

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALENCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Análisis de la expresión de moléculas de adhesión en cultivos celulares primarios derivados de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas

TRABAJO FIN DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: MARTA PIQUERAS NEBOT

TUTORES: RAFAEL SIRERA PÉREZ y ELOISA JANTUS LEWINTRE

COTUTORA: SILVIA CALABUIG FARIÑAS

***Curso Académico: 2017-2018
VALENCIA, 18 de junio de 2018***

Tipo de licencia: Creative Commons

TÍTULO: Análisis de la expresión de moléculas de adhesión en cultivos celulares primarios derivados de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas

RESUMEN

El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) representa el 85% de los casos de cáncer de pulmón, enfermedad que supone la segunda causa de muerte a nivel nacional. Esta elevada mortalidad está relacionada entre otros factores con la aparición de resistencias a los tratamientos, a su vez asociada con la existencia de una subpoblación de células llamadas células madre tumorales. De ahí, el interés por establecer marcadores específicos que permitan la caracterización de estas células y de esta forma poder diseñar estrategias terapéuticas dirigidas específicamente contra ellas. Para ello, se han desarrollado métodos de cultivo de estas células madre tumorales basándose en su capacidad para formar esferas en condiciones no adherentes y medio libre de suero. Sin embargo, se ha observado que el fenotipo que las tumoresferas adquieren en los cultivos 3D es variable y se piensa que puede estar correlacionado con la expresión de genes implicados en la adhesión celular.

Este trabajo se realizó en 7 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 genes relacionados con la adhesión celular (*CLDN1*, *CLDN3*, *CLDN4*, *CLDN6*, *CLDN7*, *CLDN8*, *CLDN14*, *Vcam1*, *OCLN*, *JAM1*, *GJA1*, *GJB6*, *EPCAM*, *CDH1*, *VIM*, *ITGA2*, *ITGA6*, *ITGB1* y *CTNNB1*) 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 de referencia comercial.

Las tumoresferas de pulmón presentaron una expresión incrementada de *CLDN4*, *CDH1* y *ITGA6* ($p=0,05$, $p=0,049$ y $p=0,002$, respectivamente) comparadas con sus correspondientes células crecidas en adherencia. Asimismo, el estudio de las posibles correlaciones entre los genes mostró un patrón de coexpresión entre la mayoría de ellos ya que están implicados en el mismo proceso de adhesión celular, siendo estas correlaciones estadísticamente significativas entre *CLDN3-CLDN4* ($p=0,001$), *CDH1-CTNNB1* ($p=0,008$) o *VIM-EPCAM* ($p=0,012$). Por otra parte, el análisis de la expresión génica relativa demostró también que la sobreexpresión de E-cadherina y Conexina 43 se relaciona con la formación de tumoresferas compactas, mientras que la expresión aumentada de la integrina $\beta 6$ se asocia con la obtención de agregados laxos de CSCs.

Con todo ello, se propone la modulación de la expresión de los genes involucrados en la adhesión celular que condicionan la morfología de los esferoides de CSCs como una opción terapéutica para tratar a los pacientes con CPNM.

PALABRAS CLAVE: Cáncer de pulmón no microcítico, Adhesión celular, Expresión génica, Células madre tumorales, Tumoresferas, Agregados

AUTORA: Marta Piqueras Nebot

LOCALIDAD Y FECHA: Valencia, junio de 2018

TUTORES ACADÉMICOS: Rafael Sirera Pérez y Eloisa Jantus Lewintre

TUTOR/A INSTITUCIÓN: Silvia Calabuig Fariñas

TIPO DE LICENCIA: Creative Commons

TITLE: Analysis of the expression of adhesion molecules in primary cell cultures derived from non-small cell lung cancer patients

SUMMARY:

Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) represents approximately 85% of lung cancer cases, a disease which accounts for the second cause of death in Spain. This high mortality is related with the existence of resistances to treatments, which is associated with the presence of a subpopulation of cells called Cancer Stem Cells (CSC). For this reason, interest is set in establishing specific markers which allow the characterization of these cells in order to design therapeutic strategies targeted specifically to these cells. As a result, different culture methods have been proposed based on the ability of CSCs to form spheres in non-adherent conditions and in serum-free medium. However, the phenotype of the tumorspheres in 3D cell cultures is variable and it is believed that it is linked to the expression of genes implicated in cell adhesion.

This study was carried with 7 samples from resectable NSCLC patients and 12 cell lines grown both in monolayer and as spheroids. The expression of genes related with cell adhesion (*CLDN1*, *CLDN3*, *CLDN4*, *CLDN6*, *CLDN7*, *CLDN8*, *CLDN14*, *Vcam1*, *OCLN*, *JAM1*, *GJA1*, *GJB6*, *EPCAM*, *CDH1*, *VIM*, *ITGA2*, *ITGA6*, *ITGB1* y *CTNNB1*) was analysed by quantitative real-time PCR. Housekeeping genes *ACTB*, *CDKN1B* and *GUSB* were used as endogenous controls for relative expression calculation.

Lung tumorspheres had increased expression of *CLDN4*, *CDH1* y *ITGA6* ($p=0,05$, $p=0,049$ y $p=0,002$, respectively) when compared to their paired-adherent cells. Moreover, when studying possible correlations between genes, a coexpression pattern was observed between most of them since they are involved in the same process of cell adhesion, being significant the correlations between *CLDN3-CLDN4* ($p=0.001$), *CDH1-CTNNB1* ($p=0.008$) or *VIM-EPCAM* ($p=0.012$). What's more, the relative gene expression analysis revealed that the overexpression of E-cadherin and Connexin 43 was related with the formation of tight tumorspheres while the increased expression of integrin $\beta 6$ was associated with the presence of loose aggregates of CSCs.

Altogether, the modulation of the expression of these genes involved in cell adhesion, which determine the spheroids morphology, is proposed as a therapeutic option to treat NSCLC patients.

KEY WORDS: Non-small Cell Lung Cancer, Cellular Adhesion, Gene expression, Cancer stem cells, Tumorspheres, Aggregates

AUTHOR: Marta Piqueras Nebot

LOCATION AND DATE: Valencia, June 2018

ACADEMIC SUPERVISORS: Rafael Sirera Pérez y Eloisa Jantus Lewintre

INSTITUTION SUPERVISOR: Silvia Calabuig Fariñas

LICENSE: Creative Commons

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CONCEPTO DE CÁNCER.....	1
1.2 CÁNCER DE PULMÓN.....	2
1.2.1 Epidemiología y factores de riesgo.....	2
1.2.2 Diagnóstico, pronóstico y estadificación	3
1.2.3 Cáncer de pulmón no microcítico	3
1.2.3.1 Clasificación histológica y molecular.....	3
1.2.3.2 Tratamiento.....	5
1.3 CÉLULAS MADRE TUMORALES	5
1.3.1 Propiedades de las células madre tumorales	6
1.3.2 Métodos de aislamiento y crecimiento in vitro de CSCs	7
1.3.3 Las moléculas de adhesión celular y el fenotipo de las tumoresferas	8
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. MUESTRAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO.....	14
3.2. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES	14
3.3. CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES	16
3.4. EXTRACCIÓN DE ADN Y ARN.....	16
3.5. REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN.....	16
3.6. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (qPCR).....	17
3.7. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA	19
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1 ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUMORESFERAS	21
4.2 CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL ARN	22
4.3 ENSAYO DE CÁLCULO DE EFICIENCIA TAQMAN.....	22
4.4 ANÁLISIS RELATIVO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	23
4.4.1 Comparación de la expresión génica relativa entre cultivos 2D y 3D.....	23
4.4.2 Análisis de correlaciones entre genes.....	26
4.4.3 Comparación de la expresión génica relativa entre tumoresferas compactas y agregados.....	29
4.4.4 Análisis de genes cuya expresión alterada caracterizan el tipo de esferoide formado.....	30
5. CONCLUSIONES	32
6. REFERENCIAS	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características de la célula tumoral y opciones terapéuticas antidiana específicas (Hanahan & Weinberg, 2011).....	1
Figura 2. Cifras aproximadas de nuevos casos diagnosticados y muertes para los 10 tipos de tumores más comunes (Siegel, Miller & Jemal, 2018).....	2
Figura 3. Clasificación histológica del cáncer de pulmón (Adaptación de Gridelli et al., 2015) ...	4
Figura 4. Frecuencia de las mutaciones presentes en adenocarcinoma y carcinoma epidermoide (Rosell & Karachaliou, 2016).....	4
Figura 5. Microambiente tumoral constituido por distintos tipos celulares (Vermeulen et al. 2012).....	6
Figura 6. Modelos de desarrollo tumoral a partir de las CSC. (A) Modelo determinista: postula el desarrollo del tumor a partir de una CSC (naranja oscuro) (B) Modelo estocástico postula que es una célula tumoral la que adquiere el fenotipo CSC por acumulación de mutaciones (Gottschling et al., 2012)	7
Figura 7. Representación esquemática de la transición epitelio-mesenquimal (EMT) (Tiwari et al., 2012).....	7
Figura 8. Estructura de las claudinas: se compone de una región intracelular N-terminal corta, 4 dominios transmembrana que forman dos bucles extracelulares y una cola citoplasmática C-terminal que contiene sitios diana para modificación post-traduccionales además de tener un motivo de unión PDZ (Tabariès & Siegel, 2016).....	9
Figura 9. Interacciones en el nicho de las células madre mediadas por cadherinas e integrinas (Chen & Mellman, 2013)	12
Figura 10. Pasos de la reacción TaqMan® PCR (Life Technologies).....	17
Figura 11. Líneas celulares y cultivos primarios de pacientes con CPNM. Cultivos en adherencia y en esferas.....	22
Figura 12. Representación gráfica del cálculo de eficiencias para el gen JAM1	22
Figura 13. Expresión relativa a nivel de ARNm de genes implicados en la adhesión celular en células cultivadas en adherencia y en tumoresferas. Las barras representan la mediana \pm intervalo intercuartílico. *p<0,05; **p<0,01	24
Figura 14. Representación de las proteínas que participan en la unión célula-célula mediada por cadherinas. Esta unión es mediada por la interacción de β -catenina con el dominio citoplasmático de E-cadherina, por un lado, y con α -catenina por el otro; α -catenina, a su vez, interactúa con los filamentos de actina (Mantilla et al., 2015).....	28
Figura 15. Representación esquemática de las vías de señalización activadas por EGF. El color rojo indica sobreexpresión, mientras que en verde se señalan genes cuya expresión ha sido inhibida (Guillén et al., 2013)	29
Figura 16. Expresión relativa a nivel de ARNm de genes implicados en la adhesión celular en tumoresferas compactas y agregados. Las barras representan la mediana \pm intervalo intercuartílico.	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características clinicopatológicas de los pacientes incluidos en el estudio	14
Tabla 2. Líneas celulares de cáncer de pulmón utilizadas en este estudio	15
Tabla 3. Programa de temperatura y tiempo de la retrotranscripción.....	17
Tabla 4. Genes analizados y longitud del amplicon de los Genes TaqMan® Gene Expression Assays utilizados en la qPCR	18
Tabla 5. Programa para RT-qPCR	19
Tabla 6. Resultados de las correlaciones analizadas entre los genes implicados en la adhesión celular de células madre tumorales crecidas en forma de tumoresferas.....	27
Tabla 7. Tablas de contingencia que analizan la correlación entre la variable tipo de esferoide y la variable expresión génica dicotomizada para distintos genes: (a) <i>CDH1</i> , (b) <i>CDH1</i> y <i>GJA1</i> y (c) <i>CDH1</i> e <i>ITGA6</i>	30

ABREVIATURAS

ACTB: Actina beta
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
ADC: Adenocarcinoma
AECC: Asociación Española Contra el Cáncer
ALK: Quinasa del linfoma anaplásico
APC: Adenomatous Polyposis Coli
bFGF: Factor de crecimiento básico de fibroblastos
BRAF: Proto-oncogén B-Raf, serina treonina quinasa
CD133: *Cluster* de diferenciación 133 o prominina-1
CD44: *Cluster* de diferenciación 44
CDH1: E-cadherina
CDKN1B: Inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina
CLDN1: Claudina 1
CLDN3: Claudina 3
CLDN4: Claudina 4
CLDN6: Claudina 6
CLDN7: Claudina 7
CLDN8: Claudina 8
CLDN14: Claudina 14
CPM: Cáncer de pulmón microcítico
CPNM: Cáncer de pulmón no microcítico
CSC: *Cancer Stem Cell* (Célula Madre Tumoral)
Ct: *Cycle threshold*
CTNNB1: β -catenina
EGF: Factor de crecimiento epidérmico
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMT: Transición epitelial-mesenquimal
EpCAM o *CD326*: Molécula de adhesión de las células epiteliales
FDA: *Food and Drug Administration*
FRET: *Fluorescence-Resonance Energy Transfer*
GJA1: *Gap junction protein alpha 1*
GJB6: *Gap junction protein beta 6*
GSK-3 β : Glucógeno sintasa quinasa-3
GUSB: Glucuronidasa beta
HER2: Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano
INE: Instituto Nacional de Estadística
ITGA2: Integrina alfa 2
ITGA6: Integrina alfa 6
ITGB1: Integrina beta 1

JAM1 o *F11R*: *Junctional Adhesion Molecule 1*
KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LCC: *Large cell carcinoma* (Carcinoma de células grandes)
MGB: *Minor Grove Binder*
MMP2: Metaloproteasa 2 de la matriz
MMP9: Metaloproteasa 9 de la matriz
NCI: Instituto Nacional del Cáncer
NGS: Secuenciación de nueva generación
NFQ: *Quencher* no fluorescente
NSCLC: *Non-small-cell lung cancer*
OCN: Ocludina
OCT4: *Octamer-binding transcription factor 4*
OMS: Organización Mundial de la Salud
PIK3CA: Subunidad catalítica alfa de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa
PS: *Performance status*
qPCR: Reacción de PCR en tiempo real
ROS: proto-oncogén 1 ROS, receptor tirosina quinasa
RT: Reacción de retrotranscripción
SCC: *Squamous cell carcinoma* (Carcinoma de células escamosas)
Sox2: *Sex determining Region Y-box 2*
SPSS: *Statistical Package for the Social Science*
TAC: Tomografía computerizada de tórax
TEP: Tomografía por emisión de positrones de tórax y abdomen
TKIs: Inhibidores tirosina quinasa
Tm: Temperatura de fusión
TNM: Tumor/Nódulos/Metástasis
UNG: Uracil N-glicosilasa
Vcam1 o *CD106*: Vascular cell adhesion molecule 1
VEGFR: Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
VIM: Vimentina
Wnt: Familia de proteínas tipo wingless

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CONCEPTO DE CÁNCER

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo y posteriormente invadir el tejido circundante hasta provocar metástasis en puntos distantes del organismo (Organización Mundial de la Salud, OMS, 2018).

Con el término cáncer se engloba a un conjunto de enfermedades de base genética ya que esta patología está causada por alteraciones en genes encargados de controlar las funciones celulares, especialmente la división celular. En estos genes “causantes” del cáncer se agrupan tres tipos principales: proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN (Instituto Nacional del Cáncer, NCI, 2018).

En una publicación del año 2000, Hanahan y Weinberg establecieron las seis características básicas que definían a las células cancerosas: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad hacia las señales inhibitorias del crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitada, angiogénesis sostenida e invasión tisular y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2000). Unos años después, en 2011, ellos mismos complementaron esos seis rasgos definitorios con cuatro más, los cuales son: inestabilidad genómica, desregulación del metabolismo energético, escape del sistema inmune e inflamación promovida por el tumor y así se establecieron las 10 propiedades que definen a las células tumorales (Hanahan & Weinberg, 2011) (Figura 1).

