

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Caracterización de células madre tumoraes procedentes de cáncer de pulmón no microcítico

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: SANDRA TEJEDOR GASCÓN

TUTOR: RAFAEL SIRERA PÉREZ

COTUTORA: ROSA FARRÀS RIVERA

Curso Académico: 2013-2014

VALENCIA, 1 de Septiembre de 2014

Tipo Licencia: *Creative Commons*

Caracterización de células madre tumorales procedentes de cáncer de pulmón no microcítico

Resumen

El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) representa aproximadamente el 80% de todos los tumores de pulmón y, en su conjunto, la supervivencia global a 5 años es una de las más bajas. Las ganancias, relativamente modestas, obtenidas en el tratamiento del CPNM en los últimos 30 años hacen urgente el diseño de nuevas estrategias terapéuticas. El descubrimiento de una pequeña población de células con propiedades de célula madre (Cancer Stem Cells, CSCs) ha dado lugar al inicio de una nueva área emergente en la investigación en cáncer. Se ha determinado que las CSCs son los primeros componentes del tumor que dan lugar a la progresión tumoral y metástasis. Además de su habilidad para autorrenovarse y diferenciarse, estas células son resistentes a la quimioterapia convencional. Sin embargo, el conocimiento de estas células en cáncer de pulmón es todavía pobre. Con este proyecto proponemos aislar y caracterizar CSCs derivadas de tumores de pacientes con CPNM, y de diferentes líneas celulares derivadas de CPNM. Para abordar esta caracterización analizaremos la expresión de marcadores de superficie y de proteínas implicadas en diferentes rutas de señalización. Los perfiles obtenidos basados en la expresión de proteínas serán esenciales en la comprensión de las redes de señalización oncogénicas activadas en estas células y se utilizarán para identificar firmas moleculares que permitan predecir una respuesta terapéutica.

Abstract

Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for approximately 80% of all lung tumors and overall survival at 5 years is extremely low. Given the relatively modest advances in NSCLC treatment in the last 30 years, it is necessary to design new therapeutic strategies. The discovery of a small population of cells within tumors with “stem cell-like” properties (Cancer Stem Cells, CSCs) has led to a new field of cancer research. It has been determined that the CSCs are the first components of the tumor which lead to tumor progression and metastasis. In addition to their capability for self-renewal and differentiation, these cells are resistant to conventional chemotherapy. However, the knowledge of cancer stem cells in lung cancer is relatively limited. We therefore propose to isolate and characterize CSCs derived from NSCLC and NSCLC-derived cell lines. Protein cell surface markers and the expression of proteins involved in different signaling pathways will be analyzed in order to characterize these cells. The profiles obtained will be essential in the understanding of the activation of oncogenic signaling networks in these cells and will be used to identify molecular signatures that may allow us to predict which therapeutic strategy to adopt.

Palabras clave: Cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), célula madre tumoral (CMT), H1395, H1650, H1993, PC9, citometría de flujo.

Key Words: Non-small lung cancer cells (NSCLC), Cancer Stem Cell (CSC), H1395, H1650, H1993, PC9, flow cytometry.

Alumna: Sandra Tejedor Gascón

Valencia, Septiembre de 2014

Prof. D. Rafael Sirera Pérez

Dña. Rosa Farràs Rivera

Tipo de licencia: *Creative Commons*

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutores, Rafael y Rosa, la oportunidad que me han dado al permitirme trabajar en este proyecto que tanto me ha aportado tanto personal como profesionalmente. Sobre todo, agradecerle a Rosa toda la confianza que ha depositado en mí y todo lo paciente que ha sido con respecto a mi inexperiencia en algunos casos.

Para continuar, me gustaría darles las gracias a todas las personas con las que he trabajado durante estos meses tan intensos. A mis compañeros del laboratorio, Bea, Rita, José Miguel y Eva por hacer los días más llevaderos y ayudarme en todo. Al Servicio de Citometría del CIPF, en el que se encuentran Alicia y Domingo, por su colaboración, dedicación y paciencia para enseñarme e introducirme en ese mundo tan complejo.

No pueden faltar aquí reflejadas mis compis y amigas de la carrera. Juntas hemos pasado momentos inolvidables durante estos cuatro años tan intensos. Nos hemos apoyado mutuamente en los momentos duros, que no han sido pocos y hemos compartido grandes experiencias que han hecho todo ésto mucho más llevadero.

También quiero agradecer a mi familia, mis padres y mi hermana, por todo su apoyo incondicional. A Cuelli, por conseguir que desconecte de todo siempre y a USLAND y a mis chicas RDP, simplemente por ser ellas y estar siempre ahí.

Índice

1.	Introducción	1
1.1.	Definición del cáncer.....	1
1.2.	Proceso de desarrollo de un tumor.....	1
1.2.1.	Proliferación sostenida.....	2
1.2.2.	Evasión de supresores del crecimiento.....	2
1.2.3.	Resistencia a la apoptosis.....	2
1.2.4.	Activación de la inmortalidad replicativa.....	2
1.2.5.	Inducción de la angiogénesis.....	2
1.2.6.	Activación del proceso de invasión y metástasis	3
1.2.7.	Inestabilidad genómica	3
1.2.8.	Inflamación.....	4
1.2.9.	Reprogramación del metabolismo energético.....	4
1.2.10.	Evasión del sistema inmune	4
1.3.	Heterogeneidad tumoral.....	5
1.4.	Células madre tumorales	6
1.4.1.	Historia temprana de las células madre tumorales (CMTs)	6
1.4.2.	Definición de las células madre tumorales	7
1.4.3.	La teoría de las Células Madre Tumorales	8
1.4.4.	Origen de las células madre tumorales.....	8
1.4.5.	Implicación del modelo de las células madre tumorales para el diseño y la evaluación de los tratamientos antitumorales.	9
1.5.	Incidencia del cáncer de pulmón y clasificación.	9
1.6.	Células madre tumorales de pulmón	12
1.6.1.	Evidencia de la existencia de las células madre tumorales de pulmón	12
1.6.2.	Caracterización fenotípica de las células madre tumorales de pulmón	13
1.6.3.	Caracterización molecular de las células madre tumorales de pulmón	14
1.7.	Rutas de señalización implicadas en cáncer de pulmón	15
1.7.1.	Rutas de señalización Wnt	16
1.7.2.	Ruta de señalización Hh	16
1.7.3.	Ruta de señalización Notch	16
2.	Objetivos	17
3.	Material y métodos.....	18
3.1.	Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	18

3.1.1. Formación de esferas tumorales <i>in vitro</i>	18
3.2. Muestras celulares procedentes de tumor extirpado de paciente.....	19
3.3. Expresión de marcadores de superficie de célula madre en líneas celulares tumorales procedentes de CPNM	20
3.4. Aislamiento de CMTs procedentes de tumores de pacientes con CPNM usando marcadores específicos y citometría de flujo	21
3.5. Aislamiento de poblaciones celulares mediante un citómetro separador de células de alta velocidad	21
3.6. Expresión de genes específicos de célula madre y proteínas relacionadas en líneas celulares tumorales procedentes CPNM.....	22
3.6.1. Preparación de un extracto proteico	22
3.6.2. Electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida	22
3.6.3. Transferencia proteica	22
3.6.4. Western Blot	23
4. Resultados y discusión de los resultados	25
4.1. Cinética de proliferación de líneas celulares tumorales procedentes de cáncer de pulmón no microcítico en distintas condiciones de cultivo	25
4.1.1. Crecimiento en condiciones de adherencia	25
4.1.2. Crecimiento en condiciones de baja adherencia	26
4.2. Caracterización de las líneas celulares tumorales mediante análisis de expresión de proteínas de superficie.....	28
4.3. Aislamiento de poblaciones celulares.....	29
4.3.1. La expresión de CD326 determina la capacidad de formar esferas tumorales	30
4.3.2. La expresión de E-Cadherina no determina la capacidad de formar esferas tumorales	31
4.4. Cinética de proliferación de células procedentes de muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico	32
4.5. Comparación de la expresión de proteínas de superficie en muestras de tejido sano y tejido tumoral mediante citometría de flujo	34
4.6. Caracterización de las líneas celulares tumorales mediante análisis de expresión de proteínas por ensayos Western Blot.....	37
4.6.1. El patrón de fragmentación de EpCAM varía entre las líneas celulares y condiciones de cultivo	37
4.6.2. La expresión de proteínas CiclinaA2 varía en las distintas líneas celulares y condiciones de cultivo.....	38
4.6.3. Las líneas celulares tumorales procedentes de adenocarcinoma de pulmón expresan marcadores de pluripotencia	38

4.6.4. El citoesqueleto se encuentra alterado al crecer las células en distintas condiciones de cultivo	39
5. Conclusiones.....	40
6. Referencias bibliográficas	41
8. Bibliografía complementaria	47
9. Anexos	48
9.1. Anexo I.....	48
9.2. Anexo II.....	51

Índice de tablas y figuras

Tabla 3.1. Panel de anticuerpos y sus correspondientes isotipos utilizados para el análisis de marcadores de superficie en líneas celulares de baja adherencia.

Tabla 3.2. Panel de anticuerpos y sus correspondientes isotipos utilizados para el análisis de marcadores de superficie en células procedentes de tumor extirpado de pacientes con CPNM.

Tabla 3.3. Anticuerpos utilizados para el análisis de expresión proteica en las distintas líneas celulares.

Tabla 4.4. Expresión de los marcadores de superficie CD326, E-Cadherina, CD90, CD166, ABCG2, CD34, CD44, CD133/1 y CD133/2 en las líneas celulares H1650 y PC9 en distintas condiciones de cultivo.

Tabla 4.5. Expresión de los marcadores de superficie CD326, E-Cadherina, CD90, CD166, ABCG2, CD34, CD44, CD133/1 y CD133/2 en las líneas celulares H1395 y H1993 en distintas condiciones de cultivo.

Tabla 4.6. Marcadores de superficie expresados en muestras de los tejidos sano y tumoral procedentes de distintos pacientes con CPNM.

Tabla 4.7. Marcadores de superficie expresados en muestras de los tejidos sano y tumoral del paciente 303 y de esferas tumorales formadas por células del mismo paciente una vez mantenidas en cultivo

Figura 1.1. Distintos tipos celulares presentes en el microambiente de un tumor.

Figura 1.2. Mutaciones oncogénicas más frecuentes encontradas en 139 líneas celulares procedentes de NSCLC, subtipo adenocarcinoma.

Figura 1.3. Localización de los distintos tipos celulares en las vías respiratorias y de los distintos subtipos de cáncer de pulmón.

Figura 4.4. Cinética de crecimiento de las líneas celulares procedentes de CPNM

Figura 4.5. Cinética de crecimiento de las líneas celulares procedentes de CPNM.

Figura 4.6. Expresión diferencial de marcadores de superficie celulares para la separación de subpoblaciones mediante citometría de separación de células de alta velocidad.

Figura 4.7. Crecimiento de la línea celular H1650 según la expresión o ausencia de CD326 y CD166. Aislamiento de tres subpoblaciones celulares en base a la presencia, ausencia o coexpresión de los marcadores de superficie CD326 y CD166 en la línea celular H1650

Figura 4.8. Crecimiento de la línea celular H1993 según la expresión o la ausencia de E-Cadherina.

Figura 4.9. Crecimiento de las células procedentes de muestras de tumores procedentes de los pacientes 299, 300 y 301 con CPNM.

Figura 4.10. Crecimiento de las células procedentes de muestras de tumores procedentes de los pacientes 302, 303 y 304 con CPNM

Figura 4.11. Expresión de CD326 (EpCAM), CcnA2, Sox2, Nanog, Tubulina, GAPDH y Actina en las cuatro líneas celulares tumorales procedentes de CPNM (H1395, H1993, H1650 y PC9) en distintas condiciones de cultivo detectada mediante ensayos Western Blot.

1. Introducción

1.1. Definición del cáncer

El cáncer se define tradicionalmente como un conjunto de células que proliferan de manera descontrolada, formando un tumor. Además, estas células con crecimiento anormal pueden invadir otras partes del cuerpo, proceso conocido como metástasis. Hoy en día, se entiende el término cáncer no sólo como una enfermedad, sino como un conjunto de patologías, ya que existen diversos tipos de tumores y éstos tienen unas propiedades moleculares específicas que los diferencian. El factor común de todos ellos es que los tumores constituyen un tejido complejo, compuesto por múltiples tipos celulares que participan en interacciones heterotípicas entre ellos. Por ejemplo, Hanahan y Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000) manifestaron la participación activa de las células normales que forman el estroma asociado al tumor en el desarrollo tumoral. También han descrito la expresión de ciertas capacidades distintivas de los mismos que les permiten el crecimiento y la diseminación metastásica, conocidas como "Hallmarks of Cancer". Por lo tanto, actualmente se sabe que los tumores son más que masas aisladas de células cancerosas con capacidad de proliferar y que su definición debe incluir la contribución del microambiente tumoral a la tumorigenesis.

1.2. Proceso de desarrollo de un tumor

Durante el desarrollo de un tumor, el genoma celular sufre una serie de alteraciones genéticas que llevan a la transformación tumoral maligna. Estas alteraciones genómicas se acumulan a lo largo de los años o pueden tener un factor hereditario, pudiendo ser favorecidas por la exposición a agentes mutagénicos, como el humo del tabaco (Zhong et al., 2011). Este modelo de desarrollo tumoral explica fenómenos como que en muchos casos la incidencia del cáncer sea mayor con la edad o si posees factores de riesgo heredados; así como que el desarrollo temprano de cáncer de pulmón se produzca en pacientes con exposición a los agentes carcinógenos presentes en el tabaco debido al incremento de alteraciones genéticas que provocan estos compuestos.

Desde el punto de vista de la biología celular, el proceso de desarrollo de un tumor debe incluir múltiples pasos clave que lleven al fenotipo maligno de la célula. Hanahan y Weinberg describieron en el año 2000 los seis sellos distintivos del cáncer o los seis "hallmarks" del cáncer (Hanahan and Weinberg, 2000) y, en el año 2011 se extendieron a diez sellos (Hanahan and Weinberg, 2011) gracias a los progresos llevados a cabo en la investigación de la biología molecular del cáncer durante ese periodo de tiempo.

Los diez sellos del cáncer incluyen la señalización celular que permite la proliferación sostenida, la evasión de supresores del crecimiento, la resistencia a la apoptosis, la activación de la inmortalidad replicativa, la inducción de la angiogénesis y la activación de la invasión y metástasis. Las dos propiedades más novedosas comprenden la reprogramación del metabolismo energético y la evasión del sistema inmune. Subyacente a estas propiedades se

encuentra la inestabilidad genómica, que permite generar la diversidad genética, y la inflamación.

1.2.1. Proliferación sostenida

En su estado normal, los diferentes tejidos controlan la producción y liberación de señales promotoras de crecimiento y división celular, asegurando que el número de células sea estable. Manteniendo dicha homeostasis, los tejidos son capaces de sostener la arquitectura y el correcto funcionamiento de los mismos. Estas señales se transmiten principalmente por factores de crecimiento que se unen a receptores presentes en la superficie celular y que, normalmente, presentan como mínimo un dominio intracelular del tipo tirosina quinasa. Sin embargo, las células cancerosas presentan una pérdida de regulación en este tipo de señales transmitidas por los factores de crecimiento, siendo capaces de inducir y sostener señales estimuladoras de crecimiento y proliferación de manera descontrolada.

1.2.2. Evasión de supresores del crecimiento

Además de mantener una proliferación continua mediante la pérdida de regulación de rutas de señalización en las que participan los factores de crecimiento, las células cancerosas también son capaces de evadir programas de señalización que regulan negativamente la proliferación celular. Muchos de estos programas dependen de la acción de los genes supresores de tumores, que se encuentran inactivados en neoplasias. Los dos genes supresores de tumores más estudiados codifican para las proteínas Rb (*retinoblastoma-associated*) y TP-53, que operan como nodos centrales en dos circuitos regulatorios clave que son complementarios y que guían las decisiones de las células, conduciéndolas hacia la proliferación o a la activación de programas de senescencia o apoptosis.

1.2.3. Resistencia a la apoptosis

La apoptosis celular se desencadena en respuesta a distintos estreses fisiológicos que las células cancerosas sufren durante el proceso de tumorigénesis o como resultado de la terapia aplicada contra el cáncer. Entre estos estreses inductores de la apoptosis, se encuentran los desequilibrios en la señalización que resultan de unos altos niveles de señalización oncogénica y daño al DNA asociado con la hiperproliferación. Un ejemplo que determina este sello del cáncer es el de los genes P53 o Bcl2, que se encuentran alterados en células cancerosas, dando lugar a la resistencia a la muerte celular programada.

1.2.4. Activación de la inmortalidad replicativa

La mayoría de los linajes de células normales únicamente son capaces de llevar a cabo un número limitado de ciclos celulares de crecimiento y división. Este fenómeno se ha asociado a la senescencia, proceso en el que la célula adquiere un estado en el que no prolifera pero sí es viable, y la crisis, que comprende la muerte celular. Sin embargo, las células cancerosas requieren un potencial replicativo ilimitado para generar tumores macroscópicos. Esta capacidad se ha asociado principalmente a la acción de la telomerasa, que se encuentra sobrepresada en tumores en la mayoría de los casos y les permite crecer de manera descontrolada mediante la evasión del desencadenamiento de la apoptosis o la senescencia.

1.2.5. Inducción de la angiogénesis

Para mantener un funcionamiento correcto, tanto las células normales como las tumorales requieren un sistema que les permita tanto un aporte de nutrientes y oxígeno como evacuar

los desechos metabólicos y el dióxido de carbono. Esta necesidad se suple a través del sistema de circulación sanguínea mediante difusión. Sin embargo, los tumores son capaces de liberar el factor de crecimiento endotelial vascular (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), principal responsable de inducir el proceso de angiogénesis, que permite la neovascularización o formación de nuevos vasos sanguíneos. Cabe destacar que diversos estudios han demostrado que la angiogénesis no sólo tiene lugar cuando el tumor es macroscópico, sino que también se ha asociado a estadios tempranos, en la fase premaligna microscópica de la progresión neoplásica (Raica et al, 2009; Hanahan and Folkman, 1996), haciendo este hallmark todavía más relevante en el proceso de desarrollo de un tumor.

1.2.6. Activación del proceso de invasión y metástasis

El proceso de invasión y metástasis se puede esquematizar en una secuencia de pasos que implican una serie de cambios biológicos. Se divide en un primer paso de invasión local o migración, seguido por la intravasación de las células cancerosas a los vasos linfáticos y sanguíneos próximos. Tras viajar por los vasos sanguíneos y linfáticos, las células escapan de la circulación y se introducen en el parénquima del tejido distal (extravasación) y, si se dan las condiciones adecuadas, se establece un tumor con crecimiento continuo en la zona distal a la del tumor primario. Durante este proceso, las células cancerosas sufren una serie de modificaciones, tanto en su forma como en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular.

Una de las proteínas clave en este proceso es la E-Cadherina, una molécula de adhesión clave en las interacciones célula-célula. Un aumento en la expresión de E-Cadherina se traduce en el mantenimiento de la quiescencia de las células epiteliales, por lo que es un antagonista de la invasión y la metástasis. Por otro lado, la reducción de expresión de dicha proteína potencia los fenotipos que permiten la invasión y metástasis (Berx and van Roy, 2009; Cavallaro and Christofori, 2004).

1.2.7. Inestabilidad genómica

La adquisición de los signos distintivos del cáncer nombrados depende en gran parte de una sucesión de alteraciones en los genomas de las células neoplásicas (Hanahan and Weinberg, 2011). El ratio de mutaciones aumenta en las células cancerosas con respecto a las células sanas debido a defectos que afectan a varios componentes de la maquinaria de mantenimiento del DNA, como genes cuyos productos están involucrados en (1) detectar un daño en el DNA y activar la maquinaria de reparación, (2) en reparar el DNA de forma directa e (3) inactivando o interceptando moléculas mutagénicas antes de que puedan dañar el DNA (Negrini et al., 2010; Ciccia and Elledge, 2010; Jackson and Bartek, 2009; Kastan, 2008; Harper and Helledge 2007; Friedberg et al., 2006). Estos fenómenos pueden deberse a mutaciones que alteran la expresión de dichos genes, inhibiéndolos, o a cambios epigenéticos, que afectan a la regulación de la expresión y que afectan negativamente a la misma.

Aunque las variaciones genómicas cambien entre los distintos tipos de tumores, la inestabilidad genética se da en todos ellos. Los genotipos resultantes de dichos defectos en el genoma (mutaciones y variaciones epigenéticas) son selectivamente ventajosos y por lo tanto beneficiosos para la progresión tumoral, ya que favorece la aceleración del proceso neoplásico y permite la adquisición de otros signos distintivos del cáncer tratados anteriormente.

