



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Departamento y Facultad de Medicina

Programa de Doctorado en Medicina

**TUMORES FERAS COMO PLATAFORMAS DE CRIBADO
FARMACOLÓGICO *IN VITRO/IN VIVO* PARA LA BÚSQUEDA
DE NUEVAS TERAPIAS CONTRA EL CÁNCER DE PULMÓN NO
MICROCÍTICO**

TESIS DOCTORAL presentada por:

Héctor Antonio Amado Labrador

Directores:

Dr. Carlos Camps Herrero

Dra. Silvia Calabuig Fariñas

Valencia, noviembre de 2019



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



CARLOS CAMPS HERRERO, Dr. por la Universitat de València, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universitat de València y Jefe del Servicio de Oncología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (HGUV).

CERTIFICA:

Que Don Héctor Antonio Amado Labrador, Médico, Especialista en Medicina Interna, ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral que lleva por título **“Tumoresferas como plataformas de cribado farmacológico *in vitro/in vivo* para la búsqueda de nuevas terapias contra el cáncer de pulmón no microcítico”**. Dicha tesis reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación para optar al título de Doctor por la Universitat de València.

Valencia, 27 de noviembre de 2019.



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



FUNDACIÓ
INVESTIGACIÓ
HOSPITAL GENERAL
UNIVERSITARI
VALÈNCIA

SILVIA CALABUIG FARIÑAS, Dra. por la Universitat de València, Investigadora postdoctoral de Oncología Molecular de la Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGU) y Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Medicina de la Universitat de València.

CERTIFICA:

Que Don Héctor Antonio Amado Labrador, Médico, Especialista en Medicina Interna, ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral que lleva por título **“Tumoresferas como plataformas de cribado farmacológico *in vitro/in vivo* para la búsqueda de nuevas terapias contra el cáncer de pulmón no microcítico”**. Dicha tesis reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación para optar al título de Doctor por la Universitat de València.

Valencia, 27 de noviembre de 2019.

“Un hombre auténtico tiene como ideal moral hacer el bien en el hombre”

DR. JOSE GREGORIO HERNÁNDEZ

AGRADECIMIENTOS

Este es el pequeño espacio que dedico para agradecer a todas aquellas personas que colaboraron en hacer realidad este objetivo.

Primeramente, a **DIOS**, mi guía espiritual y protector.

A mis padres María Doris y Héctor, quienes con sus sabios consejos y apoyo incondicional han hecho posible todo lo que me he propuesto, dejando en mi un gran legado, la mejor herencia que se puede recibir "Educación", siendo los responsables de mi formación personal, académica y profesional; a quienes amo y admiro enormemente.

Al Dr. Carlos Camps, por su acogida en el Servicio de Oncología del HGUV y en el Laboratorio de Biología Molecular de la FIHGUV, por apoyarme durante estos años y brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto de tesis doctoral que hoy en día se materializa.

A la Dra. Silvia Calabuig, por haber sido como una "madre", como se hace llamar para todos en el laboratorio, una persona admirable, inteligente, currante como nadie he visto en la vida, con mucho profesionalismo y capacidad de resolver, siempre con tiempo, aunque poco pero suficiente para atender a las necesidades presentadas, psicoterapeuta en los momentos de agobio y sobre todo una buena amiga.

A la Dra. Eloísa Jantus, por su acogida en el laboratorio, sabios consejos, apoyo incondicional y su valiosa aportación científica durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Cristóbal Aguilar por sus valiosos aportes y participación en el proyecto.

A todo el personal humano que conforma el Laboratorio de Biología Molecular, en primer lugar y muy en especial a Eva Escorihuela, Marais Mosqueda, Dra. Sandra Gallach y Dr. Alejandro Herreros; por sus invaluable enseñanzas, apoyo, colaboración, confianza y amistad. A mis compañeros y amigos Dr. Franklin, Elena, Andrea, Feiyu Zhang (Bruno), Ning Dong (Clara), Susana, Sara, Valentina y Eva (PD-L1); por su colaboración, apoyo incondicional en todo momento, por compartir sus conocimientos y hacer de la estancia una grandiosa experiencia.

Quiero agradecer a todos los profesionales que forman parte del Servicio de Oncología Médica del HGUV, así mismo al Servicio de Anatomía Patológica, Quirófano y Cirugía Torácica; muy en especial a la Dra. Lara Navarro por su colaboración y al Dr. Juan Murga, del Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universidad Jaume I de Castellón.

A la Fundación Carolina y a la Fundación BBVA por brindarme la oportunidad de venir a España a desarrollar un proyecto de investigación traslacional en cáncer, en el marco de uno de los programas de sus becas ofertadas para médicos especialistas Latinoamericanos.

Al Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), muy en especial a Alicia Martínez y al personal del Animalario de la Unidad Central de Investigación de la Universitat de València, muy en especial a la Dra. Ana Diaz y a Pilar Navarro.

A toda mi familia, muy en especial a mi hermana Stefany y abuela Flor, a quienes amo.

Finalmente, quiero agradecer en mención especial a los pacientes, ya que su desinteresada colaboración ha permitido tanto la realización de esta tesis como el continuo avance en la investigación contra el cáncer.

RESUMEN

El cáncer de pulmón es el tumor con mayor mortalidad a nivel mundial, y en concreto el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) comprende más del 80% de los casos. Actualmente, los fármacos más empleados en este tipo de cáncer son los quimioterápicos; sin embargo, la adquisición de resistencia a estos compuestos limita en gran medida la eficacia de los tratamientos. Dentro de las diferentes poblaciones celulares presentes en el microambiente tumoral se encuentran las células madre tumorales (CMTs), encargadas de la proliferación y diferenciación, estas células tienen capacidad de latencia y poca respuesta a los tratamientos empleados actualmente en la práctica clínica, por tanto, responsables de las recidivas. El objetivo principal del presente trabajo es identificar nuevos fármacos, más eficaces para la inhibición de la población de células madre tumorales en cáncer de pulmón no microcítico. Para ello, se emplea la formación de tumoresferas *in vitro* como aproximación de células enriquecidas en propiedades de células madre tumorales, a partir de 12 líneas celulares (H23, H358, H460, H1395, H1650, H1975, H1993, H2228, A549, PC9, SW900 y HCC827) y 7 cultivos primarios (FIS299, FIS302, FIS303, FIS315, FIS317, FIS320 y FIS343) derivados de tumores de CPNM resecados de pacientes. Las tumoresferas se emplearon como plataformas de cribado farmacológico *in vitro* de 11.280 compuestos pertenecientes a las quimiotecas Prestwick y Myria, identificando mediante ensayos de viabilidad celular tres compuestos (DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4) con capacidad inhibitoria estadísticamente significativa ($p < 0.05$) frente a las tumoresferas, en comparación con los datos obtenidos en las células crecidas en adherencia. Demostrando que estos 3 fármacos inducen apoptosis mediante la activación de la vía de señalización ROS-p38 MAPK y son capaces de inhibir *MMP9*, gen implicado en el desarrollo de metástasis a distancia. Posteriormente, el ensayo *in vivo* corroboró los resultados *in vitro*, demostrando la capacidad antitumoral de estos compuestos seleccionados, al reducir el volumen tumoral en xenografts inducidos con tumoresferas de CPNM. Sin embargo, faltarían más estudios para la caracterización de otras posibles vías activadas o inhibidas por estos fármacos, como posibles mecanismos de acción implicados en la inhibición de las tumoresferas de pulmón con propiedades de CMTs, para en un futuro intentar implementar estos fármacos como posibles nuevos inhibidores de CMTs de pulmón, solos o en combinación con los tratamientos convencionales.

RESUM

El càncer de pulmó és el tumor amb major mortalitat a nivell mundial, i en concret el càncer de pulmó no microcític (CPNM) compren més del 80% dels casos. Actualment, els fàrmacs més empleats en aquest càncer són els quimioteràpics; no obstant, l'adquisició de resistència a aquests compostos limita en gran manera l'eficàcia dels tractaments. Dins de les diferents poblacions cel·lulars presents en el microambient tumoral es troben les cèl·lules mare tumorals (CMTs), encarregades de la proliferació i diferenciació, estes cèl·lules tenen capacitat de latència i poca resposta als tractaments empleats actualment en la pràctica clínica, per tant, responsables de les recidives. El nostre objectiu principal és identificar nous fàrmacs, més eficaços per a la inhibició de la població de cèl·lules mare tumorals en càncer de pulmó no microcític. Per a això, s'empra la formació de tumoresferes *in vitro* com a aproximació de cèl·lules enriquides en propietats de cèl·lules mare tumorals, a partir de 12 línies cel·lulars (H23, H358, H460, H1395, H1650, H1975, H1993, H2228, A549, PC9, SW900 i HCC827) i 7 cultius primaris (FIS299, FIS302, FIS303, FIS315, FIS317, FIS320 i FIS343) derivats de tumors de CPNM ressecats de pacients. Les tumoresferes es van emprar com a plataformes de garbellament farmacològic *in vitro* de 11.280 compostos pertanyents a les quimioetesques Prestwick i Myria, identificant per mitjà d'assajos de viabilitat cel·lular tres compostos (DSF, JMM 1-3 i JMM 1-4) amb capacitat inhibidora estadísticament significativa ($p < 0.05$) enfront de les tumoresferes, en comparació amb les dades obtingudes en les cèl·lules crecudes en adherència. Demostrant que estos 3 fàrmacs induïxen apoptosi per mitjà de l'activació de la via de senyalització ROS-p38 MAPK i són capaços d'inhibir *MMP9*, gen implicat en el desenrotllament de metàstasi a distància. Posteriorment, l'assaig *in vivo* va corroborar els resultats *in vitro*, demostrant la capacitat antitumoral d'estos compostos seleccionats, al reduir el volum tumoral en xenografts induïts amb tumoresferes de CPNM. No obstant això, faltarien més estudis per a la caracterització d'altres possibles vies activades o inhibides per estos fàrmacs, com a possibles mecanismes d'acció implicats en la inhibició de les tumoresferes de pulmó amb propietats de CMTs, para en un futur intentar implementar estos fàrmacs com a possibles nous inhibidors de CMTs de pulmó, sols o en combinació amb els tractaments convencionals.

ABSTRACT

Lung cancer is the most frequent cancer and the leading cause of cancer death worldwide, and specifically non-small cell lung cancer (NSCLC) comprises more than 80% of cases. Currently, the most commonly used drugs in this type of cancer are chemotherapeutics; however, the acquisition of resistance to these compounds greatly limits the effectiveness of the treatments. Inside the different cell populations present in the tumor microenvironment are the cancer stem cells (CSCs), responsible for proliferation and differentiation, these cells have latent capacity and little response to the treatments currently used in clinical practice, therefore, responsible for recurrences. The main objective of this work is to identify new compounds, more effective for the inhibition of the population of cancer stem cells in non-small cell lung cancer. For this purpose, *in vitro* tumorspheres formation is used as an approximation of enriched cells in properties of cancer stem cells, from 12 cell lines (H23, H358, H460, H1395, H1650, H1975, H1993, H2228, A549, PC9, SW900 and HCC827) and 7 primary cultures (FIS299, FIS302, FIS303, FIS315, FIS317, FIS320 and FIS343) derived from resected NSCLC tumors from patients. The tumorspheres were used as *in vitro* pharmacological screening platforms of 11.280 compounds belonging to the Prestwick and Myria libraries, identifying three compounds (DSF, JMM 1-3 and JMM 1-4) with statistically significant inhibitory capacity ($p < 0.05$) against tumorspheres, compared with data obtained in cells grown in monolayer. Proving that these 3 drugs induce apoptosis by activating the ROS-p38 MAPK signalling pathway and are capable of inhibiting *MMP9*, a gene involved in the development of distant metastases. Subsequently, *in vivo* assay supported the results *in vitro*, demonstrating the antitumor capacity of these selected compounds, by reducing tumor volume in xenografts induced with NSCLC tumorspheres. However, more studies would be lacking for the characterization of other possible pathways activated or inhibited by these drugs, as possible mechanisms of action involved in the inhibition of lung tumorspheres with CSCs properties. The future steps could be to try to implement these compounds as possible new inhibitors of lung CSCs, alone or in combination with conventional treatments.

LISTADO DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

ABCG2: Transportador de casete de unión a ATP, miembro 2 de la superfamilia G

ACTB1: Gen actina beta 1

ADAM: Metaloproteinasa y desintegrina

ADC: Adenocarcinoma

ADH: Adherentes

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

AJCC: Comité Americano sobre el Cáncer

AKT: Proteína quinasa B

ALCAM: Molécula de adhesión de células leucocitarias activadas (CD166)

ALDH: Enzima aldehído deshidrogenasa

ALDH1A1: Gen codificante de la proteína aldehído deshidrogenasa 1, miembro de la familia A1

ALK: Kinasa de linfoma anaplásico

AP: Anatomía patológica

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato

BCC: Carcinoma basocelular

bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico

BMI-1: Proteína del complejo Polycomb BMI-1

BRAF: Proto oncogén B-Raf o homólogo B del oncogén viral del sarcoma murino

BSA: Albumina de suero bovino

CDKN2A: Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2A, "*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*"

CDKN1B: Inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina

CD34: Glucoproteína transmembranal (Cúmulo de diferenciación 34)

CD38: Glucoproteína transmembranal (Cúmulo de diferenciación 38)

CD44: Glicoproteína transmembrana implicada en la adhesión celular

CD74: Clúster de diferenciación 74

CD90: Antígeno de diferenciación de timocitos 1 (THY-1)

CD133: Prominin-1, es una glicoproteína codificada por el gen PROM1

Cél: Células

Ciclina D1: Proteína específica de G1/S

c-Met: proteína o receptor tirosina-quinasa, factor c de transición epitelio-mesenquimal

cm²: Centímetros cuadrados

CMTs: Células madre tumorales

CNT: Control

COX2: Gen de la ciclooxigenasa 2 o PTGS2 (Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2)

CO₂: Dióxido de carbono

Cp: Punto de cruce, "*crossing point*"

CPNM: Cáncer de pulmón no microcítico

Ct: Ciclo umbral, "*Cycle threshold*"

CTLA-4: Linfocito T citotóxico ligado a la proteína 4

Cu: Cobre

CYP1A1: Citocromo P450, familia 1, miembro A1

CYP3A4: Citocromo P450, familia 3, subfamilia A, polipéptido 4

Cyt-c: Citocromo C

C797S: Mutación que sustituye una cisteína (C) por una serina (S) en la posición 797 del exón 20 en *EGFR*

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DCAMKL-1: Quinasa 1 de tipo doublecortina; Grupo: CAMK, "Doublecortin-like kinase 1; Group: CAMK"

DHH: *Desert Hedgehog*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DSF: Disulfiram

E: Eficiencia del gen

EBUS: Ecografía endobronquial o ecobroncoscopia lineal

ECD: Colorante de acoplamiento electrónico

IC₅₀: Concentración mínima inhibitoria

EE. UU.: Estados Unidos de América

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

EMA: Agencia Europea Reguladora de Medicamentos

EML4: Proteína asociada a microtúbulo de equinodermo 4

EpCAM: Molécula de adhesión de células epiteliales, CD326

ERK: Vía de señalización regulada por quinasas extracelulares

ESF: Esferas

EUS: Ultrasonido endoscópico

FAS: Receptor de muerte celular Fas

SBF: Suero bobino fetal

FDA: Agencia de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos

Gli1: Factor de transcripción familia Gli 1

Gli2: Factor de transcripción familia Gli 2

GSIs: Inhibidores de la gamma-secretasa

GSTM: Glutación S-transferasa Mu 1

GSTT1: Glutación S-transferasa theta-1

GUSB: Gen precursor glucorinidasa beta

G1202R: Mutación que sustituye una glicina (G) por una arginina (A) en la posición 1202 del exón 23 en *ALK*

G2032R: Mutación que sustituye una glicina (G) por una arginina (A) en la posición 2032 del exón 38 en *ROS1*

HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

HER3: Receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano

HER4: Receptor 4 del factor de crecimiento epidérmico humano

HGUV: Hospital General Universitario de Valencia

IASLC: Asociación Internacional para el estudio del cáncer de pulmón

IHC: Inmunohistoquímica

IHH: *Indian Hedgehog*

ILGFR1: Receptor del factor de crecimiento semejante a insulina

ITS: Insulina transferrina-selenio

IWPs: Inhibidores de la producción de Wnt

IWRs: Inhibidores de la respuesta de Wnt

KEAP1: Proteína asociada a ECH de tipo Kelch

Kg: Kilogramos

KIT: Protooncogén *c-Kit* o *CD117*

KRAS: gen Kirsten ras

LEF: Factor de activación linfoide

LNH: Linfoma no Hodgkin

L858R: Mutación que sustituye una leucina (L) por una arginina (R) en la posición 858 del exón 21 en *EGFR*

MAPK: Vía de señalización de proteínas-quinasa activadas por mitógenos

MET: Protooncogén, receptor Tirocin-Kinasa

Mg: Miligramos

ml: Mililitros

MMP: Metaloproteinasas

MMP-2: Metaloproteinasa 2

MMP-9: Metaloproteinasa 9

mm³: Milímetros cúbicos

MT: Metástasis

mTOR: Vía de señalización diana de la rapamicina en los mamíferos

MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt

Myc: Familia de protooncogenes compuesta por varios miembros (L-myc, N-myc y c-myc)

N: Muestra

NAD(P)H: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NANOG: Factor de transcripción de la proteína Nanog

NCCN: Red Nacional Integral de Cáncer

NF1: Neurofibromatosis tipo 1

NFK-β: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NHC: Número de historia clínica

nm: Nanómetros

NOD/SCID: Ratones diabéticos no obesos con inmunodeficiencia combinada grave, "*Non-Obese Diabetic Severe Combined Immunodeficient*"

NTC: Control negativo, "*Non Template Control*"

OCT-4: Factor de transcripción 4 de enlace octámero

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORR: Tasa de respuesta objetiva

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PD-1: Proteína 1 de muerte programada

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

PET: Tomografía por emisión de positrones

PFA: Paraformaldehído

pH: Es una medida de acidez o alcalinidad que indica la cantidad de iones de hidrógeno presentes en una solución o sustancia.

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa

PIK3CA: Fosfatidilinositol 3-quinasa subunidad catalítica alfa

PS: Escala ECOG de estado funcional

P/S: Penicilina/estreptomicina

PTCH1: Receptor transmembrana Patched 1

PTCH2: Receptor transmembrana Patched 2

PVDF: Poli fluoruro de vinilideno

PW2B8: Disulfiram

PW6C9: *Cephaline dihydrochloride heptahydrate*

PW10C7: *Pyrithione sodium salt*

p38: Proteína quinasa activada por mitógenos p38

RANK: Activador del Receptor del Factor Nuclear κ B

RAS: Oncogén *RAS*

Ref: Gen endógeno

RLT: Tampón de lisis celular

RMN: Resonancia magnética nuclear

ROS: Especies reactivas de oxígeno

ROS1: Proteína tirosin quinasa ROS

RPMI: *Medio Roswell Park Memorial Institute*

RT: Retrotranscripción o transcripción inversa

RTqPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

SCC: Carcinoma de células escamosas

Seg: Segundos

SG: Supervivencia global

SG124F6: Compuesto de la librería Myria

SG124G6: Compuesto de la librería Myria

SG125A2: Compuesto de la librería Myria

SHH: Vía de señalización *Sonic Hedgehog*

SLP: Supervivencia libre de progresión

SMO: *Receptor Smoothened*

Snail: Factor de transcripción *SNAIL*

SNAIL1: Gen codificante de la proteína *SNAIL1*

SOX2: Factor de transcripción también conocido como **SRY-box 2** (de sus siglas en inglés Sex determining Region Y-box 2)

SP: *Side population*

SPSS: *Software Statistical Package for the Social Sciences*

STK11: Serina / treonina quinasa 11

TC: Tomografía computarizada

TCF: Factor de transcripción específico de células T

TCF4: Factor de transcripción específico de células T tipo 4

TEM: Transición epitelio mesenquimal

TERT: Telomerasa transcriptasa inversa

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TKI: Inhibidor de la actividad Tirosin-Kinasa específica de *EGFR*

TNF: Factor de necrosis tumoral

TNM: Sistema de Clasificación Tumor/Nódulos/Metástasis

TP53: Proteína tumoral 53, "*Tumor protein 53*"

TRAF6: Factores asociados a los receptores del factor de necrosis tumoral

TR1-H1650: Tumor ratón 1 derivado de la línea H1650

TR2-H1650: Tumor ratón 2 derivado de la línea H1650

TR3-H1650: Tumor ratón 3 derivado de la línea H1650

TR4-H1650: Tumor ratón 4 derivado de la línea H1650

TR5-FIS343: Tumor ratón 5 derivado del paciente FIS343

TR6-FIS343: Tumor ratón 6 derivado del paciente FIS343

TR7-FIS343: Tumor ratón 7 derivado del paciente FIS343

TR8-FIS343: Tumor ratón 8 derivado del paciente FIS343

TTF1: Factor de transcripción tiroideo 1

T790M: Mutación que sustituye una treonina (T) por una metionina (M) en la posición 790 del exón 20 en *EGFR*

UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

V-FITC: Anexina V o A5

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

VT: Volumen tumoral

WT: Mutación nativa

WB: *Western blot*

2D: Dos dimensiones

3D: Tres dimensiones

μl: Microlitros

μM: Micro molar

°C: Grados centígrados

ΔCp: Diferencia de expresión entre muestra no tratada

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. EL CÁNCER	3
1.1. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER	3
1.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER	4
2. CÁNCER DE PULMÓN	5
2.1. EPIDEMIOLOGÍA	5
2.2. DIAGNÓSTICO	6
2.2.1. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA	7
2.2.2. ESTADIFICACIÓN	9
2.2.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN CPNM	11
2.3. TRATAMIENTO EN CPNM	12
2.3.1. QUIMIOTERAPIA	12
2.3.2. TERAPIA DIRIGIDA	14
2.3.2.1. <i>EGFR</i>	14
2.3.2.2. <i>ALK</i>	16
2.3.2.3. <i>ROS1</i>	17
2.3.2.4. <i>KRAS</i>	17
2.3.2.5. <i>BRAFV600E</i>	18
2.3.2.6. <i>c-MET</i>	18
2.3.2.7. <i>NTRK</i>	18
2.3.3. INMUNOTERAPIA	18
3. CÉLULAS MADRE TUMORALES	20
3.1. PROPIEDADES DE LAS CMTs	22
3.2. MARCADORES PARA LA IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE CMTs	24
3.3. CMTs COMO DIANA TERAPÉUTICA	26
3.3.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE WNT/B-CATENINA	26

3.3.2. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE SONIC HEDGEHOG (SHH)	28
3.3.3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH	29
3.3.4. OTRAS APROXIMACIONES EN LA BÚSQUEDA DE NUEVOS FÁRMACOS ANTI-CMTs	31
3.3.4.1. DISULFIRAM	32
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
III. MATERIALES Y MÉTODOS	39
1. ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES	41
1.1. LÍNEAS CELULARES	41
1.1.1. ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS EN MONOCAPA Y EN FORMACIÓN DE TUMORESFERAS DE LAS LÍNEAS CELULARES	42
1.2. CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS	42
1.2.1. ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS EN MONOCAPA Y EN FORMACIÓN DE TUMORESFERAS	43
2. CARACTERIZACIÓN DE LAS TUMORESFERAS	44
3. OPTIMIZACIÓN DE LOS ANÁLISIS DE TOXICIDAD CELULAR	44
3.1. CURVAS DE CRECIMIENTO Y ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR	44
3.2. CRIBADO FARMACOLÓGICO	46
4. CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN FARMACOLÓGICA	46
4.1. ENSAYOS DE APOPTOSIS	47
4.2. ANÁLISIS DE ROS INTRACELULAR	47
4.2.1. ANÁLISIS POR MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA	48
4.2.2. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	49
4.3. ANÁLISIS DE ANTI – p38	50
4.3.1. ANÁLISIS POR MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA	50
4.4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	51
4.4.1. AISLAMIENTO DE ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO (ARN)	51
4.4.2. TRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT)	51
4.4.3. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RTqPCR)	52

4.4.4. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA	53
5. MODELO <i>IN VIVO</i>	54
6. CULTIVOS <i>EX VIVO</i>	55
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	56
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
1. ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUMORESFERAS	59
1.1. TUMORESFERAS DE LÍNEAS CELULARES	59
1.2. TUMORESFERAS DE CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS	61
2. CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LAS TUMORESFERAS CON FENOTIPO DE CMTs	62
3. CURVAS DE CRECIMIENTO Y OPTIMIZACIÓN DE DENSIDADES CELULARES	63
4. CRIBADO FARMACOLÓGICO	65
4.1. CRIBADO CON AGENTES QUIMIOTERÁPICOS CONVENCIONALES	65
4.2. CRIBADO CON QUIMIOTECAS	68
4.2.1. LIBRERÍA QUÍMICA PRESTWICK	69
4.2.2. LIBRERÍA QUÍMICA MYRIA	72
5. CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN FARMACOLÓGICA	95
5.1. ENSAYOS DE APOPTOSIS CON ANEXINA	95
5.2. VÍA DE SEÑALIZACIÓN ROS-p38 MAPK	99
5.2.1. ANÁLISIS DE ROS	99
5.2.2. ANÁLISIS DE p38	103
5.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	105
5.3.1. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL ARN	106
5.3.2. CÁLCULO DE EFICIENCIAS Y LINEALIDAD	106
5.3.3. CUANTIFICACIÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA	107
6. MODELO <i>IN VIVO</i>	112
6.1. MODELO DE TUMOR SUBCUTÁNEO	112
6.2. ENSAYOS DE TRATAMIENTO	113

6.3. CULTIVOS <i>EX VIVO</i>	120
V. CONCLUSIONES	123
VI. REFERENCIAS	127
VII. ANEXOS	147
ANEXO 1. COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE ESTE ESTUDIO.....	149
ANEXO 2. DOCUMENTO DE INFORMACION AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LA FIHGUV.....	155
ANEXO 3. FORMULARIO DE EVALUACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN POR PARTE DEL COMITÉ DE ÉTICA DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.....	161

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características distintivas del cáncer.	3
Figura 2. Incidencia y mortalidad estimada de los tumores más frecuentes a nivel mundial en el año 2018 (ambos sexos).....	4
Figura 3. Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en España en el año 2018 (ambos sexos).	5
Figura 4. Tasas de incidencia de cáncer de pulmón estimadas a nivel mundial en 2018, en ambos sexos, todas las edades. Tasas estandarizadas por edad, por cada 100.000 habitantes.	6
Figura 5. Localización de los subtipos histológicos de CPNM.	8
Figura 6. Frecuencia de las alteraciones moleculares en los subtipos histológicos de CPNM.....	11
Figura 7. Esquema de tratamiento del CPNM estadio IV sin alteraciones moleculares detectables. ..	13
Figura 8. Algoritmo de tratamiento para CPNM no escamoso avanzado con mutación EGFR.	15
Figura 9. Algoritmo de tratamiento para CPNM no escamoso avanzado con reordenamiento ALK....	16
Figura 10. Algoritmo de tratamiento para CPNM no escamoso avanzado con reordenamiento ROS1.	17
Figura 11. Anticuerpos inhibidores de los inmunocheckpoints en cáncer de pulmón.	19
Figura 12. Células que componen el microambiente tumoral.....	20
Figura 13. Esquema representativo del modelo jerárquico de las CMTs y el modelo estocástico.....	21
Figura 14. Modelo unificado de evolución clonal y células madre tumorales.....	21
Figura 15. Propiedades de las células madre tumorales.....	22
Figura 16. Características de las CMTs.	23
Figura 17. Vía de señalización canónica de Wnt y sus potenciales inhibidores farmacológicos.	27
Figura 18. Vía de señalización de Hedgehog y sus potenciales inhibidores farmacológicos.	29
Figura 19. Vía de señalización principal de Notch e inhibidores farmacológicos en desarrollo.	30
Figura 20. Ensayo de MTS, de mayor a menor viabilidad celular, de izquierda a derecha de la imagen en función de la intensidad colorimétrica.	45
Figura 21. Ilustración esquemática de la citometría de flujo basada en MitoSOX para detectar ROS/superóxido mitocondrial. La carga positiva de MitoSOX es responsable de su acumulación intramitocondrial.	49

Figura 22. Esquema del modelo in vivo tumoral subcutáneo desarrollado. A) Ensayo de formación de esferas, B) Preparación de suspensión a inocular, C) Ensayo de inducción tumoral, D) Ensayo de tratamiento..	55
Figura 23. Diferentes líneas celulares comerciales de CPNM. A) Células crecidas en monocapa; B) Células crecidas en formación de tumoresferas.	60
Figura 24. Diferentes cultivos celulares primarios de CPNM. A) Células crecidas en monocapa; B) Células crecidas en formación de tumoresferas.	62
Figura 25. Curvas de crecimiento de los cultivos primarios (FIS299, FIS302, FIS303, FIS315, FIS317 y FIS320) sembrados en monocapa. Evaluación del tiempo estimado de duplicación celular en base a la absorbancia espectrofotométrica (490 nm) con lecturas a las 24, 48 y 72 horas; partiendo de una densidad celular basal de 1000 células por condición.	63
Figura 26. Optimización de la densidad celular de los cultivos primarios (FIS299, FIS302, FIS303, FIS315, FIS317 y FIS320) sembrados en monocapa. Evaluación de la absorbancia espectrofotométrica a 490 nm (0.1 seg) deseada por cada densidad celular con lectura a las 72 horas.	64
Figura 27. Porcentaje de viabilidad celular de las líneas H1650, HCC827, H2228, PC9 y de los cultivos primarios FIS302 y FIS343 en adherencia y en suspensión a las 48 horas de tratamiento con cisplatino, paclitaxel y docetaxel a dosis de 10 μ M.	66
Figura 28. Porcentaje de viabilidad celular de la línea A549 en adherencia y en suspensión a las 48 horas de tratamiento con doxorubicina, vinorelbina y pemetrexed.	67
Figura 29. Porcentaje de viabilidad celular de la línea H1650 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con los 5 compuestos seleccionados de la librería química Prestwick.	70
Figura 30. Porcentaje de viabilidad celular de la línea A549 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con los tres compuestos seleccionados de la librería Myria.	74
Figura 31. Porcentaje de viabilidad celular de la línea H23 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con PW2B8, SG124F6 y SG124G6.	75
Figura 32. Porcentaje de viabilidad celular de la línea H358 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con PW2B8, SG124F6 y SG124G6.	76
Figura 33. Porcentaje de viabilidad celular de la línea H1395 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con PW2B8, SG124F6 y SG124G6.	77
Figura 34. Porcentaje de viabilidad celular de la línea H1993 en células crecidas monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con PW2B8, SG124F6 y SG124G6.	78
Figura 35. Porcentaje de viabilidad celular de la línea H2228 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con PW2B8, SG124F6 y SG124G6.	78
Figura 36. Superior: Porcentaje de viabilidad celular de la línea H1650 en células crecidas monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC ₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en H1650.	81

Figura 37. Superior: Porcentaje de viabilidad celular de la línea H1975 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC ₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en H1975.....	82
Figura 38. Superior: Porcentaje de viabilidad celular de la línea A549 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC ₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en A549.....	83
Figura 39. Superior: Porcentaje de viabilidad celular de la línea SW900 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC ₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en SW900.....	84
Figura 40. Superior: Porcentaje de viabilidad celular del paciente FIS299 en células crecidas monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC ₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en FIS299.	87
Figura 41. Superior: Porcentaje de viabilidad celular del paciente FIS302 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC ₅₀ DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en FIS302.	88
Figura 42. Superior: Porcentaje de viabilidad celular del paciente FIS317 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC ₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en FIS317.	89
Figura 43. Superior: Porcentaje de viabilidad celular del paciente FIS303 en monocapa y en suspensión a las 48 horas de tratamiento con Doxorubicina, DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC ₅₀ de Doxorubicina, DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en FIS303.	90
Figura 44. Superior: Porcentaje de viabilidad celular del paciente FIS315 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC ₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en FIS315.	91
Figura 45. Superior: Porcentaje de viabilidad celular del paciente FIS320 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC ₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en FIS320.	92
Figura 46. Superior: Porcentaje de viabilidad celular del paciente FIS343 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC ₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en FIS343.	93
Figura 47. Resumen del cribado farmacológico in vitro de alto rendimiento realizado en el presente estudio.....	94
Figura 48. Análisis de Anexina en células crecidas en formación de esferas de la línea celular H1650 a las 24 horas de tratamiento. A) CNT, B) DSF, C) JMM 1-3, D) JMM 1-4.....	96
Figura 49. Análisis de Anexina en células crecidas en monocapa de la línea celular H1650 a las 24 horas de tratamiento. A) CNT, B) DSF, C) JMM 1-3, D) JMM 1-4.....	96
Figura 50. Análisis de Anexina en células crecidas en formación de esferas del cultivo primario FIS343 a las 24 horas de tratamiento. A) CNT, B) DSF, C) JMM 1-3, D) JMM 1-4.....	97

Figura 51. Análisis de Anexina en células crecidas en monocapa del cultivo primario FIS343 a las 24 horas de tratamiento. A) CNT, B) DSF, C) JMM 1-3, D) JMM 1-4.	98
Figura 52. Evaluación de ROS intracelular (fluorocromo rojo) por microscopía de fluorescencia en tumoresferas de la línea celular H1650 a las 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al Control (CNT).	100
Figura 53. Evaluación de ROS intracelular (fluorocromo rojo) por microscopía de fluorescencia en células sembradas en monocapa de la línea celular H1650 a las 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al Control (CNT).	100
Figura 54. Evaluación de ROS intracelular (fluorocromo rojo) por microscopía de fluorescencia en tumoresferas del cultivo primario FIS343 a las 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al Control (CNT).	101
Figura 55. Evaluación de ROS intracelular (fluorocromo rojo) por microscopía de fluorescencia en células sembradas en monocapa de la línea celular H1650 a las 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al Control (CNT).	101
Figura 56. Intensidad media de fluorescencia detectada por citometría de flujo de MitoSOX TM en células crecidas en monocapa y en formación de esferas de la línea celular H1650, posterior a 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al Control (CNT).	102
Figura 57. Intensidad media de fluorescencia detectada por citometría de flujo de MitoSOX TM en células crecidas en monocapa y en formación de esferas del paciente FIS343, posterior a 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al Control (CNT).	102
Figura 58. Determinación de p38 (fluorocromo rojo) por inmunofluorescencia en células crecidas en formación de esferas de la línea H1650 a las 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al Control (CNT).	103
Figura 59. Determinación de p38 (fluorocromo rojo) por inmunofluorescencia en células crecidas en formación de esferas de la línea H1650 a las 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al Control (CNT).	104
Figura 60. Posible mecanismo de inducción de apoptosis de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en la línea H1650.	104
Figura 61. Tumoresferas de la línea H1650 a las 24 horas de tratamiento con JMM 1-4 (10 μ M), con marcador Anti-p38 (fluorocromo rojo) capturado a nivel de vesículas (flechas blancas) y liberado a nivel citoplasmático, además de núcleos fragmentados marcados con DAPI (fluorocromo azul) correspondientes a células apoptóticas (flechas amarillas). Imagen captada por inmunofluorescencia.	105
Figura 62. Ejemplo de representación de la curva estándar para el cálculo de la eficiencia de amplificación del gen ALDH1A1.	106
Figura 63. Expresión génica relativa de ALDH1A1 en la línea celular H1650 a las 12 y 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M).....	108
Figura 64. Expresión génica relativa de MMP-9 en la línea celular H1650 a las 12 y 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M).....	109

Figura 65. Expresión génica relativa de SOX2 en la línea celular H1650 a las 12 y 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M).	110
Figura 66. Expresión génica relativa de COX2 en la línea celular H1650 a las 12 y 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M).	111
Figura 67. Expresión génica relativa de SNAIL1 en la línea celular H1650 a las 12 y 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M).....	112
Figura 68. A) Xenoinjertos inducidos a partir de tumoresferas derivadas de la línea celular H1650 (ratones 1-4); B) Xenoinjertos a partir de tumoresferas derivadas del cultivo primario FIS343 (ratones 5-8).	113
Figura 69. Evolución del volumen tumoral en los xenoinjertos H1650 tratados con el DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (100 mg/kg peso) respecto al CNT.	114
Figura 70. Evolución del volumen tumoral en los xenoinjertos FIS343 tratados con el DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (100 mg/kg peso) respecto al control (CNT).	115
Figura 71. Evolución semanal del peso de los ratones con tumores FIS343 durante los ensayos de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4.	116
Figura 72. Comparación de las dimensiones finales obtenidas de la medición de los tumores inducidos con las tumoresferas de la línea celular H1650. TR1-H1650=CNT; TR2-H1650=DSF; TR3-H1650= JMM 1-3; TR4-H1650= JMM 1-4.	117
Figura 73. Tinción de hematoxilina-eosina en corte del tumor TR1-H1650 (CNT).	118
Figura 74. Tinción de hematoxilina-eosina en corte del tumor TR2-H1650 (DSF).....	118
Figura 75. Tinción de hematoxilina-eosina en corte del tumor TR3-H1650 (JMM 1-3).....	119
Figura 76. Tinción de hematoxilina-eosina en corte del tumor TR4-H1650 (JMM 1-4).....	119
Figura 77. Cultivos ex vivo en monocapa y en formación de esferas derivados de tumores inducidos con: A) Línea celular H1650 (con los códigos TR1-H1650 – TR4-H1650); B) Cultivo primario FIS343 (con los códigos TR5-FIS343 – TR8-FIS343).....	120
Figura 78. Posibles mecanismos de acción de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 a dosis de 10 μ M, implicados en la inhibición de las tumoresferas de CPNM.	121

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadificación del cáncer de pulmón, Sistema de Clasificación TNM 8ª Edición (2017).	9
Tabla 2. Descriptor T del Sistema de Clasificación TNM 8ª Edición (2017).	10
Tabla 3. Descriptor N del Sistema de Clasificación TNM 8ª Edición (2017).	10
Tabla 4. Descriptor M del Sistema de Clasificación TNM 8ª Edición (2017).	10
Tabla 5. Marcadores propuestos para la caracterización de CMTs de pulmón.	24
Tabla 6. Características de las líneas celulares utilizadas en este estudio.	41
Tabla 7. Características de los cultivos celulares primarios utilizados en este estudio.	43
Tabla 8. Genes diana y genes endógenos seleccionados en este estudio.	53
Tabla 9. Densidades celulares seleccionadas por cada línea comercial para el cribado farmacológico.	64
Tabla 10. Densidad celular seleccionada por cultivo primario para cribado farmacológico.	65
Tabla 11. Compuestos químicos seleccionados del cribado masivo con la librería Prestwick.	69
Tabla 12. Porcentaje de viabilidad celular de las líneas A549, H460, H1650 y PC9 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con los 3 compuestos seleccionados de la librería Prestwick.	71
Tabla 13. Compuestos químicos seleccionados del cribado masivo con la librería Myria.	73
Tabla 14. IC ₅₀ de PW2B8 (DSF), SG124F6 y SG124G6 en las líneas celulares H23, H1993 y H2228 en monocapa y en formación de esferas a las 48 horas de tratamiento.	79
Tabla 15. IC ₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en las líneas celulares H1650, A549, H1975 y SW900 en células crecidas en monocapa y en formación de esferas a las 48 horas de tratamiento.	85
Tabla 16. IC ₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en los cultivos primarios sembrados en monocapa y en formación de esferas a las 48 horas de tratamiento.	94
Tabla 17. Eficiencias para las sondas Taqman® empleadas en este estudio.	107
Tabla 18. Porcentaje de reducción tumoral en los ratones tratados respecto al CNT.	115

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Cálculo de viabilidad celular.	46
Ecuación 2. Cálculo de la eficiencia de los genes a analizar en este estudio.....	53
Ecuación 3. Fórmula Pfaffl para el cálculo de la expresión génica relativa.....	54
Ecuación 4. Cálculo del Volumen Tumoral (VT) en el modelo animal.	54

I. INTRODUCCIÓN

1. EL CÁNCER

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la palabra “Cáncer” como un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, también se denominan “tumores malignos” o “neoplasias malignas”. Sin embargo; conceptualmente es una enfermedad que resulta de la suma de modificaciones genéticas impulsadas por la evolución somática (1,2), alteraciones que se producen como consecuencia de defectos en los circuitos reguladores que gobiernan la proliferación celular normal y la homeostasis, presentando como punto común el crecimiento celular descontrolado y la diseminación a otros tejidos. Hay más de 100 tipos de cáncer y según su localización manifiestan diferentes subtipos de tumores, cada uno de ellos con distintas características histopatológicas y moleculares que los hacen muy complejos.

1.1. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

En la actualidad, existe un consenso sobre las características distintivas que debe presentar un tejido para que sea considerado tumoral. En el año 2000, Hanahan & Weinberg propusieron que todos los cánceres tienen en común seis características esenciales que se adquieren durante la tumorigénesis, conocidas como los “hallmarks” del cáncer: potencial replicativo ilimitado, independencia de las señales de crecimiento, insensibilidad a inhibidores de crecimiento, evasión de la apoptosis, angiogénesis mantenida y capacidad de invasión o metástasis (3). Once años más tarde, los mismos autores propusieron cuatro nuevas propiedades: la inestabilidad genómica, la alteración del metabolismo energético, capacidad pro-inflamatoria y evasión del sistema inmunitario; constituyendo así, las 10 características distintivas del cáncer (4) (Figura 1).

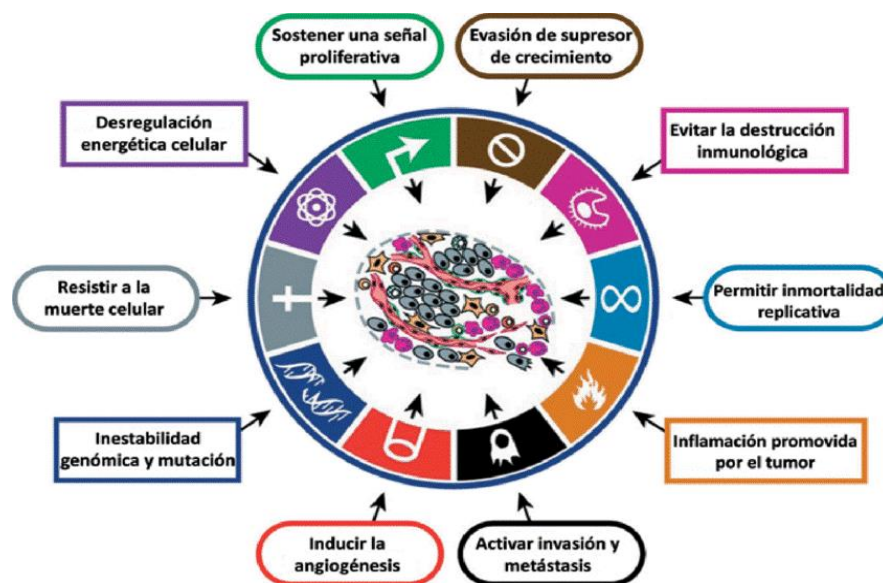


Figura 1. Características distintivas del cáncer (4).

1.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

El cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de morbilidad del mundo, con 18,1 millones de casos nuevos en el año 2018, los tumores más frecuentes fueron los de pulmón (11,6%), mama (11,6%), colorrecto (10,2%), próstata (7,1%) y estómago (5,7%) (**Figura 2**). Además, el cáncer es la primera causa de muerte a nivel global, responsable de 9,6 millones de muertes en el año 2018 (5).

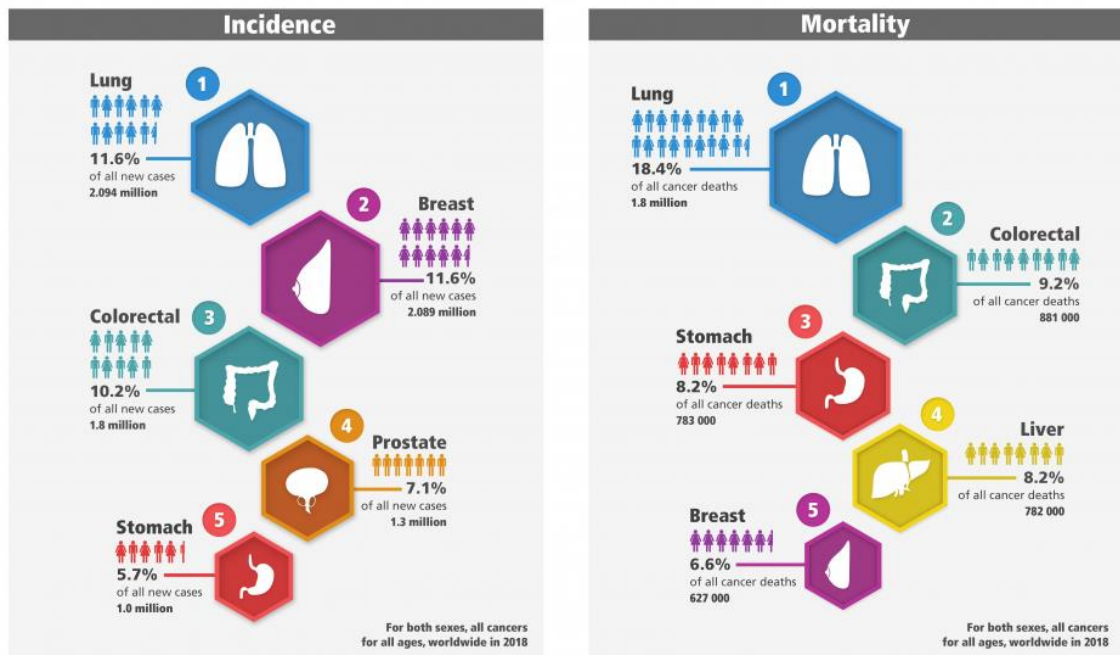


Figura 2. Incidencia y mortalidad estimada de los tumores más frecuentes a nivel mundial en el año 2018 (ambos sexos) (5).

En España, el número estimado para el año 2018 fue de 270.363 nuevos casos de cáncer. Los tumores más frecuentemente diagnosticados fueron: colorrecto (13,7%), mama (12,1%), próstata (11,7%), pulmón (10,1%) y vejiga (6,8%) (**Figura 3**). Los cinco tumores más frecuentemente diagnosticados en varones fueron próstata (20,3%), colorrecto (14,6%), pulmón (13,1%), vejiga (9,5%) y riñón (3,7%). Siendo en mujeres el cáncer de mama (28,7%), colorrecto (12,6%), pulmón (6%), útero (5,9%) y páncreas (3,3%) (5).

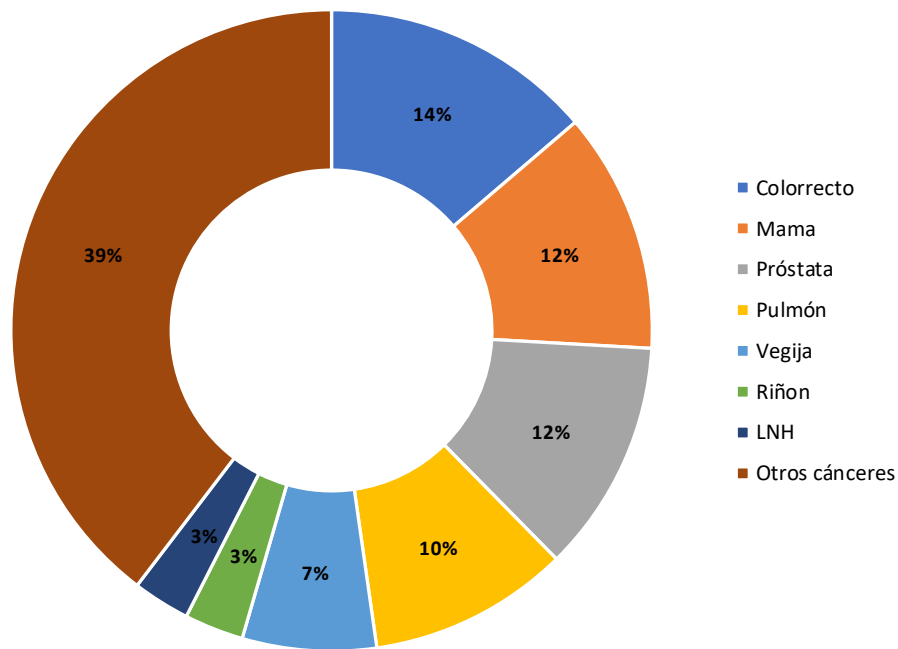


Figura 3. Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en España en el año 2018 (ambos sexos) (5). LNH: Linfoma no Hodgkin.

El cáncer en España es también una causa fundamental de mortalidad, de acuerdo con los datos de GLOBOCAN 2018, 113.584 fallecimientos se debieron a tumores, representando la segunda causa de muerte después de las enfermedades del sistema circulatorio. Los tumores responsables del mayor número de muertes en 2018 en España en la población general fueron el cáncer de pulmón (20,2%) y el cáncer colorrectal (14,7%), seguidos a una gran distancia del cáncer de páncreas (6,4%), el cáncer de mama (5,7%) y de próstata (5,1%) (5).

En los últimos 20 años, el número de tumores diagnosticados ha experimentado un crecimiento constante en España debido no sólo al aumento poblacional, sino también a las técnicas de detección precoz y al aumento de la esperanza de vida; siendo el cáncer de pulmón la principal causa de muerte por cáncer, convirtiéndose en un gran problema de salud pública.

2. CÁNCER DE PULMÓN

2.1. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de pulmón es el tumor más frecuentemente diagnosticado para el año 2018 a nivel mundial en ambos sexos (2.093.876 casos), representando el 11,6% de todos los cánceres, responsable del mayor número de muertes por cáncer (1,76 millones) (5). En la **Figura 4** se muestra la distribución mundial del cáncer de pulmón, en función de las tasas de incidencia estandarizadas por edad, por cada 100.000 habitantes.

Introducción

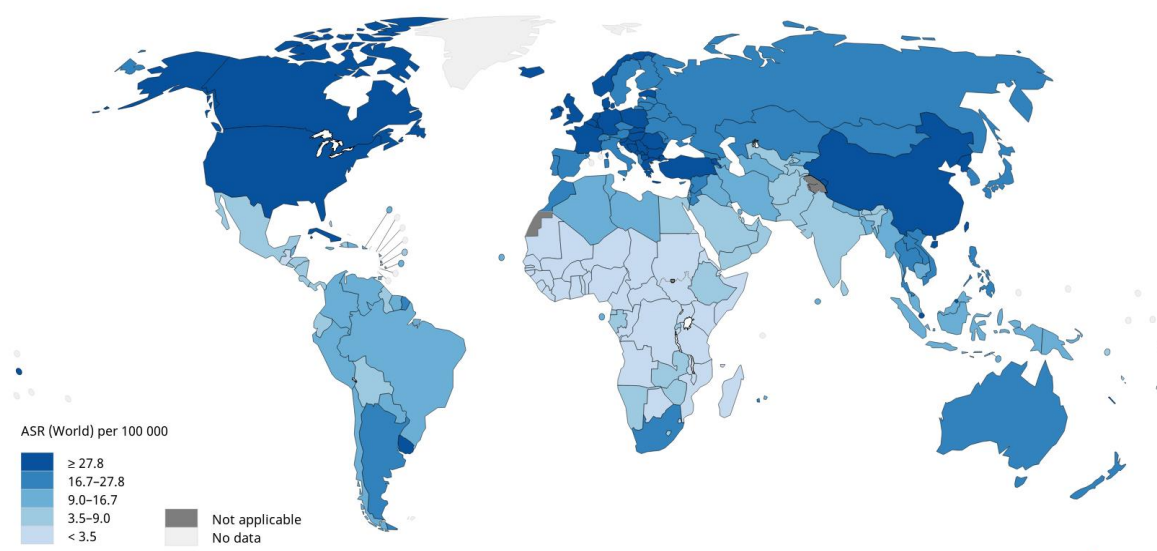


Figura 4. Tasas de incidencia de cáncer de pulmón estimadas a nivel mundial en 2018, en ambos sexos, todas las edades (5). Tasas estandarizadas por edad, por cada 100.000 habitantes.

El hábito tabáquico es la principal causa del cáncer de pulmón (6,7). El humo del tabaco contiene unas 4000 sustancias químicas, 60 de las cuales se consideran carcinógenas. Entre estas sustancias se encuentran los hidrocarburos policíclicos aromáticos, N-nitrosaminas y aminas aromáticas. Estos metabolitos son responsables del daño al ADN, por lo que son compuestos relacionados tanto con el origen como con la promoción del desarrollo de los tumores (8,9). Sin embargo, a pesar de que el 90% de los casos de cáncer de pulmón se asocian con el tabaquismo, solamente el 15-30% de fumadores desarrolla este tipo de neoplasias, sugiriendo la influencia de otros factores en la susceptibilidad de los individuos a los carcinógenos pulmonares. Se han identificado tanto modificaciones epigenéticas en el ADN como mutaciones en alelos de algunos genes, asociados a la mayor susceptibilidad del cáncer de pulmón, codificantes para proteínas relacionadas con el metabolismo de los carcinógenos del tabaco como *CYP1A1*, *GSTM* y *GSTT1* (9).

Además del tabaquismo, otros factores asociados a un mayor riesgo de padecer cáncer de pulmón son la exposición ambiental o laboral a contaminantes cancerígenos como el gas radón, el arsénico y los hidrocarburos policíclicos. Por otra parte, una dieta rica en grasas saturadas, el consumo de alcohol, aminas heterocíclicas, agentes infecciosos y otras enfermedades como la fibrosis quística difusa tienen un efecto pro-tumorigénico (10).

2.2. DIAGNÓSTICO

Los pacientes con cáncer de pulmón son diagnosticados inicialmente por anamnesis ante la presencia de síntomas tales como tos persistente, hemoptisis, disnea, dolor torácico, pérdida de peso,

entre otros. Información que es trasladada a la historia clínica y complementada con el examen físico y estudios por imagen como radiografía de tórax, tomografía computarizada (TC), resonancia magnética nuclear (RMN) o tomografía por emisión de positrones (PET); además de prueba de funcionalidad pulmonar y análisis de laboratorio que ayudan a completar el estudio y valorar el grado de extensión de la enfermedad.

La obtención de material tisular adecuado para el diagnóstico histológico y las pruebas moleculares son importantes para permitir decisiones de tratamiento individuales. La prueba diagnóstica más común es la fibrobroncoscopia, que a menudo se amplía con la evaluación de los ganglios linfáticos regionales mediante ecografía endobronquial (EBUS) y/o ultrasonido endoscópico (EUS) (11).

El diagnóstico patológico se debe realizar de acuerdo con la clasificación de la OMS de 2015. La clasificación discute el enfoque de los tumores resecados quirúrgicamente, pero también tiene recomendaciones para biopsias pequeñas y diagnósticos de citología, que son las únicas muestras disponibles para la mayoría de los pacientes. Las decisiones terapéuticas para los pacientes con CPNM dependen de un subtipo histológico de tumor específico, y esto debe darse siempre que sea posible.

2.2.1. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA

La inmunohistoquímica (IHC) debe utilizarse para aumentar la especificidad del diagnóstico y reducir la tasa de CPNM no especificado a menos del 10% de los casos diagnosticados. Solo dos marcadores, p40 o p63 para predecir el carcinoma de células escamosas y TTF1 (Factor de transcripción tiroideo 1) para predecir el adenocarcinoma, generalmente son todo lo que se requiere (12). Es así como el cáncer de pulmón, de acuerdo a la expresión clínica y comportamiento biológico es clasificado clásicamente en dos grandes grupos (13):

Cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico: Su nombre deriva del tamaño de sus células. Un 20% de los cánceres de pulmón son de este tipo y se localiza preferentemente en la zona central de los pulmones, pudiendo comprimir vasos u órganos localizados en ese nivel (vena cava, etc.). Además, se caracterizan por su alta agresividad y crecimiento rápido.

Cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico (CPNM): Es el tipo más común, representa el 80% restante de los cánceres de pulmón. Los tres subtipos histológicos del CPNM tal y como los describe la OMS son (14):

- **Carcinoma de células escamosas o epidermoide:** representando el 40% de los carcinomas no microcítico, es la variedad de cáncer broncopulmonar más frecuente en España. Suele

Introducción

localizarse en la parte central de los pulmones (**Figura 5**), y con frecuencia se necrosa en su interior y se asemeja a un absceso. Tiene un crecimiento relativamente lento y esta usualmente asociado a la exposición al humo de tabaco.

- **Adenocarcinoma (ADC):** Representa el 30% de los carcinomas no microcíticos, es el menos relacionado con el consumo de tabaco, pero aun así es más frecuente en fumadores. Suele ser más frecuente en mujeres y localizarse en zonas más periféricas de los pulmones (**Figura 5**), por lo que frecuentemente afecta a la pleura y pared torácica. También existe una forma rara de adenocarcinoma, llamado carcinoma broncoalveolar que se está viendo con mayor frecuencia a nivel mundial. Este se disemina a lo largo de todo el pulmón a diferencia de otros tipos de cáncer de pulmón más comunes que forman tumores únicos. Se desconoce la causa de este tipo de adenocarcinoma, y a pesar de presentarse en personas que fuman, generalmente se da en aquellas que nunca han fumado.
- **Carcinoma de células grandes:** Se denomina así por el tamaño de las células que lo componen. Es el tipo menos frecuente de los carcinomas broncopulmonares, representando el 10% de ellos, es de crecimiento rápido y puede aparecer en cualquier parte del pulmón.

Los distintos tipos histológicos tienen diferente evolución natural y, por tanto, como paso previo al tratamiento, es necesario un diagnóstico histológico y molecular preciso realizado por un anatomopatólogo experto. Las principales decisiones con respecto al tratamiento se toman al distinguir claramente los carcinomas de células pequeñas y los que no corresponden a este tipo.

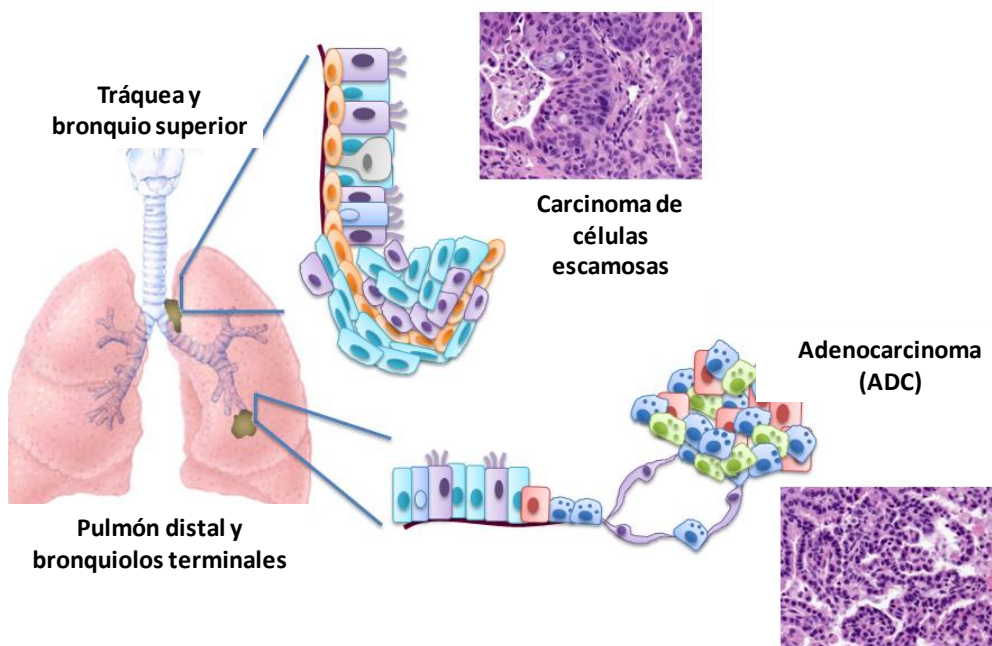


Figura 5. Localización de los subtipos histológicos de CPNM (15).

2.2.2. ESTADIFICACIÓN

La estadificación del cáncer de pulmón se basa en el sistema de tumor-ganglios-metástasis (TNM), designado por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). El sistema está basado en la diseminación del tumor primario (T), la magnitud de la afectación de ganglios linfáticos (N) y la presentación o no de presentación de metástasis (M). Durante el 16º Congreso Mundial de Cáncer de Pulmón, la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) presentó la clasificación revisada de tumores malignos (TNM 8), publicada en diciembre de 2016 y efectiva desde enero de 2017 (16) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Estadificación del cáncer de pulmón, Sistema de Clasificación TNM 8ª Edición (2017) (16).

Estadio	T	N	M
Carcinoma oculto	TX	N0	M0
0	Tis	N0	M0
IA1	T1a(mi)/T1a	N0	M0
IA2	T1b	N0	M0
IA3	T1c	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
IIB	T1a-T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a-T2b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0/N1	M0
IIIB	T1a-T2b	N3	M0
	T3/T4	N2	M0
IIIC	T3/T4	N3	M0
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a/M1b
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1c

Fuente: International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), 2017.

