

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



***TÍTULO:* Caracterización de la Interacción entre Célula Madre Tumoral y Microambiente Inmune en el Cáncer de Pulmón no Microcítico.**

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNO/A: SUSANA TORRES MARTÍNEZ

TUTOR/A: ELOISA JANTUS LEWINTRE

CO-TUTORA: SILVIA CALABUIG FARIÑAS

Curso Académico: 2015-2017

VALENCIA, 05/07/2017

RESUMEN PARA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER DE BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

D.^a Susana Torres Martínez

Del Trabajo Fin de Máster titulado:

Caracterización de la Interacción entre Célula Madre Tumoral y Microambiente Inmune en el Cáncer de Pulmón no Microcítico.

Aporta el siguiente **RESUMEN**:

Introducción: El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) sigue siendo uno de los tumores sólidos con mayor mortalidad en el mundo. La adquisición de resistencias a los tratamientos, unido con la falta de efectividad de los mismos sobre las células madre tumorales (*Cancer Stem Cells*, CSCs) y los mecanismos de inmunoevasión promulgados por el tumor, son unas de las causas principales que explican la elevada mortalidad. Las CSCs en CPNM son dianas pobremente reconocidas por el sistema de vigilancia inmunológica, formando un importante mecanismo de escape inmune tumoral y favoreciendo la existencia de un ambiente inmunosupresor el cual es crucial durante la tumorigénesis. Además, las células inmunes que infiltran el tumor son también capaces de modular la capacidad de las células tumorales, haciendo que adquieran características *stem-like*, favoreciendo aún más la progresión, metástasis y resistencias a los tratamientos. En consecuencia, el objetivo del presente trabajo consistió en aislar y analizar marcadores de las células tumorales y CSCs de pulmón, y estudiar su interrelación con el microambiente inmune.

Materiales y métodos: El estudio se realizó en 8 muestras tumorales de pacientes resecaos con CPNM y en 12 líneas celulares crecidas en monocapa y en placas de baja adherencia con medio sin suero (tumoresferas). La expresión de moléculas inmunosupresoras e inmunorreguladoras (*PD-L1*, *PD-L2*, *OX40L*, *CD200*, *IDO1*, *IDO2*, *ICOSL*, *TGF-β*, *LGAL3*, *IL-8*, *IL-6*, *IL-4*, *IL-1* y *STAT3*) se analizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), normalizándose frente a la expresión de tres genes controles seleccionados: *ACTB*, *CDKN1B* y *GUSB*, utilizados para el cálculo de la expresión relativa y un ADNc dereferencia comercial. Adicionalmente se analizaron 4 factores solubles, 2 con capacidad

inmunosupresora (IL-4 e IL-10) y 2 inmunorreguladora (IL-6 e IL-8) mediante un inmunoensayo multiplexado ultrasensible basado en microesferas (Millipore's Milliplex® MAP Kit HSTCMAG-28SK panel) usando la tecnología Luminex xMAP®.

Resultados: Las tumoresferas pulmonares tienen mayores niveles de expresión de los genes *GAL3* e *IL-8* ($p=0,003$, $p=0,05$, respectivamente) comparadas con sus correspondientes células crecidas en adherencia. Además *PD-L2*, *ICOS-LG*, *STAT3*, e *IDO2* también son genes con mayor expresión en CSCs de pulmón, aunque las diferencias con respecto a las células en adherencia no son estadísticamente significativas y se requeriría una ampliación de cohorte. La expresión de IL-6 por el contrario está aumentada en las células en adherencia acorde con la secreción. Se observó además que la secreción de IL-8 por parte de las tumoresferas es más elevada respecto a las células crecidas en adherencia, acorde con la expresión.

Conclusiones: Se postula por tanto que las moléculas que presentaban mayor expresión en las tumoresferas, GAL3 e IL-8, podrían ser moléculas que utilizan las CSCs de pulmón para conseguir el escape del sistema inmunológico.

Palabras clave: Células Madre Tumorales, Cáncer de Pulmón no Microcítico, Expresión génica, inmunosupresión, inmunorreguladores, inmunomoduladores, microambiente tumoral.



Valencia, Julio 2017
Susana Torres Martínez

Fdo.: D./D.ª

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA.E.T.S.I.A.M.S
Camino de Vera, s/nº. 46022 VALENCIA•Tel +34963877420•Fax+3463877429



DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

SUMMARY FOR MASTER'S DEGREE IN BIOMEDICAL BIOTECHNOLOGY FINAL PROJECT PRESENTATION

Mrs. **Susana Torres Martínez**

Author of the Master's degree Project entitled

Characterization of Cancer Stem Cell and Immune Microenvironment Interactions in Non-Small Cell Lung Cancer.

Presents the following **SUMMARY**:

Background: Non-small cell lung cancer (NSCLC) is one of the most solid tumors with high mortality in the world. The acquisition of treatment's resistances, together with the lack of treatment's effectiveness on Cancer Stem Cells (CSCs) and evading immune mechanism produced by the tumor are one of the main causes of the high mortality. CSCs in NSCLC are targets poorly recognized by the immune surveillance system given that they favour an immunosuppressive microenvironment. What is more, immune cells in the tumor microenvironment are able to modulate the tumor cells, making acquire stem-like characteristics, favoring further progression, recurrence, metastasis and resistance to treatment. Consequently, the aim of this study was to isolate and analyze lung CSCs and their interactions with the immune cells of the immune microenvironment.

Methods: The study was performed on cells from 8 NSCLC tumor samples and 12 cell lines grown in monolayer and as spheroids. The expression of immunosuppressive and immunoregulatory molecules were analysed by quantitative real-time PCR (qPCR). Housekeeping genes ACTB, CDKN1B and GUSB were used as endogenous controls for relative expression calculation. What is more, we analysed four soluble factors with immunosuppressive (IL-4, IL-10), and immunoregulatory (IL-6, IL-8) capacity through sensitivity bead-based multiplex assay using the Millipore's Milliplex® MAP Kit HSTCMAG-28SK panel and

the Luminex 100/200.

Results: Lung tumorspheres had increased expression of *GAL3* and *IL-8* ($p=0.003$, $p=0.053$, respectively) when compared to their paired-adherent cells. Besides, *PD-L2*, *ICOS-LG*, *STAT3* and *IDO2* showed higher expression in spheroids but no significant differences were obtained. The next step is the expansion of the cohort to obtain significant results. In contrast, adherent cells had increased expression of *IL-6*, according with the gene expression. We had observed that the levels secreted of *IL-8* were higher on tumorspheres when compared to their paired-adherent cells, according with the gene expression.

Conclusions: Our results suggest that lung spheroid from cancer cell lines and primary tumors showed increased levels of immunoregulatory molecules, *GAL3* e *IL-8*, and they are used by lung CSCs to favors an immunosuppressive microenvironment and avoid the immune surveillance system

Key words: Cancer stem cells, non-small cell lung cancer, Relative Gene Expression, Interleukine secretion, of immunosuppressive and immunoregulatory molecules, tumor microanvironment



Valencia, Julio 2017
Susana Torres Martínez

Fdo.: D./D.ª

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA.E.T.S.I.A.M.S
Camino de Vera, s/nº. 46022 VALENCIA•Tel +34963877420•Fax+3463877429

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Concepto de cáncer	1
1.1.1. Biología Molecular del cáncer	1
1.2. Cáncer de pulmón.....	2
1.2.1. Epidemiología	2
1.2.2. Factores de riesgo.....	3
1.2.3. Clasificación del cáncer de pulmón	3
1.2.4. Diagnóstico y pronóstico.....	4
1.2.5. Tratamiento.....	6
1.3. Células madre tumorales, CSCs	7
1.4. Heterogeneidad en cáncer	7
1.5. Microambiente tumoral.....	9
1.5.1. Infiltrado inmune en el microambiente tumoral del CPNM	10
1.5.2. Propiedades inmunomoduladoras de las CSCs.....	11
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Muestras incluidas en el estudio	18
3.2. Establecimiento de cultivos celulares primarios en adherencia y en esfera	19
3.3. Cultivos de líneas celulares	20
3.4. RTqPCR.....	21
3.4.1. Extracción y aislamiento de ARN/ADN	21
3.4.2. Reacción de retrotranscripción	21
3.5. Inmunoensayo multiplexado para factores solubles.....	25
3.5.1. Cultivos de cultivos primarios y líneas celulares para el análisis de mediadores solubles.....	25
3.5.2. Análisis de las citoquinas mediante la tecnología Luminex xMap®	25

3.5.3.	Análisis en el analizador Luminex® 100/200™	27
3.5.4.	Análisis de datos en Luminex PONENT®	27
4.	Resultados y discusión	29
4.1.	Ensayo de formación de tumoresferas	29
4.2.	Cuantificación y determinación de la calidad del ARN	30
4.3.	Ensayo de cálculo eficiencia TAQMAN.....	30
4.4.	Análisis relativo de la expresión génica	31
4.4.1.	Expresión de coinhibidores y coestimuladores de las células T.....	32
4.4.2.	Expresión de moléculas que inducen tolerancia	33
4.4.3.	Expresión de factores solubles con actividad frente a las células T	34
4.4.4.	Expresión de interleucinas inmunosupresoras solubles y STAT3	36
4.5.	Correlaciones entre genes	38
4.6.	Análisis de la secreción de citoquinas.....	39
4.6.1.	Puesta a punto de los cultivos.....	39
4.6.2.	Medición de la secreción de citoquinas al medio de cultivo	40
5.	Conclusiones.....	45
6.	Bibliografía.....	46
7.	Anexos	54

ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxirribonucleico

ADC: Adenocarcinoma

ALK: Quinasa del linfoma anaplásico

CD: Célula dendrítica

CSC: *Cancer Stem Cell* (Célula Madre Tumoral)

CPM: Cáncer de pulmón microcítico

CPNM: Cáncer de pulmón no microcítico

CTLA4: Antígeno 4 del linfocito T citotóxico

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidermal

FAT: Fibroblastos asociados a tumores

ICOS-LG: Ligando coestimulador inducible de las células T

IDO: Indolemina -2,3-dioxigenasa

IL: Interleucina

LCC: *Large cell carcinoma* (Carcinoma de células grandes)

MCP-1: Proteínas quimioatrayente de macrófagos 1.

MDSCs: Células mioeloides supresoras

MIF: Factor inhibidor de macrófagos

qPCR: Reacción de PCR en tiempo real

PD-1: Proteína de muerte celular programada

PD-L1: Ligando 1 de muerte programada

PD-L2: Ligando 2 de muerte programada

RT: Reacción de retrotranscripción

SCC: *Scuamous cell carcinoma* (Carcinoma de células escamosas)

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

OX40-LG: Factor de necrosis tumoral (ligando)

TAMs: Macrófagos asociados a tumores

TC: Tomografía computarizada

TEP: Tomografía por emisión de positrones de tórax y abdomen

TGF- β : *Transforming growth factor beta* (Factor de crecimiento transformante beta)

TKIs: Inhibidores tirosina quinasa

Tregs: Linfocitos T reguladores

TNM: Tumor/Nodulos/Metástasis

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Concepto de cáncer

El cáncer es un concepto genérico que engloba un gran número de patologías caracterizadas por el desarrollo de células anormales, que se dividen, crecen y se diseminan sin control a cualquier parte del cuerpo. Existen más de 100 tipos de cáncer, manifestándose en numerosos subtipos cuyo factor común es que los tumores constituyen un tejido complejo y están compuestos por múltiples tipos celulares que participan en las interacciones heterotípicas entre células. En los tumores, las células tumorales tienen defectos en los mecanismos reguladores y de la reparación produciendo el crecimiento descontrolado y la diseminación de estas a otros tejidos. Además de esta visión reduccionista del cáncer, hay otras dos visiones más complejas. La primera de ellas postula que los tumores son tejidos complejos en los cuales las células tumorales pueden reclutar diferentes tipos de células normales para que actúen como colaboradores activos creando un microambiente tumoral en el que se favorece la proliferación y la invasión (Hanahan and Weinberg, 2000). En segundo lugar, la diversidad genética en las poblaciones de células tumorales es una consecuencia inevitable de la inestabilidad del genoma, la cual está causada por defectos que afectan a los componentes de la maquinaria de mantenimiento del ácido desoxirribonucleico (ADN) en combinación con un gran número de divisiones celulares necesarias para la formación de tumores macroscópicos (Marusyk et al., 2012).

1.1.1. Biología Molecular del cáncer

En el proceso de desarrollo de un tumor se engloban múltiples pasos claves que llevan al fenotipo maligno de la célula. Hanahan y Weinberg describieron estas características de las células cancerosas, las cuales se adquieren durante el proceso de tumorigénesis: las señales proliferativas, la evasión de supresores de crecimiento y de la muerte celular, permitir la replicación inmortal, inducir la angiogénesis, activar la invasión y metástasis, reprogramar el metabolismo energético, inflamación crónica y evadir el sistema inmune (Hanahan and Weinberg, 2011) (Figura 1).

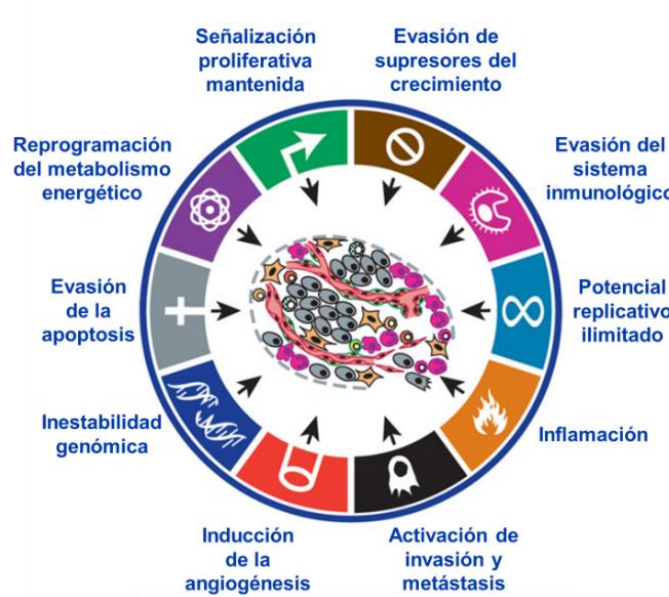


Figura 1. Las propiedades del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011)

1.2. Cáncer de pulmón

1.2.1. Epidemiología

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo con 14,1 millones de casos nuevos y 8,2 millones de muertes ocurridas en 2012 y con expectativa de superar a las enfermedades cardiovasculares como principal causa de muerte en los próximos años (Torre et al., 2015; Siegel et al., 2017). Actualmente, el cáncer de pulmón es de los tumores más frecuentemente diagnosticados y a pesar de los avances que se han producido en los últimos años (Ferlay et al., 2015), sigue siendo el de mayor mortalidad en todo el mundo; seguido por el de próstata y colorrectal en hombres y, detrás del de mama en mujeres (Torre et al., 2015) (figura 2).

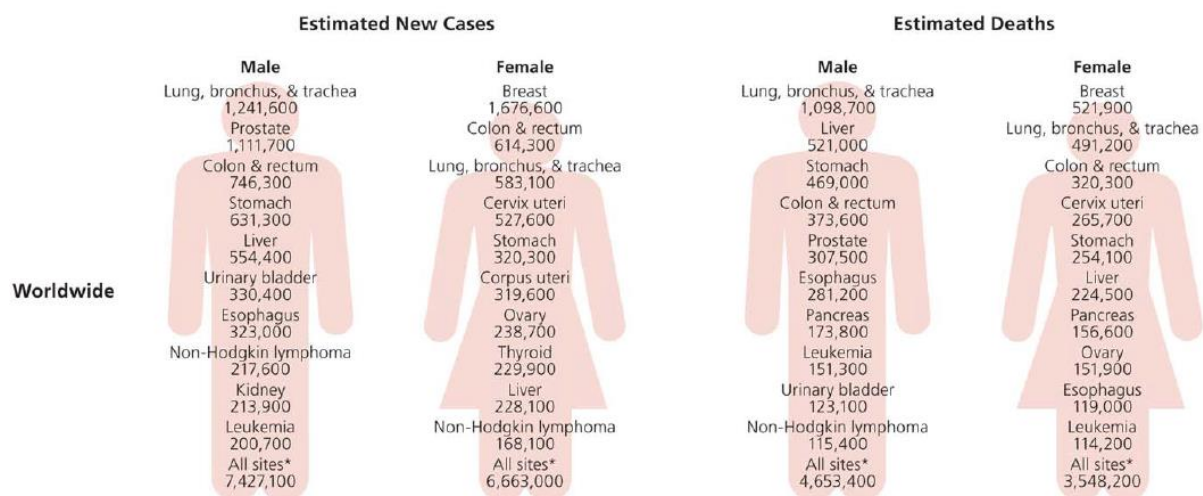


Figura 2. Mortalidad y nuevos casos estimados de cáncer, según sexo. Estadísticas referidas a toda la población (Torre et al., 2015)

En España, disponemos de los datos recientemente publicados por REDECAN, y el número total de nuevos casos de cáncer en 2015 fue de 247.771 (148.827 en varones y 98.944 en mujeres) (Galceran et al., 2017). Los tumores responsables del mayor número de fallecimientos en 2015 en la población general española fueron el cáncer de pulmón (21.579 muertes) y el cáncer colorrectal (15.363 muertes), seguidos a una gran distancia del cáncer de mama (6.287 muertes), cáncer de páncreas (6.098 casos) y de próstata (5.746 muertes)(ISCIII, 2015).

1.2.2. Factores de riesgo

El consumo del tabaco es la principal causa de cáncer de pulmón debido a los compuestos tóxicos contenidos en el humo (60 de ellos carcinogénicos) y es responsable del 85-90% de estos tumores (de Groot et al., 2012; Sobue et al., 2002). Se ha demostrado en numerosos estudios que el hábito tabáquico está relacionado con un aumento del riesgo entre 15 y 30 veces de sufrir cáncer de pulmón, dependiendo de la intensidad y la duración de la exposición ya que el riesgo disminuye en ex-fumadores, aunque sin llegar a los niveles de los que nunca han sido fumadores activos (Jemal et al., 2008; Sasco et al., 2004).

Otros factores ambientales que se relacionan con el riesgo de sufrir cáncer de pulmón son la exposición involuntaria al humo del tabaco, la susceptibilidad genética, las dietas ricas en colesterol, grasas saturadas y bebidas alcohólicas o la exposición a otros carcinógenos ambientales como arsénico, radón o hidrocarburos policíclicos (Sawyers et al., 2013; de Groot and Munden, 2012; Malhotra et al., 2016).

1.2.3. Clasificación del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón, se clasifica histológicamente en dos grandes grupos: cáncer de pulmón microcítico (CPM 15% de los casos) y cáncer de pulmón no microcítico (CPNM: 85% de los casos). Sin embargo, gracias a las técnicas histológicas y patológicas, este último grupo se divide en tres subtipos debido a las diferencias clínicas existentes en lo referente a la manifestación, capacidad de metástasis o respuesta a tratamiento: adenocarcinoma (ADC, 40%), carcinoma de células escamosas (SCC, 30%) y carcinoma de células grandes (LCC, 15%) (Travis, 2002; Travis et al., 2013; Gridelli et al., 2015). En este trabajo nos hemos centrado en el cáncer de pulmón por su elevada mortalidad y en particular en el no microcítico por ser el subgrupo mayoritario. El CPNM se origina generalmente en el epitelio bronquial y suele caracterizarse por un crecimiento lento, una baja sensibilidad a la quimioterapia y a la radioterapia y por su mal pronóstico, ya que un grupo importante de pacientes presentan recaídas y progresiones de la enfermedad en corto espacio de tiempo.

Las técnicas actuales de biología molecular han permitido clasificar de manera más detallada los distintos tipos de carcinomas de pulmón por las diferencias moleculares. El CPNM es uno de los tumores con mayor diversidad genómica y presenta una gran variedad de alteraciones específicas como *EGFR*, *ALK* o *KRAS* (Ladanyi, 2008; Pao et al., 2011; Hirsch et al., 2010)

1.2.4. Diagnóstico y pronóstico

El cáncer de pulmón actualmente es principalmente diagnosticado en los pacientes por la presencia de síntomas como dolor, tos, hemoptisis, disnea, y pérdida de peso. La mayoría presentan diseminación tumoral en el momento del diagnóstico, y el 40% de los pacientes con CPNM presentan metástasis locales o a distancia (Morgensztern et al., 2010). Estos pacientes, en los cuales el diagnóstico se realiza cuando la enfermedad se encuentra en estadios avanzados tienen un pronóstico poco favorable, ya que no son susceptibles de que el tumor pueda ser resecado quirúrgicamente y por lo tanto la opción terapéutica es la de un tratamiento paliativo que, aunque ha mostrado algunos beneficios en supervivencia, en muchos casos solo consigue estabilizar la enfermedad por un período de tiempo poco mayor a un año (Reck et al., 2013).

Aunque muchos pacientes son inicialmente diagnosticados por una radiografía de pecho, diversas tecnologías están ahora disponibles para localizar el tumor primario y realizar posteriormente la estadificación, como son la tomografía computarizada (TC) o la tomografía por emisión de positrones de tórax y abdomen (TEP) combinadas con técnicas invasivas para el análisis de la muestra, como la citología del esputo o la broncoscopia. A pesar de su gran uso, todavía no son capaces de detectar los estadios más tempranos de la enfermedad o de localizar micrometástasis, por lo que actualmente la investigación se centra en encontrar marcadores moleculares capaces de detectar la enfermedad en estadios tempranos y de forma mínimamente invasiva (Camps et al., 2012).

