



Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Bioquímica

**Estudio de la resistencia a quimioterapia en
células con características de *cancer stem cells*
(CSC) derivadas de cáncer no microcítico de
pulmón (CNMP)**

TESIS DOCTORAL

BLANCA DÍES LÓPEZ-AYLLÓN

Madrid, 2013

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Estudio de la resistencia a quimioterapia en células con características de *cancer stem cells* (CSC) derivadas de cáncer no microcítico de pulmón (CNMP)

Memoria que presenta

Blanca Díes López-Ayllón

Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor por la
Universidad Autónoma de Madrid

Directores de la tesis:

Dra. Rosario Perona Abellón

Profesor de Investigación

Dr. Leandro Sastre Garzón

Investigador Científico

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”

CSIC-UAM



Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"

Por la presente, **Rosario Perona Abellón**, Profesor de Investigación del CSIC, y **Leandro Sastre Garzón**, Investigador Científico del CSIC, ambos adscritos al Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid "Alberto Sols", certifican que:

Dña. Blanca Díez López-Ayllón, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección su Tesis Doctoral titulada:

"Estudio de la resistencia a quimioterapia en células con características de *cancer stem cells (CSC)* derivadas de cáncer no microcítico de pulmón (CNMP)" en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid "Alberto Sols".

Consideramos que la presente Tesis Doctoral reúne a nuestro juicio las condiciones de originalidad y rigor necesarios y, por lo tanto, se encuentra en condiciones de ser presentada y defendida públicamente para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a todos los efectos, firmamos la presente autorización para la defensa de esta Tesis en Madrid a 8 de Enero de 2013.

Dra. Rosario Perona Abellón

Director de la Tesis

Profesor de Investigación

CSIC

Dr. Leandro Sastre Garzón

Director de la Tesis

Investigador Científico

CSIC

A mis dos familias

*“No nos atrevemos a hacer muchas cosas porque son
difíciles, pero son difíciles porque no nos atrevemos a
hacerlas”*

(Séneca)

AGRADECIMIENTOS

Ahora que me encuentro en la recta final de mi tesis doctoral, no puedo evitar mirar atrás y acordarme de todos los que han hecho posible que haya llegado hasta aquí. Y más aun teniendo en cuenta que cuando terminé la carrera, si algo tenía claro, es que NO quería hacer tesis...y aquí estoy, casi 6 años después, terminando de escribirla.

En primer lugar, quiero darles las gracias a mis directores de tesis: la Dra. Rosario Perona y el Dr. Leandro Sastre. Gracias a los dos por darme la oportunidad de trabajar con vosotros, y por ser mis "padres" científicos. Gracias por enseñarme a trabajar en ciencia, y hacerme ver que todo resultado puede ser positivo. Gracias Rosario por tu cercanía y tu comprensión, y por la confianza que siempre depositas en la gente que trabaja contigo. Gracias Leandro por estar siempre ahí y por ser tan humilde. Nunca te he visto decirle que no a nadie que te haya pedido ayuda, ya sea estudiante, predoctoral o jefe de laboratorio, y eso dice mucho de ti como persona.

Gracias también a mis compis del 2.13. A María, con la que coincidí en la facultad de biología, y por cosas del destino acabamos siendo compañeras de laboratorio. Me llevo tu gran sentido del humor y tu gran implicación en todo lo que haces. Siempre estás dispuesta a ayudar a quién te lo pide, en eso te pareces a tu jefe. A Javi, siempre capaz de sacarte una sonrisa de la cara, y con una vocación enorme para la ciencia. Te espera uno de los experimentos más importantes de tu vida.....serás un papá muy grande!! Y a Laura I, mi vecina de Paracuellos. Cuando llegaste me pareciste una persona muy tímida....pero nada más lejos de la realidad. Me quedo con tu buen carácter y las ganas que pones en hacer las cosas. No puedo olvidarme de aquellos que pasaron por el labo y ya no están.....Rebeca, te deseo mucha suerte en tu nuevo proyecto!! y las estudiantes Irene, Maite y Estela. Muchas gracias a todos!

Gracias también a todos los que han formado parte del laboratorio 1.11! Gracias a Isabel, Carmen y Olga. A Olatz, por los ratos de risas. A Jaime, por enseñarnos a tomarnos la vida de otra manera. A Vane, que ha compartido conmigo tantos paseos a La Paz en busca de muestras de pacientes. A la reciente Dra. María Cortes, por su buen carácter. A Vero, porque gracias a su "teoría de la amistad" he conseguido los resultados más bonitos de mi tesis. Admiro tus ganas de aprender y probar cosas nuevas, gracias por tus buenos consejos y tus ideas. A Inma, por su cercanía y su paciencia. Gracias por estar siempre dispuesta a ayudar, sin una mala cara ni un mal gesto. Transmites serenidad en todo lo que haces. Y también aquellas personas que pasaron por el labo y ya no están...Ascen, Ale y Andrea. Os deseo todo lo mejor!!

Y por supuesto, gracias a Laura P y a Cris...todo empezó con un café en la cafetería de medicina...y a partir de ahí, muchos más cafés, cenas, cervezas y casas por inaugurar. Gracias Laura por tu alegría, porque siempre transmites optimismo, y por ese punto de picardía que te hace ser única, no cambies nunca!! Gracias Cris por ser incansable, por estar siempre dispuesta a hacer todo y a ayudar a todos. Siempre te decimos que cuando no estás somos como hormigas sin antenas...y es verdad, eres más que un técnico, eres el motor que hace funcionar el labo! Gracias a las dos por creer en mí dentro y fuera del laboratorio (sois de las pocas personas que me han

visto bailar en un escenario.....jjiji), y por saber darme esa palabra de ánimo cuando la he necesitado.

Además del laboratorio, es mucha la gente que trabaja en este centro y que hacen de él una gran familia. Es rara la persona que no conoces de vista por los pasillos, que te la has encontrado revelando, calentando en el microondas de la sala de personal....Sin duda dónde más tiempo he pasado a lo largo de esta tesis ha sido en cultivos. Gracias a Maria V, Jose, Sole, Merche, Carmen.....y a todos los que estuvisteis conmigo codo con codo en la campana con las células. También a Fernando, Geni y Cristina Crespo del animalario, dónde también he pasado mucho tiempo con mis ratonas. A Guti, Alex, y todos los de informática. A Javi y Antonio de imagen. A Carlos y Diego de la entrada....Y ahora que paso tanto tiempo en la biblio, gracias a Ana S por tu compañía. A parte de muchos experimentos compartidos en la campana de cultivos, también se agradece tener a alguien codo con codo aquí abajo, en la cueva. Además, para envidia de muchos.....somos la primera generación de doctorandos que escribe la tesis sin escuchar el teclado de Fernando por las mañanas...jejejeje. Y por último, gracias a la Dra. Ángela Martínez Valverde, ya que gracias a ella metí la cabeza en este centro y tuve la oportunidad de aprender a cacharrear en un laboratorio.

Tampoco me olvido de mis compañeros del doctorado. De Antonio, Mario, Ale, Daniela, Rafa...Gracias por compartir conmigo las clases, los trabajos y las ganas de aprender a hacer ciencia.

A mis amigas de la facultad de biología de la UAM. A Raquel y Laura, compañeras de trabajos, prácticas, charlas y cervezas en la cafetería. Aunque estéis lejos, sabéis que siempre estaremos cerca. A Carmen, por enseñarme que la vida tiene otra perspectiva, y que lo que no te mata te hace más fuerte. Jamás pensé que aquel encuentro fortuito en el metro iba a ser el principio de una gran amistad. Desde entonces has sido un gran apoyo dentro y fuera de la ciencia. Gracias también a tu hermano, Salva, por ser una gran persona y por tener un corazón tan grande. Tenías razón cuando me dijiste que esta tesis me la merecía yo, nadie más. Es ahora cuando me doy cuenta de que era a mi misma a quién tenía que convencer de que mi trabajo valía la pena.

A Vicente, mi fisio particular, que tantos dolores de cuello y espalda me ha quitado. Gracias por esas cervezas y ese apoyo incondicional a lo que yo consideraba una batalla perdida.

A mi familia, por su cariño y su apoyo, cada uno a su manera. Gracias mamá por creer en mi siempre. Y gracias a mis dos abuelas por ser un ejemplo a seguir.

Y a mi "otra" familia, que me acogió como una más desde el primer día. En especial a "El Corral". Gracias por estar ahí y por apoyarme siempre, en los buenos y malos momentos. Gracias por quererme y por aceptarme tal como soy.

Y por supuesto te lo agradezco a ti, Nacho, porque has sido mi compañero en todas las facetas de mi vida desde aquel último curso de biología. Hace más de 7 años que empezamos esta aventura juntos, y han sido muchos los buenos momentos, pero también los malos, y ahí has estado tú siempre. Gracias por ser cómo eres y por tu forma de ver la vida. Y por sacar lo mejor de mí cuando más lo he necesitado. Esta tesis, por supuesto que también es para ti...TE QUIERO.

Muchas gracias a todos por confiar en mí más de lo que yo confío en mi misma, sin vosotros jamás habría escrito esta tesis.

“Reconoce y valora a los que están a tu lado, ellos son en gran medida responsables de tus éxitos”

GRACIAS!!

RESUMEN

El cáncer de pulmón es uno de los cánceres con mayor mortalidad, y en concreto el cáncer no microcítico de pulmón (CNMP) comprende más del 80% de los casos. Actualmente, los compuestos más utilizados en quimioterapia para este tipo de cáncer, son los compuestos derivados del platino, entre ellos el Cisplatino o CDDP. Sin embargo, la adquisición de resistencia a estos compuestos limita en gran medida la eficacia de los tratamientos, ya que en muchos casos no consiguen eliminar definitivamente el tumor y un porcentaje bastante alto de pacientes acaban desarrollando recidivas. Recientemente, la teoría de las células iniciadoras tumorales o *cancer stem cells* (CSC) nos ha permitido tomar una nueva perspectiva en el tratamiento contra el cáncer. Según esta teoría, la formación de un tumor se llevaría a cabo por la proliferación y diferenciación de una pequeña población de células “madre”, que serían resistentes a los tratamientos utilizados actualmente en clínica, y, por tanto, responsables de las recidivas. En este trabajo hemos generado células resistentes a CDDP y hemos aislado células CSC a partir de líneas celulares de CNMP, para estudiar la relación existente entre ambas poblaciones celulares. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con una única dosis de CDDP genera células con una resistencia estable al fármaco. Por otro lado, células cultivadas en un medio selectivo y en condiciones de baja adherencia, presentan comportamientos de células iniciadoras tumorales o CSC. Además, estas células son más resistentes a CDDP y poseen un fenotipo más invasivo que las células de partida. Tanto las células CSC como las células resistentes presentan cambios de expresión de genes relacionados con invasión celular y angiogénesis, mientras que la expresión de determinados marcadores descritos previamente para las células CSC, parece estar más relacionada con la adquisición de resistencia a CDDP. Los ensayos *in vivo* demuestran que existe una relación entre la proporción de células CSC, la agresividad del tumor, y el aumento de la capacidad metastásica de las células tumorales. De hecho, los datos sugieren que las células CSC no son más tumorogénicas, sino que aumentan la tumorogenicidad de otras células cuando están en la proporción adecuada. Sin embargo, las células resistentes parecen tener mayor afinidad por metastatizar en hueso. Nuestros resultados concuerdan con otros estudios realizados con células CSC de CNMP aisladas por otros métodos, y sugieren que la adquisición de resistencia y el fenotipo CSC son cualidades independientes pero que están relacionadas entre sí dentro del proceso de invasión celular y metástasis. Posteriormente se ha estudiado la resistencia a CDDP y Erlotinib (Tarceva®) de células aisladas a partir de muestras quirúrgicas de pacientes con CNMP. Los resultados obtenidos indican una posible correlación entre la sensibilidad a CDDP y la presencia de células CSC, y también han permitido identificar varios posibles marcadores de resistencia a Erlotinib.

ABSTRACT

Lung cancer is one of the cancer types that produces more mortality over the World, and, in particular, non-small cell lung cancer (NSCLC) covers more than 80% of these cases. Nowadays, the compounds more frequently used for treatment of this tumor are those derived from platinum, such as cisplatin (CDDP). However, cisplatin-acquired resistance limits greatly the efficiency of this treatment, because the tumor is not completely eliminated and many patients regenerate the tumor and develop metastasis. Recently, the cancer stem cells (CSC) theory has offered a new perspective in cancer therapy. According to this theory, tumor formation takes place because of the proliferation and differentiation of a small “stem” cells population, which are therapy resistant, and so, responsible for cancer recurrence. Our objective was to generate CDDP-resistant cells and CSC from NSCLC to study the relationship between both cell populations. Our results show that only one dose of CDDP can generate cells with stable-resistance to drug, and that cells cultured in non-adherent conditions with a selective media, have CSC behavior and are also more resistant to CDDP. Besides, these cells have more invasive and metastatic phenotype. Furthermore, both CSC and resistant cells presented gene expression changes related to cellular invasion and angiogenesis, whereas the expression of some CSC markers described previously, seems to be more connected to acquired-resistance. *In vivo* assays demonstrated the existence of a relationship between CSC proportion, tumor aggressiveness and metastatic capacity of tumor cells. In fact, our data show that CSC are not more tumorigenic, but they increase the tumorigenicity of other cells when they are present in a suitable proportion. However, resistant cells seem to have more affinity for bone metastasis. Our results are in agreement with studies of CSC from NSCLC isolated by different methods, and suggest that resistance acquisition and CSC phenotype are independent properties but they are connected and related to cellular invasion and metastasis. We have also studied the resistance of cells isolated from CNMP patients to CDDP and Erlotinib (Tarceva®). The results obtained indicate a possible relationship between CDDP resistance and the presence of CSC, and also allowed the identification of several possible markers of resistance to Erlotinib.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	23
INTRODUCCIÓN.....	27
1.- El Cáncer	29
2.- Cáncer de pulmón	30
2.1.- Anatomía Patológica del cáncer de pulmón.....	31
2.2.- Biología molecular del cáncer de pulmón.....	32
2.2.1.- Mutaciones en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).....	33
2.3.- Tratamiento del cáncer no microcítico de pulmón (CNMP).....	34
3.- Mecanismos de resistencia al tratamiento con cisplatino (CDDP)	36
3.1.- Estudio <i>in vitro</i> de la resistencia adquirida a CDDP.....	37
4.- Progresión tumoral, angiogénesis y metástasis	37
5.- Las Células Iniciadoras Tumorales o <i>Cancer Stem Cells</i> (CSC).....	39
5.1.- Las células iniciadoras tumorales (CSC) en cáncer de pulmón	42
5.2.- Las células iniciadoras tumorales (CSC) y la resistencia a los tratamientos contra el cáncer ...	44
5.3.- Crecimiento <i>in vitro</i> de las células iniciadoras tumorales (CSC)	45
OBJETIVOS.....	47
MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
1.- Líneas celulares	53
1.1.- Cultivo y conservación	53
1.2.- Tratamiento con CDDP.....	54
1.3.- Ensayos de viabilidad celular.....	55
1.3.1.- Técnica de cristal violeta.....	55
1.3.2.- CellTiter 96®Aqueous one solution cell proliferation assay (MTS) (Promega)	55
1.4.- Ensayo de crecimiento en agar blando (<i>soft-agar</i>)	56
1.5.- Ensayo de capacidad clonogénica.....	56
1.6.- Crecimiento en medio condicionado procedente de H460 CSC	56
1.7.- Ensayo de invasión celular.....	57
1.8.- Extracción de ADN.....	57
2.- Análisis de la expresión génica en las líneas celulares	58
2.1.- Extracción de ARN total.....	58
2.2.- Estudio de los perfiles de expresión génica mediante el uso de microarrays	58

2.3.- Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)	59
2.3.1.- Ensayo con sondas TaqMan® (Applied Biosystems).....	60
2.3.2.- Ensayo con oligonucleótidos (Sigma).....	60
3.- Análisis de la expresión de proteínas mediante Western Blot	61
3.1.- Extracción de proteínas totales	61
3.2.- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (Western Blot)	62
4.- Transfección estable de líneas celulares.....	63
5.- Infección de líneas celulares con vectores lentivirales	64
6.- Ratones.....	64
6.1.- Ensayo de tumorigénesis.....	65
6.2.- Ensayo de competencia celular	65
6.3.- Ensayo de angiogénesis	65
6.3.1.- Inmunofluorescencia.....	66
6.4.- Ensayo de metástasis.....	66
6.4.1.- Necropsia y análisis histopatológico.....	66
6.4.2.- Análisis histológico del hueso.....	67
7.- Muestras de pacientes con CNMP	67
7.1.- Procesamiento de muestras quirúrgicas	68
7.1.1.- Ensayo de viabilidad celular	68
7.1.2.- Aislamiento de células CSC.....	68
7.2.- Análisis de la expresión génica en muestras de pacientes con CNMP	68
7.2.1.- Extracción de ARN total.....	68
7.2.2.- Estudio de los perfiles de expresión génica mediante el uso de microarrays.	68
7.2.3.- Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)	69
7.3.- Estudio de las mutaciones del receptor de EGF (EGFR).....	69
7.3.1.- Extracción de ADN.....	69
7.3.2.- PCR semicuantitativa.....	69
7.3.3.- Discriminación alélica	70
7.4.- Consideraciones éticas	71
8.- Análisis estadístico	71
RESULTADOS.....	73
1.- GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES RESISTENTES A CISPLATINO A PARTIR DE LÍNEAS CELULARES DE CNMP	75
2.- CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS CON FENOTIPO DE <i>CANCER STEM CELLS</i> (CSC) AISLADAS A PARTIR DE LÍNEAS CELULARES DE CNMP	77

2.1.- Cultivo de células en condiciones no adherentes.....	77
2.2.- Caracterización <i>in vitro</i> de las células con fenotipo CSC.....	79
2.3.- Análisis de la expresión de marcadores de resistencia y de fenotipo CSC.....	82
2.4.- Estudio de la tumorigenicidad celular y la capacidad metastásica.....	88
3.- ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A QUIMIOTERAPIA EN PACIENTES CON CNMP ...	95
3.1.- Estudio de la viabilidad celular en biopsias de pacientes con CNMP en respuesta a CDDP. ...	95
3.2.- Estudio de la respuesta a otro agente antitumoral: Erlotinib (Tarceva ®).....	96
3.2.1.- Estudio de mutaciones del receptor de EGF (EGFR)	¡Error! Marcador no definido.
DISCUSIÓN.....	103
1.- GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES RESISTENTES A CISPLATINO A PARTIR DE LÍNEAS CELULARES DE CNMP	105
2.- CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS CON FENOTIPO DE <i>CANCER STEM CELLS</i> (CSC) AISLADAS A PARTIR DE LÍNEAS CELULARES DE CNMP	107
2.1.- Tumorigenicidad celular y capacidad metastásica de las líneas celulares R0.5µg y CSC.....	112
3.- ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A QUIMIOTERAPIA EN PACIENTES CON CNMP .	114
3.1.- Estudio de la viabilidad celular en biopsias de pacientes con CNMP en respuesta a CDDP. .	114
3.2.- Estudio de la respuesta a otro agente antitumoral: Erlotinib (Tarceva ®).....	115
CONCLUSIONES.....	119
BIBLIOGRAFÍA.....	123
ANEXO I: Curriculum Vitae.....	139
ANEXO II: Publicaciones.....	147

ABREVIATURAS

- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario
- **ARN:** Ácido ribonucleico
- **ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- **ATCC:** *American Type Culture Collection*
- **ATP:** Adenosin trifosfato
- **BSA:** *Bovine Serum Albumin* (albúmina sérica bovina)
- **CDDP:** cis-Platino
- **CMP:** Cáncer Microcítico de Pulmón
- **CNMP:** Cáncer No Microcítico de Pulmón
- **CSC:** *Cancer Stem Cells* (células iniciadoras tumorales)
- **DAPI:** 4,6-Diamino-2-fenil-indol
- **D.E.:** Desviación Estándar
- **DMEM:** Medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbecco
- **DMEM/F-12:** Medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbecco mezclado con nutriente F-12 de Ham
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido
- **ECL:** *Enhanced Chemoluminescence*
- **EDTA:** Ácido etilendiaminotetracético
- **EGF:** *Epidermal Growth Factor* (factor de crecimiento epidérmico)
- **EGFR:** *Epidermal Growth Factor Receptor* (receptor del factor de crecimiento epidérmico)
- **FBS:** *Fetal Bovine Serum* (suero fetal bovino)
- **FDR:** *False Discovery Rate* (tasa de falsos positivos)
- **FGF-b:** *basic Fibroblastic Growth Factor* (factor de crecimiento fibroblástico básico)
- **GAPDH:** gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- **GFP:** *Green Fluorescent Protein* (Proteína verde fluorescente)
- **H&E:** Hematoxilina y Eosina
- **HEK:** Fibroblastos embrionarios de riñón humano
- **Hepes:** Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfónico
- **IC50:** Concentración a la que se produce la mitad de la máxima inhibición
- **KD:** Kilo Dalton
- **MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógenos
- **MKP1:** Fosfatasa de MAPK Tipo I
- **MUT:** Mutado

- **NF- κ B**: Factor Nuclear- κ B
- **NSCLC**: *Non-Small Cell Lung Cancer* (CNMP)
- **OCT**: *Optimal Cutting Temperature*
- **OMS**: Organización Mundial de la Salud
- **PBS**: Tampón fosfato salino
- **PCR**: *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la ADN polimerasa)
- **PI3K**: Fosfoinosítidol-3 quinasa
- **PK**: Proteínasa K
- **qRT-PCR**: Reacción en cadena de la ADN polimerasa cuantitativa a tiempo real
- **rpm**: Revoluciones por minuto
- **RPMI**: *Roswell Park Memorial Institute*
- **RT-PCR**: Transcripción Reversa – Reacción en cadena de la ADN polimerasa
- **RQ**: *Relative Quantity* (cantidad relativa, “cambio en veces de expresión génica”)
- **SDS**: Dodecil sulfato de sodio
- **TEM**: Transición Epitelio-Mesénquima
- **TKIs**: *Tyrosine Kinase Inhibitors* (inhibidores de la actividad tirosina quinasa)
- **TNM**: Tumor-Nódulo-Metástasis
- **T-TBS**: Solución Tris-salino con Tween-20
- **WB**: Western Blot
- **WT**: *Wild Type*
- **ZO-1**: *Zonula Occludens protein 1*

INTRODUCCIÓN

1.- El Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en los países desarrollados. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 7,6 millones de personas murieron en el año 2008 a causa de tumores malignos (aproximadamente un 13%), y se prevé que en el año 2030 esta cifra supere los 13 millones. En España, datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), reflejan que en 2010 el cáncer supuso la segunda causa de muerte por debajo de los 80 años de edad (28,1%), siguiendo muy de cerca a las enfermedades cardiovasculares (31,2%) (**Figura 1**).

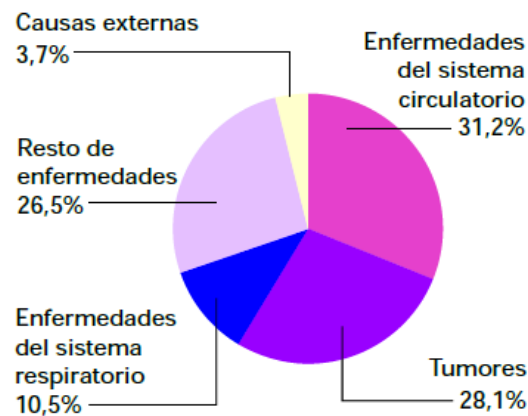


Figura 1. Distribución de las causas de muerte en la población española en el año 2010. Datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) según la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE).

Estos datos ponen de manifiesto la importancia que adquiere el desarrollo de nuevas herramientas y metodologías fiables de detección temprana del cáncer. La investigación de nuevas dianas terapéuticas, así como de los mecanismos moleculares de aparición y progresión tumoral son, también, fundamentales en la lucha contra el cáncer.

Desde el punto de vista molecular, el cáncer se inicia debido a la acumulación de alteraciones en genes esenciales en el control de la proliferación y muerte celular. En el año 2000, Hanahan y Weinberg postularon que la gran mayoría de los tipos de cáncer en humanos compartían un pequeño número de alteraciones moleculares, bioquímicas y celulares (Hanahan and Weinberg, 2000). Así, estos autores sugirieron que el fenotipo de una célula cancerígena se manifestaba por seis alteraciones esenciales en la fisiología celular, que conjuntamente podían dar lugar a un crecimiento maligno: capacidad de proliferar de una manera independiente de señales mitogénicas, insensibilidad a la señalización antiproliferativa, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, capacidad de generar nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), y por último, invasión de tejidos circundantes y capacidad de

diseminación y metástasis. Más recientemente, y gracias a los avances en la investigación del cáncer de la última década, estos autores han propuesto dos nuevas alteraciones esenciales para el desarrollo de un tumor: la capacidad de modificar o reprogramar el metabolismo celular con el fin de sustentar de una manera más eficaz la proliferación neoplásica, y la capacidad de las células tumorales de evadir al sistema inmune (Hanahan and Weinberg, 2011). La naturaleza de estas alteraciones puede ser diversa, tratándose, entre otras, de mutaciones puntuales, cambios epigenéticos, amplificaciones, deleciones cromosómicas, translocaciones, pérdida de heterocigosidad y alteraciones en la regulación transcripcional y en los niveles de expresión génica. Además, estas alteraciones pueden traducirse a nivel funcional en la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores tumorales que son esenciales para el control de la proliferación celular (Santarius et al., 2010; Sidransky, 2002).

Debido a la gran heterogeneidad que existe entre los distintos tipos tumorales, resulta complicado establecer una clasificación que permita englobar las características patológicas y clínicas del tumor, a fin de facilitar el establecimiento del tratamiento y el seguimiento más adecuado de los pacientes. A modo de consenso, una de las clasificaciones más utilizadas, y que es indicativa del estadio tumoral, es la denominada **TNM**, donde **T** hace referencia al tamaño del tumor primario, **N** a la aparición de células cancerosas en los nódulos linfáticos regionales, y **M** a la presencia de diseminación metastásica (Gospodarowicz et al., 2004).

2.- Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es uno de los cánceres con mayor incidencia en el ser humano a nivel mundial. En 2008, la OMS registraba este tipo de cáncer como la primera causa de muerte por cáncer en hombres (22,3%) y la segunda en mujeres después del cáncer de mama (11,3%). En concreto en mujeres, la mortalidad por cáncer de pulmón ha experimentado un incremento significativo en los últimos años, con un crecimiento anual del 4,1% (Cabanes et al., 2009). De hecho, ha pasado a ocupar el primer puesto en mortalidad por cáncer, por delante incluso del cáncer de mama (Jemal et al., 2010). Estos datos son un reflejo del aumento en el consumo de tabaco por parte de este colectivo.

El cáncer de pulmón es un tumor maligno que se origina a partir de un crecimiento agresivo y desordenado de células procedentes de estructuras broncopulmonares. Inicialmente, el tumor suele ser asintomático y, a medida que aumenta de volumen, tiende a invadir otras estructuras del pulmón o de la vecindad como la pleura, los músculos, los ganglios y el corazón. Es, por tanto, un tumor localmente muy agresivo, que puede producir a menudo metástasis a distancia. Es frecuente, en este tipo de cáncer, que estas metástasis se produzcan en huesos,

cerebro e hígado, y más localmente en otros lóbulos de los propios pulmones (Chiang and Massague, 2008), aunque la metástasis puede aparecer en cualquier otro órgano.

2.1.- Anatomía Patológica del cáncer de pulmón

La última clasificación histológica del cáncer de pulmón divide a este tipo de cáncer principalmente en dos grandes grupos, según la morfología que presentan las células tumorales:

1) Carcinomas de células pequeñas o microcíticos (CMP): formados por células pequeñas que presentan abundante necrosis y una alta tasa mitótica. Estos tumores representan alrededor del 15-20% de todos los tumores de pulmón (Hanahan and Weinberg, 2011), y suelen tener una localización peribronquial y un alto porcentaje de metástasis cuando son diagnosticados. Presentan, además, una evolución clínica muy agresiva. De hecho, cuando la enfermedad no se trata los pacientes fallecen en 2-3 meses y es rara la supervivencia mayor de 1 año. Por esta razón, los tumores de este tipo no suelen ser operables, y sólo se llevan a cabo tratamientos con quimioterapia y/o radioterapia (Collins et al., 2007; Crino et al., 2007; Travis, 2002).

2) Carcinomas de células no pequeñas o no microcíticos (CNMP): compuestos por células de mayor tamaño. Representan el 80-85% de todos los tumores de pulmón, y suelen tratarse con cirugía en estadios tempranos. Estos tumores se dividen en tres grupos (Travis, 2002; Zochbauer-Muller et al., 2002):

- *Carcinoma escamoso o epidermoide*: representan aproximadamente el 20-30% de todos los tumores de pulmón, y se originan a partir del epitelio bronquial.
- *Adenocarcinoma*: engloban un 30-40%, y son muy heterogéneos desde el punto de vista histológico.
- *Carcinoma de células grandes*: representa el 9% de todos los tumores de pulmón. Son carcinomas indiferenciados que no cumplen los criterios de los tipos histológicos anteriores, tratándose, por tanto, de un diagnóstico de exclusión.

Si nos referimos al grado de extensión de la enfermedad, los tumores de CNMP se clasifican en cuatro estadios: **Estadio 0**, cuando se encuentra localizado en la capa mucosa de la estructura bronquial; **Estadio I**, si está localizado dentro del pulmón; **Estadio II**, cuando el tumor ha diseminado a los ganglios linfáticos regionales; **Estadio III**, si el tamaño del tumor supera los 7 cm o hay afectación de los ganglios mediastínicos; y **Estadio IV**, cuando el tumor se ha diseminado a otros órganos. En la **Tabla 1** se muestra la comparación de estos estadios con la clasificación patológica TNM en CNMP (Goldstraw et al., 2007).

Estadio	Clasificación TNM		
carcinoma oculto*	TX	N0	M0
0	Tis	N0	M0
IA	T1a,b	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T1a,b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
IIIB	T4	N2	M0
	cualquier T	N3	M0
IV	cualquier T	cualquier N	M1a,b

Tabla 1. Comparación de los estadios de CNMP con la clasificación patológica TNM. (*) El tumor primario no puede valorarse, o el tumor se demuestra por la presencia de células malignas en el esputo o en los lavados bronquiales, pero no se visualiza radiológicamente o broncoscópicamente. *Adaptado de Goldstraw et al. 2007 (Goldstraw et al., 2007).*

2.2.- Biología molecular del cáncer de pulmón

Los tumores se caracterizan por un complejo patrón de alteraciones moleculares. A lo largo de las últimas décadas se han identificado varios genes con un papel clave en la carcinogénesis pulmonar. Se trata de genes cuya expresión nos permite distinguir de manera objetiva entre un estado normal y un estado tumoral, y además nos pueden servir como herramienta para establecer un diagnóstico temprano de la enfermedad y nos permiten optar por una terapia dirigida y personalizada con inhibidores propios de los genes expresados. Son, por tanto, **biomarcadores**. La identificación de estos genes varía enormemente entre los distintos tipos de cáncer, y es difícil su identificación debido a la enorme heterogeneidad que presentan los pacientes y las líneas celulares.

En concreto en CNMP, se han descrito receptores y proteínas con actividad quinasa o fosfatasa implicadas en la transducción de señales (EGFR, ERBB2, BRAF, KRAS, STK11, PIK3CA y PTEN), factores de transcripción (MYC y TP53) y reguladores del ciclo celular (CDKN2A y RB) (Sanchez-Céspedes, 2003; Sekido et al., 1998). No obstante, el abanico de genes se ha ido ampliando en los últimos años con la identificación de nuevas alteraciones, como la amplificación de MET (Bean et al., 2007; Engelman et al., 2007), la translocación de ALK (Soda et al., 2007), la sobreexpresión y amplificación de IGF1R (Chitnis et al., 2008;

Dziadziuszko et al., 2008), la amplificación de FGFR1 (Weiss et al., 2010) o las mutaciones en el gen DDR2 (Hammerman et al., 2011), entre otras. Actualmente, los genes que se encuentran alterados con relativa frecuencia (> 15-20%) representan una minoría (TP53, KRAS, EGFR, STK11, CDKN2A); mientras que en la mayoría de ellos (PTEN, ERBB2, BRAF, PIK3CA, MET, ALK) las alteraciones son poco frecuentes (5-10%) (Ding et al., 2008).

2.2.1.- Mutaciones en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

El receptor de EGF pertenece a la familia ErbB de receptores tirosina quinasa, que regulan la expresión de genes implicados en proliferación y supervivencia celular a través de la vía de las MAPK y la vía PI3K/AKT (Ciardiello and Tortora, 2008).

En las células tumorales, la actividad tirosina quinasa de EGFR puede verse alterada por varios mecanismos oncogénicos, incluyendo mutaciones y aumento del número de copias del gen, o la sobreexpresión de la proteína (Ciardiello and Tortora, 2008). La sobreexpresión de EGFR, por ejemplo, se ha observado en más del 60% de pacientes con CNMP y además se ha correlacionado con mal pronóstico de la enfermedad (Sharma et al., 2007). Las mutaciones de EGFR descritas hasta la fecha afectan al sitio de unión del ATP en el dominio tirosina quinasa del receptor. De hecho, se encuentran localizadas entre los primeros cuatro exones del dominio (18 al 21) (Gazdar, 2009) (**Figura 2**). Existen mutaciones que confieren sensibilidad a los inhibidores de la actividad tirosina quinasa (TKIs, del inglés *Tyrosine Kinase Inhibitors*), de las cuales más del 90% consisten en deleciones del exón 19 y en la mutación puntual L858R del exón 21. También se ha descrito que, tras una respuesta inicial a estos fármacos, determinados pacientes desarrollan resistencia entre 6 y 12 meses tras el tratamiento. Estos pacientes presentan mayoritariamente una mutación puntual del exón 20 (T790M) (Sharma et al., 2007).

