



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

Universitat de València

Centro de Investigación Príncipe Felipe

Laboratorio de señalización oncogénica

Tesis Doctoral

Aislamiento y caracterización de células madre tumorales en cáncer de pulmón no microcítico.

Memoria presentada para la obtención del título de Doctor, en el programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología por

Juan Diego De Maya Gironés

Dirigida por

Dra. Rosa Farràs Rivera

Valencia, abril 2022

AGRADECIMIENTOS

No puedo sino agradecer a todos aquellos que han hecho posible que esta tesis se lleve a cabo.

Comenzar por mi directora, la Doctora Rosa Farras, por ofrecerme la oportunidad de formar parte de su equipo y tener la paciencia de guiarme y enseñarme los entresijos de la investigación; también por su comprensión con mis circunstancias los últimos años de esta tesis. Bajo su tutela he adquirido las habilidades que hoy me permiten desempeñar con soltura mi puesto de trabajo, mil gracias por todo.

Agradecer también a la Doctora Eloisa Jantus y a su equipo el excelente trabajo que realizaron, de cuya colaboración surge uno de los resultados más importantes de esta tesis. Especialmente mencionar a Alejandro Herreros, con el que tuve el placer de trabajar durante la realización de esta tesis.

A todo el maravilloso equipo presente en el CIPF que velan por el buen funcionamiento del centro. Aunque especialmente por su directa implicación en esta tesis:

Al equipo de citómica, especialmente a Alicia Martínez por su inestimable ayuda en el diseño y análisis de los resultados, así como su disponibilidad y paciencia para responder a todas mis preguntas sobre la técnica.

A la unidad de Bioinformática y bioestadística por su ayuda a lo largo de todo el estudio. En especial a Francisco García, cuyo entusiasmo y labor docente me animo a iniciarme en R y escribir mis propias Macros y Códigos.

Al equipo de Jeronimo Forteza por su asistencia en técnicas histológicas, aunque dichos resultados no han sido incluidos en esta tesis. También a Alberto Hernández por su experta asistencia en la obtención de las imágenes de microscopía confocal y al equipo del animalario por el cuidado y vigilancia de nuestros modelos de xenografts.

A mis compañeros de laboratorio, Beatriz, Carol, José Miguel, Arantxa, Ana y Sandra. Para algunos he sido aprendiz, para otros compañero o tutor; pero independientemente de esto he aprendido algo de cada uno de ellos y todos han hecho el trabajo del día a día mucho más llevadero. Os deseo lo mejor a todos.

A la escuela de doctorado de la Universidad de Valencia, por su extraordinaria paciencia y comprensión con mis circunstancias, en especial a la Dra. Mercedes Costell y a Jose Vicente Sancho. A mi tutor, el Dr. Sergi Maicas, por sus siempre rápidas respuestas y su asistencia siempre que fue necesaria. Así como a todo el personal de la universidad que me ha asistido durante estos años.

DEDICATORIAS

A mi esposa y compañera de vida África, por su amor incondicional, infinita paciencia, comprensión y apoyo con todo el tiempo que he debido dedicar para la culminación de esta tesis. Espero poder devolverte todo lo que me has dado estos años.

A mis dos hijos, Diego y Mateo, que han dado un nuevo sentido a mi vida.

A mis Padres, por educarme, guiarme y ayudarme a convertirme en quien soy ahora, por su incondicional amor y apoyo en todas las etapas de mi vida. A mi hermano, por la unión que nunca nos ha fallado, y porque sé que siempre puedo contar con él.

A Julián Castillo, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, animarme a terminar esta tesis e inspirarme a ser cada día mejor con su infinita capacidad de trabajo y excelente calidad humana.

RESUMEN

El carcinoma pulmonar es la causa principal de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo. El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) representa un alto porcentaje del total de todos los tumores de pulmón. Hoy en día en la clínica existen fármacos y estrategias terapéuticas dirigidas para tratar a los pacientes según el subtipo o mutaciones conductoras del tumor. Estas terapias dirigidas han sido posibles gracias al mayor conocimiento del genoma, así como de mejoras en las técnicas de identificación de las mutaciones génicas. La supervivencia del cáncer de pulmón sigue siendo baja ya que la mayoría de los pacientes no pueden beneficiarse de una terapia dirigida y el fracaso en los tratamientos de quimioterapia son frecuentes. Uno de los factores que puede contribuir a este fracaso es la existencia de una subpoblación de células madre tumorales (CMT) en el tumor. Las CMT se creen en gran parte responsables de la agresividad y progresión del cáncer. Esta tesis se centra en la identificación y caracterización de subpoblaciones de CMT en el CPNM. Hemos usado una colección de líneas celulares establecidas como son las A549, H1395, H1650, H1993 y PC9, pero también líneas celulares derivadas de tumores de pacientes (LDP) con CPNM establecidas en nuestro laboratorio a partir de la disgregación de tumores primarios de pacientes. Hemos puesto a punto una metodología para la formación de tumoroesferas enriquecidas en poblaciones de CMT. Ensayos de inyección de células en ratones inmunocomprometidos permitieron la evaluación de la capacidad iniciadora de tumores (CIT) de las tumoroesferas, confirmando su característica de CMT. Se han realizado ensayos de citometría multiparamétrica de poblaciones de tumoroesferas comparados con cultivos tradicionales en monocapa que permiten la identificación de potenciales marcadores de CMT. Mediante citometría de flujo ha analizado marcadores de CMT en células provenientes de la disgregación de tumores primarios de CPNM recién resecados. Estos tumores primarios muestran una enorme variabilidad, pero a pesar de esta, algunos de los potenciales marcadores de CMT se han relacionado con variables clínico-patológicas, aunque estos resultados deberán ser validados en cohortes de pacientes mayores. Los resultados obtenidos identifican posibles marcadores de CMT en CPNM y sus vías de señalización. En concreto, el marcador de superficie EpCAM muestra la activación de una ruta de transducción de señales en las tumoroesferas de las LDPs. Un análisis génico identificó una firma de 6 genes, *CD44*, *NOTCH3*, *ITGA6*, *NANOG*, *P21* y *SNAI1*, que se encuentran sobreexpresados en las esferas de las LDP y que podrían ser de utilidad para la identificación de poblaciones de CMT en el adenocarcinoma pulmonar.

Índice

ÍNDICE

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

1 El cáncer.....	1
1.1 Cáncer de pulmón: Estadísticas y etiología.....	4
1.2 Detección y cribado del cáncer de pulmón.....	7
1.3 Clasificación de la OMS del 2015.	7
1.4 Clasificación TNM, 8ª edición y diagnóstico clínico.	8
1.5 Mutaciones y terapias dirigidas en el cáncer de pulmón.	10
2 Células madre tumorales.....	13
2.1 Las CMT en tumores sólidos, modelos y controversias.	14
2.2 Estrategias de identificación clásicas de las CMT.	18
2.3 CMT y Transición Epitelio Mesenquimal (TEM).	20
3 Rutas y factores importantes en las CMT y el CPNM.	22
3.1 Ruta de Notch.	22
3.1.1 La ruta de Notch en Cáncer.....	24
3.2 La ruta de WNT.	24
3.2.1 La ruta de WNT en las CMT e intercomunicaciones relevantes.	26
3.3 La ruta de Hedgehog.	27
3.4 Ruta de las MAPK.	29
3.5 La Ruta de fosfoinositol 3 fosfato.	31
3.5.1 La Ruta de fosfoinositol 3 Kinasa en CPNM	32
4 Proteínas de superficie características de células de CPNM.....	33
4.1 EpCAM.....	33
4.1.1 Utilidad como marcador diagnóstico.....	33
4.2 Antígeno CD166.	34
4.3 Antígeno CD44.	36
4.4 Antígeno CD133.	38
4.4.1 CD133 en cáncer	39
4.4.2 CD133 como diana farmacológica	40
4.5 Antígeno CD90.	41
4.6 Antígeno CD34.	41
4.7 Antígeno CD117.	42

HIPOTESIS Y OBJETIVOS	45
------------------------------------	-----------

MATERIAL Y MÉTODOS

M1 Cultivo Celular	47
--------------------------	----

M1.1 Cultivo en adherencia de líneas celulares	48
M1.2 Mantenimiento de cultivos de líneas celulares en adherencia	48
M1.3 Cultivo de tumoresferas de líneas celulares.....	48
M1.4 Mantenimiento de cultivos de tumoresferas	49
M2 Establecimiento de cultivos primarios de tumoresferas	50
M2.1 Criterio de selección de muestras y recepción.....	50
M2.2 Obtención de cultivos primarios derivados de tumores de CPNM	51
M2.3 Cultivo de tumoresferas derivadas de tumores de CPNM	51
M2.4 Cultivo en adherencia de derivadas de tumores de CPNM.....	51
M3 Técnicas de análisis celular.....	52
M3.1 Ensayos de citometría multiparamétrica.....	52
M3.1.1 Preparación de células para citometría.....	52
M3.1.2 Marcaje con anticuerpos y detección de eventos.....	52
M3.2 Ensayos de Microscopía.....	53
M3.2.1 Microscopía óptica	53
M3.2.2 Microscopía de Fluorescencia	53
M3.2.2.1 Fijación de cultivos crecidos en adherencia o tumoresferas	53
M3.2.2.2 Inmunofluorescencia.....	54
M4 Técnicas de análisis molecular	55
M4.1 Western Blot.....	55
M4.1.1 Preparación y lisis de células para extracción proteica	55
M4.1.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida y transferencia a membrana ..	55
M4.1.3 Bloqueo, incubación con anticuerpos y detección de quimioluminiscencia	56
M5 Modelo experimental in vivo de CPNM.....	57
M5.1 Animales	57
M5.2 Inyección subcutánea de células de CPNM	57
M5.3 Disgregación de tumores de CPNM crecidos en ratón.....	57
M6 Análisis estadístico y de imagen	58

RESULTADOS

R1 Puesta a punto de un protocolo para la generación de cultivo 3D o tumoresferas derivadas de CPNM	61
R1.1 Generación de tumoresferas derivadas de líneas celulares de CPNM	61
R1.2 Generación de tumoresferas derivadas de tumores de pacientes con CPNM	62
R2 Las tumoresferas tienen mayor capacidad iniciadora de tumores.	64
R3 Las tumoresferas y sus contrapartes adherentes correspondientes expresan EpCAM, CD166, CD44 y CD90	66
R3.1 Identificación de subpoblaciones celulares en la línea de CPNM H1650	68
R4 Análisis de la expresión de marcadores de CMT por microscopía de fluorescencia y WB en las líneas celulares A549, H1395, H1650, H1993 y PC9.....	70

R4.1 Análisis de expresión de los marcadores de superficie EpCAM, CD166, CD44, CD144, ALDH1 mediante microscopía de fluorescencia.....	70
R4.2 Análisis de expresión de los marcadores Sox2, Oct-4, Nanog, E-Cadherina y Vimentina mediante microscopía de fluorescencia.....	72
R4.2.1 Expresión de los factores de transcripción Sox2, Oct-4 y Nanog	72
R4.2.2 Expresión de E-Cadherina y Vimentina.....	75
R4.3 Análisis de la expresión de marcadores de CMT mediante Western blot	75
R5 Análisis de la expresión de marcadores de CMT por microscopía de fluorescencia y WB en las LDP 302, 303, 315, 317 y 320.....	78
R5.1 Análisis de expresión de EpCAM, CD166, CD44, CD133, ALDH1 mediante microscopía de fluorescencia	78
R5.2 Expresión de Sox2, Oct-4, Nanog, E-Cadherina y Vimentina	80
R5.2.1 Expresión de los factores de transcripción Sox2, Oct-4 y Nanog	80
R5.2.2 Expresión de E-Cadherina y Vimentina.....	83
R5.3 Análisis de la expresión de marcadores de CMT mediante Western Blot.....	84
R6 Análisis de la expresión génica de marcadores de CMT mediante PCR a tiempo real (RTqPCR)	86
R6.1 Análisis de expresión génica	86
R6.2 Validación de una firma génica en las líneas A549, H1395, H1650, H1993 y PC9	88
R6.3 Validación de una firma génica en las líneas 299, 301, 302, 303, 315, 317, 320, 343.....	92
R7 La ruta de transducción EpCAM está activa en las LDP	95
R8 Correlación de marcadores de superficie de CMT de tumores primarios de pacientes con CPNM con sus características clinicopatológicas	98

DISCUSIÓN

D1 Desarrollo de modelos experimentales y capacidad iniciadora de tumores.....	105
D2 Uso de marcadores de superficie para la caracterización y aislamiento de CMT en CPNM	107
D2.1 La expresión de EpCAM extracelular no discrimina entre tumoroesferas y células adherentes.....	107
D2.2 Expresión de CD166 en las CMT de CPNM	107
D2.3 3 Expresión de CD44 en las CMT de CPNM	108
D2.4 Expresión de CD133 en las CMT de CPNM.	109
D2.5 El marcador de superficie CD90 solo se expresa en la línea H1650	110
D2.6 CD34, ABCG2, CD117, ALDH1A1, E-Cadherina y Vimentina	111
D2.7 Consideraciones sobre los ensayos de citometría en las CMT	112
D3 Rutas de transducción de señales de CMT	114

D4 Una firma molecular de 6 genes identifica a la población de CMT en la variedad adenocarcinoma	116
D4.1 Las LDP como modelo de estudio para las CMT in vitro.....	117
D4.2 Sox2 y Oct4 están ausentes de la firma molecular.....	118
D5 Estudio de los marcadores de CMT en la cohorte de pacientes con CPNM.....	120
CONCLUSIONES.....	126
BIBLIOGRAFÍA.....	130

Abreviaturas

ABREVIATURAS

ADC: Adenocarcinoma de pulmón.

ADH: Cultivos en adherencia.

ATCC: American Type Culture Collection.

bFGF: Factor de crecimiento básico de los fibroblastos.

CAMs: Moléculas de Adhesión Celular.

CCE: Carcinoma de Células Escamosas.

CCG: Carcinoma de Células Grandes.

CDK: Kinasa dependiente de Ciclina.

CEBA: Comité de Ética en Bienestar Animal de CIPF.

CIPF: Centro de Investigación Príncipe Felipe.

CIT: Capacidad Iniciadora de Tumores.

CMH: Células madre hematopoyéticas.

CMT: Células Madre Tumorales.

CPNM: Cáncer de Pulmón No Microcítico.

CRD: Dominio rico en cisteína.

CTC: células tumorales circulantes.

CTLA-4: Antígeno 4 del linfocito T citotóxico.

CXCL: Ligando del receptor de las quimiocinas CXC.

CXCR: Receptor de las quimiocinas CXC.

DVL: Dishevelled.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

EpEX: EPCAM extracelular.

EpICD: Fragmento intracelular de EpCAM.

ERM: Ezrin, Radixina y Moesina.

ESF: Cultivos en baja adherencia o tumoresferas.

FASL: Ligando de FAS.

FIHGUV: Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia.

FGF: Factor de crecimiento de los fibroblastos.

FISH: hibridación fluorescente in situ.

GSK: Glucógeno Sintasa Kinasa.

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico de tipo 1.

IGF-1R: Receptor del factor de crecimiento insulínico de tipo 1.

IHQ: inmunohistoquímica.

INF- γ : Interferón gamma.

IL-X: Interleuquina X (siendo X un número).

IL-XR: Receptor de Interleuquina X (siendo X un número).

LDCT: tomografía computarizada de baja dosis.

LDP: Líneas celulares Derivadas de tumores de Pacientes.

LRP: proteína relacionada con el receptor de LDL.

NCCN: National Comprehensive Cancer Network.

NGF: Factor de crecimiento Nervioso.

NGS: Secuenciación de nueva generación.

NICD: Fragmento intracelular N-terminal de Notch.

NK: Células Natural Killer.

NLST: Ensayo nacional de cribado de pulmón.

NOD: Diabéticos no obesos.

NOS: "Not otherwise specified".

OMS: Organización mundial de la salud.

PDX: xenoinjertos derivados de pacientes.

PD-1: proteína de la muerte celular programada 1.

PD-L1: Ligando de la proteína de la muerte celular programada 1.

PET: Tomografía por emisión de positrones.

pRB: proteína del retinoblastoma.

P/S: Penicilina/Streptomycin.

RNM: Resonancia Magnética Nuclear.

RTK: Receptores Tirocín Kinasa.

SEOM: Sociedad española de oncología médica.

SCID: inmunodeficiencia combinada severa.

SP: Side Population.

TAC: Tomografía axial computarizada.

TEM: Transición Epitelio-Mesenquimal.

TNM: Clasificación Tamaño Nódulos Metástasis.

TTF-1: Factor de transcripción tiroideo 1.

PAHs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido.

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante β .

TKIs: Inhibidores de la tirosina kinasa.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

TNFR1: Receptor 1 del factor de necrosis tumoral alfa.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

WB: Western blot.

Introducción

1 El cáncer.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo y un problema de salud pública de enorme magnitud. El cáncer engloba a un grupo de enfermedades que implican un crecimiento celular anormal con el potencial de invadir o extenderse a otras partes del cuerpo. Estas enfermedades se mencionan en documentos históricos muy antiguos. El papiro "Edwin Smith", un documento médico llamado así por el caballero que lo adquirió, contiene la descripción clínica de un caso de cáncer de mama en el antiguo Egipto que data de entre los años 3000 y 2500 a.C.; de esta misma época tratados de medicina ayurvédica india también describen otros casos de cáncer como orales, faríngeos, esofágicos, pélvicos o de recto. Hipócrates, también describió varios casos de cáncer; pero fue Galen (131-200 a.C.) el que describió su parecido con un cangrejo, "karkinos" en griego y "cáncer" en latín; acuñando el nombre por el que es conocida esta enfermedad (1). Hoy en día, gracias a la medicina moderna, tenemos una idea más precisa de qué es la biología del cáncer; un complejo proceso mediante el cual algunas células son capaces de ignorar las restricciones de su genoma y propia mortalidad, dividirse sin control y al tiempo evitar que los múltiples mecanismos de control tanto a nivel celular como sistémico terminen con ella. La comprensión y tratamiento del cáncer es uno de los mayores desafíos de la medicina contemporánea.

En dos artículos fundacionales publicados en la revista *Cell*, los autores Hanahan y Weinberg propusieron un modelo que define las propiedades que adquiere y caracterizan a las células tumorales; "Hallmark of Cancer" (2,3). En estos se describen las características funcionales adquiridas de las células tumorales y sus ventajas adaptativas en el cáncer. Las características propuestas fueron: la proliferación sostenida, la insensibilidad a las señales antiproliferativas, evasión de la apoptosis, potencial replicativo infinito, inducción y mantenimiento de la angiogénesis, invasión y metástasis, inestabilidad genética y mutaciones, evasión del sistema inmune, inflamación y reprogramación del metabolismo (2,3). Estas características se pueden ver en la figura **11** y se definen brevemente como:

Proliferación sostenida: Las células normales proliferan cuando sus receptores celulares se unen a los factores de crecimiento, necesitando además la unión a moléculas extracelulares e intercelulares. Las células cancerígenas son capaces de producir y mantener señales de crecimiento y proliferación de manera continuada. Esto lo consiguen o bien produciendo los factores de crecimiento de manera autocrina, o bien activando rutas dependientes de estos factores en su ausencia. Los cánceres son además capaces de alterar las integrinas de su matriz extracelular, favoreciendo aquellas prometóticas. De entre las rutas celulares activadas la ruta de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK) es una de las más importantes (2-4)

Insensibilidad a las señales antiapoptóticas: En los tejidos, múltiples señales mantienen la quiescencia celular; incluyendo inhibidores solubles, presentes en la matriz extracelular o en las membranas de células cercanas. A nivel intracelular muchas de estas señales usan la proteína del retinoblastoma (pRb), así como p107 y p130, para bloquear la proliferación y alterar la función del factor de transcripción E2F. Este factor controla la expresión de un amplio número de genes esenciales para la progresión de G1 a S. El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) en condiciones normales evita la activación de pRb, este factor suprime también otros genes importantes en la transición G1-S como el proto-oncogén *MYC*;

otra función de TGF- β es la regulación de la síntesis de las proteínas p15^{INK4B} y p21, implicadas en la inhibición de los complejos ciclina/kinasa dependiente de ciclina (CDK). Los tumores pueden inactivar estas rutas de diversas maneras (2,3).



Figura 11. Los originales “sellos distintivos del cáncer” o “Hallmarks of Cancer”, adaptado de Hanahan y Weinberg 2011 (3).

Evasión de la apoptosis: La apoptosis es una vía de destrucción o muerte celular programada que cuando es activada culmina con la destrucción de la célula. La maquinaria apoptótica consta de 2 tipos de componentes: los receptores y los efectores. Parejas de ligando/receptor extracelular como el factor de crecimiento insulínico de tipo 1 y su receptor (IGF-1/IGF-1R) o la interleuquina 3 y su receptor (IL-3/IL-3R) favorecen la supervivencia de la célula, mientras que otros como FAS y su ligando (FASL/FAS) o el factor de necrosis tumoral alfa y su receptor (TNF- α / TNFR1) inclinan la balanza hacia la apoptosis. En el interior de la célula hay también sensores que dispararán la apoptosis ante evidencia de daño celular, activación aberrante de rutas, falta de factores de supervivencia o hipoxia entre otros. Dentro de los efectores, la mitocondria juega un papel principal; mediante el equilibrio entre las proteínas de la familia Bcl-2 apoptóticas (Bax, Bak, Bid o Bim) y antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL o Bcl-W) se regula la liberación de Citocromo C. p53 actúa principalmente como un sensor de daño en el DNA y puede activar la expresión de la proteína proapoptótica Bax. Las ejecutoras de la apoptosis son las caspasas, activadas por el Citocromo C o receptores como FAS; dichos efectores activan las caspasas 8 y 9, las cuales inician una cascada que culmina con la ejecución de la muerte celular programada. Las células tumorales tienen una alta resistencia a la apoptosis, mediada por un gran número de mecanismos: entre otros c-Myc actuando en tándem con la proteína Bcl-2, efectores o sensores como la ruta de FAS o p53 pueden ser inactivados, o la síntesis de factores de crecimiento antiapoptóticos como IGF-1 entre otros. El gen *P53* está mutado en más de un 50% de los cánceres, otras rutas como la de ruta de fosfoinositol 3 Kinasa

(PI3K/AKT) o las MAPK suelen también estar activadas en cáncer al promover la activación de señales antiapoptóticas. La apoptosis es un proceso bien descrito en el CPNM (2,3,5).

Potencial replicativo infinito: las células normales tienen un potencial limitado de replicación; este mecanismo está ligado a la pérdida de DNA en cada replicación lo que acorta los telómeros y lleva a la senescencia. La inactivación de p53 y pRB puede permitir a la célula seguir dividiéndose, pero el acortamiento de los cromosomas llevará a un estado de crisis seguido de una masiva muerte celular. Las células tumorales pueden alcanzar la inmortalidad replicativa gracias a la actividad de la telomerasa, una enzima que puede evitar el acortamiento de los telómeros. Diferentes oncogenes como *MYC* o *WNT* son capaces de activar la telomerasa en las células tumorales, además de tener un papel relevante en el mantenimiento de los reservorios de células madre (2,3,6).

Inducción y mantenimiento de la angiogénesis: Las células necesitan un constante aporte de nutrientes y oxígeno, y las células cancerígenas no son una excepción; de hecho, por su metabolismo acelerado tienen requerimientos más elevados que el resto de células. La activación de la angiogénesis llevará a la formación de un sistema capilar que nutrirá al tumor y le aportará oxígeno, y es por tanto un requisito para el crecimiento tumoral. Las señales principales de este proceso son el Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el Factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) que activarán las células endoteliales adyacentes, aunque otras señales como el balance de las integrinas o la activación de la ruta de NOTCH también son importantes. Los tumores, gracias a la secreción de dichos factores y la alteración de la matriz extracelular, pueden promover la formación de los vasos. De nuevo encontramos inactivación de proteínas como p53 o la activación de otras como Ras, importantes para este proceso, aunque otros mecanismos como la liberación de proteasas que liberen FGF básico (bFGF) en la matriz extracelular también están descritos (2,3,7)

Invasión y metástasis: La invasión de tejidos lejanos y el establecimiento en estos de cánceres secundarios lleva al estadio IV, donde la esperanza de recuperación decae dramáticamente. En este paso la alteración de las moléculas de adhesión celular (CAMs), E-cadherina y las integrinas; así como la activación de la motilidad de aquellas células invasoras tienen un papel principal. La transición epitelio-mesenquimal (TEM) permite este cambio de CAMs y moléculas de adhesión a un nuevo perfil, así como la síntesis de proteasas que ayudarán a atravesar el estroma adyacente y llegar a los vasos sanguíneos o linfáticos (2,3,8).

Inestabilidad genómica y mutaciones: La alteración de los mecanismos de control del ADN y los mecanismos de reparación, así como el gran número de divisiones hacen que el número de mutaciones en los cánceres sea mayor que en las células no malignizadas; esta característica es usada por el tumor para adaptarse mediante una especie de mecanismo darwiniano. Este mecanismo no tiene por qué estar mediado por cambios en la secuencia del ADN, la inactivación epigenética de genes supresores de tumores puede ser un mecanismo tan efectivo como la mutación o delección de estos por ejemplo (2,3).

Evasión del sistema inmune: El sistema inmune es una de las barreras de nuestro cuerpo ante el cáncer, especialmente mediado por las células “natural killer” (NK) y otras células del sistema inmune innato; la inactivación o evasión de las células del sistema inmune es un paso necesario para el desarrollo de un tumor. Dicha inactivación es llevada a cabo mediante la

secreción de inmunosupresores, como el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β), o el reclutamiento de células inhibitoras de la respuesta inmune como los linfocitos T reguladores. Actualmente la inmunoterapia trata de conseguir que el sistema inmune del paciente vuelva a atacar al tumor, inhibidores de puntos de control del sistema inmune como el Antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) o la proteína de la muerte celular programada 1 y su ligando (PD-1 y PD-L1) están siendo usados con resultados prometedores (2,3,9).

Inflamación: En cada tumor hay también un proceso inflamatorio crónico que favorece el reclutamiento de células inmunes. Estas células, ahora incapaces de atacar al tumor e influenciadas por el nicho tumoral, favorecerán la perpetuación de este mediante la síntesis de citoquinas, IL o factores de crecimiento. La importancia de este proceso está reforzada por el hecho de que el tumor secreta sus propias moléculas proinflamatorias, como el TNF- α , las IL-1, IL-6 o el Interferón gamma (INF- γ); o presenta mayores niveles de receptores asociados como los receptores de las quimiocinas CXC (CXCR) (2,3). Algunas de estas citoquinas pueden incluso actuar como reguladores epigenéticos; por ejemplo, se ha descrito que una alta presencia de TGF- β puede llevar a la síntesis del marcador de célula madre CD133 (10).

Reprogramación del metabolismo: En las células tumorales está descrito el cambio de un metabolismo aeróbico a uno anaeróbico, incluso en presencia de oxígeno. Este proceso, el efecto Warburg, lleva a la sobreexpresión de transportadores de glucosa, especialmente GLUT1. Este efecto es contraintuitivo inicialmente, dada la menor eficiencia en la obtención de energía de la vía anaeróbica; pero el uso de los intermedios glucolíticos hacia la síntesis de otras moléculas, así como la mayor velocidad comparada con la ruta aeróbica parece justificarlo. El efecto Warburg genera una gran cantidad de lactato, que es usado células del tumor para la generación de su propia energía (2,3).

1.1 Cáncer de pulmón: Estadísticas y etiología.

El cáncer de pulmón es el segundo cáncer más frecuente en hombres y mujeres, después del cáncer de próstata y mama respectivamente (11); aunque es el más frecuente si se tienen en cuenta ambos sexos (12). Es el cáncer más letal, por un amplio margen, en ambos sexos. En España en 2019 según el informe de la SEOM se estimaba que habría 29.503 nuevos casos de cáncer de pulmón, un 10.64% del total de nuevos casos esperados, siendo los más frecuentes los de colon y recto (24.14%), próstata (12.41%) y mama (11.74%). En hombres se esperaban 22.083 nuevos casos, un 13.71%, siendo el segundo más frecuente después del de próstata (21.35%), mientras que en mujeres se esperaban 7.420 nuevos casos, un 6.39%, siendo el tercero más frecuente después del de mama (28.01%) y el de colon y recto (15.66%). La mortalidad del cáncer de pulmón es muy alta, alcanzando los 22.896 casos en 2018, por lo que la prevalencia a los 5 años es baja, de un 3.7% en la población general; de hecho fue el cáncer con mayor número de muertes en 2018 y se estimaba que lo será también en 2019 (13).

En estados unidos en 2018 se estimó que el 25.27% de todas las muertes por cáncer serían debidas al cáncer de pulmón. La supervivencia a los 5 años está en un 18%, una de las más bajas, al nivel del cáncer de hígado (18%) y superado por el de páncreas (8%) en los estados unidos; aunque ninguno de estos 2 llega a los niveles de prevalencia del cáncer de pulmón (11); si tenemos en cuenta los datos mundiales, es solo del 13% (12); la supervivencia del cáncer de pulmón, aunque baja, ha mejorado en los últimos años más que la de otros cánceres

al mejorar la atención al diagnóstico de pacientes susceptibles de desarrollarlo, dado que este cáncer suele ser diagnosticado en estadios avanzados (11) y la identificación de biomarcadores con el fin de seleccionar a los pacientes que se pueden beneficiar de una terapia dirigida (14).

Como podemos ver en la figura 12, el cáncer de pulmón tuvo un pico de mortalidad en hombres sobre principios de los 90, la mortalidad ha caído un 45% de 1990 a 2015 para los hombres y un 19% del 2002 hasta el 2015 para las mujeres, actualmente decae a mayor velocidad en hombres que en mujeres. Hay que tener en cuenta que la prevalencia de este cáncer está muy ligada al consumo de tabaco; esto, al menos en parte, explica las diferencias observadas entre ambos sexos (11). Según el informe de 2019 de la sociedad española de oncología médica (SEOM), en España la incidencia del cáncer de pulmón en mujeres continua aumentando mientras que la de varones desciende a pesar de que el consumo de tabaco sigue siendo más frecuente en hombres que en mujeres (13).

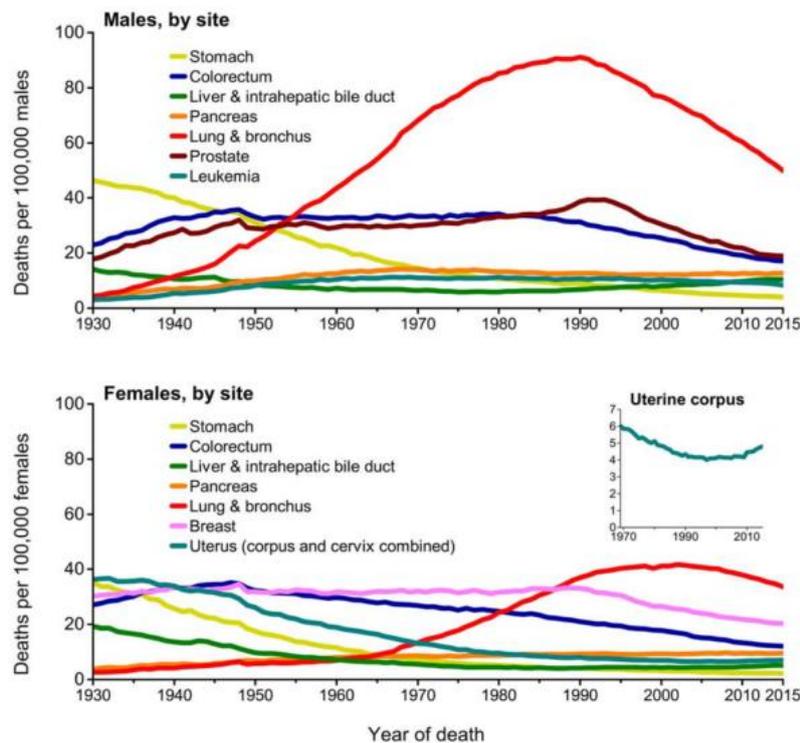


Figura 12: Evolución de la incidencia del cáncer de pulmón a lo largo del tiempo, adaptado de Siegel, Miller and Jemal, 2018 (11).

El cáncer de pulmón se asocia positivamente con el índice de desarrollo, aunque esto puede estar relacionado con la mayor detección y esperanza de vida en estos países; y negativamente con el estatus socioeconómico. Esto es de esperar al contar este segundo segmento de población con un mayor porcentaje de fumadores, menor cobertura sanitaria y mayor exposición ocupacional a carcinogénicos. Hay algunas tendencias globales a señalar, el cáncer de pulmón asociado a la mutación activadora del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), también conocido como erBB-1, es más frecuente en Asia que en Estados Unidos y Europa, lo que también hace que en estos países el uso de los inhibidores de la tirosina kinasa (TKIs) para el EGFR sea más elevado. Además, hay diferencias en los mismos

estudios clínicos realizados en países diferentes que podrían relacionarse con diferencias genéticas en el metabolismo de fármacos (12).

Aunque el tabaco es una de las causas principales del cáncer de pulmón, otros factores implicados en el desarrollo de este cáncer son los procesos pulmonares inflamatorios, causados entre otros por neumonías, infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* o fibrosis. Hay también factores ambientales que han sido relacionados a la aparición de cáncer de pulmón: la exposición a altas dosis de radiación ionizante(12,15); la exposición a asbesto, sílice, radón, metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) (15); la contaminación del aire en ambientes cerrados, incluyendo el uso de combustibles como la madera o el carbón, el humo de aceites vegetales sin refinar en cocinas; así como la contaminación del aire libre (15).

La relación tabaco-cáncer de pulmón fue demostrada en los años 50, e incrementa el riesgo de cáncer de pulmón de 20 a 50 veces; el riesgo decrece en aquellos que dejan de fumar, pero aun así el riesgo sigue siendo mayor que en aquellos que nunca han fumado. Hay también una asociación epidemiológica plausible de incremento de riesgo en los fumadores pasivos (15). El humo del tabaco está compuesto por un gran número de químicos, más de 500 compuestos como Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), N-nitrosaminas específicas del tabaco (TSNAs), aminas aromáticas, óxido de etileno y 1,3-butanodieno. Entre las sustancias más carcinogénicas tenemos las TSNAs nitrosamina cetona (NNK) y la N-nitrosornicotina (NNN). Estudios recientes señalan que el uso de los cigarrillos electrónicos reduce en gran medida la exposición a estas sustancias pero tienen otros riesgos asociados y aún deben ser totalmente regulados por los organismos competentes como la Comisión Europea o la FDA (16)

Una historia familiar de cáncer de pulmón es también un factor de riesgo para el desarrollo de este cáncer; los mayores riesgos se han asociado al locus 6q23-25 así como en casos de mutaciones en el gen supresor de tumores *TP53*; aunque múltiples polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en un gran número de cromosomas también han sido asociados con mayor riesgo de desarrollo de este tipo de cáncer (15).

1.2 Detección y cribado del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es diagnosticado con frecuencia en estadios avanzados, lo que contribuye en gran medida a su alta mortalidad; hoy en día se está haciendo un especial esfuerzo para definir mejores formas de hacer cribados eficaces para una detección más temprana. Hasta la fecha los programas de diagnóstico precoz basados en rayos X, análisis de esputo o biomarcadores no han dado buenos resultados; se apuesta por la tomografía computarizada de baja dosis (LDCT) pero aún está lejos de estar estandarizado para el cribado masivo, necesitando más estudios que demuestren su eficacia, la definición de la población de mayor riesgo, tipo de tomografía o los intervalos en el cribado (17). La detección temprana solucionaría gran parte de los problemas de este cáncer (en especial su alta mortalidad), por lo que hay bastante investigación en esta dirección; un caso poco convencional que quería destacar es una curiosa estrategia de cribado usando perros entrenados para detectar cáncer de pulmón mediante muestras de aliento (18), aunque esta aproximación aún está lejos de ser definitiva (19).

Un estudio reciente que merece la pena señalar es el estudio NELSON en el que siguieron la evolución de nódulos pulmonares por LDCT. En este estudio se demuestra que los nódulos detectados por LDCT crecen de manera exponencial cuando son malignos; este tipo de estudios son importantes ya que ayudarán a optimizar los protocolos de cribado (20). El Ensayo nacional de cribado de pulmón (NLST), realizado en los Estados Unidos, es un estudio realizado en más de 53.000 personas con alto riesgo de padecer cáncer de pulmón; dicho estudio mostró una reducción de un 20% en la mortalidad cuando se realizó el cribado usando LDCT frente al uso de radiografías, aunque hubo una mayor detección de falsos positivos en grupo de LDCT; en algunos casos esto llevó al uso de metodologías diagnósticas agresivas, pero también se detectó un porcentaje mayor de los cánceres en estadios más tempranos que en el grupo de radiografías (21). Teniendo en cuenta la reducción de la mortalidad se determinó que la LDCT era la estrategia más eficaz a la hora de detectar el cáncer; aunque los investigadores discuten que también debe estudiarse la viabilidad económica de estos cribados, y no se deben dejar de buscar estrategias alternativas, como detección de marcadores en orina, esputo o sangre (21).

En el caso de que se vayan a usar estrategias que requieran poca cantidad de tejido tumoral para su análisis, como secuenciación de nueva generación (NGS), se puede recurrir a otras estrategias de muestreo; la búsqueda de mutaciones en el líquido pleural es posible mediante PCR múltiple en tiempo real o pirosecuenciación múltiple; pudiendo buscar mutaciones para genes importantes como *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *NRAS*, *MEK1*, *AKT1*, *PTEN*, *HER2* o las translocaciones de *ALK*, *ROS1* y *RET* (22).

1.3 Clasificación de la OMS del 2015.

La referencia más importante para la clasificación del cáncer de pulmón es la organización mundial de la salud (OMS). Las 2 últimas clasificaciones datan del 2004 y del 2015, la clasificación del 2015 tiene cambios bastante importantes gracias al avance de las pruebas diagnósticas y los estudios a gran escala realizados en los últimos años; esto ha llevado a una reorganización de la clasificación de los tumores más afín a las técnicas y necesidades de hoy día. A continuación detallo el estado actual en referencia al CPNM, el cual está dividido

principalmente en los subtipos adenocarcinoma (ADC), carcinoma de células escamosas (CCE) y carcinoma de células grandes (CCG), aunque hay muchos otros subtipos minoritarios (23)

Brevemente, el ADC tiene varios patrones histológicos relacionados directamente con el nivel de diferenciación y el pronóstico: sólido y micropapilar, los más indiferenciados y de peor pronóstico; acinar y papilar, con un mejor pronóstico que el grupo anterior; lepidicos, con el mejor pronóstico. Puede aparecer más de un patrón en el mismo tumor. Según el grado de invasión se pueden clasificar en adenocarcinoma in situ y adenocarcinoma mínimamente invasivo si cumplen determinados criterios. El adenocarcinoma se detecta mediante la expresión por inmunohistoquímica (IHQ) del Factor de transcripción tiroideo 1 (TTF-1) o la Napsina A (23).

El CCE de pulmón se clasifica actualmente en queratinizado, no queratinizado y con subtipo basaloide; no parece haber diferencias en el pronóstico de los queratinizados frente a los no queratinizados, y hay controversia acerca de si los basaloides tienen peor pronóstico. Los marcadores usados en IHQ para su detección son el p40 y el p63 (23).

El CCG se ha reducido enormemente en la clasificación del 2015, actualmente varios de sus subtipos se han redistribuido dentro de los subgrupos ADC (sólidos) y CCE (subtipo basaloide), siempre que presenten los marcadores de IHQ de estos subtipos. El carcinoma neuroendocrino de células grandes se han unificado dentro de tumores neuroendocrinos y el carcinoma linfoepitelial ha sido movido a un grupo de carcinomas sin clasificar (23).

Hoy en día hay fármacos y estrategias terapéuticas que funcionan mejor en determinados subgrupos del cáncer de pulmón, por esto se ha hecho especial hincapié en metodologías de análisis de muestras de biopsias, usando principalmente Hematoxilina y Eosina, junto con la inmunohistoquímica siempre que sea posible. El objetivo de esta aproximación es reducir al mínimo el término “NOS” (“Not otherwise specified”), este término ha llegado a ser usado hasta en el 50% de los casos en el pasado, cuando el patrón histológico no era tan relevante a la hora de elegir una terapia. El termino NOS se utiliza cuando las pruebas diagnósticas no son concluyentes, lo que llevaría al potencial tratamiento con una terapia subóptima (23).

1.4 Clasificación TNM, 8ª edición y diagnóstico clínico.

Considerada la actual referencia desde enero de 2017, la octava edición del sistema de clasificación TNM (Tamaño Nódulos Metástasis) es la que se está utilizando. Se realiza una clasificación por estadios en función de 3 componentes. El componente T actualmente se divide en 5 categorías, 15 si se cuentan las subcategorías; el tamaño es el principal discriminador, aunque la invasión de ciertas localizaciones como la pleura, corazón o nervios puede incrementar el valor T sin necesitar un mayor tamaño. El componente N se divide en 4 categorías, en función de si hay metástasis en los nódulos linfáticos y en cuales. El componente M se divide en 2 categorías, 4 contando las subcategorías; indica si hay metástasis, la distancia del pulmón y si hay más de una. Si este componente M es mayor a 0 el tumor se considera en estadio IV, sin importar cuales sean su componente T y N.

Diferentes combinaciones de TNM definen diferentes estadios, tal y como indica la figura 13. Estos estadios tratan de representar subgrupos homogéneos con pronósticos parecidos,

aunque no hay duda de que hay muchos factores adicionales que afectarán a este. Este sistema provee a los profesionales que trabajan con pacientes de un lenguaje universal claro, conciso, y que hace hincapié en puntos clave del desarrollo del tumor (24,25).

Los protocolos actuales tratan de identificar el subtipo de tumor previamente al tratamiento al haber grandes diferencias ante la respuesta a estos, patrones de metástasis, recidivas y supervivencia entre los diferentes subtipos de CPNM. Esto es cierto incluso dentro del mismo subtipo cuando hay diferentes mutaciones conductoras, el objetivo final es realizar una terapia lo más personalizada y eficaz posible. La endoscopia bronquial o la endoscopia esofágica son los métodos usados para biopsiar las lesiones y confirmar el estado de los nódulos (17,23,26).

Las técnicas mencionadas son las más recomendadas al ser poco invasivas, aunque hay casos en los que es necesaria una biopsia por punción; que también está dentro de los protocolos recomendados por la OMS (23). Según la SEOM, los procedimientos recomendados para el diagnóstico clínicos son: Citología del esputo, para el estudio de células cancerosas mezcladas con el esputo; Broncoscopia; Punción transtorácica o toracoscopia, para obtención de material directamente sobre el tumor; Toracotomía, para el estudio in situ, toma de muestras y resección de este; toracentesis, para toma de muestra del exceso de líquido en la cavidad pleural; Mediastinoscopia, para el estudio de los ganglios linfáticos. A nivel radiológico también recomiendan: Tomografía axial computarizada (TAC), Resonancia Magnética Nuclear (RNM), Gammagrafía ósea y Tomografía por emisión de positrones (PET) (27).

T/M	Label	N0	N1	N2	N3
T1	T1a ≤ 1	IA1	IIB	IIIA	IIIB
	T1b >1-2	IA2	IIB	IIIA	IIIB
	T1c >2-3	IA3	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2a <i>Cent, Yise Pl</i>	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2a >3-4	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2b >4-5	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	T3 >5-7	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 <i>Inv</i>	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 <i>Satell</i>	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4	T4 >7	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T4 <i>Inv</i>	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T4 <i>Ipsi Nod</i>	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1	M1a <i>Contr Nod</i>	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1a <i>PI Dissem</i>	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b <i>Single</i>	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c <i>Multi</i>	IVB	IVB	IVB	IVB

Figura 13: Sistema de clasificación TNM del cáncer de pulmón (8th edición) de 2017 (25)

Actualmente el tratamiento recomendado en los estadios I a III es de resección siempre que sea posible, recomendando además la eliminación sistemática de los nódulos linfáticos para reducir el riesgo de recidivas en estadios superiores a I. Tras esto se recomienda quimioterapia adyuvante combinada de cisplatino más otro quimioterápico, siendo la vinorelbina el más común. A día de hoy no recomiendan el uso de agentes dirigidos a mutaciones en esta fase, asumiendo que la detección del subtipo de cáncer y la terapia dirigida no es tan importante en estos estadios tempranos; en estos, el uso de terapias clásicas de primera línea es la metodología estándar. A pesar de ello siempre se trata de detectar el tipo de tumor ante el

que se está si eso no retrasa demasiado el tratamiento. En aquellos casos en los que la resección no fuese posible se ofrece la radioterapia estereotáctica ablativa. En estadios avanzados no resecables el tratamiento de elección es radioquimioterapia (17).

Aunque en estadios tempranos el uso de terapias dirigidas no está indicado, en los estadios avanzados hasta un 69% de los cánceres podrían tener mutaciones susceptibles de ser tratadas con agentes dirigidos a estas; en estas fases ya se introducen quimioterápicos que los tienen como dianas (28). Además se están explorando otras opciones terapéuticas, como el uso de inmunoterapia contra cánceres positivos para el PD-L1, capaces de inhibir la respuesta inmune (28). Dado el éxito de la vinorelbina como agente quimioterápico en las terapias combinadas en CPNM, la búsqueda de nuevos inhibidores de los microtúbulos, así como nuevas terapias combinadas es también una de las estrategias que están siendo evaluadas (29).

1.5 Mutaciones y terapias dirigidas en el cáncer de pulmón.

Actualmente el tratamiento recomendado en caso de detección temprana es la resección del tumor, en casos de tumores de gran tamaño o con sospecha de diseminación a los ganglios linfáticos (estadios IIA, IIB o IIIA) los pacientes se pueden beneficiar de quimioterapia tras la cirugía, la radioterapia se emplea en aquellos pacientes que no se pueden someter a una intervención quirúrgica, pero el porcentaje de curación es menor (27). Por desgracia en muchos casos la detección ocurre en estadios avanzados donde la resección no es posible, o hay ya una alta posibilidad de expansión del tumor. Como hemos visto por las cifras de mortalidad de este cáncer los tratamientos clásicos no son muy efectivos, por esto hoy día hay un interés creciente en buscar tratamientos personalizados basado en el estudio de las mutaciones conductoras (26). Los marcadores predictivos en CPNM usados actualmente según las guías del “National Comprehensive Cancer Network” (NCCN) son EGFR, las translocaciones de la kinasa del linfoma anaplásico (*ALK*) o el homólogo 1 del oncogén del virus del sarcoma UR2 v-ros (*ROS*) o mutaciones en el homólogo del oncogén viral del sarcoma de la rata de Kirsten (*KRAS*) (14,30). Aunque otros como el PD-L1 o *BRAF V600E* también se recomiendan. (26)

La detección de estas mutaciones utiliza técnicas como la secuenciación génica, inmunohistoquímica, hibridación fluorescente in situ (FISH) o NGS (14,30). Una correcta detección de dichas mutaciones conductoras es importante a la hora de elegir el tratamiento, ya que estas mutaciones son en su gran mayoría mutuamente excluyentes; por esto los tratamientos que tendrían un gran efecto en tumores con una mutación pueden ser absolutamente ineficaces en tumores con otra. (14)

Las mutaciones relevantes de *EGFR* son aquellas que hacen al tumor sensible ante los TKIs. Las deleciones del exón 19 y una mutación puntual en el exón 21 (L858R) son las 2 más comunes, aunque hay muchas otras como las L861Q o G719X. Ante este tipo de tumores se utilizan erlotinib, gefitinib y afatinib como tratamientos de primera línea, estos incrementan la supervivencia libre de progresión pero no la supervivencia general. La aparición de resistencia a estos tratamientos está asociada con mutaciones en EGFR que la hacen insensible a los TKIs. La mutación T790M es una de las más comunes en CPNM y el tratamiento recomendado es Osimertinib. Las mutaciones en EGFR son bastante frecuentes, presentándose en el 10-20% de los pacientes caucásicos, llegando al 48% en pacientes de origen asiático (14,26)

Las translocaciones de *ALK* y *ROS1* también comunes, siendo crizotinib, un TKI de ALK, ROS1 y el receptor de factor de crecimiento del hepatocito c-Met el tratamiento de primera línea por defecto. Recomendando los derivados de segunda generación ceritinib y alectinib en caso de aparición de resistencia en ALK. Estas mutaciones se han visto en rangos que varían del 2 al 7% en el caso de *ALK* y del 1 al 2% en de *ROS* (14,26). En el caso de mutaciones en *KRAS* no hay tratamiento específico, aunque actualmente hay inhibidores de MEK en pruebas clínicas. Estas mutaciones en *KRAS* son bastante frecuentes en adenocarcinoma, habiéndose detectado en un 25% de los pacientes. (14)

Otra estrategia siendo evaluada hoy día son los inhibidores del receptor PD-1 o su ligando PD-L1 (14). Esta terapia busca desactivar la supresión de la activación de los linfocitos T mediante la activación de este punto de control inmunológico, esta terapia estaría dirigida a aquellos tumores con una alta expresión de PD-L1, teniendo como efectos secundarios una activación aberrante del sistema inmune en hasta un 30% de los pacientes, lo que requiere un especial cuidado en el uso de esta aproximación (26).

Los oncogenes descritos son los más usados en la clínica, pero no son los únicos puntos en los que se puede incidir; hay otras mutaciones conductoras que son vigiladas y sobre las que se investiga para dotar en el futuro a los médicos de más herramientas:

El homólogo del oncogén viral del sarcoma v-raf murino B1 (*BRAF*) codifica a otro miembro de las MAPK, su activación lleva a la fosforilación y activación de MEK y ERK. Las mutaciones más comunes son la T1799A, G469 y la D594G, aunque su impacto en el pronóstico del cáncer de pulmón es motivo de debate actualmente (22).

También se observan alteraciones de la ruta de PI3K/AKT en el cáncer de pulmón, las más frecuentes son la mutación de *PIK3CA* y la pérdida de PTEN, el gen supresor de tumores que regula negativamente la ruta. Sus efectos negativos en el pronóstico del cáncer de pulmón son claros, aunque su respuesta a las terapias estándar no está aún claras (22)

HER2 o erbB-2 es un miembro de la familia de receptores tirosín kinasa erbB, igual que EGFR, (también conocido como HER1), su ligando no ha sido descrito y es activado por homo- o heterodimerización con otros miembros de la familia de erbB. La activación constitutiva de este receptor lleva a la activación de las rutas de PI3K/AKT y MAPK (MEK). Se observa con mayor frecuencia en mujeres, no fumadoras y en adenocarcinoma, recientes estudios sugieren que terapias contra HER2 como los HER2-TKIs o anticuerpos contra este podrían ser beneficiosas en pacientes de cáncer de pulmón con esta mutación (22,28)

Las translocaciones de *RET* también pueden ocurrir con baja frecuencia en el CPNM, inhibidores de RET como el cabozantinib and vandetanib han mostrado eficacia en ensayos clínicos (22). Translocaciones para el gen del receptor de tirosina quinasa neurotrófico 1 y 2 (*NTKR1* y *NTKR2*) se encuentran en un bajo porcentaje de CPNM, actualmente inhibidores contra estos receptores como cabozantinib o entrectinib están en fases clínicas (28).

Los porcentajes concretos de estas mutaciones conductoras varía según el estudio o el origen de los casos, se muestra un ejemplo en la figura 14. La correcta detección y tratamiento del

tumor es una gran herramienta en estadios avanzados sobre la que hay una intensa investigación.

Mutaciones en genes supresores de tumores como: *TP53*, *STK11*, *CDKN2A8*, *KEAP1*, *SMARCA4*, *NF1*, *RB1* han sido también descritas; algunas como el *TP53* presentes en un gran porcentaje de los cánceres. Actualmente en la clínica no son terapéuticamente tratables (31).

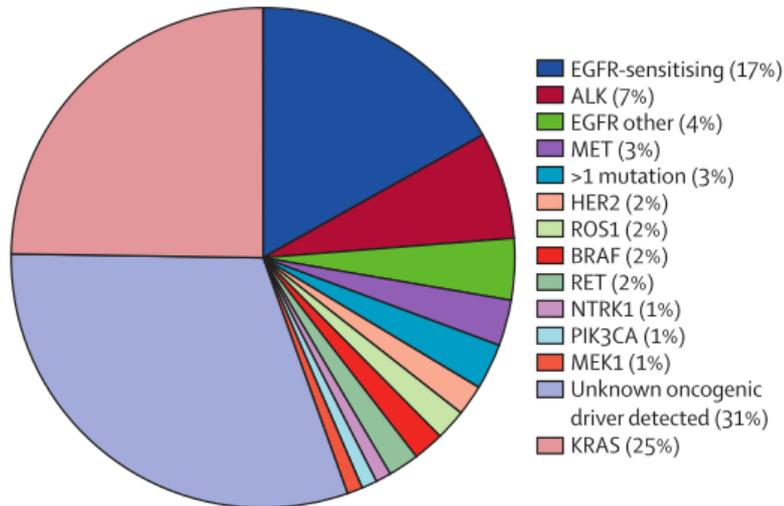


Figura 14. Frecuencia de las mutaciones conductoras en ADC, tomado de Hirsch et al., (28).

Como se ha comentado, mutaciones en determinados genes permiten a las células adquirir capacidades necesarias para su supervivencia, multiplicación y crecimiento; sin embargo, cabe añadir que los tumores están formados por poblaciones celulares diferentes que confieren heterogeneidad a la masa tumoral, y en esta heterogeneidad radica las características del tumor y la dificultad de su erradicación. La composición celular heterogénea de los tumores malignos consiste en: una masa de células que se dividen, diferencian y mueren; células del estroma; vasculatura infiltrante y células hematopoyéticas. Desde que se postuló, hace más de 150 años que el cáncer era una enfermedad basada en las células (2,3,32), la complejidad celular que forma la malignidad neoplásica ha sido ampliamente estudiada. Las complejidades subyacentes a la heterogeneidad tumoral son ahora foco de enorme interés (33).

Se ha descrito que un factor que contribuye a la heterogeneidad tumoral es la presencia de células madre tumorales (CMTs). Estas células con capacidad para iniciar tumores cuando se trasplantan en un ratón y propiedades de células madre, es una población minoritaria de células, situada en lo alto de la jerarquía tumoral, que presenta unas características específicas como: Alta capacidad de resistencia a los agentes quimioterápicos, alta capacidad iniciadora de tumores (CIT), así como de regenerar el tumor. Su presencia podría explicar las recidivas tras tratamientos aparentemente exitosos, y su alta CIT las hace muy peligrosas (34). A continuación se detallan las características de las CMTs, la población celular de estudio en esta tesis, así como algunos de los procesos biológicos relacionados con ellas como la TEM, que está relacionada con la adquisición de sus características (3).