1.2.8. Inflamación

El sistema inmune responde ante cualquier amenaza para la homeostasis del organismo. En el caso de un tumor emergente, éste actúa para erradicar el tumor. Sin embargo, la respuesta inflamatoria resultante, llevada a cabo mayoritariamente por parte del sistema inmune innato, tiene un efecto positivo en la tumorigénesis mediante la liberación por parte de las células cancerosas de moléculas bioactivas al microambiente tumoral. Estas moléculas incluyen factores de crecimiento y de supervivencia que sostienen la proliferación celular y limitan la muerte celular, respectivamente, enzimas modificadoras de la matriz extracelular que facilitan la angiogénesis, invasión y metástasis, factores proangiogénicos y señales que llevan a la activación de la transición epitelial-mesenquimal (TEM) y otros programas celulares que facilitan la activación de otras capacidades distintivas del desarrollo de tumores (DeNardo et al., 2010; Grivennikov et al., 2010; Qian and Pollard, 2010; Colotta et al., 2009).

1.2.9. Reprogramación del metabolismo energético

La proliferación celular crónica y descontrolada de las células cancerosas no sólo está causada por una desregulación en el control de la proliferación celular, sino también por un ajuste en el metabolismo energético que permite la mayor tasa de crecimiento y división que tiene lugar en este tipo de células en comparación con las células sanas. Las células cancerosas son capaces de reprogramar su metabolismo y la producción de energía incluso en presencia de oxígeno, favoreciendo la glicólisis y limitando el transporte de piruvato a la mitocondria. Este fenómeno se denomina “glicólisis aeróbica” (Wargurg, 1930, 1956a, 1956b). Sin embargo, el rendimiento de ATP es mucho menor en comparación con los niveles del mismo obtenidos en la fosforilación mitocondrial oxidativa, y las células cancerosas deben compensar este déficit mediante la sobreexpresión de transportadores de glucosa, como GLUT1, que aumentan el flujo de glucosa al citoplasma (Jones and Thomson, 2009; De Berardinis et al., 2008; Hsu and Sabatini, 2008).

Este tipo de metabolismo provoca que los intermediarios formados durante la glicólisis formen parte de rutas anabólicas, como aquellas en las que se sintetizan nucleósidos y aminoácidos. Esto facilita la biosíntesis de macromoléculas y orgánulos, necesarios para la formación de nuevas células (Vander Heiden et al., 2009; Potter, 1958).

El hecho de que las células cancerosas favorezcan la glicólisis se ha asociado con la activación de oncogenes, como Ras o Myc, con genes supresores de tumores mutados, como TP53, y con condiciones de hipoxia. Estos factores pueden contribuir al aumento de la expresión de factores de transcripción inducible por hipoxia como HIF1 α y HIF2 α , que favorecen la glicólisis (Semenza, 2010; Kroemer and Pouyssegur, 2008).

1.2.10. Evasión del sistema inmune

Según la teoría de la vigilancia inmunológica, las células y tejidos se encuentran monitorizados por el sistema inmune constantemente. Esta vigilancia es responsable de reconocer y eliminar la mayor parte de las células cancerosas emergentes, funcionando como una barrera e impidiendo la formación y progresión de un tumor. Acorde con esta teoría, los tumores sólidos que logran evadir la detección por parte del sistema inmune o que consiguen limitar el alcance el mismo consiguen proliferar. Un ejemplo de ello es que las células cancerosas podrían paralizar las células natural killers y los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ mediante la secreción de

factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) u otros factores inmunosupresores (Yang et al., 2010; Shields et al., 2010).

1.3. Heterogeneidad tumoral

Aunque los tumores se originen a partir de una única célula transformada, las células presentes en un tumor presentan distintos fenotipos. De hecho, se ha demostrado la existencia de diversos tipos celulares en un tumor, incluyendo desde células cancerosas hasta células normales infiltradas, como células endoteliales o pericitos, que contribuyen al crecimiento del mismo, tal y como se muestra en la Figura 1 (Hanahan and Weinberg, 2011). Se piensa que la heterogeneidad celular presente en los tumores puede ser atribuida a la inestabilidad genómica y a la selección de células con capacidad de adaptarse al microambiente tumoral (Heng et al., 2006). Debido a estos nuevos conocimientos, los tumores son reconocidos en la actualidad como órganos, cuya complejidad es similar a la de un tejido sano. Como consecuencia, se ha hecho necesario el estudio tanto de las células presentes en un tumor de forma individual como del microambiente tumoral que se forma durante el proceso de tumorigénesis descrito anteriormente.

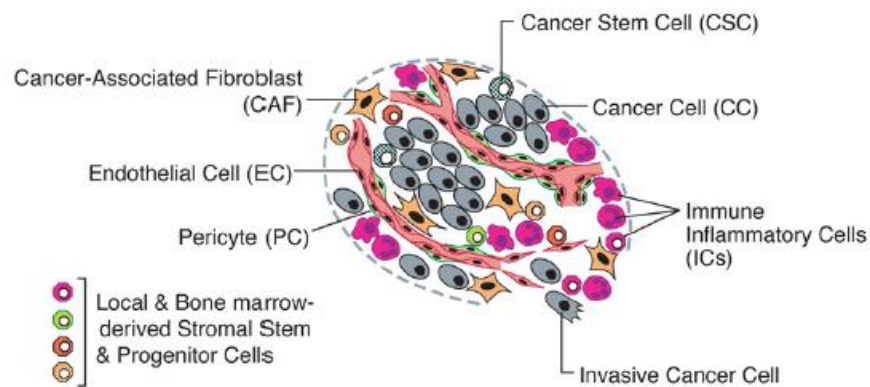


Figura 1. Distintos tipos celulares presentes en el microambiente de un tumor. Tanto el parénquima como el estroma de un tumor contienen distintos tipos y subtipos celulares que, de forma colectiva, permiten el crecimiento y la progresión tumoral. El parénquima del tumor comprende las células epiteliales neoplásicas; mientras las células mesenquimales forman el estroma asociado al tumor. Además, se observa la presencia de subpoblaciones de células del sistema inmune inflamatorias con distintas funciones, tanto algunas que favorecen el crecimiento del tumor como otras que favorecen su desaparición.

La presencia de distintas subpoblaciones en un tumor con distintas capacidades, derivadas de combinaciones de alteraciones genéticas y epigenéticas, determina la predisposición de cada una para contribuir en el crecimiento, la supervivencia, la capacidad metastásica y la dominancia en el microambiente tumoral. Además, la existencia de una subpoblación de células en el tumor con propiedades de célula madre (Figura 1) representa una nueva dimensión de complejidad en la heterogeneidad intratumoral y abre un nuevo campo de investigación dirigido al conocimiento de dicha subpoblación de células para tratar de dirigir terapias contra ellas e impedir el relapso de un tumor tras el tratamiento.

1.4. Células madre tumorales

1.4.1. Historia temprana de las células madre tumorales (CMTs)

La existencia de células madre hematopoyéticas normales se sugirió por primera vez en estudios realizados por Till & McCulloch (1961). El experimento consistió en privar a ratones receptores del sistema sanguíneo mediante radiación ionizante para, posteriormente, inyectarles células de médula ósea de donante en las venas de la cola para comprobar cuántas células son necesarias para restaurar la producción sanguínea. Se observaron colonias clonales derivadas de células sanguíneas en el bazo de los ratones receptores que contenían tanto plaquetas como leucocitos y eritrocitos. Cuando clones individuales de dichas colonias se inyectaron en receptores secundarios, sólo algunos dieron lugar a colonias que contenían células de distintos linajes, confirmando la existencia de células madre hematopoyéticas (Hematopoietic stem cells, HSC).

Posteriormente, se demostró que sólo una minoría de células sanguíneas malignas era capaz de formar colonias en el bazo de un ratón (Bruce & Van Der Gaag, 1963). Acorde con estos resultados, otros estudios mostraron que sólo un reducido porcentaje de células tumorales procedentes de tumores de origen epitelial podían producir colonias *in vitro* (Hamburger and Salmon, 1977).

No fue hasta la década de los noventa cuando estudios pioneros propusieron la posibilidad de aislar HSCs primitivas en leucemia mieloide aguda (acute myeloid leukemia, AML) (Bonnet & Dick 1997, Lapidot et al., 1994). Los experimentos realizados consistieron en utilizar como modelo ratones con inmunodeficiencia severa (Severe Combined Immunodeficiency Disease, SCID) para estudiar el potencial de proliferación y auto-renovación de células humanas procedentes de AML. Para ello, emplearon una técnica de aislamiento basada en el fenotipo que consiste en el marcaje de proteínas de superficie celulares mediante fluorescencia. Esta técnica se sigue utilizando en la actualidad para aislar tanto células madre normales como cancerosas. En dicho estudio se obtuvo que sólo un grupo de células cancerosas que expresaban o no unos antígenos de superficie determinados, concretamente las células $CD34^+CD38^-$, eran las únicas capaces de formar tumores cuando se inyectaba en los ratones inmunodeficientes y que los tumores formados reflejaban los efectos de las mutaciones oncogénicas del tumor original. Esta subpoblación de células se denominó células madre leucémicas (Leukaemic Stem Cells, LSC).

El primer estudio realizado en tumores sólidos utilizando los métodos anteriores fue en el año 2003 (Al-Hajj et al., 2003), cuando se analizó la presencia de una expresión heterogénea de antígenos de superficie en cáncer de mama. En él, se utilizó la citometría de flujo para separar dos poblaciones celulares, asumiendo para la identificación que las células madre tumorales mantienen la expresión de marcadores de las células madre normales. Posteriormente, las poblaciones aisladas se inyectaron en modelos de ratón NOD/SCID (diabéticos no obesos con inmunodeficiencia severa combinada). Los resultados mostraron que sólo la población de células con el perfil $CD44^+CD24^{low/-}$ eran capaces de formar tumores. Ensayos similares sirvieron para extender el modelo de célula madre tumorigénica o tumoral al identificar subpoblaciones de células con capacidad de iniciar la progresión tumoral en otros tumores

sólidos, como en cáncer cerebral (Singh et al., 2003), cáncer de próstata (Collins et al., 2005), cáncer colorrectal (O'Brien et al., 2007) y cáncer de pulmón (Eramo et al., 2008).

1.4.2. Definición de las células madre tumorales

Muchos tejidos humanos, como la piel o el tejido epitelial gastrointestinal (boca, faringe, esófago, estómago,..), respiratorio (laringe, tráquea, bronquios, pulmones) y reproductivo y genitourinario (pecho, ovario, vagina, útero,..) se encuentran en una renovación rápida y continua mediante un proceso altamente regulado; mientras que otros tejidos tradicionalmente considerados más estables, como cerebro o músculo, sufren una renovación mínima. En condiciones fisiológicas, este proceso se sostiene por una minoría de células con gran potencial de expansión, las células madre. Estas células se definen por tres propiedades principales. En primer lugar, la capacidad de **diferenciación**, que se refiere a la habilidad de dar lugar a una progenie de células heterogéneas. Estas células son capaces de especializarse y diversificarse según un modelo jerárquico. La segunda propiedad que las define es la **auto-renovación** o capacidad de formar una nueva célula madre con el mismo potencial de proliferación, expansión y diferenciación, manteniendo la reserva de un número concreto de células madre en el tejido. Por último, presentan un **control homeostático** mediante la habilidad de modular y equilibrar los procesos de diferenciación y auto-renovación según los estímulos ambientales y las restricciones genéticas (Dalerba et al., 2006).

Del mismo modo que los tejidos sanos equivalentes, los tumores están compuestos por poblaciones heterogéneas de células que difieren en su estado de diferenciación y se organizan de manera jerárquica. Este hecho sugiere que los tumores no emergen a partir de expansiones clonales, sino que podrían estar sustentados por una población de células madre tumorales que posee la capacidad de auto-renovación y que sufren una diferenciación anormal (Al-Hajj et al., 2003).

Los métodos utilizados para el aislamiento de células madre tumorales son cruciales para la definición de dichas células, ya que para abordar el conocimiento de las mismas se han utilizado aproximaciones puramente empíricas en base a un ensayo de auto-renovación *in vitro* e *in vivo*. Por una parte, en los ensayos *in vitro* se evalúa la capacidad de crecer a las células aisladas y purificadas procedentes de tejidos tumorales como esferas en cultivos de baja adherencia. Sin embargo, actualmente el ensayo que muestra una mayor fiabilidad para identificar CMTs *in vivo* es evaluar la capacidad de las mismas de formar tumores en huéspedes inmunodeficientes, y que éstas sean capaces de generar el tumor en pasajes sucesivos en distintos hospedadores (Alamgeer et al., 2013). A partir de dichos estudios se deducen tres puntos clave que definen la existencia de las CMTs (Dalerba et al., 2006). En primer lugar, sólo una minoría de células cancerosas de un tumor tiene potencial tumorigénico cuando se trasplanta en ratones inmunodeficientes. En segundo lugar, esta subpoblación de células se caracteriza por un perfil distintivo de marcadores de superficie y pueden ser aisladas de manera reproducible de las células que no presentan capacidad tumorigénica mediante citometría de flujo u otros métodos que permitan la inmunoselección de las mismas. Por último, los tumores que se forman a partir de dichas células con potencial tumorigénico contienen poblaciones de células heterogéneas, por lo que son capaces de reproducir el fenotipo del tumor parental.

Por lo tanto, las CMTs, al igual que las células madre normales, se caracterizan por su capacidad de auto-renovación, diferenciación en múltiples tipos celulares, pero no poseen la capacidad de controlar el ratio de proliferación, conduciendo a la proliferación continua característica de los tumores. Según esta hipótesis, denominada la **Teoría de las Células Madre Tumoraes**, las CMTs serían las células del tumor con potencial para iniciar y asegurar el crecimiento del mismo.

1.4.3. La teoría de las Células Madre Tumoraes

Se han descrito múltiples oncogenes y genes supresores de tumores implicados en la iniciación y progresión tumoral. Acorde con las alteraciones que se producen en este tipo de genes, tanto a nivel de secuencia de ADN como de regulación de la expresión génica (epigenética) se han propuesto dos modelos posibles sobre la proliferación celular de un tumor. El **Modelo Estocástico** propone que es una célula somática la que presenta una mutación que desencadena un proceso de división no controlada y provoca que se acumulen nuevas alteraciones genéticas hasta alcanzar el estado de célula tumoral (Bosch et al., 2007). Por lo tanto, cada célula del tumor comparte inicialmente las mismas características debido a su origen clonal, y puede formar nuevos tumores primarios. En el **Modelo Jerárquico o Teoría de las Células Madre Tumoraes (CMT)**, los tumores están organizados jerárquicamente de manera similar al tejido del que provienen. De esta forma, se propone que sólo una pequeña subpoblación del tumor, las CMTs, es capaz de iniciar y mantener el crecimiento del tumor (Bosch et al., 2007). La presencia de las CMTs puede explicar la heterogeneidad celular presente en los procesos neoplásicos a partir de la diferenciación celular de las células hijas mediante división asimétrica de las CMTs y la capacidad de auto-renovación de las mismas. Según esta teoría, las células hijas no son capaces de generar un nuevo tumor primario, ya que esta función es propia de las células con propiedades de célula madre, las CMTs. Esto implica que en un tumor con una serie de alteraciones genéticas concretas, hay células con distinto potencial de malignidad.

La Teoría de las Células Madre Tumoraes es la más aceptada en la actualidad debido a los múltiples estudios que se han realizado tanto en tumores difusos como en tumores sólidos, donde se han encontrado células con propiedades de célula madre. Por ejemplo, en un estudio realizado por Cho y colaboradores (2008) se logró disociar tumores de mama y separar poblaciones celulares según la expresión de los marcadores de superficie Thy1, CD24 y CD45 por citometría de flujo para posteriormente inyectarlas en un modelo murino. Los resultados mostraron que, en seis tumores de siete examinados, la población de células cancerosas con el perfil de expresión Thy1⁺CD24⁺, que constituían del 1-4% de las células totales, estaba enriquecida en células capaces de generar nuevos tumores en comparación con las células que no presentan dicho perfil. Además, los tumores resultantes presentaban una diversidad fenotípica similar a la del tumor original y se comportaron de la misma forma al realizar pases en otros receptores. Sin embargo, qué células son las que sufren la transformación maligna y cómo tiene lugar dicha transformación continúa siendo una incógnita para la mayoría de cánceres humanos.

1.4.4. Origen de las células madre tumorales.

A pesar de que la caracterización de las células madre tumorales aporta más datos a medida que transcurre el tiempo, aún no se ha definido con claridad cuál es el origen de esta

subpoblación de células con propiedades de células madre presentes en los tejidos neoplásicos. Sin embargo, se han propuesto distintas teorías para tratar de explicarlo. Por una parte, debido a que comparten características y expresan antígenos iguales a los de las células madre normales, se ha propuesto la posibilidad de que las CMTs deriven de ellas. No obstante, hay otras opciones a considerar, como la desdiferenciación de células progenitoras. Según este modelo, las células progenitoras serían dianas de mutaciones durante el proceso del desarrollo tumoral. Mediante dichas alteraciones genéticas adquiridas, estas células se convertirían en los reservorios de célula madre en el tumor mediante un proceso de desdiferenciación espontáneo (Pattabiraman and Weinberg, 2014).

1.4.5. Implicación del modelo de las células madre tumorales para el diseño y la evaluación de los tratamientos antitumorales.

Algunas propiedades características de las CMTs permiten un mejor entendimiento de la ineficacia de los tratamientos actuales en algunas ocasiones. Por una parte, las CMTs se encuentran en un número reducido y con un índice de proliferación menor (nivel incrementado de quiescencia) que el resto de células del tumor a causa de la adquisición de propiedades de célula mesenquimal. Debido a que los tratamientos convencionales atacan a las células que se encuentran en división, esta característica conferiría a las CMTs una ventaja y serían más resistentes a la quimioterapia y radioterapia. Otra causa de la quimioresistencia descrita en las células madre normales es la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas y de transportadores ABC (ATP-binding cassette). Estos transportadores son capaces de inducir la expulsión de fármacos de las células cuando éstas son tratadas con el colorante Hoechst 33342. Esta población se conoce como "Side Population" y puede ser aislada mediante separación de células activadas por fluorescencia (Fluorescence-activated cell sorting, FACS) Por otra parte, estas células con propiedades de célula madre tienen un gran potencial metastásico.

Adicionalmente, se cree que las CMTs forman una pequeña población especializada en el tumor responsable de la recurrencia de la enfermedad tras la terapia, ya sea ésta local y/o sistémica. En concreto, aunque un 20% de los casos de cáncer de pulmón no microcítico son operables *a priori*, el ratio de recurrencia sigue siendo muy alto (30-50%) (Kelsey et al., 2009). Esto sería posible debido a la capacidad regenerativa de las CMTs y la resistencia de las mismas a los tratamientos convencionales.

Por lo tanto, hay una posible implicación en el crecimiento tumoral, la metástasis y el relapso del tumor en relación con la supervivencia que muestran los pacientes de cáncer. La correcta caracterización de estas células y la elucidación del origen de las mismas es necesaria para descubrir dianas moleculares más específicas y efectivas para la lucha contra el cáncer y llevar a cabo el diseño de nuevas terapias más eficaces que eviten el relapso de la enfermedad, lo cual es de gran importancia en el tratamiento del cáncer.

1.5. Incidencia del cáncer de pulmón y clasificación.

Los pulmones embrionarios se desarrollan a partir de una pequeña población de células madre que se originan en el surco laringo-traqueal aproximadamente a los 26 días de gestación. Esto conduce a la morfogénesis de la estructura ramificada del epitelio alveolar y bronquial (Warburton et al., 2004). A diferencia de otros tejidos nombrados anteriormente, los

pulmones muestran una tasa de renovación celular muy baja. Por lo tanto, el número de células con capacidad de división es mínima en condiciones normales, y la probabilidad de que sufran mutaciones que lleven al desarrollo de un tumor también lo es. Sin embargo, El cáncer de pulmón se encuentra entre los cuatro tipos de cáncer más prevalentes en la sociedad actual. Concretamente, de la totalidad de tumores malignos detectados a nivel mundial, el 13% (1.824.701 casos) fueron cánceres de pulmón en el año 2012 (Siegel et al., 2012).

Entre las principales causas de este tipo de cáncer se encuentra el tabaco, responsable de un 90% de los casos de cáncer de pulmón (Zhong et al., 2011). Otros causantes son la exposición a otros carcinógenos como a Radón (Rn), a ambientes muy contaminados o a radiación, aunque el desencadenante puede ser genético en algunos casos. También se ha asociado con el padecimiento de algunas enfermedades como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) o la tuberculosis. Se ha propuesto que la reparación necesaria para la homeostasis del tejido y el aumento del ratio de mitosis respectivo aumenta la probabilidad de que hayan mutaciones carcinogénicas que favorezcan el desarrollo del tumor (Peacock and Watkins, 2008; Dong et al., 2009). Por otra parte, también se ha demostrado una relación entre la inflamación y la carcinogénesis. Por ejemplo, los agentes carcinógenos presentes en los cigarrillos producen una respuesta inflamatoria en el en las células del pulmón y en el microambiente del epitelio pulmonar. Las citocinas que se liberan durante la inflamación pueden permanecer en el pulmón provocando una inflamación crónica que, en combinación con alteraciones genéticas, están implicadas en el desarrollo de cáncer de pulmón (Gonda et al., 2009). Algunos de los síntomas que presenta este tipo de cáncer son tos persistente, falta de aire al respirar, dolor torácico y pérdida de peso.

