



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Estudio del microambiente tumoral: Caracterización de la
interacción entre CAFs y células tumorales en modelos 3D
de cáncer de pulmón

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Nieto Gimeno, María Isabel

Tutor/a: Jantus Lewintre, Eloisa

Cotutor/a externo: Torres Martínez, Susana

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA Y
DEL MEDIO NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

ESTUDIO DEL MICROAMBIENTE TUMORAL: CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE CAFS Y CÉLULAS TUMORALES EN MODELOS 3D DE CÁNCER DE PULMÓN.

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: MARÍA ISABEL NIETO GIMENO

TUTORA: Dra. ELOISA JANTUS LEWINTRE

COTUTORA EXTERNA: Dra. SUSANA TORRES MARTÍNEZ

Curso Académico: 2023/2024

VALENCIA, 8 DE JULIO DE 2024

Tipo Licencia: *Creative Commons*

Estudio del microambiente tumoral: caracterización de la interacción entre CAFs y células tumorales en modelos 3D de cáncer de pulmón.

Resumen

El cáncer no es únicamente un proceso celular intrínseco que afecta a las células neoplásicas impulsado por una serie de errores genéticos y epigenéticos, sino que también depende de cambios en su entorno. El microambiente tumoral (TME) favorece el crecimiento, la invasión y la metástasis del tumor. Para el estudio del TME, los modelos 3D proporcionan un entorno similar al tumor, con gradientes de nutrientes e hipoxia autoimpuestos que generan un entorno no conseguido mediante los cultivos 2D tradicionales. Por todo ello, son un enfoque ideal para el estudio de las interacciones tumor-estroma. Teniendo en cuenta que uno de los componentes principales del TME son los fibroblastos asociados al tumor (CAFs), el principal objetivo de este trabajo es estudiar mediante un modelo 3D (tumoresferas) cómo interaccionan los CAFs con las células tumorales para obtener una mejor comprensión de la interrelación de ambos tipos celulares en el nicho tumoral. Para ello se establecieron co-cultivos entre tumoresferas derivadas de tejido tumoral de pacientes con cáncer de pulmón y una línea de CAFs inmortalizada. Para evaluar los cambios en las células tumorales mediados por la interacción con los CAFs y viceversa, se analizaron mediante 3 paneles multiparamétricos por citometría de flujo la expresión de diferentes biomarcadores (relacionados con propiedades *stemness*, inmunomodulatorias y procesos de transición epitelio mesenquimal (EMT)). Se observó que los CAFs son capaces de inducir la expresión de marcadores con capacidad inmunomodulatoria, de modular la capacidad *stemness* y de inducir la EMT en las células tumorales. Por otro lado, también se observaron cambios en los CAFs ya que experimentaron variaciones en la expresión de determinados marcadores en el co-cultivo. En conclusión, los CAFs y las células tumorales interaccionan entre sí y se influyen mutuamente, aunque dicho efecto puede variar en función del origen específico de las células tumorales. No obstante, es necesario ampliar la cohorte de cultivos analizados para corroborar estos resultados.

Abstract

Cancer is not only an intrinsic cellular process affecting neoplastic cells driven by a series of genetic and epigenetic errors, but also depends on changes in its environment. The tumor microenvironment (TME) promotes tumor growth, invasion, and metastasis. For the study of the TME, 3D models provide a tumor-like environment with self-imposed nutrient and hypoxia gradients that create an environment not achieved with traditional 2D cultures. Therefore, they are an ideal approach for studying tumor-stroma interactions. Considering that one of the main components of the TME are cancer-associated fibroblasts (CAFs), the main objective of this work is to study how CAFs interact with tumor cells using a 3D model (tumorspheres) to gain a better understanding of the interrelationship between both cell types in the tumor niche. To achieve this, co-cultures were established between the tumorspheres derived from tumor tissue of lung cancer patients and an immortalized CAFs cell line. To evaluate the changes in tumor cells mediated by interaction with CAFs and vice versa, the expression of different biomarkers (related to stemness properties, immunomodulatory functions, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) processes) was analyzed using three multiparametric panels by flow cytometry. It was observed that CAFs

can induce the expression of markers with immunomodulatory capacity, modulating stemness capacity, and inducing EMT in tumor cells. On the other hand, changes were also observed in CAFs as they experienced variations in the expression of certain markers in the co-culture. In conclusion, CAFs and tumor cells interact with and influence each other, although this effect may vary depending on the specific origin of the tumor cells. However, it is necessary to expand the cohort of cultures analyzed to corroborate these results.

Palabras clave: Cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), Fibroblastos asociados al cáncer (CAFs), tumoresferas, microambiente tumoral (TME), citometría de flujo,

Key words: Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC), Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs), tumorspheres, Tumor Microenvironment (TME), flow cytometry

Alumna: Dña. María Isabel Nieto Gimeno

Localidad y fecha: Valencia, Julio de 2024

Tutor académico: Prof Dña. Eloisa Jantus Lewintre

Co tutora: Dña. Susana Torres Martínez

Tipo Licencia: *Creative Commons*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera expresar mi agradecimiento a mi tutora, Eloisa, por brindarme la oportunidad de realizar mi Trabajo de Fin de Grado en su grupo de investigación. Ha sido un verdadero placer, y esta experiencia me ha permitido crecer tanto personal como profesionalmente. Asimismo, es un verdadero ejemplo a seguir por su trabajo tan excepcional.

Por otro lado, gracias a Susana por enseñarme y por responder a todas y cada una de mis preguntas. Es una gran profesional a la que agradezco toda su paciencia y dedicación.

Por último, me gustaría darle las gracias a mi padre, a mi madre, a mi hermana y a Joselu por apoyarme durante estos 4 años de carrera y por estar ahí siempre que los he necesitado. Gracias por vuestro apoyo incondicional.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CÁNCER	1
1.1.1. Definición del cáncer	1
1.1.2. Bases moleculares del cáncer	1
1.2. CÁNCER DE PULMÓN	2
1.2.1. Epidemiología y factores de riesgo	2
1.2.2. Clasificación histológica	3
1.2.3. Perfil molecular	3
1.2.4. Tratamiento	4
1.3. HETEROGENEIDAD TUMORAL	4
1.4. MICROAMBIENTE TUMORAL DE CÁNCER DE PULMÓN	5
1.4.1. Definición y composición	5
1.4.2. Papel de los CAFs en el microambiente tumoral de cáncer de pulmón... ..	6
1.5. TUMORESFERAS: UN MODELO 3D PARA EL ESTUDIO DEL TME...8	
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. CULTIVOS DE DERIVADOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN	11
3.2. FIBROBLASTOS ASOCIADOS A TUMORES (CAF _s).....	12
3.3. CO-CULTIVO DE TUMORESFERAS DE CÁNCER DE PULMÓN CON CAF _s	12
3.4. ANÁLISIS DEL MODELO DE CO-CULTIVO DE TUMORESFERAS DE CÁNCER DE PULMÓN CON CAF _s MEDIANTE CONFOCAL Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	13
3.5. SEPARACIÓN DE LAS DIFERENTES POBLACIONES CELULARES PARA SU ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	13
3.6. TITULACIÓN DE ANTICUERPOS.	13
3.7. CITOMETRÍA DE FLUJO	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1. PUESTA A PUNTO DE DIFERENTES ESTRATEGIAS DE CO-CULTIVO ENTRE TUMORESFERAS Y CAF _s	16
4.2. ESTRATEGIAS PARA LA SEPARACIÓN DE LAS POBLACIONES EN CITOMETRÍA	21
4.3. TITULACIÓN DE ANTICUERPOS	27
4.4. ANÁLISIS DE MARCADORES CELULARES EN LAS DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVOS	29
4.4.1. Análisis de marcadores relacionados con la EMT y <i>stemness</i>	30
4.4.2. Análisis de marcadores inmunomoduladores	33

5. CONCLUSIONES	37
6. BIBLIOGRAFÍA	38
7. ANEXOS	43
7.1. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	43
7.2. APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL	45
7.3. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030.....	46
7.4. RECIBO DIGITAL TURNITIN	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las 14 características distintivas del cáncer	2
Figura 2. Distribución de las muertes de los cánceres más comunes en 2022 para ambos sexos.	3
Figura 3. Múltiples tipos celulares que forman parte del microambiente tumoral y cuyas interacciones apoyan el nicho primario tumorigénico.....	5
Figura 4. Los efectos protumorales de los CAFs en el cáncer de pulmón de células no pequeñas.....	8
Figura 5. Enfoques 3D habituales para modelar el microambiente tumoral.....	9
Figura 6. Primera aproximación del co-cultivo entre tumoresferas del cultivo FIS435 sobre CAFs en adherencia.....	16
Figura 7. Segunda aproximación del co-cultivo formado mediante CAFs disgregados sobre tumoresferas del cultivo FIS435 en suspensión.....	17
Figura 8. Imágenes de la segunda aproximación del co-cultivo obtenidas por microscopía de fluorescencia.	18
Figura 9. Tercera aproximación del co-cultivo formado mediante CAFs y tumoresferas disgregadas del cultivo FIS435 co-cultivados en suspensión.	19
Figura 10. Imágenes obtenidas en microscopía confocal de las condiciones de co-cultivo 1:1 y 1:2.....	20
Figura 11. Separación de las poblaciones del co-cultivo por complejidad y tamaño	22
Figura 12. Resultados de la titulación del CD90	22
Figura 13. Segunda estrategia para separar los CAFs de las células tumorales (SPH) en el análisis por citometría de flujo	23
Figura 14. Efecto del colorante fluorescente rojo lejano sobre los CAFs a las 48 horas ..	24
Figura 15. Análisis de separación de las poblaciones por citometría utilizando el colorante fluorescente rojo lejano sobre los CAFs.....	24
Figura 16. Efecto del colorante fluorescente verde sobre los CAFs a las 48 horas.....	25
Figura 17. Resultados del análisis por citometría empleando el colorante fluorescente verde sobre los CAFs.	25
Figura 18. Análisis de separación de las poblaciones por citometría empleando diferentes concentraciones del colorante fluorescente verde sobre los CAFs.....	26

Figura 19. Selección de poblaciones para el análisis de los datos obtenidos en citometría de flujo.	29
Figura 20. Representación del porcentaje de células positivas de los marcadores relacionados con la EMT y <i>stemness</i> en las células tumorales provenientes de tumoresferas.....	30
Figura 21. Representación del porcentaje de células positivas de los marcadores relacionados con la EMT y <i>stemness</i> en los CAFs	32
Figura 22. Representación del porcentaje de células positivas de los marcadores inmunomoduladores en las células tumorales provenientes de tumoresferas.....	34
Figura 23. Representación del porcentaje de células positivas de los marcadores inmunomoduladores en los CAFs.	35

ÍNDICE DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura S 1 Tercera aproximación del co-cultivo formado mediante CAFs y tumoresferas disgregadas del cultivo FIS525 co-cultivados en suspensión.....	43
Figura S 2. Imágenes obtenidas en microscopía confocal de las condiciones de co-cultivo 1:1 y 1:2.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características clínico-patológicas de los cultivos celulares derivados de pacientes con cáncer de pulmón incluidos en el estudio.	11
Tabla 2. Concentraciones testadas de cada anticuerpo para la titulación de anticuerpos.	14
Tabla 3. Paneles utilizados para su análisis mediante citometría de flujo	15
Tabla 4. Índice de tinción calculado para cada uno de los volúmenes testados en cada anticuerpo.	28

ÍNDICE DE TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla S 1. Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)	46
---	----

RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Este trabajo contribuye significativamente al ODS 3 (salud y bienestar) y al ODS17 (alianzas para lograr objetivos). Por otro lado, contribuye en menor medida al ODS 9 (industria, innovación e infraestructuras) (mirar Anexo 3).



LISTA DE ABREVIATURAS

2D: 2 dimensiones.

3D: 3 dimensiones.

ADC: Adenocarcinoma.

AF: Alexa Fluor.

AF647: Alexa Fluor 647.

AF700: Alexa Fluor 700.

ALK: Quinasa del linfoma anaplásico.

APC-780-A: área de fluorescencia emitida por el fluorocromo Aloficocianina-eFluor 780.

APC-A: área de fluorescencia emitida por el fluorocromo Aloficocianina.

APC: Aloficocianina.

bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico.

BRAF: Homólogo B1 del oncogén viral de sarcoma murino v-Raf.

BSA: Albúmina sérica bovina.

BV: Brilliant Violet.

BV421: Brilliant Violet 421.

BV510: Brilliant Violet 510.

BV605: Brilliant Violet 605.

BV786: Brilliant Violet 786.

CAFs: Fibroblastos asociados al cáncer.

CDK2: Quinasa dependiente de ciclina 2.

CDKN2A: Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina.

CO₂: dióxido de carbono.

CPCP: Cáncer de pulmón de células pequeñas.

CPNM: Cáncer de pulmón no microcítico.

CSCs: Células madre cancerosas.

Cy: Cyanine.

Cy5.5: Cyanine 5.5.

Cy7: Cyanine 7.

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco.

E-cad: E-cadherina.

MEC: Matriz extracelular.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

EMT: Transición epitelial-mesenquimal.

EndMT: Transición endotelial-mesenquimal.

EpCAM: Molécula de adhesión celular epitelial.

FAP: Proteína activadora de fibroblastos.

FBM: Medio basal de fibroblastos.

FBS: Suero Fetal Bovino.

FGFR1: Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1.

FITC-A: área de fluorescencia emitida por el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína.

FITC: isotiocianato de fluoresceína.

FMOs: Fluorescencia menos uno.

Fn: Fibronectina.

FSC-A: área de dispersión frontal.

FSC: dispersion frontal (*Forward Scatter*).

FSP1: Proteína específica de fibroblastos-1.

Gal-3: Galectina 3.

Gal-9: Galectina 9.

GCO: *Global Cancer Observatory*.

HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

HLAE: Antígeno leucocitario humano E.

ICIs: Inhibidores de los puntos de control inmunitario.

ICOSL: Ligando de la molécula coestimuladora inducible.

ITS: Insulina-Transferrina-Selenio.

KEAP1: Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch.

KRAS: Homólogo del oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten.

L-Glu: L-glutamina.

MET: Protooncogén del factor de transición mesénquima-epitelio.

MICA/B: Secuencia A y B relacionada con el polipéptido del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I.

MMPs: Metaloproteinasas de matriz extracelular.

NF1: Neurofibromatosis tipo 1.

NTRK: Receptor neurotrófico tirosina quinasa.

P/S: Penicilina-estreptomicina.

PBS: Solución salina tamponada con fosfato.

PD-1: Proteína de muerte celular programada 1.

PD-L1: Ligando de muerte celular programada 1.

PD-L2: Ligando de muerte celular programada 2.

PDGFR- β : Subunidad β del receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PDGFR- α : Subunidad α del receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PE: Ficoeritrina.

PerCP: Complejo peridinina-clorofila-proteína.

PI3KCA: Subunidad catalítica alfa de la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa.

RET: Protooncogén Ret.

ROS1: ROS protooncogén, receptor tirosina quinasa.

SCC: Carcinoma de células escamosas de pulmón.

SOX2: Factor de transcripción SRY-Box 2.

SPARC: Proteína secretada ácida y rica en cisteína.

SPH: esferas.

SSC-A: área de dispersión lateral.

SSC: dispersion lateral (*Side Scatter*).

STAT3: Transductor de señales y activador de la transcripción 3.

STK11: Serina/Treonina quinasa 11.

TME: Microambiente tumoral.

TP53: Proteína tumoral 53.

Tregs: Células T reguladoras.

Vim: Vimentina.

α -SMA: α -actina de músculo liso.

β -cat: β -catenina.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER

1.1.1. Definición del cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades en las cuales las células crecen y proliferan de forma descontrolada. Dichas células anormales pueden adquirir la capacidad de invadir otras partes del cuerpo.

La tumorigénesis es un proceso de múltiples efectos en el que las células normales sufren sucesivas alteraciones génicas que impulsan su transformación progresiva en células malignas (1). Se producen mutaciones en una serie de genes implicados en el control del equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis, así como en la integridad de las vías metabólicas complejas que garantizan la integridad funcional y estructural de las células y los tejidos. Estas mutaciones pueden desencadenar un crecimiento celular descontrolado, la ruptura del tejido celular, la invasión de las células cancerosas en tejidos adyacentes y finalmente la metástasis.

Además, los tumores muestran una complejidad adicional ya que se componen de otros tipos celulares, creando un ecosistema complejo conocido como el “microambiente tumoral” (TME, por sus siglas en inglés), el cual tiene un importante papel en la progresión del cáncer al contribuir en la proliferación e invasión de las células cancerosas (2).

1.1.2. Bases moleculares del cáncer

En el año 2000, Hanahan y Weinberg propusieron que todos los tipos de tumores humanos comparten seis capacidades adquiridas durante la tumorigénesis (1) conocidas como “*Hallmarks of Cancer*” que incluyen: capacidad replicativa ilimitada, independencia de las señales de crecimiento, insensibilidad a supresores de crecimiento, evasión de la apoptosis, angiogénesis mantenida y habilidad para invadir o metastatizar. En 2011, estos autores añadieron cuatro características nuevas destacando la importancia del microambiente tumoral: la inestabilidad genómica, alteración en el metabolismo energético, capacidad proinflamatoria y evasión del sistema inmune (2). Once años más tarde, Hanahan volvió a examinar las características distintivas e introdujo cuatro hallazgos emergentes adicionales reconociendo el gran progreso realizado en el estudio del cáncer a través de los datos masivos: desbloqueo de la plasticidad fenotípica, la reprogramación epigenética no mutacional, el polimorfismo del microbioma y por último las células senescentes del microambiente tumoral (3) (Figura 1).

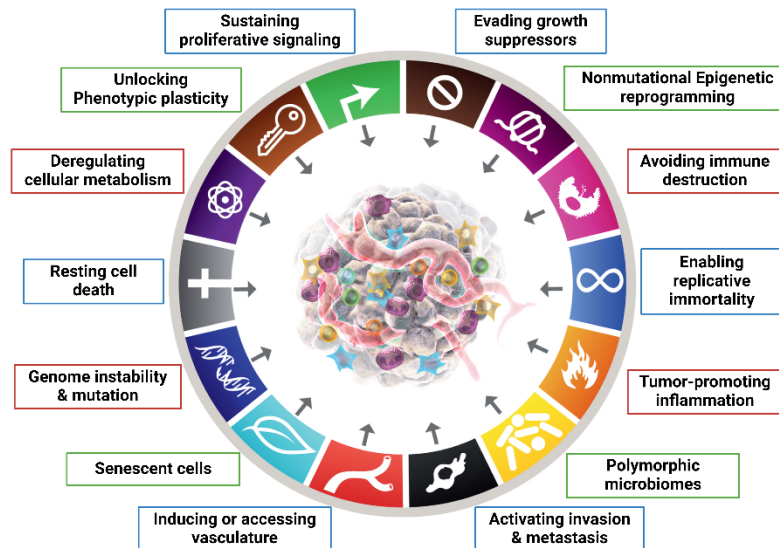


Figura 1. Las 14 características distintivas del cáncer. Los recuadros azules representan las seis características distintivas del cáncer propuestas por Hanahan y Weinberg en el año 2000. Los recuadros rojos representan las cuatro características distintivas introducidas en 2011. Y, por último, los recuadros verdes representan las características emergentes adicionales propuestas por Hanahan en 2022. Adaptado de (1,3).

Estas características del cáncer ponen de manifiesto el papel crucial del TME en el desarrollo y evolución de los tumores. La interacción dinámica entre las células cancerosas y su microambiente, que se compone tanto elementos celulares como no celulares como son los vasos sanguíneos y linfáticos, las células endoteliales, células inmunes, fibroblastos, matriz extracelular (MEC) y citoquinas entre otros, es crucial para inducir la heterogeneidad de las células cancerosas, la evolución clonal y aumentar la resistencia a multidroga, lo que finalmente conduce a la progresión y metástasis de las células cancerosas.