La valoración pronóstica es un factor importante que hay que tener en cuenta cuando se selecciona el régimen de tratamiento. Las variables que han sido asociadas con el pronóstico hasta el momento han sido agrupadas en diferentes categorías: a) relacionadas con el tumor, como el sitio primario, el tipo celular y la extensión de la enfermedad; b) relacionadas con el paciente, como el estado general, las comorbilidades y el sexo, y c) factores ambientales, como la nutrición (Goldstraw et al., 2007). Actualmente, uno de los factores pronósticos más importantes en el cáncer de pulmón es el estadio de la enfermedad, que se determina en función de tres características anatomopatológicas propias del tumor como son el tamaño de la masa tumoral (T), el grado de afectación linfática (N) y la presencia de metástasis (M) (tabla 1) (Rami-porta, 2017). Sin embargo la

caracterización histológica y molecular del tumor es necesaria para la toma de decisiones terapéuticas del paciente.

Tabla 1. 8a edición de la clasificación T/N/M para el cáncer de pulmón (Rami-porta, 2017)

T: Tumor Primario	
Tx	El tumor primario no puede ser evaluado o se ha probado por presencia de células malignas en esputo o lavado bronquioalveolar pero no visualizado por imagen o broncoscopia
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor ≤ 3 cm en su lado más grande rodeado por pulmón o pleura visceral sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal que el bronquio lobular (no en el bronquio principal) ^a
T1a(mi)	Adenocarcinoma mínimamente invasivo ^b
T1a	Tumor ≤ 1 cm en su lado más grande ^a
T1b	Tumor > 1 cm pero ≤ 2 cm en su lado más grande ^a
T1c	Tumor > 2 cm pero ≤ 3 cm en su lado más grande ^a
T2	Tumor > 3 cm pero ≤ 5 cm o tumor con alguna de las siguientes características: - Afecta al bronquio principal independientemente de la distancia de la carina pero sin afectarla - Invade la pleura visceral - Se asocia a atelectasis o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar, afectando parte o la totalidad del pulmón
T2a	Tumor > 3 cm pero ≤ 4 cm en su lado más grande
T2b	Tumor > 3 cm pero ≤ 5 cm en su lado más grande
T3	Tumor > 5 cm pero ≤ 7 cm en su lado más grande o asociado a nódulo(s) tumorales separados en el mismo lóbulo que el del tumor primario o directamente invade alguna de las siguientes estructuras: pared torácica (incluyendo la pleura parietal y tumores del surco superior), nervio frénico, pericardio parietal
T4	Tumor > 7 cm en su lado más grande o asociado a nódulo(s) tumorales separados en un lóbulo ipsilateral diferente al del tumor primario o directamente invade alguna de las siguientes estructuras: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, traquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral y carina
N: Afectación ganglionar regional	
Nx	Los ganglios regionales no pueden ser evaluados
N0	Ganglios regionales sin metástasis
N1	Metástasis en ganglios peribronquiales ipsilaterales i/o hiliares ipsilaterales y ganglios intrapulmonales, incluyendo afectación por extensión directa
N2	Metástasis en ganglio(s) mediastínicos y/o subcarinales ipsilaterales
N3	Metástasis en ganglio(s) mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, escaleno ipsilateral o contralateral, o supraclaviculares
M: Metástasis a distancia	
M0	No metástasis a distancia
M1	Presencia de metástasis a distancia
M1a	Tumor con nódulo(s) separados en un lóbulo contralateral; tumor con nódulos pleurales o pericárdicos o derrame pericárdico o pleural maligno ^d
M1b	Metástasis única extratorácica ^e
M1c	Metástasis múltiples extratorácicas en uno o más órganos
Nota: Los cambios en la séptima edición están en negrita	
^a El tumor de extensión superficial poco común de cualquier tamaño con su componente invasivo limitado a la pared bronquial, que puede extenderse próximo al bronquio principal, también se clasifica como T1a	
^b Adenocarcinoma solitario, ≤ 3 cm con un patrón predominantemente lepidico y ≤ 5 mm de invasión en cualquier foco.	
^c Tumores T2 con estas características se clasifican como T2a si el tamaño es ≤ 4 cm en su lado más grande o el tamaño no puede ser determinado, y T2b si el tamaño es > 4 cm pero ≤ 5 en su lado más grande.	
^d La mayoría de derrames pleurales (pericárdicos) en cáncer de pulmón son debidos al tumor. En algunos pacientes, sin embargo, los múltiples exámenes microscópicos del líquido pleural (pericárdico) son negativos para tumor y el líquido no es sanguinolento y ni un exudado. Cuando estos elementos y los juicios clínicos dictaminan que el derrame no está relacionado con el tumor, el derrame debe de ser excluido como un descriptor del estadiaje.	
^e Esto incluye afectación de un único ganglio a distancia (no regional).	

1.2.5. Tratamiento

La elección de un tratamiento adecuado para pacientes con cáncer de pulmón depende de la clasificación anatomopatológica, el estadio del tumor y el estado del paciente. A pesar de que la resección quirúrgica sigue siendo el tratamiento estándar para los pacientes con estadios tempranos, la radioterapia estereotáctica del cuerpo (SBRT) ha surgido como un tratamiento alternativo para pacientes con estadios I-II (Robinson et al., 2007). En los tumores en estadios no resecables, el tratamiento se centra en la quimioterapia con combinaciones de platino y otros agentes como paclitaxel, docetaxel, gemcitabina, pemetrexed o vinorelbina, en combinación con radioterapia (Felip et al., 2010; Goldstraw et al., 2011).

En los últimos años se ha producido un cambio de paradigma en el tratamiento del cáncer de pulmón debido a los hallazgos de las mutaciones en *EGFR*, *ROS1*, *ALK* o *VEGFR*, entre otras. El diseño de fármacos dirigidos más efectivos y personalizados aumenta la supervivencia de los pacientes con CPNM y disminuyen la toxicidad de la quimioterapia convencional. Algunos ejemplos de estos agentes dirigidos son los inhibidores tirosina quinasa/*tyrosine-kinase inhibitor* (TKIs) como gefitinib, afatinib, y erlotinib, específicos para pacientes con mutaciones en *EGFR* (Yang et al., 2017); crizotinib, una pequeña molécula TKI que inhibe el receptor tirosina quinasa (cMET o ROS1), y *ALK* (Chuang and Neal, 2015); o bevacizumab y ramucirumab, un anticuerpo monoclonal humanizado frente a VEGFR (Soria et al., 2013).

Durante las últimas décadas, la inmunoterapia ha sido una opción muy atractiva para tratar muchos tipos de cáncer. Esto se refiere a una serie de enfoques destinados a activar el sistema inmune con el fin de inducir respuestas objetivas y la estabilización de la enfermedad. Sobre todas las posibilidades, el bloqueo de los puntos de control inmunes con anticuerpos monoclonales ha surgido como estrategia prometedora. Hasta el momento diversos inmunoterapéuticos, incluyendo nivolumab, pembrolizumab y atezolizumab han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de cáncer de pulmón con resultados sorprendentes (Borghaei et al., 2015; Herbst et al., 2016; Fehrenbacher et al., 2016). Los dos primeros fármacos actúan inhibiendo a PD-1 e impidiendo su interacción con su ligando PD-L1 y el último por el contrario se une a PD-L1. El anticuerpo monoclonal ipilimumab que bloquea CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*, (también conocido como CD152) también ha sido aprobado en cáncer de pulmón.

Actualmente, a pesar de los avances considerables que se han logrado en las últimas décadas (Ferlay et al., 2015), el cáncer de pulmón sigue siendo el cáncer de mayor mortalidad en todo el mundo. En este sentido, se sabe que las células tumorales son heterogéneas y hay pruebas sólidas

que indican que la quimiorresistencia, la progresión tumoral y la metástasis están ligadas a una subpoblación de células con características “*stem*” llamadas células madre tumorales (*Cancer Stem Cells*, CSCs) (Han et al., 2013).

1.3. Células madre tumorales, CSCs

Las células madre tumorales o *cancer stem cells* (CSC) se definen como una población minoritaria de células que comparten diversas propiedades con las células madre embrionarias como la autorrenovación, la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares, expresión de marcadores de superficie específicos y oncogenes, habilidad de formar esferas en medio no adherente, la sobreexpresión de transportadores ABC flujo y la capacidad de proliferar indefinidamente, aunque difieren en su actividad tumorigénica.

Posiblemente, la mayor diferencia con las células madre normales radica en la desregulación de las vías de autorrenovación y diferenciación que incluyen Notch, Wnt/ β -catenina y Hedgehog de las CSCs. La activación de estas vías de forma aberrante se consideran como posibles dianas terapéuticas para bloquear la capacidad de autorenovación y proliferación de las CSCs y, por tanto, de la progresión del tumor (Cheng et al., 2009; Codony-Servat and Rosell, 2015).

En tumores sólidos, la caracterización de las CSCs se ha encontrado con la dificultad de la heterogeneidad de esta población, con marcadores de superficie no muy bien establecidos, que no se expresan de forma exclusiva y que difieren en función del órgano o tejido de procedencia, ensayos de detección y cuantificación de las CSCs no estandarizados, etc. A pesar de estas dificultades, se ha logrado caracterizar a través de diferentes marcadores (CD133,CD44,ALDH1A1) a poblaciones celulares con características de CSCs pulmonares obtenidas a partir de células de CPNM y de muestras de resección quirúrgica de pacientes con esta patología (Martinez-Romero et al., 2014) y además estas han sido capaces de iniciar tumores en modelos *in vivo*, propiedad anteriormente comentada. A pesar de estos hallazgos, es necesario aclarar el perfil de marcadores de CSCs de pulmón ya que los marcadores para CSCs bien definidos no están disponibles para CPNM. Se necesitan por tanto más estudios para elucidar los marcadores pronósticos y diagnósticos.

1.4. Heterogeneidad en cáncer

Cada tumor es único y hay una gran variedad de tipos y subtipos. Los tumores evolucionan con el tiempo, produciéndose diferencias genéticas y fenotípicas entre tumores que se encuentran en diferentes tejidos así como entre el mismo tipo de tumor en individuos diferentes (heterogeneidad intertumoral), lo que complica el diagnóstico, pronóstico y tratamiento (Greaves and Maley, 2012;

Marusyk and Polyak, 2010; Burrell et al., 2013). Pero esta diversidad no solo existe entre los tumores, sino también entre las poblaciones celulares en el tumor (heterogeneidad intratumoral) (Zardavas et al., 2015; Marusyk et al., 2012) que puede dificultar el diagnóstico y obstaculizar la toma de decisiones terapéuticas (Figura 3).

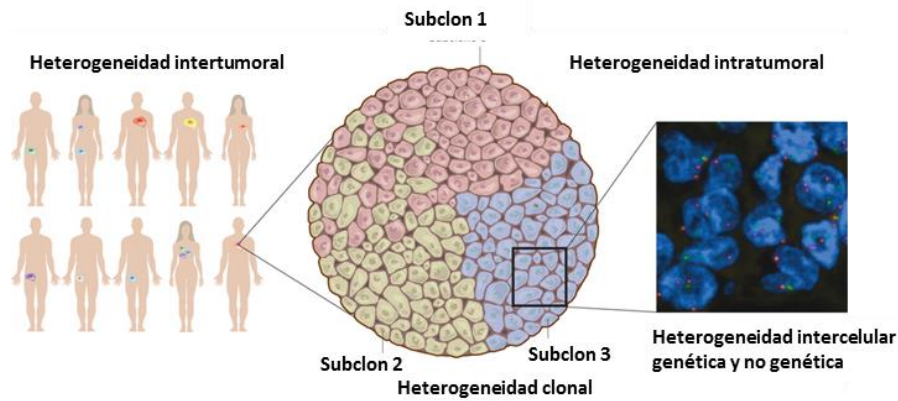


Figura 3. Heterogeneidad intertumoral e intratumoral (Burrell et al. 2013)

Hasta la fecha, dos modelos han sido propuestos para explicar esta heterogeneidad tumoral. El primer modelo es la teoría de la evolución clonal, también conocido como modelo estocástico, el cual propone que las células tumorales evolucionan progresivamente durante los diferentes pasos de la tumorigénesis, adquiriendo el tumor cambios genéticos y epigenéticos heredables (Shackleton et al., 2009) y permitiendo la selección y crecimiento de clones de poblaciones celulares. Por otro lado se ha propuesto la teoría de las células madre tumorales, también llamado modelo determinista, que sugiere que el crecimiento y la progresión de la mayoría de tumores se debe a una subpoblación celular conocida con este nombre (Marjanovic et al., 2013). Sin embargo, ambos modelos no son excluyentes y muchos autores han propuesto un modelo unificado (Meacham and Morrison, 2013; Kreso and Dick, 2014).

En este modelo unificado, la adquisición de mutaciones puede dar lugar a una expansión clonal de la célula fundadora. Paralelamente, otra célula puede ganar una mutación diferente que le permite formar un nuevo subclon. Así, a lo largo del tiempo las mutaciones se acumulan y los distintos subclones evolucionan en paralelo. Las CSCs no son consideradas como entidades estáticas por lo que pueden evolucionar a través del tiempo y los cambios genéticos pueden influir en su frecuencia de aparición, así algunos subclones pueden contener sólo unas pocas CSC autorenovables entre un gran número de células no *stem*. Otros subclones pueden contener un número relativamente alto de CSCs, y por último, algunos subclones pueden tener alteraciones genéticas que

confieren un alto potencial de renovación y donde la mayoría de células son tumorogénicas (Figura 4, Kreso & Dick 2014).

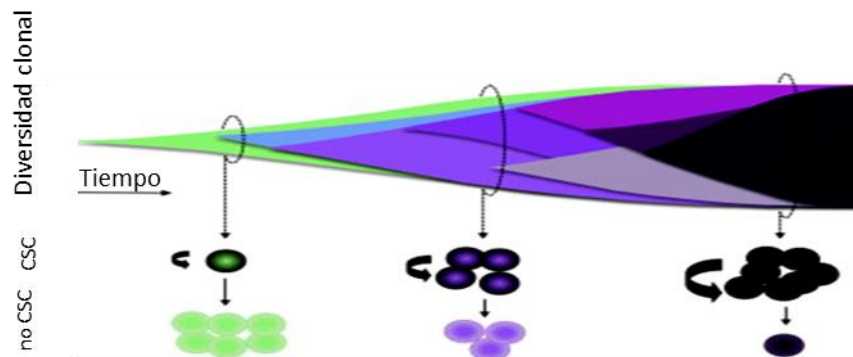


Figura 4. Modelo unificado de evolución clonal y células madre tumorales. (Kreso and Dick, 2014)

1.5. Microambiente tumoral

Los tumores son más que masas aisladas de células cancerosas (incluyendo la subpoblación de CSCs) con capacidad de proliferar y por tanto la biología del tumor debe analizarse comprendiendo que se trata de un conjunto heterogéneo de células dentro de un contexto que se conoce como microambiente tumoral, el cual es complejo y está compuesto por la matriz extracelular, factores de crecimiento de supervivencia, citoquinas, fibroblastos asociados a tumor (FAT), células endoteliales, pericitos, y células del sistema inmunes como macrófagos asociados a tumor (TAMs), células dendríticas (CDs) y células mioide supresoras (MDSC) y linfocitos (T colaboradores (Th o CD4+) o citotóxicos (CTL o CD8+) o reguladores (Treg), células *natural killers* (NK)) (Figura 5).

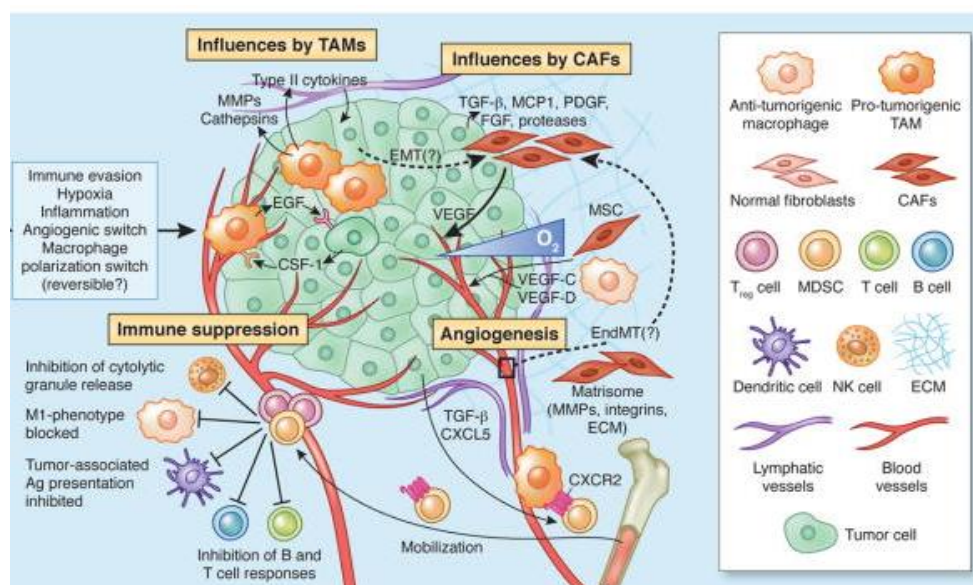


Figura 5. Representación del microambiente tumoral (F. Quail and Joyce, 2013)

Las interacciones entre las células tumorales y el microambiente son bidireccionales. Por un lado, el microambiente tumoral puede contribuir con señales positivas o negativas (factores secretados o contactos entre células) a regular las células tumorales. Por otro lado, los tumores adquieren mecanismos para regular el microambiente inmune los cuales incluyen la liberación de factores inmunorreguladores (Massague, 2008), la modulación de vías coestimuladoras (también conocidos como *immuno-checkpoints*) (Pardoll, 2012) y la inducción y atracción de células supresoras como MDSC, TAMs, CD8⁺, y Tregs (Curiel et al., 2004; Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009; Lesokhin et al., 2012; Biswas et al., 2013).

1.5.1. Infiltrado inmune en el microambiente tumoral del CPNM

El sistema inmune es un importante mecanismo de defensa antitumoral, dividido en dos grandes componentes, la inmunidad innata y adaptativa, y ambos producen una respuesta inmune efectiva a través de una gran variedad de células y mediadores solubles. La inmunidad innata que constituye la primera línea de defensa antitumoral está compuesta por macrófagos, neutrófilos, CD8⁺, mastocitos, eosinófilos, basófilos y células *NK*, pero se sabe que el control a largo plazo es dependiente de la respuesta inmune adaptativa compuesta por las células B y T que promueven la activación de la inmunidad innata y apoyan la expansión y producción de células T específicas tumorales y anticuerpos.

El sistema inmune tiene tres roles importantes en prevenir los tumores: protege al huésped de los tumores inducidos por virus eliminando las infecciones provocadas por estas; resuelve de manera rápida la eliminación de patógenos evitando que se establezca un ambiente inflamatorio y finalmente, el sistema inmune elimina las células tumorales que expresan antígenos específicos en un proceso que se llama inmunovigilancia (Vesely et al., 2011). De hecho algunas investigaciones muestran que la presencia de células T intratumorales se correlaciona con un mejor pronóstico clínico en estadios tempranos de CPNM (Usó et al., 2016). De todas estas células T intratumorales, las células T CD8⁺ son la fuente de actividad anti-tumoral in vivo más importante y son las que se convertirán en linfocitos T citotóxicos (Russell and Ley, 2002). Actualmente, estamos ante un escenario en el que existe una mayor comprensión de las interacciones entre sistema inmune y cáncer que ha suscitado un interés creciente en la aplicación de estrategias terapéuticas inmunológicas en CPNM. El uso de inhibidores de *immuno-checkpoints* (CTLA-4, PD-1 o PDL-1) está demostrando resultados muy prometedores permitiendo a los linfocitos T restaurar una respuesta inmunitaria antitumoral, lográndose respuestas mantenidas en el tiempo (Lynch et al., 2012; Carmeliet and Jain, 2000; Kitamura et al., 2015). No obstante, solo sucede en un porcentaje de los pacientes por lo que aún es necesaria una mejor definición de los pacientes respondedores.

Actualmente también se están ampliando tratamientos utilizando terapias víricas oncolíticas, inmunoterapia con células dendríticas etc, pero aún así se necesita aumentar la comprensión de los mecanismos de evasión.

Sin embargo, algunas células tumorales escapan y comienzan la fase de latencia en la cual se produce un equilibrio entre la eliminación inmunológica y el crecimiento de las células tumorales (Aguirre-Ghiso, 2007). Durante este periodo las células sufren cambios genéticos y epigenéticos y algunos de estos cambios generan una población de células madre poco inmunogénica que evita el reconocimiento inmunológico (CSCs) y manipulan el sistema inmune para promover su propio crecimiento (Schreiber et al., 2011). Finalmente, la baja inmunogenicidad de las CSCs, y la agresividad de estos clones, son capaces de formar una masa tumoral clínicamente detectable e iniciar el escape tumoral y el crecimiento del tumor.

Por lo tanto de los avances que se han realizado en los últimos años, todavía quedan muchas dudas por resolver y hace falta profundizar en el rol que pueden jugar las CSCs en este contexto del sistema inmune así como encontrar nuevos biomarcadores inmunes para una mejor estadificación de los pacientes y un mejor pronóstico.

