

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA, UNIDAD DE MEDICINA**  
**MOLECULAR. SERVICIO DE ONCOLOGÍA**



**ESTUDIO DE LA TEM CON CARACTERÍSTICAS DE CÉLULA MADRE**  
**(O CMC) EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN.**

**M<sup>a</sup> ÁNGELES NAVA RODRÍGUEZ**

**2011**

**D. JUAN JESÚS CRUZ HERNÁNDEZ, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE  
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**Dña. M<sup>a</sup> DOLORES LUDEÑA de la CRUZ, CATEDRÁTICO ACREDITADO DEL  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE  
SALAMANCA**

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo original titulado “ESTUDIO DE LA TEM CON CARACTERÍSTICAS DE CÉLULA MADRE (o CMC) EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN” que presenta Dña. M<sup>a</sup> Ángeles Nava Rodríguez, ha sido realizado bajo su dirección y reúne, a su juicio, todas las características necesarias, considerándolo apto para que sea presentado ante el tribunal correspondiente a fin de optar al Título de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Juan Jesús Cruz Hernández

M<sup>a</sup> Dolores Ludeña de la Cruz

## DEDICATORIAS

*A mi padre*

Por toda la fuerza transmitida para seguir adelante en todos los momentos de la vida, buenos y malos, y por enseñarme que la vida es lo más preciado que tenemos. Gracias por haber sido mi padre.

*A mi madre, Juana y mis hermanas Antonia, M<sup>a</sup> Jesús y M<sup>a</sup> Teresa*

Por toda la unión que nunca nos ha faltado y nos ha permitido avanzar en nuestros caminos. Por apoyarme en cada decisión de mi vida, y sobre todo por toda la confianza que me habéis transmitido en los últimos meses. Muchas gracias.

## *AGRADECIMIENTOS*

Al Profesor *Juan Jesús Cruz Hernández* director de este trabajo, por confiar plenamente en mí, por apoyarme desde el momento que me conoció, por darme la oportunidad de trabajar a su lado y enseñarme que la paciencia es el mejor camino para conseguir el fin.

A la Profesora *M<sup>a</sup> Dolores Ludeña de la Cruz* directora de este trabajo, por enseñarme con gran filosofía tantas cosas que eran desconocidas para mí, por sus sabios consejos y opiniones y sobre todo por su gran apoyo para la logro de este trabajo.

A *Carmen Suárez, Olga, Rosa, Luci y Amelia* porque sin su trabajo esta tesis no se podría haber llevado a cabo. Por todos los momentos pasados en Hospital de Día, que sin duda para mí han sido todos buenos.

A *Rosa, Asún y Maribel* por ayudarme con todas las historias que han pasado por nuestras manos, y hacer que algunos momentos se hayan convertido en inolvidables.

A *Hospital de Día* en general porque durante cuatro años he estado en el lugar idóneo, siendo mi segundo hogar.

A *Guti* por su ayuda en las técnicas anatomopatológicas y por darme su confianza para llevarlas a cabo.

Al *servicio de Anatomía Patológica* por su disposición para ayudarme y poder realizar esta tesis.

A *Chema* por su trabajo en la estadística de esta tesis, por su implicación total y dedicación plena y sobre todo por su paciencia para que aprendiera la interpretación de la misma.

A *Dalia* por su apoyo y sus consejos en los momentos más difíciles. Porque aunque te he conocido tarde eres una de las mejores amigas.

A *Eva* (laboratorio 16) por todos los cafés tertulias que nos han llevado a tantas confesiones y estrechado una amistad.

Por supuesto el agradecimiento más importante para todos *Los Pacientes* que han participado en esta tesis, y para los que no han participado, porque me han hecho crecer como persona y hacen que la vida la vea con los ojos de la fuerza y de la esperanza.

Y por último, un agradecimiento muy especial para *Alberto, José Manuel, Sheila, Lourdes, Arturo y Josema* por el cariño y apoyo moral que siempre he recibido de vosotros y con el cual he logrado culminar mi esfuerzo.

## FRASE

*“Si un día tienes que elegir entre el mundo y el amor.....recuerda: si eliges el mundo quedarás sin amor, pero si eliges el amor con él conquistarás el mundo”.*

*A. E.*

*(Albert Einstein)*

<b>INDICE</b>	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Células tumorales circulantes	2
1.2 Células madre del pulmón o células progenitoras	5
1.2.1 Cáncer de pulmón	9
1.3 Células madre del cáncer	12
1.3.1 Características de las células madre del cáncer	12
1.3.2 Células madre del cáncer en el sistema hematopoyético	15
1.3.3 Células madre del cáncer en el Sistema nervioso central	16
1.3.4 Células madre del cáncer en la mama	17
1.3.5 Células madre del cáncer de pulmón	18
1.3.6 Implicaciones biológicas de la hipótesis de célula madre del cáncer	20
1.3.7 Futuras terapias para controlar las células madre del cáncer	21
1.4 Transición Epitelio-Mesénquima	22
1.4.1 Conceptos generales	22
1.4.2 Clasificación de la TEM en tres subtipos diferentes	24
1.4.3 TEM en cáncer	26
1.4.4 TEM en cáncer de pulmón	27
1.4.5 TEM en células madre del cáncer	28
1.5 E-cadherina	31
1.5.1 Superfamilia de cadherinas: características moleculares generales	31
1.5.2 E-cadherina y cáncer	35
1.5.3 E-cadherina en cáncer de pulmón	36
1.5.4 E-cadherina en TEM y CMC	37
1.6 Vimentina	39
1.6.1 Características estructurales	39

1.6.2 Vimentina en cáncer	43
1.6.3 Vimentina en cáncer de pulmón	44
1.6.4 Vimentina y células madre	45
1.7 Notch 1	46
1.7.1 Características moleculares	46
1.7.2 Señalización de Notch en sistemas de célula madre	50
1.7.2.1 Fenotipo de ratón con Notch mutado	51
1.7.2.2 Determinación del destino de la célula por la señalización de Notch durante la embriogénesis	51
1.7.3 Mecanismos potenciales de Notch en cáncer	53
1.7.4 Notch y cáncer de pulmón	55
1.7.5 Notch y TEM	56
1.8 Snail2	56
1.8.1 Familia Snail2	56
1.8.2 Características estructurales	58
1.8.3 Funciones de Snail2	60
1.8.4 Snail2 y cáncer	62
1.8.5 Snail2 en cáncer de pulmón	62
1.8.6 Snail2 y CMC	63
<b>2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	66
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	68
3.1 Muestras de sangre periférica	69
3.1.1 Extracción de ARN	69
3.1.2 Eliminación del ADN contaminante mediante tratamiento con Dnasal	69
3.1.3 Obtención del ADNca partir del ARN tratado con Dnasal	71
3.1.4 Técnica de PCR	72



3.1.5 Electroforesis del ADNc en geles de agarosa	73
3.1.6 Transferencia del ADN a membranas de nylon	74
3.1.7 hibridación con sondas de ADN frente a Snail2 marcada con $\alpha^{32}P$	75
3.2 Muestras de tejidos	76
3.2.1 Técnica de Hematoxilina –Eosina	76
3.2.2 Inmunohistoquímica	78
3.3. Estadística	82
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>85</b>
4.1 Expresión del gen Snail2 en sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón	86
4.2 Estudio de expresión protéica de (E-cadherina, Vimentina, Notch1 y Snail2) en tejido tumoral de pacientes con cáncer de pulmón	96
4.2.1 Correlaciones entre anticuerpos	100
4.2.2 Análisis de conglomerados o cluster	102
4.2.3 Análisis factorial por componentes principales	105
4.2.4 Análisis de regresión logística múltiple para predecir la expresión positiva de Notch1	107
4.2.5 Análisis de regresión logística múltiple para predecir la expresión positiva de Snail2	108
4.3 Análisis de supervivencia	110
4.3.1 Análisis de supervivencia para los anticuerpos	115
4.3.2 Análisis de supervivencia de los conglomerados	116
4.3.3 Correlación del Éxito con tamaño del tumor (T), nº de ganglios (N) y con Metástasis al diagnóstico (M)	119
4.4 Análisis multivariado. Regresión de Cox	121

<b>5. DISCUSIÓN</b>	124
5.1 Snail2 en sangre periférica	125
5.2 Estudio inmunohistoquímico de E-cadherina, Vimentina, Notch1 y Snail2 en tumores primarios de cáncer de pulmón	128
5.2.1 Formación de Cluster	131
5.2.2 Factores pronósticos de Notch1 y Snail2	132
5.3 Supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón	134
5.4 Notch1 y Snail2 en la TEM y CMCs ¿una esperanza para el cáncer de pulmón?	136
<b>6. CONCLUSIONES</b>	137
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	139

## ***1. INTRODUCCIÓN***

## 1.1 CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

El cáncer de pulmón es la causa principal de mortalidad por cáncer en la mayoría de los países industrializados, y esta mortalidad se debe principalmente a la recurrencia de metástasis a distancia. De hecho, aproximadamente el 40% de los pacientes con cáncer de pulmón tienen metástasis en sitios distantes que se detectan con las modalidades actuales de diagnóstico por imagen, como la Tomografía Computerizada (TC) y la Tomografía por Emisión de Positrones (PET por sus siglas en inglés) (Socinski MA et al., 2007). Lo más importante es que, incluso los pacientes sin metástasis en órganos distantes detectable clínicamente en el momento del diagnóstico, pueden desarrollar metástasis a distancia durante el tratamiento o durante un periodo de seguimiento largo. En consecuencia, en la mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón, las células tumorales pueden circular en la sangre con o sin aparente metástasis a distancia, y la detección de tales Células Tumorales Circulantes (CTCs) podría contribuir a la mejora en el diagnóstico y la terapia de los pacientes con cáncer (Alix-Panabières C et al., 2008).

En esta tesis queremos contribuir al desarrollo de un biomarcador molecular en sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón. Para ello, hemos elegido el gen *SNAIL2*, por estar relacionado con procesos moleculares tan importantes como, Células Madre del Cáncer (CMC) y el programa de Transición Epitelio-Mesénquima (TEM).

La formación de metástasis de los tumores epiteliales progresa a través de varios pasos incluyendo la invasión de tejidos adyacentes, la generación de CTCs seguido por la intravasación en la sangre o en los vasos linfáticos, supervivencia en la vascularidad, extravasación y crecimiento en sitios secundarios. Toda esta cascada metastásica, de cambios fenotípicos oportunos y espacialmente regulados se cree que tienen lugar en células tumorales epiteliales, permitiendo solamente a unas pocas de ellas sobrepasar las barreras sucesivas y desarrollar metástasis. Entre estos cambios, el proceso de transición epitelio-mesénquima, caracterizado por disminuir las características epiteliales e incrementar las propiedades mesenquimales, se cree que contribuye a las etapas específicas de la cascada metastásica (De Wever O et al., 2008; Yanhg J y Weinberg RA., 2008; Iwatsuki M et al., 2009; Klymkowsky MW y Savagner P., 2009).

Los procesos de TEM podrían ocurrir en los tumores primarios y generar varios derivados mesenquimales, algunos de ellos adquieren la capacidad de invadir el estroma circundante y la intravasación en la vasculatura, como es el caso del gen *SNAIL2* que está involucrado en

procesos de migración celular. También se ha propuesto que los procesos de TEM en los tumores primarios podrían estar involucrados en la generación de las supuestas células madre de cáncer (Mani SA et al., 2008; Gupta PB et al., 2009; Hollier BG et al., 2009; Polyak K y Weinberg RA., 2009).

Actualmente, se piensa que coexiste una progresión paralela de los tumores primarios y la metástasis. La duración de vida calculada para algunos tumores secundarios de hecho, no coincide con el ritmo de la diseminación celular del cáncer del tumor primario sugerido por el modelo de cascada comentado anteriormente. Estas observaciones sugieren una generación muy temprana de CTCs, las cuales podrían diseminarse y crecer en sitios distantes en paralelo con el tumor primario (Klein CA., 2009). También, están las observaciones sobre algunos pacientes que desarrollan metástasis, en algunos casos muchos años, después del aparente éxito del tratamiento del tumor primario, dando la idea de tumor latente (Hedley BD y Chambers AF., 2009), de esta manera, las CTCs o las células tumorales diseminadas (CTD) (muy estudiadas en la médula ósea) podrían permanecer en un estado latente o inactivo, como células solas o micrometástasis, y así resistir a las terapias antiproliferativas convencionales. Evidentemente, la metástasis detectable clínicamente podría entonces desarrollarse en algunos casos muchos años después de que ocurriera la diseminación.

La contribución de TEM para la generación de CTCs por lo tanto representa una hipótesis acertada, pero actualmente no está muy desarrollada (Aktas B et al., 2009; Pantel K y Riethdorf S., 2009). Además, las propiedades mesenquimales se han asociado con la resistencia a señales apoptóticas, una propiedad que podría ser utilizada por las CTCs para sobrevivir en el torrente sanguíneo, resistir a la quimioterapia y posiblemente también escapar de la vigilancia inmunológica. Las CTCs ofrecen un potencial diagnóstico excelente, representan buenas dianas terapéuticas y permiten una evaluación longitudinal de la eficacia terapéutica. Las CTCs se han encontrado en pacientes con una enfermedad metastásica declarada, y también en pacientes sin señales de metástasis (Serrano MJ et al., 2009). La detección temprana de las CTCs podría servir como un factor predictivo para la metástasis, además, la detección de las CTCs y la monitorización después de la cirugía y la terapia adyuvante tiene un enorme potencial para; identificar pacientes en los que la eliminación del tumor no ha sido curativo; monitorizar la respuesta de los pacientes a la terapia y; una predicción temprana de la recaída. (Cristofanilli M et al., 2005).

Los procesos de TEM dota a las células tumorales epiteliales con propiedades que podrían contribuir para facilitar la generación de CTCs y supervivencia: una capacidad invasiva

incrementada, resistencia incrementada a las señales apoptóticas y una capacidad incrementada para potenciar la angiogénesis.

La invasión de células tumorales en sí mismo no es suficiente para producir la metástasis a distancia. La estimulación de angiogénesis y la intravasación son aspectos importantes que obviamente afectan a la generación de CTCs. La resistencia a la quimioterapia y radioterapia es otro aspecto importante de la supervivencia de las CTCs en el torrente sanguíneo para la cual la TEM probablemente participa. Las células que experimentan una TEM han mostrado en efecto, un desarrollo de resistencia a agentes anti-cáncer (Sabbah M et al., 2008). Por ejemplo, líneas celulares de cáncer de colon y ovario que presentan un fenotipo TEM son resistentes a oxaliplatino y paclitaxel, respectivamente (Yang AD et al., 2006; Kajiyama H et al., 2007). La expresión de factores de transcripción relacionados con TEM se ha relacionado a la resistencia a quimioterapia y radioterapia. Snail1 y Snail2 han demostrado así mediar la resistencia en células epiteliales de ovario por antagonizar la apoptosis mediada por p53 y quimiorresistencia al paclitaxel (Kurrey NK et al., 2009).

Las CTCs representan una oportunidad única de diagnóstico y terapéutica en cáncer de pulmón. Los procesos de TEM transitorios podrían participar en la generación de las CTCs, y de su biología. Los mediadores de TEM, como el factor de transcripción Snail2, y los mecanismos que lo originan consecuentemente tienen un potencial enorme como dianas terapéuticas. Los datos actuales parece que soportan la idea que algunos fenotipos de TEM identificados en los tumores primarios humanos podrían representar los progenitores de CTCs, y que los programas de TEM podrían estar involucrados en la generación de CTCs y supervivencia, sin embargo, esta hipótesis necesita un estudio más detallado. También los mediadores de TEM moleculares específicos y las vías de señalización, llevan a estados específicos de la progresión del tumor (Bonnomet A et al., 2010).

Así, el apoyo a la implicación de la TEM en la formación de CTCs por tumores humanos, parece evidente o al menos contribuyen, en parte, a la heterogeneidad tumoral (Klymkowsky MW y savagner P., 2009). La evidencia más directa de que los derivados de TEM podrían engendrar CTCs viene de un estudio reciente (en cáncer de mama), utilizando la técnica de RT-PCR, que revela la presencia de marcadores de TEM compartidos con marcadores de Células Madre del Cáncer (expresión incrementada del marcador CD44 y una expresión reducida del marcador CD24) en el ARN extraído de CTCs enriquecidas de la sangre de pacientes con cáncer (Bonnomet A et al., 2010).

Sobre las biopsias del tumor se asocia la presencia de fenotipos derivados de la TEM con agresividad, manteniendo la idea de que algunos de estos fenotipos podrían representar a los progenitores de CTCs en los tumores primarios.

Los datos inmunohistoquímicos recopilados revelan, que los fenotipos de TEM existen en los tumores humanos y se correlacionan con mal pronóstico (Guarino M et al., 2007). Estudios independientes, los cuales no serán detallados aquí pero que han sido revisados previamente (De Wever O et al., 2008; Peinado H et al., 2007; Hennesy BT et al., 2009) han reportado una reducción o una deslocalización subcelular de marcadores epiteliales (E-cadherina, beta catenina, Claudina, ocludina), o la expresión de marcadores mesenquimales (vimentina) y factores transcripcionales maestros de TEM en células tumorales epiteliales de muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de pulmón. Los datos también han demostrado una localización más específica de células positivas de TEM en los frentes invasivos (De Wever O et al., 2008; Christofori G., 2006), quizás mejor ejemplificados en cáncer colorrectal (Brabletz T et al., 2005). En muchos de esos casos, los rasgos de la TEM se asociaron con capacidad invasiva y/o mal pronóstico.

Por todo lo comentado anteriormente, decidimos estudiar la TEM y su conexión con las supuestas CMCs estudiando la expresión de una serie de marcadores que definen a ambas, TEM Y CMCs, en el tejido primario tumoral procedente de las biopsias de broncoscopias, mediastinocopias y en algún caso resección quirúrgica del tumor, de los pacientes con cáncer de pulmón incluidos en el estudio de la expresión génica de *Snail2* en sangre periférica. Mostramos la expresión proteica de los siguientes anticuerpos: E-CADHERINA, VIMENTINA, NOTCH1 y SNAIL2, los dos primeros por ser las huellas del fenómeno TEM y los dos segundos por su relación directa con las CMCs. Por tanto, a continuación hacemos una descripción breve de cada uno de ellos para ver su implicación en cáncer, en cáncer de pulmón, en la TEM y la relación con las CMCs.

## 1.2. CÉLULAS MADRE DEL PULMÓN O CÉLULAS PROGENITORAS

En los organismos adultos, la homeostasis del tejido se mantiene por células madre o progenitoras que tienen la capacidad de dividirse a lo largo de la vida, y reemplazar las células dañadas o muertas. La organización anatómica compleja de estos componentes celulares está regulada por un programa de desarrollo estereotipado y muy coordinado, según lo examinado en los modelos de ratón. El desarrollo del pulmón se inicia siguiendo una especificación de destino en el endodermo del intestino anterior ventral como se define por la expresión de

*Nkx2.1* (Cardoso WV y Lu J., 2006). Los datos actuales indican que la ramificación ocurre por una combinación de tres tipos de ramas geométricas, en una combinación con tres series estereotipadas. La regulación de la proliferación celular y el destino están muy ligados a este proceso, como las señales de perturbaciones que afectan a estos procesos y conducen a defectos en la ramificación del pulmón y a la especificación de linajes epiteliales. Estos programas de señalización involucran interacciones recíprocas entre los tipos de células epiteliales y mesenquimales, lo cual resulta en un crecimiento coordinado y de diferenciación. Aunque se conoce menos de la señalización de ejes que contribuyen a un comportamiento epitelial en el pulmón adulto, es evidente que el eje de señalización epitelio-mesénquima se mantiene y su regulación es esencial para la homeostasis del tejido. (Snyder JC et al., 2009).

Parte de la dificultad en demostrar la existencia de las células madre adultas del pulmón, se debe a la baja tasa de renovación celular en el epitelio adulto. Al contrario de lo que sucede en la médula ósea, intestino o epidermis donde las células proliferan rápidamente, en el pulmón la fracción de proliferación se ha estimado en el 1,3% en el epitelio traqueal y del 0,06% en el epitelio bronquiolar (Snyder JC et al., 2009). A pesar de las dificultades descritas, existen diversos estudios que demuestran la existencia de supuestas células madre adultas en cada compartimento epitelial de los pulmones. (Kraatz JR et al., 2010).

El epitelio de las vías respiratorias adultas consiste en tres compartimentos diferentes organizados a lo largo del eje proximal-distal (Figura 1) (Snyder JC et al., 2009). La vía respiratoria proximal está compuesta por la tráquea y el bronquio principal unidos por un epitelio pseudoestratificado (Snyder JC., 2009). Se ha demostrado que las células basales que expresan queratina (K) tienen las capacidades de auto-renovación, proliferación y multipotencialidad, por tanto se las puede considerar supuestas células madre de la vía respiratoria (Hong KU et al., 2004; Hong KU et al., 2004; Borthwick DW et al., 2001; Schoch KG et al., 2004). Borthwick demostró en un modelo animal con daño epitelial la presencia de células madre basal de la tráquea que expresaba K5. Las vías respiratorias del ratón se dañaron con detergente vía intra traqueal o por inhalación de dióxido de sulfuro, y las células que se marcaron con bromodeoxiuridina proliferaron y se localizaron en la tráquea durante y después del daño. Estas células marcadas se encontraron en los mismos nichos que las células con una actividad elevada con promotor K5. Los ratones transgénicos que expresaban K5 como promotor mejoraron la expresión de la proteína verde fluorescente en los supuestos nichos de células madre, con lo cual se confirmó la expresión de K5 en las células madre traqueales auto-renovadas (Schoch KG et al., 2004). Las células que expresaban K5 también tenían una capacidad incrementada para formar colonias y una capacidad superior para formar grandes



colonias in vitro, demostrando de esta manera el potencial proliferativo de estas células madre traqueales auto-renovadas (Schoch KG et al., 2004).

Rawlins EL et al demostraron con un modelo animal transgénico *KRT5-CreER<sup>T2</sup>* que las células basal generaban células diferenciadas durante el crecimiento postnatal y en estado adulto en estado estacionario o durante la reparación epitelial al causar daño. Hong KU et al utilizaron un modelo de ratón con la vía aérea dañada con naftaleno para demostrar la multipotencialidad de las células basal traqueales que expresan queratina. En este modelo el daño resultó en la rápida inducción de células basal que expresan K14. Los ratones transgénicos que albergaban un promotor K14 unido a un reporter lox-cre mostraron que, las células basal que expresaban k14 proliferaban rápidamente y daban lugar a una progenie fenotípicamente heterogénea, incluyendo especies clonales de las células basal originales que expresaban k14, demostrando auto-renovación, proliferación y multipotencialidad de estas células basal traqueales (Hong KU et al., 2004).

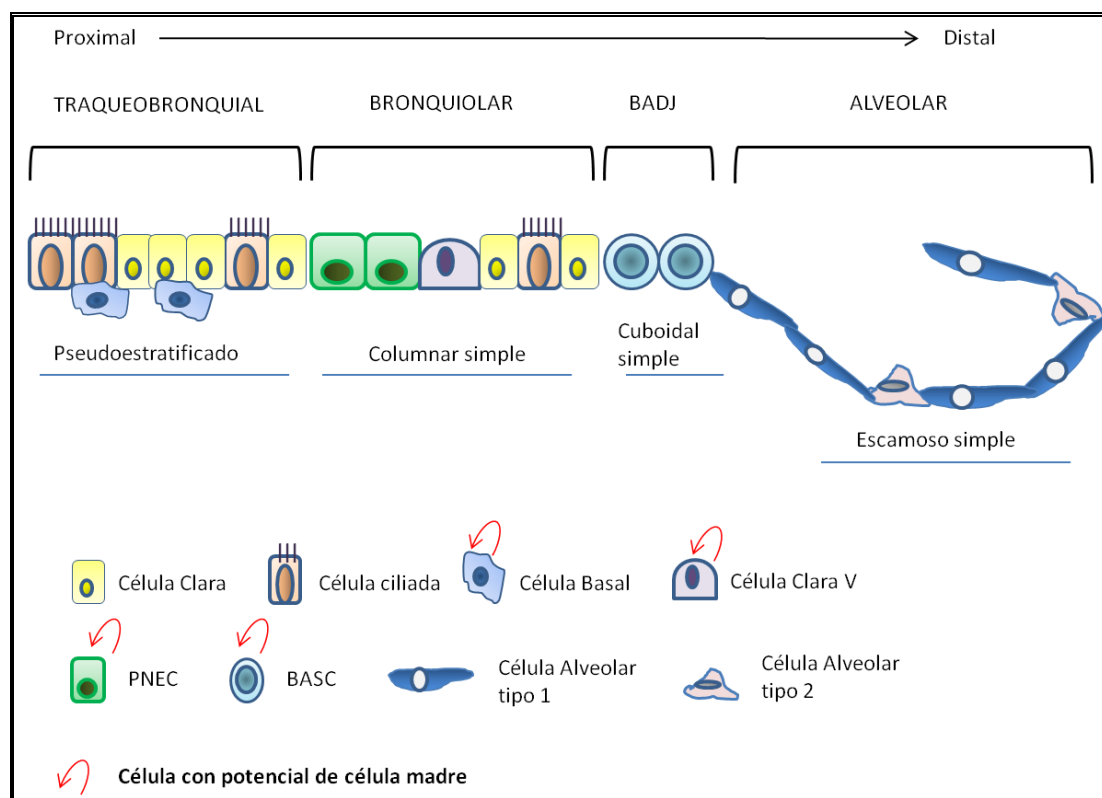


Figura 1. El revestimiento del epitelio de las vías respiratorias de los mamíferos está compartimentado a lo largo del eje proximal-distal en cuatro zonas distintas, divididas por su composición, estructura y función. El esquema presenta los cambios en la composición celular de acuerdo con la localización en las vías respiratorias. El epitelio pseudoestratificado traqueobronquial se caracteriza por la abundancia de células ciliadas y Basal. El epitelio bronquiolar está compuesto por células ciliadas columnar y células clara y la variante de célula clara V, también se encuentra un tipo especial de células, PNEC (pulmonary neuroendocrine cell). El conducto del epitelio de las vías respiratorias en la unión bronquioalveolar (BADJ) contiene células denominadas BASC (Bronchioalveolar stem cell) Adaptada de Snyder JC et al., 2008.

Los bronquiolos del medio de la vía aérea están unidos por un epitelio columnar simplificado (Snyder JC et al., 2009). Hay dos tipos de células progenitoras bronquiolares que proliferan en respuesta al daño (Evans MJ et al., 1976). En un modelo de rata con daño provocado por inhalación de óxido de nitrógeno/ozono demostraron que células clara maduras podían dediferenciarse y dar lugar a células epiteliales bronquiolares fenotípicamente diferentes después de las lesiones por inhalación. Estas células Clara eran equivalentes funcionalmente a células epiteliales diferenciadas maduras en estado quiescente, pero tenían el potencial para llegar a ser células amplificadas de tránsito (células de tipo A Clara) para dar lugar a una progenie diversa en respuesta al daño (Stripp Br., 2008) y han denominado a este tipo de células Clara como “células progenitoras facultativas”.

Otros estudios han identificado otras poblaciones de células progenitoras bronquioalveolares, resistentes al daño causado por naftaleno, que posiblemente representen las verdaderas células madre de la vía aérea bronquial (Krazt JR et al., 2010). Las células Clara se pueden dañar con naftaleno selectivamente, lo cual permite un modelo para estudiar células progenitoras en un ambiente empobrecido en células Clara. Estos modelos demostraron que los cuerpos neuroepiteliales (NEB) contenían dos poblaciones separadas de células, que proliferaban en respuesta al daño inducido por naftaleno. La primera población constaba de células neuroendocrinas pulmonares positivas para el péptido relacionado con el gen calcitonina, que proliferaban y formaban lesiones hiperplásicas después del daño provocado por naftaleno (Reynolds SD et al., 2000). La segunda población constaba de células positivas para la proteína secretora de célula Clara que proliferaban y repoblaban las vías aéreas de los bronquiolos con una progenie fenotípicamente diversa después de la exposición a naftaleno.

Sin embargo, a pesar de que la función exacta en el mantenimiento y reparación del pulmón no se conoce muy bien todavía, existe una creciente evidencia de que los adenomas y los adenocarcinomas crecen de BASCs transformadas, por lo menos en modelos de ratón (Eramo A et al., 2010). Por tanto, se podría deducir que las células madre origen del pulmón pueden sufrir mutaciones para dar origen al cáncer de pulmón.

### **1.2.1. Cáncer de pulmón**

El cáncer de pulmón es la mayor causa de mortalidad por cáncer, con un número de muertes superior a 160.000 en Estados Unidos en 2008 y con un ratio de supervivencia a 5 años que se mantiene estable en el 15 %.(Jemal A et al., 2008). Se ha estimado que 9 de cada 10 casos de cáncer de pulmón están relacionados directamente con el tabaco. Otros factores de riesgo de cáncer de pulmón son la exposición a asbesto, y en menor medida al radón, arsénico, cromo, níquel, cloruro de vinilo y a la radiación ionizante o a algunas enfermedades pulmonares preexistentes no malignas (Dubey S y Powell CA., 2009).

Diferentes etiologías conocidas o desconocidas, podrían explicar la aparición de formas diferentes de cáncer de pulmón. La heterogeneidad de las cuales tiene implicaciones diagnósticas, en el pronóstico y terapéuticas críticas (Borczuk AC et al., 2009). Para facilitar decisiones de tratamiento y pronóstico el cáncer de pulmón se ha estratificado en Cáncer de pulmón de célula pequeña (CPCP) y en cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPCNP). El CPCNP se divide en tres clases histológicas principales: Adenocarcinoma (AC), carcinoma de

célula escamosa o epidermoide y carcinoma de célula grande (Collins LG et al., 2007). El CPCP representa aproximadamente el 20% de los tumores pulmonares. A pesar de tener una respuesta inicial buena a los tratamientos, se caracteriza por tener mal pronóstico debido a la rápida diseminación extra torácica y la frecuente recaída de la enfermedad. El CPCP se localiza predominantemente en el nivel medio de los bronquiolos (Figura 2) y muestra una diferenciación neuroendocrina, sugiriendo que las células neuroendocrinas pulmonares transformadas dan lugar a esta forma de cáncer de pulmón (Giangreco A et al., 2007).

Con una prevalencia aproximada del 40% se encuentra el adenocarcinoma, es la forma más común de CPCNP se presenta tanto en fumadores como no fumadores. Se desarrolla principalmente desde la unión entre el bronquiolo terminal y los alveolos, (Figura 2) denominada “unión del conducto broncoalveolar” y muestra una diferenciación de las vías respiratorias o una diferenciación alveolar o ambas (Giangreco A et al., 2007).

El carcinoma de célula escamosa o epidermoide tiene una prevalencia del 25% y está altamente asociado al tabaco. Crece en las vías respiratorias proximal (Figura 2) debajo de la segunda o tercera bifurcación, raramente se muestra distal. El carcinoma de célula grande, comparado con los otros tipos de CPCNP consta de una clase pobremente diferenciada y tumores menos agresivos, el subtipo más frecuente es el carcinoma neuroendocrino de célula grande. (Giangreco A et al., 2007).

Los análisis de las alteraciones genéticas que ocurren en cáncer de pulmón muestran que las diferencias histopatológicas están en línea con la heterogeneidad genética de la enfermedad. Las diferencias genéticas se han encontrado entre el CPCP y el CPCNP y además entre los subtipos del CPCNP (Minna JD et al., 2002; Sekeido Y et al., 2003; Bianchi F et al., 2008). Sin embargo hasta hace poco, todas las formas de CPCNP se han tratado con enfoques similares, independientemente de sus diferencias biológicas. Por tanto, es probable que la baja tasa de respuesta del cáncer de pulmón se deba, al menos en parte, a un enfoque de tratamiento demasiado homogéneo en el pasado para una enfermedad tan heterogénea (Borczuk AC et al., 2009; Eramo A et al., 2010). Recientemente se han propuesto opciones terapéuticas para cada tipo de tumor (Tiseo M et al., 2009). Además, del enfoque basado en la histología se están llevando a cabo estudios para identificar las propiedades biológicas clínicamente relevantes de los tumores de pulmón que permitan una terapia individualizada. Para definir una terapia más personalizada es necesario determinar las firmas genéticas y proteómicas de cada subtipo de tumor y relacionarlas con los resultados clínicos y la respuesta al tratamiento. (Eramo A et al., 2010).

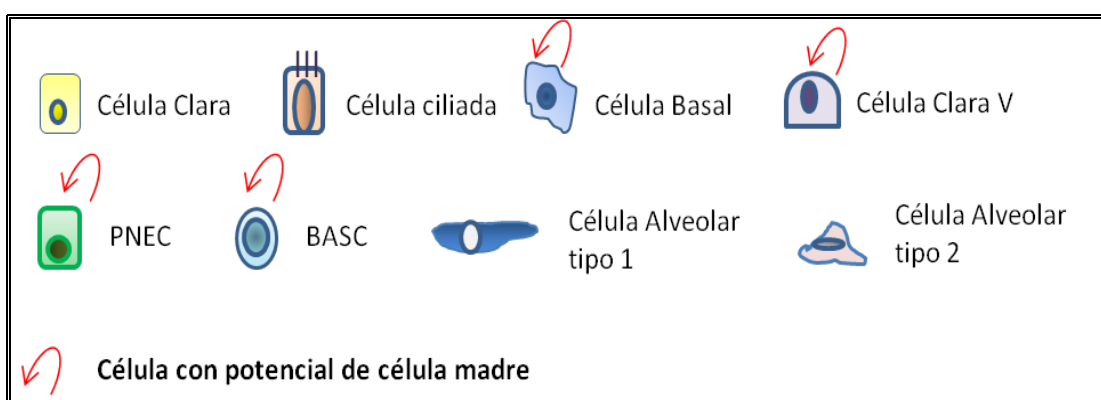
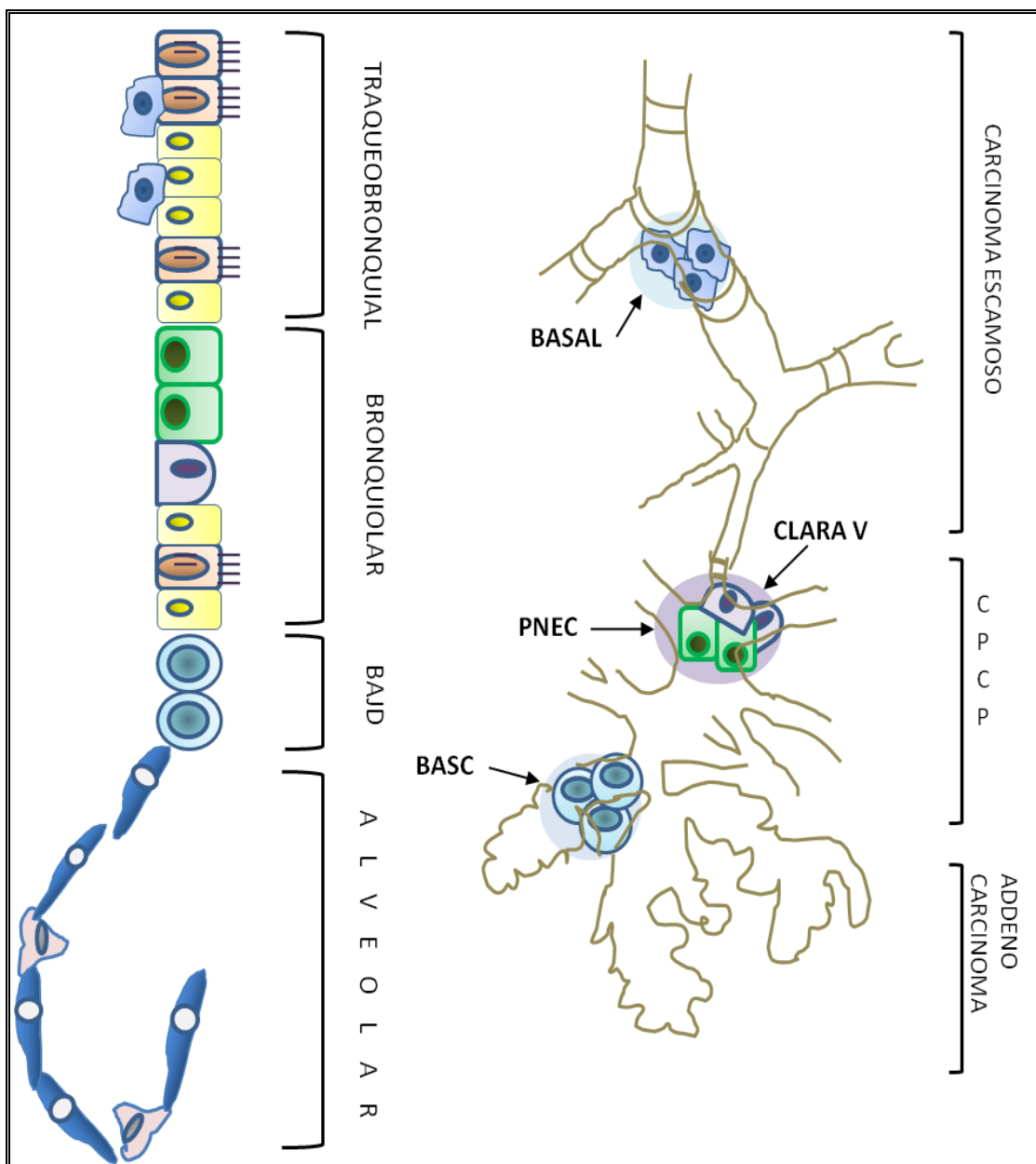


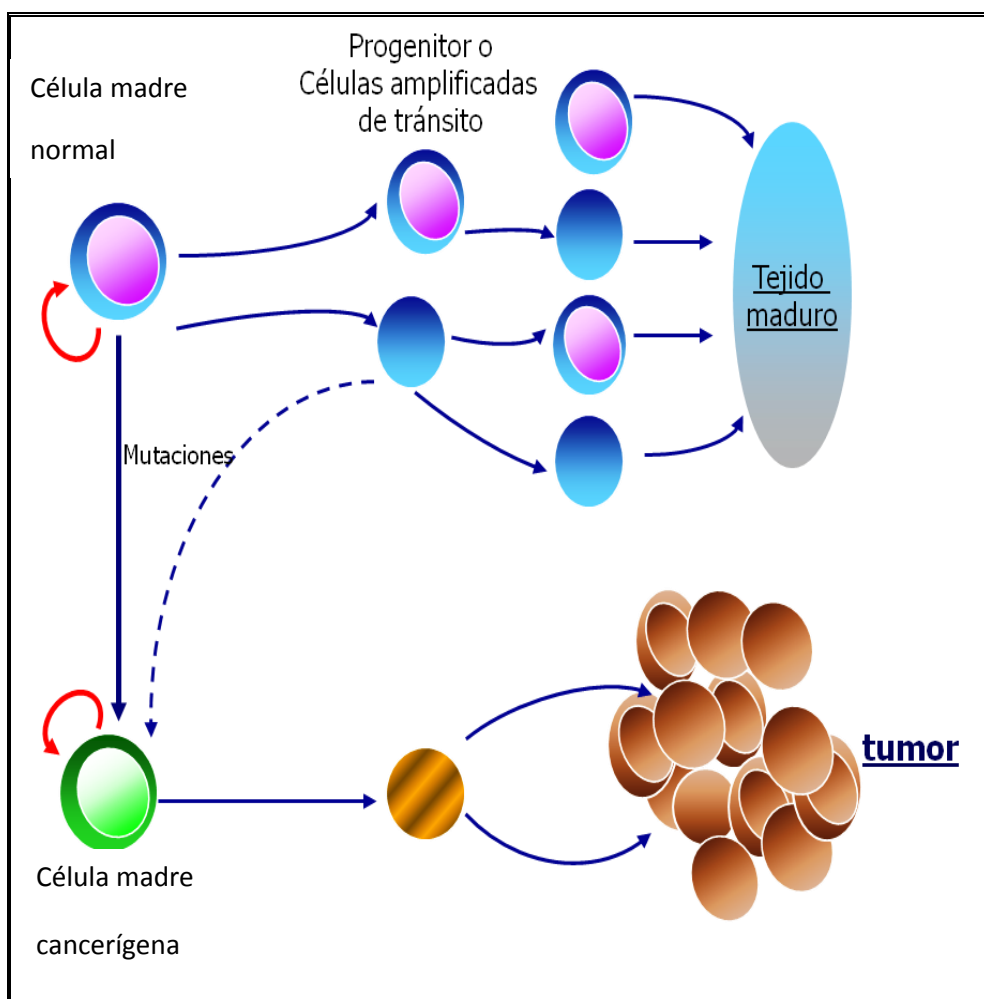
Figura 2. Representación esquemática de los diferentes tipos de células presentes en cada región y la localización principal de las distintas formas de cáncer de pulmón. Adaptada de Eramo A et al., 2010.

## **1.3. CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER**

### **1.3.1. Características de las células madre del cáncer**

Las células madre existen en muchos tejidos somáticos diferentes, y participan de manera importante en su fisiología. Las poblaciones de células que derivan de las células madre están organizadas de manera jerárquica, con la célula madre residiendo en el ápice de la vía de desarrollo. Las células madre tienen tres propiedades características: Autorrenovación, la capacidad de desarrollarse en varias líneas y un potencial de proliferación ilimitado. La combinación de estas tres propiedades hace a las células madre únicas. El atributo de autorrenovación es especialmente notable, porque su subversión es altamente relevante para la oncogénesis y los tumores malignos. Un incremento aberrante de la autorrenovación, en combinación con el potencial de crecimiento intrínseco de las células madre puede explicar gran parte de lo que se considera un fenotipo maligno (Jordan CT et al., 2006).