2 Células madre tumorales.

El concepto de las CMTs las presenta como una subpoblación de células dentro del tumor que poseen la capacidad de autorrenovarse y generar los linajes heterogéneos de las células cancerosas. Estas células con propiedades de célula madre, son relativamente quiescentes y cada vez hay más evidencias que muestran que podrían ser las responsables de la metástasis, la recidiva, o la resistencia a fármacos (35,36). Los principales mecanismos de resistencia a fármacos de las CMT se muestran en la figura 15.

El uso del nombre célula madre tumoral hace referencia a varios hechos, el primero es el modelo inicial propuesto para este tipo de poblaciones. Se expuso que un cáncer no era una caótica mezcla de subpoblaciones de células en continua competencia entre ellas y con el sistema inmune, como defiende el modelo estocástico; sino que había una estructura jerárquica parecida a un tejido donde las células más indiferenciadas, las CMTs, serían las encargadas de generar una suerte de progenitores más diferenciados por división asimétrica; y que serían estos a su vez los que generarían el grueso de células “diferenciadas” del tumor (37).

Otro punto a favor de la existencia de las CMTs es el hecho de que las rutas que se han encontrado activas en ellas son rutas bastante específicas de las células madre embrionarias; por ejemplo, las rutas de WNT, Hedgehog (HH) y NOTCH. Dichas rutas regulan la proliferación, diferenciación, migración, destino celular y apoptosis de células madre del tejido de origen (38).

Además de esto las CMTs comparten más características con las células madre como la expresión de factores de transcripción específicos de células madre sanas, una alta actividad de reparación del ADN, una alta resistencia a la apoptosis o una alta expresión de transportadores de la familia ABC o un estado quiescente (39,40).



Figura 15: Mecanismos de resistencia a la quimioterapia de las CMT. Adaptado de Colak and Medema, 2014 (39).

2.1 Las CMT en tumores sólidos, modelos y controversias.

El concepto de CMT fue descrito por primera vez en leucemia. La primera evidencia experimental de la existencia de células madre tumorales fue en 1937 cuando Furth y Kahn inyectaron una sola célula leucémica de un ratón en un ratón endogámico y transmitieron la leucemia (41). En 1994, un experimento histórico demostró que solo una subpoblación de células cancerosas podía generar el cáncer en ratón inmunodeprimido (42). John Dick y su grupo aislaron células cancerosas de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) y separaron estas células en función de la expresión de CD34 y CD38. En este estudio, el trasplante de medio millón de células positivas para CD34 y negativas para CD38 (CD34⁺ CD38⁻) en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) indujo LMA en ratones en treinta días, mientras que la misma cantidad de células CD34⁺ CD38⁺ no indujo LMA. La subpoblación de células cancerosas que podrían transmitir cáncer se denominó células iniciadoras de leucemia y se pensó que se encontraba entre las células CD34⁺ CD38⁻. Inicialmente objeto de debate, el concepto de CMT se asentaba en 1997 cuando ya se proponía una organización jerárquica para la leucemia con esta población de células CD34⁺/CD38⁻ en la cúspide de ella (37). El hallazgo clave fue que solo dicha población CD34⁺/CD38⁻ era capaz de autorrenovarse ilimitadamente, iniciar y mantener el crecimiento del clon leucémico in vivo; así como diferenciarse en el resto de la población de células cancerosas. Estas capacidades llevaron a la conclusión de que las células madre cancerosas existían y formaban una subpoblación distinta del resto de células cancerosas (37,42,43).

Similitudes entre las células madre hematopoyéticas (CMH) y aquellas células iniciadoras de leucemia CD34⁺/CD38⁻ llevaron a sugerir que estas últimas derivaban de las CMH; las diferentes características de las CMT con respecto al resto de células tumorales y la existencia de una jerarquización en la población llevó a proponer que la leucemia seguía un modelo de CMT o clonal frente al estocástico, mostrado en la figura 16 (44). Los experimentos en ratones inmunocomprometidos SCID mostraron que estas células, con fenotipo CD34⁺/CD38⁻ eran capaces de replicar el tumor original; estas evidencias son cruciales para definir la base biológica de la heterogeneidad tumoral y sentar las bases de las CMT (42). En conjunto esta es la primera evidencia en el campo de las CMT de que un cambio genético específico está asociado con el cáncer y el trastorno es de naturaleza clonal.

Años más tarde este mismo tipo de población se describió por primera vez en un tumor sólido, en 2003 usando los marcadores CD44⁺/CD24^{-/low} las CMT fueron descritas en cáncer de mama (45). Tras este hallazgo, poblaciones de CMTs fueron descritas en otros tumores sólidos: en cerebro en 2004 (46), en colón en 2007 (47,48), en pulmón en 2008 (49,50) y en ovario en 2011 (51). Varios de estos tumores se describieron inicialmente por expresar el antígeno CD133, también conocido como prominin-1, en cerebro, colón, pulmón y ovario; sin embargo en varios de estos artículos se hace hincapié que, aunque la población CD133 positiva (CD133⁺) es aquella con mayor potencial para iniciar tumores, no todas las células de esta población pueden formarlos; incluso en la publicación inicial de la población de CMT en cáncer de ovario se remarca la heterogeneidad de las poblaciones CD133⁺, citando casos donde esta población no tiene capacidad iniciadora de tumores (51).

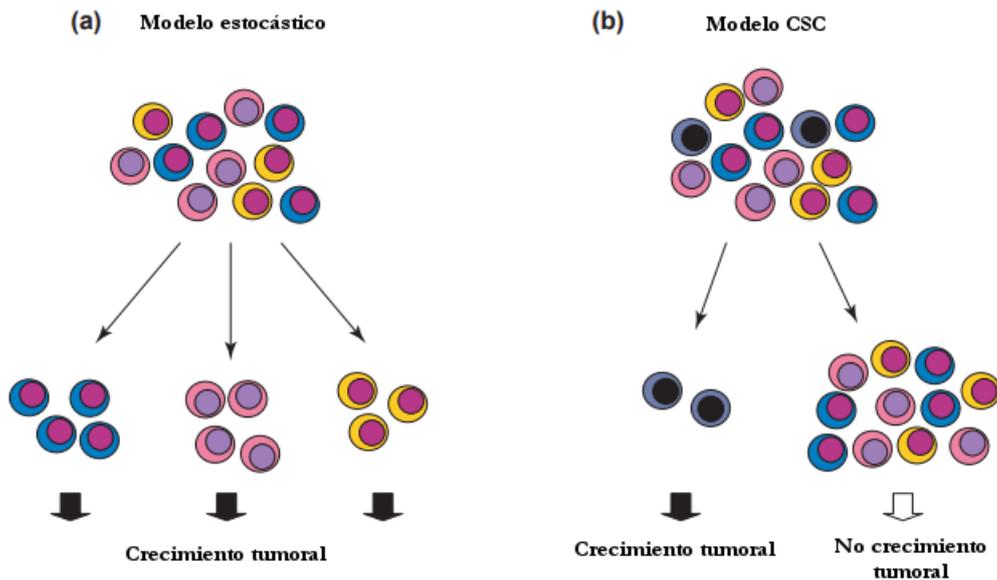


Figura 16: Modelo estocástico y modelo de CMT. En ambos se asume una heterogeneidad tumoral **(a)** En el modelo estocástico cada célula tiene una probabilidad similar de dividirse. En este modelo todas las células tienen el mismo potencial tumorigénico, lo que hace que todas las células tumorales sean equipotentes con la capacidad de autorrenovarse o diferenciarse, lo que conduce a la heterogeneidad del tumor **(b)** Existe una jerarquía donde las células de la cúspide es la subpoblación de células madre (CMT) que tiene la capacidad de generar un nuevo tumor, siendo capaces de regenerar el tumor original. Estas CMT tienen características diferentes al resto de células tumorales. Adaptado de Wang and Dick (44).

El modelo de las CMT podría no aplicarse en todos los cánceres. En los cánceres sólidos se ha descrito también que con solo el fenotipo no se puede aislar esta población de CMTs (52); además en otros tumores como en melanoma se ha visto que las células capaces de iniciar tumores en ratones inmunocomprometidos son altas, poniendo en duda si este modelo se aplica en todos los tumores y estadios (53).

El principal modelo de propagación de las células tumorales alternativo al clonal propuesto es el modelo estocástico, descrito formalmente en 1976. Este modelo describe la evolución de un tumor de una forma darwiniana, es decir las células evolucionarían tal y como evolucionaría una especie cualquiera ante un ambiente hostil; solo aquellos individuos/células que mejor se adapten a las condiciones sobrevivirían y se reproducirían/dividirían (54). El modelo de las CMTs aboga sin embargo por un sistema piramidal jerarquizado rígido parecido al presente en tejidos sanos (37). Esto hizo que inicialmente ambos modelos fuesen incompatibles; sin embargo esto cambió tras la descripción de que la reversión de células tumorales ya diferenciadas a más indiferenciadas con propiedades de CMTs era posible (55). En la figura 17 se puede apreciar un modelo cercano al consenso actual sobre el funcionamiento de esta población.

En la bibliografía hay también evidencias que apoyan este hecho; un trabajo de Gupta et al., publicado en 2011 (56) donde se estudian las líneas celulares de cáncer de mama SUM159 y SUM149 demuestra, apoyándose en un modelo matemático, que es imposible que la rápida regeneración de la subpoblación con características de célula madre en cáncer de mama $CD44^{hi}/CD24^{neg}/EpCAM^{low}$ fuese debida a la división de dicha subpoblación; sino que existía un equilibrio entre las 3 subpoblaciones descritas que tendía a recuperarse, y que además era diferente en función de la línea celular usada. En este artículo también se constató la diferente resistencia a fármacos quimioterápicos de las 3 poblaciones (56). No es el único caso, también en cáncer de mama otro grupo demostró que la población $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ podía generarse a partir de una subpoblación con células $CD44^{-}$; mostrando además que estas no procedían de un posible remanente de células $CD44^{+}$, sino que se desdiferenciaban a partir de las células $CD44^{-}$ (57).

En referencia al modelo propuesto de CMTs cabe destacar algunas de las observaciones realizadas en la “Year 2011 Working Conference on CSCs for CSC terminology”. La falta de una terminología unificada y de un modelo celular claro es lo que ha generado buena parte de la controversia sobre la existencia de las CMT en tumores sólidos. Hay un consenso general sobre que un tumor se origina a partir de una única célula que ha adquirido mutaciones, pero un error frecuente es asociar a las CMTs detectadas con esta célula original; ya que estas CMTs podrían ser subclones que han adquirido mutaciones diferentes y se han desdiferenciado en una nueva progenie de CMTs. Destacan también la alta heterogeneidad y las limitaciones de los ensayos comúnmente usados para la detección de las CMTs (52).

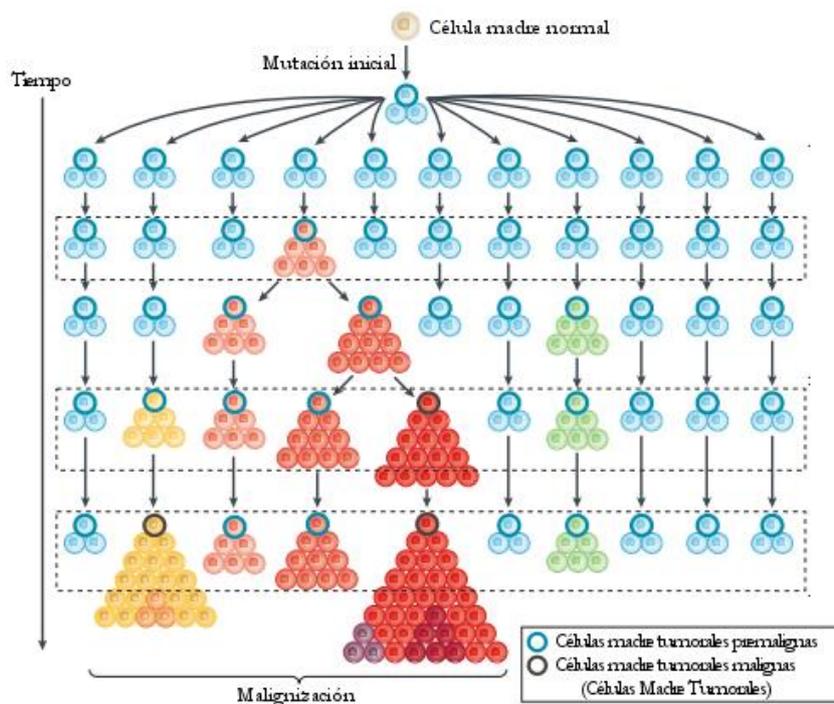


Figura 17: Modelo de evolución de CMTs dentro de un tumor propuesto en la “Year 2011 Working Conference on CSCs for CSC terminology”. Las CMT siguen formando parte de la cúspide de su jerarquía, pero la evolución de un tumor puede dar lugar a la aparición de varias de estas jerarquías y nuevas CMTs a partir de células de la masa tumoral. Adaptada de (52)

Con esta idea de un férreo sistema tisular jerarquizado, la reversión de un estado diferenciado a uno más indiferenciado era percibida como una gesta celular prácticamente imposible; no obstante Yamanaka demostró en 2006 que con solo 4 factores de transcripción (los ya conocidos como factores de Yamanaka Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4) se pueden revertir fibroblastos de ratón a células madre pluripotentes inducidas (iPS); mostrando un gran parecido en morfología y capacidades a las células madre embrionarias de ratón (58). Se describió posteriormente que en células humanas la expresión del factor de transcripción Nanog también era necesario (59). Esto abre la posibilidad de que, con los estímulos adecuados, las células de un tumor sean capaces de pasar a estadios menos diferenciados.

De hecho hay autores que sostienen que el concepto de CMT es más un proceso celular de desdiferenciación que muchas células de un tumor pueden llegar a sufrir que una población con unos límites bien definidos (60). Estas características de las CMT dificultan su aislamiento y estudio; lo cual no ha evitado una intensa investigación sobre terapias dirigidas a esta población, las cuales se esperan que ayuden a una mejor erradicación y control del tumor (60).

2.2 Estrategias de identificación clásicas de las CMT.

Para la identificación de las CMTs se utilizan diferentes técnicas: el estudio de proteínas de superficie específicas de estas células, la población lateral o “side population” (SP) (61), la actividad de la ALDH1A1 (61) y el uso de cultivos de baja adherencia que dan lugar al crecimiento celular en 3 dimensiones son las principales (62). Otras estrategias como el estudio de los potenciales de membrana, reporteros asociados a genes de CMTs, estudio de la autofluorescencia, trazadores de membrana, inmunoselección o ensayos funcionales de invasión o resistencia a fármacos también son utilizados (62). A continuación, se describen brevemente algunas de estas técnicas.

El estudio de proteínas o marcadores de superficie se basa en identificar aquellos marcadores específicos de las CMTs, diferentes al resto de la población de células cancerosas; esta estrategia ha tenido diferentes niveles de éxito en diferentes cánceres, aunque tiene la desventaja de que cambios fenotípicos que hagan que dejen de expresar los marcadores de superficie las harían indetectables. La técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) se utiliza para separar estas poblaciones celulares mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen a los marcadores de superficie específicos de las CMTs conjugados a un marcador fluorescente. La gran ventaja de esta técnica es la capacidad para aislar subpoblaciones minoritarias de células vivas, permitiendo confirmar posteriormente el potencial de estas mediante ensayos funcionales (61).

Otra técnica para aislar CMTs es la identificación de la SP de una población de células cancerosas, se puede ver un ejemplo en la figura 18. La SP está compuesta por aquellas células capaces de expulsar el colorante fluorescente de ADN Hoesch 33342 gracias a la actividad de los transportadores ABC; esta característica brinda una mayor resistencia a las terapias ya que permite la expulsión de los fármacos y es una característica de las CMTs ampliamente aceptada (61).

La alta actividad de la enzima ALDH1A1, un marcador de muchas células madre sanas, es otra potencial característica de las CMTs que se utiliza para identificarlas. Esta enzima cataliza la conversión de retinol en ácido retinoico, pero también puede actuar sobre muchos otros aldehídos. Esta es una de las razones por las que ofrece ventajas a las CMTs, puede modificar e inactivar fármacos que actúan a partir de intermedios aldehídos, como el Cisplatino. De nuevo el citómetro de flujo junto con un ensayo funcional, la transformación de un sustrato en una forma acetato fluorescente detectado por el canal verde (λ 570/530 nm), es el mecanismo de detección usado para este ensayo (61).

Otra técnica ampliamente utilizada para aislar CMTs es la generación de esferoides. El uso de cultivos de baja adherencia para el crecimiento en tres dimensiones se basa en un trabajo de Reynolds y Weiss. En este trabajo se aislaron potenciales precursores de neuronas y astrocitos usando un sustrato de baja adherencia y varios factores de crecimiento: bFGF, EGF y el factor de crecimiento nervioso (NGF), consiguiendo los primeros cultivos de neuroesferas (63). Esta estrategia aplicada a los tumores permite la generación de esferas tumorales que está enriquecida en células con propiedades de CMT; estas células han demostrado la capacidad de iniciar esferas a partir de una célula única, un fenotipo más indiferenciado, agresivo, y quimiorresistente (62).

Otra estrategia usada en este campo son los trazadores, como el PKH-26, que permiten saber el número aproximado de divisiones que ha sufrido una célula; esto permite seguir aquellas células más quiescentes de una población tumoral, aquellas en lo alto de la jerarquía y, según esta teoría, uno de los mayores objetivos terapéuticos (62). El uso de trazadores se usó en el CPNM para la identificación de una jerarquía en la población de células cancerosas con una buena correlación con la expresión de los marcadores de superficie CD133 y CXCR4 (64). Hoy día la tecnología para la caracterización de célula única es de elevado coste; pero en el futuro la secuenciación de células individuales dentro del tumor podría ayudar a comprender las diferentes subpoblaciones, e incluso tener un papel importante en la elección de terapias (65).

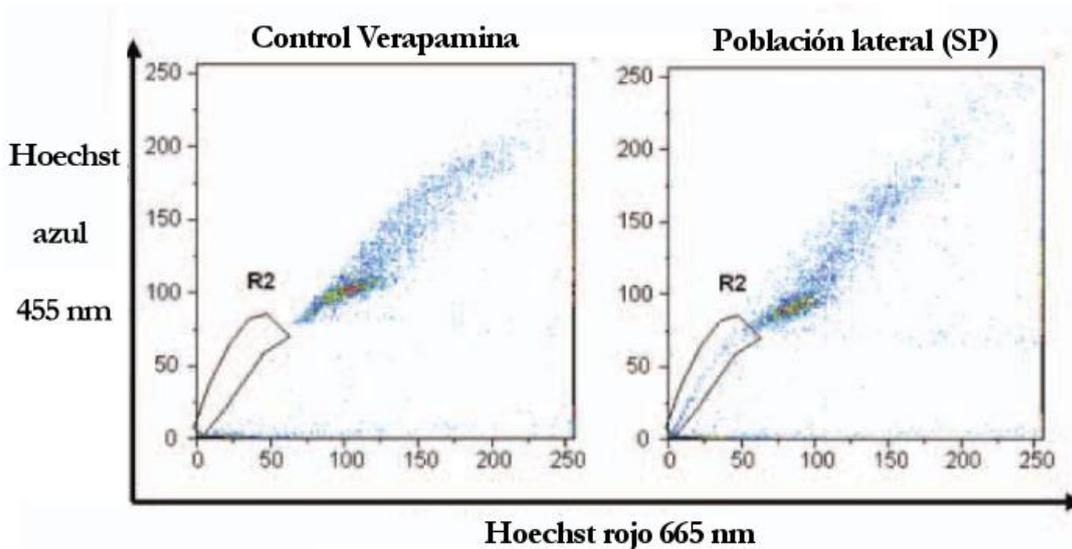


Figura 18: Ensayo clásico de detección de la “Side Population” En el diagrama de puntos de la derecha se observa esta población (región R2) en la parte inferior. Cuando las células se tratan con inhibidores de los transportadores ABCG2 como verapamil (diagrama de puntos de la izquierda) la población R2 desaparece ya que las células no pueden expulsar el Hoechst y por tanto se comportan como el resto de células. Imagen adaptada de Greve et al., (61)

Por otro lado, los xenoinjertos de estas poblaciones celulares en ratón son uno de los ensayos más importantes en el campo de las CMTs. Una población de CMT por definición debe tener capacidad iniciadora de tumores, capacidad que normalmente se comprueba mediante este ensayo, la inyección de potenciales CMTs en ratón inmunocomprometido NOD/SCID. Aunque los detractores de estos ensayos afirman que el uso de sistemas inmunodeprimidos y extraños al tumor podría permitir a células sin potencial CMT también dividirse (53,66–68).

Sin embargo, no hay duda de que los xenoinjertos tienen algunas ventajas sobre los cultivos celulares en adherencia tradicionales, los segundos someten a las células a sustratos de plástico, medio rico en nutrientes y concentraciones altas de oxígeno; condiciones más alejadas de su contexto original que los modelos *in vivo* o xenoinjertados. Además las líneas celulares, incluso en número de pases bajos en el cultivo celular, tienden a presentar modificaciones en la expresión de genes y una reducción de la heterogeneidad; mientras que

en los xenoinjertados, especialmente si se implanta un fragmento completo de tumor resecado, mantienen la heterogeneidad del tumor primario en un alto porcentaje (53,68).

Dadas las características de las CMTs, su implicación en la progresión del cáncer y resistencia a las terapias convencionales, la búsqueda de fármacos que puedan atacarlas está en auge; además de los fármacos hay otras estrategias que se han contemplado como el uso de anticuerpos dirigidos, terapia antiangiogénica (69) o incluso viroterapia (70).

2.3 CMT y Transición Epitelio Mesenquimal)

La Transición epitelio mesenquimal (TEM) es un proceso mediante el cual las células llevan a cabo una serie de cambios fenotípicos y genotípicos en los que pierden las características epiteliales en favor de características mesenquimales. La pérdida de las uniones célula-célula epiteliales, el cambio de polaridad y la reorganización del citoesqueleto son las alteraciones más importantes de este proceso; alteraciones que favorecen un aumento de la motilidad y la invasividad (71).

El TGF- β es uno de los mediadores más potente de la TEM, esta ruta señala a través de SMAD, PI3K y las MAPK. Varios receptores tirosina kinasa también median la TEM, siendo muy relevantes los activadores FGF, el IGF-1 y el EGF (8,72).

Algunas de las proteínas clave involucradas en la TEM también lo están en el cáncer. Por ejemplo, represión de E-cadherina y, activación de la señalización de β -catenina; activación de factores de transcripción de las familias *SNAI*, *ZEB* y *TWIST* que potencian la represión de los marcadores epiteliales y activan la transcripción de proteínas asociados con el fenotipo mesenquimal como N-cadherina, fibronectina o vimentina (71–73).

La TEM es un proceso reversible, y las células mesenquimales pueden volver al estado epitelial al someterse a la transición mesenquimal epitelial. TEM y su inverso ocurren durante el desarrollo normal y durante la progresión del cáncer (74). Aunque la TEM en si no es suficiente para malignizar las células, si promueve la invasión en células con mutaciones malignizantes, como la delección de p53 o mutaciones activadoras en *KRAS* (75).

La TEM y las CM son 2 conceptos que están muy relacionados; varias de las rutas de señalización que activan la TEM son WNT, NOTCH y HH, rutas también clave en el mantenimiento del fenotipo CM y CMT (76); otros eventos como la hipoxia también pueden activarla (71). La TEM tiene estadios intermedios entre una célula con características totalmente epiteliales o mesenquimales y, como ya hemos comentado, no es un proceso unidireccional. En el cáncer la TEM se ha asociado principalmente a la metástasis, siendo la transición mesenquimal epitelial necesaria para el establecimiento de las metástasis. Aunque se ha visto también TEM dentro del contexto de los tumores primarios, y se ha descrito que aquellos tumores con células con TEM parcial tienden a ser más agresivos (73,76,77).

En la TEM también participa todo un conjunto de células malignizadas por el microambiente tumoral que secretan desde metaloproteasas a citoquinas, y que favorecen la migración o retroalimentan el fenotipo; incluso las propias células cancerígenas pueden secretar TGF- β y TNF, activando una señalización autocrina que les permite mantener el fenotipo, esto ha sido descrito específicamente en cáncer de pulmón (78).

En cáncer de pulmón, así como en otros cánceres como mama o estómago, se ha descrito que la señalización de IGF, asociada a la TEM, señala a través de las rutas PI3K/AKT y las MAPK; llevando a la activación de marcadores de esta como *ZEB1/2*, *SNAIL1* and *TWIST1* (72). En la Figura 19 se puede ver un esquema resumiendo las diferentes rutas de señalización que inducen la TEM en el contexto del cáncer.

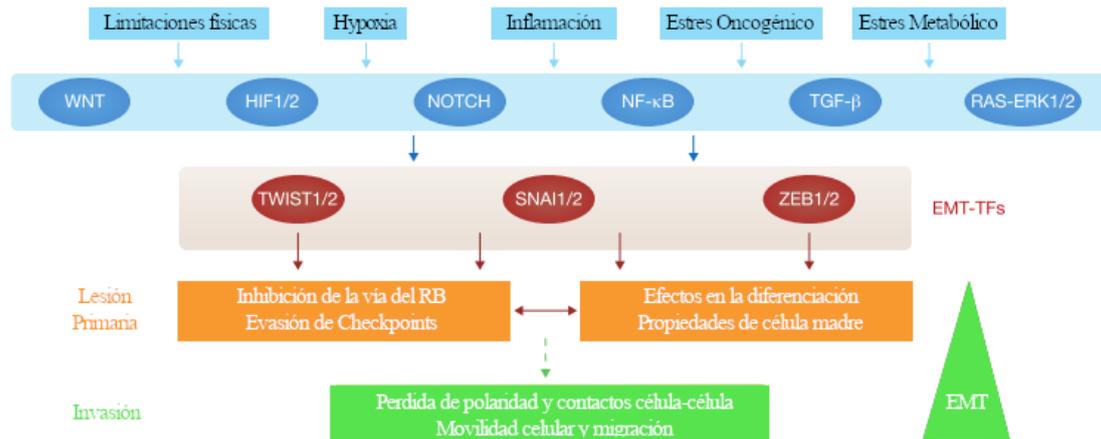


Figura 19. Esquema del proceso de estimulación de la TEM en el contexto del cáncer. Se muestran algunas rutas asociadas a la TEM, estrés asociado a la tumorigénesis, los factores de transcripción activados y el proceso de malignización en presencia de mutaciones. Tomado de Puisieux et al., (76)

El solapamiento de estas rutas de señalización puede ser importante a la hora del tratamiento. Como hemos comentado en el apartado general las mutaciones en EGFR son mutaciones conductoras en un porcentaje alto del CPNM; se ha visto que IGF-1, mediante la activación de TEM y sus rutas, confiere resistencia a las TKIs de EGFR a través de la activación de la TEM y su inductor *SNAIL1* (72).

Veremos más sobre la TEM dentro de los apartados de las diferentes rutas y factores de transcripción ya que como he comentado la TEM y las CMT están bastante relacionadas.

3 Rutas de señalización clave en las CMT y el CPNM.

Varias de las principales rutas de señalización relacionadas con las CMT en CPNM son las rutas de Notch, WNT, HH, MAPK y PI3K/AKT/mTOR. La pérdida de regulación de estas rutas se ha relacionado con diferentes tipos de cáncer, incluyendo el CPNM. En este apartado se introducen brevemente:

La ruta de Notch es una ruta de señalización celular implicada en las interacciones célula-célula durante el desarrollo embrionario, es una ruta evolutivamente muy conservada; de hecho los componentes centrales de esta ruta y el modelo básico de la ruta fueron primero descritos en *Drosophila* y *C. elegans*; posteriormente se comprobó que había muy poca diferencia con la de humanos (79).

La ruta de WNT es una ruta implicada en muchos procesos esenciales como la regulación del nicho de células madre, la migración celular, la diferenciación en el desarrollo o la curación de heridas y la homeostasis de tejidos en el adulto (80).

La ruta de HH es una ruta muy importante en el desarrollo humano, participando en eventos como el desarrollo del tubo neural, la yema de las extremidades y la yema pulmonar; también está implicada en el desarrollo de multitud de otros órganos, procesos y estructuras (81). En esta ruta no es solo importante su presencia y ausencia, sino también la presencia de gradientes para el correcto desarrollo del embrión (82). Participa además en algunas funciones en el adulto como la autorrenovación de las células madre, la homeostasis de tejidos (83), la reprogramación metabólica de adipocitos (81) o la curación de heridas.

Las ruta de las MAPK se basa en cadenas de quinasas conservadas evolutivamente que vinculan las señales extracelulares a la maquinaria que controla los procesos celulares fundamentales como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, la migración y la apoptosis (84).

La ruta de PI3K/AKT/mTOR se activa por factores de crecimiento a través de RTK o Tirocinas kinasas no receptoras. Los residuos fosforilados sirven de anclaje para proteínas adaptadoras y para PI3K (4).

3.1 Ruta de Notch.

La ruta de Notch tiene un papel fundamental en el desarrollo del pulmón, coordinando el destino celular de las células desde el inicio de la formación de este órgano. Esta descrita su presencia en varias patologías como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la hipertensión arterial pulmonar o el cáncer de pulmón (85).

El receptor Notch activo es un heterodímero procesado, activado por la proteólisis gracias a una furina durante el transporte a la membrana (85,86). En mamíferos hay 4 receptores Notch: Notch1, Notch-2, Notch-3 y Notch-4; y 5 ligandos de la familia DSL (Delta/Serrate/Lag-2): Delta-like 1 (Dll1), Dll3, Dll4, Jagged-1 y Jagged-2 conservados a lo largo de la evolución (79) (85,86). Las proteínas Numb y Sanpodo guían las divisiones asimétricas dependientes de Notch (86)

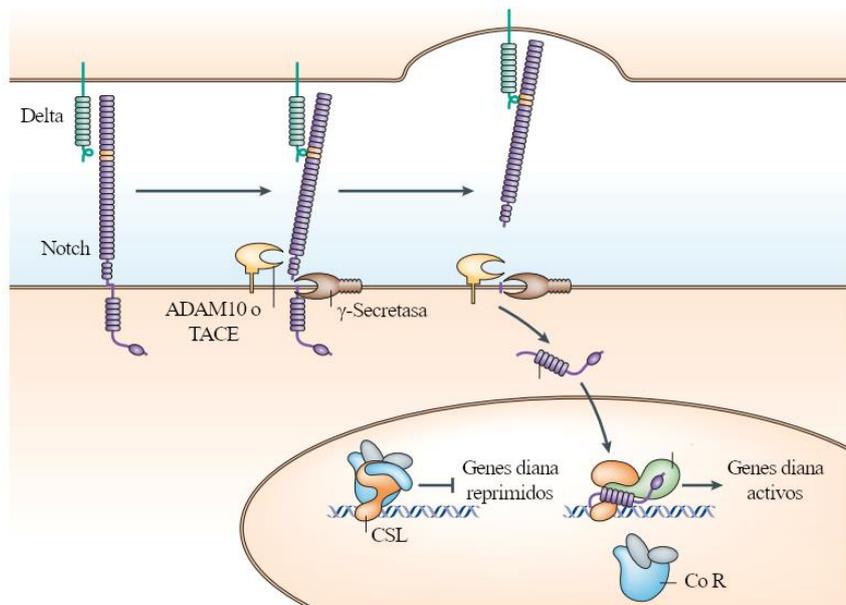


Figura 110: Esquema básico de la ruta de Notch donde se pueden apreciar las 2 proteólisis y la formación del complejo con CSL, Mam y otros coactivadores. Tomado de Bray 2006 (87)

Todos los receptores de Notch constan de las mismas estructuras: 36 repeticiones EGF-like, 3 repeticiones Lin-12/Notch (LNR), un dominio RAM de unión al factor de transcripción CSL, una secuencia PEST y 7 repeticiones Ankyrin-like (88). La mayoría de los genes diana de Notch se activan mediante una ruta dependiente de los factores de transcripción CSL, pero hay también una ruta independiente de estos (88).

Una vez que el receptor Notch se une a su ligando, para lo que son necesarias las repeticiones EGF-like, reciben 2 proteólisis adicionales en tándem. Estas son llevadas a cabo por una metaloproteinasas ADAM y por una γ -secretasa (86). Dichas proteólisis liberan el fragmento intracelular (NICD), este fragmento viaja al núcleo y forma un complejo con CSL, Mastermind y otros coactivadores como las acetiltransferasas CBP/p300 o complejos remodeladores de cromatina (86).

Ahora este complejo conocido como RBPJ pasa de represor a activador (89). Quinasas como la GSK-3 β , G-CSF y la CDK8 fosforilan al fragmento intracelular N-terminal de Notch (NICD) con diferentes efectos en su estabilidad y actividad (86). Este mecanismo mediante el cual es el propio NICD el que se une al complejo hace que no pueda haber una amplificación de la señal en esta ruta (88). Además de la interacción ligando-receptor en *trans* descrita puede haber también interacción en *cis* si el ligando está en la misma célula; sin embargo esta interacción es inhibitoria al no permitir la proteólisis de Notch (90). Se muestra un esquema de esta ruta de señalización en la figura 110.

La actividad de la ruta de Notch es altamente dependiente del contexto celular, pudiendo tanto promover la proliferación o la apoptosis en función de este o activar diferentes genes o respuestas celulares (86,91). Los genes *HESR*, que codifican represores transcripcionales, son los principales genes activados por esta ruta, otros genes que activados son *MYC*, *CCND1*,

CDK5, *P21*, *SNAI1* o el receptor *PDGFRβ* (91); estos genes pueden a su vez modular la respuesta celular al activar sus propios genes diana o regular negativamente la transcripción de Notch inhibiendo la unión del complejo RBPJ al ADN (91).

Aunque la ruta de señalización de Notch es conocida, no lo es tanto el rol de los marcadores individuales; se ha sugerido que Notch 1 y 2 pueden divergir ligeramente de Notch 3 y 4. De hecho Notch3 ha mostrado no ser un buen activador de HES-1, el gen diana “canónico” de la ruta de Notch (89,92).

La activación de la ruta de Notch está asociada a células madre o células poco diferenciadas; hecho congruente dado su papel regulando las divisiones asimétricas, una característica muy importante de estas (86). Aún no se entiende aún bien el papel de Notch en la apoptosis, se ha descrito que esta ruta puede dirigir a las células hacia la división o la apoptosis en función del contexto celular (86).

3.1.1 La ruta de Notch en Cáncer.

En el CPNM se han descrito la presencia de los receptores Notch, en especial Notch3, y se han asociado con una menor supervivencia y mayor resistencia a la quimioterapia (85). En el contexto del cáncer de pulmón esta descrita su interacción con varias rutas importantes: activa la ruta de las MAPK, se activa por las ruta de WNT (85) y el TGF- β (89,91), interacciona con la ruta de NF- $\kappa\beta$ (88), se activa también por hipoxia y participa en la angiogénesis. La ruta de Notch aumenta la autorrenovación de las CMTs, enriquece los cultivos en poblaciones ricas en células con características de CMTs, está asociada a fenotipos más resistentes a fármacos e incluso incrementa la agresividad de un fenotipo TEM (85,89). Esta ruta también está implicada en la resistencia de las células CD133⁺ ante el cisplatino (93,94). Incluso se ha descrito en un modelo murino que la coexpresión de NICD y c-Myc lleva a al desarrollo de adenocarcinoma (85).

La sobreexpresión de Notch3 ocurre en otros tipos de cánceres como cervix, ovario, carcinomas hepatocelulares, melanoma o próstata; en la variedad CCE se ha descrito una menor expresión de este marcador (89). Hay, sin embargo, algunos cánceres como melanoma o próstata donde Notch actúa como supresor de tumores (88).

3.2 La ruta de WNT.

La ruta de WNT regula múltiples actividades en el pulmón dependientes del contexto celular específico (95). WNT señala a través de 3 rutas: la canónica, la no canónica de polaridad de células planares y la ruta no canónica dependiente de calcio. La señalización a través de WNT es el resultado de la señalización a través de las 3 rutas (80), se puede ver un esquema de estas rutas de señalización en la figura **111**.

Los receptores de la ruta de WNT son los receptores Frizzled, existiendo 10 genes diferentes en mamíferos; son receptores con 7 hélices transmembrana, un dominio N terminal con un dominio rico en cisteína (CRD), así como un dominio C terminal donde se realizan las interacciones con las proteínas citosólicas (96). Los correceptores de esta ruta son las LRP, codificadas por 12 genes y necesarias para la activación de esta ruta. Las LRPs son proteínas transmembrana tipo I, de un solo paso que tienen en el fragmento C terminal citosólico

dominios fosforilables importantes para su función. Por ejemplo, en el caso del LRP5 y 6 tienen un motivo rico en prolinas que es fosforilado por la GSK-3 β (96).

En la ruta canónica las proteínas Wnt se unen a su receptor Frizzled y a los correceptores LRP5 y 6 en la ruta canónica; esta unión lleva a la fosforilación de Dishevelled (DVL), el reclutamiento de axina-1 a la membrana y la inhibición del complejo de destrucción de β -catenina; formado por Axina, APC y las quinasas CK1a y GSK-3 β . En ausencia de señalización por Wnt este complejo de destrucción está activo, fosforilando la β -catenina; la cual es reconocida entonces por la β -transducina, parte de un complejo ubiquitin-ligasa; acabando con su destrucción por el proteasoma (80).

Hay descritos varios mecanismos para la inactivación del complejo de destrucción de β -Catenina: La inhibición competitiva mediada por el extremo N-terminal de los LRPs que actuaría como pseudosustrato de la GSK-3 β ; la endocitosis del complejo de destrucción unido a DVL; un cambio de conformación en la axina, que llevaría a la separación e inactivación del complejo de destrucción de β -catenina (96).

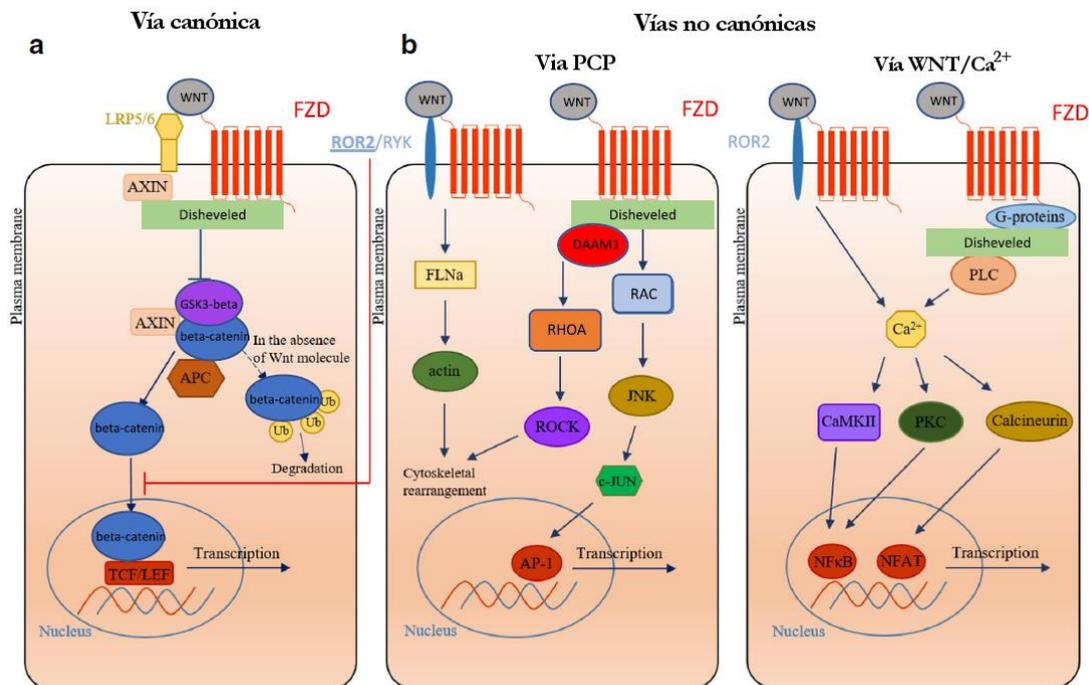


Figura I11: Vías canónica y no canónicas de la ruta de Wnt, tomado de Rapp et al., (95).

La señalización por la vía canónica lleva a la estabilización de β -catenina; la cual puede entonces migrar al núcleo para unirse a los factores de transcripción TCF/LEF y reclutar varios coactivadores; siendo los más importantes la proteína p300 y la proteína de unión a CREB (CBP) (80,96). A través de la ruta canónica se señalizan los procesos de autorrenovación, proliferación y diferenciación (97) y la activación de esta puede llevar a la sobreexpresión de genes importantes en el cáncer y las CMT como *CCND1*, *FOXM1*, *MYC* y *YAP/TAZ*; además de inducir la secreción de factores de crecimiento como los FGFs, ligandos de Kit y el VEGF, con un papel en la modulación del microambiente tumoral (80,96,97).

En la ruta no canónica de polaridad de células planares se activan las GTPasas RhoA, RAC y Cdc59 también a través de DVL; mediando por tanto las respuestas asociadas al citoesqueleto, la adhesión y la migración (80), a través principalmente de la activación de la kinsasa N-terminal de c-Jun (JNK) (95,97); aunque también se ha descrito la sobreexpresión de YAP/TAZ por esta vía (97). La ruta no canónica dependiente de calcio señala a partir de 2 receptores Frizzled alternativos, RYK y ROR, activando posteriormente la quinasa de calmodulina II (CaMK2), JNK y la PKC (80,95); esta ruta está implicada en el mantenimiento del estado de célula madre y la modulación del citoesqueleto, además se ha descrito que puede activar PI3K-AKT incluso en ausencia de señalización canónica (97).

3.2.1 La ruta de WNT en las CMT e intercomunicaciones relevantes.

La ruta de WNT es importante en el contexto de las CMT, se ha descrito que marcadores de CMT como el CD44, CD133, Oct4 o CD24 están sobreexpresados tras la activación de esta ruta; además, otros marcadores de CMT como EpCAM pueden potenciar la señalización canónica de WNT/ β -catenina mediante la proteólisis intracelular controlada (RIP) y la translocación nuclear de su fragmento C-terminal (97,98).

La ruta de WNT participa en una señalización conjunta junto a otras rutas, habiéndose descrito intercomunicaciones con las rutas de FGF, NOTCH, HH y TGF- β . Los receptores no canónicos ROR1 y ROR2 pueden ser fosforilados por otras TK como aquellas codificadas por *EGFR*, *ERBB3* o *MET* (97). También hay intercomunicaciones con Notch o las MAPK; y otros factores como la hipoxia o altos niveles de glucosa también pueden activar esta señalización (99). Estas pueden tener un efecto importante en el tumor, por ejemplo en modelos de ratón de cáncer de pulmón que la activación conjunta de *KRAS* y la ruta de WNT lleva al incremento del tamaño del tumor (95).

En el contexto de las CMTs tanto la ruta canónica como la no canónica pueden participar en la invasión y metástasis; ambas rutas pueden llevar a la sobreexpresión de *SNAI1*, reprimiendo genes epiteliales como la *CDH1* y facilitando el inicio de la TEM (97).

Una importante intercomunicación entre rutas de señalización es el de la ruta de WNT con p53 y los mecanismos de reparación del ADN. La presencia de β -catenina gracias a la activación de la ruta de WNT lleva a la activación p53 a través del eje ARF/Mdm2/p53; en este ARF se une y promueve la degradación de Mdm2, lo que lleva a la acumulación y activación de p53 y su consiguiente respuesta celular. La presencia de β -catenina lleva también a la activación del mecanismo de respuesta al daño del ADN e induce la expresión de proteínas como p21, p53 o p16. Se ha observado además la interacción molecular entre p53 y β -catenina y su translocación al núcleo donde participa en la respuesta de p53; esto a su vez evita que la quinasa GSK-3 β pueda fosforilar a β -catenina para inducir su degradación vía ubiquitina-proteasoma; aunque por otro lado p53 activa a SIAH-1; otra ubiquitina ligasa que promueve la ubiquitinación y degradación de β -catenina estableciendo una retroalimentación negativa (100).

Otra intercomunicación relevante con la ruta de WNT es la de la proteína de superficie EpCAM o CD326, un potencial marcador de CMTs. EpCAM participa en una ruta de transducción de señales en la que sufre RIP, compartiendo tanto componentes de la ruta de WNT como dianas

(101–103). Una de las dianas más importante es *MYC* (101), el cual a su vez promueve la síntesis de las Ciclinas D y E (102). El fragmento intracelular de EpCAM forma complejos proteína/ADN en sitios consenso para Lef-1; y hay otros genes relacionados con el establecimiento o mantenimiento de poblaciones de células indiferenciadas como *nanog*, *sox2*, *oct4* y *kfl4*, cuyos genes son dianas directas de EpCAM (103).

Se han descrito además otras intercomunicaciones con varias de las rutas de señalización de las CMTs. Wnt regula a *Hes-1*, uno de los genes diana más importantes de la ruta de Notch; esta regulación se produce a través de la disminución de la ubiquitinación de Notch-1 al interaccionar este con la β -catenina, promoviendo que el dominio intracelular de Notch se transloque al núcleo (104).

3.3 La ruta de Hedgehog.

Muy bien estudiada en mosca de la fruta, ratón y pez cebra (*D. melanogaster*, *M. musculus* y *D. Rerio respectivamente*), la ruta de Hedgehog (HH) esta conservada a lo largo de la evolución; aunque en vertebrados se presentan algunas estructuras adicionales, así como duplicaciones de varios genes (105).

Entre las proteínas más importantes en vertebrados encontramos: los receptores Patched (Ptch1 y Ptch2) con roles parcialmente redundantes; los co-receptores Cdo y Boc, también con roles parcialmente redundantes; las proteínas inhibidoras Hhip1 y Sufu; Kif7, con un papel inhibidor o activador dependiendo del resto de señales de la ruta; los ligandos Hedgehog SHH DHH e IHH (Sonic, Desert e Indian) y las proteínas Gli (Gli1-3) con dominios activadores y represores. Gli3 actúa principalmente como represor de la ruta mientras que Gli 1 y 2 actúan sobre todo como activadores. En mamíferos esta ruta se organiza alrededor del cilio primario (81,105). La cascada de señalización de esta ruta culmina en un cambio en el balance entre las proteínas Gli activadoras y represoras (106).

Las proteínas HH, ligandos de Ptch, sufren varias modificaciones antes de su secreción; la proteína de 45 kDa es cortada en 2 péptidos. La parte N-terminal, el péptido activo, es modificada añadiendo colesterol y ácido palmítico; siendo además translocada a la membrana celular (107). Esta parte lipídica hace que esta proteína sea altamente insoluble y requiera de la participación de otras proteínas para su secreción, siendo la más importante Disp1 (82,105). Las proteínas HH secretadas pueden promover una señalización autocrina o paracrina (106).

El receptor de la ruta canónica son los receptores Ptch. El receptor Ptch en ausencia de HH está inhibiendo a Smo, en este contexto sobre Ptch actúan como inhibidoras las proteínas Kif7 y Sufu (81,107), así como Hhip1 que compite competitivamente con HH por el receptor (81). Hhip1 es un gen diana de esta ruta por lo que la propia ruta de HH tiene un bucle de feedback negativo directo (81). La unión de HH a Ptch lleva a la internalización y destrucción de ambos en los lisosomas, lo que evita que Ptch siga ejerciendo su actividad inhibidora sobre Smo. Ptch es una diana de su propia ruta, por lo que su transcripción lleva a un segundo bucle de retroalimentación negativo que evita una activación anómala de la ruta (106).

Tanto Ptch como Smo son receptores transmembrana: Ptch es un receptor con 12 hélices transmembrana y 2 bucles extracelulares, Smo es un miembro de la superfamilia de los

receptores asociados a proteínas G con 7 helices transmembrana (83). No se conocen el mecanismo exacto por el que Ptch inhibe a Smo, aunque dado que 1 molécula de Ptch puede inhibir a unas 50 moléculas de SMO se sabe que no es por interacción directa (82).

La actividad de varias quinasas es fundamental para la activación de esta ruta de señalización. Todas proteínas Gli tienen un dominio activador C-terminal, Gli2 y Gli3 tienen además un dominio represor N-terminal (83)(82). En ausencia de Hh, Gli2 y Gli3 son fosforiladas por las quinasas PKA, CK1 y GSK-3; esto lleva a la eliminación del fragmento activador y la degradación de estas proteínas Gli (82,106,108). La unión de HH hace que dichas quinasas dejen de inhibir a los factores de transcripción Gli; tras esta unión receptor-ligando varias de ellas pasan a fosforilar y activar a Smo (106,108) (figura 112).

Tras la activación de la ruta, las proteínas Gli migran al núcleo donde activan a sus genes dianas; en ausencia de ligando hay una mayor presencia de formas Gli represoras que migran al núcleo e inhiben a estos. La proteína inhibidora Sufu también puede unirse e inhibir estos mismos promotores (106). Entre los genes activados por esta ruta tenemos a *PTCH1*, *PTCH2*, *HHIP1* y *GLI1* (81–83,106).

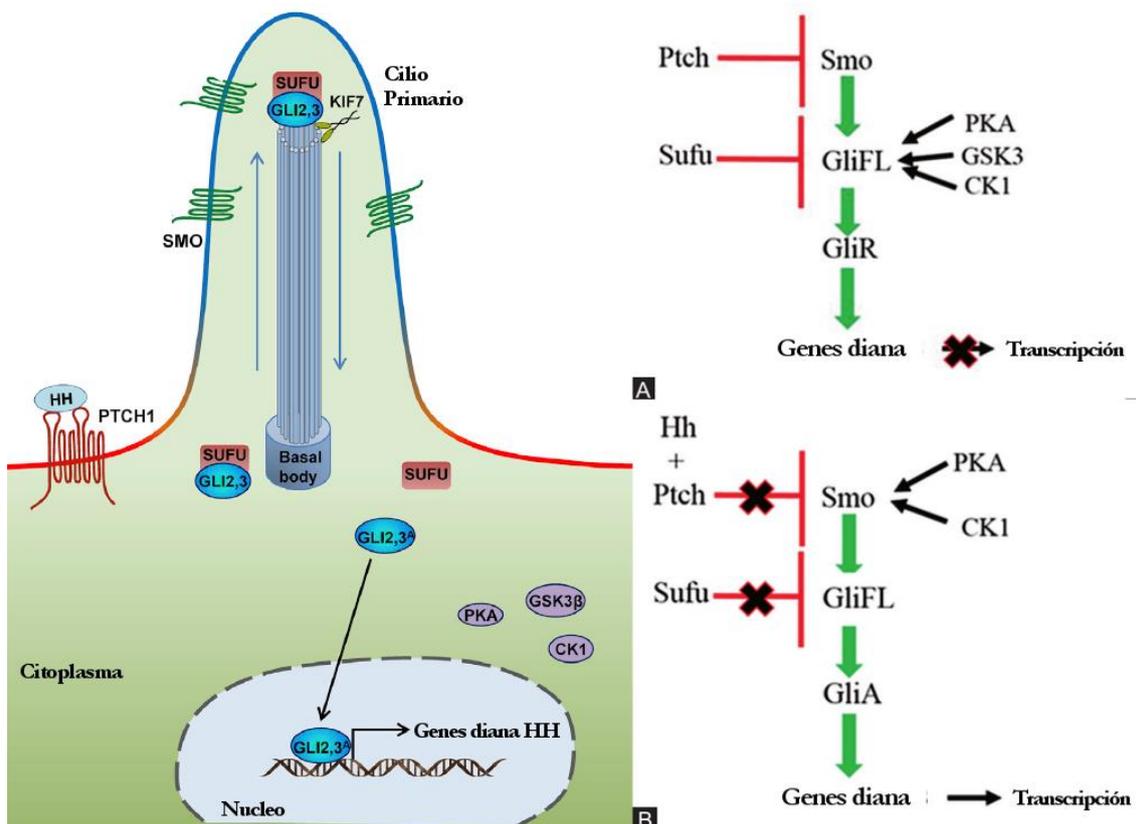


Figura 112: *Izquierda*, organización de los elementos de la ruta de Hedgehog en el cilio primario en humanos, adaptado de Wu et al., (108). *Derecha*, papel dual de las protein quinasas como moduladoras del la ruta de Hh, adaptado de Skoda et al., (106)

El cilio primario es una estructura que consiste en microtúbulos cubiertos por una evaginación de la membrana celular que reciben señales mecánicas, químicas y térmicas (106). Esta

estructura es donde todas estas proteínas se organizan: El receptor Ptch y los complejos inhibidores de los factores de transcripción Gli con las proteínas Sufu están arrestados en el extremo del cilio, principalmente Gli1; encontramos también a la proteína kif7 con roles diferentes según el estado de activación de la ruta. Kif7 favorece la ruptura de los factores Gli en ausencia de activación o su disociación de Sufu junto con su transporte fuera del PC en presencia de HH (81,108). Tras la activación de la ruta es Smo el que se acumula en el PC, allí promueve la activación de Gli y su translocación al núcleo (83,106,107). Se puede ver un esquema del cilio primario con los elementos de la ruta de HH en la parte izquierda de la figura **112**

La activación no canónica de esta ruta ocurre cuando no median las proteínas Hh; como hemos comentado Smo pertenece a la superfamilia de los receptores asociados a proteínas G, pudiendo señalar a través de estas (81,105). Especialmente en cáncer otras rutas como las rutas de las MAPK, PI3K, EGFR, TGF- β o TNF- α pueden llevar a la activación de las proteínas Gli no mediada por las proteínas HH (107,109).

Hay 3 formas diferentes de activación de esta ruta descritas en cáncer: tipo I, señalización de HH autónoma e independiente de ligando; tipo II, señalización de HH dependiente de ligando de manera autocrina o juxtacrina; o tipo III, señalización de HH dependiente de ligando de manera paracrina. La ruta puede ser activada por mutaciones, ligandos e incluso por eventos epigenéticos (106).

3.4 Ruta de las MAPK.

La ruta de las MAPK es activada por factores de crecimiento, hormonas y citoquinas a través de receptores tirosín kinasa (RTK) (4). La activación de esta ruta puede ser debida a un amplio abanico de efectos, tanto estrés metabólico, daño en el DNA, concentración de proteínas, factores de crecimiento o interacciones célula-matriz entre otras (84). Estos receptores, tras la unión del ligando apropiado, dimerizan y se autofosforilan; las tirosinas fosforiladas actúan como sitios de anclaje para proteínas con un dominio de holología Src (SH2) o un dominio de unión a fosfotirosina (PTB). Tras esto, proteínas que se unen a estos dominios sirven de adaptadoras para los efectores de la ruta (4).