1.5.2. Propiedades inmunomoduladoras de las CSCs

Una de las características o *“hallmarks”* del cáncer definidas por Hanahan y Wekinberg mencionadas anteriormente es la capacidad de las células tumorales de evadir la respuesta inmune (Hanahan et al., 2011). En el caso de las CSCs, hay un gran desconocimiento del papel que ejercen en el sistema inmune. Posiblemente, la dificultad en la eliminación de estas células por el sistema inmune no solo radica en su pobre reconocimiento ante la vigilancia inmune, sino en la activa inmunosupresión que mantienen en su entorno, lo cual es crucial durante la tumorigénesis, ya que las CSCs pueden producir moléculas inmunosupresoras que atenúen el sistema inmune (Aguirre-Ghiso, 2007), y además son capaces de reclutar células reguladoras que lo suprimen como Tregs y MDSC (Kaplan et al., 2005; Silver et al., 2016).

INMUNO CHECKPOINTS

A pesar de haberse realizado muy pocos estudios, se ha demostrado que las CSCs son capaces de modular negativamente la respuesta inmune como PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4 (Yao et al., 2008; Bin et al., 2014; Schatton and Frank, 2010; T. Di Tomaso et al., 2010; Comber and Philip, 2014; Volonte et al., 2013). **PD-L1** y **PD-L2** son ligandos del receptor linfocitario PD-1 y regulan negativamente la activación de las células T, proporcionando un mecanismo por el cual las células

tumorales evaden el sistema inmune. La inmunoterapia en cáncer basada en estas moléculas de punto de control inmune es una estrategia muy investigada en cáncer de pulmón no microcítico. Para la mejora del tratamiento del cáncer sería importante que las células madre tumorales expresen PD-L1 y PD-L2 con el objetivo de tener una inmunoterapia más efectiva. A su vez, las CSCs podrían expresar menores niveles de moléculas coestimuladoras como son CD40, CD80, CD86 y **OX40-LG**. Este último es un ligando de un miembro de la familia de receptores de necrosis tumoral, CD137, y activa a la célula T tras su interacción (Croft et al., 2009).

MOLÉCULAS TOLEROGÉNICAS

También algunos estudios sugieren que las CSCs pueden expresar CD200, una glicoproteína muy estudiada como diana terapéutica por su rol en la inmunorregulación y tolerancia (Gorczyński, 2005). La interacción de CD200 con su receptor en las células dendríticas induce la vía inmunosupresora del catabolismo del triptófano (Fallarino et al., 2004). Por otro lado, la unión de CD200 con su receptor desencadena una señal inhibitoria al linaje de los macrófagos (Hoek et al., 2000; Jenmalm et al., 2006) y altera el perfil de citoquinas de Th1 (IFN- γ , IL-2) a Th2 (IL-4, IL-10) producido por células dendríticas (Gorczyński et al., 1999), lo que conlleva a que no se activen los linfocitos T. Adicionalmente, CD200 puede inducir la proliferación o la inducción de novo de células T reguladoras (Gorczyński et al., 2005), importantes atenuadoras de la función de las células T (Figura 7). También se ha visto que las CSCs podrían expresar la enzima indolemina-2,3-dioxigenasa (**IDO**) que comprende dos isozimas, IDO-1 e IDO-2, y está implicada en el catabolismo del triptófano (Trp), provoca un agotamiento de este aminoácido esencial en el intersticio del tumor y la producción de metabolitos inmunosupresores que inhiben la activación, proliferación y supervivencia de las células T citotóxicas y algunos pueden afectar a la función de las células NK (Zhai et al., 2015). La actividad de IDO parece favorecer un fenotipo regulatorio en las células T CD4+ (Katz et al., 2008) (Figura 6). Otra molécula que induce tolerancia que también se ha visto que expresan las CSCs es **ICOS-LG** (B7-H2 o CD275), cuya interacción con su receptor ICOS en las células T CD4+ *naive* inducen la diferenciación de estas a células Treg productoras de IL-10 (Ito et al., 2007) suprimiendo la respuesta inmune anti-tumoral e inhibiendo la activación y expansión de células T efectoras, CD y NK (Vignali et al., 2008).

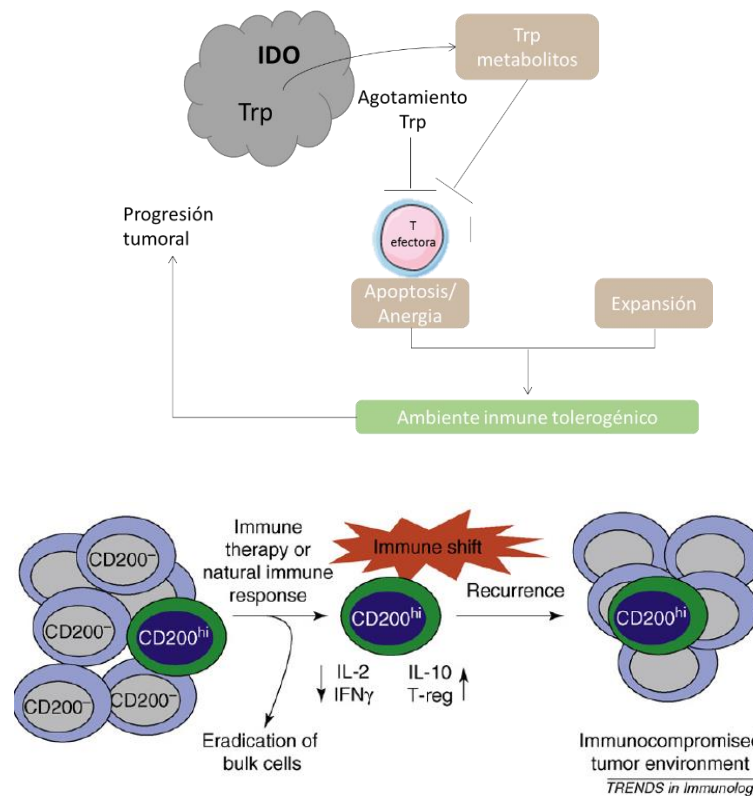


Figura 6. Modelo hipotético de como CD200 e IDO podría influir la inmunoevasión de las CSC. a) La expresión de CD200 provocada la supervivencia a la inmunoterapia o a la respuesta inmune natural de las CSC. Los efectos inmunosupresores podrían estar mediados por eventos como la desviación en la producción de citoquina (de Th1 a Th2), y aumento de la proliferación o inducción de Treg (Kawasaki and Farrar, 2008). b) IDO provocaría la depleción del Trp en el medio así como la producción de metabolitos secundarios induciendo la apoptosis o anergia de las células T y la expansión de células Treg produciendo un ambiente inmune tolerogénico.

SECRECIÓN MEDIADORES SOLUBLES

Los mediadores inmunosupresores que podrían ser liberados por las CSCs pueden suprimir las CD, inhibiendo la penetración de las células T en el nicho tumoral o suprimiendo directamente la activación de las células T efectoras, al tiempo que aumentan la función de las células Treg. El factor de crecimiento transformante β (**TGF- β**) es un factor inmunosupresor importante que promueve la metástasis aumentando la invasión de células tumorales. Además inhibe la función de células inmunes suprimiendo o alterando la activación, maduración y diferenciación de las células inmunes innatas y adaptativas, incluyendo las células NK, CD, macrófagos, neutrófilos, y células CD4⁺ Y CD8⁺ (Massague, 2008). También se ha visto que tiene un importante rol en la diferenciación e inducción de las Tregs naturales e inducidas, lo que contribuye a crear un microambiente inmunotolerante (Li et al., 2006). La **Galectina-3** es una molécula inmunosupresora que puede modular la respuesta inmune e inflamatoria a través de la apoptosis de las células T (Peng et al., 2008; Kouo et al., 2015). También se une específicamente a Nkp30 e inhibe la citotoxicidad de las células NK (Wang et al., 2014) (Figura 7).

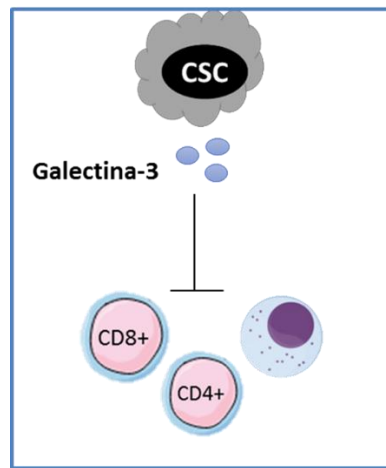


Figura 7. Representación de las funciones llevadas a cabo por la Galectina-3

Las CSCs de algunos tipos tumorales también son capaces de producir citoquinas inmunosupresoras como las IL-4 e IL-10 y citoquinas inmunorreguladoras como la IL-6, IL-8 e IL-13 (Chikamatsu et al., 2011; T. Di Tomaso et al., 2010). La **IL-10** es una citoquina que inhibe la presentación antigénica, la expresión de MHC clase II, y la sobrerregulación de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86. Además suprime las citoquinas inflamatorias IL1, IL6, e IL12 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). La IL10 parece actuar en CD8 y macrófagos y protege a las células tumorales de los linfocitos T citotóxicos. (Kurte et al., 2004). Sin embargo, algunas evidencias indican que puede poseer propiedades inmunoestimuladoras. De hecho la sobreexpresión de *IL10* en el microambiente tumoral junto con otras citoquinas puede promover el rechazo tumoral en vez de inducir la inmunosupresión (Lopez et al., 2005). La **IL-4** es un importante regulador negativo de apoptosis, que confiere resistencia a la muerte inducida por la quimioterapia (Conticello et al., 2004) y también se ha observado que es la responsable de la inhibición de la proliferación de linfocitos T (Volonte et al., 2013). Junto con la IL-10, induce la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M2 facilitando el crecimiento tumoral, invasión y angiogénesis (Linde et al., 2012). La **IL-6** es una citoquina multifuncional conocida como reguladora de la respuesta inmune y de la inflamación que puede conducir a la angiogénesis promoviendo la expresión de VEGF y bFGF por las células tumorales a través de la vía STAT3 (Wei et al., n.d.) así como también promueve la inflamación reclutando células mononucleares. Además promulga la supresión de la respuesta inmune adaptativa a través de; la interferencia con las células presentadoras de antígeno como las CD, necesarias para la citotoxicidad de las células T (Park et al., 2004) y el bloqueo de la maduración de estas, induciendo el estado de anergia o muerte de las células T. A pesar de ello, un nuevo rol de la IL-6 se ha descrito recientemente ya que podría movilizar la respuesta inmune antitumoral de las células T (Mikucki et al., 2013; Fisher et al., 2011). Por último, la **IL-8**, es una citoquina proinflamatoria, miembro de la familia de las quimiocinas, clasificado originalmente como un quimioatrayente de neutrófilos con

actividad inflamatoria (Baggiolini et al., 1989). También se ha descrito como un potente factor angiogénico en muchos cánceres incluyendo el CPNM (Smith et al., 1994) y está asociado con metástasis (Singh et al., 1994). Recientemente se ha descubierto que la IL-8 derivada del tumor aumenta la infiltración de células mieloides supresoras de tumores (MDSCs) (Alfaro et al., 2016), que son células con actividad inmunosupresora. Por último, se ha observado que algunas CSCs utilizan la vía STAT3 envuelta en la inflamación e inmunosupresión. STAT3 regula la transcripción de factores inmunosupresores como IL-10, VEGF, IL-6 PGE y TGF- β (Steinbrink et al., 1997) que reducen la citotoxicidad de las células T, células NK y neutrófilos, así como disminuyen la expresión de moléculas coestimuladoras como MHC II, CD80, CD86 en células dendríticas, haciéndolas incapaces de madurar y por tanto de activar las células T e iniciar la inmunidad antitumoral (Kortylewski et al., 2005) (Figura 8).

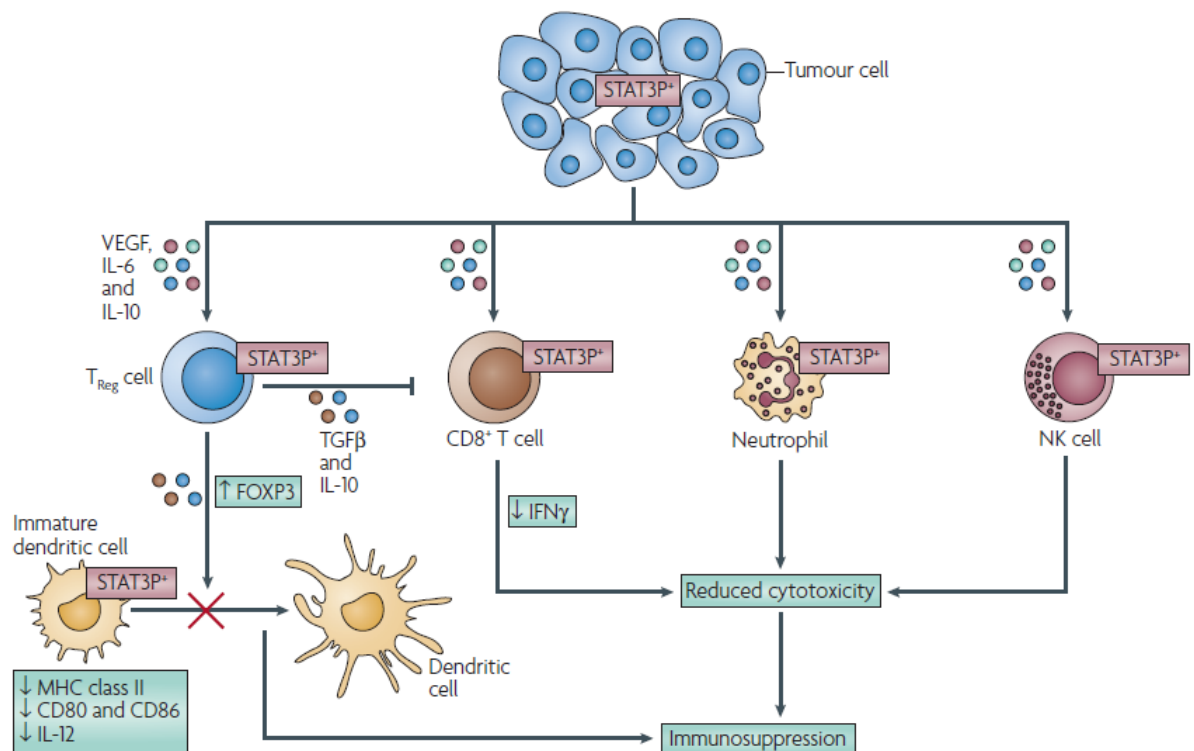


Figura 8. Representación de la Vía STAT3 en células tumorales

Parece que existen evidencias que apuntan a que las CSCs expresan marcadores de superficie y liberan factores solubles que les permiten modular la respuesta inmune en su entorno, protegiéndolas contra su destrucción del sistema inmune de una manera mucho más efectiva que como lo harían las células tumorales totalmente diferenciadas. Aun así, es necesario estudiar más a fondo y en cohortes más grandes de CSCs, que procedan principalmente de pacientes, su relación con el sistema inmune ya que aún existe un gran desconocimiento y hay muy pocos estudios. Por lo

tanto, el microambiente tumoral de las CSCs podría tener un gran rol en modular la respuesta inmune por lo que el éxito de las aproximaciones inmunoterapéuticas dependerá de un mejor entendimiento del rol que este microambiente tumoral juega en respuestas inmunes. Por ende, la identificación molecular de agentes inmunomoduladores que sean capaces de revertir o inhibir el escape inmunológico asociado a las CSCs permitiría diseñar nuevas estrategias que tengan como diana esta población, y en consecuencia, la completa erradicación de tumores con altas tasas de recaídas como es el caso del cáncer de pulmón. Consecuentemente, uno de los principales objetivos de este trabajo es estudiar la relación entre las CSC pulmonares y el microambiente inmune tumoral proporcionando una mejor caracterización del contexto inmune en CPNM.

2. OBJETIVOS

Las CSCs en CPNM son una población de células pobremente reconocidas por el sistema de vigilancia inmunológica, que podrían activar mecanismos de escape inmunológico que podrían estar involucrados en el proceso de tumorigénesis; por consiguiente, el principal objetivo de este trabajo es analizar y caracterizar el papel modulador que ejercen las CSCs sobre el microambiente tumoral en CPNM, utilizando modelos derivados de tejido tumoral de pacientes y líneas celulares de cáncer de pulmón.

Los objetivos específicos del estudio son:

1. Establecer cultivos primarios, a partir de muestras de resecciones quirúrgicas de CPNM, en condiciones de adherencia (cultivos 2D) y esferoides (cultivos 3D).
2. Analizar la expresión relativa de los genes inmunomoduladores (*TGF- β* , *STAT3*, *PD-L1*, *PD-L2*, *IDO1*, *IDO2*, *CD200*, *ICOS-LG*, *OX40-LG*, *LGAL-3*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-4*) en tumoresferas y en células crecidas en monocapa.
3. Estudiar la interrelación entre el microambiente inmune y las CSCs valorando la presencia de mediadores solubles con capacidad inmunosupresora (IL-4 e IL-10) o inmunorreguladora (IL-6 e IL-8) mediante inmunoensayos multiparamétricos.
4. Correlacionar e integrar los resultados de los análisis de expresión génica y de secreción de citoquinas en modelos 2D y 3D en CPNM.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras incluidas en el estudio

En este estudio, se utilizaron las células tumorales de pacientes con CPNM en estadio resecable del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia. Los pacientes que cumplían los criterios de inclusión (estadio I-IIIB resecables no tratado, de acuerdo con el sistema de estadificación de *American Joint Committee on Cancer* con un diagnóstico histológico de CPNM) fueron informados e invitados a participar en el estudio. Las características demográficas y clinicopatológicas de las muestras que fuimos capaces de establecer cultivos primarios se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características clinicopatológicas de los pacientes incluidos en el estudio.

Cultivo primario	Edad	Sexo	Estadio	Histología	Hábito tabáquico	Mutaciones	Progresión	Exitus
299	69	Hombre	IIIB	SCC	Ex-fumador	Wt. EGFR, ALK, KRAS	SÍ	SÍ
301	71	Hombre	IIB	SCC	Ex-fumador	Wt. EGFR, ALK	NO	NO
302	74	Mujer	IIA	ADC	Nunca	Wt. EGFR, KRAS, ALK	NO	NO
303	57	Hombre	IB	ADC	Fumador	Wt. EGFR, KRAS, ALK	SÍ	NO
315	65	Mujer	IA	ADC	Nunca	Wt. EGFR, KRAS, ALK	NO	NO
317	76	Hombre	IIB	SCC	Fumador	Wt. EGFR, KRAS, ALK	NO	SÍ
320	65	Mujer	IB	SCC	Fumador	Wt. EGFR, ALK, KRAS	NO	NO
343	60	Mujer	IB	ADC	Ex-fumadora	Wt. EGFR, ALK	SÍ	NO

SCC: Carcinoma de células escamosas; ADC: Adenocarcinoma; LCC: Carcinoma de células grandes

Además, doce líneas celulares comerciales de cáncer de pulmón (H1650, A549, HCC827, PC9, H1993, H2228, H1395, H460, H23, H358, H1975, H1395) fueron analizadas en este proyecto. Todas estas líneas se obtuvieron de *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, USA), con excepción de la línea celular PC9, que fue obtenida en Sigma (St Louis, MO, USA). Las características de las líneas celulares se encuentran ilustradas en la Tabla 3.

Tabla 3. Líneas celulares de cáncer de pulmón utilizadas en este estudio.

Línea celular	Tejido	Edad	Sexo	Estadio	Histología	Hábito tabáquico	Mutaciones
A549	Pulmón	58	Hombre	IA	ADC	NE	<i>KRAS p.G12S</i>
H1650	Efusión pleural	27	Hombre	IIIB	ADC	Poco fumador	<i>EGFR p.E746_750del</i>
HCC827	Pulmón	39	Mujer	NE	ADC	NE	<i>EGFR p.E746_750del</i>
PC9	Pulmón	NE	Mujer	NE	ADC	No fumador	<i>EGFR p.E746_750del</i>
H1993	Pulmón metastásico	47	Mujer	IIIA	ADC	Fumador	<i>TP53 p.C24W</i>
H2228	Pulmón	NE	Mujer	NE	ADC	No fumador	<i>ELM4-ALK+traslocación RB1 p.E204fs*10</i>
SW900	Pulmón	53	Hombre	IV	SCC	NE	<i>KRAS p.G12C</i>
H460	Efusión pleural	NE	Hombre	NE	LCC	NE	<i>PI3KCA p.E545K, KRAS pQ61H</i>
H23	Pulmón	51	Mujer	NE	ADC	NE	<i>KRAS p.G12C</i>
H358	Pulmón metastásico	NE	Hombre	IV	ADC	NE	<i>KRASp.G12C</i>
H1975	Pulmón	NE	Mujer	NE	ADC	No fumadora	<i>EGFR p.L858R, p.T790M</i>
H1395	Pulmón	55	Mujer	II	ADC	Fumador	<i>BRAF p.G469A, c.G1406C</i>

SCC: Carcinoma de células escamosas; ADC: Adenocarcinoma; LCC: Carcinoma de células grandes; NE; no especificado

3.2. Establecimiento de cultivos celulares primarios en adherencia y en esfera

El tejido tumoral fresco (proporcionado por el servicio de patología) procedente de pacientes con CPNM (n =8) sometidos a lobectomía o pnemonectomía se lavó con PBS que contenía penicilina-estreptomina antes de ser disgregado por métodos mecánicos y enzimáticos. En resumen, cada pieza tumoral se cortó en pequeños trozos usando un bisturí y se incubó con 7 ml de medio de disgregación que consiste en DMEM/F12 (Gibco,Paisley,UK) con 0,001% DNAasa (Sigma-Aldrich, St Louis,USA), 1 mg/ml de colagenasa (Gibco,Paisley,UK), 1 mg/ml de dispasa (Gibco, Paisley, UK) 200 U/mL penicilina y 200 µg/mL estreptomina (2% antibiótico, Gibco, Paisley, UK) a 37°C durante 3 horas en el baño con agitación intermitente. Una vez disgregado enzimáticamente la muestra se pasa por dos filtros de 70 µm y 40 µm (BD Falcon, San Jose, USA). A continuación se centrifuga el filtrado a 1200 rpm durante 5 minutos a T° ambiente y se evalúa la viabilidad celular mediante azul de tripano (Gibco, Paisley, UK). Para su amplificación, la mitad de las células tumorales se ponen a crecer en una placa de 6 pocillos de adherencia (Corning, Lowell, MA, USA) con medio *Defined*

Keratinocyte-Serum Free Medium (DK), medio supresor del crecimiento de fibroblastos (Gibco, Paisley, UK) y con superficie tratada que favorece la adherencia. Una vez los cultivos primarios se establecieron, el mantenimiento se realizó con DMEM/F12 suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco, Paisley, UK), 2% de penicilina-estreptomicina y 1% de L-glutamina.