Actualmente, se clasifica en dos grandes grupos: cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) o non-small cell lung cáncer (NSCLC), con una frecuencia de más del 80% de los casos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013) y cáncer de pulmón microcítico (CPM) o small cell lung cáncer (SCLC), cuya prevalencia es de aproximadamente el 15% de los casos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013). Cuando un paciente sufre SCLC, la respuesta inicial a la quimioterapia suele ser buena, pero la prognosis es pobre debido a que se disemina por el resto del tórax de forma rápida y a que existe un relapso de la enfermedad tras el tratamiento. Este tipo de cáncer suele aparecer en los bronquiolos y presenta diferenciación neuroendocrina, por lo que el origen de este tipo de cáncer de pulmón podrían ser las células neuroendocrinas pulmonares transformadas (Giangreco et al., 2007). Por otra parte, el NSCLC representa más del 80% de todos los tumores de pulmón y, en su conjunto, la supervivencia global a 5 años es una de las más bajas (Askoxylakis et al., 2010). Además, la supervivencia prácticamente no ha mejorado desde los estudios realizados en 1990 (Askoxylakis et al., 2010; Sant et al., 2009). A su vez, el CPNM se puede dividir en tres subtipos principales: adenocarcinoma (AC), carcinoma de células escamosas (SCC) y carcinoma de células grandes (LCC), cuya prevalencia es de un 45-50%, 25-30% y 5-10%, respectivamente (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

Los tres subtipos principales de cáncer de pulmón no microcítico se distinguen gracias a diferencias histológicas entre ellos y el lugar predominante donde aparecen, aunque los tumores presentan heterogeneidad de forma individual (Lundin and Driscoll, 2012). El AC es la forma más común de NSCLC tanto en fumadores como en no fumadores. Este tipo de cáncer se localiza generalmente en la zona de unión entre los bronquiolos terminales y los alveolos,

llamada la “unión bronquioalveolar” (Giangreco et al., 2007). El SCC está fuertemente asociado con pacientes fumadores. Se origina en las vías respiratorias proximales, hacia la segunda o tercera bifurcación de las mismas, y no se suele observar en zonas distales (Giangreco et al., 2007). Por último, el LCC es una clase de cáncer que comprende poca diferenciación celular y presenta una menor agresividad comparado con el resto de subtipos de NSCLC (Giangreco et al., 2007).

El conocimiento obtenido a partir de la secuenciación del genoma de los tumores nos ha permitido descubrir algunas de las mutaciones oncogénicas y amplificaciones más frecuentes en genes implicados en cáncer de pulmón no microcítico, que aportan al clon que las sufre una ventaja selectiva frente al resto. Esto permite clasificar los subtipos de cáncer en grupos más pequeños y concretos en base a la aparición de las mutaciones recurrentes que ocurren en ciertos oncogenes y permite realizar un tratamiento más preciso en base a la alteración genética del paciente. Para exponer un ejemplo de las mutaciones oncogénicas más frecuentes en un subtipo de cáncer de pulmón no microcítico, nos centramos en el adenocarcinoma, ya que las líneas celulares que se utilizan en el presente estudio proceden de este tipo de tumores.

Los genes que se encuentran mutados con mayor frecuencia en adenocarcinoma son KRAS, receptor del factor de crecimiento epidérmico o EGFR, quinasa anaplásica de linfoma o ALK y los protooncogenes MET y BRAF, aunque en la mayoría de los casos (aproximadamente un 40%) todavía no se conocen las activaciones oncogénicas presentes. Los genes que sufren mutaciones en NSCLC conocidos y su frecuencia así como el porcentaje de mutaciones que se desconocen en la actualidad se muestran en la Figura 2 (Sharma et al., 2010). Mutaciones en EGFR, KRAS y ALK son mutuamente exclusivas en pacientes con NSCLC, y la presencia de una mutación u otra influye en la respuesta a la terapia aplicada. Como consecuencia, se ha tratado de diseñar inhibidores específicos para cada gen según cuál de ellos se encuentre mutado. Por ejemplo, mutaciones en el dominio tirosina quinasa de EGFR, suelen ser características en pacientes no fumadores. Concretamente, las activaciones oncogénicas se encuentran en los exones 18 19 y 21. En el exón 18 tiene lugar una sustitución de glicina por cisteína (G719C), en el 19 una delección (Δ E746-A750) y en el 20 ocurre otra mutación puntual, en este caso de leucina por arginina (L858R) (Lynch et al., 2004). Los inhibidores tirosina quinasa que se utilizan en la terapia son el Gefitinib o el Erlotinib. Otro caso es la translocación cromosómica del gen EML4, que se fusiona con el gen ALK y provoca su activación oncogénica. En este caso, los inhibidores que se utilizan en la terapia son los inhibidores Crizotinib (Kwak et al., 2010) y Ceritinib (Shaw et al., 2014).

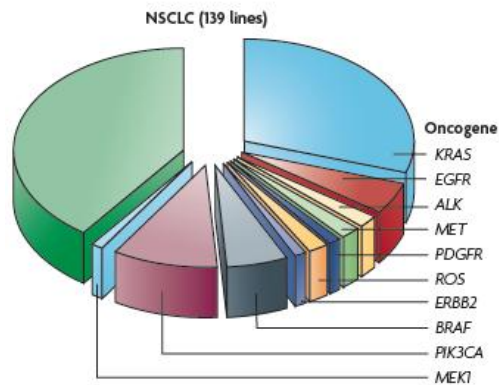


Figura 2. Mutaciones oncogénicas más frecuentes encontradas en 139 líneas celulares procedentes de NSCLC, subtipo adenocarcinoma. Las mutaciones más comunes se encuentran en los oncogenes KRAS (15-25 %), EGFR (5%), ALK (2%), MET (2%), PDGFR (1%), ROS (2%), ERBB2 (1%), BRAF (6%), PIK3CA (10%), MEK1(1%). El porcentaje de mutaciones desconocidas hasta el momento se muestra en la parte izquierda en verde y representa aproximadamente el 40% de los casos.

1.6. Células madre tumorales de pulmón

1.6.1. Evidencia de la existencia de las células madre tumorales de pulmón

Debido a la complejidad del tejido pulmonar, se ha propuesto la existencia de diversos tipos celulares como progenitores en base a si la célula presenta propiedades de célula madre o progenitora frente a un daño. Los estudios que han abordado este campo de investigación han conseguido identificar progenitores limitados y locales capaces de repoblar el epitelio pulmonar tras una herida (Reynolds and Malkinson, 2010; Hong et al., 2004). Por una parte, se han identificado las células alveolares epiteliales de tipo II (AEC2) como posibles progenitoras de las células alveolares de tipo I (AEC1), responsables del intercambio gaseoso en el alveolo (Evans et al., 1973). Estas células se han caracterizado como un progenitor epitelial en los alveolos. Por otra parte, se han descrito las células pulmonares neuroendocrinas (PNEC), células especializadas del epitelio respiratorio capaces de producir neuropéptidos y que se agrupan formando los cuerpos neuroepiteliales (NEBs) (Stevens et al., 1997).

Sin embargo, más recientemente se ha identificado una población de células menos diferenciadas en la unión broncoalveolar, llamadas células madre bronquioalveolares (BASCs). Estas células son resistentes a sustancias contaminantes y contribuyen a la restauración del epitelio tras el agotamiento de células clara (Giangreggo et al., 2002), que participan en el mantenimiento de las células de tipo secretoras y ciliadas tras un daño oxidativo (Evans et al., 1978). Las BASCs se identificaron por su respuesta a la sobreexpresión del oncogen K-ras, que expresa una proteína oncogénica que promueve la proliferación. En estos estudios se observó que la activación prolongada de K-ras en BASCs conducía al desarrollo de tumores con células que presentaban marcadores tanto de células Clara (proteína secretora de células Clara o CCSP) como de AEC2 (proteína surfactante C o SP-C). La aparición de estas células dobles positivas para marcadores de células Clara y de AEC2 llevan a pensar que las BASCs podrían ser las responsables de la reparación de daños y mantenimiento de la homeostasis en el epitelio distal (Reynolds and Malkinson, 2010, Griffiths et al., 2005), por lo que podrían ser las responsables de la formación de adenocarcinomas cuando haya alteraciones en las mismas

(Peacock and Watkins, 2008; Sutherland and Berns, 2010). Todos estos hallazgos conducen a pensar que los distintos tipos y subtipos de cáncer de pulmón podrían derivar de células progenitoras concreta o de células más diferenciadas que han vuelto a adquirir la capacidad de auto-renovación. Este último modelo apoyaría la teoría de que las CMTs no son estáticas, sino que poseen plasticidad, referida a la habilidad de sufrir modificaciones que les permiten cambiar el linaje celular y adoptar un fenotipo diferenciado. Aunque esta teoría todavía se encuentre en debate, el origen de cada tipo de cáncer sería distinto en ambos casos, tal y como se muestra en la Figura 3 (Rivera et al., 2011).

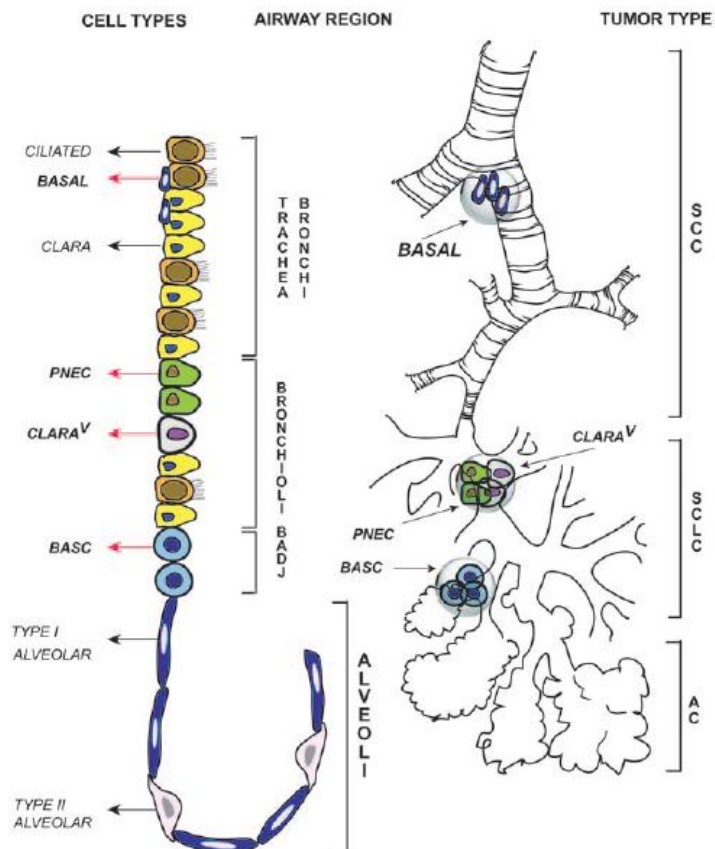


Figura 3. Localización de los distintos tipos celulares en las vías respiratorias y de los distintos subtipos de cáncer de pulmón. Representación esquemática de las vías respiratorias y de los distintos tipos celulares presentes en dicha región. Las células con potencial de célula madre candidatas a ser el origen de los distintos tipos de cáncer de pulmón se encuentran señaladas con las flechas rojas.

1.6.2. Caracterización fenotípica de las células madre tumorales de pulmón

Las células madre tumorales de pulmón con capacidad tumorigénica han sido aisladas utilizando distintas aproximaciones a partir de líneas celulares y tumores procedentes de pacientes. La falta de marcadores previos para progenitores de pulmón representa una dificultad para estos estudios, y los marcadores conocidos hasta el momento no son específicos para separar poblaciones de CMTs, por lo que la definición de nuevas combinaciones de marcadores es necesaria para reconocer CMTs de manera fiable (Rivera et

al., 2011). Los estudios realizados hasta el momento se han centrado en la caracterización fenotípica de las CMTs de pulmón mediante la expresión de marcadores de superficie, como CD133 (prominina I o AC133), transportadores como ABCG2 mediante la separación de la “Side Population” o ensayos de actividad aldehído deshidrogenasa (actividad ALDH) para determinar la tumorigenidad de las células unas propiedades fenotípicas determinadas.

En estudios realizados por Eramo et al. (2008) se aislaron y expandieron por primera vez CMTs de pulmón a partir de muestras de tumores de pacientes. El ensayo se basó en la capacidad de las células de sobrevivir en condiciones de baja adherencia y en un medio de cultivo sin suero, creciendo en forma de esferas tumorales. Las células que expresaban la glicoproteína CD133 separadas por citometría de flujo presentaron propiedades de CMT en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Bertolini et al., 2009). Otro marcador utilizado comúnmente para separar poblaciones de CMTs es el CD44, otra glicoproteína transmembrana activada en muchos tipos de cáncer y juega un papel importante en adhesión, migración, supervivencia e invasión (Marhaba and Zoller, 2004). Sin embargo, no se han descrito marcadores universales de CMTs de pulmón, ya que los descritos anteriormente son específicos de un tejido concreto. Por ejemplo, la expresión de CD133 en muchas muestras de cáncer de pulmón no ha sido detectada y su valor pronóstico no ha sido establecido debido a que hay datos discrepantes (Salnikov and Moldenhauer, 2010).

La actividad ALDH es un marcador funcional importante de células madre normales y malignas, ya que está implicada en el desarrollo temprano de las células madre mediante la oxidación de retinol a ácido retinoico (Chute et al., 2006). La primera vez que se aislaron CMTs de pulmón en base al incremento de actividad ALDH se obtuvo utilizando el ensayo Aldefluor seguido de la separación de células activadas por fluorescencia (FACS) (Deng et al., 2010; Jiang et al., 2009). Además, la enzima aldehído deshidrogenasa contribuye a la resistencia a fármacos mediante la detoxificación de muchos agentes citotóxicos (Moreb, 2008). Debido a esto, se ha descrito como un marcador de CMTs en muchos tipos de cáncer (Ginestier et al., 2007; Matsui et al., 2004).

Por último, se ha utilizado la detección del fenotipo de *side population* (SP). Esta población de células ha mostrado la capacidad de resistir a muchos fármacos utilizados en cáncer de pulmón durante la quimioterapia. Además, se ha visto que la expresión de la telomerasa transcriptasa reversa (hTERT) es mayor en dicha población celular, por lo que podría estar enriquecida de células con un potencial ilimitado de proliferación (Ho et al., 2010). Sin embargo, este ensayo es difícil de llevar a cabo en células procedentes de muestras de tumor de pacientes. Además, tanto las células cancerosas como algunas células del estroma podrían contener propiedades de exclusión de fluoróforos, por lo que la interpretación de los resultados se complica. Otra desventaja es la toxicidad del agente empleado (Hoechst 33342) para las células (Zhong et al., 2007).

1.6.3. Caracterización molecular de las células madre tumorales de pulmón

Los oncogenes y genes supresores de tumores son dos tipos de genes implicados en la carcinogénesis. Mientras que los oncogenes son genes dominantes, los genes supresores de tumores son recesivos. Alteraciones en la secuencia de estos genes o en la regulación de la expresión de los mismos favorecen el proceso de tumorigénesis, por lo que la caracterización

molecular de CMTs de pulmón mediante el estudio de la expresión de factores de transcripción como *Runx3*, *Sox2*, *Oct4* o *c-kit (CD117)* es esencial para diseñar tratamientos combinatorios que sean capaces de eliminar tanto las células cancerosas que forman la masa del tumor como las CMTs del mismo.

Como se ha dicho anteriormente, las BASCs poseen el potencial de diferenciarse en células Clara o AEC2, presentando coexpresión de CCSP y SPC. Estas células tienen capacidad de auto-renovación y expresan *Oct4*, un factor de transcripción de células madre embrionarias cuya expresión ha sido asociada con una peor prognosis (Zhang et al., 2010). Otro regulador importante implicado en la transcripción de células madre embrionarias es *Sox2*, ya que controla los procesos de auto-renovación y diferenciación. Además, está implicado en la morfogénesis ramificada del pulmón durante su desarrollo (Ishii et al., 1998). Se ha propuesto que *Sox2* es un oncogén y que su sobreexpresión está asociada con una peor prognosis (Lu et al., 2010). *Oct4* y *Sox2*, junto con los factores de transcripción c-Myc y Klf4 cooperan en la reprogramación de células diferenciadas en células con propiedades de célula madre pluripotentes (Takahashi and Yamanaka, 2006), por lo que pueden reprogramar un genoma somático a un estado de célula madre embrionaria. En concreto, *Oct4* y *Sox2* podrían participar en un proceso similar que conduce a la formación de CMTs de pulmón (Rivera et al., 2011).

El factor de células madre (Stem Cell Factor o SCF) es un factor mitogénico y angiogénico involucrado en la carcinogénesis. Se ha visto que el factor de transcripción humano c-kit actúa como receptor de SCF, promoviendo el crecimiento del tumor. Se ha asociado la mutación o la sobreexpresión de c-kit con una menor supervivencia y resistencia a la quimioterapia en humanos (Hassan, 2009).

Por último, los genes *Runx* pueden presentar características tanto de oncogenes como de genes supresores de tumores. Estos genes codifican factores de transcripción que participan en el desarrollo normal en tejidos específicos. Por ejemplo, *Runx3* es un factor de transcripción esencial en la última fase del desarrollo de los pulmones, ya que se requiere para el control de la diferenciación y proliferación del epitelio de los bronquios. Se ha observado el silenciamiento de *Runx3* por hipermetilación de su promotor en la fase preneoplásica del adenocarcinoma de pulmón, que interfiere en la diferenciación de las células progenitoras (Lee et al., 2010).

1.7. Rutas de señalización implicadas en cáncer de pulmón

La identificación de CMTs en cáncer de pulmón proporciona una nueva diana para posibles tratamientos dirigidos a estas células con propiedades de célula madre. Muchas dianas terapéuticas posibles que sean específicas de las células con propiedades de célula madre de pulmón incluyen la reparación o corrección de cascadas de señalización que no funcionan de manera adecuada en las mismas en condiciones patológicas. Estas vías de señalización embrionarias incluyen rutas implicadas en el desarrollo y en la regulación de la función de célula madre en organismos adultos, como son las rutas WNT, Hedgehog (Hh) y Notch (Alison et al., 2009). Las funciones de estas rutas de señalización en condiciones normales sugieren que una alteración de las mismas puede dar lugar al inicio de la tumorigénesis por la pérdida de control de los procesos de auto-renovación y diferenciación.

1.7.1 Rutas de señalización Wnt

Las vías de señalización desencadenadas por la unión del receptor Frizzled a su ligando, Wnt, desencadenan cascadas de señalización que juegan papeles vitales en la embriogénesis y en el mantenimiento homeostático de tejidos adultos. De hecho, las glucoproteínas de tipo Wnt son esenciales para la regulación de la diferenciación, auto-renovación y migración de células madre (Van Scoyk et al., 2008). Se ha visto que la expresión de Wnt1 y Wnt2 aumenta en NSCLC, por lo que son considerados protooncogenes. Además, se ha visto un descenso en la expresión de Wnt-7a en los mismos tipos de tumores, sugiriendo que Wnt-7a podría actuar como un gen supresor de tumores. Por lo tanto, alteraciones que provoquen el descenso de expresión celular del mismo favorecerían el proceso de desarrollo del cáncer (Van Scoyk et al., 2008).

1.7.2. Ruta de señalización Hh

Del mismo modo que las vías metabólicas Wnt, la señalización Hh es vital para el desarrollo durante la embriogénesis y el mantenimiento de los tejidos adultos. Esta proteína se encuentra involucrada en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de células progenitoras (Varjosalo and Taipale, 2008). Además, se ha visto que está silenciado en la mayoría de los tejidos sanos, incluido el tejido pulmonar, pero sí se expresa en tumores, lo que sugiere un posible papel en el desarrollo del cáncer (Lundin and Driscoll, 2012).

1.7.3. Ruta de señalización Notch

La señalización vía los receptores Notch se encuentra altamente conservada en rutas embrionarias de mamíferos. La activación de dicha ruta mediante la interacción célula-célula permite conservar la viabilidad celular favoreciendo la división asimétrica (Artavanis-Tsakonas et al., 2004). Las investigaciones realizadas sugieren que, en su estado normal, Notch funciona como un gen supresor de tumores, pero alteraciones en los receptores Notch pueden inducir la formación de ciertos tipos de carcinomas, como el de pulmón (Lundin and Driscoll, 2012).

