;1692:89-95. doi:10.1007/978-1-4939-7401-6_8
568. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(3):211-224. doi:10.1038/nrm1858
569. Suuronen EJ, Sheardown H, Newman KD, McLaughlin CR, Griffith M. Building in vitro models of organs. *Int Rev Cytol.* 2005;244:137-173. doi:10.1016/S0074-7696(05)44004-8
570. Wang P, Gao Q, Suo Z, et al. Identification and Characterization of Cells with Cancer Stem Cell Properties in Human Primary Lung Cancer Cell Lines. *PLoS One.* 2013;8(3). doi:10.1371/journal.pone.0057020
571. Nunes T, Hamdan D, Leboeuf C, et al. Targeting Cancer Stem Cells to Overcome Chemoresistance. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12). doi:10.3390/ijms19124036
572. Sullivan JP, Spinola M, Dodge M, et al. Aldehyde dehydrogenase activity selects for lung adenocarcinoma stem cells dependent on notch signaling. *Cancer Res.* 2010;70(23):9937-9948. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0881

573. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(6):400-414. doi:10.1038/nrc2657
574. Insinga A, Cicalese A, Faretta M, et al. DNA damage in stem cells activates p21, inhibits p53, and induces symmetric self-renewing divisions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(10):3931-3936. doi:10.1073/pnas.1213394110
575. Chen C-Y, Chen Y-Y, Hsieh M-S, et al. Expression of Notch Gene and Its Impact on Survival of Patients with Resectable Non-small Cell Lung Cancer. *J Cancer*. 2017;8(7):1292-1300. doi:10.7150/jca.17741
576. Liu C-W, Li C-H, Peng Y-J, et al. Snail regulates Nanog status during the epithelial-mesenchymal transition via the Smad1/Akt/GSK3 β signaling pathway in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*. 2014;5(11):3880-3894. doi:10.18632/oncotarget.2006
577. Schmitt M, Metzger M, Gradl D, Davidson G, Orian-Rousseau V. CD44 functions in Wnt signaling by regulating LRP6 localization and activation. *Cell Death Differ*. 2015;22(4):677-689. doi:10.1038/cdd.2014.156
578. Stewart RL, West D, Wang C, et al. Elevated integrin α 6 β 4 expression is associated with venous invasion and decreased overall survival in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol*. 2016;54:174-183. doi:10.1016/j.humpath.2016.04.003
579. Yanagawa J, Walser TC, Zhu LX, et al. Snail promotes CXCR2 ligand-dependent tumor progression in non-small cell lung carcinoma. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009;15(22):6820-6829. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1558
580. Chang W-H, Ho B-C, Hsiao Y-J, et al. JAG1 Is Associated with Poor Survival through Inducing Metastasis in Lung Cancer. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150355. doi:10.1371/journal.pone.0150355
581. Raponi M, Zhang Y, Yu J, et al. Gene expression signatures for predicting prognosis of squamous cell and adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res*. 2006;66(15):7466-7472. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1191
582. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(27):2817-2826. doi:10.1056/NEJMoa041588
583. Sanmartín E, Sirera R, Usó M, et al. A gene signature combining the tissue expression of three angiogenic factors is a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(2):612-620. doi:10.1245/s10434-013-3330-x
584. Huang E, Ishida S, Pittman J, et al. Gene expression phenotypic models that predict the activity of oncogenic pathways. *Nat Genet*. 2003;34(2):226-230. doi:10.1038/ng1167
585. Jochum W, Passequé E, Wagner EF. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene*. 2001;20(19):2401-2412. doi:10.1038/sj.onc.1204389
586. Sonntag R, Giebler N, Nevzorova YA, et al. Cyclin E1 and cyclin-dependent kinase 2 are critical for initiation, but not for progression of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(37):9282-9287. doi:10.1073/pnas.1807155115
587. Hwang HC, Clurman BE. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene*. 2005;24(17):2776-2786. doi:10.1038/sj.onc.1208613
588. Hagerstrand D, Tong A, Schumacher SE, et al. Systematic interrogation of 3q26 identifies TLOC1 and SKIL as cancer drivers. *Cancer Discov*. 2013;3(9):1044-1057. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0592
589. Coni S, Serrao SM, Yurtsever ZN, et al. Blockade of EIF5A hypusination limits colorectal cancer growth by inhibiting MYC elongation. *Cell Death Dis*. 2020. doi:10.1038/s41419-020-03174-6