Por otro lado, una de las características de las CSCs es la formación de esferoides en medio libre de suero por lo que para la formación de las tumoresferas la otra mitad de células tumorales se crecieron en una placa de baja adherencia de 6 pocillos (Corning, Lowell, MA, USA), 3 pocillos con medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 50 µg/mL factor de crecimiento epidérmico (EGF, Gibco, Paisley, UK), 20 µg/mL factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF, Gibco, Paisley, UK), insulina-transferrina-selenio (ITS, BD Biosciences), 0.4% albumina de suero bovino (BSA, Gibco, Paisley, UK), 200 U/mL de penicilina y 200 µg/mL estreptomicina y 2% B27 (Gibco, Paisley, UK), y otros tres con medio Bronchial Epithelial Cell Growth Medium BEGM (Lonza, Suecia).

Cuando los cultivos primarios son establecidos, se pasan a frascos de cultivo de 75 cm² con su correspondiente medio de cultivo. Todas las células cultivadas se mantienen a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5% y se reemplaza el medio de cultivo dos veces por semana.

3.3. Cultivos de líneas celulares

Todas las líneas celulares comerciales fueron mantenidas en RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 2% penicilina-estreptomicina y 1% de L-glutamina 200 mM a 37°C y 5% de CO₂. A partir de estas líneas celulares se establecieron dos tipos de cultivo diferentes, crecimiento en adherencia y crecimiento en esferoides.

Para obtener cultivos de esferas, característicos de las CSCs, cuando la monocapa de células en adherencia llegó a una confluencia del 70-80% de células fue enzimáticamente disociada en una única suspensión de células usando 0,5% EDTA-Tripsina 1x (Gibco, Paisley, UK). A continuación se sembraron a la densidad deseada en frascos de cultivo de baja adherencia de 75 cm². Para la expansión de los cultivos se disgregaron enzimáticamente las esferas y se volvieron a cultivar las células individuales y los pequeños agregados en medio fresco completo. Se reemplazó el medio de cultivo dos veces por semana.

Se comprobó de manera rutinaria que tanto los cultivos primarios como las líneas celulares fueran negativos para la presencia de micoplasma (Uphoff, 2014).

Por último, cabe destacar que las células fueron crecidas en 2D y en 3D para los experimentos de expresión génica así como para los experimentos de secreción de citoquinas realizados en este trabajo.

3.4. RTqPCR

3.4.1. Extracción y aislamiento de ARN/ADN

Para el aislamiento del ARN/ADN, se recogieron las células con 0,5% EDTA-Tripsina 1x cuando adquirieron una confluencia del 70-80%. Posteriormente se centrifugaron a 1200 rpm las células en monocapa y a 1000 rpm las tumoresferas durante 5 minutos. Los pelets celulares se lavaron con PBS y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

El ARN y ADN se aisló usando el método basado en trizol (Tri Reagent®, Invitrogen, USA). Se añadieron 1 ml Tri Reagent® y 200µl de cloroformo a cada pelet celular para separar la fase acuosa que contiene el ARN. Se utilizó a continuación el isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos y el etanol para lavar. Finalmente, el ARNm aislado se resuspendió en agua libre de nucleasas (Qiagen) y se almacenó a -80°C hasta su análisis posterior. La interfase de ADN se recogió con etanol absoluto y se lavó, primero con 10% de etanol/0,1M citrato sódico y luego con etanol al 75%. Al final se resuspendió en agua libre de nucleasas y se almacenó a -80°C hasta su análisis posterior. Para determinar la calidad y cuantificar los ácidos nucleicos se utilizó la nanoespectrometría (Nano Drop 2000C, Thermo Fisher Scientific, USA).

3.4.2. Reacción de retrotranscripción

La transcripción reversa o retrotranscripción, es una técnica molecular que permite la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de moléculas de ARNm extraído utilizando la enzima transcriptasa reversa. En este caso, se utilizó el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*® (Applied Biosystems), que incluye una mezcla de cebadores de 8 nucleótidos generados al azar (*random primers*) para retrotranscribir 0,5 µg de ARN por muestra en un volumen final de 20 µl utilizando para ello la enzima *Multiscribe*. En este estudio, se empleó el termociclador *Mastercycler* (Eppendorf) siguiendo el programa de temperaturas especificado en la Tabla 4. El ADNc resultante se guardó a -80°C hasta su análisis futuro.

Tabla 4. Programa de temperatura y tiempo de la retrotranscripción.

Fase	Tiempo	Temperatura
1	10 minutos	25° C
2	2 horas	37° C
3	5 segundos	85° C
4	∞	4° C

3.4.3. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

La PCR cuantitativa a tiempo real es una variante de la PCR clásica que proporciona información cuantitativa además de detectar y amplificar muestras de ADN. En este tipo de PCR se utilizan sondas de hidrolisis marcadas con dos fluorocromos en los extremos, diseñadas con la secuencia complementaria al fragmento de ADN que se desea amplificar.

El fluorocromo del extremo 5' actúa como donador de fluorescencia (*reporter*) y el del extremo 3' como aceptor (*non-fluorescent quencher, NFQ*), unido al cual está el *Minor Grove Binder* (MGB) el cuál incrementa la temperatura de fusión (T_m) sin incrementar la longitud de la sonda. La ADN polimerasa se desplaza sobre la cadena molde de ADN sintetizando la cadena complementaria a partir del cebador. Cuando llega al punto donde ha hibridado la sonda, la hidroliza, de modo que se libera el fluorocromo donador y el aceptor deja de captar la fluorescencia. Esta separación, provoca un aumento de la emisión de fluorescencia que mide el detector, que es proporcional a la cantidad de sonda unida al ADN molde, lo que nos proporcionará una medida cuantitativa de este (Figura 9)

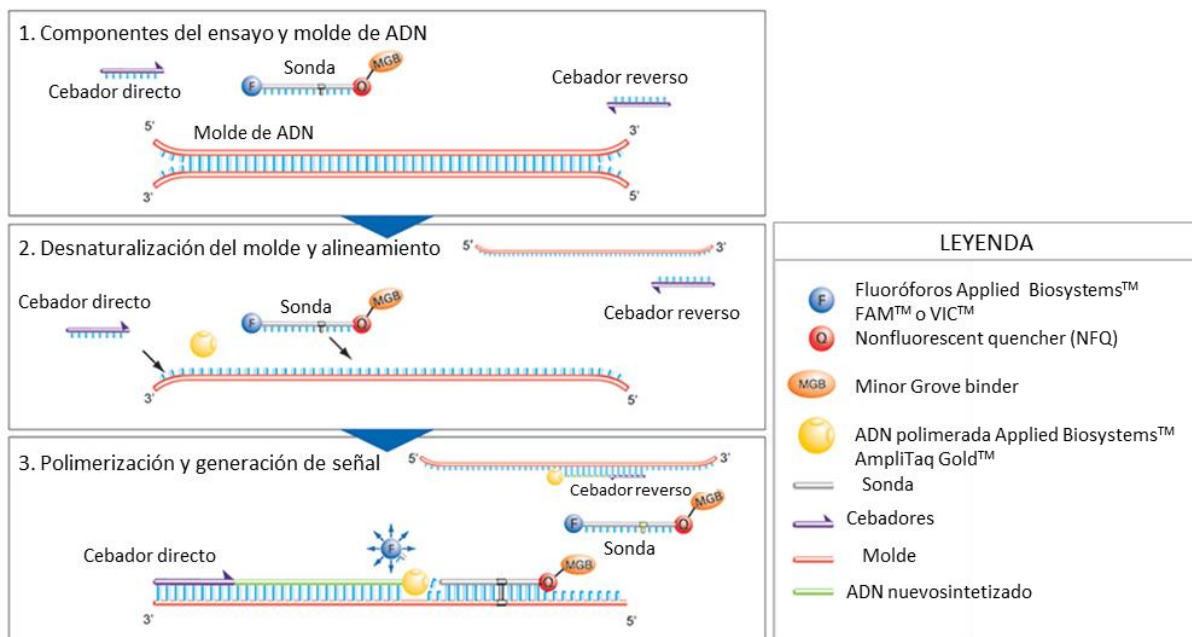


Figura 9. Pasos de la reacción TaqMan® PCR (Life Technologies)

Cada reacción se realizó por duplicado en placas de 384 pocillos con un volumen final de 5µl; y 1 µl de ADNc, 2,5 µl del reactivo TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystem) y 1,25 µl de agua libre de nucleasas. Además se incluyó un control negativo en cada lectura para confirmar la ausencia de contaminación, así como un control positivo de ADNc de referencia disponible comercialmente preparado a partir de una mezcla de ARNs obtenido de varios tejidos humanos (*qPCR Human Reference cDNA*, Clontech, USA). Esta mezcla de ADNc ha sido elegida para representa un amplio

rango de genes. La reacción tuvo lugar en el termociclador Light Cycles 480 (Roche) siguiendo las condiciones de ciclos descritas en la Tabla 5.

Tabla 5. Programa para RT-qPCR

	Paso	Tiempo	Temperatura
Pre-PCR	Incubación con UNG	2 min	50° C
	Activación Taq	10 min	95° C
(40 ciclos)	Desnaturalización	15 seg	95° C
	Unión/Extensión	1min	60° C

UNG: Uracil N-glicosilasa

3.4.4. Cuantificación de la expresión génica relativa

La eficiencia para cada sonda TaqMan® se evaluó llevando a cabo una serie de diluciones (50 ng/μL, 5 ng/μL, 0,05 ng/μL, 0,005 ng/μL and 0,0005 ng/μL) usando el ADNc de referencia mencionado anteriormente y calculada mediante la ecuación $E=10^{-1/\text{pendiente}}$.

Los niveles de expresión génica se analizaron usando sondas TaqMan Gene Expression Assays® (Life technologies, USA), debido a su alto nivel de sensibilidad y especificidad. Como control endógeno o *housekeeping*, se seleccionaron 3 genes, *GUSB*, *ACTB* y *CDK1* para normalizar los resultados. Estos genes endógenos fueron previamente evaluados usando el software Genorm, el cuál calcula la estabilidad génica para diferentes genes controles, permitiendo la selección de los mejores estándares internos (Vandesompele et al., 2002; Bustin et al., 2009) (Tabla 6).

Tabla 6. Genes endógenos para normalizar los resultados

Gen	Código de ensayo	Descripción	Longitud amplicón
ACTB	Hs99999903_m1	Actina beta	171
CDKN1B	Hs.00153277_m1	Inhibidor de ciclinas dependiente de quinasa	71
GUSB	Hs015558067_m1	Glucuronidasa, beta	71

Después de N ciclos de amplificación, la señal fluorescente sobrepasará la fluorescencia base estableciendo el ciclo de cuantificación (Cq), lo que permitirá determinar la cantidad relativa de cada muestra (VanGuilder et al., 2008). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. La media del valor Cq se usó para los análisis.

En este estudio, un total de 14 genes inmunomoduladores, seleccionados de acuerdo a sus implicaciones en la interacción entre las CSCs y el microambiente inmune tumoral, fueron analizados (Tabla 7). La relevancia de estos genes se estableció de la búsqueda en la base de datos Pubmed, que reveló información del rol de estos genes inmunomoduladores en el microambiente tumoral de las CSCs.

Tabla 7. Genes analizados en este estudio, descripción y sonda TaqMan usada para la RTqPCR.

Gen	Descripción	Código de ensayo	Longitud amplicón
PD-L1	Ligando 1 de muerte programada	Hs01125301_m1	89
PD-L2	Ligando 2 de muerte programada	Hs01057777_m1	61
ICOSL	Ligando coestimulador inducible de las células T	Hs00323621_m1	59
LGAL3	Galectina-3	Hs_00173587	64
CD200 – OX2	Cluster de diferenciación 200	Hs01033303_m1	64
IDO1	Indoleamina-2,3- dioxigenasa 1	Hs00984148_m1	66
IDO2	Indoleamina-2,3- dioxigenasa 2	Hs01589373_m1	101
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3	Hs01047580	87
OX40L – CD252	Factor de necrosis tumoral (ligando) superfamilia, miembro 4	Hs00182411_m1	72
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta	Hs00998133_m1	57
IL-8 (CXCL8)	Interleucina 8	Hs99999034_m1	81
IL-6	Interleucina 6	Hs00985639_m1	66
IL-4	Interleucina 4	Hs00174122_m1	70
IL-10	Interleucina 10	Hs00961622_m1	74

Los niveles de expresión génica relativa se expresaron como el ratio de la expresión del gen diana y la expresión del gen de referencia usando la fórmula de Pfaffl (Ecuación 1). La cuantificación relativa se calcula a partir de las eficiencias de los genes y el punto de cruce de la desviación de una muestra desconocida frente a un control (Pfaffl, 2001). La expresión de los tres genes endógenos mencionados anteriormente se consideró la expresión del gen de referencia. Aquí, la cuantificación relativa determina los cambios en los niveles de ARNm del estado estacionario de un gen diana a través de múltiples muestras y lo expresa en relación con los niveles del ADNc control de referencia.

$$Ratio = \frac{E_{diana}^{\Delta C_p \text{ diana (Control-Muestra)}}}{E_{ref}^{\Delta C_p \text{ ref (Control-Muestra)}}$$

Ecuación 1. Fórmula Pfaffl para el ratio de la expresión génica relativa. Diana: gen analizado; Ref:gen endógeno; E: Eficiencia del gen; Cq: punto de cruce; ΔCq: Diferencia de expresión entre el ADNc y muestra tumoral.

3.5. Inmunoensayo multiplexado para factores solubles

3.5.1. Cultivos de cultivos primarios y líneas celulares para el análisis de mediadores solubles

Las células adherentes y las tumoresferas (10.000, 50.000 y 100.000 cél/ml) se sembraron en placas de 24 pocillos en 1ml de medio durante el tiempo deseado (24h). El medio de cultivo se recogió y se centrifugó a 1200rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se guardó a -80°C hasta su posterior utilización con el objetivo de determinar las citoquinas y factores que secretan las líneas celulares y cultivos primarios para observar las diferencias entre las células adherentes y esferas. Además las células fueron de nuevo contadas en una cámara Neubauer utilizando una dilución 1:1 con azul de tripano (Gibco, Paisley, UK) para determinar el número de células a las 24 horas y posteriormente tenerlo en cuenta al calcular la cantidad de factores secretados por las células.

3.5.2. Análisis de las citoquinas mediante la tecnología Luminex xMap®

En este trabajo para medir la concentración de los diferentes factores y citoquinas se utilizaron los paneles y kits MILLIPLEX®MAP basados en la tecnología Luminex xMap®, una de las tecnologías multiplexadas más rápidas y robustas y capaz de llevar a cabo una gran variedad de bioensayos, incluyendo inmunoensayos en la superficie de microesferas magnéticas con fluoróforos, conocidas como microesferas MagPlex®. La tecnología Luminex xMAP® más conocida como LapMap (Laboratory Multiple Analyte Profiling), se basa en el uso de microesferas magnéticas de 6.45µm internamente teñidas con fluoróforos rojo e infrarrojo a concentraciones distintas, creando sets de 80 microesferas cada uno con una firma espectral, cada uno de los cuales es incubado con un anticuerpo específico de captura. Después de que un analito de la muestra es capturado por la microesfera, se introduce un anticuerpo de detección biotinilado. Posteriormente, la mezcla de reacción es incubada con el conjugado Estreptavidina-Ficoeritrina, una molécula reportera que detecta la reacción en la superficie de cada microesfera (Figura 10). La capacidad de añadir múltiples esferas conjugadas a cada muestra resulta en la habilidad de obtener múltiples resultados de múltiples analitos de cada muestra.

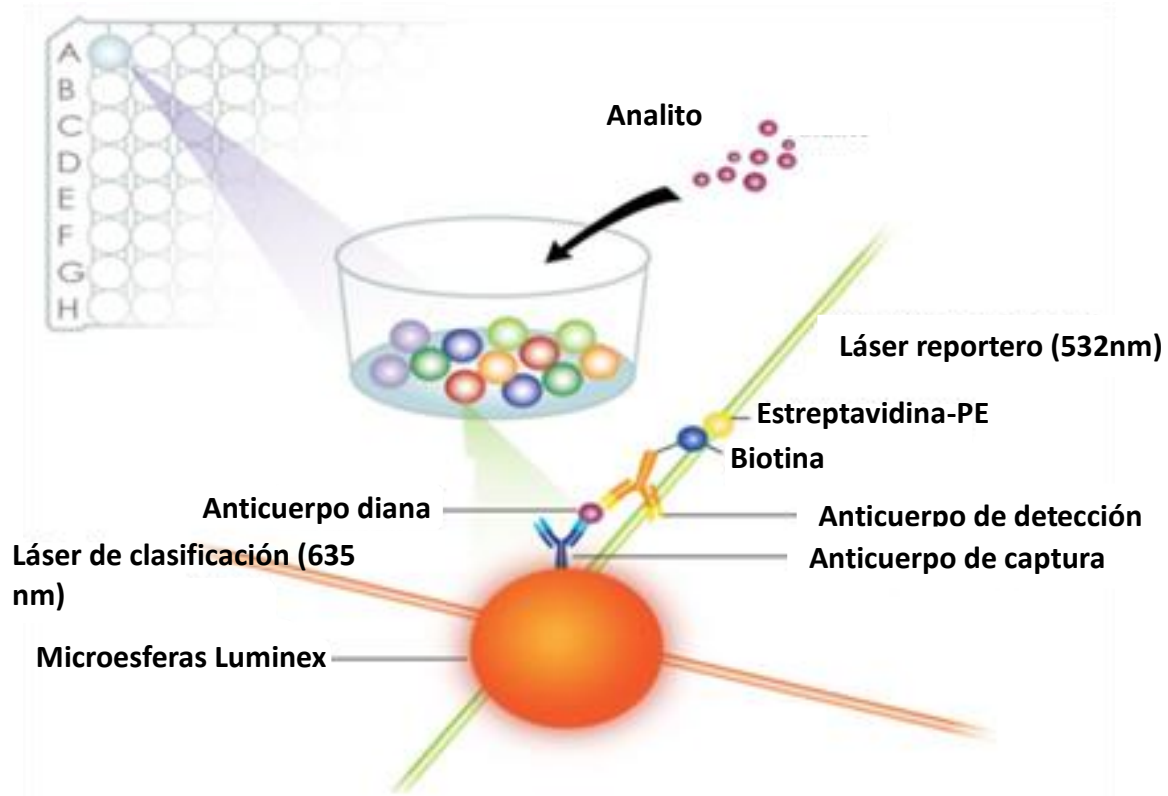


Figura 10. Esquema general del inmunoensayo xMAP Luminex (R&D Systems)

Uno total de 4 analitos se midieron con el panel de 4 citoquinas (Human High Sensitivity T Cell Panel HSTCMAG-28SK-04C, Merck Millipore, USA). El ensayo se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos suministrada y el protocolo se realizó según las instrucciones del kit. Dos controles de calidad proporcionados en cada kit de Millipore (QC1 y QC2) se añadieron a la placa, para evaluar la variabilidad, así como las diluciones de trabajo de los estándares. Para el ensayo, 25 μl de muestra y 25 μl de RPMI se añadieron a cada pocillo y se incubó con 25 μl de la mezcla de microesferas fluorescentes revestidas con los anticuerpos. La placa se incubó toda la noche (16-18 horas) a 2-8°C en agitación constante para su correcta hibridación. Posteriormente se añadió el anticuerpo biotinilado (detector) y la Estreptavidina-Ficoeritrina respectivamente, con incubaciones y pasos de lavado alternantes. Finalmente se añadieron a cada pocillo 100 μl de *sheat fluid* y rápidamente se llevó a cabo el análisis en el sistema Luminex® 100/200TM (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany).