1.2. CÁNCER DE PULMÓN

1.2.1. Epidemiología y factores de riesgo

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte por cáncer a nivel mundial. En comparación con otros tipos de cáncer, el número de pacientes afectados por cáncer de pulmón es el más alto y sigue aumentando constantemente (4). Según el *Global Cancer Observatory* (GCO), la incidencia de cáncer de pulmón para ambos sexos en 2022 fue del 12,4% del total de pacientes con cáncer y la mortalidad fue del 18,7% del total de las muertes por cáncer (5) (Figura 2).

La principal causa de cáncer de pulmón es el tabaquismo, siendo la causa en aproximadamente el 80% de los cánceres de pulmón (6). No obstante, hay otros factores de riesgo como el radón, la exposición al asbesto, arsénico, radiación ionizante, el humo de los combustibles domésticos, infecciones víricas y bacterianas, etc (7,8).

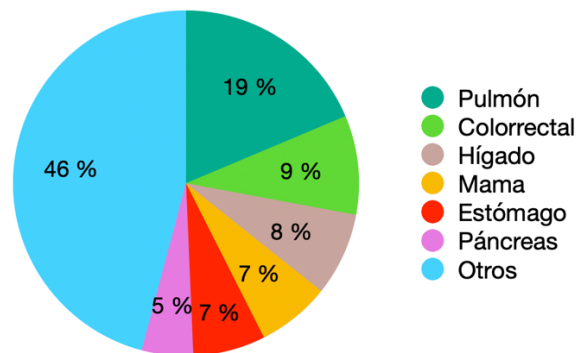


Figura 2. Distribución de las muertes de los cánceres más comunes en 2022 para ambos sexos. Imagen de elaboración propia (datos de (5)).

1.2.2. Clasificación histológica

Histológicamente, el cáncer de pulmón se divide en dos grupos principales: el cáncer de pulmón microcítico, también denominado cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), que representa el 15% de los casos, y el cáncer de pulmón no microcítico también denominado cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPNM) que representa el 85% restante (4,9).

El CPNM se clasifica a su vez en tres subtipos histológicos: el adenocarcinoma de pulmón (ADC), el carcinoma de células escamosas de pulmón (SCC) y el carcinoma de células grandes (9). El SCC, que representa el 30% de los casos, se caracteriza histológicamente por áreas de queratinización y la presencia de puentes intercelulares mientras que el ADC, que representa el 40% de los casos, generalmente muestra una formación glandular y estructuras papilares (10).

1.2.3. Perfil molecular

El CPNM es uno de los tumores genéticamente más diversos, por lo tanto, existe una variedad de subconjuntos de pacientes caracterizados molecularmente por conjuntos específicos de mutaciones. En los últimos años, se ha avanzado considerablemente en la comprensión de los procesos moleculares y celulares que subyacen a la iniciación, mantenimiento y avance del cáncer (11). Los genes más comúnmente mutados en ADC incluyen *KRAS* (homólogo del oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten), *EGFR* (receptor del factor de crecimiento epidérmico), y los genes supresores de tumores *TP53*, *KEAP1*, *STK11* y *NF1* (9,12,13). Asimismo, las translocaciones en *ALK* también han sido identificadas en ADCs (13).

Por otro lado, los genes comúnmente mutados en SCC incluyen el *TP53* (representa el 90% de los casos), *PI3KCA*, *SOX2*, *CDK2* y *FGFR1* (13). Además, *CDKN2A* que codifica las proteínas p16INK4A y p14ARF, se inactiva en más del 70% de SCC mediante silenciamiento epigenético por metilación, mutación inactivadora, omisión del exón 1 β o delección homocigota (12).

1.2.4. Tratamiento

El cáncer de pulmón es molecularmente heterogéneo y comprender su biología es esencial para el desarrollo de terapias efectivas (12). Su tratamiento ha evolucionado desde el uso de la terapia citotóxica estándar hacia una medicina personalizada, que incluye terapias dirigidas para mutaciones conductoras e inmunoterapias (4,12).

En cuanto a los estadios tempranos, la cirugía es la primera opción, acompañada muchas veces de tratamiento adyuvante o neoadyuvante (14).

El manejo del CPNM en estadios avanzados ha experimentado cambios notables en los últimos años. Existen evidencias de que el tratamiento con terapias dirigidas tiene resultados clínicos superiores a la quimioterapia citotóxica tradicional (9). Actualmente, las dianas moleculares con terapias dirigidas disponibles son *EGFR*, *KRAS*, *AKL*, *ROS1*, *HER2*, *RET*, *NTRK*, *MET* y *BRAF* (15). En los últimos años, el panorama del tratamiento del CPNM ha cambiado drásticamente debido a la inmunoterapia. Por ejemplo, los inhibidores de los puntos de control inmunológico (ICIs), pueden bloquear mediante anticuerpos específicos la interacción entre la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) y su ligando PD-L1 ya que esta interacción puede ser explotada por las células tumorales para evadir la respuesta inmune (14).

No obstante, a pesar de que se han logrado avances significativos en el desarrollo de tratamientos dirigidos y terapias inmunológicas para pacientes con CPNM en los últimos años, muchos desarrollan resistencia al tratamiento, progresan y fallecen. Aunque la cirugía estándar en etapas tempranas es común, la recurrencia es alta y muchos pacientes recaen después de un tratamiento quirúrgico aparentemente exitoso. Esto destaca la necesidad de biomarcadores pronósticos y objetivos terapéuticos adicionales (16).

1.3. HETEROGENEIDAD TUMORAL

Después de la transformación maligna, un tumor sigue siendo dinámico y continúa evolucionando, volviéndose más heterogéneo (17). Al igual que la mayoría de los tumores, el cáncer de pulmón está compuesto por subpoblaciones de células, o clones, con características moleculares distintas, lo que resulta en una heterogeneidad intra-tumoral (12,13). Además, dicha heterogeneidad tumoral representa un desafío continuo en el campo de la terapia contra el cáncer (18), por ello, una evaluación precisa es esencial para el desarrollo de terapias efectivas (17).

Históricamente, se han propuesto dos modelos para explicar la heterogeneidad dentro de un tumor: el “modelo de evolución clonal” y la “hipótesis de las células madre cancerosas” (18,19). El primer modelo, propuesto por Peter Nowell en 1976, explica la heterogeneidad intra-tumoral como resultado de la selección natural. Considera que el cáncer es iniciado por múltiples mutaciones escalonadas que ocurren en células somáticas, y va acompañado por la selección natural de aquellos clones con el fenotipo más favorable (17–19). Por otro lado, el segundo modelo sugiere que solo un subconjunto de células cancerosas, llamadas células madre cancerosas (CSCs),

poseen la capacidad de autorrenovación indefinida para iniciar y mantener el crecimiento del tumor (18,19).

En los últimos años, estos dos modelos han sido propuestos como un modelo unificado por algunos autores (20). Recientemente, Kreso y Dick propusieron un modelo, llamado el “modelo de plasticidad”. Este modelo se basa en que las CSCs pueden adquirir mutaciones y generar nuevas ramas de células madre, mientras que, al mismo tiempo, las células tumorales en la subpoblación no-CSC pueden experimentar la transición epitelial-mesenquimal (EMT) y adquirir características similares a las CSC, contribuyendo a la heterogeneidad tumoral (21,22).

Asimismo, cabe decir que parte de la heterogeneidad intra-tumoral también destaca la existencia de la heterogeneidad inter-tumoral que se refiere a la heterogeneidad entre pacientes que albergan tumores del mismo tipo histológico (17).

1.4. MICROAMBIENTE TUMORAL DE CÁNCER DE PULMÓN

1.4.1. Definición y composición

Un tumor es un ecosistema complejo que contiene células tumorales y otros tipos de células, como células endoteliales, células inmunes infiltrantes y células estromales, así como una red compleja de matriz extracelular (MEC), que definen el microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés). Concretamente, el TME está compuesto por células cancerosas y constituyentes no malignos heterogéneos, que incluyen fibroblastos, pericitos, células inmunes, células inflamatorias y factores solubles como factores de crecimiento, hormonas y moléculas de señalización. En las etapas tempranas del desarrollo del tumor, existe una comunicación recíproca entre los componentes del TME y las células cancerosas, promoviendo la angiogénesis, el suministro de nutrientes y la eliminación de desechos (23,24) (Figura 3).

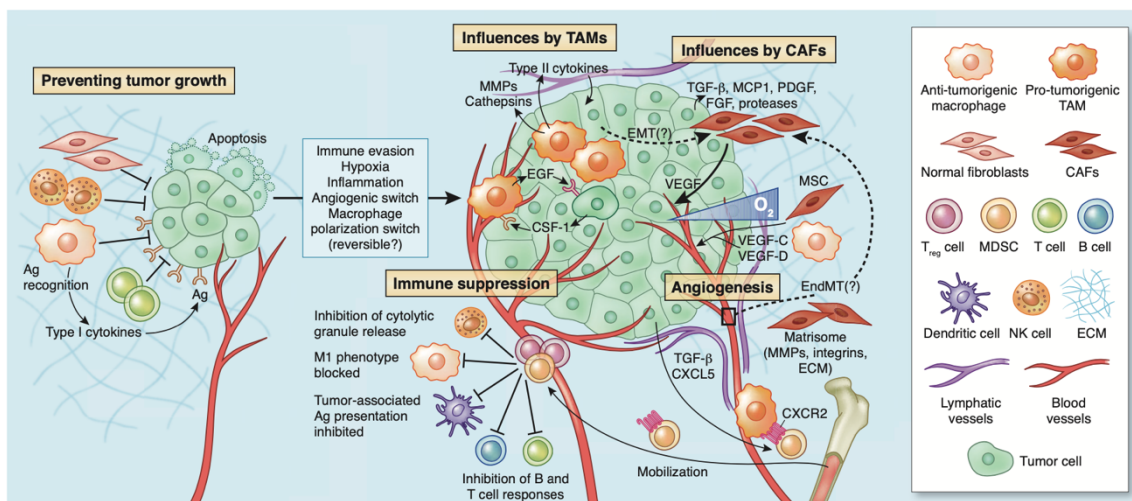


Figura 3. Múltiples tipos celulares que forman parte del microambiente tumoral y cuyas interacciones apoyan el nicho primario tumorigénico. Imagen obtenida de (25).

Las células tumorales experimentan una proliferación descontrolada y una tendencia a la metástasis y resistencia terapéutica debido al apoyo proporcionado por las complejas organizaciones de tejidos en el TME. La formación de estos fenotipos malignos depende tanto de los cambios genómicos de las células cancerosas como del microentorno adecuado para su crecimiento (26,27). El TME, controla la plasticidad tanto de las células estromales como de las tumorales, modelando así el contexto celular complejo, que en última instancia forma un entorno pro y anti-tumorigénico (27). Las interacciones dinámicas entre las células tumorales y el estroma asociado influyen profundamente en la iniciación y progresión de la enfermedad, así como en el pronóstico del paciente (25). En nuestro grupo, hemos analizado la presencia de células T reguladoras (Tregs) y otras células inmunorreguladoras en el microambiente tumoral, y encontramos que un mayor porcentaje de estas células en el tumor hace que los pacientes con CPNM presenten un peor curso clínico de la enfermedad (28–30).

Los fibroblastos activados, también conocidos como fibroblastos asociados al cáncer (CAFs), son el tipo celular predominante dentro del estroma de muchos tipos de tumores y se sabe que influyen en la patología de múltiples maneras (26,27,31).

1.4.2. Papel de los CAFs en el microambiente tumoral de cáncer de pulmón

Los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) son uno de los principales componentes en el estroma tumoral y pueden tener distintos orígenes. Muchos tipos de células podrían ser reclutadas como precursores de CAFs; (1) fibroblastos de tejidos residentes, (2) adipocitos peritumorales (3) células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, (4) células madre hematopoyéticas, (5) células epiteliales (a través de la transición epitelial-mesenquimal; EMT) y (6) células endoteliales (a través de la transición endotelial-mesenquimal; EndMT) (26,32). Una vez reclutados de las diversas fuentes, un subconjunto de estos progenitores adquiere el fenotipo de CAFs a través de diversos procesos de activación (27). Las células tumorales pueden activar las células fibroblásticas estromales convirtiéndolas en CAFs mediante la estimulación de factores de crecimiento paracrinos (31).

Histológicamente, los CAFs tienen forma de huso con nucléolos prominentes, retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi, uniones de hendidura y miofilamentos citoplasmáticos (26). Se caracterizan por expresar diferentes proteínas como la α -actina de músculo liso (α -SMA), la proteína activadora de fibroblastos (FAP), la proteína específica de fibroblastos-1 (FSP1), proteína secretada ácida y rica en cisteína (SPARC), la tenascina C y el receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR)- α y β (26,27,31). Lamentablemente estos marcadores no son absolutamente privativos de esta población lo que evidencia dificultades intrínsecas para su aislamiento y estudio.

En el contexto del microambiente tumoral, los CAFs desempeñan un papel fundamental. En primer lugar, existen evidencias de que están implicados en la angiogénesis tumoral. Los CAFs podrían promover la angiogénesis de las células cancerosas para respaldar el crecimiento, la invasión y la metástasis del tumor,

mediante la secreción al TME de una serie de proteínas señalizadoras pro-angiogénicas o la producción de quimioatrayentes para macrófagos proangiogénicos, neutrófilos y otras células mieloides, entre otros mecanismos (24,31).

En segundo lugar, numerosos estudios han respaldado un papel importante de los CAFs en el desarrollo de la metástasis debido a la secreción de varios factores de crecimiento y citocinas (24,31). Los CAFs facilitan la metástasis de las células tumorales remodelando la MEC gracias a la síntesis de proteínas estructurales como el colágeno tipo I y IV, proteoglicanos de sulfato de heparina, tenascina-C, la secreción de factores de crecimiento del tejido conectivo y la producción de factores digestivos como las MMPs y activadores de plasminógeno (32). Además, también ensamblan una matriz extracelular (MEC) rica en fibronectina (Fn) y altamente organizada para promover la migración de las células tumorales (27).

En cuanto a la transición epitelial-mesenquimal (EMT) es un proceso por el cual las células epiteliales pierden su polaridad celular y la adhesión célula-célula, y adquieren propiedades migratorias e invasivas para convertirse en células mesenquimales. A pesar de que no se cuentan con numerosos estudios, se ha visto que los CAFs mejoran el potencial metastásico de las células de cáncer de pulmón al inducir la EMT y modular genes relacionados con la metástasis (31,32).

Por otro lado, el carácter inmunosupresor de los CAFs promueve el crecimiento tumoral al facilitar la evasión inmunitaria. Algunos subconjuntos de CAFs pueden desactivar directamente el sistema inmunológico mediante la expresión de ligando de muerte programada (PD-L)1/2 o la secreción de prostaglandina E2 (24,26). El efecto directo de los CAF en la inmunomodulación consiste en la atenuación de la función de los linfocitos T CD8+ y el aumento y polarización del contenido en células T reguladoras (Tregs) FOXP3+, las cuales son críticas para mantener la tolerancia inmunológica y la homeostasis del sistema inmunológico (26,33). Además del efecto directo sobre las células inmunitarias, los CAFs participan en la construcción de redes de proteínas de la matriz extracelular (MEC) que sirven como barrera física para los fármacos terapéuticos, así como para las células inmunitarias, impidiendo que alcancen el tumor (26). Por otra parte, cabe decir que hay evidencias de que diversas citocinas y quimiocinas derivadas de los CAFs participan en el mantenimiento de las CSC, promoviendo aún más la resistencia a los fármacos (26).

En resumen, los CAFs son componentes cruciales en el TME debido a su participación en la remodelación de la MEC, en la modulación del metabolismo y la angiogénesis y en la comunicación con las células tumorales e inmunes mediante la secreción de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas. Además, pueden favorecer la tumorigénesis, el desarrollo del cáncer al crear un TME pro-inflamatorio e inmunosupresor y la resistencia a diversas terapias. Por ello, los CAFs pueden suponer una diana terapéutica prometedora para el diseño de nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer (Figura 4).

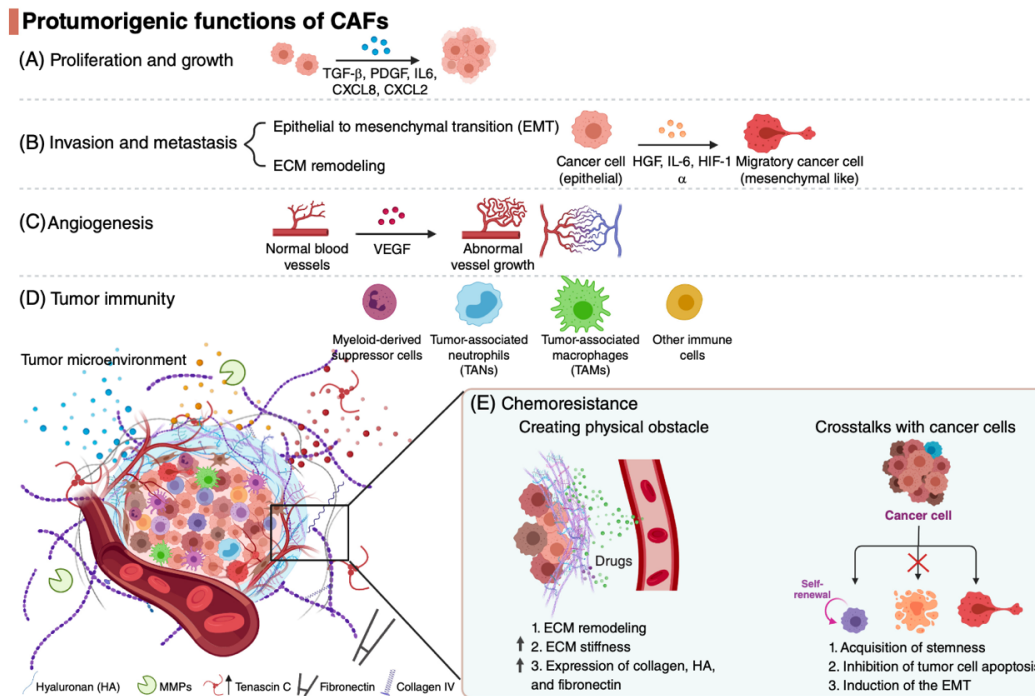


Figura 4. Los efectos protumorales de los CAFs en el cáncer de pulmón de células no pequeñas. Los CAFs secretan múltiples citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento para estimular directamente (A) la proliferación celular del cáncer, (B) la invasión y metástasis, (C) la angiogénesis, (D) la evasión inmune y (E) la resistencia al tratamiento. Mientras tanto, los CAFs también moldean el microambiente tumoral remodelando la matriz extracelular (MEC) para proporcionar un mecanismo de quimiorresistencia. Imagen obtenida de (32).

1.5. TUMORESFERAS: UN MODELO 3D PARA EL ESTUDIO DEL TME

Existen numerosos sistemas de modelos tridimensionales (3D) para el estudio del TME, que van desde co-cultivos celulares dentro de hidrogeles hasta complejos sistemas microfluídicos multicompuestos, cada uno con sus propias ventajas y limitaciones (Figura 5). Los modelos 3D presentan el puente ideal entre los cultivos 2D simples y los sistemas *in vivo* complejos (34).

A pesar de que los sistemas en dos dimensiones (2D) han sido fundamentales para investigar las bases moleculares de la biología tumoral y facilitar el desarrollo preclínico de numerosos fármacos contra el cáncer a lo largo del tiempo, las restricciones de estos modelos son evidentes. La complejidad del microambiente tumoral, compuesto por células malignas y el estroma, es demasiado complejo para ser reproducido en una monocapa 2D. Una de las opciones disponible actualmente son los modelos *in vivo*. No obstante, estos son modelos complejos que no siempre pueden ser utilizados debido a razones éticas y de costo. En su lugar, los métodos de cultivo en 3D representan una solución excepcional ya que permiten que se produzcan los contactos intra-tumorales y tumor-estroma de tal forma que se asemeja a una masa tumoral real que crece en un organismo vivo (35).