El descriptor T con respecto a la 7ª edición del TNM se dividió aún más fraccionando T1 en tres subgrupos basado en el tamaño del tumor primario (T1a \leq 1 cm, T1b $>$ 1 cm a \leq 2 cm, T1c $>$ 2 cm a \leq 3 cm), se continúa en T2 (T2a $>$ 3 cm a \leq 4 cm, T2b $>$ 4 cm a \leq 5 cm), T3 ($>$ 5 cm a \leq 7 cm) y T4 ($>$ 7 cm). La definición del descriptor T del Sistema de Clasificación TNM 8ª Edición (2017) se especifica en la (**Tabla 2**), el descriptor N en la (**Tabla 3**), y el descriptor M en la (**Tabla 4**).

La combinación T, N y M determina la etapa apropiada del cáncer y cada etapa conlleva especificaciones de tratamiento y pronóstico específicas, por ello es de vital importancia clasificar bien los tumores antes de tomar cualquier decisión terapéutica.

Introducción

Tabla 2. Descriptor T del Sistema de Clasificación TNM 8ª Edición (2017) (16).

T: Tumor primario	
Tx	El tumor primario no puede ser evaluado o tumor evidenciado por la presencia de células malignas en esputo o lavados bronquiales, pero no evidenciado en pruebas de imagen o broncoscopia.
T0	Sin evidencia de tumor primario.
Tis	Carcinoma in situ.
T1	Tumor < o igual a 3 cm en su diámetro mayor rodeado por pulmón o pleura visceral sin evidencia mediante broncoscopia de invasión más proximal que el bronquio.
T1a (mi)	Adenocarcinoma mínimamente invasivo.
T1a	Tumor < o igual a 1 cm en su diámetro mayor.
T1b	Tumor > 1 cm pero < o igual a 2 cm en su diámetro mayor.
T1c	Tumor > 2 cm pero < o igual a 3 cm en su diámetro mayor.
T2	Tumor > 3 cm pero < o igual a 5 cm o tumor con alguno de los siguientes criterios: - Afecta bronquio principal independientemente de la distancia desde carina pero sin afectación carinal. - Invade pleura visceral. - Asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar, afectando a parte o todo el pulmón.
T2a	Tumor > 3 cm pero < o igual a 4 cm en su diámetro mayor.
T2b	Tumor de >4 cm pero < o igual a 5 cm en su diámetro mayor.
T3	Tumor de > 5 cm pero < o igual a 7 cm en su diámetro mayor o con nódulos tumorales en el mismo lóbulo que el tumor primario o que invade directamente alguna de las siguientes estructuras: pared torácica (incluyendo pleura parietal), nervio frénico, pericardio parietal.
T4	Tumor > 7 cm en su diámetro mayor o asociado a nódulos tumorales en distinto lóbulo ipsilateral al del tumor primario o invade alguna de las siguientes estructuras: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral y carina.

Fuente: International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), 2017.

Tabla 3. Descriptor N del Sistema de Clasificación TNM 8ª Edición (2017) (16).

N: afectación de ganglios linfáticos regionales	
NX	No se puede evaluar la afectación de los ganglios linfáticos regionales.
N0	No existe afectación de ganglios linfáticos regionales.
N1	Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales y/o hiliares e intrapulmonares ipsilaterales. Incluyendo afectación por extensión directa.
N2	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales.
N3	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, escalénicos o supraclaviculares ipsilaterales o contralaterales.

Fuente: International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), 2017.

Tabla 4. Descriptor M del Sistema de Clasificación TNM 8ª Edición (2017) (16).

M: metástasis a distancia	
M0	No existen metástasis a distancia.
M1	Presencia de metástasis a distancia.
M1a	Nódulos tumorales presentes en lóbulo contralateral; tumor con nódulos pleurales o pericárdicos o derrame pleural o pericárdico malignos.
M1b	Metástasis única extratorácica.
M1c	Metástasis múltiples extratorácicas en uno o varios órganos.

Fuente: International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), 2017.

2.2.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN CPNM

El CPNM es una enfermedad molecularmente heterogénea y su biología es crucial para el desarrollo de terapias efectivas, este se compone de subpoblaciones de células o clones con características moleculares distintas, que dan lugar a una heterogeneidad intratumoral. Una mayor fracción de mutación subclonal se puede asociar con una mayor probabilidad de recaída posquirúrgica en pacientes con ADC localizado, lo que implica una mayor predisposición a metástasis al principio del desarrollo tumoral en aquellos tumores con mayor heterogeneidad intratumoral (17).

La primera alteración molecular descrita en CPNM y específicamente en ADC es el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (**EGFR**), segunda alteración más frecuente en este subtipo histológico (10%) (**Figura 6**), luego de **KRAS** (25%), además de la identificación de reordenaciones en el gen Kinasa de Linfoma Anaplásico (**ALK**) (4%) (18,19), la fusión de **ROS1** (1,9%) que codifica un receptor tirosin-quinasa (20), la mutación en el exón 14 de **c-MET** (3%) y las fusiones de **NTRK** (1%); la mayoría de estas mutaciones en la actualidad son dianas en terapia dirigida. En cambio, los genes más comúnmente mutados en carcinoma de células escamosas son los supresores tumorales **TP53**, que está presente en más del 90% de los tumores, y **CDKN2A**. Aunque se produce la amplificación de **EGFR**, a diferencia de los ADC, raramente se observan mutaciones accionables en los receptores tirosin-quinasa en carcinoma de células escamosas (21,22).

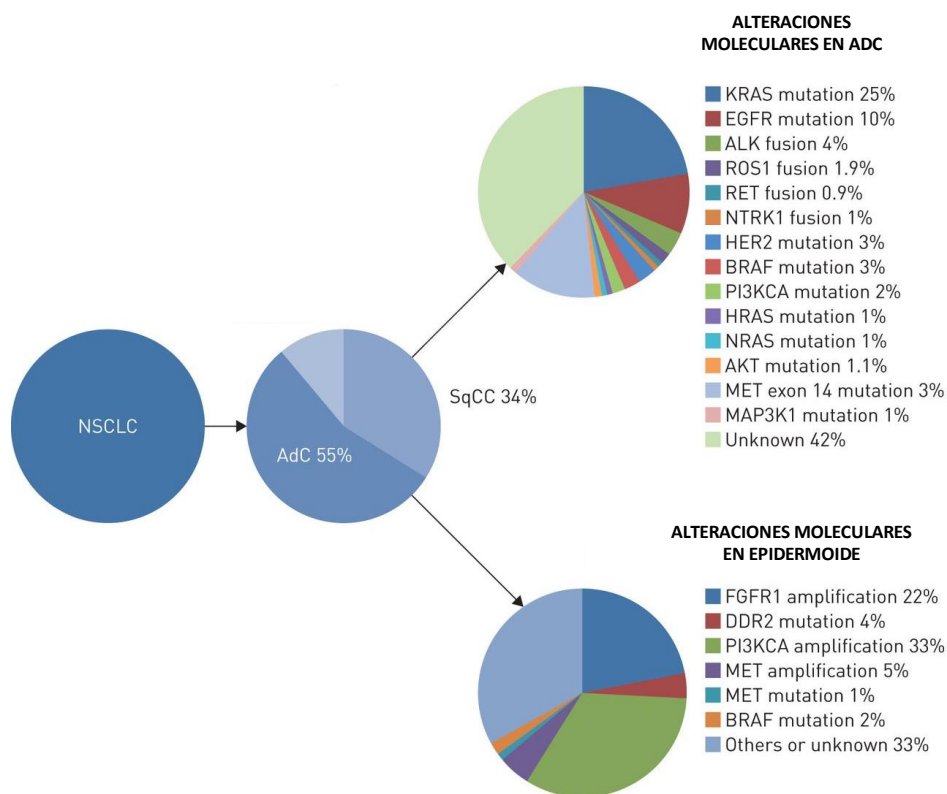


Figura 6. Frecuencia de las alteraciones moleculares en los subtipos histológicos de CPNM (23).

Introducción

Alteraciones en **BRAF** (Proto oncogén B-Raf o homólogo B del oncogén viral del sarcoma murino) se encuentran en ambos subtipos, pero son más frecuentes en ADC (3%) que en carcinoma epidermoide (2%) (24).

La caracterización molecular de estos tumores ha demostrado que las mutaciones en *KRAS* y en *EGFR*, cuando se detectan, suelen estar presentes en los clones iniciadores, indicando su papel en el inicio del tumor y representando objetivos atractivos para la intervención terapéutica (25). Es decir, los hallazgos en la biología molecular del tumor, junto con la identificación de alteraciones como por ejemplo *EGFR*, *ALK*, *ROS1* y *BRAF*, que conducen a una señalización oncogénica, han realizado un cambio de paradigma en el tratamiento de esta enfermedad, proporcionando nuevos tratamientos dirigidos contra mutaciones diana, con el consiguiente beneficio a nivel de calidad y esperanza de vida para el paciente; además de aumentar la comprensión de los diferentes mecanismos oncogénicos de resistencia a diferentes terapias antineoplásicas.

2.3. TRATAMIENTO EN CPNM

El tratamiento en CPNM depende de varios factores como es el estado funcional del paciente (*Performance Status*, PS), el tipo histológico, la funcionalidad pulmonar y las distintas alteraciones moleculares presentes en las células tumorales. Sin embargo, la piedra angular del tratamiento del cáncer de pulmón potencialmente resecable (estadios I-II y casos seleccionados en estadio IIIA) es la extirpación quirúrgica completa del tumor, cuya intención es realizar un tratamiento curativo en estos pacientes en los que la enfermedad se encuentra localizada y no hay diseminación (26). Sin embargo, un alto porcentaje de estos tumores recurrirá, con una supervivencia global a 5 años que varía del 83% para el estadio IA al 36% para el estadio IIIA (27). La terapia estándar para pacientes con CPNM no resecable localmente avanzado es la combinación de terapia citotóxica y radiación torácica, con una ventaja de supervivencia para la terapia concurrente versus la secuencial (28).

En los últimos 20 años, el tratamiento ha evolucionado desde el uso empírico de terapias citotóxicas hasta regímenes efectivos y mejor tolerados que están dirigidos a subtipos moleculares específicos en ADC, y terapias en desarrollo dirigidas al carcinoma de células escamosas (21,22).

2.3.1. QUIMIOTERAPIA

La quimioterapia es el tratamiento estándar en CPNM, se utiliza en adyuvancia y neoadyuvancia, además se recomienda para pacientes con CPNM en estadio IV sin alteraciones moleculares detectadas (**Figura 7**). La quimioterapia recomendada incluye agentes de platino (p. Ej., cisplatino,

carboplatino), taxanos (p. Ej., paclitaxel, paclitaxel unido a albúmina, docetaxel), vinorelbina, etopósido, pemetrexed y gemcitabina. Las combinaciones que usan muchos de estos medicamentos producen tasas de supervivencia de 1 a 30% durante 1 año y son más eficaces que los agentes individuales. Para aclarar el uso de la terapia sistémica, las pautas de la NCCN (Red Nacional Integral de Cáncer) enumeran todos los regímenes de terapia sistémica combinada y los agentes únicos que se recomiendan para los pacientes con CPNM metastásico según la histología y el PS (Escala ECOG de estado funcional) (29).

La terapia de doblete basada en platino (por ejemplo, cisplatino en combinación con otra terapia citotóxica) ha sido la terapia estándar en primera línea para pacientes con CPNM en estadio avanzado y buen estado funcional, con la opción de terapia de mantenimiento en pacientes con histología no epidermoide que logran control tumoral después de los cuatro a seis ciclos iniciales (30).

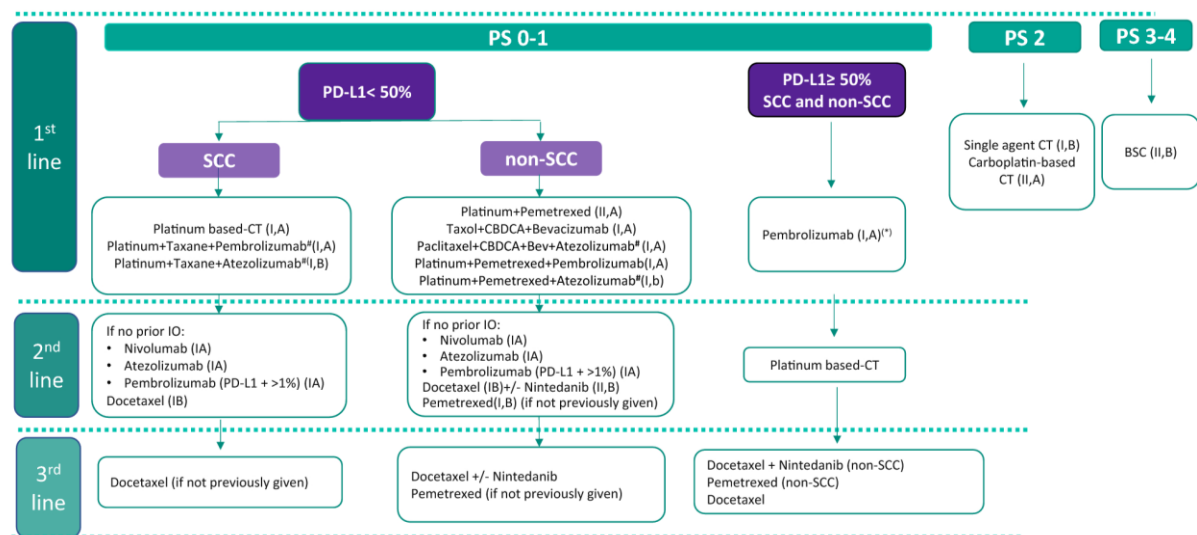


Figura 7. Esquema de tratamiento del CPNM estadio IV sin alteraciones moleculares detectables (31).

Los regímenes citotóxicos iniciales utilizados con frecuencia para el CPNM no escamoso incluyen: 1) cisplatino (o carboplatino) / pemetrexed; o 2) carboplatino / paclitaxel con (o sin) bevacizumab. Gemcitabina / cisplatino se recomienda para pacientes con Carcinoma de células escamosas o CPNM no escamoso. Estos regímenes se recomiendan en base a ensayos aleatorizados de fase 3 (por ejemplo, cisplatino / pemetrexed carboplatino / paclitaxel [con o sin bevacizumab], gemcitabina / cisplatino) (29).

En general, no ha habido diferencias clínicamente significativas en el resultado entre los múltiples regímenes citotóxicos utilizados en pacientes con CPNM en estadio avanzado (32), con la excepción del pemetrexed, que es menos efectivo en pacientes con carcinoma de células escamosas (33). En

Introducción

segunda línea, el estándar de tratamiento ha sido docetaxel, con o sin el anticuerpo anti-VEGF receptor-2 (Ramucirumab) (34). La terapia citotóxica adyuvante con un doblete basado en cisplatino se asocia con una mejor supervivencia en pacientes con CPNM en estadio II y IIIA completamente resecado, con un beneficio probable para la enfermedad en estadio IB (35).

Sin embargo, en los últimos años no se han producido grandes avances en este tipo de tratamiento y se ha visto incrementada la resistencia a esta terapia, asociada en parte a las células madre tumorales (CMTs) y a nuevas mutaciones diana que se han descubierto y son el motivo del nacimiento de la terapia dirigida, que ha marcado un cambio de paradigma en el manejo y tratamiento contra el cáncer de pulmón.

2.3.2. TERAPIA DIRIGIDA

La alta mortalidad por cáncer de pulmón se debe a la presencia de enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico en la mayoría de los pacientes, lo que indica que las mejoras en la supervivencia a largo plazo requerirán terapias sistémicas más efectivas (36,37). Las terapias dirigidas molecularmente en pacientes con CPNM se utilizaron inicialmente a finales de la década de 1990 con la introducción de gefitinib, un Inhibidor de la actividad Tirosin-Kinasa específica de *EGFR* (TKI); marcando lo que sería un antes y un después en el tratamiento con terapia dirigida en CPNM (38–40). Los estudios retrospectivos demostraron posteriormente que se observaron mutaciones activadoras de *EGFR* en la gran mayoría de los pacientes que se beneficiaron de TKIs (41,42). Desde entonces, las alteraciones genéticas posibles como *EGFR*, reordenamientos de *ALK*, fusiones de *ROS1* y mutaciones de *BRAF* condujeron al desarrollo de terapias dirigidas efectivas (43).

2.3.2.1. EGFR

EGFR pertenece a una familia de receptor tirosina quinasa que también incluye el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*HER2*, también conocido como *ERBB2*), *HER3* (*ERBB3*) y *HER4* (*ERBB4*). Las mutaciones de *EGFR* más comunes asociadas con la sensibilidad a los TKIs incluyen delección del exón 19 (50% de los casos) y una mutación puntual en el exón 21 (L858R) (40% de los casos) (44). Es importante destacar que las mutaciones descritas del gen *EGFR* son mutuamente excluyentes con las de *KRAS*, *BRAF* y *Her2*, y estas ocurren más frecuentemente en ADC en mujeres no fumadoras con patrón de crecimiento bronquioalveolar prominente y se asocian con una elevada sensibilidad al tratamiento con TKIs de primera generación (41,45). Por otro lado, estas mutaciones también parecen comportarse como factor pronóstico ya que se asocian con mejor supervivencia.

Sin embargo, no todo son buenas noticias, ya que la gran mayoría de los pacientes con una respuesta inicial suelen recaer. Uno de los mecanismos que ocurren con mayor frecuencia en los tratamientos con TKIs de primera generación es la mutación en el exón 20 (T790M) (46).

Osimertinib, un TKI de tercera generación, es eficaz en pacientes con CPNM en progresión que albergan mutaciones de *EGFR* (T790M) posterior a tratamiento con TKI de primera generación (47), y mostró un aumento de tasas de supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) en comparación con el tratamiento citotóxico basado en platino (48) (**Figura 8**). Además, en un ensayo aleatorizado que comparó osimertinib con erlotinib o gefitinib en pacientes sin tratamiento previo con CPNM en estadio avanzado que albergaban delección del exón 19 de *EGFR* o mutación L858R, el osimertinib se asoció con una mejoría significativa en la SLP (49). El seguimiento adicional de este ensayo, incluidas las actualizaciones sobre la SG, puede proporcionar una guía para la terapia de primera línea en pacientes no tratados previamente con tumores que albergan una mutación de *EGFR*.

Otros mecanismos de resistencia al tratamiento con TKIs incluyen la amplificación del oncogén *MET* (50,51), activación de otros receptores con actividad tirosin-kinasa como el receptor del factor de crecimiento semejante a insulina (ILGFR1) (52), las mutaciones del oncogén *KRAS* (25), amplificaciones en *HER2* o mutaciones en *BRAF* y *PIK3CA*; lo que indica que es necesario un perfil molecular en la progresión para determinar el siguiente tratamiento.

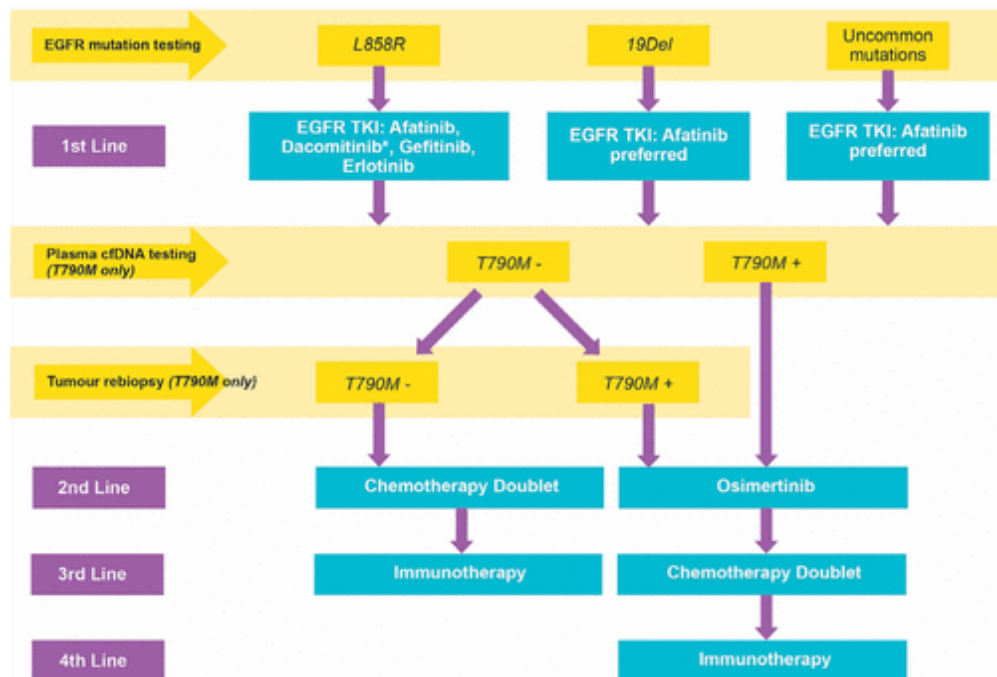


Figura 8. Algoritmo de tratamiento para CPNM no escamoso avanzado con mutación EGFR (53).

Introducción

Uno de los mecanismos para la resistencia adquirida a TKI de tercera generación es la mutación C797S (54) que, en combinación con la mutación sensibilizante y sin T790M, causa resistencia a TKI de tercera generación, pero no a gefitinib o afatinib. Sin embargo, la presencia de triples mutantes (mutación sensibilizadora, T790M y C797S) conduce a la resistencia a las tres generaciones de TKIs (55). Los estudios de resistencia actualmente en marcha diluciran posibles nuevas combinaciones.

2.3.2.2. ALK

Crizotinib es un inhibidor competitivo de ATP de las tirosinas quinasas *ALK*, *MET* y *ROS1* con actividad contra CPNM (56). El crizotinib se asocia con mejores tasas de respuesta global y mediana de SLP en comparación con la terapia citotóxica en pacientes tratados previamente y no tratados (57,58). La mayoría de los pacientes tratados previamente con crizotinib se benefician de inhibidores de *ALK* de segunda generación, incluidos ceritinib, alectinib y brigatinib (59–61). Ceritinib también aumentó la mediana de SLP en comparación con la terapia citotóxica de primera línea en pacientes con CPNM *ALK* positivo (62). Dos estudios aleatorizados mostraron un aumento de tasas de respuesta global y la mediana de SLP para alectinib en comparación con crizotinib en pacientes con CPNM *ALK* positivo sin tratamiento previo, estableciendo el alectinib como una opción de tratamiento de primera línea (63,64). Del mismo modo que *EGFR*, los tratamientos dirigidos son muy eficaces durante un periodo de tiempo, pero posteriormente se producen mutaciones de resistencia como mutaciones en *ALK* o activaciones de la vía de señalización de *EGFR* o MAPK.

Lorlatinib es un potente inhibidor de *ALK* de tercera generación con actividad contra la mayoría de las mutaciones de resistencia *ALK* conocidas y eficaz en pacientes previamente tratados con hasta tres líneas previas de inhibidores de *ALK* (65) (**Figura 9**).

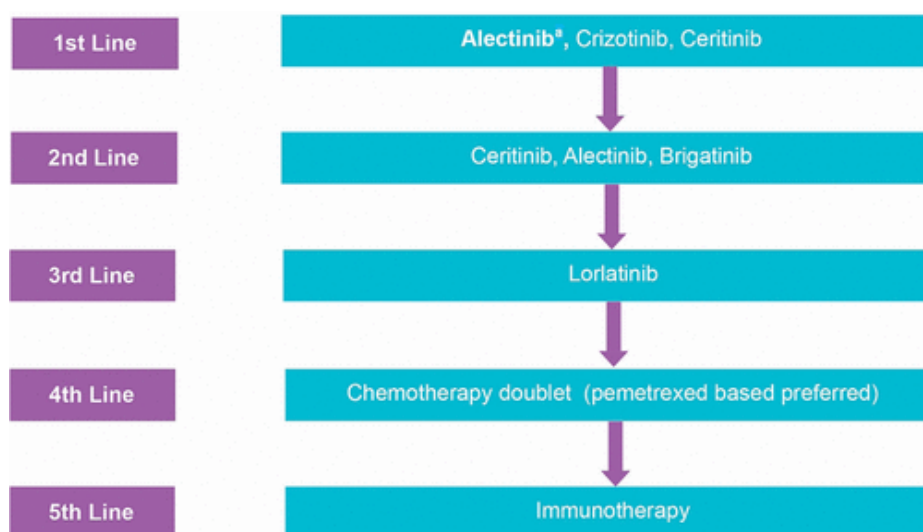


Figura 9. Algoritmo de tratamiento para CPNM no escamoso avanzado con reordenamiento ALK (53).

2.3.2.3. ROS1

ROS1 codifica un receptor tirosin-quinasa que se activa constitutivamente cuando una reordenación conduce a la fusión de su dominio tirosina quinasa con un gen asociado como *CD74* (20). Debido a la alta homología entre los dominios quinasa de *ROS1* y *ALK*, los fármacos utilizados para tratar los tumores *ALK* positivos incluyendo crizotinib (66), ceritinib (67) y lorlatinib (65) también han mostrado una actividad marcada en tumores *ROS1* positivos. Los mecanismos de resistencia adquirida de reordenamientos de *ROS1* a crizotinib incluyen mutaciones secundarias, más comúnmente G2032R, activación de señalización de *EGFR* de tipo no mutado, mutaciones de *KRAS* y *KIT* (68,69) (**Figura 10**).

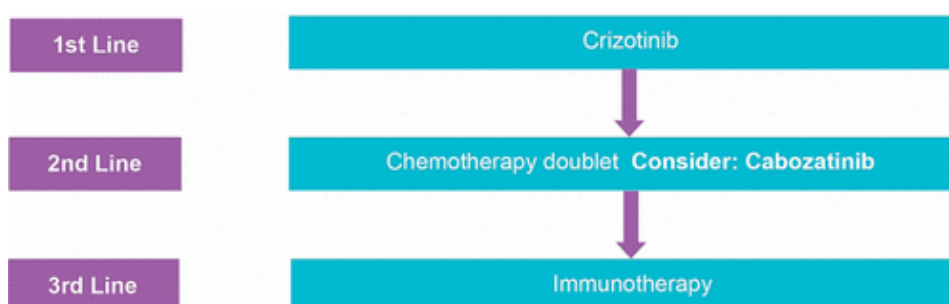


Figura 10. Algoritmo de tratamiento para CPNM no escamoso avanzado con reordenamiento *ROS1* (53).

2.3.2.4. KRAS

KRAS es el oncogén mutado con mayor frecuencia en el cáncer y codifica una proteína de señalización clave en los tumores, incluyendo el CPNM. La mutación *KRAS* (G12C) tiene un residuo de cisteína que ha sido utilizado para diseñar inhibidores covalentes que tienen una actividad preclínica prometedora. Los esfuerzos han llevado al descubrimiento de AMG 510, que es, el primer inhibidor de *KRAS* (G12C) en el desarrollo clínico. En los análisis preclínicos, el tratamiento con AMG 510 condujo a la regresión de los tumores *KRAS* (G12C) y mejoró la eficacia antitumoral de la quimioterapia y las terapias dirigidas. En ratones inmunocompetentes, el tratamiento con AMG 510 en monoterapia dio como resultado un microambiente tumoral proinflamatorio y produjo curas duraderas, así como en combinación con anticuerpos monoclonales inmunomoduladores o “inmun checkpoints”. Los ratones curados rechazaron el crecimiento de tumores isogénicos *KRAS* (G12D), lo que sugiere inmunidad adaptativa contra antígenos compartidos. Además, en ensayos clínicos, AMG 510 demostró actividad antitumoral en las primeras cohortes de dosificación y representa una terapia potencialmente transformadora para quienes no existen tratamientos efectivos (70).

Introducción

2.3.2.5. BRAF V600E

El régimen de combinación de dabrafenib / trametinib está aprobado por la “*Food and Drug Administration, FDA*” para pacientes con mutaciones metastásicas de CPNM y *BRAF V600E*. Dabrafenib es un TKI oral que inhibe las mutaciones *BRAF V600E*; trametinib es un TKI oral que inhibe las mutaciones *BRAF V600E* y MEK (71,72).

2.3.2.6. c-MET

El papel de la vía de señalización del factor c de transición epitelio-mesenquimal (*c-MET*) en la progresión e invasión del tumor se ha estudiado ampliamente. Los inhibidores de *c-MET* han mostrado actividad antitumoral en el CPNM en ensayos preclínicos y clínicos. Sin embargo, dada su heterogeneidad molecular, es probable que solo un subconjunto específico de pacientes se beneficie de los inhibidores de *c-MET* (73).

2.3.2.7. NTRK

La familia *NTRK* desempeña un papel en el desarrollo del sistema nervioso con la modulación del crecimiento, la proliferación, la reparación, el mantenimiento y la apoptosis. Sin embargo, las fusiones *NTRK* también están presentes en tumores sólidos como fusiones oncogénicas responsables del crecimiento de células cancerosas, la proliferación y supervivencia; la presencia de estos oncogenes está asociada con una escasa supervivencia en los cánceres de pulmón. Se detectaron fusiones oncogénicas *NTRK1* mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) o secuenciación masiva en aproximadamente el 3% de CPNM. Mientras que *NTRK2* y *NTRK3* se fusionan en aproximadamente el 1% de los pacientes con CPNM de todos los tipos.

Se encuentran disponibles varios TKI con diversos grados de actividad contra *TRK1*, *TRK2* y/o *TRK3*, que se pueden agrupar en general en inhibidores multi-quinasas con actividad contra un rango de objetivos que incluyen *TRK* o inhibidores de *TRK* más selectivos. El grupo inhibidor multi-quinasa incluye entrectinib, crizotinib, cabozantinib, lestaurtinib, altiratinib, foretinib, ponatinib, nintedanib, merestinib, MGCD516, PLX7486, DS-6051b y TSR-011. El larotrectinib es actualmente el inhibidor de *TRK* más específico que se está probando en pacientes con cáncer (74). Los desafíos a futuro están en la identificación de los subtipos moleculares que más se benefician.

2.3.3. INMUNOTERAPIA

La inmunoterapia se clasifica habitualmente en pasiva y activa, en función de la capacidad que tiene el huésped de activar el sistema inmune contra las células malignas (75). La inmunoterapia pasiva

se define como la administración de agentes tales como anticuerpos monoclonales o terapia celular adaptativa que se dirigen directamente al tumor, mientras que la inmunoterapia activa tiene como objetivo estimular el propio sistema inmune del huésped para erradicar el cáncer a través de la vacunación con antígenos tumorales, citocinas inmunomoduladoras, anticuerpos monoclonales inmunomoduladores o “inmun checkpoints” (anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti-PD-L1), inhibidores del metabolismo inmunosupresor e inductores de la muerte celular inmunogénica.

La introducción de los *inmun checkpoints* ha señalado una nueva dirección para el tratamiento del cáncer de pulmón. El primer inmun checkpoint aprobado por la FDA Fue ipilimumab, un anticuerpo monoclonal humano de inmunoglobulina G1 que bloquea CTLA-4, para el tratamiento del melanoma metastásico (76,77). Durante la tumorigénesis, la señalización de PD-1, impulsada principalmente por la expresión adaptativa de PD-L1 dentro del tumor, inactiva las células T que reconocen los antígenos específicos del tumor, permitiendo la progresión tumoral y la metástasis (78,79). El bloqueo de los ejes PD-1 y PD-L1 con anticuerpos ofrece un enfoque para restaurar la inmunidad antitumoral mediada por células T (80–82) (Figura 11).

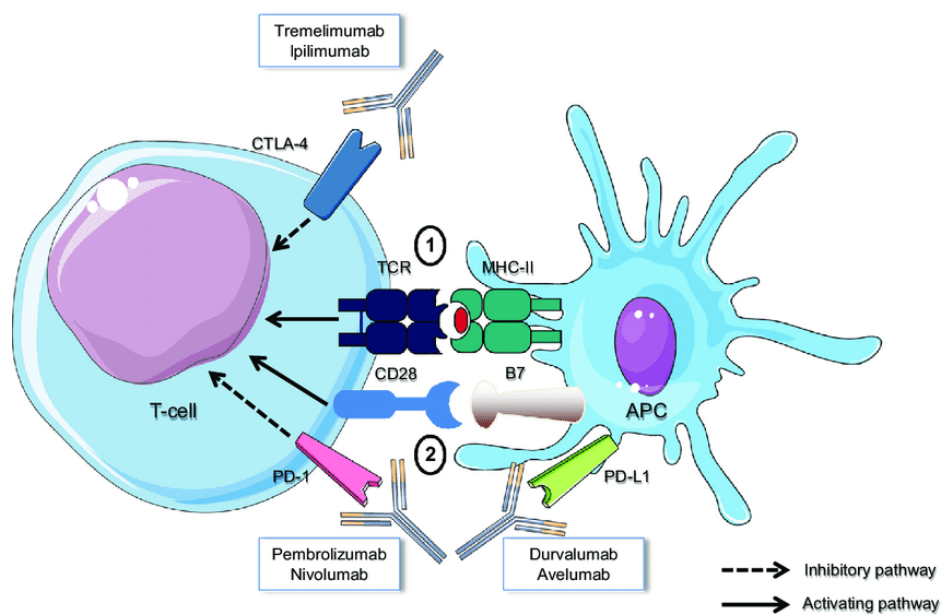


Figura 11. Anticuerpos inhibidores de los inmun checkpoints en cáncer de pulmón (83).

La adquisición de resistencias a las terapias mencionadas anteriormente es una de las principales causas de la elevada mortalidad del cáncer de pulmón (84); por lo que son necesarias a día de hoy nuevas estrategias terapéuticas. Actualmente, existe un gran cúmulo de evidencia científica que indica la relación entre la población de CMTs con la aparición de resistencias a los tratamientos, las recidivas y la diseminación tumoral. Así, mientras que los tratamientos quimioterápicos convencionales están dirigidos a causar daño en el ADN de células de rápida división, las CMTs se mantienen en estado de

Introducción

quiescencia con una cinética de división enlentecida. Por esta razón las CMTs no son sensibles a los citotóxicos que se están usando actualmente y pueden ser las responsables de la recidiva después del tratamiento.

3. CÉLULAS MADRE TUMORALES

Se debe tener presente que los tumores están compuestos por múltiples tipos celulares como son las propias células tumorales, entre las que se encuentran las células madre tumorales, células del estroma, células endoteliales, células del sistema inmune, entre otras; dentro de un contexto que se conoce como “microambiente tumoral” en el que se favorece la proliferación y la invasión celular (3) (**Figura 12**); y con una elevada heterogeneidad que se traduce en una diversidad genética que puede actuar como un sustrato para una selección natural y evolución tumoral.

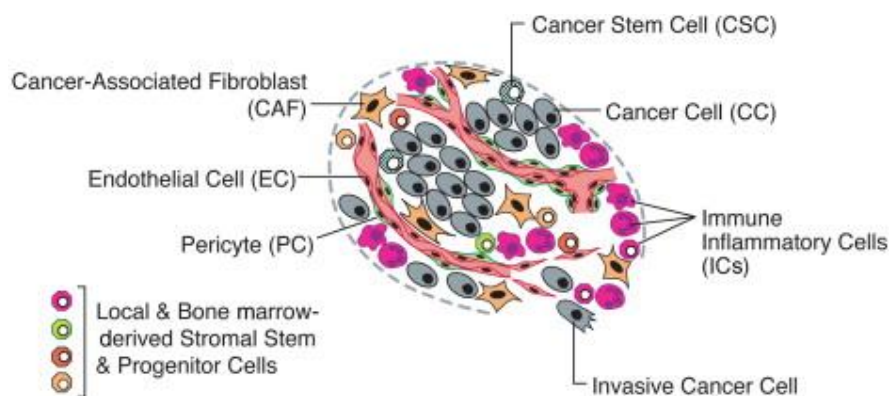


Figura 12. Células que componen el microambiente tumoral (4).

Esta heterogeneidad intratumoral puede ser explicada en la actualidad por dos modelos propuestos (85): El **modelo estocástico** o modelo de evolución clonal tradicional del cáncer, el cual postula que una o varias células del tejido adquieren una mutación y que, a partir de ésta y a través de un proceso de división no controlado, van acumulándose nuevas alteraciones genéticas que, mediante la selección de los clones más aptos, alcanzan el estado de célula tumoral, dando finalmente lugar al tumor (86). Según este modelo, cualquier célula del tumor resultante sería capaz de mantener y expandir el tumor, así como de dar lugar a nuevos tumores. Por el contrario, el **modelo jerárquico** de las CMTs implica la existencia de una célula de origen en el tumor con propiedades de célula madre, capaz de proliferar y mantenerse en el tumor de forma indefinida gracias a su capacidad autorrenovadora (87,88). En este modelo, tan sólo la población de CMTs tiene la capacidad de generar y mantener el tumor, a diferencia del resto de células que lo forman que no tienen esa habilidad (**Figura 13**).

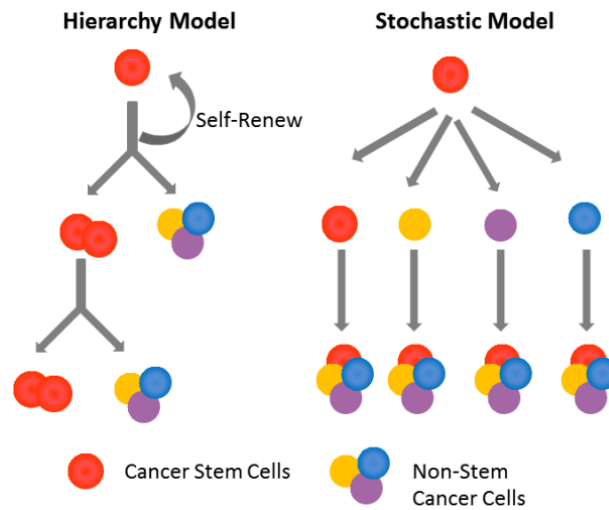


Figura 13. Esquema representativo del modelo jerárquico de las CMTs y el modelo estocástico (89).

No obstante, ambos modelos no son excluyentes y han sido propuestos como un modelo unificado por algunos autores (90,91) (Figura 14).

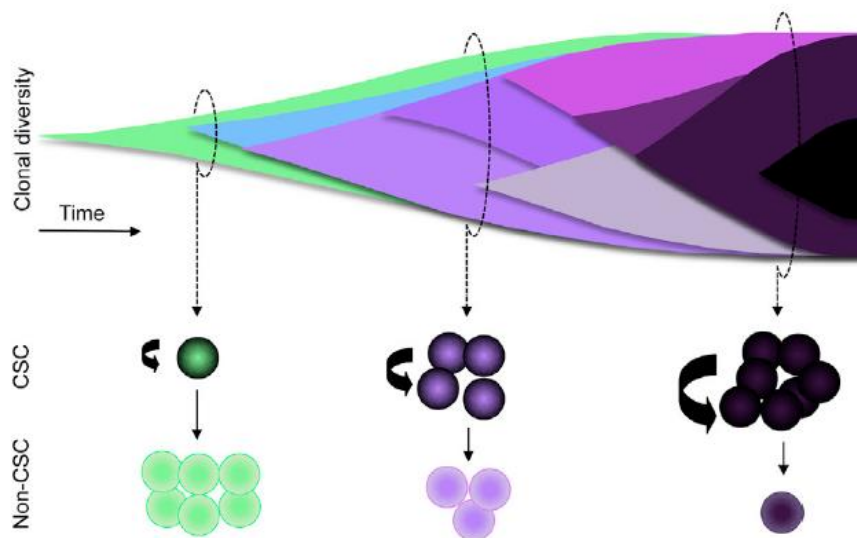


Figura 14. Modelo unificado de evolución clonal y células madre tumorales (91).

El concepto de que una subpoblación de CMTs son las responsables del mantenimiento del tumor surgió hace casi 50 años, pero la primera descripción experimental de las CMTs fue en un estudio de leucemia mieloide aguda en 1997 en el que se describió una población de células CD34+CD38- que poseía características de células madre y constituían una población celular heterogénea (92). Sin embargo, mientras las CMTs han sido descritas en un gran número de cánceres, la biología de las CMTs del CPNM sigue siendo imprecisa y la identificación de marcadores específicos y de dianas terapéuticas sigue siendo un gran reto (93).

3.1. PROPIEDADES DE LAS CMTs

Las células madre y las CMTs presentan características comunes en términos de auto-renovación, producción de progenie diferenciada, expresión de marcadores de superficie específicos y oncogenes, y la utilización de vías de señalización comunes; aunque hay una propiedad que las distingue, las CMTs presentan capacidad tumorigénica, la cual está ausente en las células madre normales. Es decir, las CMTs pueden formar nuevamente el tumor del que se aislaron cuando son trasplantadas a otro huésped; siendo definidas a través de 6 características claves (91) (**Figura 15**):

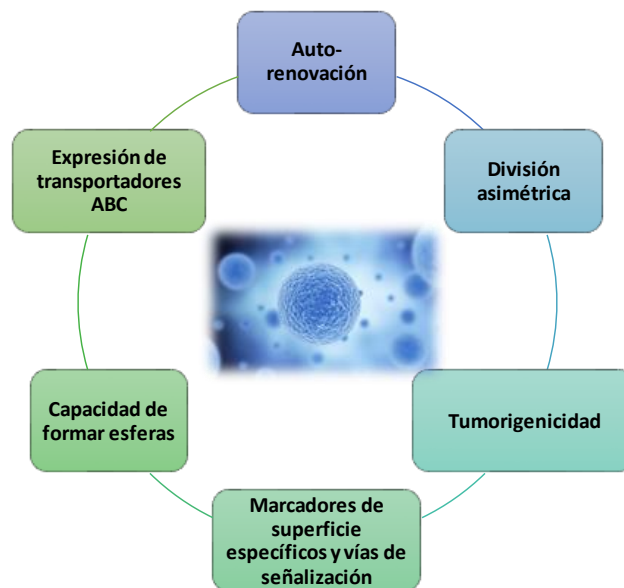


Figura 15. Propiedades de las células madre tumorales.

- Autorenovación:** La subpoblación de CMTs pueden ser trasplantadas en serie a través de múltiples generaciones, mostrando que se trata de una población celular con capacidad de auto-renovación.
- División/diferenciación asimétrica:** Las CMTs mantienen una estructura jerarquizada como cualquier otro tipo celular, y se piensa que pueden sufrir tanto división simétrica como asimétrica. Como resultado de la división asimétrica se obtienen dos células hijas diferentes mientras que mediante la división simétrica se generan dos células hijas con las mismas características que la célula progenitora. Este tipo de división es la que parece estar involucrada en el mantenimiento de una población de células madre adultas en el tumor. Por otra parte, la división asimétrica parece ser la responsable de que las CMTs puedan desarrollar nuevamente el tumor (94) (**Figura 16**).

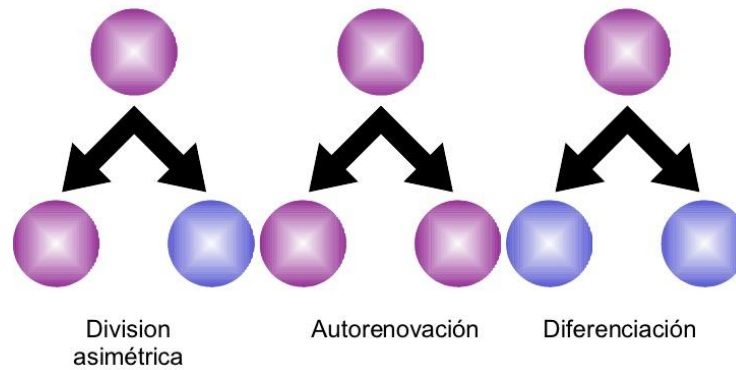


Figura 16. Características de las CMTs.

- c. **Tumorigenicidad:** Solo una pequeña porción de las células tumorales tiene potencial tumorigénico cuando se xenotrasplantan en modelos animales.
- d. **Marcadores de superficie específicos y vías de señalización,** mediante los cuales la subpoblación de CMTs se puede identificar, aislar y diferenciar funcionalmente de las células tumorales. Las CMTs tienden a ser resistentes a las terapias convencionales, tales como radiación, hormonas, citoquinas y a la quimioterapia; debido a la señalización y las diferencias de expresión génica.
- e. **Capacidad de formar esferas** en agar o en medio libre de suero enriquecido con factores de crecimiento (95–97). Las tumoresferas son un modelo de cultivo celular en tres dimensiones (3D) que aprovecha la tendencia natural a agregarse que muestran las CMTs. Este tipo de cultivos se vienen utilizando con éxito en importantes campos científicos, tales como el de la Biología Celular (adhesión, migración o morfogénesis), la Farmacología (evaluación de nuevos fármacos), la Oncobiología y Cancerología (recreación de tumores, estudios de quimiocinas en células cancerosas, o terapia basada en anticuerpos), debido a que pueden ofrecer información relevante en cuanto a la fisiopatología del cáncer y aportar datos más predictivos para los modelos *in vivo* (98).
- f. **Expresión de bombas detoxificadoras como los transportadores ABC** que permiten la expulsión de colorantes como el Hoechst 33342 y fármacos fuera de la célula constituyendo otro de los mecanismos de resistencia al tratamiento (99).

3.2. MARCADORES PARA LA IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE CMTs

Hasta el día de hoy se han aislado CMTs en varios tipos de tumores como mama, pulmón, colon y cerebro mediante citometría de flujo con marcadores de superficie tales como CD44, CD133, EpCAM o ALDH1 (100,101). No obstante, la expresión de marcadores de superficie que han sido comúnmente utilizados, como CD133 usado para el aislamiento de células madre en tejido sano y tumoral, no es exclusiva ni excluyente (102,103). Por lo tanto, la definición de CMTs basada exclusivamente en marcadores de superficie es insuficiente, por lo que debe ir ligado a marcadores de expresión y ensayos de auto-renovación.

De manera más concreta en CPNM, es interesante conocer la población de CMTs pulmonares para su correcta identificación mediante marcadores específicos, entender su biología y las vías de señalización, para poder diseñar nuevas estrategias terapéuticas que permitan restringir la población de CMTs o bien inducir su diferenciación para sensibilizarlas a los efectos de los fármacos empleados en los diferentes tipos tumorales.

Se ha propuesto un conjunto de marcadores para la caracterización de CMTs de pulmón, que incluye moléculas de superficie celular (CD133, CD90, EpCAM, CD44, ALCAM y BMI1), la enzima ALDH1A1 (Aldehído deshidrogenasa 1, miembro de la familia A1) y la expresión de la proteína ABCG2 (Transportador de casete de unión a ATP, miembro 2 de la superfamilia G) (104–107).

Tabla 5. Marcadores propuestos para la caracterización de CMTs de pulmón.

Descripción	
CD133	Prominin-1, <i>PROM1</i>
CD44	Glicoproteína transmembrana implicada en la adhesión celular
EpCAM	Molécula de adhesión de células epiteliales (CD326)
ALCAM	Molécula de adhesión celular activada de leucocitos (CD166)
CD90	Antígeno de diferenciación de timocitos 1 (THY-1)
BMI1	Proteína del complejo polycomb
ALDH1A1	Aldehído deshidrogenasa 1, miembro de la familia A1
ABCG2	Transportador de casete de unión a ATP, miembro 2 de la superfamilia G

CD133 parece ser un marcador capaz de identificar a estas células de CPNM que presentan características propias de células madre (108,109). En algunos casos, tras el tratamiento con agentes citotóxicos, se ha descrito una población de CMTs CD133+ (110); aunque el valor como biomarcador se cuestiona ya que también se han encontrado casos de poblaciones celulares CD133- con características propias de CMTs.

ALDH es otro marcador relacionado con propiedades típicas de CMTs y que se postula como marcador específico de ADC de pulmón, es un grupo de enzimas dependientes de NAD(P)⁺ que catalizan la oxidación de aldehídos en ácidos carboxílicos. ALDH1A1 es una isoenzima de la superfamilia ALDH que no solo actúa como un marcador tanto para las células madre normales y las CMTs, sino que también puede desempeñar funciones importantes en autoprotección, diferenciación y expansión. Se cree que las enzimas ALDH pueden actuar como enzimas desintoxicantes de fármacos y ser responsables de la resistencia terapéutica (111–113). ALDH1A1 se postula como biomarcador específico de adenocarcinoma de pulmón, donde se ha observado que células con una elevada expresión de este marcador presentan alta tumorigenicidad y capacidad de renovación. En relación a esto, un alto nivel de expresión de ALDH1A1 parece estar relacionado con la activación de la ruta Notch (114). ALDH1A1 se puede evaluar mediante el ensayo ALDEFLUOR, basado en la actividad de la ALDH, donde el sustrato fluorescente activado ALDH se usa como un marcador para medir y aislar las CMTs con alta actividad de esa bomba de expulsión (115).

EpCAM es una glicoproteína transmembrana que participa en el equilibrio entre proliferación y diferenciación celular. En tejido sano, altos niveles de EpCAM se relacionan con proliferación, regeneración tisular y mantenimiento de células madre. En varios tumores de origen epitelial se han encontrado altos niveles de expresión de EpCAM que se corresponden con un peor pronóstico (116). Además, también se ha observado un alto nivel de expresión de EpCAM en células metastásicas y en CMTs, de modo que un alto nivel de expresión de EpCAM se asocia con un peor pronóstico, así como a cánceres más agresivos (117).

CD166, conocido también como ALCAM, es una proteína transmembrana altamente conservada perteneciente a la súper familia de las inmunoglobulinas. Se encuentra expresada en varios tejidos como tejido neuronal, en el epitelio, en el sistema inmunitario, así como en células madre hematopoyéticas. CD166 tiene un papel importante en procesos biológicos como la activación de células T, angiogénesis y hematopoyesis. En cáncer de pulmón se ha observado una asociación entre la expresión de ALCAM en tumores poco agresivos, pequeños y sin afectación linfática, aunque la relación entre la expresión de ALCAM y el pronóstico en este tipo de tumores no es concluyente (118).

Por otro lado, se ha visto que la población de células que excluye el Hoechst 33342, denominada *Side Population* (SP) se encuentra presente en varios tipos tumorales y enriquecida en las poblaciones con propiedades de célula madre, por tanto se considera otro método de identificación y selección de CMTs (99). No obstante, la identificación de células SP mediante la exclusión de Hoechst 33342 presenta algunos inconvenientes como son la citotoxicidad del colorante y la sensibilidad de las

Introducción

condiciones experimentales (concentración del colorante, el tiempo de incubación o la concentración celular) (119,120).

La identificación de biomarcadores supone todo un desafío, debido a la elevada variabilidad en los niveles de expresión de estos entre células del mismo tipo tumoral de distintos pacientes o líneas celulares. Además, existen artículos científicos que reflejan resultados contradictorios para la selección de un único biomarcador para esta población celular. Por ello, los biomarcadores de CMTs pulmonares presentan cierta controversia entre investigadores, probablemente reflejando la heterogeneidad del cáncer de pulmón en cuanto a los términos de origen celular, patología, biología, etiología y patogénesis molecular y genética. Por tanto, se deben seguir aunando esfuerzos para establecer marcadores fiables para las CMTs pulmonares, estudiar las vías de señalización características de esta población que nos ayuden a desarrollar fármacos con el potencial de actuar sobre las CMTs y con el objetivo final de minimizar el riesgo de recurrencia en pacientes con cáncer de pulmón.

3.3. CMTs COMO DIANA TERAPÉUTICA

La capacidad de pluripotencia de las CMTs se ha asociado a una desregulación en algunas vías de señalización, las cuales contribuyen en la habilidad que presentan los tumores de migrar a sitios distantes y metastatizar. Notch, Hedgehog y Wnt constituyen las vías de señalización embrionarias más estudiadas en cuanto a su implicación en la regulación de células madre y desarrollo de órganos (121,122). La activación de estas vías de forma aberrante ha sido reportada tanto en CMTs como en poblaciones de células madre no tumorales y se consideran como posibles dianas terapéuticas para bloquear la capacidad de auto renovación y proliferación de las CMTs y, por tanto, de la progresión del tumor (123).

3.3.1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE WNT/ β -CATENINA

La cascada de señalización de Wnt comprende tres vías: la vía canónica de Wnt, la cual implica la activación del complejo β -catenina – factor de transcripción específico de células T (TCF) – factor de activación linfoide (LEF) y cuyo efecto está mediado por la acumulación citoplasmática de la β -catenina que juega un papel fundamental en la homeostasis fisiológica, actuando como un co-regulador transcripcional y un adaptador proteico para la adhesión intracelular (124); la vía no canónica de la polaridad celular, la cual regula el citoesqueleto; y por último la vía no canónica de Wnt-Ca²⁺ que se encarga de regular los niveles de calcio intracelular. De todas ellas, la vía de señalización canónica de Wnt es la más estudiada y su inhibición ha sido el foco de atención de una investigación intensa en cáncer y otras enfermedades (122) (**Figura 17**).

Algunos inhibidores de la señalización de Wnt se encuentran en desarrollo (**Figura 17**), habiendo alcanzado algunos como LGK-974 (Novartis, Basilea, Suiza) o OMP-54F28 (Cellgene, New Jersey, EE. UU.) los ensayos clínicos de fase I en combinación con otros agentes. XAV-939, IWP2 y PKF118310 se encuentran actualmente en estudios preclínicos (125). Por un lado, XAV-939 se encarga de inhibir la tanquirasa y en última instancia estabiliza la axina y el complejo de destrucción de la β -catenina. Algunos estudios han demostrado que XAV939 reduce significativamente la expresión de marcadores como EpCAM, TERT y DCAMKL-1 en la línea celular SW480, así como EpCAM en la línea celular SW620 de cáncer de colon (126).

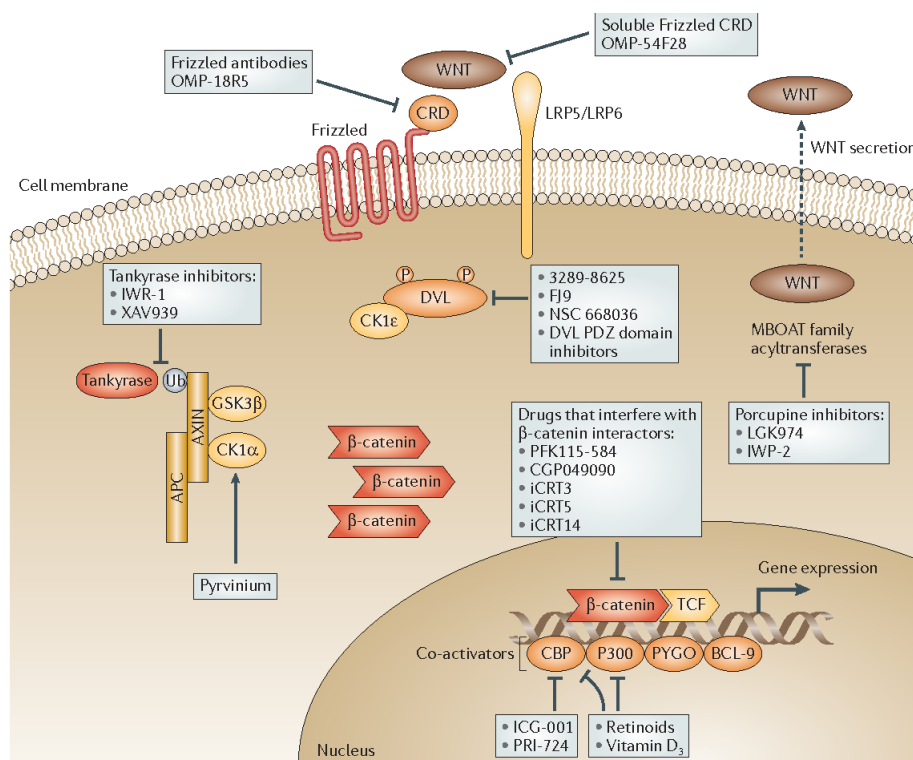


Figura 17. Vía de señalización canónica de Wnt y sus potenciales inhibidores farmacológicos (127).

En 2009, Chen y colaboradores describieron por primera vez un grupo de moléculas pequeñas, inhibidores de la respuesta de Wnt (IWRs) y otro grupo de inhibidores de la producción de Wnt, conocidos como IWPs, uno de los cuales era el IWP2 capaz de inhibir la porcupina, responsable de la maduración postraduccional de las proteínas Wnt. Estos inhibidores podrían ser efectivos evitando la secreción por parte de las células del estroma de moléculas de Wnt activas, bloqueando así la señalización paracrina que conlleva a la formación de nuevas CMTs (128). Por último, el PKF118-310, un inhibidor del factor de transcripción específico de células T tipo 4 (TCF4) ha demostrado gran eficacia en concentraciones reducidas en líneas celulares de cáncer de colon y próstata (129).

Introducción

3.3.2. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE SONIC HEDGEHOG (SHH)

Esta vía es clave en la regulación del desarrollo de los vertebrados. Está implicada en el diseño tisular durante el desarrollo del embrión, la reparación del tejido normal y la transición epitelio-mesenquimal (130,131). La unión de los ligandos de Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH), o Desert Hedgehog (DHH) – atenúa el efecto inhibitorio del receptor transmembrana Patched (PTCH) sobre el receptor Smoothed (SMO), localizado también en la membrana (**Figura 18**). Consecuentemente, la cascada de señalización iniciada por SMO conduce a la activación y localización nuclear de los factores de transcripción GLI1/2 que permiten la expresión de genes involucrados en la proliferación, supervivencia y angiogénesis (132,133).

El agente inhibidor de la vía de HH más avanzado clínicamente es vismodegib (Genentech, California, EEUU), con el cual se ha descrito una reducción sustancial del número de CMTs y de su viabilidad en diferentes neoplasias tumorales (134). Vismodegib es un antagonista competitivo del receptor SMO, siendo aprobado por la FDA en 2012 y la Agencia Reguladora de Medicamentos Europea (EMA) en 2013 para el tratamiento del carcinoma metastásico de células basales o el carcinoma basocelular (BCC) localmente avanzado en pacientes que no son candidatos para la cirugía y la radioterapia (135,136). Por lo que respecta al cáncer de pulmón, un ensayo randomizado fase II que estudiaba el posible beneficio de vismodegib en combinación con cisplatino y etopósido en pacientes con cáncer de pulmón microcítico avanzado, no ha obtenido resultados favorables en supervivencia global o en el tiempo libre de enfermedad (122).

Otro inhibidor de la vía de Hedgehog, antagonista de SMO, es NVP-LDE-225 también conocido como Sonidegib (Novartis, Basel, Suiza); se ha descrito que inhibe el crecimiento de las CMTs de cáncer próstata en ratones nude, debido a la supresión de Gli1, Gli2, PTCH1, PTCH2, Ciclina D1, Bmi-1 entre otros (137). En cáncer de pulmón existe actualmente un ensayo clínico fase I en el cual se evalúa la actividad terapéutica de LDE225 más etopósido (inhibidor topoisomerasa) en combinación con cisplatino en pacientes con cáncer de pulmón microcítico en estadios avanzados (NCT01579929); aunque un estudio randomizado sería necesario para evaluar el efecto de esta combinación terapéutica.

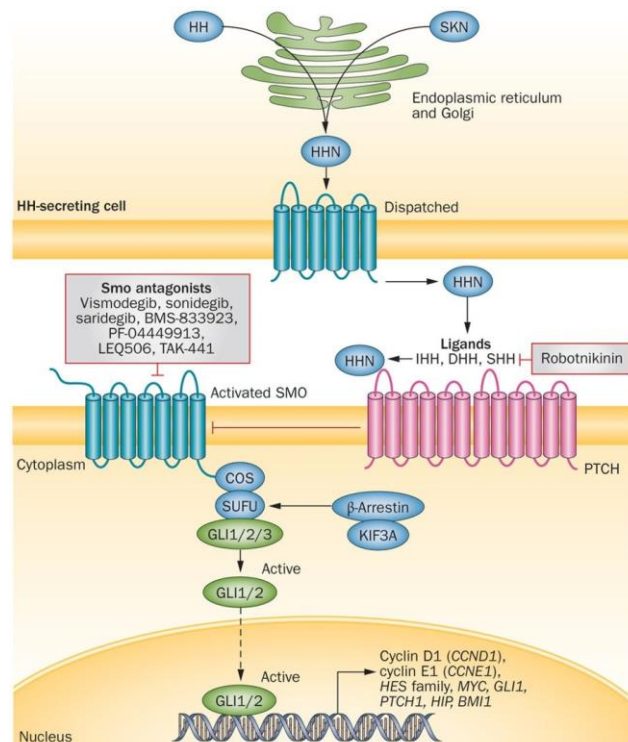


Figura 18. Vía de señalización de Hedgehog y sus potenciales inhibidores farmacológicos (138).

3.3.3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH

La vía de señalización de Notch es un sistema de señalización celular muy conservado y presente en la mayoría de los organismos pluricelulares. Su actividad afecta a la implementación de la diferenciación, proliferación y programas de apoptosis, aportando una herramienta general del desarrollo que influye en la formación de órganos y la morfogénesis (139,140). La interacción entre un ligando transmembrana en una célula y un receptor transmembrana en una célula vecina desencadena la escisión proteolítica en dos pasos del receptor; la primera escisión se produce mediante una enzima metaloproteinasas y desintegrinas (ADAM) y la segunda viene dada por la gamma-secretasa, las cuales liberan un fragmento intracelular que se transloca al núcleo e interacciona con factores nucleares que regulan la expresión de genes diana (122) (Figura 19). La vía comprende cinco ligandos principales de Notch (Delta-ligando 1 (DLL1), DLL3 y DLL4, Jagged 1 y Jagged 2) y cuatro receptores de Notch (Notch 1-4). Además, la señalización cruzada con otras vías como la de Wnt y/o la de Hedgehog puede determinar el efecto global, añadiendo así mayor complejidad (141).