3.5.3. Análisis en el analizador Luminex® 100/200™

El sistema Luminex® 100/200™ es un instrumento basado en citometría de flujo que integra componentes clave para la detección de la reacción llevada a cabo en la tecnología MILLIPLEX®MAP, como el láser, óptica, fluidos y procesador de señal digital de alta velocidad. El analizador luminex consta de dos láseres que miden tanto la fluorescencia de la esfera como la del anticuerpo marcado. El láser rojo (635 nm) excita el rojo/infrarrojo de las microesferas, clasificándolas y determinando que analito está siendo detectado. Por otro lado, el láser verde (532 nm) determina la magnitud de la señal derivada del anticuerpo marcado enzimáticamente (ficoeritrina), la cual es proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

3.5.4. Análisis de datos en Luminex PONENT®

Para la adquisición de datos se utilizó el *software* Luminex xPONENT con capacidades de análisis sofisticadas. La lectura para la concentración de cada citoquina se detectó como intensidad de fluorescencia media (*mean fluorescence intensity*, MFI). Basándonos en la medida de 7 concentraciones estándar, se utilizó una curva estándar de 5 parámetros para convertir los valores de densidad óptica en concentraciones (pg/ml). Las concentraciones calculadas para cada citoquina estaban dentro del rango de; 1,83 a 7.500 pg/ml para la IL-4; 1,46 a 6.000 pg/ml para la IL-10; 0,18 a 750 pg/ml para la IL-6, y 0,31 a 1.250 pg/ml para la IL-8. Los valores por debajo del límite detectable se les asignó la mitad del valor mínimo y los valores por encima del máximo detectable se les asignó el valor máximo.

Para calcular la concentración final de citoquinas secretadas por las células cabe tener en cuenta que la densidad final de células no será la misma que la inicialmente sembrada debido a la tasa de duplicación celular. Por ello, la concentración de citoquinas final secretada por célula se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Concentración de citoquina medida } \left(\frac{\text{pg}}{\text{ml}}\right) \times \text{Volumen de medio } \left(\frac{\text{ml}}{\text{pocillo}}\right) \times \text{número de células sembradas}}{\text{Número de células finales por pocillo}}$$

Ecuación 2. Fórmula para calcular la concentración final de citoquinas por número de células deseadas.

3.6. Análisis estadísticos

Antes de los análisis estadísticos, los datos de expresión fueron revisados cuidadosamente y los valores atípicos se excluyeron.

El primer análisis consistió en evaluar si las variables analíticas seguían una distribución normal o no usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Dado que los resultados fueron negativos, se realizaron pruebas estadísticas de tipo no paramétrico. De esta forma, se utilizó el rango de Spearman's para analizar las correlaciones entre variables continuas de expresión.

Para cada caso, la expresión génica y la secreción de citoquinas de las células adherentes y esferas se analizó usando el test de Wilcoxon. Para la comparación relativa de los genes, el ADNc comercial de referencia se usó para la normalización. Para la comparación de la secreción de citoquinas, el valor del blanco (RPMI), se usó para la normalización. Sólo aquellos valores obtenidos a partir de un conteo de igual o más de 50 microesferas se tuvieron en cuenta.

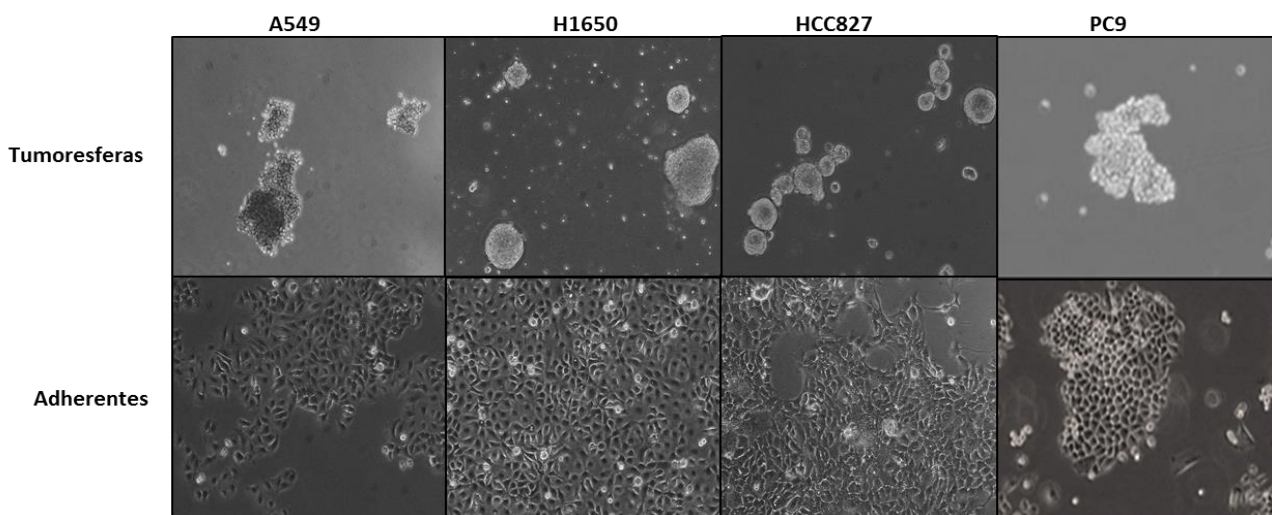
Se utilizaron tablas de contingencia usando como estadístico χ^2 para analizar la dependencia o independencia entre dos variables cualitativas, obtenidas a partir de la dicotomización de las variables continuas de expresión según el valor de su mediana. Se utilizaron los valores de la mediana en lugar de la media porque la mediana se ve menos afectada por la variabilidad de los datos y proporciona robustez estadística al análisis. Todos los análisis, se llevaron a cabo utilizando el software de análisis estadístico *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versión 15.0 (Chicago, IL), considerando estadísticamente significativos aquellos análisis donde $p < 0.05$.

4. Resultados y discusión

4.1. Ensayo de formación de tumoresferas

La técnica de formación de esferas *in vitro* es un método descrito para el aislamiento, la identificación y el enriquecimiento de CSCs (Han et al., 2013). Las células tumorales que no tienen propiedades *stem* tienen un potencial de formación de esferas limitado debido a la pérdida de la telomerasa y la senescencia celular (Patel and Rameshwar, 2013).

Se procesaron 17 muestras biológicas procedentes de la resección quirúrgica de cáncer de pulmón (lobectomía o pneumonectomías) a través de este estudio. Sólo en 8 muestras (47%) fuimos capaces de establecer cultivos primarios, siendo posible crecerlas en condiciones 2D y 3D. Hay muchas causas que influyen en la tasa de éxito del establecimiento de los cultivos primarios; la excesiva necrosis de las muestras de tumor, la mala preservación de las muestras tumorales antes del cultivo, el sobrecrecimiento de fibroblastos y la falta de viabilidad celular, entre muchas otras. Como no fue posible establecer siempre tumoresferas de cultivos primarios derivados de pacientes, se emplearon 12 líneas celulares con diferentes morfologías, tamaños y tasa de crecimiento, para tener una mayor cohorte de muestras. La Figura 11 muestra algunas de estas líneas celulares y cultivos primarios crecidos en monocapa y en esferoides.



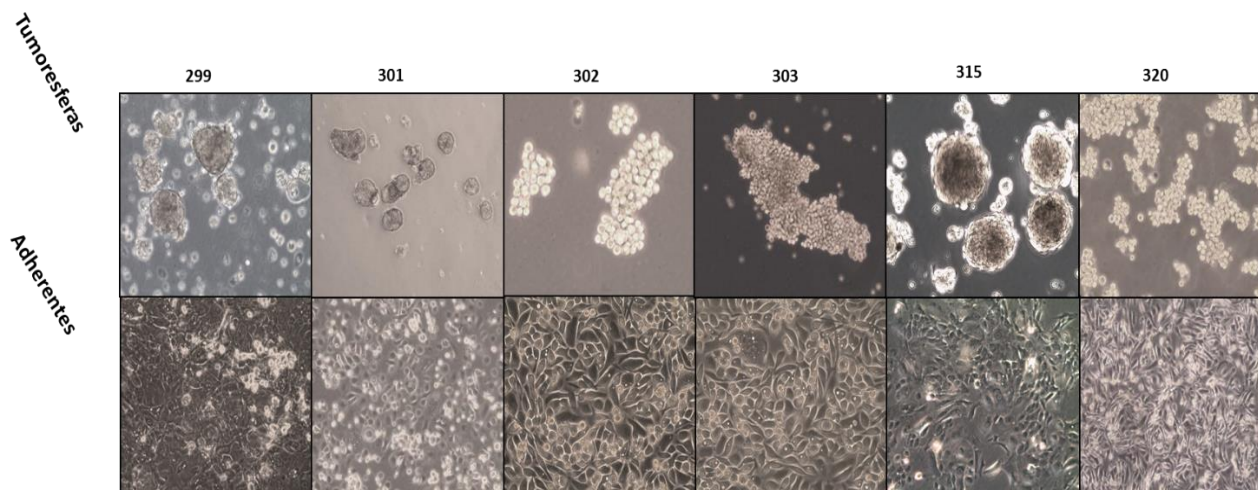


Figura 11. Líneas celulares y cultivos primarios de pacientes con CPNM. Cultivos en adherencia y en esferas.

Cabe destacar que estudios previos realizados en nuestro grupo por citometría de flujo así como por RTqPCR demostraron que tanto las tumoresferas procedentes de las líneas celulares así como de los cultivos primarios mantenían la expresión de marcadores de CSCs por lo que se decidió realizar el estudio conjunto de líneas celulares y pacientes (Pomares et al., 2016; Soto-Cerrato et al., 2015).

4.2. Cuantificación y determinación de la calidad del ARN

Para el análisis de la expresión relativa de los genes, el ARN y ADN de los pelets celulares se aisló usando el procedimiento estándar basado en trizol (ver apartado materiales y métodos). La concentración y la calidad se testaron utilizando un nanoespectrofotómetro. Sólo las muestras con una concentración óptima (≥ 40 ng/ μ l) y de calidad se incluyeron en el estudio. La media de la concentración de ARN para las células cultivadas en adherencia fue 1020,6 [215,0 – 2681,8] ng/ μ l y 850,4 [80,3 – 2131,2] ng/ μ l para tumoresferas. Con respecto a la calidad del ARN obtenido, las relaciones $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ mostraron valores de 1,8 a 2,0 y de 2,0 a 2,2, respectivamente, significando que todas las muestras incluidas en el estudio eran óptimas para los análisis. Por lo tanto, este protocolo de extracción a partir de pelets celulares permite obtener suficiente cantidad de ARN, con buena calidad para el análisis de expresión génica por qPCR y también extraer a la vez ADN y ARN en una única extracción.

4.3. Ensayo de cálculo eficiencia TAQMAN

Como se mencionó anteriormente, la eficiencia para cada ensayo TaqMan se evaluó usando el método de la pendiente de los Cq. Se obtuvieron los valores de los Cq para la dilución seriada del gen diana (triplicados en cada dilución). Después, se construyó un gráfico con los valores de Cq frente a la

pendiente, que debería estar cerca de -3,33, valor que representa un 100% de eficiencia de amplificación. En la Tabla 8, se muestra una lista de los valores de las pendientes y la eficiencia para todos los genes incluidos en el análisis de expresión.

Tabla 8. Resultados de eficiencia para los genes utilizados en el estudio.

Gen	Referencia	Pendiente	Eficiencia	% de eficiencia
<i>PD-L1</i>	Hs01125301_m1	-3,681	1,869	94
<i>PD-L2</i>	Hs01057777_m1	-3,408	1,965	98,25
<i>ICOS-LG</i>	Hs00323621_m1	-3,733	1,853	91,75
<i>LGAL3</i>	Hs_00173587	-3,613	1,891	94,55
<i>CD200</i>	Hs01033303_m1	-3,783	1,847	92,35
<i>IDO1</i>	Hs00984148_m1	-3,559	1,91	95,5
<i>IDO2</i>	Hs01589373_m1	-3,686	1,868	93,4
<i>STAT3</i>	Hs01047580	-3,620	1,889	94,45
<i>OX40-LG (CD252)</i>	Hs00182411_m1	-3,874	1,812	90,60
<i>TGF-β</i>	Hs00998133_m1	-3,617	1,89	95
<i>IL-8 (CXCL8)</i>	Hs99999034_m1	-3,481	1,938	97
<i>IL-6</i>	Hs00985639_m1	-3,47	1,938	96,90
<i>IL-4 *</i>	Hs00174122_m1	-	-	-
<i>IL-10</i>	Hs00961622_m1	-3,348	1,989	99

*Gen con valores por debajo del límite de detección.

4.4. Análisis relativo de la expresión génica

En este estudio analizamos 14 genes inmunorreguladores relacionados con el microambiente de las CSC; inhibidores de la actividad antitumoral de linfocitos y un coestimulador de linfocitos T (*PD-L1*, *PD-L2*, *OX40-LG*), genes favorecedores de la tolerancia inmune (*IDO1*, *IDO2*, *CD200*, *ICOS-LG*), efactores solubles inmunosupresores (*LGAL3* y *TGF-β*), interleucinas inmunosupresoras e inmunorreguladoras (*IL-4*, *IL-8*, *IL-10* y *IL-6*) y un activador de la transcripción de la *IL-10* e *IL-6* (*STAT3*).

Para establecer los controles internos más estables utilizamos el software GeNorm, el cuál indicó que la mejor combinación de controles endógenos era *ACTB*, *GUSB* y *CDKN1B*. Siguiendo el procedimiento propuesto por Vandesompele *et al.* se calculó el factor de normalización basado en la expresión de estos tres genes usando la media geométrica (Vandesompele *et al.*, 2002). Los resultados para los genes inmunoreguladores de las CSCs se presentan y se discuten a continuación. Los valores de expresión se normalizan con el ADNc comercial de referencia.

4.4.1. Expresión de coinhibidores y coestimuladores de las células T

Para el estudio de las moléculas coinhibitorias, que inhiben la actividad antitumoral de los linfocitos, se analizaron los genes *PD-L1* y *PD-L2*, así como también se estudió una molécula coestimuladora de las células T, *ICOS-LG (B7-H2)*. Los resultados de la expresión génica relativa para estos genes se muestran en la Figura 12.

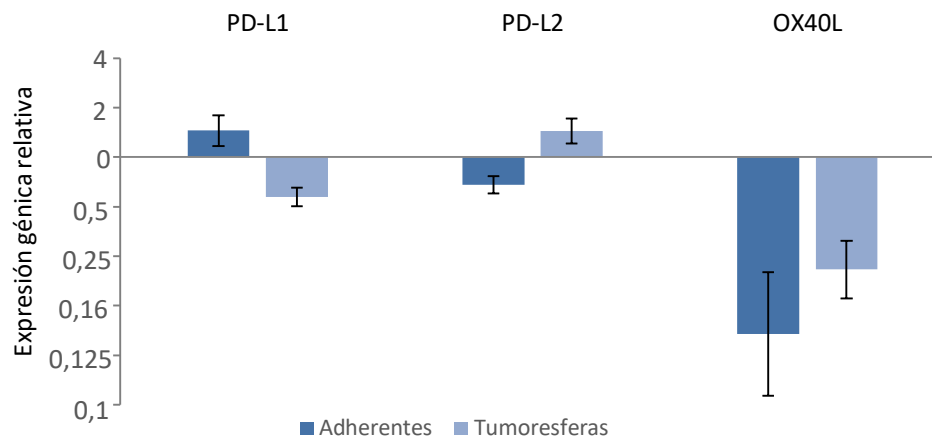


Figura 12. Expresión relativa del ARNm de genes relacionados con la inhibición o estimulación de la actividad de los linfocitos en líneas celulares y pacientes. Las barras representan los valores de expresión \pm la desviación estándar.

Se observa para el gen *PD-L1* una mayor expresión en células adherentes que en tumoresferas. Y para el caso del gen *PD-L2* por el contrario observamos una mayor expresión en esferoides que en las células en monocapa (0,811 vs 2).

Cabe destacar que la información disponible sobre la expresión de *PD-L1/2* en CSCs es muy limitada siendo este uno de los primeros trabajos en estudiarla. Recientes datos del grupo de Yanheng Wu, muestran las primeras evidencias de que la expresión de *PD-L1* está incrementada en CSCs de células MCF-7 (línea de cáncer de mama) y HTC-116 (línea de células de cáncer de colon) respecto a las células en adherencia determinada por citometría de flujo. Por el contrario, no encontraron diferencias en la expresión de *PD-L2* entre adherentes y tumoresferas, contrariamente a nuestros resultados (Wu et al., 2017). Otros datos recientes mostraron utilizando citometría de flujo y Western Blot que *PD-L1* está preferentemente expresado en la subpoblación $CD44^+CD271^+$ (CSCs) derivadas de muestras de pacientes de carcinoma de cabeza y cuello, lo que conlleva a la supresión de la actividad de las células T (Lee et al., 2016). Nuestros resultados sugieren que las CSCs de pulmón no necesitan utilizar *PD-L1* como un mecanismo de evasión del sistema inmune antitumoral. De acuerdo con nuestros resultados, podría ser que las CSCs de pulmón expresasen *PD-L2* como

mecanismo para inhibir la respuesta de las células T, aunque haría falta una ampliación de la cohorte de los pacientes para que las diferencias sean estadísticamente significativas y validar los resultados.

El gen *OX40-LG (CD137L)* mostró niveles de expresión bajos en las dos condiciones. La expresión de *CD137L* por inmunohistoquímica en tejido de pacientes con CPNM se correlacionó con estadios tempranos y una mayor supervivencias global (Qian et al., 2015) pero no hay datos de expresión de esta molécula en tumoresferas, siendo nuestro grupo los primeros en determinar la expresión de esta molécula en CSCs. Recordemos que funciona como molécula coestimuladora de la activación y proliferación de las células T ($CD4^+$ y $CD8^+$) por lo que como esperábamos, en nuestra cohorte las CSCs de pulmón presentan una baja expresión de *OX40L* lo que se traduce en un mecanismo de evasión de la activación de las células T mediante la interacción con su receptor OX40, previniendo así una respuesta inmune anti tumoral.

4.4.2. Expresión de moléculas que inducen tolerancia

Para el estudio de las moléculas que inducen la tolerancia en el microambiente tumoral, se analizaron los genes *IDO1*, *IDO2*, *CD200* e *ICOSL*. Los resultados de la expresión génica relativa para estos genes se muestran en la Figura 13.

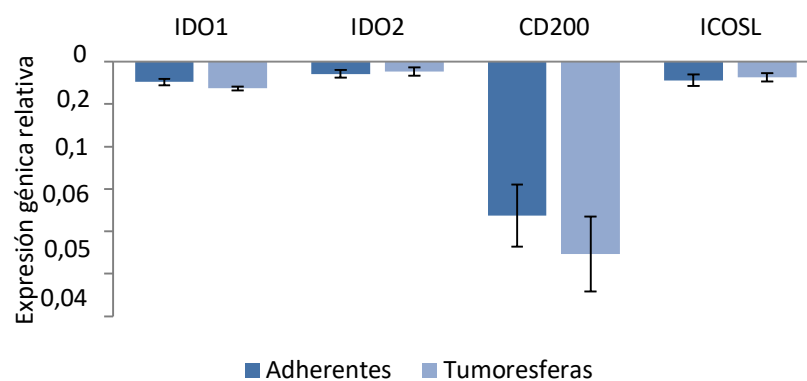


Figura 13. Expresión relativa del ARNm de genes relacionados con la tolerancia inmunológica. Las barras representan los valores de expresión \pm la desviación estándar.

A pesar de que no encontramos diferencias significativas en los genes analizados hay una tendencia de mayores niveles de expresión en las tumoresferas de *ICOSL* (0,4558 vs 0,5417) e *IDO2* (0,6945 vs 0,8567) en comparación con las adherentes. Sin embargo, los genes *IDO1* y *CD200* muestran una mayor expresión en células adherentes que en tumoresferas.

La primera evidencia de sobreexpresión de *CD200* en las CSC la describió Kawasaki *et al.* mediante un análisis de microarrays en una línea celular de próstata LNCaP. Además, por citometría

de flujo observó también la co-expresión de CD200⁺ con marcadores de CSCs en diferentes líneas celulares de mama, glioblastoma, melanoma, cáncer de colon y células madre mesenquimales de médula ósea (hMSCs). Sin embargo, no se han publicado datos de la expresión de esta molécula en CSCs de pulmón. Lo que sí se demostró hace unos años fue que *CD200* está sobreexpresado en pacientes con estadios avanzados de cáncer de pulmón pero no en estadios tempranos lo que podría explicar la baja expresión en nuestras CSCs de pulmón ya que estas se obtuvieron a partir de células pacientes de CPNM resecables en estadios I-III (Moreaux et al., 2008). En nuestro caso por tanto, CD200 no parece ser uno de los mecanismos utilizados por las CSCs de pulmón para evadir la respuesta inmune por su baja expresión en las tumoresferas.

Por otro lado, se ha demostrado que ICOSL se expresa en la membrana de células madre mesenquimales promoviendo la diferenciación y expansión de las Tregs (Lee et al., 2017). En nuestro laboratorio se demostró en una cohorte de 201 pacientes con CPNM que no había diferencias significativas en la expresión de *ICOS-LG* entre tejido tumoral y normal, lo que concuerda con nuestra baja expresión de ICOS-LG en las CSCs (Moreno, 2017).