En el caso de la ruta clásica de las MAPK, el adaptador GRB2 reclutaría a SOS y RAS, permitiendo el intercambio de GDP por GTP; RAS activo continuará la ruta de transducción RAS-RAF-MEK-ERK (4). Las MAPK conforman unas cascadas enzimáticas compuestas por 3 quinasas que se activan secuencialmente, hay 4 familias, designadas con el nombre de la MAPK efectora: MAPK/ERK, BMK-1, JNK y p-38 (84). Hay otras proteínas adaptadoras como MP1, KSR1/2, B-Arrestin1/2 o IQGAP1, algunas específicas de la ruta de ERK y otras pudiendo actuar en más de una ruta (110).

La ruta clásica o ruta de ERK es muy relevante en el cáncer puesto que ERK activa varias dianas importantes tanto citoplasmáticas como nucleares. Entre ellas están algunas quinasas ribosomales S6 que regulan la GSK-3 y promueven el ciclo celular; la proteína de adhesión L1 o la carbamoil fostato sintetasa II (CPS-II), que facilita la síntesis del ADN. También se promueve la síntesis de factores de transcripción entre los que se incluyen ELK-1, CREB, c-Fos, c-Jun (84).

La ruta de ERK puede activarse de manera aberrante por diferentes eventos, entre otros: RTK permanentemente activos, entre los que se incluye EGFR; amplificaciones o señalización autocrina o paracrina incrementada o mutaciones en genes de la ruta, como mutaciones en *RAS* (frecuentemente *KRAS* o *BRAF*), que comprometan la función GTPasa y por tanto la inactivación de este; o incluso las poco frecuentes mutaciones en *MEK* (4).

Dado el papel central de la ruta de las MAPK en cáncer, las mutaciones de componentes de esta cascada están entre las alteraciones más frecuentes: mutaciones activadoras en *KRAS* y *BRAF*; hiperactivación de *ERK* y *JNK*; también se han descrito mutaciones activadoras en *MEK1* y *MEK2* (84,110). Entre otras mutaciones frecuentes activadoras o inhibitoras de esta ruta encontramos: Mutaciones en el gen *PI3KR1*, que codifica la subunidad reguladora p85α de PI3K; mutaciones en miembros del axis inhibitor p53-p21^{CIP1}-Rb, importante para el punto de control G0-G1 (110); así como la delección del 19 EGFR (84).

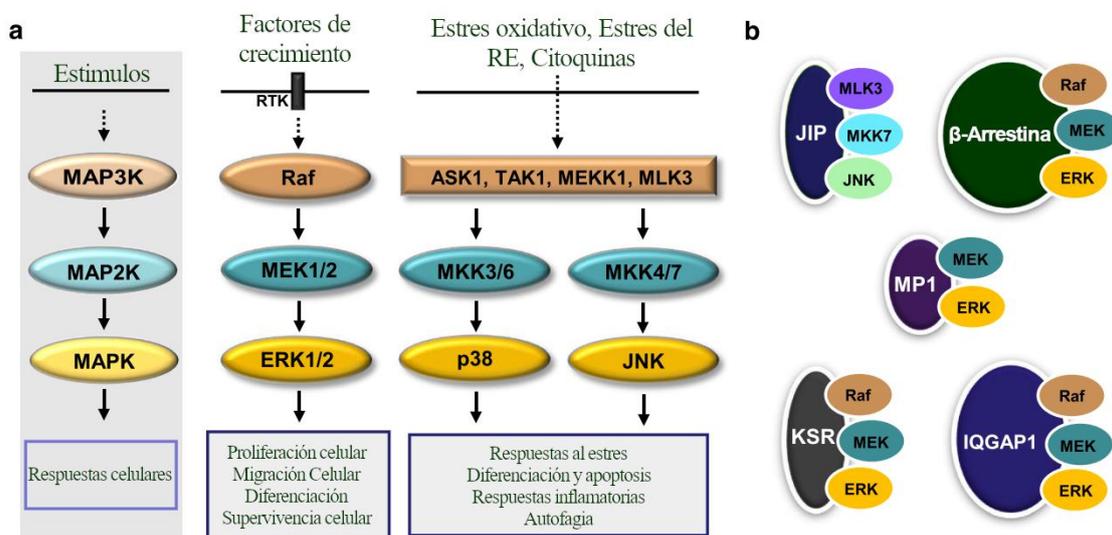


Figura 113: a, Esquema general de la ruta de las MAPK. **b**, proteínas adaptadoras que median la interacción entre las diferentes MAPK. Tomado de Kim and Choi (110).

En el CPNM las mutaciones de la ruta de las MAPK son frecuentes, aunque pueden variar según la población estudiada; en caucásicos se encuentran mutaciones en *KRAS* (20-25%), *BRAF* (2%) y amplificación de *MET* (2-5%) (22). Las mutaciones de *KRAS* son las más frecuentes y dentro de estas la sustitución G12C es la mutación más frecuente, en pacientes no fumadores se encuentra frecuentemente la mutación G12D. *KRAS* se presenta más frecuentemente en ADC (18-32%) que en los otros tipos de CPNM y se ha demostrado una asociación entre mutaciones en *KRAS* y el tabaco (22). La mutación más común de *BRAF* es la sustitución V600E, y al igual que *KRAS* esta mutación es más frecuente en ADC que en otros tipos de CPNM (22).

El efecto de la activación de estas rutas es dependiente de factores diferentes a la presencia o ausencia de estímulo; factores como la duración e intensidad de la señal, así como del contexto biológico. Los productos de los genes de respuesta temprana como c-Fos pueden ser

usados para monitorizar la señal y diferenciar una señal fuerte y mantenida de un evento fugaz (84)

3.5 La Ruta de fosfoinositol 3 Kinasa .

Como comentamos, esta ruta es activada por factores de crecimiento a través de RTK o Tirosinas kinasas no receptoras. Los residuos fosforilados sirven de anclaje para proteínas adaptadoras y para PI3K; la unión con la enzima a través de la subunidad reguladora libera la subunidad catalítica, la cual puede fosforilar fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), generando fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). Proteínas con un dominio homólogo a la pleckstrina (PH) pueden unirse a PIP3 (4).

Hay 3 clases de enzimas PI3K, las de clase I son las principalmente implicadas en cáncer. Estas PI3K de tipo I son enzimas heterodiméricas formadas por una subunidad reguladora, normalmente p85; y una unidad catalítica, siendo p110 la más común (111). La señalización de PI3K está principalmente mediada por la activación de kinasas acopladas a proteínas G (111). AKT se une al PIP3 y es activada mediante 2 fosforilaciones en las posiciones 308 y 473 por PDK1 y el complejo mTOR2. Las kinasas efectoras de esta ruta son AKT y el complejo mTOR1 (4).

AKT actúa directamente e indirectamente sobre varias dianas importantes en cáncer: inactiva a la proteína proapoptótica Bad; activa a Mdm2, represor de p53; inactiva el factor de transcripción FKHRL-1 (también conocido como FOXO-3A), arrestándolo y evitando la transcripción de genes pro-apoptóticos; inactiva la IKK, una proteína kinasa inhibidora de NF- κ B; activa también el complejo mTOR1, responsable de otras importantes respuestas; también inhibe la GSK-3, activando como ya hemos visto la ruta de WNT (4,112).

El complejo mTORC1 es activado cuando AKT inactiva TSC2, impidiendo la unión de TSC2 con TSC1 y la inactivación de Rheb por el complejo formado por ambas proteínas. Rheb activo activa mTORC1 y permite la activación de la proteína quinasa ribosomal S6K1, y la proteína de unión al factor de iniciación 4E (4E-BP1); lo que lleva a una mayor síntesis de proteínas (4). mTORC1 también inhibe el proceso de autofagia, el cual se ha demostrado tiene un papel en cáncer como supresor de tumores. Los complejos mTORC1 y 2 modulan la actividad de las proteínas de la familia de Rho, por tanto están implicados también en la reorganización del citoesqueleto y la formación de lamelipodios y filopodios (112). Entre los mecanismos de regulación de esta ruta tenemos al gen supresor de tumores *PTEN*, cuya proteína cataliza la desfosforilación de PIP3 (4); y a la propia proteína S6K1, que fosforila e induce la degradación de la proteína adaptadora IRS-1, debilitando la señalización (112).

Además de la señalización a través de AKT/mTOR, hay señalización mediada por AKT independiente relevante en cáncer. La PDK1, quinasa acoplada a proteínas G, puede colocalizar con AKT y tiene sustratos similares a esta; pudiendo incluso llegar a sustituir a AKT. PDK1 activa el mTORC2 activando mediadores independientes de AKT como el SGK. Esta señalización independiente de AKT tiene un alto solapamiento de sustratos con la señalización dependiente de AKT, y también es capaz de promover crecimiento y migración; esta señalización ha sido descrita como un mecanismo de resistencia a los inhibidores de PI3K y AKT (113).

Una de las señalizaciones de PI3K independiente de AKT más importantes es la regulación del citoesqueleto a través de la modulación de las proteínas RAC1,2 y 3 (miembros de la familia de GTPasas Rho) (113). PI3K es un activador de RAC mediante la estimulación de Rac-GEFs con dominios PH; esto lleva a la activación de otros efectores que llevan a la reorganización del citoesqueleto, formación de lamelipodios, la migración celular y la invasión (111,113).

La señalización de PI3K también puede ser generada gracias a las quinasas TEC, una familia de tirosin quinasas no receptoras que pueden fosforilar directamente la subunidad reguladora o los adaptadores (113).

3.5.1 La Ruta de fosfoinositol 3 Kinasa en CPNM.

La ruta de PI3K/AKT/mTOR es muy importante en CPNM, estando implicada en procesos celulares como la proliferación celular, supervivencia, migración y motilidad, metástasis y angiogénesis (114); además varios estudios apoyan el papel de mTOR en el mantenimiento de las CMT (115). La ruta de PI3K/AKT/mTOR ha sido asociada con CPNM de estadios avanzados (III+). En el CPNM los principales mecanismos de sobreexpresión de esta ruta son: activación de RTKs; amplificación de *PIK3CA*; mutaciones en K-RAS, PI3K, AKT o pérdida de la expresión de *PTEN* (111).

Las mutaciones más frecuentes de *PIK3C* encontradas en el CPNM son la amplificación de *PIK3CA* (35% CCE y 7% ADC) y las mutaciones E545K Y H1047R de *PIK3CA* (3-10% CCE y 0-2.7% ADC) (112,114). No se han encontrado mutaciones en los genes *PIK3CB* o *PIK3CD*. Mutaciones activadoras de AKT son eventos infrecuentes en CPNM, pero si es más frecuente la sobreexpresión de *AKT1/2* (19/32% CCE Y 16/12% ADC). Otra mutación rara en cáncer de pulmón es la mutación en el gen de la subunidad reguladora, el *PIK3CB* (114). En otros cánceres se detectan con más frecuencia mutaciones en genes como el *PIK3R1*, el *PIK3CB* o la sobreexpresión del isotipo γ de la subunidad catalítica (111).

La pérdida de función de *PTEN* es también frecuente en CPNM (hasta un 70% en los tumores mejor diferenciados), siendo las deleciones más frecuente que las mutaciones (112,114). Las mutaciones en línea germinal de *PTEN* promueven síndromes hereditarios con mayor probabilidad de desarrollo de tumores malignos. La pérdida de heterocigosidad en el 10q es también común en el cáncer de pulmón (27% CPNM), en estos casos una mutación en el alelo restante llevará a una total pérdida de función del gen (114).

Actualmente no se utilizan inhibidores de la ruta de PI3K de forma rutinaria en la clínica del CPNM, sin embargo, si se hay una amplia investigación en fármacos que actúan sobre esta ruta. La rapamicina es el primer inhibidor de mTOR descubierto, un fármaco con efectos citostáticos sobre poblaciones de tumores (112). Hoy en día nuevos análogos sintéticos como everolimus, temsirolimus o ridaforolimus, están en fases clínicas. Otros fármacos que actúan sobre mTOR, AKT, PI3K de clase I o isoformas de las subunidades de p110 están también siendo estudiados (112).

4 Proteínas de superficie características de células madre en el CPNM.

El desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas contra las CMT se basa principalmente en el uso de marcadores de superficie celular para identificar, enriquecer y/o aislar las CMTs. Se han identificado muchos marcadores de superficie de CMT, aunque algunos marcadores de superficie son controvertidos y necesitan más investigación (52). La mayoría de los marcadores de superficie de CMTs utilizados en la actualidad derivan de marcadores de superficie de células madre adultas o embrionarias normales conocidas. La similitud de los marcadores de superficie celular podría sugerir que las CMT se originan predominantemente a partir de células madre normales a través de la acumulación de alteraciones epigenéticas y genéticas (52). A continuación, se describen los marcadores de superficie característicos de CMT descritos para el CPNM.

4.1 EpCAM.

La molécula de adhesión celular epitelial, EpCAM, también conocida como CD326, fue descrita por primera vez en 1979 durante un cribado de marcadores en melanoma y cáncer de colon (116). Es un miembro de las moléculas de adhesión celular (CAMs), pero no pertenece a ninguna de las familias clásicas de estas: cadherinas, selectinas, integrinas e IgG-like. EpCAM es una proteína de membrana con una corta región intracelular de 26 aminoácidos, una región transmembrana de 23 y un dominio extracelular de 242 aminoácidos. Se localiza en la membrana basolateral de epitelios simples, pseudoestratificados y de transición; aunque es característico también de células altamente proliferativas e indiferenciadas (117–119). EpCAM participa en la señalización celular, migración, proliferación y diferenciación (103).

En células madre coexpresa con marcadores de indiferenciación como Oct4 y Sox2, y la diferenciación de estas progenies va asociado con una disminución de la expresión de EpCAM (118). En estas células EpCAM no tiene un papel inerte; se ha visto que en células madre embrionarias los factores de transcripción asociados al estado indiferenciado, como Oct4, Sox2, Nanog y Klf4, son dianas directas de EpCAM (103). Esto además ha sido confirmado en estudios con iPS, donde EpCAM ayudaba a la reprogramación y era expresado en aquellas en las que el proceso era un éxito (103).

Durante mucho tiempo la principal función que se atribuyó a este marcador fue la de adhesión celular; irónicamente se ha visto que las uniones homofílicas de EpCAM son débiles y que además puede inhibir la E-cadherina (117). Recientemente se ha descrito que esta proteína participa en las rutas transducción de señales mediante la escisión regulada de su fragmento intracelular por RIP; está implicado en proliferación al inducir la sobreexpresión de las ciclinas A y D, así como c-Myc (118). La transducción de señales inducida por el fragmento intracelular de EpCAM comparte algunas proteínas de la ruta y dianas con la ruta de Wnt/ β -catenina; dianas como MYC o CCND1 y componentes de la ruta como la propia β -catenina y las proteínas FHL2 y Lef (101,102).

4.1.1 Utilidad como marcador diagnóstico.

En el tejido adulto sano, EpCAM se expresa en la membrana basolateral de epitelios simples, pseudoestratificados o de transición; se expresa en la mayoría de órganos y glándulas. Su

expresión es mayor en células en activa proliferación y baja en células diferenciadas (118). No se encuentra en células derivadas de la estirpe linfoide o mieloide, mesenquimal, muscular o tejidos neuroendocrinos. EpCAM puede ser encontrado en células madre o progenitoras de diversos órganos (118). En cáncer, EpCAM se expresa en la mayoría de los tumores derivados epitelios y una alta expresión de este se suele correlacionar con un mal pronóstico (118).

EpCAM se expresa exclusivamente en epitelios y neoplasias derivadas del epitelio, gracias a esto EpCAM puede usarse como marcador de diagnóstico en estos. Juega también un papel en la tumorigénesis y metástasis de carcinomas, por lo que también puede actuar como un marcador pronóstico potencial y como una diana potencial para las estrategias inmunoterapéuticas (117,118).

El uso de EpCAM como marcador diagnóstico mediante diferentes técnicas ha dado en general buenos resultados, pero no exentos de limitaciones. EpCAM es usado para aislar células tumorales circulantes (CTC) (120). En la comparación de los niveles de EpCAM por ELISA en suero de pacientes con cáncer de pulmón y controles sanos se encontraron diferencias significativas (121) y está descrito que la presencia del ARNm de EpCAM o MUC1 en CTCs se asocia con un mal pronóstico en cáncer de pulmón (122). Sin embargo los sistemas clásicos de detección de CTCs tienen el problema de no poder detectar aquellas CTCs con una expresión débil o nula de EpCAM, descrito específicamente en ADC de pulmón (123) y la detección de células EpCAM por selección inmunomagnética en aspirados de médula ósea tampoco mostró ser un buen método diagnóstico (124).

El estudio de EpCAM con la clínica del CPNM presenta, de nuevo, algunos buenos resultados pero no en todos los casos y contextos. Algunos no encuentran relación entre la sobreexpresión de EpCAM, mediante inmunohistoquímica, y los parámetros clinicopatológicos (125) mientras que otros usando esta misma técnica muestran mayor presencia de EpCAM en fases tempranas, aunque no se asocia con una mejor o peor supervivencia; curiosamente en este estudio un análogo de EpCAM, TROP2, se asoció con un mejor pronóstico (126). En ambos estudios se describió la localización de EpCAM en membrana celular.

Mediante PCR cuantitativa a tiempo real una combinación de 3 genes, entre los que se encuentra *TACSTD1* (el gen que codifica a EpCAM), se asoció a micrometástasis en nódulos linfáticos, el uso de varios genes permitió la identificación de nódulos que hubiesen dado negativo solo usando *TACSTD1* (127).

Aunque algunos artículos parecen indicar que EpCAM no es un buen marcador diagnóstico por si solo en cáncer de pulmón, si puede tener cierta utilidad en el aislamiento de CTCs en combinación con otros marcadores; además parece tener un papel activo en la célula más allá de las funciones de adhesión de las CAMs.

4.2 Antígeno CD166.

La molécula de adhesión celular leucocitaria activada ALCAM o CD166 (grupo de diferenciación 166) es una glucoproteína miembro de una subfamilia de receptores de inmunoglobulina con cinco dominios de tipo inmunoglobulina (VVC2C2C2) en el dominio extracelular, se expresa en leucocitos, células madre hematopoyéticas y progenitores mieloides. Estos dominios están

implicados tanto en la unión con el ligando como en la oligomerización de esta proteína, necesaria para conseguir una interacción estable (128). CD166 tiene, además de estos 5 dominios extracelulares parecidos a inmunoglobulinas, una región transmembrana y una corta cola citoplasmática. Su peso molecular es de 65 kDa, que aumenta hasta 110 kDa por la glicosilación. En los epitelios se localiza en los sitios de unión célula célula (129).

CD166 se une al antígeno de diferenciación de células T CD6 mediante una unión heterotípica de alta afinidad y está implicada en los procesos de activación del linaje T, adhesión y migración celular. CD166 se puede unir además a sí mismo, realizando una unión homotípica de baja afinidad (128,129). Para una unión estable homotípica de CD166 se necesita la presencia de una PKC α activa que actúe sobre sus propios residuos de Ser y Thr y la disrupción del citoesqueleto (128). Además, se ha visto que E-Cadherina y CD166 son reclutados en las zonas de unión célula-célula por la α -catenina. (130).

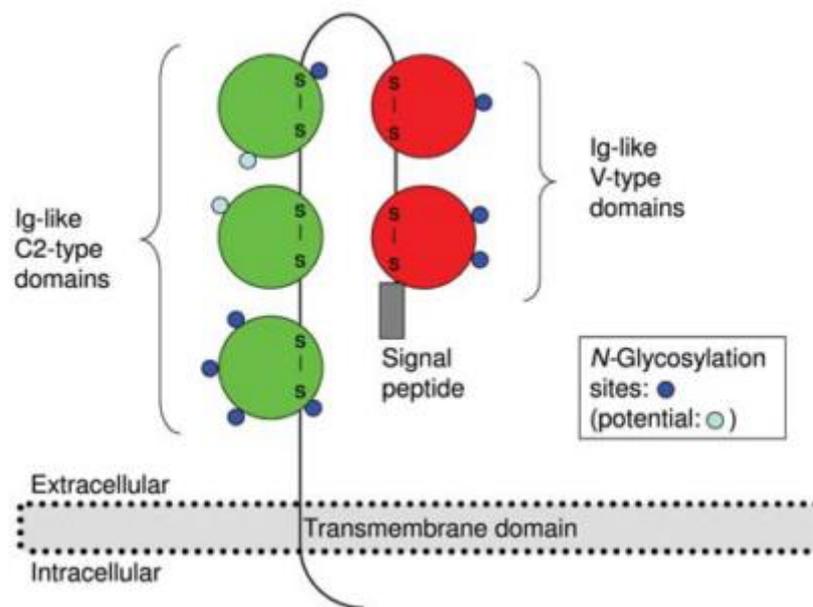


Figura I14: Estructura del CD166, tomada de Weidle et al., (128).

Esta describe la presencia del CD166 durante el desarrollo de algunos órganos, pero su rol no está aún bien definido (128). Un estudio sobre la reprogramación de células del pulmón identifica a CD166 como un marcador capaz de seleccionar la población más viable, dentro del conjunto de células obtenidas tras usar los factores de Yamanaka en líneas de células madre embrionarias de pulmón. En este estudio se analizaron CD166, EpCAM, CD44 y CD133, quedándose finalmente con CD166 como el marcador de célula madre en pulmón (131). Se detectaron altos niveles en las etapas tempranas y una caída en este conforme se diferencian. Mostraron también que estas células inyectadas en ratón son capaces de ayudar a reparar daño pulmonar inducido por fármacos. (131) Otro reciente estudio relaciona la falta de CD166 con ciertos defectos en la vascularización del pulmón, lo que también se asocia a menor metástasis y crecimiento de otros cánceres en este órgano; curiosamente la inhibición del CD166 llevo a un mayor crecimiento del tumor primario, pero acompañado de menor metástasis (132).

El papel del CD166 en cáncer necesita ser investigado más a fondo; un reciente metaanálisis usando 31 artículos de más de 12 cánceres diferentes concluye que CD166 está relacionado con el riesgo de cáncer, estadio y supervivencia, aunque hace hincapié en la necesidad de estudios a mayor escala (133).

Hay algunos artículos concretos que parecen indicar un papel del CD166 en la adhesión en el contexto del cáncer. En cáncer de próstata la localización de CD166 varía dependiendo de la presencia o ausencia de α -catenina, coexpresando con E-Cadherina en presencia de esta (130). En ADC la expresión de un miRNA por la ruta de Wnt/ β -catenina lleva a la represión de CD166, expresión de Snail y activación de la TEM; correlacionándose además con una mayor metástasis (134). Se ha descrito que la inhibición de la polimerización de actina promueve las uniones CD166-CD166 (128).

Uno de los primeros y más importantes trabajos sobre el papel de CD166 como marcador de CMT en CPNM es el de Zhang *et al.* 2012 donde describió a CD166 como el mejor marcador de CMT en su ensayo. En este estudio se disgregaron varios tumores de pacientes y se realizaron estudios funcionales probando también otros marcadores de CMT: CD166, CD44, CD133 y EpCAM. De todos ellos la subpoblación CD166+ fueron las que mostraron una mayor CIT, siendo la subpoblación CD133- la que menos CIT mostró. Estas poblaciones CD166+ también formaron esferas de manera más eficiente y llegaron a iniciar tumores con tan solo 1-5 células; aunque este estudio también concluyó que el CD166 era un marcador “inerte” (135).

Posteriormente otros grupos también lo estudiaron, Ishiguro *et al.* 2013 presentaron CD166 como un posible marcador de evolución en cáncer de pulmón al relacionarlo negativamente con la supervivencia media en una cohorte de pacientes; en estudios con líneas, incluyendo las A549, se mostró que la represión de CD166 disminuía la capacidad de invasión de estas (136). Otro estudio encontró que en una amplia cohorte de pacientes este marcador se asociaba al tamaño del tumor, al grado y a la presencia de metástasis en los nódulos linfáticos, pero no con la supervivencia media (137). Se describió también en la línea A549 que en condiciones de hipoxia inducidas por CoCl_2 , el CD166 se incrementaba acompañado de marcadores de célula madre y TEM; en una cohorte de pacientes se asoció la presencia de CD166 con menor diferenciación del tumor y que la coexpresión de CD166 y HIF se asociaba con un peor pronóstico (138). Recientemente otro estudio ha abogado por las características de CMT de la población CD166+ en un estudio con 25 pacientes, mostrando también mayor quimioresistencia y menor supervivencia en células que expresan el receptor SLC27A2 sobreexpresado en esta población; características también comprobadas *in vitro* (139).

4.3 Antígeno CD44.

El antígeno CD44 es una glicoproteína de superficie celular involucrada en interacciones célula-células, adhesión y migración celular, que se ha asociado con varios tipos de cáncer. Su ligando principal es el ácido hialurónico, componente de la matriz extracelular; aunque se ha encontrado capaz de unirse a muchas otras moléculas como colágeno, fibronectina, fibrinógeno, laminina, condroitín sulfato y osteopontina entre otras. CD44 tiene varias isoformas generadas por *splicing* alternativo y glicosilación. Sus exones 6-11 son los llamados exones variables, v1-v10, los cuales se combinan para la generación de las diferentes variantes (140,141).

La región amino terminal, acabada en un dominio globular; es la encargada de la unión a sus ligandos y es alterada según la isoforma y las modificaciones postraduccionales. La variante más común del CD44, llamada CD44s (standard), tiene a continuación un pequeño fragmento transmembrana seguido de una pequeña cola intracelular. Los exones variables añaden una estructura helicoidal entre la región aminoterminal y la región transmembrana. La pequeña cola intracelular puede unirse a miembros de la familia MRE (ezrina, radixina, moesina), Ankirina y Merlina; pudiendo a través de estas interactuar o bloquear su unión al citoesqueleto de actina (142).

El CD44 tiene 3 funciones principales: receptor, correceptor y organizador del esqueleto de actina. Estas funciones están ampliamente descritas y diversos estudios no hacen más que confirmar su papel central en numerosas rutas y procesos (141,142): Se ha demostrado su interacción con proteínas que participan en el anclaje del citoesqueleto a la membrana, las proteínas de la superfamilia de proteínas 4.1 Ezrin, Radixina y Moesina (ERM); la unión y señalización dependiente del ácido Hialurónico; el reclutamiento de metaloproteasas; un papel regulador de la señalización por MAPK; funciones como correceptor del receptor de TGF- β , EGFR, VEGFR o FGF (141,142). CD44 fue propuesto como marcador de CMT en CPNM por Leung en 2010 en lugar de CD133 que en su estudio solo fue encontrado en una línea celular, la HCC1883, mostrando además alta CIT, marcadores de TEM y resistencia a cisplatino (143).

Las variantes del CD44, especialmente CD44v6, están normalmente asociadas a proliferación y se asocian con un mal pronóstico en cáncer; en el CPNM numerosos artículos y metaanálisis lo confirman (144–149). Por tanto CD44 es un marcador con potencial tanto diagnóstico como terapéutico; un artículo reciente explora la posibilidad de usar la detección de la variante CD44v6 en suero de pacientes diagnosticados para identificar aquellos con un peor pronóstico (148).

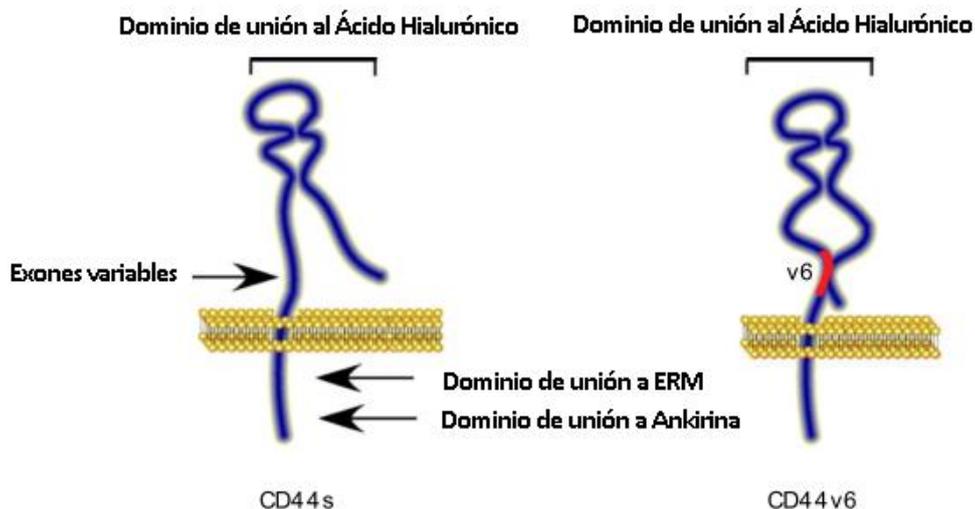


Figura I15. Representación esquemática de la estructura de CD44s y una de sus isoformas. Adaptado de Orian-Rosseau (141).

Gran parte de la bibliografía se centra en las diferencias entre las isoformas CD44v y las CD44s, esto podría ser aún más complejo si añadimos a la ecuación no solo isotipos sino también mutaciones, algo poco estudiado en el CD44; por ejemplo, un estudio reciente que establece

una relación entre un SNP del CD44, el rs187115, y el riesgo de sufrir metástasis ósea en cáncer de pulmón no microcítico (150).

4.4 Antígeno CD133.

Como he comentado previamente, la primera descripción de una población de CMT CD133+ en CPNM fue en 2008 por Eramo et al., (49). Esto ha favorecido que haya una gran cantidad de estudios sobre este marcador.

El antígeno CD133, también conocido como promonin-1, está codificado por un único gen, *PROM1*, en el cromosoma 4p15.33. Este gen codifica una proteína de unos 565 aminoácidos y 120 kDa. Su estructura consiste un dominio N-terminal extracelular, 5 helices transmembrana con 2 bucles extracelulares, una pequeña cola C-terminal de 59 aa y 8 sitios de N-glicosilación. Además, hay descritas varias isoformas generadas por splicing alternativo. CD133 se expresa en la mayoría de los tejidos, pero no así algunas de sus isoformas. Una de dichas isoformas reconocida por el anticuerpo AC133 está más restringida; habiendo sido descrita solo en progenitores endoteliales, epitelio embrionario, células miogénicas, varios tipos de células madre (hematopoyéticas, de cerebro fetal o prostáticas) y en varios cánceres. Esta variante reconocida por AC133 es una de las más importantes estudiadas en CPNM por citometría de flujo (151,152). Se muestra una representación esquemática de esta estructura en la figura **I16**

CD133 se localiza en la membrana celular donde actúa como un organizador de las protrusiones celulares (152), está descrito asociado a las balsas lipídicas en la membrana (153).

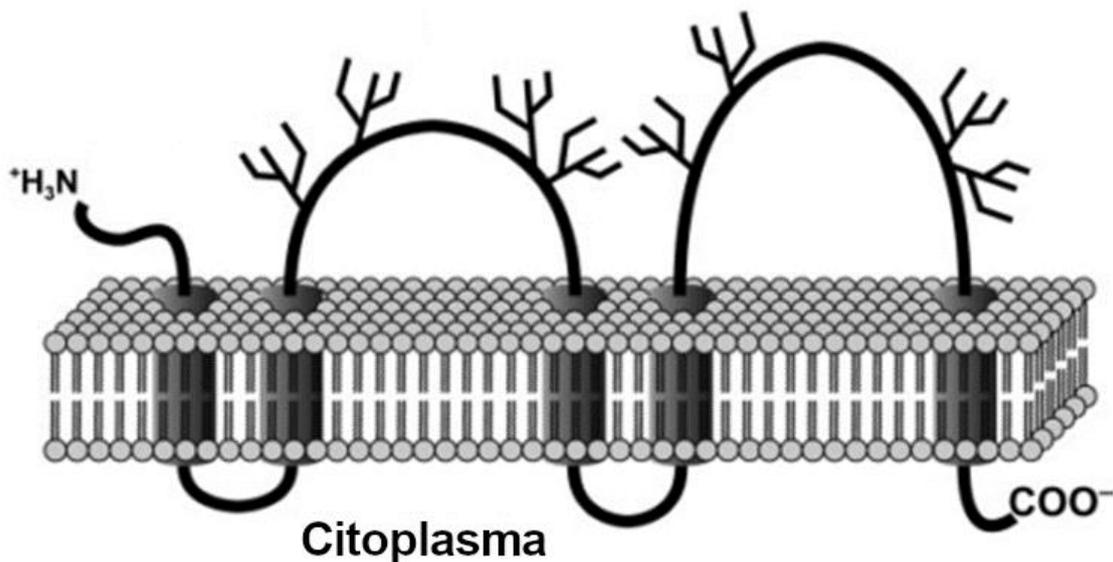


Figura I16 :Representación esquemática de la estructura del CD133, adaptado de Grosse-Gehling et al., (152).

4.4.1 CD133 en cáncer.

CD133 no es solo un marcador inerte de estirpe, esta proteína ha sido relacionada con varias rutas de señalización en varios cánceres y procesos celulares importantes; además al ser el primer marcador de CSC descrito en CPNM disponemos de una amplia bibliografía al respecto:

Está descrito que la expresión de CD133 aumenta en células con una ruta de PI3K/AKT activa (153) y algunas publicaciones apoyan esto en CPNM: CD133 activa a SRC y promueve una mayor fosforilación de AKT y GSK-3 β en varios cánceres, incluyendo pulmón (154); pudiendo activar por tanto también las MAPK. En este mismo estudio se vio que la localización polarizada de CD133 tiene importancia en sus funciones promotoras de la migración y la ruta de AKT, así como de su capacidad iniciadora de tumores *in vivo* (154). En un estudio con la línea celular de CPNM A549 la población CD133+ presentó mayor activación de PI3K/AKT/mTOR (155) y en células derivadas de una cohorte de pacientes con ADC de pulmón también se encontró que este eje PI3K/AKT/mTOR es importante en la invasión celular (156).

Además de esto hay estudios que indican intercomunicaciones entre algunos receptores importantes en CPNM y el CD133. Por ejemplo, EGFR puede interaccionar directamente con CD133, siendo además este uno de los receptores que puede activar la ruta de PI3K/AKT (153). Se ha descrito que la supresión de IGF, que también puede señalar por la ruta de PI3K/AKT, lleva a la disminución de CD133 y Oct4 en las líneas de CPNM PC9 y HCC827 (157).

Hay otras rutas que también pueden estar más activas o solo activarse en las células CD133+: En un estudio en las líneas celulares de CPNM A549, H1299 y H157, solo estas poblaciones respondieron a la IL-6 (158). Este tratamiento favoreció la autorrenovación, TEM y la activación de otras rutas importantes en las CMT como Hh, WNT, Notch, AKT o las MAPK (158).

La expresión de CD133 se ha relacionado con poblaciones de células en ambientes con baja presión de oxígeno. En la línea celular de CPNM PC9 se describió el eje Hipoxia/HIF1/IGFR, viendo también incremento de CD133 en estas condiciones (157). O en la línea celular A549 se describió que las células CD133+ tenían mayor expresión basal de HIF2a que las CD133-, y que la activación de HIF mediada por la hipoxia puede incrementar marcadores de CMT como el Oct4 (159). Cabe señalar que la ruta de PI3K/AKT tiene como diana genes relacionados con ambientes hipóxicos, como el HIF-2a (152).

La resistencia al daño en el ADN y la mayor eficiencia en la reparación de este es otra de las características de las CMT descrita en relación con el marcador CD133. Tumores enriquecidos en CD133 de varios cánceres, incluyendo CPNM, mostraron una mayor resistencia a las radiaciones ionizantes y un menor arresto del ciclo celular. Esto está asociado a una mayor resistencia al daño del ADN y vías de reparación más eficientes (160). En otro estudio con células CD133+ de varias líneas celulares de CPNM se describió una mayor capacidad de reparación de roturas dobles en líneas resistentes a cisplatino (161).

La expresión de CD133 en varios cánceres también se ha relacionado con la resistencia a la apoptosis (152) o con la angiogénesis. CD133 interacciona directamente con el VEGF y reprimiendo la expresión de CD133 también puede inhibirse la angiogénesis (162).

CD133 también ha sido relacionado con la TEM (152). En células CD133+ de CPNM se ha descrito que solo las células híbridas epitelio-mesenquimales o mesenquimales responden al TGF- β y un estudio con 60 muestras de pacientes asoció esto a peor pronóstico (163). Esto podría poner en contexto a publicaciones previas como la de Tirino *et al* 2013 donde se estudió el efecto de la señalización de TGF- β en poblaciones CMT y no CMT en las A549, mostrando mayor migración e invasión *in vitro* de las CMTs (164).

4.4.2 CD133 como diana farmacológica.

Dada la evidencia del rol de CD133 en CMT, se ha estudiado como posible diana terapéutica utilizando enfoques para dirigirse selectivamente a CD133. Estas estrategias aún están en estadios tempranos de desarrollo, además el CD133 es un marcador que como hemos comentado está expresado de manera natural en células madre y progenitoras, lo que puede llevar a toxicidad de estos fármacos (162).

Se han identificado también en las poblaciones CD133+ de CPNM marcadores y mecanismos descritos para las CMT relacionados con la resistencia a fármacos como por ejemplo la menor internalización o mayor expulsión de drogas (161), en parte gracias a los transportadores ABC (93,165).

Hay bibliografía interesante sobre la interacción de las CMT con aquellos quimioterápicos más usados. Como ya se comentó anteriormente, el cisplatino es una de las piedras angulares del tratamiento de CPNM. Los estudios en CMT parecen indicar que, aunque este es efectivo contra la mayoría de las células, no lo es contra las más indiferenciadas; y podría incluso enriquecer la población de CMT. De hecho, numerosos artículos ponen de manifiesto que las tumoroesferas de CPNM enriquecidas en CD133 tienen una mayor resistencia al cisplatino (64,93,155,160,161,165–169). Cabe destacar que en algunos de ellos la presencia de niveles no letales de cisplatino llevaron al incremento de los transportadores ABCG2 (93), activación de genes relacionados con la TEM y otras rutas de señalización (161) o mayor resistencia a otros fármacos (155,167). Este efecto podría ser dependiente de la concentración que llega a esta población, en un estudio reciente los autores usaron nanopartículas micelares para facilitar la asimilación de cisplatino en las CMT de A549 y H460, consiguiendo un efecto inhibitor en la población CD133+, mientras que el uso tradicional de cisplatino enriquecía la población CD133+ (170).

Las mutaciones en EGFR en los tumores permiten el uso de Gefitinib como terapia dirigida. Varios autores han tratado de desvelar los mecanismos detrás de las resistencias a esta terapia, y de nuevo las CMT parecen presentar una mayor resistencia y CD133+ identifica estas poblaciones de células resistentes. Por ejemplo, Alama *et al.*, 2015 describieron que las CMTs de CPNM identificadas por los marcadores CD133⁺ y EpCAM⁺ presentaban una mayor activación de la ruta de EGFR y mayor resistencia a los EGFR-TKIs que las poblaciones sin características de CMT. Encontraron este comportamiento tanto en líneas con EGFR mutado, como las PC9 o las H1650, o como en las A549, una línea EGFR^{wt} (168). Otros autores también estudiaron la resistencia a los TKIs en la línea PC9 centrándose en la señalización de EGFR, y encontraron que el tratamiento con Gefitinib aumentaba el porcentaje de células CD133⁺ y este efecto podía ser bloqueado usando inhibidores de la ruta de señalización de la insulina (171). Otros trabajos previamente comentados también establecen una relación entre líneas

resistentes a Gefitinib y marcadores como CD133, CXCR4, ALDH1A1, Oct4, Sox2, Nanog e IGFR (157,172).

Se ha descrito que la ruta de Notch en el CPNM promueve la resistencia a fármacos en la población CD133⁺ (94)(93), curiosamente uno de los artículos indicó que los niveles de Notch eran mayores en la población CD133⁻, pero su efecto sobre la resistencia se hacía efectivo en las CD133⁺ (94).

4.5 Antígeno CD90.

CD90, también conocido como Thy-1 es una proteína de 25-37 KDa altamente N-glicosilada y unida a la membrana celular por glicosilfosfatidilinositol; en los humanos está codificada por un gen localizado en el cromosoma 11q23.3. Su expresión está descrita en neuronas, células endoteliales, células madre mesenquimales y hematopoyéticas, fibroblastos, linfocitos T (173), timocitos, células foliculares del ovario y algunos tipos de cáncer (174).

CD90 tiene también un papel estabilizando las sinapsis neuronales y regulando la reparación en regiones ricas en astrocitos (175). En modelos de ratones knockout (Thy-knockout) se han visto algunas deficiencias a nivel de aprendizaje social relacionados con un exceso de inhibición por GABA (175). Se ha descrito que CD90 junto con la pro-proteína C surfactante, permite seleccionar una subpoblación progenitora en el pulmón con capacidad de diferenciarse en células alveolares tipo II (176).

Su rol en el cáncer es dependiente del contexto celular y del tumor. En el carcinoma hepatocelular está descrito que la señalización del CD90 es conductora y asociada con un peor pronóstico, esto no está tan claro en otros tumores como el cáncer de estómago, los gliomas en estadios III o IV, las leucemias o el cáncer de pulmón. Hay cánceres donde incluso se asocia a un mejor pronóstico como el adenocarcinoma de ovario, el carcinoma nasofaríngeo o el neuroblastoma infantil (173); en melanoma puede favorecer la metástasis (175).

En neuronas humanas CD90 puede interactuar con la integrina $\alpha\beta_3$, activando RhoA vía FAK y promoviendo formación de adhesiones focales y fibras de actina. Esta interacción trans de CD90 puede tener otras funciones en otros tipos celulares, como en leucocitos o melanoma donde promueve la migración transendotelial o la metástasis respectivamente (174). En otras especies sus funciones sobre la reorganización del citoesqueleto están conservadas (175). CD90 también puede señalar en cis, modificando la respuesta de las células ante citoquinas o factores de crecimiento; este fenómeno es observado en los fibroblastos pulmonares o en los linfocitos (174).

La expresión de CD90 nuclear se ha asociado a un peor pronóstico en CPNM, menor supervivencia en pacientes sin metástasis en los nódulos linfáticos (componente N=0); además se estableció una correlación entre la detección de CD90 y p53 nuclear (177).

4.6 Antígeno CD34.

CD34 es una fosfoglicoproteína transmembrana marcadora de células madre hematopoyéticas; pero está presente en muchas otras células como las células satélite musculares, los queratinocitos corneales, células intersticiales, progenitores epiteliales y

endoteliales entre otros. Sus funciones no han sido claramente establecidas pero se ha asociado a la adhesión, la proliferación celular y la regulación de la diferenciación (178).

Como se ha comentado previamente, CD34 fue identificado como un marcador específico de la población de CMT en la leucemia mieloide aguda (42). También se ha identificado una población de CMT en células de cáncer de hígado CD34⁺, aunque se ha sugerido que estas células podían provenir de una fusión de células progenitoras hepáticas y hematopoyéticas al presentar características mixtas de ambos tipos de células (179,180). En cáncer de pulmón, la utilización de un modelo de adenocarcinoma en ratón portador de una mutación KRAS G12D inducible ha permitido mostrar que las células Sca-1⁺/CD34⁺ tienen una mayor capacidad para formar colonias, invadir matrigel, así como una mayor CIT en ratones NOD/SCID. Estos resultados sugieren que esta población podría ser una población de CMT en adenocarcinoma (181). Otros estudios también han encontrado indicios de una posible sobreexpresión de CD34 en el CPNM (149).

4.7 Antígeno CD117.

C-Kit o CD117 es un miembro de la familia de receptores tirosin kinasa III que está codificado por un gen en la posición 4q11~12. Es una glucoproteína de 976 amonoácidos que consta de una parte extracelular con 5 dominios IgG-like, una corta fracción transmembrana y un dominio intracelular con 2 dominios tirosina kinasa. Se expresa en células madre hematopoyéticas, células germinales, progenitores de células B, células del hígado fetal y mastocitos entre otros (182).

Su ligando es el factor de células madre (SCF), una citoquina que tras su unión produce una homodimerización del receptor, fosforilación y activación de rutas. Se han descrito una gran cantidad de rutas de transducción para el CD117 como: MAPK, PI3K, PLC- γ , Src y Jak/STAT (182,183). Las mutaciones en CD117 son muy importantes en los tumores del estroma gastrointestinal; actualmente hay fármacos, como imatinib, dasatinib, sunitinib o PKC412, que inhiben la señalización de este receptor (182,183).

En CPNM el CD117 no está considerado uno de los principales RTKs responsables del avance de la enfermedad; de hecho este marcador se ha propuesto como diferenciador entre tumores de CPNM de las variedades ADC y CCE y tumores neuroendocrinos como el SCLC por su baja expresión en los primeros (184). Sí está descrita la presencia del CD117 en al menos un pequeño porcentaje de CPNM, aunque no asociado generalmente a un peor pronóstico (185–188). Aunque si hay algún estudio en el que la expresión de la proteína CD117 en cáncer pulmón se asocia a baja diferenciación y peor pronóstico (189) o donde mutaciones de esta pueden activar otras rutas importantes como AKT o las MAPK (190).

Las mutaciones activadoras de CD117 no son la manera más frecuente de activación de este marcador sino su amplificación génica. CD117 y la DNA metiltransferasa DNMT1 tienen un bucle de retroalimentación positiva en el que uno activa a la otra; lo que llevaría a una amplificación del marcador. Experimentos con líneas celulares de cáncer de pulmón con esta ruta constitutivamente activa demuestran que las células CD117⁺ son más agresivas y tienen una mayor CIT. Esto abre además nuevas estrategias terapéuticas al poder atacar esta los tumores con una DNMT1 hiperactiva con inhibidores del CD117 y viceversa (191,192).

La eficacia de los inhibidores de CD117, solos o en terapias combinadas, en tumores CD117+ se ha demostrado (185,186,191,192); lo que puede dotar de más herramientas terapéuticas si se encuentran casos de CPNM en el que el CD117 tenga un papel relevante en la tumorigenicidad.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis y objetivos

El CPNM es un enorme problema de salud pública por su alta prevalencia y mortalidad, este problema tiene un alto coste personal y económico. Dado la tardía diagnosis del cáncer de pulmón en la mayoría de los casos, las opciones terapéuticas viables en estadios avanzados tienen una eficacia moderada. Una de las hipótesis sobre la poca eficacia de los tratamientos en dichos estadios tiene que ver con la existencia de poblaciones de CMT.

Estas poblaciones serían las responsables de las recidivas y resistencia a las terapias y estarían detrás de los fracasos de muchas terapias. La caracterización de estas poblaciones de CMT permitiría la identificación de dianas terapéuticas y también podría ayudar a establecer nuevos diagnósticos clínicos y el uso de terapias dirigidas para eliminar estas células.

La bibliografía de las CMT en tumores sólidos en general y en el CPNM en particular deja pocas dudas acerca de la existencia de esta población. Sin embargo, a lo largo y ancho de la bibliografía hay ciertas incongruencias sobre los marcadores que caracterizan esta población

Nuestra hipótesis es que es posible el establecimiento de cultivos celulares en 3D, enriquecidos en CMT, y el uso de estos modelos para la caracterización de estas poblaciones celulares, la identificación de biomarcadores de utilidad para el diagnóstico y tratamiento del CPNM.

De esta manera el objetivo general de esta tesis es:

- El desarrollo de modelos experimentales in vivo e in vitro para el aislamiento y caracterización de las CMT de CPNM.

Los objetivos específicos son:

- El desarrollo de un modelo experimental in vitro capaz de enriquecer CMT basado en cultivos 3D.
- Puesta a punto de ensayos de xenotransplantes en ratón y validación de la característica iniciadora de tumores de las CMT.
- Estudio de la utilidad diagnóstica y predictiva de poblaciones de CMT de marcadores de CMT en CPNM.
- Estudio de la ruta de transducción del marcador EpCAM.
- Validación de una firma molecular de 6 genes CD44, Notch3, ITGA6, Nanog, P21 y Snail descriptiva de poblaciones de CMT en adenocarcinoma de pulmón.
- Asociación de las variables clínico-patológicas con los marcadores de superficie de CMT en tumores primarios.

Material y Métodos

M1 Cultivo Celular.

Las líneas A549, H1395, H1650, H1993 y PC9 fueron adquiridas de la colección americana de cultivos (ATCC). Las líneas derivadas de paciente 301, 302, 315, 317 y 320 fueron establecidas por nuestro laboratorio y el laboratorio de Oncología Molecular de la FHGUUV dirigido por el Dr. Camps y la Dra. Jantus a partir de tumor primario resecado y disgregado como se describe más adelante. Se pueden ver algunas características de las líneas celulares usadas en este estudio en la tabla **M1**.

La manipulación de los cultivos celulares se realizó en una cabina de flujo laminar Telstar BIO-II-A (Telstar®, Terrassa, España). Las células se crecieron en un incubador (Steri-Cycle® CO2 Incubador HEPA class 100, Hucoa Erlös, Madrid, España) a 37°C en una atmósfera con un 80% de humedad relativa y un 5% (v/v) de CO2/aire.

Línea Celular	Sexo del paciente original	Edad	Histología	Estatus Mutacional
A549	Masculino	58	ADC	KRAS (C. 34G>A) STK11 (c. 109C>T) CDKN2A (delección locus)
NCI-H1395	Femenino	55	ADC	BRAF (c.1406G>C) ATM (c.7996A>T)
NCI-H1650	Masculino	27	ADC	EGFR (c.2235_2249del15) CDKN2A (c.1_471del471) TP53 (c.673-2A>G)
NCI-H1993	Femenino	47	ADC	TP53 (c. 726C>G)
PC9	Masculino	Desc	ADC	EGFR (c.2235_2249del15) TP53 (c.743G>A)
299	Masculino	69	CE	TP53 K132E
301	Masculino	71	CE	TP53 D259fs*84
302	Femenino	74	ADC	KRAS 12 Asp
303	Femenino	57	ADC	TP53 R175H
315	Femenino	65	ADC	-
317	Masculino	76	CE	-
320	Masculino	65	ADC	TP53 P153fs*26
343	Femenino	68	ADC	TP53 R158L

Tabla M1: Listado de las líneas celulares establecidas utilizadas en los diferentes experimentos realizados. Los pacientes 299-343 se testaron para mutaciones en EGFR, KRAS, ALK y ROS en la Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUV, Valencia). Información obtenida de la base de datos de la colección comercial de líneas celulares de la American Type Culture Collection (ATCC); de la base de datos de líneas Cellosaurus de la web de recursos bioinformáticos ExpASY; y de la base de datos CellLineNavigator, de Medical Genomics. ADC: Adenocarcinoma; CE, Carcinoma Escamoso.

M1.1 Cultivo en adherencia de líneas celulares.

El cultivo celular se realizó en placas de 100 mm x 20 mm (Corning Incorporated[®], Corning, NY, USA). El medio de cultivo para las líneas celulares mantenidas en condiciones de adherencia fue medio de Eagle modificado por Dulbecco con formulación F12 y suplementado con GlutaMAX[®] (Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12, DMEM/F12 + GlutaMAX[®], Gibco[®], Thermo Fisher Scientific[®], Estados Unidos) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Fetal bovine serum, FBS, Gibco[®], Thermo Fisher Scientific[®], Estados Unidos) y suplementado con los antibiótico Penicilina/Estreptomina (Penicilin/Streptomycin, P/S, Gibco[®], Thermo Fisher Scientific[®], Estados Unidos) con unas concentraciones de 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina.

M1.2 Mantenimiento de cultivos de líneas celulares en adherencia.

Cada 3-4 días se realiza un cambio de medio, el medio se aspira y se añade inmediatamente medio fresco. Al llegar a condiciones de subconfluencia (densidad celular aproximada de un 80% de confluencia) se realizan dos lavados con tampón fosfato salino atemperado a 37°C (Phosphate buffered saline, PBS, Biowest[®], Nuaille, Francia). A continuación, se añade 1ml de Tripsina-EDTA al 0,05% (Tripsina-EDTA 0,5%, Gibco[®], Thermo Fisher Scientific[®], Estados Unidos) en PBS, y se incuba 5 minutos a 37°C. A continuación, la enzima se inactiva con medio DMEM/F12 suplementado con suero y se centrifuga a 400g durante 5 minutos.

El pellet resultante se resuspende en 1 ml de medio y se determina la densidad y viabilidad celular para proceder a la siembra. Para ello se han utilizado, respectivamente, la cámara de recuento Neubauer (Ref: 8100103, Hirschmann[®], Neckartenzlingen, Alemania) y la tinción con azul de tripano por métodos estándar (Trypan Blue solution, Ref: T8154, Sigma-Aldrich[®], Merck[®], Darmstadt, Alemania).

M1.3 Cultivo de tumoresferas de líneas celulares.

Para el establecimiento y el mantenimiento de las células en baja adherencia suspensiones celulares de las líneas se sembraron en placas de 6 pocillos que están tratadas con poli-2-hidroxietil-metacrilato, que permite el crecimiento de las células en suspensión (Ultra Low Attachment Surface, Corning[®] Costar[®], Nueva York, Estados Unidos), a una concentración de 10.000 células/pocillo.

Se usó medio DMEM/F12 suplementado con insulina 5 µg/mL, transferrina 5 µg/mL y ácido selenoso 5 ng/mL (Insulin-Transferrin-Selenious acid, ITS, Corning[®], Estados Unidos), factor de crecimiento epidérmico humano 0,2 µg/mL (human epidermal growth factor, hEGF, PeproTech[®], Estados Unidos), factor de crecimiento de fibroblastos humano básico 0,1 µg/mL (human Fibroblastic growth factor-basic, hFGFb, PeproTech[®], Estados Unidos), albúmina sérica bovina fracción V 0,4% (BSA, Gibco[®], Thermo Fisher Scientific[®]), 50 µg/mL de ácido ascórbico (Ref: A2218-25G, Merck), aminoácidos no esenciales del medio esencial mínimo 1X (Ref: 11140035, Gibco[®], Thermo Fisher Scientific[®], Estados Unidos) y penicilina/estreptomina (100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina, P/S).

M1.4 Mantenimiento de cultivos de tumoresferas.

Cada 3 días se sustituye la cuarta parte del volumen por medio fresco, realizando esta suplementación con mucho cuidado para no arrastrar ninguna esfera. Al alcanzar los 8 días se procede a la disgregación de las esferas, proceso mediante el cual obtenemos células individuales. Estas se recogen en un tubo cónico de 15ml (Ref: 525-0401, VWR®, Avantor®, Radnor, Estados Unidos) y se centrifugan a 400g durante 5 minutos. Se lavan con PBS y se añaden 200 µL de Tripsina-EDTA al 0,05% (Tripsina-EDTA 0,5%, Gibco®, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos) en PBS. Se incuba durante 5 minutos a 37°C. La tripsina se inactiva añadiendo 2ml de DMEM:F12 suplementado con un 1% de Albúmina bovina fracción V (BSA) y se centrifuga a 400g durante 5 minutos. El pellet de células resultante es resuspendido en 1ml de medio formulado para tumoresferas y se valora el conteo y la viabilidad celular por métodos estándares.