Hoy por hoy, algunos inhibidores de la vía de Notch están siendo clínicamente desarrollados, siendo estos diferentes en sus dianas de actuación, mecanismo de acción y clase de fármaco. La mayor parte de agentes en desarrollo que tienen como diana la vía de Notch son los inhibidores de la gamma-secretasa (GSIs), los cuales inhiben la escisión proteolítica final del receptor de Notch. Los GSIs han

Introducción

demostrado actividad anti-CMTs en tumores *ex vivo* derivados de pacientes y en esferas derivadas de cáncer de mama (142). Por lo que respecta al cáncer de pulmón, se han realizado escasos estudios, el más reciente demostró que la combinación de vismodegib o cetuximab con quimioterapia convencional en pacientes con cáncer de pulmón microcítico no aumentaba la supervivencia global ni el tiempo libre de enfermedad (143).

Debido a la diversidad de receptores, las diferentes clases de GSIs no son equivalentes farmacológicamente ni intercambiables. En la actualidad, hay dos agentes en ensayos clínicos fase I en cáncer de pulmón, RO4929097 (Roche, Basilea, Suiza) y demacizumab (Cellgene, New Jersey, EE. UU.). Sin embargo, la seguridad y/o eficacia de dichos compuestos no está hoy clara. Por ejemplo, RO4929097 induce su propio metabolismo hepático mediante el citocromo P450, familia 3, subfamilia A, polipéptido 4 (CYP3A4), lo que limita su biodisponibilidad (144). Por ello, es todavía demasiado pronto para sacar conclusiones previas a los resultados de los ensayos preclínicos y clínicos que nos aportarán información significativa.

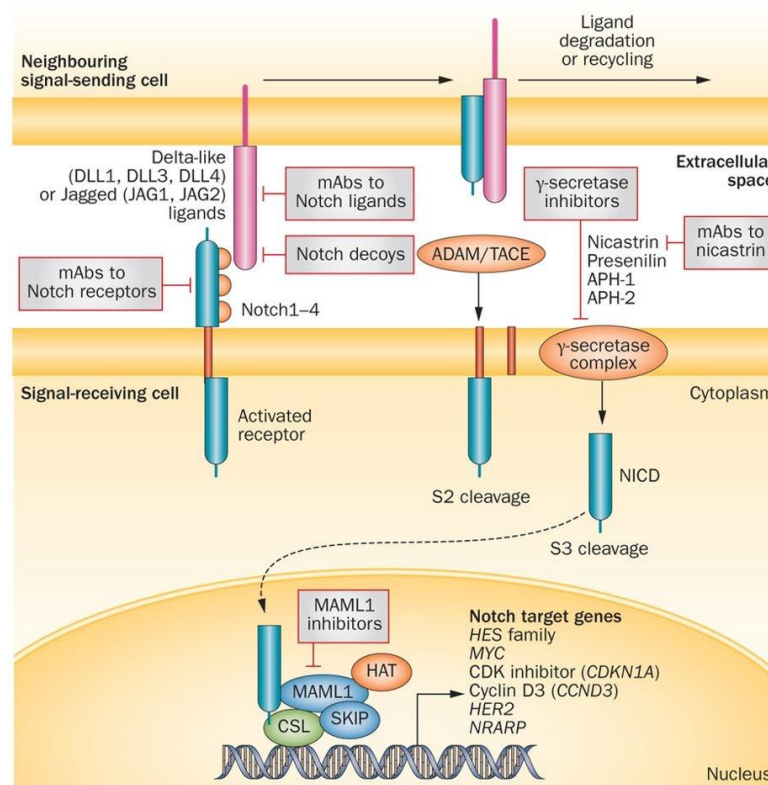


Figura 19. Vía de señalización principal de Notch e inhibidores farmacológicos en desarrollo (138).

En resumen, la identificación, caracterización y comprensión de los mecanismos de las CMTs en las diferentes neoplasias ha revelado la necesidad de desarrollar nuevas terapias moleculares específicas que tengan como diana terapéutica las principales vías de señalización esenciales para la autorenovación de esta subpoblación celular, como las vías anteriormente descritas; sin embargo,

estos fármacos no han resultado ser tan eficaces como se creía. Motivo por el cual nuestro objetivo es desarrollar nuevos fármacos, con nuevas dianas terapéuticas y más eficaces en la inactivación y eliminación de las CMTs de pulmón.

3.3.4. OTRAS APROXIMACIONES EN LA BÚSQUEDA DE NUEVOS FÁRMACOS ANTI-CMTs

A pesar de todos los avances que se han producido en los últimos años, seguimos sin lograr respuestas completas en los pacientes por periodos extensos en el tiempo. Por ello debemos de continuar en esa búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. Para ello, existen librerías con una colección de compuestos químicos habitualmente empleados para cribados farmacológicos masivos. Los estudios realizados con estas librerías se han visto incrementados en los últimos años debido a la necesidad de la búsqueda e identificación de nuevas dianas terapéuticas, así como la comprensión de los mecanismos de acción que tienen un papel fundamental en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Los avances tecnológicos y biológicos han dado lugar a un aumento de los ensayos celulares en el descubrimiento de nuevas moléculas pequeñas biológicamente activas; además, para una correcta aplicación de los nuevos fármacos así como las posibles combinaciones con otros tratamientos, se requiere caracterizar completamente los efectos que producen sobre las dianas y entender sus mecanismos de acción (145). Sin embargo, a pesar de los avances en farmacología, química y biología, el descubrimiento de nuevos fármacos es lento, con un alto costo y pocos resultados aplicables a la clínica; por lo que urge innovar en química biológica, para que esta permita que pequeñas moléculas sean capaces de modular la enfermedad.

Hay dos librerías químicas comercializadas, Myria y Prestwick (Sigma-Aldrich, Misuri, EE. UU.). Prestwick es una colección de 1.280 moléculas pequeñas, que están 100% aprobadas por la FDA, EMA y otras agencias reguladoras de medicamentos, por ejemplo, el Disulfiram, aprobado para el tratamiento del alcoholismo. Además, hay diferentes estudios que han identificado compuestos de esta librería por sus propiedades anti-proliferativas y anti-migratorias para el tratamiento del glioblastoma (146) y compuestos citotóxicos frente a potenciales células madre tumorales de glioblastoma tanto en estado proliferativo como en quiescencia (147), así como la identificación de candidatos prometedores para el tratamiento de cáncer de pulmón y carcinoma pancreático que incluyen antiparasitarios, glucósidos cardíacos, así como los medicamentos anticancerígenos vorinostat y topotecan (148).

La librería química Myria está constituida por 10.000 compuestos pequeños de elevada pureza que maximizan la diversidad química sin alterar las propiedades farmacológicas, que no están aprobados por las agencias reguladoras. Myria fue creada mediante la combinación de expertos en medicina

Introducción

química y décadas de experiencia en la adquisición de compuestos de diversas fuentes con especial atención personal para eliminar aquellos que estuvieran sobrerrepresentados o no fueran adecuados para el uso y seguimiento en la medicina.

3.3.4.1. DISULFIRAM (DSF)

El DSF es un derivado del tiuram, se usó inicialmente como un catalizador industrial para la producción de caucho en el siglo XIX. En 1937, el médico estadounidense E.E. Williams observó que los trabajadores de plantas químicas expuestos regularmente a DSF experimentaban síntomas como rubor, dolor de cabeza, dolor abdominal, sudoración, palpitaciones y dificultad respiratoria, y que los síntomas eran más evidentes después del consumo de alcohol (149). Más tarde, los investigadores encontraron que DSF ejerció este efecto probablemente a través de la inhibición de la actividad de la enzima ALDH, lo que lleva a una acumulación de acetaldehídos, que causan estos síntomas desagradables inmediatamente después del consumo de alcohol. En 1948, una serie de ensayos clínicos confirmaron las propiedades antialcohólicas de DSF (150,151), y la FDA aprobó su aplicación como una opción terapéutica para el alcoholismo, al considerarlo un medicamento seguro y bien tolerado, con la dosis diaria promedio recomendada de 125 a 500 mg o 600 a 800 mg dos veces por semana durante un año (149).

La evidencia acumulada ha demostrado la eficacia de DSF como una terapia para la dependencia de la cocaína (152,153), la reducción de incidencia de infecciones oportunistas en pacientes con infección sintomática por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (154) y contra la leishmaniasis en un sistema modelo *ex vivo* (155). Adicionalmente, en los últimos años la evidencia de la actividad anticancerígena de DSF se ha confirmado en varias líneas celulares cancerosas y modelos animales (156–159).

En resumen, la identificación, caracterización y comprensión de los mecanismos de resistencia a tratamientos convencionales de las CMTs en las diferentes neoplasias, y la elevada mortalidad del cáncer de pulmón; han despertado la necesidad por encontrar nuevos fármacos más eficaces solos o en combinación, para el tratamiento del CPNM que tengan como diana terapéutica las CMTs. En consecuencia, el propósito de este estudio es identificar la capacidad de algunos compuestos de las librerías químicas antes mencionadas, para inhibir las CMTs de cáncer de pulmón, comparando los resultados con algunos fármacos utilizados actualmente en la práctica clínica para el manejo de pacientes con CPNM. Dichos descubrimientos podrían conducir a un progreso en la terapia, la intervención y la mejora del pronóstico de los pacientes con cáncer de pulmón y, tal vez en un futuro próximo, la evaluación de las CMTs podría ser una rutina en el diagnóstico de esta enfermedad.

Para ello, se pretende aislar tumoresferas con características de CMTs de pulmón y utilizarlas como plataformas *in vitro* para realizar estudios de cribado farmacológico de alto rendimiento con los compuestos de las librerías químicas Prestwick y Myria, identificar los compuestos químicos con mayor toxicidad sobre las tumoresferas y seleccionar aquellos fármacos con mayor capacidad de inhibición de las tumoresferas con características de CMTs pulmonares y trasladarlos a ensayos *in vivo*, y así poder confirmar su eficacia en los modelos animales inducidos con CMTs derivadas de líneas celulares comerciales de cáncer de pulmón y derivadas de tumores resecados de pacientes con CPNM. Finalmente, este cribado debe utilizarse como punto de partida para continuar los futuros estudios funcionales que demuestren y confirmen los mecanismos de acción de los compuestos seleccionados.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La adquisición de resistencia a la quimioterapia convencional limita en gran medida el manejo terapéutico del cáncer, ya que en muchos casos no se consigue eliminar definitivamente el tumor y un porcentaje elevado de pacientes acaba desarrollando recidivas y progresión de enfermedad. El conocimiento de que las células madre tumorales (CMTs) son en parte responsables de esta resistencia adquirida a los tratamientos convencionales, nos lleva a la necesidad de buscar fármacos dirigidos contra esta subpoblación. Siendo el objetivo principal de la presente tesis doctoral, identificar nuevas estrategias terapéuticas mediante el empleo de plataformas de cribado farmacológico masivo con una aproximación de modelos *in vitro* 3D (tumoresferas), para la eliminación de la población de células madre tumorales en cáncer de pulmón no microcítico.

Los objetivos específicos de este estudio son:

1. Establecer cultivos de células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas, a partir de tumores resecados de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico en estadio temprano, sin tratamiento previo. Así como establecer tumoresferas a partir de líneas celulares de CPNM.
2. Evaluar la viabilidad de las tumoresferas de pulmón en los diferentes cultivos establecidos, mediante plataformas de cribado farmacológico masivo:
 - Agentes quimioterápicos empleados en la práctica clínica.
 - Librería química Prestwick (1.280 fármacos aprobados por las agencias reguladoras).
 - Librería química Myria (10.000 compuestos no aprobados por las agencias reguladoras).
3. Seleccionar los compuestos identificados con mayor potencial efecto citotóxico frente a las tumoresferas de CPNM, determinando su concentración mínima inhibitoria (IC₅₀).
4. Identificar los posibles mecanismos de acción de los fármacos seleccionados frente a las tumoresferas de cáncer de pulmón no microcítico.
5. Validar en modelo *in vivo* el efecto antitumoral de los fármacos seleccionados en los ensayos *in vitro*.
6. Integración de los resultados obtenidos *in vitro e in vivo* para la selección de los fármacos más eficaces en la eliminación de las tumoresferas de CPNM.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES

Para la realización de los experimentos en el presente estudio, se emplearon cultivos de líneas celulares comerciales y cultivos celulares primarios que se describen a continuación:

1.1. LÍNEAS CELULARES

Se incluyeron 12 líneas celulares de cáncer de pulmón (H23, H358, H460, H1395, H1650, H1975, H1993, H2228, A549, PC9, SW900 y HCC827) que se obtuvieron de *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, EE. UU.), con excepción de la línea celular PC9, que fue obtenida en Sigma; reflejando la diversidad del CPNM, comprendiendo las diferentes histologías, así como las alteraciones moleculares más frecuentes en esta patología. La Tabla 6 muestra las características generales de las líneas celulares utilizadas en este estudio.

Tabla 6. Características de las líneas celulares utilizadas en este estudio.

LÍNEA CELULAR	TEJIDO	HISTOLOGÍA	MUTACIONES
A549	Pulmón	SCC	KRAS (G12S)
PC9	Pulmón	ADC	EGFR (deleción exón 19)
NCI-H23	Pulmón	ADC	KRAS (G12C)
NCI-H1650	Pulmón derivadas de MT	ADC bronquioalveolar	EGFR (deleción exón 19)
NCI-H1975	Pulmón	ADC	EGFR (L858R+, T790M)
NCI-H1993	Pulmón, derivadas de MT	ADC	Amplificación de c-MET
NCI-H1395	Pulmón	ADC	BRAF (G469A)
SW900	Pulmón	SCC	KRAS (G12V)
H2228	Pulmón	ADC	ALK
NCI-H358	Pulmón	Carcinoma bronquioalveolar	KRAS (G12C)
NCI-H460	Pulmón, derrame pleural	Carcinoma de células grandes	KRAS
HCC827	Pulmón	ADC	EGFR (deleción exón 19)

MT: Metástasis; ADC: Adenocarcinoma; SCC: Carcinoma de células escamosas

Materiales y Métodos

1.1.1. ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS EN MONOCAPA Y EN FORMACIÓN DE TUMORESFERAS DE LAS LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Gibco, Paisley, Reino Unido), complementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS, Gibco), 2% de penicilina/estreptomicina (P/S, Gibco) y 0,001% de aminoácidos no esenciales (Gibco), a 37°C y una atmósfera de CO₂ al 5%.

Para la formación de tumoresferas es necesario alcanzar el 70-80% de confluencia de los cultivos en monocapa, las células se disociaron enzimáticamente en una suspensión de células individuales utilizando 1% de tripsina-EDTA 1x (Gibco). Las células se sembraron a la densidad deseada en flasks de baja adherencia de 75 cm² (Corning, Lowell, MA, EE. UU.) en condiciones de medio libre de suero, complementado con 50 µg/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF, Gibco), 20 µg/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, Gibco), insulina transferrina-selenio (ITS, BD Biosciences), 0,4% de albúmina de suero bovino (BSA, Gibco) y 2% de B27 (Gibco). Una vez establecidas las tumoresferas, se expandieron por disociación enzimática utilizando 1% de tripsina-EDTA 1x, seguido de la reposición de células individuales y pequeños agregados residuales en medio fresco completo, se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y el medio se reemplazó tres veces por semana.

1.2. CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS

En este estudio, se obtuvieron células derivadas de tumores resecados de 7 pacientes (FIS299, FIS302, FIS303, FIS315, FIS317, FIS320 y FIS343) del Servicio de Cirugía torácica del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (HGUV). Los pacientes cumplieron con los criterios de elegibilidad [Diagnóstico histológico de CPNM, en estadios tempranos (I – IIIA) según el sistema de estadificación del AJCC y sin tratamiento previo] y fueron informados e invitados a participar en el estudio, firmando el consentimiento (**Anexo 2**). Las características demográficas y clínico-patológicas más relevantes de la cohorte de pacientes se muestran en la **Tabla 7**. El estado mutacional de los cultivos primarios se analizó mediante diferentes técnicas: *EGFR* (PCR), *RAS* (Piro secuenciación), *ALK* / *ROS1* / PD-L1 (Inmunohistoquímica).

Tabla 7. Características de los cultivos celulares primarios utilizados en este estudio.

Paciente FIS	Edad	SEXO	HISTOLOGÍA	MUTACIONES
299	73	HOMBRE	SCC BIEN DIFERENCIADO QUERATINIZANTE	EGFR WT, RAS WT, ALK-, PD-L1 > 70%
302	73	MUJER	CARCINOMA POCO DIFERENCIADO	EGFR WT, KRAS (G12D), ALK-, ROS1-, PD-L1: 95%
303	57	HOMBRE	ADC POCO DIFERENCIADO DE TIPO ACINAR	EGFR WT, RAS WT, ALK-, ROS1-, PD-L1-
315	65	MUJER	ADC DE TIPO ACINAR	EGFR WT, RAS WT, ALK-, ROS1-
317	76	HOMBRE	SCC MODERADAMENTE DIFERENCIACIÓN	EGFR WT, RAS WT, ALK-, ROS1-
320	65	HOMBRE	ADC MODERADAMENTE DIFERENCIADO	EGFR WT, RAS WT, ALK-, ROS 1-, PD-L1-
343	56	MUJER	ADC MUCOSECRETOR	EGFR WT, RAS WT, ALK-, ROS1-, PD-L1 2%

ADC: Adenocarcinoma; SCC: Carcinoma de células escamosas; WT: No mutado.

1.2.1. ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS EN MONOCAPA Y EN FORMACION DE TUMORESFERAS

Para el establecimiento de los cultivos celulares primarios se obtuvo tejido tumoral fresco de 7 pacientes con CPNM que se sometieron a lobectomía pulmonar o neumonectomía, la pieza se lavó tres veces con tampón fosfato salino (PBS, Gibco) que contenía P/S antes de la disociación mecánica y digestión enzimática. Brevemente, cada muestra de tumor se cortó en trozos pequeños (1mm³) utilizando bisturí y se incubó en 7 ml de DMEM/F12 (Gibco) con 0,001% de ADNasa (Sigma-Aldrich), 1 mg/ml de colágeno (Gibco), 1 mg/ml de dispasa (Gibco), 200 U/ml de penicilina y 200 µg/ml de estreptomina (2% de antibióticos) a 37°C durante 3 horas en un baño con agitación mecánica. Luego, el disgregado resultante se pasó secuencialmente a través de filtros de células de 70 µm y 40 µm (BD Falcon, San Jose, EE. UU.) y se centrifugó en un tubo de 15 ml a 1.000 g durante 5 minutos para obtener el sedimento celular. Posteriormente, la viabilidad celular se evaluó con azul de tripano (Gibco).

La mitad de las células vivas se transfirieron a flasks de 75 cm² y se cultivaron en DMEM/F12 suplementado con 10% de FBS, 2% de P/S y 1% de L-glutamina (Gibco). Una vez que se establecieron los cultivos primarios en monocapa, se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% cambiando el medio tres veces por semana.

Para la formación de tumoresferas, la mitad restante de células vivas se cultivó en medio libre de suero DMEM/F12 complementado con 50 µg/mL de EGF, 20 µg/mL de bFGF, ITS, 0,4% de BSA y 2% de B27. Las células se colocaron en placas de baja adherencia de 6 pocillos (Corning) a una densidad de 5.000 células/ml durante 7 a 10 días. Una vez establecidas los tumoresferas, se expandieron por

Materiales y Métodos

disociación enzimática utilizando 1% de tripsina-EDTA 1x, seguido de la reposición de células individuales y pequeños agregados residuales en medio fresco completo, se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y el medio se reemplazó tres veces por semana.

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS TUMORESFERAS

Para la caracterización de las tumoresferas se evaluaron las propiedades típicas de CMTs, además de un exhaustivo y amplio análisis de expresión de marcadores de CMTs (*CD133*, *EPCAM1*, *ALDH1A1*, *CD166*, *ABCG2*, *CD44*, *MUC1*, *BMI1*), genes de pluripotencia (*KLF4*, *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *MYC*, *CCND1*), genes reguladores del ciclo celular (*CDKN1A*, *CDKN2A*, *MDM2*, *WEE1*), genes asociados a metástasis (*CDH1*, *VIM*, *SNAI1*, *MMP2*, *MMP9*, *CEACAM5*) y genes de las vías de señalización Notch (*NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *DLL1*, *DLL4*, *HEY1*, *HES1*), Wnt (*WNT1*, *WNT2*, *WNT3*, *WNT5A*, *CTNBB1*, *DKK1*, *FZD7*) y Hedgehog (*SMO*, *PTCH1*, *SHH*, *GLI1*) mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), Western blot e inmunofluorescencia. Estos análisis fueron realizados en células sembradas en monocapa y en formación de tumoresferas para comparar y poder establecer el perfil genético de células madre de los diferentes cultivos celulares de CPNM; trabajo que ha formado parte de una tesis doctoral previa.

3. OPTIMIZACIÓN DE LOS ANÁLISIS DE TOXICIDAD CELULAR

3.1. CURVAS DE CRECIMIENTO Y ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

Para evaluar las características de crecimiento de los diferentes cultivos, se realizaron curvas de crecimiento con el objetivo de estimar el tiempo de duplicación celular en relación con la fase exponencial de los diferentes cultivos, y mediante ensayos de viabilidad con MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] (Promega, Wisconsin, EE. UU.) poder establecer la cantidad de células suficientes para obtener absorbancias óptimas para el desarrollo del cribado farmacológico. El MTS es un ensayo de colorimetría para determinar la actividad metabólica celular dependiente de la enzima NAD(P)H. Dicha enzima es capaz de reducir el MTS a su forma insoluble, el formazano, que presenta un color marrónáceo. La conversión de MTS a formazano refleja la actividad enzimática en las células viables, por lo que la intensidad es proporcional al número de células vivas (**Figura 20**).



Figura 20. *Ensayo de MTS, de mayor a menor viabilidad celular, de izquierda a derecha de la imagen en función de la intensidad colorimétrica.*

Para los ensayos, las células se recogieron y disgregaron con tripsina-EDTA 1x, fueron contadas en una cámara de Neubauer (instrumento utilizado para realizar el recuento celular en medio líquido) utilizando una dilución 1:1 de la suspensión de células en medio de cultivo con azul de tripano (Gibco) y se sembraron en placas de 96 pocillos (Corning) a diferentes densidades, en 200 μ l de medio RPMI-1640 para las líneas celulares y DMEM/F12 para los cultivos primarios; realizando determinaciones de viabilidad celular mediante ensayos con MTS a las 24, 48 y 72 horas en cultivo para establecer el doblaje de los cultivos y la cantidad de células suficientes para obtener absorbancias óptimas para el desarrollo del cribado farmacológico.

Para determinar el tiempo de lectura de las placas luego de haber añadido el MTS, se realizaron diferentes lecturas (de 1 a 4 horas de incubación a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% como lo indica el protocolo) hasta lograr el punto de saturación, resultando ser a las tres horas; determinando así el tiempo óptimo de incubación del MTS para todos los ensayos de viabilidad celular realizados en este estudio. La absorbancia espectrofotométrica de cada pocillo se analizó a una longitud de onda de 490 nm y a una velocidad de 0,01 segundos (seg) por pocillo en el espectrofotómetro Victor 3 (Perkin Elmer, Massachusetts, EE. UU), siendo que el espectro de absorbancia del producto de formazano resultante de la reducción del compuesto de tetrazolio (MTS) muestra un máximo de absorbancia a 490 nm.

De esta manera se realizaron las curvas de crecimiento que por un lado reflejan el tiempo de duplicación de cada cultivo celular conforme aumenta el nivel de absorbancia espectrofotométrica a las 24, 48 y 72 horas de crecimiento, y por otro lado la densidad celular con absorbancia óptima para el desarrollo de los ensayos de toxicidad celular. Una vez establecidos correctamente estos criterios, se procedió a la búsqueda de nuevos agentes anti-tumoresferas de pulmón con propiedades de CMTs mediante el cribado farmacológico.

3.2. CRIBADO FARMACOLÓGICO

Para la realización del cribado farmacológico *in vitro* se utilizaron las células de los cultivos establecidos previamente (líneas celulares y cultivos primarios) que fueron crecidas tanto en monocapa o adherentes (ADH) como en condición de tumoresferas (ESF). Se sembraron en placas de 96 pocillos (Corning) para células en monocapa y en placas de baja adherencia para las tumoresferas (Corning) a las densidades anteriormente establecidas, en un volumen de 200 µl/pocillo del medio de cultivo correspondiente. A las 24 horas de cultivo, se añadieron los agentes quimioterápicos utilizados en la práctica clínica y los compuestos de las librerías químicas Prestwick y Myria (Sigma-Aldrich) a diferentes concentraciones, desde 0,01 µM a 50 µM.

La viabilidad celular se evaluó a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento, y en vista de lo observado en los ensayos con MTS se estableció las 48 horas como el tiempo de exposición a los compuestos; todos los ensayos fueron realizados por triplicado y confirmados en tres experimentos independientes. Se analizó la absorbancia espectrofotométrica transcurridas las 3 horas de incubación con MTS a 490 nm en el espectrofotómetro Victor 3; para ello, las absorbancias fueron normalizadas respecto a su control tratado en falso con DMSO (**Ecuación 1**).

$$\text{(Absorbancia - Blanco} * 100) / (\text{Tratado en falso} - \text{Blanco})$$

Ecuación 1. Cálculo de viabilidad celular. Blanco: Medio de cultivo, Tratado en falso: DMSO.

Inicialmente se realizó un cribado con algunos de los agentes quimioterápicos utilizados en la práctica clínica en el tratamiento del cáncer (doxorrubicina, pemetrexed y vinorelbina) para evaluar la resistencia de las tumoresferas a estos fármacos. Luego, se realizó un cribado masivo con los 1.280 compuestos de la librería química Prestwick y con los 10.000 compuestos de la librería química Myria en la línea celular H1650 a dosis de 1 µM, seleccionando inicialmente los compuestos positivos con toxicidad >50%, para finalmente seleccionar los posibles agentes con mayor potencial citotóxico frente a las tumoresferas con propiedades de CMTs de pulmón, validando en las diferentes líneas celulares y cultivos primarios a diferentes concentraciones y en el modelo *in vivo*.

4. CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN FARMACOLÓGICA

Del cribado farmacológico masivo de las librerías químicas Prestwick y Myria, los fármacos que resultaron seleccionados con mayor potencial citotóxico frente a las tumoresferas de pulmón fueron

sometidos a diferentes ensayos para evaluar los posibles mecanismos de acción implicados en la inhibición de las tumoresferas con propiedades de células madre.

4.1. ENSAYOS DE APOPTOSIS

Se procedió a realizar ensayos de apoptosis celular mediante anexina A5 (Annexin V-FITC, BD Biosciences, Ref.: ANXVF-200) y yoduro de propidio (Sigma, Ref.: P4170). La anexina A5 (o anexina V) es una proteína celular del grupo de las anexinas, que en citometría de flujo se suele utilizar para detectar células apoptóticas, debido a su capacidad para unirse a la fosfatidilserina, un marcador de apoptosis cuando se encuentra en la hemimembrana celular externa; mientras que el yoduro de propidio se usa como una tinción de ADN en la citometría de flujo para evaluar la viabilidad celular.

Los ensayos de apoptosis con anexina se realizaron en línea celular H1650 (línea modelo seleccionada del cribado farmacológico) y el paciente FIS343 (control negativo seleccionado del cribado farmacológico). Para ello, células en monocapa fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 75.000/pocillo, y células en formación de tumoresferas se sembraron en placas de 24 pocillos de baja adherencia a una misma densidad. Después de 24 horas de cultivo, tanto ADH como ESF fueron tratadas con los fármacos seleccionados a una concentración de 10 μ M, y posterior a 24 horas de tratamiento, se recogieron ambas condiciones con sus respectivos medios y se obtuvieron células individuales mediante disgregación enzimática con Tripsina-EDTA 1X. Se tiñeron con anexina utilizando un kit de detección de apoptosis de acuerdo con la recomendación del fabricante; las células se resuspendieron en 200 μ L de tampón de unión 1X (10 mM HEPES, 140 mM NaCl y 2,5 mM CaCl_2 , pH 7,4) y se añadieron 2 μ L de anexina V y 2 μ L de yoduro de propidio a cada tubo de polipropileno con las suspensiones celulares y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y se analizaron en el citómetro de flujo tan pronto como fue posible siguiendo el protocolo correspondiente.

Como posible mecanismo de inducción de apoptosis de los fármacos seleccionados se analizó la vía de señalización de ROS (especies reactivas de oxígeno) p38 MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno).

4.2. ANÁLISIS DE ROS INTRACELULAR

Estos análisis se realizaron en línea celular H1650 y el paciente FIS343. Las ROS son radicales, iones o moléculas que tienen un solo electrón no apareado en su capa más externa de electrones. Las ROS se pueden clasificar en dos grupos: radicales libres de oxígeno y ROS no radicales. Los radicales libres de oxígeno incluyen superóxido, radical hidroxilo, óxido nítrico, radicales orgánicos, radicales peroxilo, radicales alcoxilo, radicales tiilo, radicales sulfonilo, radicales tiilo peroxilo y disulfuros. Las ROS no

Materiales y Métodos

radicales incluyen peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete, ozono/trioxígeno, hiperóxidos orgánicos, hipocloruro, peroxinitrito, anión nitrosoperoxicarbonato, anión nitrocarbonato, dióxido de dinitrógeno, nitronio y compuestos carbonílicos derivados de lípidos o carbohidratos altamente reactivos. Entre ellos, el superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilos son los ROS más estudiados en cáncer.

Las ROS juegan un papel importante en la muerte celular y la señalización, inducen la apoptosis intrínseca al desencadenar daños en el ADN. Por el contrario, el daño en el ADN induce la producción de ROS. El daño en el ADN y/o la producción de ROS pueden desencadenar la apoptosis. Por este motivo, se decide analizar los niveles de ROS intracelular por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo; partiendo de la hipótesis de una posible generación de ROS intracelular desencadenada por los fármacos seleccionados como posible vía de inducción de apoptosis en las tumoresferas con propiedades de CTMs de pulmón.

Se utilizó un reactivo fluorescente de color rojo (MitoSOX™, Invitrogen, EE. UU., Ref.: M36008). Los ensayos basados en MitoSOX™ se usan ampliamente para detectar selectivamente ROS intracelular e intra-mitocondrial, especialmente superóxido. Para ello, se disolvió el contenido (50 µg) de un vial de MitoSOX™ en 13 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener una solución madre de reactivo a 5 mM, posteriormente esta solución madre se diluyó en PBS para obtener una solución de trabajo a 5 µM.

4.2.1. ANÁLISIS POR MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA

Los niveles de ROS mitocondrial se evaluaron por microscopía de fluorescencia en la línea celular H1650 y en el cultivo primario FIS343. Para ello, células en monocapa fueron sembradas en placas de 24 pocillos con cubreobjetos a una densidad de 75.000/pocillo, y células en formación de tumoresferas se sembraron en placas de 24 pocillos de baja adherencia a una misma densidad. Después de 24 horas de cultivo, tanto ADH como ESF fueron tratadas con los fármacos seleccionados a una concentración de 10 µM, y posterior a 24 horas de tratamiento, los cubreobjetos que contenían las células en monocapa se levantaron de las placas y fueron colocados en portaobjetos; mientras que las ESF se recogieron y centrifugaron en un cytospin para depositarlas en una pequeña zona determinada de los portaobjetos. Posteriormente, ADH y ESF se fijaron con paraformaldehído (PFA) en tampón fosfato salino (PBS, Gibco) por 10 minutos, se lavaron con PBS, fueron incubadas con FBS al 1% en PBS para bloquear y posteriormente incubar el MitoSOX™ a una dilución de 1:200 en solución de bloqueo durante la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente se lavaron con PBS y en la oscuridad se incubó Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) a una dilución de 1:200, para posteriormente

teñir los núcleos con DAPI a una dilución de 1:1000 a temperatura ambiente durante 3 minutos, se lavaron con PBS y se procedió al montaje para ser vistos en el microscopio de fluorescencia a 40x.

4.2.2. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para confirmar los resultados obtenidos en microscopía de fluorescencia se evaluaron los niveles de ROS mitocondrial por citometría de flujo en la línea celular H1650 y en el cultivo primario FIS343. Para ello, células en monocapa fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 75.000/pocillo, y células en formación de tumoresferas se sembraron en placas de 24 pocillos de baja adherencia a una misma densidad. Después de 24 horas de cultivo, tanto ADH como ESF fueron tratadas con los fármacos seleccionados a una concentración de 10 μM , y posterior a 24 horas de tratamiento, se levantaron mediante disgregación enzimática con Tripsina-EDTA 1X y las suspensiones celulares obtenidas se depositaron en tubos de polipropileno de 12x75 mm. Posteriormente se añadieron 100 μL de solución de trabajo de reactivo de MitoSOX $5 \mu\text{M}$ en cada tubo, se incubaron las células durante 10 minutos a 37°C protegidas de la luz y se analizaron un total de 10.000 células por condición en el citómetro de flujo tan pronto como fue posible siguiendo el protocolo correspondiente (**Figura 21**).

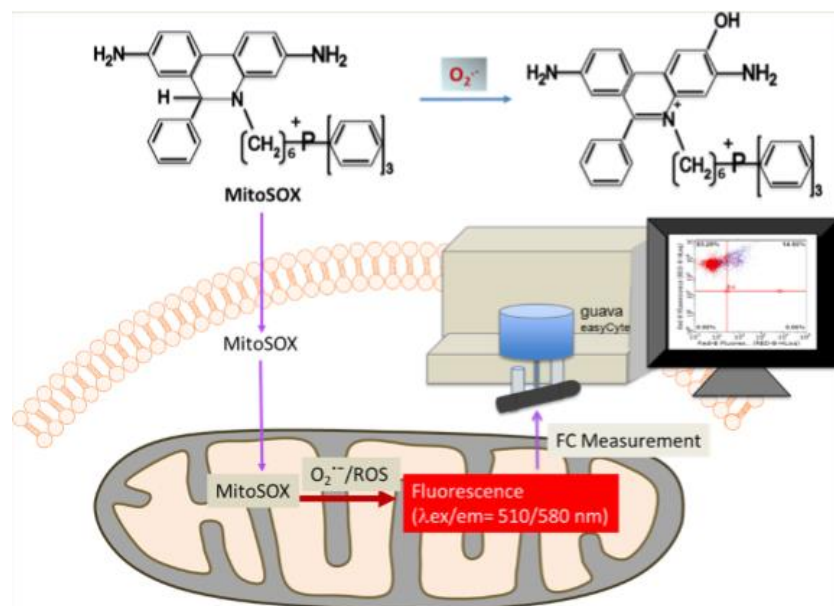


Figura 21. Ilustración esquemática de la citometría de flujo basada en MitoSOX para detectar ROS/superóxido mitocondrial. La carga positiva de MitoSOX es responsable de su acumulación intra-mitocondrial (160).

Para continuar con la evaluación de la vía de señalización ROS p38-MAPK se procedió al análisis de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 mediante el análisis de Anti-p38 por microscopía de fluorescencia.

4.3. ANÁLISIS DE ANTI-p38

Estudios recientes han demostrado que la activación de p38 da como resultado apoptosis de células tumorales iniciada por retinoides, cisplatino y otros agentes quimioterápicos. La observación de que las terapias divergentes actúan a través de una vía de transducción de señales común plantea la posibilidad de desarrollar nuevos agentes anticancerosos que carezcan de los efectos secundarios causados por eventos posteriores a la activación de p38-MAPK. Aquí, mediante estos ensayos analizamos la apoptosis de células tumorales de pulmón mediada por la posible activación de p38-MAPK y sus posibles implicaciones para la terapéutica del cáncer.

4.3.1. ANÁLISIS POR MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA

Los ensayos para la determinación de Anti-p38 (abcam, Cambridge, Reino Unido, Ref.: ab170099) se realizaron en la línea celular H1650. Para ello, células en monocapa fueron sembradas en placas de 24 pocillos con cubreobjetos a una densidad de 75.000/pocillo, y células en formación de tumoresferas se sembraron en placas de 24 pocillos de baja adherencia a una misma densidad. Después de 24 horas cultivo, tanto ADH como ESF fueron tratadas con los fármacos seleccionados a una concentración de 10 μ M, y posterior a 24 horas de tratamiento, los cubreobjetos que contenían las células en monocapa se levantaron de las placas y fueron colocados en portaobjetos; mientras que las ESF se recogieron y centrifugaron en un cytospin para depositarlas en una pequeña zona determinada de los portaobjetos. Posteriormente, ADH y ESF se fijaron con PFA en PBS por 10 minutos, se lavaron con PBS, fueron incubadas con FBS al 1% en PBS para bloquear y posteriormente incubar el anticuerpo primario (Anti-p38) a una dilución de 1:200 en solución de bloqueo durante la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente se lavaron con PBS y en la oscuridad se incubó el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 555) a una dilución de 1:200, para posteriormente teñir los núcleos con el DAPI a una dilución de 1:1.000 a temperatura ambiente durante 3 minutos, se lavaron con PBS y se procedió al montaje para ser vistos en el microscopio de fluorescencia a 40x.

Además del estudio de la vía de señalización ROS p38-MPK se realizaron análisis de expresión génica relativa de posibles genes implicados en vías relacionadas con la activación o inhibición de las células madre tumorales.

4.4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

4.4.1. AISLAMIENTO DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ARN)

Los análisis de expresión génica se realizaron en la línea celular H1650. Para ello, células en monocapa fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 300.000/pocillo, y células en formación de tumoresferas se sembraron en placas de 6 pocillos de baja adherencia a una misma densidad. Después de 24 horas cultivo, tanto ADH como ESF fueron tratadas con los fármacos seleccionados a una concentración de 10 μ M, y posterior a 12 y 24 horas de tratamiento, se levantaron y el ARN se aisló a partir de las suspensiones celulares obtenidas. Se utilizó el protocolo de extracción siguiendo las instrucciones del fabricante del RNA Isolation Kit: RNeasy Mini Kit (QIAGEN, EE. UU., Cat No./ID: 74106). Una vez preparada la alícuota de la cantidad de tampón RLT (tampón de lisis celular) necesario en un tubo de 15 ml (10 μ l de B-Mercaptoethanol por cada 1 ml de Buffer RLT), se agregó el volumen apropiado de tampón RLT (350 μ l) a cada muestra, pasando el lisado celular al menos 5 veces a través de una aguja roma de calibre 20 (0,9 mm de diámetro) instalada en una jeringa sin RNasa para homogeneizar, añadiendo además 350 μ l de etanol al 70% y mezclando por pipeteo, sin centrifugar. Se transfirieron los 700 μ l de la muestra a una columna colocada en un tubo de 2 ml y se centrifugó durante 15 seg. Posteriormente se hicieron diferentes lavados con Buffers RW1 y RPE, se centrifugó la columna a toda velocidad durante 1 minuto para precipitar el ARN y finalmente se agregaron 30 μ l de agua libre de RNasa directamente a la membrana de la columna y se centrifugó durante 1 minuto para eluir el ARN obtenido.

Se utilizó un nanoespectrofotómetro (Nano Drop 2000C, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) para realizar la cuantificación de la concentración de ARN. La calidad óptima del ARN se consideró con valores de absorbancia de 1.8 a 2.0 para el ratio A260/280, y de 2.0 a 2.2 para el ratio A260/230.

4.4.2. TRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT)

Las muestras de ARN se procesaron utilizando el Kit[®] de transcripción inversa de alta capacidad (Applied Biosystems, EE. UU., Código del producto: 10400745), y las reacciones tuvieron lugar en un termociclador Master Cycler[®] (Eppendorf, Alemania). Cada reacción contenía 2 μ l de RT Buffer, 0,8 μ l de dNTPs, 2 μ l de Random RT Primers, 1 μ l de RNase inhibitor, 1 μ l de MultiScribe Reverse Transcriptase[®], volúmenes de muestra variables para obtener una concentración final de ARN de 500 ng y agua libre de RNasa (Qiagen, Alemania) hasta un volumen final de 20 μ l. El ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) resultante se diluyó en agua libre de RNasa hasta una concentración final de 250 ng/ μ l y se almacenó a -20°C hasta análisis adicionales. Brevemente, el

Materiales y Métodos

programa de ciclos consistió en una pre-incubación (10 minutos a 25°C) para activar la enzima, la retrotranscripción del ARN a ADNc (2 horas a 37°C) y un paso final para desnaturalizar la enzima (5 minutos a 85°C).

4.4.3. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RTqPCR)

Para analizar la expresión de los genes diana, el ADNc obtenido previamente se analizó mediante RTqPCR utilizando sondas de hidrólisis (TaqMan®, Applied Biosystems, EE. UU.), diseñadas para unirse a las regiones inter-exón de los genes y, por lo tanto, evitar la amplificación del ADN genómico (161).

Cada reacción se realizó en una placa de 384 pocillos con un volumen final de 5 µl que incluye 2,5 µl de la Master Mix (Applied Biosystems), 1,25 µl de agua libre de ARNasa, 0,25 µl de la sonda de expresión génica (Applied Biosystems) y 1 µl de muestra de ADNc. La Master Mix contenía ADN polimerasa, dNTP y una enzima uracilo N-glicosilasa que evita la re-amplificación de los posibles amplicones de los contaminantes. Las reacciones tuvieron lugar en un termociclador a tiempo real (LightCycler 480, Roche, Suiza). Con respecto a las condiciones de ciclado, se requiere una fase de pre-PCR para asegurar una actividad óptima de la enzima UNG (2 minutos a 50°C) y la activación de la enzima AmpliTaq Gold (10 minutos a 95°C), seguida de 45 ciclos de desnaturalización-fusión-extensión (15 Segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C en cada ciclo). Cada ejecución incluyó *no-template controls* (NTC), agua para confirmar la ausencia de contaminación, así como un ADNc de referencia humana (Clontech, EE. UU.) que se usó como control positivo y normalizador de la placa.

En este estudio, se analizaron 5 genes diana (**Tabla 8**), seleccionados por su potencial para caracterizar las tumoresferas. Para calcular la expresión génica relativa, se utilizó la fórmula de Pfaffl (162). El factor de normalización utilizado contenía tres genes endógenos, *ACTB*, *CDKN1B* y *GUSB* (**Tabla 8**), seleccionados en la evaluación utilizando el software geNorm® (Bioinformatics tools omicX, Francia) que calcula la estabilidad de genes de diferentes genes de control, lo que permite la selección de los mejores controles internos (163,164).

Tabla 8. Genes diana y genes endógenos seleccionados en este estudio.

Gen	Código	Longitud amplicón (Pb)
ACTB	Hs99999903_m1	171
CDKN1B	Hs00153277_m1	71
GUSB	Hs01558067_m1	71
ALDH1A1	Hs00946916_m1	118
COX2 (PTGS2)	Hs00153133_m1	75
MMP-9	Hs00234579_m1	54
SNAIL1	Hs00195591_m1	66
SOX2	Hs01053049_S1	91

Pb: Pares de bases.

4.4.4. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA

La eficacia de cada sonda TaqMan® se evaluó utilizando el ADNc de referencia humano comercial (Clontech, EE. UU.) mediante la realización de diluciones en serie (50 ng/μL, 5 ng/μL, 0,05 ng/μL, 0,005 ng/μL y 0,0005 ng/μL). La eficiencia (E) de un ciclo en la fase exponencial se calculó utilizando la **Ecuación 2**.

$$E = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

Ecuación 2. Cálculo de la eficiencia de los genes a analizar en este estudio. E: Eficiencia.

Después de los ciclos de amplificación, la señal fluorescente supera la fluorescencia de fondo estableciendo el ciclo de cuantificación (Cq), que permite la determinación de la cantidad relativa de cada muestra (161). Todas las muestras se analizaron por duplicado y se utilizó el valor de Cq medio para un análisis adicional. Ciertas muestras tenían niveles de expresión génica por debajo del límite de detección, por lo que su expresión genética relativa se calculó de acuerdo con el límite de detección de cada gen.

Los niveles de expresión génica relativa se determinaron utilizando la fórmula de Pfaffl, en función de la relación entre la expresión del gen diana y la expresión del gen de referencia (**Ecuación 3**). La cuantificación relativa se calcula a partir de las eficiencias de RTqPCR y la desviación del punto de cruce de una muestra desconocida frente a un control (162). La media geométrica de la expresión de los tres genes endógenos mencionados anteriormente se consideró como la expresión del gen de referencia, que permitió la corrección de las desviaciones de la muestra (164).

Materiales y Métodos

$$\text{Ratio} = \frac{E_{\text{target}} \Delta C_p \text{ target (Control-Sample)}}{E_{\text{ref}} \Delta C_p \text{ ref (Control-Sample)}}$$

Ecuación 3. Fórmula Pfaffl para el cálculo de la expresión génica relativa. Target: gen diana; Ref: gen endógeno; E: eficiencia del gen; Cp: punto de cruce; ΔCp: Diferencia de expresión entre muestra no tratada (CNT) y tratada con fármaco.

La expresión génica relativa se evaluó teniendo en cuenta los valores medianos de cada variable y se consideró que había una expresión diferencial entre las células tratadas y las células no tratadas si el valor de la proporción era mayor a 2, lo que indicaba que el gen diana estaba sobreexpresado en las células tratadas, o si el valor de la relación era menor a 0,5, que el gen diana no estaba expresado lo suficiente.

5. MODELO *IN VIVO*

Para evaluar y validar la actividad antitumoral *in vivo* de los fármacos seleccionados en el modelo *in vitro*, se realizó un ensayo piloto utilizando un modelo tumoral subcutáneo. Para ello, se indujeron tumoresferas de la línea celular H1650 y del paciente FIS343, se recogieron en viales con una suspensión libre de suero [5x 10⁵/100 μL de PBS + 100 μL de Matrigel (Corning)] y después se inyectaron por vía subcutánea en flanco izquierdo de 8 ratones atímicos hembras NOD/SCID de 5 a 6 semanas de edad (Animal models Charles River, EE. UU.); 4 ratones inyectados con esferas H1650 (ratones 1-4) y 4 ratones inyectados con esferas FIS343 (ratones 5-8). Cuando el volumen tumoral (VT) promedio alcanzó 100 mm³, los ratones se dividieron aleatoriamente en 4 grupos. Los animales fueron tratados por vía intraperitoneal con DMSO (CNT), DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (100 mg/kg/fármaco) tres veces por semana hasta alcanzar uno de los criterios de punto final (1.500 mm³ de VT, fallecimiento, 8 semanas de tratamiento o ulceración tumoral) (**Figura 22**). Los ratones se pesaron una vez por semana y el tamaño del tumor se midió tres veces por semana con un calibrador pie de rey digital usando la **Ecuación 4**.

$$[\text{VT} = \text{largo} \times \text{ancho}^2/2]$$

Ecuación 4. Cálculo del Volumen Tumoral (VT) en el modelo animal.

Los ratones con criterio de punto final fueron sometidos a eutanasia mediante CO₂. Se procedió a la extirpación del tumor y a la autopsia y recogida de órganos para análisis posteriores que involucran ensayos de expresión génica, estudios histológicos e inmunohistoquímicos. Este estudio se realizó en estricto cumplimiento de las recomendaciones de la Guía para las buenas prácticas para el cuidado y

uso de animales de laboratorio del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de España. El protocolo del proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universitat de València con Código de referencia (CEEA): A1481538210293 (**Anexo 3**).

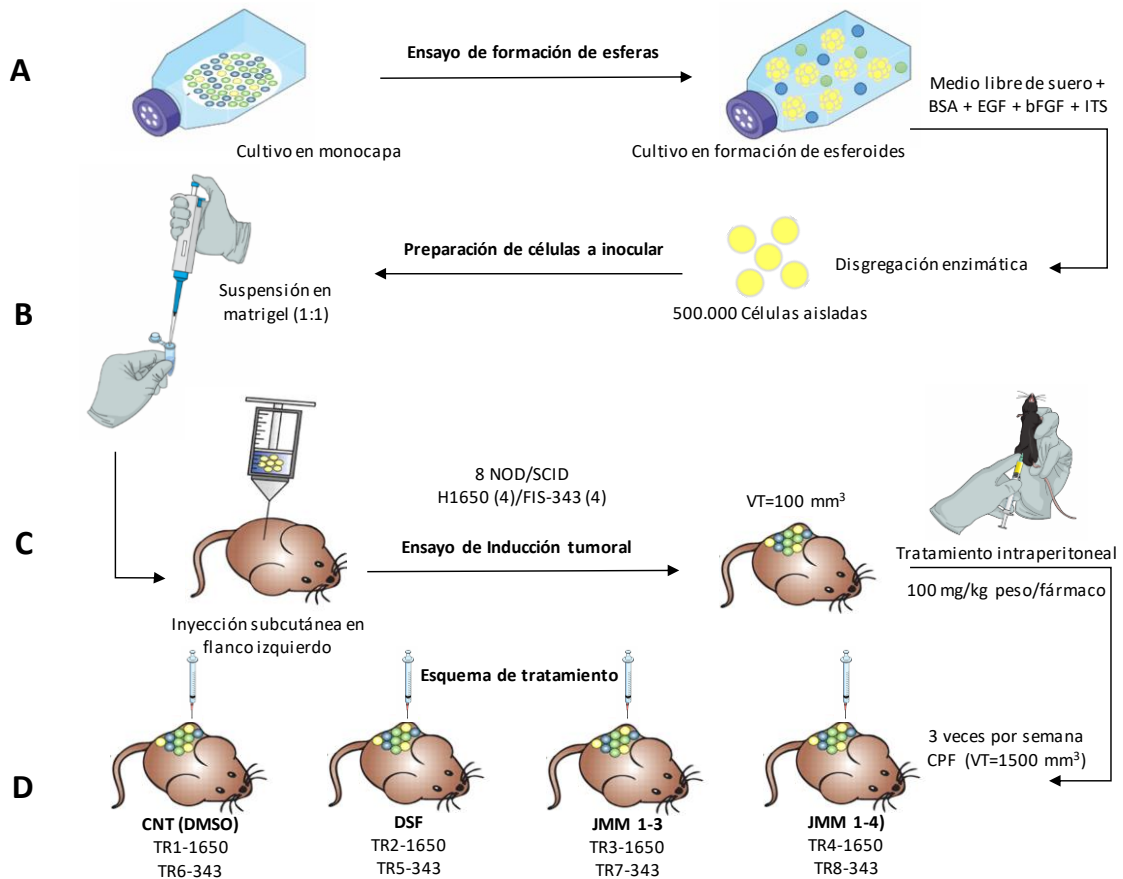


Figura 22. Esquema del modelo in vivo tumoral subcutáneo desarrollado. A) Ensayo de formación de esferas, B) Preparación de suspensión a inocular, C) Ensayo de inducción tumoral, D) Ensayo de tratamiento. CPF: Criterio de punto final; VT: Volumen tumoral.

6. CULTIVOS EX VIVO

Una vez extirpados los tumores de los ratones sacrificados, se procedió a su recogida en un tubo de 50 ml con PBS + 2% de P/S realizando un fraccionamiento en tres trozos: uno para cultivo *ex vivo* y dos para su conservación en nitrógeno líquido y a -80°C en RNA later para posteriores análisis.

Los cultivos *ex vivo* se procesan del mismo modo que los cultivos primarios de pacientes con CPNM. El trozo de tumor para los cultivos *ex vivo* se lavó tres veces con PBS+ 2% de P/S, se disgregó mecánicamente con 2 bisturís hasta obtener fragmentos de 1 mm, posteriormente se realizó

Materiales y Métodos

disgregación enzimática donde los fragmentos fueron introducidos en un tubo de 15 ml con medio de disgregación (DMEM/F-12, colagenasa IV 1mg/ml, dispasa 1mg/ml, DNase, P/S y D-valina 5 μ M) en un baño a 37°C con oscilación durante 3 horas (pipeteando los fragmentos cada 30 minutos). El disgregado se pasó por un tamiz (cell strainer) de 70 μ m y luego por uno de 40 μ m, los restos de tejido que quedaron en los tamices se recogieron con medio y se sembraron en placas de 6 pocillos recubiertas con colágeno, se pegaron y dieron lugar a explantes del tumor; y el eluido que quedó se pasó a un tubo de 15 ml para poder centrifugar a 1.000g durante 5 minutos y ver el sedimento celular más claramente. Se eliminó el sobrenadante y las células se sembraron en monocapa y en formación de tumoresferas en placas y medios correspondientes ya descritos anteriormente para evaluar su crecimiento, capacidad de formación de esferas, amplificar y congelar para posteriores análisis.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para el análisis de los ensayos de viabilidad celular del cribado farmacológico *in vitro*, se calculó la IC₅₀ que se corresponde con la concentración de un compuesto necesaria para reducir el crecimiento celular en un 50%. El cálculo se llevó a cabo con la media porcentual de viabilidad celular obtenida en los tres experimentos independientes por concentración de fármaco analizado, utilizando el programa Graphpad Prism v6.0 (Graphpad Software Inc.), realizando una regresión no-lineal y una curva de dosis-respuesta sigmoide representada gráficamente.

Los análisis estadísticos para los ensayos de viabilidad celular y de expresión génica se llevaron a cabo con el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 15.0 (Chicago, IL, EE. UU.). Se usó la Prueba T, esta prueba determina si dos sets de muestras independientes (adherentes vs. esferas) son significativamente distintas las unas de las otras en respuesta a las distintas concentraciones de fármaco. Un p-valor < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUMORESFERAS

El descubrimiento de agentes antineoplásicos se realiza mayoritariamente al examinar el efecto citotóxico *in vitro* de las células tumorales de proliferación rápida en un estado adherente de 2 dimensiones (2D). Sin embargo, después de conocer que una de las propiedades de las CMTs es la capacidad de formar esferas en medio libre de suero, enriquecido con factores de crecimiento y en placas de cultivo de baja adherencia (165,166); las tumoresferas se convierten en un elemento fundamental en la selección de fármacos. Como se describió anteriormente, la resistencia a la quimioterapia y terapias dirigidas utilizadas en la práctica clínica es otra de las principales características de las CMTs y un mecanismo de recaída tumoral. Por lo tanto, La identificación de agentes con actividad anti-CMTs ha sido considerada como la clave para una terapia exitosa contra el cáncer (167,168).

Por tal motivo, la técnica de formación de esferas *in vitro* es un método bien descrito para el aislamiento, la identificación y el enriquecimiento de CMTs que se emplean para el desarrollo de plataformas de cribado farmacológico. A continuación, se describen los resultados obtenidos de los ensayos de formación de tumoresferas a partir de líneas celulares y cultivos primarios derivados de tumores resecados de pacientes con CPNM.

1.1. TUMORESFERAS DE LÍNEAS CELULARES

Para el ensayo de formación de esferas se emplearon 12 líneas celulares derivadas de CPNM (H1650, A549, H23, H1993, PC9, SW900, H358, H460, H1395, H1975, H2228 y HCC827), comprendiendo las diferentes histologías, así como las alteraciones moleculares más frecuentes en esta patología (*EGFR*, *KRAS*, *ALK*). Las líneas celulares se sembraron en monocapa, así como en condiciones de baja adherencia (tumoresferas); lo que permitió observar la capacidad de una subpoblación celular para formar tumoresferas cuando las células sembradas a densidad clonal crecen en suspensión.

Como se observa en las imágenes de la **Figura 23**, tanto los cultivos en monocapa como en formación de tumoresferas presentan una morfología muy diversa. Las líneas celulares H1650, H2228, H1993, H1975, H358, SW900 y HCC827 forman estructuras esféricas tridimensionales bien definidas, compactas y con un borde bien delimitado; mientras que las líneas celulares A549, H23, H1395, H460 y PC9 forman agregados celulares no esferoidales. Las tumoresferas son un modelo de cultivo en tercera dimensión (3D) que aprovecha la tendencia natural a agregarse que muestran muchos tipos celulares, para crear masas multicelulares de forma esferoidal; mientras que los agregados celulares

Resultados y Discusión

no esferoidales son estructuras en suspensión menos definidas. Esto ha sido descrito en otros tipos de tumores, como es el caso del cáncer de mama en el cual se detallaron hasta cuatro subgrupos de estructuras celulares y fueron caracterizados por su expresión génica (169). En nuestro estudio, es de destacar, que la morfología de las tumoresferas establecidas no parece tener ninguna relación con la histología ni el perfil mutacional de las líneas celulares utilizadas en los ensayos.

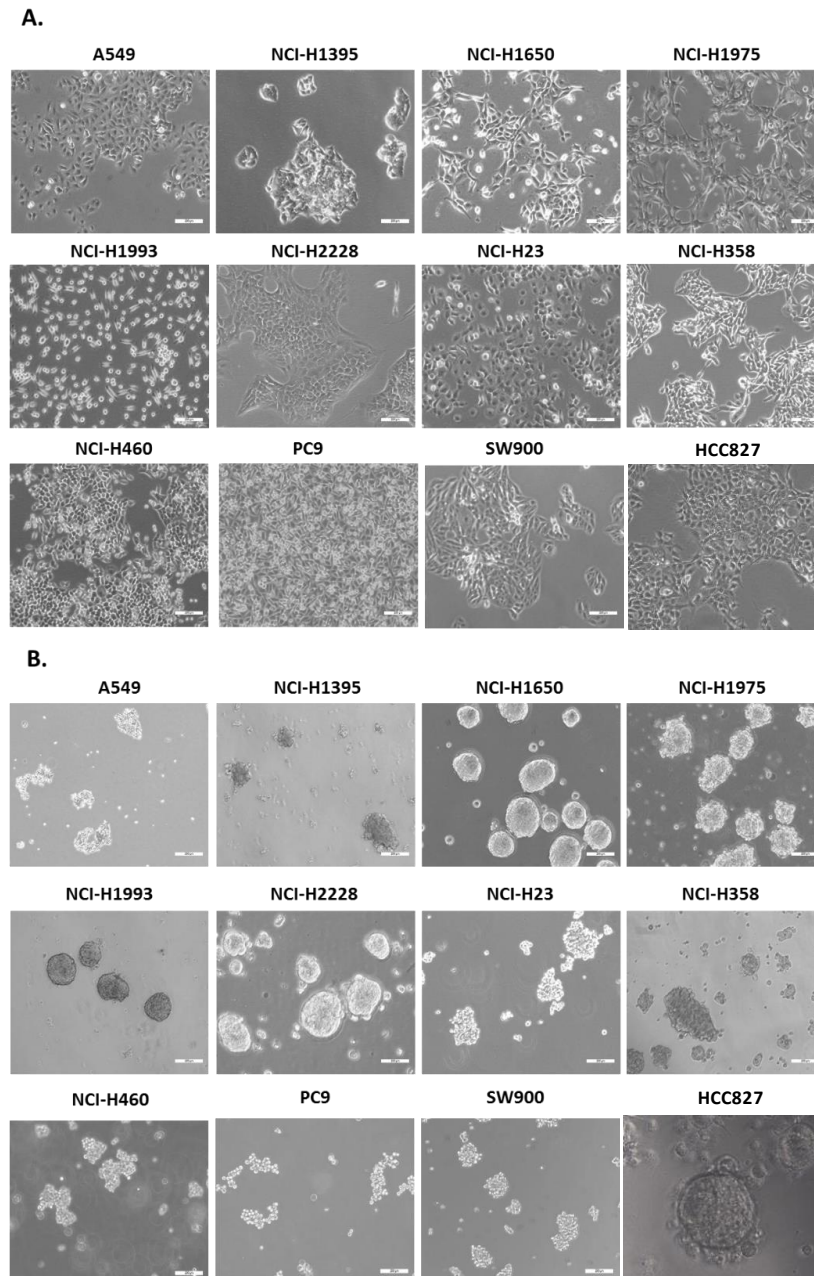


Figura 23. Diferentes líneas celulares comerciales de CPNM. A) Células crecidas en monocapa; B) Células crecidas en formación de tumoresferas.

El aislamiento de CMTs a través del cultivo de tumoresferas no requiere un conocimiento previo sobre marcadores de superficie celular. Este método fue descrito por primera vez por Singh et al. en

tumores cerebrales (170), originalmente utilizado para aislar células madre neurales (171). En 2005, Ponti et al. aplicó el método de cultivo de la mamoesfera en la propagación *in vitro* de células madre para aislar las CMTs mamarias de especímenes de cáncer de mama primario y estableció líneas celulares de cáncer de mama humano. Hasta la fecha, las tumoresferas se cultivan con éxito a partir de variedades de cánceres como colon, pulmón, páncreas, próstata, melanoma, ovario y tiroides (166,172–179).

1.2. TUMORESFERAS DE CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS

Del total de muestras de tumores resecados en pacientes con CPNM del Servicio de Cirugía torácica del Consorcio HGUV que han sido procesadas en nuestro laboratorio, se han establecido 8 cultivos celulares primarios, de los cuales 7 han sido los empleados en este estudio (FIS299, FIS302, FIS303, FIS315, FIS317, FIS320 y FIS343), lo que significa una tasa de éxito de aproximadamente un 40%. Aunado a la dificultad para obtener muestras primarias de CPNM, una explicación al impedimento de obtener un mayor porcentaje de establecimiento y mantenimiento de cultivos celulares primarios sería que después de un cierto número de divisiones las células entran en el proceso de senescencia y dejan de dividirse; además, después de alcanzar la confluencia, las células cuyo crecimiento es sensible a la inhibición por contacto dejarán de dividirse, mientras que cualquier célula que haya sufrido transformación (insensibles a la limitación por densidad) tenderá a proliferar más. Mantener la densidad celular baja (por ejemplo, mediante subcultivos frecuentes) ayuda a preservar el fenotipo normal. Por este motivo, nuestros cultivos se amplifican al alcanzar aproximadamente el 70-80% de confluencia celular.