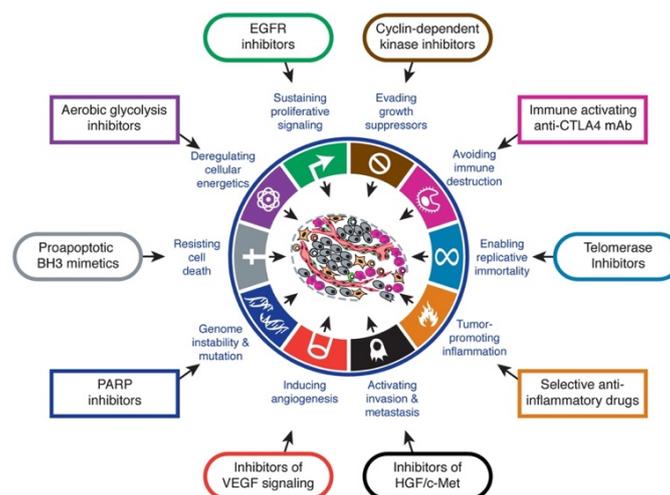


Figura 1. Características de la célula tumoral y opciones terapéuticas antitumorales específicas (Hanahan & Weinberg, 2011)

En definitiva, un tumor se entiende como una masa de células, no solo cancerosas caracterizadas por su replicación incontrolada, sino también células reclutadas que conforman el microambiente tumoral y que tienen una contribución directa al proceso de carcinogénesis.

1.2 CÁNCER DE PULMÓN

1.2.1 Epidemiología y factores de riesgo

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, siendo el cáncer de pulmón el que más mortalidad presenta a nivel global (Siegel, Miller & Jemal, 2018).

En España, las enfermedades tumorales también son la segunda causa de muerte por detrás de las del sistema circulatorio y los tumores de pulmón se consideran la primera causa de muerte por cáncer en el sexo masculino, y la sexta en el femenino (Asociación Española Contra el Cáncer, AECC, 2018; Instituto Nacional de Estadística, INE, 2012). Para este año 2018, se calcula que aproximadamente 230.000 nuevos casos de cáncer de pulmón, agrupando ambos tipos, serán diagnosticados, causando alrededor de 150.000 muertes (Siegel, Miller & Jemal, 2018) (Figura 2).

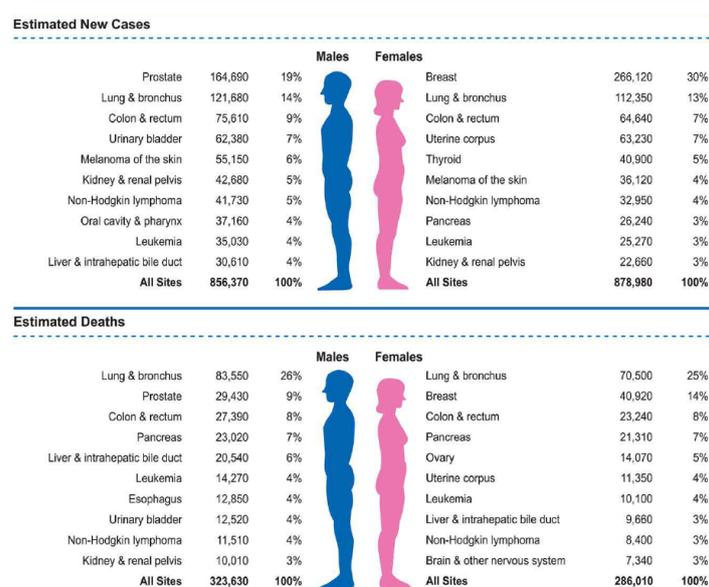


Figura 2. Cifras aproximadas de nuevos casos diagnosticados y muertes para los 10 tipos de tumores más comunes (Siegel, Miller & Jemal, 2018)

El hábito tabáquico está indudablemente relacionado con la creciente incidencia del cáncer de pulmón ya que el humo del tabaco contiene unas 4000 sustancias químicas, de las cuales 60 se consideran carcinógenas (De Groot & Munden, 2012). Otro factor importante es la exposición a carcinógenos ambientales u ocupacionales como el asbesto, sílice, metales pesados, amianto y algunos metales como níquel, cromo o cadmio (De Groot & Munden, 2012; Malhotra et al., 2016). Por otra parte, una dieta rica en antioxidantes, vitaminas y carotenoides se considera un factor protector mientras que una dieta rica en grasas saturadas y las bebidas alcohólicas tienen un efecto pro-tumorígeno (Vieira et al., 2016).

1.2.2 Diagnóstico, pronóstico y estadificación

La sintomatología asociada al cáncer de pulmón engloba: tos persistente, dolor torácico, hemoptisis, disnea o pérdida de peso. Sin embargo, en la mayoría de casos (alrededor del 75%) el diagnóstico temprano no es posible y la enfermedad neoplásica se detecta en estadios avanzados, cuando ya no es posible la intervención curativa (cirugía) y debido a la presencia de metástasis locales o a distancia (Morgensztern et al., 2010). El diagnóstico de esta patología tiene como objetivo establecer la localización del tumor primario y proceder a su estadificación. Para ello, se recurre inicialmente a radiografía de tórax, pero hay disponibles otras tecnologías como la tomografía computerizada de tórax (TAC) o la tomografía por emisión de positrones (TEP) que ayudan a valorar el grado de extensión de la enfermedad y así predecir las futuras respuestas al tratamiento (Cuaron, Dunphy & Rimner, 2012). Posteriormente, técnicas invasivas como la broncoscopia o la endoscopia por ultrasonidos son necesarias para biopsiar el tumor y proceder a la confirmación histológica (Gridelli et al., 2015). A pesar de los avances en la detección sistemática del cáncer de pulmón, el elevado coste de esta ha dirigido la investigación hacia la búsqueda de biomarcadores de predicción (Jantus-Lewintre et al., 2012).

Tras el diagnóstico, el patólogo debe aportar información sobre los factores pronósticos asociados a la enfermedad para poder establecer el tratamiento adecuado. Las variables que hasta la fecha han sido asociadas con el pronóstico se agrupan en diferentes clases: a) relacionadas con el tumor, como la localización del tumor primario, el tipo celular y la extensión de la enfermedad; b) relacionadas con el paciente, tales como estado funcional, comorbilidad y sexo; y c) relacionadas con factores ambientales, como la nutrición y el hábito tabáquico (Goldstraw et al., 2011). Actualmente, uno de los factores pronósticos más importantes en el cáncer de pulmón es la estadificación de la enfermedad en base a los criterios "TNM", donde la letra T se relaciona con las dimensiones de la masa tumoral y su diseminación regional, la letra N hace referencia a la invasión de los ganglios linfáticos cercanos y la letra M describe la existencia de metástasis (Rami-porta, 2017). Sin embargo, la caracterización histológica y molecular del tumor es necesaria para la toma de decisiones relacionadas con el tratamiento del paciente.

1.2.3 Cáncer de pulmón no microcítico

El cáncer de pulmón se clasifica en dos grandes grupos histológicos: el cáncer de pulmón de células no pequeña o cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) que representa aproximadamente el 80%-85% de todos los casos de neoplasias de pulmón y el resto corresponde al cáncer de pulmón de células pequeña o microcítico (CPM). Ambos tipos de tumores tienen un comportamiento diferente en cuanto a su evolución y tratamiento y en este trabajo nos centraremos en el CPNM dado que es el más frecuentemente diagnosticado.

1.2.3.1 Clasificación histológica y molecular

Dentro del CPNM encontramos diferentes subtipos histológicos: el carcinoma epidermoide (SCC) (30%), el adenocarcinoma (ADC) (35-40%) y el carcinoma de células grandes (LCC) (alrededor de un 10%) (Figura 3). Estos tres últimos subtipos se diferencian

histológicamente tanto por el fenotipo de sus células como a través de diferentes marcadores proteicos, pero también por el lugar de aparición, la capacidad de metástasis y la respuesta a tratamiento.

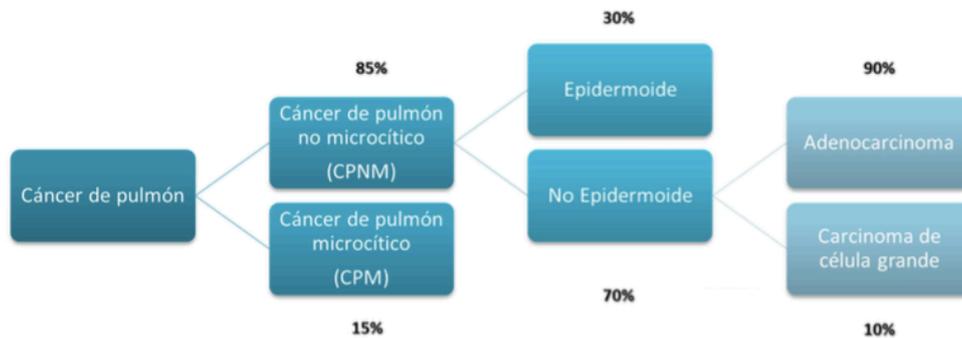


Figura 3. Clasificación histológica del cáncer de pulmón (Adaptación de Gridelli et al., 2015)

El CPNM se caracteriza por presentar células tumorales de mayor tamaño que las células pulmonares normales y los de tipo epidermoide derivan del epitelio bronquial y se caracterizan por un crecimiento lento y mal pronóstico debido a que un gran número de pacientes presentan recaídas y progresiones de la patología. El adenocarcinoma se produce como consecuencia de la transformación maligna de las células broncoalveolares y suelen ser tumores periféricos que afectan a la pleura (Travis et al., 2011), mientras que el carcinoma epidermoide está más relacionado con el hábito tabáquico y representa un 30-35 % de todos los CPNM. Por último, el carcinoma de células grandes es el que menor agresividad presenta y generalmente se localiza en la periferia del pulmón (Travis, 2002).

Los avances en la biología molecular y las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) han permitido clasificar los carcinomas pulmonares en diferentes entidades moleculares (Figura 4).

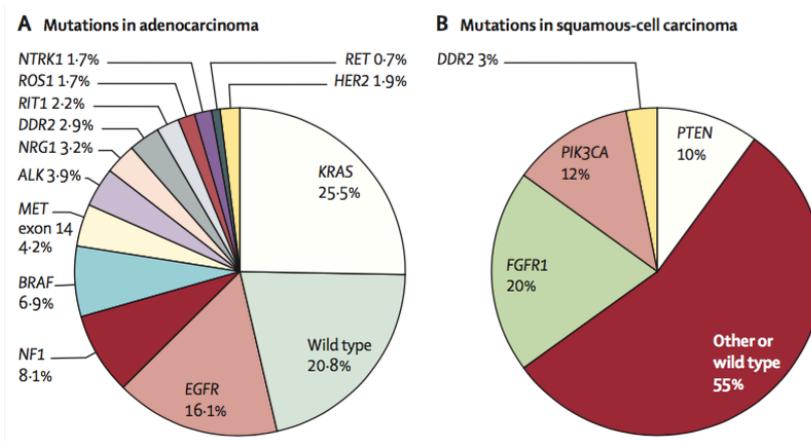


Figura 4. Frecuencia de las mutaciones presentes en adenocarcinoma y carcinoma epidermoide (Rosell & Karachaliou, 2016)

El CPNM es uno de los tumores con mayor diversidad genómica y se pueden establecer distintos grupos de pacientes en función de los genes mutados o alterados. Algunas de las

mutaciones *driver* más frecuentemente encontradas en los adenocarcinomas son las alteraciones observadas en el gen *EGFR* (gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico), seguidas de las traslocaciones que involucran al gen *ALK* (gen de la quinasa del linfoma anaplásico), las amplificaciones en *HER2* (erb-b2 receptor tirosina quinasa 2), ganancias en el número de copias o mutaciones en *PIK3CA* (subunidad catalítica alfa de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa) o las mutaciones en *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), *BRAF* (proto-oncogén B-Raf, serina treonina quinasa) y *ROS1* (proto-oncogén 1 ROS, receptor tirosina quinasa) (Fujimoto & Wistuba, 2014; Morgensztern et al., 2015).

1.2.3.2 Tratamiento

El tratamiento en pacientes con cáncer de pulmón se planifica en base a la histología, el estadio tumoral, el estado funcional del paciente y más recientemente teniendo en cuenta el perfil de mutaciones de cada tumor.

La cirugía es el tratamiento estándar para pacientes con estadios tempranos, pero para aquellos pacientes diagnosticados en estadios más avanzados, se recurre a la radioterapia o quimioterapia (Goldstraw et al., 2011). Sin embargo, estas opciones no resultan lo suficientemente efectivas y el advenimiento de las terapias dirigidas contra dianas moleculares ha supuesto un cambio radical en la supervivencia de muchos de estos pacientes, aunque los porcentajes de pacientes que se benefician de este tipo de terapias es aún reducido. Algunos ejemplos de estos agentes dirigidos son los inhibidores tirosina quinasa (TKIs) como gefitinib, y erlotinib, específicos para pacientes con mutaciones en *EGFR* (Yang et al., 2017). Asimismo, en los últimos años ha emergido la inmunoterapia como alternativa terapéutica (Novello *et al.*, 2016; Gridelli *et al.*, 2015). Entre las diferentes opciones posibles, el bloqueo de las moléculas de control inmune (*immunecheckpoints*) con anticuerpos monoclonales ha surgido como una estrategia prometedora. Hasta el momento diversos inmunoterapéuticos, incluyendo nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab y atezolizumab han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de cáncer de pulmón (Herbst et al., 2016). A pesar de que la inmunoterapia ha demostrado tener mejores tasas de respuesta que la quimioterapia, aproximadamente un 80% no responde al tratamiento con anticuerpos monoclonales debido a la aparición de resistencias, por lo que la quimioterapia sigue siendo una opción terapéutica (Chao & Pecot, 2018). Aunque las terapias citotóxicas convencionales buscan eliminar las células tumorales, hay una subpoblación de células que sobrevive y sigue proliferando y se ha clasificado este grupo como células madre tumorales.

1.3 CÉLULAS MADRE TUMORALES

La aparición de resistencias a los tratamientos es una de las causas principales de la elevada mortalidad del cáncer de pulmón. En este sentido, se piensa que las masas tumorales son heterogéneas, constituidas por células transformadas en diferentes estadios de indiferenciación (Figura 5) y hay evidencias científicas que indican que la quimiorresistencia y la progresión y diseminación están ligadas a una subpoblación de células con características "*stem*" llamadas células madre tumorales (*Cancer Stem Cells*, CSCs) (Han et al., 2013). Así, mientras que los tratamientos quimioterápicos tradicionales están dirigidos a causar daño en el

ADN de células de rápida división, las CSC se mantienen en estado de quiescencia con una cinética de división ralentizada. Por esta razón, las CSC no son sensibles a los citotóxicos usados en la actualidad y pueden ser las responsables de la recidiva de los tumores después del tratamiento. Por ello, hay un gran interés en caracterizar la población de CSC pulmonares para su correcta identificación mediante marcadores específicos y así poder diseñar nuevas estrategias terapéuticas que permitan controlar a esta población celular o bien inducir su diferenciación para sensibilizarlas a los efectos de los fármacos usados para el tratamiento de este tipo de tumores.