Muchos estudios en los últimos 30-40 años han demostrado que las características de los sistemas de célula madre, las propiedades específicas de las células madre o ambas, son relevantes para algunas formas de cáncer humano. Poblaciones biológicamente diferentes y relativamente raras de células “iniciando el tumor” se han identificado en cánceres del sistema hematopoyético, en leucemia mieloide (Dick JE., 2005) cerebro, colon (Singh SK et al., 2004) mama (Al-Hajj M et al., 2003), y pulmón (Eramo A et al., 2008). Las células de este tipo tienen la capacidad para autorrenovarse, el potencial para desarrollarse en algunas células dentro de la población celular del tumor y la capacidad de proliferación para impulsar la expansión continua de células malignas. Las propiedades de las células “iniciadoras del tumor” son muy similares a las características que definen las células madre normales. Las células malignas con estas propiedades funcionales se han denominado “células madre del cáncer” (Figura 3) (Jordan CT et al., 2006).



*Figura 3. Los tejidos normales surgen de una célula madre central que crece y se diferencia para crear poblaciones de células progenitoras y maduras. Las propiedades principales de una célula madre normal son; la capacidad para autorrenovación (indicada con la flecha roja), potencial de multilineage (células de diferentes colores) y una capacidad proliferativa extensa. Las células madre del cáncer surgen por medio de una mutación en una célula madre normal o células progenitoras, y por tanto crecen y se diferencian para formar tumores primarios (la flecha discontinua indica que los tipos específicos de progenitores que participan en la generación de células madre del cáncer son hipotéticos). De la misma manera que las células madre normales, las células madre del cáncer pueden autorrenovarse, dar lugar a poblaciones heterogéneas de células hijas, y proliferar extensamente. Adaptada de Jordan CT et al., 2006.*

Dadas estas características, es posible que las células madre del cáncer surjan por mutaciones en las células madre normales. Sin embargo, muchas líneas de evidencia indican que las células madre del cáncer surgen de células progenitoras mutadas. Tales progenitoras (conocidos como tránsito de amplificación de las células) pueden tener una habilidad sustancial de replicación, pero no la capacidad de autorrenovación de las células madre. Para llegar a células madre del

cáncer deben adquirir mutaciones que hacen que se recupere la propiedad de autorrenovación (Jordan CT et al., 2006).

Aunque las características específicas de células madre normales se pueden preservar en mayor o menor grado en las células madre del cáncer, el tema clave a considerar respecto a la biología del tumor es que un pequeño subgrupo de células en el tumor, las células madre del cáncer, es esencial para su crecimiento. El concepto de célula madre del cáncer varía en diferentes contextos. Por ejemplo, las células madre del cáncer pueden ser la fuente de todas las células malignas del tumor primario, pueden componer un pequeño reservorio de células resistentes a medicamentos que son las responsables de las recaídas después de una remisión inducida por la quimioterapia o pueden dar lugar a metástasis (Figura 4). Las características biológicas de las células madre del cáncer en cada uno de los supuestos anteriores pueden ser diferentes, lo cual sugiere que la adquisición de características asociadas con la progresión del tumor, como una inestabilidad genética y resistencia a medicamentos, también pueden estar asociadas a las células madre del cáncer (Jordan CT et al., 2006).

Lo cierto es que los tratamientos contra el cáncer fallan a la hora de eliminar las células madre del cáncer y puede permitir un rebrote del tumor. En los casos de pacientes que han recibido quimioterapia y se ha erradicado la masa de la enfermedad, pero posteriormente han sufrido una recaída una posible explicación es que las células madre del cáncer no se han destruido completamente. Las estrategias terapéuticas específicas de células madre de cáncer deberían erradicar los tumores con más efectividad que los tratamientos actuales y reducir el riesgo de recaídas y metástasis.



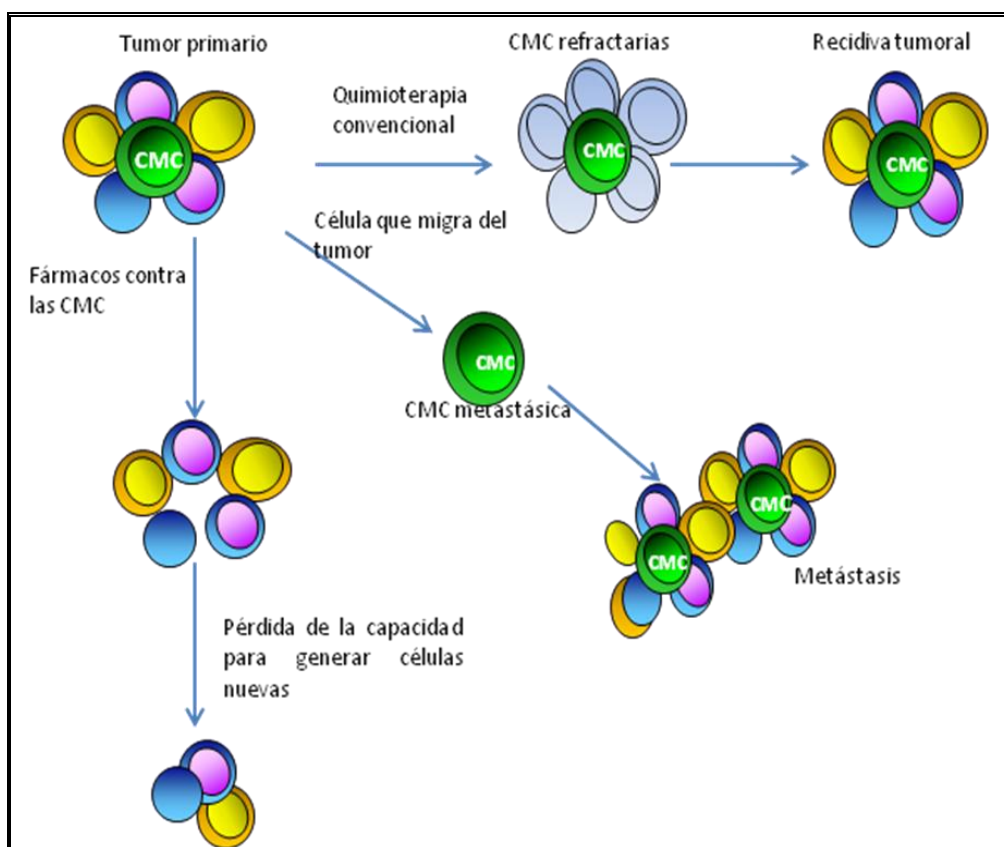


Figura 4. CMC. Células madre del cáncer. Los tratamientos convencionales destruyen las células tumorales normales pero no las CMC por tanto el tumor puede crecer de nuevo y dar lugar a una recidiva. Otra posibilidad es que las CMC derivadas del tumor primario pueden migrar a sitios distales y formar lesiones metastásicas. Tercero, una terapia contra las CMC incapacitaría al tumor para crecer de nuevo y erradicaría el tumor. Adaptado de Reya T et al., 2001.

### 1.3.2. Células madre del cáncer en el sistema hematopoyético

El sistema hematopoyético es el mejor caracterizado con respecto a la biología de las células madre. En las pasadas décadas se definieron muchas de las características físicas, biológicas y de desarrollo de las células madre hematopoyéticas normales, y se han establecido métodos útiles para el estudio de células madre en casi cualquier contexto. Cánceres de células hematopoyéticas como leucemias son claramente diferentes de los tumores sólidos, pero aspectos importantes de la biología de las células hematopoyéticas son relevantes para entender los grandes principios de las células madre del cáncer. En varios tipos de leucemia, las células madre del cáncer se han identificado inequívocamente y muchas propiedades biológicas de estas células madre que se han encontrado han sido trascendentes para las

terapias. (Dick JE., 2005; Jordan CT et al., 2006). Las células madre del cáncer son evidentes en la Leucemia Mieloide Crónica (LMC) y en la Leucemia Mieloide Aguda (LMA) también en la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). En la LMC se ha descrito muy bien el fenotipo de las células madre y el estado quiescente del ciclo celular. De manera similar las células madre de LMA están la mayoría en estado quiescente, lo cual sugiere que los tratamientos antiproliferativos citotóxicos convencionales son probablemente poco efectivos contra estas células. Las células madre de LMA tienen marcadores de superficie como la cadena de receptor  $\alpha$ -interleukina 3, que no están presentes en células madre normales. Estos marcadores pueden ser utilizados como anticuerpos o para otros regímenes terapéuticos relacionados. Se ha demostrado la utilidad de anticuerpos contra el antígeno CD33 en el tratamiento de la LMA (Tausig DC et al., 2005).

### 1.3.3. Células madre del cáncer en el sistema nervioso central

El aislamiento de las células madre del cáncer del sistema nervioso central (SNC) se ha logrado por medio de marcadores antígenos y por explotar in vitro condiciones de cultivo desarrolladas para células madre neurales normales. Primero fue observada en 1992 (Reynolds BA y Weiss S., 1992) las células del SNC crecían en superficies no adherentes dando lugar a bolas de células (neuroesferas) que tienen la capacidad para autorrenovarse y pueden generar todos los tipos de células del cerebro, (neuronas, astrocitos, oligodendrocitos). Las neuroesferas en las cuales el compartimento de las células madre se mantenía podía ser dividido en células individuales: una fracción pequeña de esas células podía generar una nueva neuroesfera. Esta capacidad para repetir la generación de neuroesferas desde una sola célula se considera como autorrenovación. Los estudios más recientes demuestran, que células madre neurales normales expresan una proteína de superficie celular que se puede detectar con un anticuerpo contra AC133 (CD133), un marcador comúnmente encontrado en célula madre y en células progenitoras de varios tejidos, como el pulmón (Shmelkov SV et al., 2005).

La aplicación de algunas estrategias para generar neuroesferas de especímenes obtenidos de los gliomas o la purificación de células positivas CD133 de gliomas humanos, permitió el aislamiento y crecimiento de poblaciones de células madre del tumor. En ambos casos, la población de células madre del cáncer era esencial para establecer un tumor in vivo. El trasplante de tan solo 100 células de glioma humano CD133 positivas en cerebros de ratones

inmunodeficientes inició el desarrollo del glioma, mientras que no se formaron tumores cuando se trasplantaron aproximadamente  $10^5$  células CD133 negativas del mismo tumor.

Muchos estudios han demostrado que la expresión de propiedades como células madre en tumores del SNC, no necesariamente sugieren que estas células se originan de células madre. En sistemas experimentales, la expresión de oncogenes cooperando en células progenitoras de líneas restringidas al SNC puede dar tumores con las características citopatológicas de los tumores del SNC con mayor componente maligno (glioblastoma multiforme). Por ejemplo, la expresión de los oncogenes *ras* y *myc* en células progenitoras de oligodendrocitos dieron células que fácilmente formaron tumores cuando se trasplantaron in vivo. Estos estudios sugieren que las células madre del cáncer no necesitan derivar de células madre de tejidos específicos auténticos, sino que podrían surgir de una célula progenitora adecuada, que ha adquirido propiedades como célula madre cuando sufre una transformación oncogénica (Jordan CT et al., 2006).

#### 1.3.4. Células madre del cáncer en la mama

Los estudios de (AL-Hajj et al., 2003) de tejidos tumorales de pacientes con cáncer de mama en estadios avanzados o metastásicos, demostraron que las células con un perfil de antígeno de superficie celular (CD44 positiva y CD24 negativa) podrían establecerse como xenoinjertos de tumores. Los experimentos se hicieron en ratones inmunodeficientes y las células se trasplantaron en la almohadilla de grasa mamaria para proporcionar un ambiente similar al cáncer de mama humano. Solo un subgrupo raro de células madre de cáncer pudo propagar exitosamente el tumor *in vivo*, mientras que la mayoría de las células malignas fallaron para reproducir el tumor. Además las células purificadas CD44 positivas y CD24 negativas pudieron diferenciarse y dar origen a células similares a las encontradas en la población del bulto del tumor.

### **1.3.5. Células madre del cáncer de pulmón**

Las células tumorigénicas en cáncer de pulmón humano se han aislado utilizando diferentes enfoques tanto en líneas celulares como en tumores primarios (tabla 1). La primera propuesta se basó en el fenotipo de “Parte de la Población” o Side Population (SP), utilizando el método de tinción de Hoechst 33342 de célula madre. Las células SP de líneas celulares de cáncer de pulmón (H460, A549, H441 entre otras) mostraron una capacidad invasiva incrementada, mayor resistencia a fármacos anticáncer y fueron más tumorigénicas “in vivo” comparadas con las células no SP (Ho MM et al., 2007). Basándose en la hipótesis de que las células madre del cáncer presentan mayor resistencia a las drogas, el segundo intento para aislar las células madre del cáncer de pulmón humano (Levina V et al., 2008) utilizaron líneas celulares que trataron con cisplatino, doxorubicina o etopóxido, las células resistentes a las drogas mostraron muchas características de célula madre del cáncer, como enriquecimiento en células SP, expresión de marcadores de células madre embrionarias, capacidad de autorrenovación, generación de una progenie diferenciada y gran tumorigenicidad. El tercer enfoque para el aislamiento de las células madre del cáncer de pulmón tuvo en cuenta el incremento de la actividad de la Aldehído Deshidrogenasa I (ALDH) previamente mostrada en poblaciones de célula madre de varios cánceres humanos. Las células ALDH positivas aisladas de líneas celulares de tumores de pulmón dieron características de células madre del cáncer in vitro e in vivo (propiedades invasivas, expresión de marcadores de célula madre) (Jiang F et al., 2009).

Estudio	Propiedad de célula madre utilizada para el aislamiento	Propiedades de célula madre
Lineas celulares de cáncer de pulmón		
Ho , 2007	Población aparte (SP)	Invasividad incrementada, potencial quimioresistente y tumorigénico
Levina 2008	Quimiorresistencia	Gran capacidad clonogénica, enriquecimiento en células SP, capacidad para la autorrenovación y diferenciación y potencial tumorigénico
Jiang.F 2009	Actividad de la ALDH1	Propiedades invasivas, expresión de marcadores de célula madre , resistencia a quimioterapia e in vivo capacidad para recapitular tumores originales
Muestras de tumores primarios de cáncer de pulmón		
Eramo .A,2008	Capacidad para crecer como esferas en un medio libre de suero	Potencial de autorrenovación, capacidad de proliferación extensiva, quimiorresistencia incrementada y capacidad para recapitular la heterogeneidad del tumor e imitarla histología del tumor xenoinjertado en ratones

*Tabla 1. Se muestra la lista de los estudios actuales sobre el aislamiento y la caracterización de las Célula Madre del Cáncer en pulmón. Para cada estudio la fuente de las CMC (líneas celulares o tumores primarios de pacientes), la propiedad de célula madre utilizada para el aislamiento y las características fisiológicas de las células aisladas.*

En 2008 Eramo A et al fueron los primeros en aislar y expandir la célula madre del cáncer de pulmón de tumores primarios de pacientes. En su estudio, las células madre del cáncer se aislaron en la base de su capacidad para sobrevivir en condiciones de suero libre y proliferar como cluster celulares, conocidos como “esferas tumorales”. Esta estrategia representó la mejor aproximación para obtener la expansión ilimitada de una población celular tumorigénica de pacientes con cáncer de pulmón primario. Debido a la baja frecuencia de células madre del cáncer de pulmón en tejido de tumor primario, la expansión de este tipo de células fue necesaria para una investigación extensiva. En el estudio de Eramo A et al, se generaron y caracterizaron esferas tumorales de los subtipos de cáncer de pulmón más importantes, incluyendo el microcítico, se encontraron propiedades de células madre del cáncer in vitro por expresión del marcador CD133, un potencial proliferativo ilimitado, autorrenovación y capacidad de diferenciación, e in vivo un gran potencial tumorigénico, y la capacidad para

recapitular la heterogeneidad del tumor e imitar la histología del subtipo de tumor del cual fueron aisladas. Además, las esferas tumorales fueron muy resistentes a los fármacos que se utilizan actualmente para tratar a los pacientes con cáncer de pulmón, mientras que las células CD133 negativos no tenían ninguna de estas características (Eramo A et al., 2010).

### 1.3.6. Implicaciones biológicas de la hipótesis de células madre del cáncer

La hipótesis de las células madre del cáncer tiene importantes implicaciones biológicas tanto para el desarrollo de modelos animales de carcinogénesis, como para el entendimiento de los procesos biológicos clave, como interacciones estroma-epitelio y la metástasis. Y a pesar de los avances en los modelos animales, en la mayoría de los casos fallan a la hora de reproducir una enfermedad humana. Muchos modelos transgénicos utilizan promotores específicos de tejidos para dar lugar a la expresión de un oncogen. Sin embargo, estos genes de tejidos específicos puede que solo se expresen en células diferenciadas. Si las células madre o su progenie son la verdadera diana de los eventos de transformación, entonces la expresión de oncogenes en las células más diferenciadas puede fallar para recapitular los procesos reales de la carcinogénesis. Existe evidencia que la expresión de oncogenes en células primarias usando directamente las tecnologías de transfección resulta en un fenotipo diferente a la expresión de los mismos genes dirigidos por promotores específicos de tejidos. Welm AL et al demostraron que la expresión de c-Met y c-Myc dirigido por un promotor específico mamario de ratón del virus de tumor mamario fallaba para producir carcinomas, mientras que estos transducidos en células primarias vía virus de células madre produjeron carcinomas mamarios. (Welm AL et al., 2005; Wicha MS et al., 2006).

El concepto de nicho de célula madre normal tiene una relevancia directa para entender las interacciones estroma-epitelio que ocurren durante la tumorigénesis, además de entender el proceso complejo de metástasis tumorales. (Wicha MS et al., 2006). El curso clínico de la micrometástasis también puede reflejar características de célula madre en células diseminadas. Hasta un 30% de las mujeres diagnosticadas de cáncer de mama y hombres con cáncer de próstata tienen micrometástasis en la médula ósea determinadas por tinción inmunquímica, Sin embargo, después de 10 años hasta el 50 % de estos pacientes no desarrollan la enfermedad macroscópica clínicamente relevante (Braun S et al., 2005). Una explicación posible, es que aunque las células madre o la progenie más diferenciada pueden ser capaces de formar micrometástasis, solo las células madre que tienen la capacidad de

autorrenovación para crear una metástasis macroscópica clínicamente relevante. Además, el concepto de “tumor latente” se puede relacionar con la biología de las células madre. Las células madre generalmente están en estado quiescente G0 y se autorrenuevan solamente cuando reciben las señales apropiadas del entorno de su nicho. Por analogía, las células madre del cáncer pueden permanecer latentes en sitios metastásicos hasta que sean activadas por las señales apropiadas del microambiente. (Wicha MS et al., 2006).

### **1.3.7. Futuras terapias para contra las células madre del cáncer**

El desarrollo de tratamientos dirigido a las células madre del cáncer es el mayor reto para algunos investigadores y para la curación del cáncer. Primero, para diseñar tratamientos que selectivamente erradican las células madre del cáncer es conveniente tener el cognado de las células madre normales o de las células progenitoras, este paso requiere el desarrollo de ensayos para caracterizar la función de las células madre normales y los medios para definir características físicas (como marcadores antígenos de superficie celular o expresión de anticuerpos en tejidos tumorales), que permitirían su aislamiento o su presencia. Sin el conocimiento suficiente, es imposible saber si un medicamento candidato es también citotóxico para una célula madre normal. Segundo, se necesitan describir las células madre del cáncer y validar los ensayos funcionales. Tercero, es necesario entender como las células madre del cáncer se diferencian de las células madre normales, en particular los mecanismos que controlan la supervivencia celular y la respuesta al daño. Lo ideal es que una terapia tenga como diana las vías utilizadas por las células madre del cáncer [por ejemplo la vía de señalización de Notch, que se ha mostrado para contribuir en la autorrenovación de células madre o células progenitoras en los sistemas hematopoyético, nervioso y en órganos como la mama y el pulmón (Reya T et al., 2001) para resistir insultos extrínsecos o mantener la viabilidad en estado estacionario. Cuarto, entender cómo las terapias que tienen como objetivo las células de todo el tumor fallan para erradicar las células madre del cáncer. Las razones para entender esta teoría pueden dar importantes claves para desarrollar regímenes más eficaces para atacar las células madre del cáncer y el volumen de enfermedad.

Las propiedades que caracterizan las células madre del cáncer hacen que sean particularmente difícil de eliminarlas. Las células madre del cáncer de leucemia residen en un estado quiescente largo con respecto a la actividad del ciclo celular, como las homólogas normales. Consecuentemente, los regímenes citotóxicos típicos que se dirigen a células de división rápida

son los menos eficaces para erradicar estas células. Por tanto, una terapia independiente del ciclo celular o que induzca selectivamente el ciclo de las células madre del cáncer sería más eficaz. Otra característica común de las células madre es la expresión de proteínas asociadas con el flujo de toxinas xenobióticas (proteínas resistentes a medicamentos y miembros relacionados con el casset ABC familia transportadora unido a ATP). Una variedad de células del cáncer, particularmente durante la recaída, expresan estas proteínas, de esa manera ofrecen resistencia a muchos agentes quimioterápicos. (Jordan CT et al., 2006).

Otro motivo de preocupación es que las células madre normales o las células progenitoras pueden resultar más susceptibles que las células madre del cáncer a los efectos de la quimioterapia. Las células madre normales del colon pueden inhibir mecanismos de reparación del ADN y por tanto experimentar apoptosis en respuesta al daño del ADN. Este mecanismo evita la acumulación de mutaciones perjudiciales. Sin embargo si las células del cáncer evaden este mecanismo, entonces la quimioterapia podría evitarlas.

## **1.4. TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA**

### **1.4.1. Conceptos generales**

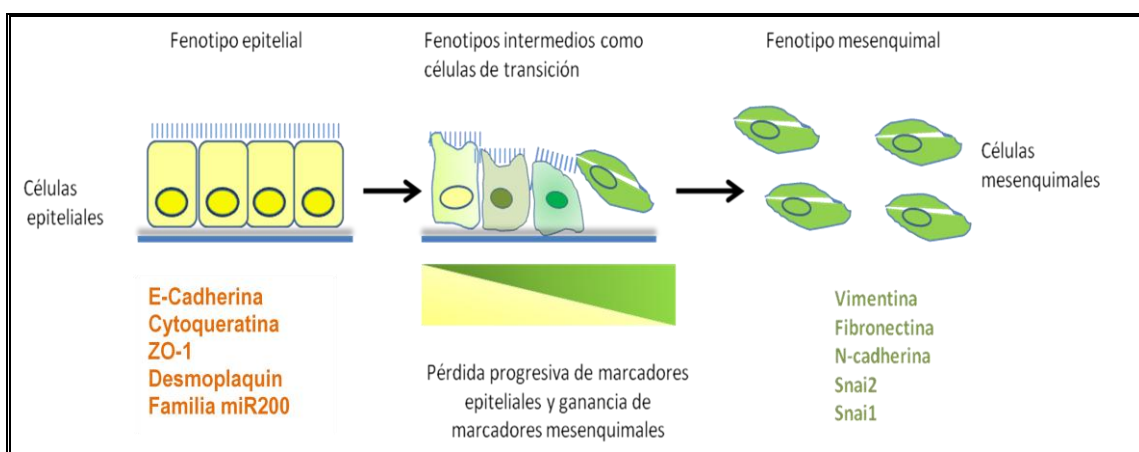
El concepto de división celular como la vía para generar más células y expandir el tamaño del tejido, surgió hace aproximadamente 150 años cuando Virchow postuló la idea de que cada célula que vive en el organismo, tanto en plantas como en animales, se origina de otra célula y a su vez todas son derivadas de una sola célula, el óvulo fertilizado. Partiendo de esta hipótesis se pretende demostrar que las células pueden adoptar varios estados fenotípicos durante el desarrollo y el crecimiento post-natal, es decir pueden experimentar un proceso de diferenciación. En 1995 Hay ED describió por primera vez el proceso de “transformación epitelio-mesénquima” utilizando un modelo de pollo en línea primitiva. Posteriormente el término “transformación se cambió por “transición” reflejando en parte, la reversibilidad del proceso y para distinguirlo de una transformación neoplásica (Kalluri R y Neilson EG., 2003).

Una transición epitelio-mesénquima (TEM) se define como un proceso biológico que permite a una célula epitelial polarizada, la cual normalmente interactúa con la membrana basal vía su superficie basal, para experimentar varios cambios bioquímicos que permiten asumir un fenotipo celular mesenquimal, lo cual implica una capacidad de migración incrementada, una capacidad invasiva, una elevada resistencia a la apoptosis y en gran medida la producción de componentes de matriz extracelulares (Kalluri R y Neilson EG., 2003; Kalluri R y Weinberg RA.,



2009; Thiery JP et al., 2009;Thompson EW y Nwgreen DF., 2008).Considerando esos estudios, muchos tejidos adultos y órganos surgen de una serie de conversiones de células epiteliales a células mesenquimales o viceversa, a través de TEM o transición mesénquima-epitelio (TME) (Van der Pluijn G., 2010).

Se han identificado varios procesos moleculares que hacen posible la transición epitelio mesénquima. Incluye la activación de factores de transcripción, la expresión de proteínas de superficie celular específicas, reorganización y expresión de proteínas citoesqueléticas, producción de enzimas que degradan la matriz extracelular, cambios en la expresión de microARN y, activación de vías moleculares (Figura 5). Estos procesos moleculares en la TME tienen papeles críticos durante el desarrollo embrionario, el crecimiento postnatal y la homeostasis epitelial, pero también están involucrados en una serie de condiciones patológicas como son la cicatrización de heridas, fibrosis, inflamación y en la progresión del cáncer, por este motivo muchos de ellos se utilizan como biomarcadores para demostrar el paso de una célula a través de una TEM (Kalluri R y Weinberg RA., 2009). Por consiguiente, la transición epitelio-mesénquima constituye mecanismos organizados para la dispersión de células en embriones, formar células mesenquimales en tejidos dañados e iniciar un comportamiento invasivo y metastático en cánceres epiteliales.



*Figura 5. La TEM involucra una transición funcional de células epiteliales polarizadas en móviles y células mesenquimales secretadas en la matriz extracelular. En la figura se representan los marcadores que se utilizan para células mesenquimales y epiteliales. La colocación de estos dos conjuntos de marcadores diferentes define un fenotipo intermedio de TEM, indicando células que han pasado solo parcialmente a través de una TEM. La detección de células que expresan los dos conjuntos de marcadores hace que sea imposible identificar todas las células mesenquimales que se han originado de células epiteliales vía TEM, como muchas células mesenquimales probablemente han perdido todos los marcadores epiteliales una vez que la transición se ha completado. Adaptada de Kalluri. R y Weinberg., 2009.*

### 1.4.2. Clasificación de la TEM en tres subtipos diferentes

La transición epitelio-mesénquima se encuentra en tres configuraciones biológicas diferentes con consecuencias funcionales distintas. Las TEMs que se asocian con la implantación, formación del embrión y el desarrollo de un órgano están organizadas para generar diversos tipos de células que comparten fenotipos mesenquimales comunes, que denominan TEMs tipo 1. Las TEM tipo 2 son las que están asociadas a la cicatrización de heridas, regeneración de tejidos y fibrosis de órganos, y por último las TEMs tipo 3 son las que ocurren en células neoplásicas que previamente han sufrido cambios genéticos y epigenéticos específicamente en los genes que favorecen la expansión clonal y el desarrollo de tumores localizados.

#### TEM Tipo1

Las primeras fases de la embriogénesis, la implantación del embrión y la iniciación de la formación de la placenta, ocurren experimentando una TEM que involucra el endodermo parietal (Vicovac L y Applin JD., 1996) (Figura 6). En particular las células del trofoectodermo experimentan una TEM para facilitar la invasión del endometrio y el posterior anclaje de la placenta, permitiendo de esta manera, la función de intercambio de nutrientes y gas (Aplin JD et al., 1998; Bischof P., 2006).

En el óvulo fertilizado tiene lugar la gastrulación generando las tres capas germinales. Las células epiteliales del rasgo primitivo de la capa del epiblasto expresan E-cadherina y muestran una polaridad apical-basal. Las células como epiteliales del epiblasto llevan a cabo cambios programados dictados por la expresión específica de proteínas asociadas con la migración celular y la diferenciación, llevando al mesoendodermo y posteriormente a la formación del mesodermo y endodermo vía TEM (Kalluri R y Weinberg., 2009; Hay ED., 1990; Thiery JP y Sleeman., 2006).

Durante el desarrollo embrionario, una transición epitelio-mesénquima involucra células epiteliales del neuroectodermo y da lugar a células de la cresta neural migratorias (Duband. JL y Thiery JP., 1982). Inicialmente las células premigratorias de la cresta neural expresan genes como *Sox*, *Snai1*, *Snai2* y estas células posteriormente experimentan una TEM (Sauka-Spengler T y Bronner-Fraser M., 2008; Knecht AK y Bronner-Fraser M., 2002). Además, en la TEM que ocurre en la cresta neural es necesario que E-cadherina, molécula de adhesión, esté reprimida para que pueda tener lugar (Thiery. JP., 2003).

### **TEM Tipo2**

Está asociada con la regeneración del tejido y la fibrosis de órganos (Figura 6). Las células inflamatorias y las células del estroma, como los fibroblastos, son capaces de liberar agentes inflamatorios y también proteínas de la matriz extracelular que incluyen colágenos, fibronectinas, tenascina y elastinas. Bajo condiciones patológicas, estas células del estroma pueden estimular células epiteliales normales para experimentar una TEM produciendo una fibrosis extensa de varios órganos y tejidos del riñón, hígado, pulmón e intestino (Zeisberg EM et al., 2007; Kim KK et al., 2006). Algunos marcadores que se utilizan para identificar células epiteliales de los órganos señalados anteriormente y que están en la línea media de la transición epitelio-mesénquima y asociados con una inflamación crónica son vimentina, desmina, entre otros. (Kalluri R y Weinberg RA., 2009).

### **TEM Tipo3**

Una excesiva proliferación y la angiogénesis son el sello de identidad de la iniciación y el crecimiento temprano de cánceres epiteliales primarios. La adquisición de una capacidad invasiva inicialmente se manifiesta por la invasión a través de la membrana basal, anunciando el comienzo de las últimas etapas de un proceso de múltiples pasos que conducen finalmente a una diseminación metastásica con consecuencias peligrosas para la vida (Kalluri R y Weinberg RA., 2009). Los múltiples pasos que forman la TEM han puesto de manifiesto que el proceso de migración celular y la capacidad invsiva podría corresponder a la activación de una TEM en las células cancerosas. El primer paso en la TEM consiste en la desintegración de la adhesión célula-célula con la pérdida de marcadores epiteliales como la E-cadherina y la adquisición de marcadores mesenquimales como la Vimentina. Después hay una pérdida de la polarización baso-apical y la adquisición de una polarización delantera-trasera. Entonces el citoesqueleto sufre una remodelación con cambios en la actina cortical y en fibras de actina. Finalmente, la adhesión célula-matriz se altera con la activación de enzimas proteolíticas como las metaloproteasas de matriz (Hay ED., 2005).El proceso de metástasis en cánceres epiteliales sufre varios pasos igualmente, las células se desprenden del tumor primario e invaden el estroma tumoral circundante (Chambers AF et al., 2002). Posteriormente, entran en la circulación y buscan nuevos sitios para metastatizar, sufriendo el proceso contrario, una TME para formar macrometástasis en el órgano colonizado (Kalluri R y Weinberg RA., 2009).Por tanto, la TEM se puede aplicar a la progresión del cáncer (Iwatsuki M et al., 2009). (Figura 6)

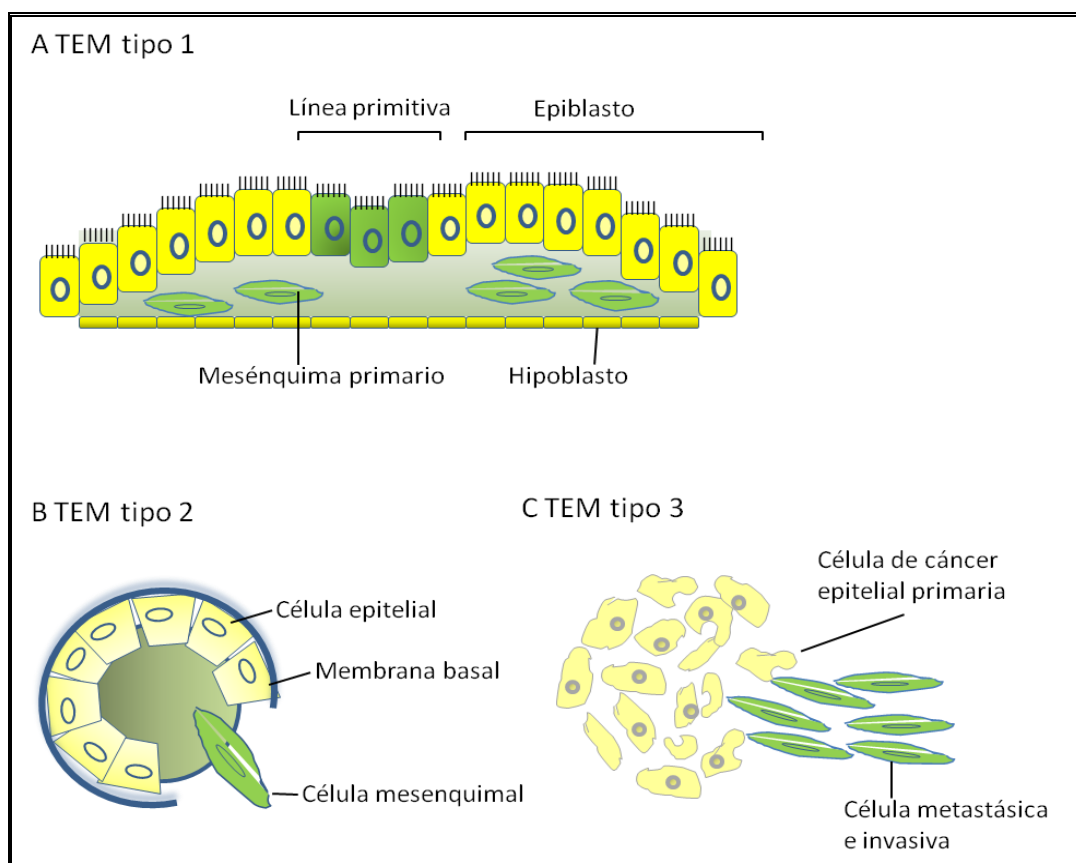


Figura 6. Diferentes tipos de TEM. (A) tipo 1 TEM está asociada con la implantación y la gastrulación embrionaria, da lugar al mesodermo y endodermo y a células móviles de la cresta neural. El epitelio primitivo, específicamente el epiblasto da lugar al mesénquima primario vía TEM. (B) tipo 2 está representada en el contexto de la inflamación y la fibrosis. A diferencia de la TEM tipo 1 se expresa en periodos largos de tiempo y con el tiempo puede destruir un órgano afectado si la inflamación primaria no se elimina o atenúa. (C) el epitelio secundario asociado con muchos órganos puede transformarse en células de cáncer que posteriormente experimentan una TEM que permiten la invasión y la metástasis, de este modo representando la TEM tipo 3. Adaptada de Kalluri R y Weinberg RA., 2009.

### 1.4.3. TEM en cáncer

Aunque el proceso de TEM está documentado en muchos modelos celulares de cáncer in vitro, la importancia de la TEM durante la progresión del cáncer e incluso su relevancia en tejidos humanos tumorales ha permanecido en materia de debate. Esta resistencia se debe principalmente a la pérdida de una convicción evidente de TEM en muestras clínicas. Así la TEM puede ser un evento focal que es fácilmente olvidado (pasado por alto). Interesantemente se ha detectado una diseminación sistémica desde lesiones tempranas en ratones transgénicos y en carcinomas ductales humanos sugiriendo que la metástasis no es un evento necesariamente tardío en la progresión del tumor (Hüsemann Y et al., 2008). Más

importante aún, es que las células mesenquimales individuales derivadas de células tumorales epiteliales después de una TEM son muy difíciles de distinguir de células del estroma o de otros fibroblastos asociados al tumor. La descripción de cables o pequeños agregados de células tumorales extendidas o separadas de la masa del tumor dentro del estroma adyacente ha dado recientemente evidencia morfológica de la TEM en frentes invasivos de tumores humanos (Prall F., 2007) De manera similar, en carcinoma de colon, la TEM ocurre en el frente invasivo y produce células migratorias solas que pierden la expresión de E-cadherina. Esto es concomitante con la desregulación de vías de señalización y una pérdida selectiva de la membrana basal (Brabletz T et al., 2001). Este fenómeno se resume en otros tumores sólidos, como los frentes invasivos del carcinoma papilar de tiroides o en algunos carcinomas de mama que revelan un perfil de expresión de TEM, y en carcinomas cervicales muestran incrementada la expresión de vimentina y una pérdida o disminución de la expresión de E-cadherina. El frente invasivo del carcinoma es la superficie de contacto inmediata del tumor y las señales del estroma. La TEM en la superficie de contacto refleja el complejo contrapeso entre la presión del crecimiento interno ejercida por el nido del tumor principal y la expansión del borde libre de la periferia del tumor.

Muchos conductores de la TEM como son Snail1 y Snail2 se ha demostrado que se correlacionan significativamente con una recaída de la enfermedad y la supervivencia en pacientes con cáncer de mama, colon y ovario, lo cual indica que la TEM lleva a resultados clínicos de mal pronóstico. También existen evidencias de que los perfiles de TEM están asociados con parámetros clinocopatológicos como el grado histológico y el subtipo de tumor como el carcinoma metaplásico de mama, los basal-like, generalmente los que se consideran de mal pronóstico. Además, la supresión de la TEM puede incrementar la sensibilidad a tratamientos en líneas celulares como se ha visto para el hepatocarcinoma, carcinoma de páncreas y cáncer de pulmón (Thiery JP et al., 2009).

#### **1.4.4. TEM en cáncer de pulmón**

En cáncer de pulmón la pérdida de moléculas de adhesión y la expresión de proteínas mesenquimales se ha asociado con la iniciación de cambios mesenquimales y la agresividad del carcinoma (Yauch RL et al., 2005; Prudkin L: 2009). La expresión de varios factores de crecimiento, de factores de transcripción y proteasas se ha asociado con la transición epitelio-mesénquima (Prudkin. L et al., 2009).

Muchos estudios referentes a la TEM en cáncer de pulmón se basan en la expresión de proteínas por inmunohistoquímica en el tejido tumoral y en el tejido circundante (estroma, citoplasma), bien en tejidos de modelos animales, líneas celulares de cáncer de pulmón o en tejidos de pacientes con cáncer de pulmón. Thomson S et al estudiaron en líneas celulares de cáncer de pulmón sensibles al inhibidor del factor de crecimiento, erlotinib y en líneas celulares normales de CPCNP, observando que las líneas celulares que experimentaban una TEM (disminución de la expresión de marcadores epiteliales y un aumento en la expresión de marcadores mesenquimales) eran más insensibles al fármaco. Un estudio similar es de (Yauch RL et al., 2005) con resultados análogos.

Otro estudio afín a los anteriores, para predecir la resistencia a otro fármaco en este caso gefitinib en CPCNP fue realizado por (Frederick BA et al., 2007), demostrando que las líneas celulares con un fenotipo más epitelial (expresión de E-cadherina alta) tienen más sensibilidad al fármaco. Soltermann A et al en una cohorte de 533 pacientes con CPCNP estudiaron la inmunohistoquímica en el tejido tumoral y sus resultados concluyen en que el programa de TEM estaba asumido para permitir a las células cancerígenas epiteliales invadir el estroma desmoplásico circundante. La alta-regulación citoplasmática de vimentina en células del estroma del tumor se asoció con un grado alto del carcinoma, mientras que la expresión de vimentina en células epiteliales se vio, pero no se asoció con ninguna característica del tumor ni de los pacientes. En otro estudio (Chow G et al., 2010) demostraron la TEM en líneas celulares de cáncer de pulmón con una pérdida de E-cadherina y una ganancia de vimentina inducida por ácido hialurónico con una actividad más invasiva y mayor resistencia a medicamentos.

#### 1.4.5. TEM y células madre del cáncer

Estudios actuales sugieren que las células que experimentan una TEM adquieren propiedades de célula madre Figura 7 (Mani SA et al., 2008; Morel AP et al., 2008). La formación de la TEM y CMC resultó en un proceso dinámico que estaba provocado por la interacción de varias vías de señalización como Hedgehog, TGF- $\beta$  y Notch. La señalización de Notch estaba involucrada en la proliferación, supervivencia, apoptosis y diferenciación lo cual afectaba al desarrollo y función de varios órganos (Miele L., 2006). La activación de Notch en células endoteliales resultó en cambios morfológicos, fenotípicos y funcionales consistentes con una transformación mesenquimal. Estos cambios incluyeron la baja-regulación de marcadores endoteliales (VE-cadherina) y la alta regulación de marcadores mesenquimales (fibronectina, vimentina). Por tanto, la TEM inducida por Notch se limita a las células que tenían activado Notch. Y a su vez

también interaccionaba con varios factores de transcripción y factores de crecimiento (Snail1, Snail2, Twist y TGF- $\beta$ ) en el proceso de TEM. Snail2 fue una diana directa de Notch y la señalización de Notch estimula directamente el promotor de Snail2 resultando en la alta-regulación de Snail2 y la formación de la TEM. Además, Snail2 fue esencial para la represión mediada por Notch de la E-cadherina con lo cual promovía la TEM. (Leong KG et al., 2007). Otro de los receptores Notch, Notch2 y su ligando estaban altamente regulados en células de cáncer de páncreas resistentes a gemcitabina y las cuales mostraron la adquisición de la TEM.

El programa de TEM se asoció con la motilidad y la capacidad invasiva, y como hemos comentado anteriormente parece que existía una vinculación entre este programa y las CMCs (Mani SA et al., 2008). El hecho de que las CMCs fueran resistentes a las terapias sugirió indirectamente que el programa TEM contribuía a la resistencia a fármacos. Una evidencia directa también se encontró para la asociación entre el fenotipo TEM y la resistencia terapéutica. Por ejemplo, la supresión de Twist en la línea celular A549 de cáncer de pulmón resultó en una sensibilidad al cisplatino (Zhuo WL et al., 2008) y células de carcinoma de ovario que eran resistentes al paclitaxel mostraron gran expresión de Twist y Snail. Además, las células tumorales de cáncer de páncreas tenían incrementada la expresión de vimentina y disminuida la expresión de E-cadherina, como también se vio una expresión incrementada de marcadores de célula madre CD44 y ESA (Shah AN et al; 2007).