La **Figura 24** muestra como los diferentes cultivos primarios de CPNM en monocapa y en formación de tumoresferas presentan una morfología muy diversa. Los cultivos primarios FIS299, FIS315 y FIS343 forman estructuras esféricas tridimensionales bien definidas, compactas y con un borde bien delimitado; mientras que FIS302, FIS303, FIS317 y FIS320 forman agregados celulares no esferoidales. Morfología que no parece tener ninguna relación con la histología ni el perfil mutacional de los cultivos primarios utilizados.

Estos resultados demuestran que podemos aislar células con capacidad para formar tumoresferas con fenotipo de CMTs, creciendo las líneas celulares y los cultivos primarios en condiciones de baja adherencia y en un medio de cultivo restrictivo, tal y como se ha descrito previamente en varios cultivos celulares como cáncer colorrectal y próstata (165,180,181).

Resultados y Discusión

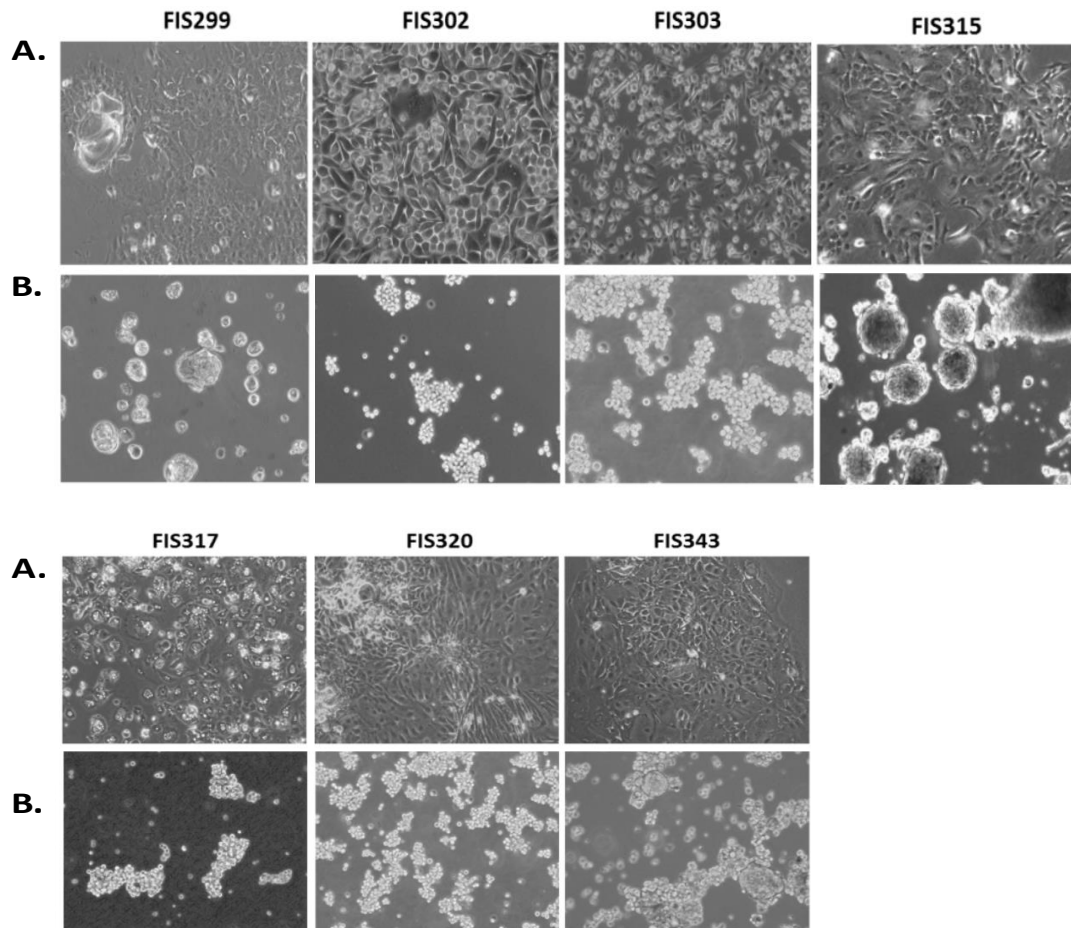


Figura 24. Diferentes cultivos celulares primarios de CPNM. A) Células crecidas en monocapa; B) Células crecidas en formación de tumoresferas.

2. CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE LAS TUMORESFERAS CON FENOTIPO de CMTs

Tal y como se esperaba según la teoría de las CMTs, en este estudio sólo una subpoblación de células tumorales tuvo la capacidad de crecer en estas condiciones, por lo que el ensayo *in vitro* de formación de esferas ha permitido la identificación, aislamiento y enriquecimiento de una subpoblación celular con propiedades características de CMTs (115,182). Por otro lado, en nuestro laboratorio se ha descrito previamente que las tumoresferas de las líneas celulares y los cultivos primarios utilizados en este estudio, presentaron propiedades de autorrenovación, potenciales de crecimiento exponencial ilimitados, resistencia contra agentes quimioterapéuticos, capacidades de invasión y diferenciación *in vitro*, y un potencial tumorigénico superior *in vivo*. Se seleccionaron, además: *NANOG*, *NOTCH3*, *CD44*, *CDKN1A*, *SNAI1* e *ITGA6*, para diferenciar las tumoresferas de las células en monocapa (183). Es así como se demuestra que nuestras tumoresferas de CPNM presentan

propiedades de CMTs. Postulándose como potenciales plataformas de cribado farmacológico *in vitro/in vivo*.

3. CURVAS DE CRECIMIENTO Y OPTIMIZACIÓN DE DENSIDADES CELULARES

Para conocer las características de crecimiento de los diferentes cultivos celulares empleados en el cribado farmacológico, se procedió a analizar y optimizar la cinética de crecimiento, evaluando el tiempo estimado de duplicación celular de los cultivos sembrados en monocapa en función de la absorbancia espectrofotométrica, realizando lecturas a las 24, 48 y 72 horas en el espectrofotómetro Victor 3. Por ejemplo, en la **Figura 25** se puede ver que en función del análisis de absorbancia espectrofotométrica a 490 nm (0.1 seg), la mayoría de los cultivos primarios sembrados en monocapa se duplican a las 24 horas; motivo por el cual se estableció que las células fueran tratadas a las 24 horas de cultivo, y la lectura de los ensayos de viabilidad celular con MTS se procediera a las 48 horas de tratamiento. Cabe resaltar que el crecimiento de los cultivos primarios es diferente al crecimiento de los cultivos de las líneas celulares, menos estrecho, lo que hace que las curvas no sean las esperadas.

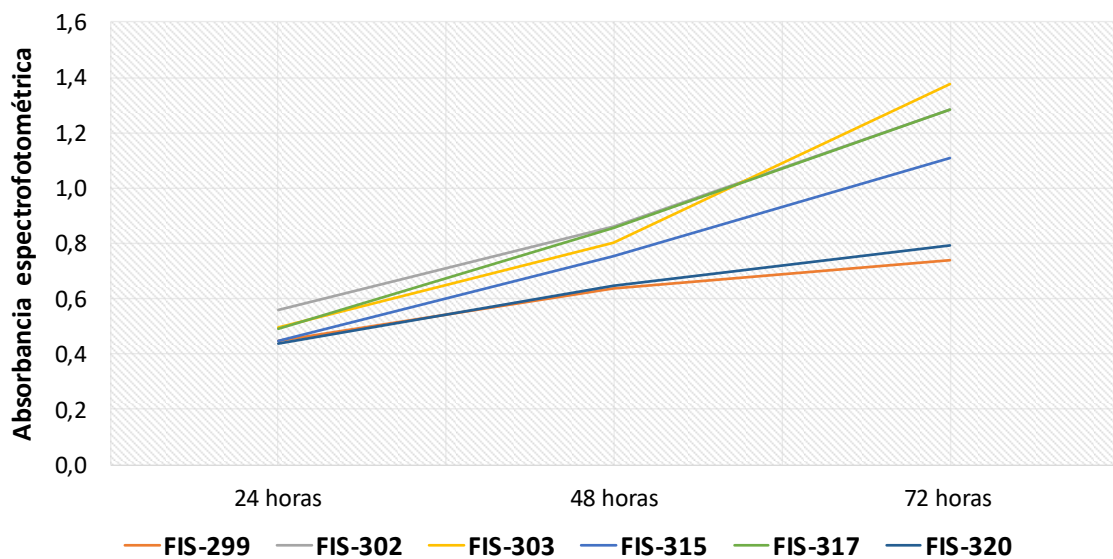


Figura 25. Curvas de crecimiento de los cultivos primarios (FIS299, FIS302, FIS303, FIS315, FIS317 y FIS320) sembrados en monocapa. Evaluación del tiempo estimado de duplicación celular en base a la absorbancia espectrofotométrica (490 nm) con lecturas a las 24, 48 y 72 horas; partiendo de una densidad celular basal de 1000 células por condición.

Para la optimización de la cantidad celular a utilizar por cada cultivo en monocapa, se realizaron varios experimentos partiendo de diferentes densidades iniciales hasta obtener valores de absorbancia espectrofotométrica en rango óptimo (1,5 - 2,0) (**Figura 26**). Por otro lado, con las tumoresferas se partió del doble de células utilizadas en monocapa hasta obtener rango óptimo de

Resultados y Discusión

absorbancia espectrofotométrica; así finalmente se pudo seleccionar la cantidad de células a utilizar por cada línea celular (**Tabla 9**) y cultivo primario (**Tabla 10**) en ADH/ESF para llevar a cabo el cribado farmacológico en óptimas condiciones.

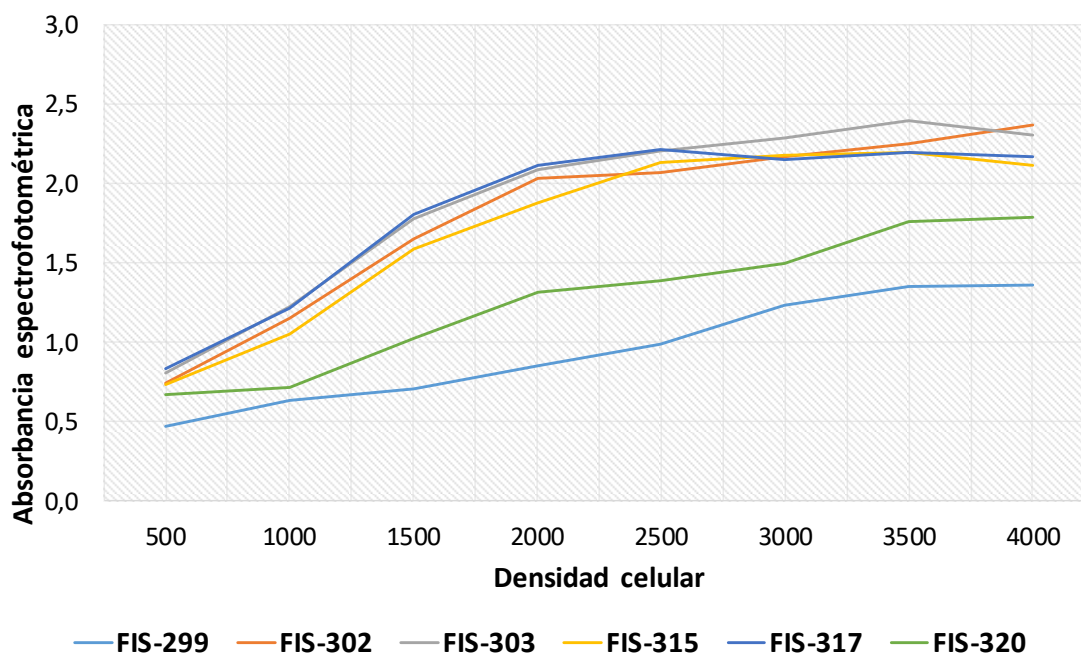


Figura 26. Optimización de la densidad celular de los cultivos primarios (FIS299, FIS302, FIS303, FIS315, FIS317 y FIS320) sembrados en monocapa. Evaluación de la absorbancia espectrofotométrica a 490 nm (0.1 seg) deseada por cada densidad celular con lectura a las 72 horas.

Tabla 9. Densidades celulares seleccionadas por cada línea comercial para el cribado farmacológico.

N° Cél/pocillo*	Adherentes	Esferas
A549	1200	2000
H-23	1500	3000
H-358	8000	10000
H460	1000	2500
H-1395	8000	10000
H-1650	5000	7000
H-1975	3000	6000
H-1993	5000	7000
H-2228	2000	4000
PC9	1500	3000
SW900	5000	7000

(*) La cantidad de células sembradas está ajustada para un pocillo de placa de 96 pocillos en 200 μ L de RPMI.

Tabla 10. Densidad celular seleccionada por cultivo primario para cribado farmacológico.

N° Cél/pocillo*	Adherentes	Esferas
FIS299	4000	10000
FIS302	2500	3000
FIS303	2500	3000
FIS315	2500	5000
FIS317	2500	5000
FIS320	2500	5000
FIS343	4000	8000

(*) La cantidad de células sembradas está ajustada para un pocillo de placa de 96 pocillos en 200 μ L de DMEM.

Las curvas definen las características de crecimiento de cada cultivo y nos permiten conocer la densidad celular óptima para evaluar la toxicidad de los compuestos a analizar mediante el cribado farmacológico. Las condiciones óptimas son aquellas en las que los cultivos se encuentran en fase exponencial de crecimiento, a la vez que al final del ensayo, exista un número suficiente de células como para poder ver las diferencias en viabilidad entre células tratadas y no tratadas (184). Esta optimización de condiciones es un requisito primordial para asegurar la reproducibilidad de los resultados, y sobre todo para trasladar este tipo de análisis a gran escala y desarrollar la automatización para poder establecer cultivos celulares en 3D estandarizados y normalizados. Por lo que una vez optimizadas las cantidades de células tanto en monocapa como en tumoresferas se procedió a realizar el cribado farmacológico masivo.

4. CRIBADO FARMACOLÓGICO

En primer lugar, se procedió a testar fármacos empleados habitualmente en la práctica clínica en cáncer y más específicamente en cáncer de pulmón, para evaluar la posible resistencia de las tumoresferas de pulmón frente a la quimioterapia convencional, ya que es una de las características que definen a las CMTs.

4.1. CRIBADO CON AGENTES QUIMIOTERÁPICOS CONVENCIONALES

En el grupo de quimioterápicos convencionales se incluyeron agentes antimetabolitos y compuestos que interfieren en la replicación del ADN, tales como doxorubicina, cisplatino, docetaxel, paclitaxel, pemetrexed y vinorelbina; que se usan como terapia estándar en cáncer y en particular cisplatino, docetaxel, paclitaxel, pemetrexed y vinorelbina en cáncer de pulmón (185–187). Se analizó la actividad de estos fármacos en diferentes líneas celulares y cultivos primarios, tanto en monocapa como en formación de tumoresferas, comparando su capacidad citotóxica.

Resultados y Discusión

En la **Figura 27** se encuentra representada la viabilidad celular obtenida en las células crecidas en monocapa frente a las células crecidas en formación de esferas, posterior a 48 horas de tratamiento con cisplatino, paclitaxel y docetaxel a 10 μM en las líneas celulares H1650, HCC827, H2228, PC9 y en los cultivos primarios FIS302 y FIS343; donde se observa que las tumoresferas de la mayoría de los cultivos empleados resultaron resistentes a los tres fármacos de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$) frente a las células en monocapa.

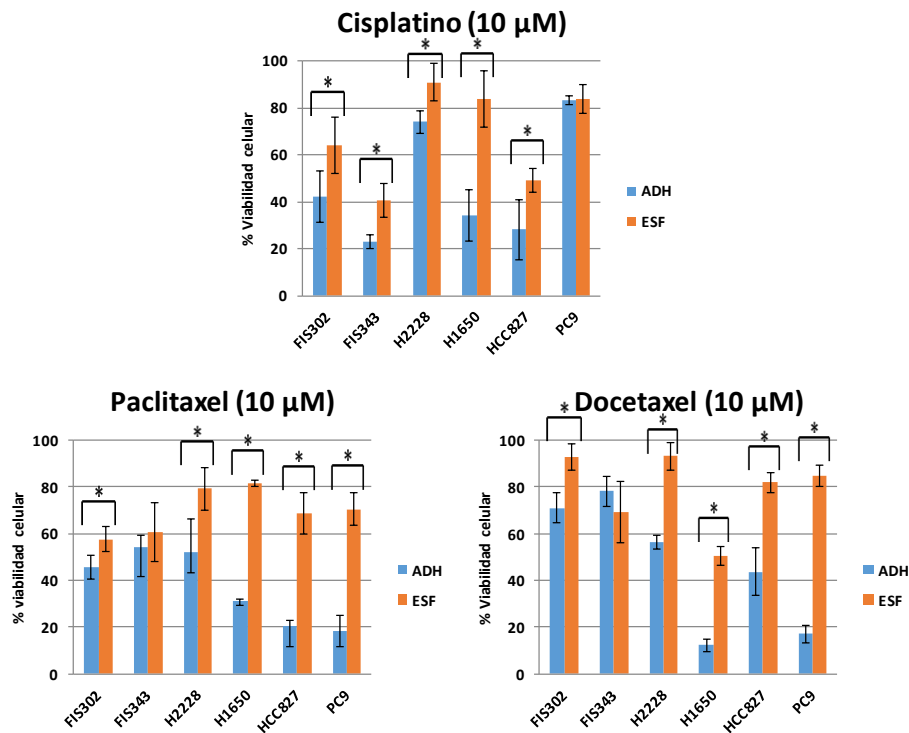


Figura 27. Porcentaje de viabilidad celular de las líneas H1650, HCC827, H2228, PC9 y de los cultivos primarios FIS302 y FIS343 en adherencia y en suspensión a las 48 horas de tratamiento con cisplatino, paclitaxel y docetaxel a dosis de 10 μM .

Se conoce que la respuesta inicial a la quimioterapia y en especial con cisplatino es relativamente alta, pero la mayoría de los pacientes finalmente recaen debido fundamentalmente a dos factores: la alta toxicidad generada por el fármaco y la adquisición de resistencia a la droga. Se sabe que la resistencia a la quimioterapia 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 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 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 (188).

Concretamente en el caso del cisplatino que actúa uniéndose al ADN y formando aductos intra e intercatenarios que bloquean la replicación y la transcripción en las células, 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 (189). 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 CPNM (190).

La **Figura 28** representa la citotoxicidad de doxorubicina, pemetrexed y vinorelbina en la línea celular A549 a las 48 horas de tratamiento, donde se observa que las tumoresferas son poco sensibles a los tres fármacos, y donde se muestra además la resistencia a la terapia con doxorubicina y vinorelbina de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en diferentes concentraciones testadas.

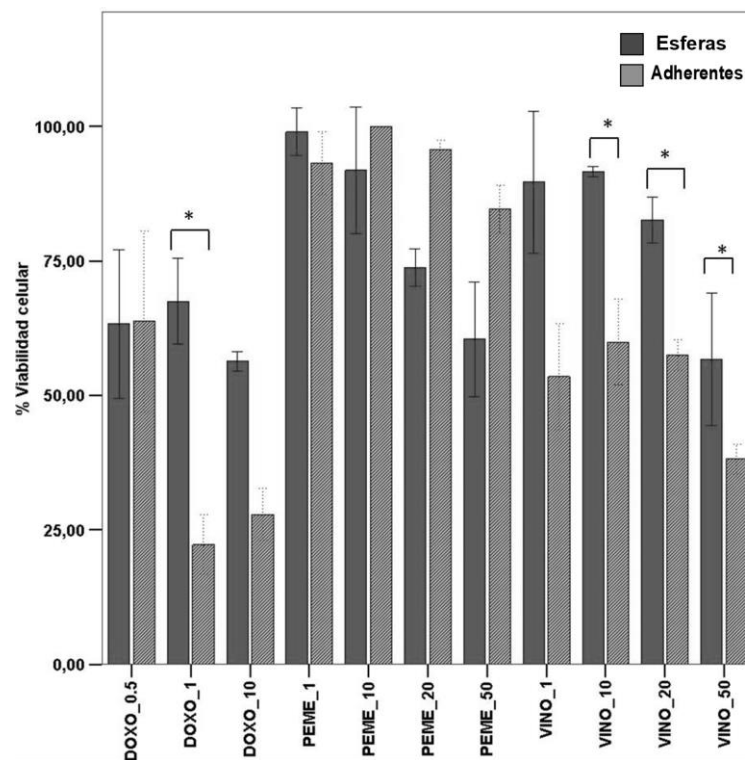


Figura 28. Porcentaje de viabilidad celular de la línea A549 en adherencia y en suspensión a las 48 horas de tratamiento con doxorubicina, vinorelbina y pemetrexed. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,5 μM ; 1 μM ; 10 μM ; 20 μM y 50 μM . Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado con la desviación estándar indicada mediante barras de error (*) $p < 0.05$.

Algunos estudios han demostrado que la resistencia a vinorelbina puede deberse a la hiperactivación de señales de crecimiento y supervivencia como *AKT* y *ERK* (191), las cuales podrían estar activas en nuestras tumoresferas, compensando la acción del fármaco sobre la replicación celular. Además, como sabemos, los resultados de vinorelbina administrada en adyuvancia en pacientes con CPNM ya sea en monoterapia o en combinación con otros agentes tiene resultados muy

Resultados y Discusión

modestos (192,193). Es por ello que quizás sea necesaria la combinación de vinorelbina con otros agentes que refuercen la acción del fármaco sobre la división celular para mejorar la eficacia de este tipo de fármacos en el tratamiento del cáncer de pulmón, aunque es necesario previamente realizar estudios preclínicos para evaluar el potencial de estas combinaciones (194,195).

Por otro lado, pemetrexed actúa inhibiendo la síntesis de purinas en las células, lo cual parece estar compensado por otros mecanismos de supervivencia celular; por ello la necesidad de combinarlo con otros compuestos. Existen algunos datos que indican una mayor efectividad *in vitro* e *in vivo* de pemetrexed cuando se combina con otros agentes como la rapamicina (196) en células de CPNM, ya que induce la inhibición de mTOR y equilibra la falta de efecto del pemetrexed en esta vía (197). Esta parece ser una buena opción terapéutica, aunque las toxicidades de este tipo de combinaciones deben ser valoradas cuidadosamente.

En cuanto a la doxorubicina, ha sido considerada muy efectiva en algunos tipos de cáncer como mama, leucemia y sarcomas (198). Sin embargo, en la práctica clínica su uso se ha visto limitado por el alto grado de cardiotoxicidad, por lo que actualmente se están diseñando nuevas estrategias para su administración, mediante nanopartículas dirigidas a ciertas dianas como por ejemplo *EGFR* (199) o en combinación con otros fármacos como dasatinib (200). En nuestro estudio, debido a su elevada toxicidad en células en monocapa ha sido empleada como control interplaca, y debido al elevado número de experimentos en el cribado masivo se procedió a emplear este fármaco para poder corroborar los resultados que en los siguientes apartados serán comentados en mayor profundidad.

Estos resultados demuestran como algunos agentes quimioterápicos convencionales utilizados en la práctica clínica, son menos eficaces frente a las tumoresferas de pulmón con propiedades de CMTs. En concordancia con otro estudio, en el que se observó menor eficacia de estos compuestos sobre células mesenquimales en cultivo (201); demostrando la resistencia de este tipo celular a los tratamientos convencionales en cáncer de pulmón, lo cual podría deberse, en parte, al estado de quiescencia de estas células. Por lo que resulta necesario la búsqueda de nuevos fármacos más eficaces, solos o en combinación frente a esta subpoblación celular en CPNM, siendo el objetivo principal de esta tesis.

4.2. CRIBADO CON QUIMIOTECAS

En la búsqueda de nuevos fármacos más eficaces en monoterapia o en combinación con quimioterapia convencional, para la inhibición de las CMTs en CPNM; se procedió a testar un gran número de compuestos pertenecientes a las librerías químicas comerciales Prestwick y Myria.

4.2.1. LIBRERÍA QUÍMICA PRESTWICK

La Librería Prestwick es una colección de 1.280 compuestos químicos aprobados por agencias reguladoras como la FDA (Agencia de medicamentos y alimentos de los Estados Unidos) y la EMA (Agencia Europea Reguladora de Medicamentos), seleccionados por su elevada diversidad química y farmacológica, así como también por su biodisponibilidad y seguridad en humanos. En esta librería se encuentran fármacos como el disulfiram (DSF), aprobado por la FDA en 1948 para tratamiento del alcoholismo (149); la digoxina, aprobada en 1954 como terapia para la insuficiencia cardiaca; y la doxorubicina (202), aprobada en 1995 como tratamiento para el sarcoma de Kaposi (203); después, sola o en combinación en el tratamiento de diferentes neoplasias, siendo efectiva en cáncer de mama, leucemias y otros sarcomas, entre otros.

Para una primera criba se empleó la línea celular H1650, por ser una de las líneas que formaban tumoresferas compactas y con marcadores de CMTs como CD44. Inicialmente se puso a punto la cantidad de esferas necesarias, así como de células en adherencia. Seguidamente, se realizó un cribado farmacológico masivo con todos los compuestos de esta quimioteca con el objetivo de hallar nuevos agentes terapéuticos eficaces contra las tumoresferas de pulmón con propiedades de CMTs; para ello, se seleccionaron fármacos que a 1 μM provocaran toxicidades superiores al 50% en las tumoresferas a las 48 horas de tratamiento. En una primera elección fueron seleccionados 18 compuestos (**Tabla 11**).

Tabla 11. Compuestos químicos seleccionados del cribado masivo con la librería Prestwick.

Compuesto	Nomenclatura	% Toxicidad 48 horas (1 μM)
Disulfiram	PW2B8	95,24
Camptotecina	PW3D11	78,54
Benzbromarona	PW5E11	57,68
Diclorhidrato de mitoxantrona	PW5G6	80,06
Anisomicina	PW6B3	85,80
Diclorhidrato de cefalina heptahidratada	PW6C9	82,04
Digoxina	PW6D8	62,52
Clorhidrato de doxorubicina	PW6D9	71,69
Octahidrato de estrofantina	PW6H2	81,08
Diclorhidrato de puomicina	PW6H11	72,10
Clorhidrato de daunorubicina	PW7A8	81,85
Diclorhidrato de emetina	PW8A11	86,56
Formil- (N) -deacetilcolchicina	PW8B11	55,09
Lanatosido C	PW9B7	59,35
Estrofantidina	PW9G11	58,72
Piritona de sodio	PW10C7	100
(-)-MK 801 maleato de hidrógeno	PW12F6	53,27
Proscilaridina A	PW13C7	70,11

En Negrita: Compuestos con actividad citotóxica mayor al 60% en tumoresferas a 1 μM en la línea H1650 a las 48 horas de tratamiento.

Resultados y Discusión

Posteriormente, se seleccionaron 13 de estos compuestos (Resaltados en **Negrita** en la **Tabla 11**) por presentar una toxicidad superior al 60% frente a las tumoresferas de la línea celular H1650 a las 48 horas de tratamiento a 1 μM . Para poder confirmar estos resultados se realizó una validación con la misma línea (H1650) y otras como A549, H23, H1993 y PC9 a diferentes concentraciones (0,1 μM ; 0,5 μM y 1 μM); dando lugar a la selección de 5 compuestos (PW2B8, PW3D11, PW6C9, PW8A11 y PW10C7) con mayor potencial anti-tumoresferas ($p < 0.05$) a 0,1 μM ; 0,5 μM y 1 μM . En este caso se seleccionaron líneas con diferentes mutaciones así como con diferentes características de formación de agregados para poder observar si realmente esa toxicidad elevada en tumoresferas se mantenía.

Una vez confirmado el potencial antitumoral, se ampliaron los experimentos en las líneas H1650, A549, H23, H358, H460, H1395, H1975, H1993, H2228, PC9 y en el paciente FIS343 para validar su citotoxicidad frente a las tumoresferas a diferentes concentraciones (0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM y 5 μM). La **Figura 29** muestra un ejemplo de la citotoxicidad estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de los 5 compuestos seleccionados sobre las tumoresferas de la línea celular H1650 a diferentes concentraciones.

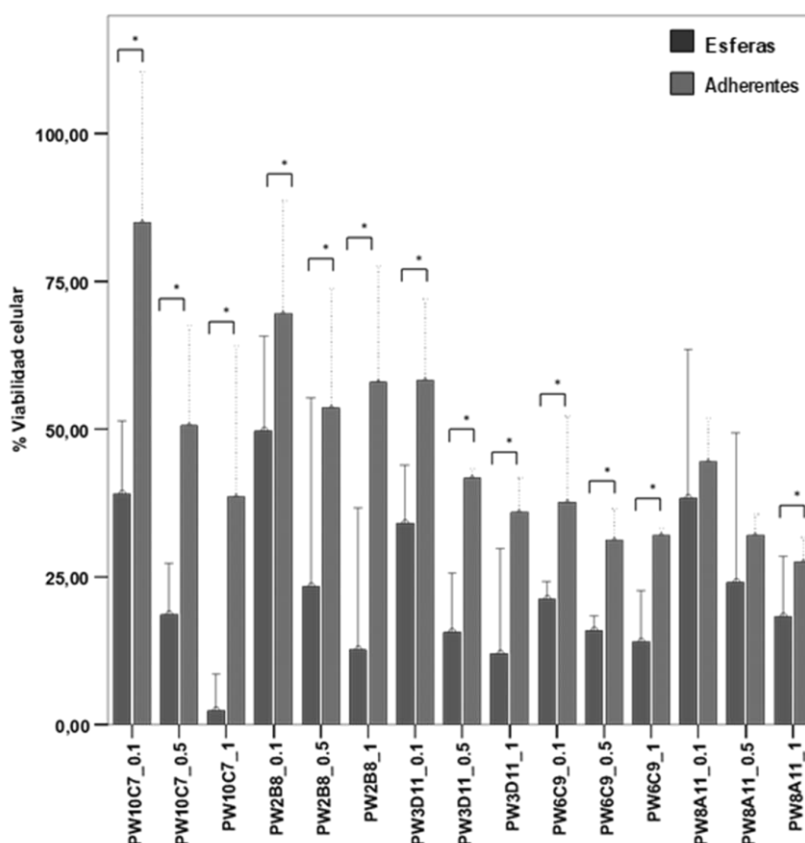


Figura 29. Porcentaje de viabilidad celular de la línea H1650 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con los 5 compuestos seleccionados de la librería química Prestwick. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,1 μM ; 0,5 μM y 1 μM . Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado con la desviación estándar indicada mediante barras de error (*) $p < 0.05$.

Finalmente, de los experimentos de validación de estos 5 compuestos, se seleccionaron los 3 fármacos [Disulfiram (PW2B8), Diclorhidrato de cefalina heptahidratada (PW6C9) y Piritiona de sodio (PW10C7)] con mayor potencial anti-tumoresferas de pulmón con propiedades de CMTs; estos alcanzaron concentraciones inhibitorias superiores al 50% a 0,1 μ M en las diferentes líneas celulares comerciales testadas (Tabla 12).

Tabla 12. Porcentaje de viabilidad celular de las líneas A549, H460, H1650 y PC9 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con los 3 compuestos seleccionados de la librería Prestwick.

% Viabilidad celular	PW2B8 Disulfiram			PW6C9 Diclorhidrato de cefalina heptahidratada			PW10C7 Piritiona de sodio		
	1 μ M	0,5 μ M	0,1 μ M	1 μ M	0,5 μ M	0,1 μ M	1 μ M	0,5 μ M	0,1 μ M
H1650 ESF	18,0	19,0	49,5	6,0	19,0	40,0	2,0	12,0	39,0
H1650 ADH	51,5	54,0	75,0	31,5	31,5	35,5	29,0	51,0	79,0
PC9 ESF	8,0	14,0	20,0	27,5	27,0	30,0	0,0	12,0	24,0
PC9 ADH	9,5	8,0	41,0	23,0	24,0	25,0	4,0	15,0	17,0
A549 ESF	5,0	8,5	69,0	32,0	28,0	27,0	0,0	3,5	66,0
A549 ADH	27,0	35,0	69,0	23,0	23,0	28,0	26,0	33,0	90,0
H460 ESF	11,0	5,0	26,0	15,5	15,0	26,0	2,5	4,5	41,0
H460 ADH	14,0	19,5	40,0	11,5	9,0	12,5	10,0	22,0	80,0

Por otro lado, esta quimioteca ha sido empleada por otros grupos investigadores. Por ejemplo, Zeniou M et al; en la búsqueda de agentes citotóxicos hacia CMTs quiescentes de glioblastoma humano, identificaron veinte moléculas activas pertenecientes a diferentes clases farmacológicas; entre ellos, el fármaco estimulante laxante bisacodilo, siendo el único que inhibió de manera potente y específica la supervivencia de las células madre quiescentes de glioblastoma (147). Así mismo, Varbanov HP et al; analizaron los 1.280 compuestos químicos y farmacológicos de esta librería contra células A549 (cáncer de pulmón) y PANC-1 (carcinoma pancreático) utilizando el ensayo de viabilidad celular basado en fluorescencia PrestoBlue. Como resultados de estos ensayos, más de 100 compuestos se identificaron efectivos en una o en ambas líneas celulares (80 de ellos son medicamentos utilizados para tratar enfermedades distintas del cáncer). Los candidatos prometedores que emanan de este estudio incluyen antiparasitarios, glucósidos cardiacos, así como los medicamentos anticancerígenos vorinostat y topotecan (148).

En referencia a la Piritiona de sodio y del Diclorhidrato de cefalina heptahidratada se desconocen efectos antineoplásicos descritos hasta el momento. Además, de la Piritiona de sodio se ha descrito

Resultados y Discusión

que tiene la capacidad de producir neuropatía retardada en algunas especies, provocando la elevación intracelular de calcio en las motoneuronas de la asta anterior de la medula espinal; causando, por ejemplo, debilidad en las patas traseras en roedores(204).

Sin embargo, varios ensayos clínicos han evaluado el DSF como un medicamento contra el cáncer. Estos ensayos han demostrado el potencial efecto citotóxico del DSF en neoplasias sólidas avanzadas con metástasis hepáticas (ClinicalTrials.gov Identificador: NCT00742911), melanoma metastásico (ClinicalTrials.gov Identificador: NCT00571116, NCT00256230), glioblastoma (ClinicalTrials.gov Identificador: NCT01777919, NCT01907165), cáncer de pulmón no microcítico (Identificador de ClinicalTrials.gov: NCT00312819) y cáncer de próstata (Identificador de ClinicalTrials.gov: NCT01118741). El informe del ensayo clínico mencionado en CPNM indicó que DSF es bien tolerado y parece prolongar la supervivencia en pacientes con este tipo de cáncer de pulmón recién diagnosticado (205), lo que respalda la noción de que DSF es un agente antineoplásico prometedor en esta patología, razón por la cual se procedió a realizar con este fármaco un mayor número de estudios como se demuestra en los siguientes apartados.

Sin embargo, más estudios de cribado farmacológico con esta quimioteca serán necesarios para poder validar el potencial de estos compuestos químicos frente a tumoresferas de CPNM y cumplir con la búsqueda de nuevos posibles fármacos anti-CMTs de pulmón. Para dar un paso más allá, se procedió a emplear otra quimioteca amplia de compuestos que no han sido previamente aprobados, pero de los cuales se conoce su estructura y posible potencial antitumoral.

4.2.2. LIBRERÍA QUÍMICA MYRIA

La librería química Myria está compuesta por 10.000 compuestos que no han sido aprobados por las agencias reguladoras, pero que pueden tener un gran potencial terapéutico. En el presente estudio se realizó inicialmente un cribado farmacológico masivo con todos los compuestos de esta quimioteca con el objetivo de encontrar nuevas terapias eficaces contra las tumoresferas de pulmón con propiedades de CMTs. Para este procedimiento se ha realizado un primer cribado el total de los compuestos en la línea celular H1650, seleccionando inicialmente 49 que resultaron positivos con toxicidades superiores al 50% frente a las tumoresferas a una concentración de 1 μ M a las 48 horas de tratamiento (**Tabla 13**).

Posteriormente, se seleccionaron 15 de estos compuestos (Resaltados en **Negrita** en la **Tabla 13**), por presentar una toxicidad mayor al 60% frente a las tumoresferas de la línea celular H1650 posterior a 48 horas de tratamiento a 1 μ M. Para confirmar estas selecciones se realizaron experimentos de

confirmación en las líneas celulares A549 y H1650 a diferentes concentraciones (0,1 μM ; 0,5 μM y 1 μM). Dentro de los estudios de confirmación destacaron tres compuestos (SG124F6, SG124G6 y SG125A2) por su elevada toxicidad en esferas en comparación con adherentes ($p < 0.05$). Además, las estructuras de estos tres compuestos eran muy similares por lo que se decidió continuar y centrar los estudios en ellos. Para confirmar estas toxicidades específicas contra las tumoresferas se realizó la validación con diferentes líneas celulares de CPNM (H1650, A549, H23, H358, H460, H1395, H1993, H2228 y PC9) a diferentes concentraciones (0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM y 5 μM).

Tabla 13. Compuestos químicos seleccionados del cribado masivo con la librería Myria.

Fórmula	Compuesto	% Toxicidad 48H 1 μM	Fórmula	Compuesto	% Toxicidad 48H 1 μM
C17H25Cl2N5	SG1E3	58	C14H10N2O4S	SG65F9	52
C10H13BrN4O3	SG1E5	57	C10H9N5O2	SG65G4	51
C16H24N2	SG1E7	52	C10H14ClN3O4S	SG65G7	56
C14H20N6O4	SG1F5	55	C12H18FN3O2S	SG65G8	63
C13H8N6O3	SG6E6	81	C20H20ClNO4	SG65G9	58
C14H13NO4	SG10G9	53	C19H19ClN2O	SG72D6	50
C16H14N4OS2	SG11E9	51	C13H9N3O2S	SG78C9	96
C16H11ClFN3O	SG20G5	87	C16H14N2O8S	SG82G7	56
C12H15N3O2S	SG26D10	51	C11H6Cl2N2O4	SG87H9	100
C21H25N5O3	SG35G4	54	C14H18N2O4	SG89F10	55
C15H15N5O3	SG36E5	59	C21H23NO2	SG90F6	56
C21H14N4O8	SG36E7	61	C14H12Cl2N2O	SG93D2	56
C19H29N3O2S	SG40G3	51	C15H23NO4	SG97G2	60
C20H17Br2NO	SG45E11	54	C18H19N3OS	SG97G10	54
C11H17N5O2	SG47D5	52	C23H24N4S	SG103E6	87
C10H15N3O3	SG47G4	56	C13H10FN5O4	SG106A5	68
C19H18N2	SG50H11	71	C13H10BrClN2O	SG106E11	52
C14H14N2O2	SG53G3	64	C21H31NO2	SG108C10	57
C19H13N3O	SG53G4	57	C10H14FNO3S	SG112D11	59
C15H20ClN3O2S2	SG55D9	90	C13H19N5O2	SG113G2	50
C16H23NO4S	SG56F6	51	C11H17N5O2	SG113G3	51
C11H12N2O5	SG56G6	50	C12H19N5O2	SG113G5	54
C15H11BrN2	SG60G6	63	C10H18N4S2	SG124F6	94
C26H21ClN2O5	SG60G10	58	C11H20N4S2	SG124G6	100
			C10H18N4S2	SG125A2	85

En Negrita: Compuestos con actividad citotóxica mayor al 60% en tumoresferas a 1 μM en la línea H1650 a las 48 horas de tratamiento.

La **Figura 30** muestra un ejemplo de las citotoxicidades estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de los 3 compuestos seleccionados (SG124F6, SG124G6 y SG125A2) sobre las tumoresferas de línea celular A549 a diferentes concentraciones (0,1 μM ; 0,5 μM y 1 μM), en comparación a las células crecidas en monocapa.

Resultados y Discusión

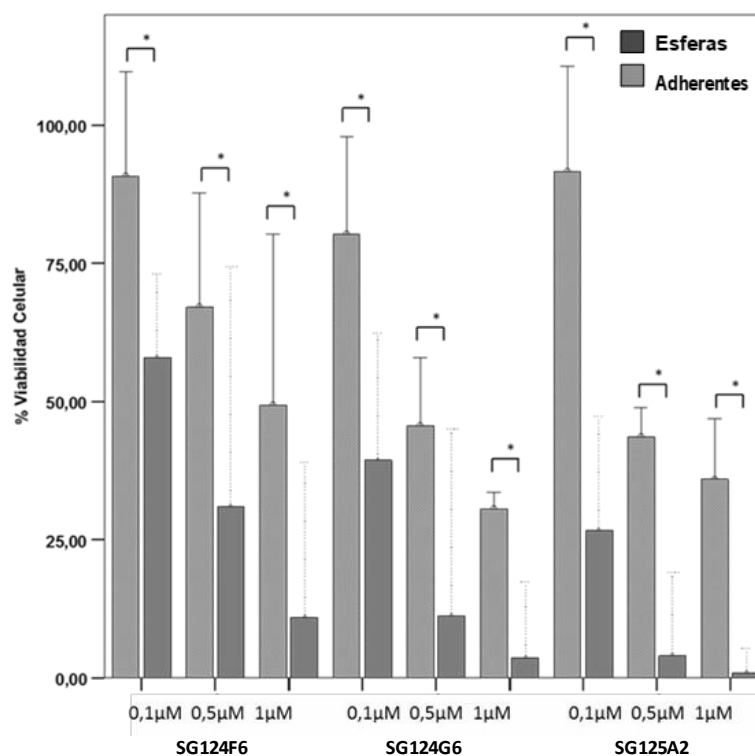


Figura 30. Porcentaje de viabilidad celular de la línea A549 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con los tres compuestos seleccionados de la librería Myria. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,1 μM; 0,5 μM y 1 μM. Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado con la desviación estándar indicada mediante barras de error (*) $p < 0.05$.

En consonancia con nuestros estudios, la quimioteca Myria ha sido utilizada por otros grupos investigadores como por ejemplo, Morrow JK et al; que han empleado los compuestos de esta librería con la esperanza de desarrollar inhibidores de moléculas pequeñas de la interacción proteína-proteína [TRAF6 (Factores asociados a los receptores del Factor de Necrosis Tumoral, TNF) – RANK (Activador del Receptor del Factor Nuclear κ B)], unión que activa las vías de quinasa NF- κ B, JNK y MAP en cáncer de pulmón y mieloma múltiple (206); demostrando la utilidad clínica que pueden tener estas aproximaciones.

Finalmente, de la primera fase del cribado farmacológico masivo de alto rendimiento desarrollado en este estudio, se seleccionaron 3 compuestos [PW2B8 (DSF) de la librería química Prestwick, SG124F6 y SG124G6 de la librería química Myria] producto del potencial efecto inhibitorio evidenciado frente a las tumoresferas de pulmón enriquecidas en propiedades de CMTs, en todos los cultivos celulares testados. Además, estos compuestos comparten estructuras químicas similares, haciendo formular la hipótesis de que los agentes seleccionados de la librería química Myria, posiblemente también compartan mecanismos de actividad antineoplásica y específicamente inhibitorios frente a las CMTs como los ya descritos con el DSF.

Una vez seleccionados estos fármacos se procedió a confirmar su potencial citotóxico en diferentes líneas celulares (H23, H358, H1395, H1993 y H2228), para evaluar la efectividad inhibitoria frente a las tumoresferas en las diferentes histologías y frente a las diferentes mutaciones presentes en CPNM, con la intención de hacer una aproximación a la medicina de precisión.

Es así como en la **Figura 31** se encuentra representado el ensayo de viabilidad celular en la línea H23 derivada de ADC con la mutación *KRAS* G12C, donde se observa que las tumoresferas resultaron ser más sensibles a los 3 fármacos respecto a las células crecidas en monocapa, de manera estadísticamente significativa; frente a PW2B8 a concentraciones de 0,5 μ M ($p < 0.001$) y 1 μ M ($p < 0.01$) y frente a SG124F6 y SG124G6 a todas las concentraciones evaluadas ($p < 0.001$). Dato importante que nos podría ayudar a comprender uno de los posibles mecanismos de acción de estos fármacos, dada la resistencia a la terapia actual en CPNM asociada a *KRAS* G12C. Sin embargo, en la línea H358 derivada de carcinoma bronquioalveolar también mutada en *KRAS* G12C, se demuestra la variabilidad entre histologías, puesto que esta línea celular presenta baja sensibilidad en ambas condiciones a la acción de los 3 fármacos, en especial frente a SG124F6 y SG124G6, tal y como se representa en la **Figura 32**.

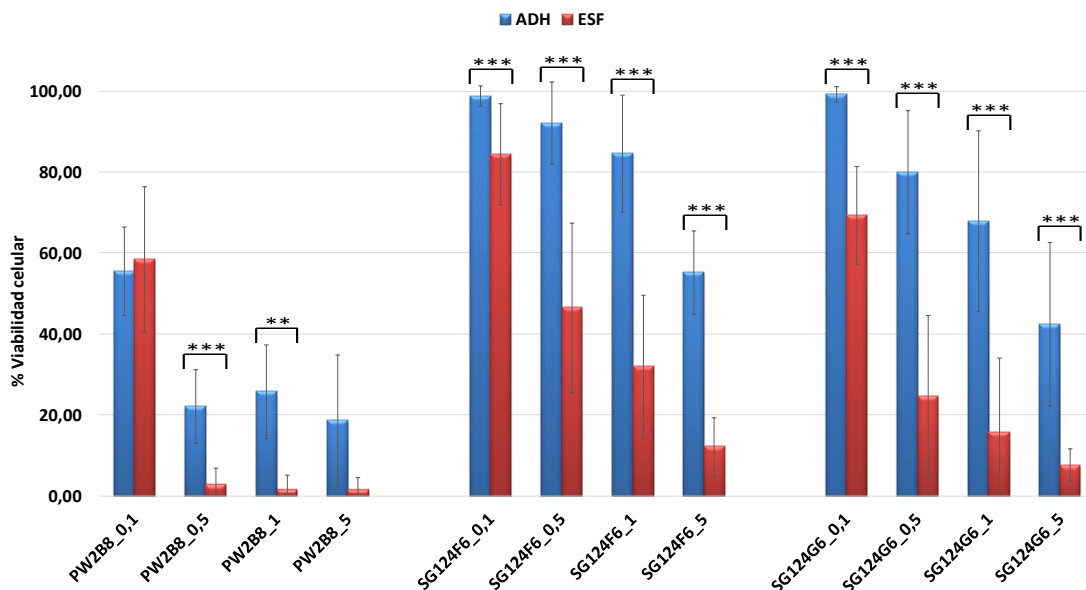


Figura 31. Porcentaje de viabilidad celular de la línea H23 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con PW2B8, SG124F6 y SG124G6. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,1 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M y 5 μ M. Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error. (*) <math>p < 0.05</math>, () <math>p < 0.01</math>, (***) <math>p < 0.001</math>.**

Resultados y Discusión

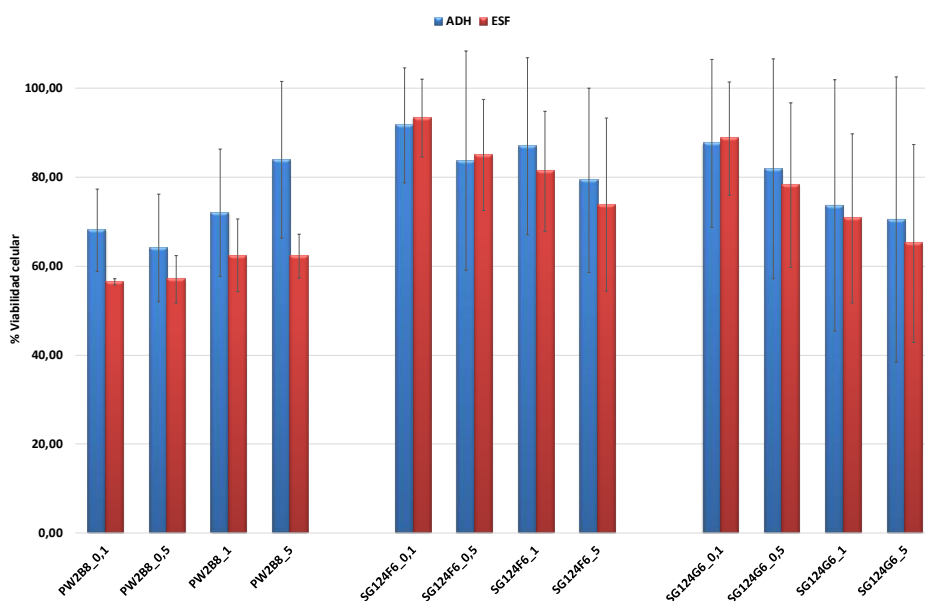


Figura 32. Porcentaje de viabilidad celular de la línea H358 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con PW2B8, SG124F6 y SG124G6. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,1 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M y 5 μ M. Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error.

El papel pronóstico y predictivo de las mutaciones en *KRAS* en CPNM sigue sin estar claro; sin embargo, la presencia de la mutación *KRAS* (especialmente la mutación *KRAS* G12C) ha sido considerada por varios investigadores como un marcador de mal pronóstico en pacientes con CPNM tratados con quimioterapia (207,208) y sin terapia dirigida. Aunque recientemente han sido presentados en el congreso de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) 2019, los primeros datos clínicos de AMG 510, el primer inhibidor específico e irreversible del gen *KRAS* G12C que entra en fase clínica (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03600883) tras tres décadas de investigación en *RAS*; los primeros resultados en humanos muestran datos positivos de seguridad, tolerabilidad y actividad antitumoral en los tumores sólidos con mutación en el gen *KRAS*, concediendo la FDA a AMG 510 la designación de “medicamento huérfano” para el tratamiento del CPNM y el cáncer colorrectal con *KRAS* G12C (209).

Cuando se analiza la línea celular H1395 con la mutación *BRAF* c.1406G>C p.G469A se observan datos similares representados en la **Figura 33**, donde se observa baja sensibilidad de las tumoresferas a la acción de los 3 fármacos, en especial frente a SG124F6 y SG124G6. Las mutaciones de *BRAF* se observan en hasta el 3,5-4% de los pacientes con CPNM. El comportamiento biológico de los tumores pulmonares mutados con *BRAF* tiende a ser más agresivo y resistente a la quimioterapia, pero las respuestas a los inhibidores de la tirosina quinasa, como los inhibidores de *BRAF* con o sin inhibidores de *MEK*, han proporcionado otra herramienta eficaz para lograr mejores tasas de respuesta en

comparación con la quimioterapia citotóxica. Nuevas estrategias, como la inmunoterapia, se están convirtiendo en otra opción para tratar pacientes en segunda línea con CPNM mutado en *BRAF* (210).

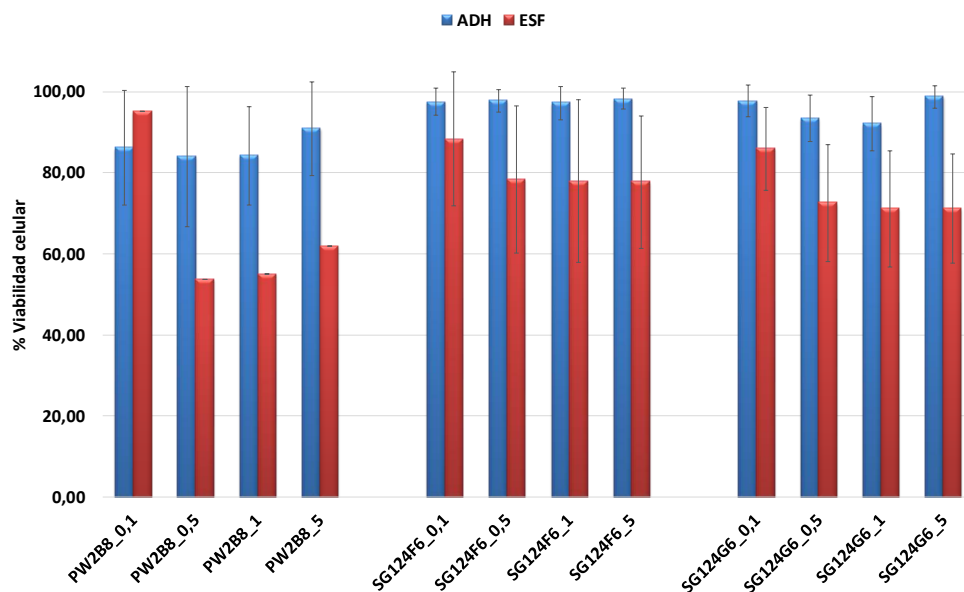


Figura 33. Porcentaje de viabilidad celular de la línea H1395 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con PW2B8, SG124F6 y SG124G6. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM y 5 μM . Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error.

Por otro lado, vemos como en la **Figura 34** se representa el ensayo de viabilidad celular en la línea H1993 con amplificación de *c-MET*, donde se evidenció mayor sensibilidad en las tumoresferas tratadas con SG124F6 y SG124G6 respecto a las células crecidas en monocapa de manera estadísticamente significativa; frente a SG124F6 a concentraciones de 0,1 μM ($p < 0.001$), 0,5 μM ($p < 0.01$) y 1 μM ($p < 0.05$) y frente a SG124G6 a 1 μM ($p < 0.01$) y 5 μM ($p < 0.001$), caso contrario a lo observado con PW2B8 donde las esferas resultaron ser menos sensibles a todas las concentraciones evaluadas. Resultado esperanzador dada la resistencia a la terapia actual en CPNM asociada a los inhibidores de *EGFR* y *MET*. Puesto que los inhibidores de *MET* tienen el potencial de beneficiar a subconjuntos de pacientes con CPNM con alteraciones genéticas específicas. Las mutaciones del exón 14 parecen ser hasta ahora el subconjunto molecular más sensible a los inhibidores de *MET*, mientras que la amplificación de *c-MET* parece ser uno de los subgrupos más difíciles de alcanzar (73). La combinación con otros agentes diana, como los inhibidores de *EGFR* o inhibidores de CMTs como SG124F6 y SG124G6, representarían una estrategia terapéutica prometedora en áreas específicas (por ejemplo, resistencia a *EGFR*-TKIs).

Resultados y Discusión

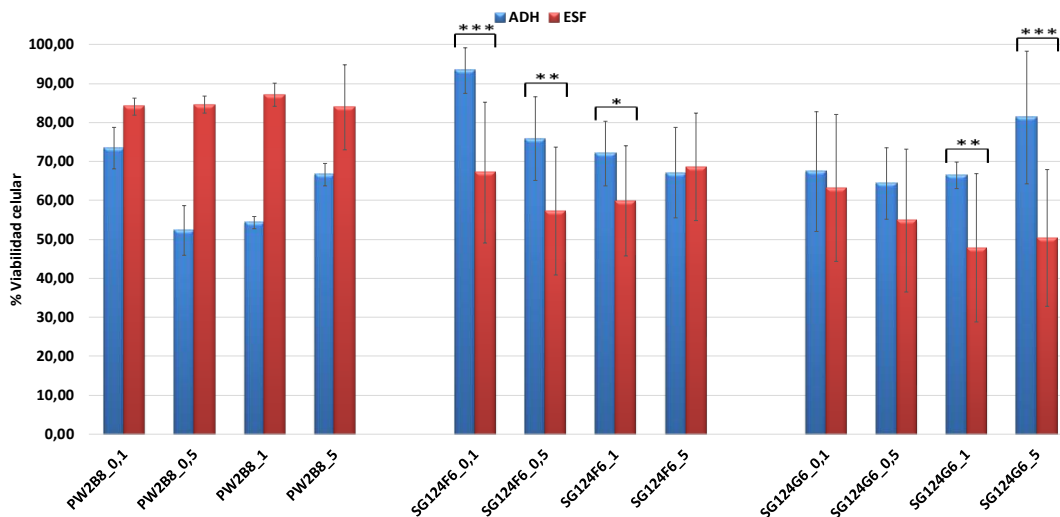


Figura 34. Porcentaje de viabilidad celular de la línea H1993 en células crecidas monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con PW2B8, SG124F6 y SG124G6. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM y 5 μM . Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error. (*) <math>p < 0,05</math>, (**) <math>p < 0,01</math>, (***) <math>p < 0,001</math>.

Resultados similares en la línea H2228 con translocación de *ALK* se encuentran representados en la **Figura 35**, donde se observa que las esferas son más sensibles a los 3 fármacos respecto a las células crecidas en monocapa de manera estadísticamente significativa; frente a PW2B8 a todas las concentraciones evaluadas ($p < 0,001$), frente a SG124F6 a 0,5 μM ($p < 0,01$) y a 1 μM y 5 μM ($p < 0,001$) y frente a SG124G6 a 0,1 μM ($p < 0,01$) y entre 0,5 μM y 5 μM ($p < 0,001$). Lo que también significa un dato prometedor ante el posible desarrollo de nuevos fármacos anti-CMTs de pulmón en pacientes *ALK+* resistentes a las terapias actuales con inhibidores de *ALK* de primera y segunda generación (211).

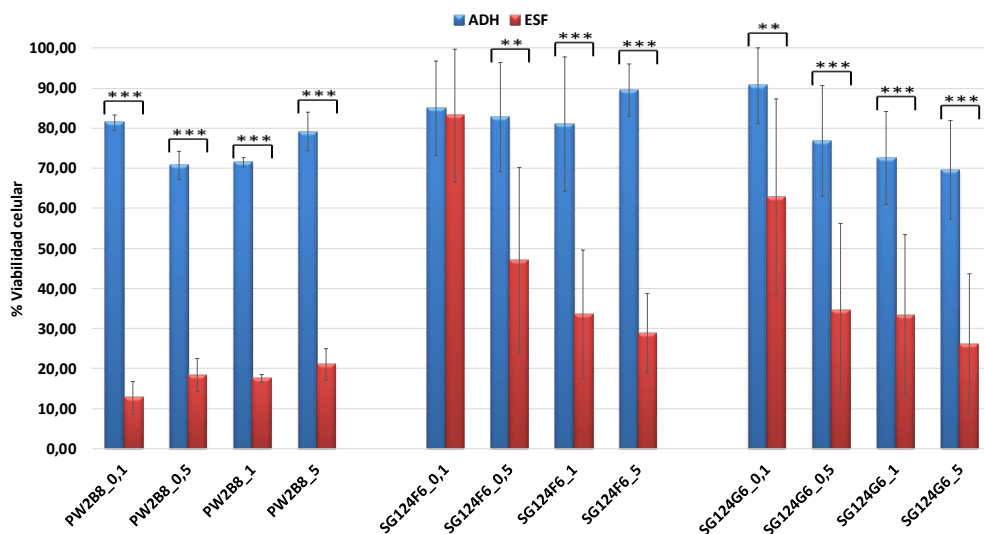


Figura 35. Porcentaje de viabilidad celular de la línea H2228 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con PW2B8, SG124F6 y SG124G6. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM y 5 μM . Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error. (*) <math>p < 0,05</math>, (**) <math>p < 0,01</math>, (***) <math>p < 0,001</math>.

En resumen, nuestros fármacos parecen ser muy versátiles, siendo que nuestras tumoresferas con características de CMTs resultaron ser más sensibles a los 3 fármacos de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en las líneas celulares H23, H1993 y H2228, incluso a bajas concentraciones (0,1 μM); líneas de ADC con mutaciones *KRAS* G12C, amplificación de *c-MET* y *ALK*. De las mutaciones de *KRAS* y amplificación de *c-MET* se ha descrito que confieren resistencia al tratamiento con *EGFR*-TKIs, lo que pone en evidencia la capacidad de estos fármacos para inhibir las tumoresferas con propiedades de CMTs de pulmón responsables de la resistencia a estas terapias. Por este motivo, ha sido importante el evaluar la acción de estos fármacos en las líneas celulares con mutaciones diana responsables de la resistencia a otras terapias actuales, porque al final los pacientes progresarán y se deben hallar fármacos más eficaces en estos casos. En la **Tabla 14** se resumen las IC_{50} de los tres fármacos en las líneas celulares H23, H1993 y H2228.

Tabla 14. IC_{50} de PW2B8 (DSF), SG124F6 y SG124G6 en las líneas celulares H23, H1993 y H2228 en monocapa y en formación de esferas a las 48 horas de tratamiento.

IC_{50} (μM)	PW2B8 Disulfiram	SG124F6	SG124G6
H23 ESF	0,15	0,40	1,04
H23 ADH	0,11	3,11	1,96
H1993 ESF	-	0,61	0,91
H1993 ADH	0,12	0,45	0,67
H228 ESF	0,1	0,61	0,50
H2228 ADH	-	-	0,28

(-) No se alcanzó a obtener la IC_{50} .