Por último en lo que respecta a IDO1 e IDO2, estudios previos demostraron que CSC derivadas de 3 líneas celulares de mama, próstata y mesotelioma y dos cultivos primarios de pacientes con glioblastoma multiforme (GBM) presentaban en esferas niveles mayores de expresión de *IDO1* (a nivel de ARNm y de proteína) que en células en adherencia, lo que se tradujo en una disminución de Trp en el medio de cultivo de las CSCs más rápida que en células adherentes, traducido en inmunosupresión, mientras que no se observó cambios en los niveles de ARNm de IDO2 (Stapelberg et al., 2014). En nuestro caso, en cultivos primarios derivados de pacientes con CPNM y en líneas celulares de CPNM, observamos mayor expresión en esferas en el caso de IDO2 (0,6945 vs 0,8567) aunque sin diferencias significativas entre estos cultivos 2D y 3D debido al gran grado de diferencia en la expresión en las distintas muestras. Estos resultados podría ser muy interesantes ya que aumentando la cohorte estas pequeñas diferencias en la expresión entre tumoresferas y células adherentes podrían ser significativas y se podría postular como un mecanismo utilizado por las CSCs de pulmón para evadir el sistema inmune anti-tumoral.

4.4.3. Expresión de factores solubles con actividad frente a las células T

Para el estudio de las moléculas solubles con actividad inhibitoria frente a las células T se estudiaron los genes *LGAL-3* y *TGF- β* . Los resultados de la expresión génica relativa para estos genes se muestran en la Figura 14.

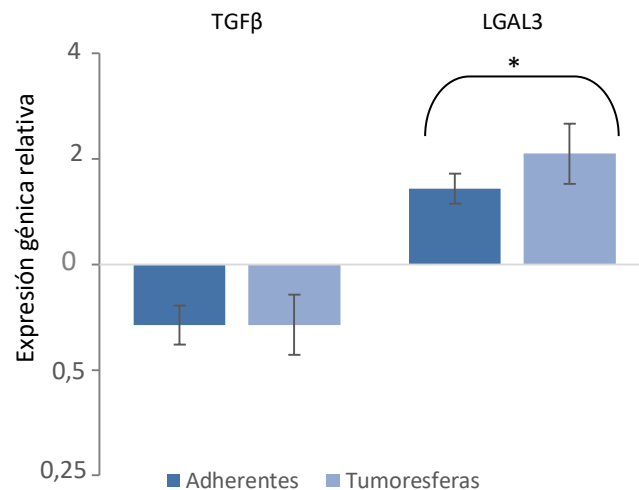


Figura 14. Expresión relativa del ARNm de genes relacionados con la inmunosupresión. Las barras representan los valores de expresión \pm la desviación estándar. * $p < 0,01$

En este caso los niveles de expresión de LGAL3 fueron significativamente mayor en tumoresferas cuando las comparamos con las células en adherencia (1,42 vs 2,10, $p=0,003$).

Jun Wei *et al.* ya observó que las células indiferenciadas de glioblastoma, las CSC, secretaban mayores niveles de Galectina-3 que aquellas células en estado diferenciado (posiblemente acorde a su expresión génica) y que además la Galectina-3 era la responsable directa de la apoptosis de las células T inmunes pero no afectaba a la inducción de los Treg sugiriendo que también otros mecanismos están envueltos en la inmunosupresión mediada por las células madre tumorales de glioma (J. Wei et al., 2010). Acorde con nuestros resultados, un estudio reciente también demostró que las tumoresferas de pulmón derivadas solo de 4 líneas celulares (H1299, A549, HOP62, NCI-H522) expresaban altos niveles de galectina-3, destacando la línea H1299 de CPNM que secretaban 8 veces más la Galectina-3 que las células adherentes de esta misma línea y además se postuló que actúa como cofactor interaccionando con la β -catenina en el núcleo para aumentar la actividad transcripcional de genes relacionados con las propiedades *stem* y la formación de CSC (Chung et al., 2014). Gracias al uso de tumoresferas obtenidas de cultivos primarios de pacientes con CPNM y no solo de líneas de cultivos como en el estudio de Chung *et al.*, y la sensibilidad y reproducibilidad de la técnica usada, la RTqPCR, nuestros resultados son más robustos, con mayor aplicabilidad clínica y aportan mayor validez a que uno mecanismos que pueden utilizar las CSCs de CPNM para suprimir la respuesta inmune contra el tumor es a través de la vía de la galectina-3.

Por el contrario, en nuestra cohorte de células no observamos diferencias en la expresión del gen *TGF-β* entre adherentes y tumoresferas. Acorde con nuestros resultados previos estudios han demostrado que no hay diferencias en la expresión de esta citoquina entre CSCs y células tumorales adherentes de glioblastoma (Tiziano Di Tomaso et al., 2010). Opuestamente, se han descrito en una línea celular de carcinoma de cabeza y cuello una mayor secreción de *TGF-β* (medida por ELISA) en las CSCs comparada con aquellas células sin características *stem* (Chikamatsu et al., 2011). A pesar de ello somos de los primeros grupos en analizar la expresión de esta molécula en CSCs de pulmón tanto en líneas celulares como en cultivos primarios derivados de pacientes y basándonos en nuestros resultados no parece que las CSCs de pulmón utilicen la vía de *TGF-β* para inducir la inmunosupresión.

4.4.4. Expresión de interleucinas inmunosupresoras solubles y STAT3

Una de las estrategias que utilizan las CSCs para regular el microambiente inmune con el propósito de evadir los mecanismos efectores antitumorales es el incremento de la secreción de interleucinas inmunosupresoras e inmunorreguladoras. Se evaluó la expresión de genes relacionados con la inmunosupresión: *IL-8*, *IL-6*, *IL-4* e *IL-10* (Figura 15). Además también se evaluó la expresión del gen *STAT 3*, un regulador de la transcripción de estos factores solubles (Figura 15).

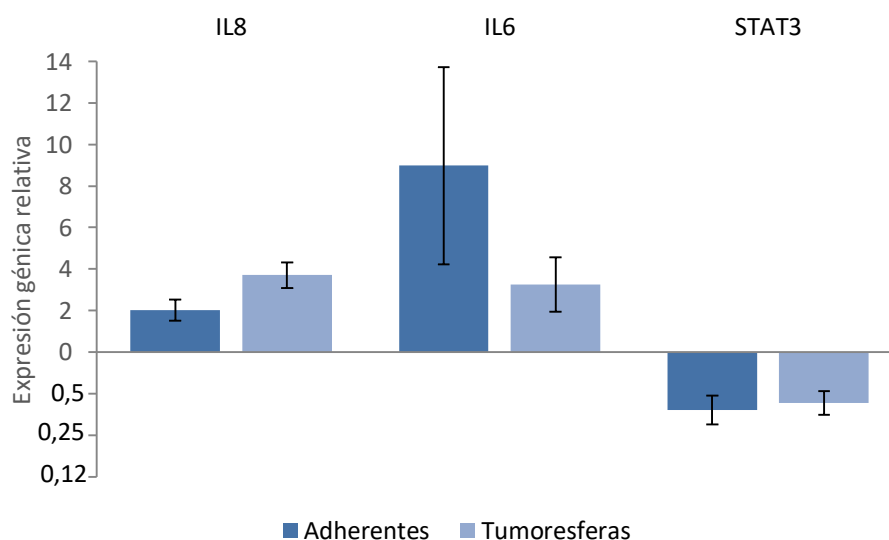


Figura 15. Expresión relativa del ARNm de moléculas inmunosupresoras y STAT3. Las barras representan los valores de expresión \pm la desviación estándar.

No se observó expresión de los genes *IL-4* e *IL-10*, genes cuyos valores de expresión estuvieron por debajo del límite de detección, así como tampoco secreción. Estos resultados concuerdan con los niveles de expresión de *IL-4* e *IL-10* en tejido tumoral de pacientes con CPNM analizados en nuestro

laboratorio, siendo incapaces de detectar la expresión de IL-4 y detectando niveles de expresión muy bajos para la IL-10, resultados que explicarían no haber detectado ni en células adherentes ni en tumoresferas secreción ni expresión.

Los niveles de expresión de *IL-8* en tumoresferas fueron significativamente mayores que en las células adherentes (2,03 vs 3,7113; $p=0,05$) y al contrario para *IL-6*, cuya expresión en las células adherentes fue más alta que en las tumoresferas (8,9732 vs 3,2563), no siendo esta significativa seguramente por el gran grado de variación de la expresión de este gen entre las muestras. De acuerdo con nuestros resultados, a pesar de ser tipos de cáncer muy diferentes podría dar valor a nuestros resultados el hecho de que también se haya observado que la expresión de IL-6 en CSCs derivadas de cultivos primarios de pacientes con glioblastoma sea menor frente a las células tumorales normales (Tiziano Di Tomaso et al., 2010). Nuestros resultados proponen que las CSCs al no expresar IL-6 evitan un ambiente inflamatorio y hacen que no se favorezca la respuesta inmune antitumoral de las células T. En este caso posiblemente aumentando la cohorte obtengamos diferencias significativas entre cultivos 2D y 3D. Por otro lado, acorde con nuestros resultados, las CSCs obtenidas a partir de pacientes con cáncer de ovario así como de una línea celular de carcinoma escamoso de cabeza y cuello presentaban niveles altos de IL-8 (Alvero et al., 2009; Chikamatsu et al., 2011). Gracias al uso tanto de líneas celulares como de cultivos primarios derivados de pacientes con CPNM, así como a la gran sensibilidad de la técnica empleada, y la significancia de los datos, podríamos postular con mayor grado de certeza que las CSCs utilizan la IL-8 como un mecanismo para evadir el sistema inmune. Por último, analizando el gen STAT3 que regula la transcripción de IL-6 e IL-10 y está implicado en inmunosupresión se observó una tendencia de mayores niveles de expresión en tumoresferas comparadas con las adherentes (0,36 vs 0,41) sin ser las diferencias estadísticamente significativas. La investigación llevada a cabo por Jun Wei *et al.* indicó que la vía de STAT3 se trataba de una vía molecular significativa utilizada por las CSC para mediar la supresión inmune del sistema inmune adaptativo, específicamente las respuestas mediadas por las células T (Jun Wei et al., 2010). Posiblemente con un mayor número de muestras las pequeñas diferencias observadas entre las células crecidas en esferoides y en monocapa podrían llegar a ser significativas y poder postular su una implicación en la evasión inmune.

Pero una de las cuestiones que nos planteamos fue si realmente estas diferencias en los niveles de expresión génica entre células adherentes y tumoresferas concordaban con los niveles de proteína secretados tras la traducción. Decidimos entonces medir la secreción de estas 4 citoquinas mediante un inmunoensayo multiplexado ultrasensible para dar mayor validez a nuestros resultados. Cabe destacar que tanto para la IL-6, IL-8, IL-4 e IL-10 los niveles de expresión sí concuerdan con los

niveles de proteína secretados al medio de cultivo que serán comentados posteriormente. Estos resultados se discutirán más a fondo junto con los niveles de secreción en el apartado 4.6.2.

4.5. Correlaciones entre genes

Para llegar a saber qué genes están correlacionados realizamos un análisis de rango *Spearman* explicado en el apartado Materiales y Métodos.

Cabe destacar la correlación positiva encontrada entre CD200 e ICOSL ($CD200 - ICOSL$, $p=0,004$), acorde con lo anteriormente explicado, ya que ICOS-LG induce la expansión de las células T reguladoras lo que está además se ha visto que está relacionado con una sobreexpresión de *CD200* (Aref et al., 2017).

Una correlación muy interesante que encontramos en tumoresferas fue entre los genes *PD-L1* e *IL-8* ($p=0,05$). Tanto PD-L1 directamente como IL-8 atrayendo a las MDSC inhiben la proliferación y activación de las células T, creando ambos un fuerte ambiente inmunosupresor. Recientemente se ha descrito que los pacientes respondedores a terapias anti-PD1/PD-L1 como nivolumab o pembrolizumab presentan tras la terapia niveles reducidos de IL-8 en suero mientras que los niveles de los que no responden a la terapia se incrementan (los niveles en suero se correlacionaban con la expresión del gen). Por lo tanto los cambios en los niveles de la IL-8 predicen la respuesta a las terapias anti-PD1 (Sanmamed et al., 2017), lo que podría reflejar los cambios importantes en la composición del microambiente tumoral. Este descubrimiento está acorde con nuestros resultados ya que nosotros observamos que los genes *PD-L1* e *IL-8* están correlacionados, y estos resultados sugieren que el bloqueo de PD-1 y por tanto el bloqueo de la inmunosupresión ejercida por el tumor a través de PD-L1 disminuiría los niveles de IL-8, disminuyendo aún más la inmunosupresión ejercida por el tumor a través de PD-L1 e IL-8 haciendo por tanto que estos pacientes respondan mejor al tratamiento y tengan una tasa de supervivencia mayor.

Por último, encontramos una correlación positiva entre los niveles de expresión en tumoresferas de *IL-6* y *PD-L1* ($IL-6 - PD-L1$, $p= 0,049$). Como ya comentamos anteriormente, tanto el PD-L1 tras su unión a PD-1 como la IL-6 impidiendo la maduración de las CD provocan la inactivación o el estado de anergia de las células T efectoras. Acorde con esta correlación, recientemente un grupo observó que la inhibición de la IL-6 así como el bloqueo de PD-L1 reduce la progresión tumoral en modelos de raton de cáncer de páncreas (Mace et al., 2016), por lo tanto la inhibición de la IL-6 podría aumentar la eficacia de los fármacos anti-PD-L1.

4.6. Análisis de la secreción de citoquinas

Los inmunoensayos han sido ampliamente utilizados para la cuantificación de proteínas y pequeñas moléculas en el diagnóstico médico, proteómica, descubrimiento de fármacos y otras investigaciones biológicas. La técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay) es la técnica más utilizada para realizar un inmunoensayo, pero son laboriosos, caros, y consumen una gran cantidad de reactivos. Con el tiempo se han desarrollado métodos de bajo coste, flexibles y que generan una gran cantidad de datos para la detección de múltiples proteínas en paralelo en un solo ensayo (inmunoensayo multiplexado). Un gran número de plataformas multiplexadas se han desarrollado, particularmente, los recientes avances en la tecnología (por ejemplo; fluidos, óptica, dispositivo automático de manipulación de muestras) y la informática han permitido los inmunoensayos multiplexados de alto rendimiento. Hasta la fecha, muchas plataformas están disponibles comercialmente incluyendo la tecnología que utilizamos basada en microesferas codificadas ópticamente xMAP (Multi-Analyte Profiling) por Luminex® (Self and Cook, 1996).

Mediante este inmunoensayo multiplexado analizamos 4 interleucinas relacionadas con el microambiente de las CSC; dos citoquinas inmunorreguladoras (IL-6 e IL-8) y dos inmunosupresoras (IL-4 e IL-10).

4.6.1. Puesta a punto de los cultivos

En primer lugar se realizó la puesta a punto del cultivo de células así como de tiempos de recogidas del medio de cultivo. Se llevaron a cabo siembras a diferentes densidades (5.000, 10.000, 50.000, 100.000 y 200.000 cé/ml) para determinar el número óptimo de células cultivadas. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando todas las líneas celulares excepto la H1975 y la H1395 por la disponibilidad, así como dos de los pacientes; el 301 y el 343 por ser los pacientes con la expresión de *IL-8* más alta en las dos condiciones de cultivo (1,93 vs 1,49), y el 343 por su elevada expresión observada en adherentes y en esferas para *IL-6* (44,41 vs 3,30). Nuestro próximo paso será analizar todos los pacientes. Finalmente decidimos de acuerdo con otros autores y observando el crecimiento de las células realizar los análisis de secreción en los medios de cultivo de las células sembradas a estas tres densidades (10.000, 50.000, y 100.000 cél/ml) en placas de 24 pocillos. Otros autores realizaron la detección de citoquinas sembrando líneas celulares, entre ellas de CPNM, en un rango de densidades entre 12.500 y 100.000 y cél /ml obteniendo niveles de estas citoquinas detectables dentro del límite de detección de nuestro kit (Levina, Su, et al., 2008) por lo que nuestra densidad de células parecía ser la correcta para la detección de citoquinas. Realizamos además distintas pruebas se recogida de medio de cultivo a las 24, 48 y 72 horas pero basándonos en otros estudios de análisis

de secreción de estas citoquinas realizados en células tumorales, incluidas líneas de CPNM, decidimos medir la concentración de citoquinas a las 24 horas de ser sembradas, ya que este periodo de tiempo es el elegido por muchos autores y el óptimo para medir diferencias de lo que las células adherentes y esferas secretan al medio de cultivo (Levina, Marrangoni, et al., 2008; Desai et al., 2013).

La Figura 16 muestra los cultivos a las tres densidades sembradas en condiciones de adherencia y en esferoides a las 24h a las tres densidades distintas.

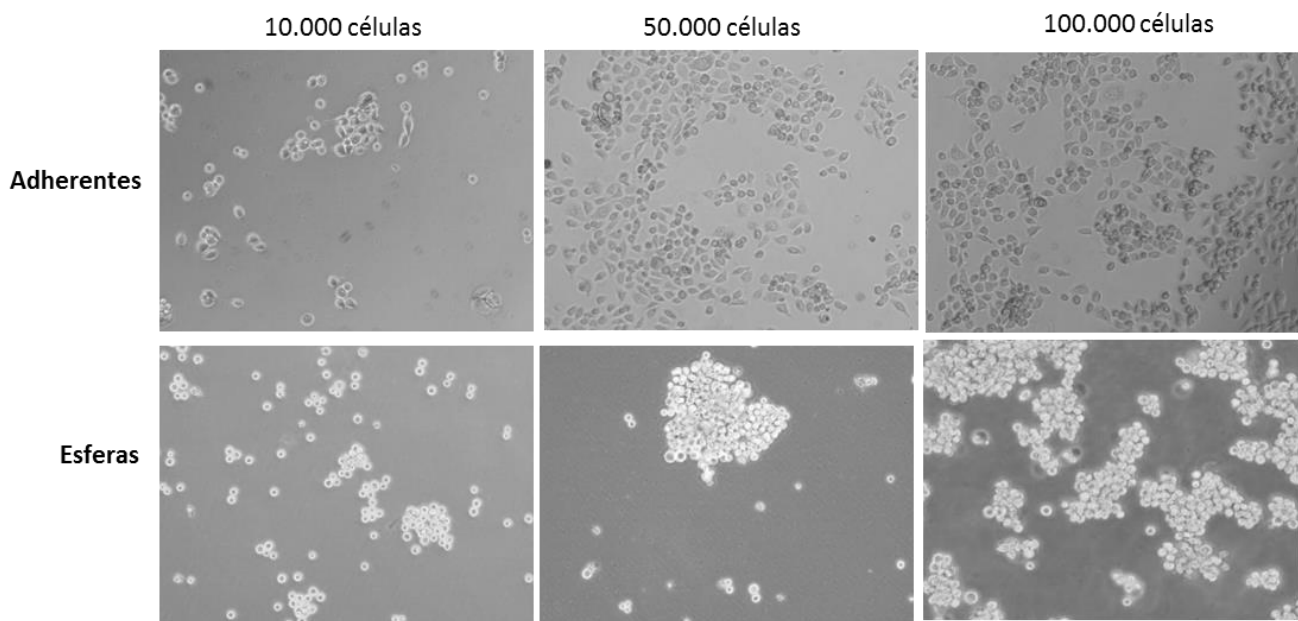


Figura 16. Cultivo a las tres densidades sembradas (10.000, 50.000 y 100.000 cél/ml) a las 24h: en adherencia y en esferas.

4.6.2. Medición de la secreción de citoquinas al medio de cultivo

A continuación quisimos medir la cantidad de IL-6, IL-8, IL-10 e IL-4 secretadas al medio de cultivo por las células crecidas en monocapa y en esferoides para observar si la expresión del gen concordaba con la secreción proteica.

Cabe destacar que a pesar de que no detectamos expresión de los genes *IL-4* e *IL-10* decidimos intentar usar otra metodología para poder detectar los niveles de proteína secretada al medio utilizando un kit ultrasensible con límites de detección muy bajos de 1,83 pg/ml para *IL-4* y 1,46 pg/ml para *IL-10* en comparación con los límites de detección en un kit de ELISA convencional que son del orden de más de 10 pg/ml para *IL-4*, y del orden de más de 3pg/ml para la *IL-10*. A pesar de ello no fuimos capaces de detectar tampoco proteína secretada al medio de cultivo por parte de las

líneas celulares y cultivos primarios ni en adherentes ni en tumoresferas, acorde con los resultados obtenidos con la expresión de estos genes. En pacientes con CPNM, se conoce que las células tumorales de pulmón secretan mediadores inmunosupresores que incluyen citoquinas tipo 2 (IL-10 e IL-4) (Neuner et al., 2002), a pesar de ello, nosotros no detectamos secreción y de acuerdo con nuestros resultados, dos grupos de científicos confirmaron que las CSCs de glioblastoma tampoco producían niveles de IL-10 apreciables (Jun Wei et al., 2010; Tiziano Di Tomaso et al., 2010) así como tampoco una línea celular de CSCs de cabeza y cuello (Chikamatsu et al., 2011) utilizando ELISA y microarrays, técnicas con una menor sensibilidad que el inmunoensayo multiparamétrico utilizado en este trabajo. Al contrario que nuestros resultados, previos estudios han demostrado que la población de CSCs de colon derivadas de cultivos celulares de pacientes secretan IL-4 promoviendo la resistencia fármacos pero no demostraron que afectara a la respuesta de las células T (Todaro et al., 2007). Por otro lado, Volonte *et al.* también observó que la secreción de IL-4 estaba preferentemente asociada a las CSCs derivadas de cáncer colorrectal respecto a las células tumorales normales y que además era responsable de la inhibición de la proliferación de linfocitos T, posiblemente a través de su interacción con el receptor de la IL-4 (IL-4R) expresado en las células T (Volonte et al., 2013). A pesar de utilizar una técnica ultrasensible, el hecho de no haber detectado ni expresión ni secreción de estas citoquinas en nuestra población de CSCs de pulmón sugiere que posiblemente necesitemos crear un microambiente más real con células inmunitarias (a través de un co-cultivo) que activen a las células tumorales y poder así producir algún estímulo para que puedan secretar factores inmunosupresores o bien que las CSCs no necesiten utilizar estas citoquinas para evadir el sistema inmune antitumoral.