Los mecanismos de señalización por los cuales el programa de TEM regulaba la resistencia a agentes quimioterapéuticos no estaban muy establecidos. Cheng GZ et al encontraron en líneas celulares de cáncer de mama muy invasivas, que expresaban altos niveles de Twist, el cual elevaba la regulación de la transcripción de AKT-2 para promover la supervivencia y ofrecer resistencia al paclitaxel. De igual manera la sobreexpresión de Snail1 y Snail2 en líneas MCF-7 las protegían de la apoptosis inducida por daño al ADN por agentes quimioterapéuticos como doxorubicina.

La TEM también puede contribuir a la resistencia a la radioterapia, Por ejemplo células de carcinoma endometrial radiorresistentes tuvieron cambios fenotípicos asociados con la TEM, incluyendo la decrecida expresión de E-cadherina y una expresión incrementada de vimentina, pérdida de polaridad celular y un incremento en la motilidad (Tsukamoto H, et al.,2007). La inducción de TEM en células mamarias de ratón de EpH-4 y NmuMG podría conferir resistencia a la apoptosis inducida por luz ultravioleta (Robson EJ et al., 2006). Estos hallazgos sugirieron que muchos de los reguladores transcripcionales de la TEM, como Twist, Snail1 y Snail2 podrían dar una ventaja selectiva a las células del tumor invasivas que han experimentado una

TEM debido al incremento en la capacidad de supervivencia vía resistencia a la apoptosis, para sobrevivir en microambientes extraños y hostiles. Esta ventaja selectiva podría permitir la diseminación de células cancerígenas y su supervivencia a largo plazo en los sitios distantes como también daría resistencia a las células del cáncer a las terapias convencionales. Es importante señalar que, estas capacidades son similares a las atribuidas a la población de CMC (Hollier BG et al., 2009).

Además de esta asociación con la quimioterapia y la radioterapia, el proceso de TEM también se ha propuesto para estar asociado con la resistencia a dianas de terapias actuales, incluida la resistencia a inhibidores de EGFR. Los estudios en CPCNP han mostrado, que el fenotipo de TEM se ha asociado con sensibilidad al inhibidor de EGFR, erlotinib. Las células de CPCNP que expresaban E-cadherina y mostraban un fenotipo epitelial fueron más sensibles a la inhibición del crecimiento por erlotinib que las células que mostraban un fenotipo mesenquimal, como evidencia de la pérdida de E-cadherina, y la expresión incrementada de vimentina (Yauch RL et al., 2005).

Mani SA et al encontraron una baja-regulación de los marcadores epiteliales como la E-cadherina y la alta-regulación de marcadores mesenquimales con la vimentina en una población celular  $CD44^{alta}/CD24^{baja}$  caracterizada como células madre del cáncer en mama, las cuales experimentaron una TEM, incluyendo la autorrenovación y la capacidad de formar mamosferas. Lo cual sugiere que la TEM puede tener un papel en el desarrollo de las CMC y en las propiedades invasivas, metástasis, recurrencia y quimiorresistencia (Figura 7) (Iwatsuki M et al., 2010).



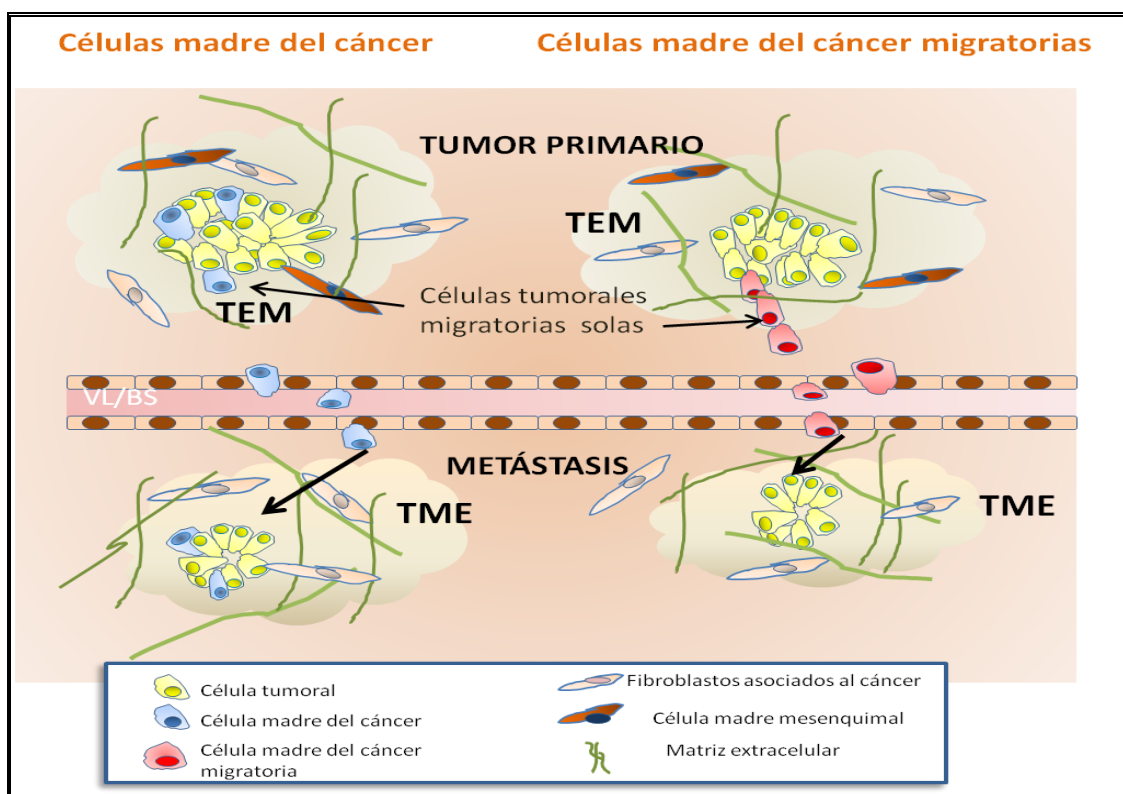


Figura 7. La TEM se piensa que tiene un papel fundamental en la progresión del tumor y la formación de metástasis. Las células individuales que se desprenden de los tumores primarios y migran siguiendo la red de la matriz extracelular. Las investigaciones actuales están analizando las contribuciones de los fibroblastos asociados al cáncer (FAC), incluyendo células madre mesenquimales procedentes de la médula ósea. Otro reto es comprender si las células migratorias malignas son células madre del cáncer actuando como células que inician el tumor en el tumor primario (células azules), si son derivadas de células del tumor epiteliales somáticas que han experimentado una TEM para adquirir propiedades de célula madre (células rojas), o es una combinación de estas dos posibilidades. VL/BS, vasos linfáticos /vasos sanguíneos. Adaptada de Thiery. JP et al., 2009.

## 1.5. E-CADHERINA

### 1.5.1 Superfamilia de cadherinas: características moleculares generales

Las cadherinas fueron originalmente identificadas como glicoproteínas de superficie celular responsables en la adhesión homofílica célula-célula dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , durante la compactación de la mórula en la reimplantación del embrión de ratón y en el desarrollo de polluelos (Yoshida H et al., 1982).

Se han identificado aproximadamente 100 miembros de la familia cadherinas con diferentes estructuras de proteína (Figura 8). La mayoría son proteínas transmembrana, y tienen en común un dominio único denominado motivo cadherina o EC (Takeichi M., 1990) que contiene la carga negativa y una secuencia de motivos DXD, DRE, y DXDNDNAPXF que están involucrados en la unión al  $\text{Ca}^{2+}$ . Los dominios EC son repeticiones en tándem en el segmento extracelular de todas las moléculas de la superfamilia cadherina, pero el número de dominios varía en cada miembro de la familia. Aunque el dominio EC es la identidad de la familia, las secuencias de aminoácidos de la parte citoplasmática divergen significativamente entre los miembros, sugiriendo que la diversificación ha tenido lugar durante la evolución (Yagi T y Takeichi M., 2000).

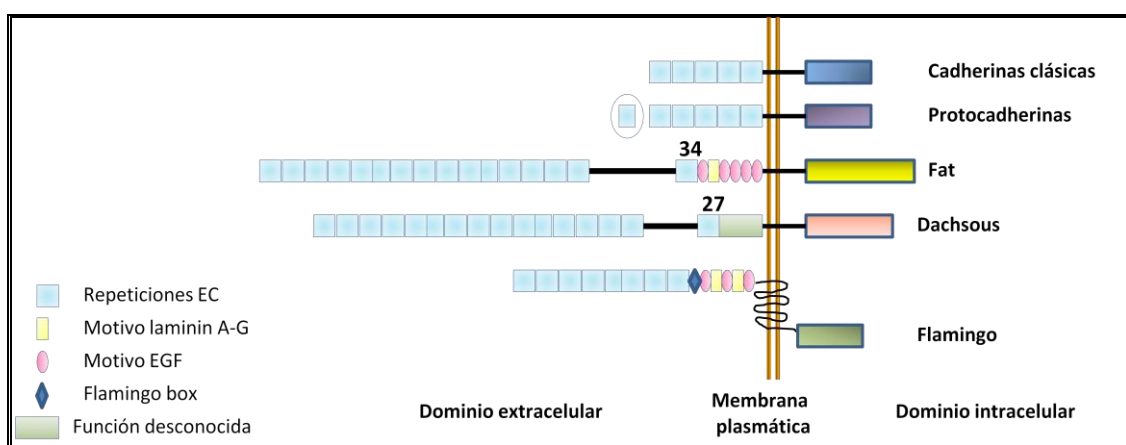


Figura 8. Representación de la estructura de las cadherinas. Todas las cadherinas poseen uniones calcio repeticiones EC que varían en el número. Las cadherinas no clásicas también tienen en su estructura motivos extracelulares adicionales que incluyen dominios laminin y EGF y boxes flamingo. Las cadherinas son proteínas que atraviesan la membrana con la excepción de Flamingo, que es una proteína de membrana de siete pasos. La cola citoplasmática de las cadherinas clásicas está conservada, pero es diferente de las protocadherinas y las cadherinas atípicas. El círculo indica que las protocadherinas tienen seis o siete ECs. Adaptado de Halbleib JM y Nelson WJ., 2006.

Las cadherinas son importantes tanto en organismos simples como en los complejos, en los últimos años se han encontrado en coanoflagelados unicelulares (King N et al., 2003) y en la esponja *Oscarella Carmela* (Nichols SA et al., 2006).

### Cadherinas clásicas

Las cadherinas clásicas han sido el primer subtipo de la familia que se ha identificado, y se ha estudiado lo suficiente para dar detalles de la función y estructura en la regulación molecular de las mismas. Las cadherinas se expresan en la mayoría de los tejidos de vertebrados, forman

principalmente interacciones homofílicas célula -célula y a menudo se concentran en uniones adherentes (AJ), y modulan la adhesión a través de interacciones dinámicas con el citoesqueleto de actina (Halbleib JM y Nelson WJ., 2006). Este subtipo de cadherinas se subdivide a su vez en tipo I y tipo II, tienen 5 ECs en dominio extracelular (Figura 8).

Las cadherinas clásicas tipo I median una fuerte adhesión célula-célula y tienen un motivo tripéptido conservado HAV en el dominio EC más distal (EC1). Se incluyen en este subtipo las cadherinas epitelial (E) y neuronal (N) como la más importantes. El tipo II de las cadherinas clásicas como la cadherina de epitelio vascular (VE) pierde este motivo EC1. El motivo EC1 es importante para la adhesión homofílica y contiene residuos de triptófano conservados que son los responsables de las uniones trans-cadherinas (Nose A et al., 1988).

El dominio citoplasmático está más conservado entre los diferentes subtipos de las cadherinas clásicas. y se une directamente a varias proteínas citoplásmicas incluyendo  $\beta$ -catenina y p120 (Figura 9). Las proteínas asociadas de unión citoplasmática afectan a las interacciones de las cadherinas clásicas con el citoesqueleto de actina. p120 puede regular el nexo de cadherina-citoesqueleto de actina directamente uniéndose e inhibiendo RhoA (Anastasiadis PZ y Reynolds AB., 2001) e indirectamente activando rac1 y Cdc42 vía Vav (Noren NK et al., 2000) y estabilizan las cadherinas en la superficie celular (Davis MA et al., 2003). La  $\beta$ -catenina, también funciona como un activador cotranscripcional con el factor de célula T (TCF) se une directamente a la  $\alpha$ -catenina que a su vez es una proteína agrupada/unida a un filamento de actina, que también interactúa con otras proteínas unidas a actina. (Kobielak A y Fuchs E., 2004).

Estos vínculos proteína-proteína llevan a la conclusión de que  $\alpha$ -catenina une las cadherinas a actinas aunque la mayoría se basa en datos de interacción binaria. Drees F et al han demostrado que las interacciones con  $\beta$ -catenina y actinas filamentosas no ocurren simultáneamente.

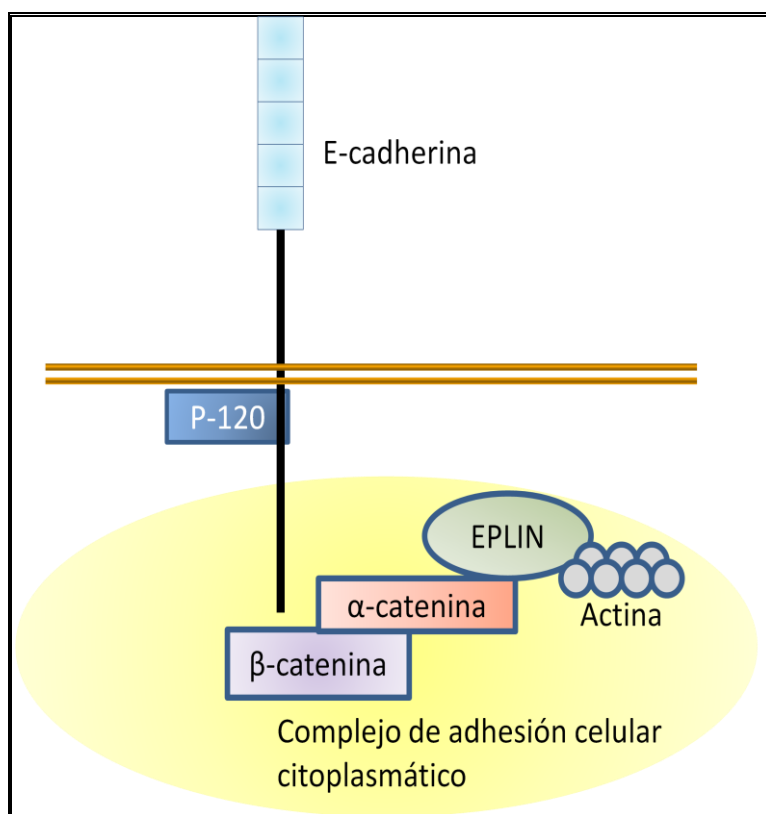


Figura 9. E-cadherina y el complejo de adhesión celular citoplasmático. E-cadherina está estabilizada a la superficie de la célula por su unión al citoesqueleto de actina vía  $\beta$ -catenina y  $\alpha$ -catenina y posiblemente también EPLIN (proteína epitelial perdida en neoplasias). P120 estabiliza el CCC (complejo de adhesión celular citoplasmático) para prevenir la endocitosis mediada por clatrina. Adaptado de Mohamet. L et al., 2010.

### Regulación de la expresión de las cadherinas

La expresión de las cadherinas clásicas está regulada en muchos niveles incluyendo la expresión génica y de transporte, y el recambio protéico en la superficie celular (Figura 10).

La transcripción de la cadherina está regulada directamente por la metilación y la represión de la actividad promotora. La metilación es una modificación común del ADN mediado por una familia de enzimas DNA metiltransferasas, que catalizan la adición de un grupo metilo a residuos de citosina en dinucleótidos CpG (Richards E., 2006). Durante la carcinogénesis, la metilación del promotor de E-cadherina se asocia con la expresión reducida de E-cadherina y con una progresión de la enfermedad y metástasis (Strathdee G., 2002). Varios genes de las cadherinas clásicas poseen un segundo intrón inusualmente grande (en humanos el tamaño del intrón2 comparado con el tamaño total del gen E-cadherina es 63kb de 98 kb) lo cual ha mostrado para E-cadherina que contiene elementos regulatorios que modulan los niveles

generales de cadherina y la expresión específica de tejidos durante el desarrollo (Stemmler MP et al., 2005).

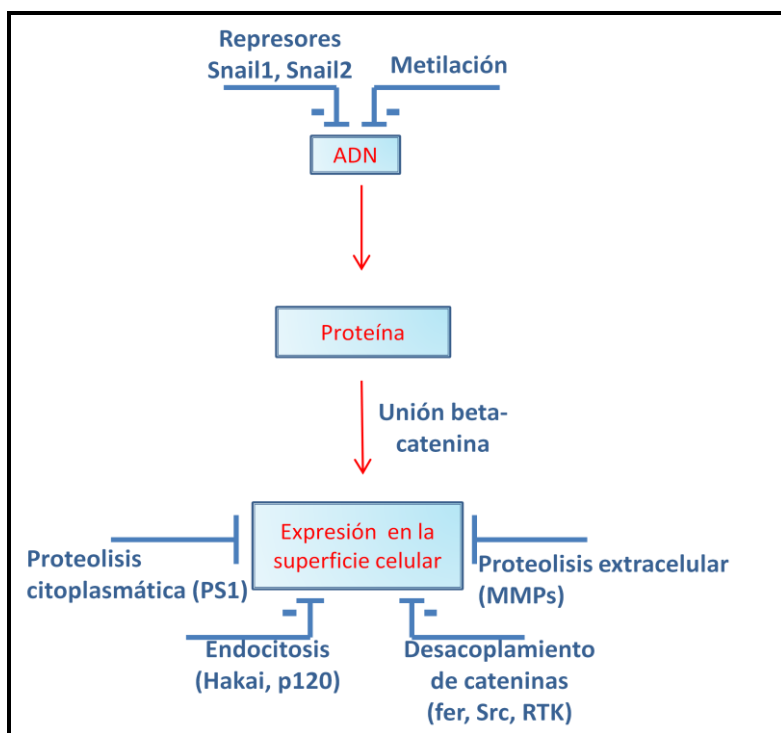


Figura 10. Regulación de las cadherinas. Las cadherinas clásicas están transcripcionalmente reguladas por factores de transcripción dedos de zinc como Snail1 y Snail2 y metilación del promotor. La exocitosis de proteínas recién sintetizadas en el retículo endoplasmático a la superficie celular es dependiente de la unión beta-catenina. Los niveles de cadherina en la superficie celular son regulados por endocitosis sobre la ubiquitinación mediada por Hakai después del desacoplamiento de las cateninas siguiendo la fosforilación. Adaptado de Halbleib. JM: 2006.

### 1.5.2. E-cadherina y cáncer

Como ya se ha comentado, la diseminación metastásica de las células tumorales es la primera causa de muerte en los pacientes con cáncer, en los tumores epiteliales representa al menos el 80% de todos los cánceres. La pérdida de la proteína E-cadherina de superficie celular está correlacionada con la invasión de las células tumorales en la mayoría de los cánceres epiteliales, y también imparte propiedades de la TEM, permitiendo un incremento de la movilidad y la capacidad invasiva. El papel de la E-cadherina como un represor de la metástasis está bien documentado (Cavallaro U y Christofori G., 2004; Di Croce L y Pelicci PG., 2003) la

pérdida de E-cadherina en células epiteliales llevó a una aniquilación en el contacto célula-célula y a un incremento de la movilidad, mientras que una expresión forzada de la proteína E-cadherina en líneas celulares tumorales metastásicas fue suficiente para cambiar este fenotipo (Cavallaro U y Christofori G., 2004). La E-cadherina resultó estar regulada por varios mecanismos no relacionados entre sí. La represión de los transcritos de E-cadherina vía proteínas de unión E-box, como Snail1 o Snail2 estaba también relacionada con la metástasis (Nieto MA., 2002), MMP-7 y 13 pudo escindir la proteína E-cadherina y resultando un ectodominio soluble de la proteína que actuaba como un efecto paracrino para inhibir la función de la E-cadherina sobre las células vecinas. Además, los fragmentos solubles de la cadherina indujeron la expresión de las MMP 2, 9 y 14 en células tumorales de pulmón (Mohamet L et al., 2010). En estudios iniciales por (Watabe M et al., 1994) sugirieron que la adhesión mediada por Cadherinas-cateninas alteraba la cinética de crecimiento en una línea celular de carcinoma de pulmón (PC9). Aunque estas células expresaban E-cadherina y  $\beta$ -catenina, no expresaban  $\alpha$ -catenina y fueron incapaces de formar agregados de células cuando crecían en cultivos en suspensión. Sin embargo, cuando se transfectaron  $\alpha$ -catenina, el contacto célula-célula se restableció mediado por E-cadherina, y resultó en un crecimiento alterado de esas células, lo cual indica que la adhesión E-cadherina podría participar indirectamente o directamente en la proliferación celular. Por tanto, la expresión aberrante de E-cadherina podría estar inducida por la pérdida de función de las moléculas de unión citoplasmática de la proteína (Mohamet L et al., 2010).

### 1.5.3. E-cadherina en cáncer de pulmón

La reducción en la expresión de E-cadherina ha estado siempre relacionada con metástasis y baja supervivencia en los CPCNP (Shibanuma H et al., 1998; Sulzer MA et al., 1998; Smythe WR et al., 1999). Pero en la mayoría de los estudios la expresión de E-cadherina está unida a una molécula catenina, bien beta o alfa catenina. Bremnes RM et al demostraron que la expresión reducida de E-cadherina en la membrana es un factor pronóstico independiente en la supervivencia de pacientes con CPCNP, pero su expresión está relacionada con beta-catenina. Además, todos los estudios anteriores han demostrado la relación de la expresión de E-cadherina con el tipo histológico de cáncer de pulmón escamoso o epidermoide, nunca con el tipo de adenocarcinoma. Bremnes RM et al sugirieron, que el hallazgo de que la expresión reducida de E-cadherina o beta catenina se refiera a la dediferenciación o acortamiento de la supervivencia, principalmente en el tipo histológico epidermoide o escamoso, podría indicar

que la progresión de los adenocarcinomas depende más de otros factores celulares que de los componentes del complejo E-cadherina-catenina. Sin embargo, Kase S et al., 2000, demostraron la existencia de una correlación entre la expresión reducida de beta-catenina con el pronóstico desfavorable de los adenocarcinomas de pulmón y concluyeron con que el complejo cadherina-catenina puede tener un papel más importante en sistemas de adhesión célula-célula, y la expresión reducida de E-cadherina o beta-catenina indica un pronóstico desfavorable (Kase S et al., 2000).

Para el CPCP la expresión de E-cadherina tuvo un comportamiento similar al de CPCNP, la expresión reducida se relacionó con un pronóstico desfavorable y estaba involucrada en la metástasis de los nódulos linfáticos (Yoshida H et al., 1996).

#### 1.5.4. E-cadherina en TEM y CMC

La expresión aberrante de E-cadherina en células epiteliales produjo una respuesta del factor de crecimiento alterada, permitiendo a las células responder a factores exógenos o endógenos que estimulaban la proliferación e inhibían la apoptosis. Además, la expresión aberrante de E-cadherina podría resultar en una transición de las células a un fenotipo de célula madre, (Figura 11) por tanto llevaba al mantenimiento prolongado de un fenotipo de célula madre del cáncer proliferativo, y como consecuencia derivaba en una prolongada reprogramación genética de las células que posteriormente condujeron a la TEM y a la metástasis en etapas avanzadas de la enfermedad (Mohamet L et al., 2010).

Mohamet L et al; Andersen H et al demostraron que la pérdida de E-cadherina solamante no era suficiente para inducir una TEM inmediata, por lo tanto, la expresión aberrante de E-cadherina en una célula tumoral no inducirá necesariamente la invasión y la metástasis, sin embargo la ausencia de E-cadherina dará lugar a una respuesta alterada del factor de crecimiento, y esta puede aumentar la probabilidad de las células que responden a factores exógenos o endógenos que pueden estimular la expresión de las moléculas asociadas a la TEM, como MMP, así como la reprogramación genética gradual de las células (Andersen H, et al., 2005). Así la expresión aberrante de la E-cadherina dentro de la masa de la célula del tumor es probable que lleve a la intensificación del fenotipo metastásico. Por ejemplo, se ha demostrado que los fragmentos de E-cadherina extracelulares solubles podían inducir un ciclo de retroalimentación positivo de la expresión de gelatinasa en las células tumorales de pulmón.

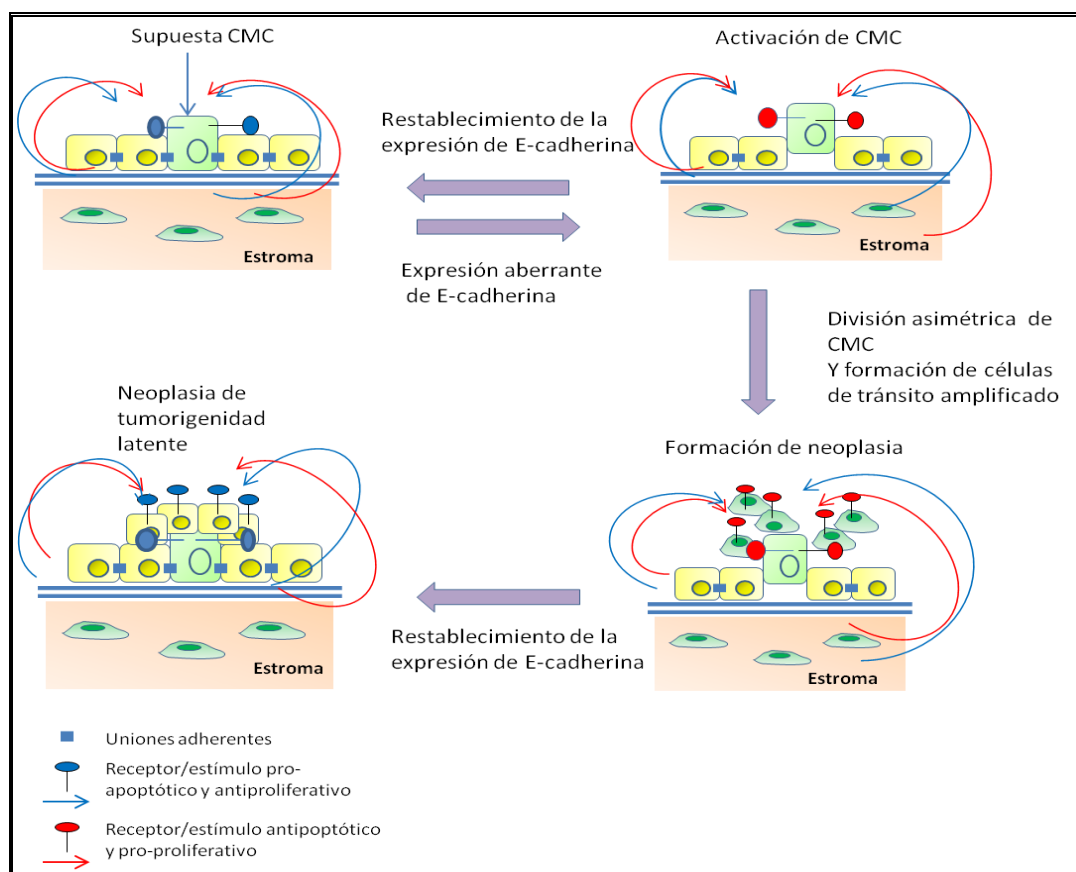


Figura 11. Expresión aberrante de E-cadherina y la formación de neoplasias. E-cadherina funciona en células epiteliales para permitir el reconocimiento y la respuesta a señales anti-proliferativas y pro-apoptóticas (señales azules) y la represión de reconocimiento y respuestas a señales pro-proliferativas y antiapoptóticas (señales rojas). La desregulación de la expresión de E-cadherina en células epiteliales evita la regulación de señales anti-proliferativas y pro-apoptóticas y responde a estímulos proliferativos y antiapoptóticos (receptores rojos). En este punto las CMCs pueden mostrar una restauración de la expresión de E-cadherina si pierden el fenotipo de célula madre y se restablecen en el epitelio. También pueden dar lugar a la formación de células de tránsito amplificadas y debido a la desregulación de E-cadherina, entonces fallan en la formación de tejido normal y forman neoplasias. Pero si hay una restauración de la expresión de E-cadherina, se puede restablecer en el epitelio y forma una neoplasia latente. Adaptado de Mohamet L et al., 2010.

Como se ha demostrado la E-cadherina es importante para la integridad epitelial, y es probable que las células metastásicas sean dependientes de la expresión de E-cadherina para el establecimiento en el sitio secundario. Esto se ha demostrado por datos experimentales mostrando que los tumores secundarios derivados de carcinomas a menudo contenían células dentro de la población que expresa E-cadherina (Gaspar RH et al., 1999). Por tanto, es posible que las células metastásicas halladas conservaran el control de la regulación, sugiriendo que estas células probablemente sean CMC, en la cual se mantiene la regulación de la E-cadherina. De hecho es posible que la expresión de E-cadherina dentro de las CMCs metastásicas permita su establecimiento en el sitio secundario y que el proceso de desregulación de E-cadherina



tenga que ocurrir una vez más para la formación de una neoplasia secundaria, y el establecimiento de una masa celular tumoral. En el sitio secundario donde la expresión de E-cadherina es perjudicial para el establecimiento de las CMCs, entonces las células muestran una expresión de E-cadherina aberrante e irreversible para que logren metastatizar (Mohamet L et al., 2010).

## 1.6. VIMENTINA

### 1.6.1 Características estructurales

Vimentina es una proteína fibrosa de 57 kd, predominante en la familia de proteínas de Filamentos Intermedios (FI) (10nm de diámetro), que constituyen el citoesqueleto de las células eucariotas. Se encuentra principalmente en los fibroblastos, linfocitos, células endoteliales y otros tejidos mesenquimales, siendo la huella de las células mesenquimales. (Minin AA y Moldaver MV., 2008).

Las proteínas FI se expresan en diferentes estados del desarrollo embrionario, y se diferencian en diferentes tipos de células, de acuerdo a diferentes rutas de diferenciación. Aproximadamente 70 genes del genoma humano codifican para diferentes proteínas FI formando una de las mayores familias de proteínas (Hesse M et al., 2001). La función principal intracelular de los FI se basa en sus propiedades mecánicas y en la capacidad de autoensamblaje para mantener la integridad de la célula y del tejido que formen (Fuchs E y Weber K., 1994).

Las proteínas FI tienen una organización estructural tripartita. Consisten en un dominio central helicoidal, que está flanqueado por un dominio amino terminal (cabeza) no helicoidal y una cola carboxy terminal no helicoidal (Figura 12) (Lazarides E., 1980).

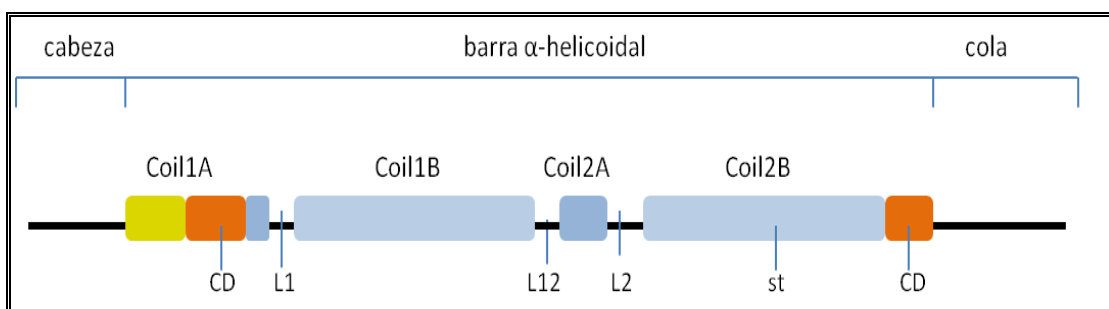


Figura 12. Representación esquemática de la organización estructural de una molécula de F1: Los fragmentos azules representan segmentos; los fragmentos naranjas representan motivos consenso de F1 (CD) y el fragmento amarillo representa un dominio pre-enrollado  $\alpha$ -helicoidal que solamente se encuentra en vimentina. L1, L12 y L2 son segmentos de unión. L2 se prevé para formar un segmento  $\alpha$ -helicoidal, la bobina (Coil2A) y el vinculador (L2) están designados como una paquete (pb) La cabeza y la cola representan los dominios no  $\alpha$ -helicoidales. Los modelos de repetición de siete aminoácidos se representan como st. Adaptado de Herrmann H et al., 2009.

En el dominio  $\alpha$ -helicoidal los aminoácidos están organizados regularmente en repeticiones de siete (heptada), de tal manera que generalmente cada primero y cuarto de la cadena lateral son hidrofóbicos, lo que genera una juntura (unión) hidrofóbica, que a su vez impulsa la asociación de moléculas en forma de bobina enrollada. Por tanto, la estructura principal de las proteínas F1 es una barra  $\alpha$ -helicoidal de 45 nm de longitud en las proteínas F1 citoplasmáticas y de 7 nm más larga en las proteínas F1 nucleares. Dos barras  $\alpha$ -helicoidales tienen la capacidad de asociarse en paralelo para formar una superhélice, un dímero de bobina -enrollada (Hatzfeld M y Weber K., 1990). (Figura 13)

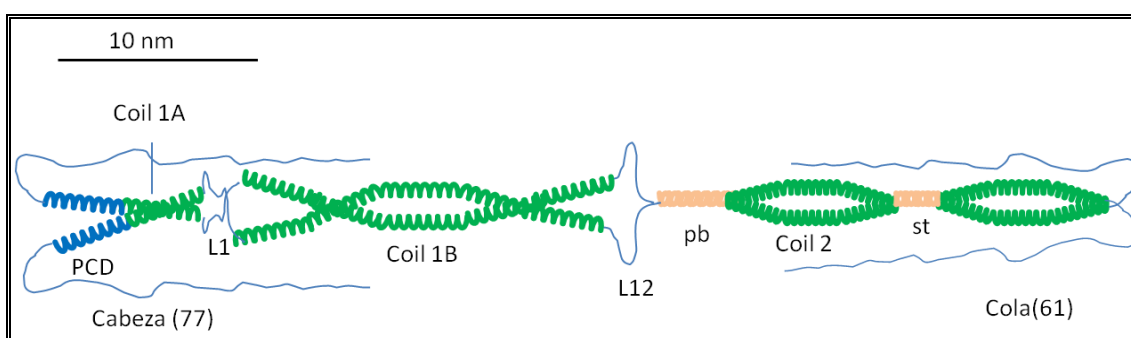


Figura 13. Modelo dímico de la estructura de vimentina humana, muestra el dominio pre-cola (PCD) y el número entre paréntesis indica el número de aminoácidos en el respectivo dominio no helicoidal. Adaptado de Herrmann. H; 2009.

Aunque la inactivación funcional de los genes que codifican para Vimentina no es letal en los embriones de ratones, la ausencia ha demostrado que tiene un impacto considerable en la fisiología celular y del tejido. Los ratones que han perdido el gen funcional de la Vimentina eran aparentemente normales, pero los fibroblastos primarios derivados de esos animales tenían una reducción considerable en rigidez (Eckes B et al., 1998). Además, estas células manifestaron una reducción en su estabilidad mecánica, en la motilidad y en la migración direccional, con una organización espacial de las proteínas de adhesión focal turbada. Como resultado la habilidad de estas células para reparar la monocapa de fibroblastos heridos estaba gravemente dañada (Eckes B et al., 1998).

En consecuencia, las heridas infligidas a los embriones deficientes en Vimentina se curaban considerablemente más lentamente que las de los ratones control (Eckes B et al., 2000). Este efecto se ha atribuido a un fallo de la contracción del mesénquima en el sitio de la herida embrionaria. Otra forma en la cual la pérdida de Vimentina afectaba a la fisiología celular y del tejido fue que el rendimiento de células mononucleares de sangre periférica y de células endoteliales en la migración transendotelial estaba disminuido, indicando que los FI de Vimentina eran importantes para la adhesión de linfocitos y la trans migración a través del endotelio. (Nieminen M et al., 2006; Hermann H et al., 2009).

Algunos autores demostraron los papeles de Vimentina en la participación de un gran número de funciones críticas, relacionadas con la organización de las proteínas que están involucradas en adhesión, migración y señalización celular (Ivaska J et al., 2007), lo cual podría explicar las investigaciones en los ratones carentes de Vimentina explicados anteriormente.

La siguiente tabla, tabla 2, muestra las supuestas funciones de Vimentina.

Función celular	Objetivo de la regulación	Efecto
<b>Integridad estructural de las células y tejidos</b>	Uniones de las células y/o interacciones MEC	La integridad de las capas de las células y tejidos
<b>Adhesión y migración</b>	Integrinas, moléculas de adhesión celular, proteínas del citoesqueleto de reticulación	Formación y rotación de estructuras adhesivas
<b>Transducción de señales</b>	Proteínas y quinasa Receptores y proteínas asociadas al receptor  Factores de transcripción	Dirección y organización de quinasa Localización de receptores de membrana , formación de un complejo funcional de superficie celular  Modulación de la actividad a través de la secuestación
<b>Apoptosis y defensa inmune</b>	Factores de regulación de muerte celular Componentes virales Dominios extracelulares	Modulación de la actividad a través de la secuestación Regulación de la localización subcelular Activación de células del sistema inmune innato
<b>Regulación del ADN genómico</b>	ADN genómico	Recombinación del ADN y reparación

*Tabla 2. MEC (Matriz Extra celular). Funciones de Vimentina en diferentes procesos fisiológicos, y los objetivos de interacción molecular identificados o tanteados implicados en los efectos observados.*

La Vimentina tiene un papel importante en la migración de leucocitos. Los leucocitos pueden migrar a través de las uniones celulares o migrar directamente a través de células endoteliales. La red de Vimentina juega un papel crucial en la unión de los linfocitos al endotelio vascular y en la migración transcelular de linfocitos a través de células endoteliales individuales. La ausencia de Vimentina en linfocitos o en células endoteliales redujo significativamente la adhesión de estos tipos de células entre sí (Nieminen M et al., 2006).

Una investigación interesante fue una filtración clara del endotelio en ratones vim<sup>-/-</sup>, lo cual probablemente refleja defectos en la adhesión célula-célula y/o interacciones celulares (Nieminen M et al., 2006). Estos resultados indicaron que la Vimentina participa en la formación de la estructura de anclaje para la migración de linfocitos, tanto en el endotelio y en el lado de los linfocitos. En apoyo al papel de la Vimentina en la transmigración de células mieloides, se ha demostrado que la Vimentina residía en filopodios y podosomas de macrófagos adherentes (Correia I et al., 1999). Los podosomas son principios de la estructura de adhesión celular encontrados en células mieloides que son vitales para movimientos direccionales y la transmigración (Calle Y et al., 2006). En estas estructuras no filamentosas de Vimentina asociadas con actina en el cruce con la proteína Fimbrina. La asociación tenía lugar a través del N-terminal de Vimentina y parece que había una dependencia sobre la fosforilación de Vimentina (Correia I et al., 1999).

Normalmente la expresión de Vimentina se asocia con células mesenquimales, sin embargo también se ha visto su expresión en células epiteliales, involucrada en procesos patológicos y fisiológicos que requieren la migración de células epiteliales. La Vimentina se ha descrito en células epiteliales en procesos embriológicos y de organogénesis (Guarino M, 1995; Hay D, 1995), en cicatrización de heridas (SundarRaj N et al., 1992), placentación (Nawrocki B et al., 1997) o invasión tumoral (Ramaekers FC et al., 1983; Savagner P et al., 1994; Guilles C et al., 1999).

Guillen C et al estudiaron con líneas celulares de mama humanas (MCF10a) en un sistema in vitro de cicatrización de heridas y estableció un modelo de TEM con el objetivo de estudiar la dinámica de la expresión de Vimentina en función del estado migratorio, encontraron que Vimentina se detectaba preferentemente en las células localizadas en los bordes de las heridas, las cuales estaban involucradas en una migración activa hacia el centro de la lesión. La expresión de Vimentina desapareció cuando la herida se cerró, demostrando por tanto, que la expresión de Vimentina era inducible y podía ser reversa una vez que la monocapa confluyente está restaurada. Además, las células que expresaban Vimentina se movían más rápidamente que las que no la expresaban. Así se demostró que Vimentina se podía expresar en células epiteliales concomitando con sus propiedades migratorias (Guillen C et al., 1999).

### 1.6.2. Vimentina en cáncer

Los estudios de la expresión de Vimentina en líneas celulares de cáncer de mama han demostrado que está relacionada con un mal pronóstico (Sommers CL et al., 1989), además se encontró que la expresión es mayor en tumores de mama con Receptores de Estrógenos negativos (Sommers CL et al., 1989). La expresión de Vimentina fue mayor en células de cáncer de mama con mayor grado maligno. Este estudio sugirió que la expresión de Vimentina in vitro, podría ser un marcador para un subconjunto de células hormono independientes en cáncer de mama (Sommers CL et al., 1989).

McInroy L y MäättäA., estudiaron el efecto de la ablación de Vimentina en líneas celulares invasivas de colon (SW480) y de mama (MDA-MB 231). Se bajo-reguló la expresión de Vimentina por transfecciones del siARN. Se redujo la expresión de Vimentina y no causó cambios en la morfología de la célula, sin embargo si hubo un retraso en la cicatrización de la herida. Con lo cual la migración celular estaba afectada por la ausencia de Vimentina. El siARN media la baja-regulación de Vimentina y podía inhibir la migración de células del carcinoma

epitelial que había adquirido la expresión de Vimentina como parte de una TEM. La inhibición de Vimentina se ha visto en líneas celulares que continuaban expresando queratinas y en las que han perdido todas las queratinas. En este estudio el 70% de inhibición de Vimentina fue suficiente para dañar la invasión y la migración.

La expresión de Vimentina en el estroma de los tumores indicó un peor pronóstico y progresión de la enfermedad (Ngan CY et al., 2007). El microambiente estromal en tumores tuvo un papel crucial en la progresión del tumor. La expresión incrementada de Vimentina en el estroma indicó un mal pronóstico y un cambio dinámico en el estroma del tumor durante la progresión del tumor. (Nga CY et al., 2007).