El primer agente identificado es el DSF, un fármaco empleado en el alcoholismo que ha sido previamente descrito como un potente agente anticanceroso en distintas neoplasias sólidas como mama y pulmón (205,212), y varios estudios *in vitro* han demostrado que puede actuar específicamente como un inhibidor de CMTs induciendo la apoptosis celular por varios mecanismos: a) inhibiendo la actividad de ALDH en células tumorales de glioblastoma y cáncer de páncreas (213,214); b) inhibiendo la transición epitelio-mesenquimal en cáncer de mama inducida por TGF- β a través de la vía ERK / NF- κB / Snail(215), c) estimulando especies reactivas de oxígeno (ROS) activando la vía p38 MAPK en melanoma y hepatocarcinoma (158,216), d) inhibiendo la actividad del proteosoma(217), entre otros descritos. Sin embargo; el mecanismo específico subyacente de la actividad anticancerosa de DSF aún no se ha dilucidado por completo. Por otro lado, los dos compuestos identificados de la librería Myria (SG124F6 y SG124G6) no han sido estudiados previamente, siendo estos los primeros datos que describen una potencial actividad inhibidora de estos fármacos en ensayos *in vitro* sobre las tumoresferas con características de CMTs, derivadas de líneas celulares comerciales y cultivos primarios de pacientes con CPNM.

Resultados y Discusión

En una segunda fase, se procedió a la síntesis de los compuestos seleccionados de la librería Myria, en colaboración con el Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universitat Jaume I de Castellón, para continuar con el cribado farmacológico en las líneas celulares restantes (H1650, A549, H1975 y SW900) y en los cultivos primarios (FIS299, FIS302, FIS303, FIS315, FIS317, FIS320 y FIS343); para poder completar la evaluación de la efectividad inhibitoria frente a las tumoresferas en las diferentes histologías y frente a las diferentes mutaciones presentes en CPNM. Los compuestos sintetizados los hemos denominado JMM 1-3 (SG124F6) y JMM 1-4 (SG124G6), que en conjunto con el DSF fueron validados en los diferentes cultivos a diferentes concentraciones (0,01 μM ; 0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 20 μM y 50 μM). Se realizaron los ensayos de viabilidad celular posterior a 48 horas de tratamiento, obteniendo los siguientes resultados:

En la línea celular **H1650** derivada de ADC bronquioalveolar con la mutación *EGFR* deleción exón 19, las tumoresferas resultaron ser más sensibles a los 3 fármacos de manera estadísticamente significativa respecto al efecto pobre o nulo observado en las células crecidas en monocapa, en casi todas las concentraciones evaluadas (**Figura 36**); frente al DSF a 0,01 μM ($p < 0.01$) y al resto de concentraciones evaluadas ($p < 0.001$), frente a JMM 1-3 a 0,01 μM ($p < 0.05$) y entre 0,5 μM y 50 μM ($p < 0.001$) y frente a JMM 1-4 a 0,01 μM ($p < 0.05$), a 0,5 μM ($p < 0.05$) y entre 5 μM y 50 μM ($p < 0.001$). La deleción del exón 19 de *EGFR* se asocia con una supervivencia libre de progresión (SLP) y una supervivencia global (SG) favorables en pacientes que han recibido tratamiento con gefitinib en primera línea (218). De allí la importancia de conocer el subtipo de mutación *EGFR* y su consideración al momento de tomar decisiones de tratamiento o al diseñar ensayos clínicos para pacientes con CPNM avanzado con mutación *EGFR* positiva.

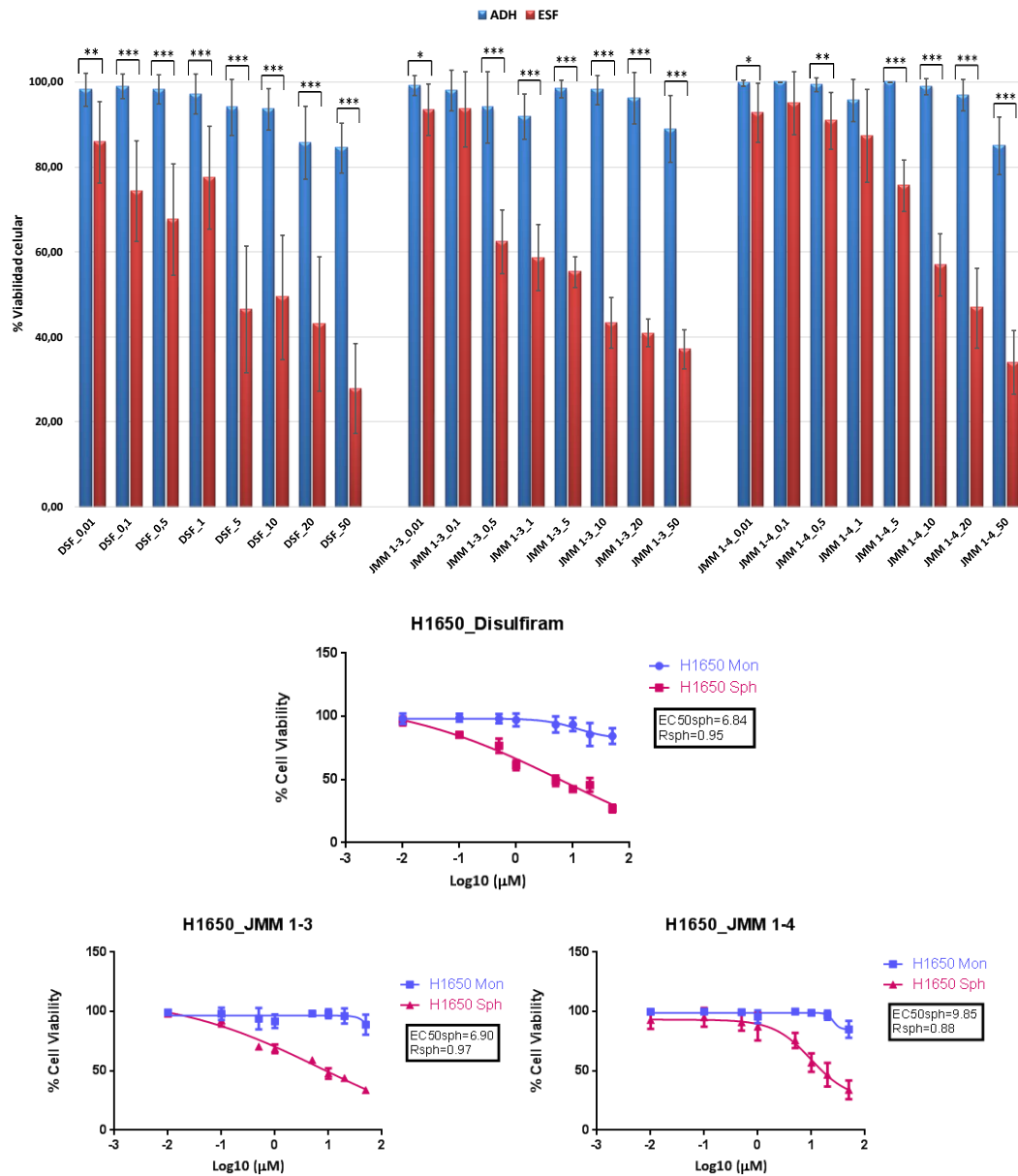


Figura 36. Superior: Porcentaje de viabilidad celular de la línea H1650 en células crecidas monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en H1650. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,01 µM; 0,1 µM; 0,5 µM; 1 µM; 5 µM; 10 µM; 20 µM y 50 µM. Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error. (*) <0.05, (**) <0.01, (***) <0.001.

Continuando con las líneas mutadas en *EGFR*, en el ensayo realizado con la línea H1975 derivada de ADC con mutaciones L858R y T790M, también se evidenció como las tumoresferas resultaron ser más sensibles a los 3 fármacos de manera estadísticamente significativa; frente a DSF a 1 µM (p<0.05) y JMM 1-3 a 0,5 µM (p<0.001) a 5 µM (p<0.05) y a 20 µM (p<0.01) y frente a JMM 1-4 a 0,5 µM, 5 µM y 50 µM (p<0.05) y a 10 µM y 20 µM (p<0.001) (**Figura 37**). Dato relevante dada la resistencia a los *EGFR*-TKIs que supone la mutación T790M y la ausencia de selectividad de nuestros 3 fármacos para con algún subtipo de mutación *EGFR*; puesto que, en diferentes líneas celulares, con los diferentes

Resultados y Discusión

subtipos de mutación en *EGFR* (delección exón 19, T790M y L858R), ejercen un efecto inhibitorio sobre las tumoresferas con características de CMTs de pulmón. Dado que la existencia de una diferencia clínicamente significativa en la sensibilidad a los inhibidores de la tirosina quinasa del *EGFR* entre diferentes subtipos de mutación del *EGFR* sigue siendo un tema de debate(219).

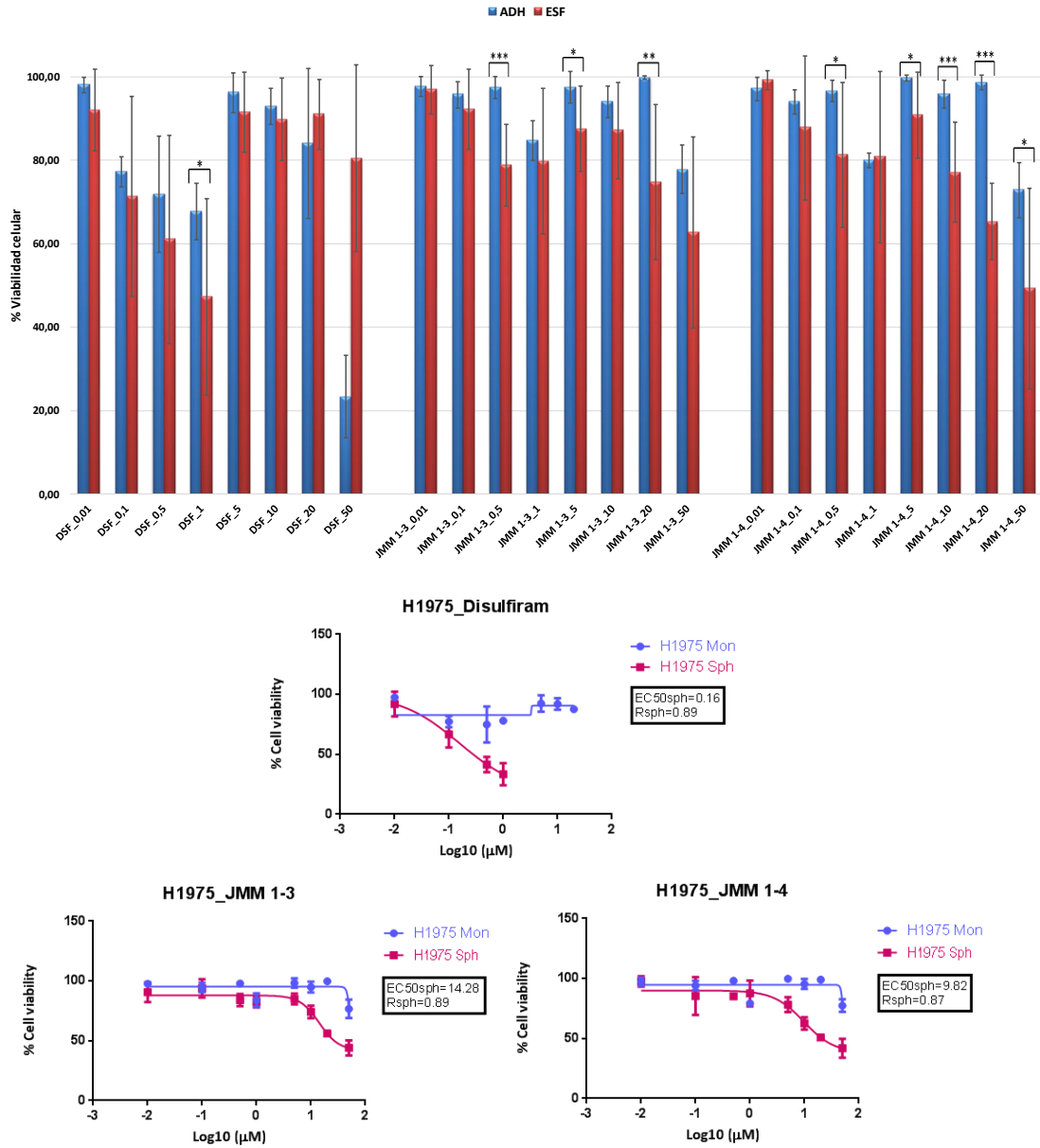


Figura 37. Superior: Porcentaje de viabilidad celular de la línea H1975 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en H1975. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,01 μ M; 0,1 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M; 5 μ M; 10 μ M; 20 μ M y 50 μ M. Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error. (*) <0.05, (**) <0.01, (***) <0.001.

Por otro lado, en relación con las líneas celulares mutadas en *KRAS*, En la **Figura 38** se representa el ensayo de viabilidad celular en la línea A549, derivada de carcinoma de células escamosas con la mutación *KRAS* G12S, donde se observa como las tumoresferas resultaron ser más sensibles a los 3 fármacos de manera estadísticamente significativa en comparación con el efecto pobre o nulo en las células crecidas en monocapa; frente a DSF a 0,01 y 0,1 μM ($p < 0.05$) y a 0,5 μM , 10 μM y 20 μM ($p < 0.001$), frente a JMM 1-3 a 0,01 μM ($p < 0.05$) y a 20 μM ($p < 0.01$) y frente a JMM 1-4 a 0,01 μM ($p < 0.05$) y a 20 μM ($p < 0.01$). Sin embargo, en ninguno de los casos las toxicidades fueron superiores al 50%.

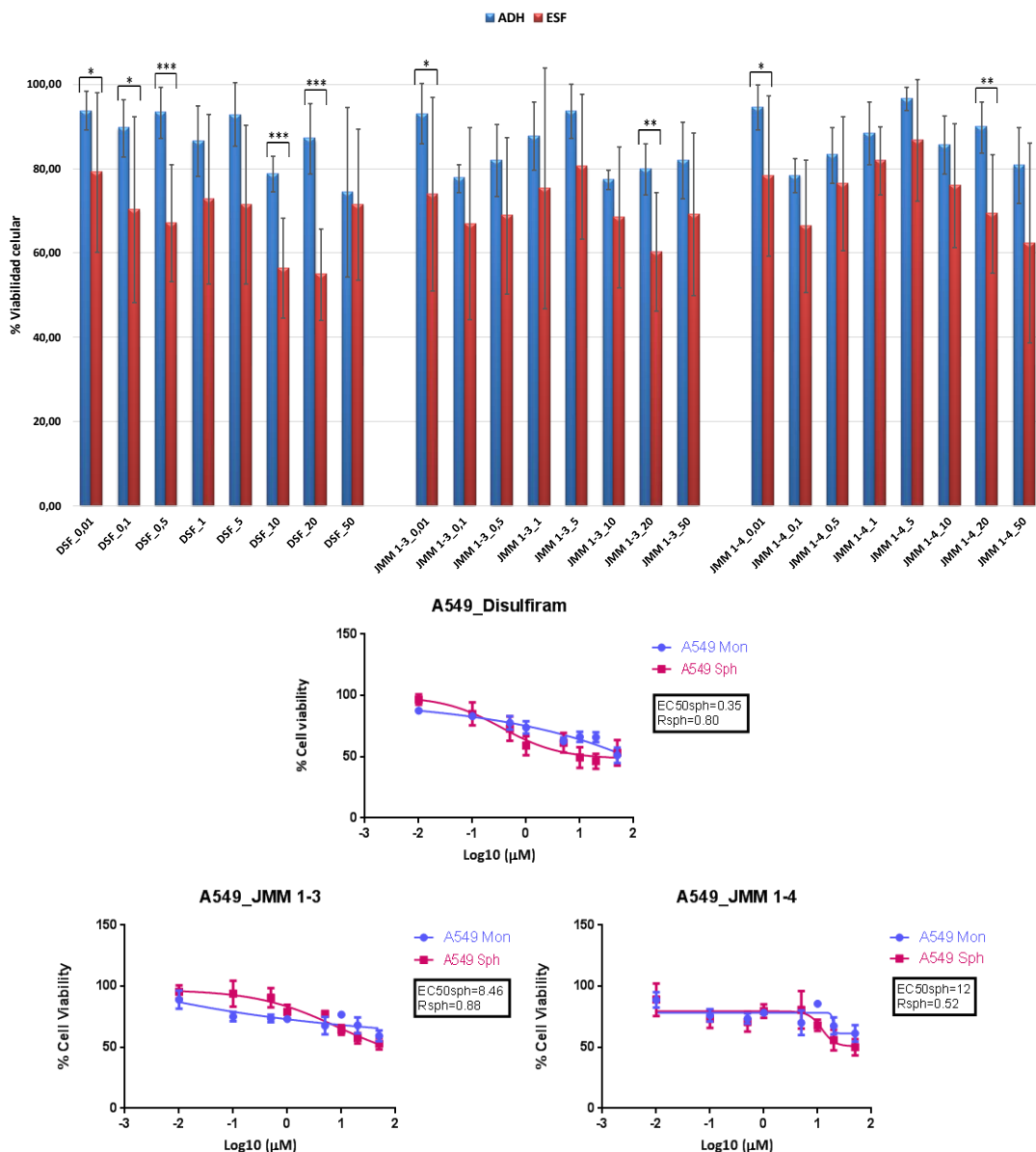


Figura 38. Superior: Porcentaje de viabilidad celular de la línea A549 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en A549. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,01 μM ; 0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 20 μM y 50 μM . Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error. (*) <math> < 0.05</math>, (**) <math> < 0.01</math>, (***) <math> < 0.001</math>.

Resultados y Discusión

Así mismo, en la línea SW900, derivada de carcinoma de células escamosas con la mutación *KRAS* G12V, las tumoresferas resultaron ser más sensibles a los 3 fármacos de manera estadísticamente significativa; frente a DSF a 5 μM ($p < 0.05$), a 10 μM ($p < 0.01$) y a 20 μM y 50 μM ($p < 0.001$), frente a JMM 1-3 a partir de 0,5 μM ($p < 0.001$) y frente a JMM 1-4 a 0,1 μM y 5 μM ($p < 0.05$), a 0,5 μM ($p < 0.01$) y entre 10 μM y 50 μM ($p < 0.001$) (**Figura 39**). Ensayos que confirman la versatilidad de estos fármacos frente a las tumoresferas con propiedades de CMTs de diferentes histologías y diferentes subtipos de mutación *KRAS* G12.

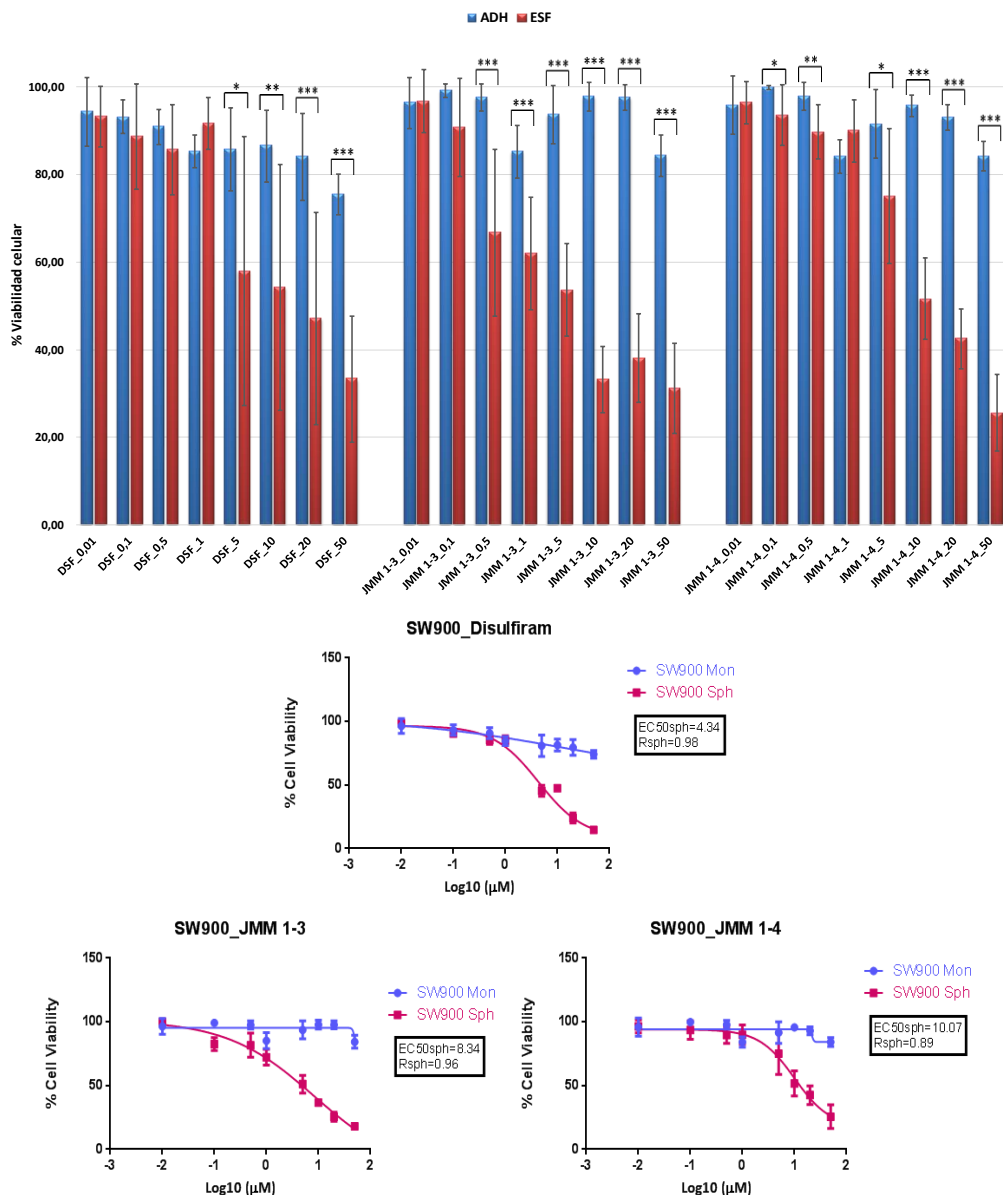


Figura 39. Superior: Porcentaje de viabilidad celular de la línea SW900 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en SW900. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,01 μM ; 0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 20 μM y 50 μM . Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error. (*) 0.05, (**) 0.01, (***) 0.001.

En resumen, los ensayos de validación de los fármacos sintetizados en las diferentes líneas celulares comerciales, demostraron que las tumoresferas son más sensibles de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$), incluso a bajas concentraciones ($0,01 \mu\text{M}$); dejando en evidencia el potencial de inhibición selectiva que poseen estos fármacos frente a las tumoresferas con características de CMTs de las diferentes histologías de CPNM, y frente a las diferentes mutaciones en *EGFR* y *KRAS*, inclusive a mutaciones asociadas a resistencia al tratamiento con *EGFR*-TKIs (T790M). Estos datos indican que nuestros fármacos pudieran mejorar la eficacia de los *EGFR*-TKIs y superar estas resistencias originadas por mutaciones en pacientes con CPNM con mutación de *EGFR* y/o *KRAS*. Tal y como se ha descrito con la curcumina en líneas celulares de CPNM con mutaciones *EGFR* y *KRAS* de tipo nativo y resistencia primaria a gefitinib, donde se demostró que la curcumina mejora significativamente el efecto inhibitorio de gefitinib en líneas de CPNM con resistencias primarias a gefitinib (H157 y H1299). Estos datos demostraron además que la sinergia de la curcumina con el gefitinib fue autofagia dependiente, y que la curcumina se puede usar como sensibilizador para mejorar la eficacia de los *EGFR*-TKIs y superar la resistencia en pacientes con CPNM con mutación de *EGFR* y/o *KRAS* de tipo nativo (220).

En la **Tabla 15** se resumen las IC_{50} de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en las líneas celulares H1650, A549, H1975 y SW900 sembradas en formación de tumoresferas; en ausencia de valores de IC_{50} para las células crecidas en monocapa, por el bajo o nulo efecto citotóxico de estos fármacos frente a esta condición de cultivo celular a las 48 horas de tratamiento.

Tabla 15. IC_{50} de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en las líneas celulares H1650, A549, H1975 y SW900 en células crecidas en monocapa y en formación de esferas a las 48 horas de tratamiento.

IC_{50} (μM)	DSF	JMM 1-3	JMM 1-4
H1650 ESF	6,84	6,90	9,85
H1650 ADH	-	-	-
A549 ESF	0,35	8,46	12
A549 ADH	-	-	-
H1975 ESF	0,16	14,28	9,82
H975 ADH	-	-	-
SW900 ESF	4,34	8,34	10,07
SW900 ADH	-	-	-

(-) No se alcanzó a obtener la IC_{50} .

Dada la significancia de los datos obtenidos en las líneas celulares comerciales, se procedió a confirmar la eficacia de estos fármacos en los cultivos celulares primarios establecidos en nuestro laboratorio, a partir de tumores resecados de pacientes con distintas histologías de CPNM, en estadios

Resultados y Discusión

tempranos, con variado perfil mutacional y sin tratamiento previo. Para ello, DSF (PW2B8), JMM 1-3 (SG124F6) y JMM 1-4 (SG124G6) fueron validados en los cultivos primarios FIS299, FIS302, FIS303, FIS315, FIS317, FIS320 y FIS343.

Es así como, en la **Figura 40** se representa el ensayo de viabilidad celular en el paciente FIS299, con carcinoma de células escamosas PD-L1 > 70%, donde se observa que las tumoresferas respecto a las células crecidas en monocapa, resultaron ser más sensibles a los 3 fármacos de manera estadísticamente significativa; frente a DSF a 5 μ M y 20 μ M ($p < 0.001$), frente a JMM 1-3 en todas las concentraciones evaluadas a partir de 0,5 μ M ($p < 0.001$) y frente a JMM 1-4 a partir de 1 μ M en todas las concentraciones evaluadas ($p < 0.001$). Datos que supondrían la posibilidad de existir una mayor sensibilidad de las tumoresferas con expresión > 50% de PD-L1 frente a la acción de estos fármacos. La monoterapia con pembrolizumab se ha convertido en el tratamiento en primera línea para los pacientes con CPNM y una proporción tumoral de PD-L1 de al menos el 50%; y se ha descrito como la adición de quimioterapia a pembrolizumab mejora aún más los resultados de SG, SLP y la tasa de respuesta objetiva (ORR) en los pacientes con CPNMP avanzado con PD-L1 de al menos el 50% (221).

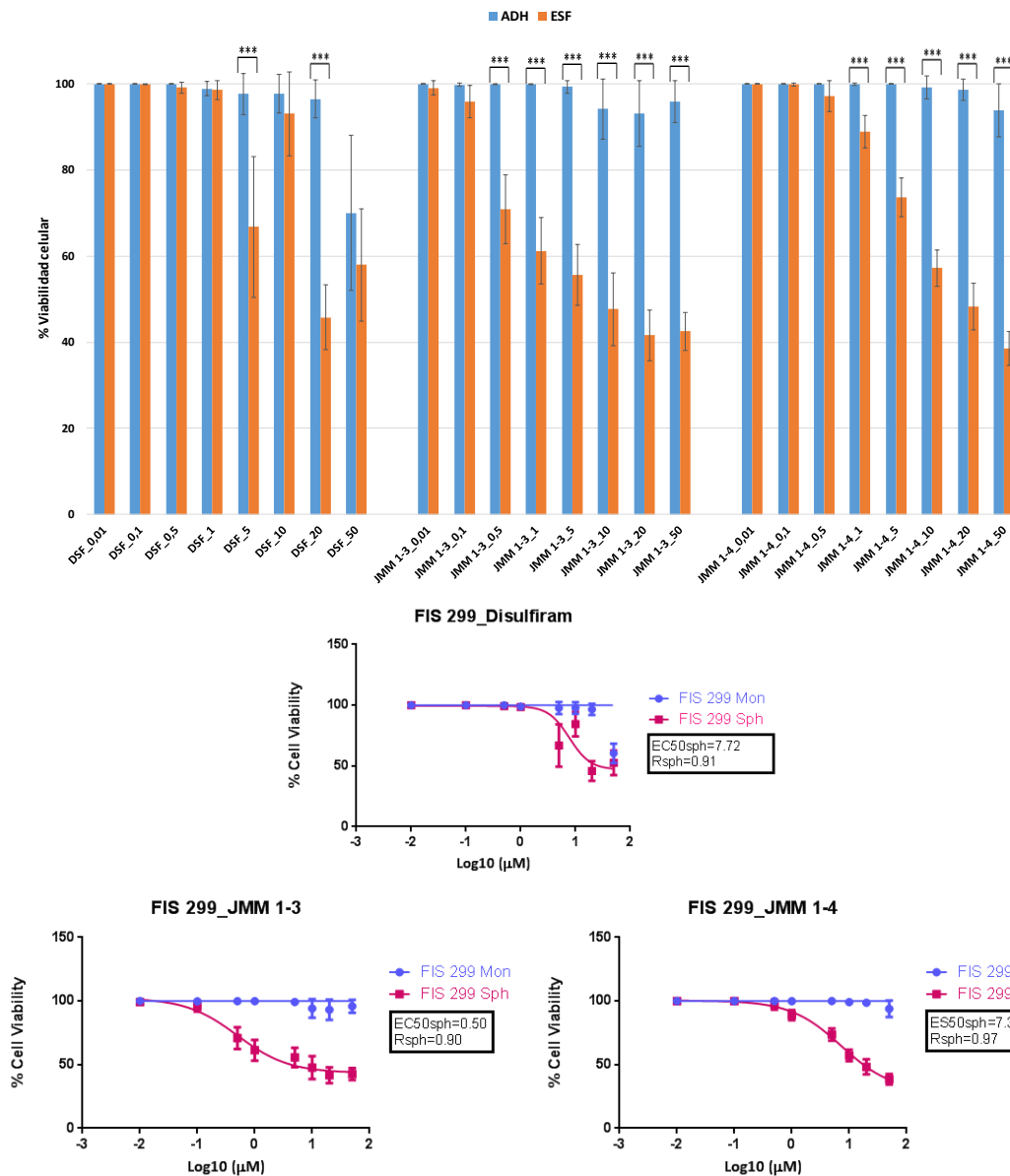


Figura 40. Superior: Porcentaje de viabilidad celular del paciente FIS299 en células crecidas monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en FIS299. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,01 µM; 0,1 µM; 0,5 µM; 1 µM; 5 µM; 10 µM; 20 µM y 50 µM. Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error. (*) <0.05, (**) <0.01, (***) <0.001.

De igual forma, en el paciente FIS302 con un tumor de histología de carcinoma poco diferenciado con la mutación *KRAS* G12D y PD-L1: 95%, se observó que las tumoresferas resultaron ser más sensibles a los 3 fármacos de manera estadísticamente significativa; frente a DSF entre 0,01 µM y 0,5 µM (p<0.001), a 1 µM (p<0.01) y a 5 µM (p<0.05), frente a JMM 1-3 entre 0,01 µM y 5 µM µM (p<0.001) y a 10 µM (p<0.05) y frente a JMM 1-4 a 20 µM (p<0.05) y al resto de concentraciones evaluadas (p<0.001) (**Figura 41**). Confirmándose en este paciente como la proporción tumoral de PD-L1 > 50% aunado a la coexistencia de la mutación *KRAS*, parecer aumentar aún más la sensibilidad de las tumoresferas con propiedades de CMTs frente a los 3 fármacos evaluados.

Resultados y Discusión

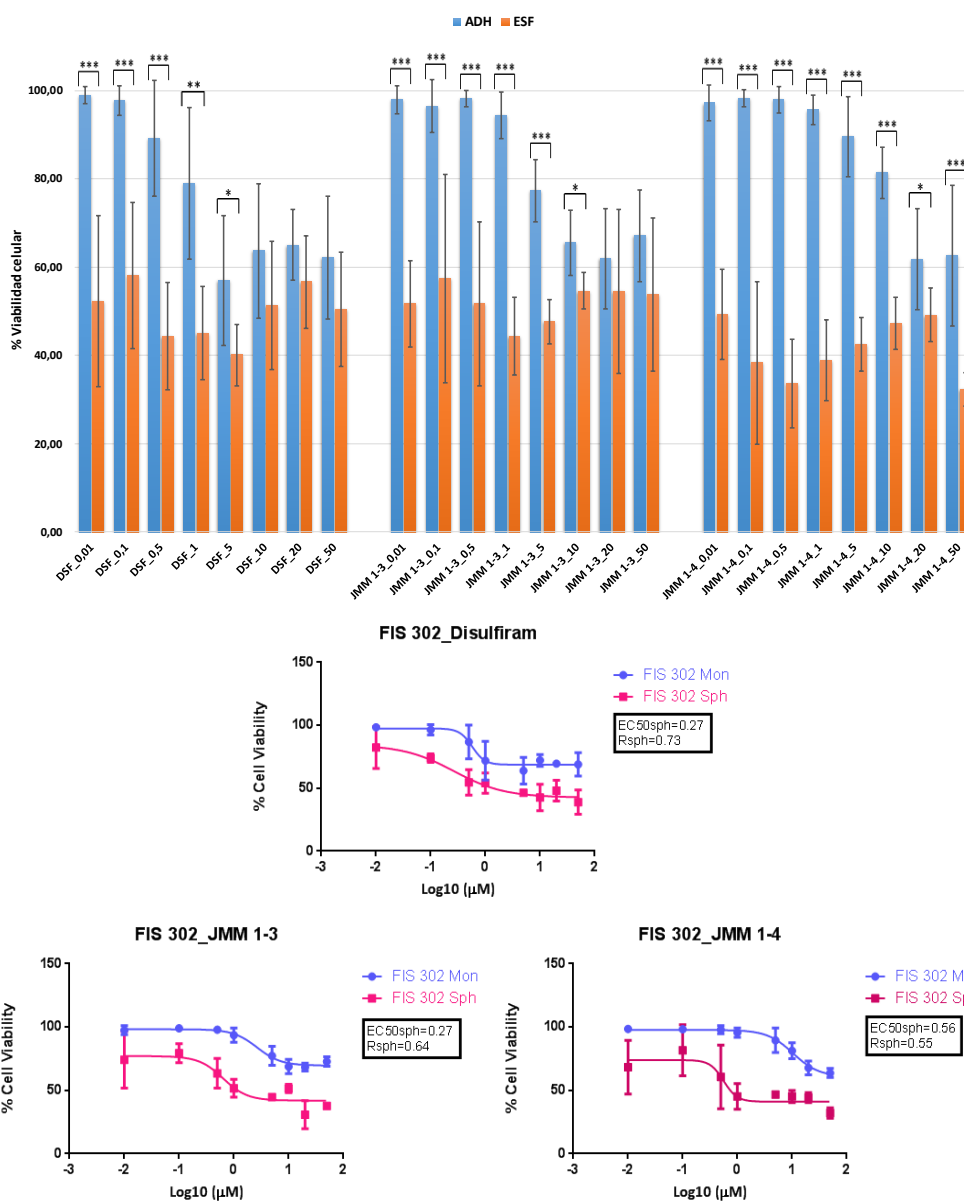


Figura 41. Superior: Porcentaje de viabilidad celular del paciente FIS302 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC₅₀ DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en FIS302. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,01 μM; 0,1 μM; 0,5 μM; 1 μM; 5 μM; 10 μM; 20 μM y 50 μM. Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error. (*) <0.05, (**) <0.01, (***) <0.001.

Mientras tanto, en el paciente FIS317 con carcinoma escamoso sin alteraciones moleculares encontradas, representado en la **Figura 42**, se observa que las tumoresferas respecto a las células crecidas en monocapa, resultaron ser más sensibles a los 3 fármacos de manera estadísticamente significativa; frente a DSF a 0,1 μM (p<0.01), a 1 μM (p<0.05) y entre 5 μM y 50 μM (p<0.001), frente a JMM 1-3 a 0,01 μM y entre 10 μM y 50 μM (p<0.01), a 0,1 μM y 0,5 μM (p<0.05) y a 1 μM y 5 μM (p<0.001) y frente a JMM 1-4 a 1 μM, 10 μM y 50 μM (p<0.01), a 5 μM (p<0.001) y a 20 μM (p<0.05).

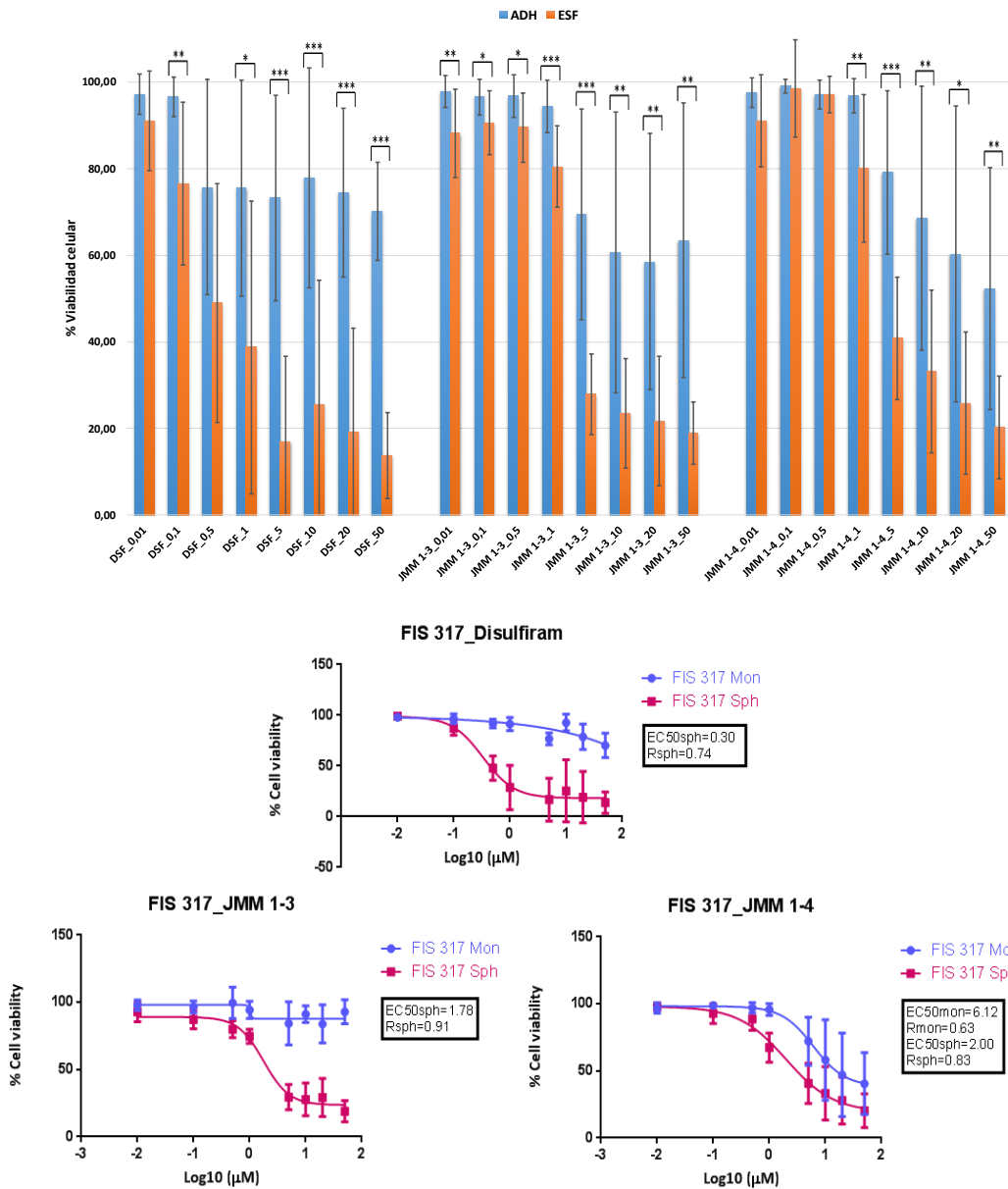


Figura 42. Superior: Porcentaje de viabilidad celular del paciente FIS317 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en FIS317. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,01 µM; 0,1 µM; 0,5 µM; 1 µM; 5 µM; 10 µM; 20 µM y 50 µM. Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error. (*) <0.05, () <0.01, (***) <0.001.**

Por otro lado, en cuanto a los ensayos de viabilidad celular en los pacientes con ADC, en el paciente FIS303 sin alteraciones moleculares encontradas, representado en la **Figura 43**, se observó como las esferas resultaron ser más sensibles a JMM 1-3 y JMM 1-4 de manera estadísticamente significativa; frente a JMM 1-3 a 0,5 µM (p<0.05) y frente a JMM 1-4 a 0,01 µM y 0,1 µM (p<0.001), a 0,5 µM (p<0.01) y 5 µM y 10 µM (p<0.05). Caso contrario a lo observado frente a DSF donde las esferas resultaron menos sensibles.

Resultados y Discusión

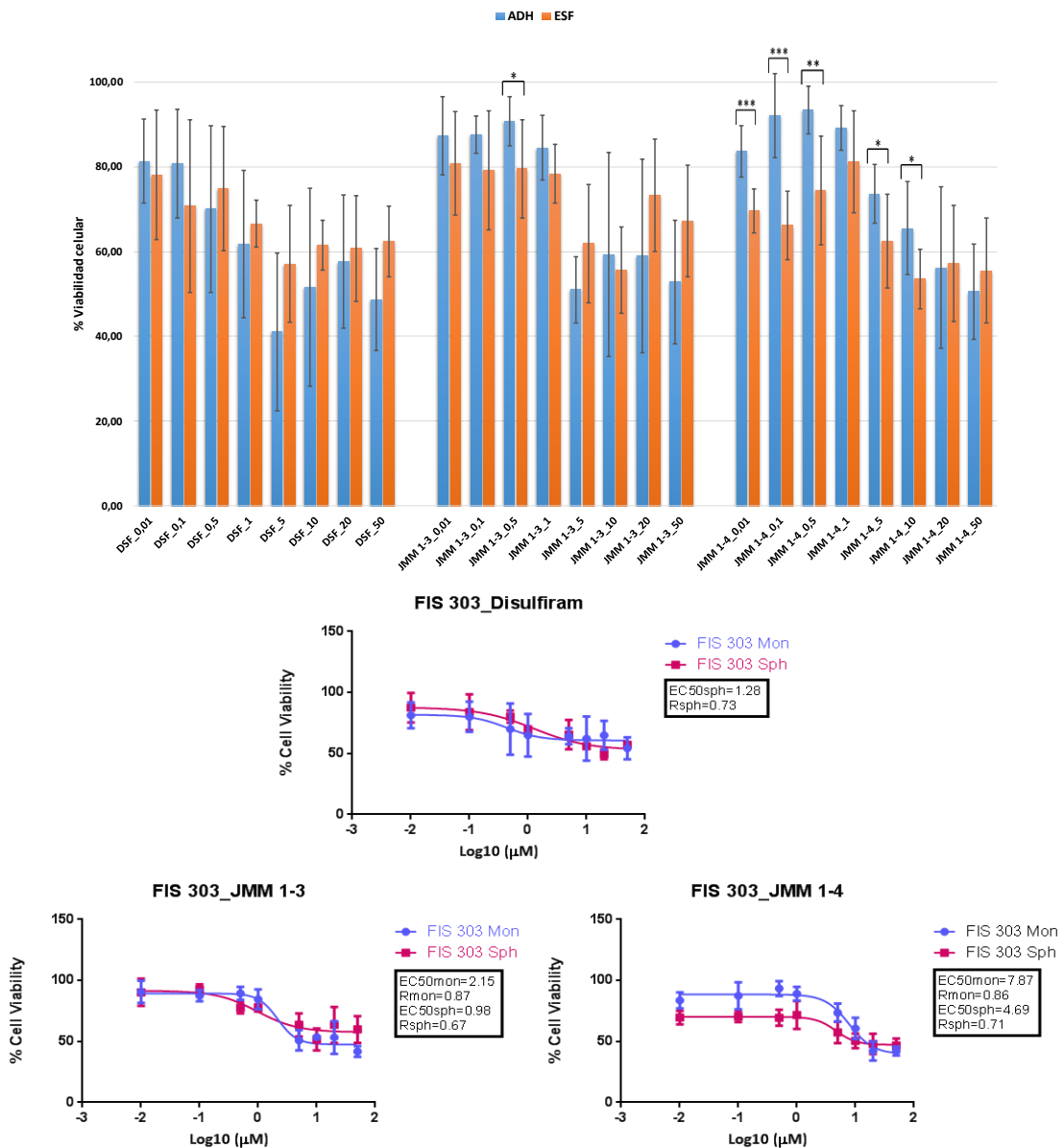


Figura 43. Superior: Porcentaje de viabilidad celular del paciente FIS303 en monocapa y en suspensión a las 48 horas de tratamiento con Doxorubicina, DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC₅₀ de Doxorubicina, DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en FIS303. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,01 μ M; 0,1 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M; 5 μ M; 10 μ M; 20 μ M y 50 μ M. Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error. (*) <0.05, (**) <0.01, (***) <0.001.

Así mismo, en el paciente FIS315 con ADC sin alteraciones moleculares encontradas, representado en la **Figura 44**, se observó que las tumoresferas resultaron ser más sensibles a los 3 fármacos de manera estadísticamente significativa; frente a DSF a 20 μ M y 50 μ M ($p < 0.05$), frente a JMM 1-3 a 0,01 μ M, 0,1 μ M, 5 μ M y 10 μ M ($p < 0.05$), a 0,5 μ M, 20 μ M y 50 μ M ($p < 0.01$) y frente a JMM 1-4 a 1 μ M ($p < 0.001$), a 5 μ M y 10 μ M ($p < 0.05$) y a 50 μ M ($p < 0.01$).

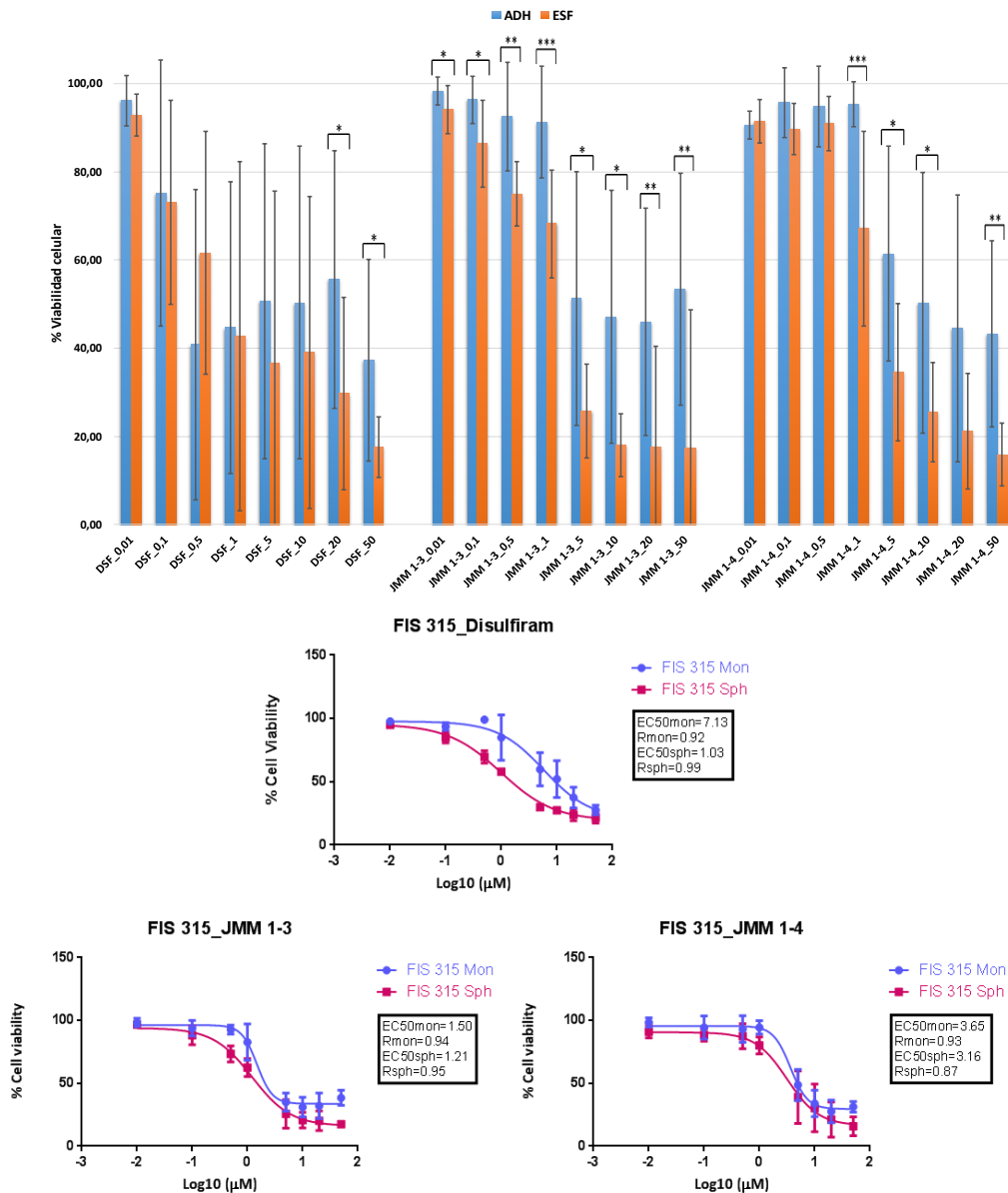


Figura 44. Superior: Porcentaje de viabilidad celular del paciente FIS315 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en FIS315. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,01 µM; 0,1 µM; 0,5 µM; 1 µM; 5 µM; 10 µM; 20 µM y 50 µM. Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error. (*) <0.05, (**) <0.01, (***) <0.001.

En la **Figura 45** se representa el paciente FIS320 con un tumor de histología de ADC sin alteraciones moleculares encontradas, donde se observa como al igual que en los pacientes FIS303 y FIS315, las tumoresferas respecto a las adherentes resultaron ser más sensibles a los 3 fármacos de manera estadísticamente significativa; frente a DSF a 0,01 µM, 5 µM y 10 µM (p<0.05) y a 0,1 µM (p<0.001), frente a JMM 1-3 a 0,01 µM, 1 µM y 50 µM (p<0.01) y a 0,1 µM y 0,5 µM (p<0.001) y frente a JMM 1-4 a 0,01 µM y 1 µM (p<0.01), a 0,1 µM y 0,5 µM (p<0.001) y a 50 µM (p<0.05).

Resultados y Discusión

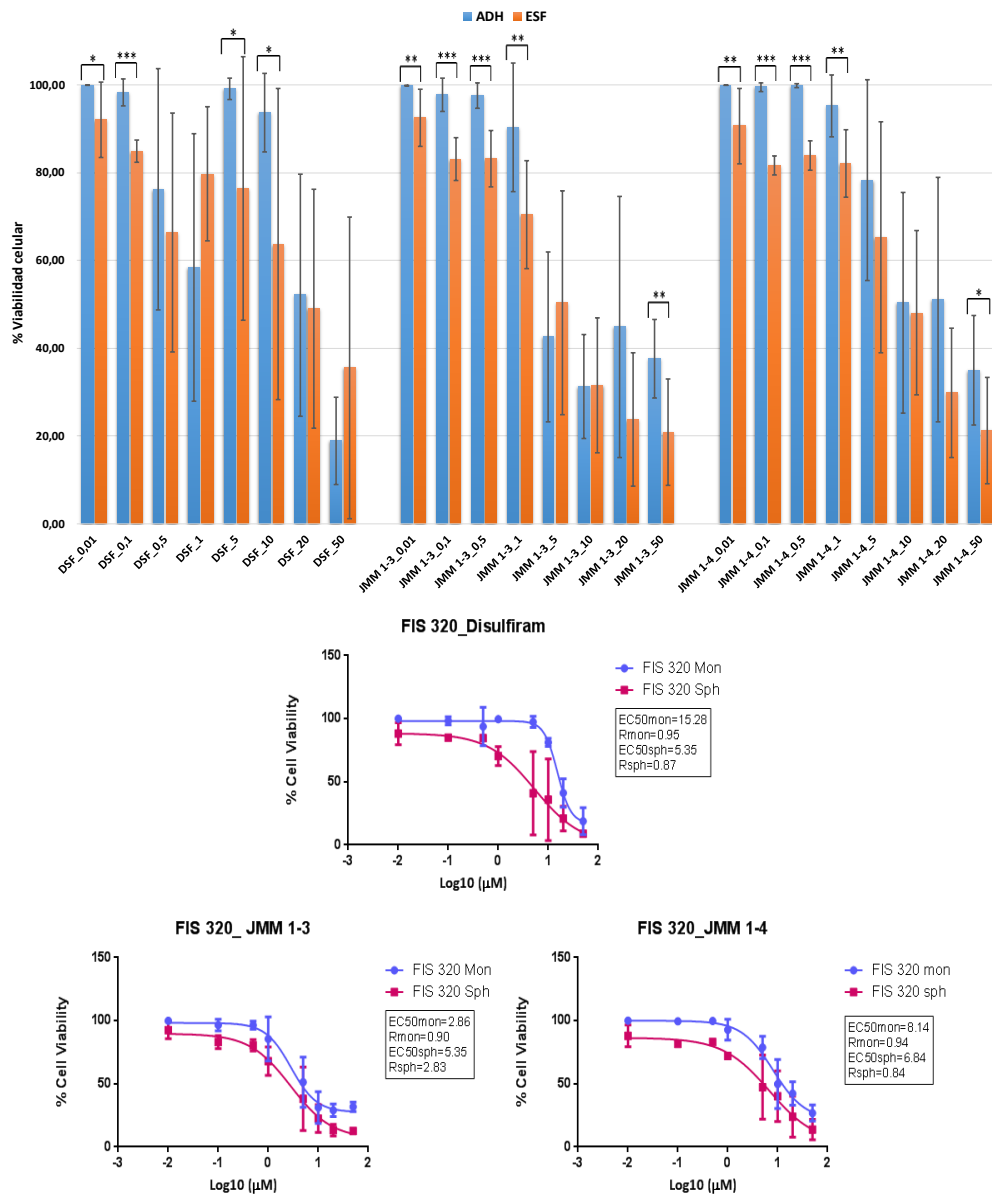


Figura 45. Superior: Porcentaje de viabilidad celular del paciente FIS320 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en FIS320. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,01 μM; 0,1 μM; 0,5 μM; 1 μM; 5 μM; 10 μM; 20 μM y 50 μM. Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error. (*) <0.05, () <0.01, (***) <0.001.**

Por el contrario, en el paciente FIS343 con ADC PD-L1 2% representado en la **Figura 46**, se observó que las tumoresferas respecto a las adherentes, resultaron ser sensibles a DSF de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$) tan sólo a 0,1 μM y 1 μM y frente a JMM 1-3 y JMM 1-4, no hubo diferencias significativas entre ambas condiciones en la mayoría de las concentraciones evaluadas, a excepción de JMM 1-4 a 20 μM, en la cual las tumoresferas se mostraron resistentes de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$) frente a las adherentes.

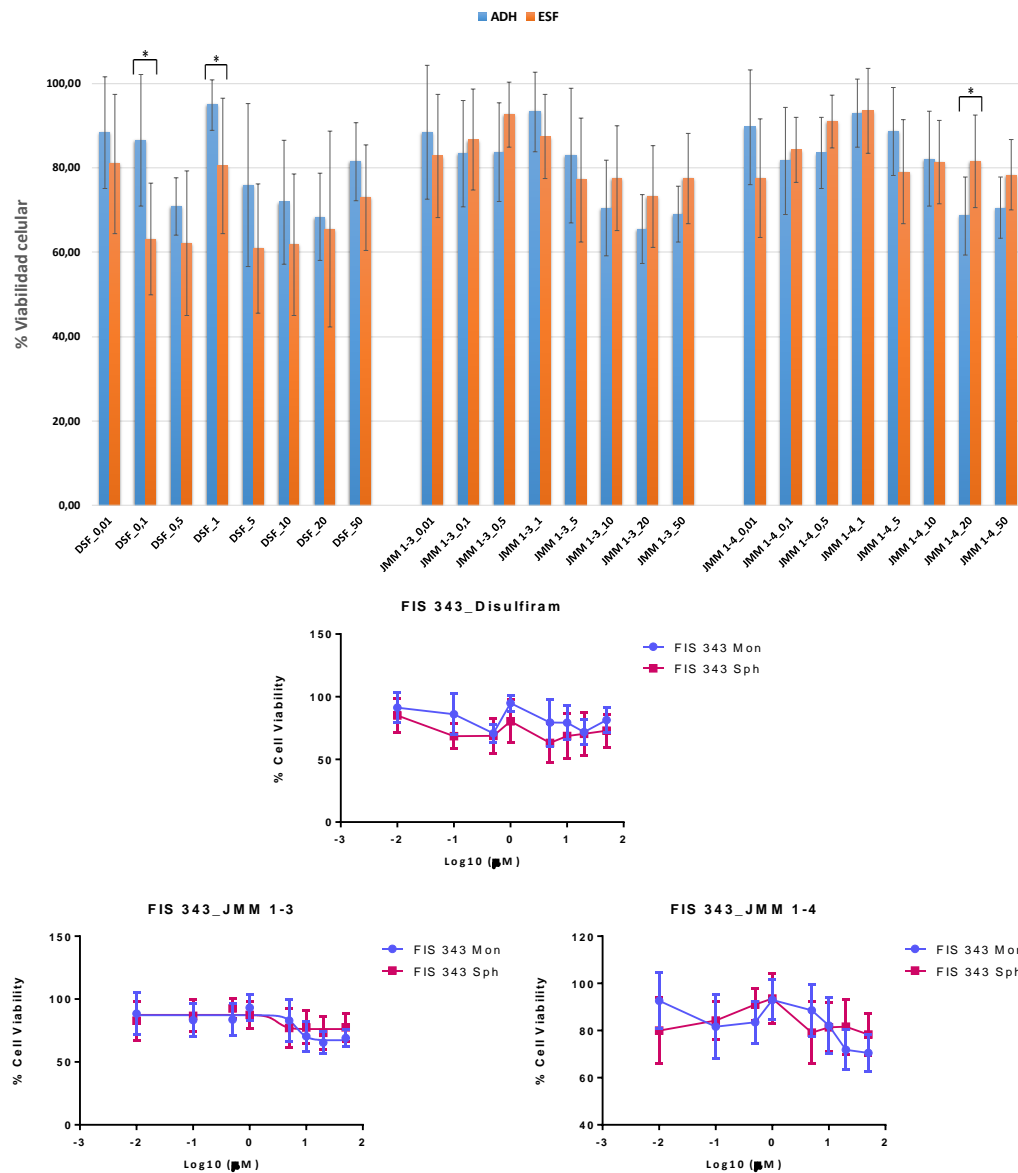


Figura 46. Superior: Porcentaje de viabilidad celular del paciente FIS343 en células crecidas en monocapa y en formación de tumoresferas a las 48 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4. Inferior: IC50 de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en FIS343. Las concentraciones de los fármacos usadas fueron: 0,01 μM ; 0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 20 μM y 50 μM . Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error. (*) <0.05, () <0.01, (***) <0.001.**

En resumen, estos hallazgos confirman el potencial efecto citotóxico de estos fármacos frente a las tumoresferas de la mayoría de los cultivos primarios de CPNM establecidos, independientemente del subtipo histológico y perfil mutacional. He aquí el valor de los cultivos primarios como plataformas de cribado farmacológico, siendo la mejor aproximación al tumor. En la **Tabla 16** se resumen las IC₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en los diferentes cultivos primarios sembrados en monocapa y en formación de esferas; donde se observa ausencia de valores de IC₅₀ para las células crecidas en monocapa en los pacientes FIS299 y FIS302, por el bajo o nulo efecto citotóxico de estos fármacos frente a esta condición de cultivo celular a las 48 horas de tratamiento; además de la

Resultados y Discusión

destacable baja sensibilidad del paciente FIS343 a los tres fármacos al no obtener valores de IC₅₀ en ambas condiciones de cultivo.

Tabla 16. IC₅₀ de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en los cultivos primarios sembrados en monocapa y en formación de esferas a las 48 horas de tratamiento.

IC ₅₀ (µM)	DSF	JMM 1-3	JMM 1-4
FIS299 ESF	7,72	0,50	7,33
FIS299 ADH	-	-	-
FIS302 ESF	0,27	0,27	0,56
FIS302 ADH	-	-	-
FIS303 ESF	1,28	0,98	4,69
FIS303 ADH	-	2,15	7,87
FIS315 ESF	1,03	1,21	3,16
FIS315 ADH	7,13	1,50	3,65
FIS317 ESF	0,30	1,78	2,00
FIS317 ADH	-	-	6,12
FIS320 ESF	5,35	5,35	6,84
FIS320 ADH	15,28	2,86	8,14
FIS343 ESF	-	-	-
FIS343 ADH	-	-	-

(-) No se alcanzó a obtener la IC₅₀.

En la **Figura 47** se resume el cribado farmacológico masivo de alto rendimiento realizado *in vitro* en el presente estudio.