2. Objetivos

Con el presente proyecto se propone:

- Aislar células madre tumorales derivadas de tumores de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico y de líneas celulares procedentes de cáncer de pulmón no microcítico, subtipo adenocarcinoma.
- Analizar la cinética de crecimiento de los anteriores cultivos celulares y testar la capacidad de formación de esferas tumorales *in vitro*.
- Caracterizar células madre tumorales derivadas de las muestras de tumores de pacientes y de las líneas celulares mediante el análisis de marcadores de superficie y expresión de distintas proteínas intracelulares implicadas en diferentes rutas de señalización alteradas en cáncer. Para ello, se utilizarán técnicas como Western Blot y citometría de flujo.
- Generar esferas tumorales *in vitro* procedentes de células que expresan determinados marcadores de superficie específicos de CSCs mediante la separación de poblaciones celulares con citómetro separador de células de alta velocidad.

3. Material y métodos

3.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Para la realización de los experimentos se utilizan líneas celulares humanas establecidas procedentes de cáncer de pulmón no microcítico, subtipo adenocarcinoma, en distintas fases de la enfermedad (H1993, H1650, H1395 y PC9) obtenidas del centro de biorecursos ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Las propiedades de cada línea celular se especifican en la Tabla Suplementaria 1 (T.S.1) del Anexo I. Todas las líneas celulares se cultivan en monocapa en placas de 100 mm x 20 mm que permiten la adhesión de las células a la superficie (Corning Incorporated®, Corning, NY, USA) con medio DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) + GlutaMAX™ (Gibco®, Paisley, UK) suplementado con antibióticos 100X Penicilina-Estreptomicina-Glutamina (Gibco®, Paisley, UK) y suero bovino fetal (FBS) (Gibco®, Paisley, UK ...) a una concentración final del 10% en incubador (Steri-Cycle® CO₂ Incubator HEPA class 100, Hucoa Erlöss, Madrid, Spain) a 37 °C y un 5% de CO₂. Las líneas celulares se siembran en a subconfluencia y se subcultivan cada 3-4 días en función de la cinética de crecimiento específica de cada tipo celular.

3.1.1. Formación de esferas tumorales *in vitro*

Para la formación de esferas tumorales, se parte del cultivo adherente de la correspondiente línea celular y se siembran las células a densidad clonal en placas de baja adherencia. Para ello, las células del cultivo adherente se levantan con tripsina tras aspirar el medio de cultivo y se lavan con PBS. Las células se recogen en un tubo de 15 mL y se centrifugan a 1200 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se resuspenden en PBS y se cuentan mediante ensayo con Trypan Blue en la Cámara Neubauer. El ensayo con Trypan Blue es un test de exclusión que se utiliza para determinar el número de células viables en una suspensión celular. Se basa en que las células vivas poseen intacta la membrana celular, por lo que son capaces de excluir el marcador; mientras que las células muertas o en proceso de apoptosis poseen daños en la membrana y no son capaces de excluirlo, por lo que el citoplasma se tiñe de azul. Por lo tanto, con este test se comprueba que la viabilidad celular es adecuada. Por último, se ajusta la concentración y se siembran en placas de baja adherencia de 6 pocillos, con 2 mL de medio por pocillo a una concentración de 5.000 células/mL.

Las placas utilizadas (Corning Inc., Corning, NY, USA) (Corning®Costar®, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) están recubiertas con poli-2-hidroxietil-metacrilato para que las células no se adhieran a la superficie. Las células se cultivan en medio DMEM/F-12 + GlutaMAX™, libre de suero cada 3 o 4 días. Dicho medio es suplementado con antibióticos, factores de crecimiento, aminoácidos no esenciales en medio mínimo esencial y BSA (Bovine Serum Albumin) al 0.4%. Los factores de crecimiento que se añaden son Recombinant Human Fibroblast Growth Factor-basic o bFGF (Gibco®, Carlsbad, CA), Recombinant Human Epidermal Growth Factor o HuEGF (Gibco®, Carlsbad, CA) e ITS™ Premix (BD Biosciences, Two Oak Park, Bedford, MA, USA), que contiene insulina, transferrina humana y ácido selenioso. Los aminoácidos no esenciales en medio mínimo esencial (Gibco®, Paisley, UK) se adicionan para mejorar el crecimiento y la viabilidad; mientras que el BSA se añade debido a que contribuye a la estabilidad de los factores de crecimiento y los aminoácidos no esenciales en el medio.

Para realizar un seguimiento de la evolución del cultivo y la formación de esferas tumorales, se observan al microscopio y se toman fotos de todas las líneas celulares tanto en condiciones de adherencia (crecimiento en monocapa) como de baja adherencia periódicamente, desde el primer día de crecimiento hasta el procesamiento de las mismas.

3.2. Muestras celulares procedentes de tumor extirpado de paciente

En el análisis se incluyen muestras de pacientes a los que se les ha extirpado un tumor de tipo adenocarcinoma o carcinoma de células escamosas que no han recibido tratamiento previo y que han firmado el consentimiento adecuado, aprobado por el Comité de Ética Institucional. Las muestras se seleccionan por el patólogo (Servicio de Patología de la “Fundació de Investigació de l’Hospital General Universitari de València”) y se envían, junto con muestras de tejido sano del paciente como control, al Laboratorio de Señalización Oncogénica en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) para su análisis.

Las muestras (tejido tumoral y tejido normal) se reciben en PBS (phosphate buffer saline) con antibióticos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en frío. En primer lugar, se lavan tres veces con PBS con antibióticos frío y se colocan cada una en una placa de cultivo, donde se cortan con cuchillas estériles en secciones milimétricas. Una vez realizados los cortes, cada muestra se coloca en un tubo de 50 mL, donde se añaden 5 mL de medio DMEM/F12 libre de suero y 10 mL de medio de disgregación enzimática. El medio de disgregación utilizado contiene: DNasa al 0.001% (Sigma-Aldrich), colagenasa/disypasa a una concentración de 1 mg/mL (Roche, Indianápolis, IN, USA), penicilina 200 U/mL, streptomina 200 µg/mL y anfotericina 0.5 µg/mL (antibióticos obtenidos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Las muestras se incuban durante 3 horas en condiciones de oscilación y en baño de agua a 37 °C. Tras la incubación, los tubos se rellenan con el medio usado anteriormente y se centrifugan durante 5 minutos a 1500 rpm. Después, el medio se decanta dejando 2 mL del mismo en el tubo. Seguidamente, se procede a la disgregación mecánica de las muestras con 3 o 4 pipetas pasteur de diferentes diámetros (pipetas de 10 mL, 5 mL, 2 mL y 1 mL), según la muestra. Una vez realizada la disgregación mecánica, las células se filtran dos veces. En primer lugar, con un filtro con un diámetro de poro de 70 µm y, a continuación, por un filtro con un diámetro de poro de 40 µm (BS Falcon, San Jose, CA, USA).

Una vez filtradas, las muestras se centrifugan a 800 rpm durante 5 minutos a 4 °C. A continuación, se resuspenden en 500 µL de DMEM y 10 mL de buffer de lisis de células rojas sanguíneas (BD) y se dejan durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación orbital. Seguidamente, se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos y se resuspenden las células precipitadas en 2 mL de medio para hacer un ensayo de viabilidad mediante el test de exclusión con tinción Trypan Blue (detallado en el punto 3.1.1). Una vez realizado el conteo celular y comprobado que la viabilidad es elevada, se ajusta la concentración celular para el análisis de marcadores celulares mediante citometría de flujo (punto 3.3). Por otra parte, las células restantes se siembran en placa de baja adherencia de 6 pocillos para seguir la evolución del cultivo y posteriores análisis. Si todavía hay células restantes, se congelan a -80 °C para realizar un posterior extracto proteico (punto 3.6).

3.3. Expresión de marcadores de superficie de célula madre en líneas celulares tumorales procedentes de CPNM

Las células sembradas en condiciones de baja adherencia (punto 3.1.1) se recogen en un tubo de 50 mL una vez transcurridos 8/10 días desde la siembra, se centrifugan 5 minutos a 350 RCF (Relative Centrifugal Force) en frío (4 °C) y se realiza un lavado con 5 mL PBS. El pellet resultante se resuspende y se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones. Mientras se centrifugan las muestras, se prepara el medio de digestión, que consiste en una dilución de PBS y Accumax™ (Sigma®, Saint Louis, MO, USA) en proporción 1:1. En el estudio, se utiliza 1 mL de medio de digestión por línea celular. Tras centrifugar, el sobrenadante se decanta y se añade el medio de digestión. Las células se depositan en el incubador (37 °C) durante 5 minutos. Posteriormente, se añade medio de cultivo DMEM-F12 + Glutamax™ (Gibco®, Paisley, UK) con antibióticos sin suplementar y libre de suero para disgregar mecánicamente los agregados de células y realizar un recuento de células mediante el análisis de exclusión con el marcador Trypan Blue. Una vez contadas, la concentración se ajusta a 1.000.000 de células por mL o 100.000 células por 100 µL. A continuación, se prepara el volumen de medio necesario para el ajuste de concentración. El volumen final dependerá del panel de anticuerpos que se utilice en cada estudio. En esta ocasión, se prepara el medio DMEM-F12 + Glutamax™ (Gibco®, Paisley, UK) libre de suero. A continuación, se añaden los anticuerpos necesarios para el marcaje celular. La combinación de anticuerpos utilizados se detalla en la Tabla 1. Una vez añadidos, la suspensión celular resultante se incuba durante 1 hora en oscuridad a 4 °C. En el Anexo I, Tablas Suplementarias S.2 y S.3, se detalla la fuente de los distintos anticuerpos e isotipos utilizados, respectivamente.

Tabla 1. Panel de anticuerpos y sus correspondientes isotipos utilizados para el análisis de marcadores de superficie en líneas celulares de baja adherencia.

	COMBINACIÓN ANTICUERPOS/ISOTIPOS	CANTIDAD (µL)
ANTICUERPOS	CD326 (EpCAM)-FITC + CD90-PE- CF594 + CD166-PerCP-eFluor®710	10+10+5
	ABCG2-PE + CD34-PC5	10+10
	E-Cadherina (CD324)-PE + CD44-PE-Cy7	10+5
	CD117-PC5 (c-kit)	2
	CD133/1-APC	5
	CD133/2-APC	5
ISOTIPOS	Iso-CD326-FITC + Iso-CD90-PE-CF594 + Iso-PerCP-eFluor®710	10+10+5
	Iso-ABCG2-PE + Iso-CD34-PC5	10+10
	Iso-E-Cadherina-PE + Iso-PE-Cy7	10+5
	Iso-CD117-PC5	2
	Iso-CD133-APC (mismo para CD133/1 y 2)	5

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se añade 1 mL de PBS a cada tubo, se centrifuga 5 minutos a 350 RCF en frío y se decanta el sobrenadante. Por último, se añaden 500 µL de medio de cultivo DMEM-F12 + Glutamax™ (Gibco®, Carlsbad, CA) libre de suero, con antibióticos a cada tubo y se analizan mediante el citómetro de flujo FC500 MCL (Beckman-

Coulter, CA, USA), equipado con dos láseres (488 nm y 635 nm) y cinco detectores de fluorescencia.

3.4. Aislamiento de CMTs procedentes de tumores de pacientes con CPNM usando marcadores específicos y citometría de flujo

Para el presente experimento, se parte de la suspensión celular obtenida en el punto 3.2. La concentración celular se ajusta a 1.000.000 de células por mL o 100.000 células por 100 μ L y se sigue el procedimiento descrito en el punto anterior, cambiando la combinación de anticuerpos utilizada. El panel de anticuerpos utilizado en este caso se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Panel de anticuerpos y sus correspondientes isotipos utilizados para el análisis de marcadores de superficie en células procedentes de tumor extirpado de pacientes con CPNM.

	COMBINACIÓN ANTICUERPOS/ISOTIPOS	CANTIDAD (μL)
ANTICUERPOS	CD326 (EpCAM)-FITC + CD90-PE-CF594 + CD166-PerCP-eFluor710 + CD31-PE + CD45-PE	10+10+5+20+20
	ABCG2-PE + CD34-PC5 + CD326-FITC + CD44-PE-Cy7	10+10+10+5
	E-Cadherina (CD324)-PE + CD326-FITC + CD133/2-APC	10+10+5
	CD117-PC5 (c-kit)	2
ISOTIPOS	Iso-CD326-FITC + Iso-CD90-PE-CF594 + Iso-PerCP-eFluor710 + Iso-CD31-PE + Iso-CD45-PE	10+10+5+20+20
	Iso-ABCG2-PE + Iso-CD34-PC5 + Iso-CD326-FITC + Iso-CD44-PE-Cy7	10+10+10+5
	Iso-E-Cadherina-PE + Iso-CD326-FITC + Iso-CD133-APC	10+10+5
	Iso-CD117-PC5	2

3.5. Aislamiento de poblaciones celulares mediante un citómetro separador de células de alta velocidad

En primer lugar, se recogen las células y se coge una muestra de la suspensión celular para realizar el conteo mediante el método de exclusión con Trypan Blue para, además, comprobar que la viabilidad de las células es adecuada. A continuación, se centrifuga a 350 rcf durante 5' a 4°C y se resuspenden las células en la cantidad de medio correspondiente según el número de células obtenido. Para los estudios realizados, se añaden 100 μ L de medio DMEM-F12 + GlutamaxTM por cada cien mil células. Seguidamente, se coge parte de la suspensión celular y se lleva a otro tubo para realizar una dilución 1:10. En el tubo que queda la suspensión celular más concentrada se añaden los anticuerpos correspondientes según la población de células que se quiera a separar. Para asegurar el correcto marcaje de la totalidad de las células, se añade el doble de la cantidad utilizada para los ensayos de citometría de flujo. En el tubo con la suspensión celular se añaden los isotipos según las cantidades especificadas en las tablas 2 y 3. Ambos tubos se incuban durante una hora a 4°C y en oscuridad. Una vez transcurrido el

tiempo, se añaden 2 mL de PBS a cada tubo y se centrifugan en las condiciones anteriores para después resuspender en medio DMEM-F12 + GlutamaxTM para que quede una suspensión de 5-6 millones de células totales en cada tubo. Las suspensiones resultantes se pasan por un filtro de 40nm para impedir que queden agregados y se llevan al servicio de citometría del CIPF, donde se analizan y separan en el citómetro separador de células de alta velocidad MoFlo (Beckman-Coulter, CA, USA), equipado con tres láseres (uno que se excita a dos longitudes de onda, 488 y 351 nm, y otro a 635 nm) y ocho detectores de fluorescencia. Las subpoblaciones separadas se siembran a densidad clonal en placas de baja adherencia para estudiar su capacidad de formación de esferas tumorales.

3.6. Expresión de genes específicos de célula madre y proteínas relacionadas en líneas celulares tumorales procedentes CPNM

3.6.1. Preparación de un extracto proteico

Para realizar el análisis del perfil proteico celular, el primer paso es lisar las células. Para ello, en el caso de las líneas celulares con crecimiento en adherencia, se levantan las células con el raspador (scraper), se añaden 5 mL de PBS frío, la suspensión se pasa a un Falcon de 15 mL, se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se aspira el PBS (sobrenadante). Las células se congelan inmediatamente a una temperatura de -80 °C. En el caso de las líneas celulares de baja adherencia y las células procedentes de tumor de paciente, se recogen las células en un Falcon de 15 mL, se centrifuga a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C, se lava con 5 mL de PBS frío, se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones y se aspira el PBS. Las células se llevan de forma inmediata a una temperatura de -80 °C. Seguidamente, se procede a lisar las células con el tampón de lisis (Triplex Complex). Esta solución contiene Triplex Buffer (50 mM tris-HCl a pH8, 150 mM NaCl, 0.01% SDS, 1% Igepal, 0.5% DOC) y un complejo de inhibidores de proteasas. Cada línea celular precisa 50 µL de Triplex Complex. Una vez añadido el tampón de lisis a las células, se incuba la suspensión durante 30 minutos en hielo, se centrifuga a 15.000 rpm en una microcentrífuga durante 15 minutos a 4 °C y se pasa 40 µL del sobrenadante a un microtubo (extracto proteico). Seguidamente, se añaden 10 mL de Laemmly Buffer 5x al extracto proteico y se incuban los tubos 5 minutos a 95 °C en el calefactor (VWR®, Digital Dry Block Heater). La suspensión resultante se cargará en el gel de electroforesis. Con el resto de sobrenadante se realiza un ensayo Bradford para cuantificar la concentración de proteína en la solución. Este ensayo permitirá calcular la cantidad de extracto proteico a añadir para realizar la electroforesis con la misma carga proteica en todos los pocillos.

3.6.2. Electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida

A continuación, se separan las proteínas del extracto proteico obtenido mediante electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con SDS (dodecilsulfato sódico), que permite la desnaturalización de las proteínas. La electroforesis se realiza fijando los miliamperios (mA). En los experimentos realizados se establecen 30 mA constantes, y los Voltios (V) aumentan desde 70 a unos 130.

3.6.3. Transferencia proteica

Las proteínas se transfieren del gel a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) mediante transferencia semi-líquida. Este material es muy hidrofóbico, por lo que hay que activar la membrana previamente con metanol, que le ayuda a empaparse. Las membranas de

transferencia se obtienen de Millipore (Immobilon®-P transfer membrane, Millipore™, Billerica, MA, USA). La transferencia proteica se realiza durante 1 hora en cámara fría a 100V con el agitador o a temperatura ambiente durante toda la noche (overnight, o/n) a 12V.

Una vez se ha transferido las proteínas a la membrana, éstas se visualizan mediante tinción Ponceau. Este compuesto químico es un colorante que se utiliza para comprobar que las proteínas se han transferido de forma correcta. Si es así, se teñirán de color fucsia. Además, esta prueba sirve para corroborar que la carga en todos los pocillos del gel de electroforesis es homogénea. Para realizar la comprobación de la carga, la membrana se sumerge en el colorante durante 5-6 minutos.

3.6.4. Western Blot

Para detectar proteínas específicas en las muestras se utiliza la técnica de Western Blot o inmunoblot. Para ello, el primer paso consiste en el bloqueo de la membrana. Este paso se realiza para saturar la membrana de proteínas, de forma que se evitan las posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos a la membrana. La solución de bloqueo consiste en 5% de leche en TBS/Tween 0.05%. La solución de bloqueo se añade a una cubeta junto con la membrana y se mantiene durante una hora a temperatura ambiente o durante toda la noche en la cámara fría (4 °C), siempre en agitación.

Seguidamente, se incuba la membrana con el anticuerpo primario durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C. Una vez terminada la incubación, las membranas se lavan tres veces con TBS-Tween al 0,05% y se incuban con el anticuerpo secundario, que está conjugado a peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase, HRP).

En este estudio, se utilizaron los anticuerpos primarios para detectar las siguientes proteínas, cada una se utiliza con una dilución concreta y un anticuerpo secundario característico. Los anticuerpos primarios Anti-Actina, Anti- α/β -Hsp90, Anti-GAPDH, Anti- β -Tubulina y Anti-Oct4 se utilizan junto con el anticuerpo secundario *Anti-Mouse IgG* (específico de la cadena κ) conjugado a peroxidasa producido en conejo (Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA). El anticuerpo primario Anti-EpCAM [1:1.000] se utiliza junto con el anticuerpo secundario *Donkey Anti-Rabbit IgG-HRP* (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Por último, los anticuerpos primarios Anti-Sox2, Anti-Nanog y Anti-Ciclina A2 (CcnA2) se utilizan junto con el anticuerpo secundario *Donkey Anti-Goat IgG-HRP* (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Los anticuerpos primarios utilizados y sus correspondientes anticuerpos secundarios, así como la dilución utilizada para el estudio en cada caso se detallan en la Tabla 3. En el Anexo I (Tabla S.4) se detalla la fuente de cada anticuerpo utilizado.

Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo mediante el método de quimioluminiscencia (ECL) utilizando un kit comercial Roche y/ o Pierce (Thermo Scientific Pierce ECL Western Blotting Substrate). Se utiliza un kit u otro en función del experimento, siendo el segundo más sensible. Ambos contienen dos soluciones, peróxido de hidrógeno y luminol, que se mezclan en solución 1:1 (Volumen total de 1 mL por membrana completa de 9x7 cm). La emisión de luz se captura en una película de rayos X estándar.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para el análisis de expresión proteica en las distintas líneas celulares.