El estudio de Vimentina en células de carcinoma del tumor primario y en los nódulos metastásicos de cáncer de tiroides (Vasko V et al., 2007), asoció la expresión de Vimentina con invasión, metástasis nodal y multifocalidad, además de estar asociado con la iniciación y mantenimiento de la TEM.

### 1.6.3. Vimentina en cáncer de pulmón

La expresión de Vimentina en el epitelio pulmonar se ve principalmente en el epitelio bronquial fetal y decrece con la edad, pero la expresión de Vimentina se ha visto incrementada en cáncer de pulmón. Esta activación de la expresión de Vimentina fue importante por dos motivos:

- podía ejercer efectos directos o indirectos sobre los contactos célula-célula y la migración celular (Guilles C et al., 1999; Singh S et al., 2003). Existía una asociación entre la expresión de Vimentina y una capacidad invasiva incrementada en células cancerosas.;
- Los eventos moleculares que llevaban a la activación de esta expresión podían proveer una pista para acceder a los mecanismos reguladores que contribuyen a la TEM y por tanto a la progresión del cáncer (Chu S et al., 2007).

El estudio de Maeda J et al., basado en un análisis proteómico en tejidos de adenocarcinoma de pulmón con estadio I en una muestra de 355 pacientes, demostró que la expresión negativa de Vimentina era un indicador de buen pronóstico para estos pacientes.

Otro estudio de microarrays de proteínas realizado en 335 pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña, demostró que la expresión de Vimentina en células epiteliales del tumor correspondía con una pobre supervivencia, fue factor pronóstico independiente negativo para la supervivencia específica de enfermedad. (Al-Saad S et al., 2008).

#### 1.6.4. Vimentina y células madre

Algunos estudios, relacionan la expresión de Vimentina en fenotipos celulares caracterizados para ser supuestamente las células madre de los tejidos o las células madre del cáncer en el caso de los tumores. Como se ha descrito anteriormente Vimentina es una proteína de los FI, que se expresa principalmente en células mesenquimales, sin embargo (Tsarfaty I et al., 1994) demostraron la expresión de Vimentina durante la diferenciación de células inmaduras (progenitoras) en células epiteliales del riñón, ovario y testículos. Para identificar las células progenitoras en el desarrollo del hígado humano, se utilizaron una serie de proteínas (citoqueratinas) y Vimentina. Se vio la expresión de Vimentina en la placa ductal y en células epiteliales biliares y no se expresó en los conductos biliares maduros. (Haruna Y et al., 1996). Resultados similares se han obtenido en un estudio para regenerar el hígado de rata, donde la expresión de Vimentina se produjo en la diferenciación de células progenitoras a células ovas (Sarra C et al., 1994)

Korsching E et al sugirieron que la expresión de Vimentina en el cáncer de mama invasivo podría derivar de células progenitoras de la mama con una diferenciación potencial bilineal (glandular y mioepitelial). Otro estudio en línea celular de cáncer de mama con micrometástasis, revelaba el perfil proteico de células progenitoras o madre donde mostraba la expresión positiva de Vimentina conjuntamente con citoqueratina 5 y negativa para citoqueratinas 8/18, el fenotipo descrito de cáncer de mama, y además la expresión de Her-2 que también se encuentra en células madre o progenitoras de los tumores primarios (Bartowiak K et al., 2009).

En el estudio de las células madre de Müller en la retina neural, la expresión de Vimentina predominaba en células no pigmentadas del epitelio cilial junto con Notch1. Además, demostraron que Vimentina se expresaba en la población celular que sugieren los autores del estudio como la población de células madre de la retina neural en el ojo adulto humano (Bhatia B et al., 2009).

## 1.7. NOTCH1

### 1.7.1. Características moleculares

La construcción de un organismo desde una célula a una estructura tridimensional multicelular de forma y de tamaño característico, es el resultado de una acción coordinada de genes que dirigen el destino en el desarrollo de una célula individual. La adquisición de diferentes destinos celulares organiza una interacción complicada de proliferación celular, migración, crecimiento, diferenciación y muerte, elaborando y trayendo un grupo celular de manera precisa. Intrínsecamente, los factores autónomos de la célula como los no autónomos, las señales de corto alcance y de largo alcance dirigen a las células a través de diferentes vías de desarrollo. Frecuentemente un organismo utiliza la misma vía de señalización con diferentes contextos celulares para lograr un único objetivo de desarrollo. Factores intrínsecos y extrínsecos están integrados en la ontogenia para concretar el destino de la célula, para definir una cuestión básica en la biología del desarrollo (Artavanis-Tsakonas S et al., 1999).

La señalización de Notch es un mecanismo conservado evolutivamente, que es usado por metazoos para controlar el destino de las células por medio de interacciones locales de las células. Las señales transmitidas a través del receptor de Notch, en combinación con otros factores celulares, influyen en la diferenciación, proliferación y eventos apoptóticos en todos los estados del desarrollo. En consecuencia la señalización de Notch surge como una herramienta del desarrollo general, que se utiliza para dirigir el destino de la célula y consecuentemente para construir un organismo (Artavanis-Tsakonas S et al., 1999).

El gen que codifica el receptor de Notch fue descubierto en moscas, *Drosophila melanogaster*, hace un siglo aproximadamente, en virtud de que la pérdida parcial de la función (haploinsuficiencia) resultó en muescas en el margen del ala (Moohr OL., 1919). *Drosophila melanogaster* posee un solo gen *Notch*, mientras que los mamíferos poseen al menos cuatro genes denominados *Notch1/TAN1*, *Notch2*, *Notch3* y *Notch4/Int-3*. (Artavanis-Tsakonas S et al., 1995) Tanto en vertebrados como en invertebrados, los genes *Notch* se expresaron durante el desarrollo del embrión en células proliferantes no comprometidas. Posteriormente, en el desarrollo y en la vida adulta la expresión de Notch continuó en las capas proliferantes de tejidos maduros (Kopan R y Weintraub H., 1993; Milner LA et al., 1994; Zagouras P et al., 1995). Estos modelos de expresión sugirieron que las proteínas Notch funcionan en el mantenimiento de la capacidad proliferativa de células inmaduras (Capobianco AJ et al., 1997).



Las proteínas Notch, (Figura 14), son receptores de transmembrana con pesos moleculares elevados. El dominio extracelular del receptor está compuesto por 1750 amino ácidos, los cuales incluyen 36 repeticiones en tándem de una secuencia semejante al factor de crecimiento epidermal (EGF) y tres repeticiones de un motivo denominado como repeticiones LIN-12. El dominio citoplasmático comprende una secuencia de 750 aminoácidos sin actividad enzimática aparente pero conteniendo seis copias en tándem de una ankirina (CDC10/ANK), una región rica en glutamina (OPA) y una región rica en glutamina, serina y treonina (PEST) (Wharton KA et al., 1985). El primer y segundo motivos citoplasmáticos se cree que son los que median interacciones proteína-proteína y el tercero puede llevar a las proteínas para la degradación (Capobianco AJ et al., 1997).

En todos los modelos animales testados, las mutaciones en el receptor de Notch han resultado en anomalías en el desarrollo que pueden dar lugar a patologías humanas.

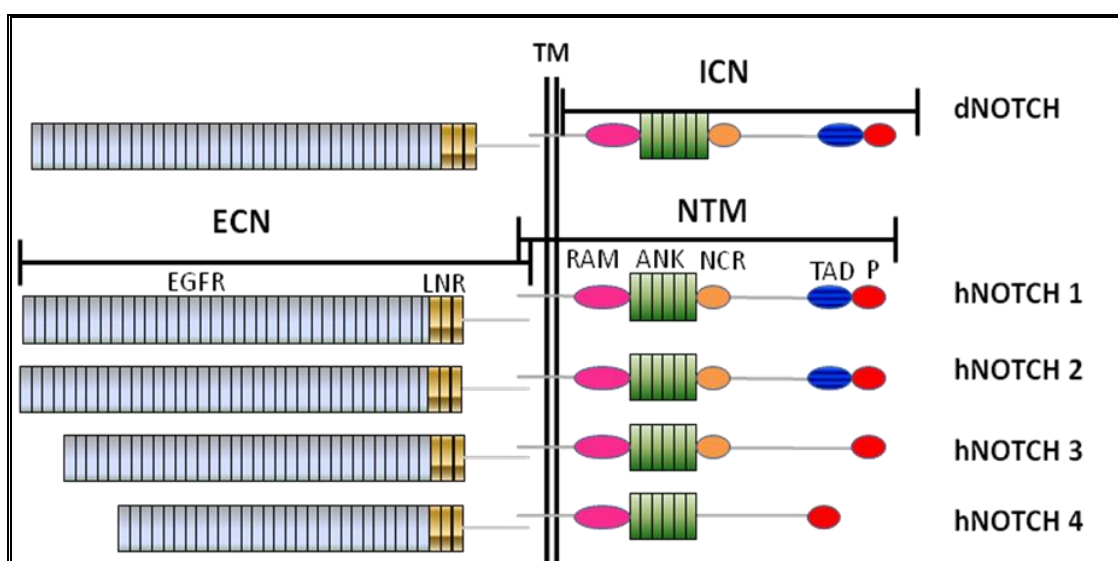


Figura 14. Receptores de Notch humanos. Representación de los 4 receptores humanos de Notch. Las proteínas de larga longitud se expresan en la superficie como heterodímeros compuestos de asociaciones no covalentes asociadas a subunidades de Notch extracelulares (ECN) y transmembrana. (NTM) Todos los receptores de Notch contienen repeticiones del receptor de factor de crecimiento epidermal (EGFR), repeticiones Notch lin12 (LNR), un dominio RAM23 (RAM), repeticiones Ankirina (ANK), secuencias PEST (P). El mayor grado de homología entre los receptores Notch está en las repeticiones ankirina, mientras que las secuencias C-terminal muestran el mayor grado de divergencia. Los receptores Notch 1-3 contienen secuencias respuesta a citoquinas (NCR) junto al C-terminal de las repeticiones ankirina que regulan la actividad funcional. hNotch1 y hNotch2 también contienen fuerte y débil, respectivamente, dominios de activación transcripcional (TAD) entre las secuencias NCR y PEST. Transmembrana (TM); dominio intracelular Notch (ICN). Adaptada de Allenspach. EJ: 2002.

Notch fue identificado como un gen neurogénico (Poulson D., 1937) En *Drosophila melanogaster* las mutaciones de Notch presentan una hiperplasia del sistema nervioso a expensas del tejido epidérmico. Los receptores de Notch son activados por ligandos de transmembrana tipo I, conocidos colectivamente como proteínas DSL (*Delta*, *Serrate* y *Lag 2*), (Figura 15), propuestos para recibir señales de corto alcance entre células directamente relacionadas. Las interacciones entre Notch y sus dos ligandos en *Drosophila*, *Delta* o *Serrate* pueden ser modulados diferencialmente por la glicosiltransferasa Fringe. Esta modulación se piensa que deriva de la elongación medida de fringe de específicos O-residuos con las repeticiones del factor de crecimiento extracelular de Notch. La activación mediada del ligando de Notch lleva a la conversión de proteínas CSL (CBF1, Su (H), Lag-1) desde represores transcripcionales activadores, por tanto a una alta-regulación de dianas corriente abajo [ej; HES, Hairy/Enhancer of Split genes las cuales codifican proteínas nucleares basic hélix-loop-hélix (bHLH)] (Mumm JS y Kopan R., 2000).

Generalmente la señalización de Notch se ha descrito para dirigir células equivalentes, o grupos de equivalencia, cada uno expresando el ligando y el receptor para adquirir el adecuado destino de la célula durante el desarrollo. Los estudios de tipo de señalización lateral han implicado la inhibición de Notch en un defecto en el destino de las células primarias, permitiendo la expresión de vías de destino secundarias. Notch también participa en múltiples procesos de desarrollo como una fuente de señales inductivas entre células no equivalentes. En estos casos las células “señalizadoras” (expresan el ligando) y las células vecinas que reciben la señal (expresan el receptor) están claramente demarcadas (Mumm JS y Kopan R., 2000).

La imagen básica es que el dominio extracelular de los ligandos expresados en la superficie de una célula interactuando con el dominio extracelular del receptor de Notch. Como resultado de la activación del receptor Su (H) se une a secuencias regulatorias de genes E (spl) y una expresión up-regulada de sus proteínas codificadas bHLH. Los factores bHLH, a su vez afectan a la regulación de genes diana downstream. Una diana muy bien definida es el complejo Achaete-Scute, el cual contiene genes proneurales que codifican proteínas involucradas en la segregación de líneas neurales y epidérmicas, un proceso que está afectado por mutaciones en Notch. Sin embargo, cada paso necesita elementos adicionales y características que modulan la actividad y eficacia de las señales transmitidas a través del receptor de Notch (Artavanis-Tsakonas S et al., 1999).

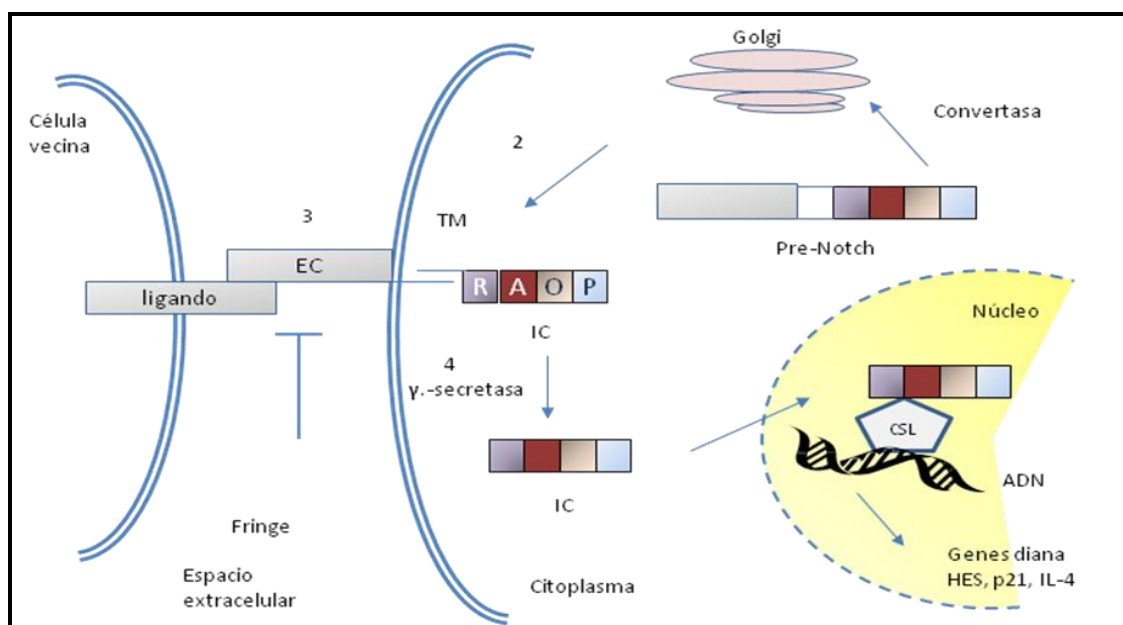


Figura 15. Notch se sintetiza en forma de precursor inactivo (pre-Notch) y su procesamiento en el aparato de Golgi (paso1) es a través de hidrólisis generada por la enzima convertasa. El producto de esta reacción es la formación de las subunidades IC, TM y EC que se reensamblan posteriormente en la membrana plasmática (paso2) como un complejo heterodimérico activo. La unión de Notch y su ligando (paso3) proveniente de una célula vecina, induce el procesamiento de Notch (paso4) por la proteína Presenilina -1 (parte del complejo enzimático gama-secretasa) liberando la subunidad intracelular IC. La traslocación de IC al núcleo y su unión a factores de transcripción de la familia CSL (paso5) de cómo resultado la activación de la expresión de genes específicos, esto es, los factores de transcripción HES, IL-4, NFkB, etcétera.

Pre-Notch, polipéptido precursor de Notch; EC, subunidad extracelular; IC, subunidad intracelular; TM, subunidad transmembrana; R: RAM-23, sitio de alta afinidad de los factores de transcripción; A, repeticiones Ankirina necesarias para la transmisión de señales; O, OPA, región rica en glutamina; P: PEST, región rica en prolina-serina-treonina; csl: cbf-1/Lag-1/Supresor de Hairless. Adaptado de Santos L et al., 2006.

En el nivel extracelular la acción de los ligandos puede estar influenciada por una molécula Fringe, pero es bastante posible que existan otros factores extracelulares capaces de influir en la acción de los ligandos de Notch (Fleming RJ et al., 1997).

En el nivel intracelular, la región de Notch que abarca las repeticiones de ankirinas es necesaria para la transmisión de las señales de Notch. Entre las proteínas Ankirinas que están interactuando se encuentran EMB5 en *C elegans* que está relacionada con el regulador de la estructura de la cromatina Stp6 de *Saccharomyces cerevisiae*, Deltex y SU (h). Deltex es una proteína pionera que contiene un motivo anillado de dedos de zinc y una supuesta homología

SCR3 en los dominios de unión. En *Drosophila*, *deltex* actúa como un regulador en la señalización de Notch, aunque no es esencial. En las células de mamíferos se ha documentado una regulación positiva y negativa por el homólogo de *Deltex*. Su (H) interactúa con dos sitios diferentes en el dominio intracelular de Notch, uno abarca las repeticiones de ankirina y otro que no las abarca. Otras proteínas estudiadas para interactuar con Notch son Numb (es un factor crítico para la elaboración del sistema periférico nervioso), Disheveled, se encuentra en la vía de Wingless y Disabled una proteína accesoria de la quinasa Abl. En los sistemas mamíferos Bcl3 (un miembro de la familia I $\kappa$ B) y Nur77 (una proteína envuelta en el desarrollo linfoide) son las proteínas que interactúan con el dominio intracelular de Notch (Artavanis-Tsakonas S et al., 1999).

### **El espectro celular de la acción de Notch**

Un amplio análisis de la pérdida y ganancia de función en las mutaciones de Notch se han estudiado en *Drosophila*, *C.elegans*, erizos de mar, ranas, peces, pollos, ratones y humanos indicando una notable conservación de la función. Los análisis de la pérdida de función de Notch o de una mala función en vertebrados se asocia con tumores sólidos y linfáticos, igualmente se ha visto una interrupción en aspectos de neurogénesis, formación de capas, angiogénesis y desarrollo linfoide (Egan B et al., 1998; Gridley T., 1997).

El estudio de anticuerpos contra antígenos específicos que refuerzan y promueven líneas lacZ, lo cual permite marcar la mayor parte de tejidos embrionarios, demostró que la pérdida de señalización de Notch resultó en anomalías en el tejido derivadas de las tres capas germinales. Post embrionario, la señalización de Notch fue necesaria para la formación de los sistemas nervioso central y periférico, para la espermatogénesis, oogénesis, miogénesis, formación del corazón y discos imaginarios en desarrollo (Artavanis-Tsakonas S et al., 1999).

### **1.7.2. SEÑALIZACIÓN DE NOTCH EN SISTEMAS DE CÉLULA MADRE**

Durante la embriogénesis, es difícil distinguir entre células primordiales y células madre específicas del tejido y entre célula madre y progenitores. Los estudios que utilizan animales modificados genéticamente han demostrado el papel de la señalización de Notch en células madre y progenitores tempranos (Yoon K y Gaiano N., 2005; Fre S et al., 2005; Arai F et al., 2004).

### 1.7.2.1. Fenotipos de ratón con Notch mutado

Se han introducido mutaciones en ratones para cada uno de los cuatro genes Notch y cuatro para cada gen de los ligandos de Notch (*Delta-Like1*, *Delta-Like4*, *Jagged1* y *Jagged4*). Los ratones interrumpidos homocigóticamente en Notch1 o Notch2 (Swiatek PJ et al., 1994) se morían en el día 11 embrionario, sin embargo los ratones nulos en Notch3 y Notch4 sobrevivían sin ninguna anomalía fenotípica, aunque se confirmó que Notch3 y Notch4 eran necesarios para el desarrollo vascular embrionario. La inactivación homocigótica de *Delta-Like1*, *Delta-Like4* o *Jagged2* era letal para los embriones en los días 9.5 y 12.5 y los ratones nulos en *Jagged2* morían durante el periodo perinatal. Así demostraron que los genes *Notch* y los genes ligandos tenían un papel redundante en la embriogénesis del ratón. La somatogénesis, formación anormal del sistema vascular, incremento en la apoptosis celular, diferenciación neuronal excesiva, se han observado en este tipo de ratones mutantes (Chiba S., 2006).

En el sistema nervioso central durante la embriogénesis en *Drosophila* algunas células neuroectodermales no diferenciadas expresaban Delta en niveles altos enviando una señal a las células circundantes que expresaban el receptor de Notch. A las células que recibían la señal se les impedía diferenciarse en neuroglioblastos, y asumían eventualmente otro destino de diferenciación. Por otro lado, las células que expresaban Delta se diferenciaban en neuroglioblastos y posteriormente en neuronas y en células gliales (Gaiano N y Fishell G., 2002). Por tanto, los niveles insuficientes de la señal de Notch resultaban en un fenotipo neurogénico donde todas las células con potencial neuronal se diferenciaban en neuronas.

La señalización de Notch podría actuar sobre las células madre neurales en dos pasos: Inicialmente inhibiendo el destino neuronal mientras permite un destino para la célula glial, y seguidamente promoviendo la diferenciación a astrocitos mientras inhibe la diferenciación a neuronas y oligodendrocitos (Grandbarbe L et al., 2003). Esto encaja con el enfoque de la señalización de Notch, para evitar que las células tomen la primera vía y las guía a una vía secundaria (Chiba S., 2006).

### 1.7.2.2. Determinación del destino de la célula por la señalización de Notch durante la embriogénesis

La señalización de Notch tiene tres papeles importantes durante el desarrollo embrionario. Primero: afecta a la diferenciación desde células primarias a células madre específicas de

tejido en el estado embrionario temprano y medio, inhibiendo la diferenciación o induciéndola depende del contexto; segundo inhibe células madre específicas de tejidos u órganos o progenitores inmaduros de una diferenciación mayor y presumiblemente la ayuda a expandirse mientras mantiene el estado inmaduro, tercero, esta bloquea la vía por defecto y promueve una vía alternativa, la cual se observa durante los estados medios y tardíos del desarrollo embrionario, como durante la formación de órgano (Chiba S et al., 2006).(Figura 16)

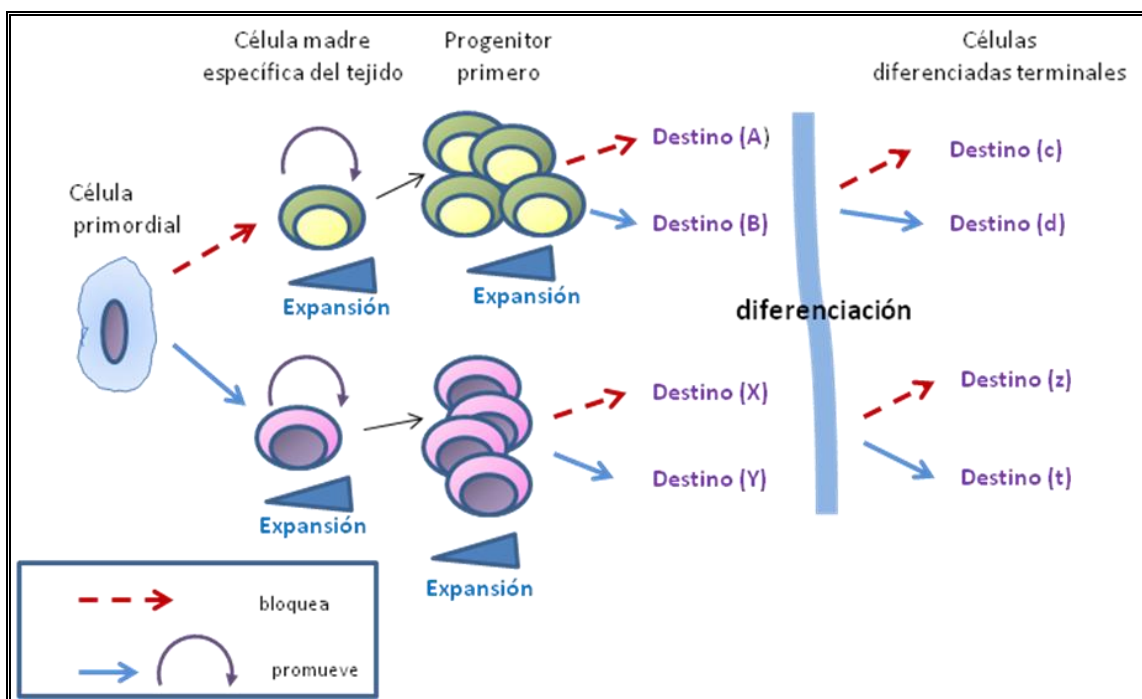


Figura 16. Influencia de la señalización de Notch sobre el destino de las células madre y progenitoras. Los efectos biológicos de la señalización de Notch se pueden generalizar como representa la figura. La señalización de Notch guía a las células para diferenciarse o no, y a una diferenciación A en vez de B o a una B en lugar de una A. Por lo tanto, la señalización de Notch desempeña un papel en el aumento de células madre o de células progenitoras tempranas. Adaptada de Chiba S et al., 2006.

El papel de la señalización de Notch en células madre postdesarrollo .Las células madre adultas se consideran que mantienen la homeostasis de células y de los tejidos durante la vida de los seres vivos. Las células adultas madre mantienen el número de células madre y también las células diferenciadas, durante una rotación normal y después de reparar el daño de una lesión. La participación de la señalización de Notch ocurre en un estado normal o dañado en varios sistemas de células madre (Chiba S et al., 2006).

### 1.7.3. Mecanismos potenciales de Notch en cáncer

La vía de señalización de Notch controla numerosas decisiones del destino de la célula en el desarrollo, a través de la regulación de genes involucrados en diferenciación y proliferación. Los receptores y ligandos Notch y otros componentes de señalización tienen patrones de expresión dinámicos superpuestos, sugiriendo que esta vía está sujeta a un ajuste amplio para asegurar que el ritmo y la fuerza de las señales de Notch son apropiados para el contexto. Los cánceres comúnmente se asemejan a las células correspondientes a estados normales del desarrollo, por tanto no sorprende que las moléculas de señalización de Notch estén ampliamente expresadas en diversas neoplasias. Un reto importante es distinguir la etapa apropiada de la expresión de los componentes de la vía de Notch de la expresión aberrante que es fisiopatológica. Esto se debe a que los tumores pueden recapitular las etapas de desarrollo del tejido normal que tienen lugar en el desarrollo temprano o tienen como origen las células madre del cáncer que son complicadas para estudiar (Allenspach EJ et al., 2002).

Los mecanismos de tumorigénesis en los que participa la vía de señalización de Notch se resumen en la tabla 3.

Mecanismo de propagación del tumor	Tumores potenciales	Terapias potenciales
Ganancia de función de las mutaciones	LLA-T, carcinomas mamarios de ratón	Inhibidores intracelulares de la vía de Notch (interrumpir el complejo nuclear ICN, activan inhibidores de Notch)
Activación del ligando mediado de la vía de señalización de Notch	Desórdenes linfoproliferativos (LLC), linfoma de Hodgkin's	Inhibidores intracelulares o extracelulares de la vía de Notch (bloquean el ligando unido a Notch)
Down regulación de la vía de señalización de Notch	CPCP, adenocarcinoma de próstata, carcinoma cervical, cáncer de células basales, neuroblastomas	Activar la vía de Notch (ligandos solubles, anticuerpos de activación de la señalización de Notch)

Tabla 3. Posibles funciones de la señalización de Notch en cáncer humano (Allenspach. EJ; 2002).

#### Notch en neoplasias linfoides

La identificación de una traslocación recurrente t (7; 9) (Sklar J et al., 1980) se asoció con un subconjunto pequeño de T-ALL. Los análisis de estos tumores mostraron que el punto de

interrupción recaía en el cromosoma 9 en el locus de NOTCH1 y con una yuxtaposición de la parte potenciadora del promotor del receptor-  $\beta$  de célula T con el extremo final 3' de NOTCH en el cromosoma 9 derivado. Como TCR $\beta$  se expresa continuamente en células T, la traslocación causa una expresión desregulada en una serie específica de tumores.

### **Notch en tumores mamarios**

El gen Notch1 también se ha identificado como un sitio de inserción proviral de MMTV en carcinomas mamarios murinos. La infección MMTV fue usada para detectar sitios de inserción que aceleran la tumorigénesis causada por el transgen Erb2. De 24 tumores analizados, dos tenían la inserción proviral con el gen Notch1 lo cual se piensa que da lugar a transcripciones aberrantes codificando formas activas de Notch1. (Dievart A et al., 1999). Basándose en el papel de Notch en promover la autorrenovación de las células madre mamarias y su posible función como protooncogen (Brennan K y Brown AM., 2003) sugiere que la señalización de Notch anormal puede estar involucrada en carcinogénesis a través de la desregulación de la autorrenovación de la célula madre mamaria normal. Así se propuso que las células madre o las células progenitoras tempranas constituyen el primer objetivo de la transformación.

### **Notch en cáncer de colon**

Reedijk M et al estudiaron la expresión génica de la vía de señalización Notch cáncer colorectal (CCR) humano. Los genes, *NOTCH1* y *LFNG* se expresaron en niveles mayores en la cripta que en las vellosidades, y estos dos genes se expresan en niveles comparables a la cripta en los tumores con tejido normal adyacente. Además los ligandos JAGGED, NOTCH1 y LFNG se expresaron en niveles altos en un número aceptable de casos de CCR sugiriendo que estos genes tienen un papel importante en el desarrollo y progresión del tumor. Otro estudio en este tipo de tumores de (Zang Y et al., 2010) demostró que Notch1 estaba sobreexpresado en células de cáncer del colon y los niveles de expresión se asociaban con el grado patológico y con la metástasis de cáncer de colon. Además, la señalización de Notch podía regular de manera positiva el crecimiento de los tumores por promover la proliferación y la supervivencia de las células madre del cáncer en colon y de las células cancerígenas.



#### **1.7.4. Notch y cáncer de pulmón**

Los estudios que existen sobre expresión de Notch en CPCNP han demostrado un potencial oncogénico de Notch para este tipo de tumores. (Westhoff B et al., 2009) presentó resultados de la expresión de Notch en tejidos de pacientes con CPCNP, donde los pacientes con expresión de Notch positiva tenían peor pronóstico. Para el subtipo de CPCNP de adenocarcinoma la expresión de Notch resultó como factor independiente de mal pronóstico (Donnen T; 2010). El adenocarcinoma de pulmón parece ser el subtipo más significativo y susceptible con respecto a la expresión de Notch, (Chen Y et al., 2007, 2010) demostraron en líneas celulares de adenocarcinoma y en condiciones de hipoxia (una característica muy unida a la fisiología de cáncer de pulmón) que la expresión de Notch es esencial para la supervivencia de las células y por tanto para una autorrenovación del tumor.

Sin embargo, para el CPCP la expresión o presencia de Notch se relaciona con mejor pronóstico o función supresora de tumores para Notch, como se detalla a continuación. El CPCP, un tumor con diferenciación neuroendocrina (NE) está involucrando la alta-regulación de una vía de señalización específica normalmente antagonizada por la señalización de Notch.

Durante el desarrollo humano fetal las células pulmonares neuroendocrinas (PNEC) expresan una proteína conservada bHLH, Achaete-scute homologue-1 (ASH-1), las cuales se requieren para el control NE de esas células. Durante este proceso la señalización de Notch controla el destino de la célula pulmonar epitelial por activación de HES, que a su vez inhibe genes requeridos para la diferenciación celular NE, como ASH1 (Linnoila RI et al., 2000). En modelos experimentales del desarrollo del pulmón, ASH1 se expresó en PNEC mientras que Notch1 y HES1 se expresaron fuertemente en no PNEC. ASH1 formaba un heterodímero con otros factores bHLH y condujo la expresión de genes corriente abajo necesarios para una diferenciación neuronal o NE. Ambos HES1 y HES3 se unieron al promotor hASH1 y reprimieron la transcripción de hASH1, dando un mecanismo para la baja-regulación de ASH1 por Notch. ICN1 también pudo inducir la degradación de hASH1 a través de la poliubiquitación TAD-dependiente de la proteína hASH.

La pérdida de ASH1 en ratones no detectó PNEC, mientras que una expresión forzada de ASH1 resultó en una hiperplasia y metaplasia, aunque esas células no mostraron marcadores NE detectables. Esto indicó que ASH era necesaria pero no era suficiente para una diferenciación NE pulmonar. Sin embargo, una expresión forzada de ASH1 y SV40 Large T Antigen resultó en adenocarcinomas muy agresivos de pulmón con características de NE, un fenotipo que se

encontró solamente en tumores espontáneos murinos. Las dianas de Large T antigen, p53 y Rb se encuentran inactivados en cánceres de pulmón humanos (Allenspach EJ et al., 2002).

La proteína humana ASH1 se encontró fuertemente expresada en líneas celulares de CPCP pero no se detectó en líneas celulares de CPNCP. El transcripto hASH1 también tenía una expresión alta en tumores primarios de célula pequeña de pulmón comparada con la expresión en tumores de célula no pequeña de pulmón y en biopsias de broncoscopias normales (Ball DW et al., 1993).

### 1.7.5. Notch y TEM

Los procesos que gobiernan la adquisición de la TEM están regulados por muchos estímulos, como las vías de transducción de señales y factores de transcripción. Recientemente, la vía de señalización de Notch se ha encontrado para ser un regulador importante en la inducción de TEM. No obstante, parece ser que esta TEM inducida por Notch está limitada a las células que tienen activada la expresión de Notc (Wang Z et al., 2010).

La TEM inducida por Notch la ha demostrado (Niessen K et al., 2008) en la celularización de la caja cardíaca. En este proceso el factor de transcripción Snail2 era una diana de Notch directa necesaria para iniciar la TEM. Snail2 se expresaba en un conjunto de células endoteliales y células mesenquimales del canal atrioventricular en el día 9.5 del embrión, que resultaba ser el paso de iniciación de la TEM. Los embriones deficientes en Snail2 resultaron con una generación celular dañada. Durante este proceso la señalización de Notch directamente regulaba el promotor de Snail2, lo cual resultó en la alta-regulación de Snail2 en células endoteliales, y se podía unir al promotor de E-cadherina para reprimirla e iniciar la TEM (Sarkar FH et al., 2009).

## 1.8. SNAIL2

### 1.8.1. Familia Snail

El gen *SNAI2* (*SLUG*) pertenece a la familia Snail factores de transcripción dedos de Zinc (Nieto MA., 2002), la cual está implicada en la morfogénesis, y son miembros esenciales en la formación del mesodermo en múltiples organismos desde insectos hasta mamíferos. En el

estudio de diversos vertebrados también se ha visto una función importante de esta familia en el desarrollo de la cresta neural, lo cual implica movimientos de células importantes (Nieto MA., 2002).

En el nivel celular, los factores Snail regulan la adhesión célula-célula y activan la transición epitelio-mesénquima (TEM), convirtiendo la mayoría de las células epiteliales en células mesenquimales móviles e invasivas con propiedades de célula madre (Barrallo-Gimeno A y Nieto MA., 2005 y 2009; Mani SA et al., 2008).

La familia Snail se puede subdividir en dos grupos independientes pero relacionados entre sí como muestra la (Figura 17), (Barrallo-Gimeno A y Nieto MA., 2009).

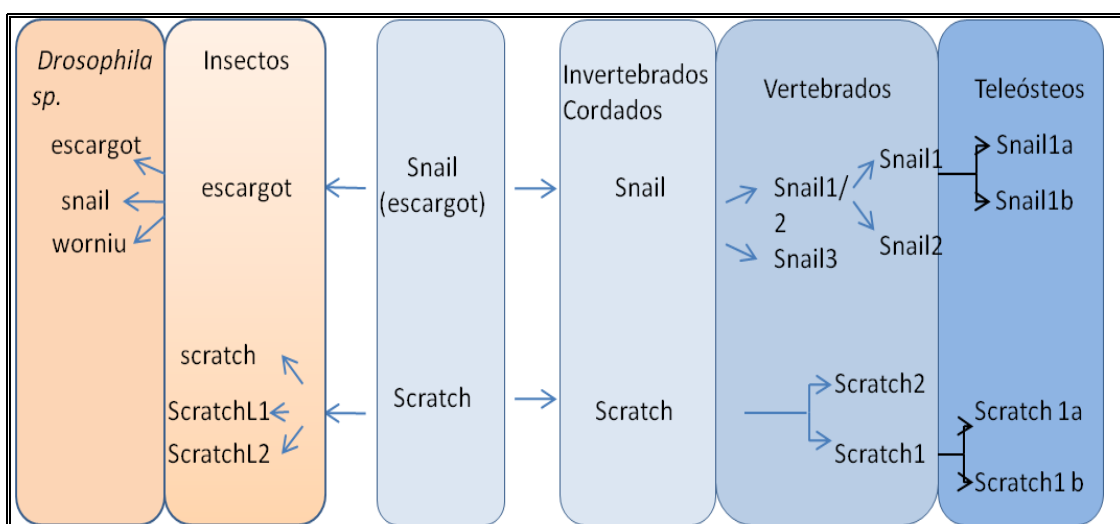


Figura 17. Supuesta Historia evolutiva de la superfamilia Snail/Scratch. El tamaño actual de la superfamilia es el resultado de diferentes eventos de duplicación en linajes diferentes. La figura muestra duplicaciones del genoma completo en el linaje de los vertebrados y duplicaciones genómicas en tandém intracrosomal en los insectos. Adaptada de Barrallo-Gimeno A y Nieto MA., 2009.

Esta división se ha llevado a cabo por las relaciones filogenéticas cuando se han comparado las secuencias de la región de los dedos de zinc de todos los miembros de la familia Snail. Los genes Scratch son un grupo más unido y los genes Snail están menos unidos y más ramificados, pudiéndose dividir en dos subfamilias Snai1 (Snail) y Snail2 (Slug). Snail3 (Smuc) ha sido el último miembro en encontrarse, (Barrallo-Gimeno A y Nieto MA., 2009).

### 1.8.2. Características estructurales

La familia Snail codifica factores de transcripción de tipo dedos de Zinc, que están compuestos por una región carboxy, que incluye grupos CH<sub>2</sub> (CCHH, CCHC, CCCH y CCCC) donde C pertenece a cisteína y H a histidina. Los dedos de Zinc unen ácidos nucleicos o bien interaccionan con proteínas. (Hemavathy K et al., 2000)

Dentro de la familia Snail el número de dedos de Zinc varía entre 4 y 6 siendo 4 el número mínimo requerido para que funcione el gen, (Figura 18). En el extremo N-terminal el dominio se denomina SNAG (Snail/Gfi-1) y funciona como un dominio represor, este dominio está conservado en todos los vertebrados y en Gfi1 que es una oncoproteína y es esencial como dominio represor y para localización nuclear (Hemavathy K et al., 2000).

El dominio SNAG contiene 20 aminoácidos, pero para que funcione como represor necesita 32 aminoácidos, esta característica se ha visto bastante conservada en los vertebrados, en hSlug el extremo N-terminal contiene 32 aminoácidos y tiene actividad como represor. (Hemavathy K et al., 2000).

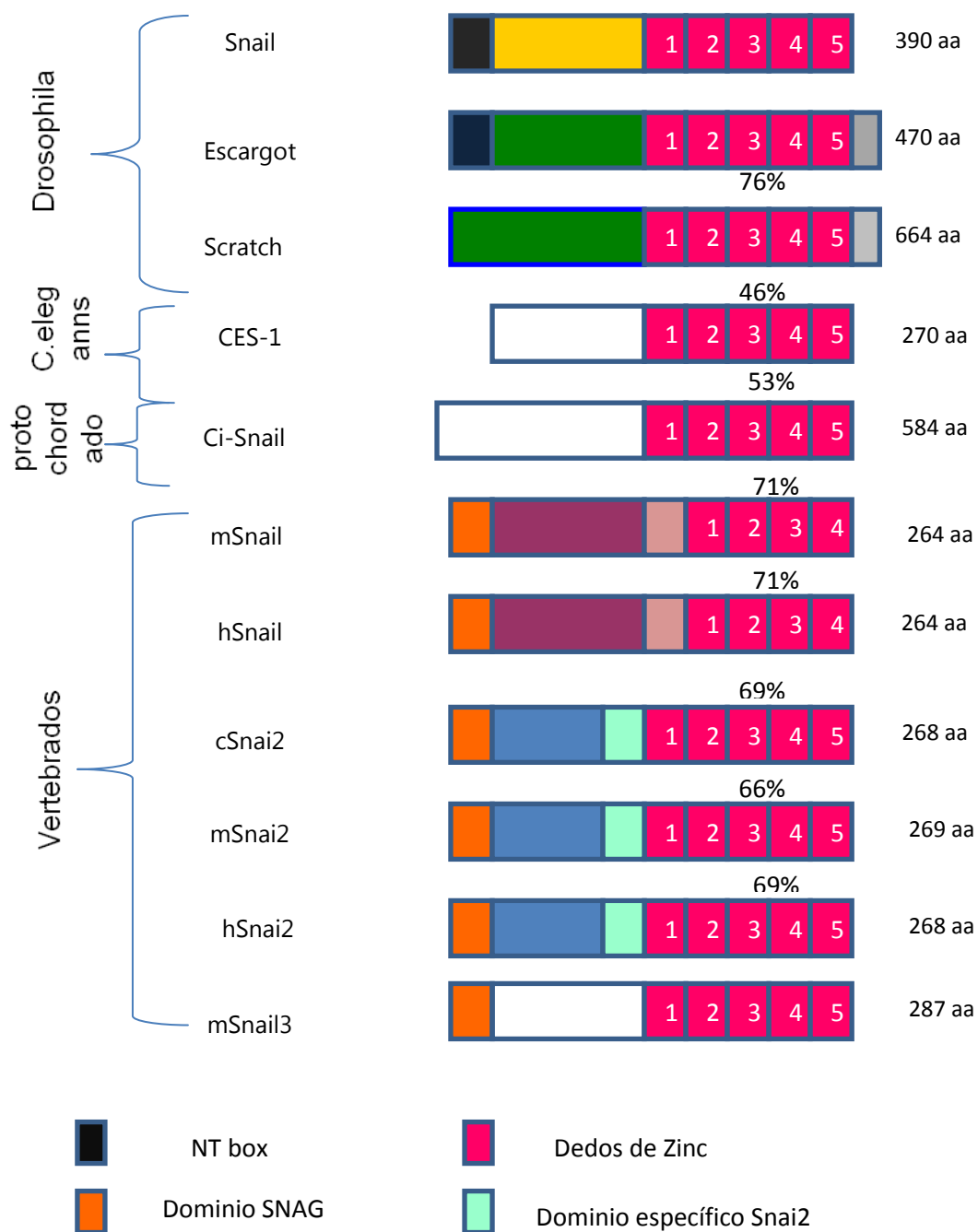


Figura 18. Comparación estructural de las proteínas de la familia Snail. Los tres primeros miembros pertenecen a *Drosophila*. CES-1 es de *C. elegans*. El miembro procordado corresponde a *Ciona Intestinalis*. Y los vertebrados corresponden a ratón, humano, pollo, los diferentes colores en los extremos N-terminal de las proteínas representan la divergencia que existe en estas proteínas.