En cuanto a la incidencia en pacientes con CNMP, se ha visto que las mutaciones de EGFR son más frecuentes en individuos asiáticos (30-50%) en comparación con pacientes europeos y de norteamérica (aprox. 10-15%). Además, la mayoría (> 50%) están asociadas a adenocarcinomas con características broncoalveolares y desarrollados en mujeres no fumadoras (Langer et al., 2010; Sequist et al., 2006; Takeuchi et al., 2006). Sin embargo, la amplificación de EGFR parece ser más habitual en tumores de pacientes fumadores, y no muestra una predilección clara por ninguna etnia ni por una histología determinada del tumor (Sharma et al., 2007).

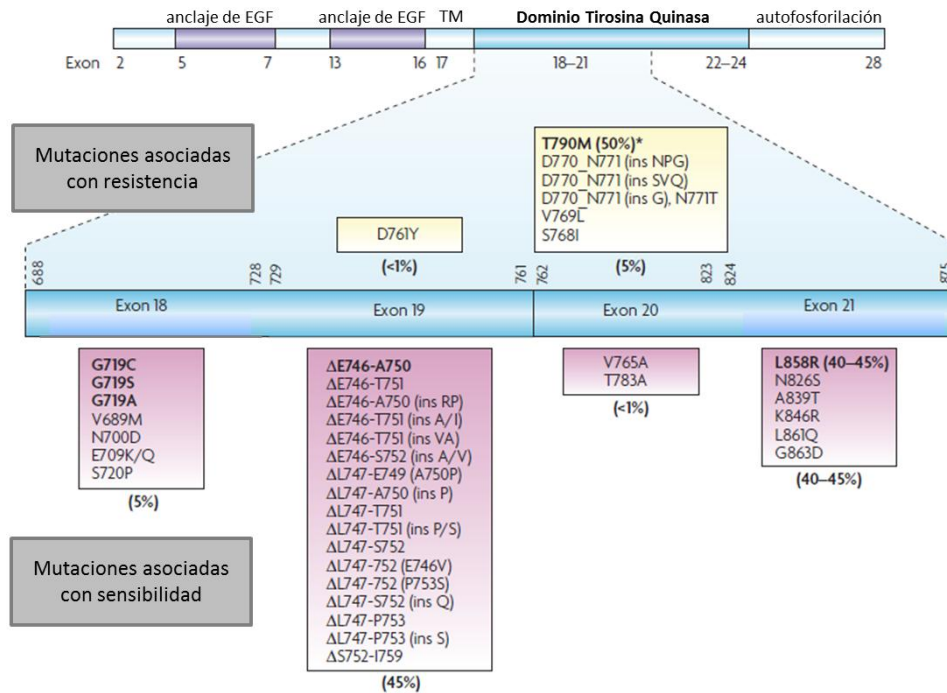


Figura 2. Mutaciones en el receptor de EGF. Esquema del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mostrando la distribución de los exones en el dominio extracelular (anclaje de EGF), dominio transmembrana (TM) y dominio intracelular (dominio tirosina quinasa y región de autofosforilación). En los cuatro primeros exones del dominio tirosina quinasa (18 al 21) se encuentran las mutaciones más significativas de EGFR. Mayoritariamente encontramos deleciones del exón 19 y la mutación puntual L858R del exón 21. (*) Mutación puntual mayoritaria del exón 20 que además está relacionada con la adquisición de resistencia a inhibidores de la actividad tirosina quinasa (TKIs). *Adaptado de Sharma et al. 2007 (Sharma et al., 2007).*

2.3.- Tratamiento del cáncer no microcítico de pulmón (CNMP)

Actualmente el tratamiento del CNMP se lleva a cabo mediante cirugía, radioterapia, quimioterapia o una combinación de éstas. La elección del tratamiento depende de la clasificación del tumor y del estadio de la enfermedad. El mejor tratamiento hoy en día es la cirugía, pero sólo puede ofrecerse a un número limitado de pacientes en estadios tempranos, y de forma esporádica a grupos de pacientes seleccionados en estadios más avanzados y en combinación con otras modalidades de tratamiento. Así, los estadios I y II suelen ser “tumores localizados” y por tanto candidatos a cirugía. Sin embargo, la mayoría de los tumores de CNMP se detectan cuando están localmente avanzados (estadios IIIA y IIIB) o diseminados (IV), por lo que no son aptos para la cirugía en el momento del diagnóstico, y son tratados habitualmente con radioterapia y/o quimioterapia (Eberhardt et al., 1999; Ornstein et al., 1999). Sin embargo, aún en estadios tempranos, la resección completa no siempre asegura la curación, ya que más del 80% de las

recaídas se producen en los 2 primeros años tras la cirugía. De hecho, la recurrencia metastásica es más frecuente que la local que sólo ocurre en un 10% de casos. Por ello, tras la cirugía puede llevarse a cabo un tratamiento adyuvante de quimioterapia y/o radioterapia cuyo objetivo es eliminar los focos micrometastásicos, indetectables por los métodos actuales de diagnóstico, y que son responsables de la recidiva tumoral.

Existen varios fármacos empleados en los tratamientos contra el cáncer de pulmón. Entre ellos destacan los compuestos derivados de platino como el **Cisplatino o CDDP**, que actúa uniéndose al ADN y formando aductos intra e intercatenarios que bloquean la replicación y la transcripción en las células. En el tratamiento del CNMP, habitualmente se administra una terapia combinada de CDDP con otros fármacos como Docetaxel, Gemcitabina o Paclitaxel, en ciclos de 21 a 28 días (*The Elsevier pocket guide to Oncology drugs and Regimens*, Fac. Medicine/Univ. Harvard. Agosto 2009). La respuesta inicial al tratamiento con CDDP es relativamente alta, pero la mayoría de los pacientes finalmente recaen debido fundamentalmente a dos factores: la alta toxicidad generada por el fármaco, ya que actúa por igual sobre todas las células en división, ya sean tumorales o no; y la adquisición de resistencia a la droga. Se sabe que la resistencia a los tratamientos antitumorales depende de diversos factores que incluyen variaciones individuales de cada paciente, así como diferentes alteraciones genéticas presentes en cada tumor, dentro incluso del mismo tipo de cáncer.

Esta resistencia que presentan los tumores a la quimioterapia es una de las principales limitaciones de los tratamientos contra el cáncer, y puede ser intrínseca, es decir que la presenta el tumor antes del tratamiento, o bien adquirida, cuando adquiere la resistencia al fármaco durante el tratamiento. Ambos tipos de resistencia limitan la eficacia de los agentes antitumorales utilizados y se cree que son responsables del fallo del tratamiento que se produce en aproximadamente el 90% de pacientes con cáncer metastásico (Longley and Johnston, 2005). Además, la resistencia intrínseca siempre ha sido bastante frecuente, pero a medida que se han ido desarrollando terapias antitumorales más efectivas, la resistencia adquirida ha ido ganando terreno (Gottesman, 2002).

Por otro lado, la identificación de diferentes alteraciones genéticas nos ha permitido dividir a los pacientes en subgrupos en función de las alteraciones que presentan. De acuerdo con esto, el desarrollo de terapias dirigidas surge como una estrategia prometedora en el tratamiento del CNMP. De hecho, ya existen inhibidores específicos que están demostrando su eficacia en numerosos ensayos clínicos, como es el caso de Gefitinib y **Erlotinib (Tarceva®)**. Ambos fármacos son inhibidores reversibles de la actividad tirosina quinasa de EGFR (TKIs) que inactivan el sitio de unión del ATP al receptor (Janku et al., 2011; Pao and Girard, 2011; Sharma et al., 2007; Sharma et al., 2010). Diversos estudios han demostrado que los pacientes con mutaciones en el gen EGFR tratados con estos TKIs presentan una tasa de respuesta y una

supervivencia mayor, en comparación con un tratamiento basado únicamente en quimioterapia (Mitsudomi et al., 2005; Mok et al., 2009; Rosell et al., 2011; Rosell et al., 2009; Sequist et al., 2008). En concreto en pacientes asiáticos, donde la incidencia de mutaciones es mayor, también se observa mayor tasa de respuesta a los TKIs (aproximadamente un 30% frente al 10% observado en pacientes europeos) (Sharma et al., 2007).

Estos datos ponen de manifiesto la importancia de identificar las distintas alteraciones genéticas presentes en cada tipo de tumor, ya que la heterogeneidad que nos estamos encontrando a medida que profundizamos en el estudio molecular del cáncer, está redirigiendo el tratamiento de esta enfermedad a una terapia específica y personalizada.

3.- Mecanismos de resistencia al tratamiento con cisplatino (CDDP)

Como hemos comentado anteriormente, la adquisición de resistencia a compuestos derivados del platino, como el cisplatino o CDDP, limita en gran medida la eficacia de los tratamientos de quimioterapia utilizados actualmente en la clínica. Se ha descrito que esta resistencia se adquiere habitualmente por la expresión de transportadores de membrana que expulsan los fármacos del interior de la célula, aunque también se ha visto que están implicados otros procesos como la evasión de la apoptosis y la inducción de mecanismos de detoxificación y de reparación del ADN (Gottesman, 2002).

Concretamente en el caso del CDDP, se han descrito alteraciones en varias rutas de señalización implicadas en proliferación, supervivencia celular y apoptosis. Así, la ruta de las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK) se ha visto alterada en varios procesos tumorales (Dhillon et al., 2007). También se han descrito alteraciones en las vías de PI3K/AKT y NFkB que juegan un papel crítico en el desarrollo y progresión tumoral en muchos tipos de cáncer, entre ellos el CNMP (Baldwin, 2001; Vivanco and Sawyers, 2002). Además, la inhibición de ambas vías aumenta la citotoxicidad de CDDP en células de CNMP con niveles bajos de MKP1 (Cortes-Sempere et al., 2009). MKP1 pertenece a la familia de las MKPs, fosfatasas duales y específicas que actúan como reguladores negativos de la actividad de las MAPK. MKP1 es el miembro mejor estudiado, y estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que tiene un papel importante en el crecimiento tumoral y en la respuesta al tratamiento con CDDP en células de CNMP (Chattopadhyay et al., 2006).

Más recientemente, también se han descrito otros mecanismos de resistencia como son los sistemas de reparación del ADN involucrados en la reparación de los aductos CDDP-ADN (Jayachandran et al., 2010), así como procesos epigenéticos como la hipermetilación del promotor de IGFBP-3, responsable de bloquear la unión de IGF a su receptor, impidiendo así la activación

de rutas implicadas en proliferación y control del ciclo celular (Cortes-Sempere et al., 2012; Ibanez de Caceres et al., 2010). Incluso se ha observado que compuestos naturales como el Resveratrol disminuye la supervivencia e induce apoptosis en células de CNMP resistentes a varios fármacos antitumorales (Zhao et al., 2010).

3.1.- Estudio *in vitro* de la resistencia adquirida a CDDP

Otra cuestión importante a tener en cuenta en el estudio de la resistencia a agentes antitumorales, es que resulta complicado simular en el laboratorio un tratamiento de quimioterapia aplicado en la clínica. Como hemos comentado anteriormente, los fármacos como el CDDP suelen administrarse en ciclos periódicos combinados con otros fármacos y en concentraciones establecidas en función del paciente y el tipo tumoral. En este caso, no sabemos a ciencia cierta la concentración de fármaco que llega a las células tumorales, ni si uno de los fármacos es más efectivo que los demás.

Sin embargo, la generación de líneas celulares resistentes en el laboratorio habitualmente se realiza por la exposición repetida y/o con concentraciones altas de CDDP, generalmente sin combinar con otros fármacos (Bertolini et al., 2009; Ibanez de Caceres et al., 2010; Jayachandran et al., 2010; Latifi et al., 2011; Mitsumoto et al., 1998; Wintzell et al., 2012; Zhang et al., 2012c). Así, el estudio de estas líneas celulares nos permite caracterizar un fenotipo muy concreto de resistencia adquirida, y que equivaldría, a *grosso modo*, al fenotipo de un paciente tras un tiempo recibiendo tratamiento. Sin embargo, conocer la respuesta del tumor en los primeros periodos de la terapia nos permitiría cambiar de fármaco(s), en caso de que el tumor presentara resistencia, o aumentar la dosis cuando éste mostrara indicios de remitir. Así, el estudio de la resistencia a CDDP con tratamientos *in vitro* asemejando los ciclos aplicados en clínica, y tras las primeras dosis de fármaco, nos permitiría conocer más a fondo cuándo y cómo se genera la resistencia a la droga.

4.- Progresión tumoral, angiogénesis y metástasis

La **formación de un tumor** es un proceso complejo que resulta de la acumulación de modificaciones genéticas y epigenéticas que alteran la homeostasis celular (Berdasco and Esteller, 2010; Hanahan and Weinberg, 2000). Como vemos en la **Figura 3**, las células alteradas modifican su patrón de división dando lugar a una hiperplasia localizada, que posteriormente conlleva a una desorganización del tejido (displasia). La membrana basal de los epitelios y la matriz extracelular subyacentes constituyen una barrera física, continua y prácticamente infranqueable, capaz de mantener los tumores benignos en un espacio bien definido. Por el

contrario, las células tumorales más agresivas son capaces de degradar localmente esa barrera gracias a la síntesis de proteasas (metaloproteasas, MMP). Además pierden la adhesión celular y reorganizan su citoesqueleto para adquirir un fenotipo mesenquimal (transición epitelio-mesenquima) (Moreno-Bueno et al., 2008). Todos estos cambios permiten a las células invadir el tejido adyacente (formación de carcinoma o tumor maligno) y llegar a alcanzar incluso los sistemas linfático y circulatorio para dar lugar a futuras metástasis (**Figura 3**).

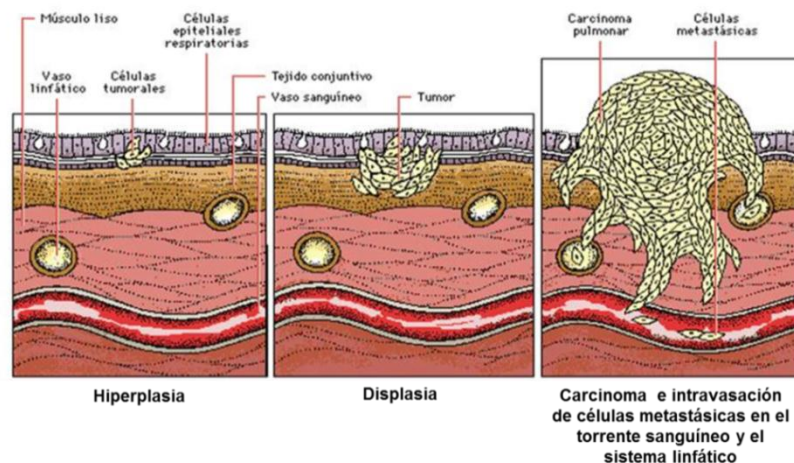


Figura 3. Progresión tumoral. Esquema de la formación de un tumor en el epitelio pulmonar. Se representan las fases de hiperplasia, displasia, formación del carcinoma e intravasación de células metastásicas en el torrente sanguíneo y el sistema linfático.

La progresión tumoral y el desarrollo de metástasis son estrictamente dependientes de la formación de nuevos vasos sanguíneos (**angiogénesis**) que aporten los nutrientes necesarios para la supervivencia de las células tumorales, y que proporcionen el medio de diseminación a otras regiones del organismo (**Figura 4**). Así, en ausencia de neovascularización, un tumor sólido no puede crecer más allá de unos pocos mm^3 (Zetter, 1998). La capacidad de algunas células tumorales para inducir angiogénesis es un requisito indispensable para su malignización, e implica la estimulación de la proliferación de las células endoteliales que forman los vasos sanguíneos cercanos, la invasión del estroma circundante por las mismas y su migración en dirección al tumor.

Durante el proceso de angiogénesis se establece un equilibrio entre factores pro-angiogénicos (FGF, PDGF, miembros de la familia VEGF, etc) y factores anti-angiogénicos (trombospondina, endostatina, angiostatina, tumstatina, etc) secretados por las propias células tumorales (Herbst et al., 2005; Kerbel, 2008). A medida que va creciendo el tumor, se va generando un ambiente de hipoxia en el interior del mismo que hace que se active la subunidad α del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF). Este factor activa la expresión de los factores pro-angiogénicos de la familia VEGF, que se unirán a sus respectivos receptores en la

membrana de las células endoteliales. Así, estas células endoteliales serán atraídas por las células tumorales y formarán nuevos vasos sanguíneos cerca del tumor (Herbst et al., 2005; Jimenez and Volpert, 2001).

Una vez alcanzado el sistema circulatorio, las células tumorales pueden ser capaces de atravesar la membrana endotelial (intravasación), sobrevivir en el torrente sanguíneo y finalmente abandonarlo (extravasación) para anidar en el órgano diana y formar **metástasis** a distancia (Figura 4).

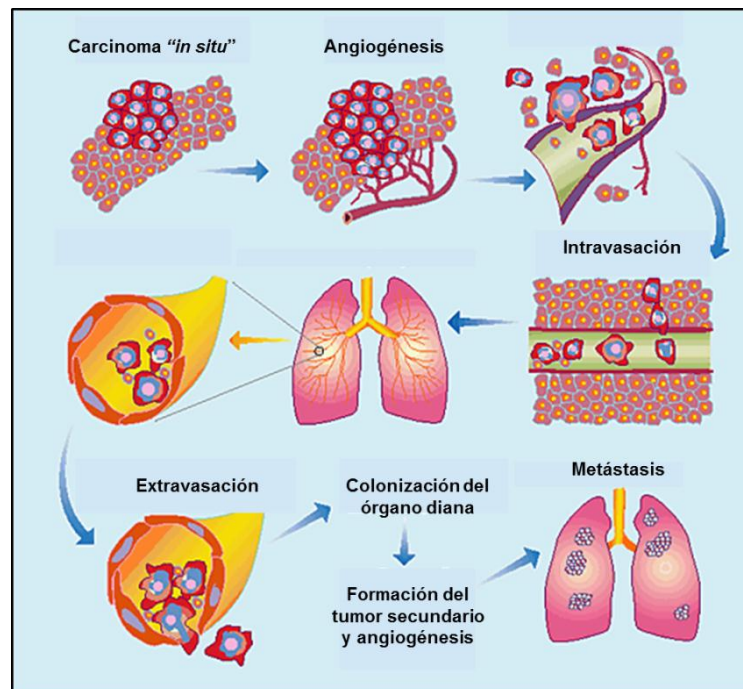


Figura 4. Angiogénesis y metástasis. El proceso de metástasis depende de la formación de vasos sanguíneos que aporten nutrientes al tumor y un medio de diseminación a otras regiones del organismo. Algunas células tumorales son capaces de estimular a las células endoteliales de los vasos sanguíneos cercanos para formar nuevos vasos hacia el tumor (angiogénesis). Una vez alcanzado el torrente sanguíneo las células tumorales pueden viajar a través de él y colonizar otros órganos para formar tumores secundarios o metástasis. *Adaptado de Fidler & Ellis 2000 (Fidler and Ellis, 2000).*

5.- Las Células Iniciadoras Tumorales o *Cancer Stem Cells* (CSC)

Como hemos comentado anteriormente, a pesar del conocimiento que tenemos sobre la biología del cáncer, muchos de los tratamientos utilizados actualmente en clínica no consiguen eliminar definitivamente el tumor y un porcentaje bastante alto de pacientes acaban desarrollando recidivas. La pregunta inmediata que se nos plantea es: ¿Se han desarrollado los tratamientos de quimioterapia contra las células equivocadas? Hace más de una década comenzaron a publicarse estudios que postulaban que la organización intrínseca de un tumor podría asemejarse a la

organización de un tejido normal adulto (Reya et al., 2001). Estos trabajos demostraron que existía una pequeña población de células dentro de la masa tumoral capaces de iniciar y mantener el crecimiento del tumor. A estas células “madre” del tumor se las denominó en origen células madre tumorales o *cancer stem cells*, aunque en los últimos años se está acuñando cada vez más el término “células iniciadoras tumorales” para distinguirlas de las células madre propiamente dichas (Dalerba et al., 2007a). Así, la formación de un tumor se llevaría a cabo por la proliferación y diferenciación de estas células, y no únicamente por la proliferación de las células tumorales.

Si analizamos las terapias convencionales empleadas actualmente en clínica, éstas actúan principalmente sobre células en división. De hecho la respuesta inicial de los pacientes a estas terapias es bastante alta, puesto que el tamaño del tumor disminuye y puede incluso dejar de verse macroscópicamente en las pruebas diagnósticas. Sin embargo, sorprende el alto porcentaje de recaídas que se producen en los pacientes debido a que el tumor vuelve a regenerarse. De acuerdo con la teoría de las *Cancer Stem Cells*, existiría una pequeña población de células resistentes a las terapias convencionales y capaces de regenerar el tumor. Por tanto, la caracterización de estas células, y la búsqueda de terapias específicas contra ellas, nos permitiría acabar definitivamente con el tumor (Perez-Caro and Sanchez-Garcia, 2006) (**Figura 5**).

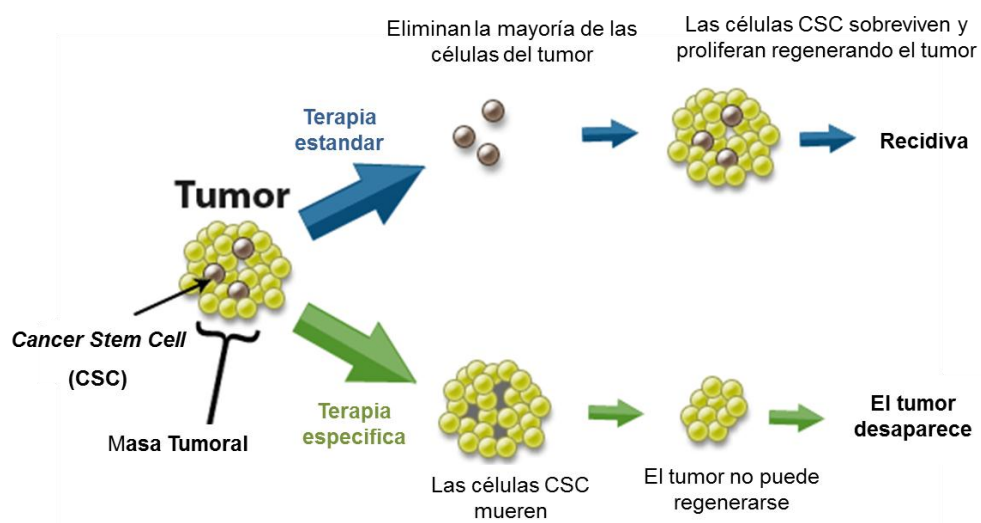


Figura 5. Nueva estrategia en el tratamiento del cáncer mediante el uso de terapias específicas contra las células CSC (*Cancer Stem Cells*). Las terapias actuales eliminan la gran mayoría de células que forman el tumor disminuyendo su tamaño, pero las células CSC, inmunes a estas terapias, acaban regenerando el tumor dando lugar a recaídas. Por el contrario, mediante el uso de terapias específicas contra las células CSC, eliminamos las células iniciadoras del tumor de forma que éste no puede regenerarse. Así, combinando ambos tipos de terapia, podríamos conseguir la curación definitiva del tumor. *Adaptado de www.stemline.com.*

La primera evidencia del papel de estas células iniciadoras tumorales o CSC apareció en 1994 con un estudio realizado en leucemia mieloide aguda humana (Lapidot et al., 1994). Posteriormente, a partir del año 2003, comenzaron también a identificarse en tumores sólidos incluyendo mama, cerebro, melanoma, próstata, colon, páncreas, cabeza y cuello (Al-Hajj et al., 2003; Fang et al., 2005; Galli et al., 2004; Li et al., 2007; Patrawala et al., 2006; Prince et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Singh et al., 2003) y más recientemente en pulmón (Eramo et al., 2008). Todos estos trabajos demuestran que existe un pequeño grupo de células dentro del tumor que presentan determinadas características de células madre. Entre ellas se encuentran la capacidad de auto-renovación, la capacidad de diferenciar a otros tipos celulares del tumor, y la habilidad de formar tumores *in vivo* cuando se realizan xenoinjertos en ratones. Estas células además, pueden distinguirse dentro del tumor por su división asimétrica y por presentar determinadas alteraciones de la expresión génica (Rosen and Jordan, 2009). La división asimétrica, a diferencia de la simétrica, genera una célula madre y una célula diferenciada. De esta forma se mantiene siempre una progenie con capacidad de auto-renovación.

Respecto al origen de las células CSC, actualmente se barajan dos teorías. La primera postula que una célula progenitora normal presente en el tejido adquiere la capacidad de generar el tumor por una o varias alteraciones genéticas y del entorno. Así, determinadas células CSC aisladas en mama, por ejemplo, presentan marcadores de superficie propios de los progenitores normales de la glándula mamaria, tales como CD44⁺/CD24^{-/low} (Al-Hajj et al., 2003). La segunda teoría sugiere que las células CSC provienen de células somáticas normales que adquieren propiedades de célula madre debido a alteraciones genéticas y epigenéticas. La inducción de transición epitelio-mesenquima (TEM), por ejemplo, induce la adquisición de fenotipo mesenquimal y la expresión de marcadores *stem* en tumores de mama (Mani et al., 2008).

También se ha descrito que se pueden aislar células CSC en base a la expresión de determinados marcadores de superficie, tales como CD44, CD24 ó CD133, entre otros. El hecho de que estas células supongan una pequeña población dentro del tumor, hace indispensable poder separarlas del resto de las células, y es aquí donde estos marcadores juegan un papel fundamental. Durante años, numerosos trabajos han identificado nuevos marcadores de células CSC para cada tipo tumoral, a fin de encontrar un patrón de expresión órgano-específico. Sin embargo en 2010, Stuelten y cols. (Stuelten et al., 2010) demostraron que los marcadores de estas células dependían del tipo tumoral, pero también variaban mucho su expresión en función de la línea celular y las condiciones de cultivo.

5.1.- Las células iniciadoras tumorales (CSC) en cáncer de pulmón

En el pulmón sano se ha descrito que existen progenitores de los distintos tipos celulares. Así, nos encontramos células progenitoras broncoalveolares, secretoras de moco y neuroendocrinas que mantienen la homeostasis pulmonar y juegan un papel fundamental en la reparación de daños en el tejido (Giangreco et al., 2009; Giangreco et al., 2007; Otto, 2002). Estas células no se convierten en células tumorales a menos que se produzcan cambios genéticos y epigenéticos, como los que producen los carcinógenos presentes en el tabaco (Besson et al., 2007; Giangreco et al., 2009; Giangreco et al., 2007; Otto, 2002). Al igual que en otros tumores, se piensa que las células CSC de pulmón podrían surgir fundamentalmente a partir de cualquiera de estos progenitores.

Como hemos comentado anteriormente, se han identificado varios marcadores de superficie para identificar células CSC. En la **Tabla 2** se recogen los más utilizados en cáncer de pulmón, y se comparan con líneas celulares de otros tipos tumorales.

Tipo tumoral	Línea Celular	CD44+	CD133+	ALDH+
CNMP	H460	67,44	0,38	1,61
CNMP	A549	84,41	3,64	2,55
CNMP	H23	30,95	0,11	0,01
Glioma	SF-539	84,22	0,13	0
Glioma	SNB-19	65,79	0,5	0,01
Mama	MCF7	1,37	1,24	0,4
Mama	BT-549	45,27	4,54	0,04
Ovario	OVCAR-3	12,7	22,46	0,97
Ovario	SK-OV-3	90,74	0,78	0
Colon	SW-620	11,49	22,04	0,11
Colon	HT29	71,39	74,51	38,8

Tabla 2. Expresión de marcadores de células CSC en líneas celulares de distintos tipos tumorales. Los datos muestran el porcentaje de células positivas para cada uno de los marcadores. CNMP: Cáncer no microcítico de pulmón; ALDH: Enzima aldehído deshidrogenasa. *Adaptado de Stuelten et al. 2010* (Stuelten et al., 2010).

Estos datos muestran la heterogeneidad que hay entre las distintas líneas celulares, y que es la causa de las discrepancias existentes en el uso de unos u otros marcadores para la identificación de las células CSC en los distintos tipos tumorales (Stuelten et al., 2010).

A continuación comentaremos un poco más en detalle los marcadores más utilizados en cáncer de pulmón:

CD133: También conocido como Prominina 1, se identificó por primera vez en células madre hematopoyéticas (Yin et al., 1997) y posteriormente se encontró en varios tipos de leucemia (Wuchter et al., 2001). Actualmente sirve como marcador específico de células CSC en varios tipos tumorales incluyendo glioma, colon, páncreas, mama, próstata, ovario (Ahn et al., 2008; Klonisch et al., 2008; Visvader and Lindeman, 2008; Yang and Chang, 2008) y algunos cánceres de pulmón (Eramo et al., 2008). Aunque también existen trabajos en los que apenas detectan la expresión del mismo (Zhang et al., 2012b), o que sólo la detectan en líneas celulares de CMP, pero no en CNMP (Cui et al., 2011). CD133 es una glicoproteína transmembrana de 120 kD (Piechaczek, 2001) cuya función aún se desconoce. Varios estudios sugieren su posible implicación en la activación y mantenimiento de las células *stem* cuando es co-expresado con la subunidad $\beta 1$ de la integrina en las células de la epidermis basal (Yu et al., 2002). Además se han observado partículas con este marcador en el espacio extracelular entre los progenitores neurales y algunas células epiteliales, por lo que también podría estar implicado en las uniones célula-célula (Marzesco et al., 2005; Taieb et al., 2009). Sin embargo, existen también varios trabajos que demuestran que las células CD133 negativas son igualmente capaces de generar tumores *in vivo* (Ogden et al., 2008; Shmelkov et al., 2008; Wang et al., 2008). Por lo tanto, parece que la población CD133 negativa también posee propiedades de células CSC. Estos datos ponen de manifiesto la enorme variabilidad que podemos encontrar en la expresión de este marcador.

CD44: Este marcador comprende una familia de glicoproteínas codificadas por el mismo gen que varía en tamaño debido a mecanismos de procesamiento alternativo. Actúa como un factor pleiotrópico y tiene un papel importante en la remodelación del tejido, uniones célula-matriz extracelular y migración celular. Este antígeno sirve también de marcador de células CSC en varios tipos tumorales incluyendo mama, ovario, colon, páncreas y cabeza y cuello (Marhaba et al., 2008).

CD166: También llamado ALCAM (molécula de adhesión celular leucocitaria activada), se trata de una proteína transmembrana de unos 100 kD que forma parte de la súper familia de las inmunoglobulinas, y juega un papel importante en el desarrollo de los linfocitos T en el timo (Bowen et al., 1995). Un trabajo publicado recientemente (Zhang et al., 2012b) muestra que las células CD166 positivas aisladas a partir de muestras de pacientes con cáncer de pulmón, son bastante más tumorigénicas, tanto *in vitro* como *in vivo*, que las poblaciones CD44 y CD133 positivas. Estos datos sugieren que este antígeno puede ser un nuevo marcador para el estudio y caracterización de las células CSC en cáncer de pulmón.

Side population (Población SP): La llamada “población SP” está formada por un grupo de células capaces de expulsar el colorante Hoechst 33242 gracias a que expresan transportadores de la familia ABC (*ATP Binding Cassette*) en su membrana (Zhou et al., 2001). Se ha descrito que estas células presentan características de células CSC tales como la auto-renovación, diferenciación celular, alta tumorigenicidad, así como la expresión de marcadores y genes de células *stem* (Ho et al., 2007; Wu and Alman, 2008), aunque también hay estudios que demuestran que estas células no siempre poseen características de células CSC (Zhang et al., 2012a). También se ha observado que son bastante resistentes a los agentes antitumorales y juegan un papel importante en las recidivas y la resistencia al tratamiento del cáncer de pulmón (Hirschmann-Jax et al., 2005; Hirschmann-Jax et al., 2004; Wu and Alman, 2008). Sin embargo, también se han descrito varios problemas que presenta el método utilizado para aislar la población SP (Wu and Alman, 2008). No todas las células resistentes al Hoechst33242 tienen por qué ser células CSC, y además, los ajustes que necesita este método en cuanto a la tinción y adquisición en el citómetro, deben ser regulados en función de cada línea celular. Estos problemas conllevan a una “contaminación” de las poblaciones SP y no SP que puede generar datos contradictorios.

Aldehído deshidrogenasa (ALDH): La súper familia aldehído deshidrogenasa comprende un grupo de enzimas que metabolizan una amplia variedad de aldehídos endógenos y exógenos. Están implicadas en la modulación de la proliferación celular, lo que también se extiende a la proliferación de células madre (Huang et al., 2009). De hecho, se ha visto que las células madre normales y CSC de cáncer de mama, colon y pulmón, presentan una alta actividad ALDH, lo que apoya su uso como marcador de las células CSC (Dylla et al., 2008; Ginestier et al., 2007; Huang et al., 2009; Jiang et al., 2009; Sullivan et al., 2010).

5.2.- Las células iniciadoras tumorales (CSC) y la resistencia a los tratamientos contra el cáncer

Es habitual que los tumores que vuelven a formarse tras un tratamiento con quimioterapia sean más resistentes a dicho tratamiento. Se ha postulado que esto tenga relación con las propiedades *stem* que se les atribuye a las células CSC, tales como la expresión de transportadores de membrana que las permite protegerse de la acumulación de compuestos potencialmente nocivos (Dean et al., 2005). Un ejemplo que hemos comentado anteriormente, es la capacidad de las células de la población SP para expulsar colorantes como Hoechst 33242.

Existen varios estudios que demuestran que existe relación entre las células CSC y la resistencia que presentan los tumores a los tratamientos. En mama, Li & cols. estudiaron el efecto de la quimioterapia en varias muestras de pacientes y observaron que la proporción de células CD44⁺/CD24^{-/low} (marcadores de células CSC en mama) aumentaba notablemente tras el tratamiento (Li et al., 2008). También Meirelles & cols. observaron mayor resistencia a la Doxorubicina en las células CSC de ovario (Meirelles et al., 2012). Por otro lado, en cáncer de pulmón, Bertolini & cols. demostraron que la población CD133⁺ obtenida a partir de líneas celulares y muestras de pacientes presentaban mayor tumorigenicidad y mayor resistencia a cisplatino (CDDP) (Bertolini et al., 2009). Asimismo, Levina & cols. seleccionaron células resistentes a distintas drogas usadas a quimioterapia, y obtuvieron células mucho más tumorigénicas y con características de células CSC (Levina et al., 2008).