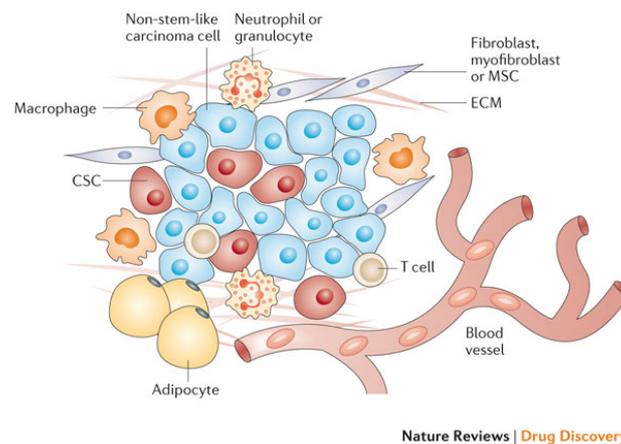


Figura 5. Microambiente tumoral constituido por distintos tipos celulares (Vermeulen et al., 2012)

1.3.1 Propiedades de las células madre tumorales

Las células madre tumorales o *cancer stem cells* (CSC) constituyen una subpoblación minoritaria de células que comparte ciertas propiedades con las células madre embrionarias como son las capacidades de auto-renovación y proliferación indefinida, resistencia a los tratamientos, división asimétrica, pluripotencia o habilidad de formar esferas en medio no adherente, pero difieren en su capacidad de iniciar tumores *in vivo* y de metastatizar (Sourisseau et al., 2014). 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 (Kotiyal & Bhattacharya 2015).

Hay dos teorías que pueden explicar la tumorigénesis guiada por las CSC (Figura 6). El modelo determinista se basa en la idea de que el tumor se forma a partir de una CSC procedente de una célula tumoral que ha sufrido un proceso de dediferenciación u originada a partir de una célula madre degenerada. Este modelo postula que la CSC da lugar a una progenie de CSCs junto con células tumorales por el proceso de división asimétrica. En contra, el modelo estocástico postula que una o más células tumorales, por acumulación de mutaciones, dan lugar a una célula tumoral con fenotipo CSC.

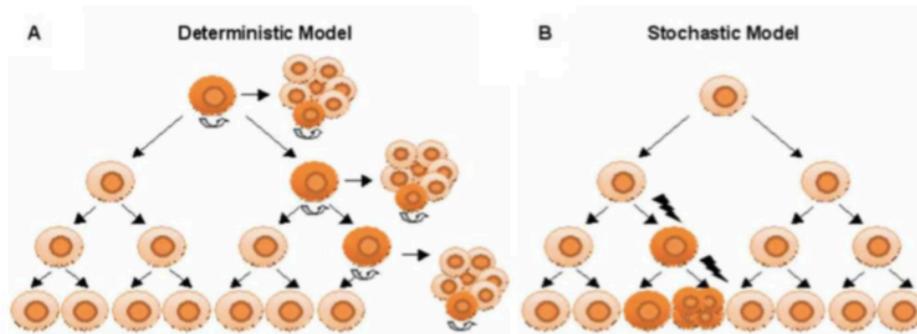


Figura 6. Modelos de desarrollo tumoral a partir de las CSC. (A) Modelo determinista: postula el desarrollo del tumor a partir de una CSC (naranja oscuro) (B) Modelo estocástico postula que es una célula tumoral la que adquiere el fenotipo CSC por acumulación de mutaciones (Gottschling et al., 2012)

Asimismo, durante la invasión local y metástasis, las células tumorales sufren alteraciones en su forma y en la adhesión con otras células y con la matriz extracelular. Se piensa que como consecuencia del proceso conocido como transición epitelio-mesenquimal (EMT), las células cancerígenas adquieren características de *stem cells* y es por ello, que las células tumorales metastásicas son capaces de iniciar nuevos tumores (Liu & Fan, 2015; Ombrato & Malanchi, 2014). Durante este proceso, las células pierden el contacto célula-célula y reorganizan su citoesqueleto perdiendo marcadores epiteliales y adquiriendo marcadores típicos de células mesenquimales con el fin de migrar e invadir tejidos circundantes (Figura 7).

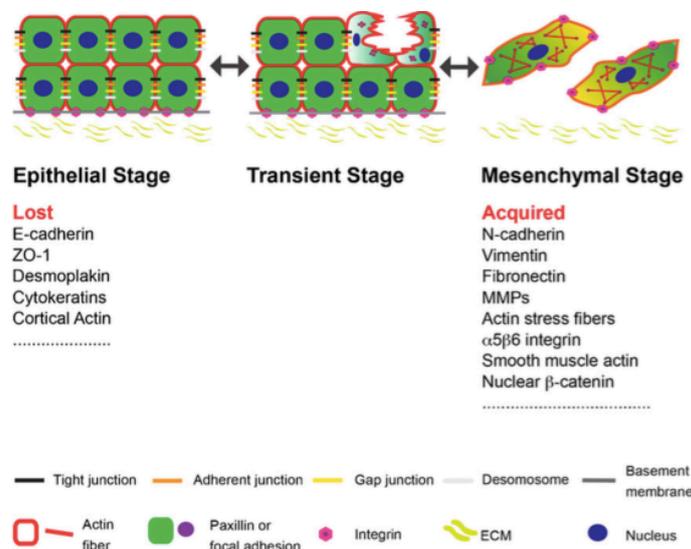


Figura 7. Representación esquemática de la transición epitelio-mesenquimal (EMT) (Tiwari et al., 2012)

1.3.2 Métodos de aislamiento y crecimiento *in vitro* de CSCs

En los cultivos celulares en 2D, las células crecen en forma de monocapa sobre una superficie sólida, pero no se reproducen las interacciones célula-célula y célula-matriz que sí están presentes en los tumores nativos. Además, las células crecidas en 2D, sufren reorganizaciones del citoesqueleto que a su vez se traduce en una expresión génica y proteica aberrante. Por el contrario, los cultivos 3D ofrecen la posibilidad de cultivar células tumorales

individuales o junto a otras células, reproduciendo de manera exacta el microambiente tumoral. Gracias a este tipo de cultivos, se han podido diseñar plataformas de alto rendimiento para el cribado de fármacos, investigar células madre y líneas celulares, desarrollar técnicas de ingeniería tisular o estudiar el proceso de angiogénesis en el microambiente tumoral (Nath & Devi, 2016).

El cultivo en suspensión de células tumorales favorece la formación de este tipo de estructuras en 3D, las cuales están enriquecidas en células con características de CSCs, por lo que este tipo de modelo supone una herramienta interesante para reproducir el comportamiento tumoral *in vivo*. En las tumoresferas nos encontramos con una estructura que presenta tanto células expuestas en la superficie como células sumergidas, células en proliferación como células quiescentes y células oxigenadas, pero también una zona interior del esferoide que es francamente hipóxica (Sirenko et al., 2015). Con el fin de aislar y caracterizar las células madre tumorales y dada la capacidad de las CSC para formar esferas en condiciones de cultivo de baja adherencia, se pueden aislar CSC a partir de tejidos tumorales en medios libres de suero y con algunos suplementos como la insulina, hidrocortisona o factores de crecimiento como el EGF (factor de crecimiento epidérmico) o bFGF (factor de crecimiento básico de fibroblastos), dependiendo del tejido de origen de las células tumorales (Zhang et al., 2015).

Los métodos de aislamiento de CSC y expansión en forma de esferoides consisten básicamente en un primer paso de disgregación tanto mecánica como enzimática de la muestra tumoral en una suspensión celular, a continuación, la suspensión celular se cultiva a bajas densidades y en placas con superficies tratadas denominadas de baja adherencia (*low attachment*), de esta manera, al inhibir la adhesión, se induce la muerte de células diferenciadas y no malignas a través del fenómeno de anoikis. En ocasiones, se añade al medio progesterona para inducir la proliferación de las células madre y heparina para estabilizar la asociación entre bFGF y su receptor. También es posible realizar pasos intermedios para enriquecer la muestra en CSCs y eliminar células del estroma basándose en los marcadores de células madre tumorales, como son CD44, CD133 o EpCAM (Weiswald et al., 2015).

Sin embargo, este sistema de cultivo de esferoides en suspensión aún presenta ciertos retos como son el elevado coste, bajo rendimiento y difícil procesamiento. Por ello, se han desarrollado ciertos materiales no tóxicos como quitosano, colágeno, agarosa o alginato que actúan como matrices sobre las cuales crecen las tumoresferas (Zhu et al., 2017).

1.3.3 Las moléculas de adhesión celular y el fenotipo de las tumoresferas

En el cultivo en 3D de CSCs se ha visto que la morfología que adquieren las tumoresferas es variable, pudiendo ser compactas y redondeadas o más bien formando agregados. Se piensa que la morfología del esferoide formado puede depender de las moléculas de adhesión expresadas en las células tumorales en cultivos celulares primarios en adherencia. A continuación, se comentarán las principales moléculas involucradas en la adhesión celular cuya expresión podría estar relacionada con la apariencia que adquieren los cultivos en 3D de células tumorales.

Las uniones estrechas son estructuras localizadas en la región apicobasal de las membranas celulares y están constituidas por moléculas como ocludinas, claudinas y la familia JAM (*junctional adhesion molecules*), cuya expresión puede estar desregulada en las células tumorales y además están implicadas en la transición epitelio-mesenquimal, por lo que condicionan la diseminación del tumor (Soini, 2012).

Claudinas

Las claudinas son proteínas transmembrana de unos 20-34 kDa de tamaño (Figura 8) que se localizan en las uniones estrechas entre células y promueven la adhesión entre ellas, además de regular la permeabilidad y polaridad de las membranas celulares. En función de si tienen un papel supresor o estimulador del cáncer, sus niveles de expresión están relacionados con el buen o mal pronóstico de los pacientes oncológicos. Entre ellas, destacan las claudinas 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 9, por ser las que más alterada tienen su expresión en células tumorales en comparación con el tejido normal (Tabariès & Siegel, 2016).

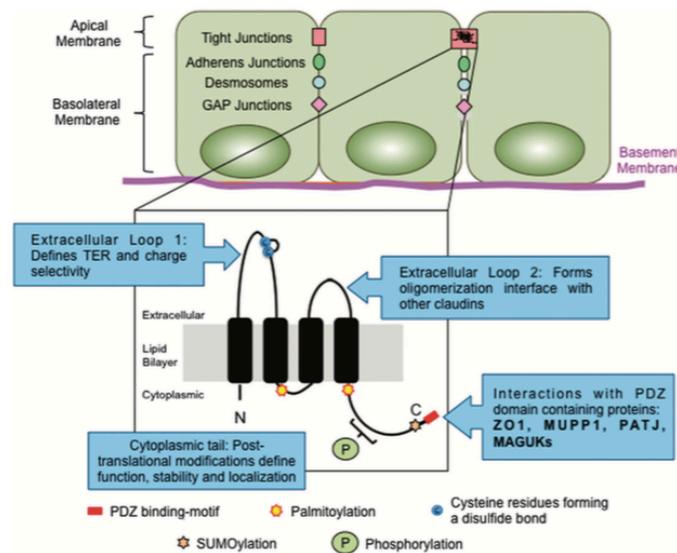


Figura 8. Estructura de las claudinas: se compone de una región intracelular N-terminal corta, 4 dominios transmembrana que forman dos bucles extracelulares y una cola citoplasmática C-terminal que contiene sitios diana para modificación post-traduccionales además de tener un motivo de unión PDZ (Tabariès & Siegel, 2016)

Familia JAM

La familia de moléculas JAM (*junctional adhesion molecule*) intervienen en el tráfico de linfocitos T, neutrófilos y células dendríticas desde los compartimentos linfoides y vasculares hacia los tejidos durante la respuesta inflamatoria. Son proteínas glicosiladas compuestas de 3 dominios estructurales: una región extracelular con dos dominios variables tipo Ig, uno transmembrana y una cola corta intracelular que tiene motivos de unión PDZ. Una disminución en los niveles de expresión se relaciona con un aumento en el potencial de metastásico de las células tumorales (Soini, 2012).

Ocludinas

Las ocludinas son proteínas presentes en las uniones adherentes y están formadas por 4 dominios transmembrana que dejan dos bucles extracelulares del mismo tamaño, un dominio N-terminal corto y un dominio C-terminal largo, estos dos últimos intracelulares. Los dos bucles extracelulares presentan muchos residuos de tirosina que son diana de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación (Soini, 2012).

Proteínas de uniones GAP

Las uniones GAP son canales intercelulares formados por diferentes combinaciones de la proteína conexina que forman hemicanales. Su función se relaciona con la regulación del ciclo celular y diferenciación y señalización celular (Bigelow & Nguyen, 2014). Dado que las uniones GAP se forman al interaccionar los hemicanales de células adyacentes, durante la progresión del cáncer se pueden formar 3 tipos de uniones GAP: tumor-tumor, tumor-estroma o estroma-estroma (Hong et al., 2015). Se ha observado una relación entre una elevada expresión del gen GJA1 que codifica para la conexina Cx43 y un buen pronóstico en pacientes de cáncer de pulmón, así como con la prevención de la transición epitelio-mesenquimal y de la resistencia a la quimioterapia con cisplatino en la línea celular A549 de adenocarcinoma de pulmón (Yu et al., 2014).

Vimentina

La vimentina forma parte de la familia de proteínas constituyentes de los filamentos intermedios que se expresa de manera ubicua en las células mesenquimales normales y su función es mantener la integridad celular y proporcionar resistencia frente al estrés (Liu et al., 2015). La expresión aumentada de esta proteína se ha asociado con varios cánceres epiteliales, incluyendo pulmón, mama o gastrointestinal. Su sobreexpresión se correlaciona con un aumento de la invasión, del crecimiento tumoral y con un mal pronóstico (Havel et al., 2015).

Cateninas

La familia de cateninas engloba proteínas del citoesqueleto como α -, β -, γ - y δ -cateninas que son importantes para la formación de las uniones adherentes entre células ya que pueden enlazar los filamentos de actina del citoesqueleto a las cadherinas. La β -catenina es una proteína multifuncional que participa en el desarrollo embrionario, organogénesis y homeostasis celular. Esta proteína participa como un coactivador transcripcional en la ruta Wnt. En ausencia de señalización por Wnt, la β -catenina forma parte de un complejo junto a axina, APC (adenomatous polyposis coli) y GSK-3 β (glucógeno sintasa quinasa-3) que es degradado continuamente por el proteasoma. Cuando se activa la señalización, el complejo se disocia y la β -catenina se transloca al núcleo donde activa la expresión de ciertos genes implicados en la proliferación y adhesión celular, como las metaloproteasas que degradan la matriz extracelular y, por tanto, causa que las células tumorales sean más invasivas (Farahani et al., 2014). A su vez, la ruta de señalización Wnt/ β -catenina se ha relacionado con la regulación de marcadores típicos de CSCs, como OCT-4 (Teng et al., 2010).

EpCAM o CD326

La molécula de adhesión de las células epiteliales (EpCAM) es una glicoproteína transmembrana expresada en la membrana basolateral de la mayoría de tejidos epiteliales normales y está sobreexpresada en muchos carcinomas humanos, lo que se relaciona con un mal pronóstico (Schnell, Cirulli & Giepmans, 2013). Estructuralmente, consta de un dominio extracelular largo (N-terminal) y un dominio intracelular corto (C-terminal), separados por un único dominio transmembrana (Fong et al., 2014). Entre sus funciones se incluyen la adhesión celular y señalización mitogénica y además se identifica como un marcador de células iniciadoras de CSC. Sin embargo, hay cierta controversia en el papel que EpCAM juega en el desarrollo del cáncer. Por una parte, se ha asociado la sobreexpresión de este gen con una mejora en la supervivencia global en ciertos tumores epiteliales, como gástrico, colorectal o renal, sugiriendo así una función supresora de tumores. Por otra parte, se ha descrito que EpCAM promueve la motilidad celular, proliferación, supervivencia y formación de metástasis. Además, se han identificado muchos genes cuya regulación está mediada por EpCAM, entre ellos CD44, Oct4 o Sox2, relacionados con el mantenimiento de la pluripotencia de las CSCs (Herrerros-Pomares et al., 2018).