En el presente trabajo se van a emplear las tumoresferas como modelo 3D, las cuales consisten en agregaciones de células con uno o más tipos celulares que pueden ser cultivadas en suspensión. Estos modelos proporcionan un entorno más similar al tumor, con gradientes de nutrientes e hipoxia autoimpuestos que generan un entorno no conseguido mediante los cultivos 2D tradicionales (34). La creación de un gradiente de hipoxia conlleva a que las células cancerosas no estén expuestas homogéneamente a nutrientes y oxígeno (35). Además, estos modelos de tumoresferas pueden formarse en co-cultivo con CAFs en suspensión, pudiendo así profundizar en el estudio de la interrelación entre estos tipos celulares.




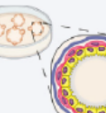
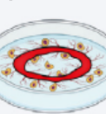
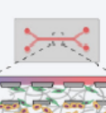
<p>Hydrogels</p> 	<p>Crosslinked polymer structures sharing similarity to native matrix in which cell types can be embedded</p>	<p>Advantages</p> <ul style="list-style-type: none"> Additional matrix proteins can be incorporated Ability to tailor properties High throughput 	<p>Disadvantages</p> <ul style="list-style-type: none"> Batch to batch variation Basic composition Cell structures may not recapitulate physiology
<p>Organotypic</p> 	<p>Specialised hydrogel approach in which cancer cells are layered on top and submitted to a gradient</p>	<p>Compartmentalization of different cell types</p> <p>Long term cellular crosstalk can be examined</p> <p>Ability to introduce gradients</p>	<p>Time-consuming</p> <p>Mostly restricted to end-point analysis</p>
<p>Spheroids</p> 	<p>Cellular aggregated consisting of one or more cell types which can be cultured in suspension or embedded within a hydrogel</p>	<p>Establishment of hypoxia/nutrients gradients</p> <p>Spatially distinct modelling of cancer-stromal crosstalk</p> <p>Real time imaging possible</p>	<p>Dependent on cells' ability to form spheroids</p> <p>Limited to short term culture</p>
<p>Organoids</p> 	<p>Self-assembling multicellular structures which closely resemble organization of host tissue</p>	<p>Model innate heterogeneity</p> <p>Can be embedded in hydrogels containing additional TME cells</p> <p>Reproducible</p>	<p>High maintenance</p> <p>Limited to specific cancer types</p>
<p>Explants</p> 	<p>Isolated tissue segments, retaining physiological characteristics, capable of being cultured <i>ex vivo</i> as a functional unit</p>	<p>Native cell type interactions retained</p> <p>Close recapitulation of tumour-TME interactions</p>	<p>Challenging to manipulate genetically</p> <p>Access to tissue may be limited</p> <p>Technically demanding</p>
<p>Microfluidics</p> 	<p>Bespoke Bioengineered chips facilitating the study of compartmentalized cell types under fluid flow</p>	<p>Recapitulates circulation</p> <p>Real time imaging possible</p> <p>Flexibility in design of cellular compartments</p>	<p>Expensive manufacturing process</p> <p>Highly specialised</p>

Figura 5. Enfoques 3D habituales para modelar el microambiente tumoral. Imagen obtenida de (34).

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El TME impulsa el crecimiento, la invasión y la metástasis del tumor. Teniendo en cuenta que entre los componentes principales del TME se encuentran los CAFs, que representan alrededor del 80% de la masa de los tumores, la hipótesis de este proyecto se basa en que los CAFs modularían el comportamiento de las células tumorales incrementando su capacidad *stemness*, propiedades inmunomodulatorias y procesos de transición epitelio mesenquimal (EMT), favoreciendo aún más la progresión, recurrencia, metástasis y resistencias a los tratamientos. Asimismo, las células tumorales también podrían influir en la expresión de ciertos biomarcadores en los CAFs. Su estudio derivaría en una mejor comprensión de cómo interaccionan ambos tipos celulares en el nicho tumoral.

El principal objetivo de este trabajo es establecer co-cultivos entre tumoresferas (cultivos celulares en 3D) y CAFs con el fin de comprender cómo interaccionan ambos tipos celulares en el nicho tumoral. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos concretos:

- 1) Desarrollar y optimizar diferentes modelos de co-cultivos 3D entre tumoresferas derivadas de pacientes con cáncer de pulmón y CAFs.
- 2) Identificar la mejor estrategia para separar los CAFs y las células tumorales en el análisis por citometría de flujo.
- 3) Estudiar el efecto de los CAFs en las propiedades inmunomodulatorias de las células tumorales. Además, se quiere identificar si las células tumorales son capaces de influir en la expresión de marcadores inmunomodulatorios en los CAFs.
- 4) Esclarecer si los CAFs son capaces de modular la capacidad *stemness* de las células tumorales.
- 5) Analizar si los CAFs pueden modular procesos de EMT de las células tumorales. Asimismo, se quiere estudiar si las células tumorales son capaces de alterar la expresión de marcadores relacionados con la EMT en los CAFs.
- 6) Integrar los hallazgos más relevantes del presente trabajo sobre la relación entre las interacciones en el microambiente tumoral de las células tumorales y los CAFs.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CULTIVOS DE DERIVADOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN

Siguiendo el protocolo de disociación tumoral previamente descrito por nuestro grupo, muestras de tumores de pacientes resecados fueron establecidas tanto en cultivos en monocapa como en tumoresferas (16). En el presente trabajo se emplearon 2 cultivos de largo término derivados de pacientes con CPNM, denominados FIS525 de histología ADC y FIS435 de histología adenoescamosa. La información clínica y patológica detallada para cada uno de ellos se resume en la Tabla 1. Los cultivos celulares se realizaron en condiciones de adherencia en medio Advanced DMEM/F12 (Gibco) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina (P/S) (Gibco) y 1% de L-glutamina (L-glu) (Gibco). Posteriormente, se utilizó el ensayo de formación de esferas (cultivos 3D) para obtener el modelo de tumoresferas. Para ello, las células de monocapa con un 70-80% de confluencia fueron disociadas mediante 1% tripsina-EDTA (Gibco). Las células disgregadas se cultivaron en medio libre de suero Advanced DMEM/F12, suplementado con 0,4% de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich) y 50 µg/mL EGF (Gibco), 20 µg/mL bFGF (Gibco), 5 µg/mL ITS PREMIX (Gibco), 200 µg/mL P/S, y 1% de L-glu a baja densidad celular. En todos los casos, las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y el comité de revisión ética institucional aprobó el protocolo. Todos los individuos firmaron un consentimiento informado para la adquisición de muestras con fines de investigación antes del inicio del presente estudio (mirar Anexo 2).

Tabla 1. Características clínico-patológicas de los cultivos celulares derivados de pacientes con cáncer de pulmón incluidos en el estudio.

ID	Género	Edad	Estado TNM	Histología	Hábito tabáquico	Recurrencia	RFS	Estado mutacional
435	Hombre	73	IIB	Adenoescamoso	Fumador	No	24	KRAS p.G12C PIK3CA p.H1047R
525	Hombre	65	IIIA	ADC	Ex – fumador	SI	1	TP53 p.R273L CD274 ERBB2

ID: identificador; ADC: adenocarcinoma de pulmón; RFS: Supervivencia libre de recurrencia; TNM: tumores-nodos-metástasis.

3.2. FIBROBLASTOS ASOCIADOS A TUMORES (CAFs)

Una línea celular de fibroblastos inmortalizada derivada de un paciente con CPNM, denominada CAF154-hTERT fue utilizada para realizar co-cultivos con células tumorales. Esta línea proviene de fibroblastos asociados a tumor, fue proporcionada por el Dr. Luca Roz (*Istituto Nazionale dei Tumori*, Italia) y se encuentra caracterizada exhaustivamente (36). Las células CAF154-hTERT se cultivaron en Medio Basal de Fibroblastos (FBM) (ATCC). En todos los casos, las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.

3.3. CO-CULTIVO DE TUMORESFERAS DE CÁNCER DE PULMÓN CON CAFs

Se realizaron 3 técnicas diferentes de co-cultivos entre las tumoresferas y los CAFs.

- 1) Co-cultivo de las tumoresferas sobre CAFs en adherencia: Para ello, se cultivaron 3×10^5 CAFs durante 2 horas con FBM en placas de 6 pocillos adherentes. Después de 2 horas, se co-cultivaron 10-15 tumoresferas (previamente formadas a partir de 50000 células) junto con los CAFs en un medio compuesto por 50% de FBM y 50% de DMEM-F12 SPH (medio de tumoresferas) durante 48 horas.
- 2) Co-cultivo inverso, es decir, primero se sembraron las tumoresferas (previamente formadas a partir de 50000 células) y posteriormente 3×10^5 CAFs disgregados en suspensión en un medio compuesto por 50% de FBM y 50% de DMEM-F12 SPH durante 48 horas.
- 3) Co-cultivo entre las tumoresferas y los CAFs disgregando ambos modelos y co-cultivándolos a la vez. Para ello, se generó un co-cultivo en proporción 1:1 (con la misma cantidad de células tumorales y de CAFs) y un co-cultivo en proporción 1:2 (con el doble de CAFs que de células tumorales). Primeramente, se formaron las tumoresferas en el medio adecuado. Después de 3 días, se disgregaron y se co-cultivaron 150000 células tumorales provenientes de las tumoresferas disgregadas junto con 150000 CAFs disgregados (co-cultivo 1:1). En el caso del co-cultivo 1:2 se co-cultivaron 150000 células tumorales provenientes de las tumoresferas disgregadas junto con 300000 CAFs disgregados.

Cabe decir que para estos dos últimos co-cultivos se emplearon placas de 6 pocillos con superficie *ultra low attachment*.

3.4. ANÁLISIS DEL MODELO DE CO-CULTIVO DE TUMORESFERAS DE CÁNCER DE PULMÓN CON CAFs MEDIANTE CONFOCAL Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Para observar la interacción física que se produce entre las células tumorales y los CAFs se llevó a cabo un análisis mediante microscopía confocal y microscopía de fluorescencia. Para ello, se utilizó el CellTracker™ Green CMFDA para teñir las células tumorales a una concentración de 5 μM y los CAFs fueron teñidos mediante el CellTracker™ Deep Red a 2 μM , concentración máxima recomendada por la casa comercial (Thermo Fisher Scientific). Para su análisis por microscopía confocal se utilizó el microscopio confocal de Leica SP-8 y el software LAS X (Leica Microsystems). Por otro lado, para su análisis por microscopía de fluorescencia se empleó el microscopio de fluorescencia Leica DM6000B y el software Leica LAS EZ (Leica Microsystems).

3.5. SEPARACIÓN DE LAS DIFERENTES POBLACIONES CELULARES PARA SU ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Con el objetivo de separar las diferentes poblaciones celulares en el análisis por citometría de flujo se probaron diferentes metodologías.

1) Empleo de un marcaje con el anticuerpo CD90 para diferenciar la población de células tumorales (CD90-) respecto a la de CAFs (CD90+), utilizando una cantidad de 1,25 μl de acuerdo con la titulación realizada previamente.

2) Tinción fluorescente CAFs. Por un lado, se utilizó el CellTracker™ Deep Red (Thermo Fisher Scientific), testándose varias concentraciones para determinar la concentración mínima capaz de separar eficazmente las diferentes poblaciones celulares en el análisis por citometría de flujo (1, 1,25, 1,5 y 2 μM). Por otro lado, se utilizó el CellTracker™ Green CMFDA (Thermo Fisher Scientific), a partir del cual también se testaron varias concentraciones (0,25, 0,75, 1,5 y 2,5 μM).

3.6. TITULACIÓN DE ANTICUERPOS.

Para determinar la cantidad correcta de anticuerpo necesaria se realizó la titulación de cada uno de los anticuerpos calculando la concentración de anticuerpo necesaria para 250000 células tumorales. Esta se obtuvo a partir de la concentración máxima necesaria para un millón de células indicada por el fabricante. Posteriormente, se testaron 3 concentraciones diferentes para cada anticuerpo indicadas en la Tabla 2.

Para determinar la concentración óptima de anticuerpos, se utilizó el índice de tinción (*stain index*, por su nombre en inglés), definido como la relación de separación entre la población positiva y negativa dividida por dos veces la desviación estándar de la población negativa (Ecuación 1).

Ecuación 1. Fórmula para calcular el índice de tinción.

$$\text{Índice de tinción} = \frac{(\text{mediana población } +) - (\text{mediana población } -)}{2 \times (\text{desv. estándar población } -)}$$

Para aquellos anticuerpos que no pudieron ser titulados utilizando las células tumorales debido a una expresión casi nula, se empleó el kit comercial AbC™ Total Antibody Compensation Bead Kit (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 2. Concentraciones testadas de cada anticuerpo para la titulación de anticuerpos.

Anticuerpos / Fluoróforos			Concentraciones testadas (µL)
EpCAM-AF700	MICA/B-PE	PD-L2-BV421	1,25
E-cad-BV605	CD276-BV510	Gal-9-AF647	0,6
CD44-PE-Cy7	HLAE-PerCP-Cy5.5	Vim-PE	0,3
CD90-BV510	CD200-PE-Cy7	β-cat-PE-Cy7	
ICOSL-BV786	PD-L1-BV650		
CD133-PE			2
			1
			0,5
Gal-3-AF647			1
			0,5
			0,25
STAT3-AF647			5
			2,5
			1,25

E-cad: E-cadherina; ICOSL: ligando de la molécula coestimuladora inducible; MICA/B: Secuencia A y B relacionada con el polipéptido del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I; HLAE: Antígeno leucocitario humano E; PD-L1: Ligando de muerte celular programada 1; PD-L2: Ligando de muerte celular programada 2; Gal-9: Galectina-9; Vim: Vimentina; β-cat: β-catenina, Gal-3: Galectina-3; STAT3: Transductor de señales y activador de la transcripción 3. AF: Alexa Fluor; BV: Brilliant Violet; PE: Ficoeritrina; Cy: Cyanine; PerCP: complejo peridina-clorofila-proteína.

3.7. CITOMETRÍA DE FLUJO

Para analizar las subpoblaciones celulares en base a la expresión de los diferentes marcadores relacionados con capacidad inmunoreguladora, transición epitelio-mesénquima y *stemness*, se llevaron a cabo diferentes análisis por citometría de flujo mediante la creación de tres paneles con diferentes marcadores tanto intracelulares como de superficie celular (Tabla 3).

Para examinar la expresión de los diferentes marcadores, las tumoresferas y los CAFs se trataron con TrypLE™ Express Enzyme (1X) sin rojo fenol (Gibco) para obtener una suspensión de células únicas. Esta enzima, a diferencia de la tripsina porcina, no contiene componentes derivados de animales y su pureza aumenta la especificidad debido a la acción de una sola enzima y reduce el daño causado por la disociación de múltiples enzimas presentes en la tripsina y otros extractos. Posteriormente, para los paneles 1 y 2, las soluciones de células individuales se lavaron con tampón de tinción (PBS 1x + 0,5 % de BSA + 2 mM de EDTA) y se incubaron durante 30 minutos a

temperatura ambiente en oscuridad con 100 µl de una dilución 1:1000 Fixable Viability Stain 780 (BD Horizon) para la exclusión de las células muertas antes del análisis, junto con el panel de anticuerpos correspondiente en todas condiciones de cultivos analizadas.

Por otro lado, para el panel 3, las soluciones de células individuales se lavaron con la solución de tinción y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con 100 µl de una dilución 1:1000 Fixable Viability Stain 780 (BD Horizon). Posteriormente, se empleó el kit Transcription Factor Buffer Set (BD Pharmingen™) siguiendo las instrucciones del fabricante para fijar y permeabilizar la membrana celular. Finalmente, las soluciones de células se lavaron e incubaron con solución de lavado 1x junto con el panel de anticuerpos correspondiente.

Para los controles, se utilizaron los controles de fluorescencia menos uno, o FMOs (por sus siglas en inglés *Fluorescence Minus One*) para cada uno de los anticuerpos analizados en cada panel. En un control FMO se incluyen todos los fluorocromos del panel, excepto el que se está midiendo, con el fin de determinar de manera correcta la población negativa de la positiva para cada uno de los anticuerpos. Este tipo de controles son importantes al construir paneles de citometría de flujo multicolores, ya que nos ayudan a determinar correctamente las regiones. Un control de FMO garantiza que se identifique de manera adecuada cualquier propagación de los fluorocromos en el canal de interés.

Todas las señales fueron adquiridas utilizando un citómetro de flujo FC500 MPL y el software CytExpert v2.3 (Beckman-Coulter). Para el análisis post-adquisición de los datos se empleó el software de análisis Flow-Jo v10.8.1.

Tabla 3. Paneles utilizados para los análisis mediante citometría de flujo.

Panel	Extracelular / Intracelular	Anticuerpos / Fluoróforo
1	Extracelular	EpCAM-AF700
		E-cad-BV605
		CD44-PE-Cy7
		CD90-BV510
		CD133-PE
		Gal-3-AF647
2	Extracelular	ICOSL-BV786
		MICA/B-PE
		CD276-BV510
		HLAE-PerCP-Cy5.5
		CD200-PE-Cy7
		PD-L1-BV650
		PD-L2-BV421
		Gal-9-AF647
3	Intracelular	Vim-PE
		β-cat-PE-Cy7
		STAT3-AF647

E-cad: E-cadherina; ICOSL: ligando de la molécula coestimuladora inducible; MICA/B: Secuencia A y B relacionada con el polipéptido del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I; HLAE: Antígeno leucocitario humano E; PD-L1: Ligando de muerte celular programada 1; PD-L2: Ligando de muerte celular programada 2; Gal-9: Galectina-9; Vim: Vimentina; β-cat: β-catenina, Gal-3: Galectina-3; STAT3: Transductor de señales y activador de la transcripción 3. AF: Alexa Fluor; BV: Brilliant Violet; PE: Ficoeritrina; Cy: Cyanine; PerCP: complejo peridinina-clorofila-proteína.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PUESTA A PUNTO DE DIFERENTES ESTRATEGIAS DE CO-CULTIVO ENTRE TUMORESFERAS Y CAFs

Varias técnicas de co-cultivos entre las tumoresferas y los CAFs fueron ensayadas con el objetivo de determinar las condiciones óptimas para estudiar la influencia de los CAFs sobre las tumoresferas y viceversa.

La primera aproximación consistió en realizar un co-cultivo de las tumoresferas sobre CAFs en condiciones de adherencia (Figura 6A-E). Tras 24 horas en co-cultivo se observó que la mayoría de las tumoresferas se adherían a la placa y se integraban con los CAFs (Figura 6 D). Por otro lado, a las 48 horas, se observó como las tumoresferas se integraban formando una estructura única con los CAFs (Figura 6 E). En esta aproximación no se vio una integración entre los CAFs y las células tumorales por lo que se consideró que esta estrategia no era óptima para estudiar las interacciones entre ambos tipos celulares.