Respecto a la secreción de la IL-6 hay una tendencia de mayor secreción por parte de las adherentes si las comparamos con las tumoresferas, a pesar de no ser estadísticamente significativa, acorde con los resultados obtenidos en la expresión génica vistos anteriormente (Figura 27).

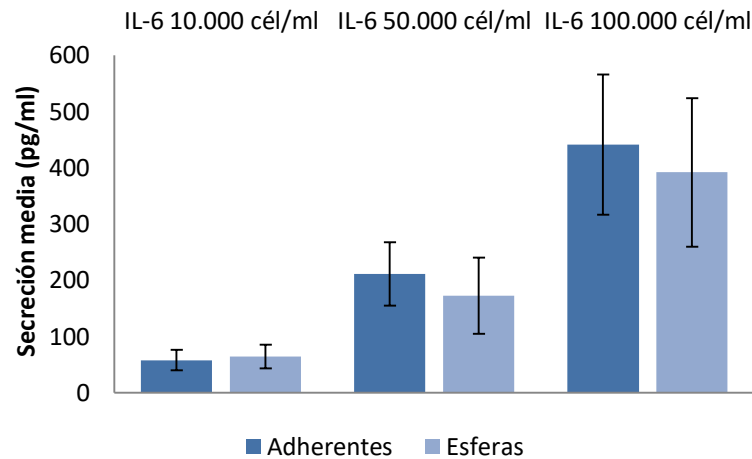


Figura 17. Concentración media (pg/ml) de IL-6 de células adherentes y tumoresferas a las tres densidades sembradas. Líneas celulares y los pacientes FIS 301 y FIS 343.

Existen pocos datos sobre la expresión y secreción de IL-6 por parte de las CSCs. El grupo de Jun Wei *et al.* no fue capaz de determinar la secreción de esta citoquina por parte de CSCs derivadas de pacientes con glioblastoma mediante un ELISA convencional (Jun Wei *et al.*, 2010). Por el contrario, nosotros sí que fuimos capaces de detectar tanto la expresión de esta citoquina como la secreción en cultivos 2D y 3D, gracias posiblemente al uso de técnicas tan sensibles y reproducibles como son la RTqPCR y el ELISA multiparamétrico, lo que da valor a nuestros resultados y a nuestra técnica. Además de acuerdo con nuestros datos, a pesar de ser tipos de cáncer muy diferentes, también se ha observado que la secreción de *IL-6* en CSCs de glioblastoma derivadas de cultivos primarios de pacientes fue menor frente a las células tumorales en adherencia, al igual que la expresión (Tiziano Di Tomaso *et al.*, 2010). El perfil de expresión y de secreción bajo de este factor proinflamatorio en CSCs de pulmón podría ser un resultado del silenciamiento general de la inflamación que puede facilitar el escape de CSCs del sistema inmune de vigilancia o bien podría deberse al hecho de que no se favorezca la respuesta inmune antitumoral de las células T a través de la IL-6, rol descrito recientemente (Mikucki *et al.*, 2013; Fisher *et al.*, 2011), lo que sugiere que la IL-6 pueda ser aprovechada para inclinar el equilibrio en el microambiente tumoral lejos del crecimiento de las células tumorales hacia la inmunidad antitumoral (Angell and Galon, 2013).

Por otro lado, con respecto a la IL-8 se observa una tendencia a que las tumoresferas (Figura 22) secreten mayores niveles, acorde con la expresión vista anteriormente, no siendo la secreción de IL-8 estadísticamente significativa seguramente por el gran grado de variación de la secreción de este gen entre las muestras (Figura 18).

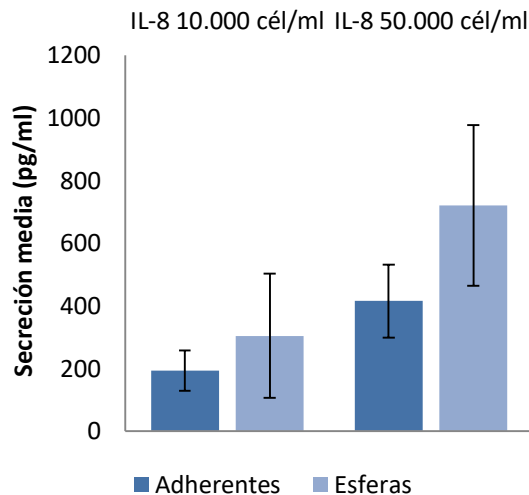


Figura 18. Concentración media (pg/ml) de IL-8 de células adherentes y tumoresferas a las dos densidades sembradas. Los datos de 100.000 cél/ml no se muestran debido a que la mayoría estuvieron extrapolados (fuera del límite de detección).

Al contrario que nuestros resultados Wei et al. observaron una menor secreción de IL-8 en tumoresferas de glioma con respecto a las células en adherencia, datos acordes también con los niveles de expresión como se mencionó anteriormente, pero podría deberse a que se trata de un tipo tumoral muy diferente al pulmón (Jun Wei et al., 2010). Por el contrario y acorde con nuestros resultados, las CSCs de ovario, obtenidas a partir de cultivos primarios de pacientes, así como también las CSCs de una línea de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, presentan altos niveles de esta citoquina en el sobrenadante del medio de cultivo comparado con las células tumorales en adherencia (Alvero et al., 2009; Chikamatsu et al., 2011). Nuestros resultados obtenidos a partir no sólo de líneas celulares sino también de cultivos primarios de pacientes con CPNM dan mayor validez al hecho de que las CSCs de pulmón utilicen la IL-8 como un mecanismo de inmunoevasión así como hacen que nuestros resultados tengan una mayor aplicabilidad clínica. La sobreexpresión y mayor secreción de IL-8 por parte de las tumoresferas respecto a las células adherentes podría ser un mecanismo de inmunosupresión utilizado por las CSC de pulmón, de manera que la IL-8 atraerá a las MDSCs al microambiente tumoral suprimiendo la respuesta inmune antitumoral mediante la inhibición principalmente de las células T a través diversos mecanismos; producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que inactivan los receptores de las células T (Nagaraj et al., 2007); disminución de los nutrientes en el microambiente tumoral lo que inhibe la proliferación y activación de células T (Srivastava et al., 2010); producción de factores inmunosupresores como *IL-10* y *TGF- β* (Huang et al., 1996); expresión de moléculas coinhibitorias como *PD-L1* o *CTLA-4* e inducción de Tregs (Pan et al., 2010).

En resumen, este ha sido el primer estudio realizado sobre la relación de las CSCs de pulmón con el sistema inmune analizando diferentes moléculas relacionada con la inmunorregulación o inmunosupresión tanto en líneas celulares de CPNM como en cultivos primarios de pacientes con CPNM en estadios resecables, lo que le da a nuestro estudio una mayor validez y robustez de los datos respecto a otros estudios realizados con una cohorte más pequeña. Gracias a este estudio estamos más cerca de elucidar el papel que ejercen las CSCs en el microambiente tumoral. Nuestros resultados muestran que la actividad inhibitoria inmune mediada por las CSCs de pulmón de nuestra cohorte, no dependen de la expresión de genes inmunosupresores como TGF- β , PD-L1,CD200 los cuales están expresados en muy baja cantidad en las CSCs de pulmón, o IL-10 e IL-4 que no se detectó expresión ni secreción. Por otro lado, las CSC de pulmón podrían expresar otras moléculas que regulen de forma negativa al sistema inmune conllevando a efectos inmunosupresores en la respuesta de las células T en el CPNM como son PD-L2, IDO-2, ICOS-L y STAT3, aunque haría falta un aumento de la cohorte para que las diferencias entre los cultivos 2D y 3D sean significativas. Por último, lo que sugiere este trabajo es que las posibles vías utilizadas por las CSCs de pulmón para la inmunoevasión serían mediante la Galectina-3 y la IL-8, siendo por tanto posibles dianas terapéuticas en el CPNM (Figura 19).

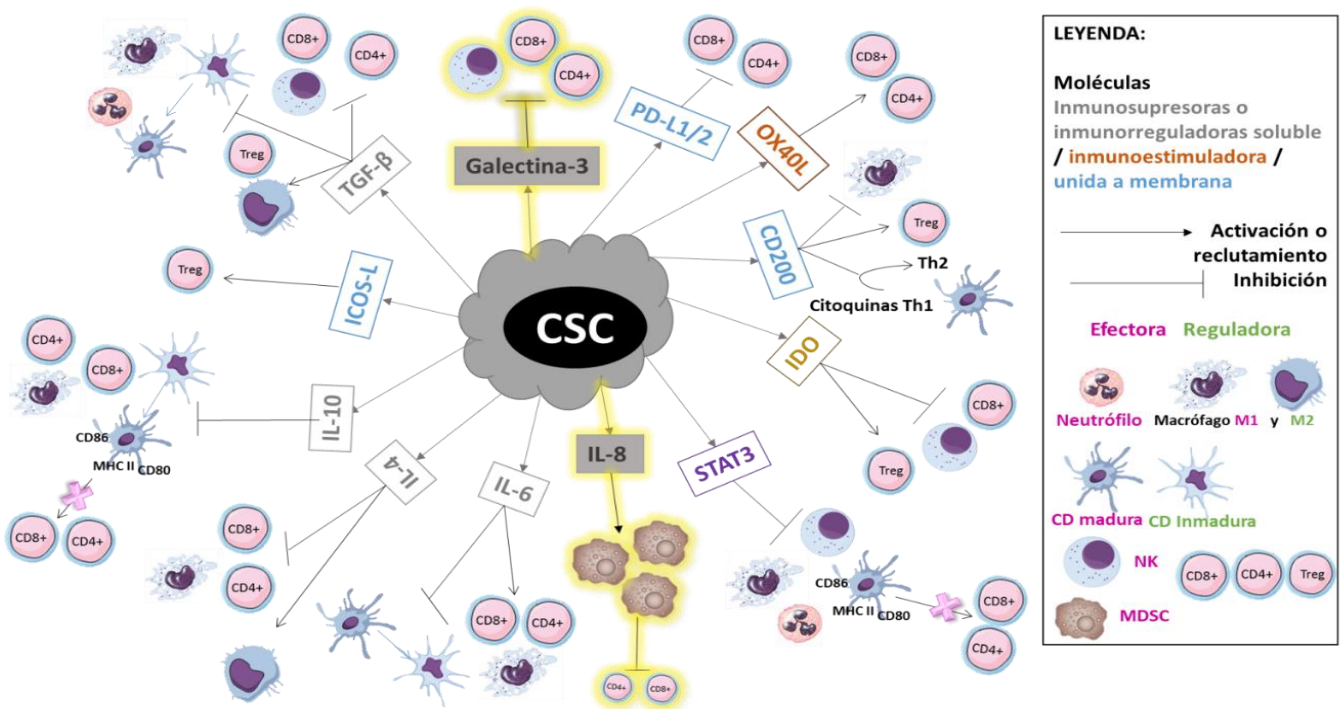


Figura 19. Representación de las interacciones de las CSCs con las células inmunes estudiadas en este trabajo. Se destacan las dos moléculas que posiblemente son utilizadas por las CSCs de pulmón para inhibir al sistema inmune antitumoral.

5. Conclusiones

1. Se establecieron con éxito modelos in vitro de cultivos de células tumorales en 2D y de poblaciones enriquecidas en CSCs en 3D a partir de tejido tumoral de pacientes con CPNM y líneas celulares.
2. El análisis por qPCR demostró que:
 - a) Los genes PD-L2, ICOS-LGM IDO2, y STAT3 presentaban una tendencia a mayores niveles de expresión en tumoresferas respecto a las células en adherencia, por lo que sería necesario un análisis en un mayor número de muestras para validar estos resultados.
 - b) Las tumoresferas expresan significativamente mayores niveles de los genes *LGAL3* e *IL-8* cuando se comparan con las células en adherencia, siendo mediadores interesantes teniendo en cuenta su papel inmunosupresor.
3. La técnica de inmunoensayo multiparamétrico ultrasensible nos permitió detectar diferencias en los niveles de secreción de *IL-6* e *IL-8* entre cultivos en 2D y 3D.
4. Los niveles de expresión de IL-8 (tanto a nivel de ARNm como de proteína) indican que esta citoquina podría estar involucrada en la modulación del microambiente inmune ejercida por las CSCs pulmonares, abriendo nuevas vías de intervención terapéutica.

6. Bibliografía

- Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews Cancer*, 7(11), pp.834–846.
- Alfaro, C. et al. (2016). Tumor-Produced Interleukin-8 Attracts Human Myeloid-Derived Suppressor Cells and Elicits Extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs). *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22(15), pp.3924–3936.
- Alvero, A.B. et al. (2009). Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance. *Cell Cycle*, 8(1), pp.158–166.
- Angell, H. and Galon, J. (2013). From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Current Opinion in Immunology*, 25(2), pp.261–267.
- Aref, S., Azmy, E. and El-Gilany, A.H. (2017). Upregulation of CD200 is associated with regulatory T cell expansion and disease progression in multiple myeloma. *Hematological oncology*, 35(1), pp.51–57.
- Baggiolini, M., Walz, A. and Kunkel, S.L. (1989). Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *The Journal of clinical investigation*, 84(4), pp.1045–9.
- Bin, Z., Guangbo, Z., Yan, G., Huan, Z., Desheng, L. and Xueguang, Z. (2014). Overexpression of B7-H3 in CD133+ colorectal cancer cells is associated with cancer progression and survival in human patients. *The Journal of surgical research*, 188(2), pp.396–403.
- Biswas, S.K., Allavena, P. and Mantovani, A. (2013). Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Seminars in Immunopathology*, 35(5), pp.585–600.
- Borghaei, H. et al. (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 373(17), pp.1627–1639.
- Burrell, R.A., McGranahan, N., Bartek, J. and Swanton, C. (2013). The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*, 501, pp.338–345.
- Bustin, S.A. et al. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4).
- Camps, C., Jantus-Lewintre, M., Usó, E. and Sanmartin, C. (2012). Update on biomarkers for the detection of lung cancer. *Lung Cancer: Targets and Therapy*, Volume 3, p.21.
- Carmeliet, P. and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), pp.249–257.
- Cheng, L., Zhang, S., Davidson, D.D., Montironi, R. and Lopez-beltran, A. (2009). Implications of Cancer Stem Cells for Cancer Therapy. *Cancer Drug Discovery and Development*, (1), pp.255–262.
- Chikamatsu, K., Takahashi, G., Sakakura, K., Ferrone, S. and Masuyama, K. (2011). Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head & neck*, 33(2), pp.208–215.
- Chuang, J.C. and Neal, J.W. (2015). Crizotinib as first line therapy for advanced ALK-positive non-small cell lung cancers. *Translational lung cancer research*, 4(5), pp.639–41.
- Chung, L., Tang, S., Wu, Y. and Sun, G. (2014). Galectin-3 augments tumor initiating property and tumorigenicity of lung cancer through interaction with β -catenin. *Oncotarget*.
- Codony-Servat, J. and Rosell, R. (2015). Cancer stem cells and immunoresistance: clinical implications and solutions. *Translational lung cancer research*, 4(6), pp.689–703. Comber, J.D. and Philip, R.

- (2014). MHC class I antigen presentation and implications for developing a new generation of therapeutic vaccines. *Therapeutic advances in vaccines*, 2(3), pp.77–89.
- Coticello, C., Pedini, F., Zeuner, A., Patti, M., Zerilli, M., Stassi, G., Messina, A., Peschle, C. and De Maria, R. (2004). IL-4 protects tumor cells from anti-CD95 and chemotherapeutic agents via up-regulation of antiapoptotic proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(9), pp.5467–5477.
- Croft, M., So, T., Duan, W. and Soroosh, P. (2009). The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunological reviews*, 229(1), pp.173–91.
- Curiel, T.J. et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*, 10(9), pp.942–949.
- Desai, S., Kumar, A., Laskar, S. and Pandey, B.N. (2013). Cytokine profile of conditioned medium from human tumor cell lines after acute and fractionated doses of gamma radiation and its effect on survival of bystander tumor cells. *Cytokine*, 61(1), pp.54–62.
- F. Quail, D. and Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*, 19(11), pp.1423–1437.
- Fallarino, F., Asselin-Paturel, C., Vacca, C., Bianchi, R., Gizzi, S., Fioretti, M.C., Trinchieri, G., Grohmann, U. and Puccetti, P. (2004). Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(6), pp.3748–3754.
- Fehrenbacher, L. et al. (2016). Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *The Lancet*, 387(10030), pp.1837–1846.
- Felip, E. et al. (2010). Preoperative chemotherapy plus surgery versus surgery plus adjuvant chemotherapy versus surgery alone in early-stage non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(19), pp.3138–3145.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D. and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), pp.E359–E386.
- Fisher, D.T. et al. (2011). IL-6 trans-signaling licenses mouse and human tumor microvascular gateways for trafficking of cytotoxic T cells. *Journal of Clinical Investigation*, 121(10), pp.3846–3859.
- Galceran, J. et al. (2017). Cancer incidence in Spain, 2015. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 19(7), pp.799–825.
- Goldstraw, P. et al. (2007). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Seventh) Edition of the TNM Classification of Malignant Tumours. *Journal of Thoracic Oncology*, 2(8), pp.706–714.
- Goldstraw, P., Ball, D., Jett, J.R., Le Chevalier, T., Lim, E., Nicholson, A.G. and Shepherd, F.A. (2011). Non-small-cell lung cancer. *Lancet (London, England)*, 378(9804), pp.1727–1740.
- Gorczynski, L., Chen, Z., Hu, J., Kai, Y., Lei, J., Ramakrishna, V. and Gorczynski, R.M. (1999). Evidence that an OX-2-positive cell can inhibit the stimulation of type 1 cytokine production by bone marrow-derived B7-1 (and B7-2)-positive dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(2), pp.774–781.
- Gorczynski, R.M. (2005). CD200 and its receptors as targets for immunoregulation. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)*, 6(5), pp.483–488.

- Gorczynski, R.M., Lee, L. and Boudakov, I. (2005). Augmented Induction of CD4+CD25+ Treg using monoclonal antibodies to CD200R. *Transplantation*, 79(9), pp.1180–1183.
- Greaves, M. and Maley, C.C. (2012). Clonal Evolution in Cancer. *Nature*, 481(7381), pp.306–313.
- Gridelli, C., Rossi, A., Carbone, D.P., Guarize, J., Karachaliou, N., Mok, T., Petrella, F., Spaggiari, L. and Rosell, R. (2015). Non-small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, p.15009.
- de Groot, P. and Munden, R.F. (2012). Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Radiologic Clinics of North America*, 50(5), pp.863–876.
- de Groot, P., Munden, R.F., Fuller, C. and al., et (2012). Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Radiologic Clinics of North America*, 50(5), pp.863–876.
- Han, L., Shi, S., Gong, T., Zhang, Z. and Sun, X. (2013). Cancer stem cells: therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 3(2), pp.65–75.
- Hanahan, D. et al. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–74.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), pp.57–70.
- Herbst, R.S. et al. (2016). Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *The Lancet*, 387(10027), pp.1540–1550.
- Hirsch, F.R., Wynes, M.W., Gandara, D.R. and Bunn Jr., P.A. (2010). The tissue is the issue: personalized medicine for non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.*, 16(20), pp.4909–4911.
- Hoek, R.M. et al. (2000). Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science (New York, N.Y.)*, 290(5497), pp.1768–1771.
- Huang, S., Xie, K., Bucana, C.D., Ullrich, S.E. and Bar-Eli, M. (1996). Interleukin 10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells: potential inhibition of angiogenesis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2(12), pp.1969–79.
- ISCIII, A. de E.A. y C.C.N. de E. (2015). Servicios Científicos-Técnicos proporcionados por el Instituto de Salud Carlos III. Mortalidad de cáncer en España 2015.
- Ito, T., Yang, M., Wang, Y.-H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O.A., Qin, X.-F., Liu, Y.-J. and Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *The Journal of experimental medicine*, 204(1), pp.105–115.
- Jemal, A. et al. (2008). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J.Natl.Cancer Inst.*, 100(23), pp.1672–1694.
- Jenmalm, M.C., Cherwinski, H., Bowman, E.P., Phillips, J.H. and Sedgwick, J.D. (2006). Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(1), pp.191–199.
- Kaplan, R.N. et al. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438(7069), pp.820–827.
- Katz, J.B., Muller, A.J. and Prendergast, G.C. (2008). Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunological reviews*, 222, pp.206–221.
- Kawasaki, B.T. and Farrar, W.L. (2008). Cancer stem cells, CD200 and immunoevasion. *Trends in immunology*, 29(10), pp.464–468.