### 1.8.3. Funciones de SNAIL2

Inicialmente Snail2 fue identificado como un factor de transcripción con un papel importante para el desarrollo como se ha comentado en el apartado 1.8.1. Estudios posteriores han demostrado que SNAIL2 está implicado en múltiples procesos patológicos (Pérez-Mancera PA et al., 2005).

Diversos estudios con ratones deficientes en *Snai2* han demostrado que estos desarrollan ciertas patologías relacionadas con despigmentación irregular, anemias macrocíticas e infertilidad (Sánchez Martín M et al., 2002). Otro papel importante, se encuentra en células madre de melanocitos y células germinales, *Snail2* está expresado en células migratorias de la cresta neural y es necesario para la migración y la supervivencia de melanoblastos, pero no para la formación de la cresta neural. Se ha visto la expresión de *Snai2* en el mesénquima craneo facial, proliferación de condrocitos en la cresta neural y de origen mesodérmico, en paredes del intestino y del estómago y en el mesénquima de pulmón y del riñón (Cobaleda C et al., 2007).

La activación del ligando *ckit* por Factor Stem Cell (SCF) induce específicamente la expresión de *Snail2*, indica una clara relación entre la activación de SCF/*ckit* y la expresión de *Snail2*. El estudio intenta demostrar si *Snail2* media algunas funciones de la vía de señalización de SCF/*ckit*, para ello utilizaron ratones *Snail2*<sup>-/-</sup>. Estos mostraron alteraciones en la pigmentación, lo cual indica que la ausencia de *Snail2* daña la migración y supervivencia de células madre pigmentadas derivadas de la cresta neural. El fallo en melanoblastos de ratones *Snail2*<sup>-/-</sup> ocurre en la frente lejos de la cresta neural, siendo congruente con el hecho de que el gen *Snail2* no se expresa en células de la cresta neural premigratorias, sino que se expresa en células migratorias de la cresta neural. (Jiang R et al., 1998; Pérez-Mancera PA et al., 2005).

Los ratones *Snail2* mostraron deficiencias en los testículos, defectos en espermatogonia y en las células de Leyding. El compartimento de las células de Leyding deriva de la cresta neural y es *ckit* positivo. El deterioro en el desarrollo de las células de Leyding observadas en *Snail2*<sup>-/-</sup> indica que *Snail2* puede ser necesario para un correcto mecanismo de acción. Este defecto del desarrollo de las células de Leyding podría afectar a la maduración de células germinales. Con esto la vía de señalización de SCF/*ckit* podría tener una función dual en los testículos, el desarrollo de células germinales, que estaba mediado por *ckit* y la activación de PI3-Kinasa, y el desarrollo de Leyding controlado por *Snail2* (Pérez-Losada J et al., 2002).

También presentan anemia macrocítica, Snail2 causa daño en el desarrollo de tres poblaciones de células madre, melanoblastos, progenitores hematopoyéticos y células germinales (Pérez-Losada J et al., 2002). Se encontraron resultados consistentes con que las células madre que contienen el receptor ckit podrían expresar Snail2 , promueven supervivencia a las células que dependen de una señal externa SCF y permitirían a las células migrar fuera de su ambiente normal.

Esta activación de ckit se ha descrito en leucemia mieloide aguda, en cáncer de pulmón microcítico, tumores ginecológicos, cáncer de mama y tumores colónicos derivados de células intersticiales de Cajal (un tipo de célula que es dependiente de SCF. Snail2 confiere supervivencia y propiedades migratorias a las células ckit positivas). El estudio presenta resultados que identifica a Snail2 como una molécula que contribuye en la vía de señalización de SCF/ckit, sugiriendo que Snail2 podría tener aplicaciones clínicas (Pérez-Losada J et al., 2002).

#### **Papel que SNAI2 podría desarrollar en humanos:**

- Enfermedad en el desarrollo de melanocitos: La deficiencia de SNAIL2 parece estar implicada en el Síndrome de Waardenburg y Piebaldismo (Sánchez Martín M et al., 2002).
- Enfermedad cardíaca: SCF/kit parece ser un marcado de célula madre cardíaca y este activa la expresión de SNAIL2 (Pérez-Losada J et al., 2002).
- Anemias Hereditarias: alteraciones en SNAIL2 parecen ser las responsables en algunos individuos de la anemia de Diamond-Blackfan (Spritz R., 1992).

#### 1.8.4. Snail2 y cáncer

SNAIL2 se ha descrito en varios tipos de cáncer, leucemias, rhabdomyosarcoma, cáncer de esófago, y mama donde está muy correlacionado con la pérdida de E-Cadherina. También se ha visto implicado en mesoteliomas malignos donde su inducción se debe a SCF, y está asociado a una resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos demostrando su papel como supresor de la apoptosis celular (Pérez-Mancera PA et al., 2005).

La expresión SNAIL2 se ha relacionado con la supresión del gen BRCA2 en tumores de mama, ovario y páncreas. Para confirmar el rol de Snail2 en tumores mesenquimales se estudió el oncogen BCR-ABL el cual induce la expresión de Snail2. En tumores mesenquimales la expresión de Snail2 está incrementada (leucemias y sarcomas). Inukai T et al., demostraron al estudiar la oncoproteína E2A-HLF (oncoproteína de células pro-B leucémicas) que Snail2 está sobre-regulado por dicha proteína. La sobreexpresión de Snail2 está reconocida como una alteración en tumores mesenquimales (Pérez-Mancera PA et al., 2005).

La capacidad leucogénica del oncogen BCR-ABLp190 depende de la presencia de Snail2, indicando que es fundamental para la biología de las células cancerígenas de BCR-ABL. En el modelo de ratón se vio que las células que poseen la proteína de fusión BCR-ABL expresaban Snail2 dando como resultado una supervivencia de las células del tumor y la migración de células a diferentes ambientes (Pérez-Mancera PA et al., 2005).

Haitra en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-9), demostró que la expresión de Snail2, se correlacionaba con la ausencia de transcritos de E cadherina, con lo cual facilitaba la migración celular.

En tejido pancreático (Hotz B et al., 2007) vieron que Snail2 estaba sobre-regulado, jugando un papel importante en tumorigénesis y en el mantenimiento de un fenotipo invasivo.

#### 1.8.5. Snail2 en cáncer de pulmón

Snail2 también se asocia con un perfil de expresión con potencial invasivo en adenocarcinoma de pulmón. Shih JY et al., realizaron un estudio con tejidos resecados de pacientes con



adenocarcinoma de pulmón, y mostraron que los pacientes con gran expresión de Snail2 tienen una recaída temprana después de la resección, con una supervivencia baja y además, la expresión de Snail2 se correlaciona positivamente con líneas celulares invasivas. Snail2 suprime E-cadherina con lo cual favorece la invasión celular.

Kuner R et al., utilizaron microarrays de tejidos para ver la expresión global de genes relacionados con la transición epitelio -mesénquima y de unión en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (adenocarcinoma y escamoso) han mostrado la expresión incrementada de Snail2 en los tumores, dotándolos de características mesenquimales y con potencial invasivo y migración.

La expresión de Snail2 también se ha visto asociada con factores de transcripción relacionados con la autorrenovación, como Oct4 y Nanog. La asociación con estos dos factores en adenocarcinoma de pulmón demostró por inmunohistoquímica que la expresión de Snail2 se encontraba en tumores de alto grado y además los tumores triple positivos Oct4/Nanog/Snail2 tenían un pronóstico peor (Chiou SH et al., 2010).

#### 1.8.6. Snail2 y CMC

SNAIL2 controla ciertos aspectos de la función de las células madre en ratones y en humanos. Estos datos dan un papel esencial a Snail2 en células madre, en concordancia con el hecho que Snail2 media la radiorresistencia biológica en ratones (Pérez-Losada J et al., 2003). Las CMC son biológicamente diferentes de otras células en el tumor, y son capaces de iniciar y mantener el crecimiento del tumor. La función de Snail2 de regular el camino del cáncer en las CMC sería diferente al resto del tumor.

Snail2 se ha relacionado con el mantenimiento del fenotipo madre (stem) en varios tipos de cáncer hematológicos, contribuye a la función del factor stem cell SCF. Catalano A et al., identificaron la vía de señalización de SCF/ckit como un componente del programa de MDR (un fenotipo maligno de mesotelioma) inducido por quimioterapia y con una gran evidencia que la señal está modulada, en parte por la actividad de SNAIL2.

En un estudio Pérez-Losada J et al., identificaron la expresión de Snail2 correlacionada con el fenotipo MDR de células Mesotelioma Maligno (MM) y se observó una resistencia a la quimioterapia. Esta resistencia a diferentes terapias por el gen Snail2 también ha sido descrita en radiorresistencia en células de la médula ósea.

La producción de SCF por células del tumor activa el receptor de tirosina quinasa ckit y entonces induce la expresión del gen *Snail2*, que media una resistencia de las células a quimioterapia (Pérez-Losada et al., 2003).

La expresión de SNAIL2 está reconocida como una alteración en cáncer humano, sugiriendo que puede ser un factor crítico en mantener el fenotipo no epitelial durante la progresión del tumor. Podría, además mantener la plasticidad celular asociada con una limitada diferenciación epitelial. Esta actividad podría resultar en un incremento de invasión local que contribuiría indirectamente a la diseminación o metástasis.

Las células que experimentan una TEM se comportan de forma similar a las células madre (Mani et al., 2008) de tejidos sanos o neoplásicos. Se ha comprobado estudiando los antígenos CD49f y CD24, que se encuentran en células madre normales (CD49f es un marcador de células madre epidérmico). Los estudios demuestran que células madre normales de origen mamario expresan marcadores asociados al proceso TEM.

Las células CD49f<sup>alto</sup>/CD24<sup>bajo</sup> reducen la expresión de E-cadherina y aumentan la expresión de vimentina, N-Cadherina y el factor de transcripción Snail2. Esta población de células madre contempla una morfología mesenquimal, y expresa marcadores asociados a células que han experimentado una TEM, por tanto, es posible pensar que si esto ocurre en células normales o sanas también se pueda asociar a los procesos malignos por los que se desarrolla el cáncer, y la diseminación tumoral. Se vieron estos marcadores de la TEM en tejido normal y neoplásico en células aisladas CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>bajo</sup> (marcadores de célula madre en tejido mamario) (Mani et al., 2008).

Storci et al., en un estudio de Carcinoma Basal de mama, un tipo de cáncer de mama agresivo, caracterizado por la ausencia de receptores de estrógenos y expresión de HER2 y presencia de citoqueratina 5 y expresión de EGFR y por una elevada-regulación de genes reguladores de células madre. En el mARM de tejidos de este tipo de tumor se observaron niveles de expresión de SNAIL2 elevados, también expresaban *CD133*, *Bmi1* (genes relacionados con células madre). La expresión de CD133 solo se detectó en tumores que expresaban HSNAIL2. Por tanto evidencian una posible relación del gen *Snail2* con marcadores de células madre en procesos malignos. El papel que tiene SNAIL2 en el fenotipo de carcinoma basal con características de célula madre corresponde con niveles de expresión de Bmi1 y de CD133.

Otra relación de Snail2 con un fenotipo celular indiferenciado, se ha encontrado en un estudio realizado por (Chen J et al., 2010), en el cual Snail2 era el responsable del incremento en la hipoxia en células MEF-7 (línea celular de cáncer ductal de mama, con potencial muy invasivo). Los resultados sugirieron que la hipoxia puede contribuir a mantener el fenotipo indiferenciado por una respuesta inducida de SNAIL2. Las células madre están sobre una base o nicho de regiones hipóxicas y se benefician de la presencia de hipoxia para su funcionalidad y supervivencia (Chen J et al., 2010).

También podemos relacionar SNAIL2 con fenotipos de célula madre porque ofrece resistencia a las células a tratamientos (quimioterapia y radioterapia) (Inukai T et al., 1999), inhibe la apoptosis por represión de p53 (Kurrey NK et al., 2009), lo cual puede proveer una ventaja selectiva a las células del tumor para invadir porque incrementa la capacidad de supervivencia, y además persisten en ambientes diferentes al tumor. Esto permite la diseminación de las células del tumor a sitios distantes por tanto diseminación tumoral o metástasis.

Snail2 se podría considerar un marcador de malignidad y una diana terapéutica de metástasis en cáncer humano.

## ***2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

Teniendo en cuenta la notable mejora en la supervivencia de pacientes con neoplasias de mama, próstata, entre otras, por avances en el diagnóstico, cirugía y quimioterapia, el ratio en la supervivencia de 5 años para cáncer de pulmón ha variado muy poco en las décadas recientes, menos del 9% en países en desarrollo y un 15% en US. Siendo el pronóstico más desolador para pacientes con CPCP, el cual es más agresivo y con rápida diseminación.

A pesar del tratamiento inicial basado en radioterapia y quimioterapia la supervivencia a 5 años de pacientes con CPNCP es inferior al 15 %. La recurrencia es común en pacientes con cáncer de pulmón y la mayoría son refractarios a los tratamientos recibidos bien en, neoadyuvancia o adyuvancia como en primera línea para pacientes metastásicos. Un acercamiento para mejorar el resultado en cáncer de pulmón es la búsqueda de una población de células única con un fenotipo definido denominadas células madre del cáncer, además estudios recientes han revelado que existe un vínculo directo entre el programa de TEM y el aumento de las propiedades de célula madre epiteliales. La TEM es suficiente para inducir una población con características de célula madre a partir de células epiteliales bien diferenciadas y las células cancerosas. Estas células, y los marcadores que expresan, son una fuente de recurrencia del tumor, por lo que serían una diana para distintas terapias y así controlar o erradicar la enfermedad residual.

## OBJETIVOS

Identificar la diseminación del cáncer mediante el estudio de la expresión de SNAIL2 en sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón.

Encontrar un fenotipo que caracterice la TEM y su relación con las CMCs en el tumor primario de cáncer de pulmón.

- Relación entre la expresión de los anticuerpos E-CADHERINA, VIMENTINA, NOTCH1 y SNAIL2 en el tejido tumoral de cáncer de pulmón.
- Encontrar la relación del gen *Snail2* estudiado en sangre periférica con los anticuerpos estudiados en el tejido tumoral primario de pacientes con cáncer de pulmón.

Analizar la expresión de los marcadores NOTCH1 y SNAIL2 como biomarcadores de factor pronóstico en cáncer de pulmón.

### ***3. MATERIAL Y MÉTODOS***

### 3.1. MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Se han obtenido 169 muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón y 100 muestras de voluntarios sanos (6ml de sangre periférica) durante un periodo de 4 años (2004-2008) en Hospital de Día, Servicio de Oncología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Los criterios de inclusión elegidos para la recogida de muestras son. Pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón confirmado por el servicio de Anatomía Patológica; edad superior a 18 años; Estado ECOG 0 ó 1; Consentimiento informado firmado. Y los criterios de exclusión: Infección por VIH conocida; mujeres embarazadas o lactantes; pacientes con otra neoplasia diferente de cáncer de pulmón.

La obtención de las muestras se ha llevado a cabo previo Consentimiento Informado, siguiendo las regulaciones legales para Estudios Clínicos y de investigación en España y las del comité de ética del Hospital Universitario de Salamanca.

#### 3.1.1 Extracción de ARN

De todas las muestras de sangre periférica se ha extraído el ARN mediante el uso del kit QIAamp® (QUIAGENE). Seguimos el protocolo del fabricante, como muestra la (Figura 19). El ARN obtenido se guarda a -70°C.

#### 3.1.2 Eliminación del ADN contaminante mediante tratamiento de las muestras con Dnasal.

La preparación de ARN libre de ADN es un paso crítico antes de realizar un ensayo de RT-PCR. Evita que se amplifiquen moléculas parecidas a los amplicones esperados.

- Manipulamos en hielo, en eppendorfs de 1.5 ml.
- añadimos 25 µl de ARN+1 µl Dnasal y se incuba a 37 °C durante 15 minutos.
- A continuación lo añadimos a un eppendorf que contiene una mezcla de Fenol (sigma)/Cloroformo (Panreac) 50/ 50 y lo centrifugamos durante 10 minutos a 13,5 rpm.
- Nos quedamos con el sobrenadante, que lo pasamos a otro eppendorf que contiene 1 ml de una mezcla formada por EtOH 100 % (Panreac)/AcNa (Merck) 80/20 (conservado a -20°C) y lo guardamos a -20°C durante 12 horas.

- Posteriormente centrifugamos en centrífuga de 4°C y eliminamos el sobrenadante y nos quedamos con el sedimento.
- Lo lavamos con etanol al 80 % (conservado a -20°C) y centrifugamos en centrífuga de 4°C durante 10 minutos a máxima revolución.
- Eliminamos el sobrenadante y dejamos secar el sedimento en hielo durante 5 minutos y, por último, resuspendemos en 25 µl de MPW (millipore water). Se guardan a -20°C.

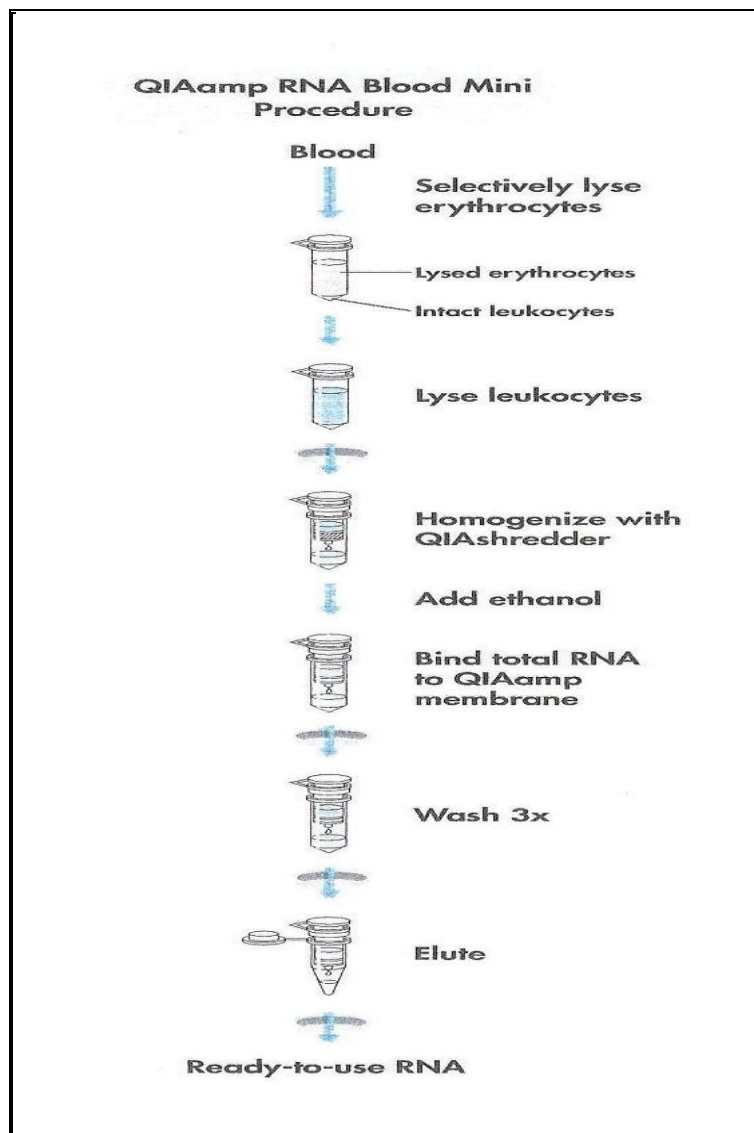


Figura 19. Esquema del protocolo de extracción de ARN de sangre periférica del kit QIAamp® de QIAGEN.



### 3.1.3. Obtención de ADNc a partir del ARN tratado con Dnasal

Manipulamos en hielo:

- Partiendo de 5  $\mu$ l del ARN tratado con Dnasal, añadimos 1  $\mu$ l de RNasin (Promega)+7  $\mu$ l de MPW lo incubamos durante 5 minutos a 65  $^{\circ}$ C (para desnaturalizar el ARN)
- A continuación (seguimos manipulando en hielo) preparamos un mix:

Componente	$\mu$ l/reacción
Buffer 5X	4 $\mu$ l
RNasin (Promega <sup>®</sup> )	1 $\mu$ l
Oligo dT (Promega <sup>®</sup> )	1 $\mu$ l
RT superscript <sup>™</sup>	0.5 $\mu$ l

Buffer 5X (DDT 10mM+dNTPs; 20 mM+TRIS-HCl; 250mM, pH: 8, 3+KCl 1 mM+ MgCl 1 mM).

- Añadimos 6.5  $\mu$ l del mix al ARN desnaturalizado y se incuba durante 1 hora a 42  $^{\circ}$ C. Posteriormente añadimos MPW hasta un volumen final de 50  $\mu$ l, y se guarda a -20  $^{\circ}$ C.

#### Integridad del ADNc

Se ha comprobado la integridad de ADNc mediante la amplificación de la actina .con los oligos apropiados. La  $\beta$ actina (nombre del gen ACTB) es una de las seis isoformas diferentes de actina que se han identificado en humanos. Es una de las dos actinas citoesqueléticas no musculares. Las actinas son proteínas muy conservadas, que están involucradas en la motilidad celular, estructura e integridad. La  $\beta$ actina se utiliza generalmente como control de la integridad celular, degradación de proteínas, control de carga.

Las secuencias de los primers utilizados para comprobarlo son las siguientes:

Primer F      5'CGGAACCGCTCATTGCC3'

Primer R      5'ACCCACACTGTGCCCATCTA3'

### 3.1.4. Técnica de PCR

Por su siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa). es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias definidas de ADN. La PCR consta de tres etapas: la primera se realiza a una temperatura de 95°C se trata de la desnaturalización, las cadenas dobles de ADN se abren o desnaturalizan: la segunda etapa se lleva a cabo entre temperaturas de 40-60°C se denomina de alineamiento, se forman y se destruyen constantemente puentes de hidrógeno entre los oligonucleótidos y el ADN y aquellas uniones más estables (las que son complementarias) durarán más tiempo, quedando los oligonucleótidos alineados formando una pequeña región de doble cadena. La polimerasa se une a este pequeño fragmento de ADN de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5'-3', al agregar unas bases más, los puentes de hidrógeno que se forman entre las bases estabilizan más la unión y el oligonucleótido permanece en ese sitio para el siguiente paso. Después la temperatura sube a 72°C paso que se conoce como extensión, ya que a 72 °C la polimerasa alcanza su máxima actividad y continúa la síntesis de ADN a partir de los oligonucleótidos que ya se habían alineado.

En nuestro caso hemos utilizado la técnica de la RT-PCR, que es una variante de PCR anteriormente descrita. Es muy utilizada en el laboratorio en biología molecular para generar una gran cantidad de copias de ADN, proceso llamado de amplificación. En el RT-PCR sin embargo, una hebra de ARN es retrotranscrita en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada Transcriptasa reversa, y el resultado es se amplifica por un PCR tradicional. El objetivo es tener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo.

Para la realización de PCR, limpiamos la superficie de trabajo y los materiales que vamos a utilizar (pipetas Gilson; gradilla; puntas Art Tips de 200µl, 20µl y 10µl; centrífuga para que el ambiente sea lo más aséptico posible para evitar contaminaciones.

- Descongelamos el ADNc, y lo dejamos en hielo
- Preparamos un Mix como se describe para un volumen final de reacción de 50µl.

Componente	μl/reacción
Buffer 5 X	5 μl
dNTPs 2mM	5 μl
MgCl 15mM	5 μl
Primer A	2.5 μl
Primer B	2.5 μl
Taq Polimerasa (Promega®)	0.5 μl
ADNc	10 μl
MPW	19.5 μl

Llevamos la solución anterior a un termociclador (Stratagene), que hemos precalentado con anterioridad.

Las condiciones de temperatura y ciclos utilizadas para la amplificación de SNAIL2 y de la βactina son las descritas a continuación:

95°C 5 minutos

---

95°C 1 minuto desnaturalización

55°C 1 minuto alineación

 35 ciclos

72°C 2 minutos extensión

---

72 °C 10 minutos

4°C mantenimiento

### 3.1.5. Electroforesis del ADNc en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN resultantes de la PCR son separados por su tamaño molecular mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1% con tampón TBE 1X (Tris base; Ácido bórico; EDTA 0.5 M, pH: 8) y bromuro de etidio (que actúa intercalándose en las bases

nitrogenadas del ADN y emite fluorescencia al exponerle a la luz UV). A las muestras de DNA se le añaden 4 $\mu$ l de tampón de carga 5X (50% glicerol; 200Mm EDTA pH: 8; 0.1 % azul de bromofenol). Como marcador de tamaño se utilizó una mezcla de DNA fago  $\lambda$  cortado con la endonucleasa Hind III (GIBCO/BRL), y de fago  $\phi\chi$ -174 cortado con la endonucleasa Hae III (GIBCO/BRL), que generan 19 fragmentos de DNA de longitud conocida, y que se cargan en el primer pocillo de cada gel. Para monitorizar la migración del ADN en el gel utilizamos dos colorantes que se incluyen en el tampón de carga: el xileno cianol, que en un gel de agarosa al 1 % migra aproximadamente con los fragmentos de 5Kb, y el azul de bromofenol, que migra con los fragmentos de 0.5 Kb. Después de cargar las muestras en el gel. La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial de 55 voltios durante 1 hora.

Tras la electroforesis, el ADN se visualizó en una lámpara de luz UV de longitud de onda comprendida entre 250-310 nm. Para tener referencia de los tamaños que se buscan tras la hibridación, se fotografió el gel con una cámara Polaroid MP-40.

### 3.1.6. Transferencia del ADN a membranas de nylon

Los fragmentos de ADN separados mediante electroforesis se transfirieron a membranas de nylon (Hybon-N, Amersham Pharmacia, Madrid, España). Previamente a la transferencia, los fragmentos de ADN se desnaturalizaron para obtener cadenas de ADN monocatenarias y así poder luego detectar la presencia del gen *SLUG* por hibridación con sonda específica frente al ADN de *SLUG*. Para ello, se sumergió el gel en una solución alcalina desnaturalizante (1.5 M NaCl; 0.5 M NaOH) a temperatura ambiente durante 20 minutos en agitación continua con el fin de romper los enlaces de hidrógeno que unen las dos cadenas y obtener fragmentos de ADN monocatenario. Seguidamente, el gel se sumergió en una solución neutralizante (1.5 M NaCl; 1M TRIS-HCL pH: 8) durante 20 minutos a temperatura ambiente en agitación continua. A continuación, se transfirió el ADN a la membrana de nylon utilizando como tampón de transferencia 20X SSC (6 M NaCl; 0.6 M citrato dibásico pH: 7). La transferencia se hizo durante 12 horas y, por último, la membrana se trató con una fuente de luz ultravioleta de 312 nm durante 20 segundos (UV Stratalinker 2400, Stratagene) con el fin de conseguir la unión covalente del ADN a la misma.

### 3.1.7. Hibridación con sondas de ADN frente a SNAIL2 marcada con $\alpha^{32}\text{P}$

La hibridación del ADN unido a la membrana se realizó en tres etapas:

- A-etapa de prehibridación. Se trata de bloquear la hibridación no específica del ADN a la membrana. Así, se incubó la membrana durante 2 horas a 65°C en agitación constante en 30 ml de solución de prehibridación 3X SSC (0.9 M NaCl; 0.09 M citrato sódico dibásico pH 7); 0.1 SDS 1X solución de Denhardt's (0.2 mg/ml polivinilpirrolidona (sigma); 0.2 mg/ml albúmina de suero bovino (sigma); 0.2 mg/ml Ficoll 400 (Amersham Pharmacia Biotech); 5 % sulfato de dextrano y 10 mg/ml de ADN heterólogo sonificado y desnaturalizado (Sigma).
- B-etapa de hibridación: la finalidad es que la sonda de ADN marcado y desnaturalizado, se una a la secuencia homóloga del ADN problema. Para ello se añadió a la misma mezcla utilizada en prehibridación una sonda de ADN, correspondiente al ADNc de SNAIL 2 (idéntico en más de un 90% l de Snail2, marcada radioactivamente mediante el método de *random primer* o cebado aleatorio. La reacción de marcaje radiactivo se llevó a cabo empleando el sistema "*Oligolabelling Kit*" (Amersham Pharmacia Biotech). Se marcaron 50 ng de ADN resuspendidos en 46  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada con 5  $\mu\text{l}$  de ( $\alpha^{32}\text{P}$ ) deCTP (3000Ci/mol). La reacción se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Una vez marcada, la sonda se purificó mediante centrifugación a temperatura ambiente durante 5 minutos a 1500 g. a través de columnas de Sephadex G-50, de tal manera que en la columna quedan retenidos los nucleótidos y hexanucleótidos libres, recuperándose la sonda marcada radioactivamente en la solución eluida. La eficiencia de la reacción, así como la cantidad de sonda marcada radioactivamente, se determinó en un contador de radiación  $\beta$  (Quick Count 2000, Bioscan). La hibridación se realizó durante 16 horas a 65 °C con  $10^6$  cpm/ml de la sonda marcada, previamente desnaturalizada durante 5 minutos a 100 °C.
- C-Lavado de membrana: el objeto de esta etapa es quitar la sonda que se haya pegado inespecíficamente a la membrana. Así, una vez hibridada, la membrana se sometió a dos lavados de 30 minutos a 65 °C en una solución que contiene SDS y SSC. Por tratarse de una sonda de alta homología, los lavados se realizaron en condiciones altamente restrictivas [1X SSC (0.3 M NaCl; 30mM citrato sódico dibásico pH: 7); 0.1 % SDS].

- Tras el lavado, las membranas se expusieron sobre películas de autorradiografía (Kodak-X-Omat-AR9 utilizando un intensificador de la señal Reflection™ Intensifying Screen; Dupont). La exposición se realizó durante 12 horas a -70°C.

## 3.2. MUESTRAS DE TEJIDOS

El estudio inmunohistoquímico se ha realizado con material de las broncoscopias, y en algún caso con tejido de resección quirúrgica del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca. En ningún caso los pacientes habían recibido tratamiento antineoplásico. Todas las muestras se procesaron con las técnicas convencionales utilizadas en el servicio de Anatomía Patológica para su diagnóstico.

Las muestras se incluyeron en un autotecnicon para deshidratar e impregnar en parafina, con posteriorformación de los bloques.

Los cortes de los bloques de parafina se realizan en un micrótopo de rotación con una sección de 4µm que manipulamos con un pincel para llevarla a un baño de 37 °C (Aprovechando la hidrofobia de la parafina, las secciones se colocan sobre agua calentada entre 35 °C y 40 °C y el calor las hace extenderse sin llegar a su punto de fusión) para que se estire, y de esta manera el tejido queda perfectamente extendido. A continuación, las secciones de parafina se recogen del baño de 37° C en un portaobjetos, y se dejan secar en estufa durante 24 horas para limpiar la parafina, y posteriormente se realizan las tinciones.

### 3.2.1. Técnica de Hematoxilina Eosina

La técnica de Hematoxilina-eosina, (Figura 20) también llamada técnica convencional, utiliza como fundamento la afinidad de las moléculas ácidas y básicas para atraer a su opuesto. Así, una molécula ácida tendrá afinidad por una molécula básica, y viceversa, una simple reacción química. En esta técnica el colorante básico es la hematoxilina, mientras que el ácido es la eosina.

La hematoxilina es de color azul violáceo, y tenderá a unirse a moléculas ácidas como el núcleo (rico en ADN), ribosomas y polirribosomas (ricos en ARN) y el retículo endoplasmático rugoso (rico en ribosomas) y la eosina es de color rojo pálido o rosado, y tiende a unirse a moléculas

básicas como las mitocondrias por estar cargadas de enzimas (proteínas), las proteínas extracelulares (como el colágeno del tejido conectivo) y proteínas intracelulares (como las actinas y la miosina del tejido muscular).

Cortamos los bloques de parafina a  $4\mu\text{m}$  en un micrótopo (comentado anteriormente) y los desparafinamos en una estufa a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas, y a continuación los dejamos en xilol durante 20 minutos. Posteriormente se hidratan en alcoholes: alcohol absoluto durante 5 minutos; alcohol de  $96^{\circ}$  durante 5 minutos; alcohol de  $70^{\circ}$  durante 5 minutos, se introducen en hematoxilina durante 6 minutos, se lavan con agua destilada y se pasa por eosina alcohólica durante 1 minuto y por último se deshidratan en alcoholes de  $70^{\circ}$  durante 5 minutos; alcohol de  $96^{\circ}$  durante 5 minutos; alcohol absoluto durante 5 minutos; xilol durante 5 minutos y a continuación se montan en un montador automático.

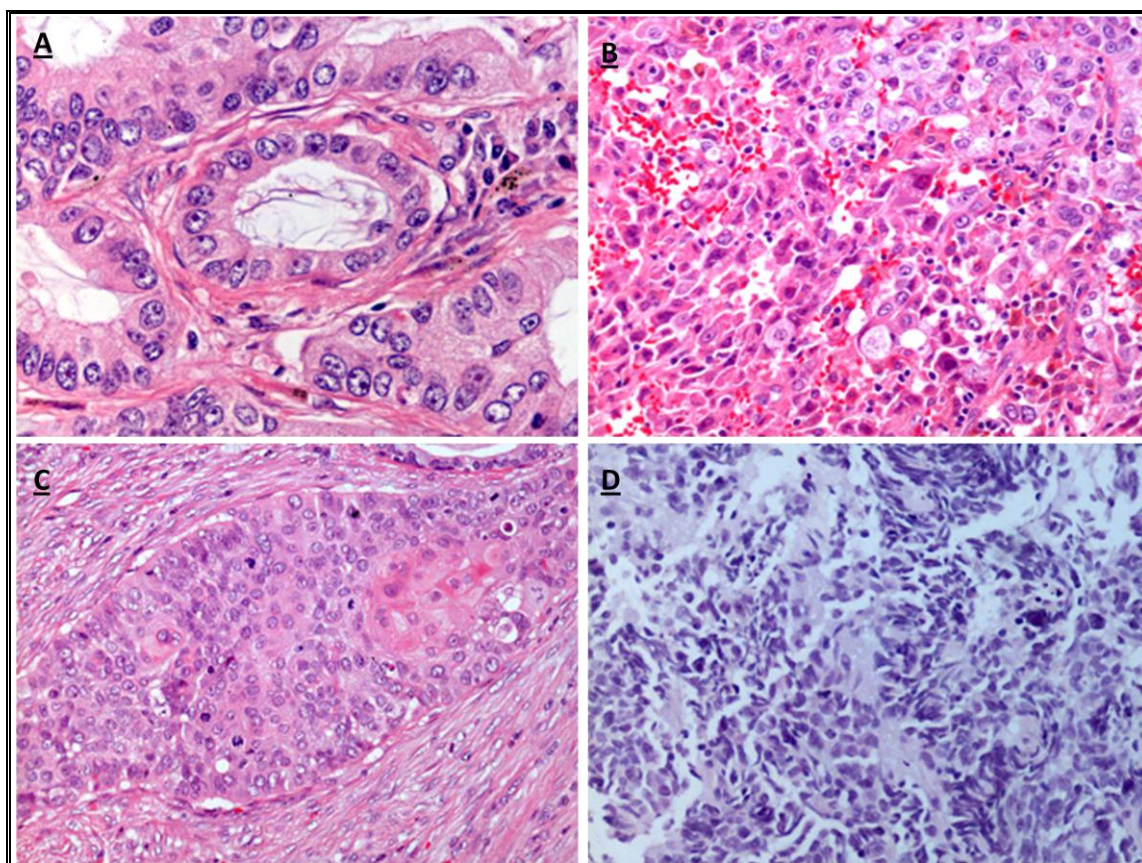


Figura 20. H-E de los diferentes tipos histológicos de tumor del estudio. A muestra un Adenocarcinoma; B muestra un Carcinoma de Célula grande; C muestra un Carcinoma Epidermoide; y D muestra un Carcinoma Microcítico, las imágenes están realizadas con objetivo de 20x.



### 3.2.2. Inmunohistoquímica

Corresponde a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta reacción es visible solo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración.

En las técnicas de inmunoperoxidasa se utilizan como marcadores enzimas capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro. Por ejemplo, las enzimas más frecuentemente utilizadas son peroxidasa y fosfatasa alcalina y los sustratos diaminobenzidina (color pardo), aminoetilcarbazol (color rojo), y nitroazul de tetrazolio (color azul). Estos marcadores pueden unirse (conjugarse) directamente al anticuerpo primario o bien indirectamente mediante otros anticuerpos (secundarios) o sustancias como biotina o proteína A.

La inmunohistoquímica tiene utilidad diagnóstica en identificación de diferenciación y de marcadores pronóstico de neoplasias (marcadores tumorales). Es posible la identificación de productos de oncogenes con anticuerpos monoclonales.

En todas las muestras de tejido tumoral realizamos técnicas de inmunohistoquímica para estudiar la expresión protéica de las moléculas objeto de estudio: E-cadherina, Vimentina, Notch1 y Snail2. La inmunohistoquímica se realiza en un procesador automático en el cual se efectúa el desparafinado y la tinción deseada (Menarini/Leyca).

Para este estudio la técnica de inmunohistoquímica se realizó en un autoteñidor Vision Dycor System con un bond polímero para detectar todos los anticuerpos, siguiendo el siguiente esquema:

- 1º bloqueo de peroxidasa 5 minutos (peróxido de hidrógeno 30 %), lavado con TBS.
- 2º Incubación con el anticuerpo 1º (E-cadherina, Vimentina, Notch1 o Snail2) durante el tiempo y dilución adaptadas para cada uno en el laboratorio de Anatomía Patológica y siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, ver tabla 4), a continuación se lava y se pone el anticuerpo postprimario (es un potenciador del polímero que contiene suero animal al 10 %), se incuba durante 8 minutos, a continuación se lava.
- 3º se añade el polímero (es un anticuerpo de ratón o de conejo que lleva peroxidasa de rábano picante) y se incuba durante 8 minutos, a continuación se lava.



- 4º se añade la DAB (diaminobenzidina), se deja actuar durante 10 minutos y se lava. Se contrasta con hematoxilina.
- Posteriormente, se deshidratan en alcoholes: Alcohol de 70º durante 4 minutos, alcohol de 96º durante 4 minutos; alcohol absoluto durante 4 minutos y finalmente en xilol durante 4 minutos y a continuación se montan en un montador automático.

El proceso descrito anteriormente es el indicado por el fabricante del procesador, por tanto, es el mismo para todos los anticuerpos estudiados. Lo que varía es el tiempo de incubación del anticuerpo primario, y la dilución (paso 2º), que son diferentes para cada anticuerpo. La tabla 5 muestra las características de cada uno de los anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Clon	Dilución	Tiempo de incubación
<b>E-cadherina</b>	Master Diagnostica	MAD-020050Q	#36B5	1:20	15 min
<b>Vimentina</b>	Master Diagnostica	MAD-151040Q	#V9	1:400	15min
<b>Notch 1</b>	Cell Signaling	D1E11	Rabbit mAb #3608	1:300	30min
<b>Snail2 (Slug)</b>	Cell Signaling	C19G7	Rabbit mAb #9585	1:100	45 min

Tabla 4. Detalle de la casa comercial, la referencia, el clon, la dilución utilizada en el estudio y el tiempo de incubación de cada una de los anticuerpos del presente estudio.

Una vez terminado el proceso de tinción y de montaje, las preparaciones del tejido tumoral incubado con los anticuerpos objeto de estudio se analizaron con la patóloga experta en cáncer de pulmón del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca. El microscopio utilizado fue de la marca ZEISS con cámara Nikon incorporada.

Realizamos el estudio semicuantitativo de la expresión de las distintas moléculas objeto del estudio. Siguiendo criterios previamente establecidos (López-Malpartida et al., 2009), cuantificamos el porcentaje de células positivas para el anticuerpo utilizado y la intensidad de la tinción, teniendo en cuenta la localización celular (membrana, citoplasma, núcleo) y las

características de la expresión del anticuerpo estudiado. De todo ello se obtuvo un porcentaje de expresión utilizado en el estudio estadístico.

La E-cadherina es una molécula de adhesión celular que se expresa normalmente en la membrana de las células epiteliales. Su pérdida de la membrana de las células se asocia a la pérdida de “inhibición de contacto” de las células. Para su cuantificación hemos valorado el porcentaje de células tumorales que lo expresaban en la membrana celular y el porcentaje del contorno de la membrana celular.

Siguiendo criterios previamente establecidos hemos tomado como punto de corte en 60 % de expresión celular, consideramos positiva una expresión mayor del 60 % de las células y negativo (o pérdida de expresión) cuando la expresión es menor del 60 % celular (Figura 21). Por otro lado, la expresión de Vimentina normalmente se ve en el citoplasma de las células de estirpe mesenquimales. En el presente estudio, se ha considerado positiva cuando la expresaban las células tumorales epiteliales, que normalmente al ser de estirpe epitelial no deberían expresarlo. La expresión de Notch1 se observa en la membrana epitelial y la expresión de Snail2 se visualiza en los núcleos de las células epiteliales del tumor (Figura 22).