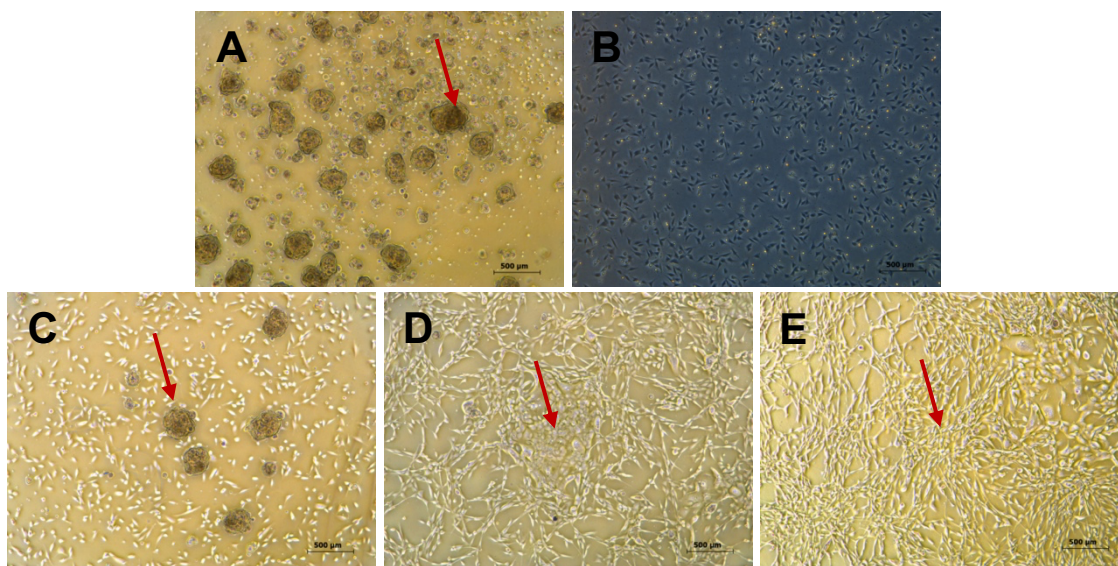


Figura 6. Primera aproximación del co-cultivo entre tumoresferas del cultivo FIS435 sobre CAFs en adherencia. A) Esferas control a 2 horas. B) CAFs control a las 2 horas. C) Co-cultivo a las 2 horas. D) Co-cultivo a las 24 horas. E) Co-cultivo a las 48 horas. Imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fases. Magnificación: 5x. Barra de escala: 500 µm. Flechas rojas: tumoresferas.

La segunda aproximación se basó en realizar un co-cultivo inverso en condiciones 3D (Figura 7A-E). En este caso, tanto a las 24 horas (Figura 7 D) como a las 48 horas (Figura 7 E) se pudo observar cómo los CAFs fueron capaces de penetrar en las tumoresferas, aunque algunos de ellos se adherían a la placa.

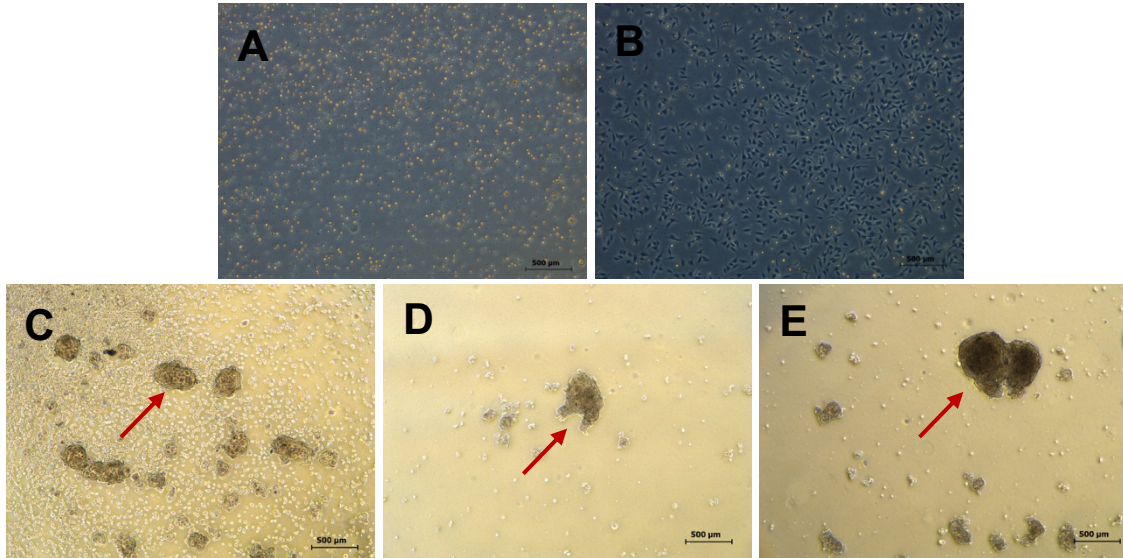


Figura 7. Segunda aproximación del co-cultivo formado mediante CAFs disgregados sobre tumoresferas del cultivo FIS435 en suspensión. A) Esferas control a 2 horas. B) CAFs control a las 2 horas. C) Co-cultivo a las 2 horas. D) Co-cultivo a las 24 horas. E) Co-cultivo a las 48 horas. Imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fases. Magnificación: 5x. Barra de escala: 500 µm. Flechas rojas: tumoresferas.

Con la finalidad de observar mejor la interacción entre los CAFs y las tumoresferas en esta estrategia, se llevó a cabo una visualización del co-cultivo por microscopía de fluorescencia. Cabe destacar que los diferentes colorantes fluorescentes utilizados para la visualización de las células no tuvieron ningún efecto negativo sobre la viabilidad ni sobre la proliferación de las células. Se observó que tanto a las 24 horas (Figura 8 A, B, C) como a las 48 horas (Figura 8 D, E, F) a pesar de que había una interacción física entre tumoresferas y CAFs, estos últimos (teñidos en rojo) formaban agregaciones en suspensión lo que se traducía en una interacción no deseada solo por un lado de las tumoresferas. Al no lograr la interacción física deseada entre los CAFs y las tumoresferas, se optó por plantear una nueva aproximación.

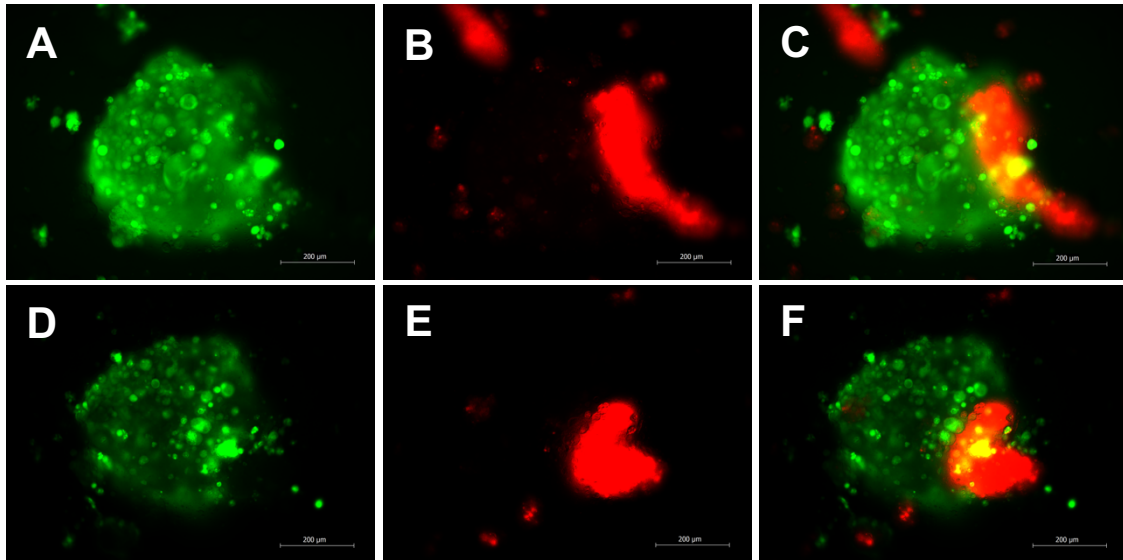


Figura 8. Imágenes de la segunda aproximación del co-cultivo obtenidas por microscopía de fluorescencia. (A, B, C) 24 horas. (D, E, F) 48 horas. (C, F) Fluorescencias fusionadas. Fluorescencia verde (A, D) y rojo lejano (B, E). CAFs: rojo. FIS435: verde. Espectro excitación/emisión colorante fluorescente verde: 492/517 nm; rojo lejano: 630/660 nm. Magnificación: 20x. Barra de escala: 200 µm

En la tercera y última aproximación, se realizó un co-cultivo entre las tumoresferas y los CAFs disgregando ambos modelos y co-cultivándolos a la vez en suspensión. En la Figura 9 se observan las diferentes condiciones de co-cultivo entre el cultivo FIS435 y CAFs. En esta estrategia, a las 24 horas se pudo observar cómo ambos tipos celulares se integraban formando esferoides tanto en el co-cultivo con proporción 1:1 (Figura 9 H) como 1:2 (Figura 9 K). Por otro lado, a las 48 horas se formaron esferoides más compactos (Figura 9 I, L). Asimismo, se pudo ver que a las 48 horas había un menor número de células individualizadas, lo cual nos indica que conforme va pasando el tiempo hay una mayor formación de esferoides y/o una mayor integración de las células a los esferoides ya formados. En cuanto al co-cultivo 1:1 (Figura 9 G, H, I) y 1:2 (Figura 9 J, K, L) se observó que en el co-cultivo 1:2 se formaban esferoides más grandes y con una coloración más oscura, sobre todo en el interior. Los mismos resultados se observaron para el cultivo FIS525 (Figura Suplementaria S1).

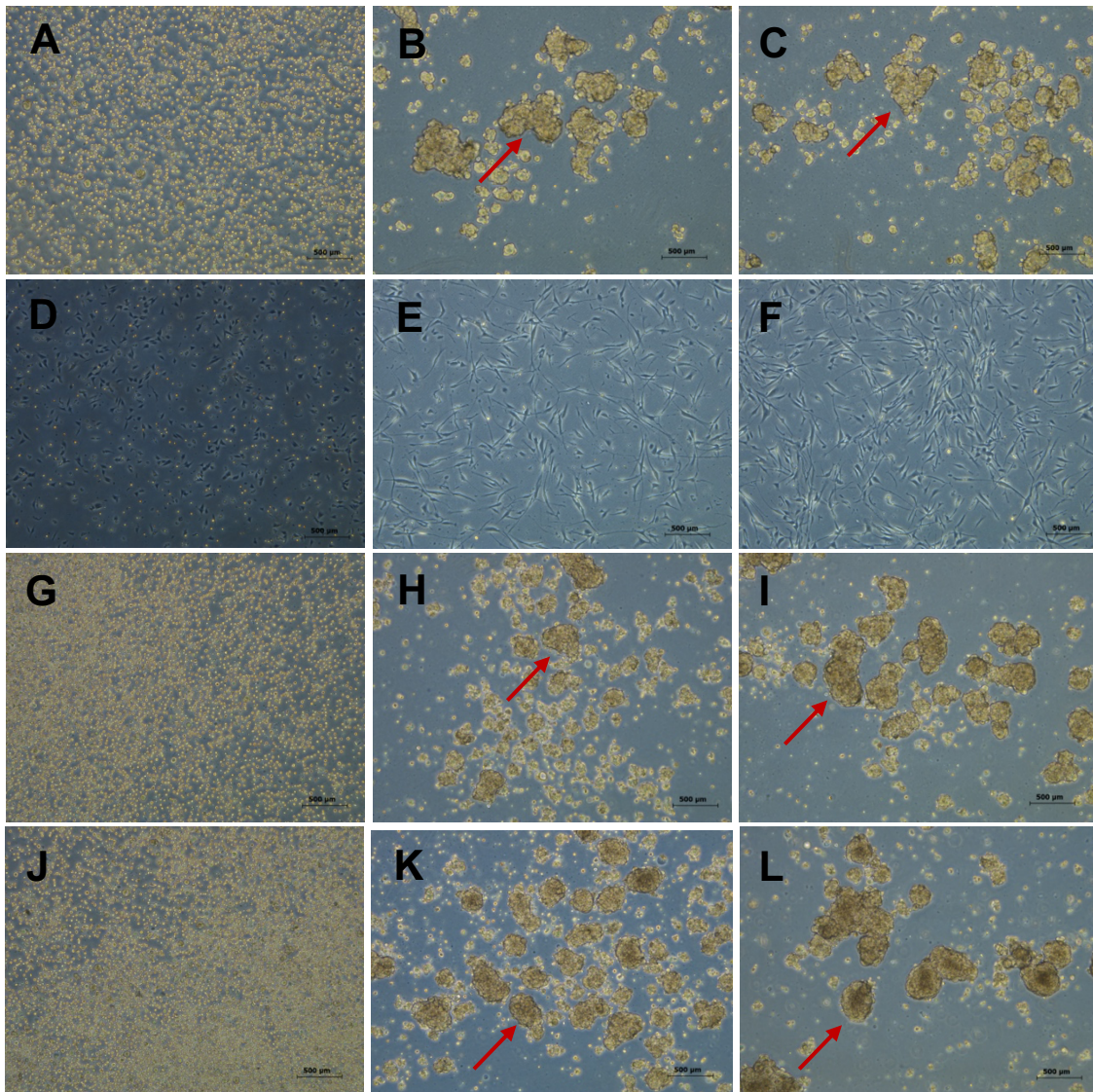


Figura 9. Tercera aproximación del co-cultivo formado mediante CAFs y tumoresferas disgregadas del cultivo FIS435 co-cultivados en suspensión. (A, B, C) Tumoresferas del cultivo FIS435 a las 2h (A), 24h (B) y 48h (C). (D, E, F) CAFs obtenidos tras su disgregación a las 2h (D), 24h (E) y 48h (F). (G, H, I) Co-cultivo proporción 1:1 a las 2h (G), 24h (H) y 48h (I). (J, K, L) Co-cultivo proporción 1:2 a las 2h (J), 24h (K) y 48h (L). Imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fases. Magnificación: 5x. Barra de escala: 500 µm. Flechas rojas: tumoresferas.

Con la finalidad de observar mejor la interacción física entre los CAFs y las tumoresferas en esta estrategia, se llevó a cabo una visualización del co-cultivo por microscopía confocal. En la Figura 10 se observan las diferentes condiciones de co-cultivo entre el cultivo FIS435 y CAFs. En general se observó que en ambos co-cultivos a las 24 horas ya había una interacción y una formación de esferoides con ambos tipos celulares (Figura 10 A, C). Además, a las 48 horas la integración de ambos tipos celulares era mucho mayor y con esferoides más compactos (Figura 10 B, D). En comparación con la estrategia anterior, en este caso se pudo observar una interacción más homogénea entre ambos tipos celulares. Los mismos resultados se obtuvieron para el cultivo FIS525 (Figura Suplementaria S2).

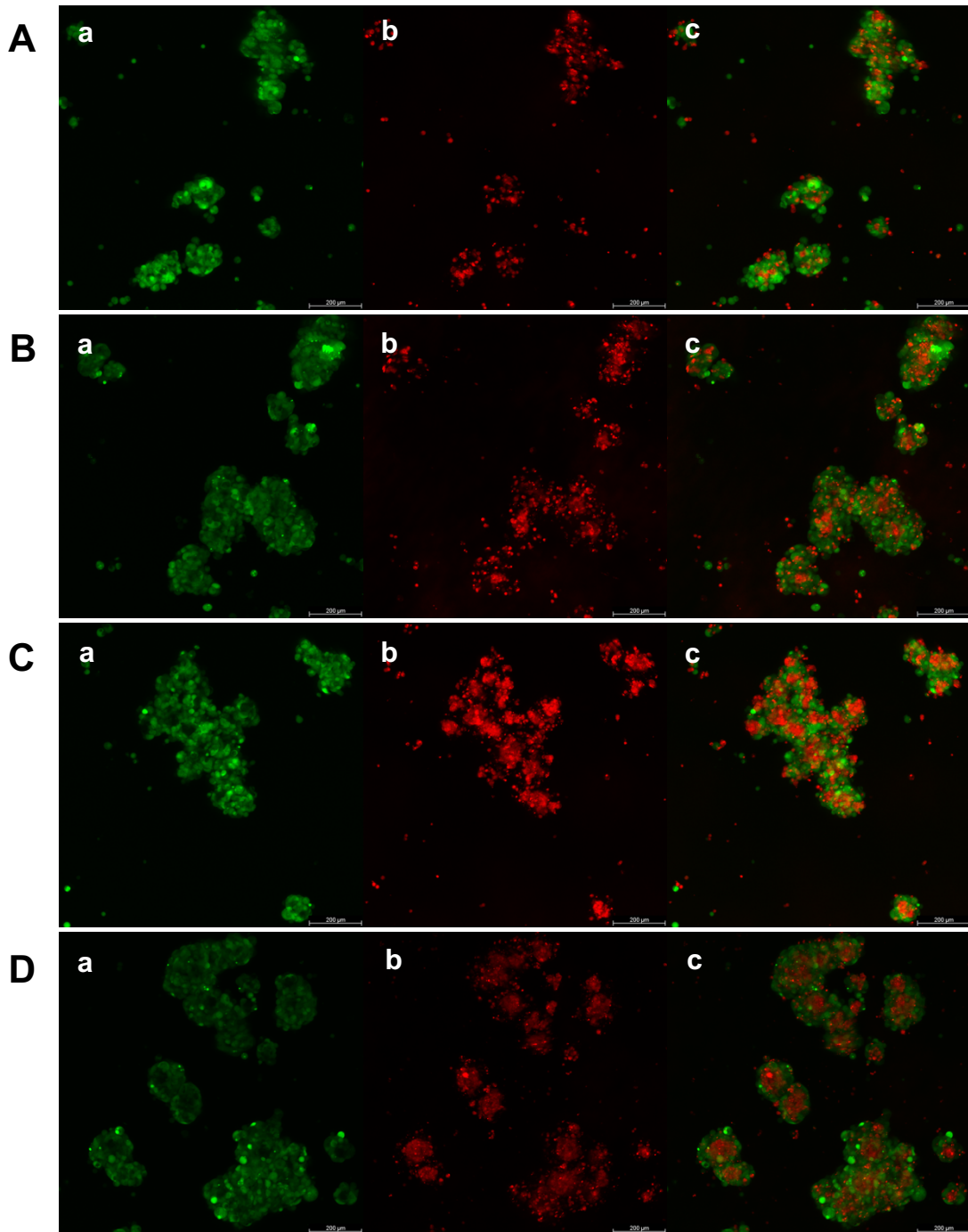


Figura 10. Imágenes obtenidas en microscopía confocal de las condiciones de co-cultivo 1:1 y 1:2. (A, B) Co-cultivo proporción 1:1 a las 24h (A) y 48h (B). (C, D) Co-cultivo proporción 1:2 a las 24h (C) y 48h (D). Fluorescencia verde (a), rojo lejano (b). (c) Fluorescencias fusionadas. CAFs: rojo. FIS435: verde. Espectro excitación/emisión colorante fluorescente verde: 492/517 nm; rojo lejano: 630/660 nm. Magnificación: 10x. Barra de escala: 200 µm.

Para el estudio de las interacciones entre el tumor y el estroma, se han descrito varias aproximaciones; a) el medio condicionado (37,38), b) el co-cultivo indirecto (vía transwell) (39) y c) el co-cultivo directo como en el presente trabajo. Centrándonos en este último, el grupo de Strating et al., realizó un co-cultivo entre pequeños organoides de cáncer de colon en una matriz donde añadieron CAFs en suspensión al medio de co-

cultivo. En este caso, los CAFs se organizaron en un círculo continuo alrededor de la matriz que contenía los organoides, y entraron en la gota durante los primeros 2-3 días organizándose en trayectorias estromales (40).

El grupo de Kuen et al., realizó también un co-cultivo directo 3D en condiciones de no adherencia entre células tumorales de cáncer pancreático, fibroblastos MRC-5 y monocitos. Como resultado, observaron una mayor producción de citocinas inmunosupresoras que promovieron la polarización de los monocitos a macrófagos M2 y células supresoras derivadas de mieloides (41). En este caso, a diferencia de nuestro modelo se emplearon células inmunitarias para recapitular mejor el microambiente tumoral.