Sin embargo, otro trabajo publicado en 2011 demostró que la respuesta de las células CSC al tratamiento dependía de la variabilidad intrínseca de cada paciente (Zielske et al., 2011). Aislaron células CD44⁺/CD24^{-/low} de dos muestras de pacientes con cáncer de mama, y las trataron con quimio y radioterapia. Sorprendentemente, las células CSC de una de las muestras acabaron muriendo con el tratamiento, mientras que las células CSC procedentes de la otra muestra aumentaron su crecimiento y se hicieron más tumorigénicas.

Todos estos datos reflejan la enorme variabilidad que puede existir entre los pacientes. Una heterogeneidad que ya vimos reflejada en la expresión de marcadores de superficie en las líneas celulares. Así, las futuras terapias específicas contra células CSC deberán tener en cuenta esta variabilidad, que también sugiere la búsqueda de marcadores más robustos para aislar e identificar estas células iniciadoras tumorales.

5.3.- Crecimiento *in vitro* de las células iniciadoras tumorales (CSC)

Las células CSC se caracterizan por formar esferas cuando crecen en suspensión bajo condiciones no adherentes y en un medio libre de suero. Además de la selección por marcadores, actualmente existen varias técnicas de aislamiento de células CSC basados en la formación de estas esferas en suspensión (Dalerba et al., 2007b; Lim et al., 2011) y la capacidad clonogénica (formación de esferas a partir de una única célula) (Clarke et al., 2006). Todos estos ensayos *in vitro* permiten seleccionar una población de células capaces de crecer en unas condiciones específicas de cultivo, propias de las células CSC, aunque también puede haber una proporción de células no CSC. Por ello es fundamental combinar varios de estos métodos de aislamiento, así como realizar estudios *in vivo* que permitan corroborar que las células aisladas son células iniciadoras tumorales o *cancer stem cells*.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es el estudio de la respuesta a Cisplatino (CDDP) en células con características de *cancer stem cells* (CSC) derivadas de cáncer no microcítico de pulmón (CNMP).

Para el desarrollo del estudio, hemos dividido el trabajo en los siguientes objetivos parciales:

- 1.-** Generación de líneas celulares resistentes a CDDP a partir de líneas celulares de CNMP.
- 2.-** Aislamiento de células con fenotipo CSC a partir de líneas celulares de CNMP para estudiar su tumorigenicidad y resistencia a CDDP.
- 3.-** Estudio de la resistencia a quimioterapia en células aisladas de pacientes con CNMP.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Líneas celulares

1.1.- Cultivo y conservación

Las diferentes líneas celulares humanas utilizadas en este trabajo, así como el tipo celular que representan, su origen y medio de cultivo empleado, se especifican en la **Tabla 3**.

Línea celular	Tipo celular	Descripción	Medio de cultivo	Origen
H460	CNMP	Fluido pleural de carcinoma	RPMI+10% FBS (G/F/G)	ATCC (HTB-177)
R0.5µg	CNMP	H460 resistentes a CDDP	RPMI+10% FBS (G/F/G)	Nuestro laboratorio
H460 CSC	CNMP	H460 cultivadas en placas NO adherentes	DMEM/F-12 [1:1] (G/F/G)*	Nuestro laboratorio
H460 GFP	CNMP	H460 infectadas con el vector lentiviral vacío pGIPZ	RPMI+10% FBS (G/F/G)+Puro	Nuestro laboratorio
H460 Cherry	CNMP	H460 transfectadas con el plásmido pmCherry-N1	RPMI+10% FBS (G/F/G)	Nuestro laboratorio
A549	CNMP	Carcinoma	RPMI+10% FBS (G/F/G)	ATCC (CCL-185)
R2.5µg	CNMP	A549 resistentes a CDDP	RPMI+10% FBS (G/F/G)	Nuestro laboratorio
A549 CSC	CNMP	A549 cultivadas en placas NO adherentes	DMEM/F-12 [1:1] (G/F/G)*	Nuestro laboratorio
HT1080	Tejido conectivo	Fibrosarcoma	DMEM+10% FBS (G/F/G)	ATCC (CCL-121)
MCF7	Glándula mamaria	Adenocarcinoma	RPMI+10% FBS (G/F/G)	ATCC (HTB-22)
A431	Epidermis	Carcinoma de células escamosas	DMEM+10% FBS (G/F/G)	ATCC (CRL-1555)
H1975	CNMP	Adenocarcinoma	RPMI+10% FBS (G/F/G)	ATCC (CRL-5908)
H1650	CNMP	Carcinoma broncoalveolar	RPMI+10% FBS (G/F/G)	ATCC (CRL-5883)
HEK 293T/17	Epitelio renal	Células epiteliales de riñón embrionario humano	DMEM+10% FBS (G/F/G)	ATCC (CRL-11268)

Tabla 3. Características de las líneas celulares utilizadas. CNMP: Cáncer No Microcítico de Pulmón. CDDP: cis-Platino. (G/F/G): Medio suplementado con 2 mM de glutamina, 0,5 µg/ml de fungizona y 40 µg/ml de gentamicina; (G/F/G)*: Medio suplementado con 2 mM de glutamina, 0,5 µg/ml de fungizona, 40 µg/ml de gentamicina, 5mM de Hepes, 0.4% (p/v) de albúmina bovina sérica (BSA), suplemento N2 (Invitrogen) y 20 ng/ml de factores de crecimiento EGF y FGF-b (PeproTech). Puro: Puromicina (2.5µg/ml). ATCC: *American Type Culture Collection*.

Las líneas celulares HT1080, A431 y HEK293T/17 se cultivaron en medio DMEM (Medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbeco), y el resto de las líneas, a excepción de las células CSC, se cultivaron en medio RPMI (*Instituto Memorial Roswell Park*) (ambos procedentes de Gibco). Ambos medios de cultivo se suplementaron con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 0,5 µg/ml de fungizona y 40 µg/ml de gentamicina, lo que denominamos medio completo.

Las células CSC se cultivaron en placas no adherentes de 6 y 12 pocillos con medio DMEM/F-12 [1:1] (Medio de cultivo *Eagle* modificado por Dulbeco mezclado con nutriente F-12 de Ham) (Gibco), 2 mM de glutamina, 0,5 µg/ml de fungizona, 40 µg/ml de gentamicina, 5mM de HEPES, 0.4% (p/v) de albúmina bovina sérica (BSA), suplemento N2 (Gibco) y 20 ng/ml de factores de crecimiento EGF y FGF-b (PeproTech).

Las líneas celulares se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar de 37°C de temperatura, 95% de humedad y 5% de presión de CO₂. Todas las manipulaciones se hicieron en una campana de flujo laminar de seguridad Clase II (nivel de seguridad biológica 2; *Class II Biohazard Safety Cabinet*, ESCO).

Para su almacenamiento a largo plazo, las células se conservaron en un contenedor de nitrógeno líquido, en criotubos de 2 ml, y en su medio de cultivo habitual más 10% de FBS y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). En las células CSC, el FBS se substituyó por los factores de crecimiento EGF y FGF-b.

1.2.- Tratamiento con CDDP

El agente quimioterápico utilizado para el tratamiento de las líneas celulares fue cis-Platino o CDDP (Ferrer Farma). Para generar células resistentes a esta droga, se sembraron 3×10^6 células en placas de 100 mm de diámetro, y se trataron con una única dosis de la concentración correspondiente de CDDP. Tras 72 horas de tratamiento se retiró la droga y las células se mantuvieron en cultivo hasta que alcanzaron una confluencia del 90%. Durante este periodo de reposo, se estudió la viabilidad celular como se indica en el apartado 1.3.

1.3.- Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular se estudió mediante curvas de respuesta a diferentes dosis de fármaco utilizando dos ensayos colorimétricos: la técnica de cristal violeta y MTS.

1.3.1.- Técnica de cristal violeta

Se sembraron las células en placas de 24 pocillos (50.000 células/pocillo) y tras 24 horas de cultivo en su medio habitual, las células se trataron con diferentes dosis del fármaco correspondiente. A las 72 horas de tratamiento se fijaron las células con 1% de glutaraldehído y se lavaron con PBS. A continuación las células se tiñeron con 0,1% de colorante cristal violeta durante 30 minutos. Después se lavaron con PBS y el colorante asociado a las células se desprendió con una solución de ácido acético al 10%. Se cuantificó la tinción obtenida leyendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de placas (*Molecular devices versamax tunable microplate reader*). La viabilidad celular se calculó como el porcentaje de tinción obtenida en cada dosis con respecto a las células sin tratamiento, representándose la media de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado con sus correspondientes desviaciones estándar (D.E.).

1.3.2.- CellTiter 96®Aqueous one solution cell proliferation assay (MTS) (Promega)

Para llevar a cabo este ensayo, las células adherentes se sembraron en placas estándar de 96 pocillos, y las células CSC en placas no adherentes de 96 pocillos (50 células/pocillo en ambos casos). Tras 24 horas de cultivo, las células se trataron con diferentes dosis del fármaco correspondiente. A las 72 horas de tratamiento se determinó la supervivencia celular utilizando el método colorimétrico basado en la reducción del compuesto [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MTS]. Para ello, se añadieron 20 µl de reactivo en cada pocillo y se incubó la reacción durante 3 horas a 37°C de temperatura, 95% de humedad y 5% de presión de CO₂. Posteriormente se cuantificó la cantidad de formazan soluble en el medio, originado por la reducción del MTS en las células metabólicamente activas, leyendo la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro de placas (*Molecular devices versamax tunable microplate reader*). La viabilidad celular se calculó como el porcentaje de MTS reducido en cada dosis con respecto a las células sin tratamiento, representándose la media de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado con sus correspondientes desviaciones estándar (D.E.).

1.4.- Ensayo de crecimiento en agar blando (*soft-agar*)

En primer lugar se prepararon placas de 60 mm de diámetro con una base de agar noble (Sigma) al 0,5% en medio de cultivo. Posteriormente se prepararon las células (1×10^4 células/placa) en una mezcla de agar noble al 0,33% en medio de cultivo, y se vertieron sobre la base preparada anteriormente. Las placas se mantuvieron en cultivo durante 10 días añadiendo medio fresco con frecuencia a fin de evitar el agrietamiento del agar. Finalmente, las placas se tiñeron con cristal violeta al 0,005% durante 1 hora a 37°C, y se cuantificó al microscopio el número de clones formados por placa, representándose la media de tres experimentos independientes realizados por duplicado con sus correspondientes desviaciones estándar (D.E.).

1.5.- Ensayo de capacidad clonogénica

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (0,5 células/pocillo) y se mantuvieron en cultivo durante 10 días. Para observar la formación de clones se cultivaron las células en placas adherentes, mientras que para determinar la formación de esferas se utilizaron placas no adherentes. Posteriormente se cuantificó al microscopio el número de clones o esferas por placa, representándose la media de diez experimentos independientes realizados por duplicado con sus correspondientes desviaciones estándar (D.E.).

1.6.- Crecimiento en medio condicionado procedente de H460 CSC

Se sembraron células H460 en placas de 12 pocillos (1000 células/pocillo) con medio CSC sin factores de crecimiento EGF y FGF-b. Tras 10 días de incubación, se recogió el medio y se guardó a 4°C. Posteriormente se sembraron las células A549 en placas de 12 pocillos (1000 células/pocillo) con el medio condicionado (MC) recogido de las H460 CSC, y se mantuvieron en cultivo durante 10 días. Finalmente se cuantificaron las células presentes en cada pocillo. Para disgregar las células CSC, se incubaron las esferas en DMEM/F-12 [1:1] + 0.3mg/ml de Colagenasa (Sigma) durante 45 minutos a 37°C. Los datos representan la media de dos experimentos independientes realizados por duplicado con sus correspondientes desviaciones estándar (D.E.).

1.7.- Ensayo de invasión celular

Para el ensayo de invasión celular se utilizaron cámaras de invasión BD BioCoat™ Matrigel™ con factores de crecimiento reducido (BD Biosciences). Para llevar a cabo el ensayo, primero se ayunaron las células en presencia de medio de cultivo con 0,5% FBS. Tras 48 horas de incubación se sembraron 1×10^4 células por pocillo en medio de cultivo con 0,5% FBS y 0,1% BSA en la parte superior del filtro, y se puso medio con 10% FBS en la parte inferior como quimioatrayente. En el caso de la línea celular CSC, el medio de cultivo de ayuno fue el medio de cultivo habitual sin factores de crecimiento EGF y FGF-b. El medio de cultivo en el que se sembraron las células fue el medio de cultivo con 0,1% BSA y sin factores de crecimiento, y como quimioatrayente se utilizó su medio de cultivo habitual.

Después de 24 horas se recortaron los filtros y posteriormente se fijaron y tiñeron con el kit *Diff Quik* (Dade Behring). Para cuantificar el número de células retenidas en el matrigel, se tomaron 10 campos elegidos al azar en cada uno de los filtros y se determinó el área teñida (μm^2) en cada caso con el software informático *analySIS (Soft Imaging System)*. Así, se representó la media de tres experimentos independientes realizados por triplicado con sus correspondientes desviaciones estándar (D.E.).

1.8.- Extracción de ADN

La extracción de ADN de las líneas celulares se realizó por duplicado a partir de placas de 100 mm de diámetro que estaban al 80-90% de confluencia. Las células se incubaron entre 12 y 16 horas a 37°C en presencia de EDTA 20 mM, NaCl 65 mM, SDS al 1% y Proteinasa K (PK) (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). A continuación se llevó a cabo la extracción con Fenol-Cloroformo-Isoamílico (25:24:1) y Cloroformo. Finalmente el ADN fue precipitado con etanol al 100% y resuspendido en un volumen apropiado de tampón con Tris 10 mM y EDTA 1 mM (tampón TE).

La cuantificación se llevó a cabo por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop ND2000. A partir de estos valores, se determinó el ratio de contaminación proteica (absorción 260nm/280nm) y la concentración de ADN en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Para todas las muestras, los valores del ratio se situaron dentro del rango óptimo (1.8-2.0).

2.- Análisis de la expresión génica en las líneas celulares

2.1.- Extracción de ARN total

La extracción de ARN total de las líneas celulares se realizó por duplicado a partir de placas de 60 mm de diámetro que estaban al 80-90% de confluencia. El ARN se aisló utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) y posteriormente se purificó con el *kit Mini RNeasy* (Qiagen).

La cuantificación se llevó a cabo por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop ND2000. A partir de estos valores, se determinó el ratio de contaminación proteica (absorción 260nm/280nm) y la concentración de ARN en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Para todas las muestras, los valores del ratio se situaron dentro del rango óptimo (1.8-2.0). Para determinar la integridad y el RIN (*RNA Integrity Number*) del ARN se utilizó el Bioanalizador 2100 (Agilent).

2.2.- Estudio de los perfiles de expresión génica mediante el uso de *microarrays*

A) Para llevar a cabo el análisis comparativo de las **líneas celulares H460, R0.5 μg y CSC** se utilizó la plataforma de arrays *Whole Human Genome Microarray 4x44K G4112F* (Agilent) que contiene 45220 sondas. El marcaje y la hibridación del ARN se llevaron a cabo según el protocolo de la casa comercial *Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Quick Amp Labeling)* (Agilent). Se hibridaron dos muestras independientes (réplicas biológicas) de las líneas celulares R0.5 μg y CSC con una única muestra de la línea celular H460, realizando dos réplicas técnicas con *dye-swap*. Posteriormente se escanearon los *microarrays* con el *DNA Microarray Scanner* y se extrajeron los datos con el *Feature Extraction Software* (ambos de Agilent).

El análisis informático de los datos se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, Madrid). Los niveles de intensidad obtenidos con el escáner fueron corregidos con la señal de fondo utilizando el método *normexp* de *limma* con una compensación de 50. Las intensidades de las dos réplicas biológicas se obtuvieron calculando la media de las intensidades normalizadas de las dos réplicas técnicas (*dye-swap*), y se calculó la media de estas últimas para cada línea celular. Estas intensidades normalizadas se transformaron a valores logarítmicos (\log_2), y fueron normalizados por el método *lowess* (normalización intra-array) (Smyth and Speed, 2003), y por ajuste de cuantiles (normalización inter-array) (Bolstad et al., 2003). Posteriormente se realizaron dos comparaciones (H460 vs. R0.5 μg y H460 vs. CSC) con el método *Rank Products* (Breitling et al., 2004), y se seleccionaron los genes que

resultaron comunes en ambas comparaciones con *False Discovery Rate* (FDR) < 0,05. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el correspondiente paquete *bioconductor* (<http://www.bioconductor.org/>), y se empleó el programa *FIESTA* (Oliveros et al., 2007a) para filtrar y visualizar los datos obtenidos. Para la obtención del diagrama de Venn se utilizó el programa *VENNY* (Oliveros et al., 2007b). Finalmente se seleccionaron los genes más significativos y se validaron por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

B) La hibridación y posterior análisis de los distintos tiempos de **diferenciación** de las **células CSC**, se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, Madrid). Para ello se utilizó la plataforma de arrays *Whole Human Genome Microarray 4x44K G4112F* (Agilent) y las muestras se marcaron con un color. Los niveles de intensidad obtenidos fueron corregidos con la señal de fondo utilizando el método *normexp* de *limma* con una compensación de 50. Estas intensidades normalizadas se transformaron a valores logarítmicos (log₂), y fueron normalizados por el método *lowess* (normalización intra-array) (Smyth and Speed, 2003), y por ajuste de cuantiles (normalización inter-array) (Bolstad et al., 2003). Tras el procesamiento de los datos, se analizaron los cambios de expresión génica con dos métodos distintos: el modelo empírico *Bayes moderated t statistic* (Smyth, 2004), y el método *Rank Products* (Breitling et al., 2004). En el caso del *Bayes moderated t statistic*, se calculó el *False Discovery Rate* (FDR) usando el método de Benjamini & Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995). El método *Rank Products* calcula el FDR automáticamente con un método similar. Para filtrar y visualizar los datos obtenidos se utilizó el programa *FIESTA* (Oliveros et al., 2007a), donde se seleccionaron los genes con FDR < 0,05.

Se analizaron los cambios de expresión de los tiempos de diferenciación: 3, 9 y 24 horas, con respecto a la situación de partida (0 horas). Los genes más significativos se compararon con los obtenidos en el análisis de las líneas celulares, y los más relevantes se validaron por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

2.3.- Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Para la obtención del ADN complementario de cadena simple (ADNc) se utilizaron cebadores de secuencia aleatoria (*random primers*, Applied Biosystems). A partir de 1 µg de ARN total se preparó un volumen final de 20 µl de reacción que posteriormente se incubó a 37°C durante 60 minutos. Posteriormente se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa

cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) en la plataforma *Step One Plus Real Time PCR System* (life technologies Co-Applied Biosystems).

2.3.1.- Ensayo con sondas TaqMan® (Applied Biosystems)

Para determinar la expresión de los genes seleccionados en los arrays se llevó a cabo la PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) mediante el uso de sondas TaqMan® (Applied Biosystems). La PCR se preparó en un volumen final de 20 µl que contenía 2 µl de solución de ADNc (correspondiente a 100 ng de ARN total), 10 µl de la mezcla *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) y 1 µl de la sonda *TaqMan Gene Expression Assay* correspondiente (Applied Biosystems) (**Tabla 4**). Como controles internos se emplearon los genes GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y β-actina.

El programa de PCR utilizado consistió en una desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

Gen	Sonda TaqMan®	Gen	Sonda TaqMan®
GAPDH	Hs03929097_g1	COX2	Hs00153133_m1
β- ACTINA	Hs99999903_m1	JUN	Hs1103582_s1
IL1B	Hs01555410_m1	AKAP12	Hs011112126_m1
LOXL2	Hs00158757_m1	CXCR4	Hs02330069_s1
ADM	Hs02562698_s1	DUSP1	Hs00610256_g1
EGR1	Hs00152928_m1	DUSP6	Hs00737962_m1
MALAT1	Hs01910177_s1	VEGFC	Hs00153458_m1

Tabla 4. Sondas TaqMan® utilizadas para qRT-PCR.

2.3.2.- Ensayo con oligonucleótidos (Sigma)

Para analizar la expresión de los marcadores de fenotipo *stem* CD44, CD166 y CD133, se llevó a cabo la PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) mediante el uso de oligonucleótidos (Sigma). La PCR se preparó en un volumen final de 20 µl que contenía 1,6 µl de solución de ADNc (correspondiente a 80 ng de ARN total), 10 µl de la mezcla *Power Sybr-Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) y 0,2 µM de oligonucleótidos (**Tabla 5**). Como control interno se empleó el gen GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

El programa de PCR utilizado consistió en una desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C, y por último, una curva de *melting* con una rampa de 55°C a 95°C midiendo cada 0,3°C.

Nombre	Primer	Oligonucleótido (5'-3')
CD44	F	AGAAGGTGTGGGCAGAAGAA
	R	AAATGCACCATTTCTGAGA
CD166	F	ATTGAAGTTTTATTTGGCAGGAA
	R	GGCTTAGCCATGCAAAACA
CD133	F	TCTCTATGTGGTACAGCCG
	R	TGATCCGGGTTCTTACCTG
GAPDH	F	GAGAGACCCTCACTGCTG
	R	GATGGTACATGACAAGGTGC

Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la RT-PCR. F: oligo directo, del inglés *forward*; R: oligo reverso, del inglés *reverse* (CD44, CD166 y CD133 cedidos por el Dr. Ángel Ayuso, Madrid).

En ambos ensayos, la cuantificación relativa de la expresión de los genes se calculó por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001). A partir de los valores de umbral de ciclo (*Cycle threshold*; Ct) obtenidos para cada gen en cada muestra tras la reacción, este método consiste en calcular la expresión normalizada del gen de estudio en la muestra problema con respecto a la expresión normalizada del mismo gen en la muestra de referencia. Los datos muestran el “cambio en veces de expresión” (RQ) de cada muestra problema con respecto a la muestra de referencia. Las barras representan la media de dos o tres experimentos independientes realizados por triplicado con sus correspondientes desviaciones estándar (D.E.).

3.- Análisis de la expresión de proteínas mediante Western Blot

3.1.- Extracción de proteínas totales

Para la extracción de proteína total procedente de las líneas celulares, las células se lavaron dos veces con PBS y se añadió sobre ellas un volumen apropiado de tampón de lisis complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma) (**Tabla 6**). Se recogieron los lisados mediante raspado en hielo y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. En el caso de la línea celular CSC, las células se recogieron en un tubo cónico y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente se añadió al sedimento un volumen apropiado de tampón de lisis complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma) (**Tabla 6**), y las células se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El contenido de proteína total de los extractos se evaluó por el método Bradford modificado (BioRad), según las instrucciones del fabricante, utilizando como control la albumina sérica bovina (BSA).

TAMPÓN DE LISIS	INHIBIDORES DE PROTEASAS Y FOSFATASAS
0,2 mM EDTA	1 µg/ml leupeptina
0,3 M NaCl	1 µg/ml aprotinina
1,5 mM MgCl ₂	0,5 mM DTT
25 mM HEPES pH 7,5	100 mM Na ₃ VO ₄
0,1% Tritón X-100	100 mM ABSF
20 mM β-Glicerofosfato	

Tabla 6. Componentes del tampón de lisis y los inhibidores de proteasas y fosfatasa añadidos por ml de tampón. DTT: ditioneitol. Na₃VO₄: ortovanadato sódico. ABSF: fluoruro de aminoetilbencenosulfonilo. Todos los inhibidores procedían de Sigma.

3.2.- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (Western Blot)

El análisis de expresión de proteínas endógenas se llevó a cabo mediante la técnica de *Western Blot (WB)*. Después de determinar la concentración de proteína, las cantidades apropiadas de cada muestra se disolvieron en tampón de carga y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C. Se analizaron 20 µg del extracto proteico total por separación electroforética en geles de poliacrilamida-SDS (con una concentración del 8, 10, 12 o 15% dependiendo del tamaño de la proteína a detectar (BioRad)) en tampón de electroforesis. Las proteínas separadas en los geles se transfirieron a una membrana de PVDF Immobilon-P (Millipore) mediante transferencia en húmedo (300 mA, 90 minutos en tampón de transferencia) y se comprobó la transferencia de las proteínas a la membrana tiñéndola con Rojo Ponceau S (Sigma).

Para llevar a cabo la inmunodetección, las membranas se bloquearon en 5% leche desnatada (Fluka) o 5% BSA (Calbiochem) disuelto en tampón de tratamiento de membrana durante 60 minutos, y se incubaron con el anticuerpo primario durante 15 horas a 4°C. Posteriormente, las membranas se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa durante 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los inmunocomplejos se visualizaron utilizando el sistema de quimioluminiscencia *ECL Western Blotting Luminol Reagent* (Santa Cruz Biotechnology), según las instrucciones del fabricante.

Para reincubar las membranas con diferentes anticuerpos primarios, se retiró el primer anticuerpo mediante tratamiento con un tampón de lavado de anticuerpos durante 30 minutos a 65°C, y se llevó a cabo de nuevo la inmunodetección como se ha descrito anteriormente.

Los niveles de proteína se relativizaron a la intensidad del control de carga utilizado (α -Tubulina). Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para *Western Blot*, así como su origen, clonalidad, dilución y procedencia se detallan en la **Tabla 7**.

Anticuerpo primario	Especie	Clonalidad	Dilución	Proveedor
Fibronectina (FN1)	Ratón	Monoclonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology (Sc-71113)
Cadherina E (CDH)	Conejo	Monoclonal	1:1000	Cell Signaling (#9782)
Vimentina (Vim)	Conejo	Policlonal	1:1000	Cell Signaling (#9782)
ZO-1	Conejo	Policlonal	1:1000	Cell Signaling (#9782)
α -tubulina	Ratón	Monoclonal	1:1000	Sigma (T9026)
Anticuerpo secundario	Especie	Clonalidad	Dilución	Proveedor
Anti-Mouse IgG (H + L)-HRP Conjugate	Cabra	Policlonal	1:2000 (FN1) 1:5000 (α -tub)	BIORAD (#170-6516)
Anti-Rabbit IgG, HRP linked antibody	Cabra	Policlonal	1:1000	Cell Signaling (#9782)

Tabla 7. Características de los anticuerpos utilizados para *western blot*.

4.- Transfección estable de líneas celulares

Para obtener células que expresaran de forma estable la proteína Cherry, se realizó una transfección con el plásmido pmCherry-N1 (Clontech Laboratories).

Se sembraron 5×10^5 células de la línea celular H460 en placas de 60 mm quedando a un 60-70% de confluencia. Transcurridas 24 horas se llevó a cabo la transfección utilizando el reactivo lipídico Lipofectamina2000 (Invitrogen) y siguiendo las indicaciones del fabricante. La cantidad de ADN plasmídico total se mantuvo constante a 1 μ g por placa con una relación ADN (μ g) : lípido (μ l) de 1:3. Las células transfectadas se seleccionaron añadiendo el antibiótico G418 (Neomicina). Finalmente, se aislaron las células con mayor expresión de la proteína Cherry mediante *Sorting* con un filtro infrarrojo en el servicio de citometría del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

5.- Infección de líneas celulares con vectores lentivirales

Para obtener células que expresaran de forma estable la proteína GFP se generaron partículas lentivirales anfotrópicas no replicativas, empleando el vector lentiviral de segunda generación pGIPZ-shRNA^{mir}-NS (Open Biosystems) que contiene una secuencia que no presenta homología con ningún gen conocido de mamíferos.

Se sembraron 1×10^7 células de la línea HEK293T/17 en placas de 100 mm, y tras 24 horas de cultivo se co-transfectaron con los siguientes plásmidos: 15 μg del vector pGIPZ-shRNA^{mir}-NS, 5 μg del plásmido empaquetador pCD-NL-BH y 5 μg del plásmido de la envuelta glicoproteica del virus de la estomatitis vesicular (VSVg) pMD2.G. La transfección se llevó a cabo con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. A las 6 y 24 horas después de la transfección se cambió el medio, y a las 48 y 72 horas se recogieron los sobrenadantes con las partículas lentivirales. Posteriormente estos sobrenadantes se pasaron por un filtro de 0,45 μm y se congelaron a -80°C .

Las células H460 se sembraron en placas de 24 pocillos (100.000 células/pocillo), y 24 y 48 horas después se infectaron con las partículas lentivirales a una MOI de 2,5 y en presencia de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de polibreno (Sigma) durante 16 horas. Las células infectadas se seleccionaron añadiendo puomicina (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) al cultivo y se confirmó la expresión de GFP observando las células con el microscopio invertido Observer Z1 acoplado a una Cámara Cascade 1k de Photometrics.

6.- Ratones

Para llevar a cabo los experimentos de este trabajo se emplearon ratones atímicos-Foxn1^{nu} (nu/nu), hembra, de cinco semanas de vida y procedentes de Harlan.

Los ratones se mantuvieron en un ambiente estéril con viruta, agua y comida esterilizada por rayos γ , y fueron alimentados *ad libitum*. Cuando se detectó cualquier signo importante de enfermedad, los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO_2 . Todos los procedimientos con los animales se llevaron a cabo según la normativa española del uso de animales de experimentación (Real Decreto 1201/2005, del 10 de octubre).

6.1.- Ensayo de tumorigénesis

En este ensayo se emplearon cuatro ratones para cada línea celular. Las células tumorales se prepararon en Matrigel (BD Biosciences) diluido 1:3 en PBS (5×10^3 ó 5×10^4 células en 100 μ l), y se inocularon subcutáneamente en los flancos de los ratones (100 μ l por flanco). Cada cantidad de células se inoculó en dos ratones. El volumen tumoral fue medido 3 veces por semana desde su aparición visible (volumen inicial 0,014 cm^3) calculándose según la ecuación $V = (l \cdot w^2 \cdot 0,52)$, donde l es el diámetro mayor del tumor y w el diámetro menor. Los ratones fueron sacrificados cuando el volumen del tumor en el flanco alcanzó los 2,5-3 cm^3 .

6.2.- Ensayo de competencia celular

En este ensayo se emplearon dos ratones para cada mezcla de células GFP-Cherry. Las células tumorales se prepararon en Matrigel (BD Biosciences) diluido 1:3 en PBS (n° células total = 1×10^5 en 100 μ l), y se inocularon de forma subcutánea en ambos flancos (100 μ l por flanco). El volumen tumoral fue medido 3 veces por semana desde su aparición visible (volumen inicial 0,014 cm^3) calculándose según la ecuación descrita en el apartado anterior. Los ratones fueron sacrificados a los 30 días, y los tumores se extrajeron y fijaron con formaldehído (4% en solución de tampón fosfato) durante 24 horas. A continuación se sumergieron en un gradiente de sacarosa (del 15% al 30%) en PBS, se incluyeron en OCT (*Optimal Cutting Temperature*) y se congelaron a -80°C . Posteriormente se cortaron secciones de 10 μm de los bloques congelados con el criostato CM1950 (Leica) y se montaron con el reactivo Vectashield (ATOM) para analizarlas con el microscopio de fluorescencia Nikon ECLIPSE 90i. Se tomaron 10 campos elegidos al azar en cada una de las muestras, y se determinó la proporción de cada tipo celular como porcentaje de eventos coloreados en verde (GFP) o rojo (Cherry) por campo. Para la cuantificación se utilizó el software ImageJ (*National Institutes of Health*; NIH, USA). Cada canal fue grabado independientemente y las imágenes se generaron por superposición.

6.3.- Ensayo de angiogénesis

En este ensayo se emplearon dos ratones para cada línea celular. Se inyectaron en ambos flancos 30 μg de proteínas de medio condicionado de las líneas celulares, embebidas en una matriz de Matrigel (BD Biosciences) (volumen final: 300 μ l). Se utilizaron FGF-b (1 $\text{ng}/\mu\text{l}$) y PBS como controles positivo y negativo, respectivamente. Los ratones fueron sacrificados a los 10 días, y las muestras de matrigel gelificado se extrajeron y se sumergieron en un gradiente

de sacarosa (del 15% al 30%) en PBS. Posteriormente se incluyeron en OCT (*Optimal Cutting Temperature*) y se congelaron a -80°C.

6.3.1.- Inmunofluorescencia

La microvascularización se analizó mediante la tinción de secciones de 10 µm de matrigel congelado cortados con el criostato CM1950 (Leica). Después de fijar a -20°C con acetona, acetona-cloroformo (1:1) y acetona, y bloquear con BSA (3% en PBS), las secciones se incubaron con el anticuerpo monoclonal de rata anti-CD31 de ratón (BD Pharmingen) diluido (1:100) en BSA (3% en PBS) durante toda la noche a 4°C. Tras los correspondientes lavados con PBS, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de rata, conjugado con Alexa 546 (Molecular Probes) diluido (1:500) en BSA (3% en PBS) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente las secciones se tiñeron 5 minutos con 1 µg/mL de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) para la detección de los núcleos, y se lavaron y montaron con el reactivo Vectashield (ATOM). Las preparaciones se analizaron con el microscopio de fluorescencia Nikon ECLIPSE 90i. Se tomaron 20 campos elegidos al azar en cada una de las muestras, y se determinó la densidad microvascular como eventos positivos por área. Para la cuantificación se utilizó el software ImageJ (*National Institutes of Health; NIH, USA*). Cada canal fue grabado independientemente y las imágenes se generaron por superposición.

6.4.- Ensayo de metástasis

Para este ensayo se emplearon 45 ratones distribuidos en cuatro grupos experimentales, según las líneas celulares utilizadas. Las células tumorales se resuspendieron en suero fisiológico (0.9% NaCl en agua MiliQ) (n° células total = 1×10^6 células en 100 µl), y se inocularon por vía intravenosa en la cola de los ratones. Posteriormente se registró a diario cualquier anomalía externa y el peso de los animales, que se sacrificaron cuando presentaron signos evidentes de enfermedad.