M2 Establecimiento de cultivos primarios de tumoresferas.

M2.1 Criterio de selección de muestras y recepción.

Las muestras de tejido tumoral y tejido pulmonar adyacente al tumor proceden de pacientes a los que se les ha extirpado un tumor de CPNM en el Hospital General Universitario de Valencia. El criterio de selección de pacientes fue el siguiente: pacientes que fueron intervenidos quirúrgicamente, con posibilidad de obtener biopsia, no tratados previamente, estadios I-IIIa y con diagnóstico histológico de algún subtipo de CPNM.

Paciente	Sexo	Edad	TNM	Histología	Formación Esferas	Estatus Mutacional	Relapse or Exitus	Fumador
290	Masculino	70	IIB(T3N0M0)	SCC	NO	-	SI	exfumador
291	Masculino	66	IIA(T2bN0M0)	SCC	SI	KRAS G 12C	SI	fumador activo
292	Femenino	62	IA(T1bN0M0)	ADC	NO	-	NO	fumador activo
293	Masculino	70	IIA(T2bN1M0)	SCC	NO	-	NO	exfumador
299	Masculino	69	IIIA(T4N1M0)	SCC	SI	TP53 K132E	SI	-
301	Masculino	71	IIB(T3N0M0)	SCC	SI	TP53 D259FS*84	NO	exfumador
302	Femenino	74	IIA(T2aN0M0)	ADC	SI	KRAS G12D / TP53 E285K	NO	-
303	Femenino	57	IB(T1bN0M0)	ADC	SI	TP53 R175H	SI	exfumador
304	Masculino	48	IIA(T2bN1M0)	SCC	NO	-	NO	fumador activo
307	Masculino	62	IB(T2aN0M0)	ADC	NO	-	NO	exfumador
308	Masculino	72	IIB(T3N0M0)	SCC	NO	-	NO	fumador activo
311	Masculino	78	IB(T2aN0M0)	ADC	NO	-	NO	exfumador
315	Femenino	65	IA(T1aN0M0)	ADC	SI	-	NO	nunca fumo
316	Femenino	42	III-B(T2aN3M0)	ADC	NO	-	SI	fumador activo
317	Masculino	76	IIB(T3N0M0)	SCC	SI	-	SI	-
320	Masculino	65	IB(T2aN0M0)	ADC	SI	TP53 P153fs*26	NO	
322	Masculino	75	IB(T2aN0M0)	SCC	NO	-	NO	exfumador
325	Femenino	67	IB(T2aN0M0)	ADC	NO	EGFR L858R	NO	nunca fumo
326	Femenino	62	IB(T2aN0M0)	ADC	NO	EGFR L858R / TP53 G2RRC	SI	exfumador
327	Masculino	66	IB(T2aN0M0)	SCC	NO	-	NO	exfumador
334	Masculino	67	IIB(T3N0M0)	SCC	NO	-	NO	exfumador
336	Masculino	62	IIIA(T4N3M0)	ADC	NO	-	SI	fumador activo
343	Femenino	60	IB(T2aN0M0)	ADC	SI	TP53 R158L	SI	-

Tabla M2: Listado de los pacientes incluidos en esta tesis y sus variables clínico-patológicas. El estado mutacional fue testado en la Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUV, Valencia).

Las muestras seleccionadas por un patólogo fueron enviadas al Laboratorio de Oncología Molecular de la Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUV, Valencia), dirigido por el Dr. Camps y la Dra. Eloisa Jantus y al Laboratorio de Señalización Oncogénica en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF, Valencia). Las secciones biopsiadas se recibieron sumergidas en DMEM/F12+GlutaMAX® suplementado con antibióticos P/S.

Las muestras fueron caracterizadas histológicamente en el hospital, donde también se determinó si contenían mutaciones en los genes EGFR, TP53, ROS1, ALK, y KRAS. En la tabla **M2** se muestran las características de los pacientes que se han incluido en esta tesis.

M2.2 Obtención de cultivos primarios derivados de tumores de CPNM.

El protocolo usado está adaptado del trabajo de Zhang del 2012 (135). Siempre que la cantidad de material extraído lo permite se reserva parte del tumor para extracción de DNA/RNA y estudios histológicos. Brevemente, el fragmento de tumor primario resecado recibido es lavado con PBS y penicilina/estreptomina en las concentraciones previamente mencionadas al menos 3 veces y es cortado en varios fragmentos representativos.

El fragmento destinado a cultivo primario es cortado usando cuchillas de bisturí en fragmentos de como máximo 1 mm³, con precaución de no aplastar la muestra. Estos fragmentos son sometidos a una disgregación enzimática con colagenasa tipo IV 1 mg/mL (Gibco®, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos), dispasa 1 mg/mL (Gibco®, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos) y DNasa I 0,001% (10 µg/mL, Sigma Aldrich®, Merck®, Darmstadt, Alemania) durante 2 horas con agitación suave. Tras ello se procede a una disgregación mecánica usando pipetas de diámetros descendentes y se realiza una filtración con filtros de 0,70 µm y 0,40 µm (Falcon®, Estados Unidos).

Este tumor disgregado se centrifuga a 400g durante 5 minutos, se lava con PBS, se resuspende en 10 ml de tampón de lisis de eritrocitos 1X (Ref: 555899, BD Biosciences®, Estados Unidos) y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación media. Tras un último lavado con PBS, la suspensión celular se resuspende en medio fresco para tumoroesferas, se evalúa la viabilidad y el número de células mediante método estándar.

M2.3 Cultivo de tumoroesferas derivadas de tumores de CPNM.

Para establecer el cultivo de tumoroesferas derivadas de tumores de CPNM las células se sembraron a una densidad de 25.000 células/mL de medio en placas de 6 pocillos tratadas para cultivos de baja adherencia según el protocolo descrito en el apartado **M1.3**.

M2.4 Cultivo en adherencia de derivadas de tumores de CPNM.

Para establecer el cultivo en adherencia, las células obtenidas tras la disgregación se sembraron a una densidad de 10.000 células/cm² en placa de 6 pocillos para cultivos en adherencia (TC-treated, Ref:153516, Corning® Costar®) en DMEM/F12 suplementado con un 10% de FBS y P/S.

M3 Técnicas de análisis celular.

M3.1 Ensayos de citometría multiparamétrica.

La citometría de flujo nos permite estudiar el fenotipo de nuestras células usando anticuerpos unidos a fluorocromos contra nuestras proteínas de interés. La caracterización de la expresión de las proteínas de membrana tanto de las tumoresferas como de los cultivos en adherencia se realizó mediante citometría multiparamétrica.

M3.1.1 Preparación de células para citometría.

Tanto las células crecidas en adherencia como las tumoresferas se sembraron y disgregaron como se detalla en los apartados **M1.2** y **M1.4** respectivamente. Los tumores primarios de pacientes o derivados de los xenotransplantes son disgregados tal y como se describe en el apartado **M2.2**, con el paso adicional indicado en **M5.3** en el segundo caso, y son analizados inmediatamente tras su disgregación. Las células individualizadas se resuspendieron a razón de 1×10^6 células/ml.

M3.1.2 Marcaje con anticuerpos y detección de eventos.

En tubos de citometría se preparan 50.000 células por tubo, realizando tantos tubos como el panel de anticuerpos requiera. Se añade a continuación el cóctel de anticuerpos (ver tablas **M3** y **M4**) y se incuba durante una hora en hielo. Tras la incubación se añaden 500ul de PBS frío, se centrifuga durante a 400 g durante 4 minutos a 4°C, se decanta el sobrenadante y el sedimento celular se resuspende en 300ul de medio frío DMEM/F12 suplementado con Penicilina/Estreptomicina. Las muestras se analizaron en el citómetro FC500 MCL Flow (Beckman-Coulter®, Estados Unidos).

Anticuerpo	Referencia	Casa comercial
CD44 PE-Cy7	560533	BD Pharmingen™
Isotype IgG2b,k PE-Cy7	560542	BD Pharmingen™
CD90 PE-CF594	562385	BD Pharmingen™
Iso-IgG1k PE-CF594	562292	BD Pharmingen™
CD133/1 APC	130-090-826	Miltenyi Biotec
CD133/2 APC	130-090-854	Miltenyi Biotec
Iso IgG1 APC	130-098-846	Miltenyi Biotec
CD166 PerCP-eFluor710	46-1668-41	eBioscience
Isotype IgG1, k PerCP-eFluor 710	46-4714-80	eBioscience
E-cadherine PE	FAB18381P	R&D
Isotype IgG2B PE	IC0041P	R&D
ABCG2 APC	FAB995A	R&D
Isotype IgG2B, APC	IC0041A	R&D
CD117-PC5	IM2733U	Beckman Coulter
Epcam FITC	130-080-301	Miltenyi Biotec
Isotype IgG1, FITC	130-092-213	Miltenyi Biotec
CD34-PE	555822	BD Pharmingen™
CD31-PE	555446	BD Pharmingen™
CD45-PE	555483	BD Pharmingen™
Isotipo PE IgG1k	555749	BD Pharmingen™

Tabla M3: Lista de anticuerpos utilizados en los ensayos de citometría multiparamétrica.

Lineas establecidas	
Combinación anticuerpos/isotipos	Por 100ul (1x106 cels/ml)
CD326-FITC + CD166-PerCPeF710 + CD90-PECF594 + E-Cadh-PE	10 + 5 + 10 + 10
CD326-FITC + CD34-PE + CD44-PE-Cy7 + ABCG2-APC	10 + 10 + 5 + 10
CD133/1-APC	5
CD133/2-APC	5
Iso-FITC + IsoPerCPFluor710 + IsoPE-CF594 + IsoPE	10 + 5 + 10 + 20
Iso-FITC + Iso-PE + Iso-PE-Cy7 + Iso-APC	10 + 10 + 5 + 10
Iso-APC	10 + 10 + 5
Disgregación tumores (Paciente o PDX)	
Combinación anticuerpos/isotipos	Por 100ul (1x106 cels/ml)
CD326-FITC + CD166-PerCPeF710 + CD90-PECF594 + CD45-PE + CD31-F	10 + 5 + 10 + 20 + 20
CD326-FITC + CD34-PE + CD44-PE-Cy7 + ABCG2-APC	10 + 10 + 5 + 10
CD326-FITC + Ecadh-PE + CD133-APC	10 + 10 + 5
Cd117-PC5	2
Iso-FITC + IsoPerCPFluor710 + IsoPE-CF594 + IsoPE	10 + 5 + 10 + 20
Iso-FITC + Iso-PE + Iso-PE-Cy7 + Iso-APC	10 + 10 + 5 + 10
Iso-FITC + Iso-PE + Iso-APC	10 + 10 + 5
medio (autofluorescencia)	2

Tabla M4: Combinación de anticuerpos usados en los ensayos de citometría multiparamétrica.

M3.2 Ensayos de Microscopía.

M3.2.1 Microscopía óptica.

Las imágenes de microscopía óptica fueron tomadas en un microscopio Leica DM6000 (Leica Microsystems®, Wetzlar, Alemania) y un microscopio Leica DM IL (Leica Microsystems®) con cámara incorporada DFC350FX (Leica Microsystems®). Se tomaron imágenes a diferentes magnificaciones (4x, 10x, 20x, 40x) y, según el caso, por contraste de fases o directas.

M3.2.2 Microscopía de Fluorescencia.

M3.2.2.1 Fijación de cultivos crecidos en adherencia o tumoresferas.

Las células provenientes de cultivos adherentes se sembraron en densidad de 30.000 células/cm² sobre cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro (Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos). 48 horas después de la siembra los cultivos en monocapa se fijaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído al 4% (PFA 4%) en PBS y se realizaron 5 lavados de 5 minutos con PBS.

Tumoresferas de 8 días de cultivo se recogieron en un tubo de 15 mL, se centrifugaron a 400g durante 5 minutos y se resuspendieron en 600 µL de PBS. Las tumoresferas son entonces transferidas al porta gracias a la centrifuga adaptada Cytospin 4 (Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos). Para una correcta adhesión de las tumoresferas al portaobjetos, este fue tratado con una solución de gelatina de alumbre, formada por 0,5% de gelatina (Gelatina tipo A, Sigma-Aldrich®, Merck®, Alemania) y 0,05% de alumbre de cromo y potasio (Merck®, Alemania). A continuación, las células se fijaron con 100 µL de paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente y se realizaron 5 lavados de 5 minutos con PBS.

Las preparaciones se conservaron en PBS + 0.05% azida sódica a 4°C hasta realizar la inmunocitoquímica.

M3.2.2.2 Inmunofluorescencia.

Para analizar la expresión y localización de las proteínas de estudio, las células se permeabilizaron con PBS con 0,4% de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich®, Merck®, Alemania) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se bloquearon con un 10% de albúmina sérica bovina (BSA), y 0,2% de Tritón X-100 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, y a continuación se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo durante 16 horas a 4°C. Tras este tiempo, se realizaron 5 lavados de 5 minutos con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en la solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente.

A continuación, se realizaron 5 lavados de 5 minutos con PBS y las preparaciones se montaron con el medio de montaje antidecoloración ProLong® Gold Antifade (Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos) que ya lleva DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), colorante para la tinción fluorescente del ADN. Los anticuerpos primarios empleados, así como los correspondientes anticuerpos secundarios aparecen indicados en la Tabla **M5**.

Anticuerpo	Referencia	Casa Comercial
EpCAM-FITC	Miltenyi	130-080-301
EpCAM(ICD)	Abcam	ab32392
CD166	Abcam	ab109215
CD44	Cell Signaling Tech	#3570
CD133	Novus Biologicals	NB120-16518SS
Notch1	Abcam	ab8387
Sox2	Abcam	ab97959
Oct4	abcam	ab272985
Nanog	Santa Cruz	sc-293121
Integrin α6	Santa Cruz	sc-374057
Notch3	Santa Cruz	sc-515825
p21	Cell Signaling Tech	#2946
SNAI 1	Santa Cruz	sc-271977
E-Cadherina	Santa Cruz	sc-8426
Vimentina	Abcam	ab8978
Anti-ratón IgG (AlexaFluor 647)	Abcam	ab150115
Anti-cabra IgG (AlexaFluor 647)	Abcam	ab150129
Anti-conejo IgG (AlexaFluor 488)	Abcam	ab150073
Anti-conejo IgG (AlexaFluor 647)	Invitrogen	A21244

Tabla M5: Anticuerpos usados en la inmunocitoquímica de fluorescencia.

M4 Técnicas de análisis molecular.

M4.1 Western Blot.

M4.1.1 Preparación y lisis de células para extracción proteica.

Las líneas celulares se sembraron para western blot en las condiciones descritas en los apartados **M1.1** y **M1.3**. Las tumoresferas se sembraron 8 días antes a 10.000 células/ml (2ml por pocillo en placas de 6 pocillos). Los cultivos adherentes se sembraron 2 días antes a 300.000 células/ml (10 ml en placas de 10 cm). Se realiza un mantenimiento de cultivos tal y como se describió en los apartados **M1.2** y **M1.3**.

Las células adherentes se lavaron con PBS frío y se separaron de la placa con un raspador celular y las células en baja adherencia se centrifugaron y se lavaron 2 veces con PBS frío. Una vez recogidas las células se lisaron a 4°C en tampón Triplex (50 mM Tris; HCl pH 8; 150 mM NaCl; 0.01% SDS; 1% Igepal; y 0.5% desoxicolato de sodio), conteniendo el cóctel de inhibidores de proteasas cOmplete® de Roche. Las células se incubaron en hielo durante 30 min y se centrifugaron a 16000 g durante 10 min a 4°C para eliminar los restos celulares.

Las concentraciones proteicas se determinaron mediante el método de Bradford, un método colorimétrico que se basa en el desplazamiento del máximo de absorción desde 465 nm a 595 nm que experimenta el colorante Brilliant Blue G al formar un complejo con proteínas. Se mezclaron 200 µl del reactivo de Bradford (Sigma) con 5 µl de los extractos diluidos y se midió la absorbancia de las muestras a 595 nm. Se empleó una curva patrón con concentraciones conocidas de BSA para interpolar las concentraciones de las muestras. Una vez determinada la concentración de proteínas, se añadió tampón de muestra Laemmli 5X a los extractos, y se calentaron 5 minutos a 95°C.

M4.1.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida y transferencia a membrana.

Las proteínas de cada muestra se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), que permite la separación por tamaño de las proteínas, con tampón de electroforesis formado por Running Buffer 1X (formado por Tris base y glicina), agua tipo II (90% del volumen) y SDS 20% (5 mL/L de tampón), y en fuente de alimentación de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories®, Estados Unidos). Se usaron concentraciones de poliacrilamida de entre el 10 y el 12,5% según las proteínas de interés.

Una vez realizada la electroforesis, se procedió a la transferencia en condiciones húmedas de las proteínas del gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (Immun-Blot® PVDF Membrane, Bio-Rad Laboratories®, Estados Unidos), utilizando el sistema Mini Trans-Blot® Cell” (Bio-Rad Laboratories®, Estados Unidos). El tampón de transferencia empleado se compuso de Tris base 6 g/L y ácido bórico 3,1 g/L. Previamente a la transferencia, la membrana de PVDF se activó con metanol 100% siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se realizó durante 16 horas a temperatura ambiente con un voltaje fijo de 12 V.

Para comprobar la correcta transferencia de proteínas a la membrana se realiza una tinción de la membrana. La tinción se prepara como 0,1% (masa/volumen) de Ponceau S (Sigma-Aldrich®, Merck®, Alemania) en ácido acético al 1% (volumen/volumen agua tipo II). La membrana de

PVDF es sumergida en la tinción durante 5 minutos; y seguidamente se destiñe el rojo inespecífico del fondo con tres lavados de 3 minutos con ácido acético al 1%. La tinción con Ponceau S no priva del posterior marcaje con anticuerpos y detección específica de proteínas.

M4.1.3 Bloqueo, incubación con anticuerpos y detección de quimioluminiscencia.

Para la detección inmunológica de las proteínas de interés, las membranas se bloquearon con solución de bloqueo (5% leche desnatada en TBS/Tween 0,05%) durante una hora a temperatura ambiente, en agitación. A continuación, se incubó la membrana con anticuerpo primario. Posteriormente, se lavó la membrana tres veces durante 10 minutos con TBS/Tween 0.05% y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente. Los anticuerpos usados en el estudio se detallan en la Tabla **M6**. Los tiempos de incubación son dependientes de cada anticuerpo y experimento.

Finalmente se detectó la unión antígeno-anticuerpo mediante el método de quimioluminiscencia, empleando un kit comercial de quimioluminiscencia mejorada (ECL, Enhanced chemiluminescence) de Pierce® (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos). Este kit contiene dos soluciones: peróxido de hidrógeno y luminol en proporción 1:1. Se empleó una reveladora automática de películas AGFA® para detectar la señal en películas radiográficas (Carestream Medical X-Ray Film, Kodak®, Nueva York, Estados Unidos).

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia
EpCAM(ICD)	Abcam	ab32392
CD44	Cell Signaling Tech	156-3C11
CD166	Abcam	ab109215
CD133	Abcam	ab19898
ALDH1	Abcam	ab23375
Sox2	Abcam	ab97959
Oct3/4	Santa Cruz	sc-5279
Oct4	abcam	ab272985
Nanog	Santa Cruz	sc-293121
Integrin α 6	Santa Cruz	sc-374057
Notch3	Santa Cruz	sc-515825
p21	Cell Signaling Tech	#2946
SNAI 1	Santa Cruz	sc-271977
E-Cadherina	Santa Cruz	sc-8426
Vimentina	Abcam	ab8978
β -Actina	Sigma-Aldrich	A5441
Anti-conejo IgG-HRP	Sigma-Aldrich	A6154
Anti-ratón IgG	Sigma-Aldrich	A9044

Tabla M6: Anticuerpos usados en la inmunocitoquímica de fluorescencia.

M5 Modelo experimental in vivo de CPNM.

M5.1 Animales.

Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con el Real Decreto 53/2013 sobre protección y cuidado de los animales en experimentación y otros fines científicos. Se siguieron estrictamente las normas y recomendaciones del Comité de Ética en Bienestar Animal de CIPF (CEBA, CIPF, Valencia, España). Los procedimientos (2013/027/CIPF/0284) fueron aprobados por la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalitat Valenciana (Comunidad Valenciana, España). Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado donde se les informa del uso para investigación del material extirpado en las cirugías.

Un total de 26 ratones NOD SCID (NOD.CB17-Prkdc^{scid}/NCrCrI, Charles River Laboratories®, Estados Unidos) se incluyeron en este proyecto de tesis doctoral para la inyección subcutánea de células de CPNM.

M5.2 Inyección subcutánea de células de CPNM.

Fue realizada en ratones de 5-6 semanas. El ratón se anestesió con isoflurano (dosis inicial al 5% y dosis de mantenimiento al 2,5%), se colocó en posición supina y se realizaron dos inyecciones subcutáneas (una en cada lado del abdomen) con el correspondiente número de células (500, 2.000, 5.000, 20.000, 50.000 o 500.000) derivadas de tumoresferas de CPNM en un volumen de 200 µL de medio libre de suero y Matrigel® (Falcon® Corning®, Estados Unidos) (1:1). Una vez realizadas las inyecciones, esperamos a que el ratón se despierte para volverlo a meter en la jaula.

A partir de aquí se observa el crecimiento tumoral en el lugar de la inyección o alrededores, hasta alcanzar volumen de 1500 mm³, momento en el que el ratón es sacrificado con dióxido de carbono (>70%) y los tumores se extirpan para proceder a su estudio. El tamaño del tumor se midió una vez a la semana y se usó la fórmula descrita en el material suplementario del artículo de 2015 de Bertolini et al. (193) VT (mm³) = d² x D/2, donde d y D son el diámetro corto y largo respectivamente para calcular el tamaño tumoral.

M5.3 Disgregación de tumores de CPNM crecidos en ratón.

Los tumores extirpados son disgregados siguiendo el protocolo descrito en el apartado **M2.2** con una modificación. Tras la lisis de eritrocitos se procede a eliminar las células de ratón de la suspensión celular mediante el kit de depleción de células de ratón (130-104-694, Milteny Biotec, Alemania) siguiendo las instrucciones de la ficha técnica.

M6 Análisis estadístico y de imagen.

Para el manejo de bases de datos con nuestros datos de citometría y los análisis se usó el programa libre R (versión 3.3.0), usado mediante la aplicación R studio, versión 0.99.902.

Los análisis de imágenes de microscopio, Western Blot, inmunocitoquímica para cuantificación o incorporación de escala, mejora del visionado por correcciones de brillo y contraste, y otros tratamientos, se realizaron con el software de código abierto de procesamiento de imágenes digitales Fiji ImageJ (ImageJ, Estados Unidos, versión 1.51j).

Resultados

R1 Puesta a punto de un protocolo para la generación de cultivo 3D o tumoresferas derivadas de CPNM.

El cultivo de tumoresferas es un cultivo tridimensional (3D) a partir de células madre tumorales (CMT) en el que se utiliza medio de cultivo sintéticos de composición definida. Esta técnica derivada de la usada por Reynold y Weiss en 1992 (63) permite la obtención de una población más indiferenciada y pluripotente. Las tumoresferas se han revelado en los últimos años como una alternativa a las líneas celulares establecidas y a los xenoinjertos derivados de pacientes (PDX) en ratones inmunodeprimidos. Poseen las ventajas de las líneas celulares como son el crecimiento *in vitro*, la facilidad para ser expandidas y conservadas, y la posibilidad de ser manipularlas genéticamente. También poseen ventajas atribuidas a los PDX, como son la estabilidad biológica, ser genéticamente similares al tumor, crecimiento tridimensional, y poder mantener parte de la heterogeneidad tumoral.

El establecimiento se realiza a partir de suspensiones de células sembradas a densidad clonal en placas cuya superficie impide la adhesión celular (placas de baja adherencia) en medio DMEM-F12 suplementado con factores de crecimiento como EGF y bFGF, además de insulina, transferrina humana y ácido selenioso, (ITS) como se ha descrito en Materiales y Métodos. En estas condiciones de cultivo solo algunas células serán capaces de dividirse y formar tumoresferas, y serán aquellas que tienen características de CMT. Los experimentos se realizan con un cultivo de tumoresferas con entre dos y doce pases, tratando siempre de usar un cultivo más cercano a la parte inicial de dicho intervalo. Una vez formadas, las tumoresferas pueden expandirse tras ser disgregadas y cultivadas de nuevo de la misma forma en placas de 6-10 cm de diámetro o en placas multipocillo (6, 24 o 96 pocillos) en función de la técnica a realizar (por ej. citometría de flujo, aislamiento de ADN, ARN mensajero, proteína o ensayos de citotoxicidad).

El cultivo de tumoresferas puede derivar tanto de líneas celulares establecidas, de líneas derivadas de pacientes (LDP) establecidas en nuestro laboratorio, como de células obtenidas de la disgregación de tumores primarios de pacientes. La obtención de tumoresferas nos dota de un modelo experimental para el estudio *in vitro* de las CMT, al tener una población enriquecida en células con propiedades de célula madre y por tanto se pueden utilizar para identificar, aislar y caracterizar CMT derivadas de tumores de pacientes con CPNM, objetivo de esta tesis doctoral.

R1.1 Generación de tumoresferas derivadas de líneas celulares de CPNM .

Como se ha comentado previamente en la introducción, una importante herramienta para la búsqueda de marcadores de CMT es la comparación entre las poblaciones con características de CMT y la misma población adherente y más diferenciada, cultivada en placas de adherencia en presencia de suero bovino fetal al 10%. A continuación, se muestran imágenes de ambos tipos de cultivos para las líneas celulares derivadas de CPNM A549, H1395, H1650, H1993 y PC9.

Como podemos ver en la figura **R1**, las diferentes líneas celulares generan tumoresferas con diferentes características morfológicas. Se observan principalmente 2 tipos de fenotipos: Las líneas celulares H1650, H1993 y PC9 forman tumoresferas redondeadas, mientras que las

líneas A549 y H1395 presentan una morfología parecida a racimos de uva, más cercana a agregados que esferas. Los cultivos en adherencia también muestran una heterogeneidad tanto en morfología como en ritmo de crecimiento: las líneas celulares A549 y H1650 están compuestas por células con morfología escamosa, las células de las líneas PC9 y H1395 tienden a ser más fusiformes, mientras que las de la línea H1993 tienden a agruparse sin formar una monocapa confluyente. Las células A549, H1395 y PC9 muestran un mayor ritmo de crecimiento que las H1650 y las H1993.

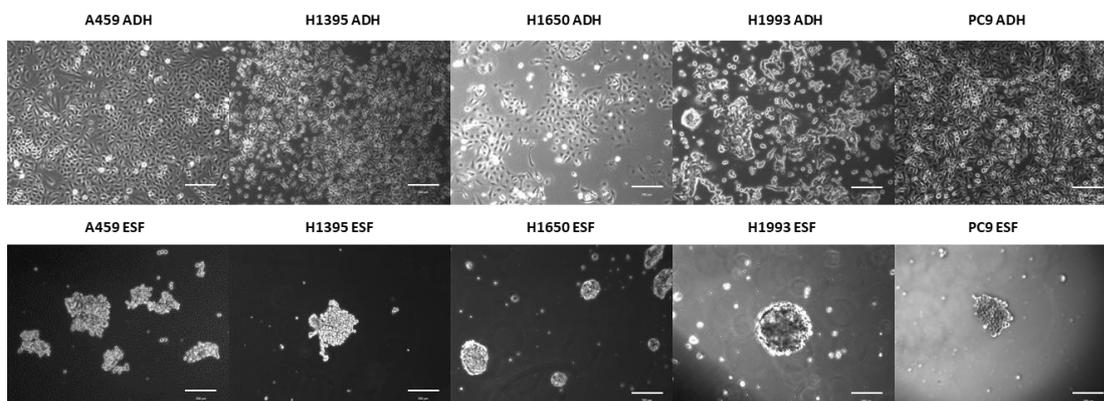


Figura R1: Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases de las líneas celulares A549, H1395, H1650, H1993 y PC9 en condiciones de adherencia (ADH), arriba y de baja adherencia o tumoresferas (ESF), abajo. Las imágenes se capturaron con un de aumento 10x. Las barras de escala indican 200 µm.

Los cultivos en condiciones de baja adherencia se siembran a baja densidad y solo un pequeño porcentaje de las células pueden dividirse en esas condiciones de cultivo; por este motivo se asume que cada una de las tumoresferas proviene de una única célula, independientemente de la morfología de esta.

R1.2 Generación de tumoresferas derivadas de tumores de pacientes con CPNM .

En colaboración con el laboratorio de Oncología Molecular de la FIHGUV dirigido por el Dr. Carlos Camps y la Dra. Eloisa Jantus, en el laboratorio hemos generado cultivos de baja adherencia a partir tumores de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico procedentes del HGUV (FIS302, FIS303, FIS315, FIS317, FIS320). En el caso de estos cultivos establecidos en nuestro laboratorio, las 5 líneas celulares crecidas en condiciones de baja adherencia presentaron una morfología en racimo de uva como se aprecia en la figura **R2**. En condiciones de adherencia estas células mostraron abundantes interacciones célula-célula en forma de filopodios y lamelipodios, las células de la línea 317 son cúbicas y crecen en monocapa; las células de las líneas 302, 303, 315 y 320 son más elongadas, con unos núcleos más brillantes y menores interacciones célula-célula.

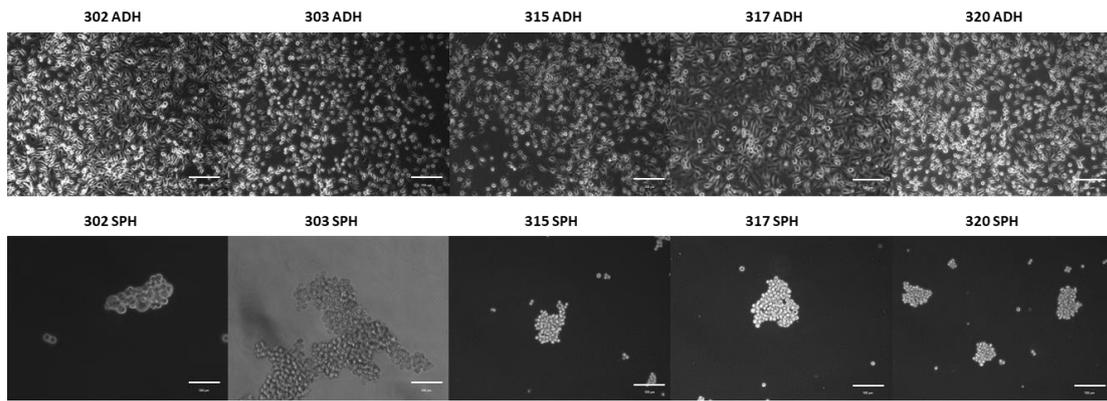


Figura R2: Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases de células derivadas de tumores de pacientes con CPNM en condiciones de adherencia (ADH), arriba y de baja adherencia o esferas (ESF), abajo. Las imágenes se capturaron con un aumento 10x. Las barras de escala indican 200 μm .

R2 Las tumoresferas tienen mayor capacidad iniciadora de tumores.

Para demostrar la capacidad de iniciar tumores (CIT) de las tumoresferas, éstas se inyectaron en ratón inmunodeprimido NOD SCID. Se inyectaron entre 500 y 500.000 células derivadas de las tumoresferas de las muestras FIS302, FIS303, FIS315, FIS317 y FIS320. En paralelo, se inyectaron el mismo número de células crecidas en adherencia. Tanto las células crecidas en adherencia (ADH) como en baja adherencia (ESF) fueron capaces de generar tumor en ratón, sin embargo, el crecimiento del tumor era más acelerado en células derivadas de tumoresferas.

La línea 302 requirió un alto número de células inyectadas para formar tumor, más de 50.000. Para los experimentos en los que se inyectaron 50.000 células obtuvimos un 100% de éxito en 2 inoculaciones usando células cultivadas en condiciones de adherencia; y un 33,33% de éxito en 3 inoculaciones usando tumoresferas, midiendo como éxito la capacidad de inducir tumores. Para los experimentos donde se inyectaron 500.000 células, las células cultivadas en condiciones de adherencia volvieron a dar un 100% de éxito en 2 inoculaciones, mientras que las inyecciones de tumoresferas presentaron un 80% de éxito. Inoculaciones de 100.000 células de cultivos de tumoresferas presentaron un porcentaje de éxito intermedio de 66,67% en 3 inoculaciones.

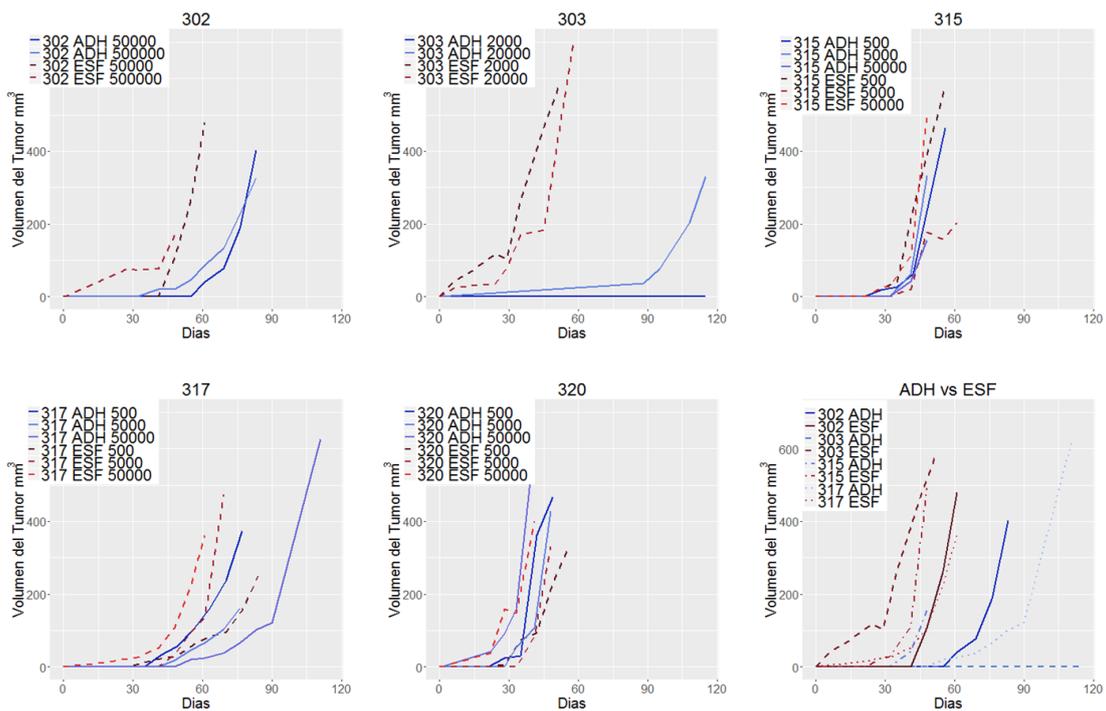


Figura R3, Capacidad iniciadora de tumores y curvas de crecimiento de las células FIS302, FIS303, FIS315, FIS317 y FIS320 inyectadas en ratón inmunodeficiente. Las líneas azules corresponden a las células adherentes (ADH), las líneas rojas a las células provenientes de cultivos de tumoresferas (ESF).

La línea 303 requirió una menor cantidad de células para generar un tumor. En los experimentos donde se inyectaron 2.000 células, las inoculaciones de células cultivadas en condiciones de adherencia presentaron un 0% de éxito en 2 inoculaciones, mientras que las

células de cultivos de tumores presentaron un 100% de éxito en 3 inoculaciones. En experimentos con 20.000 células los porcentajes de éxito fueron del 50% en 2 inoculaciones para células cultivadas en condiciones de adherencia y de un 100% en 3 inoculaciones para células de cultivos de tumores.

En las líneas 315, 317 y 320 se realizaron 2 inoculaciones de 500, 5.000 y 50.000 células en tanto con células crecidas en condiciones de adherencia como en células de cultivos de tumores. Las 3 líneas celulares obtuvieron un 100% de éxito en todas las condiciones, con la excepción de la inoculación de 500 células cultivadas en condiciones de adherencia de la línea 320, donde solo se obtuvo un 50% de éxito en 2 inoculaciones.

En la figura **R3** se observan las curvas de crecimiento de los tumores representativas de estos ensayos, en la tabla **R4** se pueden ver el número de pinchazos y número de células. En todas las líneas el crecimiento de los tumores de las células derivadas de tumores fue mayor que su contrapartida adherente. Así mismo, el tiempo de latencia para la formación del tumor fue mayor en los tumores derivados de células adherentes. Este resultado es muy claro para las líneas 302, 303 y 317, aunque en la diferencia es bastante menor en las líneas 315 y 320.

		500	2000	20000	5000	50000	100000	500000
FIS302	ADH					2/2		2/2
FIS302	ESF		0/1	0/1		1/3	2/3	4/5
FIS303	ADH		0/2	1/2				
FIS303	ESF		3/3	3/3				
FIS315	ADH	2/2			2/2	2/2		
FIS315	ESF	2/2			2/2	2/2		
FIS317	ADH	2/2			2/2	2/2		
FIS317	ESF	2/2			2/2	2/2		
FIS320	ADH	2/2			2/2	2/2		
FIS320	ESF	1/2			2/2	2/2		

Tabla R4, Tabla donde se indica el número de inyecciones donde se observó crecimiento tumoral (número a la izquierda) frente al número de inyecciones totales (número a la derecha), desglosado por línea celular, tipo de cultivo y número de células inyectadas.

R3 Las tumoroesferas y sus contrapartes adherentes correspondientes expresan EpCAM, CD166, CD44 y CD90.

Se evaluó la expresión de las proteínas de superficie EpCAM, CD166, CD44, CD90, CD34, CD133 y ABCG2 mediante citometría de flujo en las tumoroesferas y células adherentes derivadas de las líneas celulares A549, H1395, H1650, H1993 y PC9; las líneas celulares derivadas de tumores de pacientes establecidas en nuestro laboratorio 302, 303, 315, 317 y 320; así como en las células derivadas de los tumores generados en los ratones (Xenoinjerto derivado del tumor del paciente, PDX). Llamaré a esta última condición PDX en este apartado. Los resultados se muestran en la figura **R5**.

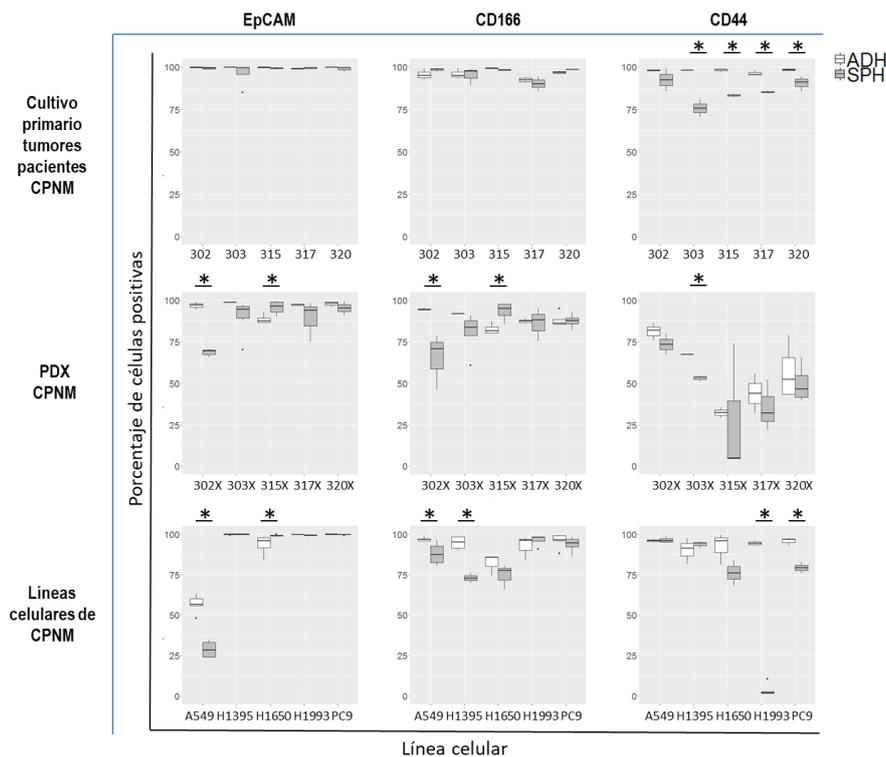


Figura R5: Representación de cajas de los resultados para EpCAM, CD166 y CD44 en cultivo primario derivado de pacientes (fila 1), los PDX de estos (fila 2) y en líneas celulares establecidas (fila 3). En cada línea celular se presentan los resultados de cultivos de células adherentes primero, en blanco, y los de cultivos de tumoroesferas después, en gris. La caja representa los cuartiles Q1 y Q3, la línea dentro de la caja la mediana, los bigotes van hasta un máximo de 1,5 veces el rango intercuartílico, los valores fuera de este rango se representan como círculos.

Los datos numéricos se muestran en la tabla **R6**, donde se indica además el número de repeticiones, en la tabla **R7** se pueden ver además los valores p del test de la T. Es importante destacar que la falta de desviación en los cultivos en adherencia de los PDX de la línea 303 se debe a la dificultad de la obtención de PDXs usando células adherentes en esta línea. En esta línea solo 1 de 4 tumores crecieron, frente a 6 de 6 tumores en el caso de la inyección con

células de tumoresferas. Los valores de citometría de los tumores derivados de los PDX de la línea 303 se han representado, pero no serán considerados en adelante al carecer de réplicas.

	302a	302e	303a	303e	315a	315e	317a	317e	320a	320e
CD326	99.75 ± 0.15 (3)	99.28 ± 0.75 (4)	99.9 ± 0.06 (3)	95.95 ± 7.44 (4)	99.68 ± 0.47 (3)	99.23 ± 0.67 (3)	98.97 ± 0.19 (3)	99.26 ± 0.65 (3)	99.8 ± 0.19 (3)	98.82 ± 1.41 (3)
CD166	95.64 ± 3.39 (3)	98.44 ± 1.25 (3)	95.83 ± 3.15 (3)	95.16 ± 5.02 (3)	99.31 ± 0.35 (2)	98.23 ± 0.27 (2)	92.38 ± 2.67 (2)	90.15 ± 6.19 (2)	96.71 ± 1.57 (2)	98.59 ± 0.39 (2)
CD44	98.05 ± 0.4 (3)	92.34 ± 9.41 (2)	98.09 ± 0.08 (3)	75.7 ± 7.21 (2)	98.13 ± 0.86 (3)	83.18 ± 1.03 (3)	96.29 ± 1.61 (3)	85.25 ± 0.83 (2)	98.36 ± 0.78 (3)	90.44 ± 4.38 (3)
	302xa	302xe	303xa	303xe	315xa	315xe	317xa	317xe	320xa	320xe
CD326	96.68 ± 2.34 (3)	68.41 ± 2.63 (3)	98,68 (1)	90.08 ± 10.26 (6)	88.42 ± 3.05 (4)	95.55 ± 4.51 (4)	97.27 ± 0.99 (2)	89.11 ± 12.35 (3)	97.8 ± 1.48 (4)	95.25 ± 3.57 (4)
CD166	94.53 ± 0.74 (3)	65.31 ± 16.88 (3)	91,86 (1)	80.26 ± 11.87 (5)	82.53 ± 3.51 (4)	93.33 ± 5.72 (4)	87.29 ± 2.16 (2)	86.05 ± 10.13 (3)	88.09 ± 4.65 (4)	87.48 ± 4.36 (4)
CD44	81.22 ± 5.18 (3)	73.45 ± 9.08 (2)	67,24 (1)	53.04 ± 1.69 (3)	32.19 ± 4.43 (2)	27.7 ± 39.94 (3)	43.83 ± 16.89 (2)	35.35 ± 15.38 (3)	56.59 ± 17.12 (4)	49.57 ± 11.64 (4)
	A549a	A549e	H1395a	H1395e	H1650a	H1650e	H1993a	H1993e	PC9a	PC9a
CD326	56.77 ± 5.76 (5)	28.86 ± 5.66 (4)	99.74 ± 0.33 (4)	99.74 ± 0.19 (4)	93.46 ± 6.56 (4)	99.09 ± 0.52 (4)	99.69 ± 0.23 (3)	99.21 ± 0.19 (5)	99.87 ± 0.15 (6)	99.61 ± 0.3 (8)
CD166	96.81 ± 1.27 (5)	87.69 ± 7.35 (4)	94.6 ± 4.32 (4)	72.84 ± 4.33 (2)	81.96 ± 6.52 (3)	74.68 ± 7.69 (3)	92.41 ± 7.59 (3)	96.08 ± 3.25 (5)	95.76 ± 4.53 (5)	93.61 ± 4.34 (6)
CD44	95.86 ± 1.1 (3)	96.22 ± 2.04 (3)	89.99 ± 7.91 (3)	93.63 ± 2.08 (3)	92.16 ± 9.71 (3)	76.03 ± 11.05 (2)	94.28 ± 2.17 (2)	3.75 ± 3.85 (5)	95.62 ± 2.42 (3)	79.22 ± 3.43 (3)

Tabla R6: A. Tabla con la Media ± desviación estándar junto al número de repeticiones entre paréntesis ($M \pm SD$ (n)) del porcentaje de células que expresa cada marcador en el análisis de citometría de flujo de los cultivos en adherencia (a), cultivos de tumoresferas (e) y tumores primarios disgregados de PDX generados a partir de cultivos en adherencia (xa) y de tumoresferas (xe).

	302a / 302e	303a / 303e	315a / 315e	317a / 317e	320a / 320e
CD326	0,3324	0,41113	0,39704	0,50935	0,29735
CD166	0,25003	0,85516	0,07284	0,6854	0,24276
CD44	0,33419	0,00975	0,00004	0,00328	0,03671
	302xa / 302xe	303xa / 303xe	315xa / 315xe	317xa / 317xe	320xa / 320xe
CD326	0,00016	NA	0,03963	0,44093	0,23543
CD166	0,04009	NA	0,01815	0,88113	0,85462
CD44	0,29544	NA	0,89015	0,60022	0,52266
	A549a / A549e	H1395a / H1395e	H1650a / H1650e	H1993a / H1993e	PC9a / PC9a
CD326	0,00017	0,97221	0,13815	0,01859	0,07445
CD166	0,02765	0,00435	0,27904	0,36492	0,4441
CD44	0,79941	0,48299	0,18103	$7,418 \times 10^{-7}$	0,00247

Tabla R7: Valores p del test de la T para cada marcador comparando la expresión entre los cultivos adherentes y tumoroferes.

Como podemos ver en la figura **R5**, EpCAM es un marcador que se expresa en la gran mayoría de las células analizadas; solo la línea A549 se aleja de este patrón. Las líneas celulares que han dado significativo en el test de la T para este marcador al analizar la expresión en ambas condiciones (adherentes frente a tumoresferas) son los tumores de los PDX de las líneas 302 y 315, así como las líneas A549 y H1650.

CD166 es un marcador que también se expresa en un alto porcentaje de las células analizadas, y además con un patrón de expresión bastante heterogéneo, pudiéndose observar mayor expresión tanto en ADH como en ESF, incluso en la misma pareja de ADH/ESF en cultivo y xenoinjerto, como ocurre también en el caso de las líneas 302, 303, 315 y 317. Para este marcador los valores significativos en el test de la T provienen de las líneas A549 y H1395, así como de nuevo de los PDX de los pacientes 302 y 315.

CD44 tiende a expresarse en un porcentaje de células ligeramente inferior en las esferas de la mayoría de los casos, y de nuevo las A549 se alejan de este patrón. Todos los valores significativos del test de la T corresponden a este comportamiento: las líneas derivadas de los tumores de pacientes 303, 315, 317 y 320 y las líneas celulares H1993 y PC9; cabe mencionar que en la línea H1993 se produce una gran disminución de la expresión de este marcador en las tumoroesferas, pasando de un 94.28% de expresión en células adherentes a un 3.75% en tumoroesferas.

La expresión de CD90 solo se observó en 2 análisis en las células H1650 crecidas en adherencia, en la figura **R8** se puede ver uno de ellos en la columna superior. En el resto de casos los valores fueron negativos o posibles falsos positivos. Los marcadores CD34, CD133 y ABCG2 no pudieron ser detectados por citometría de flujo en ningún caso.

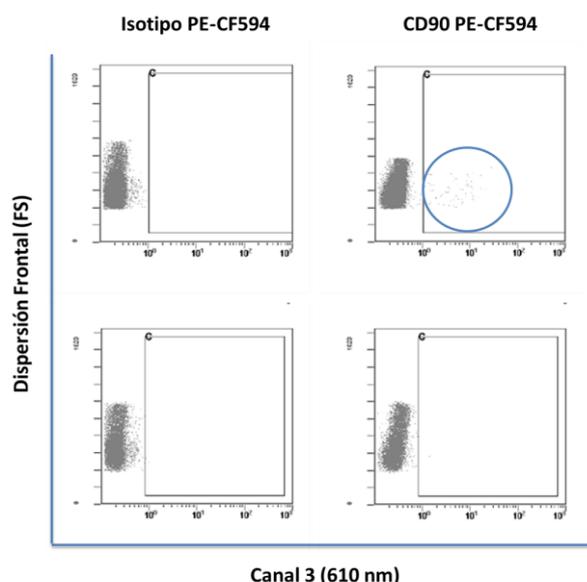


Figura R8: Ejemplo de un positivo y un negativo para CD90 en un cultivo de H1650 adherente. A la izquierda se observa el isotipo, usado como control negativo para CD90. A la derecha podemos ver el marcaje con el anticuerpo CD90 PE-CF594, en el panel superior se observa un resultado positivo y en el inferior un negativo.

R3.1 Identificación de subpoblaciones celulares en la línea de CPNM H1650.

En células H1650 crecidas en adherencia se identificó una subpoblación celular EpCAM^{neg}/CD44^{pos}. En la figura **R9** se muestra un ejemplo de células H1650 ADH y ESF analizadas consecutivamente el mismo día, encontrando dicha población en las células adherentes, pero no en las esferas.

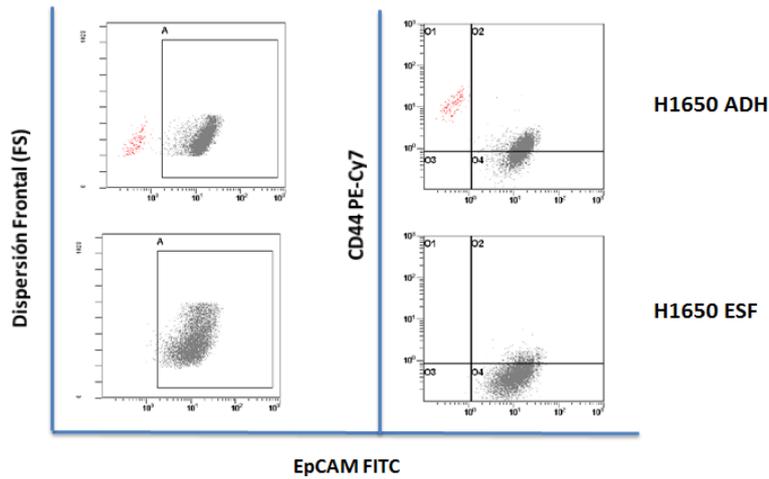


Figura R9: Ejemplos representativos para la línea celular H1650 cultivada en condiciones de ADH (arriba) y ESF (abajo). Se muestra la expresión de EpCAM respecto al FS (panel de la derecha) y la expresión de EpCAM respecto a CD44 (panel de la derecha). La población $EpCAM^{neg}/CD44^{pos}$ está señalada en rojo en el histograma EpCAM/CD44.

El estudio de las subpoblaciones EpCAM/CD166 en las H1650 también identificó una posible subpoblación en ADH, las subpoblaciones $EpCAM^{neg}/CD166^{bright}$ mostraron también buena resolución, pudiéndose diferenciar incluso una segunda subpoblación con mayor expresión de CD166. En la figura **R10** se muestra los histogramas que identifican estas subpoblaciones.

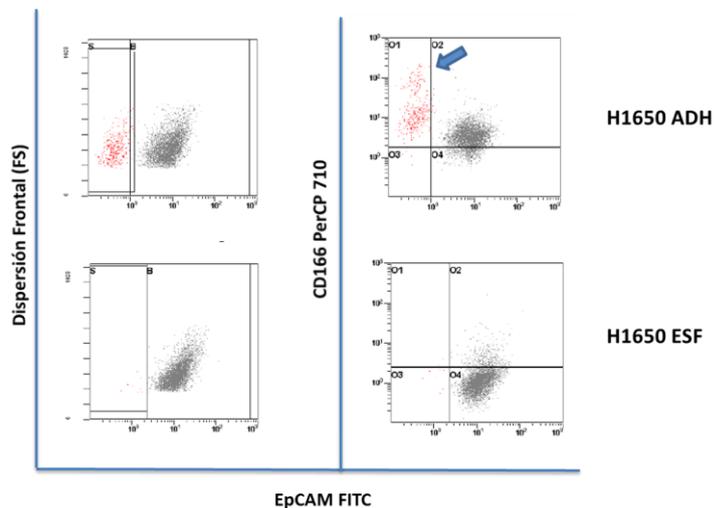


Figura R10: Ejemplos representativos para la línea H1650 en condiciones de ADH (arriba) y ESF (abajo). En el panel de la izquierda se muestra la expresión de la población EpCAM respecto al FS. En el panel de la izquierda se muestran las poblaciones EpCAM/CD166). Podemos observar la doble población $EpCAM^{neg}/CD166^{bright}$, con la subpoblación con mayor expresión de CD166 señalada por la flecha azul.

R4 Análisis de la expresión de marcadores de CMT por microscopía de fluorescencia y WB en las líneas celulares A549, H1395, H1650, H1993 y PC9.

Se analizó la expresión de marcadores de CMT por microscopía de fluorescencia y western blot. Además, se analizaron analizamos también otras proteínas intracelulares relevantes de las CMT como ALDH1, los factores de transcripción Sox2, Oct4 y Nanog, o los marcadores de célula epitelial E-Cadherina y de células mesénquimal Vimentina.

R4.1 Análisis de expresión de los marcadores de superficie EpCAM, CD166, CD44, CD144, ALDH1 mediante microscopía de fluorescencia.