Por otro lado, Prieto-García et al. también realizaron un co-cultivo directo entre líneas celulares de tumores pancreáticos y fibroblastos en una proporción 1:1. No obstante, en este caso el co-cultivo fue en adherencia. Como resultado observaron que los fibroblastos se disponían alrededor de las células tumorales, aunque el contacto entre las células no era tan homogéneo como en nuestro modelo (42).

4.2. ESTRATEGIAS PARA LA SEPARACIÓN DE LAS POBLACIONES EN CITOMETRÍA

En la citometría de flujo cada partícula es analizada por la dispersión de la luz visible y por uno o varios parámetros de fluorescencia. Por un lado, en cuanto a la luz visible se mide en dos direcciones diferentes: la dirección frontal (FSC, por sus siglas en inglés *Forward Scatter*) que indica el tamaño relativo de la célula y a 90° (SSC por sus siglas en inglés *Side Scatter*) que indica la complejidad interna de la célula. De acuerdo con esta premisa, se intentó separar las dos poblaciones del co-cultivo basándonos en el tamaño y la complejidad de los dos tipos celulares, pero esta estrategia no resultó óptima al no poder distinguir una población de otra debido a que el tamaño de las células tumorales y CAFs es similar (Figura 11). Por ello, fue necesario elaborar una estrategia alternativa para separar las dos poblaciones celulares. Esta se basó en emplear el marcador CD90, molécula expresada por los CAFs, que se probó tanto en los co-cultivos como en los controles. Previamente, se realizó su respectiva titulación. Tras el análisis por citometría de flujo para cada una de las concentraciones se calculó el índice de tinción y se escogió aquella concentración con un índice más elevado, que en este caso fue el volumen de 1,25 μ L. Cabe destacar que para todos los volúmenes probados se identificó una población de CAFs CD90- (Figura 12), cuando lo esperado era que esta población fuera en su totalidad CD90+. Estos resultados nos permitieron deducir que el CD90 no es un buen marcador para separar las poblaciones de células tumorales y CAFs correctamente. No obstante, se continuó con el experimento para verificar esta hipótesis.

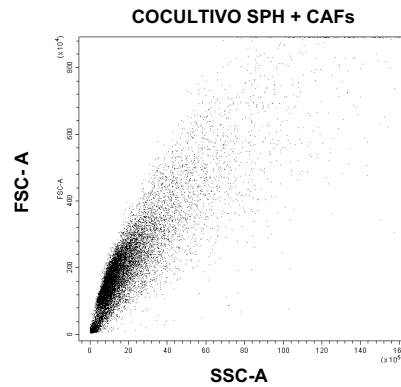


Figura 11. Separación de las poblaciones del co-cultivo por complejidad y tamaño. FSC-A: área de dispersión frontal (FSC-A por sus siglas en inglés *Forward Scatter Area*). SSC-A: área de dispersión lateral (SSC-A por sus siglas en inglés *Side Scatter Area*).

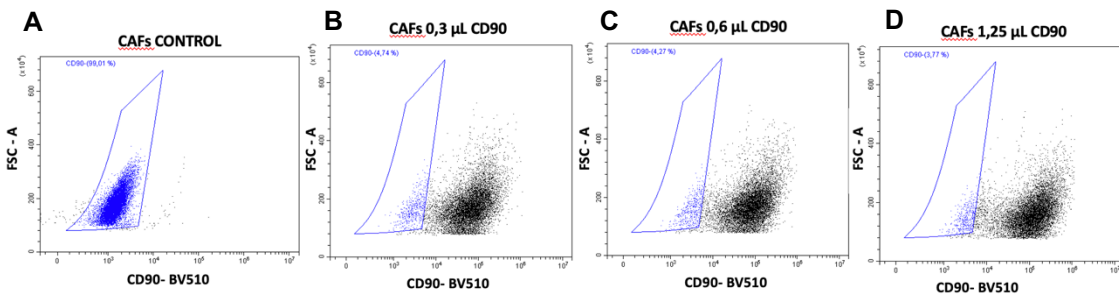


Figura 12. Resultados de la titulación del CD90. A) CAFs control a los que no se les ha añadido CD90 (población CD90-). B) CAFs a los que se les agregó 0,3 µL de CD90. C) CAFs a los que se les agregó 0,6 µL de CD90. D) CAFs a los que se les agregó 1,25 µL de CD90. FSC-A: área de dispersión frontal (FSC-A por sus siglas en inglés *Forward Scatter Area*). CD90-BV510: CD90 - Brilliant Violet 510).

El siguiente paso fue analizar la población de CD90+ en el co-cultivo. En las células tumorales se observó que eran CD90- (Figura 13 A). Por otro lado, en los CAFs se pudo observar que la mayoría expresaba CD90, aunque había una parte importante de la población que era CD90- (Figura 13 B), resultados que concuerdan con la titulación del CD90 realizada previamente. En el co-cultivo no hubo una separación clara entre los CAFs y las células tumorales que era nuestro principal objetivo (Figura 13 C).

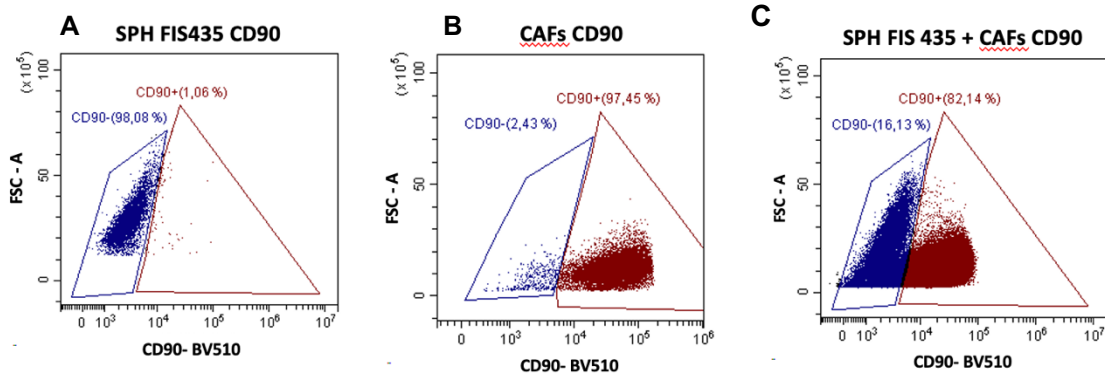


Figura 13. Segunda estrategia para separar los CAFs de las células tumorales (SPH) en el análisis por citometría de flujo. A) Células tumorales a las que se les ha añadido 1,25 μ L de CD90. B) CAFs a los que se les ha añadido 1,25 μ L de CD90. C) Co-cultivo al que se le añadió 1,25 μ L de CD90. FSC-A: área de dispersión frontal (FSC-A por sus siglas en inglés *Forward Scatter Area*). CD90-BV510: CD90 - Brilliant Violet 510.

Ante estos resultados, se planteó utilizar dos colorantes de fluorescencia diferentes que retienen la señal fluorescente de 3 a 6 generaciones, presentan una citotoxicidad baja (no afecta a la viabilidad ni a la proliferación) y sirve tanto para células en adherencia como para células en suspensión, según el fabricante.

En primer lugar, se utilizó un colorante de fluorescencia rojo lejano comercial sobre los CAFs. De las diferentes concentraciones testadas observamos que a las 48 horas en todos los casos la población de CAFs presentaba un crecimiento normal del mismo modo que el control (Figura 14). Posteriormente, decidimos testar la máxima concentración en los CAFs para observar su separación tras el co-cultivo mediante citometría de flujo. En este caso, se observó que en comparación con la población sin teñir (Figura 15 A), la población de los CAFs teñidos con el colorante rojo lejano se desplazaba hacia la derecha (región de positividad) (Figura 15 B). En cuanto al co-cultivo, se observó una separación entre los CAFs teñidos y las células tumorales, aunque dicha separación no fue muy pronunciada (Figura 15 C).

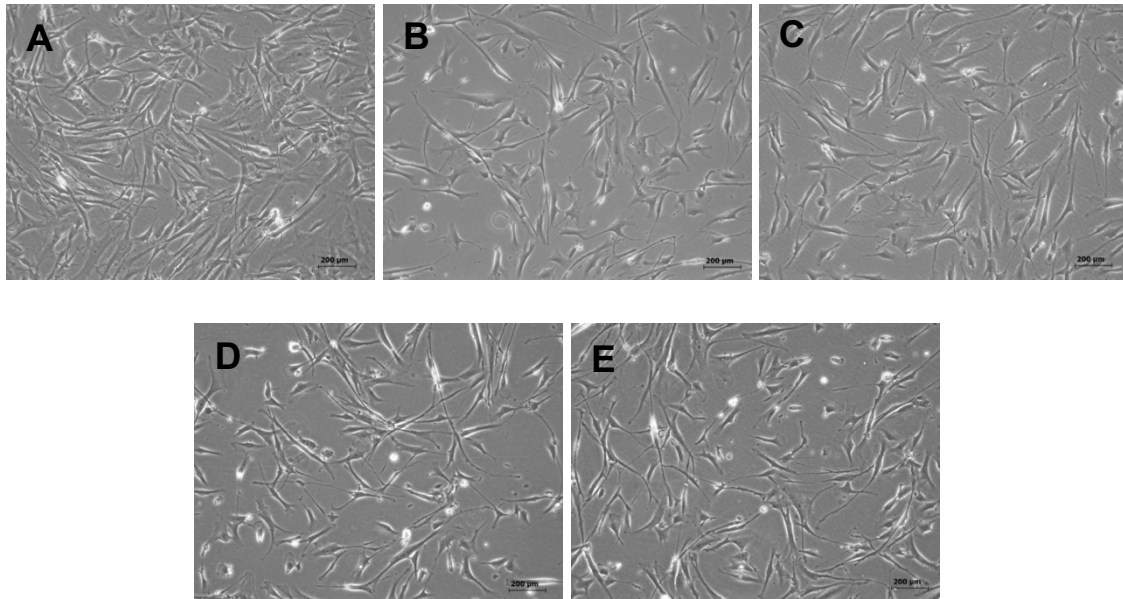


Figura 14. Efecto del colorante fluorescente rojo lejano sobre los CAFs a las 48 horas. A) CAFs control sin teñir. B) CAFs teñidos con 1 μM del colorante fluorescente rojo lejano. C) CAFs teñidos con 1,25 μM del colorante fluorescente rojo lejano. D) CAFs teñidos con 1,5 μM del colorante fluorescente rojo lejano. E) CAFs teñidos con 2 μM del colorante fluorescente rojo lejano. Magnitud: 10x. Barra de escala: 200 μm .

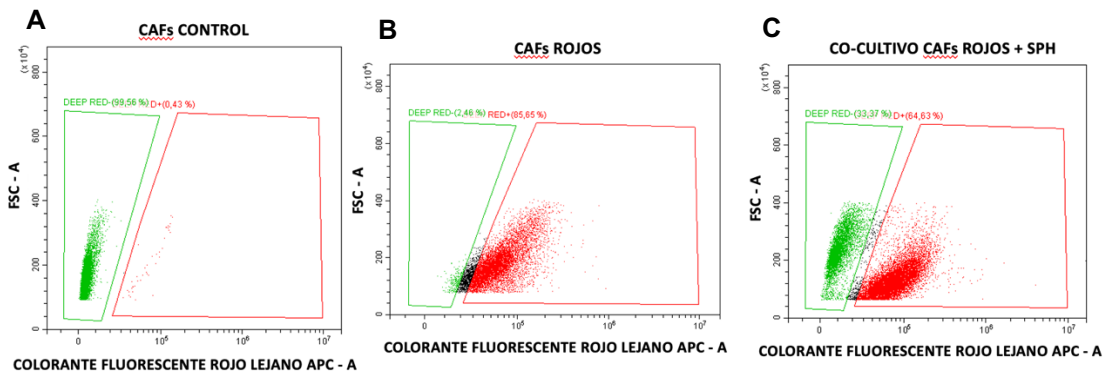


Figura 15. Análisis de separación de las poblaciones por citometría utilizando el colorante fluorescente rojo lejano sobre los CAFs. A) CAFs control sin teñir. B) CAFs teñidos con el colorante fluorescente rojo lejano. C) Co-cultivo entre CAFs teñidos con el colorante fluorescente rojo lejano y las tumoresferas no teñidas. FSC-A: área de dispersión frontal (FSC-A por sus siglas en inglés *Forward Scatter Area*). APC-A: área de fluorescencia emitida por el fluorocromo Alociocianina.

En segundo lugar, se utilizó un colorante fluorescente verde comercial sobre los CAFs. Se comprobó que dicho colorante no tenía ningún efecto sobre la fisiología de los CAFs a las 48 horas (Figura 16). En cuanto a los resultados de la citometría de flujo, se testaron tanto la máxima concentración como la mínima, y al igual que en la estrategia anterior se observó un desplazamiento hacia la derecha de los CAFs teñidos con el colorante fluorescente verde en comparación con los CAFs control no teñidos (Figura 17). Utilizando la concentración más baja de 0,25 μM del colorante fluorescente verde, se visualizó una buena separación de las poblaciones a una ganancia de 100, ya que

se podían distinguir las células tumorales a la izquierda y los CAFs teñidos a la derecha del gráfico (Figura 18 A). Por otro lado, en cuanto a la concentración de 2,5 μM a una ganancia de 100 se observó que la población se desplazaba fuera del gráfico (Figura 18 B) y para conseguir una buena visualización hacía falta disminuir la ganancia a un valor de 20 (Figura 18 C). Cabe decir que la ganancia hace referencia a la amplificación de la señal fluorescente detectada por el citómetro. Dado que esta técnica permitió una mejor separación de las poblaciones y a la concentración de colorante fluorescente más baja testada (0,25 μM), la presente estrategia fue la seleccionada para los siguientes experimentos.

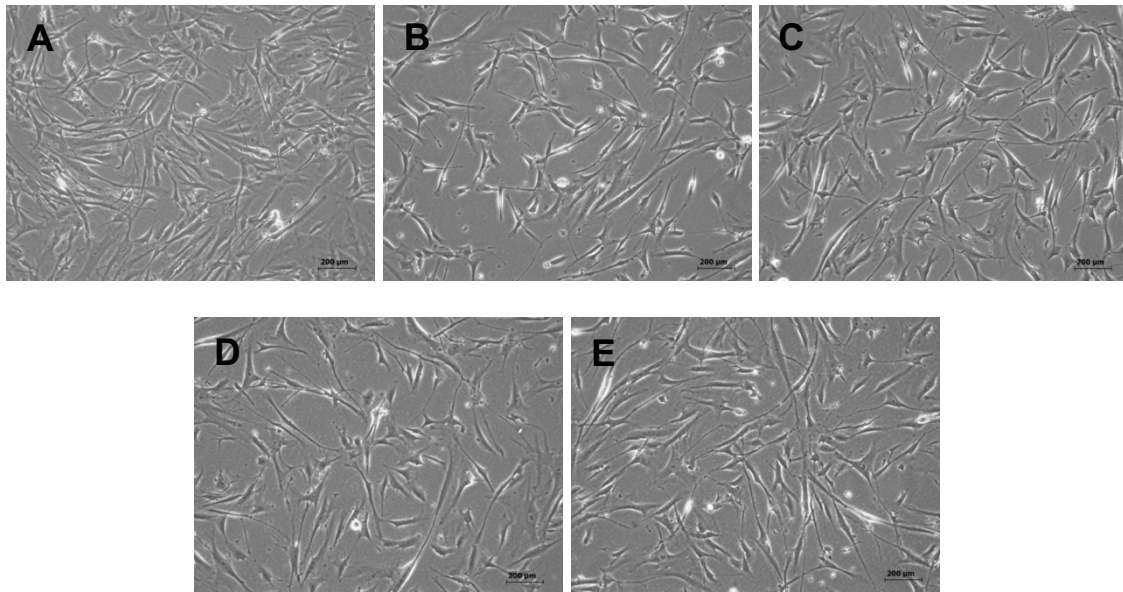


Figura 16. Efecto del colorante fluorescente verde sobre los CAFs a las 48 horas. A) CAFs control sin teñir. B) CAFs teñidos con 0,25 μM del colorante fluorescente verde. C) CAFs teñidos con 0,75 μM del colorante fluorescente verde. D) CAFs teñidos con 1,5 μM del colorante fluorescente verde. E) CAFs teñidos con 2,5 μM del colorante fluorescente verde. Magnitud de 10x. Barra de escala: 200 μm .

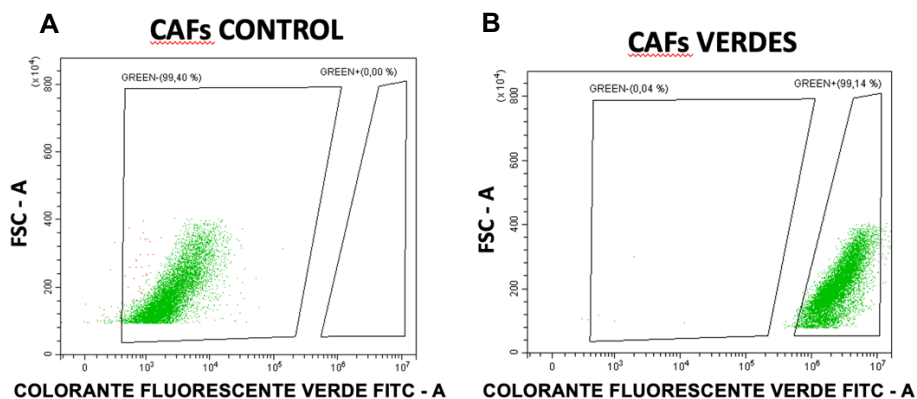


Figura 17. Resultados del análisis por citometría empleando el colorante fluorescente verde sobre los CAFs. A) CAFs control sin teñir. B) CAFs teñidos con el colorante fluorescente verde. FSC-A: área de dispersión frontal (FSC-A por sus siglas en inglés *Forward Scatter Area*). FITC-A: área de fluorescencia emitida por el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína.

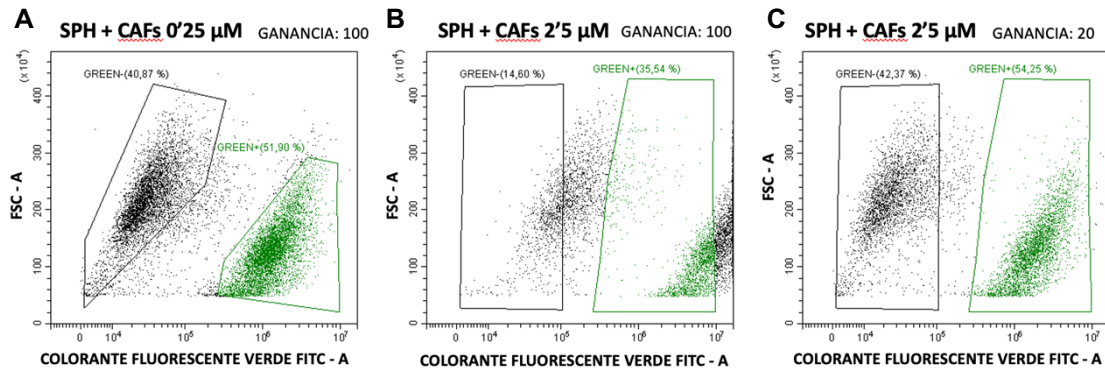


Figura 18. Análisis de separación de las poblaciones por citometría empleando diferentes concentraciones del colorante fluorescente verde sobre los CAFs. A) Co-cultivo con CAFs teñidos con el colorante fluorescente verde a 0,25 µM. Ganancia: 100. B) Co-cultivo con CAFs teñidos con el colorante fluorescente verde a 2,5 µM. Ganancia: 100. C) Co-cultivo con CAFs teñidos con el colorante fluorescente verde a 2,5 µM. Ganancia: 20. FSC-A: área de dispersión frontal (FSC-A por sus siglas en inglés *Forward Scatter Area*). FITC-A: área de fluorescencia emitida por el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína.