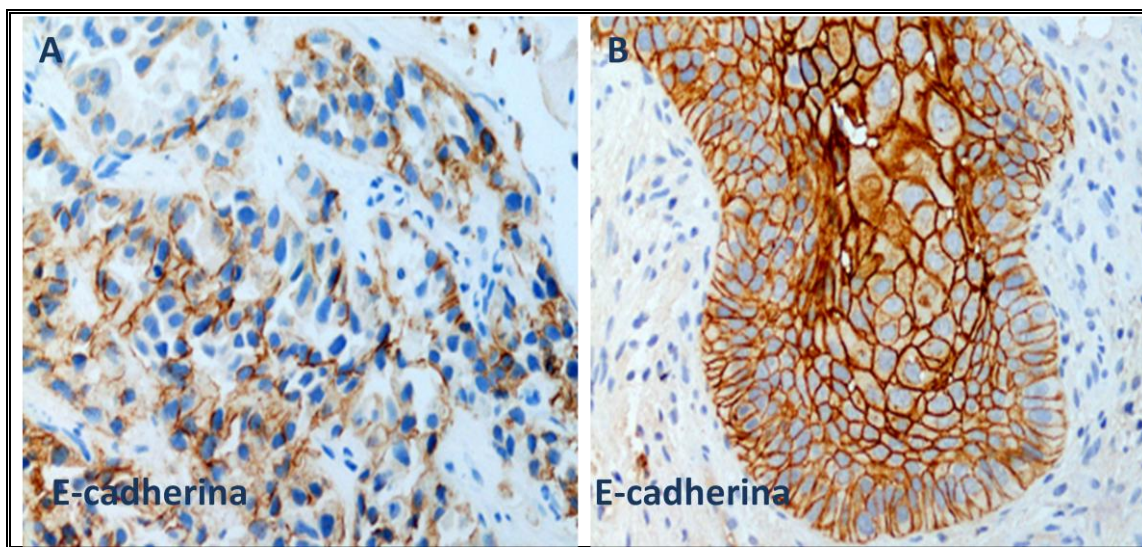


Figura 21. Inmunohistoquímica de E-cadherina. La imagen A representa la expresión de E-cadherina en menos del 60 % de las células (negativo), y la imagen B representa la expresión de E-cadherina en más del 60 % de las células (positivo). Nótese la expresión membrana. Imágenes tomadas con objetivo de 20x.

Para los anticuerpos o marcadores Vimentina, Notch1 y Snail2 nuestro criterio ha sido negativo para la no expresión de los marcadores o expresión mínima (<5%) y positivo para la expresión



de los marcadores por encima del 5% de las células. Se ha tomado de esta manera porque no hemos encontrado una expresión intermedia. Snail2 se expresa en muy pocas células (Figura 22).

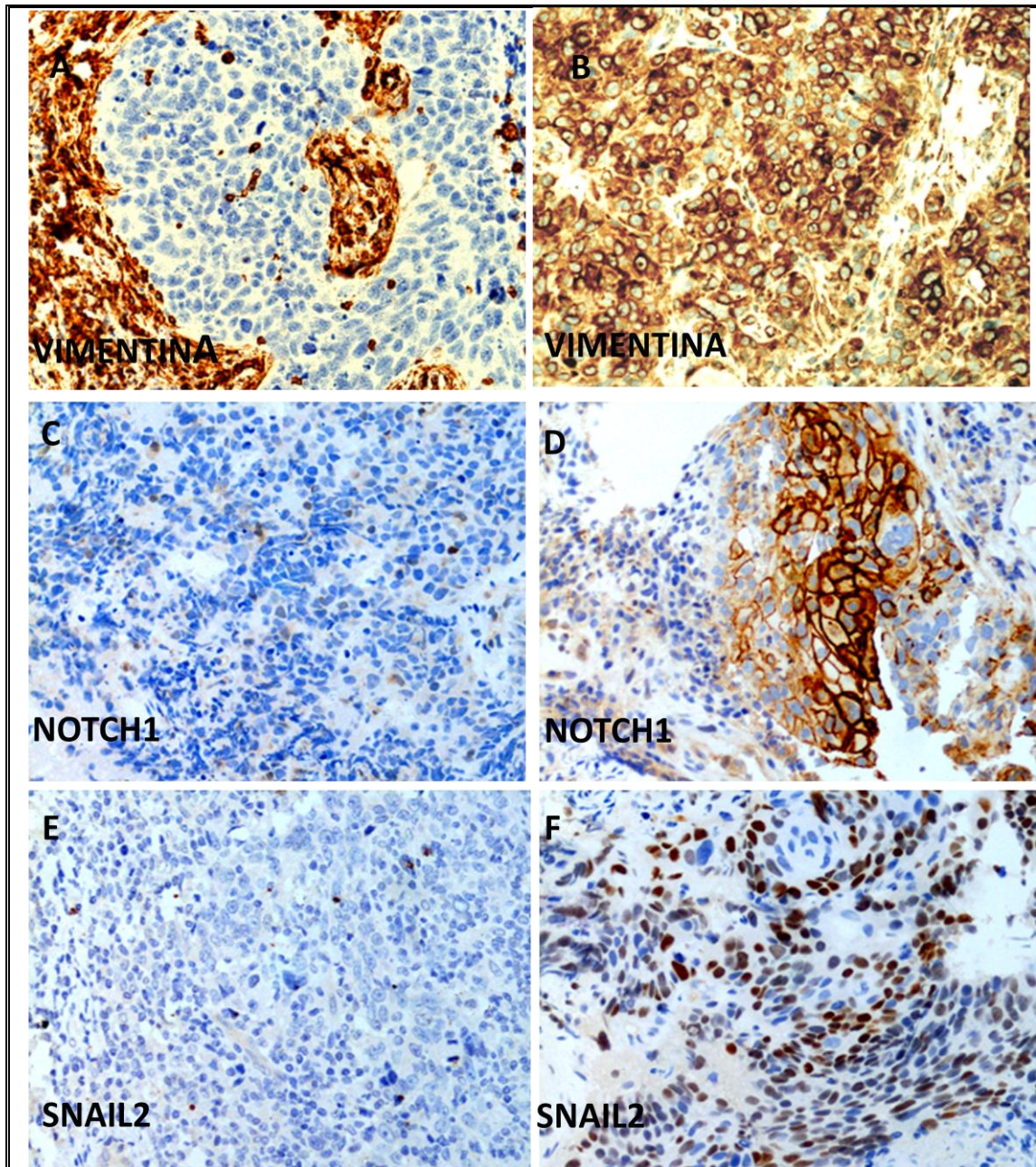


Figura 22. Inmunohistoquímica de los marcadores Vimentina-(A-B); Notch1-(C-D) y Snail2-(E-F). En la parte izquierda aparece la expresión negativa de los marcadores en las células tumorales, y en la parte derecha la expresión positiva de los marcadores en las células tumorales. Como se aprecia la expresión de Vimentina aparece en el citoplasma del tejido tumoral, la expresión de Notch1 aparece en la membrana celular, y la expresión de Snail2 aparece en el núcleo. Imágenes tomadas con objetivo de 20x.

### 3.3. ESTADÍSTICA

Se ha utilizado el programa estadístico Minitab para el estudio de la expresión del gen *Snail2* en sangre periférica y el programa SPSS Statistic versión 17 para el estudio de la expresión proteica de los anticuerpos E-cadherina, Vimentina, Notch1 y Snail2 en tejido tumoral.

- Tablas de frecuencia y porcentajes para la descripción univariada de las variables categóricas. Utilizamos la estadística descriptiva para establecer un primer contacto con los datos de una variable.
- Análisis exploratorio univariado (diagrama de caja, histograma y test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov) para la variable numérica (edad), descriptiva con las estadísticas habituales.
- Estudio de la expresión del gen Snail2 en sangre periférica:
  - La estadística inferencial la hemos utilizado con la variable gen *SNAIL2* en sangre periférica por tratarse de una variable dicotómica cualitativa (aunque reformulada a cuantitativa), que hace referencia a la expresión o no del gen en pacientes con cáncer de pulmón. Esta variable se va a tratar como muestras independientes con la finalidad de relación existente entre esta variable y el resto de las variables estudiadas. Mediante la prueba ANOVA conoceremos si existe relación entre las variables. Con la prueba ANOVA vamos a saber si existe diferencia entre las medias de la existencia o no del gen *SNAIL2* y las diferentes variables, Anatomía patológica y TNM.
  - Por otro lado realizamos una prueba no paramétrica de Chi cuadrado para conocer la relación existente entre el gen *SNAIL2* y las diferentes variables. Anatomía patológica con todas las subclases y dividida en las dos categorías principales (CPCNP y CPCP), el Estadio, metástasis (M), tamaño del tumor (T) y número de ganglios (N), fumador y sexo.
- Estudio estadístico de la expresión proteica de los anticuerpos objeto de esta tesis: Al tratarse de variables categóricas el procedimiento utilizado para correlacionarlas es la prueba de Chi-cuadrado de independencia. Esta prueba genera una tabla de descriptivos con una variable en filas y otra en columnas (en este caso la colocación es arbitraria, al ser todas variables dependientes VD) donde aparece el número de casos (frecuencia) de cada combinación de categorías de ambas variables, los porcentajes (%) sobre el total de la fila y columna, y un importante valor llamado “residuo corregido” (RC). Cuando el valor del RC  $\geq 2$  indica las categorías que se asocian, en el caso de existir correlación significativa. Cuando

el RC está comprendido entre 1,5 y 1,9 indican una tendencia que se puede convertir en significativa si la muestra tuviese un tamaño mayor.

- Prueba de T-student para la significación de la diferencia entre medias de las variables numéricas. Test Chi-cuadrado de independencia para el estudio bivariado de la asociación de variables categóricas.
- Análisis de supervivencia. Se utilizó para calcular el tiempo de supervivencia (TS) desde la fecha de diagnóstico confirmada por Anatomía Patológica, hasta la fecha de óbito (para los fallecidos) o la fecha de cierre (30/4/2009) en los vivos. Se empleó la técnica de Kaplan-Meier para comparar la supervivencia en las variables Anatomía patológica, Estadio y Conglomerados.

Para la parte multivariada:

- Análisis factorial: es una técnica de reducción de datos con la menor pérdida de información que sea posible (el requisito es que se conserve al menos el 50% de la información inicial). El análisis factorial se basa en la existencia de muchas intercorrelaciones ( $r > 0,300$ ) y significativas ( $p < 0,050$ ) entre las variables empíricas medidas en la muestra.

Las variables se agrupan en factores (componentes) en función de dichas correlaciones, que se obtienen de las siguientes pruebas estadísticas:

- Matriz de correlaciones: tabla de doble entrada que contiene las correlaciones de cada variable con todas las demás.
- La prueba de adecuación muestral de Kaiser-Meier-Olkin. Es un valor descriptivo (en una escala de 0 a 1) se precisa un KMO  $> 0,500$  y cuanto más próximo a 1, mejor adecuación muestral.
- Comprobación de la existencia de inter-correlaciones en la matriz: un índice descriptivo es el Determinante de la matriz,  $D \approx 0$ , una prueba inferencial llamada test de esfericidad de Bartlett, cuya hipótesis nula es que la matriz de correlaciones es una matriz identidad (unidad), luego se precisa  $p > 0,050$ .
- Regresión logística para la búsqueda de modelos predictivos de variables categóricas. Se pretende establecer un modelo predictivo que sea capaz de pronosticar la expresión en positivo de variables categóricas por separado, en esta tesis lo hacemos para Notch1 y para Snail2 (T), desde los predictores Anatomía patológica, Snail2 (sp), vimentina, E-cadherina, estadio, sexo, fumador. Como resultado añadido se conocerán los valores de las Odds Ratio correspondientes a cada predictor significativo. Se emplea el método de introducción de variables predictoras por pasos sucesivos hacia delante de Wald.

- Análisis Cluster para tratar de clasificar a los casos en función de su similitud en las variables. El análisis de conglomerados o clusters es el nombre genérico de una enorme variedad de métodos destinados a encontrar similitudes entre variables y/o casos. Estos métodos proporcionan clasificaciones a partir de datos inicialmente no clasificadas tratando de encontrar grupos en los datos.
- Regresión de Cox para el análisis multivariado del TS.

## ***4. RESULTADOS***

#### 4.1 EXPRESIÓN DEL GEN SNAIL2 EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN

La muestra se compone de 169 pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón, la edad media es de 64, 3 años; 152 pacientes son de sexo masculino, mientras que solo 17 de ellos corresponden con sexo femenino. En cuanto al hábito tabáquico, 72 siguen fumando, 79 son ex fumadores (hemos tomado como referencia 5 años sin fumar en el momento de obtención de la muestra) y 14 son no fumadores. Por Anatomía patológica 149 pacientes se corresponden con CPCNP y 20 con CPCP. De los pacientes con CPCNP, 70 pertenecen a la subclase de Epidermoide, 40 pacientes con Adenocarcinoma, 11 son de Célula grande, y 25 a otros. El sistema de clasificación del TNM se basa en el American Joint Committee on Cancer (AJCC ) del año 2002.

A continuación describimos las variables, edad, sexo, estadio, T (tamaño), N (nº de ganglios), M (metástasis al diagnóstico), y fumador en la tabla 5 donde aparece: n (frecuencia o número de casos) y el % (porcentaje) para una muestra de 169 casos.



	n	%
<b>Edad</b>	169	64,25 media
<b>Sexo</b>		
Hombre	152	89,9
mujer	17	10,1
<b>Estadio</b>		
IA/IB	17	10,1
IIB/IIIA	28	16,6
IIIB/L	53	31,4
IV/D	71	42
<b>T (Tamaño)</b>		
T1	3	2,6
T2	38	32,5
T3	17	14,5
T4	59	50,4
<b>N (ganglios)</b>		
N0	36	32,7
N1	9	8,2
N2	55	50,0
N3	10	9,1
<b>Metástasis</b>		
M0	95	56,2
M1	74	43,8
<b>Fumador</b>		
Activo	73	44,2
No fumador	13	7,9
Ex fumador	79	47,9

Tabla 5. Descripción de las variables sexo, estadio, tamaño (T), ganglios (N), metástasis (M), y fumador. Aparece la frecuencia y el porcentaje, para una muestra de 169 pacientes.

Para la variable Anatomía patológica vamos a considerar dos situaciones. En la primera consideramos todas las subclases histológicas aparecidas en esta tesis de cáncer de pulmón, tabla 6.

Anatomía patológica	n	%
<b>Epidermoide</b>	73	43,2
<b>Adenocarcinoma</b>	40	23,7
<b>Célula grande</b>	14	8,3
<b>Microcíticos</b>	20	11,8
<b>No microcíticos</b>	22	13

Tabla 6. Descripción de la variable Anatomía Patológica, dividida en las subclases histológicas; Carcinoma Epidermoide, Adenocarcinoma, Célula grande, Microcítico y no microcítico.

Por otra parte, también decidimos valorar la Anatomía Patológica separando las dos categorías más importantes de cáncer de pulmón, CPCNP y CPCP con el fin de comprobar si la expresión del gen *SNAIL2* discierne entre ambas categorías de cáncer de pulmón, tabla 7.

Anatomía patológica	n	%
<b>CPCNP</b>	149	88,2
<b>CPCP</b>	20	11,8

Tabla 7. Descripción de la variable Anatomía Patológica, dividida en las categorías CPCNP y CPCP.

Lo primero que pretendemos es comprobar si la detección del gen *SNAIL2* en sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón puede ser un marcador de diseminación tumoral, para ello comparamos el número de pacientes que han expresado el gen en nuestro estudio frente a los pacientes sanos o controles, que lo expresaron, tabla 8.

	n expresan <i>SNAIL2</i>	%
<b>Controles (100)</b>	10	10
<b>Pacientes (168)</b>	58	34,5

Tabla 8. n frecuencia o nº de casos que expresan el gen; % porcentaje.

Mostramos la representación gráfica (gráfico 1) del porcentaje de expresión del gen Snail2 en pacientes y en controles. El 34,5 % de los pacientes con cáncer de pulmón expresaron el gen *SNAIL2* y solamente un 10 % de las personas sanas expresaron el gen en sangre periférica, detectado por la técnica de RT-PCR explicada en materiales y métodos.

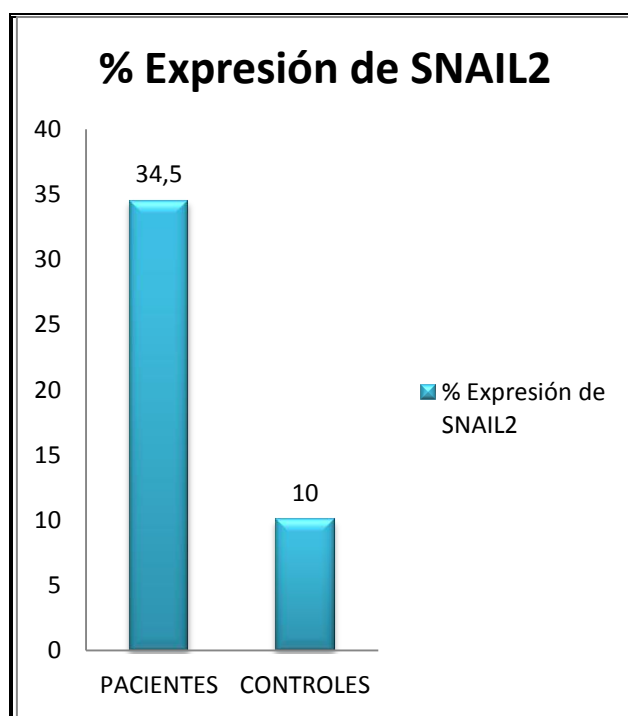


Gráfico 1. Porcentaje de expresión de Snail2 en pacientes y en controles.

Seguidamente, demostramos la relación de la expresión del gen *SNAIL2* en sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón con las características clinicopatológicas de los pacientes estudiados.

A través de Minitab realizamos la estadística descriptiva relativa a las medias de tendencia central, dispersión y correlación

Para Snail2, al tratarse de una variable dicotómica, si/no, nos encontramos con una media = 0,345, lo que hace referencia a que existe un mayor número de pacientes que no expresan el gen *SNAIL2* que los que si lo expresan, como aparece descrito en la tabla 9.

Variable	n	%
<b>Snail2</b>		
<b>No expres</b>	110	65,5
<b>Si expres</b>	58	34,5

Tabla 9. Descriptiva de la variable Snail2. Aparece la frecuencia (n), el porcentaje.

Después realizamos una matriz de correlaciones entre el gen *SNAIL2* (variable) y las características clínicopatológicas, Anatomía Patológica total, CPCNP/ CPCP, sexo, metástasis y estadio. El valor de p obtenido para cada variable lo representamos en la siguiente tabla 10.

Variable	SNAIL2
<b>Ant.Pat</b>	p=0,952
<b>CPCNP/CPCP</b>	p=0,823
<b>Sexo</b>	p=0,546
<b>Metástasis</b>	p=0,948
<b>Estadio</b>	p=0,883

Tabla 10. El contenido de celda corresponde con: el valor de p de cada correlación.

El valor de p es mayor de 0,05 en todas las variables, no existe significatividad, por tanto no hay relación de las variables con la expresión del gen *SNAIL2*.

Para conocer mejor las relaciones entre variables utilizamos otras pruebas estadísticas comentadas en material y métodos.

Para establecer la relación entre variables expresión del gen *SNAIL2* y la Anatomía Patológica total realizamos una prueba ANOVA tabla 11.

Fuente	GL	p
<b>Ant.Patológica</b>	4	0,885
<b>Error</b>	163	
<b>Total</b>	167	

Tabla 11. Parámetros de la prueba ANOVA para la variable Anatomía Patológica.

El p-valor asociado es 0,885, mayor que un nivel de significación de 0,05 asentado en la zona de no rechazo, y por lo tanto aceptamos la hipótesis nula de igualdad de medias tabla12.

Nivel	n	Media	Desv.est	IC 95%
<b>1-Epidermoide</b>	73	0,3562	0,4822	0,29-0,47
<b>2-Adenocarcinoma</b>	40	0,3500	0,4830	0,17-0,49
<b>3-Célula grande</b>	14	0,2143	0,4258	-0,01-0,47
<b>4-Microcítico</b>	19	0,3684	0,4956	0,16-0,60
<b>5-No microcítico</b>	22	0,3636	0,4924	0,16-0,55

Tabla 12. n frecuencia, Media Desviación estandar e IC 95% para las diferentes subclases de Anatomía Patológica.

Observando los intervalos de confianza no todos los tipos de Anatomía Patológica tienen la misma media, el nivel 3 (Célula grande) tiene un intervalo de confianza más amplio y con zonas diferenciadas del resto.

La tabla 13 muestra la prueba de chi-cuadrado de independencia estadística entre el tipo de Anatomía Patológica total y la expresión o no del gen *SNAIL2* en los pacientes con cáncer de pulmón.

SNAIL2	Epidermoide	Adenocarcinoma	Célula grande	Microcítico	No microcítico	Todo
<b>No expr</b>	47	26	11	12	14	110
<b>Si expr</b>	26	14	3	7	8	58
<b>Faltante</b>	0	0	0	1	0	*
<b>Todo</b>	73	40	14	19	22	168

Tabla 13. Nº de casos que expresan el gen *SNAIL2*, y de los que no lo expresan en las subclases de Anatomía Patológica

Chi-cuadrada de Pearson= 1,183; GL=4; p-valor=0,881

\*nota 1 celdas con conteos esperados menores que 5

El valor de p es de 0,881, por tanto no existe diferencia entre la existencia o no del gen *SNAIL2* y el tipo de anatomía patológica total.

De la misma manera relacionamos ahora la expresión del gen *SNAIL2* y la Anatomía Patológica diferenciada en CPCNP y CPCP, tabla 14.

SNAIL2	1-CPCNP	2-CPCP	Todo
<b>No expr</b>	98	12	110
<b>Si expr</b>	51	7	58
<b>Faltante</b>	0	1	
<b>Todo</b>	149	19	168

Tabla 14. Nº de casos que no expresan el gen *SNAIL2*, y de los que lo expresan en las dos categorías de Anatomía Patológica.

Chi-cuadrada de Pearson= 0,051; GL=1; p-valor=0,821.

El p-valor fue de 0,821 por encima del nivel de significación, por lo tanto no existe diferencia entre la expresión o no del gen *SNAIL2* y la anatomía patológica CPCNP/CPCP.

Para relacionar el gen *SNAIL2* con fumadores realizamos una prueba de chi-cuadrado para conocer si existe diferencia de medias entre ambas variables tabla 15.

SNAIL2	Fumador activo	No fumador	Ex fumador	Todo
<b>No expr</b>	46	9	55	110
<b>Si-expr</b>	26	4	24	54
<b>todo</b>	72	13	79	164

Tabla 15. Nº de casos que no expresan el gen *SNAIL* y de los que si lo expresan en fumadores, no fumadores y exfumadores.

Chi-cuadrada de Pearson= 0,590; GL=2; p-valor=0,745.

El p-valor = 0,736 mayor que el nivel de significación 0,05, por lo tanto no hay diferencia entre la expresión o no del gen y entre fumador, no fumador y ex fumador.

Para relacionar el gen *SNAIL2* con la existencia de metástasis conoceremos la correlación entre variables y de esta manera veremos el nivel de relación existente entre ambas variables.

SNAIL2	M0	M1	Todo
<b>No expr</b>	62	48	110
<b>Si expr</b>	33	25	58
<b>Todo</b>	95	73	168

Tabla 16. Nº de los casos que expresan el gen *SNAIL2*, y de los que no lo expresan en pacientes con metástasis de inicio M0 y en los pacientes con metástasis M1.

Chi-cuadrada de Pearson= -0,005; GL=1; p-valor=0,9481

El p-valor es igual a 0,9481, mayor que 0,05, por tanto no existe diferencia significativa entre la expresión o no del gen *SNAIL2*, en pacientes con metástasis de inicio, ni entre los pacientes sin metástasis.

La relación entre el gen *SNAIL2* y el estadio se determinará por la prueba de chi-cuadrado tabla 17.

SNAIL2	1-IA/IB	2-IIB/IIIA	3 IIIB/L	4-IV/D	faltante	Todo
<b>No expr</b>	11	19	31	48	1	109
<b>Si expr</b>	4	9	22	22	1	57
<b>Faltante</b>	0	0	0	1	0	*
<b>Todo</b>	15	28	53	70	*	166

Tabla 17. Tabla de contingencia para determinar la relación del gen *SNAIL2* y el estadio.

Chi-cuadrada de Pearson= 1,923; GL=3; p-valor=0,589

\*nota 1 celda con conteos esperados menores que 5

El p-valor asociado es 0,589 por encima de un nivel de significación tipo de 0,05, por lo tanto podemos concluir, que no existe diferencia entre la expresión o no del gen *SNAIL2* y el estadio de la enfermedad.

Para conocer la relación entre la expresión del el gen *SNAIL2* y la variable TNM realizamos una prueba ANOVA para un primer contacto tabla 18.

Fuente	GL	P
<b>TNM</b>	26	0,371
<b>Error</b>	116	
<b>Total</b>	142	

Tabla 18. Parámetros de la prueba ANOVA para la variable TNM.

El p-valor = 0,371, nos indica que no existe diferencia entre la expresión o no del gen *SNAIL2* con el TNM.

Separamos la variable TNM en cada uno de sus parámetros. La relación de la expresión del gen *SNAIL2* con el tamaño del tumor lo describimos en la tabla 19.



SNAIL2	T1/2	T3/4	Todo
<b>No expr</b>	27	50	77
<b>Si expr</b>	14	26	40
<b>Todo</b>	41	76	117

Tabla 19. Tabla de contingencia para determinar la relación del gen *SNAIL2* y el tamaño del tumor.

Chi-cuadrada de Pearson= 0,000; GL=1; p-valor=0,994

El p-valor = 0,994 por encima del nivel de significación de 0,05, por tanto podemos concluir que no hay relación entre la expresión n o no del gen *SNAIL2* y el tamaño del tumor.

Comprobamos la relación de la relación de la expresión del gen *SNAIL2* con el número de ganglios afectados, tabla 20.

	N0	N>0	Todo
<b>No expr</b>	24	50	74
<b>Si expr</b>	12	24	36
<b>Todo</b>	36	74	110

Tabla 20. Tabla de contingencia para determinar la relación del gen *SNAIL2* y el nº de ganglios.

Chi-cuadrada de Pearson= 0,009; GL=1; p-valor=0,925

El p-valor = 0,925 por encima del nivel de significación de 0,05, por tanto podemos concluir que no existe diferencia entre la expresión o no del gen *SNAIL2* y el número de ganglios afectados del tumor.

Por último, vamos a conocer la relación entre el gen *SNAIL2* y el sexo de los pacientes tabla 21.

SNAIL2	1-Hombre	2-Mujer	Todo
<b>No expr</b>	100	10	110
<b>Si expr</b>	51	7	58
<b>Faltante</b>	1	0	
<b>Todo</b>	151	17	168

Tabla 21. Tabla de contingencia para determinar la relación del gen *SNAIL2* y el sexo.

Chi-cuadrada de Pearson= 0,370; GL=1; p-valor=0,543

El p-valor = 0,543 por encima de un nivel de significación tipo de 0,05, por lo tanto podemos concluir que no existe diferencia entre la expresión o no del gen y la variable sexo.

#### 4.2 ESTUDIO DE EXPRESIÓN PROTEICA DE (E.cadherina, Vimentina, Notch1 y Snail2) EN TEJIDO TUMORAL DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN.

En primer lugar comentaremos los descriptivos de todas las variables clinopatológicas y de la expresión proteica de las moléculas planteadas en esta tesis en el tejido tumoral.

La muestra para este estudio se compone de 87 pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón, la edad media fue de 63,4 años con un IC 95%: 61,2-65,6, con desviación típica 10,3 años todos los casos excepto uno, son mayores de 40 años, siendo la edad más elevada de 82 años. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra, tabla 22.

		Edad
<b>N</b>		87
<b>Parámetros normales<sup>a,b</sup></b>	Media	63,40
	Desviación típica	10,28

Tabla 22. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra.

Por sexos, la edad de los hombres es mayor (media 64,4 años; IC 95%: 62,1-66,6) que de las mujeres (media 55,1 años; IC 95%: 47,8-62,4). La diferencia entre medias de los hombres y las mujeres si ha resultado significativa con  $p$ -valor < 0,05 (prueba de T de Student:  $t= 2,64$ ;  $GL= 85$ ;  $p= 0,010$ ) tabla 23.

	t	gl	p-valor	Diferencia de medias	Error tip.de la diferencia	IC 95%
<b>edad</b>	2,642	85	0,010	9,248	3,500	2,289-16,207

Tabla 23. Prueba de muestras independientes: prueba de T para la igualdad de medias.

Describimos las variables Independientes de la muestra (características de la muestra), como son histología, tamaño del tumor, ganglios afectados, metástasis de inicio, Estadio de la enfermedad y la variable fumador.

Por histología un 52,9 % de los pacientes pertenecieron a la subclase de carcinoma Epidermoide, un 18,4 % pertenecieron a la subclase de Adenocarcinoma, un 13,8% eran de la categoría Microcítico, el 8 % pertenecieron a la subclase de Célula grande y un 6,9 % correspondían a carcinomas No microcíticos.

Predomina un tamaño tumoral superior a 2 con un 60,3 % de los pacientes, y en cuanto al número de ganglios afectados son mayoría los  $N=1/2$  con el 56,9 % de los pacientes, le sigue  $N=0$  con un 32,3 % y un porcentaje muy inferior para un  $N>2$ , solo el 10,8 % de los pacientes incluidos en este estudio, tabla 24.

	n	%
<b>Histología</b>		
<b>Epidermoide</b>	46	52,9
<b>Adenocarcinoma</b>	16	18,4
<b>Célula grande</b>	7	8
<b>No microcítico</b>	6	6,9
<b>Microcítico</b>	12	13,8
<b>T</b>		
<b>T=1/2</b>	27	39,7
<b>T&gt;2</b>	41	60,3
<b>N</b>		
<b>N=0</b>	21	32,3
<b>N=1/2</b>	37	56,9
<b>N&gt;2</b>	7	10,8
<b>Estadio</b>		
<b>IB</b>	9	10,3
<b>IIB</b>	6	6,9
<b>IIIA/B/L</b>	41	47,1
<b>IV/D</b>	31	35,6
<b>Fumadores</b>		
<b>Activos</b>	57	65,5
<b>Ex fumadores</b>	24	27,6
<b>No fumadores</b>	6	6,9

Tabla 24. Descriptiva de las variables independientes; Histología, Tamaño. Número de ganglios afectados, Estadio y Fumador. Se muestra la frecuencia de cada variable y el porcentaje para una muestra de 87 pacientes.

El estadio de la enfermedad que predominó en este estudio fue el IIIA/B/L con un 47,1 %, el estadio IV/D apareció en un 35,6% de la muestra, seguido por el Estadio IB con un 10,3 %, y por último el Estadio IIB para un 6,9 % de la muestra. Para la variable Fumador, un 65,5 % de la muestra pertenecía a fumadores en activo, el 27,6 % eran exfumadores y el 6,9 % eran no fumadores.

En relación a la variable Anticuerpo (expresión proteica de los anticuerpos) se considera como variable dependiente. Para cada anticuerpo hemos considerado dos opciones: expresión baja o nula y expresión alta o positiva, siguiendo los criterios comentados en material y métodos tabla 25.

Anticuerpo	n	%
<b>E-cadherina</b>		
<b>Bajo</b>	25	29,1
<b>Alto</b>	61	70,9
<b>Vimentina</b>		
<b>Bajo</b>	71	87,7
<b>Alto</b>	10	12,3
<b>Notch1</b>		
<b>Bajo</b>	26	30,2
<b>Alto</b>	60	69,8
<b>Snail2 (T)</b>		
<b>Bajo</b>	50	57,5
<b>Alto</b>	37	42,5

Tabla 25. Descriptiva de la variable dependiente Anticuerpo. Aparece la frecuencia y el porcentaje de los anticuerpos estudiados; E-cadherina, Vimentina, Notch1, Snail2 (T) en tejido tumoral, para las expresiones bajas y altas de cada uno.

Y por último, la variable Snail2 en sangre periférica, también considerada como variable dependiente, la describimos a parte por ser un gen estudiado en sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón y no un anticuerpo. El gen *SNAIL2* no se expresó en un 64% de los pacientes y si se expresó en el 36,0 % de los pacientes para una muestra de 87 pacientes, tabla 26.

Snail2 (sp)	n	%
<b>No expr</b>	55	64,0
<b>Si expr</b>	31	36,0
<b>Perdidos</b>	1	
<b>total</b>	87	100,0

Tabla 26. Descriptiva de la variable dependiente Snail2 (sp). para una muestra de 87 pacientes.

#### 4.2.1 Correlaciones entre los anticuerpos

Para conocer las correlaciones entre la expresión proteica de los anticuerpos estudiados, utilizamos la prueba de Chi-cuadrado de independencia explicado en material y métodos. Los valores de p-valor obtenidos los resumimos en la tabla 27 donde aparecen señaladas en azul las correlaciones que son significativas.

Anticuerpo	E-cadherina	Vimentina	Notch1	Snail2 (T)
<b>N=87</b>				
<b>E-cadherina</b>				
<b>Vimentina</b>	p=0,529			
<b>Notch1</b>	p=0,485	p=0,02		
<b>Snail2 (T)</b>	p=0,481	p=0,763	p=0,047	
<b>Snail2 (sp)</b>	p=0,380	p=0,383	p=0,580	p=0,544

Tabla 27. Valor de p-valor entre las correlaciones de los anticuerpos

A continuación mostramos las tablas de contingencia de las dos correlaciones significativas obtenidas en esta tesis y la chi-cuadrada de Pearson.

Hemos encontrado que al relacionar la presencia de Notch1 con Vimentina, obtenemos una correlación significativa con  $p < 0,05$ , p-valor = 0,02. Se observa que sobre el total de negativos de Notch1 hay un 96 % de Vimentina con expresión negativa, tabla 28.

Para la expresión positiva de Vimentina se observa que sobre el total de Vimentina, hay un 95,5 % de Notch1 que son positivos. Es decir se asocian los positivos de ambos anticuerpos, y por otra parte se asocian los negativos de ambos anticuerpos, tabla 28.

Notch1	Vimentina	Vimentina	Total
	Negativo	Positivo	
<b>Negativo</b>			
<b>recuento</b>	24	1	25
<b>%dentro de Notch1</b>	96,0	4,0	100,0
<b>% dentro de Vimentina</b>	40,7	4,5	30.9
<b>RC</b>	3,1	-3,1	
<b>Positivo</b>			
<b>Recuento</b>	35	21	56
<b>%dentro deNotch1</b>	62,5	37,5	100.0
<b>%dentro de Vimentina</b>	59,3	95,5	69.1
<b>RC</b>	-3,1	3,1	
<b>Total</b>			
<b>Recuento</b>	59	22	81
<b>%dentro de Notch1</b>	72,8	27,2	100.0
<b>%dentro de Vimentina</b>	100,0	100,0	100.0

Tabla 28. Tabla de Contingencia de Notch1 sobre Snail2 (T)

Por otra parte, al relacionar la presencia de Notch1 con Snail2, se ha encontrado una correlación significativa con  $p < 0,05$ , Chi-cuadrada = 3,941; 1 GL y p-valor = 0,047. Se observa que sobre el total de negativos de Notch1 hay un 73,1% que también son negativos en Snail2 tabla 29.

Para los positivos de Snail2 se observa que sobre el total de Snail2, hay un 81,1% de Notch1 que son positivos. Es decir se asocian los negativos de ambos anticuerpos, y por otra parte se asocian los positivos de ambos anticuerpos tabla 29.

Notch1	Snail2 (T)		Total
	negativo	positivo	
<b>Negativo</b>			
<b>Recuento</b>	19	7	26
<b>% dentro de Notch1</b>	73,1	26,9	100,0
<b>% dentro de Snail2</b>	38,8	18,9	30,2
<b>RC</b>	2,0	-2,0	
<b>Positivo</b>			
<b>Recuento</b>	30	30	60
<b>% dentro de Notch1</b>	50,0	50,0	100,0
<b>% dentro de Snail2</b>	61,2	81,1	69,8
<b>RC</b>	-2,0	2,0	
<b>Total</b>			
<b>Recuento</b>	49	37	86
<b>% dentro de Notch1</b>	57,0	43,0	100,0
<b>% dentro de Snail2</b>	100,0	100,0	100,0

Tabla 29. Tabla de contingencia de Notch1 sobre Snail2 (T).

#### 4.2.2 Análisis de conglomerados o cluster

Nuestro objetivo es establecer alguna clasificación tipológica explicada en material y métodos. Para su interpretación debemos estudiar los porcentajes de casos de cada categoría de cada variable, se incluye (pertenece) a cada uno de los conglomerados o tipologías (significativamente distintos entre sí) que se han detectado.

En el conjunto de resultados incluimos las variables: Notch1, Snail2 (T), Snail2 (sp), Vimentina, E-cadherina, fumador, Estadio y Anatomía Patológica.

Han aparecido 2 conglomerados diferentes tabla 30.



		n	% de combinados	% del total
<b>Conglomerado</b>	<b>1</b>	62	77,5	71,3
	<b>2</b>	18	22,5	20,7
	Combinados	80	100	92
<b>Casos excluidos</b>		7		8
<b>Total</b>		87		100

Tabla 30. Distribución de Conglomerados.

En el gráfico 2 representamos el tamaño de los conglomerados, donde aparece una tasa de un 77,5 % para el Conglomerado 1, es decir el porcentaje de pacientes del total de la muestra que tienen unas características comunes representadas en el Conglomerado 1 es del 77,5 %. El Conglomerado 2 solamente está representado por el 22,5 % del total de la muestra.

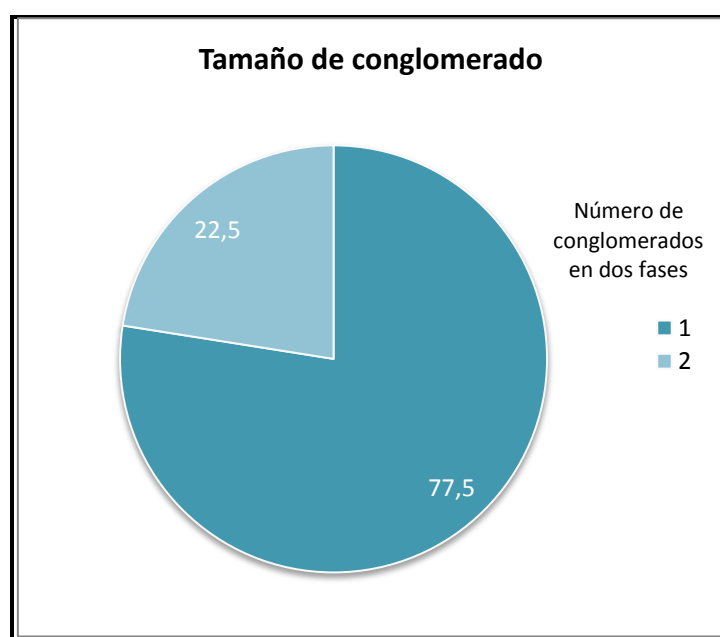


Gráfico 2. Tamaño de Conglomerados. Aparecen 2 Conglomerados representados por el 77,5 y el 22,5 % de la muestra respectivamente.

En la tabla 31 representamos los porcentajes de cada variable en cada Conglomerado. El Conglomerado 1 lo resaltamos en azul, porque resulta interesante para el objetivo de esta tesis. Las celdas que aparecen vacías para algunas variables indican que dichas variables no se asocian a ninguno de los conglomerados. Se observa un conglomerado (Conglomerado 1) que representa al 77.5 % de la muestra, la expresión en positivo del anticuerpo Notch1 y el anticuerpo Snail2, con porcentajes del 98,2 % y 97,2 % respectivamente muy caracterizados

con células madre. Por otra parte, la expresión de Vimentina en positivo, puede indicar un indicio hacia la TEM.

	Conglomerado 1	Conglomerado 2
<b>Notch1</b>	Positivo 98,2%	Negativo 70,8%
<b>Snail2 (T)</b>	Positivo 97,2%	Negativo 38,6%
<b>Snail2 (SP)</b>		
<b>Vimentina</b>	Positivo 100%	
<b>E-cadherina</b>		
<b>Fumador</b>		
<b>Estadio</b>	IIB 100%	
	IIIB 100%	
<b>Anatomía</b>	Epidermoide 90,9%	Microcítico 90,9%
<b>Patológica</b>	Adenocarcinoma 100%	Célula grande 57,1%
	No microcítico 100%	

Tabla 31. Porcentaje de las variables estudiadas en cada Conglomerado.

Podemos concretar, que existe un fenotipo con características de célula madre que cumple un 77,5% del total de la muestra estudiada. Este fenotipo se caracteriza por la expresión positiva de Notch1, expresión positiva de Snail2 y expresión positiva de Vimentina en pacientes con estadios IIB y IIIB, con las subclases histológicas de Epidermoide, Adenocarcinoma, y no microcíticos.

Al encontrar correlación significativa entre los anticuerpos Notch1 y Vimentina, y entre Notch1 y Snail2, hemos querido hacer un estudio multivariado para ver otro tipo de relaciones o asociaciones que se puedan dar en el estudio. Por otra parte, nos hemos centrado en los anticuerpos Notch1 y Snail2 por ser los que están más caracterizados con células madre, tanto normales como tumorales, como uno de los objetivos de esta tesis.

### 4.2.3 Análisis factorial por componentes principales

Para hacer este análisis, primero debemos ver las condiciones estadísticas de nuestra muestra para comprobar que efectivamente se puede realizar (ver material y métodos). Tenemos 8 variables y 80 sujetos (pacientes), o lo que es lo mismo 10 casos por variable, condición de tamaño de muestra para poder llevar a cabo el análisis.

Las condiciones estadísticas se cumplen:

- Valor de KMO=0,596
- Determinante de la matriz de correlaciones=0,549
- Y Test de Esfericidad de Bartlett significativo:  $p=0,02 < 0,05$

En consecuencia, los resultados tienen bastantes probabilidades de ser ciertos, pero deben tomarse con cierta precaución. Podemos decir que son más “indicios” (bastante sólidos) que demostraciones. Pero si podemos afirmar que existe significatividad.