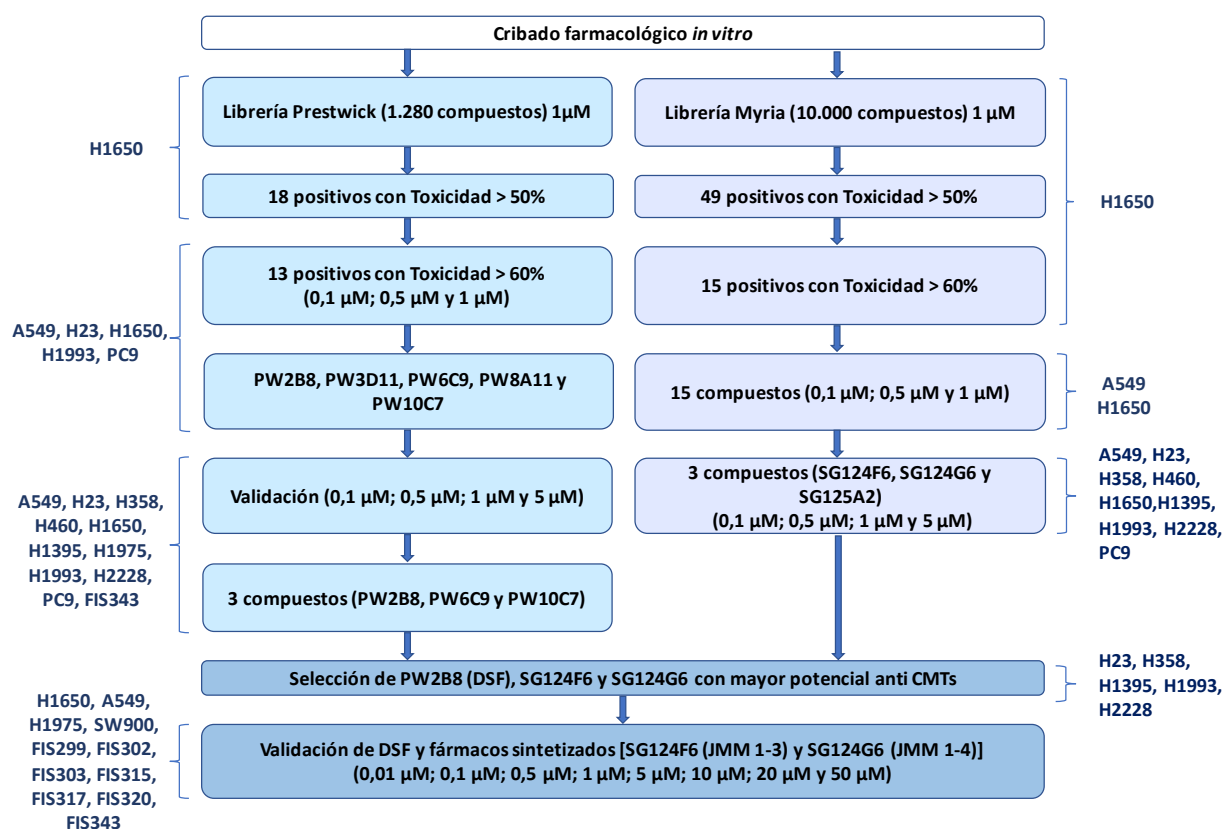


Figura 47. Resumen del cribado farmacológico *in vitro* de alto rendimiento realizado en el presente estudio.

A continuación, se procedió a confirmar las toxicidades de los 3 fármacos seleccionados mediante otras metodologías, con el objetivo de intentar comprender los posibles mecanismos de acción frente a las tumoresferas con características de CMTs de CPNM. Para ello, se emplearon la línea celular H1650 seleccionada como línea modelo y el paciente FIS343 seleccionado como control negativo, por los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular.

5. CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN FARMACOLÓGICA

5.1. ENSAYOS DE APOPTOSIS CON ANEXINA

Se realizaron ensayos de apoptosis para determinar el porcentaje de muerte celular. Estos ensayos fueron realizados mediante el análisis de anexina en células individuales procedentes de cultivos en monocapa y en formación de esferas, disgregadas y analizadas por citometría de flujo posterior a 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 a dosis de 10 μ M.

El ensayo de apoptosis a las 24 horas de tratamiento en las células crecidas en formación de esferas de la línea celular H1650 representado en la **Figura 48**, reportó que en el control (CNT, células no tratadas) tan sólo el 15,35% de las células se encontraban en apoptosis (temprana/tardía), a diferencia las células tratadas con JMM 1-3 (46,23%) y JMM 1-4 (35,91%); confirmando los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular, donde a dosis de 10 μ M estos fármacos inhibían las esferas de manera estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Contrario a lo observado en las células crecidas en monocapa, donde en los ensayos de viabilidad celular el efecto de estos fármacos era pobre o nulo, reflejado en el bajo porcentaje de apoptosis, tanto en el CNT (9,54%) como en las células tratadas con DSF (12,35%), JMM 1-3 (10,83%) y JMM 1-4 (8,54%) (**Figura 49**).

Resultados y Discusión

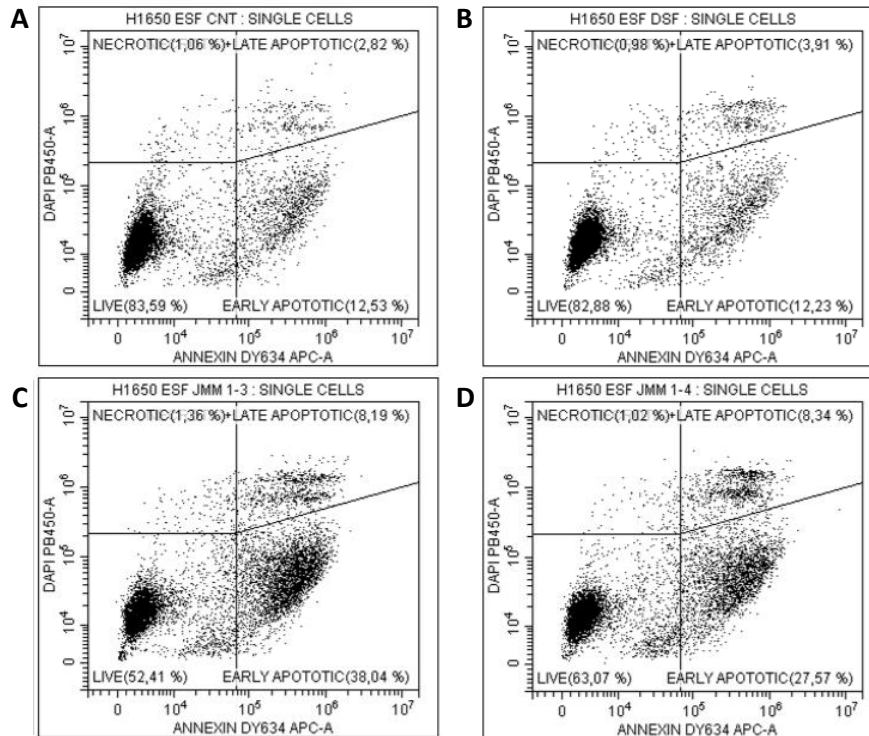


Figura 48. Análisis de Anexina en células crecidas en formación de esferas de la línea celular H1650 a las 24 horas de tratamiento. A) CNT, B) DSF, C) JMM 1-3, D) JMM 1-4. Cuadrante inferior izquierdo: % de células vivas; Cuadrante inferior derecho: % de células en apoptosis temprana; Cuadrante superior derecho: % de células en apoptosis tardía; Cuadrante superior izquierdo: % de células en necrosis. CNT: Células no tratadas.

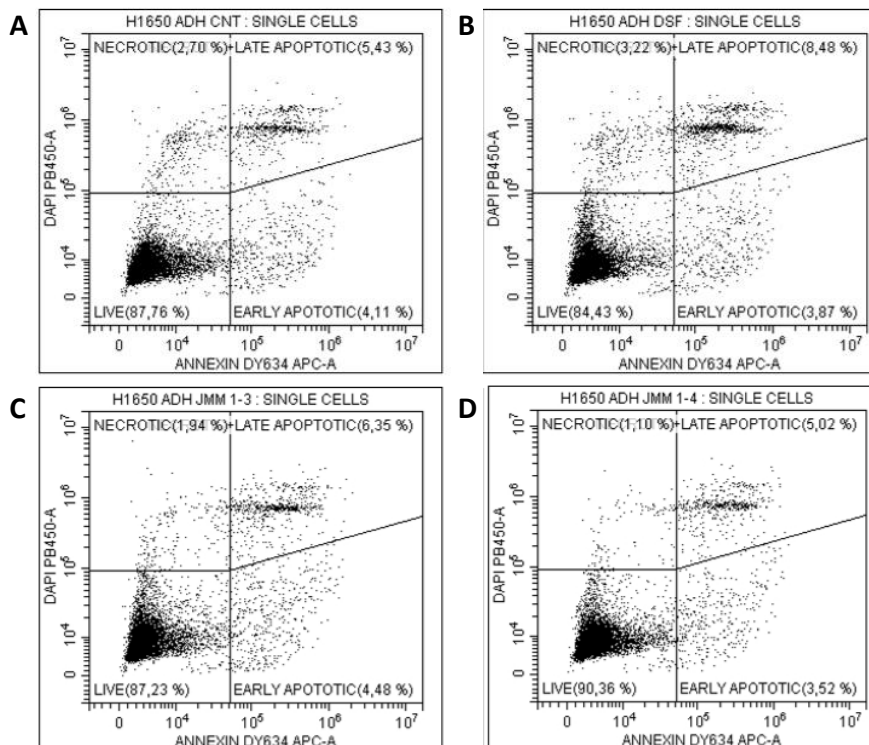


Figura 49. Análisis de Anexina en células crecidas en monocapa de la línea celular H1650 a las 24 horas de tratamiento. A) CNT, B) DSF, C) JMM 1-3, D) JMM 1-4. Cuadrante inferior izquierdo: % de células vivas; Cuadrante inferior derecho: % de células en apoptosis temprana; Cuadrante superior derecho: % de células en apoptosis tardía; Cuadrante superior izquierdo: % de células en necrosis. CNT: Células no tratadas.

Por otro lado, cuando analizamos los experimentos realizados en el cultivo primario FIS343 que resultó ser menos sensible a la terapia con estos 3 fármacos en los ensayos de viabilidad celular, se confirmó el bajo efecto inductor de apoptosis en ambas condiciones, pero en menor proporción en las células crecidas en formación de tumoresferas. Tal y como se representa en la **Figura 50** para la esferas, donde se reportó apoptosis en el 13,81% de las células CNT, similar a las células tratadas con DSF (13,69%), JMM 1-3 (11,96%) y JMM 1-4 (10,28%); y a las células CNT crecidas en monocapa (14,71%) y tratadas con DSF (14,58%), JMM 1-3 (20,36%) y JMM 1-4 (16,87%) (**Figura 51**).

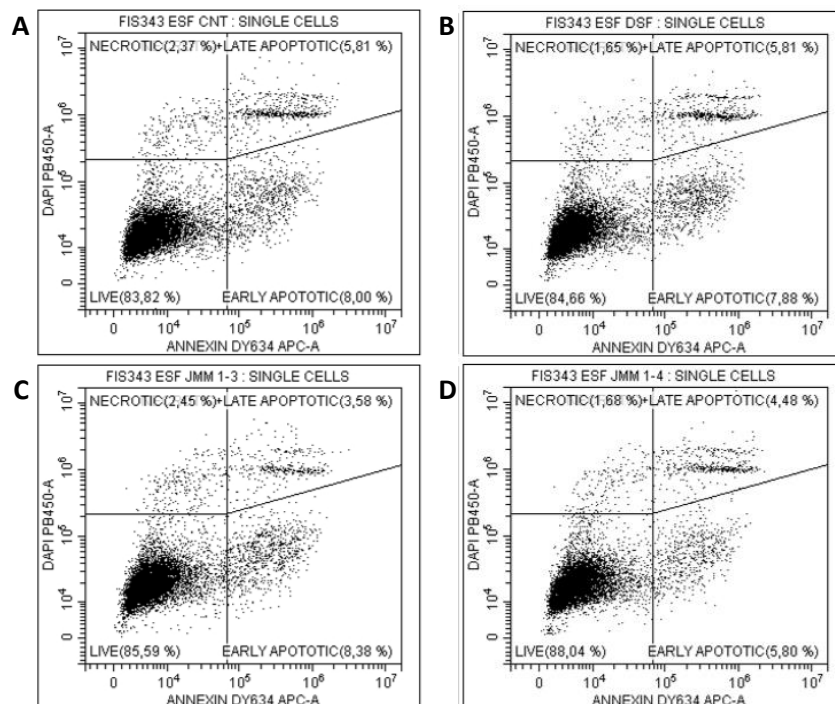


Figura 50. Análisis de Anexina en células crecidas en formación de esferas del cultivo primario FIS343 a las 24 horas de tratamiento. A) CNT, B) DSF, C) JMM 1-3, D) JMM 1-4. Cuadrante inferior izquierdo: % de células vivas; Cuadrante inferior derecho: % de células en apoptosis temprana; Cuadrante superior derecho: % de células en apoptosis tardía; Cuadrante superior izquierdo: % de células en necrosis. CNT: Células no tratadas.

Resultados y Discusión

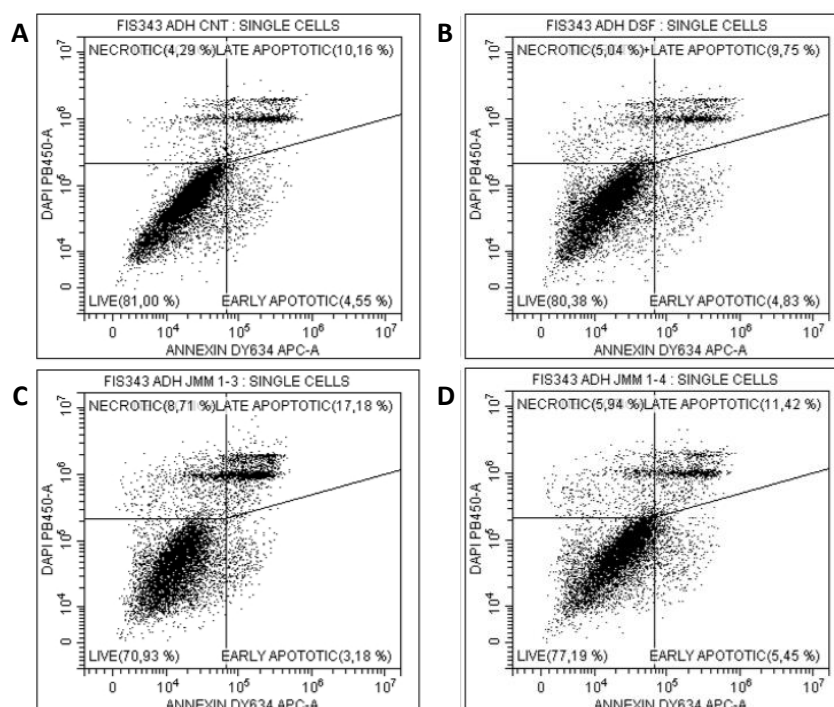


Figura 51. Análisis de Anexina en células crecidas en monocapa del cultivo primario FIS343 a las 24 horas de tratamiento. A) CNT, B) DSF, C) JMM 1-3, D) JMM 1-4. Cuadrante inferior izquierdo: % de células vivas; Cuadrante inferior derecho: % de células en apoptosis temprana; Cuadrante superior derecho: % de células en apoptosis tardía; Cuadrante superior izquierdo: % de células en necrosis. CNT: Células no tratadas.

En líneas generales, estos ensayos revelaron un mayor porcentaje de apoptosis en las esferas de la línea celular H1650 tratadas principalmente con JMM 1-3 y JMM 1-4; en comparación con el CNT, las células crecidas en monocapa y el cultivo primario FIS343, del cual se confirmó su baja sensibilidad a estas terapias.

En el año 2014, Dastjerdi MN et al. utilizando la línea celular de cáncer pancreático humano PANC-1, reportaron aumento de la proporción de células que entraron en apoptosis; en un 6% posterior al tratamiento con DSF a 5 μ M, en un 47% a 10 μ M y en un 57% a dosis de 13 μ M respecto a las células no tratadas (222). Por otro lado, en el año 2018, Wu Xi et al. reportaron que DSF aumentó la proporción de células apoptóticas de cáncer de pulmón; el porcentaje de apoptosis en el grupo tratado con DSF en comparación con los controles no tratados fue del 35,4% vs. 2,5% para A549, 21,4% vs. 4,7% para H460, y 37,9% vs. 8,7% para H1299 (223), obteniendo resultados similares a los nuestros. En líneas celulares de cáncer de pulmón como A549 y H460 también se ha descrito el análisis de anexina por citometría de flujo, para el estudio de apoptosis inducida por fármacos, tal es el caso del cisplatino como tratamiento en el cáncer de pulmón no microcítico (224).

Estos resultados remarcan la evidencia del potencial efecto inductor de apoptosis celular que estos fármacos poseen frente a las tumoresferas en nuestro estudio. Tal y como se han descrito, los mecanismos de muerte celular inducidos por el DSF resultan ser signos de apoptosis, es decir; fragmentación/condensación nuclear y activación de caspasa 3 que se produce después de 24 horas, con la posterior permeabilización de membrana, desprendimiento de sustratos e inducción de apoptosis y necrosis después de las 48 horas (225). Además, se ha informado ampliamente que DSF induce apoptosis en células tumorales humanas, incluyendo células de melanoma (226), células de cáncer de mama (227), células de mesotelioma pleural (228), células de cáncer de páncreas (222), células de leucemia mieloide (229), células de glioblastoma (230), células de cáncer colorrectal (231) y células de adenocarcinoma cervical (232).

Para tratar de comprender el mecanismo de inducción de apoptosis de estos fármacos, se procedió a analizar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) por microscopia de fluorescencia, dado que ROS ha sido considerado un activador de apoptosis y autofagia en cáncer a través de la vía de señalización ROS-p38 MAPK.

5.2. VÍA DE SEÑALIZACIÓN ROS-p38 MAPK

5.2.1. ANÁLISIS DE ROS

La apoptosis tiene dos vías bien definidas, intrínseca y extrínseca. Estas vías implican la ruptura de la membrana mitocondrial que libera citocromo c en el citoplasma, que activa la caspasa 9, 3 e induce el receptor de FAS (CD95) y la caspasa 8 respectivamente. Se ha descrito que la generación de ROS induce ambas vías apoptóticas (233).

Los ensayos para evaluar cualitativamente los niveles de ROS intracelular en la línea H1650 mediante microscopía de fluorescencia, revelaron un aumento en el nivel de superóxido intracelular en las esferas tratadas por 24 horas con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al control (CNT, esferas no tratadas) (**Figura 52**) y las células crecidas en monocapa (**Figura 53**).

Resultados y Discusión

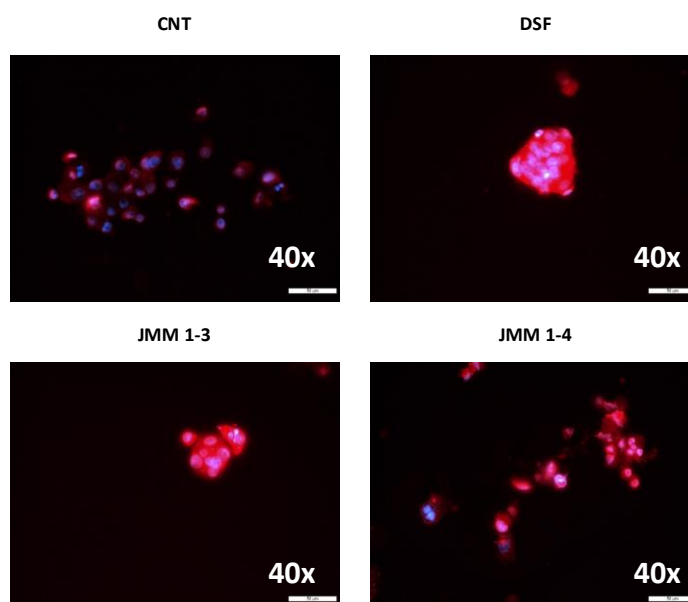


Figura 52. Evaluación de ROS intracelular (fluorocromo rojo) por microscopía de fluorescencia en tumoresferas de la línea celular H1650 a las 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al Control (CNT). Núcleos marcados con DAPI: fluorocromo azul.

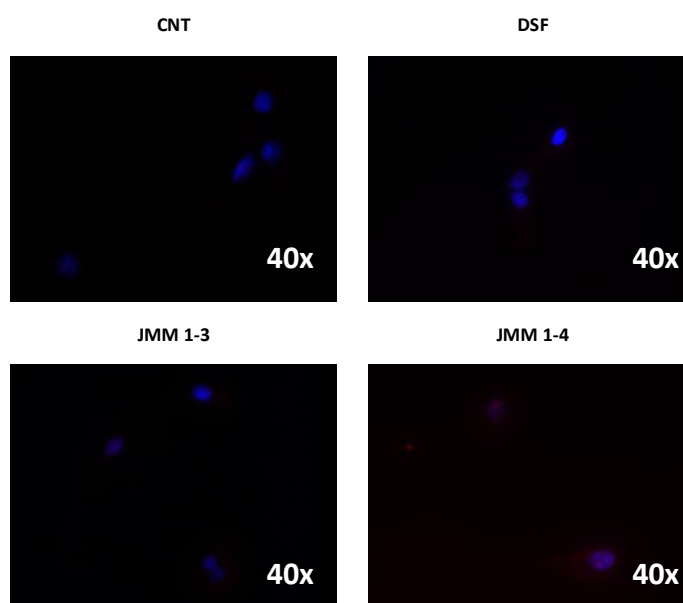


Figura 53. Evaluación de ROS intracelular (fluorocromo rojo) por microscopía de fluorescencia en células sembradas en monocapa de la línea celular H1650 a las 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al Control (CNT). Núcleos marcados con DAPI: fluorocromo azul.

Por otro lado, en el paciente FIS343, pese a la baja sensibilidad a nuestros fármacos reportada en los ensayos de viabilidad celular y apoptosis, también parece haber activación de ROS intracelular en mayor proporción en las tumoresferas tratadas por 24 horas con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al control (CNT, esferas no tratadas) (**Figura 54**) y las células crecidas en monocapa (**Figura 55**), pero en menor cantidad que la observada en las esferas de la línea celular H1650.

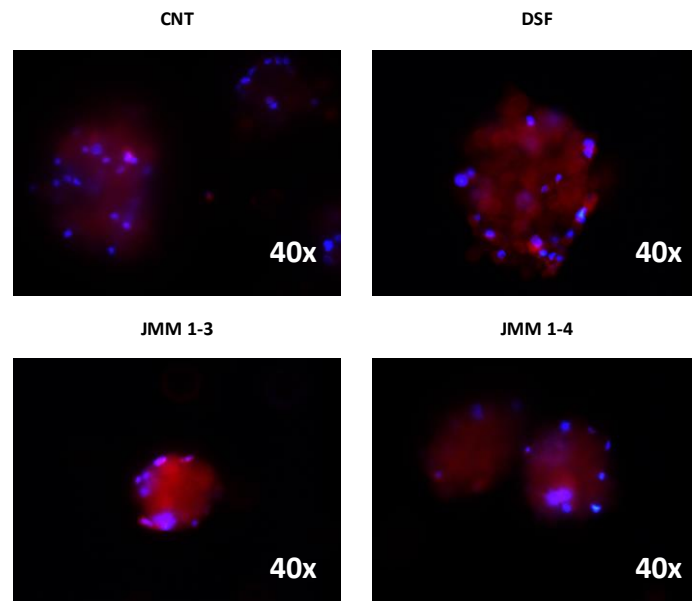


Figura 54. Evaluación de ROS intracelular (fluorocromo rojo) por microscopía de fluorescencia en tumoresferas del cultivo primario FIS343 a las 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al Control (CNT). Núcleos marcados con DAPI: fluorocromo azul.

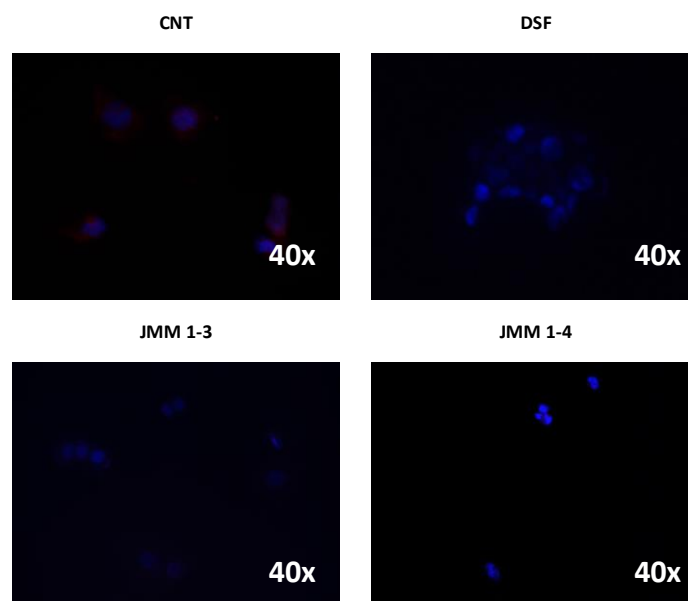


Figura 55. Evaluación de ROS intracelular (fluorocromo rojo) por microscopía de fluorescencia en células sembradas en monocapa de la línea celular H1650 a las 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al Control (CNT). Núcleos marcados con DAPI: fluorocromo azul.

Estos datos fueron confirmados mediante la técnica de citometría de flujo que permitió cuantificar los niveles de ROS generados a nivel intracelular, como posible mecanismo inductor de apoptosis de nuestros fármacos. Para ello, los niveles de MitoSOX™ se evaluaron en función de la intensidad media de fluorescencia detectada de ECD (colorante de acoplamiento electrónico) en un total de 10.000 células vivas individuales analizadas en el citómetro de flujo Cytomics FC500-MCL. Resultados que

Resultados y Discusión

demonstraron una mayor activación de ROS en las células tratadas crecidas en formación de esferas de la línea celular H1650 (**Figura 56**) en comparación con las esferas CNT, las células crecidas en monocapa y el cultivo primario FIS343 en ambas condiciones de crecimiento (**Figura 57**).

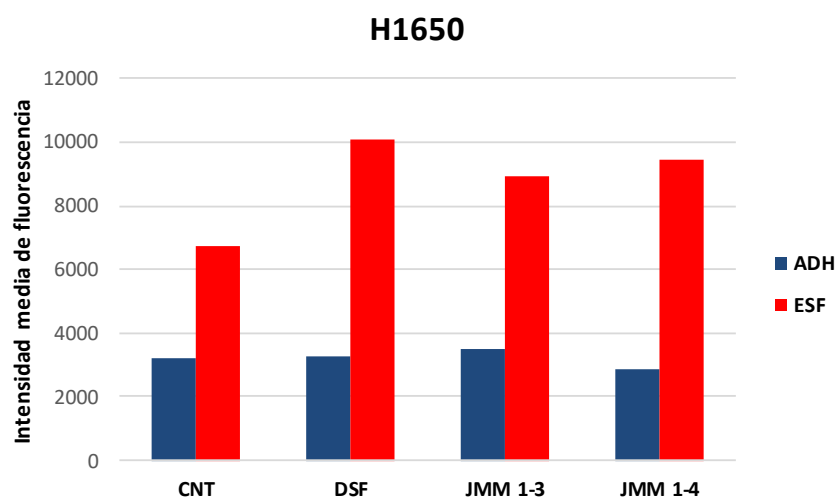


Figura 56. Intensidad media de fluorescencia detectada por citometría de flujo de MitoSOXTM en células crecidas en monocapa y en formación de esferas de la línea celular H1650, posterior a 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al Control (CNT).

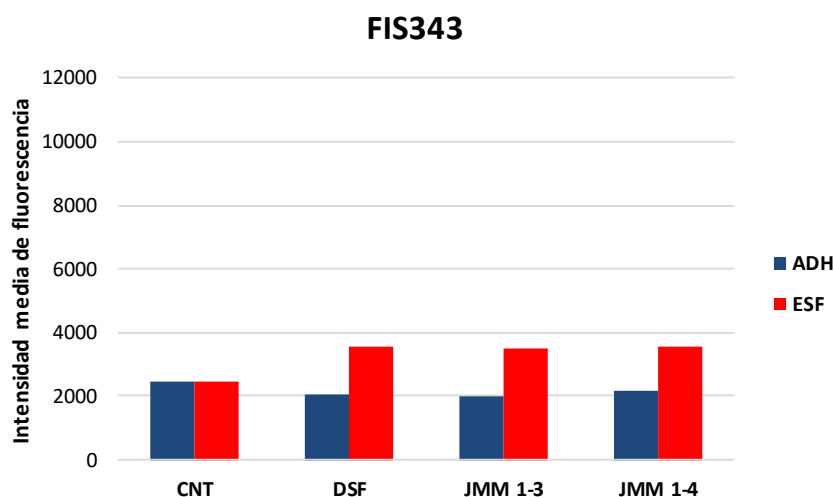


Figura 57. Intensidad media de fluorescencia detectada por citometría de flujo de MitoSOXTM en células crecidas en monocapa y en formación de esferas del paciente FIS343, posterior a 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al Control (CNT).

Se ha reportado que la generación de ROS induce las vías apoptóticas mediante la regulación de la cascada de caspasas y la activación de las vías de señalización Fas, ERK $\frac{1}{2}$ y ROS-p38 MAPK (234–238). Como ejemplo el Nimbolide, una nueva terapia contra el cáncer que actúa mediante la modulación de múltiples mecanismos en las células tumorales de osteosarcoma; este fármaco induce apoptosis al

aumentar el estrés del retículo endoplásmico, disfunción mitocondrial, acumulación de ROS y, por último, activación de caspasas. También se determinó que Nimbolide es capaz de inhibir la migración celular, siendo crucial para las metástasis a distancia (239).

Para continuar con la evaluación de la vía de señalización ROS-p38 MAPK en las tumoresferas de CPNM, una vez confirmada la generación de ROS por los 3 fármacos seleccionados, se realizaron ensayos de determinación de p38 por inmunofluorescencia para terminar de confirmar la activación de esta vía como posible mecanismo de apoptosis celular.

5.2.2. ANÁLISIS DE p38

Los ensayos de determinación de p38 por inmunofluorescencia a las 24 horas de tratamiento, han demostrado que la generación de ROS activa p38 en las esferas de la línea H1650 tratadas con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al CNT (**Figura 58**) y a las células en monocapa (**Figura 59**). Lo que parece indicar que la generación de ROS induce la activación de la vía de señalización p38-MAPK en las tumoresferas de pulmón con características de CMTs, induciendo apoptosis; tal y como se ha descrito anteriormente por ejemplo en osteosarcoma por el Nimbolide (239) y células de cáncer de mama por el Geraniin y el DSF (238,240). Además, se ha demostrado que la inactivación de p38 es un mecanismo potencial que contribuye a la adquisición y el mantenimiento de las propiedades de las CMTs en el CPNM (241).

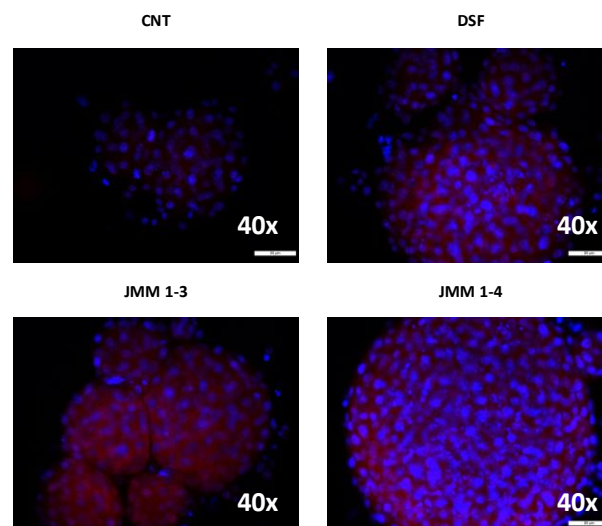


Figura 58. Determinación de p38 (fluorocromo rojo) por inmunofluorescencia en células crecidas en formación de esferas de la línea H1650 a las 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al Control (CNT). Núcleos marcados con DAPI: fluorocromo azul.

Resultados y Discusión

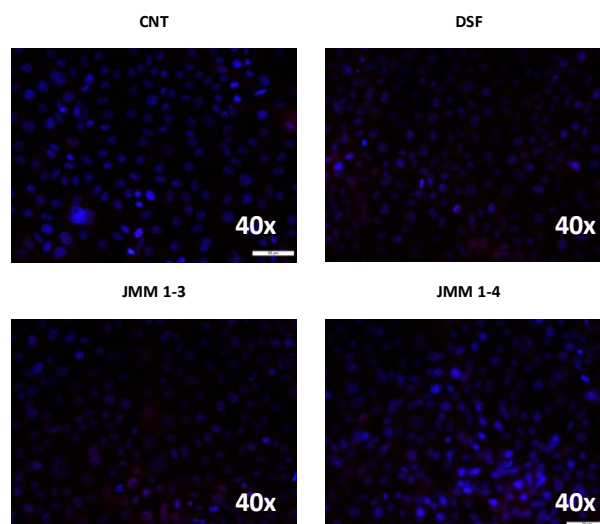


Figura 59. Determinación de p38 (fluorocromo rojo) por inmunofluorescencia en células crecidas en formación de esferas de la línea H1650 a las 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M) respecto al Control (CNT). Núcleos marcados con DAPI: fluorocromo azul.

Nos planteamos como posible mecanismo inductor de apoptosis de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4, la activación de la vía de señalización ROS-p38 MAPK en las tumoresferas de pulmón con propiedades de CMTs (**Figura 60**). Similar a estos hallazgos, en 2014, Chiba et al. encontraron que el DSF inhibía las células de carcinoma hepatocelular iniciadoras de tumor a través de la inducción de apoptosis, de maneras dependiente o independiente de la activación de la vía de señalización ROS-p38 MAPK; además de demostrar que el DSF induce inhibición de autorenovación traducida en diferenciación celular (216).

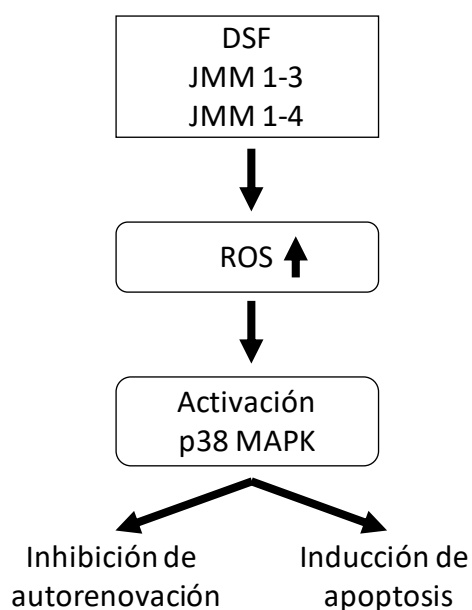


Figura 60. Posible mecanismo de inducción de apoptosis de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 en la línea H1650.

Hallazgos microscópicos encontrados en las tumoresferas de la línea celular H1650 posterior a 24 horas de tratamiento con JMM 1-4 a dosis de 10 μM se detallan en la **Figura 61**. Donde se aprecia el anticuerpo Anti-p38 (fluorocromo rojo) a nivel citoplasmático (flechas blancas) y los núcleos identificados con DAPI (fluorocromo azul); destacando que, aunque la mayoría de los núcleos presentan una morfología normal, se pueden apreciar algunos fragmentados correspondientes a células apoptóticas (flechas amarillas).

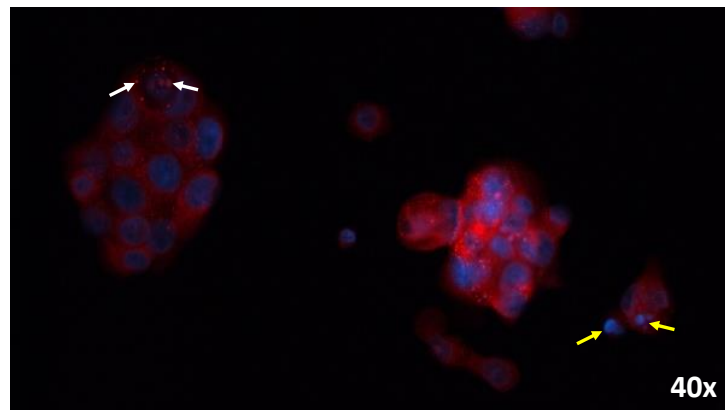


Figura 61. Tumoresferas de la línea H1650 a las 24 horas de tratamiento con JMM 1-4 (10 μM), con marcador Anti-p38 (fluorocromo rojo) capturado a nivel de vesículas (flechas blancas) y liberado a nivel citoplasmático, además de núcleos fragmentados marcados con DAPI (fluorocromo azul) correspondientes a células apoptóticas (flechas amarillas). Imagen captada por inmunofluorescencia.

Estos resultados postulan la vía p38-MAPK como posible diana para las terapias contra el cáncer destinadas a eliminar las CMTs; sin embargo, es necesario continuar con estudios que intenten caracterizar aún más los posibles mecanismos de acción farmacológica implicados en la toxicidad de los agentes seleccionados. Para ello se procedió a realizar estudios de expresión génica relativa mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RTqPCR).

5.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Los análisis de expresión génica se realizaron empleando células en monocapa y en formación de tumoresferas de la línea celular H1650. Los genes *ALDH1A1*, *SOX2*, *SNAIL1*, *MMP9* y *COX2* se analizaron debido a su posible implicación en la adquisición y mantenimiento de propiedades características de las CMTs. Además, cinco genes endógenos (*ACTB*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1* y *CDKN1B*) fueron analizados para seleccionar y establecer los controles internos más estables. Para este propósito, utilizamos el software geNorm, que indicaba que la combinación de *ACTB*, *CDKN1B* y *GUSB* era la opción más estable. Siguiendo el procedimiento propuesto por Vandesompele et al. (2002), se calculó un factor de normalización basado en la expresión de estos tres genes endógenos utilizando la media geométrica.

Resultados y Discusión

5.3.1. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL ARN

La calidad del ARN extraído se evaluó utilizando un nano espectrofotómetro, como un parámetro para valorar la pureza del ARN extraído se usaron los ratios A260/280 y A260/230 que variaron de 1.8 a 2.0 y de 2.0 a 2.2, respectivamente, en el 80% de las muestras; lo que indicó que el protocolo de extracción era apropiado para obtener un ARN de buena calidad para el análisis de la expresión génica.

5.3.2. CÁLCULO DE EFICIENCIAS Y LINEALIDAD

Como paso previo a los análisis de expresión génica, se calculó la eficiencia para cada sonda Taqman® (*ACTB*, *CDKN1B*, *GUSB*, *ALDH1A1*, *SOX2*, *SNAIL1*, *MMP9* y *COX2*); para ello, en este estudio se usó el método de la pendiente de los Ct (Ciclos de umbral). Se obtuvieron los valores de los Ct para la dilución seriada del gen diana (triplicados en cada dilución). Luego, se construyó un gráfico con los valores de los logaritmos de las diluciones en el eje X y los valores de los Ct en el eje Y, y se calculó la pendiente de la recta de regresión que unía dichos puntos, que debería estar cerca de -3, valor que representa un 100% de eficiencia de amplificación (**Figura 62**). Los resultados se muestran en la **Tabla 17**.

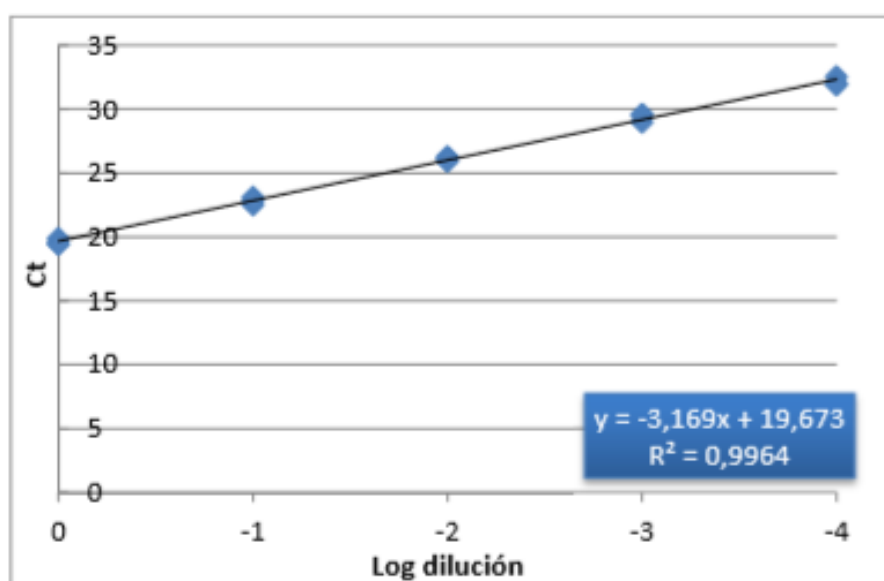


Figura 62. Ejemplo de representación de la curva estándar para el cálculo de la eficiencia de amplificación del gen *ALDH1A1*. Para el cálculo de la eficiencia se deben representar los valores de Ct de cada dilución, en función del logaritmo de la concentración.

Tabla 17. Eficiencias para las sondas Taqman® empleadas en este estudio.

Gen	Código	Longitud amplicón	Eficiencia	Eficiencia (%)
<i>ACTB</i>	Hs99999903_m1	171	2,000	100,00
<i>CDKN1B</i>	Hs00153277_m1	71	1,862	93,00
<i>GUSB</i>	Hs01558067_m1	71	2,000	100,00
<i>ALDH1A1</i>	Hs00946916_m1	61	2,070	100,00
<i>COX2 (PTGS2)</i>	Hs00153133_m1	75	2,000	100,00
<i>MMP-9</i>	Hs00234579_m1	54	1,792	90,00
<i>SNAIL1</i>	Hs00195591_m1	66	2,000	100,00
<i>SOX2</i>	Hs01053049	91	1,778	89,00

5.3.3. CUANTIFICACIÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA

A continuación se analizó la expresión de 4 genes relacionados con el mantenimiento, proliferación y auto renovación de las CMTs; *ALDH1A1*, marcador de CMTs encontrado sobreexpresado en los estudios de caracterización de nuestras esferas; *SOX2*, factor de transcripción y gen de pluripotencia; *SNAIL1* y *MMP-9*, genes relacionados con la metástasis, *SNAIL1* implicado también en la transición epitelio-mesenquimal y sobreexpresado en los estudios de caracterización de nuestras tumoresferas; además de *COX2*, factor de inflamación de respuesta temprana inducida por múltiples estímulos, sobreexpresado en múltiples neoplasias. Todos estos genes han sido descritos como posibles dianas terapéuticas en múltiples tumores frente al DSF y otros agentes antineoplásicos (242–244).

Se consideró que un gen diana estaba sobreexpresado en las células tratadas cuando la mediana de su expresión génica relativa era mayor o igual a 2, y se consideró que estaba infraexpresado cuando era menor o igual a 0,5; en comparación con el ADN de las células no tratadas (CNT). Para ello, se emplearon células en formación de tumoresferas y células crecidas en monocapa de la línea celular H1650, a 12 y 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 a 10 μ M. Posteriormente, ambas condiciones fueron confrontadas y analizadas en el programa SPSS para los cálculos de significancia estadística. Los resultados se presentan y analizan a continuación:

En primer lugar, para el gen *ALDH1A1* las medianas de expresión no variaron significativamente en ninguna de las condiciones (ADH/ESF) respecto al CNT en ninguno de los tiempos de tratamiento analizados en la línea celular H1650 (**Figura 63**).

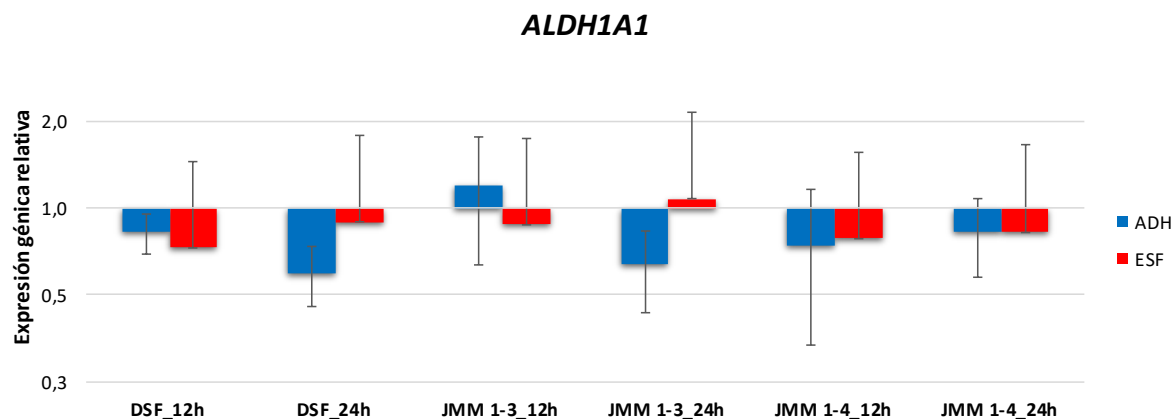


Figura 63. Expresión génica relativa de *ALDH1A1* en la línea celular H1650 a las 12 y 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M). Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error.

El gen *ALDH* es esencial para la síntesis de moléculas importantes para la proliferación celular, la diferenciación y la supervivencia (245,246). Se cree que la expresión o actividad elevada de *ALDH* está implicada en la formación de tumor de xenoinjerto en ratones y la resistencia a la quimioterapia contra cisplatino, docetaxel y doxorubicina (247). En los últimos años, la relación entre la actividad elevada de *ALDH* y el fenotipo de CMTs ha motivado a los investigadores a desarrollar inhibidores de *ALDH* específicos con potencial clínico para suprimir más eficazmente CMTs y progresión tumoral (245). En otros estudios, DSF y sus metabolitos celulares han demostrado tener una actividad inhibidora bien caracterizada contra *ALDH*, específicamente *ALDH1A1*, que parece tener la asociación más fuerte con el fenotipo de CMTs (149). Por lo tanto, se ha demostrado que la inhibición de la actividad de *ALDH* por DSF juega un papel clave en la supresión de CMTs, que se derivaron de cánceres de cerebro, mama, ovario, páncreas, pulmón, hígado y sangre (158,213,214,216,248). Sin embargo, nuestros resultados no concuerdan con estos datos, en vista de que nuestros tres fármacos no inhiben la expresión del gen *ALDH1A1* de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en ninguna de las condiciones de cultivo de la línea celular H1650.

En relación con *MMP-9*, hemos encontrado que JMM 1-3 y JMM 1-4 infraexpresan este gen en mayor proporción en las esferas de la línea celular H1650 a las 12 horas de tratamiento (0,46 y 0,35 respectivamente); mientras que los valores de mediana de expresión en las adherentes se encontraron entre 0,65 y 1,10, por lo que su expresión no varía significativamente respecto al CNT en ninguno de los tiempos de tratamiento analizados, diferencia no estadísticamente significativa (**Figura 64**).

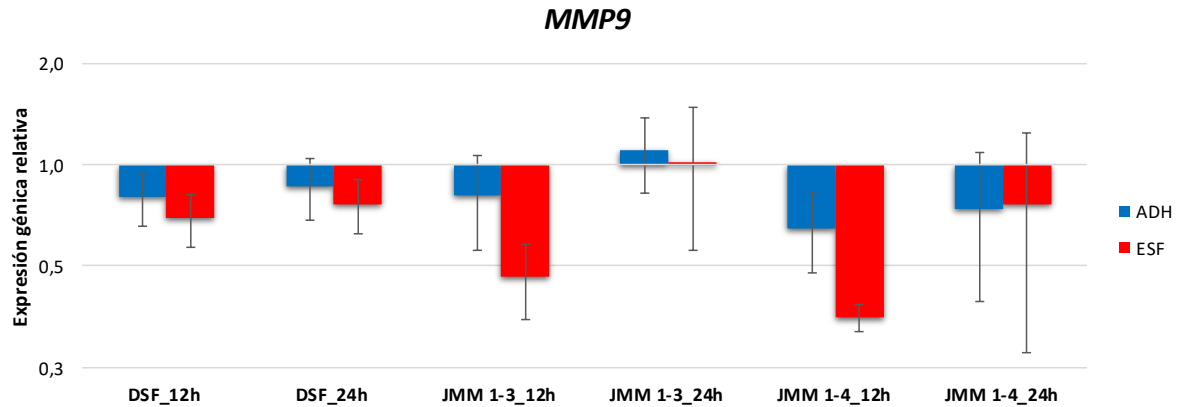


Figura 64. Expresión génica relativa de MMP-9 en la línea celular H1650 a las 12 y 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M). Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error.

La activación aberrante de las metaloproteinasas de matriz (MMP) es una característica común de las cascadas patológicas observadas en diversos trastornos, como cáncer, fibrosis, desregulación inmune y enfermedades neurodegenerativas. MMP-9, en particular, está altamente regulada dinámicamente en varios procesos patológicos. El desarrollo de inhibidores de MMP ha sido, por lo tanto, una estrategia atractiva para la intervención terapéutica. Sin embargo, una larga historia de ensayos clínicos fallidos ha demostrado que los inhibidores de MMP de amplio espectro tienen una utilidad clínica limitada, lo que ha estimulado el desarrollo de inhibidores selectivos para MMP individuales. Por ejemplo, GS-5745, un potente anticuerpo monoclonal humanizado, inhibidor alostérico altamente selectivo de MMP-9, se ha mostrado prometedor en el tratamiento de la colitis ulcerativa y el cáncer colorrectal, resultando eficaz en modelos preclínicos (249,250); así como JNJ0966, un compuesto altamente selectivo que inhibe la activación del zimógeno MMP-9 y la generación subsiguiente de la enzima catalíticamente activa. JNJ0966 fue eficaz en reducir la gravedad de la enfermedad en un modelo experimental de ratón con encefalomiелitis autoinmune, lo que demuestra la viabilidad de este enfoque terapéutico (251).

DSF también ha sido descrito como un potente supresor de la invasión tumoral, dados sus efectos descritos sobre la actividad de MMP-2 y MMP-9 en células de osteosarcoma mediante la inhibición de su expresión (252) y en células de hepatocarcinoma mediante la inhibición específica de la actividad de MMP-9 (253). Resultados similares a los obtenidos en este estudio, donde se demuestra la capacidad de JMM 1-3 y JMM 1-4 para inhibir la expresión del gen MMP-9 en la tumoresferas a las 12 horas de tratamiento, quedando pendiente por confirmar la inhibición de la actividad MMP implicada en la invasión tumoral.

Resultados y Discusión

Respecto a **SOX2**, hemos encontrado disminución de su expresión no estadísticamente significativa en las tumoresferas respecto a las adherentes a las 12 horas de tratamiento con DSF (0,53), JMM 1-3 (0,70) y JMM 1-4 (0,53) (**Figura 65**).

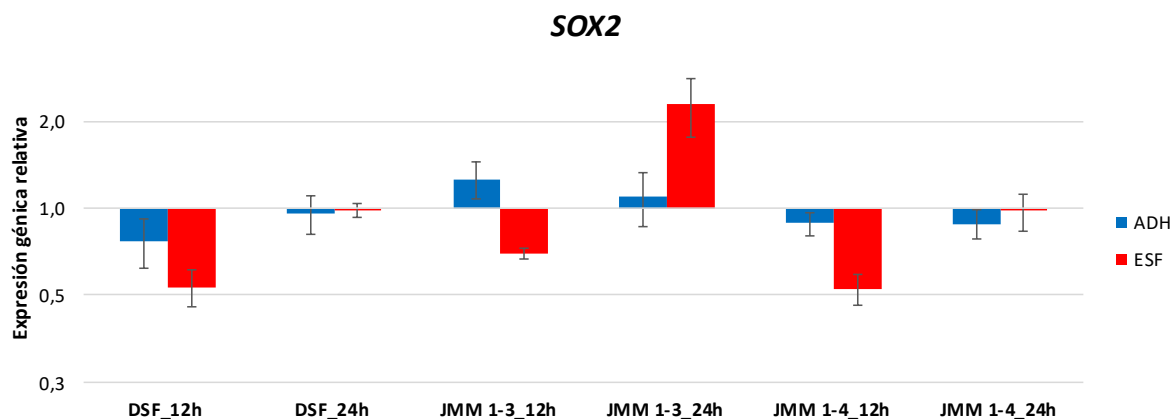


Figura 65. Expresión génica relativa de **SOX2** en la línea celular H1650 a las 12 y 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M). Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error.

Tal y como se ha descrito en células con cáncer de mama triple negativo resistentes a paclitaxel, cisplatino, docetaxel y doxorrubicina; el DSF inhibe los caracteres de CMTs (**SOX2**, **OCT-4** y **NANOG**) y revierte completamente la resistencia a paclitaxel y cisplatino (254). En células de CPNM también se ha informado como el complejo disulfiram/cobre (DSF/Cu) además de inhibir las CMTs de pulmón ALDH+ *in vitro/in vivo*, también inhibe significativamente la expresión de los factores de transcripción de células madre (**SOX2**, **OCT-4** y **NANOG**) y reduce las capacidades de las células madre de CPNM para la auto-renovación, proliferación e invasión *in vitro* (255).

Por su parte, **COX2** se ha encontrado infraexpresado en las adherentes a las 12 horas de tratamiento con DSF (0,38) y a las 12 y 24 horas de tratamiento con JMM 1-4. Por el contrario, se ha visto sobreexpresado en las tumoresferas a las 24 horas de tratamiento con DSF (2,41), JMM 1-3 (5,10) y JMM 1-4 (3,81); resultados no estadísticamente significativos (**Figura 66**).

Varios estudios han informado que el gen **COX2** está sobreexpresado de forma constitutiva en una variedad de tipos de cáncer, como el de mama, pulmón, páncreas, colon, esófago y cabeza y cuello; sobreexpresión que se asocia con un mal pronóstico (256,257). Por el contrario, la infraexpresión de **COX2** se ha relacionado con el incremento de la sensibilidad a quimioterapia, inhibición de la actividad MMP e inducción de apoptosis, por ejemplo; la inhibición de **COX2** aumentó la sensibilidad de células

de cáncer de pulmón a la sesamina al modular la señalización de pAkt-PI3K, lo que resultó en una detención del ciclo celular y un aumento de la apoptosis (258).

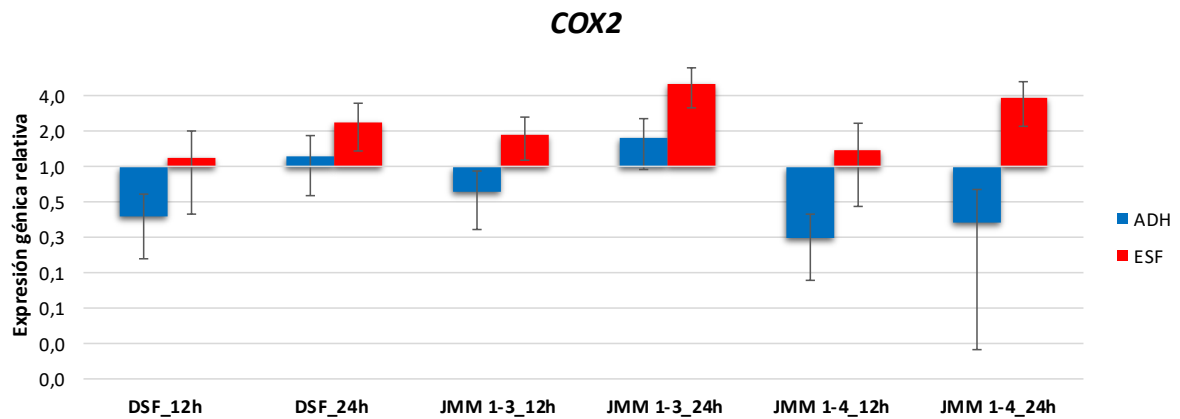


Figura 66. Expresión génica relativa de *COX2* en la línea celular H1650 a las 12 y 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M). Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error.

Por otro lado, ***SNAIL1*** se ha encontrado sobreexpresado en la tumoresferas a las 24 horas de tratamiento con DSF (2,29), JMM 1-3 (3,99) y JMM 1-4 (2,46), datos sin significancia estadística respecto a los valores de mediana de expresión obtenidos en las adherentes (**Figura 67**). Sin embargo, este resultado podría poner de manifiesto un papel activo de esta ruta que sustentaría el mantenimiento de la población de CMTs en este cultivo. Contrario a lo reportado por Han et al; quienes demostraron que DSF revierte la transición epitelio-mesenquimal (TEM) y las propiedades de células madre en células de cáncer de mama a través de la supresión de la actividad de NF- κ B y la vía ERK/NF- κ B/Snail (215). Opuesto también a los descrito por Sun et al; quienes confirmaron que el resveratrol a través de ensayos de inmunofluorescencia cambió la expresión de los marcadores relacionados con TEM E-cadherina y vimentina y como a través de ensayos de Western Blot (WB) disminuyó los niveles de expresión de MMP-2, MMP-9, Fibronectina, Vimentina y Snail1 en células de cáncer de mama, demostrando *in vivo* la capacidad de inhibir la metástasis pulmonar en un modelo de ratón con xenoinjerto (259).

Resultados y Discusión

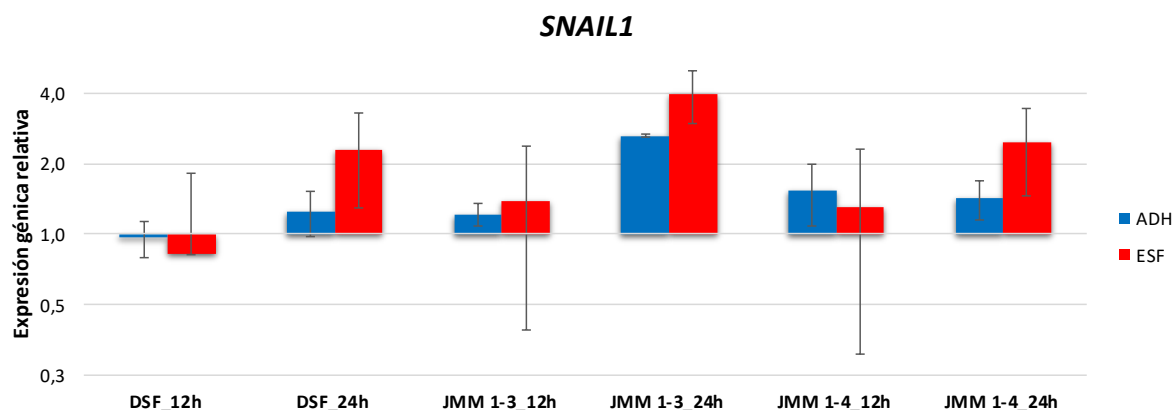


Figura 67. Expresión génica relativa de *SNAIL1* en la línea celular H1650 a las 12 y 24 horas de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (10 μ M). Las barras representan la media de tres determinaciones independientes por triplicado, con la desviación estándar indicada mediante barras de error.

A continuación, se procedió a validar *in vivo* la capacidad inhibitoria que han demostrado tener nuestros fármacos (DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4) frente a las tumoresferas enriquecidas en propiedades de CMTs de pulmón.

6. MODELO *IN VIVO*

6.1. MODELO DE TUMOR SUBCUTÁNEO

La sensibilidad de las tumoresferas de pulmón frente a DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 observada en los ensayos de viabilidad y apoptosis en la línea celular H1650, y la posible resistencia a estos compuestos observada en el cultivo primario FIS343; ha sido la razón por la cual se decide continuar con estos dos cultivos para diseñar el modelo *in vivo* de un primer estudio piloto, con el que se busca evaluar e intentar validar el efecto anti tumoral de estos nuevos agentes terapéuticos identificados como posibles terapias en CPNM.

Es así como, partiendo de una de las propiedades de las CMTs, la tumorigenicidad; es decir, el potencial de iniciar tumores cuando se trasplantan en ratones inmunodeficientes. En el presente estudio se lograron inducir tumores subcutáneos en el flanco izquierdo de 4 ratones NOD/SCID mediante la inoculación de tumoresferas derivadas de la línea celular H1650 de ADC (ratones 1-4) y 4 xenoinjertos en ratones a partir de esferas derivadas del tumor pulmonar resecao del paciente FIS343 con ADC (ratones 5-8) (**Figura 68**). Al igual que Marsden CG et al en el 2012, observaron como las tumoresferas formadas en cultivos celulares primarios derivados de tumores de pacientes con cáncer de mama, fueron tumorigénicas cuando se trasplantaron en la almohadilla de grasa mamaria de ratones NUDE y se metastatizaron en múltiples órganos (260).