En cuanto a los CAFs, se han descrito varios biomarcadores para su identificación, pero ninguno de ellos es selectivo para esta población celular. El CD90 es una proteína de superficie celular con una fuerte N-glicosilación que se expresa en una variedad de células tumorales y tipos celulares normales y se ha demostrado que media interacciones célula-célula al unirse a integrinas en diversos contextos tisulares (43). En un estudio donde se emplearon CAFs de pacientes con diferentes subtipos de CPNM se observó que el CD90 estaba sobreexpresado en los fibroblastos tumorales en comparación con fibroblastos aislados del tejido pulmonar adyacente no canceroso. No obstante, en este mismo estudio se encontraron 5 subtipos de CAFs, los cuales no eran específicos del paciente, sino que había una heterogeneidad de los CAFs dentro de los pacientes. Dos de los subtipos de CAFs tuvieron una expresión del CD90 media-alta mientras que otros dos subtipos tuvieron una expresión del CD90 baja y el otro subtipo restante era CD90 negativo (44). Esto respalda nuestros resultados donde observamos esta población negativa por lo que el CD90 no es un buen biomarcador para separar los CAFs de las células tumorales en el análisis por citometría de flujo en el presente trabajo.

En cuanto a la segunda y tercera aproximación, se plantearon dado que Conti et al. utilizaron los mismos colorantes fluorescentes comerciales CellTracker™ Green CMFDA Dye y Deep Red Dye para teñir los CAFs y las células tumorales respectivamente con buenos resultados. No obstante, en este caso se emplearon para visualizar las diferentes poblaciones celulares en un ensayo de invasión de esferoides tridimensionales. Concretamente, las poblaciones celulares que usaron fueron CAFs de carcinoma ductal invasivo de mama humano que habían sido inmortalizados y células HCC1806, una línea celular de cáncer ductal de mama humano (45).

4.3. TITULACIÓN DE ANTICUERPOS

En este trabajo se realizó la titulación de los anticuerpos utilizados en los ensayos de citometría de flujo, siguiendo las normas de buenas prácticas para este tipo de análisis. La titulación se realizó sobre 250000 células (suficiente para testar 10.000 eventos) y los resultados se muestran en la Tabla 4.

Hay que tener en cuenta que el uso del kit comercial basado en microesferas tiene una mayor sensibilidad a la concentración de anticuerpos en comparación con las células. Por este motivo, en el HLAE-PerCP-Cy5.5 se seleccionó 0,6 μ L en lugar de 0,3 μ L con el objetivo de garantizar una marcación adecuada de todas las células tumorales, minimizado así la posibilidad de que alguna se quedase sin marcar por una concentración insuficiente de anticuerpo.

En cuanto al CD44-PE-Cy7, se seleccionó el volumen de 0,6 μ L dado que la diferencia del valor del índice de tinción era mínima con respecto del volumen de 0,3 μ L. De esta forma, nos garantizamos una marcación adecuada de las células tumorales.

El objetivo de la titulación de anticuerpos marcados con fluoróforos es determinar la cantidad óptima para un par anticuerpo-fluorocromo determinado, que permita la mejor separación posible entre las poblaciones de células positivas y negativas. Además, esta titulación es esencial ya que emplear una cantidad mayor de la necesaria podría producir una saturación del anticuerpo, aumentando el ruido de fondo debido a uniones no específicas (46). Adicionalmente, calcular la cantidad específica permite ahorrar costos dado que estos anticuerpos tienen un elevado coste. En conclusión, la titulación de anticuerpos es imprescindible para obtener unos resultados favorables y optimizar el uso de los anticuerpos.

Tabla 4. Índice de tinción calculado para cada uno de los volúmenes testados en cada anticuerpo. Azul: volumen seleccionado. (*): Anticuerpos titulados con el kit comercial.

Anticuerpos-fluoróforos	Volúmenes testados (µL)	Índice de tinción calculado
EpCAM-AF700	1,25	77,98
	0,6	61,64
	0,3	42,30
E-cad-BV605	1,25	27,25
	0,6	26,02
	0,3	24,94
CD44-PE-Cy7	1,25	60,47
	0,6	62,21
	0,3	62,33
CD90-BV510	1,25	16,50
	0,6	11,01
	0,3	9,86
ICOSL-BV786 *	1,25	42,70
	0,6	20,09
	0,3	22,85
MICA/B-PE	1,25	25,34
	0,6	19,5
	0,3	15,37
CD276-BV510	1,25	5,73
	0,6	4,28
	0,3	4,42
HLAE-PerCP-Cy5.5 *	1,25	60,11
	0,6	93,69
	0,3	107,68
CD200-PE-Cy7	1,25	2,91
	0,6	2,71
	0,3	2,63
PD-L1-BV650	1,25	46,55
	0,6	41,96
	0,3	45,06
PD-L2-BV421	1,25	6,02
	0,6	5,59
	0,3	5,72
Gal-9-AF647*	1,25	79,34
	0,6	69,02
	0,3	57,79
Vim-PE	1,25	32,14
	0,6	20,76
	0,3	14,41
β-cat-PE-Cy7	1,25	72,15
	0,6	88,55
	0,3	65,50
CD133-PE*	2	498,20
	1	457,09
	0,5	61,52
Gal-3-AF647	1	22,85
	0,5	20,43
	0,25	13,31
STAT3-AF647*	5	32,79
	2,5	18,5
	1,25	9,56

4.4. ANÁLISIS DE MARCADORES CELULARES EN LAS DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVOS

En este estudio se analizaron las subpoblaciones celulares en función de la expresión tanto de marcadores de membrana como de marcadores intracelulares.

Un objetivo frecuente del análisis por citometría de flujo es determinar la proporción de células positivas y/o negativas para un marcador dado y para ello es necesario seleccionar y definir la población de estudio. Para el análisis, el primer paso es seleccionar únicamente las células individuales (*single cells*, en inglés) con la finalidad de excluir los agregados y restos celulares (Figura 19 A). Posteriormente, hay que aplicar una región de viabilidad para eliminar las células muertas del análisis (47) (Figura 19 B). Posteriormente, se selecciona el tipo celular que se pretende analizar: por un lado, se seleccionan las células tumorales provenientes de esferas que se encontrarán a la izquierda del gráfico y por otro lado se seleccionan los CAFs que se encontrarán a la derecha del gráfico al estar teñidos con el colorante fluorescente verde. Esta selección se realiza tanto para el co-cultivo 1:1 (Figura 19 C) como para el co-cultivo 1:2 (Figura 19 D). Una vez realizado este procedimiento se procede con el análisis de los marcadores para cada población y condición.

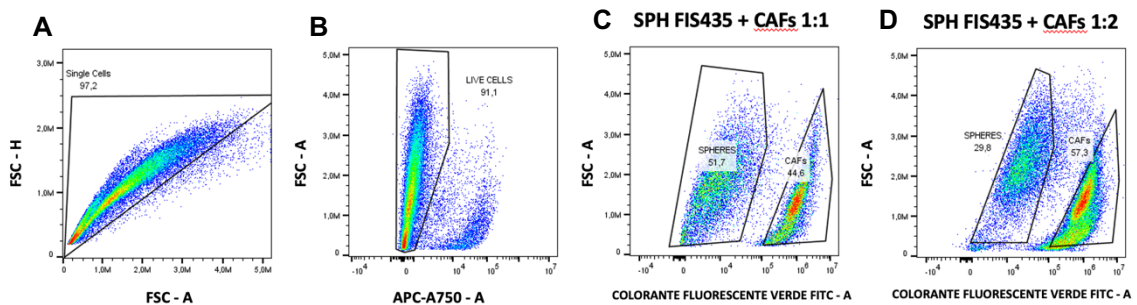


Figura 19. Selección de poblaciones para el análisis de los datos obtenidos en citometría de flujo. A) Células individuales (*single cells* por su nombre en inglés). B) Células vivas (*live cells* por su nombre en inglés). C) Células tumorales provenientes de tumoresferas (SPH) y CAFs presentes en el co-cultivo 1:1. D) Células tumorales provenientes de tumoresferas (SPH) y CAFs presentes en el co-cultivo 1:2. FSC-H: altura de dispersión frontal (*Forward Scatter Height* en inglés). FSC-A: área de dispersión frontal (*Forward Scatter Area* en inglés). APC-780-A: área de fluorescencia emitida por el fluorocromo Alociocianina-eFluor 780. FITC-A: área de fluorescencia emitida por el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína.

El análisis de las gráficas proporcionó varias conclusiones, que se mostrarán a continuación, al comparar el porcentaje de células positivas de los diferentes marcadores de las células tumorales y de los CAFs presentes en los co-cultivos con la expresión de las células tumorales y CAFs control, respectivamente. Estas comparaciones se realizaron tanto para el cultivo FIS435 como para el cultivo FIS525. Además, se llevaron a cabo dos réplicas para cada panel y cultivo a excepción del panel 3 en el que únicamente se realizó una réplica.

4.4.1. Análisis de marcadores relacionados con la EMT y stemness

En las células tumorales de la FIS435 los marcadores EpCAM, E-cad, CD44 y Gal-3 permanecieron prácticamente constantes y positivos para la mayoría de las células en todas las condiciones. En cuanto a la Vim y la β -cat, se vio un aumento de células Vim+ que fue mayor en el co-cultivo 1:1 y un ligero aumento de células β -cat+ que permaneció en niveles similares en ambos co-cultivos. No obstante, en las células tumorales de la FIS525 se observó una disminución de la población positiva para E-cad y un aumento de la Gal-3+, viéndose ambos cambios acentuados en el co-cultivo 1:2. Sin embargo, es importante mencionar que en el caso de la Gal-3, se apreció una elevada barra de error tanto en el caso de las células tumorales provenientes de las tumoresferas control como en las del co-cultivo 1:1 debido a una considerable dispersión de los datos. Además, se observó un aumento de células positivas para la Vim que fue más predominante en el co-cultivo 1:2 pero no hubo ninguna variación en el caso de la β -cat. Por otro lado, no se observó ninguna población positiva para los marcadores CD90, CD133 y STAT3 en ninguno de los casos. Estos resultados han sido representados gráficamente en la Figura 20. Cabe destacar que el análisis de Vim, β – cat y STAT3 solo se pudo realizar una vez por lo que estos resultados deben ser validados en un análisis posterior.

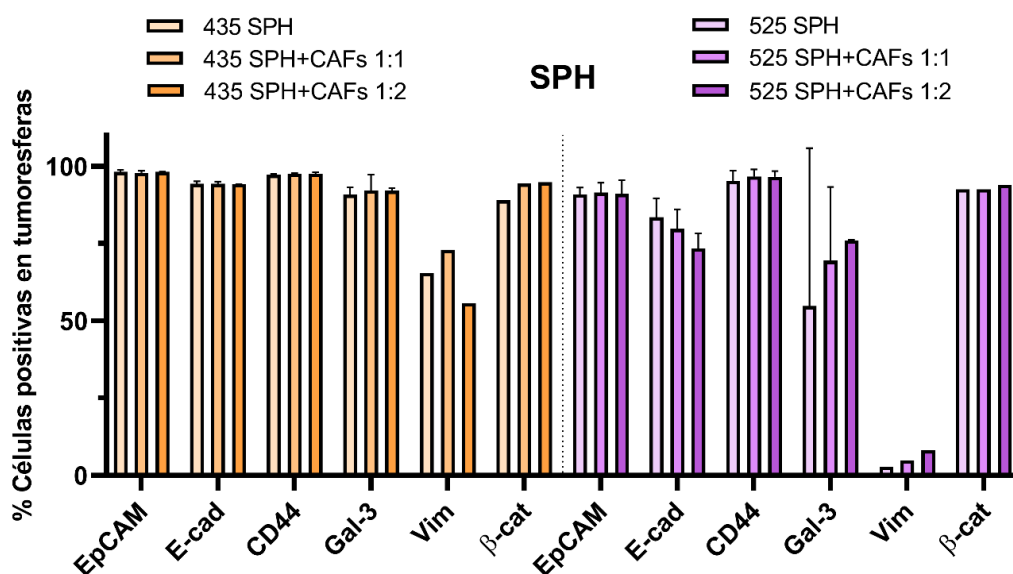


Figura 20. Representación del porcentaje de células positivas de los marcadores relacionados con la EMT y stemness en las células tumorales provenientes de tumoresferas. Aquellos marcadores que tenían una expresión nula no han sido representados.

La E-cadherina (E-cad) es una molécula de adhesión celular dependiente del calcio que tiene un papel fundamental en el comportamiento de las células epiteliales (48). Concretamente, se encarga de mantener la interacción célula-célula intacta y un citoesqueleto estabilizado, evitando así la movilidad de las células tumorales y su posterior diseminación. La transición epitelio mesénquima (EMT) es un proceso biológico en el cual una célula epitelial no motil cambia a un estado mesenquimal con capacidades invasivas. La EMT asociada al cáncer contribuye al aumento de la invasión y metástasis, la resistencia a las terapias y la generación de poblaciones celulares con

características similares a las de las células madre, y por lo tanto está profundamente involucrada en la progresión tumoral. La característica distintiva de la EMT es la pérdida de marcadores superficiales epiteliales, principalmente la E-cad, y la adquisición de un fenotipo mesenquimal con propiedades migratorias (49,50). Por ello, una disminución de la población positiva de células tumorales del cultivo FIS525 para E-cad puede indicar que los CAFs son capaces de inducir la EMT en dichas células tumorales. Además, en un estudio se observó que organoides de adenocarcinoma ductal pancreático mostraron un aumento en la expresión de genes EMT en un co-cultivo 3D con CAFs (51). Estos resultados respaldan nuestros resultados.

La Gal-3, es una proteína de unión a carbohidratos con afinidad por residuos de N-acetilactosamina. Esta regula procesos asociados con la progresión tumoral y la metástasis, tales como la proliferación celular, la agregación homotípica/heterotípica, la migración e invasión, la supervivencia y la apoptosis. A pesar de que la asociación de la Gal-3 con el fenómeno de la "stemness" tumoral no se ha esclarecido todavía, existe suficiente evidencia directa de sus roles regulatorios en los fenotipos y vías de señalización asociados con las CSCs (52). Por otro lado, la Gal-3 contribuye a la inmunosupresión en cáncer (53). Por ello, un aumento de células Gal-3+ en el co-cultivo sugiere que los CAFs son capaces de aumentar la población de CSCs y los mecanismos de inmunosupresión en el cultivo FIS525.

La vimentina (Vim) es una proteína intermedia del citoesqueleto que se encuentra en células mesenquimales y es reconocida por su importante papel en la estabilización de la estructura intracelular (54). En consonancia con los resultados observados en el cultivo FIS525, otros autores han revelado que, durante la EMT, las células epiteliales pierden marcadores epiteliales (como la E-cad) y comienzan a expresar marcadores mesenquimales (como la Vim) (50). No obstante, algunos tumores se caracterizan por una EMT incompleta, donde las células tumorales adquieren características mesenquimales, pero retienen sus marcadores epiteliales, en particular, la E-cad (50). Esto explicaría por qué hay un aumento de la vimentina en el co-cultivo de la línea FIS435, pero no hay una disminución de la E-cad como observamos anteriormente. Además, en un estudio donde se realizó un co-cultivo entre CAFs y una línea celular de CPNM se observó un aumento de los niveles de expresión de la Vim en las células tumorales del co-cultivo en comparación de las células tumorales control (55), lo cual sustenta aún más nuestros hallazgos. Por ello, se puede concluir que en nuestro modelo de estudio los CAFs podrían promover la EMT en las células tumorales a través de la Vim.

La β -catenina (β -cat) es una proteína multifuncional con un papel central en la homeostasis fisiológica. La señalización de Wnt/ β -cat es una vía evolutivamente conservada cuya activación aberrante da lugar a la acumulación de β -cat en el núcleo y promueve la transcripción de muchos oncogenes. Como resultado, contribuye a la carcinogénesis y la progresión tumoral de varios cánceres, incluyendo el cáncer de pulmón (56). Una acumulación de β -cat estimula la EMT (57). Por ello, un aumento de la expresión de dicho marcador en nuestro modelo de estudio indicaría que los CAFs son capaces de inducir la EMT en las células tumorales a través de esta molécula, lo cual facilitaría la progresión tumoral.

Con respecto al análisis de las poblaciones celulares en función de la expresión de los diferentes marcadores en la población de CAFs, se observó que, en esta población, tras el co-cultivo con tumoresferas con ambos cultivos celulares, había una disminución de células CD90+. En estos casos, no se detectaron diferencias considerables entre el co-cultivo 1:1 y 1.2. Por otro lado, se detectaron diferencias en el porcentaje de células Gal-3+. En los CAFs del co-cultivo con tumoresferas de la FIS435 se apreció una disminución de la población positiva para Gal-3, siendo más llamativa en el co-cultivo 1:1. Por el contrario, en los CAFs del co-cultivo con tumoresferas de la FIS525 hubo un aumento de la población positiva para Gal-3, siendo más notable en el co-cultivo 1:2. En cuanto a la Vim y la β -cat, en los CAFs del co-cultivo con tumoresferas de la FIS435 se observó un aumento tanto de células Vim+ como de β -cat+ en ambas condiciones de co-cultivo siendo más notable en el co-cultivo 1:1 en comparación con los CAFs control. En cuanto a los CAFs del co-cultivo con tumoresferas de la FIS525 se observó el mismo resultado, pero para ambos marcadores el aumento fue más notable en el co-cultivo 1:2. Por otro lado, no se observó ninguna población positiva de EpCAM, E-cad, CD133 ni STAT3 en los CAFs. Estos resultados han sido representados gráficamente en la Figura 21.

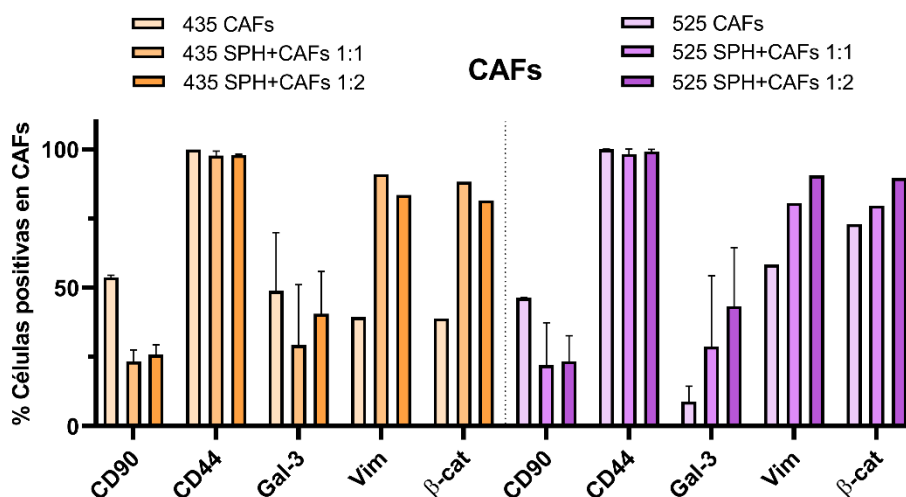


Figura 21. Representación del porcentaje de células positivas de los marcadores relacionados con la EMT y *stemness* en los CAFs. Aquellos marcadores que tenían una expresión nula no han sido representados.

En diversos estudios se ha demostrado que los CAFs son negativos para los marcadores EpCAM y E-cad (58,59), lo que está en consonancia con los resultados obtenidos.

En cuanto al CD90 (Thy-1), se ha estudiado que tiene una expresión más elevada en el estroma del cáncer en comparación con el tejido normal (60). Dado que ciertos autores han identificado la existencia de CAFs CD90- (44), nuestros resultados podrían indicar un cambio fenotípico de dicho tipo celular al ser co-cultivados con células tumorales.

Por otro lado, y acorde con nuestros resultados, se ha demostrado que el CD44 se expresa abundantemente en los CAFs contribuyendo al mantenimiento de las

poblaciones de CSCs en el TME (61), por lo que la expresión de dicho marcador puede indicar un sostenimiento de la población *stem* en nuestro modelo de estudio.