Cadherinas

La familia de cadherinas clásicas son glicoproteínas transmembrana que median la adhesión célula-célula a través de interacciones homofílicas entre los dominios extracelulares de cadherinas dispuestas en células adyacentes o entre el dominio intracelular y elementos del citoesqueleto, en este caso participan proteínas como α -catenina o β -catenina (Chen & Mellman, 2013) (Figura 9). Entre ellas, destaca la E-cadherina que es una molécula de adhesión transmembrana y dependiente de calcio que se expresa prácticamente en todas las células epiteliales. Su función se relaciona con la embriogénesis y mantenimiento del epitelio adulto, pero las alteraciones en su expresión promueven el desarrollo de tumores y la pérdida de las células madre tumorales de sus nichos. En 2016, Schmidt y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de E-cadherina en cultivos primarios en adherencia se relacionaba con la formación de esferoides compactos mientras que una baja expresión de esta molécula se vinculaba a la formación de agregados en los cultivos en 3D (Schmidt et al., 2016).

Integrinas

Las integrinas son moléculas transmembrana heterodiméricas, compuestas por subunidades α y β , que median las interacciones entre las células y los componentes de la matriz extracelular como laminina, colágeno o fibronectina (Barczyk, Carracedo & Gullberg, 2010). Igualmente, las integrinas se pueden unir a moléculas de adhesión expresadas en la superficie de las células como es el caso de Vcam1, también conocida como CD106 (*vascular cell adhesion molecule 1*), que se sabe está presente en el nicho de las células madre (Chen & Mellman, 2013) (Figura 9). Las integrinas participan en muchos procesos como migración y diferenciación celular, morfogénesis y organogénesis, así como en el mantenimiento de la integridad tisular.

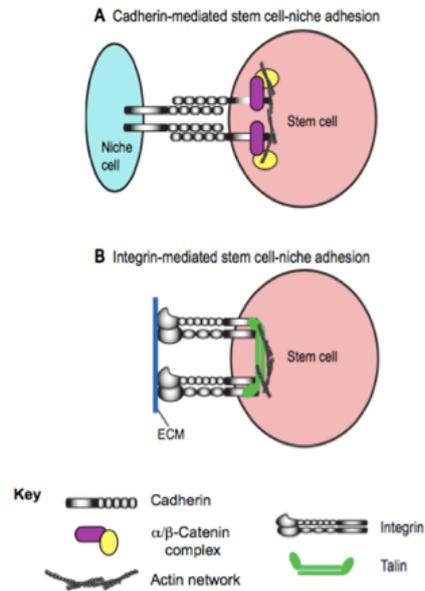


Figura 9. Interacciones en el nicho de las células madre mediadas por cadherinas e integrinas (Chen & Mellman, 2013)

Por lo expuesto anteriormente, en este trabajo nos centraremos en la caracterización de CSCs mediante el análisis de genes implicados en la adhesión celular para tratar de establecer marcadores de esta subpoblación celular que nos determinen el fenotipo que adquieren en los cultivos 3D.

2. OBJETIVOS

Las CSCs se han propuesto como una posible diana terapéutica en cáncer y en el cáncer de pulmón tienen una especial importancia debido a su alta tasa de recurrencia, sin embargo, la caracterización de esta población es todavía escasa. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo es analizar y caracterizar perfiles de expresión génica específicos de CSCs y correlacionarlos con diferentes fenotipos de tumoresferas obtenidos a partir de cultivos de líneas celulares y de tejidos tumorales resecados de pacientes con CPNM.

Los objetivos específicos de este estudio son:

1. Clasificar los cultivos obtenidos a partir de muestras de resecciones quirúrgicas de pacientes con CPNM y de líneas celulares de acuerdo al tipo de crecimiento que muestran en condiciones de cultivo en 2D y 3D (tumoresferas)
2. Analizar la expresión relativa de genes implicados en la adhesión celular (*CLDN1, CLDN3, CLDN4, CLDN6, CLDN7, CLDN8, CLDN14, Vcam1, OCLN, JAM1, GJA1, GJB6, EPCAM, CDH1, VIM, ITGA2, ITGA6, ITGB1* y *CTNNB1*) en tumoresferas y en células crecidas en monocapa
3. Estudiar las posibles correlaciones entre la expresión génica relativa de los genes analizados entre sí y en relación con características histológicas y moleculares de los cultivos
4. Evaluar la relación de los niveles de expresión génica de los genes estudiados con la morfología de las tumoresferas obtenidas en cultivos en 3D
5. Integrar los resultados de los genes analizados de manera individual o en combinaciones como biomarcadores específicos de tumoresferas de pulmón

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MUESTRAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO

En este estudio, se utilizaron muestras de tejido tumoral obtenidos a partir de la resección quirúrgica de pacientes con CPNM del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia. Los pacientes que cumplían los criterios de inclusión (estadio I-III A resecables de acuerdo con el sistema de estadificación de *American Joint Committee on Cancer*, no previamente tratados y con un diagnóstico histológico de CPNM) fueron informados e invitados a participar en el estudio, firmando el correspondiente consentimiento aprobado por el CEIC de la institución. Las características demográficas y clinicopatológicas de las muestras de las que fuimos capaces de establecer cultivos primarios se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características clinicopatológicas de los pacientes incluidos en el estudio

Cultivo primario	Edad	Sexo	Estadio	Histología	Hábito tabáquico	Mutaciones	Progresión	Exitus
301	71	Hombre	IIB	SCC	Ex-fumador	TP53 p.Ser261ValfsTer84f; Wt. EGFR, ALK	NO	NO
302	74	Mujer	IIA	ADC	No fumador	KRAS p. G12A; TP53 p.Glu285Lys; Wt. EGFR, ALK, ROS1	NO	Sí
303	57	Hombre	IB	ADC	Fumador	TP53 p.Arg175His; Wt. EGFR, KRAS, ALK, ROS1	Sí	Sí
315	65	Mujer	IA	ADC	No fumador	Wt. EGFR, KRAS, ALK	NO	NO
317	76	Hombre	IIB	SCC	Fumador	Wt. EGFR, KRAS, ALK	NO	Sí
320	65	Hombre	IB	ADC	Fumador	Wt. EGFR, KRAS, ALK	NO	NO
343	60	Mujer	IB	ADC	Ex-fumador	Wt. EGFR, ALK, ROS1	Sí	Sí

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 2.

3.2. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES

El tejido tumoral fresco obtenido de pacientes con CPNM (n=7) sometidos a lobectomía o pneumonectomía 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% DNAsa (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 centrifuga a 290g durante 5 minutos y la suspensión resultante se pasa por dos filtros de 70 μm y 40 μm (BD Falcon, San Jose, USA) y se centrifuga por segunda vez a 200g durante 5 minutos. A continuación, se resuspenden las células en 500 μl de medio libre de suero y 10 ml de tampón de lisis de eritrocitos 10X (eBioscience, San Diego, USA) y se incuban a 37°C durante 20 minutos con agitación intermitente. Tras lisar los eritrocitos, las células se centrifugan a 130 g durante 5 minutos y se evalúa la viabilidad celular con azul de tripano (Gibco, Paisley, UK).

Tabla 2. 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 p.Q61H</i>
H23	Pulmón	51	Mujer	NE	ADC	NE	<i>KRAS p.G12C</i>
H358	Pulmón metastásico	NE	Hombre	IV	ADC	NE	<i>KRAS p.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

Para su amplificación, la mitad de las células vivas se transfieren a frascos de 25 cm^2 y se cultivan 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-estreptomina y 1% de L-glutamina (Gibco, Paisley, UK). Por otro lado, para la formación de esferoides, la otra mitad de células tumorales se crecieron en medio DMEM/F12 libre de suero y suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del factor de crecimiento epidérmico (EGF, Gibco, Paisley, UK), 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF, Gibco, Paisley, UK), insulina-transferrina-selenio (ITS, BD Biosciences), 0,4% albúmina de suero bovino (BSA, Gibco, Paisley, UK) y 2% B27 (Gibco, Paisley, UK). Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos de baja adherencia (Corning, Lowell, MA, USA) a una densidad de 5000 células/ml durante 7-10 días. La expansión de los cultivos se realizó por disociación mecánica, seguida de siembra de células individuales y de pequeños agregados residuales en medio completo fresco. Todas las células cultivadas se mantienen a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5% y se reemplaza el medio de cultivo dos veces por semana.

3.3. CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES

Todas las líneas celulares comerciales se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina y 0,001% de aminoácidos no esenciales (Gibco, Paisley, UK), a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂. A partir de estas líneas celulares se establecieron dos tipos de cultivo diferentes, crecimiento en adherencia y crecimiento en esferoides.

Cuando las células crecidas en monocapa alcanzaron entre el 70-80% de confluencia fueron disgregadas enzimáticamente con 0,5% de Tripsina-EDTA 1X (Gibco, Paisley, UK) y fueron sembradas en frascos de cultivo T75 de baja adherencia (Corning, Lowell, MA, USA) en medio RPMI-1640, libre de suero, suplementado con 50 µg/ml EGF, 20 µg/ml bFGF, ITS, 0,4% BSA y 2% B27 (Gibco, Paisley, UK) para obtener cultivos de tumoresferas. Los cultivos de tumoresferas fueron expandidos mediante la disociación enzimática de los esferoides y la siembra de células individuales y de pequeños agregados residuales en medio completo fresco. Los medios de cultivo fueron reemplazados 2 veces por semana y se comprobó de manera rutinaria que los cultivos eran negativos para la presencia de micoplasma.

3.4. EXTRACCIÓN DE ADN Y ARN

Para el aislamiento del ARN/ADN, se centrifugaron a 1200 rpm las células en monocapa y a 1000 rpm las tumoresferas durante 5 minutos. Los pellets celulares se lavaron con PBS dos veces 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 200 µl de cloroformo a cada pellet 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 pureza y cuantificar los ácidos nucleicos, se utilizó la nanoespectrometría (Nano Drop 2000C, Thermo Fisher Scientific, USA), atendiendo al valor de los ratios $A_{260/280}$ y $A_{260/320}$, que indican la posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas y la presencia de ARN en la muestra, respectivamente.

3.5. 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) y cada reacción contenía 2 µl de tampón de transcripción reversa (RT buffer 10X), 0,8 µl de dNTPs (dNTPs mix 25X), 2 µl de cebadores al azar (Random primer 10X), 1 µl de la retrotranscriptasa Multiscribe™, 1 µl de inhibidor de RNasa y un volumen diferente de ARN dependiendo de la concentración de la muestra (500 µg de ARN por reacción), constituyendo un volumen final de 20 µl con agua libre de nucleasas. En este estudio,

se empleó el termociclador *Mastercycler* (Eppendorf) siguiendo el programa de temperaturas especificado en la Tabla 3. El ADNc resultante se guardó a -80°C hasta su análisis futuro.

Tabla 3. 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

3.6. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (qPCR)

En la PCR cuantitativa a tiempo real se utilizan sondas de hidrólisis marcadas con dos fluorocromos en los extremos (TaqMan®, Applied Biosystems). En su extremo 5' lleva conjugado un fluoróforo que actúa como donador de fluorescencia (reporter) y una molécula aceptora en su extremo 3', que se conoce como non-fluorescent *quencher*, (NFQ), unido al cual está el *Minor Grove Binder* (MGB) el cual incrementa la temperatura de fusión (T_m) sin incrementar la longitud de la sonda. Mientras la sonda mantenga su integridad, al excitar el fluoróforo se producirá un fenómeno conocido como FRET (*Fluorescence-Resonance Energy Transfer*) por el cual la energía emitida por el fluoróforo es absorbida en gran parte por el *quencher*, lo que da lugar a una señal de fluorescencia muy baja en el detector. Cuando durante la reacción de amplificación la polimerasa llega a la región de hibridación de la sonda, la actividad exonucleasa de la polimerasa Taq hidroliza a la misma “rompiéndola” y liberando así al fluoróforo del *quencher*, lo que se traduce en un aumento de la señal de fluorescencia en el detector (Vanguilder, Vrana & Freeman, 2008) (Figura 10).

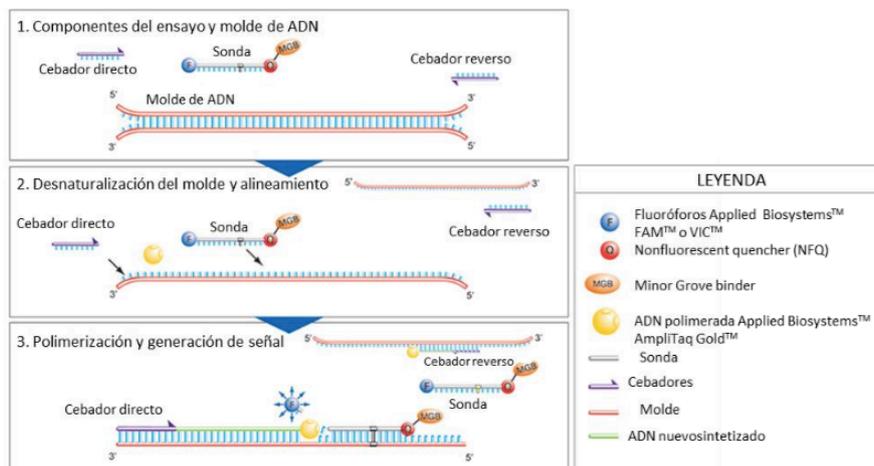


Figura 10. Pasos de la reacción TaqMan® PCR (Life Technologies)

Tras un número determinado de ciclos de amplificación, la señal fluorescente producida por los fluoróforos libres sobrepasará la fluorescencia base que no es más que la fluorescencia debida a todas las moléculas de sonda que llevan unido el fluoróforo al *quencher* (Vanguilder, Vrana & Freeman, 2008). El número de ciclos al que esta señal comienza a aumentar significativamente depende de la cantidad de moléculas diana que se tuvieron de partida y al ciclo en el que se produzca el aumento de señal se le llamará “Ciclo *Threshold*” (Ct). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y la media del valor Ct se usó para el análisis posterior.

En este estudio, se analizaron un total de 19 genes, seleccionados por su implicación en la adhesión celular (Tabla 4). La relevancia de estos genes se estableció de la búsqueda en la base de datos Pubmed, que reveló información del rol de estos genes en la adhesión entre las células tumorales.

Tabla 4. Genes analizados y longitud del amplicon de los Genes TaqMan® Gene Expression Assays utilizados en la qPCR

Gen	Descripción	Código de ensayo	Longitud amplicón
ACTB	Actina beta	Hs99999903_m1	171
CDKN1B	Inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclinas	Hs00153277_m1	71
GUSB	Glucuronidasa beta	Hs015558067_m1	71
CLDN1	Claudina 1	Hs00221623_m1	82
CLDN3	Claudina 3	Hs00265816_s1	51
CLDN4	Claudina 4	Hs00976831_s1	129
CLDN6	Claudina 6	Hs00607528_s1	154
CLDN7	Claudina 7	Hs00600772_m1	80
CLDN8	Claudina 8	Hs04186769_s1	73
CLDN14	Claudina 14	Hs00377953_m1	124
JAM1 (F11R)	Junctional Adhesion Molecule 1	Hs00375889_m1	60
OCLN	Ocludina	Hs00170162_m1	68
GJA1	Gap junction protein alpha 1	Hs00748445_s1	142
GJB6	Gap junction protein beta 6	Hs00917676_m1	102
Vcam1 (CD106)	Molécula de adhesión vascular 1	Hs01003372_m1	62
EpCAM (CD326)	Molécula de adhesión epitelial	Hs00158980_m1	64
VIM	Vimentina	Hs00185584_m1	73
ITGA2	Integrina alfa 2	Hs00158127_m1	67
ITGA6	Integrina alfa 6	Hs01041011_m1	64
ITGB1	Integrina beta 1	Hs00559595_m1	75
CTNNB1	β-catenina	Hs00355049_m1	67
CDH1	Cadherina 1, tipo 1	Hs01023894_m1	61

Cada reacción se realizó por duplicado en placas de 384 pocillos con un volumen final de 5µl: 1 µl de ADNc, 0,25 µl de TaqMan® Gene Expression Assay mix (Applied Biosystems), 2,5 µl del reactivo TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) 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 porque representa un amplio rango de genes. La reacción tuvo lugar en el termociclador Light Cycler 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-glicosasa

El paso a 50°C es necesario para la actividad óptima de la enzima UNG mientras que al aumentar la temperatura a 95°C, se activa la enzima AmpliTaq Gold.