6.4.1.- Necropsia y análisis histopatológico

Tras la muerte de cada animal se llevó a cabo la necropsia completa. Los órganos torácicos y abdominales se extrajeron en un solo bloque y se analizó la presencia de tumores macroscópicos en cada órgano. Se midió cada foco de tumor y quedó registrada la presencia de cualquier otra anomalía macroscópica. El cerebro y la glándula salival se extrajeron y procesaron de la misma manera que el paquete visceral. Todos los órganos se fijaron en formaldehído (4% en solución de tampón fosfato) durante 24 horas. Los pulmones fueron

perfundidos previamente con formaldehído para eliminar el aire residual. Tras la fijación, el paquete visceral se fotografió con la cámara digital Nikon Coolpix 5700. Posteriormente, los órganos se diseccionaron del bloque y se embebieron en parafina. Por último, se obtuvieron secciones de 5 µm de grosor de cada bloque y se tiñeron con Hematoxilina/Eosina (H&E) para su estudio. El análisis histopatológico fue realizado por el grupo de Dr. Federico Rojo en el Servicio de Anatomía Patológica de la Fundación Jiménez-Díaz (Madrid).

En el caso de los ratones inoculados con mezcla de células GFP- Cherry, tras la fijación, los órganos se sumergieron en un gradiente de sacarosa (del 15% al 30%) en PBS, se incluyeron en OCT (*Optimal Cutting Temperature*) y se congelaron a - 80°C. Posteriormente se cortaron secciones de 10 µm de todos los órganos con el criostato CM1950 (Leica) y se montaron con el reactivo Vectashield (ATOM) para analizarlas con el microscopio de fluorescencia Nikon ECLIPSE 90i.

6.4.2.- Análisis histológico del hueso

El procesamiento de los huesos de los ratones fue realizado por el Dr. Ander Abarrategi en el Servicio de Histología del Área de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Salud Carlos III (Madrid).

Ambos fémures se fijaron con formaldehído (4% en solución de tampón fosfato) durante 24 horas y después se mantuvieron a 4°C con etanol al 70%. Las muestras se descalcificaron en una solución de ácido clorhídrico y ácido fórmico (ambos al 4% en agua) durante 5 días, con cambio de medio cada 24 horas. Posteriormente se pasaron a etanol al 70% hasta su inclusión en parafina. Por último se realizaron cortes de 5 µm de espesor y se tiñeron con Hematoxilina/Eosina (H&E).

7.- Muestras de pacientes con CNMP

Las muestras humanas utilizadas en este trabajo procedían de pacientes con CNMP en estadios quirúrgicos del Hospital Universitario La Paz.

7.1.- Procesamiento de muestras quirúrgicas

Las muestras se recogieron en medio DMEM/Mix F12 Ham (Sigma) tras la cirugía y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento. Primero se llevó a cabo una digestión enzimática con Colagenasa (0,3 mg/ml) e Hialuronidasa (125 U/ml) (ambas procedentes de Sigma) durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente se realizó una disgregación mecánica por trituración con un cazo y un pistilo (ambos procedentes de Sigma), y finalmente la muestra disgregada se pasó por una malla (Sigma) y se recogió en un tubo cónico de 15 ml. El volumen recogido finalmente se separó a partes iguales para el ensayo de viabilidad celular y el aislamiento de células CSC.

7.1.1.- Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad de las muestras frente a los agentes antitumorales CDDP y Erlotinib (Tarceva®) se llevó a cabo mediante el ensayo colorimétrico (MTS) descrito en el apartado 1.3.2.

7.1.2.- Aislamiento de células CSC

Para aislar células CSC, las muestras disgregadas se sembraron en medio DMEM/F-12 [1:1] (Gibco) en placas no adherentes de 12 pocillos, y se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar de 37°C de temperatura, 95% de humedad y 5% de presión de CO₂, durante un máximo de 30 días. Pasado ese tiempo, las muestras que no habían formado esferas fueron descartadas.

7.2.- Análisis de la expresión génica en muestras de pacientes con CNMP

7.2.1.- Extracción de ARN total

La extracción de ARN de las muestras de pacientes se realizó a partir de secciones de material congelado en OCT. La extracción, purificación y posterior cuantificación del ARN se llevó a cabo tal y como se ha descrito en el apartado 2.1.

7.2.2.- Estudio de los perfiles de expresión génica mediante el uso de microarrays.

La hibridación y posterior análisis de los perfiles de expresión génica de las muestras de pacientes, se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, Madrid) tal y como se ha descrito en el apartado 2.2 (B).

Se compararon los perfiles de expresión génica de cuatro muestras Resistentes y tres muestras Muy Sensibles a Erlotinib, y se seleccionaron los genes más significativos con un FDR < 0,1, que posteriormente fueron validados por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

7.2.3.- Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Se obtuvo ADN complementario de cadena simple (ADNc) a partir de 1 µg de ARN total, utilizando el *High Capacity RNA-to-cDNA Kit* (Applied Biosystems), en un volumen final de 20 µl, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para determinar la expresión de los genes seleccionados en los arrays se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) mediante el uso de sondas TaqMan® (Applied Biosystems) en la plataforma HT7900 de Applied Biosystems. La reacción de PCR se preparó en un volumen final de 20 µl que contenía 2 µl de solución de ADNc (correspondiente a 100 ng de ARN total), 4 µl de la mezcla *5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus* (GenyCell) y 1,25 µl de la sonda *TaqMan Gene Expression Assay* correspondiente (Applied Biosystems) (**Tabla 8**). Como control interno se utilizó el gen GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). El programa de PCR utilizado consistió en una desnaturalización a 95°C durante 15 minutos, y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

Gen	Sonda TaqMan®
GAPDH	Hs03929097_g1
MMP1	Hs00899658_m1
AREG	Hs00950669_m1
MET	Hs01565584_m1
IGF2	Hs04194920_g1

Tabla 8. Sondas TaqMan® utilizadas para la qRT-PCR de las muestras de pacientes.

7.3.- Estudio de las mutaciones del receptor de EGF (EGFR)

7.3.1.- Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico de las muestras de pacientes se realizó a partir de secciones de parafina. Las muestras se trataron con Xilol para eliminar los restos de parafina, y

a continuación se llevó a cabo la extracción y cuantificación del ADN tal y cómo se ha descrito en el apartado 1.8.

7.3.2.- PCR semicuantitativa

Para determinar las mutaciones en el exón 19 y para amplificar el exón 21 del receptor de EGF, se llevó a cabo una PCR semicuantitativa a partir de 1 µg de ADN genómico. El programa de PCR utilizado consistió en una desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 54°C y 1 minuto a 72°C, y por último, una elongación final de 8 minutos a 72°C. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se indica en la **Tabla 9**.

Nombre	Primer	Oligonucleótido (5'-3')
Exón 19	F	GTGCATCGCTGGTAACATCC
	R	CATAGAAAGTGAACATTTAGGATGTG
Exón 21	F	CTAACGTTCCGCCAGCCATAAGTCC
	R	GCTGCGAGCTCACCCAGAATGTCTGG

Tabla 9. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los exones 19 y 21 del receptor de EGF. F: oligo directo, del inglés *forward*; R: oligo reverso, del inglés *reverse* (Molina-Vila et al., 2008).

El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa (1% p/v) teñido con SYBR® Safe (Gibco) diluido (1:20000). Para estudiar las mutaciones del exón 19, el producto de PCR fue secuenciado con el secuenciador automático ABI 3130XL y la presencia o no de mutaciones se determinó *de visu* sobre la secuencia de ADN obtenida. En el caso del exón 21, el producto de PCR se empleó posteriormente para el ensayo de discriminación alélica.

7.3.3.- Discriminación alélica

Para determinar las mutaciones de los exones 20 y 21 se llevó a cabo un ensayo de discriminación alélica a partir de 25 ng de ADN genómico (exón 20) ó 2 µl de producto de PCR (exón 21) (Molina-Vila et al., 2008). Para ello se utilizó el *Step One Plus Real Time PCR System* (life technologies Co-Applied Biosystems). El programa de PCR utilizado consistió en una desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. La secuencia de los oligonucleótidos y sondas TaqMan® utilizados en este ensayo se indican en la **Tabla 10**.

Nombre	Primer	Sonda	Oligonucleótido (5'-3')
Exón 20	F	-	AGGCAGCCGAAGGGCA
	R	-	CCTCACCTCCACCGTGCA
	-	FAM	TGAGCTGCATGATGA
	-	VIC	TGAGCTGCCTGATGA
Exón 21	F	-	AACACCGCAGCATGTCAAGA
	R	-	TTCTCTTCCGCACCCAGC
	-	FAM	CAGATTTTGGGCGGGCCAAAC
	-	VIC	TCACAGATTTTGGGCTGGCCAAAC

Tabla 10. Secuencia de los oligonucleótidos y sondas TaqMan® utilizados para el ensayo de discriminación alélica de los exones 20 y 21 del receptor de EGF. F: oligo directo, del inglés *forward*; R: oligo reverso, del inglés *reverse*. Los fluorocromos FAM y VIC estaban anclados en el extremo 5' de las sondas (Molina-Vila et al., 2008).

7.4.- Consideraciones éticas

Todos los pacientes con CNMP cuyas muestras fueron utilizadas para la realización de este trabajo firmaron el correspondiente consentimiento informado, y el uso de estas muestras fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario de La Paz (Madrid).

8.- Análisis estadístico

Los datos mostrados en el presente trabajo representan la media \pm la desviación estándar (D.E.) de al menos tres experimentos independientes. Para el cálculo de la significación estadística en las líneas celulares se utilizó el test t de *Student* para distribuciones normales de dos colas y datos no pareados con igualdad de varianzas. Se consideraron estadísticamente significativos valores de p menores de 0,05 (*) y 0,01 (**).

Para el cálculo de la significación estadística en las muestras de los pacientes se realizó una prueba Chi-cuadrado (X^2) y se consideró estadísticamente significativo un valor de p menor de 0,05.

RESULTADOS

1.- GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES RESISTENTES A CISPLATINO A PARTIR DE LÍNEAS CELULARES DE CNMP

Diversos estudios en diferentes sistemas celulares han demostrado que el tratamiento con CDDP induce desarrollo de resistencia a quimioterapia en algunos tumores, entre ellos el CNMP (Bertolini et al., 2009; Ibanez de Caceres et al., 2010; Jayachandran et al., 2010; Mitsumoto et al., 1998; Wintzell et al., 2012). En muchos de estos estudios se realizaron tratamientos repetidos y prolongados con CDDP para generar las líneas resistentes. Por este motivo, y para aproximarnos más a las pautas de los tratamientos clínicos, decidimos en primer lugar estudiar el efecto del tratamiento con una única dosis de CDDP, en dos líneas celulares diferentes derivadas de CNMP: H460, que procede de un fluido pleural de carcinoma y A549, procedente de un carcinoma (ATCC).

Una vez conocida la respuesta que presentaba cada línea celular al fármaco, decidimos tratar las células con única dosis de CDDP superior al valor de la IC₅₀ correspondiente en cada caso.

Línea celular	IC ₅₀ para CDDP (µg/ml)	Concentración selectiva para CDDP (µg/ml)	Tiempo de reposo (días)
H460	0.3	0.5	21
A549	0.75	2.5	15

Tabla 11. Tratamiento de las líneas celulares con CDDP. Comparativa de las IC₅₀ de cada una de las líneas frente a la dosis de tratamiento, y los días de reposo tras la exposición al fármaco en cada caso.

Tras una incubación de 72h con el fármaco, se observó el crecimiento (**Figura 6**) y la viabilidad de las células tratadas, estimada 3 y 15 o 21 días después del tratamiento (**Figura 7**). Durante el periodo de reposo, las células se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar, sin tripsinizar y añadiendo medio nuevo dos veces por semana.

Como se observa en la **Figura 7**, tras el tratamiento con el fármaco las células fueron más resistentes a CDDP que las células parentales. Este patrón de resistencia fue mayor durante las primeras horas, y fue disminuyendo con el paso de los días hasta estabilizarse al finalizar el periodo de reposo, quedándose, en ambos casos, por encima de las células parentales. Además, este grado de resistencia alcanzado por las líneas celulares R0.5µg y R2.5µg a los 21 y 15 días,

Resultados

respectivamente, se mantuvo constante tras varios pases celulares, e incluso tras la congelación y descongelación de las células.

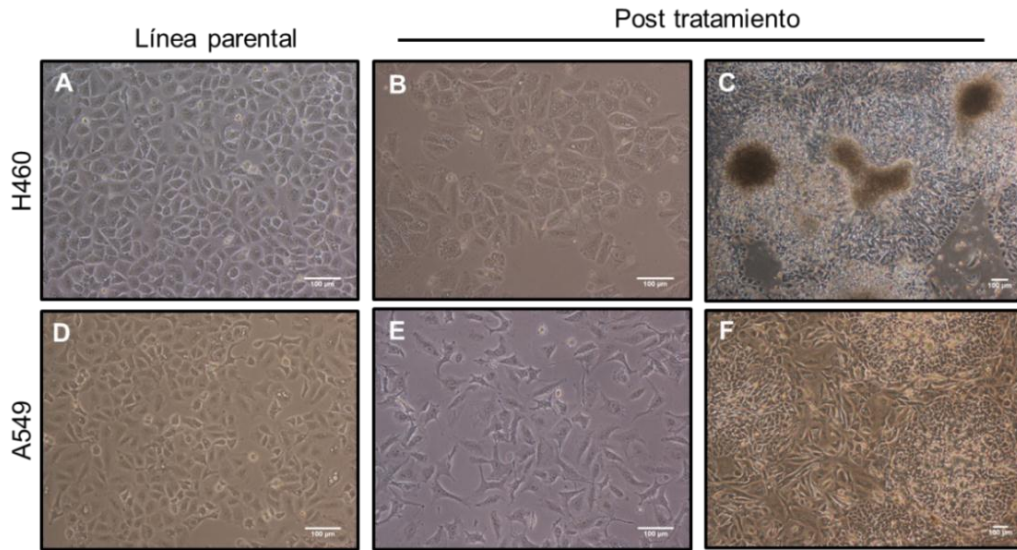


Figura 6. Morfología de las líneas celulares resistentes a CDDP generadas a partir de células H460 y A549. **A-C:** Generación de la línea resistente R0.5µg a partir de células H460. **(A)** H460 parental; **(B)** H460 tras 72h de tratamiento con 0.5 µg/ml de CDDP (día 0); **(C)** R0.5µg después de 21 días de reposo tras el tratamiento. **D-F:** Generación de la línea resistente R2.5µg a partir de células A549. **(D)** A549 parental; **(E)** A549 tras 72h de tratamiento con 2.5 µg/ml de CDDP (día 0); **(F)** R2.5µg después de 15 días de reposo tras el tratamiento. **A, B, D y E:** Objetivo 10x. **C y F:** Objetivo 4x. Escala 100µm.

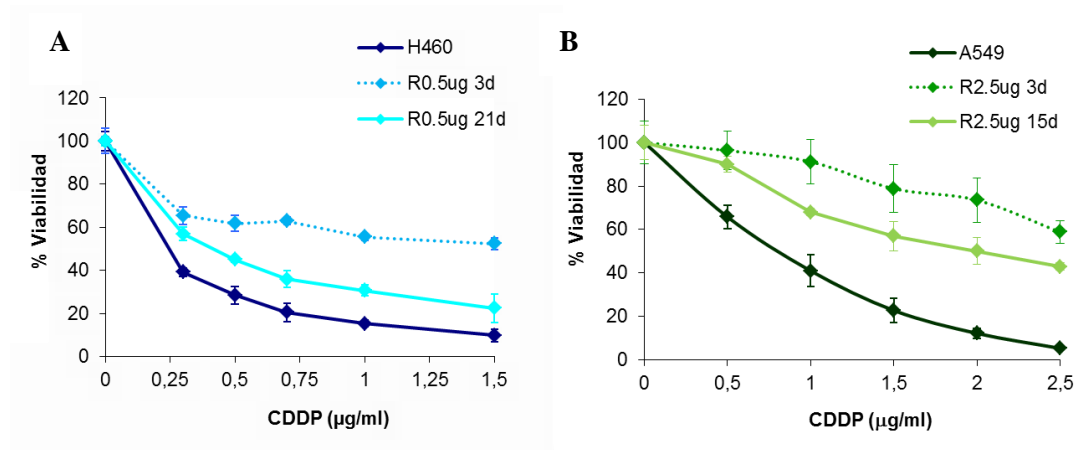


Figura 7. Viabilidad de las líneas celulares en respuesta al tratamiento con CDDP. Células H460 y A549 se trataron 72h con CDDP y posteriormente se cultivaron en ausencia de la droga durante 3 (3d), 15 (15d) ó 21 días (21d). Posteriormente se determinó el porcentaje de células viables en presencia de distintas concentraciones de CDDP mediante ensayos de cristal violeta y MTS. **(A)** H460 y R0.5µg. **(B)** A549 y R2.5µg. Los datos representan la media ± D.E. (desviación estándar) de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

2.- CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS CON FENOTIPO DE *CANCER STEM CELLS* (CSC) AISLADAS A PARTIR DE LÍNEAS CELULARES DE CNMP

2.1.- Cultivo de células en condiciones no adherentes

Una de las propiedades de las células iniciadoras tumorales o *cancer stem cells* (CSC), es que son capaces de crecer en un medio libre de suero, suplementado con factores de crecimiento, y en placas de cultivo no adherentes. En estas condiciones, las células CSC forman esferas (Dalerba et al., 2007b; Lim et al., 2011). De acuerdo con esto, las células H460 y A549 se sembraron con medio CSC en placas no adherentes y se observó la formación de estas esferas (**Figura 8**).

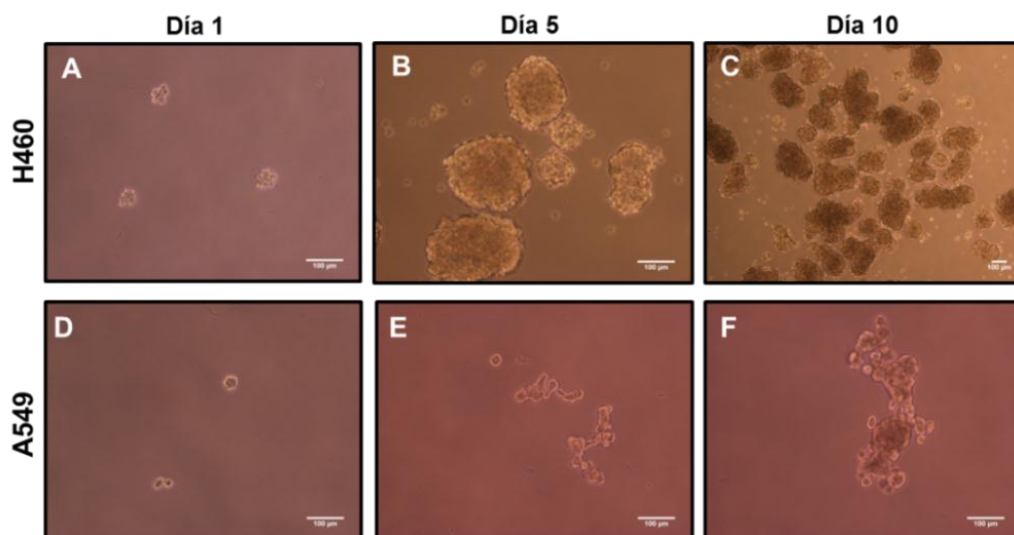


Figura 8. Formación de esferas a partir de las líneas celulares H460 y A549. Las células se sembraron en medio libre de suero (FBS) y bajo condiciones no adherentes para observar la formación de esferas. Fotos representativas del crecimiento de las esferas en cada línea celular después de 5 y 10 días de cultivo. **A-C:** Esferas crecidas a partir de la línea celular H460. **D-F:** Esferas crecidas a partir de la línea celular A549. **A, B, D, E y F:** Objetivo 10x. **C:** Objetivo 4x. Escala 100µm.

La **Figura 8** muestra como en ambas líneas celulares existe una población de células capaces de crecer en suspensión, aunque ésta es notablemente mayor en la línea H460. Esta cualidad de crecer sin necesidad de adherencia al sustrato, es propia de las células madre o *stem*. Otra forma de verificar este resultado, es cultivar las células embebidas en una matriz de agar blando (*soft-agar*). Como podemos ver en la **Figura 9**, las células que crecen en un medio libre de suero (medio CSC), tienen mayor capacidad de crecer embebidas en el agar que las células que crecen

Resultados

en un medio suplementado con FBS al 10%. Esta diferencia es estadísticamente significativa en la línea celular H460 ($p < 0,05$), y está de acuerdo con el hecho de que estas células formaran esferas más eficientemente cuando las cultivamos en suspensión.

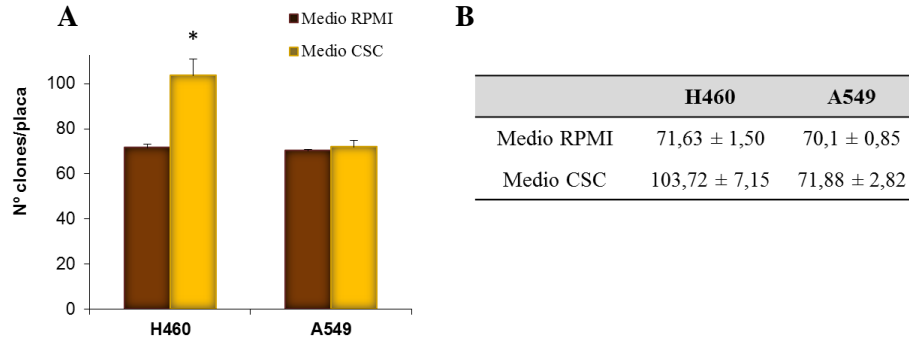


Figura 9. Crecimiento en agar blando (*soft-agar*). Las células H460 y A549 se prepararon en una mezcla de medio de cultivo con agar noble al 0,33% y se vertieron sobre una base de agar noble al 0,5%. Ambas líneas celulares se sembraron en paralelo en placas con medio RPMI (medio estándar de las células adherentes) y en placas con medio CSC (medio que favorece el crecimiento de células CSC). Tras 10 días de incubación, las placas se tiñeron con cristal violeta y los clones formados se cuantificaron al microscopio. (A) Las barras representan la media \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por duplicado. *: $p < 0,05$. (B) Valores numéricos de los datos representados en A.

Por otro lado, nos interesaba demostrar que las esferas que estaban creciendo no se formaban por la agrupación de varias células, sino a partir de una única célula. Dado que se ha descrito que las células CSC poseen la capacidad de auto-renovación (Clarke et al., 2006; Dalerba et al., 2007a), decidimos llevar a cabo un ensayo clonogénico (Figura 10). Así observamos que, en ambas líneas celulares, más del 50% de las células eran capaces de formar esferas, y en el caso de la línea H460, ese porcentaje superaban incluso el 90%.

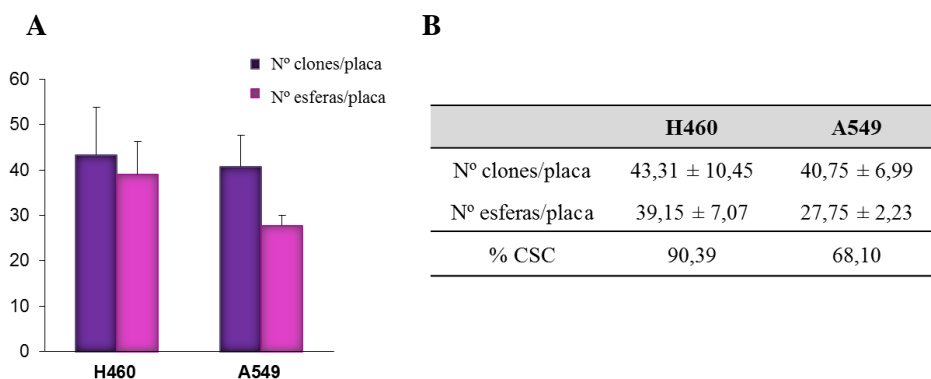


Figura 10. Ensayo de capacidad clonogénica. Las líneas celulares H460 y A549 se sembraron en paralelo en placas adherentes y no adherentes (0.5 células/pocillo) y se mantuvieron en cultivo durante 10 días. Posteriormente se cuantificó el número de clones crecidos en condiciones adherentes, y las esferas formadas en condiciones no adherentes. (A) Las barras representan la media \pm D.E. de diez experimentos independientes realizados por duplicado. (B) Valores numéricos de los datos representados en A.

Estos resultados muestran que podemos aislar células con características de células iniciadoras tumorales o CSC, creciendo las líneas celulares H460 y A549 en un medio de cultivo restrictivo, tal y como se ha descrito previamente en varias líneas celulares tumorales (Clarke et al., 2006; Collins et al., 2005; Dalerba et al., 2007b; Lim et al., 2011).

2.2.- Caracterización *in vitro* de las células con fenotipo CSC

Una vez aisladas las células CSC, decidimos caracterizar un poco más a fondo el comportamiento de estas células. Para ello lo primero que hicimos fue estudiar la viabilidad celular en respuesta a CDDP.

Como observamos en la **Figura 11**, las células CSC procedentes de ambas líneas celulares (H460 y A549) fueron más resistentes a CDDP que las líneas parentales y las líneas resistentes generadas previamente. De hecho, las curvas de viabilidad de las células CSC son muy similares a las que observamos en las líneas resistentes durante los primeros días de reposo tras el tratamiento con CDDP (**Figura 7**). Estos resultados sugieren que existe relación entre la resistencia al fármaco y el fenotipo de las células CSC.

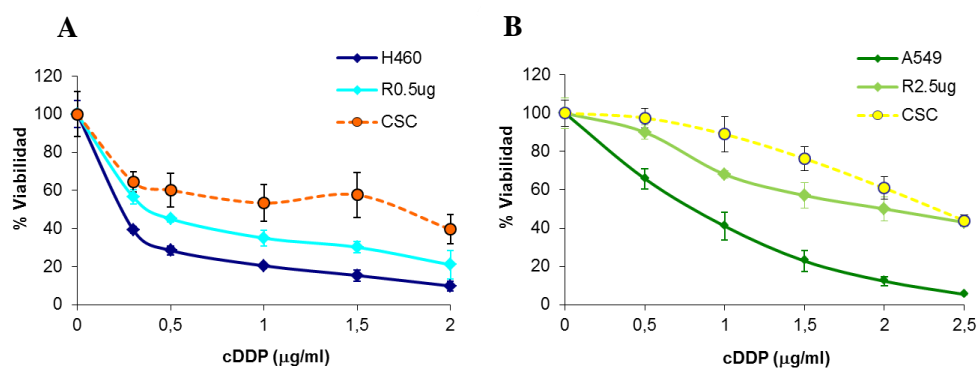


Figura 11. Viabilidad de las células CSC en respuesta al tratamiento con CDDP. Dado que estas células crecen en suspensión, para determinar el porcentaje de células viables se realizaron ensayos de MTS. (A) H460, R0.5µg y H460 CSC. (B) A549, R2.5µg y A549 CSC. Los datos representan la media \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

Por otro lado, dado que hemos visto que el porcentaje de células que forman esferas es bastante mayor en la línea H460 (**Figuras 9 y 10**), y que representa un porcentaje bastante alto dentro de la línea celular, nos planteamos si esto podía ser debido a que las propias células secretaran factores de crecimiento que favorecieran la proliferación de las células adyacentes, y que las permitieran proliferar en ausencia de los factores de crecimiento EGF y FGF-b, añadidos habitualmente al medio de cultivo. Para estudiar esto, sembramos ambas líneas celulares (H460 y A549) en medio y condiciones de células CSC, y en presencia o ausencia de factores de crecimiento EGF y FGF-b.

Resultados

La **Figura 12A y 12B** muestra que las células H460 CSC crecen sin problemas tanto en presencia como en ausencia de EGF y FGF-b, a diferencia de las células A549 CSC que son más dependientes de estos factores para proliferar. De hecho, las esferas de las células A549 que crecen en ausencia de factores tienden a adherirse a la placa y a diferenciar.

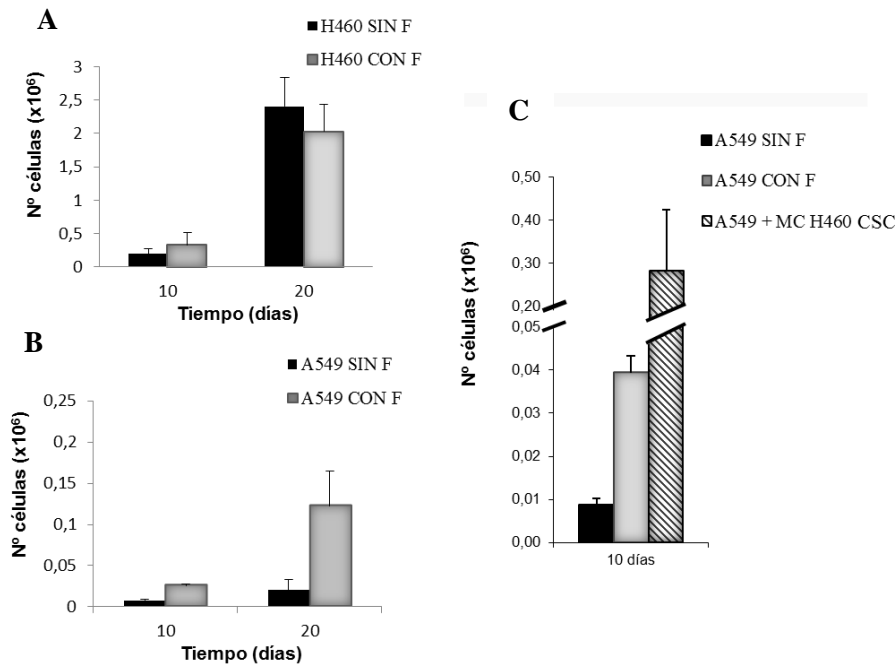


Figura 12. Crecimiento de las células CSC en presencia o ausencia de factores de crecimiento EGF y FGF-b. **A y B:** Las líneas celulares H460 y A549 se sembraron en condiciones de células CSC en presencia o ausencia de EGF y FGF-b, y se cuantificó el número de células tras 10 y 20 días de cultivo. **(A)** H460; **(B)** A549. **(C)** Las células H460 se sembraron en medio CSC y después de 10 días de cultivo se recogió el medio condicionado (MC). Posteriormente se sembraron las A549 con el MC de las células CSC procedentes de la línea celular H460, y se mantuvieron en cultivo 10 días. En el mismo experimento sembramos las células A549 con y sin factores de crecimiento como control. CON F: medio CSC con factores de crecimiento. SIN F: medio CSC sin factores de crecimiento. Las barras representan la media \pm D.E. de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

A raíz de estos resultados, nos planteamos si el crecimiento de las células H460 en ausencia de factores EGF y FGF-b podía ser debido a que secretaran al medio otros factores de crecimiento, de forma que también podrían favorecer la proliferación de otras células. Por ello, decidimos generar medio condicionado de las células H460 CSC y sembramos las células A549 con ese medio (**Figura 12C**). Lo que observamos fue que las células A549 CSC, no sólo dejaron de adherirse al sustrato y diferenciar, sino que crecieron mucho más, y además, morfológicamente empezaron a parecerse a las células H460 CSC. El control negativo, consistente en el cultivo del medio condicionado, no presentaba ninguna célula al inicio del

experimento ni se observó crecimiento alguno tras los 10 días de cultivo, corroborando que no había células H460 en el medio condicionado.

Estos datos concuerdan con lo que hemos visto anteriormente y refuerzan la idea de que las células CSC generadas a partir de la línea celular H460 presentan más características propias de células iniciadoras tumorales.

En vista de estos resultados obtenidos en la línea celular H460 y teniendo en cuenta la relación que aparentemente existe entre resistencia y fenotipo CSC, decidimos llevar a cabo un ensayo de invasión en matrigel con las líneas celulares H460, R0.5 μ g y H460 CSC.

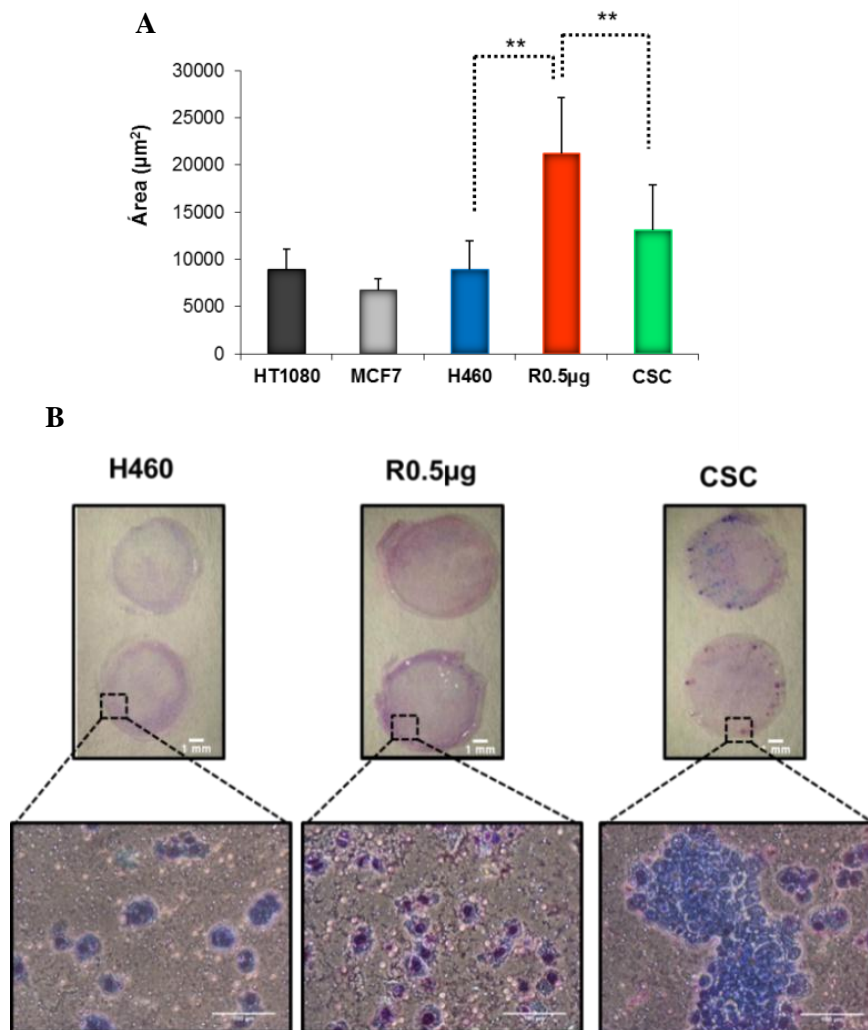


Figura 13. Invasión celular en matrigel. Las líneas celulares H460, R0.5 μ g y H460 CSC se sembraron en cámaras de invasión, y la capacidad invasiva de las células se determinó con la cuantificación de las células retenidas en el filtro de matrigel (A) Se tomaron 10 campos elegidos al azar en cada uno de los filtros y se determinó el área teñida (μm^2) en cada caso, representándose la media \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las líneas HT1080 y MCF7 se utilizaron como control positivo y negativo, respectivamente. **:p < 0,01. (B) **Panel superior:** Fotos representativas de los filtros de matrigel de cada línea celular. Objetivo 1x. Escala 1mm. **Panel inferior:** Amplificación representativa de los filtros. Objetivo 20x. Escala 100 μ m.