Anticuerpos primarios	Diana del anticuerpo primario	Concentración utilizada [μ L: μ L]	Anticuerpo 2º (Ig Type)	Concentración utilizada [μ L: μ L]	Tamaño de banda esperado (kDa)
Anti- Actina C-2 monoclonal	Extremo C-terminal de la proteína actina humana	1:10.000-1:20.000	Anti-Mouse IgG	1:20.000	40
Anti-α-Hsp90 monoclonal - isotipo IgG de ratón)	Proteína completa	1:1.000	Anti-Mouse IgG	1:20.000	95
Anti-β-tubulina monoclonal (isotipo de ratón IgG1)	Subpoblaciones de β y β' tubulina	1:10.000	Anti-Mouse IgG	1:25.000	50
Ani-GAPDH-Peroxidasa monoclonal - isotipo IgM de ratón	Isoforma 1 de GAPDH	1:20.000	Anti-Mouse IgG	1:20.000	37
Anti-Oct4 monoclonal	Proteína humana Oct-4 y su isoforma Oct-4A, aminoácidos 1-134	1:1.000	Anti-Mouse IgG	1:5.000	44
Anti-EpCAM monoclonal [E144]	Residuos en el extremo C-terminal de la proteína EpCAM humana	1:1.000	Donkey anti-rabbit IgG-HRP	1:15.000-1:20.000	39
Anti-human Nanog polyclonal	Proteína Nanog humana, aminoácidos 153-305	1:1.000	Donkey Anti-Goat IgG-HRP	1:5.000	40
Anti-human/mouse-SOX2	Proteína humana SOX2, aminoácidos 135-317	1:1.000	Donkey Anti-Goat IgG-HRP	1:5.000	40
Anti-CcnA2 (C-19): sc-596	Ciclina A de ratón, rata y humana	1:500	Donkey Anti-Goat IgG-HRP	1:5.000	54

4. Resultados y discusión de los resultados

4.1. Cinética de proliferación de líneas celulares tumorales procedentes de cáncer de pulmón no microcítico en distintas condiciones de cultivo

Con la finalidad de testar las propiedades de crecimiento de las células procedentes de adenocarcinoma de pulmón, se cultivaron, por una parte las distintas líneas celulares (H1395, H1650, H1993 y PC9) en placas adherentes en las que las células crecen en monocapa y, por otra parte, en placas que permiten el crecimiento de las células en suspensión (condiciones de baja adherencia). Las células cultivadas en condiciones adherentes se crecieron hasta llegar al estado de confluencia; mientras que las células en condiciones de baja adherencia se crecieron durante 8 días y fueron tratadas según el protocolo descrito en el apartado de Material y métodos. En suspensión, la viabilidad de las células descendía al procesarlas en un periodo de tiempo mayor a 10 días (resultados no mostrados debido a que la viabilidad es baja y los datos no son representativos), por lo que se decidió realizar todos los análisis a los 8 días de crecimiento para sincronizar el mismo y obtener una viabilidad celular mayor al realizar los posteriores análisis.

4.1.1. Crecimiento en condiciones de adherencia

Al crecer las células en cultivo en condiciones de adherencia, se observa que las distintas líneas celulares se comportan de modo diferente. Como se observa en la Figura 4, la línea celular PC9 presenta una proliferación más rápida que el resto. Mientras que la línea celular PC9 alcanza un estado de confluencia a los tres días desde la siembra de las mismas, el resto de líneas celulares se encuentra en un estado de subconfluencia. Por otra parte, la morfología de las distintas líneas celulares varía de unas a otras. Las células de la línea H1650 presentan una forma alargada, mientras que las H1395 y PC9 presentan una forma más esférica. Atendiendo a las células H1993, se observa que el crecimiento es el más distinguido con respecto al resto de líneas celulares, ya que se observa que la placa no llega al estado de confluencia y que las células se agrupan, formando agregados.

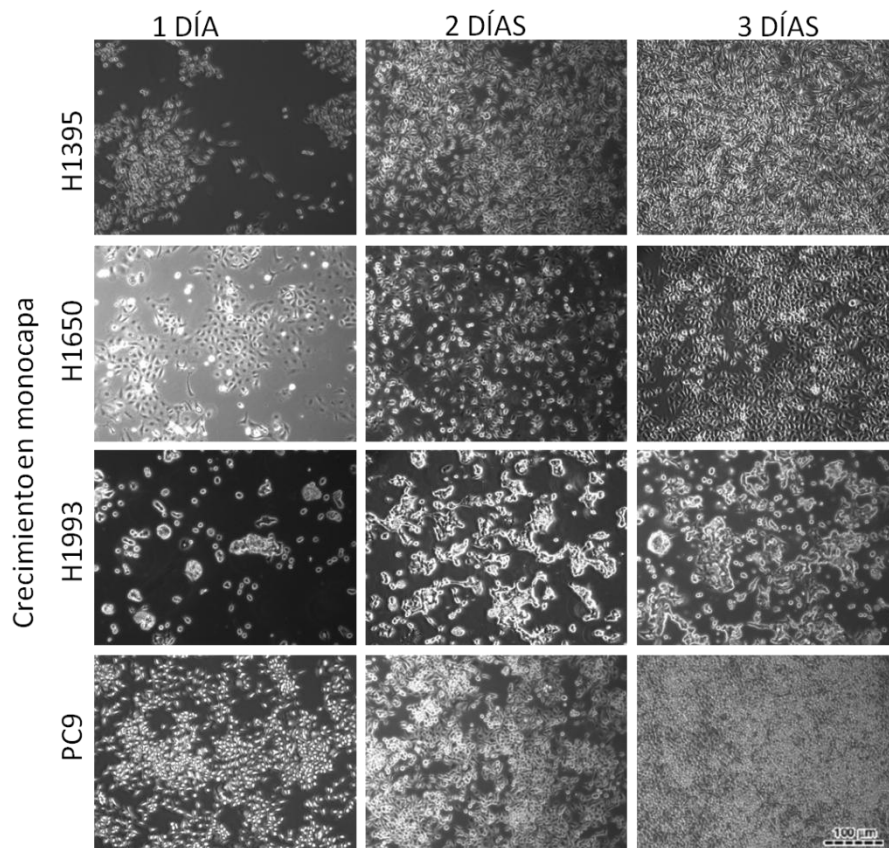


Figura 4. Cinética de crecimiento de las líneas celulares procedentes de CPMN. Al sembrar las células en condiciones de adherencia durante 3 días se observa un crecimiento diferencial entre las distintas líneas celulares. En la esquina inferior derecha de la imagen se muestra la equivalencia de 100 μm a partir de las fotos realizadas con el microscopio óptico

4.1.2. Crecimiento en condiciones de baja adherencia

Una de las formas de comprobar la existencia de células con propiedades de célula madre en un cultivo celular *in vitro*, es examinar la capacidad de formar esferas tumorales cuando las células sembradas a densidad clonal crecen en suspensión en placa de baja adherencia. Al crecer las cuatro líneas celulares en dichas condiciones, también se percibe un comportamiento distinto entre ellas. Como se observa en la Figura 5, tanto la línea H1650 como la H1993 son capaces de formar esferas tumorales regulares y redondas; mientras que las líneas H1395 y PC9 forman agregados celulares masivos con estructura irregular, pero no forman esferas tumorales.

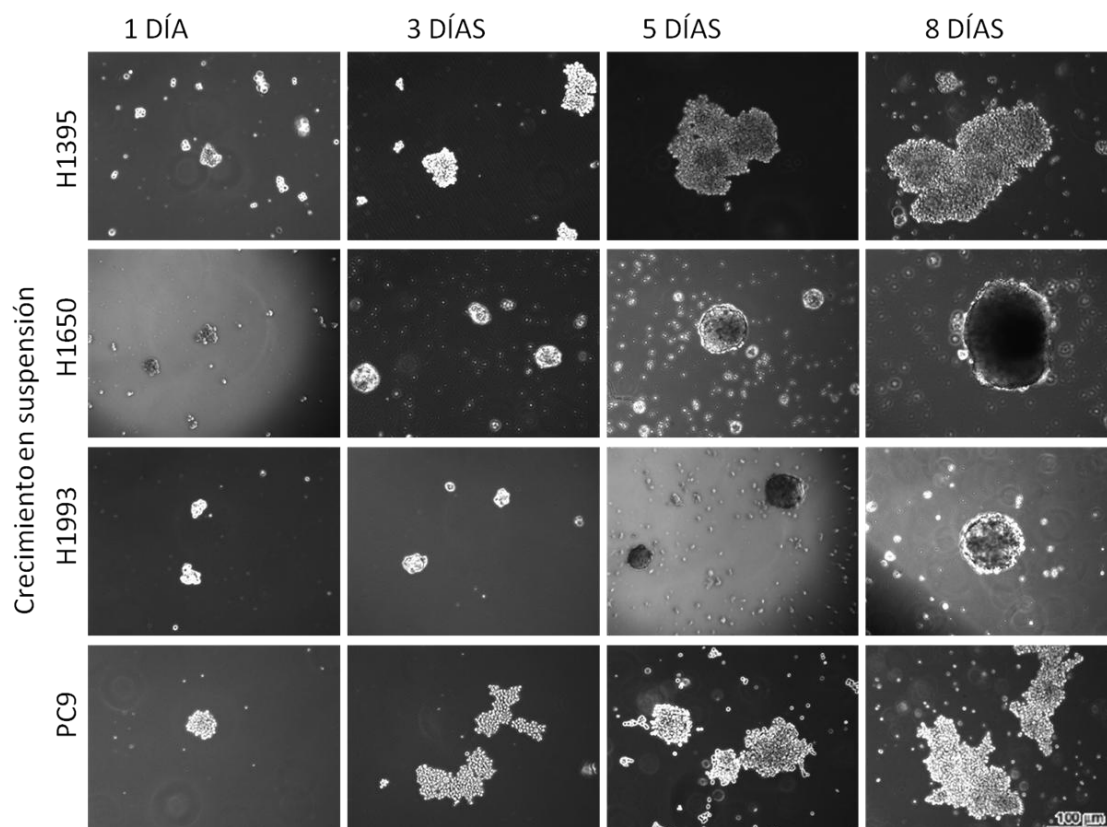


Figura 5. Cinética de crecimiento de las líneas celulares procedentes de CPNM. Al sembrar las células en condiciones de suspensión durante un periodo de 8 días se observa un crecimiento diferencial. Mientras que las líneas H1650 y H1993 forman esferas tumorales, las líneas H1395 y PC9 no crecen en forma de esferas tumorales, sino formando agregados celulares. En la esquina inferior derecha de la imagen se muestra la equivalencia de 100 μm a partir de las fotos realizadas con el microscopio óptico

El ensayo de formación de esferas tumorales *in vitro* se desarrolló inicialmente para seleccionar y propagar CMTs y posteriormente se ha utilizado como un marcador de la actividad de células madre y células madre tumorales, tumores y líneas celulares establecidas. Las líneas celulares derivadas de CPNM representan clones de células que han sobrevivido la presión de la selección del cultivo *in vitro* y por lo tanto no representan completamente el cáncer clínico que crece *in situ*. Sin embargo, son modelos celulares accesibles para estudiar los mecanismos moleculares de la tumorigénesis. Teóricamente, las líneas celulares deben tener subpoblaciones de células con característica de célula madre puesto que son capaces de iniciar tumores en ratones inmunodeprimidos y sobrevivir diferentes pasajes, de otra manera los cultivos celulares se agotarían. De hecho, la línea celular H1650 incluida en nuestro estudio, es tumorigénica cuando se inyecta en ratón inmunodeprimido (resultados obtenidos en el laboratorio no mostrados), por lo tanto debe tener células con propiedades de célula madre y capacidad iniciadora de tumor. Actualmente los modelos de xenotrasplante de ratón generados mediante la inyección de células iniciadoras de tumores es el ensayo más válido para medir la capacidad de célula madre, pero todavía nos encontramos en el primer paso de realización de los mismos.

4.2. Caracterización de las líneas celulares tumorales mediante análisis de expresión de proteínas de superficie

Con el objetivo de caracterizar las líneas celulares tumorales y comparar la expresión proteica entre ellas, así como comprobar si hay o no diferencias al cultivar y crecer las células en distintas condiciones (adherencia y suspensión), se crecen las células y, tras 8 días de crecimiento, se realiza, por una parte, el análisis mediante citometría de flujo y, por otra parte, se realiza un extracto proteico para analizar la expresión de proteínas mediante ensayos Western Blot (Apartado 4.6).

En el presente experimento se analiza la expresión de distintos marcadores de superficie celulares con distintas funciones en líneas celulares procedentes de adenocarcinoma de pulmón con el objetivo de caracterizar las células con propiedades de célula madre. Para ello, se analiza la expresión de marcadores de superficie de célula madre (CD44, CD90 y CD133), de adhesión (CD326, CD34, CD324 o E-Cadherina y CD166 o ALCAM) y transportadores de la familia *ATP-Binding cassette* (ABCG2) en las cuatro líneas celulares utilizadas en la investigación en distintas condiciones de cultivo (adherencia y suspensión). Para aumentar la fiabilidad de los resultados, se realizaron réplicas del mismo experimento en las distintas condiciones. En la primera réplica, la viabilidad celular de la línea H1650 en ambas condiciones y de la línea H1993 en condiciones de baja adherencia fue muy baja, por lo que no se muestran los resultados al no ser éstos representativos de la población total. Para aumentar la viabilidad, se decidió hacer tres cambios en el protocolo de preparación de las células. En primer lugar, tras los cinco minutos de incubación con el medio de digestión compuesto por accumax y PBS, se añadieron 2 mL de medio de cultivo para diluir la disolución y disminuir el efecto del accumax durante el análisis de viabilidad. En segundo lugar, se centrifuga la muestra siempre a 350 RCF. Por último, tras el paso de disgregación con Accumax, se mantiene la muestra siempre en hielo, a 4 °C. Tras realizar dichos cambios, se consiguió doblar la viabilidad celular en todas las muestras excepto en el caso de la línea H1993 en condiciones de baja adherencia, por lo que no se pudieron obtener resultados concluyentes de la misma. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4 y 5.

CD326 es el marcador de superficie con mayor expresión en todas las líneas celulares y su expresión parece disminuir al crecer las células en condiciones de baja adherencia. CD44 también muestra una expresión alta y su expresión es variable dependiendo del tipo celular. En las células H1650 la expresión aumenta en las células crecidas en suspensión, sin embargo disminuye en las células PC9 y H1395 crecidas en suspensión. La expresión de CD90 es baja en todas las líneas celulares y aumenta aproximadamente 3 veces en las células crecidas en suspensión, excepto en la línea celular H1395, indicando que éstas tienen características de célula mesenquimal. El marcador CD166 se expresa de manera distintiva entre las diferentes líneas celulares, mostrando una expresión elevada en las células PC9 y H1395 crecidas en adherencia. Su expresión disminuye en las células crecidas en suspensión. Los marcadores ABCG2, CD34 y CD133 muestran una expresión muy baja en todas las líneas celulares y condiciones analizadas.

Las diferentes líneas celulares analizadas muestran un patrón de expresión heterogéneo de los diferentes marcadores de superficie utilizados, pero todas tienen en común una elevada expresión de CD326. Estos datos sugieren que no hay una correlación clara entre la habilidad

de crecer como esferas y la expresión de marcadores de células madre descritos. Los resultados obtenidos nos indican que existe una falta de marcadores específicos para el estudio de CMTs derivadas de CPNM y que existe una plasticidad intrínseca de las células epiteliales tumorales, ya que se observan variaciones entre las distintas réplicas realizadas.

Tabla 4. Expresión de los marcadores de superficie CD326, E-Cadherina, CD90, CD166, ABCG2, CD34, CD44, CD133/1 y CD133/2 en las líneas celulares H1650 y PC9 en distintas condiciones de cultivo. En la tabla se muestran los porcentajes de células marcadas con respecto a las células viables de la muestra. La viabilidad celular varía entre un 60 y un 75 % en las distintas muestras. En el caso de la línea celular H1650 sólo aparecen los resultados de una réplica. En el caso de la línea celular PC9 se muestran la media y la desviación estándar procedentes de dos réplicas al crecer las células en cada una de las dos condiciones testadas.

%Marcadas Marcador	H1650		PC9	
	ADHERENCIA	SUSPENSIÓN	ADHERENCIA	SUSPENSIÓN
CD326	96,38	64,72	99,21 ± 1,02	95,55 ± 2,86
E-Cadherina	6,29	6,9	0,75 ± 0,44	0,14 ± 0,02
CD90	0,41	3,03	1,13 ± 0,69	3,67 ± 1,77
CD166	1,76	0,37	55,74 ± 44,26	4,95 ± 6,97
ABCG2	0,4	0,44	0,66 ± 0,30	0,38 ± 0,37
CD34	0,08	1,08	0,34 ± 0,01	1,09 ± 0,85
CD44	48	75,8	81,11 ± 8,52	63,43 ± 1,28
CD133/1	0	0,06	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
CD133/2	0,03	0	0,03 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Tabla 5. Expresión de los marcadores de superficie CD326, E-Cadherina, CD90, CD166, ABCG2, CD34, CD44, CD133/1 y CD133/2 en las líneas celulares H1395 y H1993 en distintas condiciones de cultivo. En la tabla se muestran los porcentajes de células marcadas con respecto a las células viables de la muestra. La viabilidad celular varía entre un 60 y un 75 % en las distintas muestras. En el caso de la línea celular H1395 y H1993 en condiciones de adherencia se muestran la media y la desviación estándar procedentes de dos réplicas al crecer las células en cada una de las dos condiciones testadas. En el caso de la línea celular H1993 en suspensión, no se obtuvieron datos representativos de la totalidad de la población celular debido a que el número de células viables fue muy bajo.

%Marcadas Marcador	H1395		H1993	
	ADHERENCIA	SUSPENSIÓN	ADHERENCIA	SUSPENSIÓN
CD326	98,68 ± 1,87	96,80 ± 1,64	88,86 ± 12,71	-
E-Cadherina	0,65 ± 0,13	0,35 ± 0,12	15,37 ± 19,98	-
CD90	2,14 ± 2,05	0,31 ± 0,15	7,27 ± 4,95	-
CD166	54,65 ± 59,21	1,82 ± 2,48	77,85 ± 22,78	-
ABCG2	1,52 ± 1,90	0,52 ± 0,45	2,34 ± 1,22	-
CD34	0,13 ± 0,18	0,88 ± 0,50	0,81 ± 0,44	-
CD44	90,02 ± 6,66	88,26 ± 5,45	31,22 ± 43,97	-
CD133/1	0,02 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,11	-
CD133/2	0,01 ± 0,014	0,01 ± 0,01	0,18 ± 0,25	-

4.3. Aislamiento de poblaciones celulares

Con el objetivo de aislar poblaciones celulares que expresen o no unos determinados marcadores de superficie, se analizan las células mediante citometría de flujo seguido de citometría de separación de células de alta velocidad. En el caso de la línea H1650, se pudieron separar tres poblaciones diferentes en base a la expresión o no de CD326 y CD166. Por otra

parte, de la línea H1993 se separaron dos poblaciones distintas en base a la expresión o no de E-Cadherina. Los resultados obtenidos antes de separar las subpoblaciones celulares se muestran en la Figura 6. Las medidas *X-mean* e *Y-mean* muestran la intensidad de fluorescencia con respecto a los ejes X e Y, respectivamente, elegidos de forma arbitraria según se considera la separación entre células marcadas y no marcadas. A mayor *X-mean* o *Y-mean*, mayor intensidad de fluorescencia, y viceversa. En la figura 6, panel de la izquierda, observamos la existencia de una población minoritaria de células que coexpresan los marcadores de superficie CD326 y CD166 y de otra población mayoritaria que expresa únicamente CD326. En el panel de la derecha podemos observar un bajo porcentaje de células que expresan E-cadherina y además la intensidad de fluorescencia es muy baja

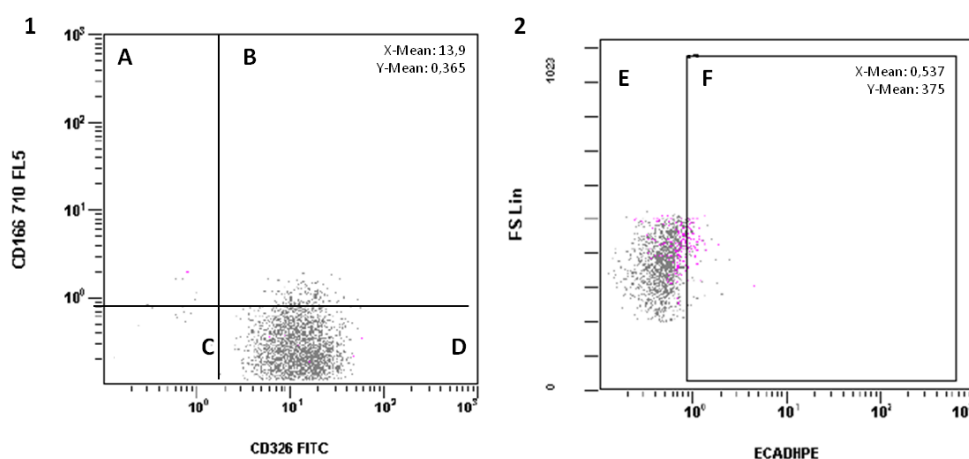


Figura 6. Expresión diferencial de marcadores de superficie celulares para la separación de subpoblaciones mediante citometría de separación de células de alta velocidad. En la figura 6.1 se muestran los resultados obtenidos para la línea H1650 al analizar por citometría de flujo las distintas poblaciones celulares. El número total de células analizadas es 4813. En la región A aparecen las células CD326(-)/CD166(+), que representan un porcentaje de 0,8%. En la región B (1%) las células CD326(+)/CD166(+). En la región C (CD326(-)/CD166(-)) no se obtuvieron células y en la región D (98%) se encuentran las células CD326(+)/CD166(-). En la figura 6.2 se muestran los resultados obtenidos para la línea H1993 marcada con E-Cadherina. Más del 80% de las células (región E) son E-Cadherina(-) y el resto positivas, aunque con poca intensidad de fluorescencia (región F).