En el proceso se han encontrado 3 factores o componentes principales, que explican (o retienen) casi un 52% de la variabilidad total empíricamente observada (el mínimo es 50% y lo recomendable es que pase del 60%). Por lo tanto, la variabilidad explicada es suficiente y estadísticamente aceptable, tabla 32.

Componente	Autovalores iniciales			Suma de las saturaciones al cuadrado de la rotación		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	1,883	23,539	23,539	1,706	21,33	21,33
2	1,261	15,768	39,307	1,263	15,786	37,116
3	1,009	12,615	51,922	1,184	14,806	51,922
4	0,96	12,001	63,923			
5	0,932	11,646	75,57			-
6	0,841	10,513	86,083			
7	0,632	7,905	93,988			
8	0,481	6,012	100			

Tabla 32. Método de extracción: Análisis de Componentes principales. La parte derecha de la tabla muestra los tres componentes con los porcentajes de la varianza de cada uno.

El primer factor explica un 21,33% del total. Está formado por la asociación de las variables: Notch1 en positivo, Vimentina en positivo y Anatomía patológica con Microcítico en positivo (tabla 33).

El segundo factor o componente explica el 15,79% (con lo que entre los 2 primeros se acumula un 37,12% de la variabilidad total) está formado por las variables Snail2 en sangre periférica en positivo y Estadio localizado/extendido en negativo, lo que significa que Snail2 (sp) se asocia con los estadios localizados, tabla 33.

Y el tercer componente que explica otro 14,81% (para llegar al 51,92% acumulado en total entre los tres) está formado por la asociación de la categoría no fumador con la E-cadherina en positivo, tabla 33.

	Componente1	Componente2	Componente3
<b>Notch1</b>	0,755		
<b>Anatomía Patológica</b>	0,692		
<b>Vimentina</b>	0,634		
<b>Snail 2 (sp)</b>		0,674	
<b>Estadio</b>		-0,567	
<b>Snail2 (T)</b>			
<b>Fumador</b>			-0,704
<b>E-cadherina</b>			0,630

Tabla 33. Matriz de componentes rotados. Método de extracción: Análisis de componentes principales. Método de rotación: Normalización de Varimax con Kaiser.

Sin embargo, los 3 componentes encontrados no parecen estar correlacionados entre sí, ya que los coeficientes Pearson entre ellos son bajos, tabla 34.

Componente	1	2
<b>1</b>	-	
<b>2</b>	-0,29	
<b>3</b>	0,179	0,211

Tabla 34. Matriz de correlaciones entre componentes. Coeficientes Pearson.

#### 4.2.4 Análisis de regresión logística múltiple para predecir la expresión positiva de Notch1

Se empleó el método de introducción de variables predictoras por pasos sucesivos hacia delante de Wald (método explicado en material y métodos). El resultado es un modelo significativo (con  $p=0,000<0,05$ ) que nos confirma la posibilidad de construir la ecuación de predicción deseada, tabla 35.

	Chi cuadrada	GL	P-VALOR
<b>Paso</b>	28,261	4	0,000
<b>Bloque</b>	28,261	4	0,000
<b>Modelo</b>	28,261	4	0,000

Tabla 35. Prueba ómnibus sobre los coeficientes del modelo.

En dicha ecuación solo se ha detectado un único predictor significativo ( $p=0,001$ ). Se trata de la variable Anatomía patológica pero no todas las subclases, tabla 36.

Antomía. Patológica	Wald	GL	p-valor	Exp (B)	IC 95%
<b>Epidermoide</b>	10,584	4	0,032		
<b>Adenocarcinoma</b>	0,000	1	0,999	538491621,463	
<b>Microcítico</b>	9,250	1	0,002	0,074	2,52-71,43
<b>Célula grande</b>	2,728	1	0,099	0,250	0,77-20,83
<b>No microcítico</b>	0,000	1	0,999	538491621,463	
<b>Constante</b>	9,957	1	0,00	3,000	

Tabla 36. Variable Anatomía patológica como única predictora de la ecuación, con todos los valores relevantes.

Teniendo en cuenta como se ha codificado la Anatomía Patológica para el análisis, la categoría de referencia es el carcinoma Epidermoide, así que las OR que aparecen en la tabla superior, son del resto de las categorías de AP comparadas con el carcinoma Epidermoide. La única que es significativa ( $p=0,002<0,05$ ) es la OR de la categoría 2 de la AP que es Microcítico. Es decir, que la probabilidad de Notch 1 positivo es 13,51 veces mayor ( $p\text{-sig}=0,002$ ) en una Anatomía

patológica Microcítico que en un carcinoma Epidermoide. El intervalo de confianza al 95% es 2,52-71,43, es decir demasiada amplitud.

También, sale casi significativa ( $p=0,099$ ) la OR de la subclase Célula grande sobre el carcinoma Epidermoide. Es decir que la probabilidad de Notch1 positivo es 4 veces mayor en la subclase Célula grande que en el carcinoma Epidermoide.

La aplicación del modelo predictivo construido a la muestra de datos reales ha dado como resultado un 91,1 % de aciertos en los pronósticos de Notch1 positivos, y un 54,2 % de acierto en los casos de Notch1 negativo. Por tanto, se puede deducir que el VPP (valor predictivo positivo) es elevado, y el VP negativo es aceptable. En consecuencia, buena especificidad y una sensibilidad regular, tabla 37.

Notch1 Observado	Notch1 pronosticado negativo	Notch 1 pronosticado positivo	Porcentaje correcto
<b>Negativo</b>	13	11	54,2
<b>Positivo</b>	5	51	91,1
<b>Porcentaje global</b>			80

Tabla 37. Valores pronosticados de NOTCH1. El valor de corte es de 0,500

#### 4.2.5 Análisis de regresión logística múltiple para predecir la expresión positiva de Snail2 (T) en tejido tumoral.

Ahora se pretende establecer un modelo predictivo que sea capaz de pronosticar la expresión en positivo de Snail2 (T) desde los predictores: Notch1, Vimentina, E-cadherina, Snail2 (sp), fumador, Estadio, Anatomía Patológica y sexo (explicado en material y métodos).

El resultado es un modelo significativo (con  $p=0,000<0,05$ ) que nos confirma la posibilidad de construir la ecuación de predicción deseada, tabla 38.

	Chi cuadrada	GL	p-valor
<b>Paso</b>	21,112	4	0,000
<b>Bloque</b>	21,112	4	0,000
<b>Modelo</b>	21,112	4	0,000

Tabla 38. Prueba ómnibus sobre los coeficientes del modelo.

En dicha ecuación se ha detectado como único predictor significativo la Anatomía Patológica en dos subclases, Adenocarcinoma y carcinoma Microcítico. Ahora la OR 3,93 indica que es aproximadamente 4 veces más probable encontrar la expresión de Snail2 (T) en un Adenocarcinoma que en un carcinoma Epidermoide con un IC 95% de 1,04-14,92, con una amplitud aceptable, por lo que se puede considerar bastante fiable. la OR para la subclase Microcítico es de 19,23 y el IC 95% es de 2,27-166,6, con un amplitud muy grande por lo que no es muy fiable, tabla 39.

Ant.Pat.	Wald	GL	p-valor	Exp (B)	IC 95%
<b>Epidermoide</b>	10,385	4	0,034		
<b>Adenocarcinoma</b>	4,089	1	0,043	0,254	1,04-14,92
<b>Microcítico</b>	7,356	1	0,007	0,052	2,27-166,6
<b>Célula grande</b>	1,053	1	0,305	0,429	0,46-11,76
<b>No microcítico</b>	0,000	1	0,999	0,000	
<b>Constante</b>	3,189	1	0,074	1,750	

Tabla 39. Variable Anatomía patológica como única predictora de la ecuación con todos los valores relevantes.

La utilización del modelo predictivo construido a la muestra de datos reales ha dado como resultado un 77,8% de aciertos en los pronósticos de Snail2 (T) positivos y un 64,4% de aciertos en los casos de Snail2 (T) negativos. Por tanto, se deduce que la sensibilidad y la especificidad están dentro de los límites para considerarlas buenas estadísticamente, tabla 40.

Snail2 Observado	Snail2 pronosticado negativo	Snail2 pronosticado positivo	Porcentaje correcto
<b>Negativo</b>	29	16	64,4
<b>Positivo</b>	8	28	77,8
<b>Porcentaje global</b>			70,4

Tabla 40. Valores pronosticados de SNAIL2. El valor de corte es de 0,500

### 4.3 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

Se utiliza para calcular el TS, explicado en material y métodos Hay 59 eventos (éxitus) que corresponde con un 69,4 % de la muestra, por tanto, tenemos un 30,6 % (26 casos) vivos.

La mediana en la tabla 41 de TS con una supervivencia global, nos muestra un valor de 19 meses con un IC al 95 % de entre 15 y 23 meses aproximadamente. Un 25 % vive menos de 9 meses y otro 25% supera los 41 meses.

<b>Mediana</b>		
Estimación(meses)	Error tip	IC 95%
19,000	2,154	14,77-23,24

Tabla 41. Análisis de la supervivencia global. Valores de la mediana en meses, y el IC al 95%.

Técnica de Kaplan-Meier para la comparación del TS entre todas las subclases histológicas de cáncer de pulmón estudiadas en esta tesis. Existieron diferencias significativas en el TS analizándolo en tiempos iniciales (log Rank), como en tiempos finales (Breslow), tabla 42. La supervivencia es menos es el carcinoma microcítico (11 meses) y mayor es el adenocarcinoma (32 meses) aunque tiene un error típico demasiado elevado por lo que el IC95% es muy poco fiable, tabla 43.



	Chi-cuadrado	GL	p-valor
<b>Log Rank</b>	14,911	4	0,005
<b>Breslow</b>	12,399	4	0,015

Tabla 42. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de anatomía Patológica.

Anatomía Patológica	Estimación (meses)	Error típico	IC 95%
<b>Epidermoide</b>	15,000	2,986	9,147-20,853
<b>Adenocarcinoma</b>	32,000	11,646	9,173-54,827
<b>Microcítico</b>	11,000	1,708	7,653-14,347
<b>Célula grande</b>			
<b>No microcítico</b>	17,000	3,926	9,304-24,696
<b>Global</b>	19,000	2,154	14,779-23,221

Tabla 43. Mediana del tiempo de supervivencia.

El gráfico 3 muestra las curvas de supervivencia de las diferentes clases de cáncer de pulmón de esta tesis.

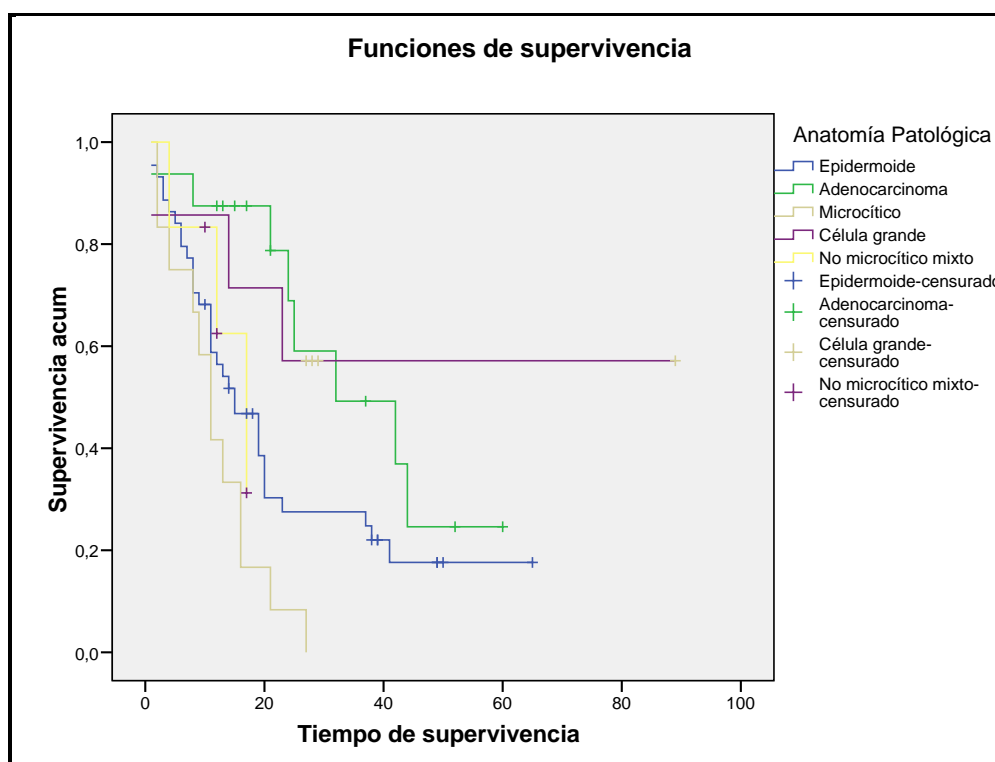


Gráfico 3. Funciones de supervivencia para Anatomía Patológica.

Comparación de supervivencia separando la histología en dos grupos CPCP y CPCNP. Como era de esperar, existió diferencia significativa con valores de p-valor menores de 0,05, tabla 44, y unos valores de IC muy interesantes, porque son bastante cortos, por tanto un resultado muy preciso, tabla 45.

	Chi-cuadrado	GL	p-valor
<b>Log Rank</b>	9,103	1	0,003
<b>Breslow</b>	5,723	1	0,017

Tabla 44. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para las dos categorías de Anatomía Patológica

Anatomía patológica	Estimación (meses)	Error típico	IC 95%
<b>CPCP</b>	11,000	1,708	7,653-14,347
<b>CPCNP</b>	20,000	1,983	16,114-23,886
<b>Global</b>	19,000	2,154	14,779-23,221

Tabla 45. Mediana del tiempo de supervivencia.

El gráfico 4 muestra las curvas de supervivencia de las dos categorías de cáncer de pulmón.

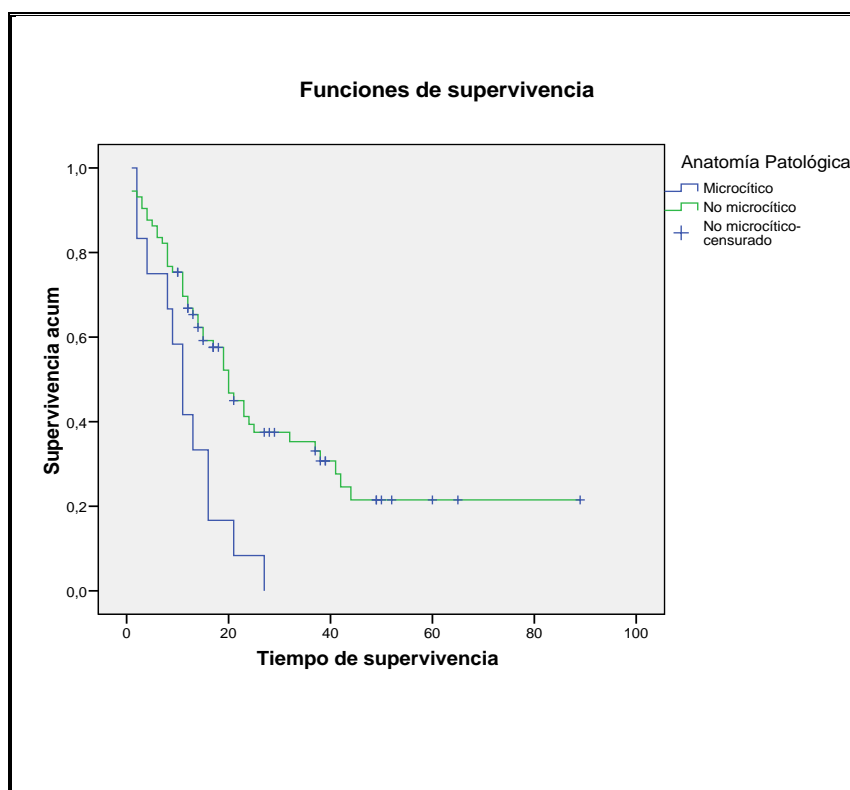


Gráfico 4. Funciones de supervivencia para CPCNP y CPCP.

Prueba de Kaplan-Meier para calcular el TS entre los estadios. Existieron diferencias significativas en el TS entre los estadios, tabla 46. Pero debemos tener cuidado porque la media del estadio I y II no se ha calculado porque hay pocos eventos (solo 3 de 13), entonces la diferencia se encuentra entre los estadios III y IV, siendo menor el TS en el estadio IV. Observando las medias (aunque estén sesgadas) parece que el TS tiene que ser muy superior en los estadios I y II con respecto a los estadios III y IV, tabla 47.

	Chi-cuadrado	GL	p-valor
<b>Long Rank</b>	19,390	2	0,000
<b>Breslow</b>	18,156	2	0,000

Tabla 46. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de Estadio.

Estadio	Estimación (meses)	Error típico	IC 95%
I y II	-	-	-
III	20,000	2,647	14,813-25,187
IV	9,000	1,987	5,105-12,895
<b>Global</b>	<b>19,000</b>	<b>2,154</b>	<b>14,779-23,221</b>

Tabla 47. Valores de supervivencia para Estadio por la prueba de Kaplan-Meier.

El gráfico 5 muestra las curvas de supervivencia de los estadios de cáncer de pulmón de los pacientes de esta tesis.

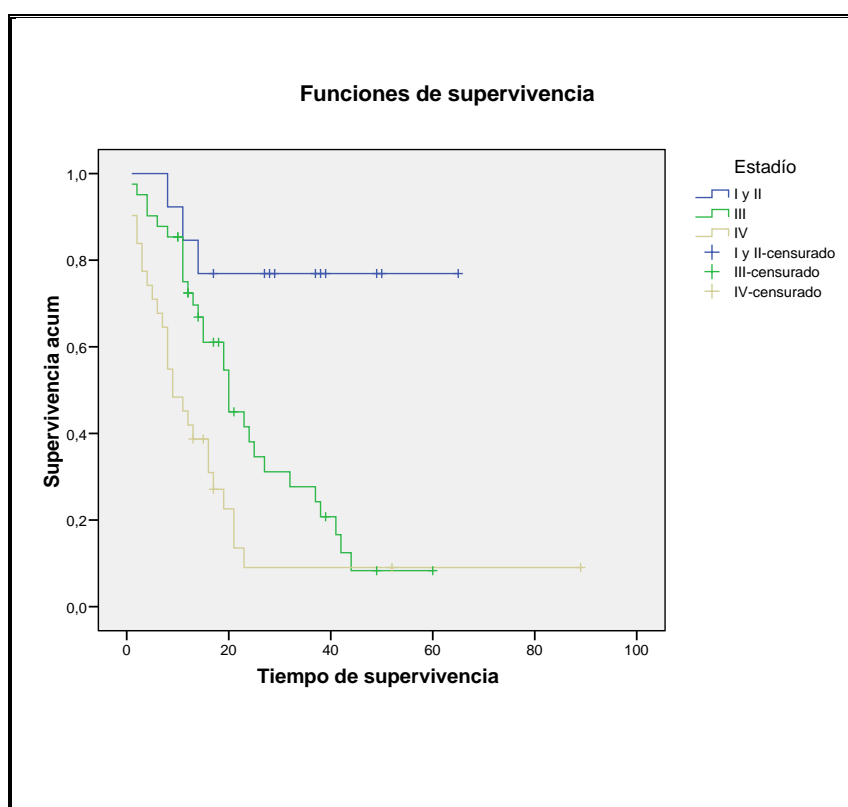


Gráfico 5. Funcion de supervivencia del Estadio en cáncer de pulmón

### 4.3.1 Análisis de supervivencia para los anticuerpos

Para ver si existe correlación entre el éxito y los anticuerpos se utiliza la prueba de Chi cuadrado. Obtuvimos los valores que resumimos en la tabla 48. No existió diferencia significativa con ninguno de los anticuerpos, todos tienen p-valor mayor de 0,05

	Chi-cuadrada	GL	p-valor
<b>E-cadherina</b>	2,240	1	0,134
<b>Vimentina</b>	0,223	1	0,637
<b>Notch1</b>	0,567	1	0,451
<b>Snail2 (T)</b>	0,269	1	0,604
<b>Snail2 (sp)</b>	2,198	1	0,138
<b>Fumador</b>	0,926	2	0,629

Tabla 48. Prueba de Chi-cuadrada para relacionar la supervivencia con los anticuerpos estudiados en esta tesis.

Sin embargo, en las tablas de contingencia de E-cadherina y Snail2 (sp), fijándonos en los RC se podría decir que hay tendencia a ser significativos. Como se ha explicado en material y métodos con RCs comprendidos entre 1,5 y 1,9 existe tendencia a ser significativo si la muestra fuese mayor.

La tabla 49 se interpreta como una tendencia a convertirse en significativa, la relación de Éxito con la pérdida de expresión de E-cadherina en pacientes con cáncer de pulmón, si el tamaño de muestra fuese mayor. Los RC positivos indican que se relaciona la expresión por debajo del corte de E-cadherina con el Éxito en positivo, y cuando la expresión de E-cadherina es superior a 60% celular el Éxito es negativo, es decir están vivos.

Éxitus	E-cadherina		Total
	<60%	>60%	
<b>Si</b>	20	39	59
<b>RC</b>	1,5	-1,5	
<b>No</b>	5	22	27
<b>RC</b>	-1,5	1,5	
<b>Total</b>	25	61	86

Tabla 49. Tabla de Contingencia de Éxitus con E-cadherina.

Para Snail2 (sp) la explicación resultó similar a la de E-cadherina, porque los valores son similares como muestra la tabla 50.

Éxitus	SNAIL2(sp)		Total
	Si exp	No exp	
<b>Si</b>	24	34	58
<b>RC</b>	1,5	-1,5	
<b>No</b>	7	21	28
<b>RC</b>	-1,5	1,5	
<b>Total</b>	31	55	86

Tabla 50. Tabla de Contingencia de Éxitus con Snail2 (sp).

#### 4.3.2. Análisis de supervivencia de los conglomerados.

Para realizar un análisis de supervivencia de los conglomerados, se procedió en primer lugar a crear una variable dicotómica con la asignación de cada uno de los casos a su conglomerado más probable. El criterio empleado, fue que si el caso tenía más de un 50 % de probabilidad de pertenecer al conglomerado objeto de estudio se le asignó a dicho grupo, y si la probabilidad era menor al 50 % se le asignó al grupo contrario.

Tras ello, el resultado se ajustó perfectamente a la distribución esperada, tabla 51.

	Conglomerado	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido
<b>Válidos</b>	Conglomerado 1	62	71,3	77,5
	Conglomerado 2	18	20,7	22,5
	Total	80	92,0	100,0
<b>Perdidos</b>	Sistema	7	8,0	
<b>Total</b>		87	100,0	

Tabla 51. Distribución de conglomerados. Aparece la frecuencia, el porcentaje.

Se empleó la técnica de Kaplan-Meier para comprobar la supervivencia de los casos del conglomerado 1 con el conglomerado 2, y el test de Chi-cuadrado para comprobar la asociación éxito-grupo. Los resultados nos indican la presencia de 44 éxitos entre los 62 casos del conglomerado 1 (71 % frente al 29% vivo), mientras que el conglomerado 2 la tasa de eventos está al 50 % (9 de 18). Esta diferencia es casi significativa con  $p=0,098$  (es  $>0,05$  y  $<0,10$ ), tabla 52.

Conglomerado	Nº total	Nº de eventos éxitos	Nº de no éxitos	Porcentaje No éxitos
<b>Conglomerado1</b>	62	44	18	29,0
<b>Conglomerado2</b>	18	9	9	50,0
<b>Global</b>	80	53	27	33,8

Tabla 52. Resumen del procesamiento de los casos.

Chi-cuadrada de Pearson. 2,743; GL=01;  $p=0,098$

La mediana del TS del conglomerado 1 es de 15 meses (IC95% 8,6-21,4) frente a la mediana del conglomerado 2 que es de 41 meses (con elevada variabilidad, por ello el límite superior del IC 95% es de casi 92 meses) tabla 53. Esta diferencia es estadísticamente significativa con  $p=0,018$ , tabla 54.

Conglomerado	Estimación (meses)	Error típico	IC 95 %
<b>Conglomerado 1</b>	15,000	3,252	8,612-21,388
<b>Conglomerado2</b>	41,000	25,815	0,000-91,597
<b>Global</b>	19,000	2,286	14,520-23,480

Tabla 53. Medianas del tiempo de supervivencia.

	Chi-cuadrado	GL	p-valor
<b>Log Rank</b>	5,624	1	0,018

Tabla 54. Valor de p por la prueba de Log Rank.

El gráfico 6 muestra las curvas de supervivencia de los dos conglomerados.

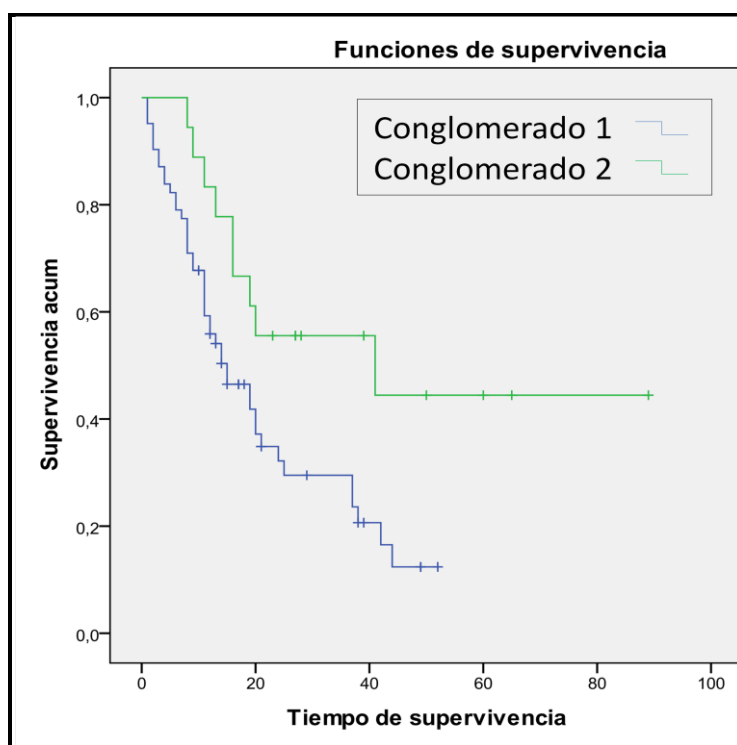


Gráfico 6. Funcion de supervivencia, comparación de las curvas de ambas funciones de supervivencia.

Finalmente empleamos la regresión de Cox, para estimar la OR de mortlidad entre ambos conglomerados. El resultado nos indicó diferencia significativa entre ambos conglomerados. Confirmando lo obtenido por Log-Rank, tal que la velocidad de llegada al evento éxitus se estima en 2,3 veces más rápida en el conglomerado 1 que en el conglomerado 2, es decir la función de supervivencia es de 2,3 veces menos en el conglomerado 1, tabla 55.

	Wald	gl	p-valor	Exp (B)	IC95%
<b>Conglomerado 1</b>	5,125	1	0,024	2,304	1,119-4,747

Tabla 55. Variables en la ecuación.



El gráfico 7 muestra las curvas de función de supervivencia de los dos conglomerados.

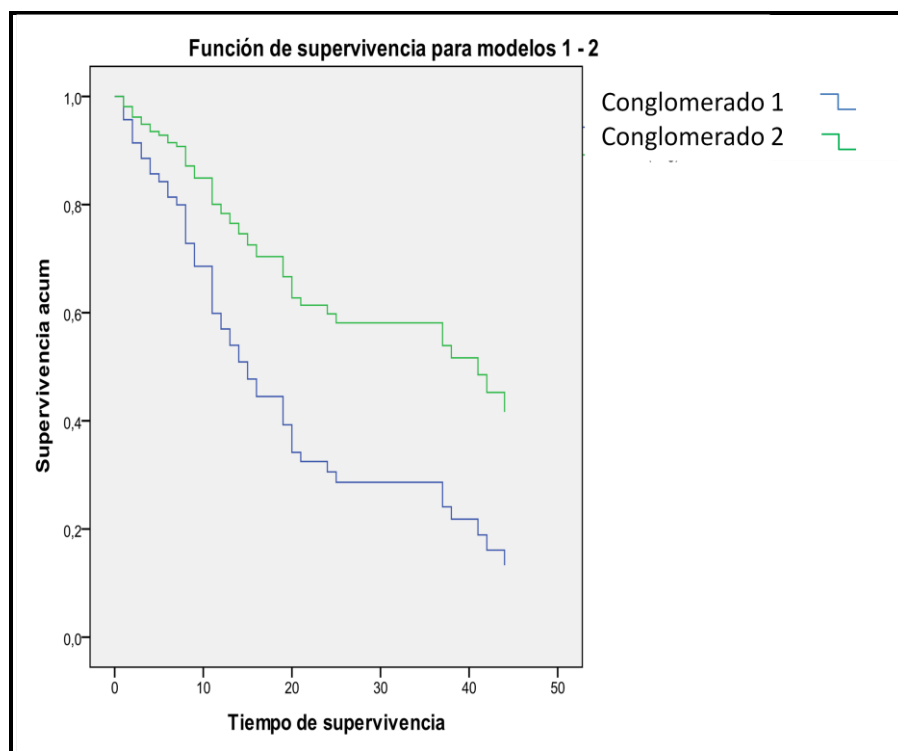


Gráfico 7. Función de supervivencia de los conglomerados

#### 4.3.3 Correlación del Éxito con tamaño del tumor (T), nº de ganglios(N) y con metástasis al diagnóstico (M).

Para relacionar el Éxito con el TNM se va a utilizar la prueba de Chi cuadrada. Vamos a mostrar las tablas de Contingencia de la variable Éxito con cada variable por separado, T, N y M. En las tablas de Contingencia aparece el número de casos y el RC. La tabla 56 corresponde a la relación Éxito-T. En este caso la Chi.-cuadrada que se utiliza es la Chi cuadrada de la tasa de verosimilitud. Por que 3 casillas tienen una frecuencia inferior a 5. El p-valor =0,133 fue mayor que 0,05, por tanto no existió correlación entre Éxito y el tamaño tumoral de los pacientes con cáncer de pulmón incluidos en esta tesis. Sin embargo, mirando los RC, apreció uno con valor de 2 que podría indicar una tendencia a ser significativo para una relación entre el Éxito en positivo y un tamaño tumoral igual a 4.

Éxito	T1	T2	T3	T4	Todo
<b>Si</b>	0	14	8	22	44
<b>RC</b>	-1,4	-1,5	-0,3	2,0	
<b>No</b>	1	12	5	6	24
<b>RC</b>	1,4	1,5	0,3	-2,0	
<b>Todo</b>	1	26	13	28	68

Tabla 56. Tabla de Contingencia de Éxito con el tamaño tumoral (T).

Chi-cuadrada de Pearson= 5,590; GL=3; p-valor=0,133

Chi-cuadrada de la tasa de verosimilitud=5,988;GL=3; p-valor=0,112

La relación Éxito con el nº de ganglios (N) la mostramos en la tabla 57. El p-valor = 0,004, menor que 0,05, por tanto fue significativo, quiere decir que existió relación entre la variable Éxito y N. Además esta relación se da cuando el número de ganglios afectados es positivo, para un Éxito en positivo. Por el contrario, cuando el número de ganglios es igual a cero el Éxito es negativo, es decir están vivos.

Éxito	N0	N>0	Todo
<b>Si</b>	8	33	41
<b>RC</b>	-2,9	2,9	
<b>No</b>	13	11	24
<b>RC</b>	2,9	-2,9	
<b>Todo</b>	21	44	65

Tabla 57. Tabla de Contingencia de Éxito con N.

Chi-cuadrada de Pearson= 8,313; GL=1; p-valor=0,004

Chi-cuadrada de la tasa de verosimilitud=8,215;GL=1; p-valor=0,004

Por último relacionamos Éxito con metástasis (M) El p-valor =0,103 mayor que 0,05, no fue significativo, por tanto no se encontró relación entre la variable Éxito con metástasis de inicio en los pacientes de cáncer de pulmón incluidos en esta tesis. Sin embargo, con los valores de los RC, tabla 58, podríamos decir que existe una tendencia a convertirse en significativo con valor de 1,6. Y esta relación se daría entre los Éxitos positivos con la Metástasis en positivo. Igualmente se daría una relación entre el Éxito negativo con la Metástasis en negativo.

Éxito	M0	M1	Todo
<b>Si</b>	31	17	48
<b>RC</b>	-1,6	1,6	
<b>No</b>	23	5	28
<b>RC</b>	1,6	-1,6	
<b>Todo</b>	54	22	76

Tabla 58. Tabla de Contingencia de Éxito con metástasis (M) de inicio.

Chi-cuadrada de Pearson= 2,651; GL=1; p-valor=0,103

Chi-cuadrada de la tasa de verosimilitud=2,780;GL=1; p-valor=0,095

#### 4.4 ANÁLISIS MULTIVARIADO. Regresión de Cox

Pretendemos obtener un resultado que nos confirme cual es el mejor predictor del TS de los pacientes con cáncer de pulmón incluidos en esta tesis.

Como predictores que han tenido significación tenemos: el conglomerado 1, la Anatomía patológica (CPCNP/CPCP), y el estadio (I-II/III/IV), y la VD considerada es el TS hasta evento éxitus.

El resultado de la Regresión de Cox es el siguiente, tabla 59: El mejor predictor con p-valor=0,004 y Wald=11,13 fue el Estadio, que entra en el primer paso del proceso multivariado

como variable con más peso y queda fuera la Anatomía Patológica tabla 60. El Estadio IV presenta una OR con respecto a la del estadio I y II de 4,2 veces más velocidad en la llegada al evento, peor supervivencia.

En el paso 2 se ha incorporado como variable predictora significativa con  $p$ -valor $<0,05$ , al grupo de clasificación de los casos según el conglomerado al que pertenecen (Wald=5,091;  $p$ -valor=0,024). La OR del conglomerado 1 con respecto al conglomerado 2 es de 2,30 veces peor supervivencia.

	Variable	Wald	gl	p-valor	Exp (B)	IC 95%
<b>Paso 1</b>	Estadio (ref I y II)	10,939	2	0,004		
	Estadio III	2,906	1	0,88	2,170	0,890-5,290
	<b>Estadio IV</b>	9,467	1	0,02	4,226	1,687-10,585
<b>Paso 2</b>	<b>Conglomerado</b>	5,091	1	<b>0,024</b>	2,297	1,115-4,731
	Estadio (ref I y II)	11,132	2	0,004		
	Estadio III	2,564	1	0,109	2,071	0,849-5,051
	<b>Estadio IV</b>	9,307	1	<b>0,002</b>	4,175	1,667-10,456

Tabla 59. Variables que aparecen en la ecuación.

La variable Anatomía Patológica definitivamente no entra como predictor significativo, tabla 60.

	Variable	Wald	GL	p-valor
<b>Paso 2</b>	Anat.Patolog	3,053	1	0,081

Tabla 60. Variables que no están en la ecuación.

Por lo que si la retiramos del análisis multivariado, y repetimos el proceso on los otros dos predictores, los valores definitivos del modelo predictivo, tabla 61, son:

	Variable	Wald	GL	p-valor	Exp (B)	IC 95%
<b>PASO 2</b>	<b>Conglomerado</b>	5,091	1	<b>0,024</b>	2,297	1,115-4,731
	Estadio(ref I y II)	11,132	2	0,004		
	Estadio III	2,564	1	0,109	2,071	0,849-5,051
	<b>Estadio IV</b>	9,307	1	<b>0,002</b>	4,175	1,667-10,456

Tabla 61. Variables de la ecuación sin considerar la Anat. Patolog como variable predictora.

Los valores obtenidos fueron idénticos a los anteriores, por lo que la Anatomía Patológica no es una variable de confusión.

Por lo tanto, el mejor predictor fue el estadio IV, seguido del Conglomerado 1, el cual presenta un fenotipo molecular con características de célula madre.

## ***5. DISCUSIÓN***

## 5.1. SNAIL2 EN SANGRE PERIFÉRICA

En esta tesis hemos estudiado la expresión del gen *SNAIL2*, relacionado con la migración celular, en sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón. El factor de transcripción Snail2 es un regulador clave en la TEM (Nieto MA., 2002) y participa de manera importante en la invasión tumoral. Además participa en otros procesos biológicos significativos, como la inducción del movimiento celular y la supervivencia, también contribuye en otros aspectos de la progresión tumoral (Barrallo-Gimeno A y Nieto MA., 2005). Se ha encontrado la expresión de Snail2 en una variedad de tumores (Peinado H et al., 2007) pero si tiene una función específica o redundante en la progresión tumoral sigue sin concretarse (Olmeda D et al., 2008). Primero mostramos que la expresión del gen es mayor en pacientes con cáncer de pulmón que en los pacientes sanos 10%, pero la capacidad discriminatoria para poderlo utilizar en la clínica habitual podría ser insuficiente. El ADN y el ARN están presentes en la sangre de pacientes con cáncer, sin embargo este ADN circulante no es específico de pacientes con cáncer, también se ha encontrado en pacientes con inflamación, infección o enfermedad autoinmune (Raptis. L; 1980), o incluso en pacientes sanas (Tanaka F et al., 2009; Alix-Panabièris C et al., 2008; Castaldo R et al., 2003), en nuestro caso solamente un 10% de personas sanas expresaron el gen frente al 34,5% de los pacientes.

La relación del gen *SNAIL2* con el parámetro clínico TNM, en nuestro estudio no tuvo ninguna correlación positiva, no existe relación entre la expresión del gen *SNAIL2* con el tamaño del tumor, ni con el número de ganglios afectados, ni con pacientes con metástasis distante de inicio. No existe mucha literatura que nos pueda dar información de la relación que podría haber entre el TNM y las células de cáncer circulantes (CTCs) en sangre de pacientes con cáncer de pulmón, lo cual podría ser de gran utilidad porque nos ayudaría a hacer un estadiaje más concreto de pacientes que presentan estadios tempranos, sin embargo desarrollan metástasis en periodos de tiempo relativamente cortos. Esta invasión temprana que no se sospechaba, puede deberse a que los pacientes con cáncer de pulmón tienen CTCs en sangre periférica y que por el sistema tradicional de TNM no se pueden detectar. Las células metastásicas son raras y crecen durante estadios latentes de la progresión del tumor (Fidler IJ., 2003). Esta afirmación se ha confirmado por estudios que han demostrado que la mayoría de las células del cáncer en un tumor primario tienen un fenotipo metastásico (Bernards R y Weinberg RA., 2002; Vant Veer LJ et al., 2002). La clasificación del TNM está basada en observaciones patológicas para determinar la progresión del cáncer por un conjunto de guías utilizando el tamaño del tumor, metástasis en los nódulos linfáticos regionales eliminados en la

cirugía, y la presencia de metástasis a distancia como parámetros. Aunque la presencia de metástasis en el nódulo linfático axilar predice el desarrollo de metástasis distantes en los pacientes con cáncer de mama, entre el 20 % y el 30 % de los pacientes que no tuvieron metástasis en los nódulos linfáticos desarrollaron la enfermedad en sitios distantes (Braun S et al., 2000). Estas observaciones indican que las células tumorales pueden pasar los nódulos linfáticos, y diseminar directamente a través del torrente sanguíneo a órganos distantes. El estudio de (Sher YP et al., 2005) encontró que los pacientes con estadio I de CPNCP desarrollaron metástasis en órganos distantes. Por tanto, podemos concluir que la detección de células de cáncer circulantes es un suplemento válido en el método de TNM para mejorar el estadiaje.

El cáncer de pulmón es una enfermedad muy compleja que se divide en dos categorías, CPCP y CPCNP, y además dentro del CPCNP existen otras subdivisiones, epidermoide o escamoso, adenocarcinoma, y carcinoma de célula grande entre otros. Como se ha explicado anteriormente (introducción) cada tipo de cáncer se presenta y comporta de diferente manera, por lo que nos parece interesante comprobar si el gen *SNAIL2* puede discernir entre los diferentes tipos de cáncer de pulmón. Nuestros resultados nos indican que no existe diferencia entre la expresión del gen *SNAIL2* y los diferentes tipos de anatomía patológica del cáncer de pulmón, por tanto, existen CTCs en todos los subtipos de cáncer de pulmón, independientemente del grado maligno que presenta cada uno.

Los avances en técnicas bioquímicas han hecho posible detectar selectivamente cantidades muy pequeñas de genes relacionados con el tumor en la sangre, incluyendo alteraciones genéticas específicas del tumor y la expresión de genes específicos del tumor. En esta tesis también discutimos el potencial clínico del método utilizado para detectar el gen *SNAIL2*. La utilización de la RT-PCR para detectar pequeñas cantidades de ADNc combina una gran rapidez con eficiencia y rigor, es un método que se ha utilizado para ver la expresión de células tumorales en sangre de neoplasias humanas de colon, páncreas y pulmón (Chausovsky G et al., 1999; Castaldo G et al., 2003). Es un método con gran sensibilidad y especificidad puesto que se utilizan primers específicos del ADNc que se quiere amplificar, con lo que se evita la amplificación del ADN genómico. Sin embargo, como en cualquier otra técnica es imposible evitar falsos positivos y falsos negativos, en nuestro estudio hay menor número de pacientes que expresan el gen *SNAIL2*, 58 pacientes que expresan el gen frente a 110 pacientes que no lo expresan, por tanto pensamos que puede deberse a que la técnica de RT-PCR elegida, podría no ser útil cuando queremos ver la expresión de un gen que se encuentra en muy pocas células y en cantidades muy pequeñas. Sin embargo, es una técnica utilizada y con resultados buenos



para marcadores epiteliales. En un estudio de 67 pacientes con CPCNP se evaluó la expresión de CK19 del ARNm de la sangre por la RT-PCR nido antes y después de quimiorradiación dada con un intento curativo (Chen TF et al., 2007). La detección de la CK19 en el ARNm después del tratamiento se correlacionó con una supervivencia global y una supervivencia libre de enfermedad inferiores. Los pacientes con peor supervivencia fueron los que tuvieron la expresión positiva de CK19 antes y después del tratamiento. El análisis multivariante mostró la expresión positiva de CK19 después del tratamiento como factor independiente de mal pronóstico para la supervivencia global y para la supervivencia libre de enfermedad (Chen TF et al., 2007). La presencia de CTCs fue detectada utilizando el ensayo ELISA con RT-PCR de sangre periférica de 143 pacientes con CPCNP (Yie SM et al., 2009). La detección de CTCs se correlacionó con el estadio de la enfermedad, el tiempo de recaída y de supervivencia. En el análisis multivariante la detección de CTCs fue factor independiente para predecir la recurrencia y la supervivencia. (Yie SM et al., 2009; Mavroudis D., 2010). Por tanto, la utilización de la técnica de RT-PCR no es del todo desacertada, pero teniendo en cuenta que el gen *SNAIL2* se expresa en muy pocas células, y supuestamente está relacionado con células madre, necesitaríamos hacer un estudio más preciso con una técnica más sensible, porque posiblemente en nuestro estudio hay varios casos de falsos negativos.