La Gal-3 afecta a la progresión del tumor y a la polarización de la superficie celular al expresarse tanto en las células tumorales como en los CAFs. Tiene tanto funciones intracelulares (efecto anti-apoptótico, regulación de la transducción de señales intracelulares, expresión génica y regulación del ARNm) como extracelulares (regulación de la adhesión celular, la angiogénesis y la regulación inmunológica). En los últimos años, se ha demostrado que la Gal-3 expresada por los CAFs puede afectar a todos estos mecanismos (62). Este es el primer estudio hasta la fecha que analiza el efecto de las células tumorales en la expresión de la Gal-3 en los CAFs. En nuestros resultados observamos efectos contrarios al co-cultivar los CAFs con dos cultivos derivados de pacientes diferentes. El aumento de la población Gal-3+ en los CAFs co-cultivados con células tumorales provenientes de tumoresferas de la línea FIS525 podría promover la progresión del cáncer al alterar los procesos mencionados. Por el contrario, la disminución de la población Gal-3+ en los CAFs co-cultivados con células tumorales provenientes de tumoresferas de la línea FIS435 podría tener el efecto contrario.

La expresión de la Vim en los CAFs está relacionada con los procesos de tumorigénesis, metástasis, recurrencia, resistencia a los medicamentos y mal pronóstico en pacientes de varios tipos de cáncer (63). Por ello, un aumento de la Vim en los CAFs de nuestro modelo de estudio puede indicar que las células tumorales son capaces de promover los procesos comentados.

En un estudio en el que se empleó un modelo de co-cultivo tumoral 3D *in vitro*, se observó que los CAFs deficientes en β -cat perdieron la capacidad de apoyar el crecimiento de las células de melanoma (64). Por ello, un aumento de la expresión de la β -cat en los CAFs puede indicar un mayor crecimiento de las células tumorales.

4.4.2. Análisis de marcadores inmunomoduladores

En las células tumorales de ambos cultivos se observó un aumento en ambos co-cultivos de células ICOSL+ y CD200+ (viéndose un mayor aumento en el co-cultivo 1:2 para ambos casos) mientras que para el CD276 no hubo cambios relevantes. En cuanto al PD-L1, no se observó ninguna variación para las células tumorales de la línea FIS435. Sin embargo, en la línea FIS525 se observó un aumento de células PD-L1+ en el co-cultivo, sin diferencias relevantes entre ellos. Por otro lado, las células tumorales de la línea FIS435 tuvieron una expresión nula del MICA/B a diferencia de la línea FIS525 donde se vio una elevada positividad en las células tumorales control que disminuía en los co-cultivos (sin diferencias destacables entre los dos tipos de co-cultivos). Además, en la FIS525, no se observó ninguna positividad para el PD-L2 ni para la Gal-9 mientras que en la FIS435 se vio un aumento de células positivas para ambos biomarcadores que fue más notable en el co-cultivo 1:2. Por último, en ningún caso se apreció una expresión del HLA-E. Estos resultados comentados se representan gráficamente en la Figura 22.

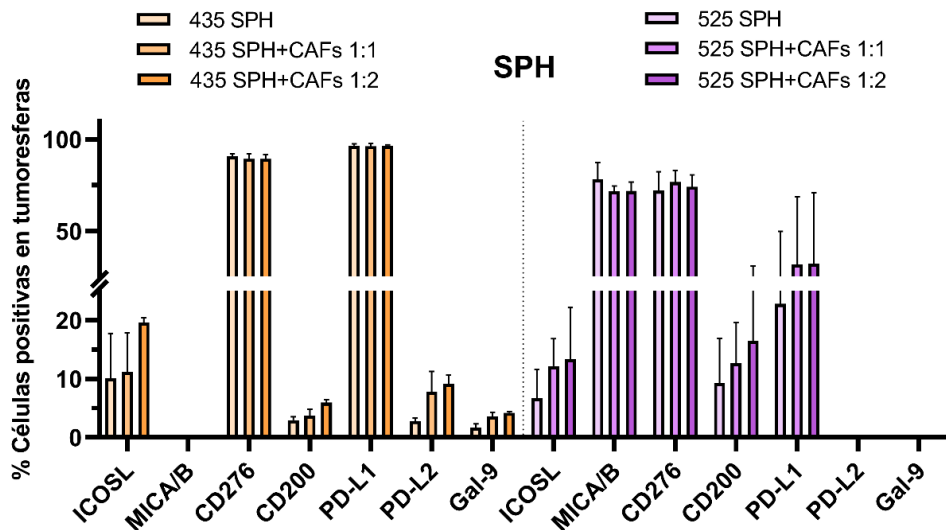


Figura 22. Representación del porcentaje de células positivas de los marcadores inmunomoduladores en las células tumorales provenientes de tumoresferas. Aquellos marcadores que tenían una expresión nula no han sido representados

Las moléculas con capacidad inmunoreguladora ICOSL, CD276, CD200, Gal-9, PD-L1 y PD-L2 son expresadas por las células tumorales como un mecanismo de escape inmunológico (65). Se ha reportado que los CAFs están asociados con una mayor expresión de moléculas inmunoreguladoras, ya sea en su propia superficie o al aumentar la expresión de estas moléculas en otras células, como en las células tumorales (66,67). Por ejemplo, en un estudio se demostró que los CAFs influían indirectamente en la inmunidad tumoral al aumentar la expresión de PD-L1 en las células de adenocarcinoma pulmonar (68). Asimismo, Lou et al. (2023) revelaron que los CAFs aumentaron la expresión de PD-L1 en células de cáncer gástrico (69). Nuestros resultados corroboran que los CAFs son capaces de aumentar la expresión de las moléculas inmunoreguladoras comentadas lo cual puede resultar en la supresión de las células inmunitarias y, en última instancia, en el crecimiento y la progresión del tumor. Cabe destacar que los niveles constantes de la población PD-L1+ del cultivo FIS435 pueden deberse a que el paciente poseía unos niveles iniciales de expresión tisular del 90% (datos obtenidos por determinación inmunohistoquímica realizada por el servicio de anatomía patológica del Hospital General de Valencia). Por el contrario, el paciente FIS525 poseía unos niveles de expresión del 60%.

En cuanto MICA y MICB son proteínas relacionadas con el complejo que funcionan como señales de estrés celular, interactuando con el receptor NKG2D, activando las respuestas citolíticas de las células T $\gamma\delta$ y las células asesinas naturales (NK) contra las células tumorales epiteliales (70). Por ello, en nuestro estudio, la disminución de MICA/B en la superficie celular de las células tumorales FIS525 en el co-cultivo puede indicar que los CAFs son capaces de provocar un mayor estado de inmunosupresión y una menor capacidad citolítica de las células efectoras en cáncer de pulmón. Además, en un estudio se realizó un análisis por citometría de flujo que reveló que una línea celular de cáncer de pulmón derivada de un paciente no expresaba MICA/B, mientras que otra línea celular derivada de otro paciente lo expresaba en gran medida. Tras realizar un análisis de la secuencia del ADN del gen MICA observaron que el alelo del dominio

transmembrana era diferente entre las dos líneas celulares derivadas de pacientes (71). Estos resultados podrían explicar que la FIS525 tenga una elevada expresión de MICA/B mientras que para la FIS435 sea nula.

Con respecto al análisis de la población de CAFs, en el co-cultivo con ambos cultivos se observó un aumento de células CD276+ y una disminución de células ICOSL+, MICA/B+, CD200+, PD-L1+ y PD-L2+. Además, en todos los casos esta tendencia fue mayor en el co-cultivo 1:2 a excepción del CD276 y del MICA/B, donde fue similar en ambos co-cultivos. Por otro lado, la expresión del HLA-E y de la Gal-9 fue nula en todos los casos. Estos resultados han sido representados gráficamente en la Figura 23.

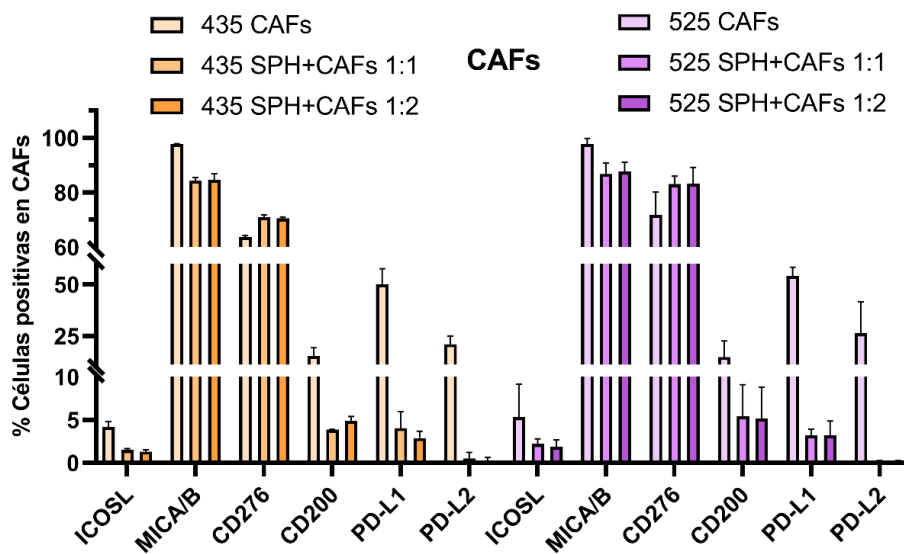


Figura 23. Representación del porcentaje de células positivas de los marcadores inmunomoduladores en los CAFs. Aquellos marcadores que tenían una expresión nula no han sido representados.

Previamente se ha observado que una interacción directa entre células cancerosas y CAFs conllevaba a una expresión mutuamente aumentada del PD-L1 tanto *in vitro* como *in vivo* (72). No obstante, en nuestro caso los resultados han sido discrepantes. El co-cultivo ha mostrado un aumento de las moléculas con capacidad inmunoreguladora en las células tumorales a medida que la expresión en los CAFs se veía disminuida (a excepción del CD276).

CD276 (también conocido como B7-H3) pertenece a la familia de moléculas B7 y actúa principalmente como una molécula co-inhibidora para promover la progresión tumoral (73). En un estudio se observó que los CAFs CD276+ promovían la invasión y metástasis en cáncer renal (74). Nuestro estudio sugiere que las células tumorales promoverían un aumento de dicha molécula, resultando en un incremento de la invasión y metástasis.

Dado que MICA/B son ligandos de NKG2D, un receptor activador presente en células NK, células T CD8+ y células T $\gamma\delta$ (75), una disminución de este biomarcador en la superficie de los CAFs puede indicar un incremento de la inmunosupresión.

En resumen, se encontró que los CAFs pueden inducir la expresión de marcadores inmunomoduladores, modular la *stemness* e inducir la EMT en las células tumorales. Además, las células tumorales también son capaces de inducir cambios en la expresión de ciertos marcadores en los CAFs. Estas variaciones evidencian una influencia mutua, aunque el impacto puede variar según el origen específico de las células tumorales. Sin embargo, es necesario validar estos hallazgos en un mayor número de muestras. Cabe destacar, que el presente trabajo es uno de los primeros estudios realizados empleando modelos 3D de co-cultivo con varios tipos celulares. En comparación con los cultivos celulares tradicionales en monocapa 2D nuestro modelo proporciona un entorno que se asemeja más a una masa tumoral real. Este enfoque nos ha permitido obtener una visión más detallada de las interacciones entre los CAFs y las células tumorales, aportando una perspectiva novedosa. No obstante, se podría utilizar una mayor variedad de tipos celulares con el objetivo de recapitular mejor el microambiente tumoral.

5. CONCLUSIONES

- 1) La estrategia seleccionada de co-cultivo entre las células tumorales y los CAFs se basa en disgregar ambos modelos y co-cultivarlos a la vez en condiciones 3D.
- 2) El colorante fluorescente verde comercial sobre los CAFs a una concentración de 0,25 μM resultó en la estrategia más óptima para la separación de los CAFs y las células tumorales. Dicho colorante fluorescente no tuvo ningún efecto negativo sobre la fisiología de las células.
- 3) Los CAFs son capaces de inmunomodular a las células tumorales al aumentar la expresión de todas las moléculas con capacidad inmunoreguladora estudiadas (ICOSL, CD276, CD200, PD-L1, PD-L2, Gal-9, Gal-3). Además, las células tumorales también producen una inmunomodulación sobre los CAFs aunque en este caso, se produce una disminución de la población positiva para estas moléculas.
- 4) Los CAFs modularían la capacidad *stemness* de las células tumorales al aumentar la expresión de biomarcadores relacionados con las CSCs como la Gal-3.
- 5) Los CAFs inducirían la transición epitelio mesénquima en las células tumorales al disminuir la expresión de E-cad y aumentar la expresión de Vim y β -cat. Por otro lado, las células tumorales también tienen un efecto sobre los CAFs ya que producen un aumento de la Vim y de la β -cat en estos.
- 6) Los CAFs y las células tumorales interactúan entre sí y se influyen mutuamente, aunque dicho efecto es diferente en función del cultivo celular. No obstante, hay que validar estos resultados en un mayor número de muestras.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
3. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31–46.
4. Deshpand R, Chandra M, Rauthan A. Evolving trends in lung cancer: Epidemiology, diagnosis, and management. *Indian J Cancer*. 2022;59(Supplement):S90–105.
5. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024;74(3):229–63.
6. Kratzer TB, Bandi P, Freedman ND, Smith RA, Travis WD, Jemal A, et al. Lung cancer statistics, 2023. *Cancer*. 2024;130(8):1330–48.
7. Corrales L, Rosell R, Cardona AF, Martín C, Zatarain-Barrón ZL, Arrieta O. Lung cancer in never smokers: The role of different risk factors other than tobacco smoking. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020;148:102895.
8. Pallis AG, Syrigos KN. Lung cancer in never smokers: Disease characteristics and risk factors. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;88(3):494–503.
9. Nooreldeen R, Bach H. Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):8661.
10. Socinski MA, Obasaju C, Gandara D, Hirsch FR, Bonomi P, Bunn P, et al. Clinicopathologic Features of Advanced Squamous NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2016;11(9):1411–22.
11. Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, Berger AH, Lee W, Chmielecki J, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014;511(7511):543–50.
12. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 2018;553(7689):446–54.
13. De Sousa VML, Carvalho L. Heterogeneity in Lung Cancer. *Pathobiology*. 2018;85(1–2):96–107.
14. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2019;94(8):1623–40.
15. Hendriks LE, Kerr KM, Menis J, Mok TS, Nestle U, Passaro A, et al. Non-oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2023;34(4):358–76.
16. Herreros-Pomares A, de-Maya-Girones JD, Calabuig-Fariñas S, Lucas R, Martínez A, Pardo-Sánchez JM, 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.
17. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;15(2):81–94.

18. Prasetyanti PR, Medema JP. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Mol Cancer*. 2017;16(1):41.
19. De Francesco EM, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer stem cells (CSCs): metabolic strategies for their identification and eradication. *Biochemical Journal*. 2018;475(9):1611–34.
20. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*. 2013;501(7467):328–37.
21. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014;14(3):275–91.
22. Rich JN. Cancer stem cells: Understanding tumor hierarchy and heterogeneity. *Medicine*. 2016;95(1 Suppl 1):S2–7.
23. Nuñez-Rios JD, Ulrich H, Díaz-Muñoz M, Lameu C, Vázquez-Cuevas FG. Purinergic system in cancer stem cells. *Purinergic Signal*. 2023.
24. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21(3):309–22.
25. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013;19(11):1423–37.
26. Feng B, Wu J, Shen B, Jiang F, Feng J. Cancer-associated fibroblasts and resistance to anticancer therapies: status, mechanisms, and countermeasures. *Cancer Cell Int*. 2022;22(1):166.
27. Liao Z, Tan ZW, Zhu P, Tan NS. Cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment – Accomplices in tumor malignancy. *Cell Immunol*. 2019;343:103729.
28. Usó M, Jantus-Lewintre E, Calabuig-Fariñas S, Blasco A, Del Olmo E, Guijarro R, et al. Analysis of the prognostic role of an immune checkpoint score in resected non-small cell lung cancer patients. *Oncoimmunology*. 2017;6(1):e1260214.
29. Usó M, Jantus-Lewintre E, Bremnes RM, Calabuig S, Blasco A, Pastor E, et al. Analysis of the immune microenvironment in resected non-small cell lung cancer: the prognostic value of different T lymphocyte markers. *Oncotarget*. 2016;7(33):52849–61.
30. Moreno-Manuel A, Jantus-Lewintre E, Simões I, Aranda F, Calabuig-Fariñas S, Carreras E, et al. CD5 and CD6 as immunoregulatory biomarkers in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2020;9(4):1074–83.
31. Wang L, Cao L, Wang H, Liu B, Zhang Q, Meng Z, et al. Cancer-associated fibroblasts enhance metastatic potential of lung cancer cells through IL-6/STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*. 2017;8(44):76116–28.
32. Wong KY, Cheung AHK, Chen B, Chan WN, Yu J, Lo KW, et al. Cancer-associated fibroblasts in nonsmall cell lung cancer: From molecular mechanisms to clinical implications. *Int J Cancer*. 2022;151(8):1195–215.
33. Torres-Martínez S, Calabuig-Fariñas S, Moreno-Manuel A, Bertolini G, Herreros-Pomares A, Escorihuela E, et al. Soluble galectin-3 as a microenvironment-relevant immunoregulator with prognostic and predictive value in lung adenocarcinoma. *Mol Oncol*. 2024;18(1):190–215.
34. Carter EP, Roozitalab R, Gibson S V., Grose RP. Tumour microenvironment 3D-modelling: simplicity to complexity and back again. *Trends Cancer*. 2021;7(11):1033–46.

35. Fontana F, Marzagalli M, Sommariva M, Gagliano N, Limonta P. In vitro 3D Cultures to Model the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2021;13(12):2970.
36. Andriani F, Majorini MT, Mano M, Landoni E, Miceli R, Facchinetti F, et al. MiR-16 regulates the pro-tumorigenic potential of lung fibroblasts through the inhibition of HGF production in an FGFR-1- and MEK1-dependent manner. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):45.
37. Nallasamy P, Nimmakayala RK, Karmakar S, Leon F, Seshacharyulu P, Lakshmanan I, et al. Pancreatic Tumor Microenvironment Factor Promotes Cancer Stemness via SPP1–CD44 Axis. *Gastroenterology*. 2021;161(6):1998–2013.e7.
38. Jin K, Pandey NB, Popel AS. Crosstalk between stromal components and tumor cells of TNBC via secreted factors enhances tumor growth and metastasis. *Oncotarget*. 2017;8(36):60210–22.
39. Koukourakis MI, Kalamida D, Mitrakas AG, Liousia M, Pouliliou S, Sivridis E, et al. Metabolic cooperation between co-cultured lung cancer cells and lung fibroblasts. *Lab Invest*. 2017;97(11):1321–31.
40. Strating E, Verhagen MP, Wensink E, Dünnebach E, Wijler L, Aranguren I, et al. Co-cultures of colon cancer cells and cancer-associated fibroblasts recapitulate the aggressive features of mesenchymal-like colon cancer. *Front Immunol*. 2023;14:1053920.
41. Kuen J, Darowski D, Kluge T, Majety M. Pancreatic cancer cell/fibroblast co-culture induces M2 like macrophages that influence therapeutic response in a 3D model. *PLoS One*. 2017;12(7):e0182039.
42. Prieto-García E, Vanesa Díaz-García C, Agudo-López A, Pardo-Marqués V, García-Consuegra I, Asensio-Peña S, et al. Tumor–Stromal Interactions in a Co-Culture Model of Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells and Fibroblasts and Their Connection with Tumor Spread. *Biomedicines*. 2021;9(4):364.
43. Schliekelman MJ, Creighton CJ, Baird BN, Chen Y, Banerjee P, Bota-Rabassedas N, et al. Thy-1+ Cancer-associated Fibroblasts Adversely Impact Lung Cancer Prognosis. *Sci Rep*. 2017;7(1):6478.
44. Mathieson L, Koppensteiner L, Dorward DA, O'Connor RA, Akram AR. Cancer-associated fibroblasts expressing fibroblast activation protein and podoplanin in non-small cell lung cancer predict poor clinical outcome. *Br J Cancer*. 2024;130(11):1758–69.
45. Conti S, Kato T, Park D, Sahai E, Trepats X, Labernadie A. CAFs and cancer cells co-migration in 3D spheroid invasion assay. *Methods Mol Biol*; 2021; 2179, 243–56.
46. Burn OK, Mair F, Ferrer-Font L. Combinatorial antibody titrations for high-parameter flow cytometry. *Cytometry A*. 2024;105(5):388–93.
47. McCoy JP Jr, editor. *Immunophenotyping: Methods and protocols*. 1st ed. New York (NY): Humana Press; 2020.
48. Van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(23):3756–88.
49. Prieto-García E, Díaz-García CV, García-Ruiz I, Agulló-Ortuño MT. Epithelial-to-mesenchymal transition in tumor progression. *Medical Oncology*. 2017;34(7):122.
50. Gloushankova NA, Zhitnyak IY, Rubtsova SN. Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Tumor Progression. *Biochemistry (Mosc)*. 2018;83(12):1469–76.