4.3.1. La expresión de CD326 determina la capacidad de formar esferas tumorales

Para comprobar si la expresión de CD326 o CD166 es determinante para la formación de esferas, se separan tres poblaciones celulares de una de las líneas celulares que sí es capaz de formar esferas en cultivo de baja adherencia, en este caso a partir de la línea celular H1650. El ensayo que se realiza es el mismo que el llevado a cabo en el apartado anterior, pero esta vez se separan las poblaciones de células CD326(+)/CD166(+), CD326(+)/CD166(-) y CD326(-)/CD166(+), pero no se separa población CD326(-)/CD166(-) debido a que no se encuentra una muestra representativa en el cultivo (Figura 6.1). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7, en la cual se observa que tanto las poblaciones CD326(+)/CD166(+) como CD326(+)/CD166(-) sí son capaces de formar esferas tumorales en un periodo inferior a 2 semanas (12 días); mientras que la población celular correspondiente a las células que no expresan CD326 pero sí expresan CD166 no es capaz de formar esferas en el mismo periodo de tiempo. El periodo de tiempo escogido es mayor a 8 días para asegurar que la población CD326(-)/CD326(+) no forma esferas tumorales aunque se deje un mayor periodo de tiempo en cultivo.

Resultados obtenidos en el laboratorio también han demostrado que la población de células CD326(-)/CD90(+) no tiene la capacidad de formar esferas tumorales (resultados no mostrados). Por lo tanto, los todos los resultados obtenidos hasta el momento muestran que la expresión de CD326 sí es importante para la formación de esferas tumorales *in vitro* y por lo tanto para la capacidad propagadora de tumores.

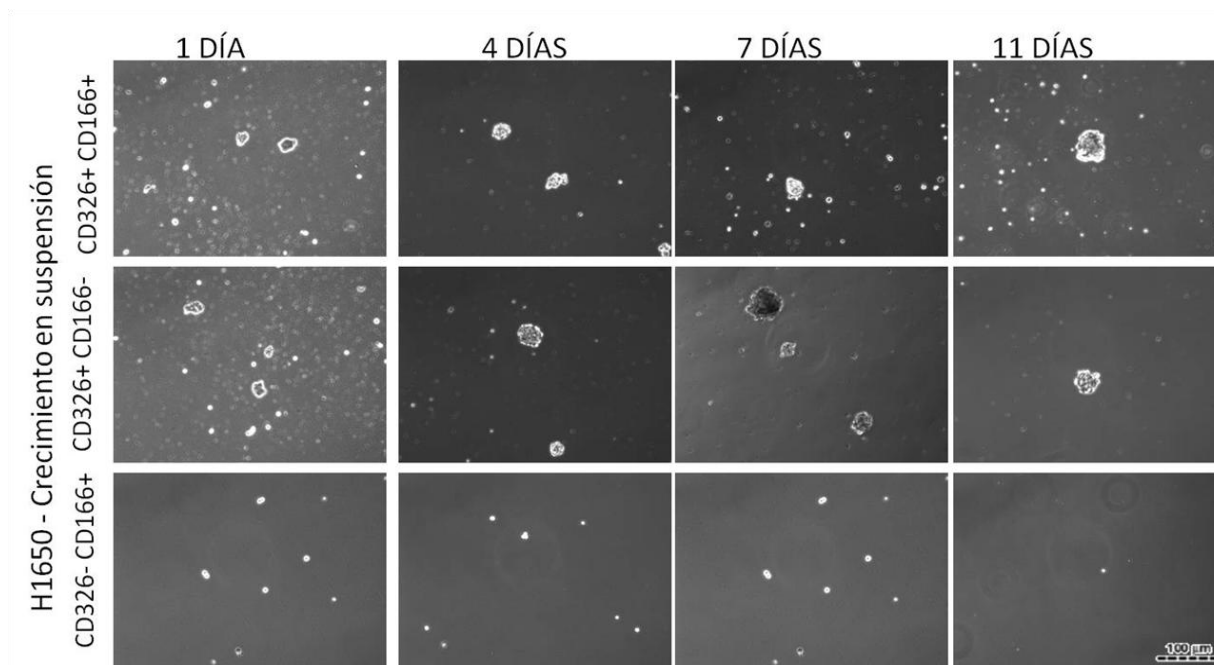


Figura 7. Crecimiento de la línea celular H1650 según la expresión o ausencia de CD326 y CD166. Aislamiento de tres subpoblaciones celulares en base a la presencia, ausencia o coexpresión de los marcadores de superficie CD326 y CD166 en la línea celular H1650. Dichas poblaciones se cultivan durante 12 días en condiciones de baja adherencia. En la fila superior se muestra la evolución del cultivo que contiene las células dobles positivas para los marcadores, en la fila central aparece el crecimiento de las células CD326(+)/CD166(-) y en la fila inferior las células CD326(-)/CD166(+). La subpoblación doble negativa para ambos marcadores no se pudo aislar por falta de representación de la misma en el cultivo. En la esquina inferior derecha de la imagen se muestra la equivalencia de 100 µm a partir de las fotos realizadas con el microscopio óptico

4.3.2. La expresión de E-Cadherina no determina la capacidad de formar esferas tumorales

Para comprobar si la expresión de E-Cadherina es necesaria para la formación de esferas al cultivar las distintas líneas celulares en condiciones de baja adherencia, se separan dos poblaciones celulares de una de las líneas que sí forma esferas en crecimiento no adherente, la línea celular H1993. Para ello, se realiza una separación de la población de células E-Cadherina(+) por una parte y de E-Cadherina(-) por otra mediante un citómetro separador de células de alta velocidad y, a continuación, se siembra cada población en una placa de cultivo de baja adherencia diferente durante un periodo de 8 días. La Figura 8 muestra la evolución de los cultivos celulares. Como se observa, tanto las células que expresan E-Cadherina como las que no, forman esferas al cultivarlas en condiciones de baja adherencia.

La citometría de flujo se ha utilizado, además de para analizar la expresión de proteínas de superficie, para enriquecer las poblaciones celulares de células con un perfil de expresión determinado que les aporte características de CMT. En este estudio hemos probado diferentes combinaciones de marcadores de superficie (CD326, CD166, CD44, CD133, E-Cadherina,...), que permiten diferenciar subpoblaciones de células que no se solapan, aunque todavía no se ha

descrito un buen marcador para identificar CMTs derivadas de CPNM. Lo que sí se ha podido determinar en el laboratorio es que una subpoblación concreta de células, CD326(+)/CD166(-)/CD90(-), derivadas de la línea H1650 es capaz de formar esferas tumorales *in vitro*, y que la expresión de E-Cadherina no es determinante para la formación de las esferas en la línea H1993.

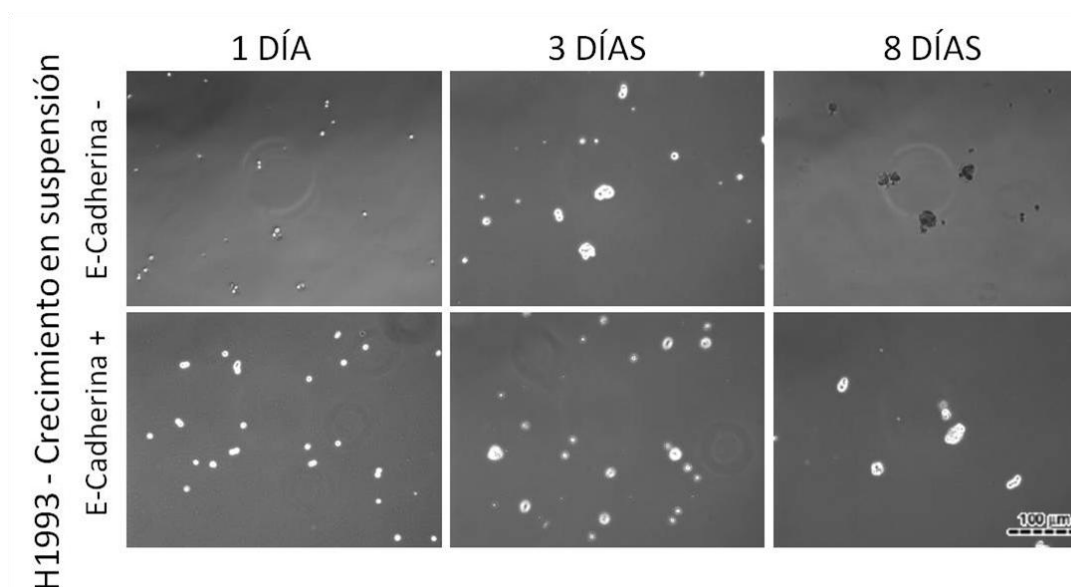


Figura 8. Crecimiento de la línea celular H1993 según la expresión o la ausencia de E-Cadherina. Aislamiento de dos poblaciones celulares en base a la presencia (fila inferior) o ausencia (fila superior) de la E-Cadherina en la línea celular H1993 y cultivo de ambas durante 8 días en condiciones de baja adherencia. En la esquina inferior derecha de la imagen se muestra la equivalencia de 100 μm a partir de las fotos realizadas con el microscopio óptico

4.4. Cinética de proliferación de células procedentes de muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico

En el laboratorio hemos analizado muestras de tumores procedentes de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico. Tras la disgregación de las muestras de tumor fresco procedentes de cáncer de pulmón no microcítico, la suspensión de células restante tras reservar una parte para los análisis mediante citometría de flujo se siembra en condiciones de baja adherencia y se suplementan los cultivos cada 3-4 días con la finalidad de comprobar la capacidad de formar esferas tumorales *in vitro*. La Figura 9 muestra los resultados obtenidos durante el cultivo de las células procedentes de los pacientes número 299, 300 y 301 durante un periodo de tres meses. La Figura 10 muestra los resultados obtenidos durante el cultivo de las células procedentes de los pacientes número 302, 303 y 304 en un periodo inferior (un mes) debido a que no hubo más tiempo. Como se puede observar, tal y como se obtuvo para el crecimiento de las líneas celulares tumorales H1395, H1650, H1993 y PC9 al cultivarlas en suspensión, las células procedentes de muestras de tumor de pacientes también se comportan de manera diferencial. En los pacientes 299 (Figura 9, fila superior), 300 (Figura 9, fila central), 301 (Figura 9, fila inferior) y 304 (Figura 10, fila inferior) se observa la formación de esferas tumorales *in vitro*; mientras que las células procedentes de los pacientes 302 (Figura 10, fila superior) y 303 (Figura 10, fila central) forman agregados celulares. Estos resultados nos muestran de una manera visual la heterogeneidad que presentan los distintos pacientes que padecen cáncer de pulmón no microcítico. La caracterización molecular de dichas suspensiones celulares

mediante citometría de flujo nos permite analizar con más detalle la heterogeneidad de los pacientes y a qué puede ser debida.

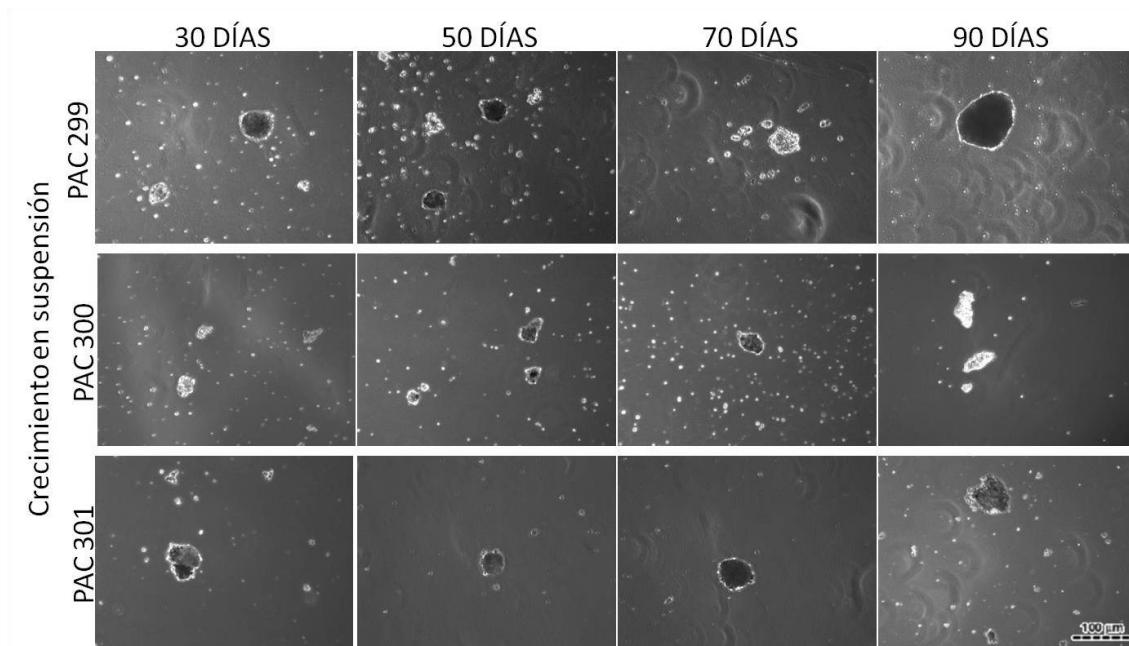


Figura 9. Crecimiento de las células procedentes de muestras de tumores procedentes de los pacientes 299, 300 y 301 con CPNM. Las suspensiones celulares obtenidas de las muestras de tejido tumoral se cultivan en condiciones de baja adherencia durante un periodo de 3 meses. En la fila superior se muestra la evolución en cultivo de las células del paciente 299, en la fila central las del paciente 300 y en la fila inferior las del paciente 301. En la esquina inferior derecha de la imagen se muestra la equivalencia de 100 μm a partir de las fotos realizadas con el microscopio óptico.

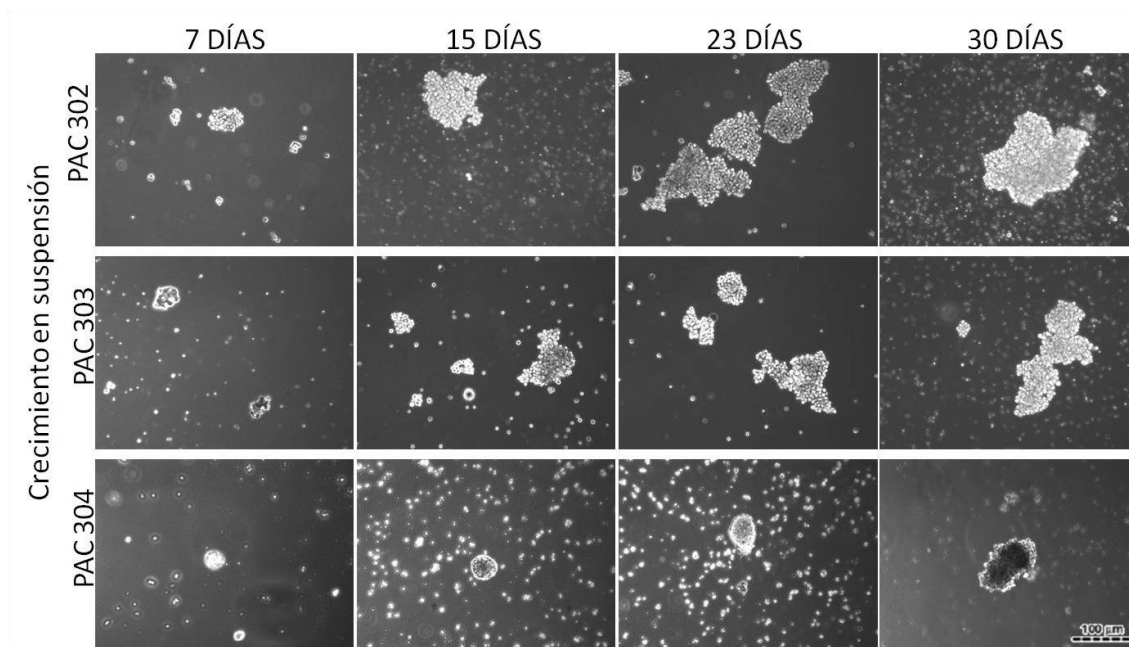


Figura 10. Crecimiento de las células procedentes de muestras de tumores procedentes de los pacientes 302, 303 y 304 con CPNM. Las suspensiones celulares obtenidas de las muestras de tejido tumoral se cultivan en condiciones de baja adherencia durante un periodo de treinta días. En la fila superior se muestra la evolución en cultivo de las células del paciente 302, en la fila central las del paciente 303 y en la fila inferior las del paciente 304. En la esquina inferior derecha de la imagen se muestra la equivalencia de 100 μm a partir de las fotos realizadas con el microscopio óptico.

4.5. Comparación de la expresión de proteínas de superficie en muestras de tejido sano y tejido tumoral mediante citometría de flujo

El presente experimento se analizó la expresión de marcadores de superficie celular entre muestras procedentes de tumores y de tejido sano del mismo paciente, realizado en paralelo a los análisis de las líneas celulares de CPNM. Para ello, se realizó una disgregación enzimática seguida de una disgregación mecánica de las muestras de tumor y del correspondiente tejido sano adyacente de manera simultánea y se analizó la suspensión celular restante mediante citometría de flujo. Las características principales de cada paciente, como subtipo de cáncer, edad, sexo y si presenta o no mutaciones en los principales genes mutados en CPNM se muestran en la Tabla Suplementaria 5 del Anexo II.

En este caso también se analizaron marcadores de superficie de célula madre o progenitora (CD44, CD90, CD117, CD133), marcadores de adhesión celular (CD326, CD166, CD34 y E-Cadherina), transportadores de la familia *ATP-binding cassette* (ABCG2) y receptores de quimiocinas CXCR4. Para tener en cuenta únicamente las células cancerosas y excluir del análisis el resto de tipos celulares, se utilizan los marcadores CD45 y CD31, ya que el primero es característico de células de origen hematopoyético y el CD31 se encuentra en las células de origen epitelial. Además, sólo se tienen en cuenta en los análisis las células vivas (CV). Sin embargo, en algunos casos no es posible analizar de manera simultánea la expresión de CD45 y CD31 con otros marcadores debido a que los rangos de fluorescencia de los fluoróforos a los que se encuentran conjugados algunos anticuerpos, como es el caso de ABCG2 y E-Cadherina conjugados a ficoeritrina (PE), solapan con ellos. En este caso, el análisis se realiza únicamente con respecto a las células vivas, tal y como se indica en las Tablas 6 y 7.

Los resultados que se muestran en las Tablas 6 y 7 son heterogéneos debido a que se han probado distintas combinaciones de anticuerpos en distintos análisis hasta ajustar el protocolo en el panel de anticuerpos concreto que se muestra en el apartado de Material y métodos. Por otra parte, algunas muestras presentaban alta tasa de necrosis celular, por lo que no fue posible realizar el análisis por citometría de flujo de las muestras de tejido sano y tumor. Por ejemplo, los resultados pertenecientes al paciente número 306 no se muestran porque debido al bajo número de células obtenido los resultados no son representativos de la población celular total. Por otra parte, en el caso de los pacientes 302 y 304 se recibió el cultivo celular en el laboratorio en lugar de la muestra de tejido sano y tumoral, por lo que tampoco se pudo realizar citometría de flujo.

Como se observa en la Tabla 6, no hay ninguna tendencia clara en la expresión de los marcadores de superficie analizados entre los pacientes. Por ejemplo, aunque parece que en 3 de los 4 pacientes de los que se tienen datos de la expresión de CD326 la tendencia es que su expresión disminuya en el tumor, en el paciente 292 se observa lo contrario. Por el contrario, parece que la expresión de CD90 aumenta en el tejido tumoral, pero sólo hay datos de los pacientes 289 y 290.

Tabla 6. Marcadores de superficie expresados en muestras de los tejidos sano y tumoral procedentes de distintos pacientes con CPNM. En la tabla se muestran los resultados obtenidos para los pacientes 289, 290, 291, 292 y 293 con respecto a las células vivas (CV), y con respecto a las células vivas, no hematopoyéticas (CD45-) ni de origen epitelial (CD31-). Un aumento en la expresión proteica se muestra en color rojo; mientras que la disminución se muestra en color azul.