A continuación, se describen los resultados para los marcadores de superficie EpCAM, CD166, CD44, CD133, así como para el marcador intracelular ALDH1, las imágenes de microscopía de fluorescencia se muestran en la figura **R11**

La línea A549 fue la única que no presentó expresión de EpCAM en ADH ni en tumoroesferas. Si presentó expresión de CD166, de una intensidad similar, pero con mucha mayor expresión en membrana plasmática en condiciones adherentes y mucha mayor expresión citoplasmática y especialmente nuclear en las tumoroesferas. La expresión de CD44 en dicha línea también fue similar, presentando expresión en membrana plasmática en ambos casos; en las tumoroesferas algunas presentaron una mayor concentración en la membrana que las adherentes. Al contrario que por citometría, CD133 si pudo ser detectado por microscopía de fluorescencia, aunque la señal fue leve, en ambos casos parece presentar una expresión citoplasmática difusa, expresándose también en núcleos en las condiciones de adherencia y estando ausente de estos en la tumoroesferas. ALDH1A1 fue expresado en ambos casos, aunque con mayor intensidad en las tumoroesferas, en ambos casos tiende a excluirse del núcleo, con algunas excepciones en las tumoroesferas.

La línea H1395 si presentó expresión de EpCAM, principalmente en membrana, pero mucho mayor en las tumoroesferas, las tumoroesferas también presentan expresión citoplasmática. CD166 de nuevo mostró una intensidad relativamente similar y con el mismo patrón de expresión que la línea A549: en membrana plasmática en los cultivos adherentes e intensa expresión intracelular, especialmente en núcleos, en las tumoroesferas. De la misma manera el patrón de CD44 fue idéntico, con expresión en membrana plasmática; aunque en este caso se aprecia una clara mayor expresión en las células adherentes. El marcador CD133 mostró una enorme expresión en el citoplasma de las tumoroesferas con exclusión en los núcleos, en cultivos adherentes la expresión fue mucho menor, pero si se observó presencia en núcleos del marcador. ALDH1 volvió a presentar un marcaje similar, aunque la diferencia de expresión entre los cultivos fue menor en esta ocasión y en este caso si se observó expresión nuclear.

La línea H1650 mostró un marcaje de EpCAM muy intenso, aunque mayor en tumoroesferas, con expresión en membrana, citoplasma y débil expresión nuclear. La expresión de CD166 mostró un patrón diferente, con mucha mayor expresión intracelular, con exclusión nuclear y menor expresión en tumoroesferas. El patrón de CD44 fue más parecido a las líneas anteriores, con una clara expresión en membrana plasmática, aunque en este caso también una clara presencia intracelular, con exclusión nuclear en condiciones de adherencia.

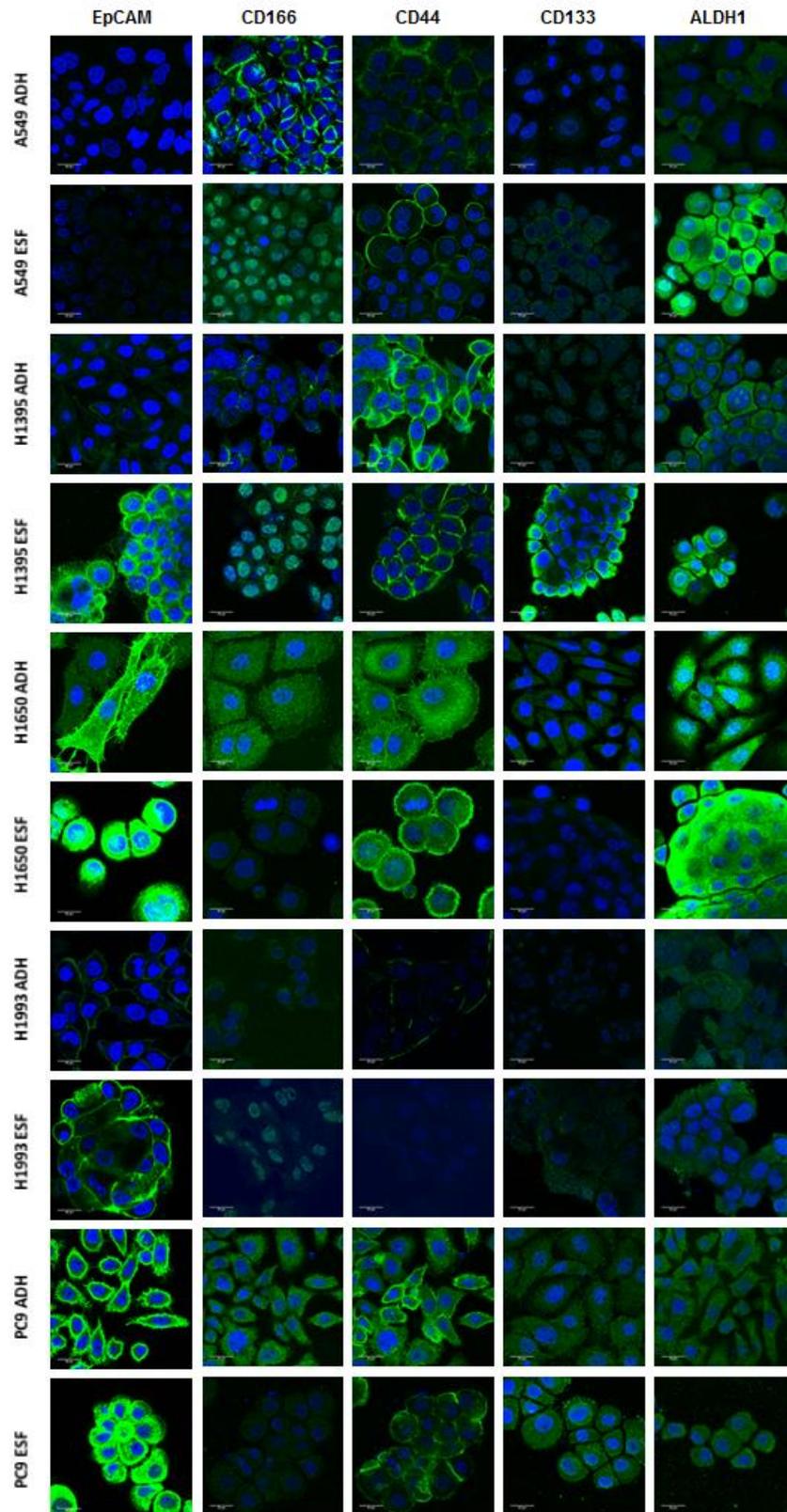


Figura R11: Imágenes de Microscopía de Fluorescencia de EpCAM, CD166, CD44, CD133, y ALDH1A1 en líneas celulares A549, H1395, H1650, H1993 y PC9, en condiciones de adherencia y tumoroesferas. En azul se observan los núcleos teñidos con DAPI. Las barras de escala indican 40 μ m.

CD133 en la línea H1650 presentó una expresión parecida a las líneas anteriores en condiciones de adherencia, aunque con ausencia de marcaje nuclear, la expresión en tumoroesferas fue muy leve. ALDH1 presentó esta vez una gran intensidad en ambas condiciones, con exclusión nuclear en tumoroesferas.

En la línea H1993 la expresión de EpCAM fue muy parecida a la observada en la línea H1395, presentando mayor expresión en tumoroesferas y expresión en membrana plasmática. CD166 también presentó una expresión parecida a dicha línea, quizás con una ligera mayor expresión en tumoroesferas, leve expresión en membrana plasmática en ambos casos con una mayor y elevada expresión en los núcleos de las tumoroesferas. CD44 mostró una leve expresión en algunas de las células en adherencia y no pudo ser detectado en las tumoroesferas. CD133 se detectó de manera leve y difusa solo en las tumoroesferas de esta línea. De nuevo ALDH1 presentó el mismo patrón que el observado en las otras líneas celulares, expresión intracelular con una similar intensidad, pero presentando exclusión en los núcleos de las tumoroesferas.

Por último, la línea PC9 presentó un intenso marcaje de EpCAM, similar a las otras líneas; este marcador se encuentra principalmente presente en membrana plasmática, aunque también se aprecia presencia citoplasmática, especialmente en las tumoroesferas. Al igual que en las H1650, la línea PC9 presentó para el marcador CD166 una mayor intensidad en cultivos adherentes y en citoplasma, aunque en este caso se excluye la expresión nuclear en ambas condiciones. CD44 se expresó en membrana plasmática y citoplasma en tumoroesferas y células adherentes, presentando mayor intensidad las células adherentes. CD133 parece presentar de nuevo expresión intracelular, de una intensidad similar en ambas condiciones, pero con un marcaje más elevado en los núcleos de las tumoroesferas. El marcador ALDH1 de nuevo mostró una expresión citoplasmática, en este caso parece que no hay expresión nuclear en ninguna de las dos condiciones.

R4.2 Análisis de expresión de los marcadores Sox2, Oct-4, Nanog, E-Cadherina y Vimentina mediante microscopía de fluorescencia.

A continuación, se muestran los resultados de los análisis de microscopía de fluorescencia de los factores de transcripción Sox2, Oct4 y Nanog, así como de los marcadores de célula epitelial-mesenquimal E-cadherina y Vimentina. Estos marcadores juegan un papel importante en las CMT y nos pueden ofrecer información que confirme la característica de CM presente en nuestros cultivos celulares. Los resultados obtenidos mediante microscopía de fluorescencia se muestran en la figura **R12**

R4.2.1 Expresión de los factores de transcripción Sox2, Oct-4 y Nanog.

En la línea A549 la expresión de Sox2 fue mayor en tumoroesferas que en adherentes, en tumoroesferas se localiza principalmente en citoplasma, presentando además una mayor concentración perinuclear; en cultivos adherentes la expresión es menor, pero hay una clara expresión nuclear. Oct-4 presentó mayor expresión en células adherentes que en esferas, la expresión es citoplasmática y nuclear; siendo la expresión nuclear especialmente patente en condiciones de adherencia. Nanog no pudo ser detectado en condiciones de adherencia y presentó una levísima expresión en tumoroesferas. La expresión de NICD es similar en ambas condiciones, siendo levemente superior en las tumoroesferas, sin embargo, estas presentan

una exclusión del marcador del núcleo, mientras que en las adherentes sí que hay expresión nuclear, más intensa en algunos casos.

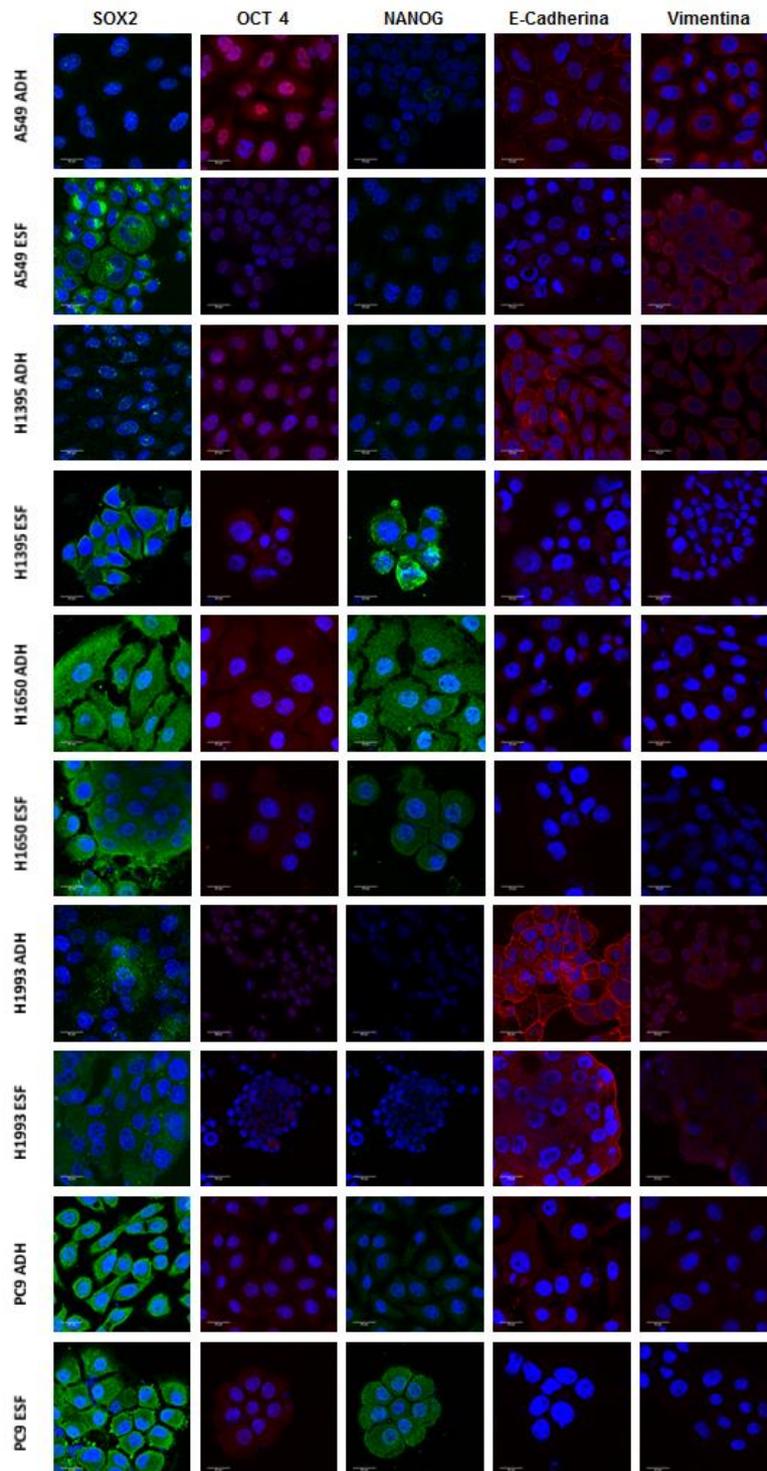


Figura R12: Imágenes representativas de Microscopía de fluorescencia para los factores de transcripción Sox2, Oct4 y Nanog; así como para los marcadores de célula epitelial-mesenquimal E-cadherina y Vimentina en las líneas A549, H1395, H1650, H1993 Y PC9 en condiciones de adherencia y tumoroesferas. En azul se observan los núcleos teñidos con DAPI. Las barras de escala indican 40 μ m.

La línea H1395 muestra el mismo patrón que las A549 para Sox2, las líneas adherentes vuelven a mostrar menor expresión, pero esta es nuclear mientras que las tumoroesferas tienen una elevada expresión citoplasmática con exclusión de marcaje nuclear; en este caso no parece haber una expresión perinuclear más intensa sino que el marcaje citoplasmático es mucho más uniforme. Oct4 de nuevo muestra un patrón similar, con mayor expresión en condiciones adherentes, donde además hay un claro mayor marcaje nuclear, más marcado en este caso que en la línea descrita anteriormente. Nanog si fue expresado en ambas condiciones, las tumoroesferas tienen mucho más marcaje que las adherentes, en ambos casos parece que no hay marcaje nuclear. NICD mostró de nuevo un patrón similar, con expresión intracelular con exclusión nuclear en tumoroesferas, en este caso la expresión en tumoroesferas fue superior.

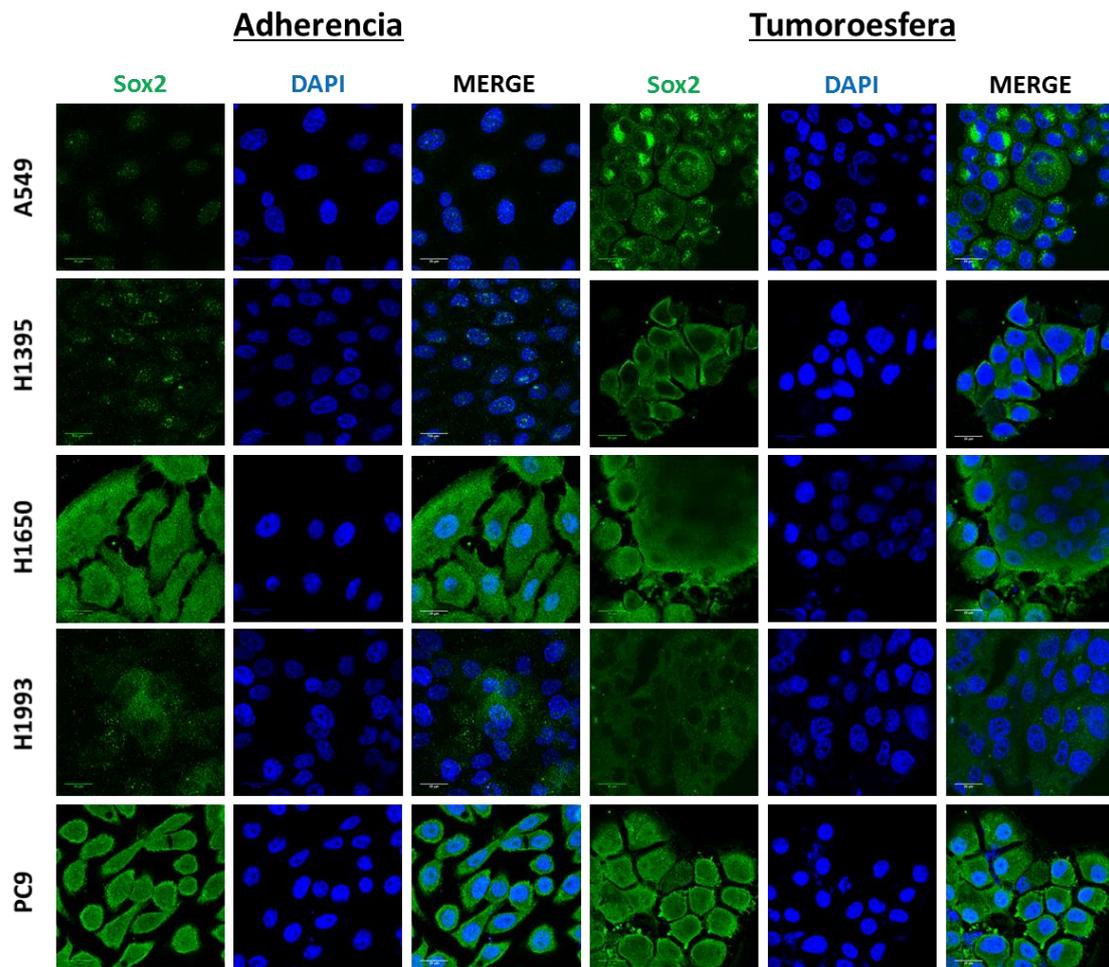


Figura R13: Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de Sox2 (en verde) de las células crecidas en condiciones de adherencia y de tumoroesferas en las líneas A549, H1395, H1650, H1993 Y PC9. Las barras de escala indican 40 μ m.

En la línea H1650 Sox 2 volvió a presentar este patrón de marcaje nuclear en condiciones de adherencia y exclusión nuclear en condiciones de tumoroesferas, pero en este caso la intensidad fue similar entre ambos tipos de cultivos. Oct4 presentó de nuevo el mismo patrón con mayor expresión en células adherentes, así como un claro marcaje nuclear en esta condición. Nanog presenta una expresión ligeramente superior en adherentes, con marcaje

intracelular y nuclear en ambas condiciones. La expresión de NICD mostró una expresión, principalmente intracelular, muy similar, en esta línea los cultivos adherentes presentaron un intenso marcaje nuclear y las tumoroesferas un claro marcaje perinuclear.

En la línea H1993 de nuevo Sox2 presenta una expresión ligeramente superior en células adherentes, con marcaje intracelular, aunque en este caso no parece haber marcaje nuclear en tumoroesferas. Oct4 presento de nuevo mayor marcaje en adherentes con cierto marcaje nuclear, aunque algunas células de baja adherencia mostraron gran expresión. La expresión de Nanog fue muy baja, no se detectó en condiciones de adherencia y es casi indetectable en tumoroesferas. Notch intracelular presenta un patrón similar a la línea H1395 con expresión intracelular ligeramente superior en tumoroesferas pero con exclusión nuclear en dicha condición, aunque en este caso el marcaje nuclear en los cultivos adherentes fue mucho menos claro.

La expresión de Sox2 fue intensa pero similar en ambas condiciones de cultivo de línea PC9 y mostró expresión en membrana plasmática, citoplasma y núcleo. En esta línea Oct4 presentó una leve expresión en ambas condiciones, ligeramente superior en tumoroesferas, con presencia de marcaje en citoplasma y núcleo. No se detectó expresión de Nanog en esta línea. NICD mostró un intenso marcaje en membrana plasmática en condiciones adherentes, y expresión citoplasmática con exclusión nuclear en ambas condiciones.

En la figura **R13** se muestran por separado imágenes de microscopía de fluorescencia de Sox2, DAPI y la superposición de ambos para poder apreciar mejor el patrón descrito para este marcador.

R4.2.2 Expresión de E-Cadherina y Vimentina.

E-Cadherina y Vimentina son los 2 marcadores de célula epitelial y mesenquimal respectivamente.

Mediante microscopía de fluorescencia observamos que la E-Cadherina se localiza en membrana plasmática y citoplasma. Los cultivos adherentes de las líneas A549, H1395 y H1993 presentan localización de E-Cadherina en membrana plasmática, las esferas de la línea H1993 también presentan marcaje similar. E-Cadherina muestra mayor expresión en las células adherentes de todas las líneas, aunque con la variación de intensidad cambia según la línea.

Vimentina muestra una localización citoplasmática en todos los casos con una expresión similar en ambas condiciones, ligeramente superior en tumoroesferas de A549, cultivos adherentes de H1395, H1650 y H1993 y muy débil expresión en PC9.

R4.3 Análisis de la expresión de marcadores de CMT mediante Western blot.

En este apartado se muestran los resultados de la expresión de los marcadores de CMT analizados mediante western blot; los resultados de los marcadores de superficie y el ALDH1 se muestran en la figura **R14**, los resultados de los factores de transcripción y la E-Cadherina y la Vimentina se presentan en la figura **R15**.

El anticuerpo contra EpCAM utilizado reconoce el fragmento intracelular de este (EpICD). EpICD no pudo ser detectado en todos los casos, y en aquellos donde se detectó fue siempre

mayor en los cultivos adherentes. Encontramos presencia en todas las líneas de CD166 por WB, con la excepción de las esferas de las H1650, aunque la intensidad de las bandas parece correlacionarse más con la expresión de CD166 en membrana o citoplasma que con aquellas líneas con una mayor expresión nuclear. Los resultados obtenidos mediante WB para analizar la expresión de CD44 difieren de los obtenidos en los análisis de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia: A549 y H1395 si presentaron una señal similar; en el caso de H1650 y PC9 no se detectó CD44 en los cultivos de esferas y CD44 tampoco fue detectado por WB en ninguna condición de la línea H1993. Cabe destacar también que la línea A549 presenta la isoforma CD44s en lugar de las CD44v y que los cultivos adherentes de H1650 muestran coexpresión de ambas isoformas.

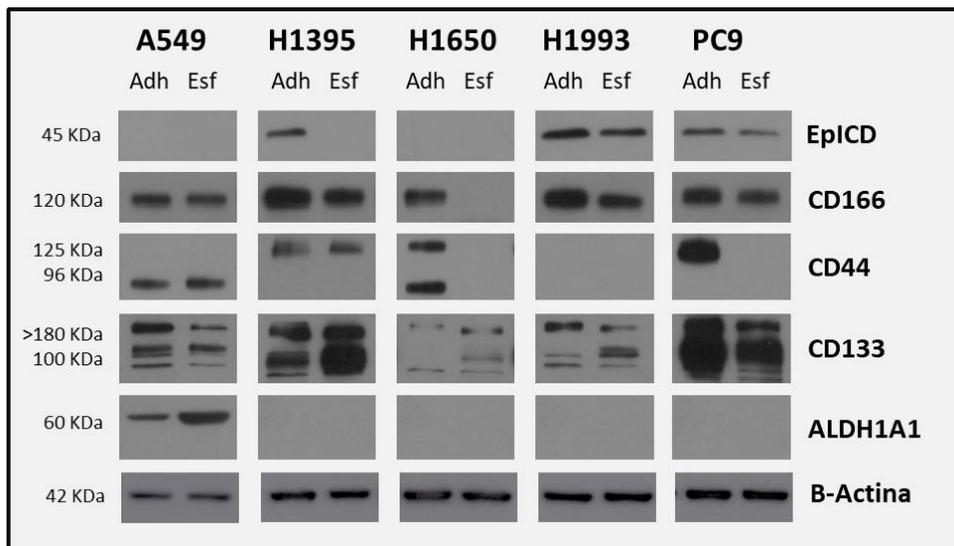


Figura R14: Westerns Blots con anticuerpos contra el fragmento intracelular de EpCAM (EpICD), CD166, CD44, CD133, ALDH1A1 en líneas celulares A549, H1395, H1650, H1993 y PC9, en condiciones de adherencia y tumoresferas. La β -actina se utilizó como control de carga.

Se observó expresión de CD133 en todos los casos, aunque la expresión solo coincide con lo observado por microscopía de fluorescencia en las H1395. Atendiendo al western blot hay una expresión heterogénea con mayor expresión en las células adherentes de las líneas A549 y PC9 y en las tumoresferas de la línea H1395. ALDH1A1 solo pudo ser detectada por WB en la línea A549, mostrando también las tumoresferas mayor expresión.

Por WB se observa una mayor expresión de Sox2 en las células adherentes de todas las líneas salvo las A549, donde además encontramos una doble banda no presente en ninguna otra línea. La expresión de Oct3/4 observada mediante WB es muy similar a los niveles encontrados por microscopía de fluorescencia, aunque hay un par de discrepancias leves entre ambas técnicas en las líneas A549 y H1395 que muestran ambas mayor expresión en esferas. La expresión de Nanog observada por WB también mostró algunas diferencias con los resultados de microscopía de fluorescencia, las líneas A549 y H1650 mostraron expresiones similares a las encontradas por microscopía, pero las H1395 y PC9 mostraron una mayor expresión en condiciones ADH y las H1993, en las que no se detectó expresión mediante microscopía de fluorescencia, si mostró expresión por WB, siendo mayor en las células adherentes.

La expresión de E-Cadherina observada por WB es similar a la observada por Microscopía de fluorescencia, aunque en la línea A549 no se pudo detectar en condiciones de ADH. Solo se observó expresión de Vimentina en las líneas A549 y H1650, mostrando mayor expresión en las esferas de las A549 y solo expresión en las células adherentes de las H1650.

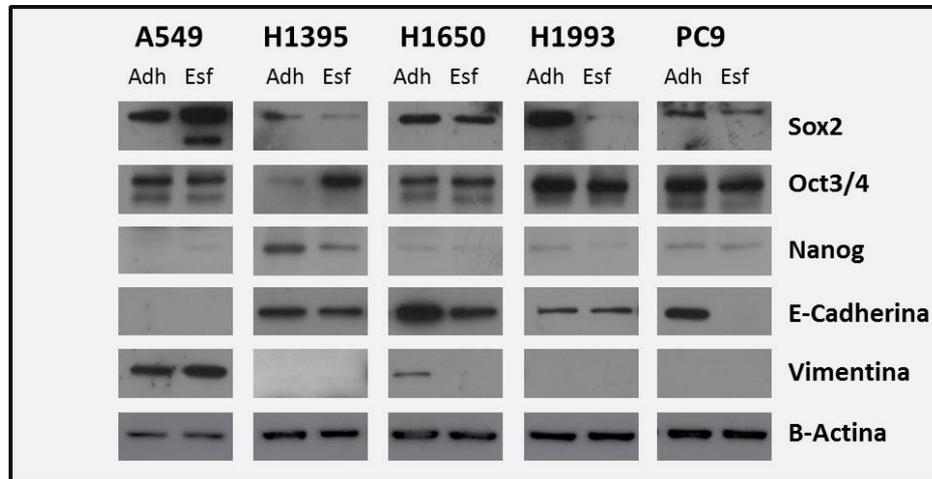


Figura R15: Westerns Blots con anticuerpos contra los factores de transcripción Sox2, Oct4 y Nanog; así como para los marcadores de célula epitelial-mesenquimal E-cadherina y Vimentina en las líneas A549, H1395, H1650, H1993 Y PC9 en condiciones de adherencia y tumoroesferas. Se ha usado la β -actina como control de carga.

R5 Análisis de la expresión de marcadores de CMT por microscopía de fluorescencia y WB en las LDP 302, 303, 315, 317 y 320.

R5.1 Análisis de expresión de EpCAM, CD166, CD44, CD133, ALDH1 mediante microscopía de fluorescencia .

Al igual que en el apartado anterior, se analizó la expresión de los marcadores de CMT extracelulares EpCAM, CD166, CD44 y CD133, así como el intracelular ALDH1 mediante microscopía de fluorescencia en las tumoroesferas derivadas de los tumores de pacientes con CPNM (LDP?), estos resultados se muestran en la figura **R16**.

EpCAM en la línea 302 no mostró diferencias de expresión entre las células crecidas en condiciones de adherencia y las tumoroesferas y se expresó con mayor intensidad en la membrana plasmática; en la membrana de los cultivos adherentes hay algunas diferencias de expresión entre células; en las tumoroesferas también se detectó marcaje citoplasmático. CD166 muestra un patrón de expresión diferente entre las células crecidas en condiciones de adherencia y las tumoroesferas. Se observa mediante microscopía de fluorescencia que su expresión se presenta principalmente en el citoplasma de las células adherentes, mientras que presenta una expresión intensa en el citoplasma y núcleo de las tumoroesferas. CD44 presentó una mayor expresión en membrana plasmática en las tumoroesferas con una expresión citoplasmática muy leve. En las células adherentes hay algunas con una clara mayor expresión de CD44. CD133 mostró expresión citoplasmática con exclusión en núcleos, ligeramente superior en tumoroesferas. La expresión de ALDH1 fue muy parecida entre las células crecidas en condiciones de adherencia y las tumoroesferas, con una intensidad similar y expresión celular y nuclear.

En la línea 303 el patrón de expresión EpCAM fue muy parecido a la línea 302, esta vez la expresión se observa ligeramente superior en tumoroesferas, se localiza principalmente en la membrana plasmática y de nuevo las células adherentes presentan diferencias en la expresión entre las diferencias células, se observa también su expresión en el citoplasma de las tumoroesferas. De nuevo el patrón de expresión de CD166 se repite en esta línea, con una mayor expresión en tumoroesferas, donde se localiza en citoplasma y en núcleo, presentando además una gran expresión en esta última localización; en cultivos adherentes hay menor expresión y solo en citoplasma. CD44 presentó de nuevo mayor expresión en la membrana plasmática de las tumoroesferas, en este caso la expresión citoplasmática en las tumoroesferas es más débil; de nuevo se aprecian diferencias en la expresión de este marcador entre las células de los cultivos adherentes. En la línea 303 CD133 mostró una clara mayor expresión en las tumoroesferas, la expresión fue citoplasmática, con presencia además en núcleos de las tumoroesferas. ALDH1 mostró de nuevo una expresión similar entre ambas condiciones con expresión citoplasmática y nuclear, aunque menos intensa y definida.

La línea 315 presenta una expresión de EpCAM ligeramente superior en los cultivos adherentes, de nuevo con diferencias de expresión entre las diferentes células; las tumoroesferas mostraron de nuevo expresión citoplasmática. La expresión de CD166 sigue el patrón descrito para las líneas 302 y 303, con la particularidad de que en las tumoroesferas de esta línea hay una expresión similar entre el citoplasma y el núcleo.

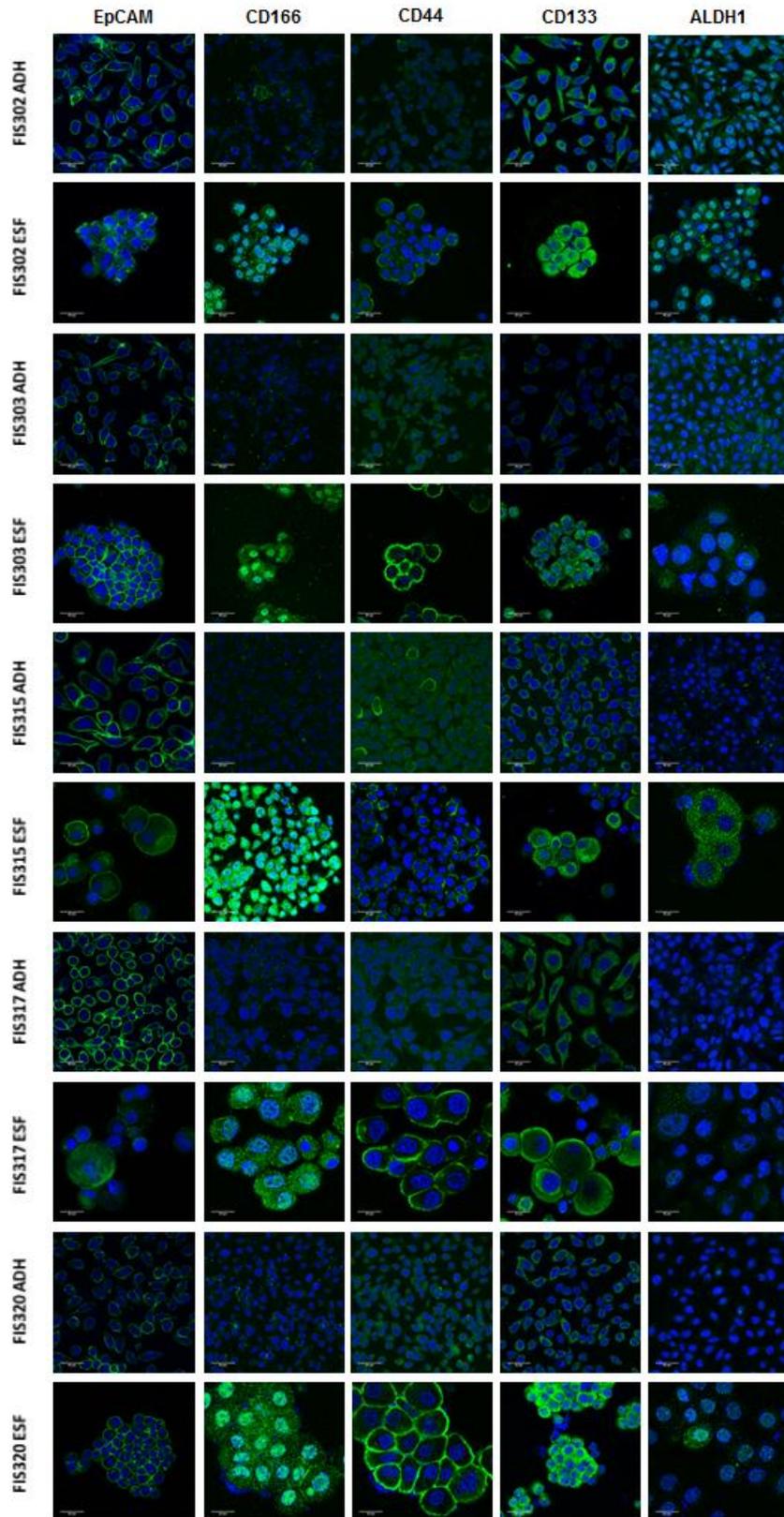


Figura R16: Imágenes representativas de Microscopía de Fluorescencia de EpCAM, CD166, CD44, CD133, ALDH1A1 en líneas derivadas de paciente 302, 303, 315, 317 y 320, en condiciones de adherencia y tumoroesferas. En azul se observan los núcleos teñidos con DAPI. Las barras de escala indican 40 μm .

Siguiendo con la línea 315, el marcador CD44 de nuevo presenta una mayor expresión en la membrana plasmática de las tumoroesferas, en este caso en ambas condiciones se observaron diferencias en la expresión de CD44, y no se detectó su presencia en el citoplasma de las tumoroesferas CD133 presentó un patrón similar a las otras líneas derivadas de pacientes, aunque en este caso en las tumoroesferas la expresión intracelular parece más intensa en algunas células cerca de la membrana nuclear o plasmática, en tumoroesferas hay algunos casos con expresión en núcleos. ALDH1 mostró una mayor expresión en tumoroesferas, y su localización fue citoplasmática en ambas condiciones.

En la línea 317 la expresión de EpCAM es claramente superior en las células adherentes, las tumoroesferas de esta línea presentan una mayor expresión relativa del marcador en el citoplasma con respecto a aquella expresada en la membrana plasmática. De nuevo la expresión de CD166 presenta el mismo patrón, expresión intracelular con exclusión de núcleos en adherentes y mucha mayor expresión en tumoroesferas. La expresión de CD44 fue muy similar a las otras líneas derivadas de pacientes, con mayor expresión en membrana plasmática en tumoroesferas y algo de expresión citoplasmática. CD133 presenta de nuevo expresión citoplasmática, ligeramente más intensa en tumoroesferas; de nuevo algunas células de esta última condición presentan mayor presencia de este marcador alrededor de la membrana plasmática o nuclear. ALDH1 presenta una mayor expresión en tumoroesferas, con expresión en citoplasma y algunos núcleos tanto en células adherentes como en tumoroesferas.

En la línea 320 EpCAM no mostró diferencias de expresión entre ambas condiciones y se expresó con mayor intensidad en la membrana plasmática; de nuevo encontramos la expresión irregular en la membrana de las células adherentes, en este caso no se aprecia expresión citoplasmática en las tumoroesferas. El marcador CD166 en esta línea mostró el mismo patrón descrito para las otras 4 líneas derivadas de pacientes. CD44 de nuevo mostró un patrón similar a las otras líneas derivadas de pacientes, con una mayor expresión en membrana plasmática de tumoroesferas y algo de expresión citoplasmática. La expresión de CD133 se observa de nuevo más intensa en tumoroesferas y se localiza en citoplasma. ALDH1 mostro de nuevo mayor expresión en tumoroesferas con expresión mayoritaria en núcleos tanto de células adherentes como de tumoroesferas; con presencia también en citoplasma, pero no en todas las células.

R5.2 Expresión de Sox2, Oct-4, Nanog, E-Cadherina y Vimentina.

En este apartado se muestran los resultados de expresión para los factores de transcripción Sox2, Oct4 y Nanog, así como los marcadores de célula epitelial-mesenquimal E-cadherina y Vimentina, en las líneas 302, 303, 315, 317 y 320. En la figura **R17** se muestran imágenes representativas de microscopía de fluorescencia y en la figura **R21**, se muestran los resultados obtenidos mediante Western Blot.

R5.2.1 Expresión de los factores de transcripción Sox2, Oct-4 y Nanog.

En la línea 302 la expresión de Sox2 fue mayor en cultivos adherentes, el patrón de expresión entre células adherentes y tumoroesferas fue diferente. En las células adherentes se expresa en citoplasma y, con más intensidad, en núcleo; en las tumoroesferas la localización es citoplasmática con mayor expresión perinuclear en algunos casos. Oct-4 presentó expresión

nuclear en células adherentes y tumoroesferas; dicha expresión fue muy similar, aunque ligeramente más intensa en tumoroesferas. Se observa la localización de Nanog en el citoplasma y núcleo de células adherentes y tumoroesferas, más intenso en los núcleos de las tumoroesferas. NICD se encuentra claramente asociado a la membrana plasmática, aunque también hay una ligera expresión citoplasmática y presenta una expresión similar entre células adherentes y tumoroesferas.

En la línea 303 la expresión de Sox2 se observa más intensa en las células adherentes, pero en esta la localización fue citoplasmática en ambas condiciones, y en algunas células de las tumoroesferas se observa mayor expresión perinuclear. Oct4 mostró una expresión nuclear con una intensidad muy similar entre células adherentes y tumoroesferas. La expresión de Nanog es de nuevo mayor en tumoroesferas y la localización vuelve a ser citoplasmática y nuclear, con mayor expresión nuclear. NICD solo pudo ser detectado en tumoroesferas, en la membrana plasmática y citoplasma.

En la línea 315 la expresión en tumoroesferas fue más intensa que en las células adherentes, pero en esta condición se observa una clara exclusión nuclear mientras que en las células adherentes tenemos expresión nuclear más intensa que en el citoplasma; de nuevo observamos una mayor localización perinuclear en algunas células de tumoroesferas. Oct4 mostró expresión nuclear de una intensidad similar en ambos tipos de cultivos. La expresión de Nanog en esta línea vuelve a presentar el mismo patrón de expresión citoplasmática y nuclear, con mayor expresión en núcleos; en este caso la expresión en los cultivos adherentes es muy parecida a la de tumoroesferas, si no ligeramente superior. NICD se presenta en la membrana plasmática de las tumoroesferas y en unas pocas células adherentes, también se detecta en citoplasma en el caso de las tumoroesferas.

La línea 317 presentó una mayor expresión de Sox2 en las células en adherencia, donde este marcador se presenta en citoplasma y, preferentemente, en núcleo; las tumoroesferas solo presentaron presencia de Sox2 claramente asociada a la membrana plasmática. En esta línea la expresión de Oct4 fue superior en las células adherentes, de nuevo de clara localización nuclear en ambos casos, además no todas las tumoroesferas presentaron expresión del marcador. Esta línea presenta para Nanog un patrón idéntico al resto de las líneas derivadas de paciente en los cultivos adherentes, pero en las tumoroesferas no se aprecia marcaje nuclear en la mayoría de los casos. NICD presenta una mayor expresión en las tumoroesferas, donde se encuentra en membrana plasmática y se detecta algo de expresión en citoplasma, en los cultivos adherentes sólo se detecta una expresión citoplasmática difusa.

En la línea 320 se observa una mayor expresión de Sox2 en los cultivos adherentes; tanto en células adherentes como en tumoroesferas la localización de este marcador es citoplasmática y nuclear; esta expresión está mucho más localizada en los cultivos adherentes. La expresión de Sox2 fue muy similar en ambos tipos de cultivos, de nuevo se detectó sólo en núcleos. La expresión de Nanog en esta línea sigue el patrón de localización general observado en las líneas derivadas de pacientes, localización citoplasmática y nuclear, en esta línea la expresión en ambas condiciones es muy parecida y la expresión en núcleos es superior a la del citoplasma, pero no tan claramente como en el resto de las líneas.

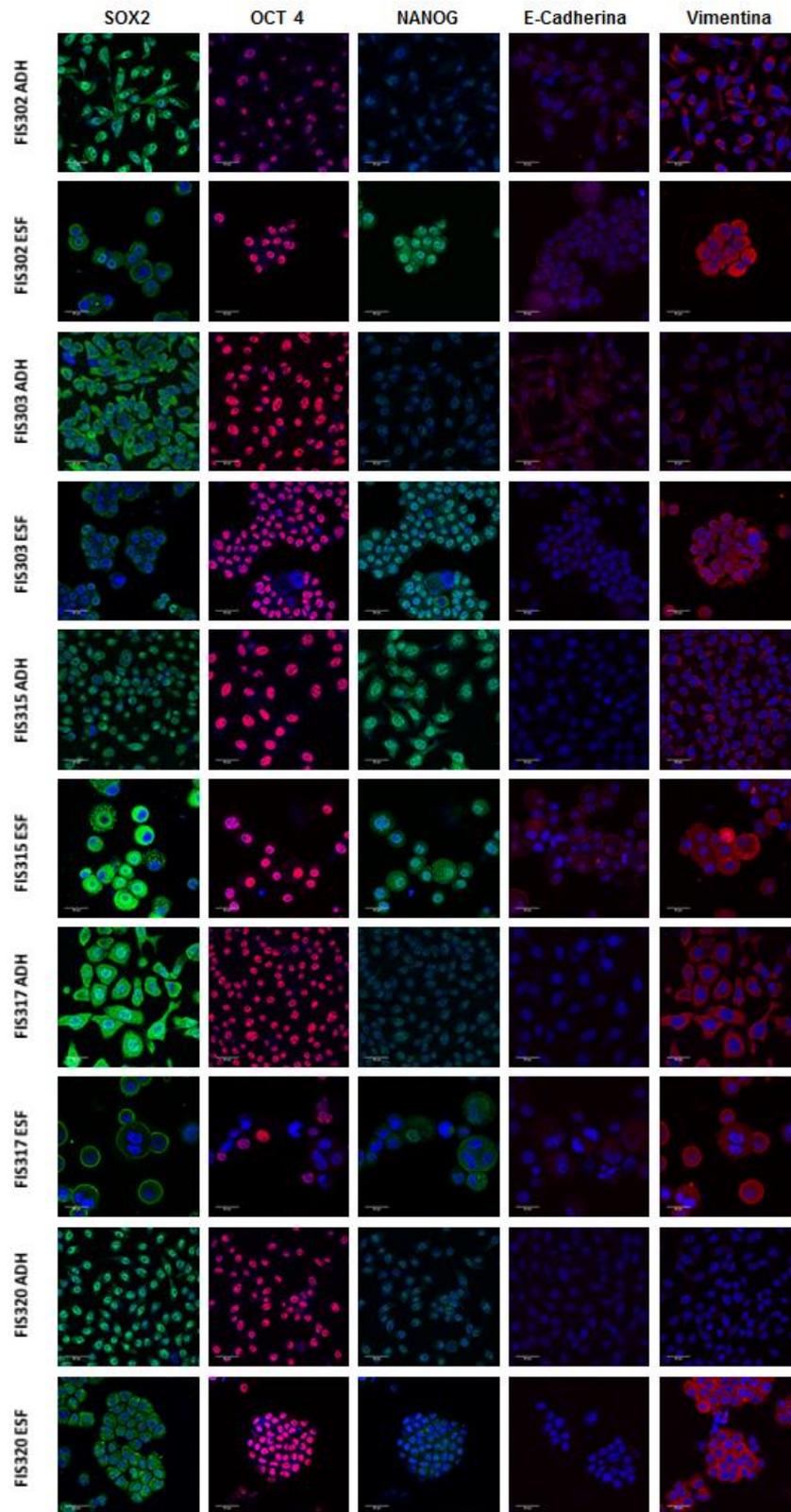


Figura R17: Imágenes representativas de Microscopía de fluorescencia para los factores de transcripción Sox2, Oct4 y Nanog; así como para los marcadores de célula epitelial-mesenquimal E-cadherina y Vimentina en las líneas derivadas de paciente 302, 303, 315, 317 y 320, en condiciones de adherencia y tumoroesferas. En azul se observan los núcleos teñidos con DAPI. Las barras de escala indican 40 μ m.

En la línea 320, NICD mostró una señal débil en ambas condiciones, mostrando una expresión citoplasmática difusa en ambos casos, aunque en cultivos adherentes parece también detectarse en membrana plasmática.

Se puede ver un detalle de imágenes representativas de microscopía de fluorescencia para Sox2 y Nanog en las figuras **R18** y **R19** respectivamente; para Nanog incluimos una imagen de una célula muy positiva para Nanog en las tumoroesferas de la línea 317.

R5.2.2 Expresión de E-Cadherina y Vimentina.

La expresión de E-Cadherina por microscopía de fluorescencia mostró una localización citoplasmática, no mostrando un marcaje claro en membrana plasmática con intensidades bastante similares entre células adherentes y tumoroesferas, salvo en las esferas de la línea 315, donde la intensidad fue mayor que su contrapartida adherente.

Vimentina, por microscopía de fluorescencia presentó también una localización citoplasmática, en las tumoroesferas presentó una mayor expresión en todos los casos salvo en la línea 317. En las líneas 303 y 320 la diferencia entre las células adherentes y las tumoroesferas fue muy marcada

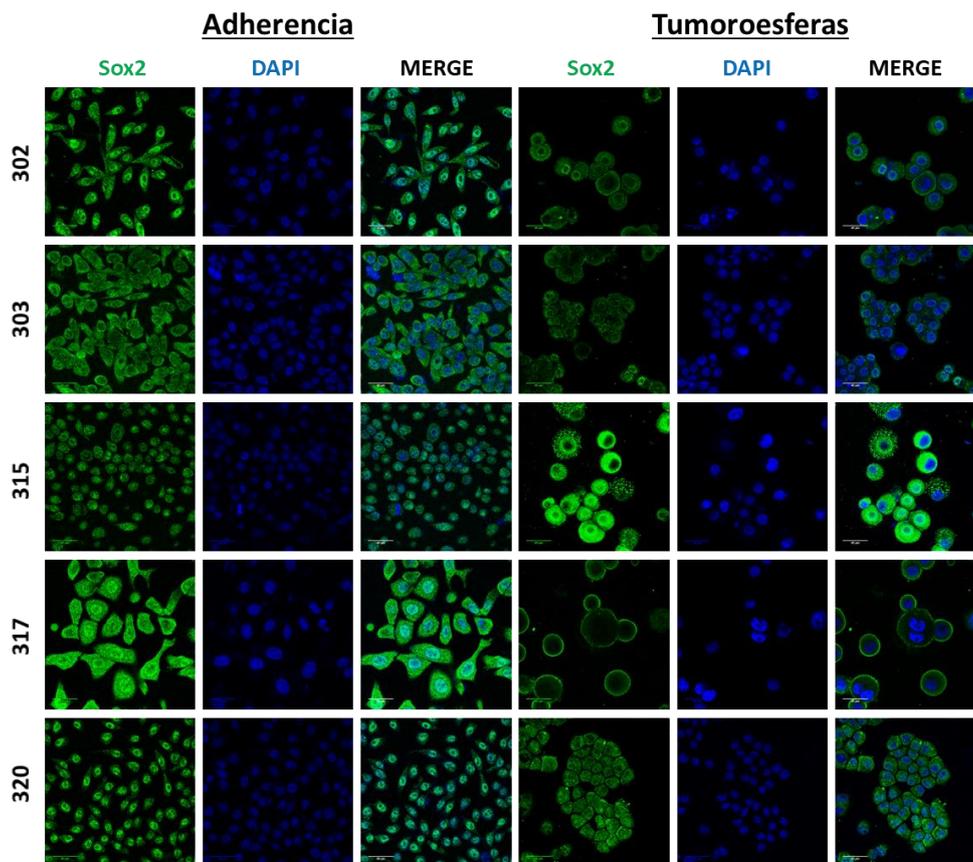


Figura R18: Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de Sox2 (en verde) de las células crecidas en condiciones de adherencia y de las tumoroesferas en las líneas 302, 303, 315, 317 y 320. Las barras de escala indican 40 μm .

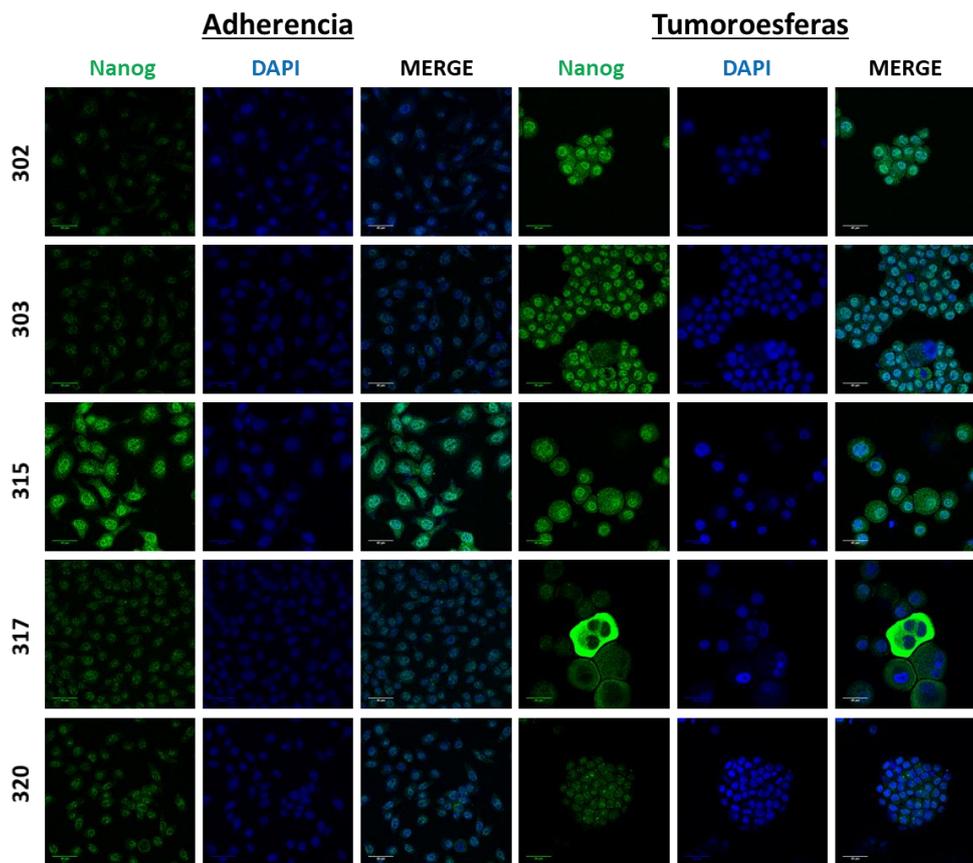


Figura R19: Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de Nanog (en verde) de las células crecidas en condiciones de adherencia y de tumoroesferas en las líneas 302, 303, 315, 317 y 320. Las barras de escala indican 40 μ m.

R5.3 Análisis de la expresión de marcadores de CMT mediante Western Blot.

En este apartado se muestran los resultados de la expresión de marcadores de CMT obtenidos mediante western blot; la expresión de los marcadores de superficie y ALDH1 se muestran en la figura **R20**, y la de los factores de transcripción, E-Cadherina y Vimentina se presentan en la figura **R21**.

EpICD mostro una mayor expresión en tumoroesferas en todas las líneas salvo en la línea 302 donde este resultado se invirtió. CD44 mostró expresión en todas las tumoroesferas, no pudiendo ser detectado en las células adherentes.

CD133 al igual que por microscopía de fluorescencia muestra mayor expresión en los cultivos en baja adherencia de las LDPs 302 y 320, aunque la LDP 317 parece indicar una ligera sobreexpresión en condiciones de adherencia no apreciable en las imágenes de microscopía de fluorescencia.

La expresión de Sox2 mostró un patrón muy diferente en el caso de células adherentes y tumoroesferas, mostrando las células adherentes un patrón de bandas compatible con degradación proteica y en tumoroesferas una única banda. Hay una mayor expresión de Sox2 en tumoroesferas en todos los casos, salvo en la línea 303. La expresión de Oct4 sugiere que

este marcador podría estar más expresado en condiciones de adherencia en las líneas 315 y 320. La expresión de Nanog también tiende a ser mayor en las tumoroesferas, con la excepción de la línea 317.

E-Cadherina mostró una expresión parecida entre células adherentes y tumoroesferas, ligeramente superior en las células adherentes de las líneas 302 y 320.

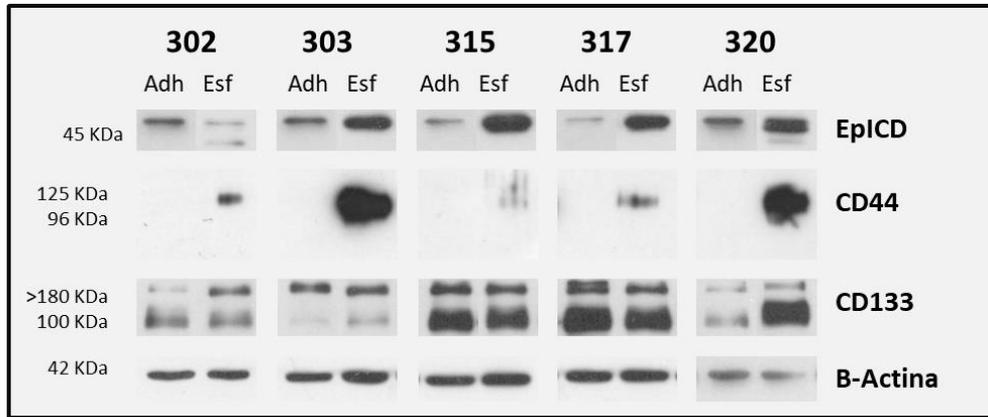


Figura R20: Westerns Blots con anticuerpos contra EpCAM, CD166, CD44, CD133, ALDH1A1 en líneas derivadas de paciente 302, 303, 315, 317 y 320, en condiciones de adherencia y tumoroesferas. Se ha usado la β -actina como control de carga.