La **Figura 13A** muestra un claro aumento de la capacidad invasiva de las células resistentes R0.5 μ g frente a las células H460 y las células CSC ($p < 0,01$). Cabría esperar que las células CSC mostraran un comportamiento similar a las células resistentes pero no fue lo que observamos cuando cuantificamos las células retenidas en los filtros. Sin embargo, sí observamos que las células CSC tienden a invadir el matrigel en forma de esferas, lo que puede provocar que a la hora de elegir campos al azar para la cuantificación, se tomen fotos de campos muy vacíos o, por el contrario, fotos como la que se muestra en el panel inferior de la **Figura 13B**, que muestra una esfera atravesando el filtro. Así, puede que no estemos comparando correctamente la capacidad invasiva de las células R0.5 μ g y las células CSC. Puesto que las esferas son estructuras tridimensionales, probablemente estamos perdiendo información sobre las células que quedan por encima y por debajo del filtro, y que también lo están atravesando.

2.3.- Análisis de la expresión de marcadores de resistencia y de fenotipo CSC

- Análisis con *microarrays* de expresión

Una vez caracterizado el comportamiento de las células CSC, decidimos estudiar los posibles cambios en la expresión génica de estas células. Para ello, llevamos a cabo un estudio comparativo de las líneas celulares H460, R0.5 μ g y CSC, en el cuál, comparamos por un lado H460 vs. R0.5 μ g, y por otro, H460 vs. CSC. En ambos casos seleccionamos los genes más significativos con $FDR < 0,05$, y analizamos los genes comunes en ambas comparaciones. La **Figura 14** muestra un diagrama de Venn con el número de genes que aumentaban o disminuían su expresión en cada línea celular, así como los genes comunes a ambas líneas, y resulta llamativo el número relativamente alto de genes co-regulados en las células R0.5 μ g y las células CSC. Así, seleccionamos 6 de los 13 genes que aumentaban su expresión en ambas líneas celulares con respecto a la línea celular H460 (ADM, EGR1, MALAT1, COX2, JUN y AKAP12) para validar su expresión por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) (**Tabla 12**).

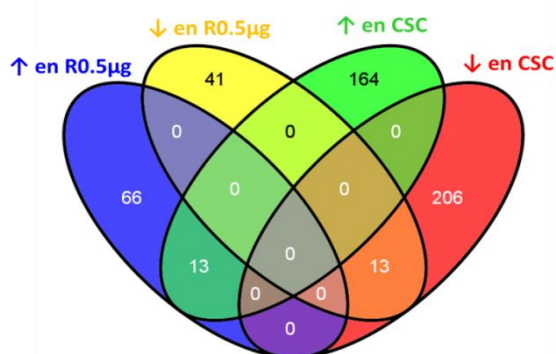


Figura 14. Diagrama de Venn de los genes obtenidos en los *microarrays*. Esquema comparativo de los genes significativos con $FDR < 0,05$ obtenidos en las dos comparaciones realizadas. El diagrama muestra el número de genes sobreexpresados e inhibidos en cada línea celular, así como los genes comunes a ambas líneas.

Asimismo, nos planteamos si al diferenciar las células CSC podríamos inhibir la expresión de estos genes y recuperar el fenotipo observado en las células H460. Para ello, después de crecer las esferas de la línea celular H460 durante 10 días en el medio y condiciones habituales de las células CSC, decidimos sembrarlas en placas adherentes con RPMI 10%FBS (medio habitual de las células H460) para realizar un ensayo cinético en el tiempo y comparar así los posibles cambios de expresión a distintos tiempos de diferenciación. Después analizamos mediante *microarrays* los cambios producidos a las 3, 9 y 24 horas con respecto a las células CSC sin diferenciar (0 horas), y seleccionamos cuatro genes con $FDR < 0,05$ que aparecían sobreexpresados en las células CSC (resultados del análisis anterior), e inhibidos en las células CSC diferenciadas (IL1B, CXCR4, LOXL2 y ADM) (**Tabla 12**). De estos genes, IL1B y CXCR4 cambiaban a partir de las 9 horas de diferenciación, mientras que LOXL2 y ADM sólo se identificaron tras 24 horas de diferenciación.

La validación por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) nos permitió confirmar que cuatro de los seis genes seleccionados en el primer análisis aumentaban de forma significativa su expresión tanto en la línea celular R0.5 μ g como en las células CSC ($p < 0,01$) (**Figura 15**), mientras que los otros dos genes únicamente se sobreexpresaban en las células CSC (ADM, $p < 0,05$; JUN, $p < 0,01$). En cuanto a las células CSC diferenciadas, observamos que los cuatro genes estudiados inhibían su expresión respecto a las células CSC ($p < 0,05$), recuperando en parte el patrón observado por la línea celular H460. También estudiamos en estas células los niveles de expresión de los genes seleccionados en el primer análisis, y observamos que, en todos los casos, había una disminución significativa de la expresión con respecto a las células CSC ($p < 0,05$) (**Figura 15**).

Gen	N° de acceso	Descripción	Cambio de expresión (R0.5µg)	Cambio de expresión (CSC)	Cambio de expresión (CSC difer)
EGR1	NM_001964	Early growth response 1	38,08	12,78	-
JUN	NM_002228	Proto-oncogene	13,39	13,27	-
PTGS2/COX2	NM_000963	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2/ Cyclooxygenase 2	4,62	17,84	-
MALAT1	NR_002819	Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1	8,59	5,15	-
AKAP12	NM_144497	Kinase (PRKA) anchor protein 12	3,51	7,16	-
ADM	NM_001124	Adrenomedullin	5,13	5,6	-4,8
CXCR4	NM_001008540	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	-	8,02	-7,5
IL1B	NM_000576	Interleukin 1, beta	-	8,73	-5,1
LOXL2	NM_002318	Lysyl oxidase-like 2	-	6,72	-8,2

Tabla 12. Genes seleccionados en los *microarrays* con FDR < 0,05. Se analizaron los perfiles de expresión de H460 vs. R0.5µg, y H460 vs. CSC. Se pusieron en común los genes significativos de ambos análisis, y se seleccionaron seis genes comunes que se sobreexpresaban en las células R0.5µg y CSC. A continuación analizamos los cambios de expresión de las células CSC durante el proceso de diferenciación, e identificamos cuatro genes que se sobreexpresaban en las células CSC, pero que resultaron inhibidos en las células CSC diferenciadas (CSC difer).

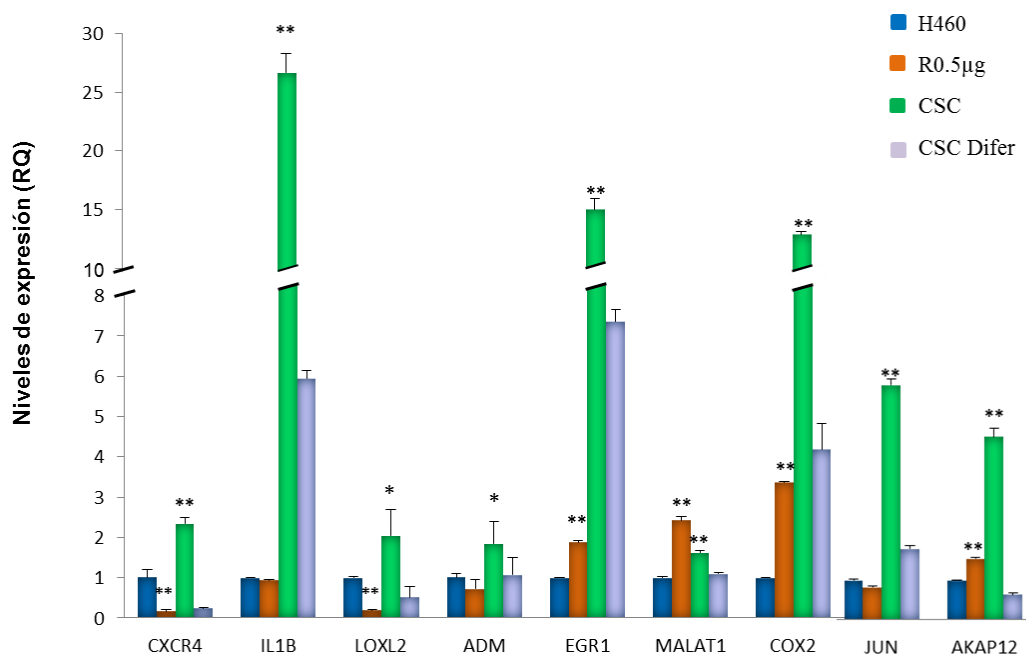


Figura 15. Expresión de los genes CXCR4, IL1B, LOXL2, ADM, EGR1, MALAT1, COX2, JUN Y AKAP12 en las líneas celulares H460, R0.5µg, CSC y CSC diferenciadas (CSC Difer). Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) de los genes seleccionados en los *microarrays*. Se muestran los niveles relativos de ARNm respecto a la línea H460, normalizados frente a los valores de GAPDH (gen endógeno). Las barras representan la media ± D.E. de dos experimentos independientes realizados por triplicado. *:p < 0,05; **:p < 0,01.

Por otro lado, en nuestro laboratorio se había descrito previamente que la inhibición de la expresión de la fosfatasa dual DUSP1 disminuye significativamente la capacidad tumorigénica de la línea celular H460 (Moncho-Amor et al., 2011), y aumenta la sensibilidad a CDDP (Chattopadhyay et al., 2006). Esta fosfatasa está implicada en procesos de angiogénesis, proliferación, migración e invasión celular, y en este trabajo se identificaron una serie de genes que disminuían notablemente su expresión cuando se inhibía DUSP1. Entre ellos encontramos DUSP6, miembro de la misma familia de fosfatasa dual que DUSP1 y también implicado en tumorigénesis, y VEGFC, relacionado con angiogénesis (Moncho-Amor et al., 2011). Por esta razón, decidimos estudiar la expresión de estos genes en nuestras células por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

Como vemos en la **Figura 16**, los genes DUSP1, DUSP6 y VEGFC aumentan notablemente su expresión en las líneas resistentes R0.5 μ g y R2.5 μ g ($p < 0,01$) a excepción de VEGFC en R2.5 μ g ($p < 0,05$). Asimismo, encontramos aumentada la expresión de estos genes en las células H460 CSC ($p < 0,01$), mientras que en las células A549 CSC, además del aumento significativo de VEGFC, llama la atención la inhibición de DUSP1 frente a la marcada sobreexpresión de DUSP6 (todas $p < 0,01$).

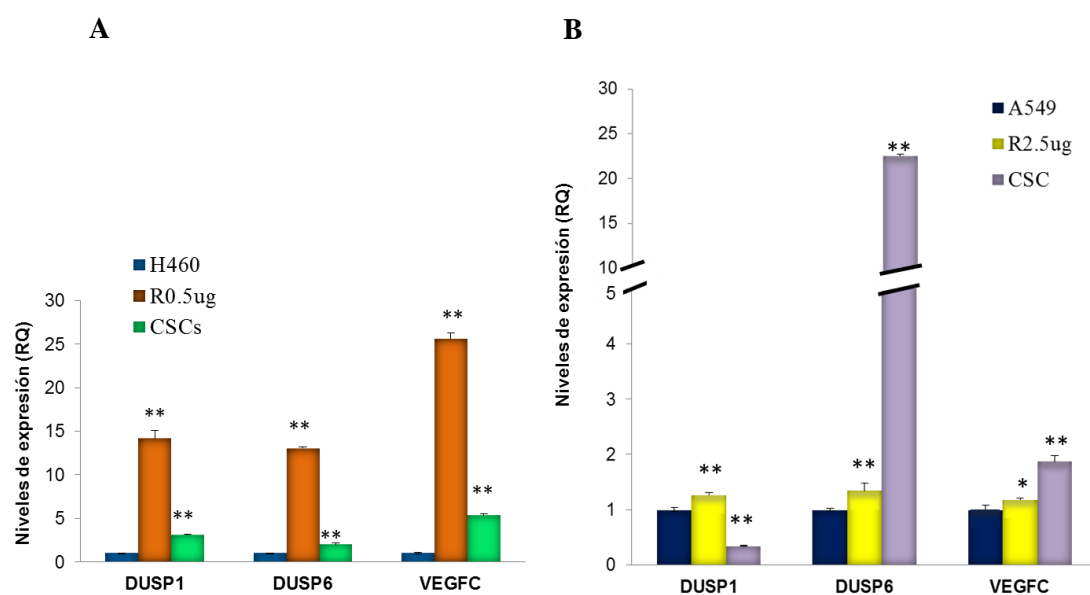


Figura 16. Expresión de los genes DUSP1, DUSP6 y VEGFC. Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) de los genes seleccionados en los *microarray* realizados previamente en el laboratorio. Se muestran los niveles relativos de ARNm respecto a la línea parental en cada caso (H460 ó A549), normalizados frente a los valores de β -actina (gen endógeno). (A) Líneas celulares H460, R0.5 μ g y H460 CSC. (B) Líneas celulares A549, R2.5 μ g y A549 CSC. Las barras representan la media \pm D.E. de dos experimentos independientes realizados por triplicado. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Resultados

- Marcadores celulares de fenotipo CSC

Hasta la fecha se han llevado a cabo numerosos ensayos para identificar marcadores celulares propios de las células CSC. Se han realizado incluso estudios comparativos en líneas celulares de varios tipos tumorales (Stuelten et al., 2010). En concreto en pulmón, se ha visto que las poblaciones CD44+ y CD166+ son más tumorigénicas tanto *in vitro* como *in vivo*, y presentan características propias de células CSC tales como la formación de esferas o la capacidad de auto-renovación. (Leung et al., 2010; Zhang et al., 2012b). Por su parte, la expresión del marcador CD133 ha permitido aislar células CSC en diferentes tipos tumorales, incluyendo gliomas, colon, páncreas, mama, próstata, ovario y pulmón (Eramo et al., 2008; Kitamura et al., 2009; Tirino et al., 2009), donde puede oscilar entre un 0.32 y un 22% de la población celular del tumor (Visvader and Lindeman, 2008). Por ello decidimos estudiar la expresión de estos tres marcadores en las líneas celulares que habíamos generado.

La **Figura 17** muestra cómo la expresión de CD133 aumenta significativamente en las líneas R0.5 μ g y R2.5 μ g ($p < 0,01$) con respecto a las líneas parentales H460 y A549, respectivamente. En el caso de CD44, también aumenta la expresión en ambas líneas pero sólo es significativo en R2.5 μ g ($p < 0,01$). Por el contrario, no observamos cambios significativos en ninguna de las dos líneas en la expresión de CD166.

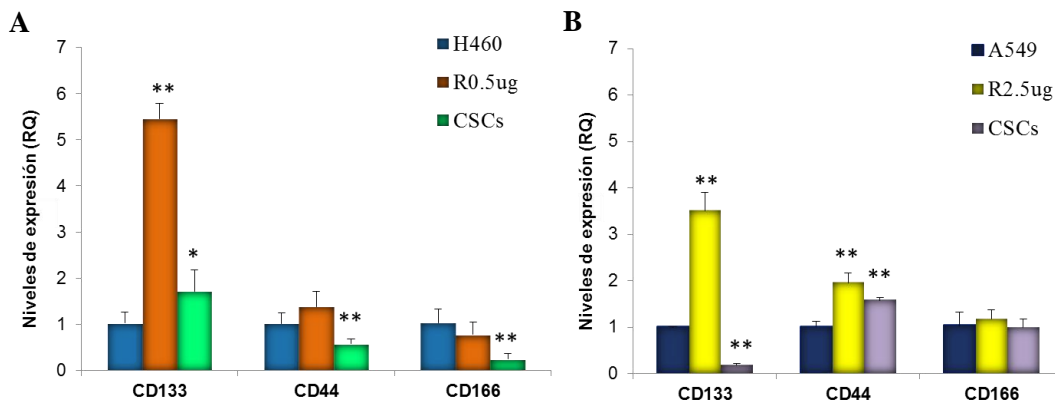


Figura 17. Expresión de los marcadores CD133, CD44 y CD166. Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) de marcadores característicos de fenotipo CSC. Se muestran los niveles relativos de ARNm respecto a la línea parental en cada caso (H460 ó A549), normalizados frente a los valores de GAPDH (gen endógeno). (A) Líneas celulares H460, R0.5 μ g y H460 CSC. (B) Líneas celulares A549, R2.5 μ g y A549 CSC. Las barras representan la media \pm D.E. de dos experimentos independientes realizados por triplicado. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

En cuanto a las líneas CSC, encontramos más heterogeneidad en función de las líneas parentales de las que provienen. En las células H460 CSC aumenta la expresión de CD133 ($p < 0,05$), mientras que disminuye la expresión de los otros dos marcadores ($p < 0,01$). Sin

embargo, en las células A549 CSC, disminuye notablemente la expresión de CD133 ($p < 0,01$), aumenta la expresión de CD44 ($p < 0,01$), y no se aprecian cambios en la expresión de CD166.

Estos datos sugieren que los marcadores CD133 y CD44 juegan un papel importante en la adquisición de resistencia a fármacos como el CDDP, y también podrían estar implicados en la adquisición de características propias de células CSC en las líneas celulares de pulmón H460 y A549.

- Marcadores de transición epitelio-mesénquima (TEM)

La transición epitelio-mesénquima (TEM) conlleva un aumento de la invasividad de las células epiteliales. En varios estudios se ha visto que la inducción de TEM favorece la auto-renovación y la adquisición de características de células CSC (Ansieau et al., 2008; Mani et al., 2008; May et al., 2011). Además, otros estudios revelan que las células tumorales con fenotipo epitelial sobreviven en el torrente sanguíneo y forman metástasis en otros órganos (Celia-Terrassa et al., 2012; Floor et al., 2011; Korpál et al., 2011; Tsuji et al., 2008). Por esta razón, decidimos analizar la expresión de varios marcadores epiteliales y mesenquimales mediante Western Blot (**Figura 18**).

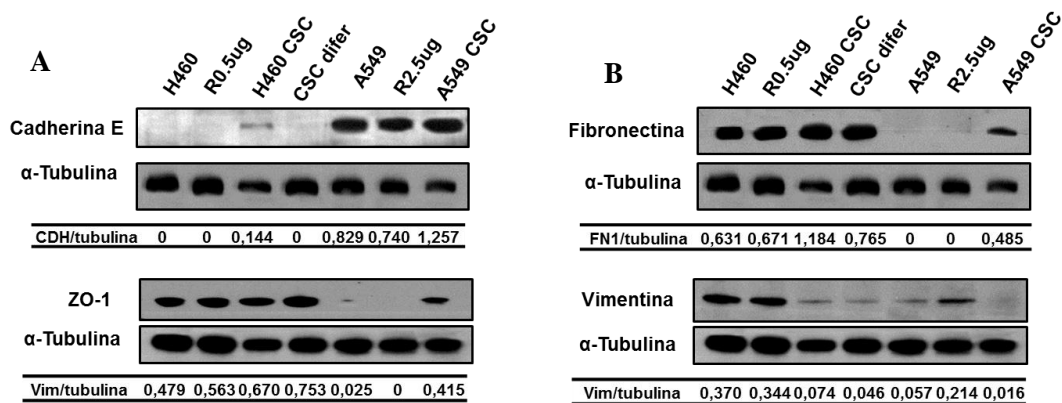


Figura 18. Expresión de proteínas implicadas en la transición epitelio-mesénquima (TEM). Se obtuvieron extractos proteicos de las líneas celulares H460, R0.5µg, H460 CSC, H460 CSC diferenciadas, A549, R2.5µg y A549 CSC, y se estudiaron mediante western blot los cambios de expresión de las proteínas Cadherina-E, *zonula occludens protein 1* (ZO-1), Fibronectina y Vimentina, implicadas en la transición epitelio-mesénquima. En la parte inferior de cada panel se muestra la normalización de cada muestra con respecto al control de carga (α -Tubulina). (A) Expresión de proteínas características del fenotipo epitelial (Cadherina-E y ZO-1). (B) Expresión de proteínas características del fenotipo mesenquimal (Fibronectina y Vimentina). Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

La **Figura 18** muestra que, en las líneas celulares H460 y A549, la expresión de Cadherina-E y ZO-1 aumenta en las células CSC con respecto a las líneas parentales y resistentes. También observamos que aumenta la expresión de Fibronectina en estas células,

mientras que, por el contrario, la expresión de Vimentina disminuye. Curiosamente, la expresión de esta proteína aumenta notablemente en la línea R2.5 μ g, aunque salvo esta excepción, en general observamos niveles de expresión muy similares entre las líneas parentales y resistentes.

A raíz de los resultados obtenidos para las células CSC, al igual que en el análisis con *microarrays*, nos preguntamos si al diferenciar estas células recuperaríamos el patrón de expresión de las células H460. Así, tras 24 horas de diferenciación, se obtuvo el extracto proteico de las células y a continuación se analizó la expresión de los marcadores de TEM mediante Western Blot. En la **Figura 18** observamos que las células CSC diferenciadas (CSC difer) recuperan los valores de las líneas parentales en el caso de la Cadherina-E y la Fibronectina, mientras que mantienen los mismos niveles de ZO-1 y Vimentina que expresan las células CSC.

2.4.- Estudio de la tumorigenicidad celular y la capacidad metastásica.

Además de los ensayos realizados *in vitro*, el uso de modelos animales ha proporcionado numerosos conocimientos de la bioquímica, biología, farmacología y genética del cáncer (Hirst and Balmain, 2004), principalmente porque nos acercan más al entendimiento de la naturaleza de los tumores en humanos. En estos modelos se pueden inducir tumores con un rendimiento bastante elevado y además permiten la manipulación de distintos parámetros que intervienen en la tumorigénesis (DePinho and Jacks, 2001).

Existen diversos trabajos en la literatura que demuestran *in vivo* las propiedades tumorigénicas de las células CSC en cáncer de pulmón (Eramo et al., 2008; Mani et al., 2008; Zhang et al., 2012b). Estos estudios están basados en la selección de células CSC por la expresión de marcadores propios de estas células, pero también nos encontramos trabajos que demuestran la tumorigenicidad de las células negativas para estos marcadores (Celia-Terrassa et al., 2012; Ogden et al., 2008; Shmelkov et al., 2008; Wang et al., 2008). De ahí la importancia, como comentábamos en la introducción, de complementar los ensayos *in vitro* con experimentos *in vivo* realizados con las células CSC aisladas en este trabajo. Con el fin de estudiar la capacidad tumorigénica de nuestras células CSC, decidimos inocular las líneas celulares H460 y CSC en los flancos de ratones atímicos-Foxn1^{nu} (nu/nu) para observar la formación de tumores (**Tabla 13**).

En este ensayo observamos que las células CSC eran capaces de formar tumores, pero fueron más pequeños y empezaron a formarse más tarde que cuando se inocularon células H460. Según la teoría de las *Cancer Stem Cells*, un tumor estaría formado por una pequeña

población de células CSC, capaces de diferenciar dando lugar a las células tumorales propiamente dichas y con mayor capacidad proliferativa que las propias células CSC. Así, las células CSC por si solas acabarían formando un tumor, pero más lentamente que las células diferenciadas de la masa tumoral.

	Nº células	Latencia (días)	Vol. tumor (cm ³)
H460	5000	20 ± 5,1	2,4 ± 0,9
	50000	15 ± 3,22	2,2 ± 1,2
CSC	5000	25 ± 5,82	0,45 ± 0,25
	50000	20 ± 2,21	0,1 ± 0,06

Tabla 13. Crecimiento tumoral de las líneas celulares H460 y CSC. Se inocularon en los flancos de los ratones las células H460 y CSC preparadas en Matrigel diluído 1:3 en PBS (5×10^3 ó 5×10^4 por cada 100 μ l). El volumen tumoral fue medido 3 veces por semana desde su aparición. En la tabla se indica la media \pm D.E. de los días que tardaron en aparecer los tumores (latencia), y el volumen medio \pm D.E. que alcanzaron 30 días después de la inoculación.

En base a esto, nos planteamos estudiar cuál sería la evolución de los tumores si inoculáramos mezclas con varias proporciones de ambas poblaciones celulares. Además de observar el crecimiento tumoral, también nos interesaba analizar los tumores a término a fin de determinar si los porcentajes de células inoculados se habían mantenido constantes durante la formación del tumor. Para ello, generamos células H460 Cherry mediante transfección estable con el plásmido pmCherry-N1, y células CSC GFP mediante infección lentiviral con el vector pGIPZ-shRNAmir-NS en células H460. De esta forma podíamos visualizar en rojo las células H460 y en verde las células CSC. Las distintas mezclas de células fueron inoculadas en flancos de ratones atímicos-Foxn1^{nu} (nu/nu) y los tumores formados a los 30 días fueron procesados y analizados.

Como vemos en la **Figura 19**, todas las mezclas que inoculamos formaron tumores (panel superior) y en todos ellos observamos la presencia de ambas líneas celulares (panel inferior). Además, macroscópicamente también observamos un aumento en el tamaño de los tumores generados por la mezcla que contenía un 75% de células H460 y un 25% de células CSC. La **Tabla 14** muestra los porcentajes de células determinados en los tumores de cada una de las mezclas. Si los comparamos con los porcentajes de células inoculados, vemos que la proporción de células H460 tiende a aumentar levemente dentro del tumor, en detrimento de las células CSC. Esto ocurre en tres de las cuatro mezclas. En aquella en la que habíamos observado los tumores de mayor tamaño (75% H460 - 25% CSC), también nos encontramos con una diferencia notable en el porcentaje de células dentro del tumor. En este caso fue la proporción de células CSC la que aumentó con respecto al porcentaje inoculado, en detrimento

Resultados

de las células H460. Además, los tumores empezaron a formarse antes y crecieron a mayor velocidad, superando incluso los 2,5 cm³.

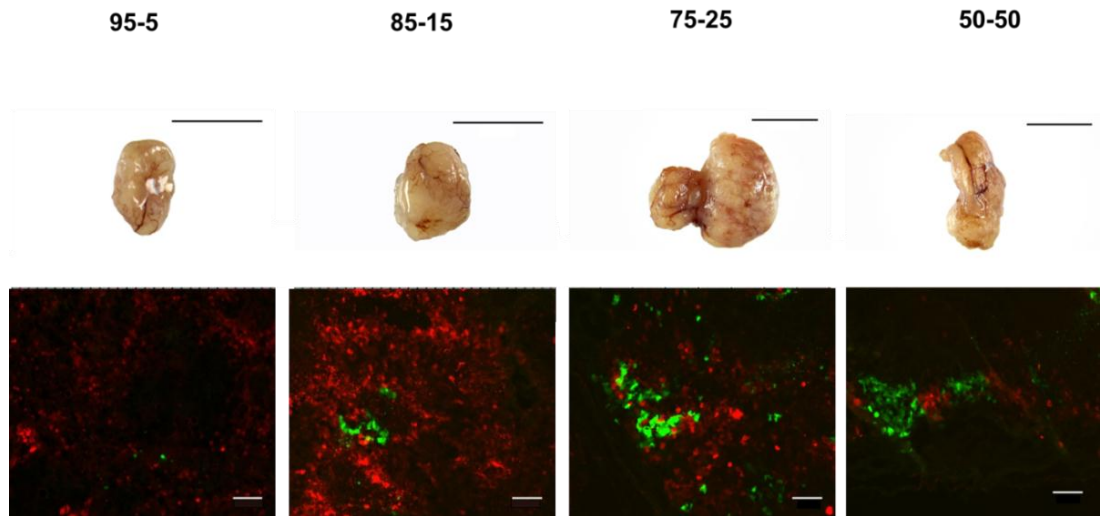


Figura 19. Crecimiento tumoral de las líneas celulares H460 y CSC inoculando mezclas de diferentes porcentajes de ambas células. Se inocularon en flancos distintas proporciones de células H460 Cherry y CSC GFP (1×10^5 células totales resuspendidas en 100 μ l de Matrigel diluido 1:3 en PBS). Los ratones fueron sacrificados a los 30 días y los tumores se extrajeron y congelaron en OCT. Posteriormente se realizaron cortes de los bloques y se cuantificó el porcentaje final de cada línea celular en los tumores. **Panel superior:** Se indican las distintas mezclas de células que se emplearon en el ensayo (% H460 - % CSC), y se muestran fotografías representativas de los tumores que crecieron al inocular cada mezcla de células. Escala 10 mm. **Panel inferior:** Fotografías representativas de secciones de tumores vistas al microscopio. Objetivo 10x. Escala 100 μ m.

Inoculación en flancos		Distribución en el tumor		Latencia (días)	Vol. tumor (cm ³)
% H460	% CSC	% H460	% CSC		
95	5	$\approx 99 \pm 0,094$	$< 1 \pm 0,094$	$20 \pm 2,18$	$0,868 \pm 0,42$
85	15	$90,13 \pm 2,42$	$9,87 \pm 2,42$	$20 \pm 4,3$	$0,748 \pm 0,39$
75	25	$65,42 \pm 3,44$	$34,58 \pm 3,44$	$15 \pm 3,42$	$2,5 \pm 0,53$
50	50	$54,56 \pm 10,61$	$45,44 \pm 10,61$	$23 \pm 3,1$	$0,943 \pm 0,43$

Tabla 14. Crecimiento tumoral inoculando diferentes porcentajes de las líneas celulares H460 y CSC. La tabla compara los porcentajes inoculados inicialmente y los porcentajes cuantificados de cada línea celular en los tumores formados a los 30 días. También se indican los días que tardaron en aparecer los tumores (latencia), y el volumen medio que alcanzaron al finalizar el experimento. Los datos representan la media \pm D.E.

Estos resultados sugieren, por un lado, que las células H460 crecen más deprisa que las células CSC, y por otro, que existen determinadas proporciones de células H460/CSC que potencian el crecimiento de cada una de ellas generando tumores más agresivos, lo que

explicaría también la enorme heterogeneidad que encontramos en las muestras de los pacientes y en las líneas celulares.

Otra de las cualidades relacionada con la agresividad de las células tumorales, es la liberación al medio de factores pro-angiogénicos. Estos factores favorecen la formación de vasos sanguíneos que permiten el aporte de nutrientes al interior del tumor. Por esta razón, decidimos estudiar también la capacidad angiogénica *in vivo* de las células H460, R0.5 μ g y CSC. Para ello, los medios condicionados de cada una de las líneas celulares embebidos en matrigel, fueron implantados subcutáneamente en flancos de ratones atímicos-Foxn1^{nu} (nu/nu).

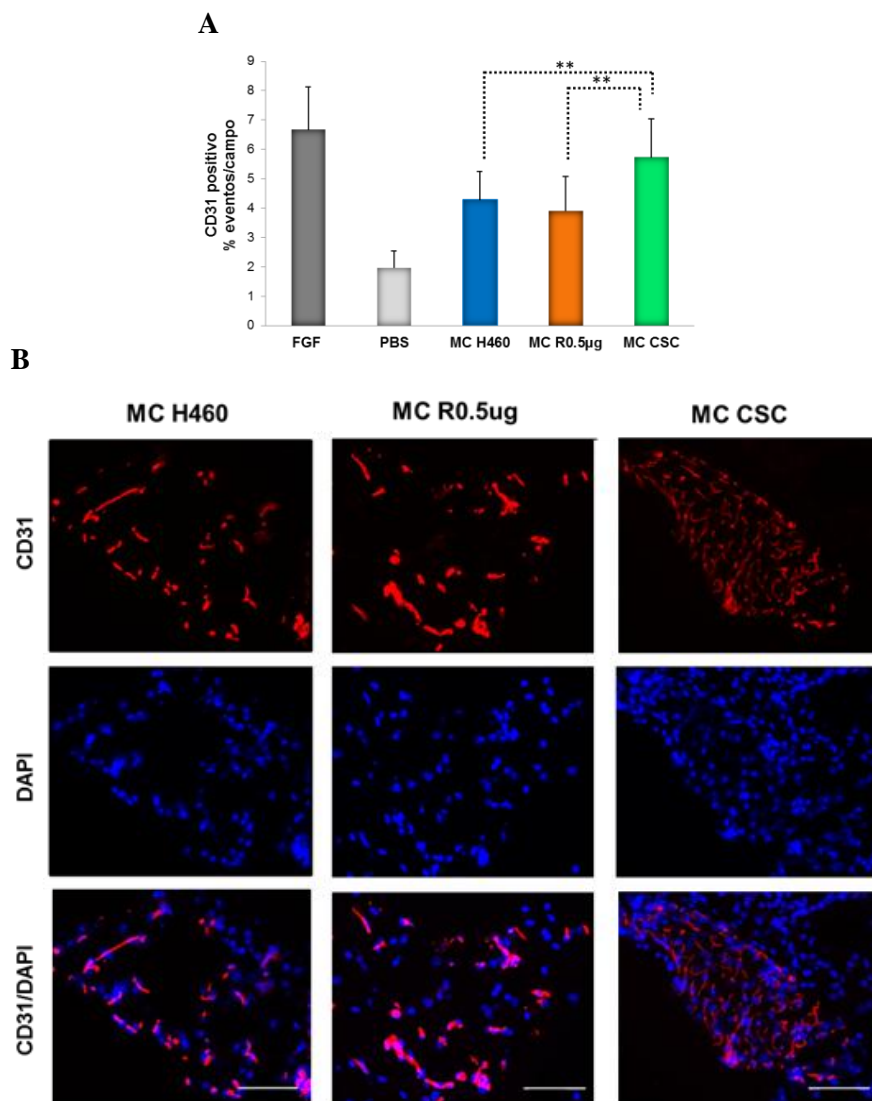


Figura 20. Las células CSC tienen mayor capacidad angiogénica *in vivo*. Se inocularon en flancos 30 μ g de proteínas de medio condicionado de las líneas H460, R0.5 μ g, CSC, PBS (control -) y FGF-b (1ng/ μ l) (control +) embebidos en matrigel. Transcurridos 10 días se extrajeron los implantes, se cortaron secciones de los mismos y se tiñeron con el anticuerpo CD31 y DAPI. Posteriormente se cuantificó el número de vasos sanguíneos. **A)** Las barras representan la media del % eventos positivos/campo para la tinción con el anticuerpo CD31. **:p < 0.01. **B)** Fotografías representativas de los implantes de matrigel de cada una de las líneas celulares. Los vasos sanguíneos se tiñeron con anti-CD31 y los núcleos de las células con DAPI. Objetivo 20x. Escala 100 μ m.