3.7. 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 con 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 *CDKN1B* 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).

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 como 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.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{diana}})^{\Delta C_t(\text{control}-\text{muestra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_t(\text{control}-\text{muestra})}}$$

Ecuación 1. Fórmula Pfaffl para el ratio de la expresión génica relativa. Diana: gen analizado; Ref: gen endógeno de referencia (*housekeeping*); E: Eficiencia del gen; Ct: punto de cruce; ΔCt: Diferencia de expresión entre el control (ADNc) y muestra tumoral.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

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

Dado que las variables analíticas no seguían una distribución normal, las pruebas estadísticas realizadas fueron de tipo no paramétrico. Para cada caso, la expresión génica 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. Además, se utilizó el rango de Spearman's para analizar las correlaciones entre variables continuas de expresión.

Asimismo, para valorar la posible relación entre la expresión génica de los genes analizados y el tipo de esferoide formado en cultivo se utilizaron tablas de contingencia usando como estadístico χ^2 para analizar la dependencia o independencia entre estas dos variables cualitativas, obtenidas a partir de la dicotomización de las variables continuas de expresión según el valor de su mediana. Se tomaron 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.

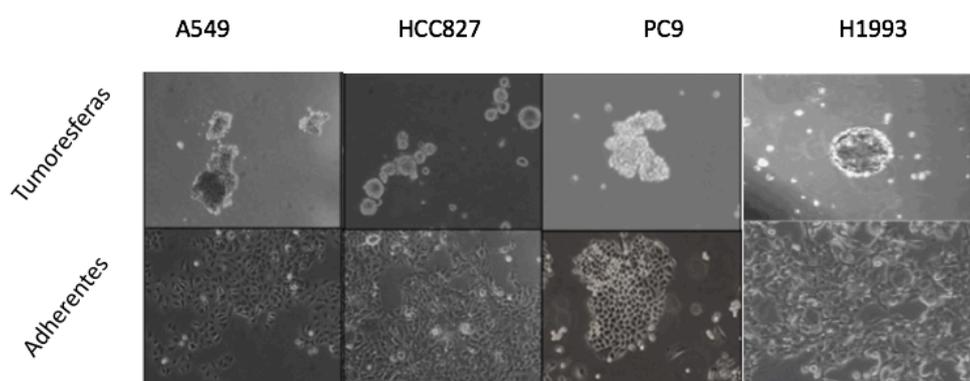
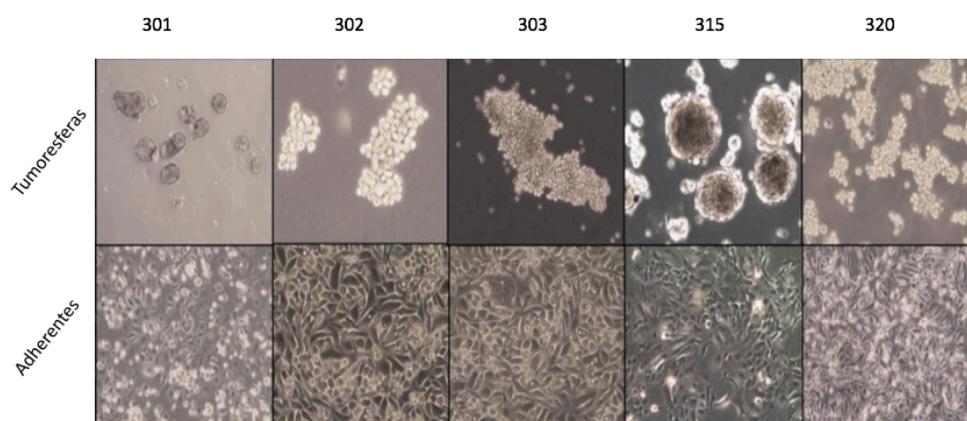
Todos los análisis, se llevaron a cabo utilizando el software de análisis estadístico *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versión 15.0 (Chicago, IL), considerando estadísticamente significativos aquellos análisis donde $p < 0,05$.

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. 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 (Han et al., 2013).

En este estudio se procesaron 15 muestras biológicas procedentes de la resección quirúrgica de pacientes con cáncer de pulmón (lobectomía o pneumonectomías). Solo en 7 muestras (47%) fuimos capaces de establecer cultivos primarios, siendo posible hacerlas crecer 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 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 (etiquetados como 301, 302, 303, 315, 317, 320 y 343) crecidos en monocapa y en esferoides.



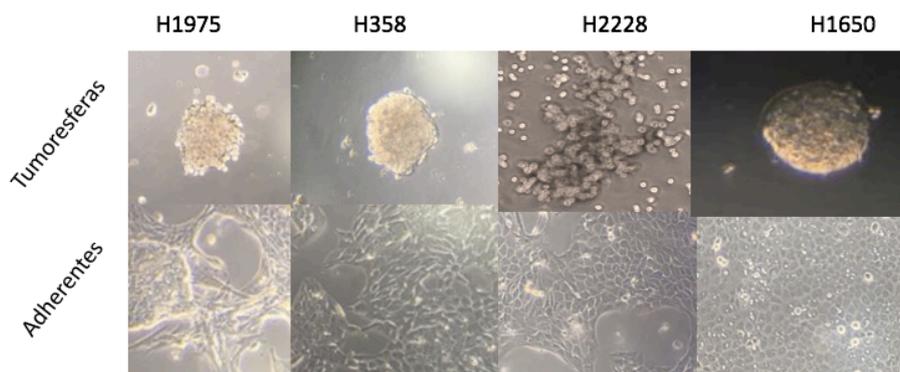


Figura 11. Líneas celulares y cultivos primarios de pacientes con CPNM. Cultivos en adherencia y en esferas

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 pellets celulares se aisló usando el procedimiento estándar basado en trizol (ver apartado materiales y métodos). La concentración y la pureza 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 1117,0 [215,0 – 2681,8] ng/ μ l y 932,13 [133,5 – 2131,2] ng/ μ l para tumoresferas. Con respecto a la calidad del ARN obtenido, las relaciones $A_{260/280}$ y $A_{260/320}$ 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 pellets 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 DE EFICIENCIA DE LAS REACCIONES qPCR

Como se mencionó anteriormente, la eficiencia para cada ensayo TaqMan se evaluó usando el método de la pendiente de los Ct. Se obtuvieron los valores de los Ct para la dilución seriada del gen diana (triplicados en cada dilución). Después, se construyó un gráfico con los valores de los logaritmos de las diluciones en el eje X y los valores de Ct en el eje Y y se calculó la pendiente de la recta de regresión que unía dichos puntos, que debería estar cerca de -3,33, valor que representa un 100% de eficiencia de amplificación (Figura 12). Los valores de las pendientes y la eficiencia para todos los genes incluidos en el análisis de expresión oscilaron entre -3,803 y -3,03 y 1,832 y 2,008, respectivamente.

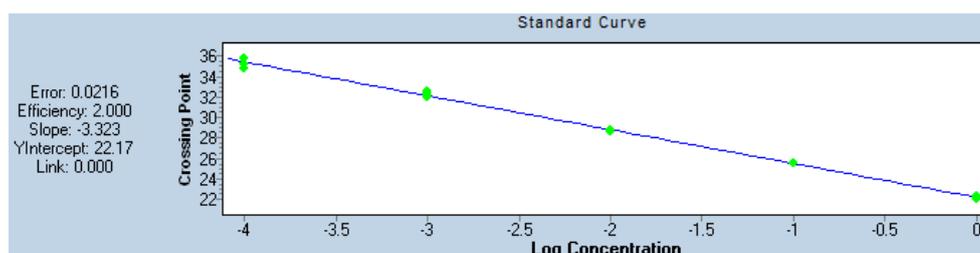


Figura 12. Representación gráfica del cálculo de eficiencias para el gen JAM1

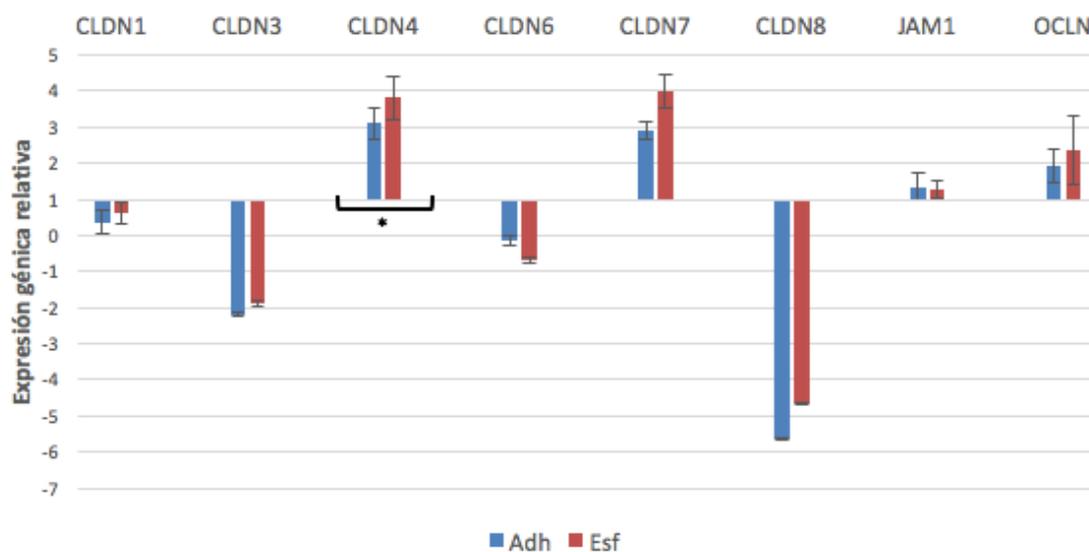
4.4 ANÁLISIS RELATIVO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

En este estudio, analizamos 19 genes relacionados con la adhesión celular de las CSC: moléculas implicadas en las uniones estrechas como son las claudinas [*CLDN1*, *CLDN3*, *CLDN4*, *CLDN6*, *CLDN7*, *CLDN8*, *CLDN14*], ocludinas [*OCLN*] o moléculas de la familia JAM [*JAM1*]; moléculas relacionadas con el proceso metastásico [*CDH1*, *Vcam1*, *EpCAM* y *VIM*]; proteínas formadoras de las uniones GAP [*GJA1* y *GJB6*]; integrinas como constituyentes de las adhesiones focales y hemidesmosomas [*ITGA2*, *ITGA6*, *ITGB1*] y un gen involucrado en la ruta de señalización Wnt [*CTNNB1*].

Para establecer los controles internos más estables utilizamos el software GeNorm, el cual indicó que la mejor combinación de controles endógenos era *ACTB*, *GUSB* y *CDKN1B*. Siguiendo el procedimiento propuesto por Vandesompele y colaboradores, 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 estudiados se presentan y se discuten a continuación. Los valores de expresión se normalizan con el ADNc comercial de referencia.

4.4.1 Comparación de la expresión génica relativa entre cultivos 2D y 3D

Los resultados de la expresión génica relativa para los genes analizados se muestran en la Figura 13, comparando las dos condiciones de cultivo: células en adherencia (ADH) y esferoides (ESF).



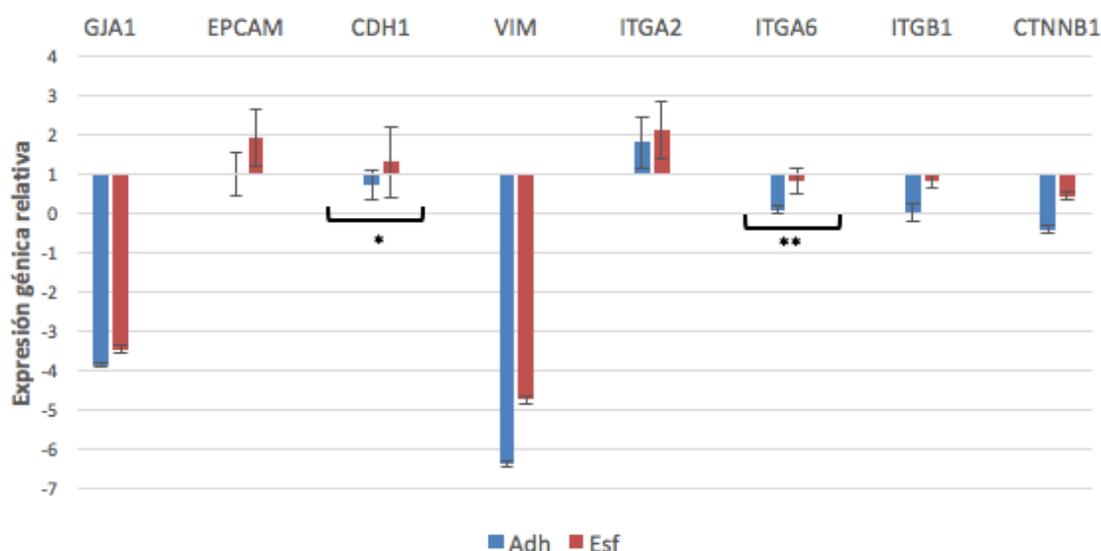


Figura 13. Expresión relativa a nivel de ARNm de genes implicados en la adhesión celular en células cultivadas en adherencia y en tumoresferas. Las barras representan la mediana \pm intervalo intercuartílico. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

En términos generales, destacar que los niveles de expresión de los genes estudiados resultaron más altos en los cultivos tridimensionales que en las células crecidas en adherencia, siendo estas diferencias entre ambas condiciones estadísticamente significativas (test de Wilcoxon) en el caso de los genes *CLDN4* ($p=0,05$), *CDH1* ($p=0,049$) y *ITGA6* ($p=0,002$).

En comparación con el ADNc de referencia, los genes *CLDN4*, *CLDN7*, *JAM1*, *OCNL*, *EPCAM* y *ITGA2* mostraron sobreexpresión, tanto en células dependientes de anclaje como en tumoresferas, mientras que los genes *CLDN1*, *CLDN3*, *CLDN6*, *CLDN8*, *GJA1*, *VIM*, *ITGA6*, *ITGB1* y *CTNNB1* se expresaron en menor medida, también en ambas condiciones de cultivo. Sin embargo, el gen *CDH1* mostró una mayor expresión en los esferoides, pero una expresión menor en adherencia, en relación al ADNc.

En relación a las claudinas analizadas en los cultivos celulares, el gen más sobreexpresado fue *CLDN7*, lo que concuerda con estudios presentados previamente (Schmidt et al., 2016; Soini, 2012). Otro gen cuya expresión se vio aumentada respecto al ADNc de referencia fue el *CLDN4*, lo que se asocia con una mayor motilidad celular e invasión tumoral, además de un incremento en la expresión de metaloproteasas de la matriz, como *MMP2* y *MMP9* (Tabariès & Siegel, 2016; Yamada et al., 2016). Por el contrario, el resto de claudinas analizadas (*CLDN1*, *CLDN3*, *CLDN6* y *CLDN8*) redujeron su nivel de expresión en relación al ADNc de referencia. En el caso del gen *CLDN6*, la expresión génica disminuida se ha correlacionado con un mal pronóstico en pacientes de cáncer de pulmón no microcítico al aumentar las propiedades invasivas del tumor debido al aumento de la actividad de las metaloproteasas (Tabariès & Siegel, 2016). La Claudina 1 fue otra molécula expresada en bajos niveles respecto al control. Sin embargo, lo que se ha descrito ha sido su sobreexpresión y se ha relacionado con un mal pronóstico de los pacientes al promover la resistencia a la quimioterapia basada en cisplatino en células de CPNM (Zhao et al., 2017).