590. Nie H, Mei J, Zhang Q, An F, Zhan Q. Systematic Characterization of the Expression and Prognostic Values of Formin-Like Gene Family in Gastric Cancer. *DNA Cell Biol.* 2020;39(9):1664-1677. doi:10.1089/dna.2020.5508
591. Zhang M-F, Li Q-L, Yang Y-F, Cao Y, Zhang CZ. FMNL1 Exhibits Pro-Metastatic Activity via CXCR2 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Front Oncol.* 2020;10:564614. doi:10.3389/fonc.2020.564614
592. Osawa H, Smith CA, Ra YS, Kongkham P, Rutka JT. The role of the membrane cytoskeleton cross-linker ezrin in medulloblastoma cells. *Neuro Oncol.* 2009;11(4):381-393. doi:10.1215/15228517-2008-110
593. Tsukita S, Yonemura S. ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9(1):70-75. doi:10.1016/s0955-0674(97)80154-8
594. Ben-David U, Beroukhim R, Golub TR. Genomic evolution of cancer models: perils and opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(2):97-109. doi:10.1038/s41568-018-0095-3
595. Ma Y, Zhang P, An G, et al. Induction of Patient-Derived Xenograft Formation and Clinical Significance of Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) in Lung Cancer Patients. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2016;22:4017-4025. doi:10.12659/msm.900661
596. Moore AR, Rosenberg SC, McCormick F, Malek S. RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged? *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(8):533-552. doi:10.1038/s41573-020-0068-6
597. Hugo H, Ackland ML, Blick T, et al. Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol.* 2007;213(2):374-383. doi:10.1002/jcp.21223
598. Ye Z, Zhang X, Luo Y, et al. Prognostic Values of Vimentin Expression and Its Clinicopathological Significance in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies with 4118 Cases. *PLoS One.* 2016;11(9):e0163162. doi:10.1371/journal.pone.0163162
599. Li Q, Gao H, Xu H, et al. Expression of ezrin correlates with malignant phenotype of lung cancer, and in vitro knockdown of ezrin reverses the aggressive biological behavior of lung cancer cells. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2012;33(5):1493-1504. doi:10.1007/s13277-012-0400-9
600. Zacharias M, Brcic L, Eidenhammer S, Popper H. Bulk tumour cell migration in lung carcinomas might be more common than epithelial-mesenchymal transition and be differently regulated. *BMC Cancer.* 2018;18(1):717. doi:10.1186/s12885-018-4640-y
601. Matsubara T, Tagawa T, Takada K, et al. Clinical and Prognostic Significance of the Epithelial-Mesenchymal Transition in Stage IA Lung Adenocarcinoma: A Propensity Score-Matched Analysis. *Clin Lung Cancer.* 2019;20(4):e504-e513. doi:10.1016/j.clcc.2019.04.006
602. Zhang Y, Wang LF, Gao JH, et al. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition-related molecules in lung adenocarcinoma. *Curr Oncol.* 2019;26(2):e121-e127. doi:10.3747/co.26.4471
603. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(7):517-531. doi:10.1038/nrm2438
604. Richardson AM, Havel LS, Koyen AE, et al. Vimentin Is Required for Lung Adenocarcinoma Metastasis via Heterotypic Tumor Cell-Cancer-Associated Fibroblast Interactions during Collective Invasion. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2018;24(2):420-432. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1776
605. Yin L-M, Duan T-T, Ulloa L, Yang Y-Q. Ezrin Orchestrates Signal Transduction in Airway Cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2018;174:1-23. doi:10.1007/112_2017_4
606. Slik K, Kurki S, Korpela T, Carpén O,

Korkeila E, Sundström J. Ezrin expression combined with MSI status in prognostication of stage II colorectal cancer. *PLoS One*.

2017;12(9):e0185436.
doi:10.1371/journal.pone.0185436