Resultados

Como se observa en la **Figura 20**, el medio condicionado de las células CSC fue capaz de atraer mayor número de células del ratón, principalmente células endoteliales, y formar mayor número de vasos sanguíneos que las líneas celulares H460 y R0.5 μ g ($p < 0.01$).

Una vez estudiada la capacidad tumorigénica y angiogénica de las células CSC, decidimos valorar su capacidad metastásica. Para ello, se inocularon en la vena de la cola células H460, R0.5 μ g, CSC, y una mezcla de 50% células H460 Cherry y 50% células CSC GFP. Una vez sacrificados los ratones, se realizó una valoración macroscópica de los órganos para determinar la presencia de tumores (**Figura 21**), y posteriormente se procesaron estos órganos para el análisis histopatológico. De esta forma se determinó el número de ratones que habían generado metástasis (**Tabla 15**) y los órganos afectados según la línea celular inoculada (**Tabla 16**).

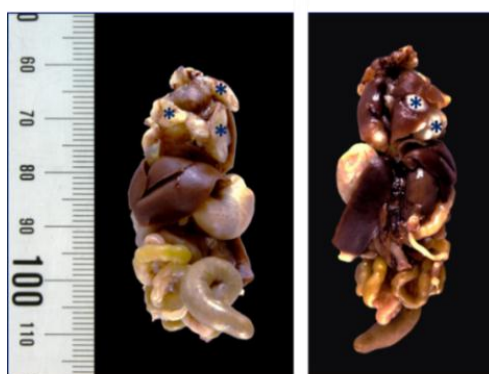


Figura 21. Análisis macroscópico de los órganos de ratones inoculados en cola con las células tumorales. Fotografía representativa del paquete visceral con los órganos torácicos y abdominales. **Izquierda:** ventral; **Derecha:** dorsal. El análisis macroscópico permitió determinar la presencia de tumores. En este caso se indican con un asterisco las masas blanquecinas observadas en los pulmones.

	Pulmón		Otros órganos	
H460	73%	8/11	64%	7/11
CSC	80%	12/15	33,3%	5/15
H460 + CSC	100%	4/4	75%	3/4
R0.5 μ g	79%	11/14	43%	6/14

Tabla 15. Formación de metástasis. Se inocularon en la vena de la cola 1×10^6 células de las líneas celulares H460, CSC, H460 Cherry + CSC GFP y R0.5 μ g. Tras el sacrificio de los animales, los órganos fueron procesados para su posterior análisis histopatológico. La tabla muestra la incidencia de metástasis observada por cada línea celular, bien en pulmón (órgano diana de estas células), o bien en otros órganos.

Como observamos en la **Tablas 15 y 16**, las cuatro líneas celulares fueron capaces de generar metástasis, aunque la incidencia fue mayor cuando se inoculaban juntas las células H460 y las células CSC. Asimismo, todas las líneas celulares mostraron un porcentaje alto de anidación en pulmón, su órgano diana, pero se observaron diferencias en cuanto a la formación de metástasis en otros órganos. Las células CSC, por ejemplo, anidaron mejor en pulmón que las células H460, pero metastatizaron peor en otros órganos. No obstante, uno de los ratones que se inocularon con células CSC presentó metástasis en diez órganos (no se tuvo en cuenta en la tabla 6 por considerarse un punto atípico) a diferencia de sus compañeros inoculados con las mismas células. Sin embargo, los ratones inoculados con células H460 + CSC presentaron mayor eficiencia de metástasis tanto en pulmón como en otro órganos.

Línea celular →	H460	CSC	H460+CSC	R0.5µg
Pulmón	8	12	4	11
Otros órganos:				
Cerebro	-	-	-	-
Gland. salival	1	-	-	2
Tráquea	-	2	1	-
Corazón	-	1	1	-
Hígado	1	-	-	-
Bazo	-	-	-	-
Páncreas	1	1	-	-
Intestino	-	1	-	-
Riñón	3	1	1	1
Genitales	2	-	-	1
Hueso	1	-	1	5
Otros tumores	4	3	1	6
Nº total de ratones	11	15	4	14
Nº metástasis/ratón	1,90	1,4	2,25	1,86

Tabla 16. Relación de órganos que presentaron metástasis en cada línea celular.

Las células R0.5µg presentaron una eficiencia de metástasis similar a la de las células CSC. Sin embargo sorprende la incidencia de metástasis que presentaron estas células a hueso (**Tabla 16**). Durante el transcurso del experimento, se observó que algunos ratones presentaban pequeños tumores en las patas traseras, por lo que decidimos procesar también los fémures de todos los ratones para determinar si existía o no metástasis. Además, el fémur y la tibia son los

Resultados

huesos típicos donde aparecen los tumores óseos primarios, aunque no está claro si también lo son cuando aparecen metástasis.

Para ello se descalcificaron los fémures y se incluyeron en parafina. Después se realizaron cortes y tinciones con Hematoxilina & Eosina que finalmente nos permitieron confirmar que existía metástasis en la mayoría de ratones con tumores en las patas. En la **Figura 22** podemos ver un ejemplo de lo que nos encontramos en la metáfisis y la diáfisis de los huesos de estos ratones. En la **Figura 22B** vemos como el tipo celular de la médula y el hueso trabecular son totalmente distintos a los de un hueso normal (**Figura 22A**), posiblemente por la infiltración de células tumorales. El cartílago también aparece hipertrofiado con abundante neoformación. En la diáfisis (**Figura 22D**), vemos como hay tejido tumoral en la parte externa del hueso. En este punto, se destruye el hueso cortical existente (continuo y denso) y se forma lo que se conoce como hueso reactivo, donde el propio hueso se remodela por infiltrado de células tumorales y forma hueso trabecular nuevo (discontinuo y esponjoso). La médula muestra también un patrón celular completamente distinto al de un fémur normal (**Figura 22C**).

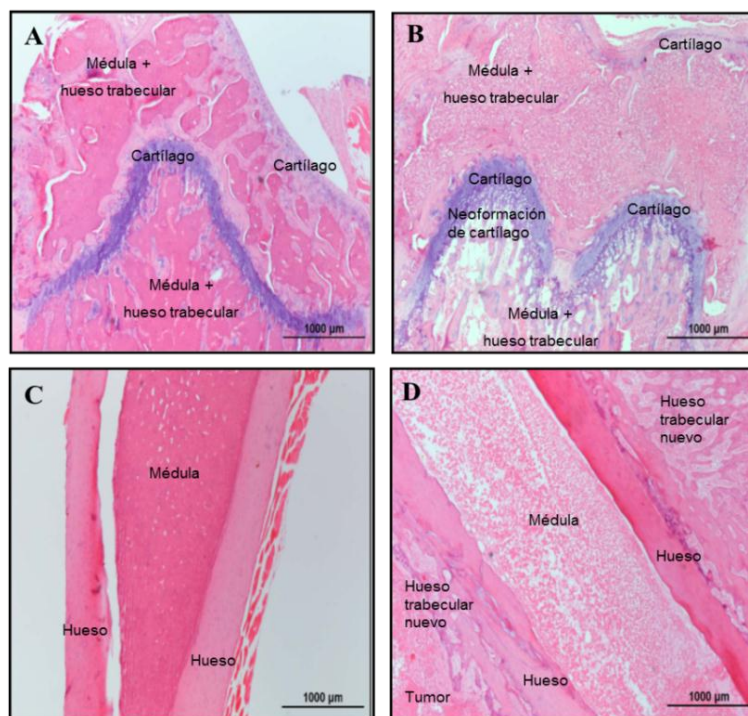


Figura 22. Metástasis en hueso. Los fémures de los ratones fueron descalcificados e incluidos en parafina. Posteriormente se realizaron cortes y se tiñeron con Hematoxilina & Eosina. **A y B:** Fotografías representativas de la metáfisis de un fémur normal (**A**) y el fémur de un ratón inoculado en cola con células R0.5µg (**B**). **C y D:** Fotografías representativas de la diáfisis de un fémur normal (**C**) y el fémur de un ratón inoculado en cola con células R0.5µg (**D**). Objetivo 20x. Escala 1000µm.

Estos datos sugieren por un lado, que tanto las células tumorales normales (H460) como las células CSC, aumentan su potencial metastásico cuando ambas se inoculan juntas en la vena

de la cola. Y por otro, que la adquisición de resistencia al CDDP podría estar relacionada con la formación de metástasis en hueso.

3.- ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A QUIMIOTERAPIA EN PACIENTES CON CNMP

Además del estudio *in vitro* e *in vivo* de las líneas celulares, decidimos llevar a cabo un estudio de la respuesta a agentes antitumorales que presentaban pacientes con CNMP. Para ello se procesaron muestras de pacientes, en estadios quirúrgicos, del Hospital Universitario La Paz, y se evaluó la viabilidad celular frente a dos fármacos utilizados actualmente en la clínica: CDDP y Erlotinib (Tarceva®).

3.1.- Estudio de la viabilidad celular en biopsias de pacientes con CNMP en respuesta a CDDP.

En el caso del CDDP nos interesaba validar los resultados que habíamos obtenido con las líneas celulares, es decir, que la proporción de células CSC estaba relacionado con la respuesta de las muestras de pacientes al fármaco. Para ello, una vez obtenidas las muestras tras la cirugía, se determinó la viabilidad celular frente a CDDP para conocer la IC₅₀, y se sembraron células en condiciones de cultivo de células CSC. De esta forma se procesaron un total de 45 muestras, de las cuáles 18 crecieron formando esferas en medio CSC (40%).

A continuación decidimos estudiar la relación entre la IC₅₀ que presentaban los pacientes frente a la capacidad de formar o no esferas. Previamente habíamos realizado un registro de las IC₅₀ en respuesta a CDDP de todas las líneas celulares utilizadas en nuestro laboratorio (tanto de CNMP como de otros tipos tumorales, datos no mostrados), con el que determinamos que las células que presentaban una IC₅₀ > 2 µg/ml eran resistentes y las que presentaban una IC₅₀ < 2 µg/ml eran sensibles. En base a esto consideramos resistentes todas aquellas muestras de pacientes que presentaron una IC₅₀ > 2 µg/ml.

En la **Figura 23** podemos ver representadas las muestras de pacientes en función de su IC₅₀ en respuesta a CDDP, y de su capacidad de crecer en condiciones de células CSC. Si nos fijamos en la IC₅₀, observamos que por debajo de 2 µg/ml hay 9 muestras que no crecieron en medio CSC, y una muestra que si lo hizo. Estos datos sugieren que aquellos pacientes cuyas células no crecen como células CSC tienen mayor probabilidad de ser sensibles y responder a CDDP. Para corroborar esto realizamos una prueba Chi-cuadrado (χ^2) y concluimos que las

Resultados

muestras sensibles a CDDP presentaban menor proporción de células CSC ($p = 0,028$). Por otro lado, el 94,4% de las muestras que originaron células CSC eran resistentes a CDDP mientras que el 65,4% de las muestras que no originaron células CSC lo eran. Estos datos parecen indicar una correlación entre la proporción de células CSC en el tumor y la resistencia a CDDP, aunque el análisis estadístico no encontró diferencias significativas con el tamaño muestral analizado.

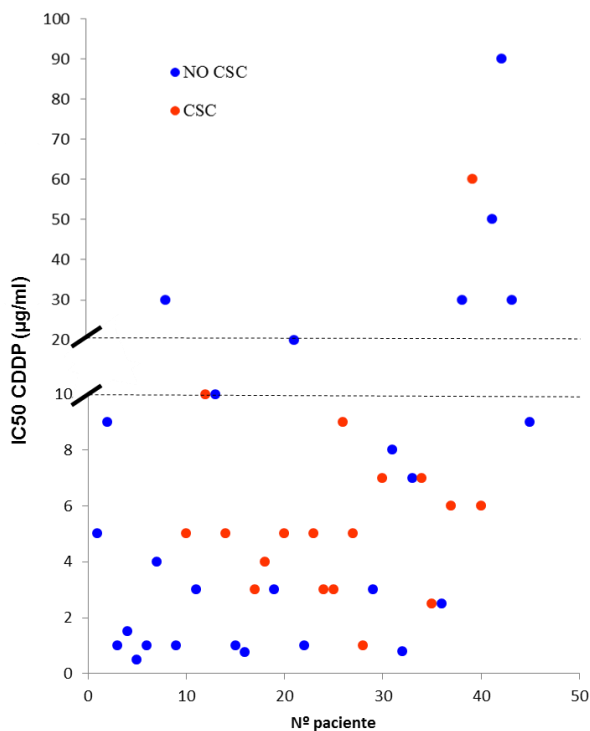


Figura 23. IC50 ($\mu\text{g/ml}$) en respuesta a CDDP de las 45 muestras de pacientes procesadas. CSC: muestras que formaron esferas en cultivo; NO CSC: muestras que no formaron.

3.2.- Estudio de la respuesta a otro agente antitumoral: Erlotinib (Tarceva®)

Como hemos comentado en la introducción, se han descrito mutaciones del receptor de EGF relacionadas con la respuesta a fármacos inhibidores de la actividad tirosina quinasa (TKIs), como Erlotinib (Sharma et al., 2007). Por esta razón, en este trabajo decidimos estudiar la posible relación entre las mutaciones en EGFR y la resistencia que presentan los pacientes a este fármaco.

Dado que en el laboratorio no habíamos trabajado previamente con Erlotinib, primero estudiamos la sensibilidad de varias líneas celulares. Para ello, elegimos tres líneas celulares de CNMP con diferentes *status* de EGFR (Gandhi et al., 2009) (**Figura 24A**) y la línea celular epidermoide A431, que sobreexpresa EGFR (Yamamoto et al., 1986). La **Figura 24B** muestra la viabilidad que presentaron las cuatro líneas celulares frente a una dosis máxima de 10 μM de Erlotinib. Además de la línea celular A431, que presenta un patrón muy sensible al fármaco (**Figura 24B**), se ha descrito que la línea celular H1650 es más sensible a Erlotinib que las

líneas celulares H460 y H1975 (Sharma et al., 2007), debido a la presencia de la delección del exón 19 (**Figura 24A**). Sin embargo, la viabilidad que observamos en las tres líneas celulares en respuesta a Erlotinib fue bastante similar.

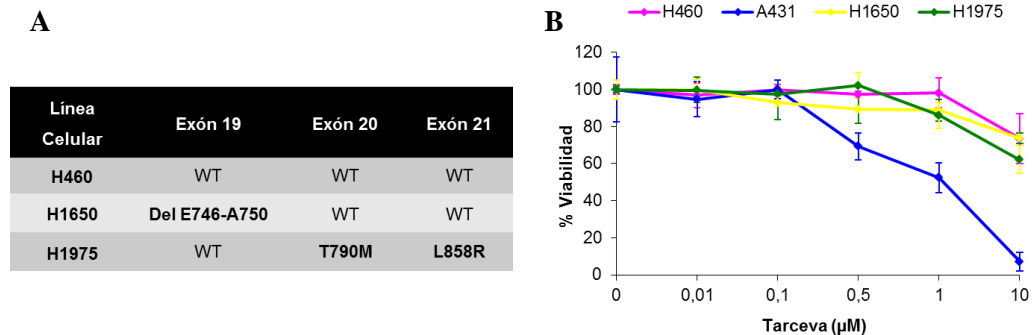


Figura 24. Líneas celulares utilizadas para el estudio de la actividad terapéutica de Erlotinib (Tarceva®). (A) Status de EGFR que presentan las líneas celulares de CNMP seleccionadas. WT: *wild type*. (B) Viabilidad de las cuatro líneas celulares en respuesta a Erlotinib.

En base a estos resultados, estudiamos la viabilidad celular de una cohorte de 41 muestras de pacientes en respuesta a Erlotinib, con una dosis máxima de 10 µM (**Tabla 17**).

3.2.1.- Estudio de mutaciones del receptor de EGF (EGFR)

A continuación se analizaron posibles delecciones del exón 19, y la presencia o no de las mutaciones T790M (exón 20) y L858R (exón 21), en las 41 muestras. Para detectar las delecciones en el exón 19, se amplificó el ADN de las muestras por PCR semicuantitativa, y posteriormente se secuenciaron los productos de PCR por secuenciación directa. La **Figura 25** muestra un ejemplo de una secuencia *wild type* y una secuencia delecionada. Así, de las 41 muestras de pacientes procesadas, encontramos dos que tenían la delección del E746-A750 en su secuencia (4,87%) (**Tabla 17**).

Las mutaciones T790M y L858R de los exones 20 y 21, respectivamente, se analizaron mediante discriminación alélica con sondas TaqMan®. Esta técnica nos permite detectar mutaciones puntuales en una secuencia de ADN, y si éstas se encuentran en homocigosis o heterocigosis (**Figura 26**). En este caso, todas las muestras de pacientes resultaron ser *wild type* para ambos exones.

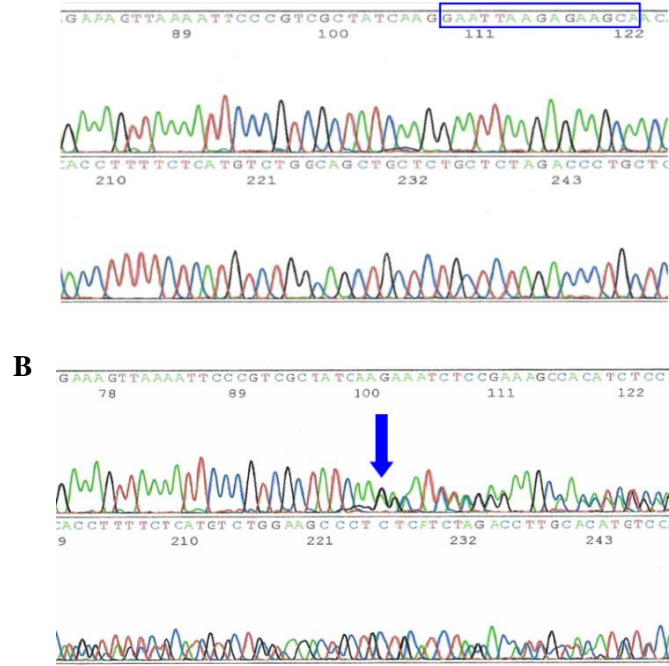


Figura 25. Secuenciación directa para analizar las deleciones del exón 19 de EGFR. Las muestras de pacientes podían presentar una secuencia *wild type*, como la que observamos en la línea celular H460 (A). O bien, podían presentar deleciones como la delE746-A750 que observamos en la línea celular H1650 (B). El rectángulo en (A) indica la secuencia de 15 nucleótidos que está delecionada en la secuencia mutada. La flecha en (B) indica el inicio de la deleción. A partir de este punto se observan dos secuencias solapadas al presentar uno de los alelos del gen la deleción y el otro no.

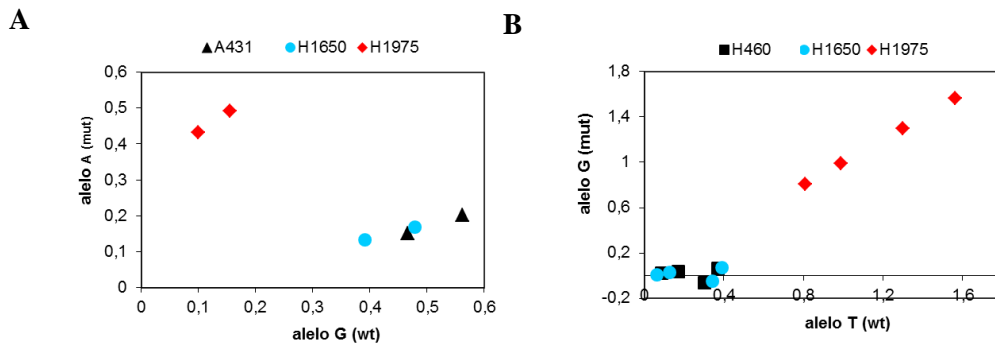


Figura 26. Ensayo de discriminación alélica con sondas TaqMan® para detectar mutaciones en los exones 20 (A) y 21 (B). En este ensayo podemos encontrar muestras con los alelos *wild type* (líneas celulares A431, H1650 y H460), o con mutaciones en uno o ambos exones (línea celular H1975), tanto en homocigosis (exón 20) como en heterocigosis (exón 21).

En la **Tabla 17** se resumen los resultados obtenidos en las 41 muestras respecto al *status* de EGFR y a la viabilidad celular frente a una dosis máxima de 10 μ M de Erlotinib.

Paciente	Edad	Sexo	Tabaco	Histología	Estadio	Exón 19	Exón 20	Exón 21	Viabilidad celular (%) frente a 10µM de Erlotinib	Clasificación
1	74	Mas	NoFum	AdCa	III	wt	wt	wt	90	R
2	52	Fem	-	CaEp	III	wt	wt	wt	90	R
3	70	Fem	NoFum	AdCa	III	wt	wt	wt	160	R
4	65	Fem	-	Otros	-	wt	wt	wt	110	R
5	53	Fem	-	CaEp	-	wt	wt	wt	140	R
6	72	Fem	-	CaEp	III	wt	wt	wt	90	R
7	44	Mas	Fum	Otros	I	wt	wt	wt	70	S
8	86	Fem	-	CaEp	I	wt	wt	wt	90	R
9	52	Fem	ExFum	AdCa	III	wt	wt	wt	120	R
10	61	Fem	Fum	AdCa	I	wt	wt	wt	100	R
11	77	Fem	Fum	Otros	I	wt	wt	wt	100	R
12	75	Fem	-	CaCGr	I	wt	wt	wt	110	R
13	66	Fem	ExFum	CaEp	III	wt	wt	wt	110	R
14	61	Fem	-	Otros	I	wt	wt	wt	40	MS
15	72	Fem	-	CaCGr	I	wt	wt	wt	120	R
16	77	Fem	NoFum	AdCa	I	wt	wt	wt	100	R
17	81	Fem	-	AdCa	I	wt	wt	wt	90	R
18	62	Fem	-	CaEp	I	wt	wt	wt	70	S
19	46	Fem	ExFum	CaEp	II	wt	wt	wt	100	R
20	52	Fem	ExFum	AdCa	I	wt	wt	wt	80	R
21	48	Mas	ExFum	AdCa	III	wt	wt	wt	60	S
22	68	Fem	ExFum	CaEp	III	wt	wt	wt	100	R
23	72	Fem	Fum	CaEp	I	wt	wt	wt	180	R
24	67	Fem	Fum	AdCa	II	wt	wt	wt	60	S
25	80	Fem	NoFum	CaEp	I	wt	wt	wt	100	R
26	62	Fem	NoFum	CaEp	III	wt	wt	wt	70	S
27	84	Fem	NoFum	CaEp	II	wt	wt	wt	50	MS
28	45	Fem	ExFum	AdCa	III	wt	wt	wt	70	S
29	67	Mas	ExFum	Otros	I	MUT	wt	wt	60	S
30	75	Fem	-	CaEp	-	wt	wt	wt	30	MS
31	60	Fem	Fum	CaEp	III	MUT	wt	wt	70	S
32	61	Fem	Fum	CaEp	III	wt	wt	wt	30	MS
33	47	Mas	Fum	CaEp	I	wt	wt	wt	60	S
34	49	Fem	ExFum	AdCa	II	wt	wt	wt	110	R
35	64	Mas	Fum	AdCa	I	wt	wt	wt	40	MS
36	60	Fem	Fum	CaEp	III	wt	wt	wt	60	S
37	59	Mas	NoFum	AdCa	I	wt	wt	wt	30	MS
38	66	Fem	-	Otros	I	wt	wt	wt	50	MS
39	67	Fem	NoFum	AdCa	II	wt	wt	wt	100	R
40	63	Fem	Fum	CaEp	II	wt	wt	wt	60	S
41	60	Fem	Fum	CaEp	I	wt	wt	wt	0	MS

Tabla 17. Relación de muestras de pacientes tratadas con Erlotinib (Tarceva®). Mas: masculino, Fem: Femenino, NoFum: No fumador, Fum: Fumador, ExFum: Exfumador (< 5 años), AdCa: Adenocarcinoma, CaEp: Carcinoma epidermoide, CaCGr: Carcinoma de células grandes. Wt: *wild type* y MUT: mutado. R: Resistente, S: Sensible y MS: Muy Sensible.

Para clasificar las muestras tomamos como referencia los dos pacientes mutantes que presentaron la delección delE746-A750 del exón 19 (pacientes 29 y 31), ya que se trata de una mutación asociada con sensibilidad a Erlotinib (Tarceva®). Así, agrupamos a los pacientes en tres grupos en función de la viabilidad celular que presentaron en relación a las muestras de los dos pacientes mutados: Resistentes (con mayor viabilidad que los pacientes mutados), Sensibles (viabilidad celular similar a la de los pacientes mutados) y Muy Sensibles (viabilidad inferior a la de los pacientes mutados) (**Tabla 17**). A continuación decidimos realizar un estudio comparativo de los perfiles de expresión génica de los dos fenotipos extremos (Resistentes y Muy Sensibles). En concreto se seleccionaron 7 muestras para el análisis: cuatro muestras Resistentes (pacientes 15, 16, 17 y 19), y tres muestras Muy Sensibles (pacientes 32, 35 y 38) (**Tabla 17**). De esta forma se obtuvieron 35 genes que disminuían su expresión en los pacientes

Resultados

más sensibles a Erlotinib (FDR < 0.1). En la **Tabla 18** se indican los cuatro genes más significativos.

Gen	Nº de acceso	Descripción	Cambio de expresión
IGF2	NM_0010071	<i>Insulin-like growth factor 2</i>	-7,88
MMP1	NM_002421	<i>Matrix Metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)</i>	-7,36
AREG	NM_001657	<i>Amphiregulin</i>	-6,58
MET	NM_000245	<i>Oncogene</i>	-5,92

Tabla 18. Genes seleccionados en los *microarray* tras comparar pacientes Resistentes y Muy Sensibles a Erlotinib.

A continuación validamos estos genes por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Además de los pacientes analizados en los *microarrays*, decidimos analizar también la expresión de estos genes en dos pacientes Sensibles (pacientes 21 y 26) que presentaban una respuesta al fármaco similar a la de los pacientes mutantes.

En la **Figura 27** podemos ver que, en general, los genes MMP1, IGF2, AREG y MET disminuyen su expresión en los pacientes Muy Sensibles a Erlotinib, tal y como habíamos visto en los *microarrays*. Por otro lado, la expresión de estos genes en los pacientes que hemos clasificado como Sensibles, tiende a ser parecida a la de los pacientes Resistentes sobre todo para los genes AREG y MMP1.

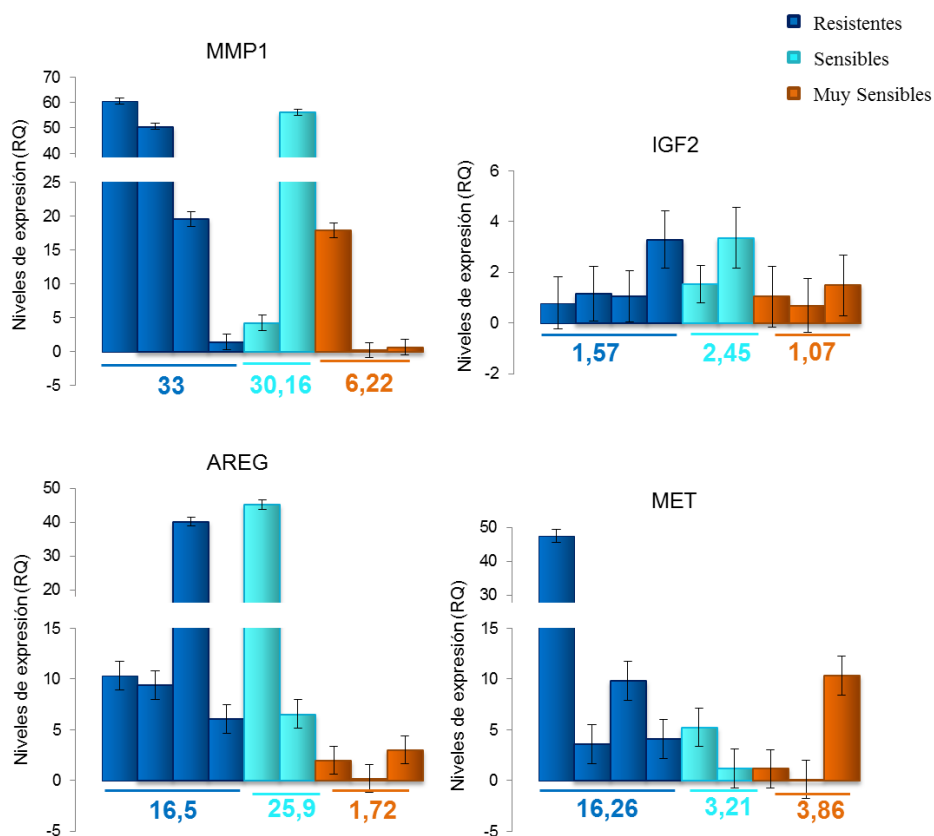


Figura 27. Expresión de los genes MMP1, IGF2, AREG y MET en muestras de pacientes tratadas con Erlotinib (Tarceva®). Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) de los genes MMP1, IGF2, AREG y MET en las muestras analizadas en los *microarray* (Resistentes y Muy Sensibles), y de dos pacientes Sensibles. Se muestran los niveles relativos de ARNm respecto a la media de los pacientes Muy Sensibles, normalizados frente a los valores de GAPDH (gen endógeno). Los números indican la media de los niveles de expresión en cada grupo de pacientes y las barras representan la media \pm D.E. de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

DISCUSIÓN

El cáncer de pulmón es uno de los cánceres con mayor mortalidad en el ser humano a nivel mundial. Las causas de esta mortalidad tan elevada están relacionadas por un lado, con una detección tardía, ya que más de un 70% de los pacientes son diagnosticados en estadios avanzados de la enfermedad, y por otro, con la resistencia de las células tumorales a los agentes quimioterápicos. Los compuestos derivados del platino, como el cisplatino (CDDP), son muy utilizados en la práctica clínica para el tratamiento de estos tumores. Por esta razón, nuestro laboratorio lleva varios años investigando los mecanismos de respuesta a estos fármacos, con el fin de identificar las moléculas implicadas en los mecanismos de resistencia, y buscar posibles biomarcadores que nos permitan identificar a aquellos pacientes con mayor probabilidad de respuesta (Cortes-Sempere et al., 2012; Chattopadhyay et al., 2006; Ibanez de Caceres et al., 2010; Moncho-Amor et al., 2011). En este trabajo nos hemos centrado en la caracterización de una pequeña población de células con propiedades de células madre (*cancer stem cells* o CSC), que parecen jugar un papel importante en la resistencia que presentan estos tumores a los fármacos utilizados en quimioterapia.

1.- GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES RESISTENTES A CISPLATINO A PARTIR DE LÍNEAS CELULARES DE CNMP

La generación de líneas celulares resistentes a fármacos es un instrumento habitual para el desarrollo de estrategias terapéuticas en los pacientes. Diversos estudios en diferentes sistemas celulares han demostrado que el tratamiento con CDDP induce desarrollo de resistencia a quimioterapia en algunos tumores, entre ellos el CNMP (Bertolini et al., 2009; Ibanez de Caceres et al., 2010; Jayachandran et al., 2010; Mitsumoto et al., 1998; Wintzell et al., 2012). Sin embargo, la generación de líneas celulares resistentes en el laboratorio habitualmente se realiza por la exposición repetida y/o con concentraciones crecientes de CDDP, generalmente sin combinar con otros fármacos (Bertolini et al., 2009; Ibanez de Caceres et al., 2010; Jayachandran et al., 2010; Latifi et al., 2011; Mitsumoto et al., 1998; Wintzell et al., 2012; Zhang et al., 2012c).

Por otro lado, existen ensayos en los que se han tratado las células con una única dosis de fármaco y también se han observado cambios importantes en el fenotipo de las células resistentes (Levina et al., 2008). Este tipo de abordaje se asemeja más al patrón de tratamiento que se realiza habitualmente con CDDP en la clínica, ya que se administran dosis únicas cada 21 ó 28 días. Se entiende que el periodo entre cada ciclo permite que los fármacos actúen y, a su vez, facilita la recuperación del paciente por los efectos secundarios que generan las drogas. La ventaja de los ensayos *in vitro* con las líneas celulares, es que podemos forzar la administración

de estas drogas para conseguir un fenotipo “extremo” de resistencia. Pero se trata de un fenotipo que está más lejos de la práctica terapéutica. Además, *in vitro* podemos controlar la concentración de droga que le llega a las células, mientras que en los pacientes es difícil determinar la cantidad de droga que llega al tumor.