Asimismo, las otras dos moléculas constituyentes de las uniones estrechas (*OCN1* y *JAM1*) mostraron una expresión aumentada respecto al control. Sin embargo, en la literatura está descrito que para las ocludinas lo que se observa principalmente es una infraexpresión relacionada con el inicio de la transición epitelio-mesenquimal (Martin, Mansel & Jiang, 2010). Por otra parte, en otra publicación se concluyó que la expresión de ocludinas solo se podía detectar en adenocarcinomas y no en carcinomas de células escamosas, o en todo caso en bajos niveles, ya que las uniones adherentes no se forman en este último subtipo histológico de cáncer de pulmón (Soini, 2012). En cuanto al gen *JAM1*, la expresión aumentada concuerda con lo publicado en la literatura (Martin, Mansel & Jiang, 2010), añadiendo además que esta desregulación a la baja se relaciona con un aumento de la invasión y el potencial metastásico de las células tumorales (Magara et al., 2017; Soini, 2012).

Otra familia de moléculas de adhesión celular estudiadas fue la de las uniones GAP, en concreto los genes *GJA1* y *GJB6*, que codifican para la conexina 43 y 30, respectivamente, aunque este último gen no se expresó en nuestras muestras. La reducción de la expresión de Cx43 ya se había descrito tanto en modelos *in vivo* de ratón (Ogawa et al., 2012) como *in vitro* en muestras derivadas de pacientes, y en este caso la baja expresión se observó en pacientes varones de CPNM, fumadores, con tumores pobremente diferenciados y con estadios avanzados de la patología (Jinn & Inase, 2010). Este nivel de expresión del gen *GJA1* por debajo del nivel del control se asoció con un mayor potencial metastásico ya que se considera un gen supresor de tumores (Aasen et al., 2016) por lo que su infraexpresión alteraría esta función y otras como la apoptosis y la sensibilización de células tumorales de CPNM a la radiación ionizante y la quimioterapia basada en cisplatino (Yu et al., 2014).

En cuanto a los genes relacionados con el proceso metastásico, *CDH1* y *EPCAM* se expresaron en mayor medida respecto al control, mientras que *VIM* mostró una notable reducción en los niveles de expresión en relación al ADNc de referencia. *EPCAM* es un biomarcador asociado a células madre tumorales en diferentes tumores sólidos y su expresión se ha descrito como aumentada en un gran número de tumores (Schnell, Cirulli & Giepmans, 2013). Esta sobreexpresión correlaciona generalmente con un mal pronóstico (Patriarca et al., 2012) y su valor pronóstico se ha estudiado conjuntamente con la expresión de E-cadherina y Claudina 7 y se ha visto que comparado con *CDH1*, *EPCAM* es una molécula de adhesión débil por lo que une a las células de manera laxa, mientras que las células que expresan E-cadherina tienden a formar agregados mucho más compactos (Schnell, Cirulli & Giepmans, 2013). Igualmente, la expresión de *CDH1* se ha asociado con la fuerza de la adhesión entre CSCs y su nicho, lo que a su vez determina el potencial de autorenovación a largo plazo de las células madre tumorales, ya que una elevada expresión de este gen puede retardar la pérdida dependiente de la edad de CSCs (Chen & Mellman, 2013). En lo referente a la expresión de *VIM*, está descrito que las células que sufren la transición epitelio-mesenquimal se caracterizan por una disminución en la expresión de *CDH1*, mientras que los niveles de *VIM* se ven aumentados (Zhang et al. 2015). Sin embargo, Yakisich et al. describieron una reducción en la expresión de esta proteína en CSCs, lo que concuerda con nuestros resultados (Yakisich et al., 2016). La implicación de este gen en la metástasis se confirmó tanto *in vitro* (Liu et al., 2015) como también *in vivo* en un modelo animal con la línea celular de pulmón H460 (Havel et al., 2015).

Como se ha comentado previamente, las integrinas son constituyentes de las adhesiones focales y hemidesmosomas (*ITGA2*, *ITGA6* y *ITGB1*) y juegan un papel importante en la adhesión de las CSCs con su nicho. La integrina $\alpha 2$ fue la única sobreexpresada, mientras que las integrinas $\alpha 6$ y $\beta 1$ redujeron su nivel expresión respecto al control. En cuanto al gen *ITGB1*, se han publicado resultados contradictorios, siendo lo más frecuente obtener una sobreexpresión de este gen tanto en tejido pulmonar normal como tumoral (Zhang et al., 2014), lo que se asocia con una supervivencia global y libre de enfermedad menor, aunque no se ha visto una relación entre la expresión de esta integrina y la presencia de metástasis. En cambio, la expresión de las integrinas $\alpha 2$ y $\alpha 6$ sí que se ha descrito como baja, lo que concuerda con los resultados de este trabajo (Dingemans et al., 2010). Wang y colaboradores demostraron la eficacia del fármaco Shikonin para atenuar la adhesión de la línea celular de adenocarcinoma A549 a la matriz extracelular debido a su mecanismo de acción como inhibidor de la expresión de *ITGB1* (Wang et al., 2013).

Por último, se estudió un gen involucrado en la ruta de señalización Wnt (*CTNNB1*), resultando estar infraexpresado respecto al ADNc de referencia en ambas condiciones de cultivo. En estudios previos se demostró que el silenciamiento de este gen inhibe el potencial metastásico en xenoinjertos de cáncer de pulmón (Chen, Muñoz & Cress, 2014) y que, en cambio, la expresión aumentada de este gen se asocia con la aparición de resistencias a fármacos quimioterapéuticos (Zhang et al., 2016). Por el contrario, se ha sugerido que la expresión reducida de β -catenina indica un mal pronóstico de los pacientes de CPNM (Guldur et al., 2010).

De todos los genes analizados, no se observó expresión de los genes *CLDN14*, *Vcam1* y *GJB6*, genes cuyos valores de expresión estuvieron por debajo del límite de detección. La claudina 14 es una molécula de adhesión expresada en el epitelio sensorial del órgano de Corti y en la rama gruesa ascendente de Henle de la nefrona (Negri, 2015), lo que podría ser la razón por la cual no se ha observado expresión de este gen en el tejido pulmonar. En cuanto a la no detección de la expresión de *Vcam1*, es cierto que se están llevando a cabo estudios para establecer el rol de este gen en varios tipos de cáncer, pero poco se ha publicado sobre la expresión de *Vcam1* en cáncer de pulmón. En los pocos estudios realizados hasta la fecha en este tipo de tumores, se ha analizado la expresión génica a nivel de tejido, por lo que sería conveniente realizarlo en fluidos biológicos como suero sanguíneo (Tas, Karabulut & Bilgin, 2014). Por último, en cuanto al gen *GJB6* que codifica para la conexina 30, se ha visto que en condiciones fisiológicas se expresa en altos niveles en cerebro y médula espinal mientras que, en órganos como el pulmón o riñón, la expresión es muy baja o inexistente (Sentani et al., 2010). En otras publicaciones, se ha asociado este gen con el cáncer gástrico y de mama (Aasen et al., 2016), pero la función que esta molécula de adhesión celular tiene en el cáncer de pulmón aún no está definida (Sentani et al., 2010).

4.4.2 Análisis de correlaciones entre genes

En la Tabla 6 se describen los resultados de las correlaciones entre los genes analizados obtenidos mediante el test estadístico de Spearman y considerando los valores de $p < 0,05$ como significativamente estadísticos.

Tabla 6. Resultados de las correlaciones analizadas entre los genes implicados en la adhesión celular de células madre tumorales crecidas en forma de tumoresferas

		CLDN1	CLDN3	CLDN4	CLDN6	CLDN7	CLDN8	JAM1	OCLN
CLDN1	p value	.	0,571	0,576	0,087	0,909	0,355	0,280	0,336
CLDN3	p value	0,571	.	0,001 (**)	0,204	0,067	0,770	0,022 (*)	0,023 (*)
CLDN4	p value	0,576	0,001 (**)	.	0,060	0,006 (**)	0,063	0,000 (**)	0,001 (**)
CLDN6	p value	0,087	0,204	0,060	.	0,014 (*)	0,193	0,043 (*)	0,014 (*)
CLDN7	p value	0,909	0,067	0,006 (**)	0,014 (*)	.	0,081	0,009 (**)	<0,001 (**)
CLDN8	p value	0,355	0,770	0,063	0,193	0,081	.	0,077	0,311
JAM1	p value	0,280	0,02 (*)	<0,001 (**)	0,043 (*)	0,009 (**)	0,077	.	<0,001 (**)
OCLN	p value	0,336	0,02 (*)	<0,001 (**)	0,014 (*)	<0,001 (**)	0,311	<0,001 (**)	.
GJA1	p value	0,538	0,008 (**)	0,034 (*)	0,027 (*)	0,007 (**)	0,533	0,099	0,039 (*)
EPCAM	p value	0,557	0,093	0,027 (*)	0,029 (*)	<0,001 (**)	0,363	0,043 (*)	0,005 (**)
CDH1	p value	0,977	0,433	0,001 (**)	0,464	0,005 (**)	0,193	0,001 (**)	0,04 (*)
VIM	p value	0,446	0,673	0,379	0,067	0,001 (**)	0,533	0,126	0,008 (**)
ITGA2	p value	0,198	0,196	0,175	0,061	0,057	0,949	0,093	0,037 (*)
ITGA6	p value	0,126	0,178	0,679	0,024 (*)	0,505	0,875	0,732	0,270
ITGB1	p value	0,336	0,209	0,004 (**)	0,003 (**)	0,001 (**)	0,001 (**)	0,002 (**)	0,001 (**)
CTNNB1	p value	0,152	0,158	0,001 (**)	0,077	0,156	0,408	0,014 (*)	0,067

		GJA1	EPCAM	CDH1	VIM	ITGA2	ITGA6	ITGB1	CTNNB1
CLDN1	p value	0,538	0,557	0,977	0,446	0,198	0,126	0,336	0,152
CLDN3	p value	0,008 (**)	0,093	0,433	0,673	0,196	0,178	0,209	0,158
CLDN4	p value	0,034 (*)	0,027 (*)	0,001 (**)	0,379	0,175	0,679	0,004 (**)	0,001 (**)
CLDN6	p value	0,027 (*)	0,029 (*)	0,464	0,067	0,061	0,024 (*)	0,003 (**)	0,077
CLDN7	p value	0,007 (**)	<0,001 (**)	0,005 (**)	0,001 (**)	0,057	0,505	0,001 (**)	0,156
CLDN8	p value	0,533	0,363	0,193	0,533	0,949	0,875	0,001 (**)	0,408
JAM1	p value	0,099	0,043 (*)	0,001 (**)	0,126	0,093	0,732	0,002 (**)	0,014 (*)
OCLN	p value	0,039 (*)	0,005 (**)	0,04 (*)	0,008 (**)	0,008 (**)	0,270	0,001 (**)	0,067
GJA1	p value	.	0,012 (*)	0,260	0,141	0,977	0,581	0,075	0,043 (*)
EPCAM	p value	0,012 (*)	.	0,005 (**)	<0,001 (**)	0,015 (*)	0,363	0,008 (**)	0,047 (*)
CDH1	p value	0,260	0,005 (**)	.	0,084	0,196	0,175	0,049 (*)	0,008 (**)
VIM	p value	0,141	<0,001 (**)	0,084	.	0,006 (**)	0,351	0,027 (*)	0,391
ITGA2	p value	0,977	0,015 (*)	0,196	0,006 (**)	.	0,03 (*)	0,201	0,424
ITGA6	p value	0,581	0,363	0,175	0,351	0,03 (*)	.	0,468	0,949
ITGB1	p value	0,075	0,008 (**)	0,049 (*)	0,027 (*)	0,201	0,468	.	0,175
CTNNB1	p value	0,043 (*)	0,047 (*)	0,008 (**)	0,391	0,424	0,949	0,175	.

(*) p < 0,05; (**) p < 0,01

De la Tabla 6 se puede afirmar que existen numerosas correlaciones entre los genes analizados, como por ejemplo *CLDN3-CLDN4* (p=0,001), *CLDN4-JAM1* (p<0,001), *CLDN6-OCLN* (p=0,014), *CLDN7-EPCAM* (p<0,001), *VIM-EPCAM* (p=0,012), *ITGA2-ITGA6* (p=0,03) o *CTNNB1-CDH1* (p=0,008).

En el caso de la asociación entre la expresión de las claudinas 3 y 4 ya se había descrito previamente (Moldvay et al., 2016), así como la correlación entre el nivel de expresión de *CLDN3* y *CDH1* y *VIM* y *CTNNB1* (Che et al., 2015), aunque en nuestro caso la claudina vinculada con la expresión de *CDH1* y *CTNNB1* fue *CLDN4* con una significancia estadística de p=0,001 en ambos casos, lo que podría evidenciar la implicación de esta molécula de adhesión en la transición epitelio-mesenquimal. Asimismo, se estableció una relación entre la expresión génica de *VIM* y *EPCAM*, ambos involucrados en la transición epitelio-mesenquimal (Giarnieri et al., 2013).

Por otra parte, se evidenció una correlación estadísticamente significativa entre los genes *CDH1* y *CTNNB1*, señalada ya en otras publicaciones anteriores (Busch et al., 2017). La E-cadherina se une a la β -catenina para mejorar la adhesión célula-célula, por lo que cambios en la expresión de ambos genes se correlacionan con la invasión tumoral y metástasis (Che et al., 2015). La β -catenina se encuentra en dos complejos moleculares, que corresponden a las dos

funciones que cumple: el primero corresponde a β -catenina como parte de complejos de alto peso molecular implicados en la adhesión celular mediada por E-cadherina (Figura 14); en la segunda función, β -catenina, se encuentra en estado monomérico participando en la señalización de la vía Wnt/ β -catenina. La coordinación de estas dos vías está implicada en procesos de patogénesis como la carcinogénesis (Camilli & Weeraratna, 2013; Mantilla et al., 2015).

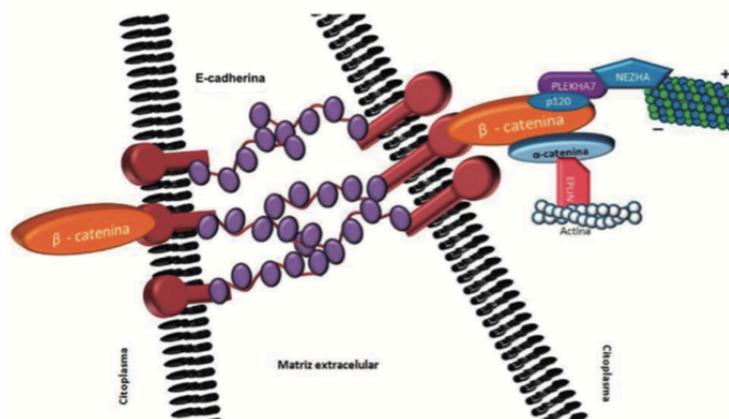


Figura 14. Representación de las proteínas que participan en la unión célula-célula mediada por cadherinas. Esta unión es mediada por la interacción de β -catenina con el dominio citoplasmático de E-cadherina, por un lado, y con α -catenina por el otro; α -catenina, a su vez, interactúa con los filamentos de actina (Mantilla et al., 2015)

En cuanto a las integrinas, nuestros análisis estadísticos señalaron una correlación entre la expresión de *ITGA2* e *ITGA6* ($p=0,03$), aunque las asociaciones descritas en la literatura entre las moléculas de integrinas son *ITGA2-ITGB1* (Li et al., 2013), genes que se han asociado con la cascada de señalización EGF/EGFR, ya que se ha descrito que la expresión de *ITGA2* e *ITGB1* es activada por EGF (Figura 15). A su vez, la sobreexpresión de la integrina beta1 inhibe la proliferación celular mediante la activación del inhibidor de ciclinas dependiente de quinasas p21 (Guillén et al., 2013).