- Kitamura, T., Qian, B.-Z. and Pollard, J.W. (2015). Immune cell promotion of metastasis. *Nature Reviews Immunology*, 15(2), pp.73–86.
- Kortylewski, M. et al. (2005). Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nature medicine*, 11(12), pp.1314–1321.
- Kouo, T., Huang, L., Pucsek, A.B., Cao, M., Solt, S., Armstrong, T. and Jaffee, E. (2015). Galectin-3 Shapes Antitumor Immune Responses by Suppressing CD8+ T Cells via LAG-3 and Inhibiting Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Cancer immunology research*, 3(4), pp.412–423.
- Kreso, A. and Dick, J.E. (2014). Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell*, 14(3), pp.275–291.
- Kurte, M., López, M., Aguirre, A., Escobar, A., Aguilón, J.C., Charo, J., Larsen, C.G., Kiessling, R. and Salazar-Onfray, F. (2004). A synthetic peptide homologous to functional domain of human IL-10 down-regulates expression of MHC class I and Transporter associated with Antigen Processing 1/2 in human melanoma cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(3), pp.1731–7.
- Ladanyi, M. (2008). Targeted therapy of cancer: new roles for pathologists. *Modern Pathology*, 21.
- Lee, H.-J., Kim, S.-N., Jeon, M.-S., Yi, T. and Song, S.U. (2017). ICOSL expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes induction of regulatory T cells. *Scientific reports*, 7, p.44486.
- Lee, Y., Shin, J.H., Longmire, M., Wang, H., Kohrt, H.E., Chang, H.Y. and Sunwoo, J.B. (2016). CD44+ Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Suppress T-Cell-Mediated Immunity by Selective Constitutive and Inducible Expression of PD-L1. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22(14), pp.3571–3581.
- Lesokhin, A.M. et al. (2012). Monocytic CCR2(+) myeloid-derived suppressor cells promote immune escape by limiting activated CD8 T-cell infiltration into the tumor microenvironment. *Cancer research*, 72(4), pp.876–86.
- Levina, V., Marrangoni, A.M., DeMarco, R., Gorelik, E. and Lokshin, A.E. (2008). Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. *PloS one*, 3(8), p.e3077.
- Levina, V., Su, Y., Nolen, B., Liu, X., Gordin, Y., Lee, M., Lokshin, A. and Gorelik, E. (2008). Chemotherapeutic drugs and human tumor cells cytokine network. *International journal of cancer*, 123(9), pp.2031–40.
- Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.-K.L. and Flavell, R.A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual review of immunology*, 24, pp.99–146.
- Linde, N., Lederle, W., Depner, S., van Rooijen, N., Gutschalk, C.M. and Mueller, M.M. (2012). Vascular endothelial growth factor-induced skin carcinogenesis depends on recruitment and alternative activation of macrophages. *The Journal of pathology*, 227(1), pp.17–28.
- Lopez, M.V., Adris, S.K., Bravo, A.I., Chernajovsky, Y. and Podhajcer, O.L. (2005). IL-12 and IL-10 Expression Synergize to Induce the Immune-Mediated Eradication of Established Colon and Mammary Tumors and Lung Metastasis. *The Journal of Immunology*, 175(9).
- Lynch, T.J. et al. (2012). Ipilimumab in Combination With Paclitaxel and Carboplatin As First-Line Treatment in Stage IIIB/IV Non-Small-Cell Lung Cancer: Results From a Randomized, Double-Blind, Multicenter Phase II Study. *Journal of Clinical Oncology*, 30(17), pp.2046–2054.
- Mace, T.A. et al. (2016). IL-6 and PD-L1 antibody blockade combination therapy reduces tumour progression in murine models of pancreatic cancer. *Gut*.

- Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C. and Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *The European respiratory journal*, 48(3), pp.889–902.
- Marjanovic, N.D., Weinberg, R.A. and Chaffer, C.L. (2013). Cell Plasticity and Heterogeneity in Cancer. *Clinical Chemistry*, 59(1), pp.168–179.
- Martinez-Romero, A., Pardo, J.M., Tejedor, S., Calabuig-Fariñas, S., Lucas, R., Figueroa, S., Jantus-Lewintre, Eloisa Camps, C. and Farras, R. (2014). Multi-color flow cytometry immunophenotyping for detection of CSC in NSCLC. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER*, 50(Suppl 6), p.115.
- Marusyk, A., Almendro, V. and Polyak, K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nature Reviews Cancer*, 12(5), pp.323–334.
- Marusyk, A. and Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochimica et biophysica acta*, 1805(1), pp.105–17.
- Massague, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell*, 134(2), pp.215–230.
- Meacham, C.E. and Morrison, S.J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, 501(7467), pp.328–37.
- Mikucki, M.E., Fisher, D.T., Ku, A.W., Appenheimer, M.M., Muhitch, J.B. and Evans, S.S. (2013). Preconditioning thermal therapy: flipping the switch on IL-6 for anti-tumour immunity. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*, 29(5), pp.464–473.
- Moreaux, J., Veyrune, J.L., Reme, T., De Vos, J. and Klein, B. (2008). CD200: A putative therapeutic target in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366(1), pp.117–122.
- Moreno, A.E.J.S.C. (2017). No. Politécnica de Valencia.
- Morgensztern, D., Ng, S.H., Gao, F. and Govindan, R. (2010). Trends in Stage Distribution for Patients with Non-small Cell Lung Cancer: A National Cancer Database Survey. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(1), pp.29–33.
- Nagaraj, S., Gupta, K., Pisarev, V., Kinarsky, L., Sherman, S., Kang, L., Herber, D.L., Schneck, J. and Gabilovich, D.I. (2007). Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nature medicine*, 13(7), pp.828–835.
- Neuner, A., Schindel, M., Wildenberg, U., Muley, T., Lahm, H. and Fischer, J.R. (2002). Prognostic significance of cytokine modulation in non-small cell lung cancer. *International journal of cancer*, 101(3), pp.287–292.
- Ostrand-Rosenberg, S. and Sinha, P. (2009). Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *The Journal of Immunology*, 182(8), pp.4499–4506.
- Pan, P.-Y., Ma, G., Weber, K.J., Ozao-Choy, J., Wang, G., Yin, B., Divino, C.M. and Chen, S.-H. (2010). Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer research*, 70(1), pp.99–108.
- Pao, W., Girard, N., Pratilas, C., et, Yatabe, Y. and Mitsudomi, T. (2011). New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *The Lancet. Oncology*, 12(2), pp.175–80.
- Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), pp.252–264.
- Park, S.-J. et al. (2004). IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(6), pp.3844–3854.
- Patel, S. and Rameshwar, P. (2013). Tumorsphere Passage for Breast Cancer Stem Cells. *Protocol*

Exchange.

- Peng, W., Wang, H.Y., Miyahara, Y., Peng, G. and Wang, R.-F. (2008). Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells. *Cancer research*, 68(17), pp.7228–36.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29(9), p.e45.
- Pomares, A.H., Maravilla, E.M., Lafuente, B., Calabuig-Fariñas, S., Cordellat, A.B., Guijarro, R., Farrás, R., Lewintre, E.J. and Camps, C. (2016). 114P: Expression analysis of tumorspheres from non-small cell lung cancer show significant differences in CSC-markers and signaling pathways. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(4), p.S105.
- Qian, Y. et al. (2015). CD137 ligand-mediated reverse signaling inhibits proliferation and induces apoptosis in non-small cell lung cancer. *Medical Oncology*, 32(3), p.44.
- Rami-porta, R. (2017). Staging Handbook In thoracic Oncology R. Rami-Porta et al., eds. , pp.55–80.
- Reck, M., Heigener, D.F., Mok, T., Soria, J.-C. and Rabe, K.F. (2013). Management of non-small-cell lung cancer: recent developments. *The Lancet*, 382(9893), pp.709–719.
- Robinson, L.A., Ruckdeschel, J.C., Wagner, H., Stevens, C.W. and American College of Chest Physicians (2007). Treatment of Non-small Cell Lung Cancer-Stage IIIA. *Chest*, 132(3), p.243S–265S.
- Russell, J.H. and Ley, T.J. (2002). LYMPHOCYTE-MEDIATED CYTOTOXICITY. *Annual Review of Immunology*, 20(1), pp.323–370.
- Sanmamed, M.F. et al. (2017). Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small cell lung cancer patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*.
- Sasco, A.J., Secretan, M.B. and Straif, K. (2004). Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer*, 45 Suppl 2, pp.S3–S9.
- Sawyers, C.L. et al. (2013). AACR Cancer Progress Report 2013. *Clinical Cancer Research*, 19(20_Supplement), pp.S1–S98.
- Schatton, T. and Frank, M.H. (2010). The In Vitro Spheroid Melanoma Cell Culture Assay: Cues on Tumor Initiation? *Journal of Investigative Dermatology*, 130(7), pp.1769–1771.
- Scheel, A.H. et al. (2016). PD-L1 expression in non-small cell lung cancer: Correlations with genetic alterations. *Oncoimmunology*, 5(5), p.e1131379.
- Schreiber, R.D., Old, L.J. and Smyth, M.J. (2011). Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*, 331(6024), pp.1565–1570.
- Self, C.H. and Cook, D.B. (1996). Advances in immunoassay technology. *Current opinion in biotechnology*, 7(1), pp.60–65.
- Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E. and Morrison, S. (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*, 138(5), pp.822–829.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2017). Cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(1), pp.7–30.
- Silver, D.J., Sinyuk, M., Vogelbaum, M.A., Ahluwalia, M.S. and Lathia, J.D. (2016). The intersection of cancer, cancer stem cells, and the immune system: therapeutic opportunities. *Neuro-oncology*, 18(2), pp.153–159.
- Singh, R.K., Gutman, M., Radinsky, R., Bucana, C.D. and Fidler, I.J. (1994). Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. *Cancer research*, 54(12), pp.3242–7.

- Smith, D.R.,Polverini, P.J.,Kunkel, S.L.,Orringer, M.B.,Whyte, R.I.,Burdick, M.D.,Wilke, C.A. and Strieter, R.M. (1994). Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. *Journal of Experimental Medicine*, 179(5).
- Sobue, T.,Yamamoto, S.,Hara, M.,Sasazuki, S.,Sasaki, S. and Tsugane, S. (2002). Cigarette smoking and subsequent risk of lung cancer by histologic type in middle-aged Japanese men and women: The JPHC study. *International Journal of Cancer*, 99(2), pp.245–251.
- Soria, J.-C. et al. (2013). Systematic review and meta-analysis of randomised, phase II/III trials adding bevacizumab to platinum-based chemotherapy as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 24(1), pp.20–30.
- Soto-Cerrato, V. et al. (2015). Facilitated Anion Transport Induces Hyperpolarization of the Cell Membrane That Triggers Differentiation and Cell Death in Cancer Stem Cells. *Journal of the American Chemical Society*, 137(50), pp.15892–15898.
- Srivastava, M.K.,Sinha, P.,Clements, V.K.,Rodriguez, P. and Ostrand-Rosenberg, S. (2010). Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer research*, 70(1), pp.68–77.
- Stapelberg, M. et al. (2014). Indoleamine-2,3-dioxygenase elevated in tumor-initiating cells is suppressed by mitocans. *Free Radical Biology and Medicine*, 67, pp.41–50.
- Steinbrink, K.,Wolfl, M.,Jonuleit, H.,Knop, J. and Enk, A.H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 159(10), pp.4772–4780.
- Todaro, M. et al. (2007). Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell stem cell*, 1(4), pp.389–402.
- Di Tomaso, T. et al. (2010). Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. *Clinical Cancer Research*, 16(3), pp.800–813.
- Di Tomaso, T. et al. (2010). Immunobiological Characterization of Cancer Stem Cells Isolated from Glioblastoma Patients. *Clinical Cancer Research*, 16(3), pp.800–813.
- Torre, L.A.,Bray, F.,Siegel, R.L.,Ferlay, J.,Lortet-tieulent, J. and Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.*, 65(2), pp.87–108.
- Travis, W.D. (2002). Pathology of lung cancer. *Clinics in chest medicine*, 23(1), p.65–81, viii.
- Travis, W.D.,Brambilla, E. and Riely, G.J. (2013). New pathologic classification of lung cancer: Relevance for clinical practice and clinical trials. *Journal of Clinical Oncology*, 31(8), pp.992–1001.
- Usó, M. et al. (2016). Analysis of the immune microenvironment in resected non-small cell lung cancer: the prognostic value of different T lymphocyte markers. *Oncotarget*, 7(33), pp.52849–52861.
- Vandesompele, J.,De Preter, K.,Pattyn, F.,Poppe, B.,Van Roy, N.,De Paepe, A. and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), p.research0034.1-research0034.11.
- VanGuilder, H.,Vrana, K. and Freeman, W. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, (4), pp.619–626.
- Vesely, M.D.,Kershaw, M.H.,Schreiber, R.D. and Smyth, M.J. (2011). Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annual Review of Immunology*, 29(1), pp.235–271.
- Vignali, D.A.,Collison, L.W. and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat.Rev.Immunol.*, 8(7), pp.523–532.

- Volonte, A. et al. (2013). Cancer-Initiating Cells from Colorectal Cancer Patients Escape from T Cell-Mediated Immunosurveillance In Vitro through Membrane-Bound IL-4. *The Journal of Immunology*, 192(1), pp.523–532. Available at:
- Wang, W.,Guo, H.,Geng, J.,Zheng, X.,Wei, H.,Sun, R. and Tian, Z. (2014). Tumor-released Galectin-3, a soluble inhibitory ligand of human NKp30, plays an important role in tumor escape from NK cell attack. *The Journal of biological chemistry*, 289(48), pp.33311–33319.
- Wei, J. et al. (2010). Glioblastoma cancer-initiating cells inhibit T-cell proliferation and effector responses by the signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Molecular cancer therapeutics*, 9(1), pp.67–78.
- Wei, J. et al. (2010). Glioma-Associated Cancer-Initiating Cells Induce Immunosuppression. *Clinical Cancer Research*, 16(2), pp.461–473.
- Wei, L.-H.,Kuo, M.-L.,Chen, C.-A.,Chou, C.-H.,Lai, K.-B.,Lee, C.-N. and Hsieh, C.-Y. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*, 22(10), pp.1517–1527.
- Wu, Y.,Chen, M.,Wu, P.,Chen, C.,Xu, Z.P. and Gu, W. (2017). Increased PD-L1 expression in breast and colon cancer stem cells. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 44(5), pp.602–604.
- Yang, Z.,Hackshaw, A.,Feng, Q.,Fu, X.,Zhang, Y.,Mao, C. and Tang, J. (2017). Comparison of gefitinib, erlotinib and afatinib in non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *International journal of cancer*, 140(12), pp.2805–2819.
- Yao, Y.,Wang, X.,Jin, K.,Zhu, J.,Wang, Y.,Xiong, S.,Mao, Y. and Zhou, L. (2008). B7-H4 is preferentially expressed in non-dividing brain tumor cells and in a subset of brain tumor stem-like cells. *Journal of neuro-oncology*, 89(2), pp.121–9.
- Zardavas, D.,Irrthum, A.,Swanton, C. and Piccart, M. (2015). Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nat Rev Clin Oncol*, 12(7), pp.381–394.
- Zhai, L.,Lauing, K.L.,Chang, A.L.,Dey, M.,Qian, J.,Cheng, Y.,Lesniak, M.S. and Wainwright, D.A. (2015). The role of IDO in brain tumor immunotherapy. *Journal of neuro-oncology*, 123(3), pp.395–403.

7. Anexos

1. European Society of Medical Oncology, España 2017.

Characterization of cancer stem cell and immune microenvironment interactions in non-small cell lung cancer (NSCLC). S. Torres, R. Sirera, C. Aguilar, S. Calabuig Fariñas, M. Mosqueda, A. Herreros-Pomares,

E. Escorihuela, E. García del Olmo, E. Jantus-Lewintre, C. Camps Herrero

Background: Lung cancer stem cells (CSCs) are a small subpopulation of cells with self-renewal, tumorigenic properties and the ability to grow forming tumourspheres in non-adherent conditions. CSCs in non-small cell lung cancer (NSCLC) are targets poorly recognized by the immune surveillance system given that they favour an immunosuppressive microenvironment. The aim of this work was to compare the release of cytokine between monolayer cells and tumourspheres.

Methods: The study was performed on medium supernatant of cells from two NSCLC tumour patients samples and ten cell lines (A549, H1650, H460, H23, H358, H2228, HCC827, PC9, H1993, and SW900) grown in monolayer and tumourspheres at 3 different densities (10^4 , $5 \cdot 10^5$ and 10^5 cells/ml). We analysed four soluble factors with immunosuppressive (IL-4, IL-10), and immunoregulatory (IL-6, IL-8) capacity through sensitivity bead-based multiplex assay using the Millipore kit and the Luminex 100/200.

Results: All human tumour cell lines and primary cells secreted detectable levels of IL-6 and IL-8. In contrast, IL-10 and IL-4 levels were below detectable range (<1.83 and <1.46 pg/ml, respectively) for most of these cell lines and NSCLC tumour samples. We have observed differences between levels of IL-6 and IL-8 secreted by adherent cells and tumourspheres and differences between samples (Table 1).

Samples	pg/ml x 10^5 cells IL-6		pg/ml x 10^5 cells IL-8	
	Adherent cells	Tumourspheres	Adherent cells	Tumourspheres
A549	<0.17	1.3	130.1	158.2
H2228	1506,62	578,30	>2273.3	172.80
HCC827	348.2	>1750.12	2177.4	>2273.3
H358	10.9	27.8	1774.8	>2273.3
H1993	34.4	2.2	658.2	479.3
PC9	144.4	5.4	597.2	321.9
SW900	121.7	5.4	1006	225.2
H460	359.8	227.8	1298.8	2201.3
H23	3.7	2.8	407.8	1290.8
H1650	995.9	352.2	30.2	50.3
Patient 1	17.4	0.6	>2273.3	30.0
Patient 2	>1750.12	>1750.12	>2273.3	>2273.3

Table 1. Differences in the secretion of IL-6 and IL-8 in adherent cells and tumourspheres by multiplex analysis. Detection range of IL-6 (0.17-1750.12 pg/ml). Detection range of IL-8(0.28-2273.3 pg/ml).

Conclusions: Our preliminary results suggest that cells grown in adherence show increased levels of IL-6 compared to lung-tumourspheres. The next step is the expansion of the cohort to obtain significant results.

2. XVII Congreso de la Sociedad Española de Oncología Médica. Madrid, España 2017.

CARACTERIZACIÓN DEL MICROAMBIENTE TUMORAL. ANÁLISIS PRONÓSTICO DE MARCADORES INMUNOLÓGICOS EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO EN ESTADIOS RESECABLES.

Susana Torres, Silvia Calabuig-Fariñas, Rafael Sirera, Alejandro Herreros-Pomares, Cristobal Aguilar Gallardo, Marais Mosqueda, Andrea Moreno, Eva Escorihuela, Eloisa Jantus-Lewintre, C.Camps

INTRODUCCIÓN: El análisis de las características inmunológicas del microambiente tumoral está dando lugar al desarrollo de nuevas inmunoterapias y biomarcadores. En este trabajo hemos analizado el valor pronóstico de marcadores relacionados con la inmunorregulación en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) así como también la liberación de estas citoquinas inmunorreguladoras por parte de las células tumorales en adherencia y en tumoresferas (células madre tumorales).

MATERIALES Y MÉTODOS: El estudio se realizó en una cohorte de 197 pacientes con CPNM en estadios resecables. La expresión de 4 genes inmunorreguladores (*IL10*, *IL4*, *IL8* e *IL6*) se analizó por RTqPCR en muestras de tejido tumoral y normal fresco. Además las correspondiente citoquinas se midieron en el sobrenadante de medio de cultivo de dos pacientes con CPNM y 10 líneas celulares mediante un inmunoensayo multiplexado ultrasensible basado en microesferas usando la tecnología Luminex xMAP®. Todos los análisis estadísticos se consideraron significativos cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS: La cohorte de pacientes se caracterizó por una media de edad de 65 años, de los cuales el 85% fueron hombres y el 48,7% exfumadores o fumadores. Se observó una menor expresión de IL10 en pacientes con KRAS mutado. En el análisis por subgrupos histológicos se observó que los pacientes con carcinoma cáncer de células escamosas (CCE). presentaban mayores niveles de expresión de IL8 que aquellos con adenocarcinoma (ADC). Sin embargo, los pacientes del grupo de ADC (n=94) que presentaba niveles de expresión génica más elevados de IL8 tenían una mayor supervivencia libre de progresión (SLP; 19,2 vs. 81,23 meses, $p=0,035$). El análisis multivariante reveló que la IL8 es un biomarcador de pronóstico independiente para la SLP (HR=0,349 [0,142-0854]; $p=0,021$). El resto de biomarcadores no mostró tener valor pronóstico. El análisis de los factores reveló que tanto las células en adherencia como las tumoresferas secretaban niveles detectables de IL8 e IL6 al contrario que IL4 e IL10, pero sin diferencias estadísticamente significativas entre adherentes y esferas.

CONCLUSIÓN: El análisis reveló que IL8 es un biomarcador de pronóstico independiente en pacientes con adenocarcinoma con CPNM en estadios resecables. El paso siguiente es la ampliación de la cohorte de pacientes para detectar diferencias significativas entre el microambiente de las células adherentes y las tumoresferas.