% Marcaje	PACIENTE 289		PACIENTE 290		PACIENTE 291		PAC 292		PAC 293	
	Sano	Tumor	Sano	Tumor	Sano	Tumor	Sano	Tumor	Sano	Tumor
Células vivas (CV)	75,50	72,80	77,70	83,90	76,30	62,90	57,80	66,80	80,00	70,00
CV/CD45-/CD31-	68,00	38,00	17,30	6,66	16,70	2,39	40,10	13,70	10,00	24,00
CV/CD45-/CD31-/CD34+	-	-	5,26	21,30	0,00	0,00	10,10	4,52	0,60	0,60
CV/CD45-/CD31-/CD44+	-	-	0,00	20,00	0,00	3,00	38,50	30,10	0,60	0,60
CV/CD45-/CD31-/CD326+	-	-	84,40	26,10	81,80	59,20	7,53	30,10	56,00	44,00
CV/CD45-/CD31-/CD34+/CD44+	-	-	5,28	9,51	-	-	-	-	0,60	0,60
CV/CD45-/CD31-/CD34+/CD44-	-	-	0,62	15,00	-	-	-	-	-	-
CV/CD45-/CD31-/CD34-/CD44+	-	-	34,10	29,40	-	-	-	-	-	-
CV/CD45-/CD31-/CD34-/CD44-	-	-	60,00	46,10	-	-	-	-	-	-
CV/CD45-/CD31-/CD326+/CD44+	-	-	32,10	4,37	40,00	68,00	-	-	-	-
CV/CD45-/CD31-/CD90+	-	-	-	-	2,71	5,68	3,39	2,75	1,00	19,00
CV/CD45-/CD31-/CD90+/CD34+	-	-	-	-	-	-	0,90	0,54	-	-
CV/CD45-/CD31-/CD133+	-	-	-	-	0,00	0,00	-	-	-	-
CV/CD45-/CD31-/ABCG2+	-	-	-	-	0,00	0,00	-	-	-	-
CV/CD44+	-	18,5	82,30	69,10	-	-	-	-	0,10	0,60
CV/CD117+	5	1,7	0,16	0,16	0,00	0,00	0,25	1,17	0,10	2,00
CV/CXCR4+	0,9	1	33,80	51,60	-	-	-	-	-	-
CV/E-Cadherina+	33	13,8	8,05	32,70	-	-	39,60	13,40	0,20	0,00
CV/CD90+	14,9	23,3	2,92	4,21	-	-	-	-	-	-
CV/ABCG2	1,7	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-
CV/N-Cadherina+	2	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-
CV/CD326+	46,4	23,2	-	-	-	-	6,34	35,00	6,00	18,00
CV/CD34+	19,6	15,2	-	-	-	-	-	-	0,10	0,60
CV/CD133+	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00	0,00

En la Tabla 7 se muestran los resultados pertenecientes a la muestra del tumor del paciente 303 en el momento en que ésta llegó al laboratorio (Tabla 9, Columnas 2 y 3) y los resultados que corresponden con la citometría de flujo realizada una vez se cultivaron las células procedentes de dicha muestra y se formaron esferas tumorales (Tabla 9, Columna 4). El objetivo de este experimento fue comparar la expresión de los marcadores celulares en la muestra del paciente tras la extirpación del tumor y de las células una vez cultivadas para observar si hay o no diferencias. Mientras que, como en la mayoría de los otros pacientes, la expresión de CD326 disminuye en el tejido tumoral, se observa un gran aumento de la expresión de la proteína tras la formación de esferas tumorales *in vitro* a partir de las células procedentes de la muestra de tumor. Sin embargo, en la segunda réplica del paciente 303, se observa una disminución del marcador de superficie CD90 con respecto a la muestra en el día de llegada al laboratorio. Estos resultados muestran que existe una plasticidad en las células con propiedades de célula madre, ya que el porcentaje de expresión varía cuando el ensayo se

realiza al llegar la muestra al laboratorio y cuando se realiza tras conseguir formar esferas tumorales en cultivo *in vitro*.

Tabla 7. Marcadores de superficie expresados en muestras de los tejidos sano y tumoral del paciente 303 y de esferas tumorales formadas por células del mismo paciente una vez mantenidas en cultivo. En la tabla se muestran los porcentajes de células marcadas con los anticuerpos utilizados. Una disminución en la expresión proteica con respecto al tejido sano se muestra en azul; mientras que un aumento en la expresión proteica con respecto al tejido sano se muestra en azul. Además, en la columna "PACIENTE 303 (ESFERAS)" se muestran los resultados obtenidos para los mismos marcadores proteicos una vez las células han formado esferas tumorales.

Marcador	% Marcaje		PACIENTE 303		PACIENTE 303 (ESFERAS)	
	Sano	Tumor	Tumor	Tumor		
Células vivas (CV)	47,9	38,5		20,08		
CV/CD45-/CD31-	33,6	15,9		20,78		
CV/CD45-/CD31-/CD34+	-	-		-		
CV/CD45-/CD31-/CD44+	23	33,4		-		
CV/CD45-/CD31-/CD326+	48,47	37,61		-		
CV/CD45-/CD31-/CD326+CD166+	1,09	0,13		-		
CV/CD45-/CD31-/CD90+	4,06	3,47		0,094		
CV/CD44+	-	-		80,8		
CV/CD326+	16,7	6,79		81,58		
CV/CD326+E-Cadherina+	2,17	0,46		0,36		
CV/CD326+E-Cadherina-	6,83	3,32		-		
CV/CD326+CD166+	-	-		80,07		
CV/CD326+CD166-	-	-		1,58		
CV/CD326-CD166+	-	-		0,028		
CV/CD34+	10,4	0,84		-		
CV/CD117	-	-		0		
CV/CD326-CD34+	-	-		0,045		
CV/CD326+CD34+	-	-		0,44		
CV/CD326-ABCG2+	-	-		0,33		
CV/CD326+ABCG2+	-	-		0,57		

El inmunofenotipo policromático muestra la elevada heterogeneidad de las muestras tumorales para determinados marcadores de superficie. Es el caso de la molécula de adhesión CD326, que se expresa en todos los tumores analizados, con un rango de expresión que va desde el 2,43% hasta el 59,20%, y el del marcador de células mesenquimales CD90 que se expresa en todas las muestras, yendo su expresión desde el 0,29% hasta el 19,00%. El antígeno leucocitario CD45 también se expresa en todas las muestras con elevada heterogeneidad, estando también presente en la mayoría de las muestras el marcador de células precursoras hematopoyéticas CD34 (0-21,30%). Las células aisladas procedentes de tumores de pacientes se han sembrado en placas de baja adhesión para favorecer la formación de esferas tumorales y proceder con los estudios de análisis de rutas de señalización alteradas. En el laboratorio se ha conseguido generar esferas tumorales del paciente 303, que al ser analizadas por citometría de flujo han revelado estar enriquecidas en los marcadores de superficie CD326 y CD44;

mientras que el marcaje de CD90 disminuye (de un 3,47 a un 0,094%). Estas esferas tumorales se han inyectado subcutáneamente en ratón inmunodeprimido para estudiar su capacidad de iniciar tumores, y hemos podido observar que con la inyección de tan solo 2.000 células se ha generado un tumor a los 45 días de la inyección de las mismas. Actualmente se están analizando las propiedades del tumor generado para analizar si el fenotipo del tumor es idéntico al fenotipo del tumor del paciente. Todos los datos moleculares, histológicos y clínicos se integrarán para la obtención de una relación clínico-patológica y de pronóstico y además, serán la base para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas personalizadas, basadas en la selección de una combinación más racional de fármacos, que tendrá como objetivo eliminar la población de CMTs y que serán testadas en el modelo de xenotrasplante de ratón.

Sin embargo, no es posible relacionar todavía la expresión o no de marcadores de superficie con características clínico-patológicas ni saber si cierta combinación en la expresión de varias proteínas tiene un efecto concreto en los pacientes. Para ello, habrá que seguir la evolución de los pacientes y analizar un mayor número de muestras.

4.6. Caracterización de las líneas celulares tumorales mediante análisis de expresión de proteínas por ensayos Western Blot

En paralelo a los análisis de citometría también hemos analizado la expresión de determinadas proteínas intracelulares en las líneas celulares mediante Western Blot. Para ello, se utilizaron distintos anticuerpos para analizar si hay o no expresión de proteínas implicadas en distintas funciones celulares, como adhesión celular (EpCAM y Ezrin), ciclo celular (Ciclina A2 o CcnA2), pluripotencia (Nanog, Sox2 y Oct4), citoesqueleto (Tubulina y Actina) y metabolismo celular (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o GAPDH), cuyos pesos moleculares esperados se detallan en la Tabla 3 del apartado Material y Métodos. La proteína HSP90 se utiliza como normalizadora, para asegurar que la carga es uniforme en todas las líneas y condiciones en las que se realiza el experimento (Figura 11).

4.6.1. El patrón de fragmentación de EpCAM varía entre las líneas celulares y condiciones de cultivo

La molécula de adhesión celular epitelial (CD326 o EpCAM) es una proteína que se encuentra en la superficie celular de las células epiteliales que participa en el equilibrio de diferenciación y proliferación de dichas células. Es una glicoproteína de transmembrana que presenta frecuentemente niveles altos de expresión en neoplasias humanas, incluyendo cáncer de colon y mama. Se ha descrito que un incremento en la expresión de CD326 está relacionado con una peor prognosis en cánceres de tipo epitelial. Puesto que hemos observado que se expresa en la superficie de las células derivadas de tumores de pacientes y en las diferentes líneas celulares analizadas, hemos también analizado la expresión intracelular de esta proteína mediante Western Blot. Esta proteína puede ser fragmentada por residuos aminoacídicos específicos, generando diferentes fragmentos que están involucrados en la activación de cascadas de señalización, aunque la consecuencia funcional de cada uno de ellos no está clara (Schnell et al., 2013).

Las bandas esperadas para CD326 son de 40 kDa (proteína completa) y alrededor de 35 kDa (proteína fragmentada entre los residuos de arginina 80 y 81 en condiciones reductoras). Los resultados obtenidos no sólo muestran las bandas esperadas, sino otras dos bandas

adicionales alrededor de los 70 kDa (Figura 11). El porcentaje de fragmentos obtenidos en cada línea celular es diferente, por lo que podría tener consecuencias funcionales en las células tumorales. Por lo tanto, sería interesante determinar la consecuencia funcional de los fragmentos generados y si estos pueden modular cascadas de señalización que confieran propiedades de célula madre a las células tumorales.

En la línea celular H1395 no se aprecian diferencias en el patrón de expresión de CD326 en las células crecidas en adherencia o en suspensión. Sin embargo sí apreciamos diferencias en el resto de líneas celulares analizadas. Se observa la aparición de un fragmento adicional de aproximadamente 30 kD cuando las células están crecidas en condiciones de baja adherencia en las líneas H1650 y H1993, que son las líneas celulares en las que se ha observado la capacidad de formar esferas tumorales. Por último, en la línea PC9 se observa mayor expresión de la proteína completa en condiciones de adherencia con respecto a a las células cuando se cultivan en suspensión.

La relación funcional que hemos observado entre la expresión de CD326 y la formación de esferas *in vitro* indica que CD326 podría ser un marcador de CMTs. Se ha descrito que CD326 está sobreexpresado en progenitores epiteliales, carcinomas y en células iniciadoras de tumores en cáncer de colon y mama. Se ha postulado que su función es actuar como molécula de adhesión inhibidora de la actividad de E-cadherina. CD326 es un activador de c-myc, promoviendo el ciclo celular y la proliferación. Sin embargo, es necesario identificar qué factores adicionales tienen las esferas tumorales CD326(+) obtenidas en el laboratorio para caracterizar los diferentes marcadores que las definen.

4.6.2. La expresión de proteínas CiclinaA2 varía en las distintas líneas celulares y condiciones de cultivo

La ciclina A2 se encuentra expresada en todos los tejidos testados hasta el momento. Durante el ciclo celular, se une a la quinasa dependiente de ciclina 2 (CDC2 o CDK2) activándola, y por tanto promueve las transiciones de las fases G1a S y G2 a M (National Center for Biotechnology Information, 2014). En la Figura 11 observamos que la expresión de ciclina A2 disminuye cuando las células son crecidas en suspensión, indicando que tienen una proliferación más lenta que las células crecidas en adherencia. Esto podría ser una prueba preliminar de que las células con propiedades de célula madre se encuentran en un estado de quiescencia al formar las esferas tumorales, por lo que la división es más lenta. Como consecuencia, estas células no se verían afectadas por tratamientos convencionales de quimio y radioterapia, cuya diana son las células que se encuentran en división.

4.6.3. Las líneas celulares tumorales procedentes de adenocarcinoma de pulmón expresan marcadores de pluripotencia

Los factores de transcripción Sox2, Oct4 y Nanog son capaces de regular factores que inhiben la diferenciación celular y promueven la auto-renovación (Takahashi and Yamanaka, 2006). Además, la expresión de estas proteínas está implicada en la reprogramación de células diferenciadas en células con propiedades de célula madre pluripotentes (He et al., 2009). Debido a la implicación de los tres factores de transcripción en rutas de renovación y reprogramación, se decidió analizar su expresión en las líneas celulares procedentes de adenocarcinoma. Aunque no se consiguieron resultados para Oct4 probablemente por algún error durante el procedimiento experimental como una excesiva dilución de los anticuerpos, sí

se observa expresión de los otros factores de transcripción en las distintas líneas celulares y condiciones de cultivo, tal y como se observa en la Figura 11. En ambos casos, el mayor incremento de expresión se observa en la línea celular H1395 en condiciones de baja adherencia. Este resultado indica que en la población celular sí hay células con propiedades de célula madre, ya que la pluripotencia es una característica de éstas en ambas condiciones de cultivo en las distintas líneas celulares.

4.6.4. El citoesqueleto se encuentra alterado al crecer las células en distintas condiciones de cultivo

Las proteínas relacionadas con el citoesqueleto celular, como la actina o la tubulina, suelen utilizarse como normalizadoras de carga en este tipo de experimentos. Sin embargo, en las células cancerosas se observa que sí existe una variación en la expresión de las proteínas, por lo que están ocurriendo cambios en el citoesqueleto de las mismas cuando éstas son cultivadas en condiciones de adherencia o baja adherencia (Figura 11). Debido a esto, la única proteína que se pudo utilizar como normalizadora en los experimentos fue HSP90. Aunque los resultados obtenidos son preliminares y será necesaria la confirmación de los mismos, parece que en las cuatro líneas celulares la β -tubulina aumenta su expresión en cuando las células se cultivan en suspensión. Por otra parte, mientras que la expresión de actina parece ser casi invariable en las líneas H1650 y PC9, su expresión es mayor en la línea H1395 y en la línea H1993 en condiciones adherentes con respecto a la expresión en condiciones de baja adherencia. Por último, la enzima GAPDH se encuentra más expresada en suspensión en las líneas H1650 y PC9, pero los resultados no parecen variar de manera significativa en las otras dos líneas celulares.

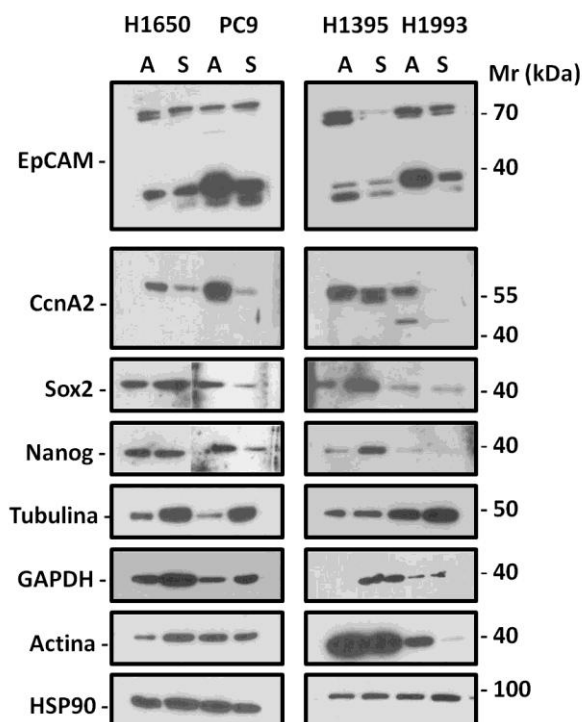


Figura 11. Expresión de CD326 (EpCAM), CcnA2, Sox2, Nanog, Tubulina, GAPDH y Actina en las cuatro líneas celulares tumorales procedentes de CPNM (H1395, H1993, H1650 y PC9) en distintas condiciones de cultivo detectada mediante ensayos Western Blot. El peso molecular de las bandas obtenidas en cada caso se muestra a la derecha de la imagen. *A: Adherencia; S: Suspensión.

5. Conclusiones

- Las distintas líneas celulares procedentes de cáncer de pulmón no microcítico, subtipo adenocarcinoma (H1395, H1650, H1993 y PC9) presentan una cinética de crecimiento diferente al compararlas entre ellas. Además, se observan diferencias morfológicas en el cultivo, tanto cuando se cultivan en condiciones adherentes como cuando se cultivan en condiciones de baja adherencia.
- Al cultivar las distintas líneas celulares en condiciones de baja adherencia, se observa que sólo las líneas H1650 y H1993 tienen la capacidad de formar esferas tumorales regulares y redondas. Sin embargo, en las líneas H1395 y PC9 se forman agregados masivos e irregulares de células, pero no esferas tumorales.
- Las líneas celulares analizadas expresan de manera diferencial los diferentes marcadores de superficie utilizados, siendo los de mayor expresión CD326 y CD44.
- La hipótesis que las CMTs está mantenida por una subpoblación de células madre (troncales) o progenitoras mientras que el resto de células no troncales tiene una vida limitada induce a pensar que la modulación de componentes específicos de las rutas reguladoras de las CMTs podría ser un mecanismo de control de las células cancerosas. Las células CD326 (+) están enriquecidas para la capacidad de propagar las esferas tumorales *in vitro* y por lo tanto CD326 es un potencial marcador de CMTs de CPNM. También hemos comprobado que ni E-cadherina, ni CD166 y ni CD90 tienen la capacidad propagadora de tumores.
- Las células del paciente 303 se analizaron después de que formaran esferas tumorales en cultivo *in vitro* y se observó que se habían enriquecido en los marcadores CD326 y CD44, confirmando que éstos son marcadores potenciales de CMTs de CPNM.

6. Referencias bibliográficas

AL-HAJJ, M.; WICHA, M.S.; BENITO-HERNANDEZ, A.; MORRISON, S.J. AND CLARKE, M.F. (2003): Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**: 3983-3988.

ALAMGEER M.; PEACOCK C. D.; MATSUI W.; GANJU V. AND WATKINS D. N. (2013): Cancer stem cells in lung cancer: Evidence and controversies. *Respirology*, **18**: 757-764.

ALISON, M.R.; LE BRENNE, A.C. AND ISLAM, S. (2009): Stem cells and lung cancer: future therapeutic targets? *Expert Opin Biol. Ther.*, **9**: 1127-1141.

AMERICAN CANCER SOCIETY (2013): What is non-small cell lung cancer?

ARTAVANIS-TSAKONAS, S.; RAND, M.D. AND LAKE, R.J. (1999): Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, **284**: 770-776.

ASKOXYLAKIS, V.; THIEKE, C.; PLEGER, S.; MOST, P.; TANNE, J.; LINDEL, K.; KATUS, H.A.; DEBUS, J. AND BISCHOF, M. (2010): Long-term survival of cancer patients compared to heart failure and stroke: a systematic review. *BMC Cancer*, **10**: 105.

BERTOLINI, G.; ROZ, L.; PEREGO, P.; TORTORETO, M.; FONTANELLA, E.; GATTI, L.; PRATESI, G.; FABBRI, A.; ANDRIANI, F.; TINELLI, S.; ROZ, E.; CASERINI, R.; SALVATORE, L.V.; CAMERINI, T.; MARIANI, L.; DELIA, D.; CALABRÒ, E.; PASTORINO, U. AND SOZZI, G. (2009): Highly tumorigenic lung cancer CD133 cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106-38**: 16281-16286.

BERX, G. AND VAN ROY, F. (2009): Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **1**: a003129.

BONNET, D. AND DICK, J.E. (1997): Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.*, **3**: 730-737.

BRUCE, W.R. AND VAN DER GAAG, H. (1963): A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature*, **199**: 79-80.

BOSCH BARRERA, J.; LÓPEZ-PICAZO GONZÁLEZ, J.M.; GARCÍA-FONCILLAS LÓPEZ, J. AND PRÓSPER CARDOSO, F. (2007): Células madre y cáncer: dilucidando el origen de la célula madre tumoral. *Rev Med Univ Navarra*, **51-2**: 14-17.

CAVALLARO, U. AND CHRISTOFORI, G. (2004): Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **4**: 118-132.

CHO, R.W.; WANG, X.; DIEHN, M.; SHEDDEN, K.; CHEN, G.Y.; SHERLOCK, G.; GURNEY, A.; LEWICKI, J. AND CLARKE, M.F. (2008): Isolation and Molecular Characterization of Cancer Stem Cells in MMTV-Wnt-1 Murine Breast Tumors. *Stem Cells*, **26**: 364-371.

CHUTE, J.P.; MURAMOTO, G.G.; WHITESIDES, J.; COLVIN, M.; SAFI, R.; CHAO N.J. AND MCDONELL, D.P. (2006): Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces

the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**: 11707-11712.

CICCIA, A. AND ELLEDGE, S.J. (2010): The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell*, **40**: 179–204.