Cabe añadir que se ha descrito una asociación entre la expresión de *CLDN3* y E-cadherina, pero una correlación negativa con β -catenina y vimentina (Che et al., 2018). En nuestro estudio, de la Figura 16, se puede concluir que la Claudina 3 se correlaciona positivamente con *ITGA6* y *EPCAM*, pero muestra una asociación negativa con *CDH1* y *GJA1*. Por otra parte, Soini publicó que la sobreexpresión de la Claudina 1 conducía a una expresión aumentada del gen *OCLN*, lo que a su vez se relacionaba con un fenotipo menos invasivo (Soini et al., 2012). De acuerdo a nuestros resultados, el gen *OCLN* se correlacionaría con los genes *CLDN6* o *ITGA2*.

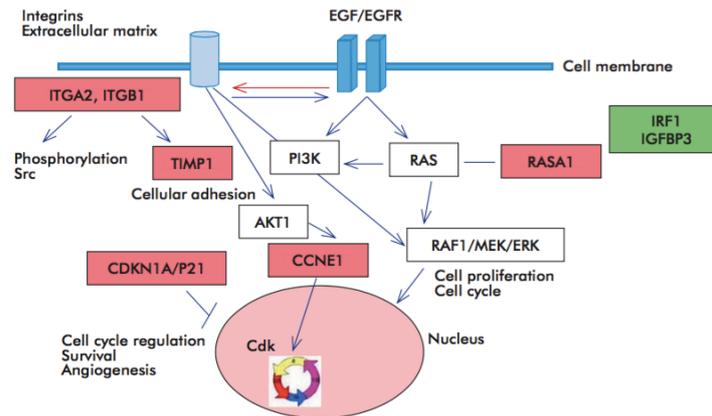


Figura 15. Representación esquemática de las vías de señalización activadas por EGF. El color rojo indica sobreexpresión, mientras que en verde se señalan genes cuya expresión ha sido inhibida (Guillén et al., 2013)

En general, los resultados evidenciaron una relación entre los genes, lo que confirma la implicación de estas moléculas en una misma función: la adhesión celular. También, las correlaciones entre los niveles de expresión concuerdan con la división en 3 grupos de los genes analizados: moléculas de adhesiones focales y hemidesmosomas (*ITGA2*, *ITGA6* e *ITGB1*), moléculas de uniones adherentes y GAP (claudinas, *OCLN*, *GJA1* y *JAM1*) y genes implicados en el proceso metastásico (*CDH1*, *VIM*, *EPCAM* y *CTNNB1*).

4.4.3 Comparación de la expresión génica relativa entre tumoresferas compactas y agregados

Los resultados de la expresión génica relativa para los genes analizados se muestran en la Figura 16, comparando los dos tipos de esferoides formados en el cultivo de células tumorales: tumoresferas compactas (Esf) y agregados (Agg).

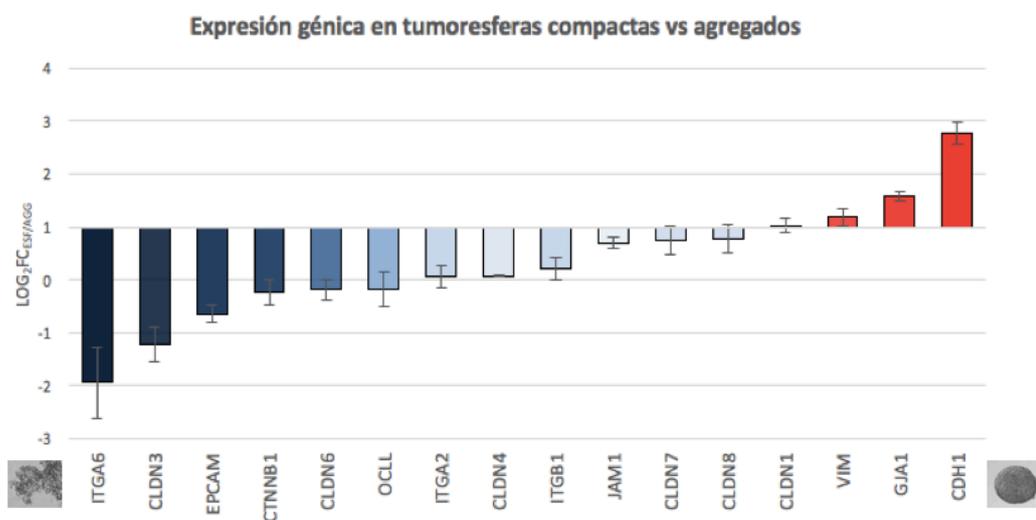


Figura 16. Expresión relativa a nivel de ARNm de genes implicados en la adhesión celular en tumoresferas compactas y agregados. Las barras representan la mediana \pm intervalo intercuartílico.

En la figura 16, se observan 3 genes (*CDH1*, *GJA1* y *VIM*) cuyos niveles de expresión son mayores en los esferoides compactos que en los agregados, resultando la expresión del resto de genes asociada a la formación de agregados laxos de células tumorales.

La morfología y el tamaño de los esferoides formados en el contexto tumoral se ha relacionado con la expresión de ciertos genes, principalmente E-cadherina. En este sentido, la sobreexpresión de *CDH1* en cultivos en monocapa se vio que inducía la formación de tumoresferas compactas mientras que la expresión reducida de este gen en cultivos 2D conducía a la producción de agregados laxos de células, que a su vez disminuían la expresión de E-cadherina (Schmidt et al., 2016; Stadler et al., 2018). De acuerdo a los resultados presentados en la Figura 16, la expresión aumentada de *CDH1* también se correlaciona con la formación de tumoresferas compactas en nuestras muestras del estudio. Por otra parte, de acuerdo a nuestros análisis, sería la expresión de *ITGA6* y *CLDN3* lo que caracterizaría a los agregados de CSCs. Fukamachi y colaboradores demostraron que las células que expresaban la integrina 6 en bajos niveles no eran capaces de formar tumoresferas al cultivarlas (Fukamachi et al., 2013). Asimismo, Liu *et al.* concluyeron que la expresión de *ITGA6* era necesaria para la formación de esferoides a partir de células derivadas de una línea celular de adenocarcinoma de próstata canino (Liu et al., 2015).

4.4.4 Análisis de genes cuya expresión alterada caracterizan el tipo de esferoide formado

Por último, se estudió la posible asociación entre la expresión génica de los genes analizados y el tipo de esferoide formado en cultivo. A continuación, se incluyen las tablas de contingencia (Tablas 7a, 7b y 7c) que se utilizaron para analizar la dependencia o independencia entre estas dos variables analíticas.

Tabla 7. Tablas de contingencia que analizan la correlación entre la variable tipo de esferoide y la variable expresión génica dicotomizada para distintos genes: (a) *CDH1*, (b) *CDH1* y *GJA1* y (c) *CDH1* e *ITGA6*

	<i>CDH1</i> ^{high}		TOTAL
	0 (NO)	1 (SÍ)	
Esferoide	2	7	9
Agregado	8	2	10
TOTAL	10	9	19

	<i>CDH1</i> ^{high} <i>GJA1</i> ^{high}		TOTAL
	0 (NO)	1 (SÍ)	
Esferoide	5	4	9
Agregado	10	0	10
TOTAL	15	4	19

	<i>CDH1</i> ^{high} <i>ITGA6</i> ^{low}		TOTAL
	0 (NO)	1 (SÍ)	
Esferoide	4	5	9
Agregado	10	0	10
TOTAL	14	5	19

Tras construir las tablas de contingencia en las que se comparaba el tipo de esferoide obtenido en cultivos 3D con la infra o sobreexpresión de ciertos genes y calcular el estadístico χ^2 , se concluyó que los análisis eran estadísticamente significativos por tener un p valor inferior a 0,05 ($CDH1^{high}$, $p=0,012$; $CDH1^{high} GJA1^{high}$, $p=0,018$ y $CDH1^{high} ITGA6^{low}$, $p=0,006$). Por lo tanto, se confirmó en nuestras muestras la relación entre la sobreexpresión de E-cadherina con la obtención de tumoresferas compactas, tal y como queda descrito en la literatura (ver apartado 4.4.3), pero, además, observamos otras dos relaciones entre la expresión génica y el tipo de esferoide formado. Por una parte, la sobreexpresión de $CDH1$ junto a la de $GJA1$ se evidenció en 4 de nuestras muestras (4/19), todas de ellas pertenecientes a la categoría esferoide compacto. Por otra parte, se estudió la variable conjunta $CDH1^{high} ITGA6^{low}$, siendo positiva en 5 de nuestras muestras (5/19), las cuales formaron tumoresferas compactas al cultivarlas.

Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de $CDH1$ y $GJA1$ tiene una clara correlación con la formación de esferas compactas de CSCs, se podría proponer la desregulación de su expresión como opción terapéutica para el tratamiento del CPNM. En primer lugar, dado que las modificaciones epigenéticas se han asociado con la expresión de $CDH1$ y que dichas modificaciones son reversibles, se ha propuesto el fármaco 5-aza-2'-deoxycytidine como opción para retrasar el proceso carcinogénico (Yu et al., 2015). Asimismo, se demostró la eficacia del factor de transcripción Trim28 como gen supresor de tumores al alterar las modificaciones post-traduccionales de la E-cadherina (Chen, Muñoz & Cress, 2014). Otra propuesta encontrada en la literatura es el tratamiento con el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) que recluta a LEF-1 y Slug que son represores transcripcionales de $CDH1$ (Kim et al., 2014). Por otra parte, se han testado dos compuestos para inhibir la actividad de las uniones tipo GAP. La oleamida es un inhibidor que se ha estudiado en una línea celular de cáncer de mama *in vitro* y en un modelo murino *in vivo* y, aunque su mecanismo de acción no se ha elucidado todavía, se ha observado una reducción en la proliferación, migración e invasión de las células tumorales (Ogawa et al., 2012). La carbenoxolona es un fármaco antiinflamatorio que ha demostrado ser eficaz también la supresión de las uniones tipo GAP. Se piensa que este compuesto aumenta la producción de ROS, lo que a su vez induce la fosforilación de la conexina 43 (codificada por $GJA1$) y como consecuencia, se inhibe la actividad de los canales GAP (Yulyana et al., 2013).

En resumen, este ha sido el primer estudio realizado sobre la relación de la expresión de genes involucrados en la adhesión celular y la morfología de las esferas de CSCs de pulmón tanto de líneas celulares de CPNM como de cultivos primarios de pacientes con CPNM en estadios resecables, dando como principal resultado la vinculación entre la sobreexpresión de E-cadherina y Conexina 43 y la formación de tumoresferas compactas en cultivos en 3D. Asimismo, se propone la modulación de la expresión de los genes involucrados en la adhesión celular que condicionan la morfología de los esferoides de CSCs ($CDH1$, $ITGA6$ y $GJA1$) como una opción terapéutica para tratar a los pacientes con CPNM.

5. CONCLUSIONES

1. El cultivo *in vitro* en condiciones no adherentes y con un medio libre de suero resulta un método satisfactorio para el aislamiento y enriquecimiento de CSCs, permitiendo obtener tumoresferas a partir de líneas celulares de cáncer de pulmón y de pacientes con CPNM en estadíos resecales.
2. Los esferoides son modelos *in vitro* apropiados para el análisis de células madre tumorales, que permiten el aislamiento de ARN de buena calidad para posteriormente realizar un estudio del perfil de expresión génica.
3. La caracterización de las oncoesferas derivadas de las muestras de cáncer de pulmón no microcítico reveló una sobreexpresión significativa de *CLDN4*, *CDH1* y *ITGA6* en estas células en comparación a los cultivos en 2D correspondientes.
4. El estudio de las posibles correlaciones entre los genes mostró un patrón de coexpresión entre la mayoría de ellos ya que están implicados en el mismo proceso de adhesión celular, siendo estas correlaciones estadísticamente significativas entre *CLDN3-CLDN4*, *CDH1-CTNNB1* o *VIM-EPCAM*.
5. El análisis por qPCR demostró también que la sobreexpresión de E-cadherina y Conexina 43 se relaciona con la formación de tumoresferas compactas, mientras que la expresión aumentada de la integrina $\beta 6$ se asocia con la obtención de agregados laxos de CSCs. Estas correlaciones se validaron en las muestras de pacientes y líneas celulares de CPNM con el test estadístico χ^2 .

6. REFERENCIAS

- AASEN, T.; MESNIL, M.; NAUS, C.C.; LAMPE, P.D. & LAIRD, D.W. (2016) Gap Junctions and Cancer: Communicating for 50 Years. *Nat Rev Cancer*, 16(12), p. 775–788.
- ASOCIACIÓN ESPAÑOLA CONTRA EL CÁNCER, AECC (2018) Evolución del cáncer de pulmón. (Consultado 3 mayo 2018). Disponible en: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-pulmon/evolucion-cancer-pulmon>
- BARCZYK, M.; CARRACEDO, S. & GULLBERG, D. (2010) Integrins. *Cell Tissue Res*. 339, p. 269-280.
- BIGELOW, K. & NGUYEN, T. (2014) Increase of gap junction activities in SW480 human colorectal cancer cells. *BMC Cancer*, 14, p. 502.
- BUSCH, E. L.; HORNICK, J.L.; UMETON, R.; ALBAYRAK, A... REBBECK, T.R. (2017) Somatic mutations in *CDH1* and *CTNNB1* in primary carcinomas at 13 anatomic sites. *Oncotarget*, 8 (49), p. 85680-85691.
- CAMILLI, T.C. & WEERARATNA, A.T. (2013) Striking the target in Wnt-γ conditions: intervening in Wnt signaling during cancer progression. *Biochem Pharmacol*, 80(5), p. 702-11.
- CHAO, Y. L. & PECOT, C. V. (2018) Immunotherapy combinations emerging in non-small-cell lung cancer. *Immunotherapy*, 10(8), p. 627–629.
- CHE, J.; YANG, Y.; XIAO, J.; ZHAO, P...CAO, B. (2015) Decreased expression of claudin-3 is associated with a poor prognosis and EMT in completely resected squamous cell lung carcinoma. *Tumor Biol*.
- CHE, J.; YUE, D.; ZHANG, B.; ZHANG, H.; HUO, Y...CAO, B. (2018) Claudin-3 Inhibits Lung Squamous Cell Carcinoma Cell Epithelial-mesenchymal Transition and Invasion via Suppression of the Wnt/β-catenin Signaling Pathway. *Int. J. Med. Sci.*,15, p. 339-351.
- CHEN, D. S. & MELLMAN, I. (2013) Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity*, 39(1), p. 1–10.
- CHEN, L.; MUÑOZ, T. & CRESS D.C. (2014) Trim28 Contributes to EMT via Regulation of E-Cadherin and N-Cadherin in Lung Cancer Cell Lines. *PLOS ONE*, 9(7).
- CUARON, J.; DUNPHY, M. & RIMNER, A. (2012) Role of FDG-PET scans in staging, response assessment, and follow-up care for non-small cell lung cancer. *Front Oncol*. 2, 208.
- DE GROOT, P. & MUNDEN, R. F. (2012) Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Radiologic Clinics of North America*, 50(5), p. 863–876.
- DINGEMANS, A.M.; VAN DEN BOOGAART, V.; VOSSE, B.A.; VAN SUYLEN, R...THIJSSEN, V.L. (2010) Integrin expression profiling identifies integrin alpha5 and beta1 as prognostic factors in early stage non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer*, 9, p. 152.
- FARAHANI, E.; PATRA, H.K.; JANGAMREDDY, J.R.; RASHEDI, I...WIECHEC, E. (2014) Cell adhesion molecules and their relation to (cancer) cell stemness. *Carcinogenesis*, 35(4), p.747–759.
- FONG, D.; SEEGER, A.; TERRACCIANO, L.; KASAL, A...SPIZZO, G. (2014) Expression of EpCAM^{MF} and EpCAM^{MT} variants in human carcinomas. *J Clin Pathol*, 67, p. 408–414.
- FUJIMOTO, J. & WISTUBA, I. (2014) Current Concepts on the Molecular Pathology of Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *Semin Diagn Pathol*, 31(4), p. 306–313.