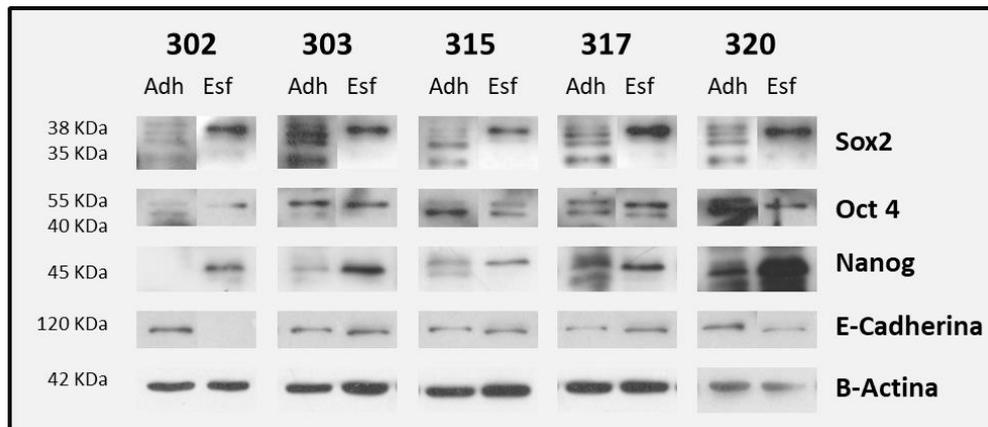


Figura R21: Westerns Blots con anticuerpos contra Sox2, Oct4, Nanog, E-cadherina y Vimentina en líneas derivadas de paciente 302, 303, 315, 317 y 320, en condiciones de adherencia y tumoroesferas. Se ha usado la β -actina como control de carga.

R6 Análisis de la expresión génica de marcadores de CMT mediante PCR a tiempo real (RTqPCR).

Los cultivos celulares establecidos en condiciones de adherencia y suspensión, derivados de tumores de CPNM y de las líneas celulares comerciales de CPNM se utilizaron para analizar la expresión génica de marcadores de CMT mediante RTqPCR. Estos análisis se realizaron en el laboratorio de Oncología Molecular de la Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUV) dirigido por el Dr. Carlos Camps y la Dra. Eloisa Jantus. En estos análisis se incluyeron también cultivos celulares derivados en el laboratorio del Dr. Camps. Fruto de este trabajo es la tesis doctoral de Alejandro Herreros Pomares (194).

En este estudio se identificó una firma génica de 6 genes (*CD44*, *NOTCH3*, *ITGA6*, *NANOG*, *P21* y *SNAI1*) que están diferencialmente expresados entre células adherentes y tumoroesferas, estos resultados se describen brevemente a continuación. Los resultados completos de este análisis se pueden consultar en (195).

R6.1 Análisis de expresión génica.

Se analizó la expresión, mediante PCR a tiempo real, de 51 genes de las rutas de señalización de Notch, WNT y HH, reguladores de pluripotencia y ciclo celular, marcadores potenciales de CMT y promotores de la invasión en 134 muestras de tumores de pacientes con CPNM y tejido sano adyacente al tumor; así como en cultivos adherentes y sus correspondientes tumoroesferas de líneas celulares establecidas. La expresión relativa de los genes *LIN28B*, *CD45*, *CD133*, *WNT1*, *WNT2*, *SHH* y *GLI1* estuvo por debajo del límite de detección de la técnica y estos genes se excluyeron del análisis.

Las tumoroesferas mostraron mayor expresión de 37 de los 44 genes comparado con las células adherentes, mostrando un grupo de 17 genes una sobreexpresión significativa (*ALDH1A1*, *KLF4*, *NANOG*, *CD44*, *CD90*, *CDKN1A*, *JUNB*, *MDM2*, *MMP9*, *SNAI1*, *ITGA6*, *NOTCH1*, *NOTCH3*, *DLL4*, *JAG1*, *CTNNB1* y *GSK3B*) según la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon como se muestra en la figura **R22**

Un análisis de componentes principales (PCA) reveló que los cultivos adherentes presentaban una expresión de genes más homogénea que las tumoroesferas. Posteriormente una regresión de mínimos cuadrados parciales-análisis discriminante (PLS-DA) se usó para buscar las diferencias entre adherentes y esferas. El componente principal 1 (PC1) separó la población de CMT de todos los tumores salvo los de las líneas A549, HCC827, H358 y H2228, el análisis reveló que los genes *SNAI1*, *GSK3B*, *CD44*, *CDKN1A*, *NOTCH3*, *NANOG* y *CTNNB1* estaban sobreexpresados en esferas y eran los que más contribuyeron a estas diferencias como se muestra en la figura **R23**

Para comprobar si la variabilidad entre los diferentes tipos de líneas afectaba demasiado al análisis se realizaron análisis PCA por separado a las líneas comerciales y a las líneas establecidas en el laboratorio. Este análisis mostró de nuevo la alta variabilidad de las líneas, separando el componente PC1 7 de los 12 cultivos de esferas de los de adherencia. En el caso de las esferas los genes que más diferencian esas 7 poblaciones fueron *CDK1A*, *CTNNB1*, *NOTCH1*, *JUNB*, *CD44*, *WEE1*, *EPCAM*, *GSK3B*, *MYC* y *CDH1*. En los cultivos derivados de

pacientes el componente PC1 separó las muestras 343 y 320 del resto, mientras que el componente PC2 separó claramente los cultivos adherentes de las tumoroesferas. Cuando se comparó la expresión de genes sobreexpresados en estas poblaciones se observó que la expresión de *BMI1*, *CD166*, *CDKN2A*, *MDM2*, *HEY1*, *NUMB*, *ITGA6*, and *NOTCH3* aumentó en estas 2 muestras, mientras que el resto mostraron una mayor expresión de *EPCAM*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *CD44*, *CTNNB1*, *MMP9* y *CDKN1A*.

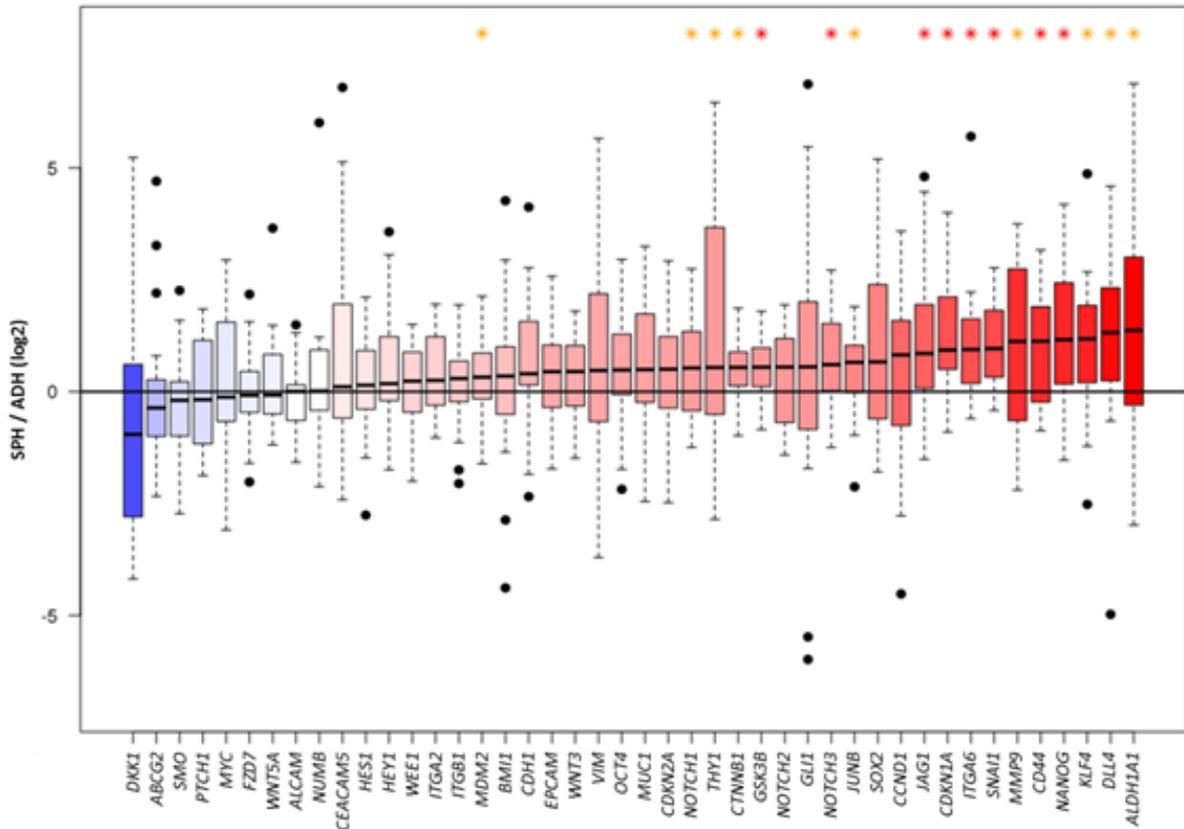


Figura R22. Niveles de mRNA de genes relacionados con las CMT en tumoroesferas frente a cultivos adherentes medidos mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Los resultados muestran el Log2 de la ratio entre la expresión del gen en tumoroesferas y la expresión en cultivos adherentes; las barras de error presentan el error estándar de la media. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. Adaptado de Herreros-Pomares et al., (195)

Seguidamente se analizó la expresión de los genes en función de su capacidad de distinguir las tumoroesferas con un modelo de regresión logística y usando los 17 genes sobreexpresados, mostrando que *CDKN1A*, *NOTCH3*, *CD44*, *ITGA6*, *NANOG* y *SNAI1* eran los genes que mejor diferenciaban las tumoroesferas de los cultivos en adherencia, siendo esta última firma génica que corresponde a las proteínas P21, Notch3, CD44, Itga6, Nanog y Snail, que procedimos a validar por WB e IHC en nuestro laboratorio.

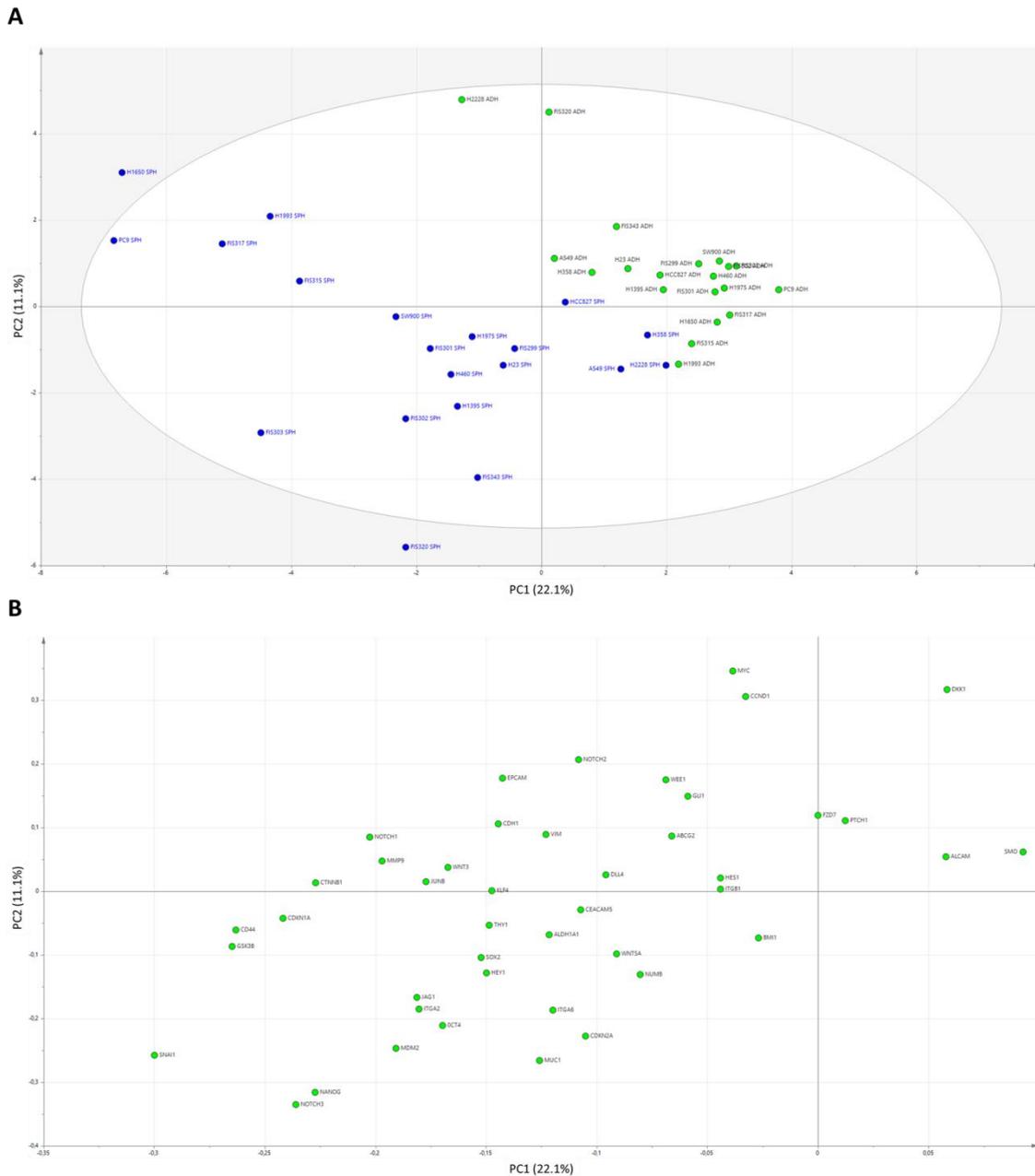


Figura R23. A) Análisis discriminante de cuadrados parciales de los cultivos primarios y las líneas celulares según la expresión de los 44 genes relacionados con las CMT. Los puntos verdes representan células de cultivos adherentes mientras que los puntos azules representan tumoroesferas. B) Gráfico de cargas del análisis de componentes principales en células adherentes y tumoroesferas. Adaptado de Herreros-Pomares et al., (195)

R6.2 Validación de una firma génica en las líneas A549, H1395, H1650, H1993 y PC9.

El análisis mediante WB de la expresión de CD44, p21, ITGA6, Snail, Notch3 y Nanog de los extractos proteicos de las líneas celulares A549, H1395, H1650, H1993 y PC9 no discrimina entre células adherentes y tumoroesferas, como podemos ver en la figura **R24**.

En el apartado de resultados **R4** ya se mostraron los resultados de la expresión de CD44, obtenidos mediante western blot, microscopía de fluorescencia y citometría de flujo; brevemente, el resultado de WB difirió bastante de los resultados de las otras 2 técnicas, no pudo ser detectado en las esferas de las líneas H1650, H1993 y PC9, ni en los cultivos adherentes de la línea H1993, en las líneas A549 y H1395 si se pudo detectar tanto en cultivos adherentes como en tumoroesferas, no mostrando diferencias en el nivel de expresión. Los diferentes pesos moleculares indicaron también la presencia de más de una isoforma. Los análisis de la expresión de **P21** mostraron mayor expresión de este en las células adherentes de las líneas A549 y en las tumoroesferas de las líneas H1650 y H1993; no fue detectado en las líneas H1395 y PC9. La integrina **ITGA6** mostró una mayor expresión en 4 de las 5 líneas en células adherentes, solo en las A549 la expresión fue mayor en las esferas. **Snail** mostró una expresión parecida en la mayoría de las líneas, aunque la alta señal inespecífica de fondo hace difícil diferenciar su expresión entre las células adherentes y las tumoroesferas en algunas líneas celulares. La expresión de **Notch3**, (banda de mayor peso molecular, 180 Kda), se mostró similar entre las células adherentes y las tumoroesferas de las líneas H1395, H1993 y PC9, mayor en las células crecidas en adherencia en las A549 y en las tumoroesferas en el caso de la línea H1650; aunque también encontramos un patrón de bandas en las células adherentes de las líneas H1650 y PC9 en adherencia que podría indicar proteólisis. **Nanog** muestra otro patrón de expresión heterogéneo con una mayor expresión en las células adherentes de H1395 y H1993; expresión similar en H1650 y PC9; junto con una señal muy débil y solo detección en las tumoroesferas de A549.

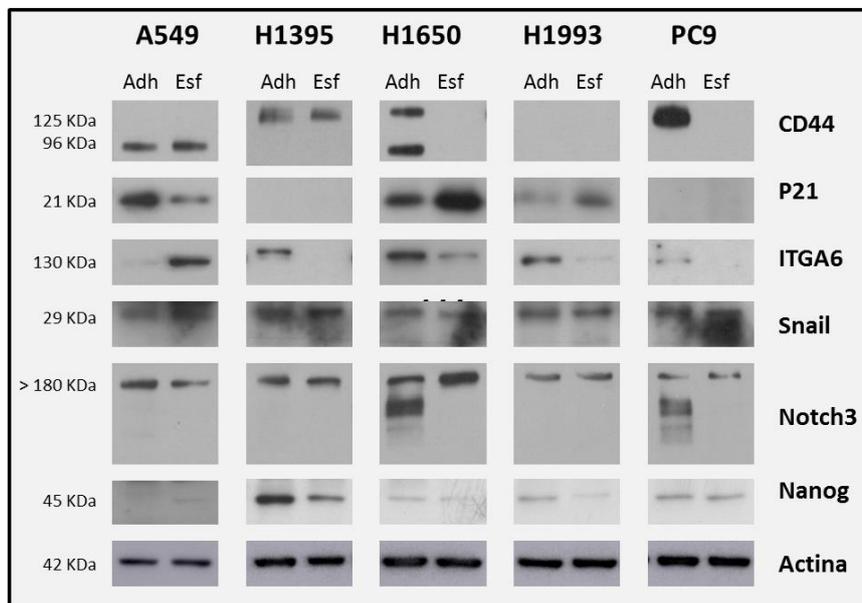


Figura R24: Westerns Blots con anticuerpos contra CD44, Notch3, ITGA6, Nanog, P21 y Snail en las líneas A549, H1395, H1650, H1993 y PC9. Se ha usado la β -actina como control de carga.

Dado que la expresión de estas proteínas no parecía ser un buen discriminador de las tumoresferas respecto a las células adherentes, en estas líneas celulares solo validamos dos de los marcadores por microscopía de fluorescencia: CD44 y Nanog, junto con otro miembro de la familia de Notch; cómo se puede ver en la figura **R25**.

En las imágenes representativas de la figura **R25** se muestra de nuevo la expresión de **CD44** y **Nanog**, que como ya comentamos en el apartado **R4** no mostraron un patrón de mayor expresión en esferas, la localización celular de ambos se comentó en dicho apartado de resultados.

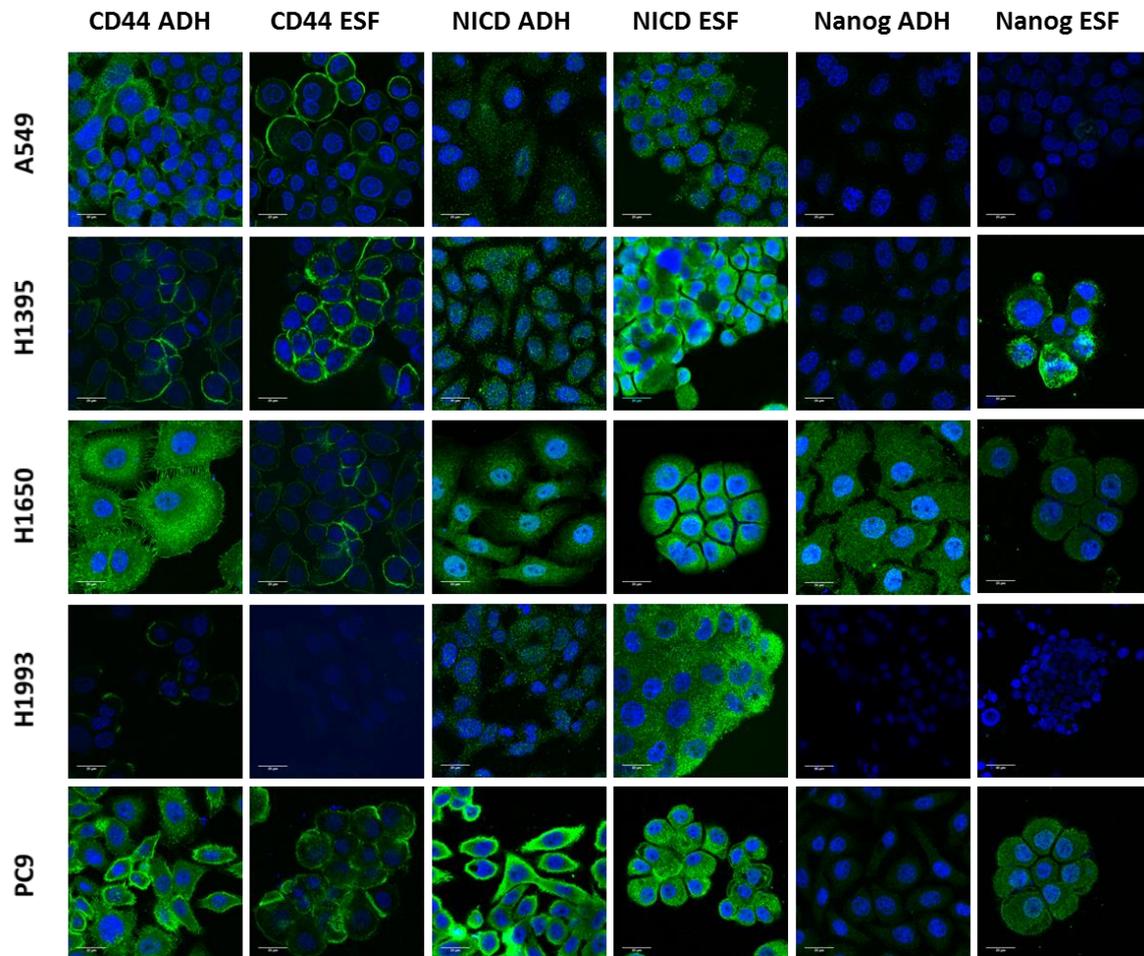


Figura R25: Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia para **CD44**, **Notch1 (NICD)** y **Nanog**, en las líneas **A549**, **H1395**, **H1650**, **H1993** y **PC9** crecidas en condiciones de adherencia y tumoroesferas. En azul se observan los núcleos teñidos con DAPI. Las barras de escala indican 40 μm .

Seguidamente se examinó la expresión de **Notch1** en lugar de Notch3 al no parecer este último un buen discriminador entre células adherentes y tumoroesferas por WB; además Notch1 fue uno de los genes discriminadores entre esferas y adherentes en la PCA que se realizó exclusivamente sobre las líneas celulares. Usamos un anticuerpo contra el fragmento intracelular (NICD), se observó mayor expresión de NICD en las tumoroesferas de las líneas H1395 y H1993. En la figura **R26** se muestran imágenes representativas de la expresión de estas proteínas. Atendiendo a la localización celular podemos observar que en todas las líneas y tanto en células adherentes como en tumoroesferas esta proteína se localiza en el citoplasma; la diferencia principal se observa a nivel de la expresión nuclear. En todas las

tumoroesferas no se observa expresión de NICD en el núcleo mientras que en el caso de los cultivos adherentes si hay mayor expresión en núcleo en las líneas A549 y H1650, una expresión uniforme citoplasma/núcleo, en H1395 y H1993. En la línea PC9 NICD está excluido del núcleo tanto en condiciones de adherencia como de tumoroesferas.

Los resultados obtenidos indican que en las líneas A549, H1395, H1650, H1993 y PC9 la firma molecular encontrada no permite diferenciar entre los cultivos adherentes y las tumoroesferas.

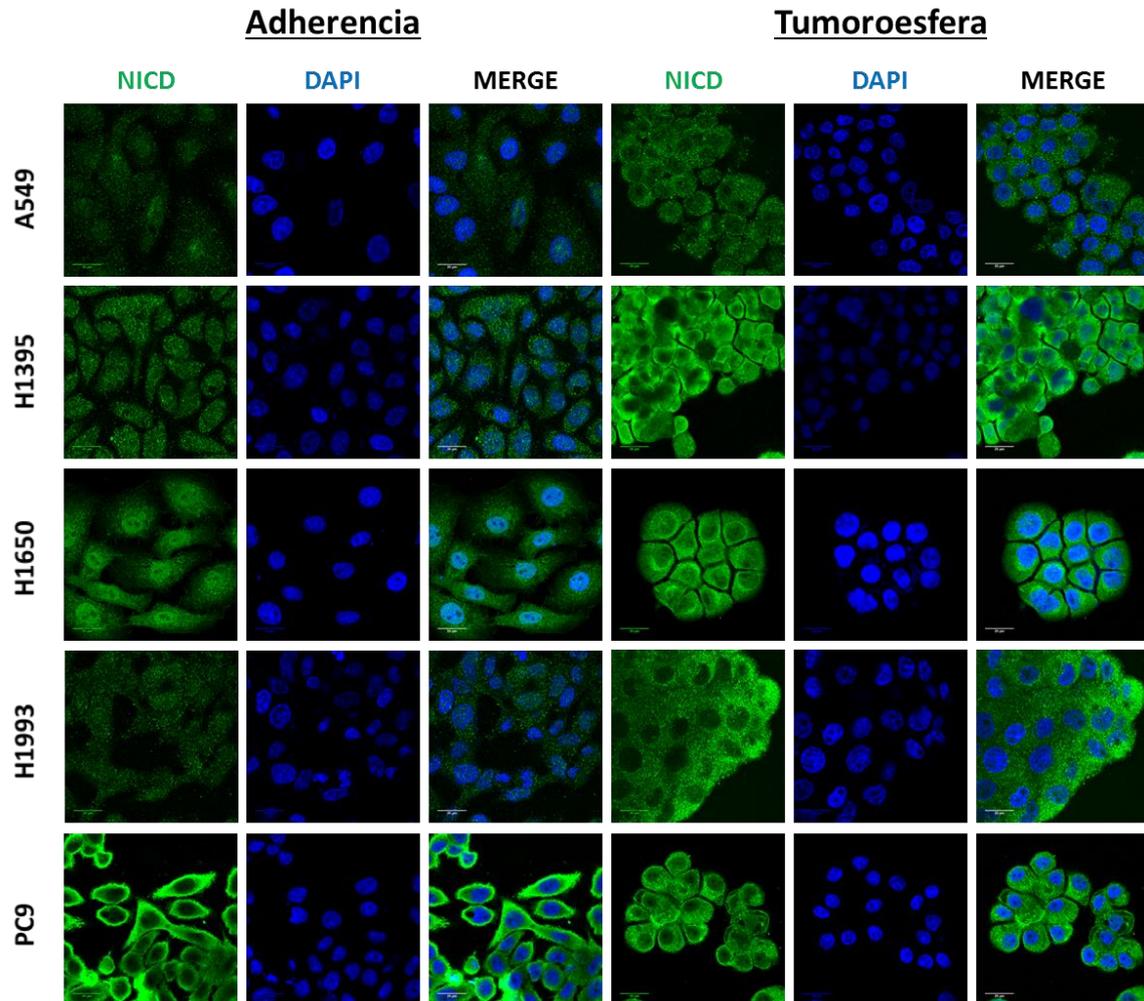


Figura R26: Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de NICD (Notch1 intracelular, en verde) de las células crecidas en condiciones de adherencia y de tumoroesferas. En azul se observan los núcleos teñidos con DAPI. Las barras de escala indican 40 μ m.

R6.3 Validación de una firma génica en las líneas 299, 301, 302, 303, 315, 317, 320, 343.

El análisis de la expresión proteica de CD44, p21, Snail, ITGA6, Notch3 y Nanog mediante western blot sí que validó la firma molecular identificada por PCR en células de adenocarcinoma en las LDP 302, 303, 315, 320 y 343 como podemos ver en la figura **R27**.

La línea 320 sería la más discordante de todas ellas, presentando mayor expresión en condiciones de adherencia de Snail e ITGA6. Las líneas establecidas de la variedad escamosa, las líneas 299, 301 y 317, no mostraron este patrón: en las líneas 299 y 301 se observa casi la firma molecular descrita invertida. Por último la línea 317 sí que tiene un patrón algo parecido al encontrado en adenocarcinoma, las tumoroesferas de esta línea tienden a sobreexpresar los marcadores CD44, p21, ITGA6 y Nanog, aunque Snail y Notch3 están claramente más expresados en ADH.

Estos resultados indican que el análisis mediante WB de la expresión de las proteínas que codifican los genes de la firma génica identificada también permite identificar a las CMT de ADC Sin embargo, no es útil para identificar una población enriquecida en células con características de célula madre en CCE.

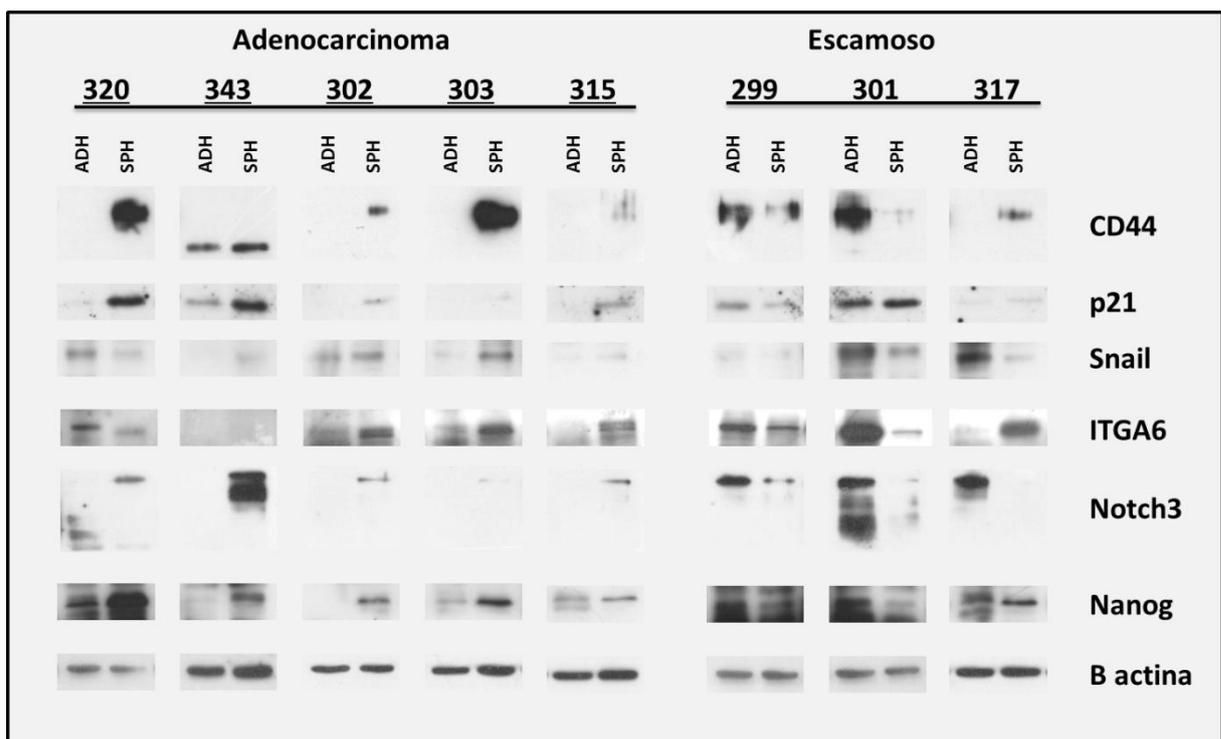


Figura R27: Análisis de la expresión por Westerns Blotts de CD44, Notch3, ITGA6, Nanog, P21 y Snail en las líneas 320, 343, 30, 303, 315 (ADC de pulmón), 299, 301 y 317 (CCE). Se ha usado la β -actina como control de carga.

Al igual que en el apartado anterior, para confirmar este patrón en las LDP la firma génica también fue validada por microscopía de fluorescencia en varias líneas celulares. En la figura **R28** mostramos imágenes representativas donde se puede ver que, salvo alguna excepción puntual como el caso del Notch3 en la línea 343, el patrón de expresión de estas proteínas coincide con el descrito por PCR y Western blot.

En la figura **R29** se muestran imágenes representativas de Notch3 para todas las líneas celulares. Por lo general se observa una mayor expresión de Notch3 en las tumoresferas, aunque las células de la línea 302 mostraron una expresión similar en ambas condiciones y en la línea 343 la expresión fue mayor en las células en adherencia. A diferencia del NICD, Notch 3 solo se observa en membrana plasmática, salvo en el caso de las adherentes de la línea 343 donde si se observa expresión nuclear.

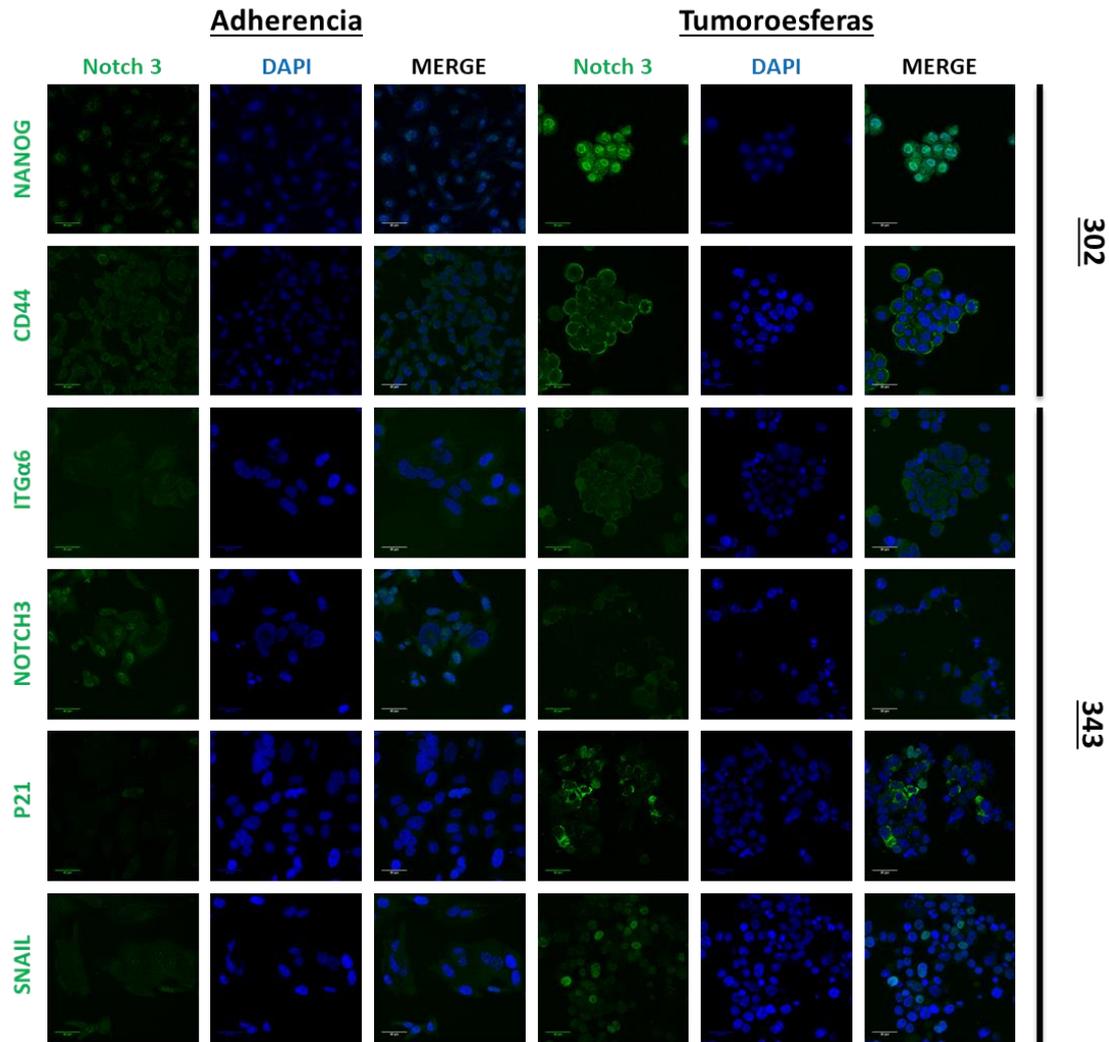


Figura R28. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia para las 6 proteínas de la firma molecular: Nanog, CD44, ITGA6, Notch3, P21 y Snail en las células adherentes (ADH) y las tumoresferas (ESF) de las líneas 302 y 343. Las barras de escala indican 40 μ m.

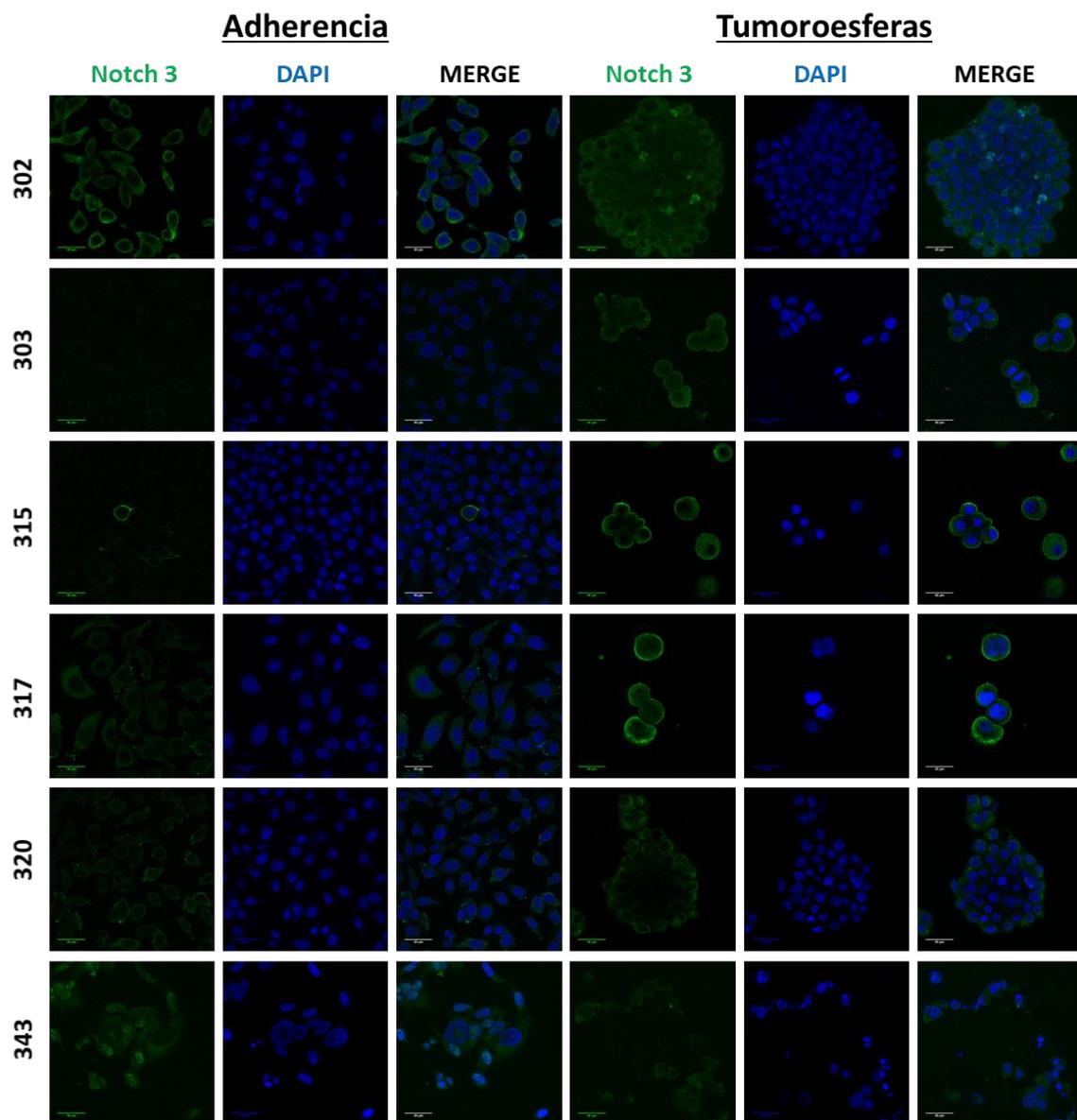


Figura R29: Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia para Notch3 en células adherentes y tumoroesferas de las líneas 302, 303, 315, 317 y 320. Las barras de escala indican 40 μm .

R7 La ruta de transducción EpCAM está activa en las LDP.

Como se comentó en el apartado 4.1 de la introducción la ruta de EpCAM mediada por WNT/ β -catenina puede señalizar usando la maquinaria post-transduccional; un esquema de esta ruta se puede ver en la figura R30. Brevemente, EpCAM sufre una proteólisis mediada realizada por las proteasas ADAM17 y una γ -secretasa, el fragmento intracelular de EpCAM forma un complejo con B-Catenina y Lef1 (118), este complejo es translocado al núcleo donde induce la regulación de genes clave como el *CCND1*; por tanto la presencia o ausencia de EpCAM extracelular no indica la activación de dicha ruta (103). Esto nos llevó a estudiar algunos de los efectores de ambas rutas de señalización.

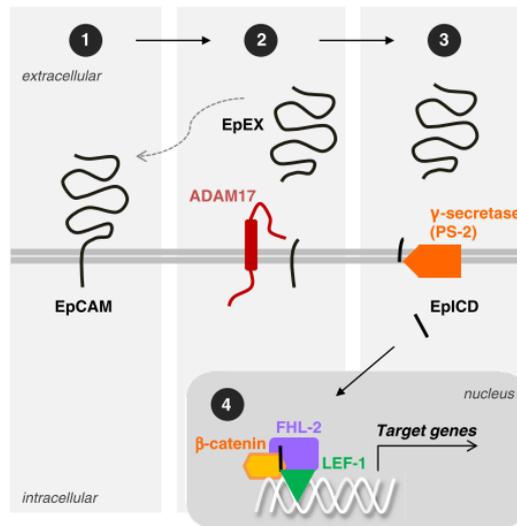


Figura R30: Esquema simplificado de la ruta de transducción de Epcam, tomado de Schnell et al. 2013 (118)

Como ya comentamos en los apartados anteriores R4 y R5, el nivel de expresión de EpCAM utilizando un anticuerpo que reconoce la parte extracelular de la proteína es mayor en las tumoresferas que en las células adherentes. En la Figura R31 se muestra el análisis de la expresión de EPCAM extracelular (EpEX) e intracelular (EpICD) para las líneas 302, 303, 315, 317 y 320, así como para las líneas A549, H1395, H1650, H1993 y PC9.

Al analizar solo el fragmento intracelular de EPCAM (EpICD) en la figura R31, las líneas 302, 303, 315, 317 y 320 mostraron mayor expresión de este en las tumoresferas, tanto en citoplasma como en el núcleo. Como se muestra en la figura R32, mediante western blot también validamos que la expresión es mayor en las tumoresferas salvo en el caso de la línea 302.

En las líneas A549, H1395, H1650, H1993 y PC9 no hay diferencias de expresión de EpICD entre las células adherentes y las tumoresferas por microscopía de fluorescencia. En la línea A549 la expresión es muy baja. En las líneas H1395, H1650 y PC9 la expresión en adherencia y esferas es idéntica, mientras que en las H1993 se observa un marcaje intenso en las tumoresferas, aunque totalmente excluido del núcleo. Como se muestra en la figura R33, los resultados de western blot de estas líneas muestran una expresión irregular de EpICD y de nuevo no apoyan la idea de una mayor expresión en esferas.

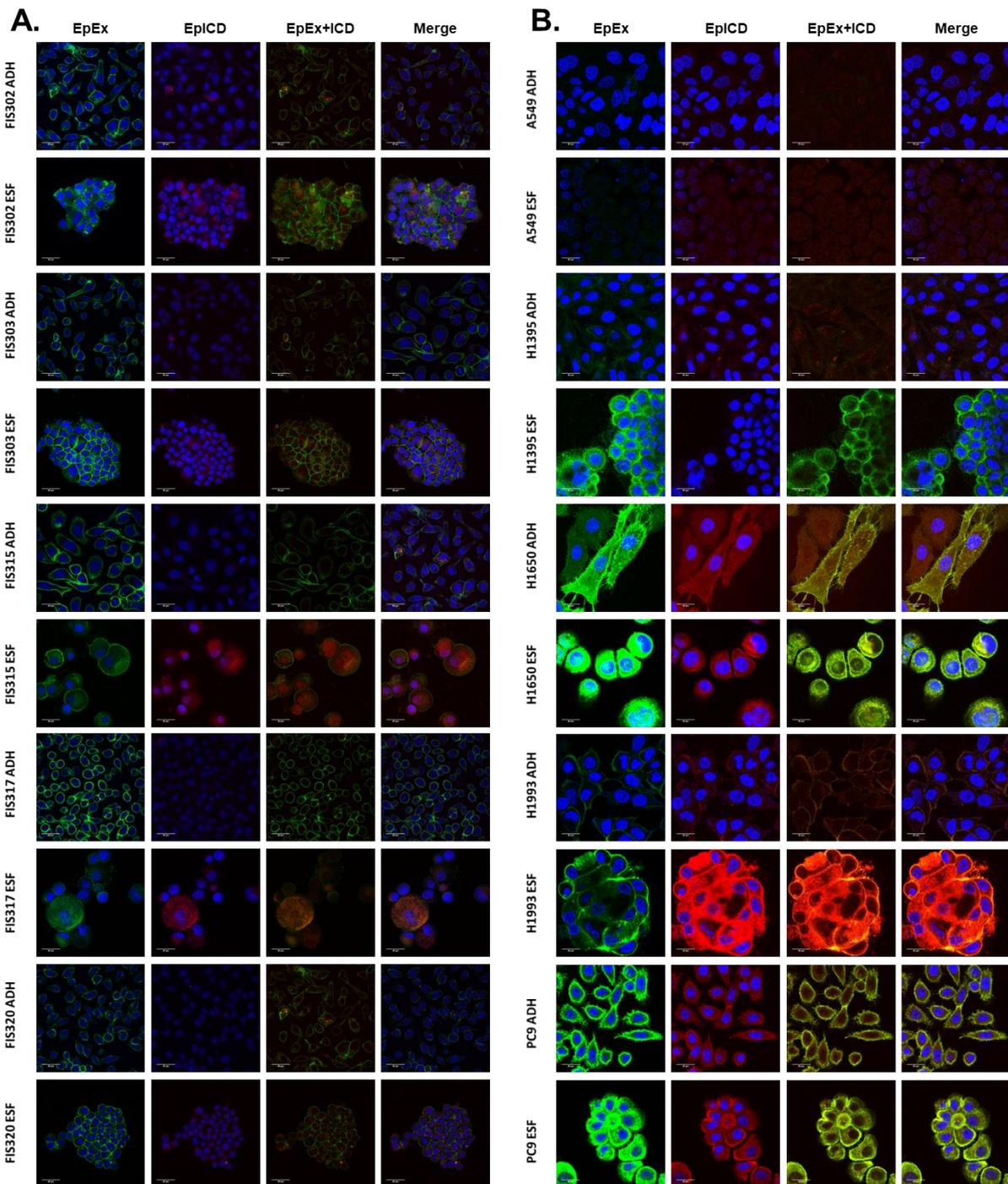


Figura **R31**. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia para EpCAM extracelular (EpEX) e intracelular (EpICD), la superposición de ambos (EpEX + EpICD) y la superposición con la tinción DAPI para observar los núcleos (Merge) en las líneas 302, 303, 315, 317 y 320 (figura A, izquierda) y en las líneas A549, H1395, H1650, H1993 y PC9 (figura B, derecha). Las barras de escala indican 40 μm .

Cuando analizamos la expresión de GSK-3 y AKT por western blot se observó en las líneas 302, 303, 315, 317 y 320 fosforilación de AKT en la treonina 308, de GSK-3 α en la serina 21 y de GSK-3 β en la serina 9 en todos los casos, lo que indica la activación de AKT e inactivación de GSK-3 como se muestra en la figura **R32**. En las líneas A549, H1395, H1650, H1993 y PC9 por otro lado no se detectó la presencia de AKT fosforilado, aunque si se observó una inactivación de GSK-3 en las líneas H1395, H1650 y H1993, pero no en las A549 y PC9 como se muestra en la figura **R33**.

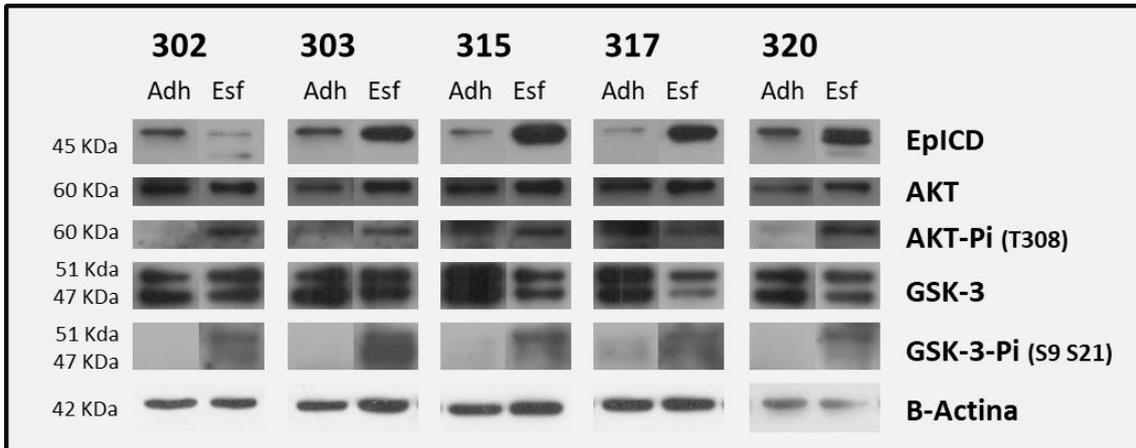


Figura R32. Western blot con anticuerpos contra EpCAM intracelular (EpICD), AKT, AKT fosforilado, GSK-3 y GSK-3 fosforilado en la serina 9 y en la serina 21 en las líneas 302, 303, 315, 317 y 320, en condiciones de adherencia y tumoroesferas. β -actina se usó como control de carga.

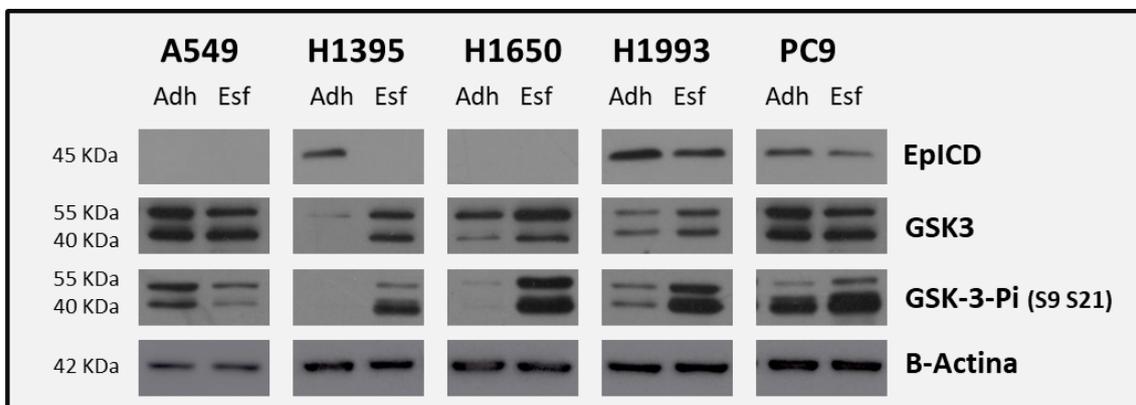


Figura R33: Western blot con anticuerpos contra EpCAM intracelular (EpICD), GSK-3, GSK-3 fosforilado para EpICD, GSK-3 y GSK-3 fosforilado en la serina 9 y en la serina 21 en las líneas A549, H1395, H1650, H1993 y PC9 en condiciones de adherencia y tumoroesferas. β -actina se usó como control de carga.

R8 Correlación de marcadores de superficie de CMT de tumores primarios de pacientes con CPNM con sus características clinicopatológicas.

19 tumores resecados y de un tamaño adecuado junto con tejido sano adyacente recibidos del Hospital general universitario inmediatamente tras su resección fueron disgregados y analizados por citometría de flujo. De estos 19 casos; en sólo 16 se pudo realizar citometría de flujo del tejido sano. El porcentaje de células que expresaban cada marcador de estas parejas de tejido sano y tumoral se muestran en la tabla **R34**. La representación gráfica de estos valores se muestra en la figura **R35**. Se seleccionaron las variables mostradas en la tabla **R36** para su correlación con los datos de citometría.

Codigo Paciente	Tejido	EpCAM	CD166	CD90	CD44	CD34	CD133	CD117	ABCG2
290	Sano	79.4			65	1.18	0	4.86	0.041
290	Tumor	21			76	2.13	0	6	0.035
291	Sano	20.1		0.46	41.7	0	0		0
291	Tumor	5.13		0.26	78.2	0	0		0
292	Sano	9.29		3.78	58.8	7.26		0	
292	Tumor	21.5		3.51	45.8	1.76		0	
293	Sano	86.5		0					
293	Tumor	71.4		0					
303	Sano	49	0	4.06	61.4	10.4			
303	Tumor	37.8	0	3.47	74.2	0.84			
304	Sano	33.5	0	0	57	36.2	0	4.96	0
304	Tumor	58.3	0	0	20	4.41	0	1.46	0
308	Sano	19.2	6.27	0.4	5.69	0.4	0	12	0.085
308	Tumor	15.9	12.7	19	0	11.2	0	0.72	0.078
307	Sano	24.6	5	3.67	24.9	0	0	0	0
307	Tumor	43.5	3	7.14	14.4	0	0	2	6.8
311	Sano	1.07	0.46	0.58	3.94	3	0	0.72	
311	Tumor	2.53	1.74	5.83	38.04	10.56	0	5.44	
316	Sano	80.5	18.55	0.22	52.5	5.57	0	9	0
316	Tumor	79	43.99	3.2	54.7	14.5	0	13	0
315	Sano	60.7	25	12.1	27.7	11.6	0	3	0
315	Tumor	56.5	18	23.5	42.4	16.1	0	8	0
325	Sano	65.4	61.2	7.81	57.5	13	0	5.03	0
325	Tumor	82.8	49.4	8	46.6	11	0	11.6	0
326	Sano	2.06	0.66	0.45	74.9	1.9	0	0	1.75
326	Tumor	57.4	10.4	22.7	56.1	0	0	4.52	3.44
327	Sano	52	0	23.3	17.2	9.52	0	17.6	0
327	Tumor	33.4	0	39.8	49.6	7.32	0	18.1	0
334	Sano	7.16	2.65	0.75	11.9				
334	Tumor	22	0.8	8.86	6.93				
336	Sano	70.3	0	2.83	20.7	1.22	0		
336	Tumor	65.2	0	7.3	32.5	4.61	0		

Tabla R34: Tabla con el porcentaje de células que representaba cada marcador en el análisis de citometría de flujo de los tumores disgregados y el tejido sano adyacente. Se han incluido las 16 muestras de pacientes para las que se obtuvieron datos de citometría tanto de tejido tumoral como de tejido sano adyacente.