COLLINS, A.T.; BERRY, P.A.; HYDE, C.; STOWER, M.J. AND MAITLAND, N.J. (2005): Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 65-23: 10946-51.

DALERBA P.; CHO R. W. AND CLARKE M. F. (2006): Cancer Stem Cells: Models and Concepts. *Annu. Rev. Med.* 58:267-84.

DEBERARDINIS, R.J.; LUM, J.J.; HATZIVASSILIOU, G. AND THOMPSON, C.B. (2008): The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.*, **7**: 11–20.

DENARDO, D.G.; ANDREU, P. AND COUSSENS, L.M. (2010): Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.*, **29**: 309–316.

DENG S.; YANG X.; LASSUS H.; LIANG, S.; LAUR, S.; YE, Q.; WANG, L.P.; ROBY, K.F.; ORSULIC, S.; CONNOLLY, D.C.; ZANG, Y.; MONTONE, K.; BÜTZOW, R.; COUKOS, G.; ZANG, L. (2010): Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *PLoS One*, **5-4**: Article ID e10277.

DONG, J.; KISLINGER, T.; JURISICA, I. AND WIGLE, D.A. (2009): Lung cancer developmental networks gone awry? *Cancer Biol Ther.*, **8**: 312–318.

ERAMO, A.; LOTTI, F.; SETTE, G.; PILOZZI, E.; BIFFONI, M.; DI VIRGILIO, A.; CONTICELLO, C.; RUCO, L.; PESCHLE, C. AND DE MARIA, R. (2008): Identification and expansion of tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell death and Differentiation*, **15-3**: 504-514.

EVANS, M.J.; CABRAL, L.J.; STEPHENS, R.J. AND FREEMAN, G. (1973): Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO₂. *Am. J. Pathol.*, **70**: 175–198.

EVANS, M. J.; CABRAL, L.J. AND FREEMAN, G. (1978): Role of the clara cell in renewal of the bronchiolar epithelium. *Laboratory Investigation*, **38-6**: 648–655.

FRIEDBERG, E.C.; AGUILERA, A.; GELLERT, M.; HANAWALT, P.C.; HAYS, J.B.; LEHMANN, A.R.; LINDAHL, T.; LOWNDES, N.; SARASIN, A. AND WOOD, R.D. (2006): DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair*, **5**: 986–996.

GIANGRECO, A.; REYNOLDS, S.D. AND STRIPP, B.R. (2002): Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *American Journal of Pathology*, **161-1**: 173–182.

GIANGRECO, A.; GROOT, K.R. AND JANES, S.M. (2007): Lung cancer and lung stem cells: strange bedfellows? *Am J Pathol*, **161**: 173-182.

GRIFFITHS, M.J.; BONNET, D. AND JANES, S.M. (2005): Stem cells of the Alveolar epithelium. *Lancet*, **366-9481**: 249–260.

- GINESTIER, C.; HUR, M.H.; CHARAFE-JAUFFRET, E.; MONVILLE, F.; DUTCHER, J.; BROWN, M.; JACQUEMIER, J.; VIENS, P.; KLEER, C.G.; LIU, S.; SCHOTT, A.; HAYES, D.; BIRNBAUM, D.; WICHA, M.S. AND DONTU, G. (2007): ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, **1**: 555–567.
- GONDA, T.A.; TU, S. AND WANG, T.C. (2009): Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. *Cell Cycle*, **8**: 2005–2013.
- GRIVENNIKOV, S.I.; GRETEN, F.R. AND KARIN, M. (2010): Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, **140**: 883–899.
- HAMBURGER, A.W. AND SALMON, S.E. (1977): Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**: 461–463
- HANAHAH, D. AND FOLKMAN, J. (1996): Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, **86**: 353–364.
- HANAHAH, D. AND WEINBERG, R.A. (2000): The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**: 57-70.
- HANAHAH, D. AND WEINBERG, R.A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**: 646-674
- HARPER, J.W. AND ELLEDGE, S.J. (2007): The DNA damage response: Ten years after. *Mol. Cell*, **28**: 739–745.
- HASSAN, H. T. (2009): c-Kit expression in human normal and malignant stem cells prognostic and therapeutic implications. *Leukemia Research*, **33-1**: 5–10.
- HE, S.; NAKADA, E. AND MORRISON, S.J. (2009): Mechanisms of stem cell self-renewal. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, **25**: 377-406.
- HENG, H.H.; STEVENS, J.B.; LIU G.; BREMER, S.W.; YE, K.J.; REDDY, P.V.; WU G.S.; WANG, Y.A.; TAINSKY, M.A. AND YE, C.J. (2006): Stochastic cancer progression driven by non-clonal chromosome aberrations. *J. Cell Physiol.*, **208**: 461-472.
- HO, M.M.; NG, A.V.; LAM, S. AND HUNG, J.Y. (2007): Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Research*, **67-10**: 4827–4833.
- HONG, K.U.; REYNOLDS, S.D.; WATKINS, S.; FUCHS, E. AND STRIPP, B.R. (2004): Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am. J. Pathol.*, **164**: 577–588.
- HSU, P.P. AND SABATINI, D.M. (2008): Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, **134**: 703–707.
- ISHII, Y.; REX, M.; SCOTTING, P.J. AND YASUGI, S. (1998): Regionspecific expression of chicken Sox2 in the developing gut and lung epithelium: regulation by epithelial-mesenchymal interactions. *Developmental Dynamics*, **213-4**: 464–475.
- JACKSON, S.P. AND BARTEK, J. (2009): The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, **461**: 1071–1078.

JONES, R.G. AND THOMPSON, C.B. (2009): Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.*, **23**: 537–548.

KARNOUB, A.E. AND WEINBERG, R.A. (2007): Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis.*, **26**: 75–85.

KASTAN, M.B. (2008): DNA damage responses: mechanisms and roles in human disease: 2007 G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Mol. Cancer Res.*, **6**: 517–524.

KELSEY, C.R.; MARKS, L.B.; HOLLIS, D.; HUBBS, J.L.; READY, N.E.; D'AMICO, T.A. AND BOYD, J.A. (2009): Local recurrence after surgery for early stage lung cancer: an 11-year experience with 975 patients. *Cancer*, **115**: 5218–5227.

KROEMER, G., AND POUYSSEGUR, J. (2008): Tumor cell metabolism: *Cancer's Achilles' heel*. *Cancer Cell*, **13**: 472–482.

KWAK, E.L.; BANG, Y.J.; CAMIDGE, D.R.; SHAW, A.T.; SOLOMON, B.; MAKI, R.G.; OU, S.H.; DEZUBE, B.J.; JÄNNE, P.A.; COSTA, D.B.; VARELLA-GARCIA, M.; KIM, W.H.; LYNCH, T.J.; FIDIAS, P.; STUBBS, H.; ENGELMAN, J.A.; SEQUIST, L.V.; TAN, W.; GANDHI, L.; MINO-KENUDSON, M.; WEI, G.C.; SHREEVE, S.M.; RATAIN, M.J.; SETTLEMAN, J.; CHRISTENSEN, J.G.; HABER, D.A.; WILNER, K.; SALGIA, R.; SHAPIRO, G.I.; CLARK, J.W. AND IAFRATE, A.J. (2010): Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.*, **363-18**: 1693-1703.

LAPIDOT, T.; SIRERD, C.; VORMOOR, J.; MURDOCH, B.; HOANG, T.; CACERES-CORTES, J.; MINDEN, M.; PATERSON, B.; CALIGUIRI, M. AND DICK, J.E. (1994): A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, **367**: 645-648.

LEE, K. S.; LEE, Y. S.; LEE, J.M.; ITO, K.; CINGHU, S.; KIM, J.H.; JANG, J.W.; LI, Y.H.; GOH, Y.M.; CHI, X.Z.; WEE, H.; LEE, H.W.; HOSOYA, A.; CHUNG, J.H.; JANG, J.J.; KUNDU, J.K.; SURH, Y.J.; KIM, W.J.; ITO, Y.; JUNG, H.S. AND BAE, S.C. (2010): Runx3 is required for the differentiation of lung epithelial cells and suppression of lung cancer. *Oncogene*, **29-23**: 3349–3361.

LYNCH, T.J., BELL, D.W., SORDELLA, R., GURUBHAGAVATULA, S., OKIMOTO, R.A., BRANNIGAN B.W., HARRIS, P.L., HASERLAT, SUPKO J.G., HALUSKA F.G., LOUIS, D.N., CHRISTIANI, D.C., SETTLEMAN, J. AND HABER, D.A. (2004): Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *The New England Journal of Medicine*, **350-21**: 2129-2139.

LU, Y.; FUTTNER, C.; ROCK, J.R.; XU, X.; WHITWORTH, W.; HOGAN, B.L.M. AND ONAITIS, M.W. (2010): Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung. *PLoS One*, **5-6**: e11022.

LUNDIN, A. AND DRISCOLL, B. (2012): Lung cancer stem cells: progress and prospects. *Cancer Lett.*, **338-1**: 89-93.

MARHABA, R. AND ZOLLER, M. (2004): CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J. Mol. Histol.*, **35**: 211-231.

MATSUI, W.; HUFF, C.A.; WANG, Q.; MALEHORN, M.T.; BARBER, J.; TANHEHCO, Y.; SMITH, B.D.; CIVIN, C.I. AND JONES, R.J. (2004): Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood*, **103**: 2332–2336.

MOREB, J.S. (2008): Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, **3**: 237–246.

NEGRINI, S.; GORGOULIS, V.G. AND HALAZONETIS, T.D. (2010): Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**: 220–228.

PATTABIRAMAN, D.R. AND WEINBERG, R. A. (2014): Tackling the cancer stem cells – what challenges do they pose? *Nature Reviews*, **13**: 497-512.

PEACOCK, C.D. AND WATKINS, D.N. (2008): Cancer stem cells and the ontogeny of lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, **26**: 2883–2889.

O'BRIEN, C.A.; POLLETT, A.; GALLINGER, S. AND DICK, J.E. (2007): A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, **445**: 106-110.

POTTER, V.R. (1958): The biochemical approach to the cancer problem. *Fed. Proc.*, **17**: 691–697.

QIAN, B.Z., AND POLLARD, J.W. (2010): Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, **141**: 39–51.

RAICA, M.; CIMPEAN, A.M. AND RIBATTI, D. (2009): Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur. J. Cancer*, **45**: 1924–1934.

REYNOLDS, S.D. AND MALKINSON, A.M. (2010): Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **42**: 1–4.

RIVERA, C.; RIVERA, S.; LORIOT, Y.; VOZENIN, M. AND DEUTSCH, E. (2011): Lung Cancer Stem Cell: New Insights on Experimental Models and Preclinical Data. *Journal of Oncology*, **2011**: 1-10.

SALNIKOV, A.V.; GLADKICH, J.; MOLDENHAUER, G.; VOLM, M.; MATTERN, J. AND HERR, I. (2010): CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. *Int. J. Cancer*, **126**: 950–8.

SANT, M.; ALLEMANI, C.; SANTAQUILANI, M.; KNIJN, A.; MARCHESI, F.; CAPOCACCIA, R.; EUROCORE WORKING GROUP (2009): EUROCORE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer*, **45-6**: 931-991.

SCHNELL, U., KUIOERS, J. AND GIEPMANS, G. (2013): EpCAM proteolysis: new fragments with distinct functions? *Biosci. Rep.*, **33**: 321-332.

SEMENZA, G.L. (2010): HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **20**: 51–56.

SHARMA, S.V.; HABER, D.A AND SETTLEMAN, J. (2010): Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nature Reviews Cancer*, **10**: 241-253.

- SHAW, A.T.; KIM, D.W.; MEHRA, R.; TAN, D.S.; FELIP, E.; CHOW, L.Q.M.; CAMIDGE, R.; VANSTEENKISTE, J.; SHARMA, S.; DE PAS, T.; RIELY, G.J.; SOLOMON, B.J.; WOLF, J.; THOMAS, M.; SCHULER, M.; LIU, G.; SANTORO, A.; LAY, Y.Y.; GOLDWASSER, M.; BORAL, A.L. AND ENGELMAN, J.A. (2014): Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.*, **370-13**: 1189-1197.
- SHIELDS, J.D.; KOURTIS, I.C.; TOMEI, A.A.; ROBERTS, J.M. AND SWARTZ, M.A. (2010): Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science*, **328**: 749–752.
- SUTHERLAND, K.D. AND BERNS, A. (2010): Cell of origin of lung cancer. *Mol. Oncol.*, **4**: 397–403.
- SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D. AND JEMAL, A. (2012): Worldwide cancer incidence statistics. *CA Cancer J Clin*, **62**: 10–29.
- SINGH, S.K.; CLARKE, I.D.; TERASAKI, M.; BONN V.E.; HAWKINS, C.; SQUIRE, J. AND DIRKS, P.B. (2003): Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.*, **63-18**: 5821-5828.
- STEVENS, T.P.; MCBRIDE, J.T.; PEAKE, J.L.; PINKERTON, K.E. AND STRIPP, B.R. (1997): Cell proliferation contributes to PNEC hyperplasia after acute airway injury. *American Journal of Physiology*, **272-3**: 486–493.
- TAKAHASHI, K. AND YAMANAKA, S. (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126-4**: 663–676.
- TILL, J. E. AND MCCULLOCH, E. A. (1961): A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *RADIATION RESEARCH*, **14**: 213-222.
- VAN SOYK, M.; RANDALL, J., SERGEW, A.; WILLIAMS, L.M.; TENNIS, M. AND WINN, R.A. (2008): Wnt signaling pathway and lung disease. *Translational Res.*, **151**: 175-180.
- VANDER HEIDEN, M.G.; CANTLEY, L.C. AND THOMPSON, C.B. (2009): Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, **324**: 1029–1033.
- VARJOSALO, M. AND TAIPALE, J. (2008): Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.*, **22**: 2454–72.
- WARBURTON, D.; BERBERICH, M. AND DRISCOL, B. (2004): Stem/progenitor cells in lung morphogenesis, repair and regeneration. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **64**: 1–16.
- YANG, L.; PANG, Y. AND MOSES, H.L. (2010): TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.*, **31**: 220-227.
- ZHANG, X.; HAN, B.; HUANG, J.; ZHENG, B.; GENG, Q.; AZIZ, F. AND DONG, Q. (2010): Prognostic significance of OCT4 expression in adenocarcinoma of the lung. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, **40-10**: 961–966.

ZHONG, Y.; ZHOU, C.; MA, W.; WANG, D.; GUO, S.; SU, X. AND ZHANG, S. (2007): Most MCF7 and SK-OV3 cells were deprived of their stem nature by Hoechst 33342. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **364**: 338–343.

ZHONG, Y.; CARMELLA, S.G.; UPADHYAYA, P.; HOCHALTER, J.B.; RAUCH, D.; OLIVER, A.; JENSEN, J.; HATSUKAMI, D.; WANG, J.; ZIMMERMAN, C. AND HECHT, S.S. (2011): Immediate Consequences of Cigarette Smoking: Rapid Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Diol Epoxides. *Chem Res Toxicol*, **24-2**: 246-252.

8. Bibliografía complementaria

GENETICS HOME REFERENCE (2013): EpCAM

NATIONAL CANCER INSTITUTE (2013): Metastatic cancer.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2014): CCNA2, cyclin A2 [*Homo sapiens* (human)]

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (2009): Stem cell information.

MEDSCAPE (2014): Genetics of Non-Small Cell Lung Cancer.

MY CANCER GENOME™ (2010): Molecular Profiling of Lung Cancer.

9. Anexos

9.1. Anexo I

Tabla S.1. Líneas celulares tumorales procedentes de cáncer de pulmón no microcítico y sus propiedades.

	H1993	H1395	H1650	PC9
Organismo	<i>Homo sapiens</i> , humano	<i>Homo sapiens</i> , humano	<i>Homo sapiens</i> , humano	<i>Homo sapiens</i> , humano
Sexo	Mujer	Mujer	Hombre	No especificado
Edad	47	55	27	No especificado
Grupo étnico	Caucásica	Caucásica	Caucásico	No especificado
Tejido de procedencia	Pulmón, derivada de región metastásica: nodo linfático	Pulmón	Pulmón, derivada de región metastásica: derrame pleural	Pulmón, tejido diferenciado
Morfología/Tipo celular	Epitelial	Linfoblasto	Epitelial	Mezcla heterogénea de células redondas y fusiformes
Enfermedad de la que proviene	Cáncer de pulmón no microcítico	Cáncer de pulmón no microcítico	Cáncer de pulmón no microcítico	Cáncer de pulmón no microcítico
Subtipo de la enfermedad	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma
Etapas de la enfermedad	3A	2	3B	No especificado
Mutación representativa	Amplificación en el gen MET, que codifica un receptor de tipo tirosina kinasa	Delección en el proto-onco gen BRAF1. Hipotriploide	Delección en el gen que codifica el receptor del factor de crecimiento epitelial o EGFR ($\Delta E746-A750$)	Delección en el gen que codifica el receptor del factor de crecimiento epitelial o EGFR ($\Delta E746-A750$)

Tabla S.2. Anticuerpos utilizados en los ensayos de citometría de flujo. En la tabla se especifican los distintos anticuerpos utilizados, la concentración de los mismos y la fuente de donde han sido obtenidos.

Anticuerpo	Fuente
Anti-Human CD326 (EpCAM) - FITC	Miltenyi Biotec Inc.
Anti-Human CD166 (ALCAM) PerCP-eFluor®710	eBioscience®
PE-Cy™7 Mouse Anti-Human CD44	BD Pharmingen™
PE-CF594 Mouse Anti-Human CD90	BD Horizon™
Anti-CD34- PC5	IOTest®
Anti-hBcrp1/ABCG2 Phycoerythrin Conjugated Mouse IgG _{2B}	R&D Systems®
Monoclonal Anti-Human E-Cadherina-Phycoerythrin	R&D Systems®
Anti-CD133/1 (AC133)	Miltenyi Biotec Inc.
Anti-CD133/2 (293C3)	Miltenyi Biotec Inc.
Anti-CD117-PC5	IOTest®
PE Mouse Anti-Human CD45	BD Pharmingen™
PE Mouse Anti-Human CD31	BD Pharmingen™

Tabla S.3. Isotipos utilizados en los ensayos de citometría de flujo. En la tabla se especifican los distintos anticuerpos utilizados, la concentración de los mismos y la fuente de donde han sido obtenidos.

Isotipo	Fuente
Mouse IgG1-FITC	Miltenyi Biotec Inc.
PE Mouse IgG1, κ Isotype Control	BD Pharmingen™
PE-CF594 Mouse IgG1, κ Isotype Control	BD Horizon™
Mouse IgG1, κ Isotype Control PerCP-eFluor710	eBioscience®
PE-Cy™7 Mouse IgG _{2B} , κ Isotype Control	BD Pharmingen™
Mouse IgG _{2B} Isotype Control-APC	R&D Systems®
Iso-PC5	IOTest®

Tabla S.4. Anticuerpos utilizados en los ensayos Western Blot. En la tabla se especifican los distintos anticuerpos utilizados, la concentración de los mismos y la fuente de donde han sido obtenidos.

Anticuerpo	Fuente
Anti- Actina C-2 monoclonal -	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-α-Hsp90 monoclonal - isotipo IgG de ratón) -	abcam [®]
Anti-β-tubulina monoclonal (isotipo de ratón IgG1),	Sigma-Aldrich [®]
Ani-GAPDH-Peroxidasa monoclonal -isotipo IgM de ratón -	Sigma-Aldrich [®]
Anti-Ezrin monoclonal, isotipo IgG1 de ratón	Thermo Fisher Scientific – Pierce Biotechnology
Anti-Oct4 monoclonal	Millipore TM
Anti-EpCAM monoclonal	abcam [®]
Anti-human Nanog polyclonal	R&D Systems [®] , Inc.
Anti-human/mouse-SOX2 monoclonal	R&D Systems [®] , Inc.
Anti-CcnA2	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-Mouse IgG (específico de la cadena κ) conjugado a peroxidasa	Sigma Aldrich [®]
Donkey Anti-Rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Donkey Anti-Goat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

9.2. Anexo II

Tabla S.5 Características de los pacientes de los cuales proceden las muestras de tejidos tumoral y sano mostrados en los resultados del presente proyecto. En la tabla se muestran las características (Caract.) principales de los pacientes cuyas muestras han sido analizadas, como la edad, sexo, subtipo de CPNM (AC=adenocarcinoma; SCC=carcinoma de células escamosas), estadio de la enfermedad y si presenta o no mutaciones en algunos de los genes que se encuentran con más frecuencia mutados en CPNM.

Paciente Caract.	289	290	291	292	293	303
Edad	70	70	66	62	70	57
Sexo	Varón	Varón	Varón	Mujer	Varón	Varón
Tipo de tumor	AC	SCC	SCC	AC	SCC	AC
Estadio de la enfermedad	IIA	IIB	IIA	IA	IIA	-
Mutaciones	-	-	-	-	-	-
Fumador	Ex fumador	Ex fumador	Fumador	Fumador	Ex fumador	No lo indica