- FUKAMACHI, H.; SEOL, H.S.; SHIMADA, S.; FUNASAKA, C....YUASA, Y. (2013) CD49^{high} Cells Retain Sphere-Forming and Tumor- Initiating Activities in Human Gastric Tumors. *PLOS ONE*, 8(8).
- GIARNIERI, E.; DE VITIS, C.; NOTO, A.; ROSCILLI, G....MANCINI, R. (2013) EMT markers in lung adenocarcinoma pleural effusion spheroid cells. *Journal of Cellular Physiology*.
- GOLDSTRAW, P.; BALL, D.; JETT, J.R.; LIM, E....SHEPHERD, F.A. (2011) Non- small-cell lung cancer. *The Lancet*, 378(9804), p.1727–1740.
- GOTTSCHLING, S.; SCHNABEL, P.A.; HERTH, F.J & HERPEL, E. (2012) Are we Missing the Target? – Cancer Stem Cells and Drug Resistance in Non-small Cell Lung Cancer. *Cancer genomics & proteomics*, 286, p.275– 286.
- GRIDELLI, C.; ROSSI, A.; CARBONE, D.P.; KARACHALIOU, N....ROSELL, R. (2015) Non-small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, p. 15009.
- GUILLÉN, I.A.; BERLANGA, J.; CAMACHO, H.; FÉRNANDEZ-DE COSSÍO, M.E....MARTÍN, J. (2013) Molecular mechanisms involved in the inhibition of tumor cells proliferation exposed to elevated concentrations of the epidermal growth factor. *Biotecnología Aplicada*; 30, p. 223-227.
- GULDUR, M.E.; KIBAR, Y.; DENIZ, H. & BAKIR, K. (2010) Comparison of Osteopontin, β -catenin and hnRNP B1 Expression in Lung Carcinomas. *Pathol. Oncol. Res*, 16, p. 55–59.
- HAN, L.; SANJUN, S.; TAO, G.; ZHIRONG, Z. & XUN, S. (2013) Cancer stem cells: therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 3(2), p. 65–75.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), p. 646–674.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R.A. (2000) Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), p.57-70.
- HAVEL, L.S.; KLINE, E.R.; SALGUEIRO, A.M. & MARCUS, A.I. (2015) Vimentin regulates lung cancer cell adhesion through a VAV2- Rac1 pathway to control focal adhesion kinase activity. *Oncogene*, 34(15), p. 1979–1990.
- HERBST, R.S.; BAAS, P.; KIM, D.W.; FELIP, E....GARON, E.B. (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), p.1540–1550.
- HERREROS-POMARES, A.; AGUILAR-GALLARDO, C.; CALABUIG-FARIÑAS, S.; SIRERA, R.; JANTUS-LEWINTRE, E. & CAMPS, C. (2018) EpCAM duality becomes this molecule in a new Dr. Jekyll and Mr. Hyde tale. *Hematology*, 126, p. 52-63.
- HONG, X.; SIN, W. C.; HARRIS, A.L. & NAUS, C. C. (2015) Gap junctions modulate glioma invasion by direct transfer of microRNA. *Oncotarget*, 6(17).
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA, INE (2012) Boletín informativo del Instituto Nacional de Estadística. (Consultado 3 mayo 2018). Disponible en: http://www.ine.es/ss/Satellite?L=es_ES&c=Page&cid=1254735116567&p=1254735116567&pagename=ProductosYServicios%2FPYSLayout
- INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER, NCI (2018) ¿Qué es el cáncer? (Consultado 3 mayo 2018). Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
- JANTUS-LEWINTRE, E.; USÓ, M.; SANMARTÍN, E. & CAMPS, C. (2012) Update on biomarkers for the detection of lung cancer. *Lung Cancer: Targets and Therapy*, 3, p. 21–29.

- JINN, Y. & INASE, N. (2010) Connexin43, E-Cadherin, β -Catenin and ZO-1 Expression and Aberrant Methylation of the Connexin43 Gene in NSCLC. *ANTICANCER RESEARCH*, 30, p. 2271-2278.
- KIM, E.Y.; KIM, A.; KIM, S.K.; KIM, H.J....CHANG, Y.S. (2014) Inhibition of mTORC1 induces loss of E-cadherin through AKT/GSK-3 β signaling-mediated upregulation of E-cadherin repressor complexes in non-small cell lung cancer cells. *Respiratory Research*, 15(26).
- KOTIYAL, S. & BHATTACHARYA, S. (2015) Lung Cancer Stem Cells and Their Therapeutic Targeting. *Archives of Stem Cell Research*, 2(2), p.1009.
- LIANG, J.; LV, J. & LIU, Z. (2015) Identification of stage-specific biomarkers in lung adenocarcinoma based on RNA-seq data. *Tumor Biol.*
- LI, X.; ISHIHARA, S.; YASUDA, M.; NISHIOKA, T.; MIZUTANI, T.... HAGA, H. (2013) Lung Cancer Cells That Survive Ionizing Radiation Show Increased Integrin α 2 β 1- and EGFR-Dependent Invasiveness. *PLOS ONE*, 8(8).
- LIU, C.; LIN, H.; TANG, M. & WANG Y. (2015) Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*, 6(18), p. 15966-15983.
- LIU, X. & FAN, D. (2015) The epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: functional and mechanistic links. *Curr Pharm Des*, 21, p. 1279–1291.
- MAGARA, K.; TAKASAWA, A.; OSANI, M.; OTA, M....SAWADA, N. (2017) Elevated expression of JAM-A promotes neoplastic properties of lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*, 108, p. 2306-2314.
- MALHOTRA, J.; MALVEZZI, M.; NEGRI, E.; LA VECCHIA, C. & BOFFETTA, P. (2016) Risk factors for lung cancer worldwide. *The European respiratory journal*, 48(3), p. 889–902.
- MANTILLA, C.; SUÁREZ, I.; DUQUE, A. & NAVAS, M.C. (2015) Mecanismos de señalización por β -catenina y su papel en la carcinogénesis. *Rev CES Med*; 29(1), p. 109-128.
- MARTIN, T.A.; MANSEL, R.E. & JIANG W.G. (2010) Loss of occludin leads to the progression of human breast cancer. *Int J Mol Med*, 26, p. 723–734.
- MOLDVAY, J.; FABIÁN, K.; JÄCKEL, M.; NÉMETHE, Z....SCHAFF, Z. (2016) Claudin-1 Protein Expression Is a Good Prognostic Factor in Non-Small Cell Lung Cancer, but only in Squamous Cell Carcinoma Cases. *Pathol. Oncol. Res.*
- MORGENSZTERN, D.; NG, S.H.; GAO, F. & 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), p. 29–33.
- MORGENSZTERN, D.; CAMPO, M. J.; DAHLBERG, S.E.; GARON, E....GOVINDAN, R. (2015) Molecularly targeted therapies in non-small-cell lung cancer annual update. *J. Thorac. Oncol* 10, S1-S63.
- NATH, S. & DEVI, G. R. (2016) Three-Dimensional Culture Systems in Cancer Research: Focus on Tumor Spheroid Model. *Pharmacol Ther.*, 163, p. 94–108.
- NEGRI, A. L. (2015) Rol de las claudinas en el manejo renal del calcio. *Nefrologia*, 35(4), p. 347–352.
- NOVELLO, S.; BARLESI, R.; CALIFANO, R.; CUFER, T....PETERS, S. (2016) Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 27, (suppl5): v1-v27.
- OGAWA, K.; PITCHAKARN, P.; SUZUKI, S.; CHEWONARIN, T....SHIRAI, T. (2012) Silencing of connexin 43

- suppresses invasion, migration and lung metastasis of rat hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci*, 103, p. 860–867.
- OMBRATO, L. & MALANCHI, I. (2014) The EMT universe: space between cancer cell dissemination and metastasis initiation. *Crit Rev Oncog*, 19, . 349–361.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS (2018) Temas de salud. Cáncer. (Consultado 3 mayo 2018). Disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
- PATRIARCA, C.; MACCHI, R.M.; MARSCHNER, A.K. & MELLSTEDT, H. (2012) Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer Treat. Rev.*, 38, p. 68–75.
- PFÄFFL, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45.
- RAMI-PORTA, R. (2017) Staging Handbook In thoracic Oncology, eds., p. 55–80.
- ROSELL, R. & KARACHALIOU, N. (2016) Large-scale screening for somatic mutations in lung cancer. *The Lancet*.
- SCHMIDT, M.; SCHOLZ, C.; POLEDNIK, C. & ROLLER, J. (2016) Spheroid-based 3-dimensional culture models: Gene expression and functionality in head and neck cancer. *Oncology reports*, 35, p. 2431-2440.
- SCHNELL, U.; CIRULLI, V. & GIEPMANS B. (2013) EpCAM: Structure and function in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828, p. 1989–2001.
- SENTANI, K.; OUE, N.; SAKAMOTO, N.; ANAMI, K....YASUI, W. (2010) Upregulation of connexin 30 in intestinal phenotype gastric cancer and its reduction during tumor progression. *Pathobiology*, 77, p. 241–8.
- SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D. & JEMAL, A. (2018) Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.*, 68(1), p. 7-30.
- SIRENKO, O.; MITLO, T.; HESLEY, J.; LUKE, S....CROMWELL, E.F. (2015) High-Content Assays for Characterizing the Viability and Morphology of 3D Cancer Spheroid Cultures. *ASSAY and Drug Development Technologies*, p. 402-414.
- SOINI, Y. (2012) Tight junctions in lung cancer and lung metastasis: a review. *Int J Clin Exp Pathol*, 5(2), p. 126-136.
- SOURISSEAU, T.; HASSAN, K.A.; WISTUBA, I.; PENAULT-LLORCA, F.....SORIA, J.C. (2014) Lung cancer stem cell: fancy conceptual model of tumor biology or cornerstone of a forthcoming therapeutic breakthrough? *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 9(1), p. 7–17.
- STADLER, M.; SCHERZER, M.; WALTER, S.; HOLZNER, S....DOLZNIG, H. (2018) Exclusion from spheroid formation identifies loss of essential cell-cell adhesion molecules in colon cancer cells. *SCIENTIFIC REPORTS*, 8, 1151.
- TABARIÈS S. & SIEGEL P.M. (2016) The role of claudins in cancer metastasis. *Oncogene*, p. 1-15.
- TAS, F.; KARABULUT, S. & BILGIN, E. (2014) Serum levels of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) may have diagnostic, predictive, and prognostic roles in patients with lung cancer treated with platinum-based chemotherapy. *Tumor Biol*.
- TENG, Y.; WANG, X.; WANG, Y. & MA, D. (2010) Wnt/b-catenin signaling regulates cancer stem cells in lung cancer A549 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 392, p. 373–379.

- TIWARI, N.; GHELDOLF, A.; TATARI, M. & CHRISTOFORI, G. (2012) EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *Semin. Cancer Biol.*, 22(3), p. 194-207.
- TRAVIS, W.; BRAMBILLA, E.; NOGUCHI, M.; NICHOLSON, A.....VAN SCHIL, P. (2011) International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol*, 6, p. 244-285.
- TRAVIS, W.D. (2002) Pathology of lung cancer. *Clinics in chest medicine*, 23(1), p.65–81.
- VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B....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. & FREEMAN, W. (2008) Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, (4), p. 619–626.
- VIEIRA, A.R.; ABAR, L.; VINGELIENE, S.; CHAN, D.S... NORAT, T. (2016) Fruits, vegetables and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 27(1), p.81–96.
- WANG, H.; WU, C.; WAN, S.; ZHANG, H....LIU, G. (2013) Shikonin attenuates lung cancer cell adhesion to extracellular matrix and metastasis by inhibiting integrin 1 expression and the ERK1/2 signaling pathway. *Toxicology*.
- WEISWALD, L.B.; BELLET, D. & DANGLES-MARIE, V. (2015) Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia*, 17, p. 1–15.
- YAKISICH, J.S.; AZAD, N.; VENKATADRI, R.; KULKARNI, Y....IYER, A.K. (2016) Formation of Tumorspheres with Increased Stemness without External Mitogens in a Lung Cancer Model. *Stem Cells International*.
- YAMADA, G.; MURATA, M.; TAKASAWA, A.; NOJIMA, M.....TAKAHASHI, H. (2016) Increased expressions of claudin 4 and 7 in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *Med Mol Morphol*.
- YANG, Z.; HACKSHAW, A.; FENG, Q.; FU, X....TANG, J. (2017) Comparison of gefitinib, erlotinib and afatinib in non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *International journal of cancer*, 140(12), p. 2805–2819.
- YU, M.; ZHANG, C.; LI, L.; DONG, S....TONG, X. (2014) Cx43 reverses the resistance of A549 lung adenocarcinoma cells to cisplatin by inhibiting EMT. *Oncol Rep.*, 31, p. 2751.
- YU, Q.; GUO, Q.; CHEN, L. & LIU, S. (2015) Clinicopathological significance and potential drug targeting of CDH1 in lung cancer: a meta-analysis and literature review. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, p. 2171–2178.
- YULYANA, Y.; ENDAYA, B.; NG, W.; GUO, C....HO, I. (2013) Carbenoxolone Enhances TRAIL-Induced Apoptosis Through the Upregulation of Death Receptor 5 and Inhibition of Gap Junction Intercellular Communication in Human Glioma. *STEM CELLS AND DEVELOPMENT*, 22(13).
- ZHANG, C.; LIU, Y.; GUO, S. & ZHANG, J. (2014) Different Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer in Blood Vessel Invasion. *Cell Biochem Biophys*.
- ZHANG, X; LOU, Y.; ZHENG, X.; WANG, H....HAN, B. (2015) Wnt blockers inhibit the proliferation of lung cancer stem cells. *Drug Design, Development and therapy*, vol. 9, p. 2399–2407.
- ZHANG, J.; LIU, J.; LI, H. & WANG, J. (2016) β -catenin signaling pathway regulates cisplatin resistance in lung adenocarcinoma cells by upregulating Bcl-xl. *MOLECULAR MEDICINE REPORTS*, 13, p. 2543-2551.

ZHAO, C.; WANG, A.; LU, F.; CHEN, H....CHEN, H. (2017) Overexpression of junctional adhesion molecule-A and EphB2 predicts poor survival in lung adenocarcinoma patients. *Tumor Biology*, p. 1-9.

ZHU, Z.W.; CHEN, L.; LIU, J.X.; HUANG, J.W....YAO, K.T. (2017) A novel three-dimensional tumorsphere culture system for the efficient and low-cost enrichment of cancer stem cells with natural polymers. *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE*, 15, p. 85-92.