En este trabajo hemos generado líneas celulares resistentes a CDDP mediante la administración de una única dosis de fármaco. Así, estaríamos simulando las condiciones del tratamiento del tumor de un paciente tras recibir la primera dosis de quimioterapia. Esta aproximación nos permite conocer los cambios iniciales que tienen lugar en el tumor en las primeras fases del tratamiento, y puede predecir los cambios asociados a la adquisición de resistencia en una fase más avanzada del mismo. Es posible que no hayamos obtenido cambios tan llamativos en la viabilidad de las células resistentes como en otros estudios (Ibanez de Caceres et al., 2010), pero lo que si hemos observado, es que si tratamos las células resistentes R0.5 μ g con una segunda dosis de CDDP, aumenta la resistencia de las células durante los primeros días tras la exposición, mostrando una viabilidad superior a la de las células R0.5 μ g 3 días después del segundo tratamiento (datos no mostrados). Estos datos sugieren que la exposición repetida de estas células a CDDP nos permitiría generar células mucho más resistentes a la droga. Además también hemos observado que la respuesta a CDDP varía mucho entre las líneas celulares. En esta tesis hemos trabajado con dos líneas celulares de CNMP (H460 y A549), y no hemos podido seguir el mismo patrón de administración de la droga porque cada línea celular respondía de forma diferente. Así, con la línea celular H460 obtuvimos células resistentes estables con una dosis de 0.5 μ g/ml (correspondiente a la IC70 para esta línea celular), mientras que para la línea A549 tuvimos que aumentar la dosis hasta 2.5 μ g/ml (correspondiente a la IC90).

Por otro lado, la resistencia de nuestras líneas celulares R0.5 μ g y R2.5 μ g se mantiene estable en el tiempo, y ensayos realizados posteriormente nos muestran una mayor diferencia entre estas células y las células de partida. Por tanto, es posible obtener grandes cambios fenotípicos con pequeños cambios en el patrón de respuesta al fármaco. Estos resultados no han podido ser comparados con los de otros muchos estudios, que generan líneas celulares resistentes a CDDP pero no analizan los cambios en la viabilidad celular, ya que asumen que las células que sobreviven al tratamiento son muy resistentes (Bertolini et al., 2009; Latifi et al., 2011; Zhang et al., 2012c). En estos trabajos se demuestra posteriormente la diferencia entre las células resistentes y las células de partida, pero *a priori* no muestran cuán resistentes son esas células, ni si esa resistencia se mantiene en el tiempo.

2.- CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS CON FENOTIPO DE *CANCER STEM CELLS* (CSC) AISLADAS A PARTIR DE LÍNEAS CELULARES DE CNMP

Desde hace más de una década, el concepto de células iniciadoras tumorales o *cancer stem cells* (CSC) ha llamado la atención a médicos y científicos en el campo de la investigación traslacional, y ha permitido tomar una nueva perspectiva en el tratamiento contra el cáncer. Según este modelo, los tumores son capaces de regenerarse gracias a una pequeña población de células que posee numerosas características que las asemejen a las células madre o *stem cell* (Nurwidya et al., 2012). Estas células tendrían, entre otras, la capacidad de dividirse indefinidamente, y también la de diferenciar dando lugar a los distintos tipos celulares que componen la mayor parte del tumor (Clarke et al., 2006). Además, se ha descrito que son más resistentes a los fármacos utilizados actualmente para el tratamiento del cáncer (Peacock and Watkins, 2008).

A diferencia de otras células, la capacidad de las células CSC para crecer independientemente de su adhesión al sustrato, hace posible su cultivo en suspensión (Hsieh et al., 2012; Rybak et al., 2011). Utilizando este abordaje experimental, en este trabajo hemos aislado células CSC a partir de dos líneas celulares de CNMP, y hemos podido identificarlas gracias a que, en estas condiciones, las células CSC crecen formando esferas (Dalerba et al., 2007b; Lim et al., 2011; Pastrana et al., 2011). Asimismo, hemos comprobado esa independencia de adherencia al sustrato con otros ensayos referidos en la bibliografía, tales como el crecimiento en agar blando (Liu et al., 2010; Veljkovic et al., 2011), y hemos demostrado que las esferas se formaban a partir de una única célula mediante ensayos clonogénicos (Clarke et al., 2006; Franken et al., 2006). También hemos demostrado que son células más resistentes a fármacos antitumorales (Peacock and Watkins, 2008), como CDDP. De hecho, el patrón de respuesta a esta droga se asemeja mucho al de las células resistentes generadas en este trabajo.

Por otro lado, en la mayoría de los tumores la pérdida de diferenciación o adquisición de un fenotipo mesenquimal se considera un evento crucial para que se generen metástasis (Visvader and Lindeman, 2008). Esto se debe a que la pérdida de adherencia al sustrato facilita la capacidad migratoria de las células, lo que les permite invadir otros órganos (Thiery et al., 2009). Un trabajo publicado en 2008 fue el primero en relacionar este proceso de transición epitelio-mesenquima (TEM) con la adquisición de propiedades de *stem cell* (Mani et al., 2008), aunque previamente ya se había relacionado con el proceso metastásico (Guarino et al., 2007). Así, la adquisición de fenotipo mesenquimal por parte de las células CSC les permitiría sobrevivir en el torrente sanguíneo, y la posterior recuperación del fenotipo epitelial les

permitiría anclarse de nuevo en otros órganos diana para generar metástasis. Por otro lado, también se han identificado células tumorales con fenotipo epitelial que sobreviven en el torrente sanguíneo (Celia-Terrassa et al., 2012; Floor et al., 2011; Korpál et al., 2011; Tsuji et al., 2008), e incluso se ha descrito que las células metastásicas expresan moléculas de adhesión célula-célula, como Cadherina E, lo que sugiere que podrían migrar en pequeños grupos (Czyz, 2008; Hsu et al., 2000). Otros estudios más recientes sugieren la existencia de ambos fenotipos (epitelial y mesenquimal) dentro de la población de células CSC (Biddle et al., 2011; Celia-Terrassa et al., 2012). Y a finales del año pasado, un estudio demostraba que la inhibición de un factor inductor de TEM (*Prrxl1*), aumentaba la capacidad metastásica de las células (Ocana et al., 2012).

En este trabajo, hemos detectado la expresión de marcadores característicos de ambos fenotipos en las células CSC, aunque hemos encontrado mayor expresión de marcadores epiteliales, tales como Cadherina E. La expresión de esta proteína se ha relacionado con la independencia de adherencia a sustrato (Celia-Terrassa et al., 2012) y con metástasis (Czyz, 2008; Hsu et al., 2000). Además, podría estar implicada en las uniones célula-célula que permitiría a las células CSC migrar en pequeñas esferas (Czyz, 2008; Hsu et al., 2000). En el ensayo de invasión en matrigel, nuestras células CSC aparentemente no fueron más invasivas que las otras líneas celulares. Sin embargo, si observamos que tienden a invadir el matrigel en forma de esferas. Quizá por esta razón, el método de cuantificación puede estar infravalorando el número de células CSC que estén atravesando la membrana, de forma que estas células se acerquen más al perfil de las células resistentes, siendo ambas más invasivas que las células H460 de partida. Estos resultados concuerdan con los trabajos referidos anteriormente, y plantean la posible existencia de ambos fenotipos (epitelial y mesenquimal) dentro de la población de células CSC.

Debido a la heterogeneidad asociada con la biología de los tumores, actualmente no existe un único marcador para identificar las células CSC de todos los tipos de cáncer. Esto se debe a que los diferentes tumores pueden expresar diferentes moléculas, y a su vez diferentes pacientes con el mismo tipo de tumor, pueden variar los patrones de expresión de esos marcadores por componentes genéticos, epigenéticos y factores medioambientales (Nurwidya et al., 2012). Actualmente existen tumores en los que se han identificado marcadores que son bastante generales dentro de ese tipo tumoral, como ocurre con $CD44^+/CD24^{-low}$ en cáncer de mama (Al-Hajj et al., 2003), pero en otros tipos tumorales, como el de pulmón, sigue siendo complicado encontrar moléculas para identificar estas células. Se han descrito marcadores, como CD133, que según unos estudios resulta muy eficiente (Eramo et al., 2008), y, según otros, no guarda apenas relación con las células CSC (Cui et al., 2011). Otros, como CD44, se

identificaron más tarde en tumores de pulmón, pero el porcentaje de células positivas para este marcador tiende a ser mayor que el de CD133 (Perona et al., 2011; Stuelten et al., 2010). Más recientemente, CD166 también se ha identificado como marcador de células CSC en pulmón. De hecho, las células CD166 positivas parecen ser bastante más tumorogénicas que las CD44 y CD133 positivas (Zhang et al., 2012b).

En este trabajo, hemos estudiado la expresión de estos tres marcadores en nuestras líneas celulares, y hemos confirmado la variabilidad descrita en la bibliografía respecto a la expresión de los mismos.

Curiosamente, la expresión de **CD133** es mucho mayor en las líneas resistentes que en las células CSC. De hecho, disminuye en las células CSC procedentes de la línea celular A549. Quizá la expresión de este marcador esté más relacionada con la resistencia a los fármacos que con la adquisición del fenotipo CSC, aun estando ambas cualidades relacionadas. De hecho, hay estudios que demuestran que el porcentaje de células CD133 positivas aumenta tras el tratamiento con CDDP (Bertolini et al., 2009; Eramo et al., 2008; Levina et al., 2008). Con **CD44** nos ocurre lo mismo que con CD133, ya que hemos observado que aumenta su expresión en las células resistentes, aunque no tanto como CD133. Estos resultados también pueden estar relacionados con el porcentaje de células positivas que presentan las líneas celulares de partida para estos marcadores. Mientras que las células CD133 positivas en líneas celulares de CNMP oscila entre 0,2 y 4%, las células CD44 positivas lo hacen entre un 30 y un 85% (Stuelten et al., 2010). Así, el porcentaje de partida es bastante elevado para CD44, por lo que no sorprende que los cambios de expresión sean menos llamativos. Por otro lado, al contrario que CD133, hemos observado que la expresión de CD44 aumenta en células A549 CSC, pero disminuye en células H460 CSC. De nuevo, la expresión de este marcador parece estar más relacionado con la resistencia a los fármacos que con el fenotipo CSC, de ahí que la expresión en las células CSC sea más variable. Asimismo, no observamos cambios en la expresión de **CD166** en las líneas resistentes, ni en células A549 CSC. Sin embargo, su expresión disminuye significativamente en células H460 CSC. Estos resultados no coinciden con lo descrito previamente (Zhang et al., 2012b), aunque puede ser debido a que en este trabajo hayamos estudiado la expresión de este marcador en líneas celulares, mientras que en el estudio citado lo hicieron en muestras clínicas de CNMP.

Por otro lado, el análisis comparativo de los perfiles de expresión génica realizados en este trabajo, ha permitido identificar genes que aumentan su expresión tanto en las células resistentes como en las células CSC. De hecho, además de las comparaciones que hemos comentado en los resultados, también realizamos comparaciones entre las células R0.5 μ g y las células CSC. Sin embargo, no obtuvimos apenas diferencias entre las dos líneas, lo cuál sugería

que los perfiles de expresión génica eran muy parecidos. Por ello, decidimos seleccionar los genes comunes a la adquisición de resistencia a CDDP y al fenotipo CSC, y, de hecho, la mayoría de estos genes fueron validados por qRT-PCR.

Entre ellos encontramos genes como **COX2** y **MALAT1**, cuya expresión en tumores de pulmón ha sido descrito previamente en la bibliografía. Se cree que la sobreexpresión de **COX2**, también conocido como **PTGS2**, tiene lugar en las primeras etapas de la carcinogénesis pulmonar, durante la hiperplasia del epitelio bronquial (Hida et al., 1998), y se considera un factor de mal pronóstico en pacientes con CNMP en estadios tempranos (Khuri et al., 2001). De hecho, la inhibición de la expresión de este gen favorece la apoptosis y aumenta la citotoxicidad de los agentes tumorales en este tipo de cáncer (Hida et al., 2000). Por su parte, **MALAT1**, se ha visto sobreexpresado en estadios tempranos de CNMP que posteriormente han desarrollado metástasis (Ji et al., 2003). Este gen codifica para uno de los ARNm no codificante de cadena larga (> 200 nucleótidos), que numerosos estudios relacionan con procesos tumorales (Yan and Wang, 2012). En el caso concreto de **MALAT1**, se ha visto que el silenciamiento de este gen reduce la capacidad migratoria de células de adenocarcinoma de pulmón (Tano et al., 2010), y reduce la proliferación y la capacidad invasiva en células de cáncer de cérvix (Guo et al., 2010). Ambos genes, por tanto, están muy relacionados con el proceso de metástasis, y el hecho de que aumente su expresión tanto en la línea celular R0.5µg como en las células CSC, corrobora la semejanza entre ambas líneas y el fenotipo descrito en este trabajo. Otros genes sobreexpresados en ambas líneas celulares, como **EGR1** y **AKAP12**, también se han visto implicados en proliferación celular y progresión tumoral (Akakura and Gelman, 2012; Jones et al., 2012). **AKAP12** además, se ha visto aumentado en líneas celulares de ovario resistentes a CDDP (Chappell et al., 2012).

Otros genes, sin embargo, aumentan su expresión en las células CSC, pero no en las células resistentes. Estos genes nos pueden ayudar a dar con la clave entre resistencia y fenotipo CSC. Llama la atención los resultados obtenidos en los genes **CXCR4** y **LOXL2**, ya que ambos, no sólo no aumentan su expresión en las células R0.5µg, sino que disminuyen significativamente. Ambos genes están implicados en la regulación de la angiogénesis y aumentan su expresión en condiciones de hipoxia (Bignon et al., 2011; Liekens et al., 2010). Además se ha visto que promueven la proliferación celular y la metástasis (Peinado et al., 2005; Razmkhah et al., 2012). La expresión de **CXCR4** depende de factores angiogénicos como **VEGF** (Liekens et al., 2010), mientras que **LOXL2** juega un papel fundamental en el mantenimiento de la matriz extracelular y en la correcta formación de los capilares (Bignon et al., 2011). Por tanto, parece que las células CSC tienden a aumentar la expresión de genes relacionados con el proceso de angiogénesis. De forma análoga, la alta expresión de interleuquina **IL1B** que hemos observado en estas células, puede contribuir a la estimulación de

las células adyacentes para la formación de nuevos vasos sanguíneos. Estos datos concuerdan con el ensayo de angiogénesis que hemos realizado *in vivo*, ya que los factores secretados por las células CSC formaron una red vascular mucho mayor que los de las células H460 y R0.5 μ g, puesto que fueron capaces de atraer mayor número de células del ratón. Asimismo, también hemos observado que las células H460 CSC son capaces de crecer sin añadir factores de crecimiento EGF y FGF-b al medio de cultivo, e incluso secretan factores que facilitan la proliferación de otras células, como las A549 CSC.

Asimismo, el análisis de *microarrays* reveló diferencias de expresión en otros genes que también son relevantes, aunque no fueron validados por qRT-PCR. Entre los genes que aumentaban su expresión en las células CSC, pero no en las células R0.5 μ g, **TMEM158**, por ejemplo, se ha visto implicado en los mecanismos de resistencia a CDDP. De hecho, la inhibición de este gen produce un aumento de la sensibilidad a la droga en líneas celulares de CNMP (Mohammed Ael et al., 2012). Otro ejemplo son los genes **S100A8** y **S100A9**, de la familia S100, que están implicados en diversas patologías que conllevan procesos inflamatorios, y se han encontrado sobreexpresados en varios tipos tumorales (Gebhardt et al., 2006).

Otros genes, como **CDH11** y **CDH13**, disminuyen su expresión en las células CSC. Varios estudios han demostrado que la metilación de los genes que codifican estas cadherinas está relacionada con metástasis, ya que no se observa en tumores primarios (Carmona et al., 2012; Selamat et al., 2011). De hecho, cuando los genes no están metilados, se inhibe la migración e invasión celular, y el crecimiento de tumor (Carmona et al., 2012). Así, la disminución en la expresión de estos genes sugiere que se encuentren metilados en las células CSC. Otro gen que nos llamó la atención, y que disminuye su expresión tanto en las células resistentes como en las células CSC, fue **SERPIN1**, también conocido como *plasminogen activator inhibitor 1* (PAI-1). Esta proteína es la encargada de inhibir la acción del activador del plasminógeno (PLAU). El plasminógeno es una proteína clave en el proceso de la degradación proteolítica de la matriz extracelular (MEC) y la membrana basal, que intervienen en los procesos de crecimiento tumoral, migración e invasión celular (Di Bernardo et al., 2009). Por tanto, la acción de SERPIN1 permite que haya una regulación de estos procesos. El hecho de que este gen esté inhibido en las células CSC, favorece la degradación de la MEC, y por tanto, la invasión a los tejidos circundantes. Además, en las células CSC, también encontramos aumentada la expresión de **PLAU**, lo que implica que se favorece aún más la acción del plasminógeno. De hecho, varios estudios sugieren que las concentraciones de PLAU y PAI-1 pueden tener valor pronóstico en varios tipos de cáncer, incluido el de pulmón (Schmitt et al., 1997; Yoshino et al., 1998). Otros genes que disminuyen su expresión en ambas líneas celulares, a diferencia de lo que está descrito en la bibliografía, son las enzimas de la familia aldehído deshidrogenasa (**ALDH**). Estos datos concuerdan con resultados previos de nuestro

trabajo, en los que intentamos, con poco éxito, identificar la población de células CSC detectando la actividad ALDH con el kit comercial *ALDEFLUOR™ Kit* (StemCell Technologies) (datos no mostrados).

Por otro lado, en este trabajo hemos demostrado que muchos de los genes que aumentan su expresión en las células CSC con respecto a las células H460, se inhiben cuando provocamos la diferenciación de las primeras adheriéndolas de nuevo al sustrato. De hecho, en la mayoría de los genes estudiados, las células CSC diferenciadas prácticamente recuperan los valores de expresión de las células H460.

Asimismo, resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que la inhibición en la expresión de la fosfatasa DUSP1 disminuye significativamente la capacidad tumorigénica de la línea celular H460 (Moncho-Amor et al., 2011). Esta fosfatasa está implicada en procesos de angiogénesis, proliferación, migración e invasión celular, y en dicho estudio se identificaron una serie de genes que disminuían notablemente su expresión cuando se inhibía DUSP1. Tres de esos genes han sido validados en este trabajo (**DUSP1**, **DUSP6** y **VEFGC**), y todos, a excepción de DUSP1 en las células A549 CSC, se sobreexpresan en las células resistentes y CSC, corroborando las propiedades tumorigénicas de estas células. Sin embargo, al igual que ocurría con los marcadores de fenotipo CSC, según la línea celular los genes se expresan más en las células resistentes (H460) o en las células CSC (A549).

Estos resultados sugieren que los cambios fenotípicos observados en las células resistentes y en las células CSC, responden a cambios en la expresión de genes relacionados con invasión celular y angiogénesis.

2.1.- Tumorigenicidad celular y capacidad metastásica de las líneas celulares

R0.5µg y CSC

Además de los experimentos realizados *in vitro*, en este trabajo hemos estudiado la capacidad tumorigénica y metastásica de las células R0.5µg y CSC *in vivo*. Para ello hemos inoculado las células en los flancos y en la cola de ratones atímicos-Foxn1^{nu} (nu/nu).

Los resultados obtenidos muestran una clara diferencia en la capacidad tumorigénica de las líneas celulares H460 y CSC. Las células CSC formaron tumores más pequeños y empezaron a formarse más tarde que los de las células H460. Estos datos no coinciden con otros

trabajos publicados (Eramo et al., 2008; Mani et al., 2008; Zhang et al., 2012b), en los que seleccionan las células CSC en base a la expresión de determinados marcadores. Pero tampoco coinciden con otros estudios en los que se ha demostrado mayor tumorigenicidad de las células CSC negativas para esos mismos marcadores (Celia-Terrassa et al., 2012; Ogden et al., 2008; Shmelkov et al., 2008; Wang et al., 2008). Sin embargo, si asumimos que un tumor está formado por una pequeña población de células CSC, capaces de diferenciar dando lugar a las células tumorales propiamente dichas y con mayor capacidad proliferativa que las células CSC (teoría de las *Cancer Stem Cells*), podría ocurrir, que las células CSC por si solas acabaran formando un tumor, pero más lentamente que las células de la masa tumoral.

Para comprobar esta hipótesis, en este trabajo hemos estudiado la tumorigenicidad de mezclas de células con distintos porcentajes de células H460 y CSC. De esta forma hemos observado que, cuando ambas líneas celulares están presentes, y mantienen la relación de 75% H460 y 25% CSC, los tumores que se forman son mucho más grandes y empiezan a formarse antes. Además, mientras que en el resto de las mezclas el porcentaje de células H460 observado en los tumores a término aumenta en detrimento del porcentaje de células CSC, en la mezcla más tumorigénica es el porcentaje de células CSC el que aumenta en detrimento de las células H460. Estos datos sugieren que las células H460 crecen más deprisa que las células CSC, lo cual corrobora el resultado obtenido en el ensayo tumorigénico, y además demuestran que existen determinadas proporciones de células H460 y células CSC que potencian el crecimiento de ambas generando tumores más agresivos.

Por otro lado, los ensayos para estudiar la capacidad metastásica corroboraron la agresividad de ambas líneas celulares cuando se inoculan juntas. De hecho, la eficiencia de anidación en órganos distintos al pulmón de las células H460 + células CSC, fue mucho mayor que la eficiencia de cada línea celular por separado.

Todos estos resultados sugieren que las células CSC parecen estar jugando un papel más invasivo que proliferativo en la formación de los tumores. Así, estas células serían las encargadas de anidar y colonizar el órgano diana, para permitir posteriormente a las células más proliferativas, dividirse y formar el tumor. De esta forma, las células CSC no serían más tumorigénicas, sino que aumentarían la tumorigenicidad de otras células, probablemente debido a la capacidad de secretar factores que estimulen a las células adyacentes.

Por su parte, las células resistentes R0.5 μ g mostraron un comportamiento metastásico intermedio entre las células H460 y las células CSC. La eficiencia de metástasis en órganos distintos al pulmón fue similar a la de las células CSC, pero el número medio de metástasis por ratón se acercaba más al de las células H460. Sin embargo, la facilidad de estas células para formar tumores en las patas de los ratones fue, cuanto menos, llamativa. El análisis histológico

de los fémures reveló la infiltración de células tumorales en la diáfisis y metafisis de 5 de los 14 ratones inoculados con estas células (35,7%), corroborando así, la afinidad de las mismas por anidar en hueso.

En resumen, estos resultados corroboran el patrón de comportamiento de las células CSC *in vitro*, demostrando que las células seleccionadas en este trabajo presentan características distintas a las células de partida, y que corresponden con un fenotipo más invasivo que puede aumentar la tumorigenicidad de otras células. Por su parte, la adquisición de resistencia no parece implicar cambios en la capacidad tumorigénica de las células, pero si parece aumentar la afinidad de las mismas por metastatizar en determinados órganos, como el hueso. No obstante, un estudio más amplio y detallado del comportamiento *in vivo* de estas células permitiría esclarecer todos estos resultados, así como estudiar las posibles consecuencias de inocular juntas las líneas celulares R0.5 μ g y CSC.

3.- ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A QUIMIOTERAPIA EN PACIENTES CON CNMP

3.1.- Estudio de la viabilidad celular en biopsias de pacientes con CNMP en respuesta a CDDP.

Tras el tratamiento con CDDP, los pacientes suelen responder de manera muy efectiva al fármaco, pero muchos de ellos recaen pasado un tiempo principalmente por la adquisición de resistencia a la droga. Además, durante ese periodo, el tumor puede regenerarse recuperando el tamaño inicial (Kim and Tannock, 2005). Actualmente, el concepto de las células CSC ha cambiado radicalmente nuestro planteamiento de la terapia contra el cáncer. Se cree que estas células son las responsables, en parte, del fallo en el tratamiento por ser resistentes a los fármacos, y de la regeneración del tumor dando lugar a las recidivas (Gorelik et al., 2010). Según estos datos, el tratamiento con quimioterapia incrementaría la proporción de células CSC resistentes a la droga a base de eliminar las células tumorales diferenciadas sensibles a la terapia (Levina et al., 2008). Así, tras varios ciclos de quimioterapia, la proporción de células CSC podría aumentar hasta un punto en que gran parte de la masa tumoral sea resistente al fármaco. Por ello, si fuéramos capaces de conocer la proporción inicial de células CSC en los tumores, podríamos predecir la respuesta de los pacientes al tratamiento, e incluso llevar a cabo

tratamientos específicos contra las células CSC, tales como la inhibición de c-kit (Levina et al., 2010).

Por esta razón, durante el desarrollo de esta tesis, después de analizar la relación entre las células CSC y la resistencia a CDDP en líneas celulares, era importante poder extrapolar los resultados obtenidos a la clínica. Para ello determinamos la respuesta a CDDP en muestras de una cohorte de 45 pacientes con CNMP en estadios quirúrgicos. Estos pacientes no habían recibido tratamiento previo de quimioterapia ni radioterapia, por lo que la resistencia que determinamos en cada caso se debía a una cualidad intrínseca del tumor. Además, mediante el crecimiento de las células del tumor en condiciones de cultivo específicas, hemos conseguido aislar células CSC a partir de estas muestras en un 40% de los casos.

Nuestro objetivo era buscar una relación entre la viabilidad que presentaban las muestras frente a CDDP, y la capacidad de formar o no esferas en condiciones de cultivo de células CSC. Al analizar los resultados, no obtuvimos datos concluyentes que determinaran que el crecimiento de células CSC implicara mayor resistencia a CDDP. Sin embargo, si encontramos evidencia estadística de que las muestras que no eran capaces de crecer en condiciones de células CSC eran más sensibles al CDDP ($p = 0,028$).

Un inconveniente de trabajar con muestras de pacientes es la enorme heterogeneidad que nos encontramos entre los individuos, de forma análoga a la que nos encontramos entre las líneas celulares. Por ello, es conveniente realizar ensayos con una serie numerosa de pacientes que nos permita obtener resultados significativos. En nuestro estudio, posiblemente el procesamiento de un mayor número de muestras habría permitido obtener resultados más concluyentes en cuanto al crecimiento de células CSC y la resistencia a CDDP.

La importancia de estos resultados, es que hemos podido extrapolar a los pacientes los ensayos realizados *in vitro* en cuanto al aislamiento de células CSC. Un estudio sistemático de estas células, y la optimización de la identificación de las mismas, podría añadir un parametro de análisis en la clínica que se tendría en cuenta a la hora de elegir una terapia u otra en función del paciente (Kitamura et al., 2009). Además de la optimización de la terapia, también evitaríamos un sufrimiento innecesario del paciente por los efectos secundarios de un tratamiento que podría ser más perjudicial que curativo.

3.2.- Estudio de la respuesta a otro agente antitumoral: Erlotinib (Tarceva®)

Actualmente, además del uso de fármacos citotóxicos como CDDP, la caracterización de alteraciones específicas en un número cada vez mayor de genes también nos permite diseñar

terapias para el tratamiento específico de esas alteraciones. La identificación de las mutaciones somáticas en el gen EGFR y su valor predictivo en respuesta a los inhibidores de la actividad tirosina quinasa (TKIs) del receptor, ha supuesto uno de los avances terapéuticos más importantes en el tratamiento del cáncer de pulmón (Pao and Girard, 2011). De los tres mecanismos moleculares responsables de la desregulación de EGFR (mutaciones, amplificación génica y sobreexpresión de la proteína), son las mutaciones en el gen las que mejor se asocian con la respuesta a los TKIs, y se consideran, por tanto, un marcador predictivo importante para la respuesta del CNMP (Mitsudomi et al., 2005; Rosell et al., 2009).

Entre las mutaciones descritas, las deleciones en el exón 19 y la mutación L858R del exón 21, representan más del 90% de los casos y se asocian con sensibilidad a los TKIs, mientras que otras alteraciones, como la mutación T790M del exón 20 se relacionan con resistencia a estos inhibidores (Sharma et al., 2007). Dada la relación existente entre la presencia de estas mutaciones y la resistencia que presentan los tumores al tratamiento con TKIs, en esta tesis hemos realizado un estudio comparativo de pacientes sensibles y resistentes a Erlotinib (Tarceva®), y un análisis mutacional de EGFR en una cohorte de 41 pacientes con CNMP en estadios quirúrgicos.

El análisis mutacional del gen en todas las muestras de pacientes procesadas reveló una frecuencia de mutaciones ligeramente inferior (aprox. 5%) a la descrita en la literatura para pacientes caucásicos (aprox. 15%). Esta diferencia podría justificarse por el hecho de que se trataba de una cohorte de pacientes en estadios iniciales, mientras que los estudios realizados hasta la fecha corresponden en su mayoría a tumores en estadios avanzados (Mitsudomi et al., 2005; Mok et al., 2009; Rosell et al., 2011; Rosell et al., 2009). De hecho, el valor pronóstico y predictivo de las mutaciones en EGFR en estadios iniciales aún no está definido (Mok, 2011), aunque todo apunta a una confirmación de lo observado en estadios avanzados de CNMP (Kosaka et al., 2009).

Por otro lado, en nuestro estudio buscábamos establecer alguna relación entre la presencia o no de mutaciones en EGFR y la resistencia de los tumores a Erlotinib. En este caso observamos que los dos pacientes que presentaron la deleción delE746-A750 del exón 19 no se encontraban dentro del grupo de muestras más sensibles al fármaco, aunque su respuesta fue similar a la de la línea celular H1650 que también presenta la mutación en este exón. Por otro lado, estos datos de viabilidad celular también pueden verse afectados si la muestra procesada tiene un porcentaje de celularidad tumoral bajo, ya que la viabilidad de células normales podría enmascarar la respuesta de las células tumorales. Sin embargo, desconocemos los datos de porcentaje de celularidad tumoral de las muestras analizadas en este trabajo, aunque el análisis

de la secuencia de ADN demuestra que las muestras no eran homogéneas para la mutación. Asimismo, dada la baja frecuencia de mutaciones descrita para pacientes caucásicos, posiblemente estos resultados poco concluyentes se deban al limitado número de tumores analizados.

Un resultado inesperado es que nos hemos encontrado un grupo de pacientes más sensibles a Erlotinib que aquellos que presentaron la mutación en el exón 19 de EGFR, a las que denominamos Muy Sensibles. Por ello, y para comparar los fenotipos extremos que hemos encontrado en los pacientes, en este trabajo hemos realizado un estudio comparativo de los perfiles de expresión génica de muestras de pacientes Muy Sensibles y Resistentes a Erlotinib. El análisis de *microarrays* reveló una disminución en la expresión de cuatro genes significativos en los pacientes que resultaron más sensibles a Erlotinib (MET, AREG, MMP1 e IGF2), todos ellos relacionados con la actividad de EGFR. Aunque la validación de los niveles de expresión por qRT-PCR no revelaron resultados concluyentes para IGF2, sí observamos diferencias en la expresión de AREG, MET y MMP. **AREG** actúa como ligando de EGFR junto con EGF, por lo que la disminución en su expresión dificultaría la activación del receptor y las consecuentes cascadas de señalización implicadas en proliferación y supervivencia celular (Ciardiello and Tortora, 2008). Por su parte, la amplificación de **MET**, más allá de su papel en carcinogénesis, tiene especial relevancia ya que se ha descrito como el principal mecanismo de resistencia a los TKIs, junto con la mutación T790M del exón 20. De hecho, se ha identificado en el 20% de los pacientes con CNMP resistentes a estos inhibidores (Engelman et al., 2007). Asimismo, se ha descrito que EGFR induce la expresión de **MMP1** a través de la vía de las MAPK (Anand et al., 2011). Tiene sentido, por tanto, que estos genes aparezcan inhibidos en pacientes sensibles a Erlotinib. Sin embargo, un estudio comparativo de los perfiles de expresión génica con un número mayor de pacientes sensibles y resistentes, aumentaría la relevancia de estos resultados obtenidos en los *microarrays*. Asimismo, de esta forma también podríamos obtener información de posibles marcadores que nos permitieran discriminar los pacientes susceptibles de responder a fármacos como Erlotinib que no tengan mutado el receptor de EGF.