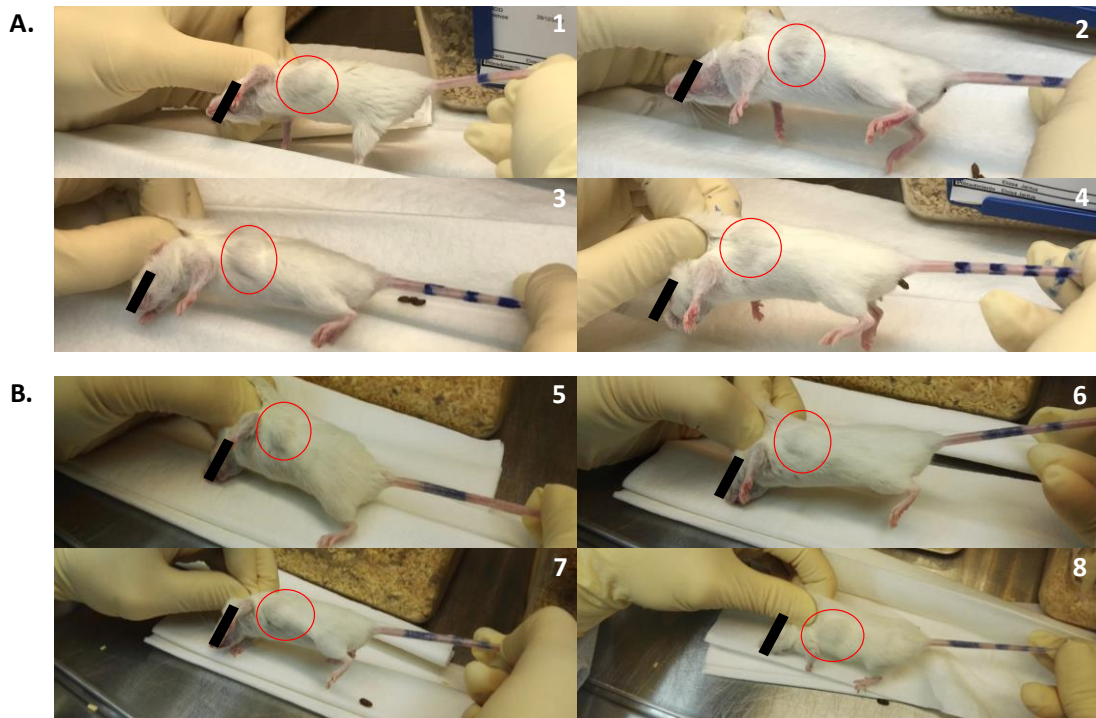


Figura 68. A) Xenoinjertos inducidos a partir de tumoresferas derivadas de la línea celular H1650 (ratones 1-4); B) Xenoinjertos a partir de tumoresferas derivadas del cultivo primario FIS343 (ratones 5-8).

6.2. ENSAYOS DE TRATAMIENTO

Luego de 21 días de crecimiento, los 4 xenoinjertos derivados de la línea celular H1650 alcanzaron el criterio de inicio de tratamiento [100 mm³ de volumen tumoral (VT)], las diferentes condiciones se distribuyeron de manera aleatoria [tumor 1 (Control, CNT, DMSO), tumor 2 (DSF), tumor 3 (JMM 1-3) y tumor 4 (JMM 1-4)] y se inició el tratamiento intraperitoneal (100 mg/kg peso) con la evaluación de peso y toxicidad de los animales tres veces por semana. En la **Figura 69** se observa la evolución del VT en los xenoinjertos H1650 tratados respecto al CNT.

El ratón con el tumor 1 (CNT) fue sacrificado el día 8 de tratamiento tras haber sido el primero en alcanzar el criterio de punto final (1.500 mm³ de VT), al igual que el ratón con el tumor 3 tratado con JMM 1-3 por haber presentado una úlcera cutánea de origen tumoral, evidenciándose una marcada reducción del tumor en estos ratones respecto al CNT; resultado similar a lo observado en los ratones con los tumores 2 y 4 tratados con el DSF y el JMM 1-4 respectivamente, demostrando así la capacidad de estos fármacos para ralentizar e inhibir el crecimiento tumoral.

Resultados y Discusión

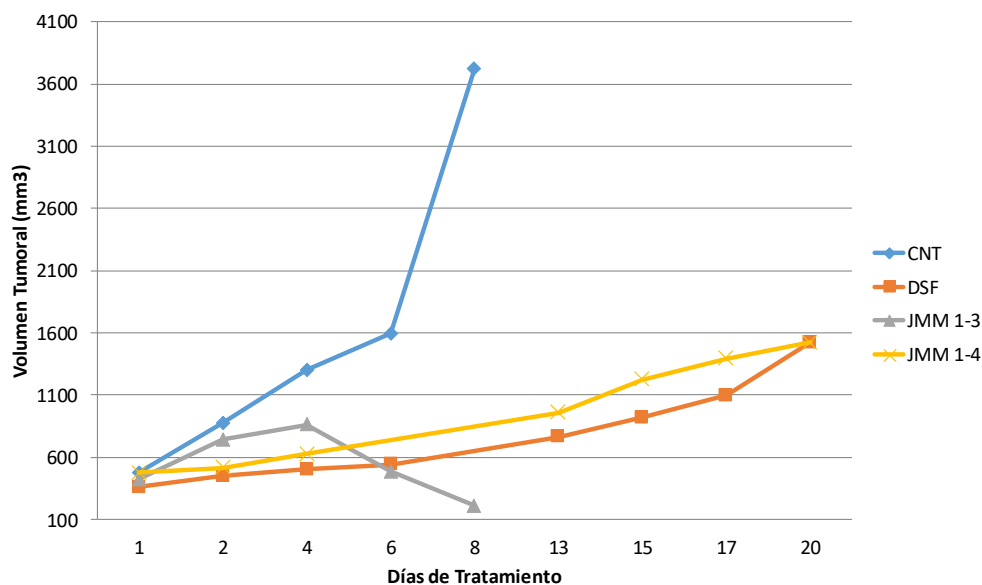


Figura 69. Evolución del volumen tumoral en los xenoinjertos H1650 tratados con el DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (100 mg/kg peso) respecto al CNT.

Por otro lado, se asignaron las condiciones de manera aleatoria para el ensayo de tratamiento con los xenoinjertos del cultivo primario FIS343 [tumor 5 (DSF), tumor 6 (Control, CNT, DMSO), tumor 7 (JMM 1-3) y tumor 8 (JMM 1-4)], los cuales alcanzaron los 100 mm³ de VT a diferentes tiempos, los primeros en alcanzarlo fueron los ratones con los tumores 6 (CNT), 7 (JMM 1-3) y 8 (JMM 1-4), seguidos por el ratón con el tumor 5 (DSF) (10 días después). Se inicia el tratamiento intraperitoneal (100 mg/kg peso/fármaco) con la evaluación de peso y toxicidad de los animales tres veces por semana. En la **Figura 70** se observa como el tumor del ratón 6 (CNT) es el primero en alcanzar el criterio de punto final (1.500 mm³ de VT) con respecto a los demás tumores tratados, con una diferencia de 7 días con el tumor del ratón 8 (JMM 1-4) y de 14 días con los tumores de los ratones 5 (DSF) y 7 (JMM 1-3); evidenciándose un menor efecto inhibitorio de estos fármacos en los tumores tratados respecto al control en este cultivo primario en comparación con los xenografts H1650, observándose como luego de lo que parecía una respuesta al tratamiento, dejan de responder a la terapia y se incrementa el crecimiento tumoral al punto de que el tumor tratado con JMM 1-3 alcanza a los 7 días criterio de punto final y a los 14 días lo hacen los tumores tratados con DSF y JMM 1-3.

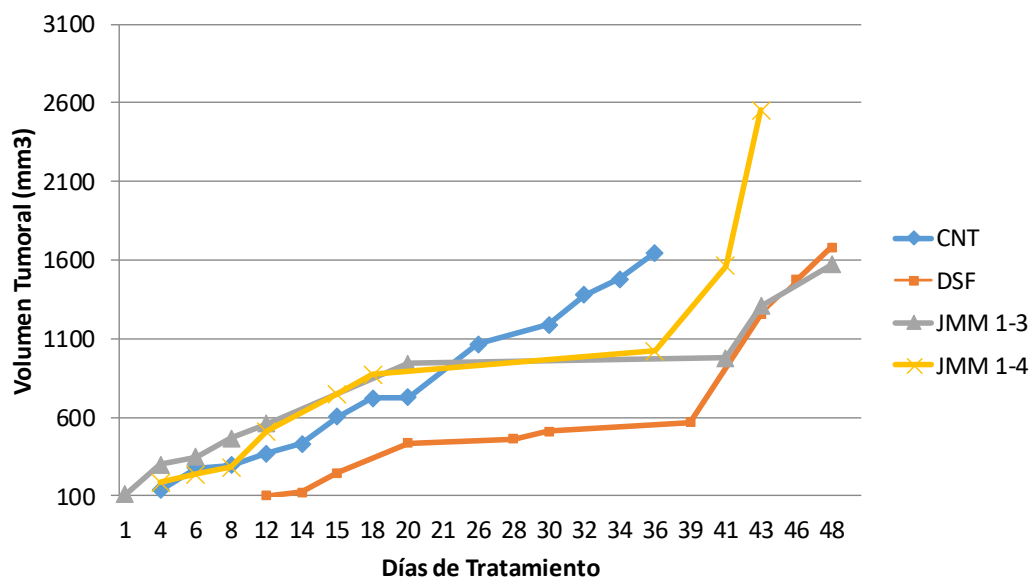


Figura 70. Evolución del volumen tumoral en los xenoinjertos FIS343 tratados con el DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 (100 mg/kg peso) respecto al control (CNT).

En la **Tabla 18** se resumen los porcentajes de reducción tumoral obtenidos en los 6 ratones tratados frente a su respectivo CNT, correspondiendo con el porcentaje de VT reducido al día de sacrificio del CNT de cada grupo.

Tabla 18. Porcentaje de reducción tumoral en los ratones tratados respecto al CNT.

Tumor	Volumen tumoral (mm ³)	Reducción tumoral (%)*
H1650_CNT	3722,65	
H1650_DSf	651,91	82,49
H1650_JMM 1-3	208,75	94,39
H1650_JMM 1-4	792,09	78,72
FIS343_CNT	1645,68	
FIS343_DSf	568,78	65,44
FIS343_JMM 1-3	975,72	40,71
FIS343_JMM 1-4	1020,00	38,02

*Se corresponde con el porcentaje de VT reducido al día de sacrificio del CNT de cada grupo.

Los ratones se pesaron antes de empezar los ensayos de tratamiento (pesando todos entre 20 y 21 gramos) y durante su desarrollo, sin observarse cambio significativo del mismo, tal y como se demuestra en la **Figura 71** que se corresponde con los pesos de los ratones con tumores FIS343.

Resultados y Discusión

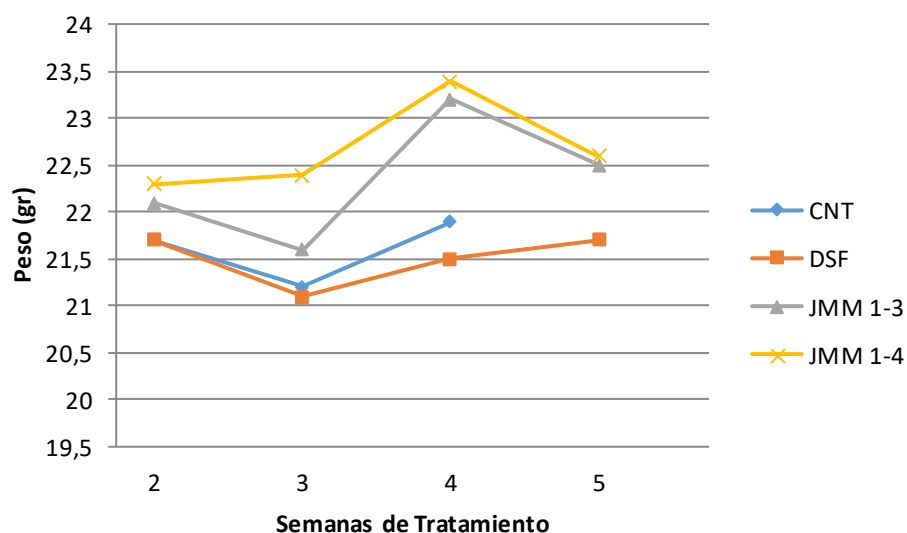


Figura 71. Evolución semanal del peso de los ratones con tumores FIS343 durante los ensayos de tratamiento con DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4.

Así mismo, los ratones fueron vigilados tres veces por semana evaluando el aspecto físico: limpieza, pelaje, descarga nasal/ocular, palidez, cianosis, cambios pupilares, signos de deshidratación; signos clínicos mesurables: disnea (taquipnea), diarrea, anuria, poliuria y hematuria, hemorragias profusas, hipotermia, ascitis, presencia de masas, coma; comportamiento involuntario: cambios mínimos, aislamiento, hiperactividad o hipoactividad; movilidad anormal o reducida, movimientos redirigidos, temblores musculares; Ataxia (imposibilidad de comer o beber), convulsiones, automutilaciones, postración, vocalizaciones no provocadas; Lesiones pequeñas, úlceras y lesiones extensas y/o sangrantes. Destacando el buen estado general de la mayoría de los ratones, sin presentar ninguna de estas alteraciones mencionadas; a excepción del ratón con el tumor 3 (H1650 - JMM 1-3) que presentó la úlcera cutánea de origen tumoral, considerándose criterio de punto final, siendo sacrificado el día 8 del tratamiento.

Resultados similares a los nuestros en el modelo *in vivo* han sido descritos en tumores subcutáneos inducidos con carcinoma esofágico de células escamosas, los ratones fueron tratados con DSF y posterior a 22 días de tratamiento estos tenían tumores significativamente más pequeños en comparación con los grupos tratados con cisplatino, no tratados y con vehículo; alcanzando 31,8% y 50,8% de reducción tumoral respecto al grupo no tratado, a dosis de 30 mg/kg y 50 mg/kg respectivamente (261). En xenoinjertos de células de cáncer de próstata en ratones atímicos, también se ha confirmado el efecto antineoplásico del DSF, donde todos los grupos de tratamiento mostraron una reducción promedio de ~40% en el volumen tumoral en comparación con los ratones de control (262).

Datos que coinciden y ponen de manifiesto la capacidad de estos fármacos para principalmente ralentizar considerablemente el crecimiento tumoral, pudiendo servir como terapia de combinación con otros compuestos como la quimioterapia o terapia dirigida a dianas moleculares para incrementar el efecto antineoplásico y así poder inhibir el crecimiento tumoral con diferentes mecanismos de acción, principalmente inhibiendo las CMTs responsables de la resistencia al tratamiento convencional del CPNM.

Una vez extraídos los tumores durante la eutanasia tras haber alcanzado el criterio de punto final, se midieron y se codificaron [Tumores inducidos con la línea celular H1650 (TR1-H1650=CNT, TR2-H1650=DSF, TR3-H1650= JMM 1-3, TR4-H1650= JMM 1-4) y tumores inducidos con el cultivo primario FIS343 (TR5-FIS343=DSF, TR6-FIS343=CNT, TR7-FIS343= JMM 1-3, TR8-FIS343= JMM 1-4)] como se observa en la **Figura 72**, donde se aprecian mayores dimensiones en TR1-H1650 respecto a los tumores que recibieron tratamiento.

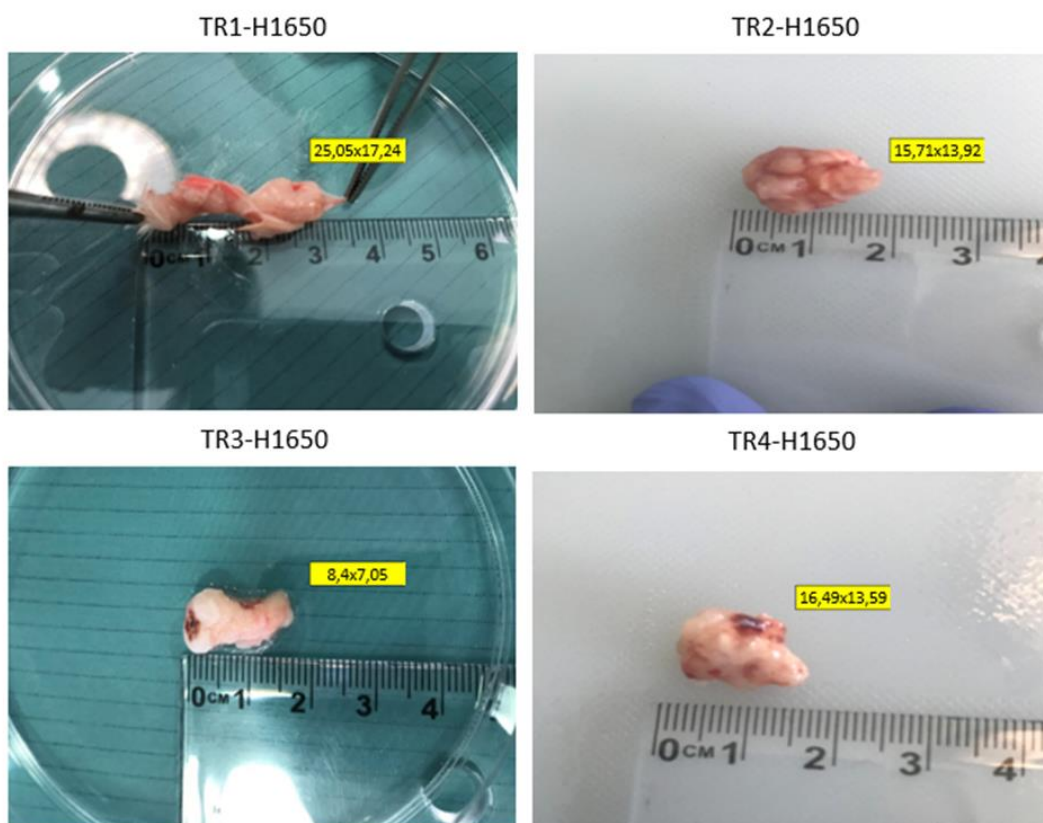


Figura 72. Comparación de las dimensiones finales obtenidas de la medición de los tumores inducidos con las tumoresferas de la línea celular H1650. TR1-H1650=CNT; TR2-H1650=DSF; TR3-H1650= JMM 1-3; TR4-H1650= JMM 1-4.

Posteriormente, los tumores se fraccionaron en varios trozos para congelar en -80°C y nitrógeno líquido, sembrar cultivos *ex vivo* para evaluar la formación de tumoresferas postratamiento y realizar análisis para posteriores tesis doctorales que involucran ensayos de expresión génica, estudios

Resultados y Discusión

histológicos e inmunohistoquímicos. Por ejemplo, se analizaron cortes de bloques de parafina con tinción de hematoxilina-eosina de los tumores inducidos con la línea celular H1650, donde el servicio de anatomía patológica ha reportado:

- **TR1-H1650:** Necrosis tumoral extensa con áreas de hemorragia, se observan células atípicas, de núcleo discretamente lateralizado, sin nucleolo evidente, con focal mucosecreción. Esta celularidad crece de forma desordenada, en sabana y en ausencia de estructuras glandulares (**Figura 73**).

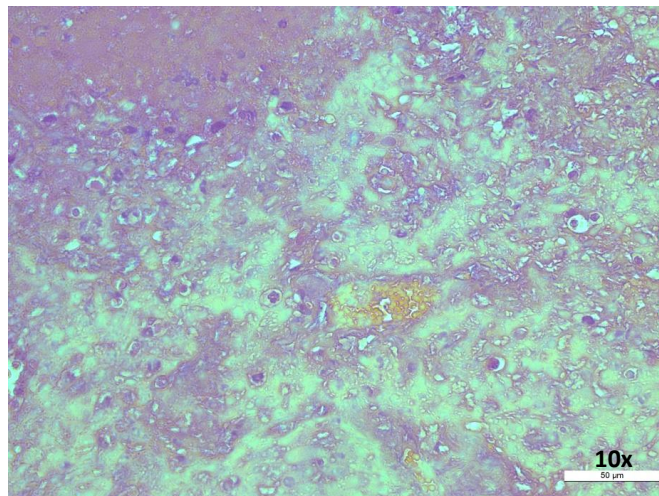


Figura 73. Tinción de hematoxilina-eosina en corte del tumor TR1-H1650 (CNT).

- **TR2-H1650:** Se observa una tumoración extensamente necrosada, que presenta en la perifería grupos celulares que crecen en sabana y nidos, algunos delimitados por estroma de aspecto fibroso, con citoplasmas claros y núcleos discretamente polarizados de cromatina fina (**Figura 74**).

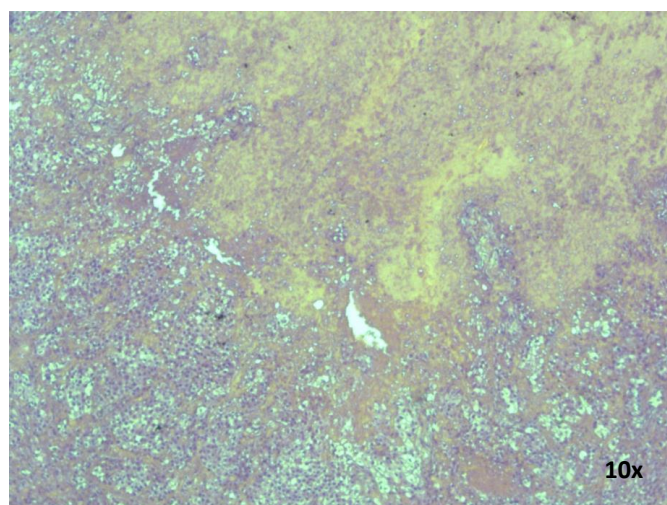


Figura 74. Tinción de hematoxilina-eosina en corte del tumor TR2-H1650 (DSF).

- **TR3-H1650:** Se observa una tumoración extensamente necrosada, con grupos celulares que crecen en sabana y nidos, con citoplasmas claros y núcleos discretamente polarizados de cromatina fina, con presencia de algunos nucleolos (**Figura 75**).

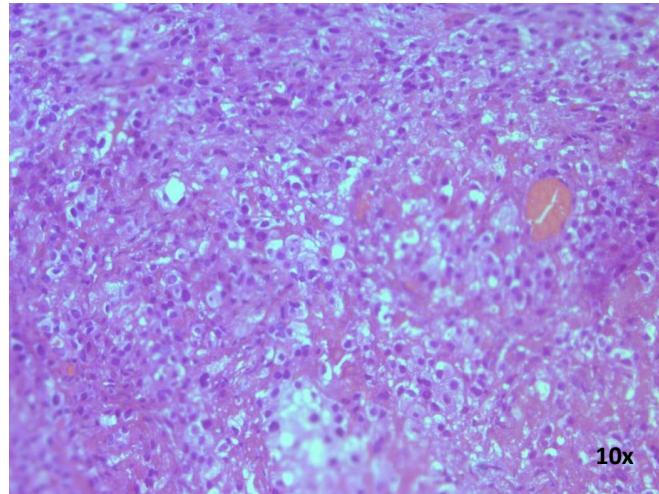


Figura 75. Tinción de hematoxilina-eosina en corte del tumor TR3-H1650 (JMM 1-3).

- **TR4-H1650:** Se observa una tumoración extensamente necrosada, con grupos celulares que crecen en sabana y nidos, con presencia de alguna luz, con citoplasmas claros, vacuolizados y núcleos discretamente polarizados de cromatina fina con algunos nucleolos (**Figura 76**).

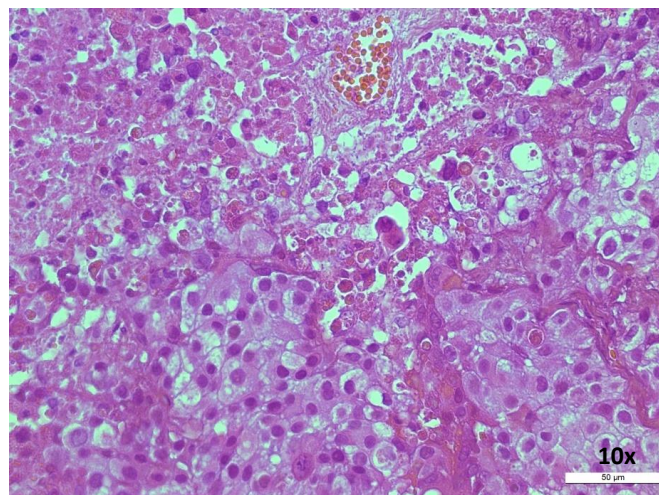


Figura 76. Tinción de hematoxilina-eosina en corte del tumor TR4-H1650 (JMM 1-4).

6.3. CULTIVOS *EX VIVO*

Para poder analizar el potencial del tumor una vez tratado, se procedió a su cultivo. De un trozo de cada tumor, siguiendo el protocolo explicado en materiales y métodos, se establecieron cultivos *ex vivo* en monocapa y en formación de esferas para evaluar el mantenimiento de la propiedad de célula madre para formar tumoresferas. Como se observa en la **Figura 77**, tanto en los cultivos de tumores inducidos con la línea celular H1650 (con los códigos TR1 – TR4) como en los inducidos con el cultivo primario FIS343 (con los códigos TR5 – TR8); posterior al tratamiento con los distintos fármacos (DSF, JMM 1-3, JMM 1-4) aún persisten células vivas con capacidad para formar esferas, pero en menor proporción y con estructuras menos definidas.

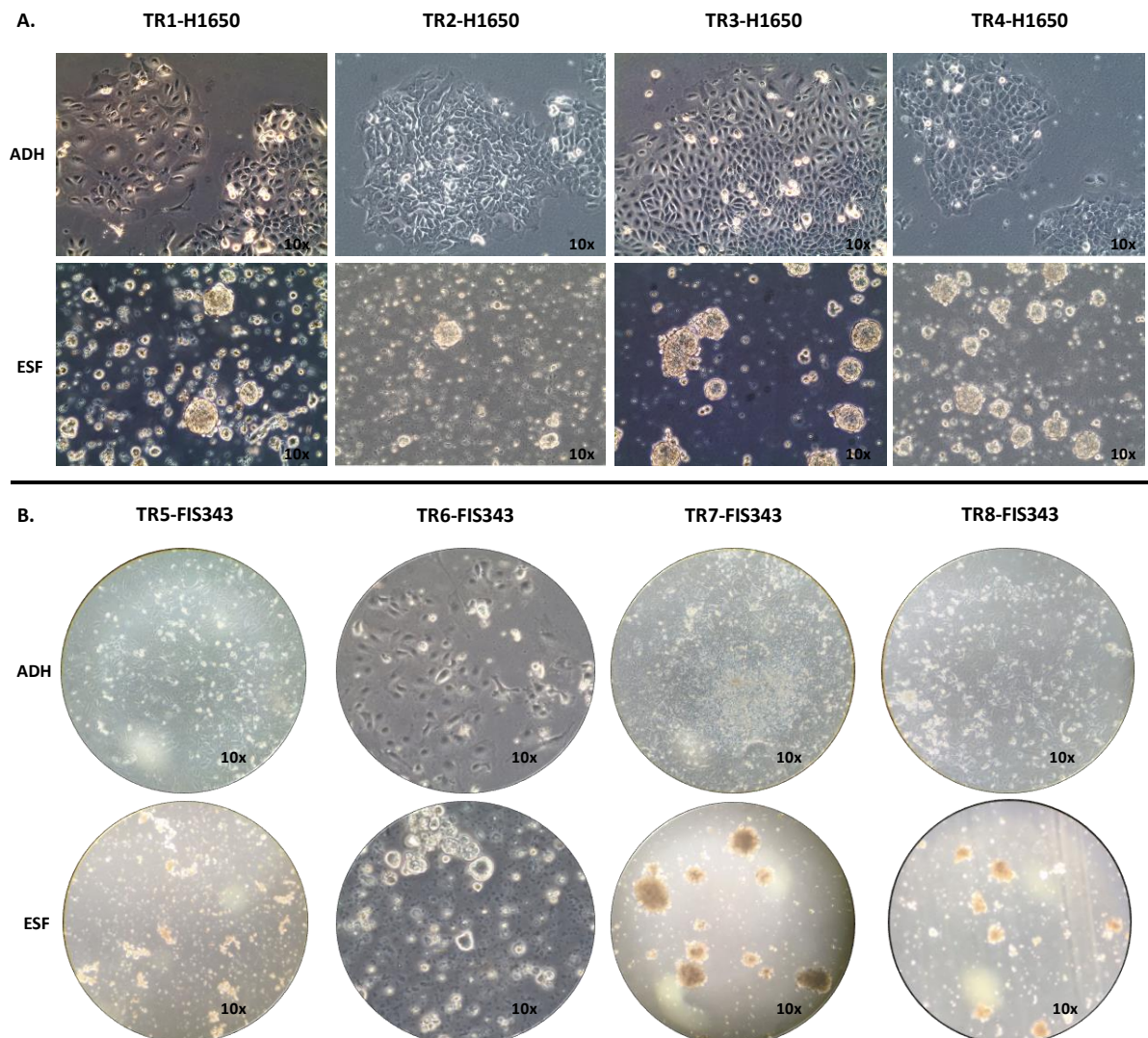


Figura 77. Cultivos *ex vivo* en monocapa y en formación de esferas derivados de tumores inducidos con: A) Línea celular H1650 (con los códigos TR1-H1650 – TR4-H1650); B) Cultivo primario FIS343 (con los códigos TR5-FIS343 – TR8-FIS343).

En resumen, del cribado farmacológico masivo de alto rendimiento con las quimiotecas Prestwick y Myria, se seleccionaron y validaron *in vitro* tres compuestos con estructura química similar identificados con mayor potencial citotóxico frente a las tumoresferas de CPNM (DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4). En cuanto a los posibles mecanismos de acción de estos fármacos, de acuerdo con los datos obtenidos, se demostró la inducción de apoptosis e inhibición de autorenovación mediante la activación de la vía ROS-p38 MAPK. Por otro lado, de acuerdo con el análisis de expresión génica, se ha identificado la posible inhibición de la actividad MMP relacionada con invasión y metástasis, al encontrar que JMM 1-3 y JMM 1-4 inhiben el gen *MMP-9* en la línea celular H1650 (**Figura 78**). Todo esto, aunado a la validación *in vivo* de la citotoxicidad de estos fármacos, demostrada en los ensayos de tratamiento, con porcentajes significativos de reducción tumoral.

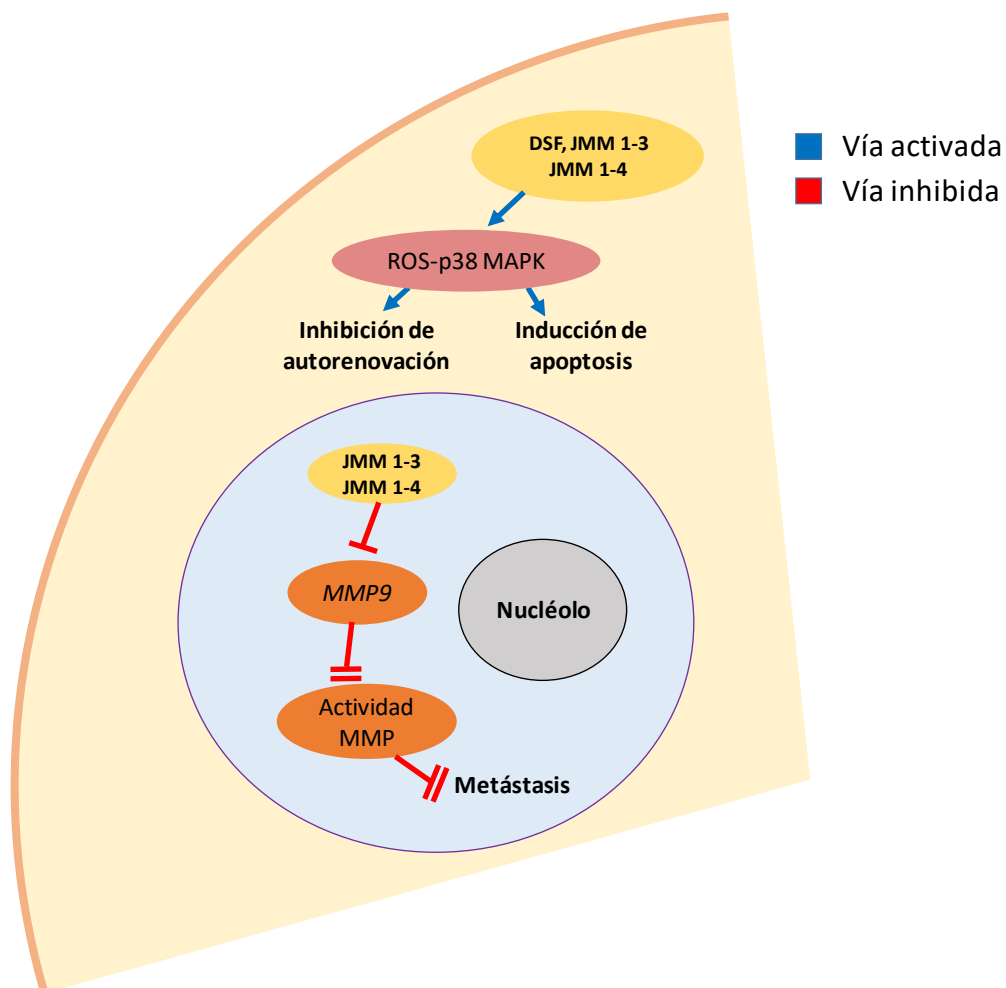


Figura 78. Posibles mecanismos de acción de DSF, JMM 1-3 y JMM 1-4 a dosis de 10 μ M, implicados en la inhibición de las tumoresferas de CPNM.

Estos resultados demuestran la versatilidad que poseen estos fármacos para inhibir las tumoresferas con características de CMTs de CPNM *in vitro/in vivo*. Sin embargo; más estudios para terminar de comprender los mecanismos de acción de estos fármacos serán necesarios.

V. CONCLUSIONES

1. Las tumoresferas establecidas a partir de cultivos en suspensión de líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de pulmón no microcítico, son una plataforma óptima para el cribado farmacológico en la búsqueda de nuevas terapias.
2. Las tumoresferas de pulmón, son más resistentes a agentes quimioterápicos empleados en la práctica clínica, tales como vinorelbina y pemetrexed; siendo una de las características que definen a las CMTs. El cribado masivo con las librerías Prestwick y Myria ha servido para seleccionar posibles compuestos tóxicos contra las tumoresferas.
3. El resultado del cribado ha permitido seleccionar tres compuestos: el Disulfiram de la librería química Prestwick, SG124F6 (JMM 1-3) y SG124G6 (JMM 1-4) de la librería química Myria; identificados con mayor potencial citotóxico contra las tumoresferas de CPNM.
4. La inducción de apoptosis mediante la activación de la vía de señalización ROS-p38 MAPK y la posible reducción de actividad MMP, relacionada con metástasis a distancia mediante la inhibición de *MMP9*, se han identificado como posibles mecanismos de acción de estos fármacos.
5. El potencial efecto antineoplásico de los compuestos seleccionados ha sido demostrado en el modelo *in vivo* mediante la implantación de tumoresferas y el tratamiento secuencial en xenografts.
6. EL empleo de tumoresferas como plataformas para el cribado farmacológico *in vitro/in vivo* ha permitido identificar nuevas terapias (Disulfiram, JMM 1-3 y JMM 1-4), con posible traslación a la práctica clínica como potenciales inhibidores de células madre tumorales de cáncer de pulmón no microcítico.

VI. REFERENCIAS

1. Loeb LA, Springgate CF, Battala N. Errors in DNA Replication as a Basis of Malignant Changes. *CANCER Res.* 1974;34:2311–21.
2. Pepper JW, Findlay CS, Kassen R, Spencer SL, Maley CC. Cancer research meets evolutionary biology. *Evol Appl.* 2009;
3. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. *Cell.* 2000;100:57–70.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011.
5. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424.
6. Freedman ND, Leitzmann MF, Hollenbeck AR, Abnet CC. The men and women of a large prospective cohort study. 2009;9(7):649–56.
7. Groot P De, Munden RF. Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention Lung cancer Epidemiology Risk factors Prevention. *Radiol Clin NA.* 2012;50(5):863–76.
8. Sasco AJ, Secretan MB, Straif K. Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. 2004;2:3–9.
9. Khuder SA, Mutgi AB. Effect of Smoking Cessation on Major Histologic Types of Lung Cancer *. *Chest.* 2001;120(5):1577–83.
10. Sawyers CL et al. AACR Cancer Progress Report. *Clin Cancer Res.* 2013;19(Supplement 1):1–99.
11. P. E. Postmus, K. M. Kerr MO et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis , treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2017;28(4):1–21.
12. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. World Health Organization classification tumours of the lung, pleura, thymus and heart. *IARC.* 2015;4(1):26–52.
13. Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, Guarize J, Karachaliou N, Mok T, et al. Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Prim.* 2015 May 21;1:15009.
14. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol.* 2015;10(9):1243–60.
15. Chen Z. and Fillmore C. et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer.* 2015;344(6188):1173–8.
16. Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. 2017;193–203.
17. Zhang J. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science (80-).* 2014;346:256–9.
18. Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, Murphy C, Lifshits E, Holmes AJ, et al. EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(13):4275–83.
19. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the

Referencias

- transforming EML4 – ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448:561–566.
20. Facchinetti F, Rossi G, Bria E, Soria JC, Besse B, Minari R, et al. Oncogene addiction in non-small cell lung cancer: Focus on ROS1 inhibition. Vol. 55, *Cancer Treatment Reviews*. Elsevier Ltd; 2017. 83–95 p.
 21. Collisson E, Campbell J BA et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma: The cancer genome atlas research network. *Nature*. 2014;511(7511):543–50.
 22. Hammerman PS, Lawrence MS VD et al. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 2012;489:519–525.
 23. Bubendorf L, Lantuejoul S, de Langen AJ, Thunnissen E. Nonsmall cell lung carcinoma: Diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens. *Eur Respir Rev*. 2017;26(144):170007.
 24. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*. 2011;12(2):175–80.
 25. Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med*. 2005;2(1):0057–61.
 26. Rosen JE, Keshava HB, Yao X, Kim AW, Detterbeck FC, Boffa DJ. The Natural History of Operable Non-Small Cell Lung Cancer in the National Cancer Database. *Ann Thorac Surg*. 2016;101(5):1850–5.
 27. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project : Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2015;11(1):39–51.
 28. Dillman RO et al. A randomized trial of induction chemotherapy plus high-dose radiation versus radiation alone in stage III non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 1990;323:940–945.
 29. David S. Ettinger, Douglas E. Wood DLA et al. (NCCN-Guidelines) Non-Small Cell Lung Cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2018;3:MS-30-MS-45.
 30. Hanna N, Johnson D, Temin S, Masters G. Systemic Therapy for Stage IV Non – Small-Cell Lung Cancer : American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update Summary. *J Clin Oncol*. 2018;13(12):832–8.
 31. Majem M, Juan O, Insa A, Reguart N, Trigo JM, Carcereny E, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clin Transl Oncol*. 2019;21(1):3–17.
 32. Schiller JH et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non–small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2002;346(2):92–8.
 33. Scagliotti GV et al. Phase III Study Comparing Cisplatin Plus Gemcitabine With Cisplatin Plus Pemetrexed in Chemotherapy-Naive Patients With Advanced-Stage Non – Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2018;26(21):3543–51.
 34. Garon EB, Ciuleanu T, Arrieta O, Prabhaskar K, Syrigos KN, Goksel T, et al. Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): a multicentre , double-blind , randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2014;6736(14):1–9.

35. Kris MG, Gaspar LE, Chaft JE, Kennedy EB, Azzoli CG, Ellis PM, et al. Adjuvant Systemic Therapy and Adjuvant Radiation Therapy for Stage I to IIIA Completely Resected Non – Small-Cell Lung Cancers : American Society of Clinical Oncology / Cancer Care Ontario Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2018;35(25):2960–2974.
36. Herbst, R. S., Heymach JV& L. Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2008;359:1367–80.
37. Morgensztern D, Ng SH, Gao F, Govindan R. Trends in Stage Distribution for Patients with Non-small. *JTO Acquis.* 2010;5(1):29–33.
38. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard J-Y, et al. Phase II Trial of Gefitinib for Previously Treated Patients With Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2003 Jun 15;21(12):2237–46.
39. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, Lynch TJ, Prager D, Belani CP, et al. Efficacy of Gefitinib , an Inhibitor of Tyrosine Kinase , in Symptomatic Patients. *J Am Med Assoc.* 2015;290(16):2149–58.
40. Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Ch B, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2005;353:123–32.
41. Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Ph D, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non–smallcell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004;350:2129–39.
42. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Am Assoc Adv Sci.* 2016;304:1497–1500.
43. Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, et al. Global Survey of Phosphotyrosine Signaling Identifies Oncogenic Kinases in Lung Cancer. *Cell.* 2007;131(6):1190–203.
44. Sharma S V, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(March):169–81.
45. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “ “ never smokers ” ” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:13306–11.
46. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med.* 2005;2(3):0225–35.
47. Felip E, Ph D, Kim J, Ph D, Frewer P, Sc M, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015;372:1689–99.
48. Templeton A, Mann H, Marotti M, Ghiorghiu S. Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in. *N Engl J Med.* 2017;376:629–640.
49. Imamura F, Nogami N, Kurata T, Okamoto I, Zhou C, Cho BC, et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2018;378(2):113–25.
50. Bean J, Brennan C, Shih J, Riely G, Viale A, Wang L, et al. 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.* 2007;104:20932–7.
51. Cappuzzo F, Marchetti A, Skokan M, Rossi E, Gajapathy S, Felicioni L, et al. Increased MET Gene Copy Number Negatively Affects Survival of Surgically Resected Non – Small-Cell Lung Cancer

Referencias

- Patients. *J Clin Oncol*. 2009;27(10):589s.
52. Morgillo F, Kim W, Kim ES, Ciardiello F, Hong WK, Lee H. Cancer Therapy : Preclinical Implication of the Insulin-like Growth Factor-IR Pathway in the Resistance of Non ^ small Cell Lung Cancer Cells to T treatment with Gefitinib. *Clin Cancer Res*. 2007;13(8):2795–803.
 53. Melosky B. Rapidly changing treatment algorithms for metastatic nonsquamous non-small-cell lung cancer. *Curr Oncol*. 2018;25(June):S68–76.
 54. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, Cho BC, Stetson D, Dougherty B, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non – small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med*. 2015;21(May):560–2.
 55. Niederst MJ et al. The allelic context of the C797S mutation acquired upon treatment with third-generation EGFR inhibitors impacts sensitivity to subsequent treatment strategies. *Clin Cancer Res*. 2015;21:3924–3933.
 56. Kwak EL et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2011;363(18):1693–703.
 57. Thomas M, Byrne KJO, Moro-sibilot D, Camidge DR, Ph D, Mok T, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;368:2385–94.
 58. Kim DW, Ph D, Wu YL. First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in. *N Engl J Med*. 2015;371:2167–77.
 59. Shaw AT et al. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2014;370:1189–97.
 60. Shaw AT, Gandhi L, Gadgeel S, Riely GJ, Cetnar J, West H, et al. Alectinib in ALK -positive , crizotinib-resistant , non-small-cell lung cancer : a single-group , multicentre , phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2015;2045(15):1–9.
 61. Kim D, Tiseo M, Ahn M, Reckamp KL, Hansen KH, Kim S, et al. Brigatinib in Patients With Crizotinib-Refractory Anaplastic Lymphoma Kinase – Positive Non – Small-Cell Lung Cancer : A Randomized , Multicenter Phase II Trial. 2018;35(22).
 62. Soria J, Tan DSW, Chiari R, Wu Y, Paz-ares L, Wolf J, et al. First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK -rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised , open-label , phase 3 study. *Lancet*. 2017;389(17):917–929.
 63. Hida T, Nokihara H, Kondo M, Kim YH, Azuma K, Seto T, et al. Articles Alectinib versus crizotinib in patients with ALK -positive randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2017;6736(17):1–11.
 64. Dziadziuszko R, Rosell R, Ph D, Zeaiter A, Mitry E, Ph D, et al. Alectinib versus crizotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2017;377:829–38.
 65. Shaw AT, Felip E, Bauer TM, Besse B, Navarro A, Postel-Vinay S, et al. Lorlatinib in non-small-cell lung cancer with ALK or ROS1 rearrangement: an international, multicentre, open-label, single-arm first-in-man phase 1 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(12):1590–9.
 66. Shaw AT et al. Crizotinib in ROS1 -Rearranged Non – Small-Cell Lung Cancer Early versus On-Demand Tube Feeding in Pancreatitis. 2015;371:683–4.
 67. Lim SM, Kim HR, Lee J, Lee KH, Lee Y, Min YJ, et al. Open-Label , Multicenter , Phase II Study of

- Ceritinib in Patients With Non – Small-Cell Lung Cancer Harboring ROS1 Rearrangement. *J Clin Oncol.* 2018;35(23):2613–2618.
68. Awad MM et al. Acquired Resistance to Crizotinib from a Mutation in. *N Engl J Med.* 2013;368:2395–401.
 69. Davies KD, Mahale S, Astling DP, Aisner DL, Le AT, Hinz TK, et al. Resistance to ROS1 inhibition mediated by EGFR pathway activation in non-small cell lung cancer. *PLoS One.* 2013;8(12):1–13.
 70. Canon J, Rex K, Saiki AY, Mohr C, Cooke K, Bagal D, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature.* 2019;575(7781):217–23.
 71. Planchard D, Besse B, Groen HJM, Souquet P, Quoix E, Baik CS, et al. An open-label phase 2 trial of dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF V600E–mutant metastatic non-small cell lung cancer. *Lancet Oncol.* 2016;17(7):984–93.
 72. Gautschi O, Milia J, Cabarrou B, Bluthgen MV, Besse B, Smit EF, et al. Targeted therapy for patients with BRAF-mutant lung cancer results from the European EURAF cohort. *J Thorac Oncol.* 2015;10(10):1451–7.
 73. Pasquini G, Giaccone G. C-MET inhibitors for advanced non-small cell lung cancer. *Expert Opin Investig Drugs.* 2018;27(4):363–75.
 74. Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(12):731–47.
 75. Galluzzi L, Vacchelli E, Pedro JB, Buqué A, Senovilla L, Baracco EE, et al. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget.* 2014;5(24):12472–508.
 76. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science (80-).* 1996 Mar 22;271(5256):1734 LP – 1736.
 77. Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Ph D, Schadendorf D, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363:711–23.
 78. Dong H et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis : A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002;8(4):793–800.
 79. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;6:12293–12297.
 80. Topalian SL et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012;366:2443–54.
 81. Garon EB et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;372:2018–2028.
 82. Herbst RS, Soria J, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature.* 2014;515(7528):563–7.
 83. Sécher T, Guillemainault L, Reckamp K, Amanam I, Plantier L, Heuzé-Vourc’h N. Therapeutic antibodies: A new era in the treatment of respiratory diseases? *Pharmacol Ther.* 2018;189:149–72.

Referencias

84. Han L, Shi S, Gong T, Zhang Z, Sun X. Cancer stem cells: therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2013;3(2):65–75.
85. Marjanovic ND, Weinberg RA, Chaffer CL. Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clin Chem*. 2013;59(1):168–79.
86. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (80-)*. 1988;194(4260):23–8.
87. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008;112(13):4793–807.
88. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. *Cell*. 2009;138(5):822–9.
89. Xiao J, Mu J, Liu T-R, Xu H. Dig the root of cancer: targeting cancer stem cells therapy. *J Med Discov*. 2017 Apr 21;2:JMD17003.
90. Meacham CE, Morrison SJ. Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity. 2013;501(7467):328–37.
91. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014;14(3):275–91.
92. Bonnet, D. & Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3(7):730–737.
93. Lundin A, Driscoll B. Lung cancer stem cells: Progress and prospects. *Cancer Lett*. 2013;338(1):89–93.
94. McCaffrey LM, Macara IG. Epithelial organization, cell polarity and tumorigenesis. *Trends Cell Biol*. 2011;21(12):727–35.
95. Dou J, Gu N. Emerging strategies for the identification and targeting of cancer stem cells. *Tumor Biol*. 2010;31(4):243–53.
96. Alison MR, Lim SML, Nicholson LJ. Cancer stem cells : problems for therapy ? *J Pathol*. 2011;223(2):147–61.
97. Ghani FI et al. Identification of cancer stem cell markers in human malignant mesothelioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;404(2):735–42.
98. Zanoni M, Piccinini F, Arienti C, Zamagni A, Santi S, Polico R, et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening : a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Nat Publ Gr*. 2016;6:1–11.
99. Hirschmann-Jax C. A distinct “side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *PNAS*. 2004;101(39):14228–14233.
100. Medema JP. Cancer stem cells: The challenges ahead. *Nat Cell Biol*. 2013;15(4):338–44.
101. Lugli A, Iezzi G, Hostettler I, Muraro MG, Mele V, Tornillo L, et al. Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2010;103(3):382–90.
102. Salnikov AV et al. CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. *Int J cancer*. 2010;126(4):950–8.

103. Shmelkov S V, Lyden D, Rafii S, Shmelkov S V, Butler JM, Hooper AT, et al. CD133 expression is not restricted to stem Find the latest version : CD133 expression is not restricted to stem cells , and both CD133 + and CD133 – metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest.* 2008;118(6):2111–20.
104. Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 2008;15(3):504–14.
105. Zhang WC, Shyh-chang N, Yang H, Rai A, Umashankar S, Ma S, et al. Errata Glycine Decarboxylase Activity Drives Non-Small Cell Lung Cancer Tumor-Initiating Cells and Tumorigenesis Modular Genetic Control of Sexually Dimorphic Behaviors. *Cell.* 2012;148(5):1066.
106. Wang P, Gao Q, Suo Z, Munthe E, Solberg S, Ma L, et al. Identification and Characterization of Cells with Cancer Stem Cell Properties in Human Primary Lung Cancer Cell Lines. *PLoS One.* 2013;8(3).
107. Zakaria N, Yusoff NM, Zakaria Z, Lim MN, Baharuddin PNJ, Fakiruddin KS, et al. Human non-small cell lung cancer expresses putative cancer stem cell markers and exhibits the transcriptomic profile of multipotent cells. *BMC Cancer.* 2015;15(1):1–16.
108. Eramo A, Haas TL, De Maria R. Lung cancer stem cells: Tools and targets to fight lung cancer. *Oncogene [Internet].* 2010;29(33):4625–35.
109. Chen K, Huang YH, Chen JL. Understanding and targeting cancer stem cells: Therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(6):732–40.
110. Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(38):16281–6.
111. Sun S, Wang Z. ALDH high adenoid cystic carcinoma cells display cancer stem cell properties and are responsible for mediating metastasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;396(4):843–8.
112. Ma I, Allan AL. The Role of Human Aldehyde Dehydrogenase in Normal and Cancer Stem Cells. *Stem Cell Rev Reports.* 2011;7(2):292–306.
113. Marcato P et al. Its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform Aldehyde dehydrogenase. *Cell Cycle.* 2011;10(9):1378–1384.
114. Sullivan JP, Spinola M, Dodge M, Raso MG, Behrens C, Gao B, et al. Aldehyde Dehydrogenase Activity Selects for Lung Adenocarcinoma Stem Cells Dependent on Notch Signaling. *Cancer.* 70AD;23:9937–48.
115. Zhang DEG, Jiang AIGUI, Lu HUIYU, Zhang LIXIN, Gao XYAN. Isolation , cultivation and identification of human lung adenocarcinoma stem cells. *Oncol Lett.* 2014;9:47–54.
116. Schnell U, Kuipers J, Giepmans BNG. EpCAM proteolysis: new fragments with distinct functions? *Biosci Rep.* 2013;33(2):321–31.
117. Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK, Mellstedt H. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: A short review. *Cancer Treat Rev [Internet].* 2012;38(1):68–75.
118. Tachezy M, Zander H, Wolters-Eisfeld G, Müller J, Wicklein D, Gebauer F, et al. Activated

Referencias

- leukocyte cell adhesion molecule (CD166): An “inert” cancer stem cell marker for non-small cell lung cancer? *Stem Cells*. 2014;32(6):1429–36.
119. Zhong Y, Zhou C, Ma W, Wang D, Guo S, Su X, et al. Most MCF7 and SK-OV3 cells were deprived of their stem nature by Hoechst 33342. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;364(2):338–43.
120. Montanaro F, Liadaki K, Schianda J, Flint A, Gussoni E, Kunkel LM. Demystifying SP cell purification: Viability, yield, and phenotype are defined by isolation parameters. *Exp Cell Res*. 2004;298(1):144–54.
121. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, et al. Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening. *Cell*. 2009;138(4):645–59.
122. Takebe N, Miele L, Harris PJ, Jeong W, Bando H, Kahn M, et al. pathways in cancer stem cells : clinical update. *Nat Publ Gr*. 2015;12(8):445–464.
123. Codony-servat J, Rosell R. Cancer stem cells and immunoresistance : clinical implications and solutions. *Transl lung cancer Res*. 2015;4(6):689–703.
124. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(1):11–26.
125. Polakis P. Drugging Wnt signalling in cancer. *EMBO J*. 2012;31(12):2737–46.
126. Wu X, Luo F, Li J, Zhong X, Liu K. Tankyrase 1 inhibitor XAV939 increases chemosensitivity in colon cancer cell lines via inhibition of the Wnt signaling pathway. *Int J Oncol*. 2016;48(4):1333–40.
127. Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov*. 2014 Jul 1;13:513.
128. Chen B, Dodge ME, Tang W, Lu J, Ma Z, Fan C, et al. Small molecule – mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol*. 2009;5(2):100–7.
129. Lepourcelet M, Chen YP, France DS, Wang H, Crews P, Petersen F, et al. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf / β -catenin protein complex. *Cancer Cell*. 2004;5(1):91–102.
130. Altaba, A., Sanchez, P. & Dahmane N. GLI AND HEDGEHOG IN CANCER : TUMOURS , EMBRYOS AND. *NatRevCancer*. 2002;2(5):361–372.
131. Cochrane CR, Szczepny A, Watkins DN, Cain JE. Hedgehog signaling in the maintenance of cancer stem cells. *Cancers (Basel)*. 2015;7(3):1554–85.
132. Velcheti V, Govindan R. Hedgehog signaling pathway and lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2007;2(1):7–10.
133. Rimkus TK, Carpenter RL, Qasem S, Chan M, Lo HW. Targeting the sonic hedgehog signaling pathway: Review of smoothed and GLI inhibitors. *Cancers (Basel)*. 2016;8(2):1–23.
134. Sloan AE et al. Targeting glioma initiating cells in GBM: a randomized phase 0/II study targeting the sonic hedgehog-signaling pathway. *Neuro Oncol*. 2014;16:42–52.
135. Dirix L. Discovery and Exploitation of Novel Targets by Approved Drugs. *J Clin Oncol*. 2014;32(8):720–1.
136. Sekulic A et al. Efficacy and Safety of Vismodegib in Advanced Basal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2012;366(23):2171–9.

137. Nanta R, Kumar D, Meeker D, Rodova M, Veldhuizen PJ Van, Shankar S, et al. NVP-LDE-225 (Erismodegib) inhibits epithelial – mesenchymal transition and human prostate cancer stem cell growth in NOD / SCID IL2R g null mice by regulating Bmi-1 and. *Oncogenesis*. 2013;2(4):e42-13.
138. Takebe N, Miele L, Harris PJ, Jeong W, Bando H, Kahn M, et al. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: Clinical update. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2015;12(8):445–64.
139. Andersson ER, Lendahl U. Therapeutic modulation of Notch signalling — are we there yet ? *Nat Publ Gr*. 2014;13(5):357–78.
140. Fortini ME. Notch Signaling: The Core Pathway and Its Posttranslational Regulation. *Dev Cell*. 2009;16(5):633–47.
141. Yuan X, Wu H, Han N, Xu H, Chu Q, Yu S, et al. Notch signaling and EMT in non-small cell lung cancer: Biological significance and therapeutic application. *J Hematol Oncol*. 2014;7(1):1–10.
142. Grudzien P, Lo S, Albain KS, Robinson P, Rajan P, Strack PR, et al. Inhibition of notch signaling reduces the stem-like population of breast cancer cells and prevents mammosphere formation. *Anticancer Res*. 2010;30(10):3853–67.
143. Belani CP, Dahlberg SE, Rudin CM, Fleisher M, Chen HX. Vismodegib or Cixutumumab in Combination With Standard Chemotherapy for Patients With Extensive-Stage Small Cell Lung Cancer : A Trial of the ECOG-ACRIN Cancer Research Group (E1508). *Cancer*. 2016;122(15):2371–8.
144. Tolcher AW, Messersmith WA, Mikulski SM, Papadopoulos KP, Kwak EL, Gibbon DG, et al. Phase I study of RO4929097, a gamma secretase inhibitor of notch signaling, in patients with refractory metastatic or locally advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2012;30(19):2348–53.
145. Suggitt M, Bibby MC. 50 Years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches. *Clin Cancer Res*. 2005;11(3):971–81.
146. Denicolaï E, Baeza-Kallee N, Tchoghandjian A, Carré M, Colin C, Jiglaire CJ, et al. Proscillaridin A is cytotoxic for glioblastoma cell lines and controls tumor xenograft growth in vivo. *Oncotarget* [Internet]. 2014;5(21).
147. Zeniou M, Fève M, Mameri S, Dong J, Salomé C, Chen W, et al. Chemical library screening and structure-function relationship studies identify bisacodyl as a potent and selective cytotoxic agent towards quiescent human glioblastoma tumor stem-like cells. *PLoS One*. 2015;10(8):1–35.
148. Varbanov HP, Kuttler F, Banfi D, Turcatti G, Dyson PJ. Repositioning approved drugs for the treatment of problematic cancers using a screening approach. *PLoS One*. 2017;12(2):1–16.
149. Suh JJ, Pettinati HM, Kampman KM, O'Brien CP. The status of disulfiram: A half of a century later. *J Clin Psychopharmacol*. 2006;26(3):290–302.
150. HALD J JE. A drug sensitising the organism to ethyl alcohol. *Lancet*. 1948;25:1001–4.
151. Peachey JE NC. Treatment of alcoholism with a sensitising drug. *Lancet*. 1948;25:1004–5.
152. Pani P, Trogu E VR et al. Disulfiram for the treatment of cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;20(1):CD007024.
153. Barth K, Malcolm R. Disulfiram: An Old Therapeutic with New Applications. *CNS Neurol Disord*

Referencias

- Drug Targets. 2010;9(1):5–12.
154. G o/tzsche P. Ditiocarb in HIV infection. *Lancet*. 1988 Oct 29;332(8618):1024.
155. Peniche AG, Renslo AR, Melby PC, Travi BL. Antileishmanial activity of disulfiram and thiuram disulfide analogs in an Ex Vivo model system is selectively enhanced by the addition of divalent metal ions. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):6463–70.
156. Iljin K, Ketola K, Vainio P, Halonen P, Kohonen P, Fey V, et al. High-throughput cell-based screening of 4910 known drugs and drug-like small molecules identifies disulfiram as an inhibitor of prostate cancer cell growth. *Clin Cancer Res*. 2009;15(19):6070–8.
157. Duan L, Shen H, Zhao G, Yang R, Cai X, Zhang L, et al. Inhibitory effect of Disulfiram/copper complex on non-small cell lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;446(4):1010–6.
158. Morrison BW, Doudican NA, Patel KR, Orlow SJ. Disulfiram induces copper-dependent stimulation of reactive oxygen species and activation of the extrinsic apoptotic pathway in melanoma. *Melanoma Res*. 2010;20(1):11–20.
159. Yang Y, Deng Q, Feng X, Sun J. Use of the disulfiram / copper complex for breast cancer chemoprevention in MMTV - erbB2 transgenic mice. *Mol Med Rep*. 2015;12:746–52.
160. Kauffman M, Kauffman M, Traore K, Zhu H, Trush M, Jia Z, et al. MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *React Oxyg Species*. 2016;2(5):361–70.
161. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*. 2008;44(5):619–26.
162. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
163. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611–22.
164. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Roy N, De Paepe A. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Vol. 3, *Genome Biol*. 2002. 1–11 p.
165. Dalerba P, Dylla SJ, Park I, Liu R, Wang X, Cho RW, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:10158–63.
166. Chang Y, Oh S, Yi Y, Kim S, Jin X, Kim H. Cancer stem cell traits in squamospheres derived from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2011;47(2):83–91.
167. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells-what challenges do they pose? The Cancer Stem Cell paradigm A semantic dispute? *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(7):497–512.
168. Maccalli C, De Maria R. Cancer stem cells: perspectives for therapeutic targeting. *Cancer Immunol Immunother*. 2015;64(1):91–7.
169. Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT, et al. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol*. 2007;1(1):84–96.

170. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003;63(18):5821–8.
171. Reynolds BA WS. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol.* 1996;175(1):1–13.
172. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 2005;65(13):5506–11.
173. Collura A, Marisa L, Trojan D, Buhard O, Lagrange A, Saget A, et al. Extensive characterization of sphere models established from colorectal cancer cell lines. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(4):729–42.
174. Fessart D, Begueret H, Delom F. Three-dimensional culture model to distinguish normal from malignant human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J.* 2013;42(5):1345–56.
175. Watanabe Y, Yoshimura K, Yoshikawa K, Tsunedomi R, Shindo Y, Matsukuma S, et al. A stem cell medium containing neural stimulating factor induces a pancreatic cancer stem-like cell-enriched population. *Int J Oncol.* 2014;45(5):1857–66.
176. Fan X, Liu S, Su F, Pan Q, Lin T. Effective enrichment of prostate cancer stem cells from spheres in a suspension culture system. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2012;30(3):314–8.
177. Ramgolam K, Lauriol J, Lalou C, Lauden L, Michel L, de la Grange P, et al. Melanoma spheroids grown under neural crest cell conditions are highly plastic migratory/invasive tumor cells endowed with immunomodulator function. *PLoS One.* 2011;6(4).
178. Liao J, Qian F, Tchabo N, Mhaweche-Fauceglia P, Beck A, Qian Z, et al. Ovarian cancer spheroid cells with stem cell-like properties contribute to tumor generation, metastasis and chemotherapy resistance through hypoxia-resistant metabolism. *PLoS One.* 2014;9(1):1–13.
179. Yasui K, Shimamura M, Mitsutake N NY. SNAIL induces epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in aldehyde dehydrogenase-negative thyroid cancer cells. *Thyroid.* 2013;23:989–96.
180. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, et al. Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* 2006;66(19):9339–44.
181. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005;65(23):10946–51.
182. Munera Maravilla E. Novel therapeutic strategies in NSCLC: Lung-tumorspheres as an effective in vitro screening platform. *J Thorac Oncol.* 2016;11(4):81.
183. Herreros-Pomares A, De-Maya-Girones JD, Calabuig-Fariñas S, Lucas R, Martínez A, Pardo-Sánchez JM, et al. Lung tumorspheres reveal cancer stem cell-like properties and a score with prognostic impact in resected non-small-cell lung cancer. *Cell Death Dis.* 2019;10(9):1–14.
184. Assanga I, Luján L. Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities. *Int J Biotechnol Mol Biol Res.* 2013;4(4):60–70.
185. Paz-ares L, Marinis F De, Dediu M, Thomas M, Pujol J, Bidoli P, et al. Maintenance therapy with pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care after induction

Referencias

- therapy with pemetrexed plus cisplatin for advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (PARAMOUNT): a double-blind, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(3):247–55.
186. Provencio M et al. Lung Cancer Cisplatin plus vinorelbine as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer: Is a hemogram on day 8 essential? *Lung Cancer.* 2010;68(3):415–9.
 187. Azzoli CG et al. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on Chemotherapy for Stage IV. *J Clin Oncol.* 2010;27(36):6251–6266.
 188. Longley D.B. et al. Molecular mechanism of drug resistance. *J Pathol.* 2005;205:275–92.
 189. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* 2007;26(22):3279–90.
 190. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *J Clin Invest.* 2001;107(3):241–6.
 191. Fan D, Zhang Y, Hu X, Li J, Zhang W. Activation of AKT / ERK confers non-small cell lung cancer cells resistance to vinorelbine. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(1):134–43.
 192. Perri F, Lazzari G, Vittoria G Della. Oral vinorelbine : a feasible and safe partner for radiotherapy in the treatment of locally advanced non-small cell lung cancer. *OncoTargetsTher.* 2016;9:2359–64.
 193. Yang JC, Srimuninnimit V. First-Line Pemetrexed plus Cisplatin followed by Gefitinib Maintenance Therapy versus Gefitinib Monotherapy in East Asian Never-Smoker Patients with Locally Advanced or Metastatic Nonsquamous Non – Small Cell Lung Cancer : Final Overall Survival Resul. *J Thorac Oncol.* 2015;11(3):370–9.
 194. Zhu K, Fang W, Chen Y, Lin S, Chen X. TNF-related apoptosis-inducing ligand enhances vinorelbine-induced apoptosis and antitumor activity in a preclinical model of non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 2014;32:1234–42.
 195. Greer RM, Peyton M, Larsen JE, Girard L, Xie Y, Gazdar A, et al. SMAC mimetic (JP1201) sensitizes non-small cell lung cancers to multiple chemotherapy agents in an IAP dependent but TNF α independent manner Rachel. *Cancer Res.* 2012;71(24):7640–8.
 196. Kawabata S, Chiang C, Tsurutani J, Shiga H. Rapamycin downregulates thymidylate synthase and potentiates the activity of pemetrexed in non-small cell lung cancer ABSTRACT : *Oncotarget.* 2014;5(4):1062–1070.
 197. Takezawa K, Okamoto I, Okamoto W, Takeda M, Sakai K, Tsukioka S, et al. Thymidylate synthase as a determinant of pemetrexed sensitivity in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer [Internet].* 2011;104(10):1594–601.
 198. Martı J, Villar VH, Vo O, Martı J, Barcelo F, Gutie A. Nilotinib Counteracts P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance and Synergizes the Antitumoral Effect of Doxorubicin in Soft Tissue Sarcomas. *PLoS One.* 2012;7(5):1–12.
 199. Wang Y, Huang H, Yang L, Zhang Z, Ji H. Cetuximab-modified mesoporous silica nano-medicine specifically targets EGFR-mutant lung cancer and overcomes drug resistance. *Nat Publ Gr.* 2016;6(1):25468.
 200. Aggerholm-Pedersen N, Demuth C, Safwat A, Meldgaard P, Kassem M, Sandahl Sorensen B. Dasatinib and doxorubicin treatment of sarcoma initiating cells: A possible new treatment

- strategy. *Stem Cells Int.* 2016;2016.
201. Liang SQ, Marti TM, Dorn P, Froment L, Hall SRR, Berezowska S, et al. Blocking the epithelial-to-mesenchymal transition pathway abrogates resistance to anti-folate chemotherapy in lung cancer. *Cell Death Dis [Internet]*. 2015;6(7):e1824-12.
 202. Blumgart H, Freedberg AS. The Clinical Use of Digitalis Preparations. *Circulation*. 1955;XII(1):291–304.
 203. Barenholz Y. Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J Control Release*. 2012;160(2):117–34.
 204. Knox RJ, Keen KL, Luchansky L, Terasawa E, Freyer H, Barbee SJ, et al. Comparative effects of sodium pyrrithione evoked intracellular calcium elevation in rodent and primate ventral horn motor neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;366(1):48–53.
 205. Nechushtan H. et al. A Phase IIb Trial Assessing the Addition of Disulfiram to Chemotherapy for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist*. 2015;20:366–7.
 206. Morrow JK. “Targeting TRAF6 for Cancer Therapeutical Development.” *UT GSBS Diss Theses (Open Access)*. 2012;293.
 207. Park S, Kim JY, Lee SH, Suh B, Keam B, Kim TM, et al. KRAS G12C mutation as a poor prognostic marker of pemetrexed treatment in non-small cell lung cancer. *Korean J Intern Med*. 2017;32(3):514–22.
 208. Svaton M, Fiala O, Pesek M, Bortlicek Z, Minarik M, Benesova L, et al. The Prognostic Role of KRAS Mutation in Patients with Advanced NSCLC Treated with Second- or Third-line Chemotherapy. *Anticancer Res*. 2016;36(3):1077–82.
 209. Fakhri M, O’Neil B, Price TJ, Falchook GS, Desai J, Kuo J, et al. Phase 1 study evaluating the safety, tolerability, pharmacokinetics (PK), and efficacy of AMG 510, a novel small molecule KRASG12C inhibitor, in advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2019 May 20;37(15_suppl):3003.
 210. Bustamante Alvarez JG, Otterson GA. Agents to treat BRAF-mutant lung cancer. *Drugs Context*. 2019;8:31–5.
 211. Gainor JF et al. Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Discov*. 2017;6(10):1118–33.
 212. Grossmann KF, Blankenship MB, Akerley W, Terrazas MC, Kosak KM, Boucher KM, et al. Abstract 1308: A phase I clinical study investigating disulfiram and copper gluconate in patients with advanced treatment-refractory solid tumors involving the liver. *Cancer Res [Internet]*. 2011 Apr 15;71(8 Supplement):1308 LP – 1308.
 213. Liu P, Brown S, Goktug T, Channathodiyil P, Kannappan V, Hugnot JP, et al. Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. *Br J Cancer [Internet]*. 2012;107(9):1488–97.
 214. Kim SK, Kim H, Lee D hye, Kim T shin, Kim T, Chung C, et al. Reversing the Intractable Nature of Pancreatic Cancer by Selectively Targeting ALDH-High, Therapy-Resistant Cancer Cells. *PLoS One*. 2013;8(10):1–11.
 215. Han D, Wu G, Chang C, Zhu F, Xiao Y, Li Q, et al. Disulfiram inhibits TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and stem-like features in breast cancer via ERK / NF- κ B / Snail pathway.

Referencias

- Oncotarget. 2015;6(38):40907–19.
216. Chiba T, Suzuki E, Yuki K, Zen Y, Oshima M, Miyagi S, et al. Disulfiram Eradicates Tumor-Initiating Hepatocellular Carcinoma Cells in ROS-p38 MAPK Pathway-Dependent and -Independent Manners. *PLoS One*. 2014;9(1):e84807.
217. Hasinoff BB, Patel D. Disulfiram is a slow-binding partial noncompetitive inhibitor of 20S proteasome activity. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2017;633:23–8.
218. Choi YW, Jeon SY, Jeong GS, Lee HW, Jeong SH, Kang SY, et al. EGFR Exon 19 Deletion is Associated with Favorable Overall Survival after First-line Gefitinib Therapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials*. 2018;41(4):385–90.
219. Liang H, Pan Z, Wang W, Guo C, Chen D, Zhang J, et al. The alteration of T790M between 19 del and L858R in NSCLC in the course of EGFR-TKIs therapy: A literature-based pooled analysis. *J Thorac Dis*. 2018;10(4):2311–20.
220. Chen P, Huang H, Wang Y, Jin J, Long W, Chen K, et al. Curcumin overcome primary gefitinib resistance in non-small-cell lung cancer cells through inducing autophagy-related cell death. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;8:1–17.
221. Zhou Y, Lin Z, Zhang X, Chen C, Zhao H, Hong S, et al. First-line treatment for patients with advanced non-small cell lung carcinoma and high PD-L1 expression: Pembrolizumab or pembrolizumab plus chemotherapy. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):1–6.
222. Dastjerdi MN, Babazadeh Z, Rabbani M, Gharagozloo M, Esmaeili A, Narimani M. Effects of disulfiram on apoptosis in PANC-1 human pancreatic cancer cell line. *Res Pharm Sci* [Internet]. 2014 Jul;9(4):287–94.
223. Wu X, Xue X, Wang L, Wang W, Han J, Sun X, et al. Suppressing autophagy enhances disulfiram/copper-induced apoptosis in non-small cell lung cancer. *Eur J Pharmacol*. 2018 May 15;827:1–12.
224. Li W, Zhang M, Xu L, Lin D, Cai S, Zou F. The apoptosis of non-small cell lung cancer induced by cisplatin through modulation of STIM1. *Exp Toxicol Pathol*. 2013;65(7–8):1073–81.
225. Wickström M, Danielsson K, Rickardson L, Gullbo J, Nygren P, Isaksson A, et al. Pharmacological profiling of disulfiram using human tumor cell lines and human tumor cells from patients. *Biochem Pharmacol*. 2007 Jan 1;73(1):25–33.
226. Cen D, Gonzalez RI, Buckmeier JA, Kahlon RS, Tohidian NB, Meyskens FL. Disulfiram Induces Apoptosis in Human Melanoma Cells: A Redox-related Process 1. *Mol Cancer Ther*. 2002;1(January):197–204.
227. Allensworth JL, Evans MK, Aldrich J, Festa RA, Finetti P, Ueno NT, et al. Disulfiram (DSF) acts as a copper ionophore to induce copper-dependent oxidative stress and mediate anti-tumor efficacy in inflammatory breast cancer. *Mol Oncol*. 2015;9:1155–68.
228. Cheriyan VT, Wang Y, Muthu M, Jamal S, Chen D, Yang H, et al. Disulfiram suppresses growth of the malignant pleural mesothelioma cells in part by inducing apoptosis. *PLoS One*. 2014;9(4).
229. Navrátilová J, Jungová P, Vanhara P, Preisler JAN, Kanicky V, Smarda JAN. Copper ions regulate cytotoxicity of disulfiram to myeloid leukemia cells. *Int J Mol Med*. 2009;24:661–70.
230. Triscott J, Lee C, Hu K, Fotovati A, Berns R, Pambid M, et al. Disulfiram, a drug widely used to

- control alcoholism, suppresses the self-renewal of glioblastoma and over-rides resistance to temozolomide. *Oncotarget* [Internet]. 2012;3(10):1112–23.
231. J. WW. MHL. C. DISULFIRAM-MEDIATED INHIBITION OF NF- κ B ACTIVITY ENHANCES CYTOTOXICITY OF 5-FLUOROURACIL IN HUMAN COLORECTAL CANCER. *Int J Cancer*. 2003;104:504–11.
 232. Robinson TJ, Pai M, Liu JC, Vizeacoumar F, Sun T, Egan SE, et al. High-throughput screen identifies disulfiram as a potential therapeutic for triple-negative breast cancer cells: Interaction with IQ motif-containing factors. *Cell Cycle*. 2013;12(18):3013–24.
 233. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2016;1863(12):2977–92.
 234. Gupta SC, Hevia D, Patchva S, Park B, Koh W, Aggarwal BB. Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer: The Roles of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy. *Antioxid Redox Signal*. 2011;16(11):1295–322.
 235. HERRERA B, ÁLVAREZ AM, SÁNCHEZ A, FERNÁNDEZ M, RONCERO C, BENITO M, et al. Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor β in fetal hepatocytes. *FASEB J*. 2002;15(3):741–51.
 236. Zhu B, Li Y, Lin Z, Zhao M, Xu T, Wang C, et al. Silver Nanoparticles Induce HePG-2 Cells Apoptosis Through ROS-Mediated Signaling Pathways. *Nanoscale Res Lett*. 2016;11(1):0–7.
 237. Zhe N, Chen S, Zhou Z, Liu P, Lin X, Yu M, et al. HIF-1 α inhibition by 2-methoxyestradiol induces cell death via activation of the mitochondrial apoptotic pathway in acute myeloid leukemia. *Cancer Biol Ther*. 2016;17(6):625–34.
 238. Zhai JW, Gao C, Ma WD, Wang W, Yao LP, Xia XX, et al. Geraniin induces apoptosis of human breast cancer cells MCF-7 via ROS-mediated stimulation of p38 MAPK. *Toxicol Mech Methods*. 2016;26(5):311–8.
 239. Liu JF, Hou CH, Lin FL, Tsao YT, Hou SM. Nimbolide induces ROS-regulated apoptosis and inhibits cell migration in osteosarcoma. *Int J Mol Sci*. 2015;16(10):23405–24.
 240. Yip NC, Fombon IS, Liu P, Brown S, Kannappan V, Armesilla AL, et al. Disulfiram modulated ROS-MAPK and NFB pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties. *Br J Cancer*. 2011;104(10):1564–74.
 241. Fang Y, Wang J, Wang G, Zhou C, Wang P, Zhao S, et al. Inactivation of p38 MAPK contributes to stem cell-like properties of non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2017;8(16):26702–17.
 242. Liu X, Wang L, Cui W, Yuan X, Lin L, Cao Q, et al. Targeting ALDH1A1 by disulfiram/copper complex inhibits non-small cell lung cancer recurrence driven by ALDH-positive cancer stem cells. *Oncotarget* [Internet]. 2016;7(36):58516–30.
 243. Long F-Y, Chen D-Q, Vaziri N, Guo Y, Zhao Y-Y. Small molecule inhibitors of epithelial-mesenchymal transition for the treatment of cancer and fibrosis. *Med Res Rev*. 2019 May 1;
 244. Liu R, Xu KP, Tan GS. Cyclooxygenase-2 inhibitors in lung cancer treatment: Bench to bed. *Eur J Pharmacol*. 2015;769:127–33.
 245. Jackson B, Brocker C, Thompson DC, Black W, Vasiliou K, Nebert DW, et al. Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics*. 2011;5(4):283–303.

Referencias

246. Pors K, Moreb JS. Aldehyde dehydrogenases in cancer: An opportunity for biomarker and drug development? *Drug Discov Today* [Internet]. 2014;19(12):1953–63.
247. Triscott J.; Rose Pambid M.; Dunn S.E. Bullseye : Targeting Cancer Stem Cells to Improve the Treatment of Gliomas by Repurposing. *Stem Cells*. 2015;33:1042–6.
248. Huang Y, Ju B, Tian J, Liu F, Yu HU, Xiao H. Ovarian cancer stem cell-specific gene expression profiling and targeted drug prescreening. *Oncol Rep*. 2014;31:1235–48.
249. Appleby TC, Greenstein AE, Hung M, Licican A, Velasquez M, Villasenor AG, et al. Biochemical characterization and structure determination of a potent, selective antibody inhibitor of human MMP9. *J Biol Chem*. 2017;292(16):6810–20.
250. Marshall DC, Lyman SK, McCauley S, Kovalenko M, Spangler R, Liu C, et al. Selective allosteric inhibition of MMP9 is efficacious in preclinical models of ulcerative colitis and colorectal cancer. *PLoS One*. 2015;10(5):1–26.
251. Scannevin RH, Alexander R, Haarlander TM, Burke SL, Singer M, Huo C, et al. Discovery of a highly selective chemical inhibitor of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) that allosterically inhibits zymogen activation. *J Biol Chem*. 2017;292(43):17963–74.
252. Cho HJ, Lee TS, Park JB, Park KK, Choe JY, Sin DI, et al. Disulfiram suppresses invasive ability of osteosarcoma cells via the inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression. *J Biochem Mol Biol*. 2007;40(6):1069–76.
253. Hoda M, Cavuturu BM, Iqbal S, Shakya G, Rajagopalan R. Disulfiram and disulfiram-loaded poly-[lactide-co-glycolic acid] nanoparticles modulate metastatic markers and proteasomal activity in hepatocarcinoma Hep3b cell line. *Eur J Nanomedicine*. 2017;9(3–4).
254. Liu P, Kumar IS, Brown S, Kannappan V, Tawari PE, Tang JZ, et al. Disulfiram targets cancer stem-like cells and reverses resistance and cross-resistance in acquired paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer cells. *Br J Cancer*. 2013;109(7):1876–85.
255. Liu X, Wang L, Cui W, Yuan X, Lin L, Cao Q, et al. Targeting ALDH1A1 by disulfiram/copper complex inhibits non-small cell lung cancer recurrence driven by ALDH-positive cancer stem cells. *Oncotarget*. 2016;7(36):58516–30.
256. Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, Muramatsu H, Kozaki KI, Nakamura S, et al. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res*. 1998;58(17):3761–4.
257. Ogino S, Kirkner GJ, Noshro K. Cyclo-oxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(24):8221–7.
258. Qing F, Yuyin Z, Qilai W. Suppression of cyclooxygenase 2 increases chemosensitivity to sesamin through the Akt-PI3K signaling pathway in lung cancer cells. *Int J Mol Med*. 2019;43(1):507–16.
259. Sun Y, Zhou Q-M, Lu Y-Y, Zhang H, Chen Q-L, Zhao M, et al. Resveratrol Inhibits the Migration and Metastasis of MDA-MB-231 Human Breast Cancer by Reversing TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Molecules*. 2019;24(6):1131.
260. Marsden CG, Wright MJ, Carrier L, Moroz K, Pochampally R, Rowan BG. “A novel in vivo model for the study of human breast cancer metastasis using primary breast tumor-initiating cells from patient biopsies.” *BMC Cancer*. 2012;12(10):1–16.

261. Jivan R, Peres J, Damelin LH, Wadee R, Veale RB, Prince S, et al. Disulfiram with or without metformin inhibits oesophageal squamous cell carcinoma in vivo. *Cancer Lett.* 2018;417:1–10.
262. Nguyen KT, King JT, Chen Z. Disulfiram Is a DNA Demethylating Agent and Inhibits Prostate Cancer Cell Growth. *Prostate.* 2011;114(25):8291–300.

VII. ANEXOS

ANEXO 1. COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE ESTE ESTUDIO

A. 2018 ASCO Annual Meeting.

New Generation of Cancer Stem Cells Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer

Background: Lung cancer is the commonest tumor worldwide of which the most frequent type is non-small cell lung cancer (NSCLC) that represents a large proportion of cancer deaths and is characterized by low response treatment rates and poor overall prognosis. Cancer Stem Cells (CSCs) model proposes that drug resistance, tumor progression, metastasis and recurrence might be driven by this subset of cells, with increased expression of stemness-associated markers and the ability to self-renew and differentiate.

Methods: Drug screening was performed by comparing tumorspheres and monolayer cells from 4 resected NSCLC patients and 12 NSCLC cell lines, which were plated at the desired density in 200 μ l of medium in 96-well plates. High-throughput screening was performed with two commercial chemical libraries (Prestwick and Myria). These compounds were added in three replicates per eight tested concentrations (from 0.01 to 50 μ M). Cell viability was measured after 48 h (MTS Assay) and was normalized to the respective mock-treated control cells and presented as a percentage of the control. Based on this study three novel compounds were identified, namely compound A, B and C. Statistical analyses were considered significant at $p < 0.05$. EC50 was calculated with GraphPad Prism 6. Subsequently, relative gene expression analysis was run by RT-qPCR in the tumorspheres treated with the three compounds.

Results: CSC-markers, pluripotency genes and signalling pathways were characterized from the resected NSCLC patients' tumor-tissue and cell lines-like tumor spheres to use them as an *in vitro* drug screening platform. The screening assay showed selective reduced cellular viability in lung tumorspheres when the three chemically related compounds were tested ($p < 0.05$). This anti-proliferative effect correlated with an earlier decrease in the expression of the CSC markers critical in lung tumorspheres, such as ALDH1A1, KLF4 and SOX2.

Conclusions: These compounds could be a serious promising targeted therapy for lung CSCs as major CSC-markers inhibitors, including pluripotency genes and signalling pathways. Our findings suggest that these compounds can inhibit CSCs-like properties, as evidenced by the lung sphere assays and reveal a potential use for developing novel therapeutic approaches.

B. ESMO 2018 Congress.

High-throughput screening of new drugs targeting lung CSCs

Background: Non-small cell lung cancer (NSCLC), the most common subtype of lung cancer, is characterized by low response rates and a poor prognosis. The majority of patients are diagnosed in advanced stages, where chemotherapy remains the gold standard of treatment. However, the resistance has been associated to cancer stem cells (CSCs), a highly tumorigenic subpopulation of cells with the ability to grow as spheres in non-adherent conditions. The aim of this study was to discover novel therapeutic strategies through screening platforms in order to target CSCs population.

Methods: High-throughput screening with commercial chemical libraries (Prestwick and Myria) was performed, comparing cytotoxic effect in monolayer cells vs. lung-tumorspheres derived from 8 resected NSCLC patients and 11 NSCLC cell lines. Compounds were added per triplicates at different concentrations (0.01 to 50 μ M). Cell viability was measured after 48h using MTS Assay. Consecutively, 8 tumors were induced by inoculating resected NSCLC patient and H1650 lung-tumor-spheroids in NOD/SCID mice. Selected drugs were administered intraperitoneally (3 times a week, 100 mg/kg). Characterization of the inhibition pathway involved in the mechanism of action of these drugs was performed by RT-qPCR.

Results: Three drugs of the commercial chemical libraries (DSF, Compound 1 and Compound 2) were identified with greater cytotoxic potential against lung tumorspheres, compared to a poor or null effect on monolayer cells. These results were validated *in vivo*, which demonstrated the capacity of these drugs to inhibit tumor growth in mice treated respect to the control (Table 1). We are currently characterizing the signaling pathways involved in the mechanism of action of these drugs.

Conclusions: Our findings reveal that these drugs can inhibit CSCs like properties, as evidenced in the lung tumorspheres *in vitro* and *in vivo* assays. Therefore, these compounds could be a promising targeted therapy as potential inhibitors of lung CSCs.

C. Congreso SEOM 2018.**Cribado de alto rendimiento y evaluación *in vitro/in vivo* de nuevos fármacos dirigidos a Células Madre del Cáncer de pulmón**

Introducción y Objetivos: El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) se caracteriza por bajas tasas de respuesta y mal pronóstico. La mayoría de los pacientes son diagnosticados en estadios avanzados, donde la quimioterapia sigue siendo el estándar de tratamiento a pesar de los avances producidos en estos últimos años. Las resistencias se han asociado a las Células Madre Tumorales (CMTs), una subpoblación altamente tumorigénica, con propiedades de auto renovación y con la capacidad de crecer en formación esferoide en condiciones de no adherencia. El objetivo de este estudio es descubrir nuevas estrategias terapéuticas frente a las CMTs de pulmón a través de plataformas de cribado.

Materiales y Métodos: Se realizó un cribado con quimiotecas comerciales (Prestwick y Myria), comparando el efecto citotóxico en células en monocapa frente a las tumoresferas de 8 pacientes con CPNM resecaos y 11 líneas celulares de CPNM. Los compuestos se analizaron por triplicado en tres experimentos independientes a diferentes concentraciones (0,01 a 50 μ M). Consecutivamente, se indujeron 8 tumores en ratones NOD/SCID mediante la inoculación de tumoresferas derivadas de un paciente con CPNM y de la línea H1650. Los fármacos seleccionados se administraron por vía intraperitoneal (3 veces por semana, 100 mg/kg). En estos momentos se están caracterizando las vías implicadas en la inhibición de las CTMs de estos fármacos mediante análisis de expresión génica.

Resultados: Se identificaron 3 fármacos (DSF, Compuesto 1 y Compuesto 2) con mayor efecto citotóxico contra las tumoresferas, en comparación con un efecto pobre o nulo sobre las células en monocapa. Estos resultados se validaron *in vivo*, demostrando la capacidad de estos fármacos para inhibir el crecimiento tumoral en ratones tratados con respecto al control (Tabla 1). Actualmente se están analizando las vías de señalización involucradas en el mecanismo de acción de estos fármacos.

Conclusión: Nuestros hallazgos *in vitro* e *in vivo* revelan que los presentes fármacos pueden inhibir las propiedades de las CMTs de pulmón. Por lo tanto, podrían ser una potencial terapia dirigida frente a la subpoblación de CMTs.

D. 16th ASEICA INTERNATIONAL CONGRESS (2018).

Lung- tumorspheres as an effective *in vitro* and *in vivo* platform for screening anti-cancer stem cell drugs

Introduction: Non-small cell lung cancer (NSCLC) in most patients is diagnosed in advanced stages, where chemotherapy continues to be one of the treatment standards, and despite the advances made in recent years, the response rates to the treatments are low and progressions occur in a large percentage of patients. Resistances have been associated with a minority population of extremely tumorigenic cells, with self-renewing properties and with the ability to grow in spheroid formation in non-adherent conditions, called Cancer Stem Cells (CSCs).

Objective: The main aim of this study is to discover new therapeutic strategies against lung CSCs through screening platforms.

Methodology: *In vitro* screening was performed with commercial libraries (Prestwick and Myria), comparing the cytotoxic effect of the compounds on monolayer cells against tumorspheres (formations enriched in CSCs) of 7 patients with resected NSCLC and 11 NSCLC cell lines. The compounds were analyzed in triplicate in three independent experiments at different concentrations (0.01 μ M to 50 μ M). Sequentially, 8 tumors were induced in NOD / SCID mice by inoculating tumors derived from a patient with NSCLC (FIS-343) and the H1650 line. The selected drugs were administered intraperitoneally (3 times per week, 100 mg / kg).

Results: Three drugs (DSF, JMM 1-3 and JMM 1-4) were identified with greater cytotoxic effect potential against lung tumorspheres, compared to a poor or null effect on monolayer cells (Figure 1). These results were validated *in vivo*, demonstrating the capacity of these drugs to inhibit tumor growth in mice treated respect to the control (Table 1).

Conclusions: Our findings reveal that these drugs can inhibit the formation and viability of lung-tumorspheres and the tumor growth in mice, as evidenced *in vitro* and *in vivo* assays. Therefore, these compounds could be a promising targeted therapy as potential inhibitors of lung-CSCs.

E. I Encuentro de Jóvenes Investigadores de CIBERONC / Jornadas de formación CIBERONC – CIBERES 2018.

Lung- tumorspheres as an effective *in vitro* and *in vivo* platform for screening anti-cancer stem cell drugs.

Introduction: Lung cancer is the leading cause of cancer-related mortality around the world. Non-small cell lung cancer (NSCLC), the most common subtype of lung cancer, is characterized by low response treatment rates and a poor overall prognosis. The most of patients are diagnosed in advanced stages, where chemotherapy remains the insufficient gold standard of treatment. However, the drug resistance, tumor progression, and metastasis has been associated to cancer stem cells (CSCs), a highly tumorigenic subpopulation of cells with the ability to grow as spheres in non-adherent conditions and the ability to self-renew and differentiate.

Methods: Drug screening was performed comparing cytotoxic effect in monolayer cells and lung-tumorspheres derived from 7 resected NSCLC patients and 11 NSCLC cell lines, which were plated at the desired density in 200µl of medium in 96-well plates. High-throughput screening was performed with two commercial chemical libraries (Prestwick and Myria). These compounds were added per triplicates at different concentrations (0.01 to 50 µM). Cell viability was measured after 48h using MTS Assay, normalized to the respective mock-treated control cells. EC50 was calculated using GraphPad Prism 6. Afterwards, 8 tumors were induced by inoculating resected NSCLC patient and H1650 lung-tumorspheres in NOD/SCID mice. Selected drugs were administered intraperitoneally (3 times per week, 100 mg/kg).

Conclusions: This study has allowed the identification of three novel drugs of the commercial chemical libraries [Disulfiram (DSF), Compound 1 (COMP1) and Compound 2 (COMP2)] with greater cytotoxic potential against lung-tumorspheres, as compared to a poor or null effect on monolayer cells. These results were validated *in vivo*, which demonstrated the capacity of these drugs to inhibit tumor growth in mice treated respect to the control (Table 1). In conclusion, our findings reveal that these drugs can inhibit the formation and viability of lung-tumorspheres and the tumor growth in mice, as evidenced *in vitro* and *in vivo* assays. Therefore, these compounds could be a promising targeted therapy as potential inhibitors of lung-CSCs.

DOCUMENTO DE INFORMACION AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

DONANTE: _____

ACERCA DE LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA OBTENIDAS EN EL CURSO DE PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS, TERAPÉUTICOS O DIAGNÓSTICOS.

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN	Oncología Molecular
INVESTIGADOR PRINCIPAL	Dr. Carlos Camps
CENTRO	Servicio de Oncología Médica (SOM) del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) y Laboratorio de Oncología Molecular de la Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUUV)
EQUIPO INVESTIGADOR	Facultativos del SOM, personal de la Unidad de Investigación Clínica del SOM, y del laboratorio de Oncología Molecular, miembros de los servicios quirúrgicos involucrados (Cirugía Torácica, Cirugía General), facultativos del servicio de Anatomía Patológica.

1. DESCRIPCIÓN GENERAL: La línea de investigación de “**Oncología Molecular**” centra sus esfuerzos en la comprensión de la patogénesis de los eventos genéticos y moleculares implicados en el origen y la progresión del cáncer. Uno de los aspectos de mayor interés en esta línea de investigación es la búsqueda de biomarcadores que puedan ser usados en la clínica y ayuden a la individualización del tratamiento del cáncer.

PROPÓSITO DE LA LINEA DE INVESTIGACIÓN: Analizar en diferentes tipos de muestras, factores que puedan ser importantes en el diagnóstico, pronóstico y en la respuesta del cáncer a los tratamientos empleados, así como en la aparición de efectos tóxicos asociados a dichos tratamientos. Si bien la constitución genética de los seres humanos es muy similar, existen pequeñas diferencias entre las personas que, en algunos casos podrían asociarse con el desarrollo o evolución de diferentes enfermedades. Por otra parte, los tumores también presentan diferencias a nivel genético que necesitan seguir siendo estudiadas. Por lo tanto, para poder llevar a cabo esta línea de investigación, es necesario disponer de muestras biológicas para poder realizar estos estudios genéticos. También es necesario recoger datos sobre su historial médico para obtener información que pudiera tener relevancia para nuestros estudios.

2. IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO: Durante la intervención quirúrgica o la prueba diagnóstica a la que va a ser sometido en las instalaciones del CHGUV se tomarán muestras de sus tejidos y/o sangre. El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente una parte de la muestra biológica sobrante de la intervención o prueba a una colección de muestras que se usará con fines de investigación biomédica, sin que esto suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. También es posible que le recojamos muestras biológicas que no requieran un procedimiento invasivo, como orina heces, saliva etc. o que el procedimiento de obtención sea mínimamente invasivo como una extracción de sangre. Las muestras que done se almacenarán en una colección de muestras que corresponden a una Línea de Investigación sobre Oncología Molecular, que se encuentra en las instalaciones de la FIHGUUV y que cumple con los requerimientos establecidos en la normativa vigente.

Sus muestras solo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación avalados científicamente y que hayan sido evaluados y aprobados por el CEIC, en los que participen miembros del equipo investigador que forma parte de esta línea de investigación.

3. OBJETIVO: El Centro Sanitario en el que usted está siendo atendido/tratado, dispone de investigadores que desean recoger y almacenar sus muestras biológicas para poder realizar proyectos de investigación biomédica en el área de la Oncología. Los resultados de dichos proyectos de investigación pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico, pronóstico y tratamientos.

4. BENEFICIOS ESPERADOS: Por su participación no percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas. Sin embargo, si las intervenciones que se pudieran realizar tuvieran éxito, podrían ayudar en el futuro a pacientes que tienen la misma enfermedad o padecen otras enfermedades similares.

Las muestras de los tejidos y/o sangre no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales.

La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando por razones de salud puedan ser necesarias.

5. CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU REALIZACIÓN: Sólo si usted lo desea, existe la posibilidad de que pueda ser contactado en el futuro para completar o actualizar la información con la que contamos relacionada con su enfermedad.

Es posible, que los estudios realizados sobre sus muestras aporten información relevante para su salud o la de sus familiares. Tiene derecho tanto a ser informado como a que no se le informe de los datos obtenidos en la investigación. A estos efectos se entenderá que no desea recibir tal información salvo que manifieste lo contrario, utilizando para ello el formulario que y se adjunta al presente documento.

6. CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU NO REALIZACIÓN Y DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO. La decisión de donar muestras biológicas es totalmente voluntaria, pudiendo negarse a donarlas e incluso pudiendo revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si decidiera revocar el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, será destruida o anonimizada. Tales efectos, no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se han llevado a cabo una vez haya revocado su consentimiento.

7. RIESGOS. El procedimiento que se le propone no supone ningún riesgo añadido para su salud ni compromete el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad, puesto que se trata de muestras sobrantes de la intervención, muestras invasivas obtenidas durante los procedimientos de diagnóstico, o muestras de sangre extra que se han obtenido para ser utilizadas en investigación. En este último caso, la extracción de sangre, apenas tiene efectos secundarios, lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 o 2 días. En el caso de las muestras que requieren procedimientos más complejos o invasivos, estos sólo se realizarán si forman parte del procedimiento habitual que debe realizarse para su correcto diagnóstico o tratamiento de su enfermedad.

8. PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD. Sus datos personales y de salud serán incorporados y tratados en una base de datos de la que es responsable el Investigador del Proyecto, que debe estar inscrita en un registro nacional dependiente del Instituto de Salud Carlos III y que debe cumplir con todos los requisitos legales. Sólo el INVESTIGADOR RESPONSABLE podrá relacionar estos datos con usted, siendo responsable de custodiar el documento de consentimiento y de garantizar el cumplimiento de su voluntad en relación al uso de la muestra biológica que usted cede para investigación. La información será procesada durante el análisis de los datos obtenidos y aparecerá en los informes y/o memorias de los proyectos derivados de la Línea de Investigación, aunque en ningún caso será posible identificarle, asegurando en todo momento el cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

La cesión de muestras así como de la información contenida en las bases de datos vinculadas a las mismas, solo se realizará si forman parte de la línea de investigación en la cual participan miembros del equipo investigador, realizándose un procedimiento de codificación previo, que consiste en desligar la información que le identifica sustituyéndola por un código.

Asimismo, el titular de los datos personales podrá ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición al tratamiento de datos de carácter personal, incluir alguna restricción sobre el uso de sus muestras, y ejercer los derechos de revocación del consentimiento (en este último caso, conforme al formulario que figura en el apartado 11) en los términos previstos en la normativa aplicable, dirigiendo al titular del centro el escrito correspondiente firmado por Ud. y copia de un documento acreditativo de su identidad.

9. DESTINO DE LAS MUESTRAS TRAS FINALIZACION DE LA LÍNEA DE INVESTIGACION. En el supuesto de finalización de la línea de investigación, es posible que existan muestras sobrantes. En relación a las mismas, se le ofrecen las siguientes opciones: a) la destrucción de la muestra sobrante, b) su utilización en otros proyectos de investigación biomédica, para lo cual, se le ofrece la opción de donar la muestra excedente al Biobanco del CHGUV (en el siguiente apartado le explicamos de manera resumida en que consiste un biobanco y cuáles son sus objetivos). En este caso, deberá marcar esta opción en el consentimiento incluido en este documento. En dicho consentimiento usted podrá escoger si desea que esta donación se haga codificada de forma que usted pueda conocer si lo desea los resultados de las investigaciones que se lleven a cabo, o anonimizada, si usted prefiere que nunca nadie pueda recobrar la relación entre sus muestras y su persona.

10. BIOBANCO. DEFINICIÓN Y OBJETIVOS. El Biobanco del CHGUV es un establecimiento público, sin ánimo de lucro, que acoge una colección organizada de muestras biológicas. Estas muestras almacenadas en el biobanco, tienen por finalidad ser utilizadas en proyectos de investigación biomédica que hayan sido aprobados por los comités ético y científico a los que esté adscrito el biobanco. Los resultados de las investigaciones realizadas con estas muestras pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico de las enfermedades o en nuevas formas de tratamientos de las mismas. Sus muestras seguirán almacenadas en el biobanco hasta el fin de las existencias si no existe una revocación del presente consentimiento.

11. DECLARACIONES Y FIRMAS.

Declaración del donante:

D./Dña _____, de _____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____ y nº de SIP _____

D./Dña _____, de _____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____ en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente _____, con DNI _____ y nº de SIP _____

DECLARO

Que he sido informado por el profesional de salud abajo firmante:

- Sobre las ventajas e inconvenientes del procedimiento
- Sobre el lugar de obtención, almacenamiento y proceso que sufrirán los datos personales y las muestras.
- Que mis muestras y datos personales serán tratados de acuerdo a la legislación vigente.
- Que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento y solicitar la eliminación o anonimización de todos mis datos personales y muestras que permanezcan almacenadas. Esta eliminación no se extendería a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hubieran llevado a cabo
- Que en cualquier momento, yo, mi representante legal, o tutor, de conformidad con lo establecido en el artículo 4, punto 5 de la Ley 14/2007, de 3 de Julio, puedo solicitar información sobre los datos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas.
- Que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas

CONSIENTO

- Que el CHGUV y la FIHGUV, a través de los miembros del equipo investigador de la Línea de Investigación: "Oncología Molecular", utilicen mis datos y las muestras, incluyendo la información sobre mi salud, para investigaciones biomédicas dentro del marco de la línea de investigación antes mencionada, manteniendo siempre la confidencialidad de mis datos.
- Libre y voluntariamente en la donación voluntaria de: (márquese con una cruz lo que proceda)
 - Mis tejidos excedentes
 - Muestra de heces, orina o saliva
 - Muestra de sangre
 - Muestras obtenidas en procedimientos que sean necesario para el diagnóstico)
- Yo, mi representante legal o tutor, accedo (márquese sí o no) a que los miembros del equipo investigador puedan contactarme en el futuro en el caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos.
 - Si
 - No
- Que en el supuesto de finalización de la línea de investigación, mis muestras sean (márquese con una cruz lo que proceda)
 - destruidas
 - cedidas al Biobanco del CHGUV y anonimizadas
 - cedidas al Biobanco del CHGUV codificada, junto a los datos clínicos asociados.

D. Dña : _____ FIRMA: _____

En _____, a _____ de _____ de 20 _____

DECLARACIÓN DEL PROFESIONAL DE SALUD:

He informado debidamente al donante:

Nombre facultativo: _____ DNI _____ Colegiado Nº _____

FIRMA : _____

En _____, a _____ de _____ de 20 _____

12. REVOCACIÓ DEL CONSENTIMIENTO.

Yo, D./Dña _____, con DNI _____ revoco el consentimiento prestado en fecha _____ de _____ de 20____ y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

Fdo: _____

En _____, a _____ de _____ de 20 _____

Yo, D./Dña _____, con DNI _____ como representante legal de D./ Dña _____, con DNI _____ revoco el consentimiento prestado en fecha ____ de _____ de 20____ y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

Fdo: _____

En _____, a _____ de _____ de 20 _____

SOLICITUD DE INFORMACION DE DATOS O RESULTADOS DERIVADOS DE LAS INVESTIGACIONES

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN	Oncología Molecular
------------------------	---------------------

PACIENTE: _____

D./Dña _____, de ____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____ y nº de SIP _____
D./Dña _____, de ____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____ _____ en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente _____, con DNI _____ y nº de SIP _____

SOLICITO

Ser informado/a del resultado de las investigaciones realizadas con la/las muestra/s donada/s de manera voluntaria en fecha _____ de _____ de 20____ si éstas afectan a mi salud o a la de mi representado.

Fdo.: _____

En _____, a _____ de _____ de 20____

FORMULARIO DE EVALUACIÓN ÉTICA DE UN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN/DOCENCIA CON ANIMALES

Fines del proyecto:	
Título del proyecto:	
Código de referencia (CEEA):	

DIRECTRICES ÉTICAS A SEGUIR EN LA INVESTIGACIÓN CON ANIMALES

Es sumamente importante que todos los investigadores que vayan a utilizar animales para sus investigaciones o prácticas docentes dediquen especial atención a:

- Revisar sus procedimientos y evaluar su idoneidad con respecto a los objetivos del estudio.
- Estudiar y considerar posibles estrategias alternativas a la utilización de animales y garantizar que los objetivos no pueden ser alcanzados por dichos procedimientos.
- Utilizar el menor número de animales posibles para la consecución de los objetivos, consultando a este respecto a expertos en estadística si fuera necesario.
- Velar para que los animales no sufran innecesariamente y proporcionarles, cuando sea necesario, analgésicos, anestésicos y otras sustancias apropiadas.
- Controlar que los métodos eutanásicos empleados sean adecuados a la especie de acuerdo con la normativa vigente.
- Controlar que el personal que participa en los procedimientos esté acreditado y entrenado para desempeñar las tareas que les corresponda.

A. DATOS GENERALES DEL PROYECTO.

1. Personal implicado.

1.1. Investigador Principal (IP):

NIF/ Pasaporte	Nombre y apellidos		
Institución			
Centro/Instituto/Departamento			
Calle	Población/Provincia	Código Postal	
Teléfono	Fax	Correo electrónico	
Categoría según el Real Decreto 53/2013; BOE 8 de febrero de 2013			
<input type="checkbox"/> B. Experimentador <input type="checkbox"/> C. Director procedimientos <input type="checkbox"/> D. Resp. bienestar <input type="checkbox"/> Ninguna			
Autoridad competente que expide la acreditación:			
Fecha:			

1.2. Investigador Responsable del Diseño de los Procedimientos en Animales (IRDPA):

❖ *Cumplimentar si el IP y el IRDPA son personas distintas.*

NIF/ Pasaporte		Nombre y apellidos	
Institución			
Centro/Instituto/Departamento			
Calle		Población/Provincia	Código Postal
Teléfono	Fax	Correo electrónico	
Obtención homologación Categoría C según el Real Decreto 53/2013; BOE 8 de febrero de 2013			
Autoridad competente que expide la acreditación:			
Fecha:			

1.3. Datos de otros investigadores/experimentadores:

❖ *Puede realizar variaciones de personal durante el periodo de aprobación del proyecto (5 años) modificando este apartado y reenviando su solicitud. El personal debe cumplir los requisitos de formación contemplados en el artículo 15 del RD 53/2013 (goo.gl/X8Yg7).*

NIF/ Pasaporte		Nombre y apellidos	
Teléfono		Correo electrónico	
Categoría según el Real Decreto 53/2013; BOE 8 de febrero de 2013			
<input type="checkbox"/> B. Experimentador <input type="checkbox"/> C. Director procedimientos <input type="checkbox"/> D. Resp. bienestar			
Autoridad competente que expide la acreditación:			
Fecha:			

NIF/ Pasaporte		Nombre y apellidos	
Teléfono		Correo electrónico	
Categoría según el Real Decreto 53/2013; BOE 8 de febrero de 2013			
<input type="checkbox"/> B. Experimentador <input type="checkbox"/> C. Director procedimientos <input type="checkbox"/> D. Resp. bienestar			
Autoridad competente que expide la acreditación:			
Fecha:			

NIF/ Pasaporte		Nombre y apellidos	
Teléfono		Correo electrónico	
Categoría según el Real Decreto 53/2013; BOE 8 de febrero de 2013			
<input type="checkbox"/> B. Experimentador <input type="checkbox"/> C. Director procedimientos <input type="checkbox"/> D. Resp. bienestar			

Autoridad competente que expide la acreditación:
Fecha:

NIF/ Pasaporte	Nombre y apellidos
Teléfono	Correo electrónico
Categoría según el Real Decreto 53/2013; BOE 8 de febrero de 2013	
<input type="checkbox"/> B. Experimentador <input type="checkbox"/> C. Director procedimientos <input type="checkbox"/> D. Resp. bienestar	
Autoridad competente que expide la acreditación: Fecha:	

NIF/ Pasaporte	Nombre y apellidos
Teléfono	Correo electrónico
Categoría según el Real Decreto 53/2013; BOE 8 de febrero de 2013	
<input type="checkbox"/> B. Experimentador <input type="checkbox"/> C. Director procedimientos <input type="checkbox"/> D. Resp. bienestar	
Autoridad competente que expide la acreditación: Fecha:	

NIF/ Pasaporte	Nombre y apellidos
Teléfono	Correo electrónico
Categoría según el Real Decreto 53/2013; BOE 8 de febrero de 2013	
<input type="checkbox"/> B. Experimentador <input type="checkbox"/> C. Director procedimientos <input type="checkbox"/> D. Resp. bienestar	
Autoridad competente que expide la acreditación: Fecha:	

NIF/ Pasaporte	Nombre y apellidos
Teléfono	Correo electrónico
Categoría según el Real Decreto 53/2013; BOE 8 de febrero de 2013	
<input type="checkbox"/> B. Experimentador <input type="checkbox"/> C. Director procedimientos <input type="checkbox"/> D. Resp. bienestar	
Autoridad competente que expide la acreditación: Fecha:	

2. Cronología y lugar de realización.

2.1. El procedimiento propuesto se utilizará para: Docencia Investigación

Fecha presentación (dd/mm/aa):
Fecha prevista de inicio del procedimiento (dd/mm/aa):
Fecha prevista de finalización (dd/mm/aa):
Duración del procedimiento (en meses):

2.2. Si su proyecto o alguno de los procedimientos que incluye ya han sido evaluados por este comité indique el código que le fue asignado a dicho proyecto/procedimiento(s) y la fecha:

--

2.3. Lugar de realización del proyecto (debe tenerse en cuenta la disponibilidad de las instalaciones del centro para su efectiva realización):

- Sección de producción animal SCSIE (Campus de Burjassot)
 Animalario Unidad Central de Investigación (Facultat de Medicina i Odontologia)
 Planta de acuarios SCSIE
 Animalario Facultat de Psicologia

3. Necesidad de autorización expresa.

❖ *Cumplimentar solo si en el proyecto concurre alguna de las siguientes condiciones:*

Utilización de animales de las especies incluidas en el anexo I del RD 53/2013 que no hayan nacido ni hayan sido expresamente criados en centros oficialmente reconocidos	<input type="checkbox"/>
Utilización de animales de las especies no incluidas en el anexo I del RD 53/2013 que no procedan de centros de cría o suministro	<input type="checkbox"/>
Ejecución de procedimientos fuera de los centros usuarios	<input type="checkbox"/>
Algún animal será dado en adopción, realojado o devuelto a un hábitat, explotación u otro medio adecuado para la especie de que se trate	<input type="checkbox"/>
Uso de animales de las especies amenazadas incluidas en el anexo A del Reglamento (CE) nº 338/97, del Consejo, de 9 de diciembre de 1996, relativo a la protección de especies de la fauna y flora silvestres mediante el control de su comercio, que no estén contemplados en los supuestos del artículo 7 de dicho Reglamento	<input type="checkbox"/>
Uso de animales capturados en la naturaleza	<input type="checkbox"/>
Uso de animales asilvestrados o animales vagabundos de especies domésticas	<input type="checkbox"/>
Uso de primates no humanos	<input type="checkbox"/>
El procedimiento conlleva dolor, sufrimiento o angustia severos para los animales y es probable que dichos efectos sean duraderos y no puedan ser aliviados	<input type="checkbox"/>

B. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.

4. Objetivos científicos del proyecto.

4.1. Tipo de proyecto según el artículo 31 del RD 53/2013, página 11383 (goo.gl/X8Yg7)

- Tipo I Tipo II Tipo III

4.2. Objetivos:

❖ *Describe clara y concisamente los principales objetivos que se pretenden alcanzar. Indique qué desea alcanzar, descubrir, establecer o producir realizando este proyecto. Los objetivos deben ser específicos de este proyecto, realistas, alcanzables y carentes de ambigüedad.*

--

4.3. Beneficios, valor docente o interés público:

❖ *Describa cuáles son los **beneficios científicos esperados, el valor docente o, en su caso, el interés público de su proyecto.** Si se trata de una actividad docente, debe indicarse el tipo de docencia (grado, postgrado, etc.), el tipo de materia (troncal, obligatoria, optativa) y el número de estudiantes previsto.*

4.4. ¿Debe experimentar con animales por imposición legal o reglamentaria? Sí No

4.5. Enumere hasta un máximo de cinco referencias clave y/o guías regulatorias que apoyen la necesidad del trabajo y/o los beneficios enumerados anteriormente y referencias relevantes para cualquier modelo animal específico propuesto en su plan de trabajo:

5. Resumen de procedimientos.

- ❖ *El Comité de Ética debe aprobar un proyecto basado en procedimientos experimentales en animales concretos.*
- ❖ *El término procedimiento se usa para describir una o varias técnicas reguladas para un objetivo experimental o científico particular aplicadas a un animal de experimentación (e.g. estudio farmacocinético, intervención quirúrgica, inducción de tumores, alimentación con dietas modificadas, ensayos de toxicidad, de vacunas, etc). En la mayoría de los casos un procedimiento englobará todas las técnicas reguladas aplicadas al animal hasta que es sacrificado o retirado del estudio. Dependiendo de la complejidad de su estudio, el proyecto puede incluir uno o varios procedimientos.*
- ❖ *Para clasificar la severidad de los procedimientos consulte el Real Decreto 53/2013 (goo.gl/X8Yq7), por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.*

Procedimiento Número	Título abreviado	Especie animal	Número de animales	Severidad*

* Sin recuperación, leve, moderada o severa (consulte el Anexo IX del RD 53/2013).

6. Etapas del plan de trabajo.

- ❖ *Describa esquemáticamente las etapas del plan de trabajo e indique claramente cómo cada procedimiento (identificado por el número asignado en el apartado anterior) será usado para alcanzar los objetivos. Cuando pueda añadir claridad, ilustre los pasos del plan usando un diagrama de flujo o mapa de procesos.*

7. Aplicación de métodos para reemplazar, reducir y refinar el uso de animales en procedimientos (3 Rs).

7.1. Reemplazo:

- ❖ *¿Por qué no es posible alcanzar los objetivos de su proyecto sin usar animales?*
- ❖ *¿Qué alternativas ha considerado y por qué no son posibles?*

7.2. Reducción:

- ❖ *¿Ha comprobado si el estudio propuesto ya se haya realizado previamente?*
- ❖ *¿Qué medidas se han tomado o se tomarán para asegurar que se utiliza el menor número posible de animales?*

7.3. Refinamiento:

- ❖ *Explique las medidas adoptadas (cría, alojamiento, cuidados y utilización) para eliminar o reducir al mínimo cualquier posible dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero a los animales.*

7.4. Justifique su elección de especie(s), cepa(s) o raza(s), modelo(s) y método(s). Explique por qué son los más adecuados para sus objetivos.

- ❖ Indique los motivos de esta elección citando, si fuese posible, alguna publicación representativa.
- ❖ Si utiliza fauna silvestre, indique el número del permiso que autoriza su captura, periodo de vigencia y entidad emisora.

7.5. Para cualquier procedimiento clasificado como severo provea una justificación específica:

7.6. ¿Ha utilizado este tipo de animales previamente en otros proyectos? Sí No

- ❖ Si ha respondido Sí, especifique en cuáles (referencia del proyecto y/o publicaciones a que diera lugar) e indique el código de identificación y la fecha del procedimiento aprobado en su momento por el Comité de Ética.

7.7. Indique si, tras su utilización experimental, el animal va a poder tener algún otro aprovechamiento por otras unidades del centro (sangre, órganos, etc.).

8. Condiciones de alojamiento, zootécnicas y de cuidado de los animales.

- ❖ Defina las condiciones de estabulación de los animales, indicando si hay alguna variación notable respecto a las condiciones de alojamiento y cuidado del resto de animales de la misma especie alojados en la instalación. Ejemplos de variaciones: cambios del ciclo de luz, estabulación en jaulas metabólicas, necesidades de climatización diferentes, alojamiento de los animales individualmente, etc.

- ❖ Los animales serán estabulados según las recomendaciones de la Directiva 63/2010
- ❖ Las condiciones de alojamiento difieren de las recomendaciones; especificar:

Condiciones de alojamiento		
Aislamiento	Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Duración y justificación (solamente en caso de aislamiento):
Método físico de contención (jaula metabólica, cepo...):	Duración:	Justificación:
Especificar métodos específicos de manejo (si los hubiera para animales de este procedimiento)		
Modificación de cualquier parámetro medioambiental del animal (si se requiere)		

C. PROCEDIMIENTOS.¹

PROCEDIMIENTO NÚMERO:

9. Datos generales.

Título:	
Especie/s animal/es:	
Cepa/raza:	
Sexo:	
Severidad*:	

*Consulte el Anexo IX del RD 53/2013 (goo.gl/X8Yq7).

10. Metodología del procedimiento.

10.1. Describa brevemente y de forma secuencial las manipulaciones a las que serán sometidos los animales experimentales:

¹ **IMPORTANTE:** si su proyecto comprende más de un procedimiento (enumerados en el apartado 5) debe cumplimentar el apartado C tantas veces como sea necesario (una por cada procedimiento).



11. Tamaño muestral total y, si procede, tamaño muestral por grupos experimentales, incluyendo los controles.

- ❖ *El número de animales utilizados debe ser el mínimo indispensable para llegar a conclusiones científicamente válidas en relación con los objetivos del proyecto.*

Grupos experimentales: indíquese el número de animales por grupo y composición (sexo, edad/peso). Añada tantos grupos como sea necesario.

$n_1 =$
 $n_2 =$
 $n_3 =$
 $n_4 =$
 $n_5 =$
 $n_6 =$
 $n_7 =$
 $n_8 =$
 $n_9 =$
 $n_{10} =$
 $n_{11} =$
 $n_{12} =$

Tamaño muestral total (obviamente, debería coincidir con el sumatorio de los tamaños muestrales de los grupos experimentales y de control):

N =

12. Diseño experimental y cálculo de tamaños muestrales.

12.1. Diseño experimental. La aleatorización (i.e. la asignación de animales a los grupos experimentales o control de manera aleatoria) y el diseño ciego (i.e. el investigador responsable de la toma de datos desconoce el tratamiento aplicado a cada sujeto experimental) se consideran elementos muy importantes del diseño experimental. Si su diseño no incorpora alguno de estos dos elementos, justifique los motivos.

12.2. Tamaños muestrales. Indique a cuál de las siguientes descripciones mejor se ajusta su procedimiento:

- Docencia.
- Producción de anticuerpos u obtención de tejidos.
- Cría para mantenimiento de una colonia de animales experimentales.
- Estudio piloto.
- Estudio que requiere el uso de análisis de estadística inferencial.

12.3. Si su procedimiento exige el uso de estadística inferencial (última casilla del apartado anterior) debe justificar los tamaños muestrales propuestos en el apartado 11 mediante un cálculo formal del tamaño muestral necesario teniendo en cuenta el tamaño del efecto esperado y la variabilidad intrínseca en el sistema de estudio, para lo cual debe rellenar el siguiente cuadro:

Tipo de análisis estadístico y test elegido	
Nivel de significación (e.g. 0.05)	
Potencia (e.g. 0.8)	
Tamaño del efecto mínimo a detectar	
Justificación del efecto mínimo a detectar (e.g. experimentos piloto, experimentos previos, trabajos publicados, etc.)	
Cálculo del tamaño muestral (Indicar el protocolo del programa utilizado o el output de los resultados que proporciona el programa estadístico - e.g. pestaña protocolo en Gpower)	

- ❖ Para más información sobre cómo realizar el cálculo del tamaño muestral puede consultar la información disponible en la dirección: [link](#)
- ❖ Si no dispone de suficiente información para realizar un cálculo formal del tamaño muestral necesario, se recomienda llevar a cabo un estudio piloto con un número reducido de animales.

13. Duración del procedimiento.

13.1. Debe indicarse el tiempo entre la primera y la última utilización (sacrificio) de CADA animal. No confundir con la duración total del estudio o proyecto, si se realiza de forma escalonada.

--

14. Ayuno.

14.1. ¿Se someterá a los animales a un periodo de ayuno forzoso? Sí No

- ❖ Si ha respondido Sí, debe rellenar el siguiente cuadro (en las casillas correspondientes a alimento y agua, ponga sí o no):

Fase	Alimento	Agua	Hora Inicio	Hora Final	Duración (horas)

14.2. Indique los motivos por lo que se considera necesario el ayuno:

--

15. Administración de productos.

15.1. ¿Administrará algún producto a los animales (excepto anestésicos y analgésicos)? Sí No

❖ Véase goo.gl/5sG1M.

❖ Si ha respondido Sí, debe rellenar el siguiente cuadro:

Producto*	Vía	Volumen (ml)	Diámetro aguja (G)	Concentración (mg/ml)

*Utilizar el nombre genérico, no el comercial.

15.2. ¿Alguno de los productos administrados supone un riesgo para la salud humana (citotóxico, riesgo biológico, etc.) o para el medio ambiente?

No

Sí. Debe presentar junto a este informe la autorización del Comité de Bioseguridad.

16. Anestesia y analgesia.

16.1. ¿Está previsto aplicar anestesia en alguna fase del procedimiento?

No. En ningún momento debido a que el procedimiento no lo requiere.

No. Es incompatible con el procedimiento (solicitar autorización previa).

Sí. Debe rellenar el siguiente cuadro:

Fase	Producto*	Vía	Dosis (mg/kg)	Concentración (mg/ml)	Control de la profundidad anestésica

*Utilizar el nombre genérico, no el comercial.

16.2. ¿Está previsto aplicar analgesia en alguna fase del procedimiento?

No. En ningún momento debido a que el procedimiento no lo requiere.

No. Es incompatible con el procedimiento (solicitar autorización previa).

Sí. Debe rellenar el siguiente cuadro:

Fase	Producto*	Vía	Dosis (mg/kg)	Concentración (mg/ml)	Frecuencia

*Utilizar el nombre genérico, no el comercial.

17. Toma de muestras.

17.1. Extracción de sangre:

❖ Véase goo.gl/fTR0b

No. En ningún momento.

Sangría total al finalizar el procedimiento en animal previamente anestesiado.

- Toma de muestra sanguínea con recuperación del animal. Si ha señalado esta casilla, debe rellenar el siguiente cuadro:

Vía extracción	Volumen de cada extracción (ml)	Frecuencia de extracción	Diámetro de aguja

17.2. Otras muestras:

- No. En ningún momento.
 Toma de muestras al finalizar el procedimiento en animal previamente anestesiado.
 Toma de muestras con recuperación del animal. Si ha señalado esta casilla, debe rellenar el siguiente cuadro:

Tipo de muestra	Volumen de cada extracción (ml)	Frecuencia de extracción	Diámetro de aguja

18. Sufrimiento, dolor y angustia de los animales.

- 18.1. Debe describir en qué fases del procedimiento se prevé que el animal pueda experimentar sufrimiento, dolor, angustia o malestar.

19. Protocolo de supervisión y criterios de punto final.

19.1. Protocolo de supervisión:

- ❖ Si se usa un protocolo de supervisión cuantificable añadida en un documento adjunto el cuadro de puntuación.
- ❖ Describa detalladamente el protocolo de supervisión que se prevé utilizar para detectar las situaciones descritas en el apartado anterior, indicando:

¿Qué se controlará?
¿A partir de qué momento?
¿Durante cuánto tiempo?
¿Con qué frecuencia se controlará?

¿Quién realizará el control? Personal investigador Personal experimentador

19.2. Medidas correctoras previstas:

20. Criterios de punto final (finalización anticipada de la experimentación).

- ❖ Los criterios de punto final pretenden evitar la muerte debida al procedimiento experimental por motivos éticos. Debe establecer criterios de punto final teniendo en cuenta los posibles efectos adversos que pueden producirse debidos a su procedimiento. Si el animal alcanza el criterio de punto final deberá ser retirado del estudio y/o sacrificado. Ejemplo: en un ensayo con una dieta experimental, cuando el animal pierda un 20% o más del peso.

21. Finalización del procedimiento.

21.1. Al finalizar el procedimiento, está previsto:

Sacrificar los animales.

¿Qué tejidos u órganos van a utilizarse?

Mantener los animales vivos.

Especifique los motivos:

22. Técnica eutanásica al finalizar el procedimiento.

❖ Véase el documento *Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación*, disponible en goo.gl/QoxjT.

22.1. Método eutanásico:

Método físico

Método:

Puntuación:

Método químico. Debe rellenar el siguiente cuadro:

Producto*	Vía	Dosis (mg/kg)	Concentración (mg/ml)	Tiempo	Puntuación

*Utilizar el nombre genérico, no el comercial.

22.2. Justificación del método de sacrificio propuesto (SOLAMENTE en aquellos casos en los que el método propuesto no alcance una puntuación mínima de 4).

El/La abajo firmante declara que conoce las directrices éticas y la legislación aplicables a la investigación con animales y su compromiso a cumplirlas.

Firma electrónica o manual

X

El/la investigador principal del proyecto

