

Resumen

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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