51. Schuth S, Le Blanc S, Krieger TG, Jabs J, Schenk M, Giese NA, et al. Patient-specific modeling of stroma-mediated chemoresistance of pancreatic cancer using a three-dimensional organoid-fibroblast co-culture system. *J Exp Clin Cancer Res.* 2022;41(1):312.
52. Nangia-Makker P, Hogan V, Raz A. Galectin-3 and cancer stemness. *Glycobiology.* 2018;28(4):172–81.
53. Farhad M, Rolig AS, Redmond WL. The role of Galectin-3 in modulating tumor growth and immunosuppression within the tumor microenvironment. *Oncoimmunology.* 2018;7(6):e1434467.
54. Paulin D, Lilienbaum A, Kardjian S, Agbulut O, Li Z. Vimentin: Regulation and pathogenesis. *Biochimie.* 2022;197:96–112.
55. Kim SH, Choe C, Shin YS, Jeon MJ, Choi SJ, Lee J, et al. Human lung cancer-associated fibroblasts enhance motility of non-small cell lung cancer cells in co-culture. *Anticancer Res.* 2013;33(5):2001–9.
56. Shang S, Hua F, Hu ZW. The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget.* 2017;8(20):33972–89.
57. Xue W, Yang L, Chen C, Ashrafizadeh M, Tian Y, Sun R. Wnt/ β -catenin-driven EMT regulation in human cancers. *Cell Mol Life Sci.* 2024;81(1):79.
58. Cruz-Bermúdez A, Laza-Briviesca R, Vicente-Blanco RJ, García-Grande A, Coronado MJ, Laine-Menéndez S, et al. Cancer-associated fibroblasts modify lung cancer metabolism involving ROS and TGF- β signaling. *Free Radic Biol Med.* 2019;130:163–73.
59. Subramaniam KS, Tham ST, Mohamed Z, Woo YL, Mat Adenan NA, Chung I. Cancer-Associated Fibroblasts Promote Proliferation of Endometrial Cancer Cells. *PLoS One.* 2013;8(7):e68923.
60. Zhao H, Peehl DM. Tumor-promoting phenotype of CD90hi prostate cancer-associated fibroblasts. *Prostate.* 2009;69(9):991–1000.
61. Kinugasa Y, Matsui T, Takakura N. CD44 expressed on cancer-associated fibroblasts is a functional molecule supporting the stemness and drug resistance of malignant cancer cells in the tumor microenvironment. *Stem Cells.* 2014;32(1):145–56.
62. Çakır Y, Kelten Talu C, Mermut Ö, Can Trabulus D, Arslan E. The Expression of Galectin-3 in Tumor and Cancer-Associated Fibroblasts in Invasive Micropapillary Breast Carcinomas: Relationship with Clinicopathologic Parameters. *Eur J Breast Health.* 2021;17(4):341–51.
63. Zhao Z, Li T, Yuan Y, Zhu Y. What is new in cancer-associated fibroblast biomarkers? *Cell Commun Signal.* 2023;21(1):96.
64. Zhou L, Yang K, Wickett RR, Kadekaro AL, Zhang Y. Targeted deactivation of cancer-associated fibroblasts by β -catenin ablation suppresses melanoma growth. *Tumour Biol.* 2016;37(10):14235–48.
65. Beatty GL, Gladney WL. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research.* 2015;21(4):687–92.
66. Lu Y, Li H, Zhao P, Tian L, Liu Y, Sun XD, et al. Dynamic phenotypic reprogramming and chemoresistance induced by lung fibroblasts in small cell lung cancer. *Sci Rep.* 2024;14(1):2884.

67. Gorchs L, Moro CF, Bankhead P, Kern KP, Sadeak I, Meng Q, et al. Human pancreatic carcinoma-associated fibroblasts promote expression of co-inhibitory markers on CD4+ and CD8+ T-cells. *Front Immunol.* 2019;10:847.
68. Inoue C, Miki Y, Saito R, Hata S, Abe J, Sato I, et al. PD-L1 Induction by Cancer-Associated Fibroblast-Derived Factors in Lung Adenocarcinoma Cells. *Cancers (Basel).* 2019;11(9):1257.
69. Lou M, Iwatsuki M, Wu X, Zhang W, Matsumoto C, Baba H. Cancer-Associated Fibroblast-Derived IL-8 Upregulates PD-L1 Expression in Gastric Cancer Through the NF- κ B Pathway. *Ann Surg Oncol.* 2024;31(5):2983–95.
70. Zhao Y, Chen N, Yu Y, Zhou L, Niu C, Liu Y, et al. Prognostic value of MICA/B in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(56):96384–95.
71. Baba T, Hanagiri T, Ichiki Y, Kuroda K, Shigematsu Y, Mizukami M, et al. Lack and restoration of sensitivity of lung cancer cells to cellular attack with special reference to expression of human leukocyte antigen class I and/or major histocompatibility complex class I chain related molecules A/B. *Cancer Sci.* 2007;98(11):1795–802.
72. Kawasaki K, Noma K, Kato T, Ohara T, Tanabe S, Takeda Y, et al. PD-L1-expressing cancer-associated fibroblasts induce tumor immunosuppression and contribute to poor clinical outcome in esophageal cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy.* 2023;72(11):3787–802.
73. Feng R, Chen Y, Liu Y, Zhou Q, Zhang W. The role of B7-H3 in tumors and its potential in clinical application. *Int Immunopharmacol.* 2021;101(Pt B):108153.
74. Zhang S, Zhou C, Zhang D, Huang Z, Zhang G. The anti-apoptotic effect on cancer-associated fibroblasts of B7-H3 molecule enhancing the cell invasion and metastasis in renal cancer. *Onco Targets Ther.* 2019;12:4119–27.
75. Verhaar ER, Knoflook A, Pishesha N, Liu X, van Keizerswaard WJC, Wuchterpfennig KW, et al. MICA-specific nanobodies for diagnosis and immunotherapy of MICA+ tumors. *Front Immunol.* 2024;15:1368586.

7. ANEXOS

7.1. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.

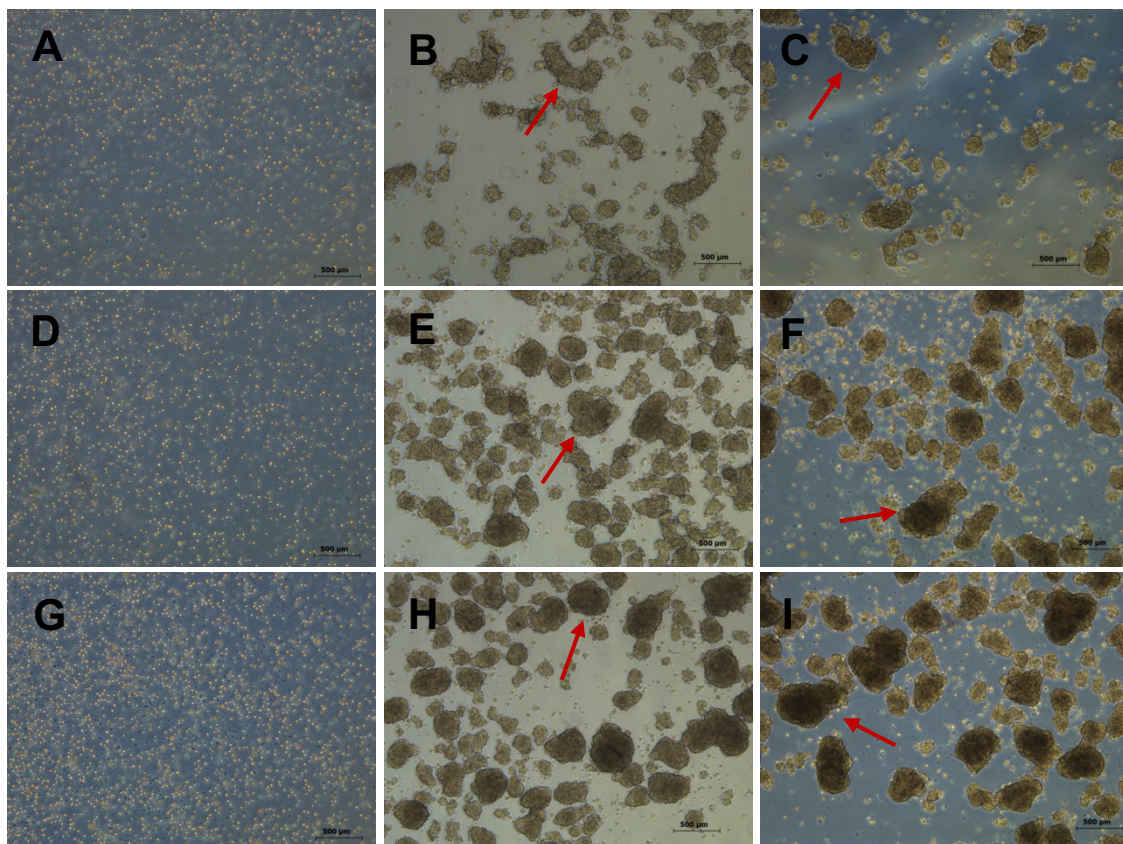


Figura S 1. Tercera aproximación del co-cultivo formado mediante CAFs y tumoresferas disgregadas del cultivo FIS525 co-cultivados en suspensión. (A, B, C) Tumoresferas del cultivo FIS525 a las 2h (A), 24h (B) y 48h (C). (D, E, F) Co-cultivo proporción 1:1 a las 2h (D), 24h (E) y 48h (F). (G, H, I) Co-cultivo proporción 1:2, a las 2h (G), 24h (H) y 48h (I). Imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fases. Magnificación: 5x. Barra de escala: 500 µm. Flechas rojas: tumoresferas.

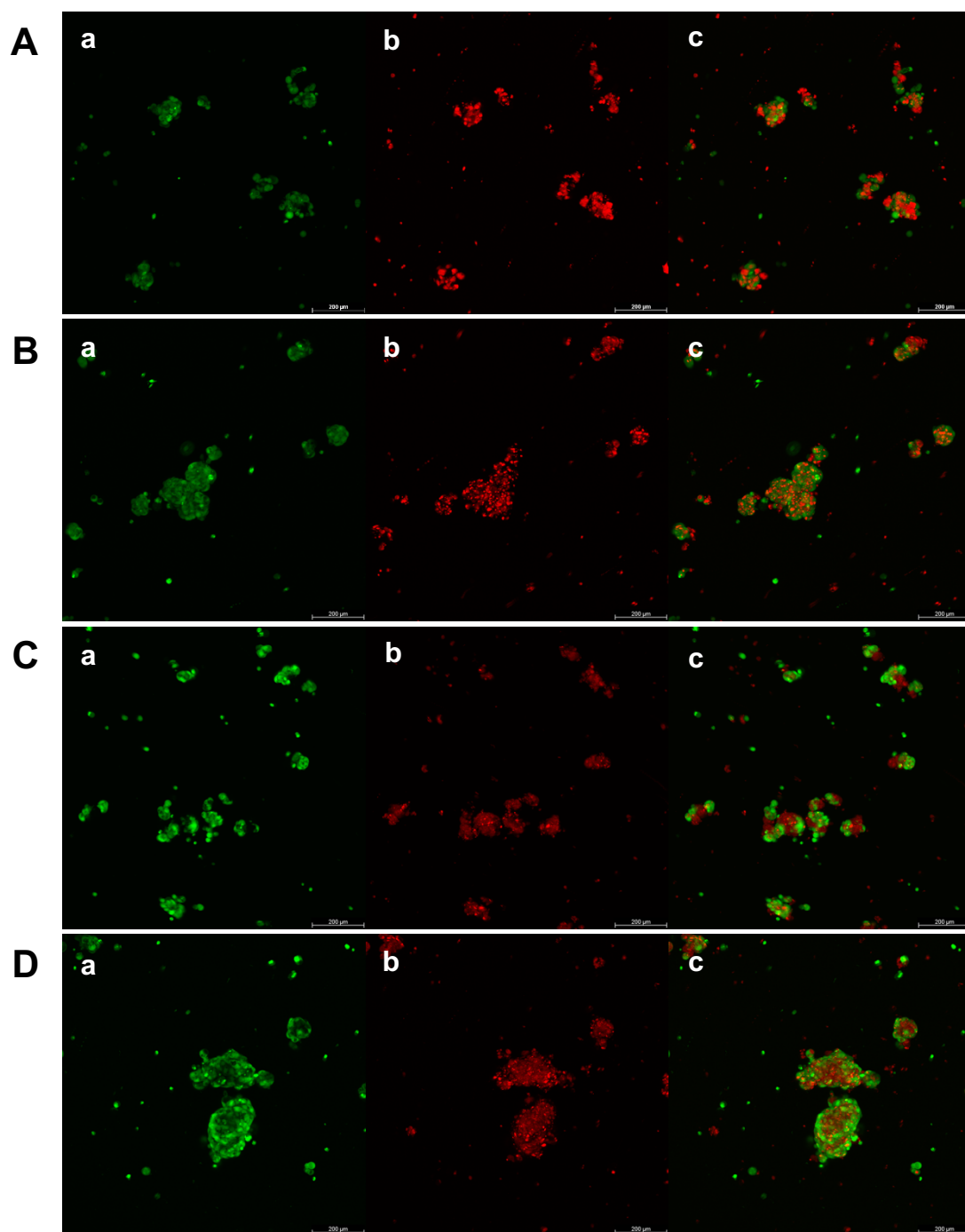


Figura S 2. Imágenes obtenidas en microscopía confocal de las condiciones de co-cultivo 1:1 y 1:2. (A, B) Co-cultivo proporción 1:1 a las 24h (A) y 48h (B). (C, D) Co-cultivo proporción 1:2 a las 24h (C) y 48h (D). (a, b) Fluorescencia verde (a), rojo lejano (b). (c) Fluorescencias fusionadas. CAFs: rojo. FIS525: verde. Espectro excitación/emisión colorante fluorescente verde: 492/517 nm; rojo lejano: 630/660 nm. Magnificación: 10x. Barra de escala: 200 µm.

7.2. APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA INSTITUCIONAL



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comisión de Investigación

APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Esta Comisión tras evaluar en su reunión de 29 de Marzo de 2017 el Proyecto de Investigación:

Título:	Caracterización de la interacción entre célula madre tumoral y microambiente inmune en el cáncer de pulmón no microcítico		
I.P.:	Dr. Carlos Camps Herrero/ Susana Torres	Servicio/Unidad	Oncología

Acuerda respecto a esta documentación:

- Que cumple con los requisitos exigidos por esta Comisión para su realización, por tanto se decide su APROBACIÓN.

Los miembros que evaluaron esta documentación:

	Presente	Ausente	Disculpa
Presidente Dr José Vte Bagan Sebastian	x		
Dr. Carlos Camps Herrero	x		
Dra. Goitzane Marcaida Benito			x
Dr. Carlos Sánchez Juan	X		
Dña. Anna Martí Monros	x		
Dr. Emilio López Alcina	x		
Dr. Rafael Paya Serrano	X		
Dr. Miguel Garcia del Toro	x		
Dr. Jose Luis Sanchez Carazo	x		
Dr. Francisco Ridocci Soriano	X		
Dra. Empar Lurbe Ferrer			x
Dª Amparo Muñoz Izquierdo	x		
Dra. Amparo Esteban Reboll	x		
Dr. Enrique Zapater Latorre	x		
Secretario Dra. Dolores Lopez Alarcón	x		

Lo que comunico a efectos oportunos a jueves, 30 de marzo de 2017:

Fdo. Dr. Jose vte Bagan Sebastian
Presidente de la Comisión de Investigación:

HOSPITAL GENERAL
UNIVERSITARIO
VALENCIA
DIRECCIÓN DE
INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA

7.3. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

A. Indicar el grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Tabla S 1. Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza				X
ODS 2. Hambre cero				X
ODS 3. Salud y bienestar	X			
ODS 4. Educación de calidad				X
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras		X		
ODS 10. Reducción de las desigualdades				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				X
ODS 12. Producción y consumo responsables				X
ODS 13. Acción por el clima				X
ODS 14. Vida submarina				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.	X			

- B. Describir brevemente la alineación del TFG/TFM con los ODS, marcados en la tabla anterior, con un grado alto.

En primer lugar, este TFG contribuye en gran medida al ODS 3 (salud y bienestar) ya que obtener una mejor comprensión de la interacción entre los CAFs y las células tumorales en el nicho tumoral puede ser útil para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. De esta forma, se podrían reducir las enfermedades no transmisibles (meta 3.4).

Por otro lado, este trabajo también contribuye significativamente al ODS 17 (alianzas para lograr objetivos) dado que se ha colaborado con diferentes servicios del Hospital General Universitario de Valencia (Anatomía Patológica, Oncología y Cirugía Torácica) para la adquisición de muestras y datos con fines de investigación. Además, también se ha colaborado con el Dr. Luca Roz del *Dipartimento di Oncologia Sperimentale e Medicina Molecolare* de la *Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano*, quien nos ha prestado la línea celular CAF154-hTERT. Concretamente, se promueve la meta 17.17 (fomento de alianzas público-privadas).

7.4. RECIBO DIGITAL TURNITIN



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: María Isabel Nieto Gimeno
Título del ejercicio: Curso 24_25 GENERAR INFORME TURNITIN TFGTFM ETSEAMN
Título de la entrega: 49624888:TFG_Isa_(Borrador_actualizado)-.pdf
Nombre del archivo: -2b09-49a0-bd18-23abd389bd32_TFG_Isa__Borrador_actualiz...
Tamaño del archivo: 16.71M
Total páginas: 62
Total de palabras: 17,230
Total de caracteres: 96,392
Fecha de entrega: 08-jul.-2024 08:55a. m. (UTC+0200)
Identificador de la entre... 2413799429

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA Y
DEL MEDIO NATURAL



ESTUDIO DEL MICROAMBIENTE TUMORAL:
CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE
CAFS Y CÉLULAS TUMORALES EN MODELOS 3D DE
CÁNCER DE PULMÓN.

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: MARÍA ISABEL NIETO GIMENO

TUTORA: Dra. ELOISA JANTUS LEWINTRE

COTUTORA EXTERNA: Dra. SUSANA TORRES MARTINEZ

Curso Académico: 2023/2024

VALENCIA, 8 DE JULIO DE 2024

Tipo Licencia: Creative Commons

Derechos de autor 2024 Turnitin. Todos los derechos reservados.