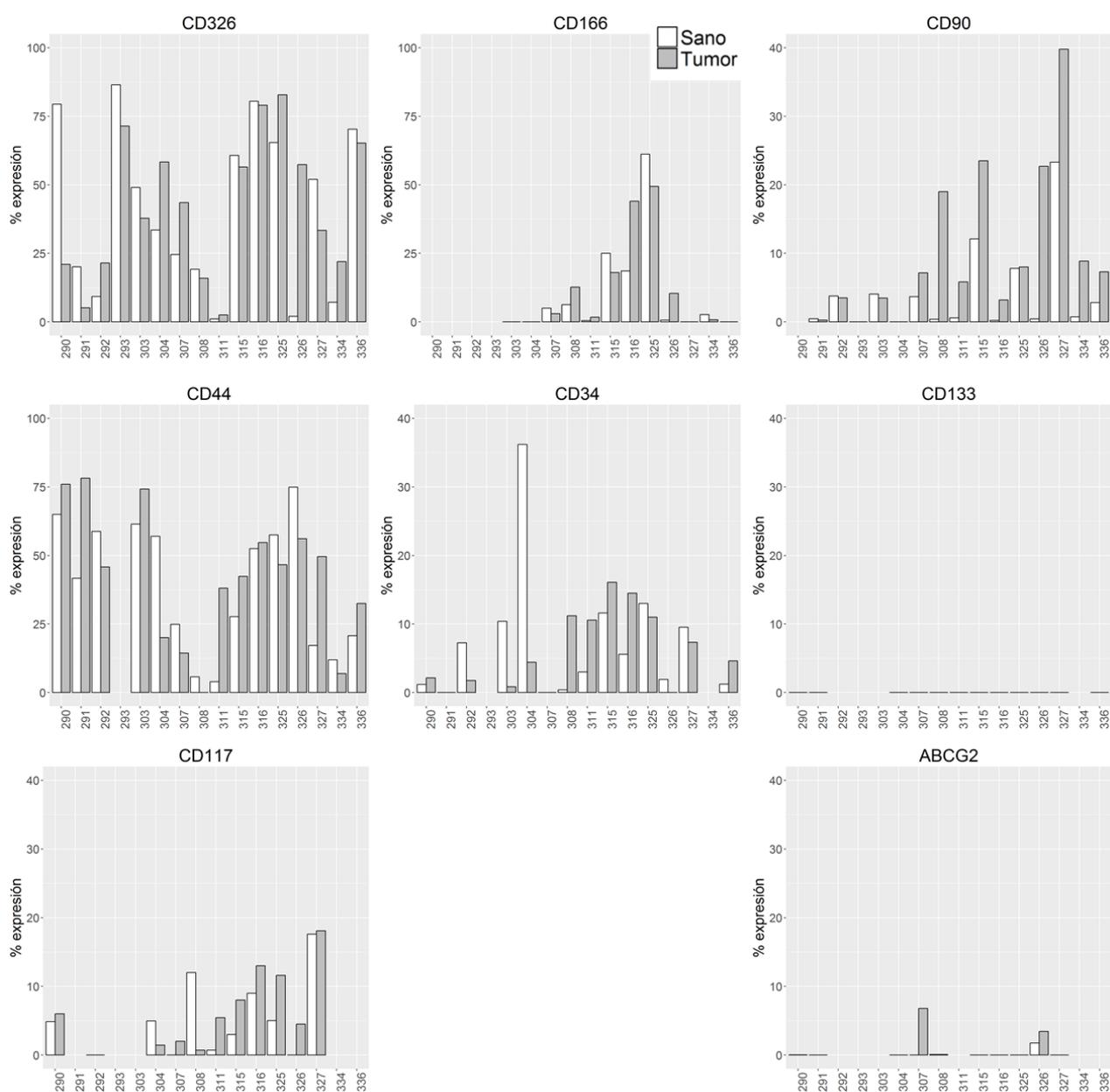


Figura R35: Diagramas de barras del porcentaje de expresión de los marcadores EpCAM, CD166, CD90, CD44, CD34, CD133, CD117 y ABCG2 analizados por citometría de flujo en tejido sano (blanco) y tumoral (gris) de 16 tumores de CPNM.

En la tabla **R37** se muestran los resultados significativos del test de chi cuadrado y el test exacto de Fisher sobre las variables cuantitativas de nuestra población. La población de estudio no es muy grande por lo que realizamos ambos estadísticos obteniendo resultados parecidos con ambos. Continuaremos analizando los resultados del test de chi cuadrado. En la tabla **R38**, se pueden ver los residuos estandarizados y ajustados del test de chi cuadrado.

	Variable	Categoría I	Categoría II	Categoría III
Cualitativo	Tipo Tejido	Sano	Tumoral	
	Género	Hombre	Mujer	
	Histología	ADC	SCC	
	Fumador	Fumador	Exfumador	No fumador
	Exitus	No	Si	
	TNM_T	T1y2	T3y4	
	TNM_N	N0	N1+	
	Edad >=65	Si	No	
	Estadio	I	II	III
	EGFR mutado	Si	no	
	KRAS mutado	Si	No	
Cuantitativo	Variable	Min	Max	Número
	EpCAM	1.07	86.5	35
	CD166	0	61.2	27
	CD90	0	39.8	33
	CD44	0	78.2	33
	CD34	0	36.2	31
	CD133	0	0	27
	CD117	0	18.1	24
	ABCG2	0	6.8	21
	Edad	42	83	31

Tabla R36: Variables incluidas en el estudio estadístico de la cohorte de pacientes incluidos en el análisis junto con las categorías establecidas para las variantes cualitativas.

	Chi	Fisher
Gender / Histology	0.00865305	0.00359627
Gender / Smoking.status	0.0034378	0.0083526
Gender / TNM_T4	0.06549542	0.03151253
Histology / TNM_T4	0.02883517	0.01661943
Histology / Age65	0.03597165	0.01997388
Histology / TNM_St1	0.04694879	0.04302035
TNM_St1 / Mut6_KRASyon	0.04626933	0.09247312

Tabla R37: Tabla con los resultados significativos del test de chi cuadrado y del test exacto de Fisher. En azul se muestran los casos en los que una de las 2 pruebas no dio un resultado significativo.

	ADC	SCC	Total		Current	Former	Never	Total		T1y2	T3y4	Total
Female_O	9	0	9	Female_O	2	3	4	9	Female_O	9	0	9
Female_E	5.23	3.77		Female_E	3.77	4.06	1.16		Female_E	6.39	2.61	
Female_Rst	1.65	-1.94		Female_Rst	-0.91	-0.53	2.63		Female_Rst	1.03	-1.62	
Female_RAd	3.03	-3.03		Female_RAd	-1.42	-0.85	3.35		Female_RAd	2.28	-2.28	
Male_O	9	13	22	Male_O	11	11	0	22	Male_O	13	9	22
Male_E	12.77	9.23		Male_E	9.23	9.94	2.84		Male_E	15.61	6.39	
Male_Rst	-1.06	1.24		Male_Rst	0.58	0.34	-1.68		Male_Rst	-0.66	1.03	
Male_RAd	-3.03	3.03		Male_RAd	1.42	0.85	-3.35		Male_RAd	-2.28	2.28	
Total	18	13	31	Total	13	14	4	31	Total	22	9	31

Tabla R38: Tabla de valores Observados (_O), Esperados (_E), residuos estandarizados (_Rst) y residuos ajustados (_Ad) del test de chi cuadrado para las variables Género/Histología, Género/Fumador y Género/TNM_T. En azul se muestran los residuos que indican una fuerte relación entre ambas variables.

Como podemos ver en la tabla **R39**, los tumores más pequeños coinciden con el subtipo adenocarcinoma, mientras que los más grandes con el escamoso. Los adenocarcinomas predominan en la población de menos de 65 años, mientras que los escamosos en la población de más de 65 y además predomina la presencia de adenocarcinomas de estadios T1. Los escamosos se presentan de manera más uniforme entre T1 y TII. En ambos hay un pequeño porcentaje de TIII aunque es ligeramente superior en el subtipo escamoso.

	T1y2	T3y4	Total		65 or more	Less than 65	Total		I	II	III	Total
ADC_O	16	2	18	ADC_O	9	9	18	ADC_O	13	2	3	18
ADC_E	12.77	5.23		ADC_E	12.19	5.81		ADC_E	9.87	4.65	3.48	
ADC_Rst	0.90	-1.41		ADC_Rst	-0.91	1.33		ADC_Rst	1.00	-1.23	-0.26	
ADC_RAd	2.59	-2.59		ADC_RAd	-2.49	2.49		ADC_RAd	2.29	-2.20	-0.45	
SCC_O	6	7	13	SCC_O	12	1	13	SCC_O	4	6	3	13
SCC_E	9.23	3.77		SCC_E	8.81	4.19		SCC_E	7.13	3.35	2.52	
SCC_Rst	-1.06	1.66		SCC_Rst	1.08	-1.56		SCC_Rst	-1.17	1.44	0.31	
SCC_RAd	-2.59	2.59		SCC_RAd	2.49	-2.49		SCC_RAd	-2.29	2.20	0.45	
Total	22	9	31	Total	21	10	31	Total	17	8	6	31

Tabla R39: Tabla con los valores Observados (*_O*), Esperados (*_E*), residuos estandarizados (*_Rst*) y residuos ajustados (*_Ad*) del test de la chi cuadrado para las variables Histología/TNM_T, Histología/Edad>=65 e Histología/Estadío. En azul se muestran los residuos que indican una fuerte relación entre ambas variables.

Se usó el test de la T o el análisis de la varianza (dependiendo del número de categorías) al descartar la viabilidad de un estudio multiparamétrico de componentes principales dado el tamaño de la cohorte. Se estudiaron todas las posibles combinaciones de las variables clínico-patológicas con los marcadores estudiados; en la figura **R40** se muestran las gráficas con los valores significativos para este análisis. Para este análisis se utilizó la cohorte completa de 19 pacientes.

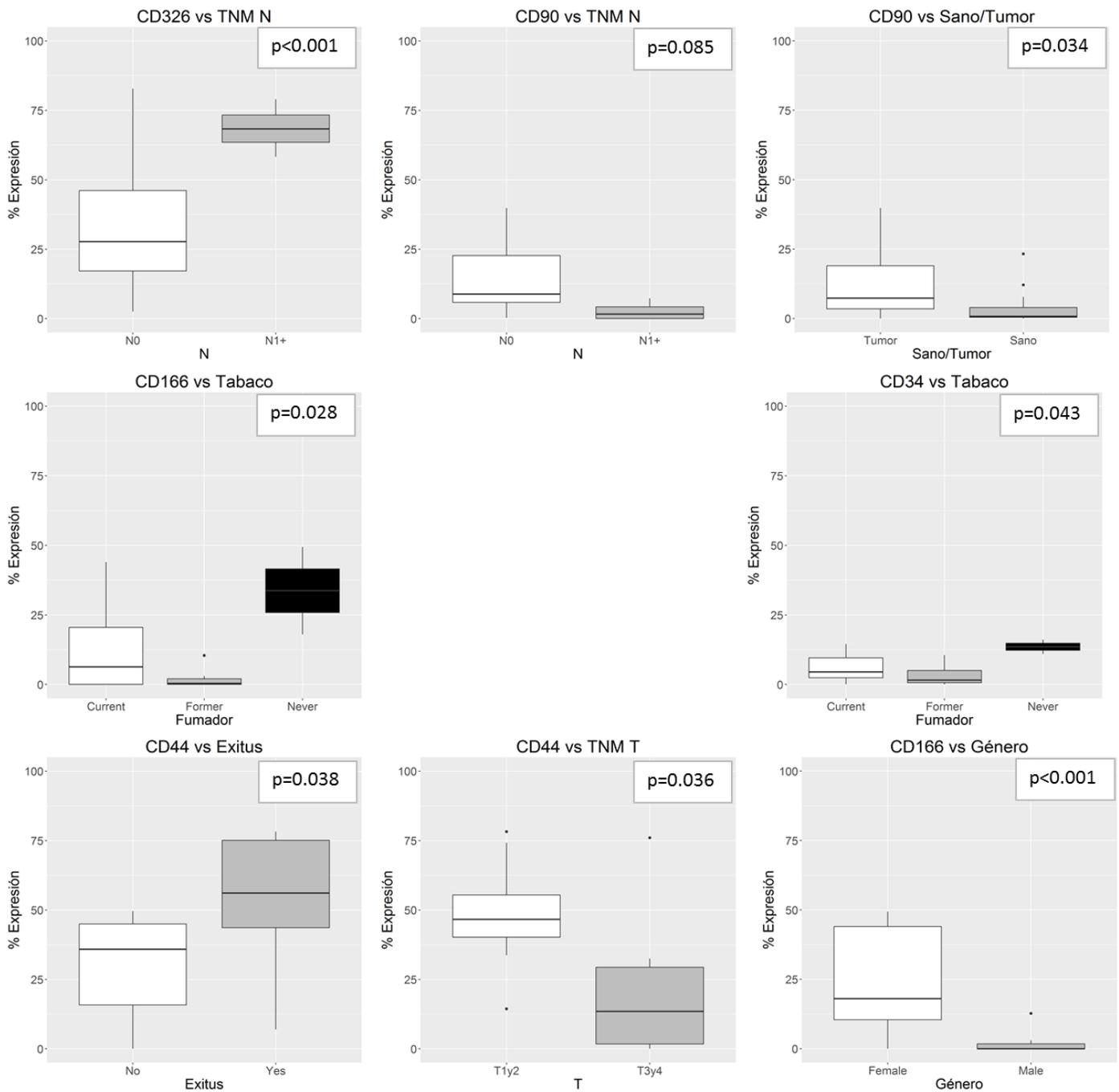


Figura R40: Diagrama de cajas de los valores significativos al analizar las variables clínico-patológicas con los marcadores de CMT. La caja representa los cuartiles Q1 y Q3, la línea dentro de la caja la mediana, los bigotes van hasta un máximo de 1,5 veces el rango intercuartílico, los valores fuera de este rango se representan como círculos

Discusión

D1 Desarrollo de modelos experimentales y capacidad iniciadora de tumores.

El tumor de cada paciente con cáncer de pulmón no microcítico es heterogéneo y único. La histopatología de un tumor puede diferir significativamente entre los pacientes y la heterogeneidad entre tumores es muy frecuente. La naturaleza compleja de los tumores supone un desafío para descifrar los mecanismos que regulan su comportamiento. En cáncer de pulmón, a pesar de los avances en el conocimiento de sus alteraciones moleculares, la supervivencia global no supera el 15% a los cinco años (13). Incluso disponiendo de terapias individualizadas, la adquisición de resistencias a los tratamientos es una de las causas principales de su elevada mortalidad. Un factor que contribuye a la heterogeneidad tumoral es la presencia de células madre o iniciadoras de tumores distintivas para cada subgrupo de CPNM. El paradigma de las CMT para la patobiología de los tumores sólidos supone un reconocimiento a la heterogeneidad fenotípica y funcional de las células observadas en estos, explica la resistencia a los tratamientos convencionales, agresividad y asociación a estadios avanzados del cáncer, y resalta la necesidad de mejora en las terapias actualmente en uso.

El estudio de las CMT en tumores sólidos se ha basado clásicamente en dos tipos de ensayos experimentales: la formación de tumoresferas *in vitro* en cultivos en suspensión o sin adherencia (61,62), y la generación de tumores *in vivo* al implantar células cancerosas en un modelo de ratón inmunodeprimido (68).

En esta tesis se han desarrollado protocolos experimentales para la generación de tumoresferas a partir de líneas celulares establecidas y de tumores de CPNM para el estudio de las CMT. El establecimiento de cultivos de tumoresferas, enriquecidas en CMT, y la comparación con sus contrapartes crecidas en cultivos de adherencia en presencia de suero bovina fetal, lo que induce su diferenciación, nos permite tratar de averiguar qué características posee esta población celular de CMT. Una parte importante de los resultados de esta tesis se basan en esta comparación, que se discuten en los siguientes apartados.

En el transcurso de este proyecto se han generado tumoresferas a partir de tumores de pacientes con CPNM (LDP), así como cultivos en adherencia. Hemos optimizado el análisis por citometría de flujo para la caracterización de los marcadores específicos de superficie y subpoblaciones celulares, y hemos analizado la expresión de estos marcadores por microscopía de fluorescencia y Western blot. Para demostrar la capacidad de inducir tumores de las CMT, hemos generado modelos de xenotrasplante en ratón a partir de la inyección de estas células (PDXs).

Al analizar la CIT de estas líneas, en las LDP 302, 303 y 317 las tumoresferas presentan una clara mayor CIT, presentando una aparición más temprana del tumor y un crecimiento más rápido. La baja diferencia entre la CIT de las líneas 315 y 320 entre las tumoresferas y sus parejas adherentes podría deberse a que ambas poblaciones tienen una similar CIT o que la CIT de estas 2 líneas es muy alta y necesitamos inyectar una cantidad de células menor para ver una diferencia entre ellas.

Estos resultados indican que la población de tumoresferas está enriquecida en células con características de CMT con una mayor CIT. Sin embargo, las células adherentes también muestran CIT, lo que nos indica que ambas poblaciones tienen células con características de

CMT. Resta estudiar con más profundidad las líneas 315 y la 320 que han mostrado una similar CIT entre ambas poblaciones de tumoresferas y adherentes, así como la línea 302 cuyos PDX derivados de tumoresferas presentan una mayor agresividad, pero menor porcentaje de éxito.

En la evaluación de la expresión de las proteínas de superficie EpCAM, CD166, CD44, CD90, CD34, CD133 y ABCG2 mediante citometría de flujo en las células derivadas de tumores de pacientes y de los PDX se observa una mayor dispersión de los datos en las LDP de PDXs. En general los resultados de los marcadores imitan a las LDPs del tumor primario, pero con un mayor ruido añadido, con la salvedad del marcador CD44 que presenta una clara menor expresión que en estas, al menos en superficie.

En el caso de los PDXs, adicionalmente al protocolo para el análisis de citometría realizado a todos los cultivos de tumores, se debió llevar a cabo una depleción de las células de ratón. Además, se deben tener en cuenta en las muestras derivadas de los tumores PDX, posibles diferencias en el desarrollo de los tumores en el ratón, presencia impurezas no excluidas por los protocolos de filtrado y depleción de células de ratón. Esta combinación de factores lleva al incremento de variabilidad mostrado en la gráfica.

D2 Uso de marcadores de superficie para la caracterización y aislamiento de CMT en CPNM.

Los resultados obtenidos del análisis de la expresión de marcadores de superficie de CMT ofrecen resultados limitados para su uso para aislar CMT de CPNM, ya que la diferencia observada entre las células adherentes y su contraparte tumoresfera no permitiría el aislamiento de CMT en las condiciones estudiadas dentro de una población heterogénea.

D2.1 La expresión de EpCAM extracelular no discrimina entre tumoresferas y células adherentes.

EpCAM se expresa en varios tejidos epiteliales humanos, carcinomas y células progenitoras y madre. El análisis de su expresión mediante citometría de flujo en las líneas H1395, H1650, H1993 y PC9, las líneas derivadas de paciente 302, 303, 315, 317 y 320, así como en los correspondientes PDX, reveló que los porcentajes de células que expresan EpCAM fueron muy elevados en prácticamente todos los casos, salvo en la línea A549. Estos resultados indican que estas células son de origen epitelial. Los porcentajes en adherencia que observamos coinciden con algunos artículos (125,196,197), pero los porcentajes de EpCAM que observamos cuando comparamos los cultivos adherentes con las tumoresferas son bastante más altos en tumoresferas que lo que está descrito en la literatura (125,168,196,197). Cabe destacar que los valores significativos del test de la T revelan un número ligeramente mayor de células adherentes positivas para EpCAM en comparación con las tumoresferas en 2 líneas celulares (A549 y 303) y mayor número de tumoresferas positivas para Epcam en otras 2 líneas (H1650 y 315). Este resultado se validó por microscopía de fluorescencia, lo que apoya los resultados obtenidos en el análisis de citometría de flujo.

La ubicuidad de EpCAM en las tumoresferas y sus homólogas adherentes hace que no pueda ser utilizado como marcador único para el aislamiento de CMT; sin embargo, varios resultados sugieren un papel activo en la biología de las CMT como se comentará más abajo.

D2.2 Expresión de CD166 en las CMT de CPNM.

Como se ha comentado en la introducción en el apartado **4.2**, CD166 se ha descrito como un marcador prometedor para identificar células CMT en CPNM, aunque también como un marcador inerte de CMT en CPNM (135).

Los resultados obtenidos del análisis de su expresión en líneas celulares y células derivadas de tumores de CPNM mediante citometría, microscopía de fluorescencia y western blot indican que tanto las tumoresferas como sus homólogas células adherentes expresan CD166. Sin embargo, se observa una gran diferencia de expresión entre las líneas celulares establecidas y aquellas derivadas del cultivo primario de los tumores de CPNM. En las líneas A549, H1395, H1650, H1993 y PC9 este marcador se expresa en tumoresferas y células adherentes con bastante intensidad, incluso más en ADH en algunos casos como las H1650 o las PC9; sin embargo, es interesante destacar la presencia de marcaje nuclear en tumoresferas de varias de las líneas celulares analizadas (A549, H1395 y H1993). Por otro lado, el análisis mediante microscopía de fluorescencia reveló que en las líneas 302, 303, 315, 317 y 320 la expresión de CD166 era claramente superior en las tumoresferas, presentando además todas ellas una

localización nuclear. Es importante señalar que el anticuerpo utilizado para detectar CD166 mediante microscopía de fluorescencia reconoce la parte extra e intracelular de la proteína, lo que permitió analizar su expresión en la membrana celular, así como como aquella que ha sufrido una RIP; esto podría estar relacionado con la ruta de transducción de este marcador y podría indicar un papel señalizador del fragmento intracelular de CD166 en las tumoroesferas. Este resultado refuerza la importancia de contextualizar bien el estudio de marcadores de CMT, y podría explicar la controversia existente entre los resultados publicados sobre marcadores de CMT en tumores sólidos.

Los análisis de citometría de flujo también revelaron la existencia de una subpoblación celular EpCAM^{neg}/CD166^{bright} en la línea H1650. Sería necesario profundizar en el estudio de esta subpoblación para analizar su papel en las CMT.

Por otro lado, los gráficos de cargas de los análisis de componentes principales realizados sobre líneas establecidas mostrados en el apartado de resultados **R6.1** mostraron que el gen que codifica a CD166 tiene una correlación negativa fuerte con la mayoría de tumoroesferas y positiva con los cultivos adherentes; implicando una mucha mayor presencia de este gen en las células adherentes; sin embargo, este resultado se invertía en los cultivos primarios derivados de pacientes.

Los resultados obtenidos sugieren que CD166 no es un buen discriminador de CMT cuando se analiza de manera individual, pero apunta hacia un posible rol del fragmento intracelular de este marcador en el CPNM. Cabría profundizar en los mecanismos moleculares sobre este marcador y su implicación en la señalización celular en CPNM.

D2.3 3 Expresión de CD44 en las CMT de CPNM.

Existen numerosos estudios sobre CD44 en CPNM en la literatura que lo describen como un marcador con un papel central en varias rutas de señalización implicadas en el cáncer, incluyendo cáncer de pulmón. El primer artículo publicado donde se propuso como posible marcador de las CMT de pulmón en lugar de CD133 pertenece a Leung *et al.* 2010 (143). Actualmente varios metaanálisis indican que CD44 está asociado a un peor pronóstico en pacientes con CPNM (144–149).

Se ha descrito el papel de esta proteína en las rutas de transducción de señales. Al igual que EpCAM o CD166, CD44 es también cortado por γ -secretasas. En cáncer de mama se describió que el fragmento intracelular de 17 KDa es translocado al núcleo donde interacciona con Sox2 y Oct4 (199). En adenocarcinoma ductal pancreático CD44 actúa como correceptor de otros RTKs; el bloqueo del CD44 evita la transducción por MET y VEGFR, y por tanto la activación de las MAPK y la ruta de PI3K/AKT (200). En cáncer de mama se describió también su papel como correceptor de EGFR y del receptor de TGF- β (TGFBR); su represión llevó a la inactivación de las rutas de AKT y ERK, así como a la represión de marcadores de TEM (201).

Nuestros resultados muestran que, en el análisis mediante citometría de flujo, todas las líneas celulares con excepción de las tumoroesferas de la línea H1993 muestran elevada expresión de CD44. El número de células que expresan CD44 es ligeramente inferior en las tumoroesferas, salvo en la línea A549; siendo la diferencia estadística significativa en las líneas 303, 315, 317 y

320; así como en la línea H1993. Estos resultados se observaron también en el análisis de las células derivadas de los tumores de los PDXs; pero la alta dispersión de los datos dificulta la obtención de valores significativos en la estadística. Es interesante señalar que la disminución relativa de la expresión de CD44 en los PDX fue mayor que la observada para EpCAM y CD166.

Mediante citometría de flujo se identificó la subpoblación EpCAM^{neg}/CD44^{pos} en las H1650. En relación a esta población, se ha descrito una población CD44^{hi}/CD24^{neg}/EpCAM^{low} en cáncer de mama como ya se comentó en la introducción (56). Sería interesante la caracterización de esta subpoblación, sin embargo, al estar ausente en el resto de líneas y al considerar los porcentajes de estos marcadores obtenidos, no parece útil para el aislamiento de CMT.

Con los resultados obtenidos mediante citometría y microscopía de fluorescencia este marcador no parece ser un buen discriminador individual entre tumoresferas y células adherentes. Sin embargo, por otras técnicas CD44 sí muestra una mayor presencia en tumoresferas: De nuevo el análisis discriminante de cuadrados parciales mostrado en el apartado **R6.1** asociaba una mayor expresión del gen de CD44 a las tumoresferas, y las LDP de la variedad adenocarcinoma presentaban una mayor expresión por western blot como vimos en el apartado **R6.3**.

Tanto por microscopía de fluorescencia como por western blot los resultados obtenidos de los cultivos primarios derivados de tumores de pacientes son más homogéneos que en las líneas celulares establecidas, y a diferencia de lo observado en las líneas establecidas todas las bandas observadas en el western blot de las tumoresferas se corresponden a los isotipos V de CD44. De nuevo se observa la heterogeneidad entre las líneas establecidas y las LDP, presentando las segundas un patrón claro de mayor expresión en las tumoresferas frente a los cultivos adherentes.

Los resultados de este estudio indican que, en las condiciones experimentales utilizadas, por sí solo, CD44 no es un buen discriminador de CMT, aunque sí podría serlo en combinación con otros marcadores, al menos en tumores primarios de pacientes.

D2.4 Expresión de CD133 en las CMT de CPNM.

CD133 se describió como marcador de CMT en CPNM en 2008 (49). El estudio de este marcador es complicado por la existencia de diferentes isoformas y sus complejas modificaciones postraduccionales lo que ha llevado a una controversia sobre su papel en las CMT a lo largo de la bibliografía (151).

Los metaanálisis señalan una clara correlación con el CD133 y peor pronóstico: Una revisión de 11 estudios correlacionó la presencia de CD133 con una peor supervivencia a los 5 años de pacientes con CPNM (202). Otro metaanálisis incluyendo 23 trabajos reportó que CD133 tiende a correlacionarse con peor pronóstico, y mayor grado de metástasis de nódulos en cáncer de pulmón (203). Los resultados de otros 13 estudios mostraron asociación entre CD133 y una menor supervivencia media (204). Curiosamente un metaanálisis comparando resultados de estudios en poblaciones asiática y caucásica mostró que el CD133 solo se asociaba con menor supervivencia en la población asiática (205).

Se ha descrito una mutación en CD133, presente en tejido tumoral, en el genoma de pacientes con una historia familiar de cáncer de pulmón (206); aunque otros estudios no asociaron polimorfismos en el CD133 con pronóstico del cáncer de pulmón (207).

En nuestro estudio, a pesar de haber utilizado diferentes anticuerpos que reconocen el marcador CD133, este fue indetectable por citometría de flujo tanto en los tumores primarios de la cohorte de pacientes, como en los tumores de los PDX y los cultivos de células de líneas establecidas, tanto en el caso de cultivos adherencia como tumoroesferas. Si encontramos alta expresión de CD133 por microscopía de fluorescencia. Se ha descrito en la literatura que la detección de CD133 por citometría de flujo es generalmente baja, habiendo reportado porcentajes de expresión inferiores al 1% (94,155,158,161,164,208).

En las líneas A549, H1395, H1650, H1993 y PC9, así como en los cultivos primarios 302, 303, 315, 317 y 320, observamos expresión de CD133 por WB y microscopía de fluorescencia en todos los casos por al menos una técnica. La mayor expresión fue observada en las tumoroesferas de H1395 y 320, tanto por WB como por microscopía de fluorescencia.

La localización de este marcador fue principalmente citoplasmática y en membrana celular, aunque tenemos algunos casos en los que se observa expresión nuclear: En ESF y ADH de la línea 303 y PC9, así como en los cultivos adherentes de la línea H1395 también se aprecia mayor expresión perinuclear en las tumoroesferas de las líneas PC9 y 315. La mayor expresión de CD133 nuclear se ha asociado previamente a un peor pronóstico en CPNM (209).

La causa de la no detección de este marcador por citometría y su elevada expresión por WB y microscopía de fluorescencia está relacionada con el anticuerpo utilizado en nuestros análisis. El anticuerpo usado en WB y microscopía fue el Ab19898, anticuerpo que se dirige contra el fragmento C-terminal, mientras que el anticuerpo usado para la citometría de flujo fue el AC133 de Miltenyi, este se dirige al segundo bucle extracelular (152). Las modificaciones postraduccionales pueden dificultar en gran medida la detección de este anticuerpo por citometría de flujo.

CXCR4 se ha asociado a la expresión de CD133 en CPNM (64,157,166,210) y se ha descrito como activador de importantes rutas y procesos en CMT como PI3K/AKT, HH o la capacidad de invasión (211). En este estudio consideramos también la inclusión del marcador CXCR4; sin embargo, las primeras pruebas realizadas mostraron que este marcador era negativo por citometría en todas las líneas, lo que nos llevó a excluirlo de nuestro estudio.

La dificultad para detectar CD133 por citometría sugieren que el CD133 no es un buen marcador para aislar CMT. No obstante, dado el amplio número de publicaciones que sugieren un papel importante de CD133 en la biología de las CMT y quimiorresistencia en el CPNM sería recomendable su inclusión en los estudios de CPNM, así como también la inclusión de CXCR4.

D2.5 El marcador de superficie CD90 solo se expresa en la línea H1650.

CD90 es un marcador poco estudiado en CPNM. En 2012 CD90 fue descrito en pacientes de CPNM, aunque no asociado a un peor pronóstico ni relacionado con las CMT; de hecho en este estudio no encontraron diferencias entre el tejido tumoral y el normal (185,186). En 2013, dos

grupos independientes identificaron CD90 como un posible marcador de CMT en cáncer de pulmón (212,213).

En nuestros análisis por citometría de flujo en las líneas establecidas CD90 solo pudo ser detectado en la línea H1650 y en un porcentaje muy bajo, y a diferencia de Yan et al., (212) no observamos su expresión en las A549. Aunque CD90 no fue un marcador seleccionado para la firma molecular, el análisis discriminante de cuadrados parciales descrito en el apartado **R6.1** si que asoció una mayor expresión del gen 1 a los cultivos de tumoroesferas. Además, como vimos en el apartado de resultados, presentó una mayor expresión en tejido tumoral que en el tejido sano adyacente en nuestra cohorte de pacientes **R8**.

CD90 es un marcador poco estudiado en CPNM pero que ha mostrado algunos resultados prometedores en nuestro estudio, siendo el único marcador expresado con valores significativo en las células derivadas de tumor primario de nuestra cohorte de pacientes. Su detección por citometría sin embargo se limitó a línea H1650 en condiciones de adherencia. Esto podría deberse a la no o menor expresión de este marcador en cultivos in vitro y queda pendiente por validar mediante western blot o microscopía de fluorescencia.

D2.6 CD34, ABCG2, CD117, ALDH1A1, E-Cadherina y Vimentina.

Los marcadores CD34, ABCG2 y CD117 no fueron detectados por citometría de flujo. Es importante señalar que la no detección de estos marcadores no indica su ausencia, solo la no detección por en nuestras condiciones experimentales. Puede que su expresión esté por debajo del límite de detección del citómetro utilizado o que nuestras condiciones experimentales dificulten su detección.

CD117 es un marcador muy poco estudiado en las CMT de CPNM por no estar considerado en este cáncer una marcador asociado a rutas conductoras en este cáncer, CD34 está más asociado a leucemias aunque ha aparecido en la descripción de CMT de algunos tumores sólidos, aunque en el caso del pulmón no parecen un marcador de CMT importante (149,181,189,214).

ALDH1 es un marcador clásico del campo de las CMT. Esta enzima cataliza la conversión de ácido retinoico en retinol, es altamente expresada en células madre de varios órganos y puede jugar un factor en la resistencia contra algunos fármacos como el cisplatino (61). Este marcador presenta dificultades para ser analizado por citometría en paralelo al resto de marcadores de superficie ya que requiere un ensayo funcional que debe realizarse adicionalmente a nuestro ensayo de citometría multiparamétrica. Dado que la cantidad de células en los cultivos en baja adherencia suele ser un factor limitante este marcador se analizó solo por microscopía de fluorescencia y WB. Las imágenes de microscopía de fluorescencia mostraron mayor expresión en algunas tumoroesferas de las líneas A549, H1395, 315 y 320, no mostrando diferencias de expresión en el resto de líneas. Se detectó localización nuclear en algunos casos, en las células adherentes y las tumoroesferas de la línea H1395, así como las células adherentes de la línea H1650. ALDH1 se localiza normalmente en citoplasma, aunque su localización nuclear en cáncer de recto o colón se ha relacionado con menor supervivencia (215).

ALDH1A1 se ha asociado a un peor pronóstico en cáncer de pulmón (216,217); aunque también es un marcador controvertido, habiéndose descrito su ausencia en las poblaciones más agresivas (218,219). Nuestros resultados preliminares para este marcador muestran que, aunque en algunas líneas podría el análisis de su expresión puede ser útil, no parece un marcador robusto para la detección de CMT en CPNM.

La expresión de E-Cadherina y Vimentina se analizó por microscopía de fluorescencia y WB. Por lo general los resultados eran esperables: En las líneas establecidas la E-Cadherina está más presente en las células crecidas en condiciones de adherencia que en las tumoroesferas por una o ambas técnicas; con la excepción de la línea H1993 donde los niveles parecen idénticos. Los niveles de Vimentina son parecidos en entre las células adherentes y las tumoroesferas al analizarlos mediante microscopía de fluorescencia.

Si consideramos ambos marcadores, las esferas tienen una ratio de E-Cadherina/Vimentina inferior. Esto sugiere un fenotipo más mesenquimal en el caso de las tumoroesferas. En las líneas H1650 y PC9 ambos marcadores mostraron muy baja intensidad por microscopía de fluorescencia, pero los resultados de WB sugieren una mayor ratio E-Cadherina/Vimentina. Las células derivadas de los cultivos primarios mostraron un comportamiento similar para E-Cadherina y Vimentina, y atendiendo de nuevo a la ratio E-Cadherina/Vimentina, las tumoroesferas mostraron un menor ratio que las adherentes, aunque en la línea 315 y 317 tanto las ADH como las ESF parecen tener una ratio similar.

Aunque estos 2 marcadores no pueden ser usados para la identificación de la población de CMT, el análisis de su expresión puede ofrecer información sobre el fenotipo de las células.

D2.7 Consideraciones sobre los ensayos de citometría en las CMT.

Para llevar a cabo la identificación de marcadores de CMT, se revisó la literatura exhaustivamente, se realizó un estudio preliminar de marcadores de las líneas celulares y se seleccionó la metodología a utilizar, así como su puesta a punto. Uno de los detalles que llama la atención al revisar la bibliografía es la gran controversia en este campo de estudio, ya que hay un gran número de marcadores que se han propuesto como posibles marcadores de CMT y existe una detección irregular entre los diferentes trabajos publicados. Si estas controversias están siendo observadas en el análisis de líneas celulares establecidas, donde la variación en las condiciones de cultivo y metodologías no varía demasiado entre diferentes laboratorios; no es difícil imaginar la alta variabilidad en estudios de marcadores de superficie al trabajar con tumores primarios. Los protocolos de disgregación de tumores de pacientes añaden además variabilidad adicional, como mostramos en el apartado de resultados con la desviación media de los marcadores EpCAM, CD44 y CD166. Por todo lo expuesto, sería necesario estandarizar las condiciones experimentales y validar la expresión de los marcadores mediante otras técnicas experimentales.

Un problema añadido al uso de marcadores de superficie es que, aunque muchos de ellos parecen tener un papel en el cáncer de pulmón, son los factores de transcripción y rutas de señalización activadas lo que hacen que realmente una célula sea una CMT. Este hecho junto con la plasticidad de este fenotipo hace tremendamente elusiva a esta población; dificultado aún más por el estudio de esta en diferente tipo de células, pacientes, protocolos y

condiciones de establecimiento de esferas; todo lo descrito puede explicar que los fenotipos observados de las CMT cambien. Esto dificulta poner en contexto artículos como el de Park et al.; estos autores usando una cohorte de 368 pacientes obtienen que varios de los marcadores clásicamente asociados con un peor pronóstico o a la subpoblación de CMT, como el CD133, CD44 o ALDH1, son predictores de un estadio más temprano y mejor pronóstico en adenocarcinoma (219).

Sería de interés realizar estudios más profundos que sigan la evolución de la población de CMT y que traten de establecer una jerarquía, como los realizados por Bertolini y Moro (64,166) o que consideren diferentes puntos temporales (160). También realizar estudios de las CMT teniendo en cuenta las mutaciones conductoras, así como un seguimiento temporal de estas, no solo a tiempo final.

Actualmente se ha avanzado en el estudio de las CMT en CPNM; su presencia es difícilmente rebatible, los estudios funcionales y la bibliografía dejan pocas dudas sobre su existencia; pero aún es necesario profundizar más en la caracterización y biología de esta elusiva población.

D3 Rutas de transducción de señales de CMT .

Como hemos visto en el apartado anterior hay marcadores como EpCAM y CD166 que muestran una localización intracelular que sugiere podría desencadenar la activación de una señalización celular específica según el tipo de cultivo celular.

EpCAM, una molécula de adhesión celular, que participa en la señalización, migración, proliferación y diferenciación celular. Controla varias vías de señalización como la vía dependiente de nPKC, la vía de señalización Wnt, y la vía embrionaria de Ras (Eras)/RAC- α serina/treonina-proteína quinasa (AKT) (220). Como ya se comentó en la introducción EpCAM es un receptor de superficie clave que puede translocarse al núcleo y regular la expresión del gen diana aguas abajo. EpCAM se escinde secuencialmente y libera un dominio extracelular N-terminal. (EpEX) y un dominio intracelular C-terminal de 5 kDa (EpICD). El fragmento EpICD, que es inestable en el citoplasma, es capaz de translocarse al núcleo y se acompaña de activadores transcripcionales para estimular la expresión génica y la proliferación celular.

Estas funciones que van más allá de su mera función como molécula de adhesión celular también se han observado en CPNM. Un estudio en la línea A549 mostró que la estimulación de EpCAM usando un anticuerpo monoclonal lleva a la síntesis de genes relacionados con el ciclo celular y la proliferación (196). En otro estudio, también en líneas de CPNM, la depleción de EpCAM inducía apoptosis en todas las líneas y reducía la invasibilidad de las líneas más agresivas (197). Varios de estos estudios señalaron la represión de p53 o proteínas de su ruta.

Otros resultados que podrían indicar una posible función de EpCAM en las CMT son varios ensayos de resistencia a fármacos: Las tumoresferas de A549 y H1650 mostraron una mayor resistencia a cisplatino y afatinib en la población EpCAM⁺/CD133⁺(168). El uso de paclitaxel enriqueció las esferas de A549 en la doble población EpCAM⁺/CD133⁺ pasando del 20% en esferas sin inducir a un 86,6% en las inducidas, mostrando además CIT en Xenografts (198). Aunque hay artículos que no arrojan resultados para EpCAM, como el artículo de Bertolini *et al.* 2015 mencionado en la introducción, que si tuvo en cuenta el EpCAM y en el cual la población más agresiva fue la CD133⁺/CXCR4⁺, (64); o el trabajo Zhang *et al.* donde CD166 mostró mucha mayor CIT que EpCAM, CD44 o CD133 (135).

En nuestro estudio hemos observado la expresión del fragmento EpICD en las tumoresferas de las líneas derivadas de pacientes. También se observó una correlación entre la expresión de EpICD con AKT activado. La activación de AKT mediada por EpCAM se ha descrito y podría estar involucrada en la diferenciación de las células madre embrionarias murinas a través de esta vía de señalización (221) pero el mecanismo de acción todavía no está bien elucidado.

Por otro lado, también hemos observado marcaje intracelular del marcador CD166 en varias de las tumoresferas de las líneas estudiadas, en las líneas de colecciones de cultivos A549, H1395 y H1993 y en las 5 LDPs estudiadas, 302, 303, 315, 317 y 320; siendo la 317 la única de estas últimas que presenta un marcaje nuclear menos claro. Lo que sugiere que este marcador también podría estar sometido a RIP y su fragmento intracelular esté siendo translocado al núcleo. Esto está ya descrito en otros cánceres, por ejemplo se ha visto en el carcinoma de ovario que CD166 es cortado por metaloproteasas ADAM17/TACE y además se ha relacionado la adhesión celular de CD166 con la secreción de metaloproteasas en melanoma (128).

La detección de subpoblaciones de células atendiendo a este tipo de marcadores extracelulares no aporta información sobre aquellas células con la ruta de transducción activa. Estos resultados refuerzan nuestra teoría de que en el aislamiento de las CMT es también relevante el estudio de la señalización de los marcadores para profundizar en la activación de la señalización de diferentes vías en función del contexto celular, no solo del fenotipo.

D4 Una firma molecular de 6 genes identifica a la población de CMT en la variedad adenocarcinoma.

Mediante estudios de expresión génica de muestras derivadas de tumores de pacientes con CPNM (apartado de resultados **R6**) realizados en el laboratorio de Oncología Molecular de la Fundación del Hospital General Universitario de Valencia se identificó una firma de 6 genes, *CD44*, *Notch3*, *ITGA6*, *Nanog*, *CDKN1A* y *Snail*, que permitía diferenciar las tumoresferas de las células adherentes derivadas de los mismos tumores primarios. Esta firma génica ha podido ser validada en las líneas derivadas de pacientes, pero no en las líneas A549, H1395, H1650, H1993 y PC9.

Todos los marcadores de la firma génica tienen un papel importante en el desarrollo del CPNM. Las proteínas expresadas a partir de estos genes se relacionan con características de CMT y son potenciales dianas terapéuticas, como ya se ha comentado para CD44 y Notch 3.

ITGA6 es un marcador recurrente en una treintena de células madre, entre las que las células madre de pulmón están incluidas; aunque también está presente en varias células somáticas como los queratinocitos, plaquetas, células epiteliales y células basales de la córnea (222). La integrina $\alpha 6\beta 4$ coopera con varios receptores como EGFR, ErbB2, ErbB3 o c-Met para amplificar la señalización de rutas como PI3K, AKT y las MAPK (223). La *Itga6* ha sido ya identificada como marcador de CMT en glioblastoma, cáncer de mama o de cérvix, donde se ha visto que Oct4 y Sox2 se unen a su promotor y activan su transcripción (222). En cáncer de pulmón, está descrita su mayor expresión en CPNM (224); más recientemente la integrina $\alpha 6\beta 4$ se correlacionó con las mutaciones de TP53, invasión y menor supervivencia (223).

Snail1 es un factor de transcripción perteneciente a la superfamilia de Snail. Los miembros de esta familia son represores transcripcionales. La función más estudiada de Snail es la de promover la TEM (225). Una de las características principales de la TEM es la represión de la E-cadherina; esta es mediada por Snail1 y 2, así como por miembros de la familia de Zeb, Twist (226)

Nanog es otro de los factores de transcripción asociados a las CMT, y además se ha asociado con la resistencia a terapias y la baja supervivencia (227). Nanog fue descubierto en células madre de ratón como un importante factor de transcripción implicado en el mantenimiento del estado indiferenciado (228). El mRNA de Nanog no es detectado en células diferenciadas, salvo en fibroblastos humanos, donde coexpresa con bajos niveles de Oct4 y Sox2. Nanog, Oct4 y Sox2 son responsables de mantener las células madre en un estado indiferenciado (228). Nanog forma complejos con alrededor de 20 proteínas, entre las que se incluye Oct4, la mayoría son necesarias para el mantenimiento de la pluripotencia (229). En el cáncer de pulmón se han visto sobreexpresados Nanog y NanogP8, una duplicación de este; lo cual se ha asociado con un peor pronóstico (230)

Los niveles de expresión de Nanog están positivamente relacionados con la resistencia a terapias y la baja supervivencia (227). En cáncer de mama y de cabeza y cuello el axis HA/CD44 lleva a la acumulación de Nanog en el núcleo, la producción de miR-21 y la reducción de supresores tumorales, mediado por PKC ϵ (229). En cáncer de pulmón hay una relación entre la resistencia a cisplatino y la expresión de Nanog y Oct4 (231).

CDKN1A codifica para p21. P21 pertenece, junto a p27 y p57, a la familia CIP/KIP de inhibidores de CDKs o CDKis. Su papel más conocido es el arresto del ciclo celular al ser inducida su expresión por P53 tras sufrir daño el ADN o presentarse una situación de estrés celular, aunque participa también de otros procesos importantes como la regulación de la apoptosis, diferenciación, autorenovación, senescencia, metástasis (232) o la reparación del DNA (233). P21 inhibe principalmente a los complejos CDK4/CiclinaD, CDK2/CiclinaA y CDK2/CiclinaE; es decir, las transiciones G1/S y G2/M. P21 también se une a PCNA, cofactor de la ADN polimerasa δ , inhibiendo directamente la replicación del DNA (234).

A pesar de que en condiciones fisiológicas p21 actúa como un gen supresor de tumores y protector de la célula, puede tener el rol opuesto en el contexto del cáncer. En un contexto celular alterado y carente de p53, p21 puede pasar de supresor a oncogén; esto en parte podría explicar los diferentes resultados según el tipo de cáncer y de localización celular. Por ejemplo, la sobreexpresión de p21 se ha asociado con un peor pronóstico en algunos tipos de cánceres (gliomas, próstata, cervical y esofágico), mientras que en otros es la pérdida de p21 lo que se asocia con esta característica (mama y gástrico); hay en otros cánceres como el de ovario donde están descritos ambos comportamientos (233). La localización celular también juega un papel importante, habiendo asociado la localización nuclear a sus funciones de supresor de tumores y la localización citoplasmática a las oncogénicas (233). En general la bibliografía de CPNM presenta a p21 en su papel de supresor tumoral (235–239).

Por tanto, hay que tener en cuenta que la expresión de P21 depende del contexto celular y el estado de P53. En nuestro estudio, dentro del contexto de las CMT y coexpresado con el resto de proteínas de la firma identificada parece un buen indicador de CMT en adenocarcinoma.

D4.1 Las LDP como modelo de estudio para las CMT in vitro.

Una vez identificada la firma génica, se analizó la expresión de sus proteínas mediante western blot y microscopía de fluorescencia. Los resultados indicaron una mayor expresión de las proteínas de la firma en las tumoresferas derivadas de las líneas 302, 303, 315, 320 y 343; con alguna excepción como la línea 320 donde Snail y ITGA6 están más expresadas en ADH, o Notch3 en la línea 343 cuando se analizó por microscopía de fluorescencia. En la variedad escamosa y en las líneas comerciales A549, H1395, H1650, H1993 y PC9 este patrón no se observó.

Cabe destacar que en las líneas A549, H1395, H1650, H1993 y PC9 se encontró localización nuclear de Notch 1 intracelular (NICD) en cultivos adherentes, pero no en tumoresferas (Figura **R26**). La señalización por Notch es importante para el mantenimiento de la pluripotencia, pero también está implicada en otros procesos como apoptosis o la activación de otras rutas importantes en cáncer de pulmón como las MAPK o la ruta de las PI3K. Aunque Notch 1 no es específicamente parte de la firma, si es remarcable la mayor presencia en el núcleo de las células adherentes.

Se observó expresión nuclear de Nanog en las líneas A549, H1395, H1650, H1993 y PC9 dada su función como factor de transcripción, aunque también se observó una elevada expresión citoplasmática. La expresión de Nanog en ambos compartimentos celulares es congruente con el hecho de que este marcador puede ser regulado mediante su exclusión nuclear gracias a su

secuencia de exportación nuclear NES (229). Más allá de este hecho, nuestros resultados muestran un patrón heterogéneo de la expresión de Nanog en las líneas de colecciones de cultivos. Por otro lado, los análisis de western blot mostraron que en las líneas 302, 303, 315, 317 y 320 había mayor expresión de Nanog en tumoresferas y los análisis mediante microscopía de fluorescencia mostraron expresión nuclear en la mayoría de los casos (con la excepción de la línea 317). Estos resultados sugieren que Nanog es un marcador compatible de CMT. Resultado avalado por la bibliografía, al haberse un gran número de publicaciones que han descrito a Nanog asociado a peor pronóstico y poblaciones más agresivas en CPNM (93,138,152,156,161,162,167,197,199,213,228,230,232,243–245).

Cabe destacar la diferencia entre los resultados de expresión de la firma génica entre los cultivos de tumores derivados de pacientes y los de líneas establecidas. Sólo podemos hipotetizar acerca del porqué de este resultado. Quizás el mantenimiento de las células de líneas comerciales a lo largo del tiempo cree una presión selectiva que haga que las células evolucionen y se adapten, manteniendo características de CMT e impidiéndonos diferenciar la firma génica en estas líneas.

Estos resultados sugieren que las células derivadas de tumores de pacientes sean las más adecuadas para el estudio de las CMT. Esta conclusión es desalentadora ya que una de las grandes ventajas del trabajo con líneas comerciales establecidas es la facilidad para cultivarlas. El cultivo primario a partir de tumores es más complicado técnicamente pero su fenotipo y biología es más cercano al tumor del que derivan.

D4.2 Sox2 y Oct4 están ausentes de la firma molecular.

Al contrario de Nanog, ITGA6 o CD44, Sox2 y Oct4 no se identificaron en la firma génica. Estos 2 factores de transcripción junto a Nanog son los encargados de la inducción y mantenimiento de un estado pluripotente y están regulados por los mismos mecanismos (228); presentando además un alto solapamiento en sus genes diana (229). Además Oct4 se ha encontrado asociado a CMT y a subpoblaciones de células más agresivas consistentemente en la bibliografía (93,103,118,138,157,161,164,166,167,169,172,199,212,222,227,229,231,245,246).

Estos 3 factores de transcripción pueden también formar parte de la regulación de otros marcadores de la firma génica. Se ha descrito también como Sox2 y Oct4 son capaces de interaccionar con el fragmento intracelular de CD44, translocado al núcleo, e inducir la expresión de Nanog (198). En otros cánceres, como glioblastoma, mama o cérvix, Oct4 y Sox2 se unen al promotor de ITGA6, activando su transcripción (221).

En las líneas A549, H1395, H1650, H1993 y PC9 encontramos una localización intracelular de Sox2 heterogénea, con una mayor expresión en núcleos en las células cultivadas en condiciones de adherencia. Esta distribución es llamativa al ser Sox2 un factor de transcripción que esperaríamos encontrar en el núcleo, sin embargo, en varias de las líneas la localización tiende a ser más citoplasmática. Este patrón heterogéneo con una distribución irregular entre citoplasma y núcleo podría estar indicando diferentes roles o la activación/inactivación de este en las diferentes líneas.

Cabe señalar las diferencias de expresión de Sox2 entre las líneas establecidas con las líneas 302, 303, 315, 317 y 320; en el caso de estas últimas encontramos mayor expresión en el núcleo de las tumoresferas y las células adherentes, aunque las adherentes siguen presentando marcaje nuclear más intenso en la mayoría de los casos. Al analizar su expresión mediante WB observamos en condiciones adherentes un patrón de múltiples bandas que podría indicar degradación de esta proteína. De nuevo la heterogeneidad observada en el patrón de expresión muestra que este marcador podría estar jugando un rol específico en las diferentes tumoresferas.

La localización de Oct4 fue principalmente nuclear en las líneas 302, 303, 315, 317 y 320, observándose pocas diferencias entre ADH y ESF. El marcaje de las líneas A549, H1395, H1650, H1993 y PC9 mostró una menor expresión de Oct4 con mayor expresión citoplasmática.

Aunque Sox2 y Oct4 no permiten discriminar entre ADH y ESF en nuestras condiciones experimentales, un estudio más profundo de su expresión y regulación proteica sería necesario.

D5 Estudio de los marcadores de CMT en la cohorte de pacientes con CPNM.

La enorme variabilidad encontrada entre la expresión de los marcadores de CMT entre los diferentes tumores fue una importante característica de estos (Figura **R35**). Se observa como los porcentajes de células del tumor primario que expresan cada marcador son muy diferentes a los encontrados una vez establecido el cultivo.

Un tumor primario disgregado tiene un gran número de células diferentes y en diferentes estadios; otros factores que podrían estar afectando son el diferente tamaño de los tumores, o incluso el tiempo desde que el tumor se resecó y llegó al laboratorio.