CONCLUSIONES

- 1.- El tratamiento de líneas celulares de CNMP con una única dosis de Cisplatino (CDDP) genera células que adquieren resistencia estable al fármaco.
- 2.- Se han aislado células de CNMP crecidas en suspensión, bajo condiciones no adherentes y con factores de crecimiento EGF y FGF-b, que presentan comportamientos *in vitro* característicos de *cancer stem cell* (CSC), entre ellos el aumento de la resistencia a CDDP.
- 3.- Los cambios fenotípicos observados en las células resistentes R0.5 μ g y en las células CSC, responden a cambios a nivel de expresión génica en genes relacionados con invasión celular y angiogénesis, algunos incluso, comunes a ambas líneas celulares.
- 4.- Las células CSC resultaron ser menos tumorogénicas y presentaron menor eficiencia de metástasis *in vivo* que las células H460. Sin embargo, la inoculación simultánea de ambas líneas celulares puede aumentar la capacidad tumorogénica y metastásica de ambas, sugiriendo que las células CSC no son más tumorogénicas, pero si aumentan la tumorogenicidad de otras células.
- 5.- Hay evidencias significativas ($p = 0,028$) de que las muestras procedentes de pacientes con CNMP en estadios quirúrgicos que responden al tratamiento con CDDP, contienen menos células CSC, existiendo, por tanto, una relación entre la respuesta del tumor al fármaco y la proporción de células CSC presente en el mismo.
- 6.- Se han identificado tres posibles genes marcadores cuya expresión disminuye en células de pacientes sensibles al inhibidor de la actividad tirosina quinasa de EGF Erlotinib. Sin embargo, no se observó correlación entre la presencia de mutaciones en el gen EGFR y la sensibilidad a este fármaco en la cohorte de pacientes analizada.
- 7.- Como conclusión general, la adquisición de resistencia a CDDP y el fenotipo de células CSC, son cualidades relacionadas entre si que generan un comportamiento similar de las células *in vitro*, y que corresponden con cambios específicos a nivel de expresión génica relacionados con procesos de invasión tumoral y metástasis.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, S.M., Goode, R.J., and Simpson, R.J.** (2008). Stem cell markers: insights from membrane proteomics? *Proteomics* 8, 4946-4957.
- Akakura, S., and Gelman, I.H.** (2012). Pivotal Role of AKAP12 in the Regulation of Cellular Adhesion Dynamics: Control of Cytoskeletal Architecture, Cell Migration, and Mitogenic Signaling. *J Signal Transduct* 2012, 529179.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F.** (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 3983-3988.
- Anand, M., Van Meter, T.E., and Fillmore, H.L.** (2011). Epidermal growth factor induces matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression and invasion in glioma cell lines via the MAPK pathway. *J Neurooncol* 104, 679-687.
- Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.P., Bouchet, B.P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S., et al.** (2008). Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 14, 79-89.
- Baldwin, A.S.** (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* 107, 241-246.
- Bean, J., Brennan, C., Shih, J.Y., Riely, G., Viale, A., Wang, L., Chitale, D., Motoi, N., Szoke, J., Broderick, S., et al.** (2007). MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 20932-20937.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y.** (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B*, 57:289{300.
- Berdasco, M., and Esteller, M.** (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell* 19, 698-711.
- Bertolini, G., Roz, L., Perego, P., Tortoreto, M., Fontanella, E., Gatti, L., Pratesi, G., Fabbri, A., Andriani, F., Tinelli, S., et al.** (2009). Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 16281-16286.
- Besson, A., Hwang, H.C., Cicero, S., Donovan, S.L., Gurian-West, M., Johnson, D., Clurman, B.E., Dyer, M.A., and Roberts, J.M.** (2007). Discovery of an oncogenic activity in p27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype. *Genes Dev* 21, 1731-1746.
- Biddle, A., Liang, X., Gammon, L., Fazil, B., Harper, L.J., Emich, H., Costea, D.E., and Mackenzie, I.C.** (2011). Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer Res* 71, 5317-5326.
- Bignon, M., Pichol-Thievend, C., Hardouin, J., Malbouyres, M., Brechot, N., Nasciutti, L., Barret, A., Teillon, J., Guillon, E., Etienne, E., et al.** (2011). Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane. *Blood* 118, 3979-3989.

Bolstad, B. M., Irizarry R. A., Astrand, M., and Speed, T. P. (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on bias and variance. *Bioinformatics* 19, 185-193.

Bowen, M.A., Patel, D.D., Li, X., Modrell, B., Malacko, A.R., Wang, W.C., Marquardt, H., Neubauer, M., Pesando, J.M., Francke, U., et al. (1995). Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J Exp Med* 181, 2213-2220.

Breitling, R., Armengaud, P., Amtmann, A., and Herzyk, P. (2004). Rank Products: A simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments, *FEBS Lett*, 57383-92

Cabanes, A., Pérez-Gómez, B., Aragonés, N., Pollán, M., López-Abente, G. (2009). La situación del cáncer en España: 1995-2006. Madrid: Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Ciencia e Innovación.

Carmona, F.J., Villanueva, A., Vidal, A., Munoz, C., Puertas, S., Penin, R.M., Goma, M., Lujambio, A., Piulats, J.M., Mesia, R., et al. (2012). Epigenetic disruption of cadherin-11 in human cancer metastasis. *J Pathol* 228, 230-240.

Celia-Terrassa, T., Meca-Cortes, O., Mateo, F., de Paz, A.M., Rubio, N., Arnal-Estape, A., Ell, B.J., Bermudo, R., Diaz, A., Guerra-Rebollo, M., et al. (2012). Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *J Clin Invest* 122, 1849-1868.

Ciardiello, F., and Tortora, G. (2008). EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 358, 1160-1174.

Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66, 9339-9344.

Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65, 10946-10951.

Collins, L.G., Haines, C., Perkel, R., and Enck, R.E. (2007). Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 75, 56-63.

Cortes-Sempere, M., Chattopadhyay, S., Rovira, A., Rodriguez-Fanjul, V., Belda-Iniesta, C., Tapia, M., Cejas, P., Machado-Pinilla, R., Manguan-Garcia, C., Sanchez-Perez, I., et al. (2009). MKP1 repression is required for the chemosensitizing effects of NF-kappaB and PI3K inhibitors to cisplatin in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 286, 206-216.

Cortes-Sempere, M., de Miguel, M.P., Pernia, O., Rodriguez, C., de Castro Carpeno, J., Nistal, M., Conde, E., Lopez-Rios, F., Belda-Iniesta, C., Perona, R., et al. (2012). IGF1R-3 methylation-derived deficiency mediates the resistance to cisplatin through the activation of the IGF1R/Akt pathway in non-small cell lung cancer. *Oncogene*.

Crino, L., Foglietta, J., and Hamzaj, A. (2007). Lung cancer. *J Thorac Oncol* 2, S24-26.

Cui, F., Wang, J., Chen, D., and Chen, Y.J. (2011). CD133 is a temporary marker of cancer stem cells in small cell lung cancer, but not in non-small cell lung cancer. *Oncology Rep* 25, 701-708.

Czyz, J. (2008). The stage-specific function of gap junctions during tumourigenesis. *Cell Mol Biol Lett* 13, 92-102.

Chappell, N.P., Teng, P.N., Hood, B.L., Wang, G., Darcy, K.M., Hamilton, C.A., Maxwell, G.L., and Conrads, T.P. (2012). Mitochondrial proteomic analysis of cisplatin resistance in ovarian cancer. *J Proteome Res* 11, 4605-4614.

Chattopadhyay, S., Machado-Pinilla, R., Manguan-Garcia, C., Belda-Iniesta, C., Moratilla, C., Cejas, P., Fresno-Vara, J.A., de Castro-Carpeno, J., Casado, E., Nistal, M., et al. (2006). MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 25, 3335-3345.

Chiang, A.C., and Massague, J. (2008). Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med* 359, 2814-2823.

Chitnis, M.M., Yuen, J.S., Protheroe, A.S., Pollak, M., and Macaulay, V.M. (2008). The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin Cancer Res* 14, 6364-6370.

Dalerba, P., Cho, R.W., and Clarke, M.F. (2007a). Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 58, 267-284.

Dalerba, P., Dylla, S.J., Park, I.K., Liu, R., Wang, X., Cho, R.W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E.H., Simeone, D.M., et al. (2007b). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 10158-10163.

Dean, M., Fojo, T., and Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 5, 275-284.

DePinho, R.A., and Jacks, T. (2001). Introduction. The laboratory mouse in cancer research. *Semin Cancer Biol* 11, 175-176.

Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279-3290.

Di Bernardo, M.C., Matakidou, A., Eisen, T., and Houlston, R.S. (2009). Plasminogen activator inhibitor variants PAI-1 A15T and PAI-2 S413C influence lung cancer prognosis. *Lung Cancer* 65, 237-241.

Ding, L., Getz, G., Wheeler, D.A., Mardis, E.R., McLellan, M.D., Cibulskis, K., Sougnez, C., Greulich, H., Muzny, D.M., Morgan, M.B., et al. (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 455, 1069-1075.

Dylla, S.J., Beviglia, L., Park, I.K., Chartier, C., Raval, J., Ngan, L., Pickell, K., Aguilar, J., Lazetic, S., Smith-Berdan, S., et al. (2008). Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One* 3, e2428.

Dziadziuszko, R., Camidge, D.R., and Hirsch, F.R. (2008). The insulin-like growth factor pathway in lung cancer. *J Thorac Oncol* 3, 815-818.

Eberhardt, W., Stamatidis, G., Stuschke, M., Wilke, H., Muller, M.R., Kolks, S., Flasshove, M., Schutte, J., Stahl, M., Schlenger, L., et al. (1999). Prognostically orientated multimodality treatment including surgery for selected patients of small-cell lung cancer patients stages IB to IIIB: long-term results of a phase II trial. *Br J Cancer* 81, 1206-1212.

Engelman, J.A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J.O., Lindeman, N., Gale, C.M., Zhao, X., Christensen, J., et al. (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* *316*, 1039-1043.

Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pilozi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., and De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* *15*, 504-514.

Fang, D., Nguyen, T.K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A.N., Hotz, S., Van Belle, P.A., Xu, X., Elder, D.E., and Herlyn, M. (2005). A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* *65*, 9328-9337.

Fidler, I.J. and Ellis, L.M. (2000). Chemotherapeutic drugs—more really is not better. *Nat Med* *6*, 500 - 502 .

Floor, S., van Staveren, W.C., Larsimont, D., Dumont, J.E., and Maenhaut, C. (2011). Cancer cells in epithelial-to-mesenchymal transition and tumor-propagating-cancer stem cells: distinct, overlapping or same populations. *Oncogene* *30*, 4609-4621.

Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., and van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* *1*, 2315-2319.

Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., and Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* *64*, 7011-7021.

Gandhi, J., Zhang, J., Xie, Y., Soh, J., Shigematsu, H., Zhang, W., Yamamoto, H., Peyton, M., Girard, L., Lockwood, W.W., et al. (2009). Alterations in genes of the EGFR signaling pathway and their relationship to EGFR tyrosine kinase inhibitor sensitivity in lung cancer cell lines. *PLoS One* *4*, e4576.

Gazdar, A.F. (2009). Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* *28 Suppl 1*, S24-31.

Gebhardt, C., Nemeth, J., Angel, P., and Hess, J. (2006). S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol* *72*, 1622-1631.

Giangreco, A., Arwert, E.N., Rosewell, I.R., Snyder, J., Watt, F.M., and Stripp, B.R. (2009). Stem cells are dispensable for lung homeostasis but restore airways after injury. *Proc Natl Acad Sci USA* *106*, 9286-9291.

Giangreco, A., Groot, K.R., and Janes, S.M. (2007). Lung cancer and lung stem cells: strange bedfellows? *Am J Respir Crit Care Med* *175*, 547-553.

Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., et al. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* *1*, 555-567.

Goldstraw, P., Crowley, J., Chansky, K., Giroux, D.J., Groome, P.A., Rami-Porta, R., Postmus, P.E., Rusch, V., and Sobin, L. (2007). The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* *2*, 706-714.

- Gorelik, E., Lokshin, A., and Levina, V.** (2010). Lung cancer stem cells as a target for therapy. *Anticancer Agents Med Chem* *10*, 164-171.
- Gospodarowicz, M.K., Miller, D., Groome, P.A., Greene, F.L., Logan, P.A., and Sobin, L.H.** (2004). The process for continuous improvement of the TNM classification. *Cancer* *100*, 1-5.
- Gottesman, M.M.** (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* *53*, 615-627.
- Guarino, M., Rubino, B., and Ballabio, G.** (2007). The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* *39*, 305-318.
- Guo, F., Li, Y., Liu, Y., Wang, J., and Li, G.** (2010). Inhibition of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in CaSki human cervical cancer cells suppresses cell proliferation and invasion. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* *42*, 224-229.
- Hammerman, P.S., Sos, M.L., Ramos, A.H., Xu, C., Dutt, A., Zhou, W., Brace, L.E., Woods, B.A., Lin, W., Zhang, J., et al.** (2011). Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discov* *1*, 78-89.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A.** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.
- Herbst, R.S., Onn, A., and Sandler, A.** (2005). Angiogenesis and lung cancer: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol* *23*, 3243-3256.
- Hida, T., Kozaki, K., Muramatsu, H., Masuda, A., Shimizu, S., Mitsudomi, T., Sugiura, T., Ogawa, M., and Takahashi, T.** (2000). Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* *6*, 2006-2011.
- Hida, T., Yatabe, Y., Achiwa, H., Muramatsu, H., Kozaki, K., Nakamura, S., Ogawa, M., Mitsudomi, T., Sugiura, T., and Takahashi, T.** (1998). Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res* *58*, 3761-3764.
- Hirschmann-Jax, C., Foster, A.E., Wulf, G.G., Goodell, M.A., and Brenner, M.K.** (2005). A distinct "side population" of cells in human tumor cells: implications for tumor biology and therapy. *Cell Cycle* *4*, 203-205.
- Hirschmann-Jax, C., Foster, A.E., Wulf, G.G., Nuchtern, J.G., Jax, T.W., Gobel, U., Goodell, M.A., and Brenner, M.K.** (2004). A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* *101*, 14228-14233.
- Hirst, G.L., and Balmain, A.** (2004). Forty years of cancer modelling in the mouse. *Eur J Cancer* *40*, 1974-1980.
- Ho, M.M., Ng, A.V., Lam, S., and Hung, J.Y.** (2007). Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res* *67*, 4827-4833.
- Hsieh, J.L., Lu, C.S., Huang, C.L., Shieh, G.S., Su, B.H., Su, Y.C., Lee, C.H., Chang, M.Y., Wu, C.L., and Shiau, A.L.** (2012). Acquisition of an enhanced aggressive phenotype in human

lung cancer cells selected by suboptimal doses of cisplatin following cell deattachment and reattachment. *Cancer Lett* 321, 36-44.

Hsu, M., Andl, T., Li, G., Meinkoth, J.L., and Herlyn, M. (2000). Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci* 113 (Pt 9), 1535-1542.

Huang, E.H., Hynes, M.J., Zhang, T., Ginestier, C., Dontu, G., Appelman, H., Fields, J.Z., Wicha, M.S., and Boman, B.M. (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* 69, 3382-3389.

Ibanez de Caceres, I., Cortes-Sempere, M., Moratilla, C., Machado-Pinilla, R., Rodriguez-Fanjul, V., Manguan-Garcia, C., Cejas, P., Lopez-Rios, F., Paz-Ares, L., de CastroCarpeno, J., et al. (2010). IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 29, 1681-1690.

Janku, F., Garrido-Laguna, I., Petruzella, L.B., Stewart, D.J., and Kurzrock, R. (2011). Novel therapeutic targets in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 6, 1601-1612.

Jayachandran, G., Ueda, K., Wang, B., Roth, J.A., and Ji, L. (2010). NPRL2 sensitizes human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells to cisplatin treatment by regulating key components in the DNA repair pathway. *PLoS One* 5, e11994.

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60, 277-300.

Ji, P., Diederichs, S., Wang, W., Boing, S., Metzger, R., Schneider, P.M., Tidow, N., Brandt, B., Buerger, H., Bulk, E., et al. (2003). MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* 22, 8031-8041.

Jiang, F., Qiu, Q., Khanna, A., Todd, N.W., Deepak, J., Xing, L., Wang, H., Liu, Z., Su, Y., Stass, S.A., et al. (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res* 7, 330-338.

Jimenez, B., and Volpert, O.V. (2001). Mechanistic insights on the inhibition of tumor angiogenesis. *J Mol Med (Berl)* 78, 663-672.

Jones, A.C., Trujillo, K.A., Phillips, G.K., Fleet, T.M., Murton, J.K., Severns, V., Shah, S.K., Davis, M.S., Smith, A.Y., Griffith, J.K., et al. (2012). Early growth response 1 and fatty acid synthase expression is altered in tumor adjacent prostate tissue and indicates field cancerization. *Prostate* 72, 1159-1170.

Kerbel, R.S. (2008). Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 358, 2039-2049.

Khuri, F.R., Wu, H., Lee, J.J., Kemp, B.L., Lotan, R., Lippman, S.M., Feng, L., Hong, W.K., and Xu, X.C. (2001). Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 7, 861-867.

Kim, J.J., and Tannock, I.F. (2005). Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nat Rev Cancer* 5, 516-525.

- Kitamura, H., Okudela, K., Yazawa, T., Sato, H., and Shimoyamada, H.** (2009). Cancer stem cell: implications in cancer biology and therapy with special reference to lung cancer. *Lung Cancer* *66*, 275-281.
- Klonisch, T., Wiechec, E., Hombach-Klonisch, S., Ande, S.R., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K., and Los, M.** (2008). Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications. *Trends Mol Med* *14*, 450-460.
- Korpál, M., Ell, B.J., Buffa, F.M., Ibrahim, T., Blanco, M.A., Celia-Terrassa, T., Mercatali, L., Khan, Z., Goodarzi, H., Hua, Y., et al.** (2011). Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nat Med* *17*, 1101-1108.
- Kosaka, T., Yatabe, Y., Onozato, R., Kuwano, H., and Mitsudomi, T.** (2009). Prognostic implication of EGFR, KRAS, and TP53 gene mutations in a large cohort of Japanese patients with surgically treated lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* *4*, 22-29.
- Langer, C.J., Besse, B., Gualberto, A., Brambilla, E., and Soria, J.C.** (2010). The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* *28*, 5311-5320.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E.** (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* *367*, 645-648.
- Latifi, A., Abubaker, K., Castrechini, N., Ward, A.C., Liongue, C., Dobill, F., Kumar, J., Thompson, E.W., Quinn, M.A., Findlay, J.K., et al.** (2011). Cisplatin treatment of primary and metastatic epithelial ovarian carcinomas generates residual cells with mesenchymal stem cell-like profile. *J Cell Biochem* *112*, 2850-2864.
- Leung, E.L., Fiscus, R.R., Tung, J.W., Tin, V.P., Cheng, L.C., Sihoe, A.D., Fink, L.M., Ma, Y., and Wong, M.P.** (2010). Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PloS One* *5*, e14062.
- Levina, V., Marrangoni, A., Wang, T., Parikh, S., Su, Y., Herberman, R., Lokshin, A., and Gorelik, E.** (2010). Elimination of human lung cancer stem cells through targeting of the stem cell factor-c-kit autocrine signaling loop. *Cancer Res* *70*, 338-346.
- Levina, V., Marrangoni, A.M., DeMarco, R., Gorelik, E., and Lokshin, A.E.** (2008). Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. *PloS One* *3*, e3077.
- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M.** (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* *67*, 1030-1037.
- Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.F., Hilsenbeck, S.G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G.C., et al.** (2008). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* *100*, 672-679.
- Liekens, S., Schols, D., and Hatse, S.** (2010). CXCL12-CXCR4 axis in angiogenesis, metastasis and stem cell mobilization. *Curr Pharm Des* *16*, 3903-3920.

- Lim, Y.C., Oh, S.Y., Cha, Y.Y., Kim, S.H., Jin, X., and Kim, H.** (2011). Cancer stem cell traits in squamospheres derived from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 47, 83-91.
- Liu, F., Killian, J.K., Yang, M., Walker, R.L., Hong, J.A., Zhang, M., Davis, S., Zhang, Y., Hussain, M., Xi, S., et al.** (2010). Epigenomic alterations and gene expression profiles in respiratory epithelia exposed to cigarette smoke condensate. *Oncogene* 29, 3650-3664.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Longley, D.B., and Johnston, P.G.** (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 205, 275-292.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al.** (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704-715.
- Marhaba, R., Klingbeil, P., Nuebel, T., Nazarenko, I., Buechler, M.W., and Zoeller, M.** (2008). CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers. *Curr Mol Med* 8, 784-804.
- Marzesco, A.M., Janich, P., Wilsch-Brauninger, M., Dubreuil, V., Langenfeld, K., Corbeil, D., and Huttner, W.B.** (2005). Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Clin Sci* 118, 2849-2858.
- May, C.D., Sphyris, N., Evans, K.W., Werden, S.J., Guo, W., and Mani, S.A.** (2011). Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 13, 202.
- Meirelles, K., Benedict, L.A., Dombkowski, D., Pepin, D., Preffer, F.I., Teixeira, J., Tanwar, P.S., Young, R.H., MacLaughlin, D.T., Donahoe, P.K., et al.** (2012). Human ovarian cancer stem/progenitor cells are stimulated by doxorubicin but inhibited by Mullerian inhibiting substance. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 2358-2363.
- Mitsudomi, T., Kosaka, T., Endoh, H., Horio, Y., Hida, T., Mori, S., Hatoaka, S., Shinoda, M., Takahashi, T., and Yatabe, Y.** (2005). Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. *J Clin Oncol* 23, 2513-2520.
- Mitsumoto, M., Kamura, T., Kobayashi, H., Sonoda, T., Kaku, T., and Nakano, H.** (1998). Emergence of higher levels of invasive and metastatic properties in the drug resistant cancer cell lines after the repeated administration of cisplatin in tumor-bearing mice. *J Cancer Res Clin Oncol* 124, 607-614.
- Mohammed Ael, S., Eguchi, H., Wada, S., Koyama, N., Shimizu, M., Otani, K., Ohtaki, M., Tanimoto, K., Hiyama, K., Gaber, M.S., et al.** (2012). TMEM158 and FBLP1 as novel marker genes of cisplatin sensitivity in non-small cell lung cancer cells. *Exp Lung Res* 38, 463-474.
- Mok, T.S.** (2011). Personalized medicine in lung cancer: what we need to know. *Nature reviews Clin Oncol* 8, 661-668.

Mok, T.S., Wu, Y.L., Thongprasert, S., Yang, C.H., Chu, D.T., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Han, B., Margono, B., Ichinose, Y., et al. (2009). Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 361, 947-957.

Molina-Vila, M.A., Bertran-Alamillo, J., Reguart, N., Taron, M., Castella, E., Llatjos, M., Costa, C., Mayo, C., Pradas, A., Queralt, C., et al. (2008). A sensitive method for detecting EGFR mutations in non-small cell lung cancer samples with few tumor cells. *J Thorac Oncol* 3, 1224-1235.

Moncho-Amor, V., Ibanez de Caceres, I., Bandres, E., Martinez-Poveda, B., Orgaz, J.L., Sanchez-Perez, I., Zazo, S., Rovira, A., Albanell, J., Jimenez, B., et al. (2011). DUSP1/MKP1 promotes angiogenesis, invasion and metastasis in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 30, 668-678.

Moreno-Bueno, G., Portillo, F., and Cano, A. (2008). Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene* 27, 6958-6969.

Nurwidya, F., Murakami, A., Takahashi, F., and Takahashi, K. (2012). Lung cancer stem cells: tumor biology and clinical implications. *Asia Pac J Clin Oncol* 8, 217-222.

Ocana, O.H., Corcoles, R., Fabra, A., Moreno-Bueno, G., Acloque, H., Vega, S., Barrallo-Gimeno, A., Cano, A., and Nieto, M.A. (2012). Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer prrx1. *Cancer Cell* 22, 709-724.

Ogden, A.T., Waziri, A.E., Lochhead, R.A., Fusco, D., Lopez, K., Ellis, J.A., Kang, J., Assanah, M., McKhann, G.M., Sisti, M.B., et al. (2008). Identification of A2B5+CD133-tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery* 62, 505-514; discussion 514-505.

Oliveros, J.C. (2007a). FIESTA at BioinfoGP. An interactive server for analyzing DNA microarray experiments with replicates. (<http://bioinfofp.cnb.csic.es/tools/FIESTA>)

Oliveros, J.C. (2007b). VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. (<http://bioinfofp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)

Ornstein, D.L., Nervi, A.M., and Rigas, J.R. (1999). Docetaxel (Taxotere) in combination chemotherapy and in association with thoracic radiotherapy for the treatment of non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 10 Suppl 5, S35-40.

Otto, W.R. (2002). Lung epithelial stem cells. *J Pathol* 197, 527-535.

Pao, W., and Girard, N. (2011). New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 12, 175-180.

Pastrana, E., Silva-Vargas, V., and Doetsch, F. (2011). Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 486-498.

Patrawala, L., Calhoun, T., Schneider-Broussard, R., Li, H., Bhatia, B., Tang, S., Reilly, J.G., Chandra, D., Zhou, J., Claypool, K., et al. (2006). Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* 25, 1696-1708.

Peacock, C.D., and Watkins, D.N. (2008). Cancer stem cells and the ontogeny of lung cancer. *J Clin Oncol* 26, 2883-2889.

- Peinado, H., Del Carmen Iglesias-de la Cruz, M., Olmeda, D., Csiszar, K., Fong, K.S., Vega, S., Nieto, M.A., Cano, A., and Portillo, F.** (2005). A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J* 24, 3446-3458.
- Perez-Caro, M., and Sanchez-Garcia, I.** (2006). Killing time for cancer stem cells (CSC): discovery and development of selective CSC inhibitors. *Curr Med Chem* 13, 1719-1725.
- Perona, R., Lopez-Ayllon, B.D., de Castro Carpeno, J., and Belda-Iniesta, C.** (2011). A role for cancer stem cells in drug resistance and metastasis in non-small-cell lung cancer. *Clin Transl Oncol* 13, 289-293.
- Piechaczek, C.** (2001). Cd133. *J Biol Regul Homeost Agents* 15, 101-102.
- Prince, M.E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G.T., Kaplan, M.J., Dalerba, P., Weissman, I.L., Clarke, M.F., and Ailles, L.E.** (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 973-978.
- Razmkhah, M., Jaberipour, M., Safaei, A., Talei, A.R., Erfani, N., and Ghaderi, A.** (2012). Chemokine and chemokine receptors: a comparative study between metastatic and nonmetastatic lymph nodes in breast cancer patients. *Eur Cytokine Netw* 23, 72-77.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L.** (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R.** (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445, 111-115.
- Rosell, R., Molina, M.A., Costa, C., Simonetti, S., Gimenez-Capitan, A., Bertran-Alamillo, J., Mayo, C., Moran, T., Mendez, P., Cardenal, F., et al.** (2011). Pretreatment EGFR T790M mutation and BRCA1 mRNA expression in erlotinib-treated advanced non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations. *Clin Cancer Res* 17, 1160-1168.
- Rosell, R., Moran, T., Queralt, C., Porta, R., Cardenal, F., Camps, C., Majem, M., Lopez-Vivanco, G., Isla, D., Provencio, M., et al.** (2009). Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 361, 958-967.
- Rosen, J.M., and Jordan, C.T.** (2009). The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 324, 1670-1673.
- Rybak, A.P., He, L., Kapoor, A., Cutz, J.C., and Tang, D.** (2011). Characterization of sphere-propagating cells with stem-like properties from DU145 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1813, 683-694.
- Sanchez-Cespedes, M.** (2003). Dissecting the genetic alterations involved in lung carcinogenesis. *Lung Cancer* 40, 111-121.
- Santarius, T., Shipley, J., Brewer, D., Stratton, M.R., and Cooper, C.S.** (2010). A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 10, 59-64.
- Schmitt, M., Harbeck, N., Thomssen, C., Wilhelm, O., Magdolen, V., Reuning, U., Ulm, K., Hofler, H., Janicke, F., and Graeff, H.** (1997). Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *Thromb Haemost* 78, 285-296.

Sekido, Y., Fong, K.M., and Minna, J.D. (1998). Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta* 1378, F21-59.

Selamat, S.A., Galler, J.S., Joshi, A.D., Fyfe, M.N., Campan, M., Siegmund, K.D., Kerr, K.M., and Laird-Offringa, I.A. (2011). DNA methylation changes in atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma in situ, and lung adenocarcinoma. *PLoS One* 6, e21443.

Sequist, L.V., Joshi, V.A., Janne, P.A., Bell, D.W., Fidias, P., Lindeman, N.I., Louis, D.N., Lee, J.C., Mark, E.J., Longtine, J., et al. (2006). Epidermal growth factor receptor mutation testing in the care of lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 12, 4403s-4408s.

Sequist, L.V., Martins, R.G., Spigel, D., Grunberg, S.M., Spira, A., Janne, P.A., Joshi, V.A., McCollum, D., Evans, T.L., Muzikansky, A., et al. (2008). First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *J Clin Oncol* 26, 2442-2449.

Sharma, S.V., Bell, D.W., Settleman, J., and Haber, D.A. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 169-181.

Sharma, S.V., Haber, D.A., and Settleman, J. (2010). Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 10, 241-253.

Shmelkov, S.V., Butler, J.M., Hooper, A.T., Hormigo, A., Kushner, J., Milde, T., St Clair, R., Baljevic, M., White, I., Jin, D.K., et al. (2008). CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 118, 2111-2120.

Sidransky, D. (2002). Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 210-219.

Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63, 5821-5828.

Smyth, G. K., and Speed, T. P. (2003). Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31, 265-273.

Soda, M., Choi, Y.L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., et al. (2007). Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448, 561-566.

Stuelten, C.H., Mertins, S.D., Busch, J.I., Gowens, M., Scudiero, D.A., Burkett, M.W., Hite, K.M., Alley, M., Hollingshead, M., Shoemaker, R.H., et al. (2010). Complex display of putative tumor stem cell markers in the NCI60 tumor cell line panel. *Stem Cells* 28, 649-660.

Sullivan, J.P., Spinola, M., Dodge, M., Raso, M.G., Behrens, C., Gao, B., Schuster, K., Shao, C., Larsen, J.E., Sullivan, L.A., et al. (2010). Aldehyde dehydrogenase activity selects for lung adenocarcinoma stem cells dependent on notch signaling. *Cancer Res* 70, 9937-9948.

Taieb, N., Maresca, M., Guo, X.J., Garmy, N., Fantini, J., and Yahi, N. (2009). The first extracellular domain of the tumour stem cell marker CD133 contains an antigenic ganglioside-binding motif. *Cancer Lett* 278, 164-173.

Takeuchi, T., Tomida, S., Yatabe, Y., Kosaka, T., Osada, H., Yanagisawa, K., Mitsudomi, T., and Takahashi, T. (2006). Expression profile-defined classification of lung

adenocarcinoma shows close relationship with underlying major genetic changes and clinicopathologic behaviors. *J Clin Oncol* 24, 1679-1688.

Tano, K., Mizuno, R., Okada, T., Rakwal, R., Shibato, J., Masuo, Y., Ijiri, K., and Akimitsu, N. (2010). MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes. *FEBS Lett* 584, 4575-4580.

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.

Tirino, V., Camerlingo, R., Franco, R., Malanga, D., La Rocca, A., Viglietto, G., Rocco, G., and Pirozzi, G. (2009). The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 36, 446-453.

Travis, W.D. (2002). Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* 23, 65-81, viii.

Tsuji, T., Ibaragi, S., Shima, K., Hu, M.G., Katsurano, M., Sasaki, A., and Hu, G.F. (2008). Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth. *Cancer Res* 68, 10377-10386.

Veljkovic, E., Jiricny, J., Menigatti, M., Rehrauer, H., and Han, W. (2011). Chronic exposure to cigarette smoke condensate in vitro induces epithelial to mesenchymal transition-like changes in human bronchial epithelial cells, BEAS-2B. *Toxicol In Vitro* 25, 446-453.

Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8, 755-768.

Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.

Wang, J., Sakariassen, P.O., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Boe, S.O., Svendsen, A., Prestegarden, L., Rosland, G., Thorsen, F., Stuhr, L., et al. (2008). CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer* 122, 761-768.

Weiss, J., Sos, M.L., Seidel, D., Peifer, M., Zander, T., Heuckmann, J.M., Ullrich, R.T., Menon, R., Maier, S., Soltermann, A., et al. (2010). Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci Transl Med* 2, 62ra93.

Wintzell, M., Lofstedt, L., Johansson, J., Pedersen, A.B., Fuxe, J., and Shoshan, M. (2012). Repeated cisplatin treatment can lead to a multiresistant tumor cell population with stem cell features and sensitivity to 3-bromopyruvate. *Cancer Biol Ther* 13.

Wu, C., and Alman, B.A. (2008). Side population cells in human cancers. *Cancer Lett* 268, 1-9.

Wuchter, C., Ratei, R., Spahn, G., Schoch, C., Harbott, J., Schnittger, S., Haferlach, T., Creutzig, U., Sperling, C., Karawajew, L., et al. (2001). Impact of CD133 (AC133) and CD90 expression analysis for acute leukemia immunophenotyping. *Haematologica* 86, 154-161.

Yamamoto, T., et al. (1986). High Incidence of Amplification of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Human Squamous Carcinoma Cell Lines. *Cancer Res*;46:414-416.

- Yan, B., and Wang, Z.** (2012). Long Noncoding RNA: Its Physiological and Pathological Roles. *DNA Cell Biol* 31 *Suppl 1*, S34-41.
- Yang, Y.M., and Chang, J.W.** (2008). Current status and issues in cancer stem cell study. *Cancer Invest* 26, 741-755.
- Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J., and Buck, D.W.** (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002-5012.
- Yoshino, H., Endo, Y., Watanabe, Y., and Sasaki, T.** (1998). Significance of plasminogen activator inhibitor 2 as a prognostic marker in primary lung cancer: association of decreased plasminogen activator inhibitor 2 with lymph node metastasis. *Br J Cancer* 78, 833-839.
- Yu, Y., Flint, A., Dvorin, E.L., and Bischoff, J.** (2002). AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen. *J Biol Chem* 277, 20711-20716.
- Zetter, B.R.** (1998). Angiogenesis and tumor metastasis. *Ann Rev Med* 49, 407-424.
- Zhang, H., Xi, H., Cai, A., Xia, Q., Wang, X.X., Lu, C., Zhang, Y., Song, Z., Wang, H., Li, Q., et al.** (2012a). Not All Side Population Cells Contain Cancer Stem-Like Cells in Human Gastric Cancer Cell Lines. *Dig Dis Sci*.
- Zhang, W.C., Shyh-Chang, N., Yang, H., Rai, A., Umashankar, S., Ma, S., Soh, B.S., Sun, L.L., Tai, B.C., Nga, M.E., et al.** (2012b). Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell* 148, 259-272.
- Zhang, Y., Wang, Z., Yu, J., Shi, J., Wang, C., Fu, W., Chen, Z., and Yang, J.** (2012c). Cancer stem-like cells contribute to cisplatin resistance and progression in bladder cancer. *Cancer Lett* 322, 70-77.
- Zhao, W., Bao, P., Qi, H., and You, H.** (2010). Resveratrol down-regulates survivin and induces apoptosis in human multidrug-resistant SPC-A-1/CDDP cells. *Oncol Rep* 23, 279-286.
- Zhou, S., Schuetz, J.D., Bunting, K.D., Colapietro, A.M., Sampath, J., Morris, J.J., Lagutina, I., Grosveld, G.C., Osawa, M., Nakauchi, H., et al.** (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 7, 1028-1034.
- Zielske, S.P., Spalding, A.C., Wicha, M.S., and Lawrence, T.S.** (2011). Ablation of breast cancer stem cells with radiation. *Transl Oncol* 4, 227-233.
- Zochbauer-Muller, S., Gazdar, A.F., and Minna, J.D.** (2002). Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu Rev Physiol* 64, 681-708.