Como se mostró en la tabla **R38** del apartado de resultados nuestra población no es muy homogénea. Los residuos estandarizados y ajustados del test de chi cuadrado nos muestran un desequilibrio de género entre ADC y SCC de CPNM. En la población estudiada el ADC se presenta más en mujeres, mientras que el SCC en hombres; de hecho, no hay ninguna mujer con un tumor escamoso. Entre los hombres hay un mayor número de fumadores activos y exfumadores. Los tumores de las mujeres son más pequeños que los de los hombres, las mujeres presentan tumores de valores T1 y T2 mientras que los pacientes masculinos sí que alcanzan los valores T3 y T4. En la tabla **R39** podemos ver que hay variables que coinciden como tamaño y subtipo o edad y subtipo.

En poblaciones pequeñas como esta existe el riesgo de sesgos debidos al azar y en este caso no podemos descartar que esto vaya a condicionar los resultados. Este pequeño estudio nos sirve para ver las características de nuestra cohorte y hay algunos detalles que son importantes para analizar los resultados. El primero es que todos los pacientes con la variedad escamosa incluidos son hombres. El segundo es que los ADCs y los SCCs no están distribuidos igual, hay más ADCs de estadios 1 y 2 y más SCCs 3 y 4. Además los hombres tienden a fumar más que las mujeres, siendo todos estos resultados significativos al realizar el test la chi cuadrado.

Esto hace que el valor significativo de histología con el componente T (del TNM) sea positivo, ya que los adenocarcinomas son de estadios más tempranos y por tanto serán más pequeños; negando la utilidad de este dato en nuestra cohorte. En nuestra cohorte los pacientes de mayor edad tienden a tener la variedad ADC; KRAS se detectó en los estadios más tempranos, aunque con solo 2 positivos en toda la cohorte es otro dato a tomar con reservas.

A continuación, se comentan los resultados obtenidos del análisis con los principales marcadores de CMT estudiados en los tumores disgregados de la cohorte de pacientes y su asociación con variables clinicopatológicas:

EpCAM mostró valores de expresión menos elevados que en los estudios de líneas celulares, aunque sí que se observa una mayor expresión significativa de EpCAM entre aquellos tumores con un valor de N positivo. EpCAM ha sido usado como marcador para identificar células tumorales circulantes (122), además de formar parte en la transducción de señales en varios cánceres (103); estos hechos apoyan aún más el papel de EpCAM como posible molécula señalizadora, o al menos como marcador en células malignas, desmarcándonos de su papel tradicional como molécula de adhesión inhibidora de la invasión (117), cuando se estudia en tumores primarios.

No se encontraron diferencias entre las células de tejido sano y tumoral que expresan CD166; es remarcable la gran diferencia en la expresión de este marcador entre los tumores primarios y las células cultivadas in vitro, donde hay casos cercanos al 100% de expresión. Tanto CD34 como CD166 mostraron menor expresión en aquellos pacientes que nunca habían fumado, sugiriendo que el tabaco podría reducir la expresión de este. Algunos componentes del tabaco alteran la expresión de genes en cáncer por lo que CD166 o CD34 podrían ser una diana de alguno de estos compuestos (246). CD166 mostró mayor expresión en mujeres; aunque no hay estudios en cáncer de pulmón donde los marcadores sean estudiados por género, este resultado podría sugerir la existencia de un componente hormonal o de expresión diferencial. CD166 es un marcador también descrito en cáncer de mama y de hecho se ha descrito que su disminución sensibiliza a algunos quimioterápicos (248,249).

Tampoco se encontraron diferencias entre las células de tejido sano y tumoral que expresan CD44 en la cohorte de pacientes analizada. Su mayor expresión en pacientes fallecidos concuerda con varios metaanálisis ya mencionados que lo señalan como un indicador de peor pronóstico, sin embargo, una cohorte mayor y análisis estadísticos más específicos como las curvas de Kaplan-Meier son necesarias para evaluar este punto correctamente.

Su potencial de menor expresión en estadios T3 y T4 frente a los estadios T1 Y T2 es llamativo ya que podríamos esperar lo opuesto de un marcador de CMT y de peor pronóstico. Este punto se podría explicar de varias maneras: (i) se ha descrito el RIP para CD44, así como sus funciones de receptor y correceptor. Una intensa activación de estas funciones puede llevar a una disminución de este marcador por liberación o internalización, encontrándonos ante una mayor activación en estadios avanzados. (ii) Otra posible explicación podría ser que un tamaño mayor de tumor con una gran masa tumoral tenga un reservorio menor de CMT y esto se refleje en los porcentajes encontrados; sin embargo, aunque otros marcadores como EpCAM y CD166 también muestran una ligera disminución en T3 y T4, otros como CD90 o CD34 apenas muestran diferencias o se incrementan (datos no mostrados) por lo que incluso si fuese este fenómeno, no afectaría por igual a los diferentes marcadores. Cabe señalar que en nuestro estudio por citometría de los tumores resultantes de los xenotransplantes en las líneas 302, 303, 315, 317 y 320 mostraron que el CD44 era el marcador que más disminuyó con respecto a los datos del cultivo in vitro; otro indicio de que este marcador podría disminuir en tumores de un alto tamaño.

El porcentaje de células que expresa CD90 fue menor en el tejido sano que en el tumoral siendo estadísticamente significativa la diferencia. CD90 puede jugar un papel oncogénico importante en otros cánceres como el hepatocelular pero su papel en el cáncer de pulmón no está claro todavía (168); por otro lado CD90 puede estar también presente en tipos celulares como las células endoteliales y linfocitos que se presentarán en el microambiente tumoral (168); por lo que sería interesante profundizar en nuestros resultados.

También observamos que su expresión tiende a ser menor en aquellos casos en los que no había metástasis ganglionar, aunque sin significación esta vez. Como se ha comentado previamente, CD90 también se ha relacionado con mayor resistencia a quimioterapia (214), en vista de este resultado sería interesante comprobar si en pacientes tratados con quimioterapia la expresión de este marcador vuelve a aumentar.

Teniendo en cuenta los resultados que relacionan las variables clinicopatológicas con los marcadores (figura **R40**) donde se observó que (i) **EpCAM** está más expresado en los tumores en los que se ha descrito metástasis en ganglio; (ii) la expresión de CD90 desciende en los estadios más avanzados, cuando al menos hay metástasis en ganglios (N1+), de hecho desciende hasta niveles equivalentes a los del tejido sano; (iii) CD90 está más presente en tumores que en tejido sano; (iv) **CD166** y **CD34** aparecen más elevados en no fumadores; (v) CD166 tiene valores medios mayores en mujeres, habiendo mayor variabilidad y por lo general menor expresión en hombres y (vi) **CD44** presenta mayor expresión en pacientes fallecidos pero menor expresión en tumores de avanzado estadio, se podría concluir que sería interesante la comprobación de estos resultados en cohortes de pacientes mayores.

Conclusiones

Conclusiones.

1. Se ha puesto a punto un protocolo para el establecimiento de cultivos 3D o en baja adherencia, lo que permite el establecimiento y mantenimiento de cultivos de tumores con aplicaciones en el aislamiento y caracterización de CMT.
2. Se ha mostrado la mayor agresividad y capacidad iniciadora de tumores de los cultivos de tumores en un modelo de ratón NOD SCID.
3. Tanto las tumores con sus homólogas células adherentes expresan marcadores de CMT.
4. EpCAM presenta activación de AKT mediada por EpCAM en las LDP y hay indicios de que CD166 o CD44 podrían también presentar rutas de transducción activas en las CMT.
5. El uso de marcadores de superficie de manera individual no parece ser un buen método para el aislamiento de las CMT.
6. Una firma molecular de 6 genes, *CD44*, *Notch3*, *ITGA6*, *Nanog*, *CDKN1A* y *Snail*, podría identificar CMT del subtipo adenocarcinoma en el CPNM.
7. Las líneas establecidas a partir de tumores primarios de pacientes parecen un mejor modelo para el estudio de las CMT que las células de colecciones de cultivos establecidas.
8. Los tumores primarios de pacientes disgregados presentan una alta heterogeneidad en la expresión de los marcadores de superficie analizados por citometría.
9. En la cohorte de pacientes analizada varios marcadores de superficie se han relacionado con varias variables clínico-patológicas: CD90 se ha encontrado más expresado el tejido tumoral que en sano. EpCAM aparece más expresado en tumores en los que se ha descrito metástasis en ganglio. CD166 y CD133 aparecen más elevados en no fumadores y CD44 presenta mayor expresión en pacientes fallecidos y menor expresión en tumores de estadio avanzado.

Bibliografía

Bibliografía.

1. Deeley TJ. A brief history of cancer. *Clin Radiol*. 1983 Nov;34(6):597–608.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan;100(1):57–70.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
4. De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets*. 2012 Apr;16 Suppl 2:S17-27.
5. Liu G, Pei F, Yang F, Li L, Amin AD, Liu S, et al. Role of Autophagy and Apoptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017 Feb;18(2).
6. Bernardes de Jesus B, Blasco MA. Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends Genet*. 2013 Sep;29(9):513–20.
7. Caporarello N, Lupo G, Olivieri M, Cristaldi M, Cambria MT, Salmeri M, et al. Classical VEGF, Notch and Ang signalling in cancer angiogenesis, alternative approaches and future directions (Review). *Mol Med Rep*. 2017 Oct;16(4):4393–402.
8. Moustakas A, Heldin P. TGF β and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2014;1840(8):2621–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.004>
9. Rolfo C, Caglevic C, Santarpia M, Araujo A, Giovannetti E, Gallardo CD, et al. Immunotherapy in NSCLC: A Promising and Revolutionary Weapon. *Adv Exp Med Biol*. 2017;995:97–125.
10. Yasmin R, Siraj S, Hassan A, Khan AR, Abbasi R, Ahmad N. Epigenetic regulation of inflammatory cytokines and associated genes in human malignancies. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:201703.
11. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018 Jan;68(1):7–30.
12. McIntyre A, Ganti AK. Lung cancer-A global perspective. *J Surg Oncol*. 2017 Apr;115(5):550–4.
13. Las cifras del cáncer en España 2019 [Internet]. www.seom.org. 2019. Available from: <https://seom.org/dmccancer/wp-content/uploads/2019/Informe-SEOM-cifras-cancer-2019.pdf>
14. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, Akerley W, Bauman J, Chirieac LR, et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017 Apr;15(4):504–35.
15. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J*. 2016 Sep;48(3):889–902.
16. Konstantinou E, Fotopoulou F, Drosos A, Dimakopoulou N, Zagoriti Z, Niarchos A, et al. Tobacco-specific nitrosamines: A literature review. *Food Chem Toxicol*. 2018 Aug;118:198–203.

17. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017 Jul;28(suppl_4):iv1–21.
18. Sculier J-P. Nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir Rev*. 2013 Mar;22(127):33–6.
19. Hackner K, Errhalt P, Mueller MR, Speiser M, Marzluf BA, Schulheim A, et al. Canine scent detection for the diagnosis of lung cancer in a screening-like situation. *J Breath Res*. 2016 Sep;10(4):46003.
20. Heuvelmans MA, Vliegenthart R, de Koning HJ, Groen HJM, van Putten MJAM, Yousaf-Khan U, et al. Quantification of growth patterns of screen-detected lung cancers: The NELSON study. *Lung Cancer*. 2017 Jun;108:48–54.
21. Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med*. 2011 Aug;365(5):395–409.
22. Calvayrac O, Pradines A, Pons E, Mazieres J, Guibert N. Molecular biomarkers for lung adenocarcinoma. *Eur Respir J*. 2017 Apr;49(4).
23. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. Vol. 10, *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. United States; 2015. p. 1243–60.
24. Brierley J, Gospodarowicz M, Wittekind K, editors. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 8th edition. 8th Editio. Oxford: John Wiley & Sons, Inc; 2016. 272 p.
25. Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest*. 2017 Jan;151(1):193–203.
26. Reck M, Rabe KF. Precision Diagnosis and Treatment for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017 Aug;377(9):849–61.
27. Cobo M. Información sobre el cáncer/ Cáncer de pulmón [Internet]. <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-pulmon?showall=1>. 2017. Available from: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-pulmon?showall=1>
28. Hirsch FR, Scagliotti G V, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJJ, Wu Y-L, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet (London, England)*. 2017 Jan;389(10066):299–311.
29. Hardin C, Shum E, Singh AP, Perez-Soler R, Cheng H. Emerging treatment using tubulin inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2017 May;18(7):701–16.
30. Sabari JK, Santini F, Bergagnini I, Lai WV, Arbour KC, Drilon A. Changing the Therapeutic Landscape in Non-small Cell Lung Cancers: the Evolution of Comprehensive Molecular Profiling Improves Access to Therapy. *Curr Oncol Rep*. 2017 Apr;19(4):24.
31. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014 Jul;511(7511):543–50.

32. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004 Jul;51(1):1–28.
33. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*. 2013 Sep;501(7467):328–37.
34. Shiozawa Y, Nie B, Pienta KJ, Morgan TM, Taichman RS. Cancer stem cells and their role in metastasis. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2013;138(2):285–93. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3602306&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
35. Rasheed ZA, Kowalski J, Smith BD, Matsui W. Concise review: Emerging concepts in clinical targeting of cancer stem cells. *Stem Cells*. 2011 Jun;29(6):883–7.
36. Bao B, Ahmad A, Azmi AS, Ali S, Sarkar FH. Overview of cancer stem cells (CSCs) and mechanisms of their regulation: implications for cancer therapy. *Curr Protoc Pharmacol*. 2013 Jun;Chapter 14:Unit 14.25.
37. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3(7):730–7.
38. Wang J, Li Z, White J, Zhang L. Lung cancer stem cells and implications for future therapeutics. *Cell Biochem Biophys*. 2014 Jul;69(3):389–98.
39. Colak S, Medema JP. Cancer stem cells--important players in tumor therapy resistance. *FEBS J*. 2014 Nov;281(21):4779–91.
40. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? Vol. 13, *Nature reviews. Drug discovery*. England; 2014. p. 497–512.
41. Furth J, Kahn MC, Breedis C. The Transmission of Leukemia of Mice with a Single Cell. *Am J Cancer* [Internet]. 1937 Oct 1;31(2):276 LP – 282. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/31/2/276.abstract>
42. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994 Feb;367(6464):645–8.
43. Wang X, Huang S, Chen J-L. Understanding of leukemic stem cells and their clinical implications. *Mol Cancer*. 2017 Jan;16(1):2.
44. Wang JCY, Dick JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol*. 2005 Sep;15(9):494–501.
45. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr;100(7):3983–8.
46. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004 Nov;432(7015):396–401.
47. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007 Jan;445(7123):111–5.
48. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of

- initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007 Jan;445(7123):106–10.
49. Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*. 2008 Mar;15(3):504–14.
 50. Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep;106(38):16281–6.
 51. Stewart JM, Shaw PA, Gedye C, Bernardini MQ, Neel BG, Ailles LE. Phenotypic heterogeneity and instability of human ovarian tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Apr;108(16):6468–73.
 52. Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo J V, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. Vol. 12, *Nature reviews. Cancer*. England; 2012. p. 767–75.
 53. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*. 2008 Dec;456(7222):593–8.
 54. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976 Oct;194(4260):23–8.
 55. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012 Jan;481(7381):306–13.
 56. Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, Shapira SD, Tao K, Kuperwasser C, et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell*. 2011 Aug;146(4):633–44.
 57. Chaffer CL, Brueckmann I, Scheel C, Kaestli AJ, Wiggins PA, Rodrigues LO, et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May;108(19):7950–5.
 58. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663–76.
 59. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007 Dec;318(5858):1917–20.
 60. Antoniou A, H??brant A, Dom G, Dumont JE, Maenhaut C. Cancer stem cells, a fuzzy evolving concept: A cell population or a cell property? *Cell Cycle*. 2013;12(24):3743–8.
 61. Greve B, Kelsch R, Spaniol K, Eich HT, Götte M. Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. *Cytom Part A*. 2012;81 A(4):284–93.
 62. Duan J-J, Qiu W, Xu S-L, Wang B, Ye X-Z, Ping Y-F, et al. Strategies for isolating and enriching cancer stem cells: well begun is half done. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2013;22(16):2221–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23540661>
 63. Reynolds BA, Weiss S. Nervous System Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. *Science* (80-) [Internet]. 1992;255(5052):1707–10. Available from:

<http://science.sciencemag.org/content/255/5052/1707%5Cr>

64. Moro M, Bertolini G, Pastorino U, Roz L, Sozzi G. Combination Treatment with All-Trans Retinoic Acid Prevents Cisplatin-Induced Enrichment of CD133+ Tumor-Initiating Cells and Reveals Heterogeneity of Cancer Stem Cell Compartment in Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2015 Jul;10(7):1027–36.
65. Ren SC, Qu M, Sun YH. Investigating intratumour heterogeneity by single-cell sequencing. *Asian J Androl* [Internet]. 2013;15(6):729–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3854033/pdf/aja2013106a.pdf>
66. Schatton T, Frank NY, Frank MH. Identification and targeting of cancer stem cells. *Bioassays*. 2010;31(10):1038–49.
67. F??bi??n ??kos, Barok M, Vereb G, Sz??llosi J. Die hard: Are cancer stem cells the bruce willises of tumor biology? *Cytom Part A*. 2009;75(1):67–74.
68. Williams SA, Anderson WC, Santaguida MT, Dylla SJ. Patient-derived xenografts, the cancer stem cell paradigm, and cancer pathobiology in the 21st century. *Lab Invest* [Internet]. 2013;93(9):970–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2013.92>
69. Deonarain MP, Kousparou CA, Epenetos AA. Antibodies targeting cancer stem cells: A new paradigm in immunotherapy? *MAbs*. 2009;1(1):12–25.
70. Friedman GK, Cassady KA, Beierle EA, Markert JM, Gillespie GY. Targeting pediatric cancer stem cells with oncolytic virotherapy. *Pediatr Res* [Internet]. 2012;71(4 Pt 2):500–10. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3607376&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
71. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2014;15(3):178–96. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm3758>
72. Cevenini A, Orru S, Mancini A, Alfieri A, Buono P, Imperlini E. Molecular Signatures of the Insulin-like Growth Factor 1-mediated Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast, Lung and Gastric Cancers. *Int J Mol Sci*. 2018 Aug;19(8).
73. Liao T-T, Yang M-H. Revisiting epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: the connection between epithelial plasticity and stemness. *Mol Oncol*. 2017 Jul;11(7):792–804.
74. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Feb;20(2):69–84.
75. Larsen JE, Nathan V, Osborne JK, Farrow RK, Deb D, Sullivan JP, et al. ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer. *J Clin Invest*. 2016 Sep;126(9):3219–35.
76. Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2014;16(6):488–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24875735>
77. Prieto-Garcia E, Diaz-Garcia CV, Garcia-Ruiz I, Agullo-Ortuno MT. Epithelial-to-

- mesenchymal transition in tumor progression. *Med Oncol*. 2017 Jul;34(7):122.
78. Dalla Pozza E, Forciniti S, Palmieri M, Dando I. Secreted molecules inducing epithelial-to-mesenchymal transition in cancer development. *Semin Cell Dev Biol*. 2018 Jun;78:62–72.
 79. Greenwald I, Kovall R. Notch signaling: genetics and structure. *WormBook*. 2013 Jan;1–28.
 80. Duchartre Y, Kim Y-M, Kahn M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016 Mar;99:141–9.
 81. Lee RTH, Zhao Z, Ingham PW. Hedgehog signalling. *Development*. 2016 Feb;143(3):367–72.
 82. Kugler MC, Joyner AL, Loomis CA, Munger JS. Sonic hedgehog signaling in the lung. From development to disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015 Jan;52(1):1–13.
 83. Abe Y, Tanaka N. The Hedgehog Signaling Networks in Lung Cancer: The Mechanisms and Roles in Tumor Progression and Implications for Cancer Therapy. *Biomed Res Int*. 2016;2016:7969286.
 84. Burotto M, Chiou VL, Lee J-M, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer*. 2014 Nov;120(22):3446–56.
 85. Jiang J, Xiao K, Chen P. NOTCH signaling in lung diseases. *Exp Lung Res*. 2017 May;43(4–5):217–28.
 86. Hori K, Sen A, Artavanis-Tsakonas S. Notch signaling at a glance. *J Cell Sci*. 2013 May;126(Pt 10):2135–40.
 87. Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Sep;7(9):678–89.
 88. Li L, Tang P, Li S, Qin X, Yang H, Wu C, et al. Notch signaling pathway networks in cancer metastasis: a new target for cancer therapy. *Med Oncol*. 2017 Sep;34(10):180.
 89. Inder S, O'Rourke S, McDermott N, Manecksha R, Finn S, Lynch T, et al. The Notch-3 receptor: A molecular switch to tumorigenesis? *Cancer Treat Rev*. 2017 Nov;60:69–76.
 90. Yamamoto S, Schulze KL, Bellen HJ. Introduction to Notch signaling. *Methods Mol Biol*. 2014;1187:1–14.
 91. Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development*. 2011 Sep;138(17):3593–612.
 92. Tamagnone L, Zacchigna S, Rehman M. Taming the Notch Transcriptional Regulator for Cancer Therapy. *Molecules*. 2018 Feb;23(2).
 93. Liu Y-P, Yang C-J, Huang M-S, Yeh C-T, Wu ATH, Lee Y-C, et al. Cisplatin selects for multidrug-resistant CD133+ cells in lung adenocarcinoma by activating Notch signaling. *Cancer Res*. 2013 Jan;73(1):406–16.
 94. Liu J, Mao Z, Huang J, Xie S, Liu T, Mao Z. Blocking the NOTCH pathway can inhibit the growth of CD133-positive A549 cells and sensitize to chemotherapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Feb;444(4):670–5.

95. Rapp J, Jaromi L, Kvell K, Miskei G, Pongracz JE. WNT signaling - lung cancer is no exception. *Respir Res.* 2017 Sep;18(1):167.
96. Tortelote GG, Reis RR, de Almeida Mendes F, Abreu JG. Complexity of the Wnt/betacatenin pathway: Searching for an activation model. *Cell Signal.* 2017 Dec;40:30–43.
97. Katoh M. Canonical and non-canonical WNT signaling in cancer stem cells and their niches: Cellular heterogeneity, omics reprogramming, targeted therapy and tumor plasticity (Review). *Int J Oncol.* 2017 Nov;51(5):1357–69.
98. Stewart DJ. Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2014 Jan;106(1):djt356.
99. Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov.* 2014 Jul;13(7):513–32.
100. Karimaian A, Majidinia M, Bannazadeh Baghi H, Yousefi B. The crosstalk between Wnt/beta-catenin signaling pathway with DNA damage response and oxidative stress: Implications in cancer therapy. *DNA Repair (Amst).* 2017 Mar;51:14–9.
101. Munz M, Baeuerle PA, Gires O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res.* 2009 Jul;69(14):5627–9.
102. Carpenter G, Red Brewer M. EpCAM: another surface-to-nucleus missile. *Cancer Cell* [Internet]. 2009 Mar;15(3):165–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.02.005>
103. Imrich S, Hachmeister M, Gires O. EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh Migr.* 2012;6(1):30–8.
104. Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat Rev.* 2018 Jan;62:50–60.
105. Petrov K, Wierbowski BM, Salic A. Sending and Receiving Hedgehog Signals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2017 Oct;33:145–68.
106. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J basic Med Sci.* 2018 Feb;18(1):8–20.
107. Giroux-Leprieur E, Costantini A, Ding VW, He B. Hedgehog Signaling in Lung Cancer: From Oncogenesis to Cancer Treatment Resistance. *Int J Mol Sci.* 2018 Sep;19(9).
108. Wu F, Zhang Y, Sun B, McMahon AP, Wang Y. Hedgehog Signaling: From Basic Biology to Cancer Therapy. *Cell Chem Biol.* 2017 Mar;24(3):252–80.
109. Rovida E, Stecca B. Mitogen-activated protein kinases and Hedgehog-GLI signaling in cancer: A crosstalk providing therapeutic opportunities? *Semin Cancer Biol.* 2015 Dec;35:154–67.
110. Kim EK, Choi E-J. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch Toxicol.* 2015 Jun;89(6):867–82.
111. Martini M, De Santis MC, Braccini L, Gulluni F, Hirsch E. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med.* 2014 Sep;46(6):372–83.

112. Fumarola C, Bonelli MA, Petronini PG, Alfieri RR. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochem Pharmacol*. 2014 Aug;90(3):197–207.
113. Lien EC, Dibble CC, Toker A. PI3K signaling in cancer: beyond AKT. *Curr Opin Cell Biol*. 2017 Apr;45:62–71.
114. Perez-Ramirez C, Canadas-Garre M, Molina MA, Faus-Dader MJ, Calleja-Hernandez MA. PTEN and PI3K/AKT in non-small-cell lung cancer. *Pharmacogenomics*. 2015 Nov;16(16):1843–62.
115. Xia P, Xu X-Y. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application. *Am J Cancer Res*. 2015;5(5):1602–9.
116. Herlyn D, Herlyn M, Steplewski Z, Koprowski H. Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human melanoma and colorectal carcinoma. *Eur J Immunol*. 1979 Aug;9(8):657–9.
117. Patriarca C, Maria R, Marschner AK, Mellstedt H, Macchi RM, Marschner AK, et al. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2012 Feb;38(1):68–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.04.002>
118. Schnell U, Cirulli V, Giepmans BNG. EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2013 Aug;1828(8):1989–2001. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.018>
119. Alix-Panabières C, Pantel K, Alix-Panabieres C, Pantel K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip* [Internet]. 2014 Jan;14(1):57–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24145967> <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3LC50644D>
120. Gires O, Stoecklein NH. Dynamic EpCAM expression on circulating and disseminating tumor cells: causes and consequences. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Nov;71(22):4393–402.
121. Tas F, Karabulut S, Duranyildiz D. Clinical significance of serum epithelial cell adhesion molecule (EPCAM) levels in patients with lung cancer. *Mol Cell Biochem*. 2014 Nov;396(1–2):307–12.
122. Zhu W-F, Li J, Yu L-C, Wu Y, Tang X-P, Hu Y-M, et al. Prognostic value of EpCAM/MUC1 mRNA-positive cells in non-small cell lung cancer patients. *Tumour Biol*. 2014 Feb;35(2):1211–9.
123. Mirza S, Jain N, Rawal R. Evidence for circulating cancer stem-like cells and epithelial-mesenchymal transition phenotype in the pleurospheres derived from lung adenocarcinoma using liquid biopsy. *Tumour Biol*. 2017 Mar;39(3):1010428317695915.
124. Rud AK, Borgen E, Maelandsmo GM, Flatmark K, Le H, Josefsen D, et al. Clinical significance of disseminated tumour cells in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2013 Sep;109(5):1264–70.
125. Kim Y, Kim HS, Cui ZY, Lee H-S, Ahn JS, Park CK, et al. Clinicopathological implications of EpCAM expression in adenocarcinoma of the lung. *Anticancer Res*. 2009 May;29(5):1817–22.

126. Pak MG, Shin DH, Lee CH, Lee MK. Significance of EpCAM and TROP2 expression in non-small cell lung cancer. *World J Surg Oncol*. 2012 Apr;10:53.
127. Xi L, Coello MC, Litle VR, Raja S, Gooding WE, Yousem SA, et al. A combination of molecular markers accurately detects lymph node metastasis in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2006 Apr;12(8):2484–91.
128. Weidle UH, Eggle D, Klostermann S, Swart GWM. ALCAM/CD166: cancer-related issues. *Cancer Genomics Proteomics*. 2010;7(5):231–43.
129. Ofori-Acquah SF, King JA. Activated leukocyte cell adhesion molecule: a new paradox in cancer. *Transl Res*. 2008 Mar;151(3):122–8.
130. Tomita K, van Bokhoven A, Jansen CF, Bussemakers MJ, Schalken JA. Coordinate recruitment of E-cadherin and ALCAM to cell-cell contacts by alpha-catenin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jan;267(3):870–4.
131. Soh BS, Zheng D, Li Yeo JS, Yang HH, Ng SY, Wong LH, et al. CD166(pos) subpopulation from differentiated human ES and iPS cells support repair of acute lung injury. *Mol Ther*. 2012 Dec;20(12):2335–46.
132. Willrodt A-H, Beffinger M, Vranova M, Protsyuk D, Schuler K, Jadhav M, et al. Stromal Expression of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule Promotes Lung Tumor Growth and Metastasis. *Am J Pathol*. 2017 Nov;187(11):2558–69.
133. Xiao M, Wang X, Yan M, Chen W. A systematic evaluation for the potential translation of CD166-related expression as a cancer biomarker. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016 Sep;16(9):925–32.
134. Song Q, Xu Y, Yang C, Chen Z, Jia C, Chen J, et al. miR-483-5p promotes invasion and metastasis of lung adenocarcinoma by targeting RhoGDI1 and ALCAM. *Cancer Res*. 2014 Jun;74(11):3031–42.
135. Zhang WC, Ng SC, Yang H, Rai A, Umashankar S, Ma S, et al. Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell* [Internet]. 2012 Jan;148(1–2):259–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.050>
136. Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, Fujii M, Kondo Y, Usami N, et al. Membranous expression of activated leukocyte cell adhesion molecule contributes to poor prognosis and malignant phenotypes of non-small-cell lung cancer. *J Surg Res*. 2013 Jan;179(1):24–32.
137. Tachezy M, Zander H, Wolters-Eisfeld G, Muller J, Wicklein D, Gebauer F, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166): an “inert” cancer stem cell marker for non-small cell lung cancer? *Stem Cells*. 2014 Jun;32(6):1429–36.
138. Zhao M, Zhang Y, Zhang H, Wang S, Zhang M, Chen X, et al. Hypoxia-induced cell stemness leads to drug resistance and poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2015 Feb;87(2):98–106.
139. Su J, Wu S, Tang W, Qian H, Zhou H, Guo T. Reduced SLC27A2 induces cisplatin resistance in lung cancer stem cells by negatively regulating Bmi1-ABCG2 signaling. *Mol Carcinog*. 2016 Nov;55(11):1822–32.

140. Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2002 Nov;39(6):527–79.
141. Orian-Rousseau V. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *Eur J Cancer*. 2010 May;46(7):1271–7.
142. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jan;4(1):33–45.
143. Leung EL-H, Fiscus RR, Tung JW, Tin VP-C, Cheng LC, Sihoe AD-L, et al. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLoS One*. 2010;5(11):e14062.
144. Ruibal A, Aguiar P, Del Rio MC, Nunez MI, Pubul V, Herranz M. Cell membrane CD44v6 levels in squamous cell carcinoma of the lung: association with high cellular proliferation and high concentrations of EGFR and CD44v5. *Int J Mol Sci*. 2015 Feb;16(3):4372–8.
145. Jiang H, Zhao W, Shao W. Prognostic value of CD44 and CD44v6 expression in patients with non-small cell lung cancer: meta-analysis. *Tumour Biol*. 2014 Aug;35(8):7383–9.
146. Zhao S, He J-L, Qiu Z-X, Chen N-Y, Luo Z, Chen B-J, et al. Prognostic value of CD44 variant exon 6 expression in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(16):6761–6.
147. Luo Z, Wu R-R, Lv L, Li P, Zhang L-Y, Hao Q-L, et al. Prognostic value of CD44 expression in non-small cell lung cancer: a systematic review. *Int J Clin Exp Pathol [Internet]*. 2014;7(7):3632–46. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4128975&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
148. Shinohara S, Hanagiri T, Taira A, Takenaka M, Oka S, Chikaishi Y, et al. Immunohistochemical Expression and Serum Levels of CD44 as Prognostic Indicators in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncology*. 2016;90(6):327–38.
149. Li G, Gao Y, Cui Y, Zhang T, Cui R, Jiang Y, et al. Overexpression of CD44 is associated with the occurrence and migration of non-small cell lung cancer. *Mol Med Rep*. 2016 Oct;14(4):3159–67.
150. Liu Y, Qing H, Su X, Wang C, Li Z, Liu S. Association of CD44 Gene Polymorphism with Survival of NSCLC and Risk of Bone Metastasis. *Med Sci Monit*. 2015 Sep;21:2694–700.
151. Shmelkov S V, St Clair R, Lyden D, Rafii S. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Apr;37(4):715–9.
152. Grosse-Gehling P, Fargeas CA, Dittfeld C, Garbe Y, Alison MR, Corbeil D, et al. CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges. *J Pathol*. 2013 Feb;229(3):355–78.
153. Jang J-W, Song Y, Kim S-H, Kim J, Seo HR. Potential mechanisms of CD133 in cancer stem cells. *Life Sci*. 2017 Sep;184:25–9.
154. Su Y-J, Lin W-H, Chang Y-W, Wei K-C, Liang C-L, Chen S-C, et al. Polarized cell migration induces cancer type-specific CD133/integrin/Src/Akt/GSK3beta/beta-catenin signaling required for maintenance of cancer stem cell properties. *Oncotarget*. 2015

Nov;6(35):38029–45.

155. Chen Q-Y, Jiao D-M, Zhu Y, Hu H, Wang J, Tang X, et al. Identification of carcinogenic potential-associated molecular mechanisms in CD133(+) A549 cells based on microRNA profiles. *Tumour Biol.* 2016 Jan;37(1):521–30.
156. Zhou X, Li D, Wang X, Zhang B, Zhu H, Zhao J. Galectin-1 is overexpressed in CD133+ human lung adenocarcinoma cells and promotes their growth and invasiveness. *Oncotarget.* 2015 Feb;6(5):3111–22.
157. Murakami A, Takahashi F, Nurwidya F, Kobayashi I, Minakata K, Hashimoto M, et al. Hypoxia increases gefitinib-resistant lung cancer stem cells through the activation of insulin-like growth factor 1 receptor. *PLoS One.* 2014;9(1):e86459.
158. Lee SO, Yang X, Duan S, Tsai Y, Strojny LR, Keng P, et al. IL-6 promotes growth and epithelial-mesenchymal transition of CD133+ cells of non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2016 Feb;7(6):6626–38.
159. Sun JC, He F, Yi W, Wan MH, Li R, Wei X, et al. High expression of HIF-2alpha and its anti-radiotherapy effect in lung cancer stem cells. *Genet Mol Res.* 2015 Dec;14(4):18110–20.
160. Lundholm L, Haag P, Zong D, Juntti T, Mork B, Lewensohn R, et al. Resistance to DNA-damaging treatment in non-small cell lung cancer tumor-initiating cells involves reduced DNA-PK/ATM activation and diminished cell cycle arrest. *Cell Death Dis.* 2013;4:e478.
161. Barr MP, Gray SG, Hoffmann AC, Hilger RA, Thomale J, O'Flaherty JD, et al. Generation and characterisation of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell lines displaying a stem-like signature. *PLoS One.* 2013;8(1):e54193.
162. Schmohl JU, Vallera DA. CD133, Selectively Targeting the Root of Cancer. *Toxins (Basel).* 2016 May;8(6).
163. Andriani F, Bertolini G, Facchinetti F, Baldoli E, Moro M, Casalini P, et al. Conversion to stem-cell state in response to microenvironmental cues is regulated by balance between epithelial and mesenchymal features in lung cancer cells. *Mol Oncol.* 2016 Feb;10(2):253–71.
164. Tirino V, Camerlingo R, Bifulco K, Irollo E, Montella R, Paino F, et al. TGF-beta1 exposure induces epithelial to mesenchymal transition both in CSCs and non-CSCs of the A549 cell line, leading to an increase of migration ability in the CD133+ A549 cell fraction. *Cell Death Dis.* 2013;4:e620.
165. Zhao W, Luo Y, Li B, Zhang T. Tumorigenic lung tumorspheres exhibit stem-like features with significantly increased expression of CD133 and ABCG2. *Mol Med Rep.* 2016 Sep;14(3):2598–606.
166. Bertolini G, D'Amico L, Moro M, Landoni E, Perego P, Miceli R, et al. Microenvironment-Modulated Metastatic CD133+/CXCR4+/EpCAM- Lung Cancer-Initiating Cells Sustain Tumor Dissemination and Correlate with Poor Prognosis. *Cancer Res.* 2015 Sep;75(17):3636–49.
167. Le H, Zeng F, Xu L, Liu X, Huang Y. The role of CD133 expression in the carcinogenesis and prognosis of patients with lung cancer. *Mol Med Rep.* 2013 Nov;8(5):1511–8.

168. Alama A, Gangemi R, Ferrini S, Barisione G, Orengo AM, Truini M, et al. CD133-Positive Cells from Non-Small Cell Lung Cancer Show Distinct Sensitivity to Cisplatin and Afatinib. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015 Jun;63(3):207–14.
169. Zhao C, Setrerrahmane S, Xu H. Enrichment and characterization of cancer stem cells from a human non-small cell lung cancer cell line. *Oncol Rep*. 2015 Oct;34(4):2126–32.
170. Zhu Y-H, Sun C-Y, Shen S, Khan MIU, Zhao Y-Y, Liu Y, et al. A micellar cisplatin prodrug simultaneously eliminates both cancer cells and cancer stem cells in lung cancer. *Biomater Sci*. 2017 Jul;5(8):1612–21.
171. Kitazono S, Takiguchi Y, Ashinuma H, Saito-Kitazono M, Kitamura A, Chiba T, et al. Effect of metformin on residual cells after chemotherapy in a human lung adenocarcinoma cell line. *Int J Oncol*. 2013 Dec;43(6):1846–54.
172. Kobayashi I, Takahashi F, Nurwidya F, Nara T, Hashimoto M, Murakami A, et al. Oct4 plays a crucial role in the maintenance of gefitinib-resistant lung cancer stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Apr;473(1):125–32.
173. Kumar A, Bhanja A, Bhattacharyya J, Jaganathan BG. Multiple roles of CD90 in cancer. *Tumour Biol*. 2016 Sep;37(9):11611–22.
174. Barker TH, Hagoood JS. Getting a grip on Thy-1 signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2009 May;1793(5):921–3.
175. Rege TA, Hagoood JS. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J*. 2006 Jun;20(8):1045–54.
176. Fujino N, Kubo H, Suzuki T, Ota C, Hegab AE, He M, et al. Isolation of alveolar epithelial type II progenitor cells from adult human lungs. *Lab Invest*. 2011 Mar;91(3):363–78.
177. Chen J, Zhang L, Zhao A, Wang Y, Wu N, Xiong H, et al. [Abnormal expression of Thy-1 as a novel tumor marker in lung cancer and its prognostic significance]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2005 Jul;85(27):1921–5.
178. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*. 2014 Jun;32(6):1380–9.
179. Zeng C, Zhang Y, Park SC, Eun JR, Nguyen NT, Tschudy-Seney B, et al. CD34(+) Liver Cancer Stem Cells Were Formed by Fusion of Hepatobiliary Stem/Progenitor Cells with Hematopoietic Precursor-Derived Myeloid Intermediates. *Stem Cells Dev*. 2015 Nov;24(21):2467–78.
180. Park SC, Zeng C, Tschudy-Seney B, Nguyen NT, Eun JR, Zhang Y, et al. Clonogenically Culturing and Expanding CD34+ Liver Cancer Stem Cells in Vitro. *Stem Cells Dev*. 2015 Jul;24(13):1506–14.
181. Zhao Z, Jin J, Zhang A, Zhang L, Wang X, Sun J, et al. MicroRNA profile of tumorigenic cells during carcinogenesis of lung adenocarcinoma. *J Cell Biochem*. 2015 Mar;116(3):458–66.
182. Liang J, Wu Y-L, Chen B-J, Zhang W, Tanaka Y, Sugiyama H. The C-kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases. *Int J Biol Sci*. 2013;9(5):435–43.

183. Ashman LK, Griffith R. Therapeutic targeting of c-KIT in cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2013 Jan;22(1):103–15.
184. Matsumura Y, Umemura S, Ishii G, Tsuta K, Matsumoto S, Aokage K, et al. Expression profiling of receptor tyrosine kinases in high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung: a comparative analysis with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015 Dec;141(12):2159–70.
185. Donnenberg AD, Zimmerlin L, Landreneau RJ, Luketich JD, Donnenberg VS. KIT (CD117) Expression in a Subset of Non-Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC) Patients. *PLoS One*. 2012;7(12):1–11.
186. Donnenberg VS, Landreneau RJ, Pfeifer ME, Donnenberg AD. Flow cytometric determination of stem/progenitor content in epithelial tissues: An example from nonsmall lung cancer and normal lung. *Cytom Part A*. 2013;83 A(1):141–9.
187. Kriegsmann M, Muley T, Harms A, Tavernar L, Goldmann T, Dienemann H, et al. Differential diagnostic value of CD5 and CD117 expression in thoracic tumors: a large scale study of 1465 non-small cell lung cancer cases. *Diagn Pathol*. 2015 Dec;10:210.
188. Pirozzi G, Tirino V, Camerlingo R, La Rocca A, Martucci N, Scognamiglio G, et al. Prognostic value of cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition and circulating tumor cells in lung cancer. *Oncol Rep*. 2013 May;29(5):1763–8.
189. Moreira AL, Gonen M, Rekhtman N, Downey RJ. Progenitor stem cell marker expression by pulmonary carcinomas. *Mod Pathol*. 2010 Jun;23(6):889–95.
190. Dziadziuszko R, Le AT, Wrona A, Jassem J, Camidge DR, Varella-Garcia M, et al. An Activating KIT Mutation Induces Crizotinib Resistance in ROS1-Positive Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2016 Aug;11(8):1273–81.
191. Yan F, Shen N, Pang J, Molina JR, Yang P, Liu S. The DNA Methyltransferase DNMT1 and Tyrosine-Protein Kinase KIT Cooperatively Promote Resistance to 5-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) and Midostaurin (PKC412) in Lung Cancer Cells. *J Biol Chem*. 2015 Jul;290(30):18480–94.
192. Yan F, Shen N, Pang J, Zhao N, Deng B, Li B, et al. A regulatory circuit composed of DNA methyltransferases and receptor tyrosine kinases controls lung cancer cell aggressiveness. *Oncogene*. 2017 Dec;36(50):6919–28.
193. Bertolini G, D'Amico L, Moro M, Landoni E, Perego P, Miceli R, et al. Microenvironment-Modulated Metastatic CD133+/CXCR4+/EpCAM- Lung Cancer-Initiating Cells Sustain Tumor Dissemination and Correlate with Poor Prognosis. *Cancer Res*. 2015 Sep;75(17):3636–49.
194. Herreros-Pomares, Alejandro; Jantus Lewintre, Eloisa; Camps Herrero C. Tumorspheres as an in vitro model for cancer stem-like cell characterization in non-small cell lung cancer. Prognostic implications. *Universitat Politècnica de València*; 2020.
195. Herreros-Pomares A, de-Maya-Girones JD, Calabuig-Fariñas S, Lucas R, Martínez A, Pardo-Sánchez JM, et al. Lung tumorspheres reveal cancer stem cell-like properties and a score with prognostic impact in resected non-small-cell lung cancer. *Cell Death Dis*. 2019 Sep;10(9):660.
196. Maaser K, Borlak J. A genome-wide expression analysis identifies a network of EpCAM-

- induced cell cycle regulators. *Br J Cancer*. 2008 Nov;99(10):1635–43.
197. Hase T, Sato M, Yoshida K, Girard L, Takeyama Y, Horio M, et al. Pivotal role of epithelial cell adhesion molecule in the survival of lung cancer cells. *Cancer Sci*. 2011 Aug;102(8):1493–500.
 198. Lin S, Sun J-G, Wu J-B, Long H-X, Zhu C-H, Xiang T, et al. Aberrant microRNAs expression in CD133(+)/CD326(+) human lung adenocarcinoma initiating cells from A549. *Mol Cells*. 2012 Mar;33(3):277–83.
 199. Cho Y, Lee H-W, Kang H-G, Kim H-Y, Kim S-J, Chun K-H. Cleaved CD44 intracellular domain supports activation of stemness factors and promotes tumorigenesis of breast cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Apr;6(11):8709–21. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget%5Cnwww.impactjournals.com/oncotarget/
 200. Matzke-Ogi A, Jannasch K, Shatirishvili M, Fuchs B, Chiblak S, Morton J, et al. Inhibition of Tumor Growth and Metastasis in Pancreatic Cancer Models by Interference With CD44v6 Signaling. *Gastroenterology*. 2016 Feb;150(2):513-25.e10.
 201. Li L, Qi L, Liang Z, Song W, Liu Y, Wang Y, et al. Transforming growth factor-beta1 induces EMT by the transactivation of epidermal growth factor signaling through HA/CD44 in lung and breast cancer cells. *Int J Mol Med*. 2015 Jul;36(1):113–22.
 202. Qu H, Li R, Liu Z, Zhang J, Luo R. Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 expression in non-small cell lung cancer: a systematic review. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(11):2644–50.
 203. Wu H, Qi X, Yan G, Zhang Q, Xu C, Bian X. Is CD133 expression a prognostic biomarker of non-small-cell lung cancer? A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(6):e100168.
 204. Wang W, Chen Y, Deng J, Zhou J, Zhou Y, Wang S, et al. The prognostic value of CD133 expression in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2014 Oct;35(10):9769–75.
 205. Chen E, Zeng Z, Bai B, Zhu J, Song Z. The prognostic value of CSCs biomarker CD133 in NSCLC: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2016 Aug;7(35):56526–39.
 206. Li Y, He Y, Qiu Z, Zhou B, Shi S, Zhang K, et al. CRTC2 and PROM1 expression in non-small cell lung cancer: analysis by Western blot and immunohistochemistry. *Tumour Biol*. 2014 Dec;35(12):11719–26.
 207. Sun J, Zhu M, Shen W, Wang C, Dai J, Xu L, et al. A potentially functional polymorphism in ABCG2 predicts clinical outcome of non-small cell lung cancer in a Chinese population. *Pharmacogenomics J*. 2017 Jun;17(3):280–5.
 208. Roudi R, Madjd Z, Ebrahimi M, Samani FS, Samadikuchaksaraei A. CD44 and CD24 cannot act as cancer stem cell markers in human lung adenocarcinoma cell line A549. *Cell Mol Biol Lett*. 2014 Mar;19(1):23–36.
 209. Huang M, Zhu H, Feng J, Ni S, Huang J. High CD133 expression in the nucleus and cytoplasm predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Dis Markers*. 2015;2015:986095.
 210. Tu Z, Xie S, Xiong M, Liu Y, Yang X, Tembo KM, et al. CXCR4 is involved in CD133-induced

- EMT in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol*. 2017 Feb;50(2):505–14.
211. Es-Haghi M, Soltanian S, Dehghani H. Perspective: Cooperation of Nanog, NF-kappaBeta, and CXCR4 in a regulatory network for directed migration of cancer stem cells. *Tumour Biol*. 2016 Feb;37(2):1559–65.
 212. Yan X, Luo H, Zhou X, Zhu B, Wang Y, Bian X. Identification of CD90 as a marker for lung cancer stem cells in A549 and H446 cell lines. *Oncol Rep*. 2013 Dec;30(6):2733–40.
 213. Wang P, Gao Q, Suo Z, Munthe E, Solberg S, Ma L, et al. Identification and characterization of cells with cancer stem cell properties in human primary lung cancer cell lines. *PLoS One*. 2013;8(3):e57020.
 214. Liu D, Li W, Mo X, Liu L, Wang Y, Che G, et al. [Multiparametric flow cytometry analyzes the expressions of immunophenotype CD133, CD34, CD44 in lung cancer naive cells]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2008 Sep;39(5):827–31.
 215. Kahlert C, Gaitzsch E, Steinert G, Mogler C, Herpel E, Hoffmeister M, et al. Expression analysis of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) in colon and rectal cancer in association with prognosis and response to chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2012 Dec;19(13):4193–201.
 216. Fang L-Z, Zhang J-Q, Liu L, Fu W-P, Shu J-K, Feng J-G, et al. Silencing of Btbd7 Inhibited Epithelial-Mesenchymal Transition and Chemoresistance in CD133(+) Lung Carcinoma A549 Cells. *Oncol Res*. 2017 May;25(5):819–29.
 217. Alamgeer M, Ganju V, Szczepny A, Russell PA, Prodanovic Z, Kumar B, et al. The prognostic significance of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) and CD133 expression in early stage non-small cell lung cancer. *Thorax*. 2013 Dec;68(12):1095–104.
 218. Miyata T, Oyama T, Yoshimatsu T, Higa H, Kawano D, Sekimura A, et al. The Clinical Significance of Cancer Stem Cell Markers ALDH1A1 and CD133 in Lung Adenocarcinoma. *Anticancer Res*. 2017 May;37(5):2541–7.
 219. Park E, Park SY, Sun P-L, Jin Y, Kim JE, Jheon S, et al. Prognostic significance of stem cell-related marker expression and its correlation with histologic subtypes in lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2016 Jul;7(27):42502–12.
 220. Huang L, Yang Y, Yang F, Liu S, Zhu Z, Lei Z, et al. Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review). *Int J Mol Med*. 2018 Oct;42(4):1771–85.
 221. Sarrach S, Huang Y, Niedermeyer S, Hachmeister M, Fischer L, Gille S, et al. Spatiotemporal patterning of EpCAM is important for murine embryonic endo- and mesodermal differentiation. *Sci Rep*. 2018 Jan;8(1):1801.
 222. Krebsbach PH, Villa-Diaz LG. The Role of Integrin alpha6 (CD49f) in Stem Cells: More than a Conserved Biomarker. *Stem Cells Dev*. 2017 Aug;26(15):1090–9.
 223. Stewart RL, West D, Wang C, Weiss HL, Gal T, Durbin EB, et al. Elevated integrin alpha6beta4 expression is associated with venous invasion and decreased overall survival in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol*. 2016 Aug;54:174–83.
 224. Patriarca C, Alfano RM, Sonnenberg A, Graziani D, Cassani B, de Melker A, et al. Integrin laminin receptor profile of pulmonary squamous cell and adenocarcinomas. *Hum Pathol*. 1998 Nov;29(11):1208–15.

225. Kaufhold S, Bonavida B. Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014 Aug;33:62.
226. Diaz VM, Vinas-Castells R, Garcia de Herreros A. Regulation of the protein stability of EMT transcription factors. *Cell Adh Migr.* 2014;8(4):418–28.
227. Gong S, Li Q, Jeter CR, Fan Q, Tang DG, Liu B. Regulation of NANOG in cancer cells. *Mol Carcinog.* 2015 Sep;54(9):679–87.
228. Gawlik-Rzemieniewska N, Bednarek I. The role of NANOG transcriptional factor in the development of malignant phenotype of cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2016;17(1):1–10.
229. Wong OGW, Cheung ANY. Stem cell transcription factor NANOG in cancers--is eternal youth a curse? *Expert Opin Ther Targets.* 2016;20(4):407–17.
230. Jeter CR, Yang T, Wang J, Chao H-P, Tang DG. Concise Review: NANOG in Cancer Stem Cells and Tumor Development: An Update and Outstanding Questions. *Stem Cells.* 2015 Aug;33(8):2381–90.
231. Chiou S-H, Wang M-L, Chou Y-T, Chen C-J, Hong C-F, Hsieh W-J, et al. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer Res.* 2010 Dec;70(24):10433–44.
232. Warfel NA, El-Deiry WS. p21WAF1 and tumorigenesis: 20 years after. *Curr Opin Oncol.* 2013 Jan;25(1):52–8.
233. Georgakilas AG, Martin OA, Bonner WM. p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends Mol Med.* 2017 Apr;23(4):310–9.
234. Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst).* 2016 Jun;42:63–71.
235. Wei H-J, Nickoloff JA, Chen W-H, Liu H-Y, Lo W-C, Chang Y-T, et al. FOXF1 mediates mesenchymal stem cell fusion-induced reprogramming of lung cancer cells. *Oncotarget.* 2014 Oct;5(19):9514–29.
236. Santak G, Santak M, Forcic D. Comparison of antitumor effects of native and recombinant human interferon-alpha on non-small cell lung cancer cells. *Anticancer Res.* 2013 May;33(5):2043–6.
237. Fujitomo T, Daigo Y, Matsuda K, Ueda K, Nakamura Y. Identification of a nuclear protein, LRRC42, involved in lung carcinogenesis. *Int J Oncol.* 2014 Jul;45(1):147–56.
238. Yang X, Han M, Han H, Wang B, Li S, Zhang Z, et al. Silencing Snail suppresses tumor cell proliferation and invasion by reversing epithelial-to-mesenchymal transition and arresting G2/M phase in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol.* 2017 Apr;50(4):1251–60.
239. Xiao K, Jiang J, Wang W, Cao S, Zhu L, Zeng H, et al. Sirt3 is a tumor suppressor in lung adenocarcinoma cells. *Oncol Rep.* 2013 Sep;30(3):1323–8.
240. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets.* 2013 Nov;13(9):963–72.

241. Kreis N-N, Louwen F, Yuan J. Less understood issues: p21(Cip1) in mitosis and its therapeutic potential. *Oncogene*. 2015 Apr;34(14):1758–67.
242. Cheng X, Xia W, Yang J-Y, Hsu JL, Chou C-K, Sun H-L, et al. Activation of p21(CIP1/WAF1) in mammary epithelium accelerates mammary tumorigenesis and promotes lung metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Dec;403(1):103–7.
243. Lee S, Wottrich S, Bonavida B. Crosstalks between Raf-kinase inhibitor protein and cancer stem cell transcription factors (Oct4, KLF4, Sox2, Nanog). *Tumour Biol*. 2017 Apr;39(4):1010428317692253.
244. Hasmim M, Noman MZ, Lauriol J, Benlalam H, Mallavialle A, Rosselli F, et al. Hypoxia-dependent inhibition of tumor cell susceptibility to CTL-mediated lysis involves NANOG induction in target cells. *J Immunol*. 2011 Oct;187(8):4031–9.
245. Yang F, Li Y, Liu B, You J, Zhou Q. Cancer stem cell-like population is preferentially suppressed by EGFR-TKIs in EGFR-mutated PC-9 tumor models. *Exp Cell Res*. 2018 Jan;362(1):195–202.
246. Roy S, Lu K, Nayak MK, Bhuniya A, Ghosh T, Kundu S, et al. Activation of D2 Dopamine Receptors in CD133+ve Cancer Stem Cells in Non-small Cell Lung Carcinoma Inhibits Proliferation, Clonogenic Ability, and Invasiveness of These Cells. *J Biol Chem*. 2017 Jan;292(2):435–45.
247. Bak Y, Jang H-J, Seo J-H, No S-H, Chae J-I, Hong J, et al. Benzo[a]pyrene Alters the Expression of Genes in A549 Lung Cancer Cells and Cancer Stem Cells. *J Microbiol Biotechnol*. 2018 Mar;28(3):425–31.
248. Chen M-J, Cheng Y-M, Chen C-C, Chen Y-C, Shen C-J. MiR-148a and miR-152 reduce tamoxifen resistance in ER+ breast cancer via downregulating ALCAM. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Feb;483(2):840–6.
249. Piao D, Jiang T, Liu G, Wang B, Xu J, Zhu A. Clinical implications of activated leukocyte cell adhesion molecule expression in breast cancer. *Mol Biol Rep*. 2012 Jan;39(1):661–8.