Podemos concluir nuestro estudio en sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón que si la detección de genes relacionados con el tumor en la sangre puede ser utilizada para el diagnóstico de cáncer de pulmón en un estadio temprano, todavía no se ha demostrado, pero en nuestro estudio hemos comprobado que el gen *SNAIL2* se expresa principalmente en pacientes con estadio localizado, lo cual podría indicar que el momento de migración de las células cancerígenas se origina en los estadios tempranos en los pacientes que posteriormente sufrirán metástasis. El hecho de que los pacientes con metástasis expresen en menor porcentaje el gen nos puede inducir a pensar, que la célula ya ha migrado, y se ha depositado en el sitio secundario, por lo tanto detectar su expresión en sangre periférica resulta bastante difícil. El estudio de (Ge MJ et al., 2009) tampoco encontró una correlación significativa entre el estadio IV de los pacientes con cáncer de pulmón con las CTCs, y su explicación se basa en que las células tumorales entran de manera intermitente en el torrente sanguíneo, por lo que tendría que haber un muestreo secuencial. Nosotros creemos que sería imposible una solución así pensando en los pacientes.

## 5.2 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE E-CADHERINA, VIMENTINA, NOTCH1 Y SNAIL EN TUMORES PRIMARIOS DE CÁNCER DE PULMÓN.

En nuestro estudio intentamos caracterizar la expresión de varios marcadores relacionados con el fenómeno de TEM y con CMCs en tumores primarios de cáncer de pulmón. La utilización de tejidos nos permite asegurar los especímenes del tumor y de tejido epitelial, y la imagen de la expresión inmunohistoquímica nos permite caracterizar la expresión de cuatro marcadores de la TEM en una muestra de 87 tejidos tumorales con especímenes epiteliales. La inmunohistoquímica como método para detectar la expresión de proteínas en tejidos embebidos en parafina ha resultado ser muy específico y sensible (Zafrani B et al., 2000). Sin embargo la especificidad de una prueba inmunohistoquímica nunca superaría la especificidad del anticuerpo proporcionado por el fabricante. No obstante, una fuente de error adicional posible puede ser la variación biológica de la expresión de la proteína en diferentes áreas del tejido tumoral. Sin embargo esta fuente de sesgo se puede reducir incrementando el número de tejidos examinados (Al-Saad S et al., 2008), en esta tesis hemos examinado 87 muestras de tejidos un número que tiende a ser bajo para que los resultados sean precisos. Demostramos que el adenocarcinoma y el carcinoma epidermoide tienen grandes niveles del fenotipo de TEM, igual que (Prudkin L et al., 2009). Hemos querido comprobar la expresión de E-cadherina y de Vimentina porque son las huellas del proceso de la TEM. Recientemente se ha publicado que una de la vías de señalización de la TEM es Notch, y en particular la forma de Notch1 se ha relacionado con Snail2 (Leong KG et al., 2007), un factor de transcripción clave para regular la TEM (Nieto MA., 2002). Los marcadores Notch1 y Snail2, además están presentes en las supuestas CMCs o bien, dotan a las células con características de célula madre. Los tumores están definidos por su potencial invasivo y metastásico. Este potencial puede estar iniciado por células tumorales vía TEM, y múltiples cambios moleculares histológicos y transcripcionales relacionados con el desarrollo de este fenotipo durante la progresión del carcinoma (Thompson EW et al., 2005). Este proceso está caracterizado por modificaciones morfológicas, incluyendo que las células polarizadas epiteliales adquieren una motilidad no polarizada, y los cambios moleculares, incluyendo la expresión alterada de factores de transcripción y la expresión modificada de moléculas del citoesqueleto y de adhesión (Thiery JP et al., 2003). El proceso de TEM se ha descrito extensamente para varios tipos de cáncer, particularmente cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de próstata (Hugo H et al., 2007; Bates RC., 2005; Tomita K et al., 2000; Peinado H et al., 2004). En cáncer de pulmón, la pérdida o inicio de moléculas de adhesión y la expresión de proteínas mesenquimales clásicas se han asociado con la inducción de cambios mesenquimales y la agresividad del carcinoma (Yauch RL et al.,

2005). Además la expresión de factores de transcripción como Snail2 se ha asociado con la TEM.

La adhesión celular mediada por la cadherina está considerada como un supresor de la invasión celular en cáncer *in vitro* (Behrens J et al., 1993). La pérdida de la expresión de E-cadherina y la adquisición de un fenotipo mesenquimal, se ha correlacionado con un mal pronóstico en varios tumores sólidos de carácter epitelial (Strathdee G., 2002). La expresión baja de E-cadherina en tumores de CPCNP se ha mostrado en varios estudios (Liu D et al., 2001) asociada con un comportamiento más agresivo de las células epiteliales tumorales y con un peor pronóstico. También se ha reportado la expresión reducida de E-cadherina previamente en especímenes de tejidos de adenocarcinomas y carcinomas epidermoides de pulmón (Bremmes RM et al., 2002; Kase L et al., 2000; Deeb G et al., 2004). Al contrario de lo que podríamos esperar nuestros resultados muestran una expresión de E-cadherina muy alta en la mayoría de las muestras, lo cual puede deberse a que hemos medido la expresión de los anticuerpos en el centro tumoral, donde predominan las células epiteliales sin tener en cuenta la expresión en el estroma o tejido circundante del tumor. Sin embargo, para algunos autores la expresión de E-cadherina en el foco tumoral demuestra que el fenotipo epitelial de las lesiones tumorales se preserva incluso cuando los rasgos mesenquimales están presentes (Blanco D et al., 2004). Otros estudios han demostrado que las células del cáncer en el centro del tumor permanecen positivas para la expresión de E-cadherina, y son las células tumorales de la periferia propensas a la invasión las que tienen una pérdida de la superficie de E-cadherina (Brabletz T et al., 2001). Por tanto, en nuestro estudio la expresión de E-cadherina puede confirmar el fenotipo epitelial del tejido tumoral.

La Vimentina está considerada como la huella de la diferenciación mesenquimal de las células, y su expresión en líneas celulares de cáncer de pulmón se ha asociado previamente con otros cambios relacionados al fenómeno TEM (Yauch RL et al., 2005; Purdkin L et al., 2009). La Vimentina es una proteína estructural de células de origen mesenquimal (Leader M et al., 1987). Su expresión es mayor en células epiteliales migratorias y puede contribuir a la migración y a un fenotipo invasivo de células metastásicas (Bindels S et al., 2006). Las correlaciones significativas entre una expresión celular tumoral alta de Vimentina y un mal pronóstico se ha mostrado en el carcinoma hepatocelular (Hu L et al., 2004) y para cáncer de mama (Dandachi N et al., 2001), en cáncer de pulmón también se ha visto que la expresión de Vimentina era un factor pronóstico independiente de peor supervivencia en los pacientes con cáncer de pulmón resecaado (Al-Saad S et al., 2008). En nuestro estudio no hemos encontrado ninguna correlación de Vimentina con la supervivencia, lo mismo le sucedió a (Pelletier MP et

al., 2001) que en su estudio de 113 pacientes de cáncer de pulmón resecaados no encontró ninguna correlación entre Vimentina y la supervivencia. La expresión de Vimentina en este estudio se ha correlacionado positivamente con la expresión de Notch1, lo que nos confirma el papel de Notch1 en dotar a las células con un fenotipo mesenquimal.

Otra correlación positiva que hemos encontrado ha sido la expresión de Notch1 con la expresión de Snail2. Muchas vías de señalización, como Notch, tienen un papel importante en la inducción de TEM (Min C et al., 2008; Wu Y y Zhou BP., 2008; Leong KG et al., 2007). La activación de la señalización de Notch se conoce para regular la expresión de sus genes diana, y así tener unas funciones importantes en el crecimiento y desarrollo, incluyendo la regulación de la proliferación y la apoptosis (Miele L., 2006; Miele L., 2006; Wang Z et al., 2006). Por tanto, no sorprende que las alteraciones de la señalización de Notch estén asociadas con la tumorigénesis (Wang Z et al., 2006; Miele L et al., 2006; Miele L., 2006). Además, se ha publicado que Notch está involucrado en la inducción de la TEM durante la progresión del tumor y convierte las células epiteliales en móviles y células invasivas (Leong KG et al., 2007) la sobreexpresión de Jagged-1 y Notch1 induce la expresión de Snail2 y se correlaciona con un mal pronóstico en varios cánceres humanos (Leon KG et al., 2007). Snail2 también es esencial para la TEM mediada por Notch por reprimir la expresión de E-cadherina (Wang Z et al., 2009). Además (Niessen K et al., 2008) mostraron que Snail2 está sobre-regulado directamente por Notch en células endoteliales y que la expresión de Snail2 se requiere para la represión mediada por Notch del promotor de la cadherina endotelial vascular y para promover la migración de células endoteliales transformadas. Nuestro estudio la expresión de Notch1 se correlaciona significativamente con la expresión de Snail2, con lo que parece está en concordancia con la literatura. Existe expresión de SNAIL2 cuando hay expresión de NOTCH1, en el tejido tumoral de diferentes tipos de cáncer de pulmón.

Snail2 es un miembro de la superfamilia Snail de factores de transcripción (Nieto MA., 2002). La superfamilia Snail se ha encontrado en *Drosophila* y así en muchas especies, incluyendo no vertebrados, vertebrados y humanos (Nieto MA., 2002). La superfamilia Snail en humanos incluye Snail2, Snail1, Scraht1 y Scraht2. Estas proteínas comparten una función conservada evolutivamente y están implicadas en la generación y migración de células del mesodermo y de la cresta neural en varias especies (Ros MA et al., 1997; Savagner P et al., 1997). La TEM es un proceso que permite a las células epiteliales separarse de las células vecinas y migrar para poblar regiones distales durante el desarrollo embrionario (Savagner P et al., 2001; Thiery JP., 2003; Peinado H et al., 2004; Ohkubo Y et al., 2004). La TEM confiere propiedades migratorias e invasivas durante los movimientos de la gastrulación y la formación de la cresta neural pero

también se ha sugerido para jugar un papel fundamental durante la invasión y metástasis de células de carcinoma (Thiery JP., 2003). Los miembros de la superfamilia Snail han sido implicados en ocupar una posición central en la activación de la TEM en situaciones fisiológicas y patológicas (Carver EA et al., 2001). Otro aspecto que destaca es que la pérdida de E-cadherina se encuentra en muchos cánceres sólidos, y es la huella principal del fenómeno TEM, y parece ser que la represión de E-cadherina se debe al factor de transcripción Snail2. Sin embargo, el papel de Snail2 como un represor potencial de E-cadherina es dudoso, la sobreexpresión de Snail2 en células de carcinoma de vejiga de rata no fue capaz de suprimir la E-cadherina, sino inducida por la disociación de desmosoma. Además una colección de líneas celulares de queratinocitos epidermales de ratón no demostró ninguna correlación entre los perfiles de expresión de E-cadherina y Snail2 (Cano A et al., 2000). Sin embargo (Hajra KM et al., 2002), reportaron que Snail2 es el represor de E-cadherina en líneas celulares de carcinoma de mama. Por tanto, es una relación importante que conviene seguir investigando pero tendríamos que definir con mucha exactitud la parte del tumor donde la expresión de la E-cadherina nos confirme la pérdida del fenotipo epitelial de las células para que adquieran el fenotipo mesenquimal y así dar lugar a una migración celular. Para que se pueda concretar con datos a nivel global.

### **5.2.1 Formación de Cluster**

Uno de nuestros objetivos es encontrar un fenotipo celular que caracterice o esté relacionado con las supuestas CMC en cáncer de pulmón, para ello utilizamos el método de los clusters estadísticos. Si definimos cluster como un racimo, conjunto o grupo nos encontramos precisamente con un grupo de células que representa el 77,5 % de la muestra total que se caracteriza por ser positivo para la expresión de Notch1, positivo para la expresión de Snail2, positivo para la expresión de Vimentina. Con la expresión de estos tres anticuerpos podemos decir que el fenotipo celular es de célula madre por la expresión de los anticuerpos NOTCH1 y SNAIL2, que como ya hemos comentado en la introducción de cada uno de ellos se expresan en células madre y en las supuestas CMC. En cuanto a la expresión de VIMENTINA, aunque también se ha visto alguna relación con célula madre (comentado en la introducción), principalmente su papel podría estar relacionado con la TEM, puesto que es una de las principales proteínas características de este fenómeno. Además, el tipo de cáncer de pulmón donde aparece este fenotipo es en CPCNP, en los subtipos histológicos de epidermoides y adenocarcinomas, si nos basamos en la literatura posiblemente este resultado nos parece el más coherente puesto que el CPCP está menos estudiado por su problema a la hora de

obtener material tumoral para estudio, y por tanto, la mayoría de los estudios en cáncer de pulmón están realizados en pacientes con CPCNP. Por otro lado, la expresión de NOTCH1 en CPCP donde predomina la diferenciación neuroendocrina se considera que está bajo-regulada o no se expresa (Shan L et al., 2007). Otro de los parámetros clínicos que pertenece este grupo de células es el Estadio, y concretamente aparecen los estadios IIB y IIIB. El estadio IIB se puede considerar temprano, pero es precisamente en estos estadios tempranos donde la TEM puede tener un papel importante en la carcinogénesis, porque las células pueden pasar de una diferenciación epitelial a una mesenquimal, y dar así lugar a la migración celular.

### **5.2.2. Factores pronóstico Notch1 y Snail2**

Cuando hacemos el análisis multivariado nos hemos encontrado con tres factores diferentes que no tienen correlación entre ellos. La primera relación que nos hemos encontrado ha sido la expresión en positivo de Notch1 con la expresión de Vimentina en positivo en CPCP. La correlación entre Notch1 y Vimentina se ha comentado anteriormente, y además en el cluster nos ha dado relacionadas con el tipo de CPCNP. La aparición ahora de una relación con CPCP necesita un estudio más detallado para poder obtener unas conclusiones más precisas en cuanto a la función de Notch1 en este tipo de tumores como comentaremos más adelante. El segundo factor que nos encontramos es la relación del gen Snail2 en sangre periférica con el estadio localizado de los pacientes, de nuevo obtenemos el mismo resultado que ya hemos comentado anteriormente en el estudio del gen en la sangre periférica de los pacientes. Sin embargo, uno de nuestros objetivos es ver si existe relación del gen Snail2 en sangre periférica de los pacientes con cáncer de pulmón y el tumor primario y no hemos obtenido ningún resultado positivo, pero nos vuelve a marcar el estadio localizado. Por tanto, quizá uno de los principales objetivos sea un estudio profundo de los pacientes con cáncer de pulmón con estadio localizado, porque son los pacientes en los que se puede evitar o cortar la migración celular a órganos distantes. Y el tercer componente, nos da la relación de la expresión de E-cadherina alta con los pacientes no fumadores, como ya hemos comentado anteriormente la expresión de E-cadherina puede evitar la migración celular y por tanto dar lugar a que la metástasis no se dé, y por otra parte el hecho de ser no fumador también es de mejor pronóstico para el cáncer de pulmón. El tabaco es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de cáncer de pulmón. Se estima que el 80% de las muertes por cáncer de pulmón en hombres y el 75 % en mujeres son atribuibles al hábito tabáquico. El riesgo de padecer cáncer de pulmón aumenta con el número de cigarrillos fumados y con la duración. No se conoce con exactitud el mecanismo de acción por el que los componentes de tabaco pueden inducir en la

carcinogénesis. Los fumadores pasivos muestran un riesgo incrementado para padecer cáncer de pulmón en relación con la población general (Cruz JJ., 2004). Por tanto esta relación es coherente con la teoría, sin embargo la relación de la pérdida de expresión de E-cadherina con los fumadores que podría tener un interés mayor no se ha visto en nuestro estudio.

Por otra parte, nuestro estudio pretende establecer un modelo predictivo para diagnosticar la expresión en positivo de Notch1 y Snail2 en cáncer de pulmón, por eso queremos ver la relación que existe de cada una de ellas con las características clínicas de los pacientes incluidos en este estudio. Para Notch1 la única relación significativa ( $p= 0,001$ ) es con la Anatomía Patológica con el tipo CPCP (Microcítico), aunque con un IC muy amplio (2,72-71, 43). Un resultado posible de las interacciones célula-célula mediada por la familia de receptores de Notch se refiere a decisiones binarias del destino celular, con la activación de Notch favoreciendo un destino u otro. Esto puede representar una opción para las células hijas entre uno o dos destinos nuevos, o alternativamente, adoptando un nuevo destino en comparación con mantener su estado original (Artavanis-Tsakonas S et al., 1999). Así, una función crítica de Notch en el desarrollo y la homeostasis es el mantenimiento de la viabilidad de la célula madre a través de una división celular asimétrica, como se ha demostrado en las células madre de la médula ósea, cerebro, criptas intestinales y el epitelio mamario (Lowry WE y Richter L., 2007). Una vista simplificada de la señalización de Notch, los receptores en una célula están activados por los ligandos en una célula contigua, llevando por último a una activación de las dianas transcripcionales, principalmente a un conjunto de factores de transcripción hélice-bucle-hélice inhibitorios. Los estudios en ratones knockout demuestran un requerimiento para la señalización de Notch en el desarrollo del pulmón. Elevados ligandos de Notch, receptores y Hes1 se han demostrado en líneas de CPCNP y la señalización de Notch también parece estar entre los efectores principales corriente abajo del oncogénico RAS, lo cual comúnmente representa un estado maligno. La relevancia de la señalización de Notch en la patogénesis del CPCNP se ha demostrado cuando se ha bloqueado su activación y se ha visto un crecimiento tumoral reducido del CPCNP y un aumento en la apoptosis. Paradójicamente, la sobreexpresión de Notch1 activado inhibe in vitro la clonogenicidad e in vitro la tumorigenicidad de líneas de adenocarcinoma de pulmón A-549, lo que subraya la complejidad de la vía de Notch y los diversos papeles que puede jugar en los diferentes subtipos de cáncer de pulmón. HES 1 bloquea la transcripción de human achaete-scute homolog-1 el cual es altamente expresado en CPCP, un tumor con características neuroendocrinas (NE). Los pulmones de ratones Knockout para *Hes1* tienen una marcada diferenciación NE incrementada con una disminución proporcionada en células Claras (Ito T et al., 2000). La expresión del

receptor de Notch es muy raro verlo en CPCP, pero la sobreexpresión de receptores de Notch activados inhibe el crecimiento de CPCP (Sriuranpong V et al., 2001). La activación de la señalización de Notch produce efectos antitumorales en otros tumores neuroendocrinos, carcinoides pulmonares, lo cual se asocia con niveles reducidos de human achaete-scute homolog-1. Así la hipótesis vista parece que los defectos de la vía de Notch facilita el mantenimiento de un fenotipo NE primario (Peacock CD y Watkins DN., 2008). Con nuestros resultados no podemos explicar si la expresión de Notch1 en los pacientes con CPCP de este estudio es supresora o tienen un mejor pronóstico que los pacientes que no lo expresan, para ello necesitamos hacer un estudio con una muestra muy grande de pacientes con CPCP y su correspondiente historia clínica.

Para el caso de Snail2 también la única relación significativa es con la Anatomía Patológica y concretamente con la subclase de Adenocarcinoma. Está en la literatura que Snail2 se expresa en el adenocarcinoma de pulmón dotando al tumor con mayor agresividad y estado maligno de la enfermedad (Chiou SH et al., 2010; Shih JY et al., 2005), y además las células presentan mayor resistencia a inhibidores del EGFR como el gefitinib en un estudio de 44 pacientes con adenocarcinoma de pulmón (Chang TH et al., 2011). Por tanto, la expresión de Snail2 en el tejido tumoral de pacientes con adenocarcinoma de pulmón podría servir como un biomarcador de pronóstico pobre, aunque en este trabajo no se haya identificado su expresión con un pronóstico peor de los pacientes estudiados, probablemente porque la muestra no es suficientemente significativa, se necesita una muestra mayor para poder asegurar un resultado más fiable.

### **5.3. SUPERVIVENCIA EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN**

El análisis de supervivencia nos ha dado como resultado que los CPCP o Microcíticos tienen una supervivencia más corta que los CPCNP. Como ya es conocido el carcinoma Microcítico de pulmón es un tumor muy agresivo con un tiempo de duplicación muy corto (30 días) y con una gran capacidad para metastatizar por vía hemática o linfática (Cruz JJ., 2004). Otro dato significativo ha sido el estadio IV de la enfermedad, con una supervivencia menor y con mayor supervivencia para los estadios I y II. El estadio IV corresponde con la enfermedad diseminada a otros órganos distantes.

Sin embargo, el dato de interés en esta tesis ha sido el resultado obtenido en la supervivencia de los Conglomerados, con una supervivencia menor del Conglomerado 1 (15 meses) respecto del Conglomerado 2 (41 meses). Recordamos que al Conglomerado 1 pertenecían los



pacientes que expresaban Notch1, Snail2 (T) y Vimentina, caracterizado por la presencia de moléculas ligadas a las CMCs y al programa de TEM, argumento fundamental en esta tesis. Hemos comentado a lo largo de este trabajo la importancia de las CMCs en el origen y mantenimiento del tumor, igualmente el programa de TEM en la migración celular dando lugar a metástasis a órganos distantes. Parece que esta supervivencia menor y con una diferencia de 26 meses, nos podría confirmar la teoría en la que se ha basado esta tesis. No obstante, tenemos que ser precavidos con los resultados porque es el primer trabajo que lo confirma.

Por otro lado, en el análisis multivariado con todos los predictores significativos de este trabajo en el TS, Anatomía Patológica, Estadio y Conglomerado 1, obtuvimos como mejor predictor el Estadio coincidiendo con (Strauss GM., 1997) que aseguró que el estadio TNM era la variable más importante para determinar la supervivencia. Le sigue como segundo más importante el Conglomerado 1 y la Anatomía Patológica deja de ser significativa, precisamente la categoría histológica que se encuentra en el Conglomerado 1 es el CPCNP, lo cual confirma que la Anatomía Patológica no es una variable de confusión.

Cuando hacemos el estudio del Éxito con el TNM por separado, obtenemos solamente una relación significativa que corresponde con la N, o número de ganglios afectados. La N describe la propagación del cáncer a los nódulos linfáticos adyacentes (regionales). Los cánceres a menudo se propagan a los ganglios linfáticos antes de afectar a otras partes del cuerpo (American Cancer Society., 2011).

Por otra parte en este trabajo hemos considerado los resultados de los Residuos Corregidos estadísticos ya explicados en el apartado de material y métodos. Teniendo en cuenta, estos datos podríamos obtener otras relaciones significativas con el Éxito. Una de ellas sería con la metástasis inicial, M, lo cual corrobora el resultado con el estadio IV, puesto que para un valor positivo de M equivale a un cáncer diseminado. Las otras relaciones casi significativas del Éxito corresponden con los anticuerpos estudiados, el primero con E-cadherina, cuando el anticuerpo se expresa por debajo del punto de corte (en este caso 60 % celular), aparecen más casos de Éxito, como ya hemos comentado anteriormente la pérdida de expresión de E-cadherina corresponde con un pronóstico peor en cáncer de pulmón. Por último, la relación de la expresión del gen *Snail2* en sangre periférica con el Éxito implica que se mueren más pacientes que lo expresan y hay más pacientes vivos cuando no expresan el gen *Snail2*. *Snail2* está implicado en migración celular y se ha visto en muchos tipos de cánceres y con un pronóstico malo, este trabajo sería el primero que obtiene un resultado así del gen *Snail2* en

sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón. Sin embargo, como hemos comentado al inicio de este párrafo son datos que solamente podemos considerar como tendencias y no sabemos el grado de certeza que tienen. Por tanto, necesitamos seguir trabajando, con la inclusión de un mayor número de pacientes en el estudio.

#### **5.4. NOTCH1 Y SNAIL2 EN LA TEM Y EN LAS CMCs ¿UNA ESPERANZA PARA EL CÁNCER DE PULMÓN?**

El descubrimiento de que la TEM genera células con propiedades de célula madre como la autorrenovación puede ser un hallazgo positivo para explicar el crecimiento de metástasis en un sitio secundario del tumor. La TEM se ha reportado para ser un paso crítico en la invasión tumoral y la metástasis. Durante el proceso de metástasis el programa de TEM permite a estas células madre del cáncer diseminarse desde el tumor primario, y también promueve su capacidad de autorrenovación para asegurar la generación de masa tumoral crítica para la progresión de micro a macro metástasis. Por tanto, las células del cáncer metastásicas podrían derivar no solamente de las CMCs preexistentes como una subpoblación del tumor primario, también pueden derivar de células epiteliales primarias que experimentan una TEM y adquieren un comportamiento mesenquimal y metastásico (Ouyang G et al., 2010). Las vías de señalización que inducen la TEM como Notch, incitan a las células epiteliales bien diferenciadas para convertirlas en células mesenquimales móviles vía activación de factores de transcripción como Snail2 o Twist 1 entre otros. El papel crítico de la vía de señalización en promover la TEM y el mantenimiento de la troncalidad de las células madre soporta la idea de que las células del cáncer a menudo reactivan programas de desarrollo latentes para regular el proceso de varios pasos en tumorigénesis. Además, la embriogénesis normal y la tumorigénesis comparten muchos de los procesos básicos y vías moleculares. Las CMCs y sus células madre del tejido normal comparten muchas propiedades fenotípicas y funcionales incluyendo la capacidad para autorrenovarse. Notch se ha implicado en la autorrenovación de células madre normales y neoplásicas. Por tanto, el conocimiento adquirido de los “jugadores” multifacéticos de la TEM durante el desarrollo, pueden proporcionar información útil para descubrir los papeles de estos reguladores de la TEM en la generación y el mantenimiento de las CMCs en la tumorigénesis y en la metástasis, y ofrecer nuevas dianas terapéuticas con el potencial necesario para ir más allá de los tratamientos tradicionales (Ouyang G et al., 2010).

## ***6. CONCLUSIONES***

1ª.- El estudio del gen Snail2 en sangre periférica, como posible marcador de células tumorales circulantes en cáncer de pulmón en nuestro estudio ha mostrado:

a.- El gen está presente en un alto porcentaje de pacientes con cáncer de pulmón, mostrando diferencias significativas respecto de la población control.

b.- Este aumento de posibles células tumorales circulantes es más importante en fases iniciales de la enfermedad.

2ª.- El estudio de la expresión proteica en el tejido tumoral, determinadas por Inmunohistoquímica y relacionadas con la TEM y Células madre tumorales, demuestra un aumento significativo de la expresión de Vimentina, Notch1 y Snail2.

3ª.- El cluster aplicado a los resultados de la expresión proteica en el tejido tumoral, ha determinado que se pueda identificar como patrón de célula madre: la sobreexpresión de Notch1, Snail2 y Vimentina, en pacientes con tumores locales y de histología epidermoide o de adenocarcinoma.

4ª.- No se encontró relación de este cluster con el aumento de expresión de Snail2 en sangre periférica ni con la baja expresión de E-cadherina, por lo cual es posible, que la sola expresión de dicho cluster no implique aumento de capacidad de emigrar (TEM).

5ª.- El análisis de supervivencia de nuestro estudio, es coherente en relación a los factores pronósticos clásicos, mostrando el análisis univariable, peor supervivencia para los estadios IV, y el tipo histológico microcítico.

6ª.- El análisis de supervivencia respecto a los factores implicados en la TEM y características de célula madre, mostraron, en el análisis univariable, peor supervivencia los pacientes con tumores que sobreexpresaban Snail2 en sangre periférica y con baja expresión de E-cadherina. Cuando se estudiaron en relación al cluster, caracterizado por sobreexpresión de Vimentina Notch1 y Snail2 (T), fue este el que tenía peor supervivencia.

7ª.- En el análisis multivariable fueron factores pronósticos independientes de supervivencia el estadio IV y el cluster de posibles células madres.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

1. Aktas B, Tewes M, Fehm T, Haunch S, Kimmig R, et al. "Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients". *Breast Cancer Res.* 2009; 11(4): R46.
2. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells". *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:3983-88.
3. Alix-Panabières C, Riethdorf S, Pantel K. "Circulating tumor cells and bone marrow Micrometastasis". *Clin Cancer Res.* 2008; 14 (16): 5013-21.
4. Allenspach EJ, Maillard I, Aster JC, Pear WS. "Notch signaling in cancer". *Cancer Biol Ther.* 2002; 5: 466-76.
5. Al-Saad S, Al-Shibli K, Donnem T, Persson M, Bremnes RM, et al. "The prognostic impact of NF- $\kappa$ B p105, vimentin, E-cadherin and Par6 expression in epithelial and stromal compartment in non-small cell lung cancer". *British J Cancer.* 2008; 99 (9): 1476-83.
6. Anastasiadis PZ, Reynolds AB. "Regulation of Rho GTPases by p-120-catenin". *Curr Opin.* 2001; 13. 604-10.
7. Andersen H, Mejlvang J, Mahmood S, Gromova I, Gromov P, et al. "Immediate and delayed effects of E-cadherin inhibition on gene regulation and cell motility in human epidermoid carcinoma cells". *Mol Cell Biol.* 2005 oct; 25(20): 9138-50.
8. Aplin JD, Haigh T, Vicovac L, Church HJ, Jones CJ. "Anchorage in the developing placenta: an overlooked determinant of pregnancy outcome?" *Hum Fertil (Camb).* 1998; 1: 75-9.
9. Arai F, Hiara A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, et al. "Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche". *Cell.* 2004; 118(2): 149-61.
10. Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. "Notch signaling". *Science.* 1995; 268: 225-32.
11. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development". *Science.* 1999; 284: 770-6.
12. Ball DW, Azzolo CG, Baylin SB, Chi D, Dou S, et al. "Identification of a human achaete-scute homologue highly expressed in neuroendocrine tumors". *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 5648-52.
13. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. "Evolutionary history of the Snail/Scratch superfamily". *Trends Genet.* 2009; 25(6): 248-52.
14. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. "The snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer". *Development.* 2005; 132(14): 3151-6.

15. Bartkowiak K, Wieczorek M, Buck F, Harder S, Moldenhauer J, et al. "Two dimensional differential gel electrophoresis of a cell line derived from a breast cancer micrometastasis revealed a stem/progenitor cell protein profile". *J Proteome Res.* 2009; 8(4): 2004-14.
16. Bates RC. "The alphaVbeta6 integrin as a novel molecular target for colorectal cancer". *Future Oncol.* 2005, 1: 821-8.
17. Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, Van Roy F, et al. "Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene". *J Cell Biol.* 1993; 120(3): 757-66.
18. Bernards R, Weinberg RA. "A progression puzzle". *Nature.* 2002; 418: 823-4.
19. Bhatia B, Singhal S, Lawrence JM, Khaw PT, Limb GA. "Distribution of Müller stem cells within the neural retina: evidence for the existence of a ciliary margin-like zone in the adult human eye". *Exp Eye Res.* 2009; 89: 373-82.
20. Bianchi F, Nicassio F, Di Fiore PP. "Unbiased vs biased approaches to the identification of cancer signatures: the case of lung cancer". *Cell Cycle.* 2008; 7: 729-34.
21. Bindels S, Mestdagt M, Vandewalle C, Jacobs N, Volders L, et al. "Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells". *Oncogene.* 2006; 25(36): 4975-85.
22. Bischof P. "Implantation of the human embryo: research lines and models. From the implantation research network 'Fruitful'". *Gynecol Obstet Invest.* 2006; 62: 206-16.
23. Blanco D, Vicent S, Elizegi E, Pino I, Fraga MF, et al. "Altered expression of adhesion molecules and epithelial-mesenchymal transition in silica-induced rat lung carcinogenesis". *Labor Invest.* 2004; 84(8): 999-1012.
24. Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A, Waltham M, Thompson EW, et al. "Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells". *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010:
25. Borczuk AC, Toonkel RL, Powell CA. "Genomics of lung cancer". *Am Thorac Soc.* 2009; 6: 152-58.
26. Borthwick DW, Shahbazian M, Krantz QT, Dorin JR, Randell SH. "Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium". *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 24: 662-70.
27. Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, et al. "Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin". *Cells Tissues Organs.* 2005; 179: 56-65.

28. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, et al. "Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment". *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(18): 10356-61.
29. Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, et al. "Cytokeratin-positive bone marrow micrometastases and survival of breast cancer patients with stage I-III disease". *N Eng J Med*. 2000; 342(8): 525-33.
30. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, et al. "A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer". *N Engl J Med*. 2005; 353(8): 793-802.
31. Bremmes RM, Veve R, Gabrielson E, et al. "High-throughput tissue microarray analysis used to evaluate biology and prognostic significance of the E-cadherin pathway in non-small cell lung cancer". *J Clin Oncol*. 2002; 20(10): 2417-28.
32. Brennan K, Brown AM. "Is there a role for Notch signaling in human breast cancer?" *Breast Cancer Res*. 2003; 5(2): 69-75.
33. Calle Y, Burns S, Thasher AJ, Jones GE. "The leukocyte podosome". *Eur J Cell Biol*. 2006; 85: 151-57.
34. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, et al. "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression". *Nat Cell Biol*. 2000; 2: 76-83.
35. Capobianco AJ, Zagouras P, Blaumueller CM, Artavanis-Tsakonas S, Bishop JM. "Neoplastic transformation by truncated alleles of human NOTCH1/TAN1 and NOTCH2". *Mol and Cellular Biol*. 1997; 17(11): 6265-73.
36. Cardoso WV, Lu J. "Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies". *Development*. 2006; 133: 1611-24.
37. Carver EA, Jiang R, Lan Y, Oram KF, Gridley T, et al. "The mouse Snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition". *Mol Cell Biol*. 2001; 21(23): 8184-8.
38. Castaldo G, Tomaiuolo R, Sanduzzi A, Ponticiello A, Marchetiello I, et al. "Carcinoembryonic antigen mRNA analysis detects micrometastatic cells in blood from lung cancer patients". *Eur Respir J*. 2003; 22: 418-21.
39. Catalano A, Rodilossi S, Ripo MR, Caprari P, Procopio A. "Induction of Stem cell Factor /ckit7Slug Signal Transduction in multidrug-resistant Malignant mesothelioma Cells". *J Biol Chem*. 2004; 279(45):46706-14.
40. Cavallaro U, Christofori G. "Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules". *Ann NY Acad Sci*. 2004; 1014: 58-66.
41. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites". *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 563-72.



42. Chang TH, Tsai MF, Su KY, Wu SG, Huang CP, et al. "Slug confers resistance to the epidermal growth factor receptor Tyrosine kinase inhibitor". *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Apr 15; 183 (8):1071-9.
43. Chausovsky G, Luchansky M, Figer A, Shapira J, Gottfried M, et al. "Expression of cytokeratin 20 in the blood of patients with disseminated carcinoma of the pancreas, colon, stomach and lung". *Cancer*. 1999; 86(11): 2398-405.
44. Chen J, Imana KN, Chen J, Griffin JD. "Hypoxia potentiates Notch signaling in breast cancer leading to decreased E-cadherin expression and increased cell migration and invasion". *Br J Cancer*. 2010; 102(2): 351-60.
45. Chen TF, Jiang GL, Fu XL, Wang LJ, Qian H, et al. "Ck19 mRNA expression measured by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in the peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer treated by chemo-radiation: an independent prognostic factor". *Lung Cancer*. 2007; 56(1): 105-14.
46. Chen Y, De Marco MA, Graziani I, Gazdar AF, Strack PR, et al. "Oxygen concentration determines the biological effects of NOTCH1 signaling in adenocarcinoma of the lung". *Cancer Res*. 2007; 67: 7954-59.
47. Chen Y, Li D, Liu H, Xu H, Zheng H, et al. "Notch1 signaling facilitates surviving expression in human non-small cell lung cancer cells". *Cancer Biol Ther*. 2011; 11(1): 14-21.
48. Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, et al. "Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel". *Cancer Res*. 2007; 67(5): 1979-87.
49. Chiba S. "Concise Review: Notch signaling in stem cell systems". *Stem Cells*. 2006; 24: 2437-47.
50. Chiou SH, Wang MC, Chou YT, Chen CJ, Hong CF, et al. "Coexpression of Oct4 and Nonog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation". *Cancer Res*. 2010 Dec 15; 70 (24):10433-44.
51. Chow G, Tauerl J, Mulshine JL. "Cytokines and growth factors stimulate Hyaluronan production: role of Hyaluronan in epithelial to mesenchymal-like transition in non-small cell lung cancer". *J Biomed and Biotechnol*. 2010, Doi:10.1155/2010/485468.
52. Christofori G. "New signals from the invasive front". *Nature*. 2006; 441: 444-50.
53. Chu S, Xu H, Ferro TJ, Rivera PX. "Poly (ADP-ribose) polymerase-1 regulates vimentin expression in lung cancer cells". *Am J Physiol lung Cell Mol Physiol*. 2007; 293: 1127-34.

54. Cobaleda C, Pérez-Caro M, Vicente-Dueñas C, Sánchez-García I. "Function of the zinc-finger transcription factor Snail2 in cancer and development". *Annu Rev Genet.* 2007; 41: 41-61.
55. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. "Lung cancer: diagnosis and management". *Am Fam Physician.* 2007; 75: 56-63.
56. Correia I, Chu D, Chou Y-H, Goldman RD, Matsudaira P. "Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. Adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages". *J Cell Biol.* 1999; 146: 831-42.
57. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck K, et al. "Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer". *J Clin Oncol.* 2005; 23(7): 1420-30.
58. Cruz-Hernández JJ. "Lecciones de oncología clínica". 2004 Nova Sidonia 3ª Ed.
59. Dandachi N, Hauseer-Kroberger C, More E, Wiesener B, Hacker GW, et al. "Co-expression of tenascin-C and vimentin in human breast cancer cells indicates phenotypic transdifferentiation during tumour progression: correlation with histopathological parameters, hormone receptors, and oncoproteins". *J Pathol.* 2001; 193(2): 181-9.
60. Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB. "A core function for p-120-catenin in cadherin turnover". *J Cell Biol.* 2003; 163: 525-34.
61. De Wever O, Pauwels P, De Craene B, Sabbah M, Emami S, et al. "Molecular and pathological signatures of epithelial- mesenchymal transitions at the cancer invasion front". *Histochem Cell Biol.* 2008; 130: 481-94.
62. Deeb G, Wang J, Rammath N, Slocum HK, Wiseman S, et al. "Altered E-cadherin and epidermal growth factor receptor expressions are associated with patient survival in lung cancer: a study utilizing high-density tissue microarray and immunohistochemistry". *Mod Pathol.* 2004; 17: 430-9.
63. Di Croce L, Pelicci PG. "Tumour-associated hypermethylation: silencing E-cadherin expression enhances invasion and metastasis". *European Journal of Cancer.* 2003; 39(4): 413-14.
64. Dick JE. "Acute myeloid leukemia stem cells". *Ann NY Acad Sci.* 2005; 1044: 1-5.
65. Diévert A, Beaulieu N, Jolicoeur P. "Involvement of Notch1 in the development of mouse mammary tumors". *Oncogene.* 1999; 18(44): 5973-81.
66. Donnem T, Andersen S, Al-Shibli K, Al-Saad S, Busund LT, et al. "Prognostic impact of Notch ligands and receptors in nonsmall cell lung cancer: coexpression of Notch1 and vascular endothelial growth factor-A predicts poor survival". *Cancer.* 2010; 116(24): 5676-85. Doi: 10.1002/cncr.25551.

67. Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis W. "α-Catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-β-catenin and regulates actin-filament assembly". *Cell*. 2005; 123: 903-15.
68. Duband JL, Thiery JP. "Appearance and distribution of fibronectin during chick embryo gastrulation and neurulation". *Dev Biol*. 1982; 94: 337-50.
69. Dubey S, Powell CA. "Update in lung cancer 2008". *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 179: 860-68.
70. Eckes B, Colucci-Guyon E, Smola H, Nodder S, Babinet D, et al. "Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin". *J Cell Sci*. 2000; 113: 2455-62.
71. Eckes B, Dogic D, Colucci-Guyon E, Maniotis A, Ingber D, et al. "Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblast". *J Cell Sci*. 1998; 111: 1897-907.
72. Egan SE, St-Pierre B, Leow CC. "Notch receptors, partners and regulators: from conserved domains to powerful functions". *Curr top Microbiol Immunol*. 1999; 228: 273-24.
73. Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Biffoni M, et al. "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population". *Cell Death and Differentiation*. 2008; 15: 504-14.
74. Eramo, A, Haas TL, De Maria R. "Lung cáncer stem cells: tools and targets to fight lung cáncer". *Oncogene*. 2010: 1-11.
75. Evans MJ, Johnson LV, Stephens RJ, Freeman G. "Renewal of the terminal bronchiolar epithelium in the rat following exposure to NO<sub>2</sub> or O<sub>3</sub>". *Lab Invest*. 1976; 35(3): 246-57.
76. Fidler IJ. "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited". *Nat rev cancer*. 2003; 3: 453-8.
77. Fleming RJ, Gu Y, Hukriede NA. "Serrate-mediated activation of Notch is specifically blocked by the product of the gene fringe in the dorsal compartment of the Drosophila wing imaginal disc". *Development*. 1997; 124(15): 2973-81.
78. Fre S, Huyghe M, Mourikis P, Robine S, Louvard D, et al. "Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine". *Nature*. 2005, 435(7044): 964-8.
79. Frederick BA, Helfrich BA, Coldren CD, Zheng D, Chan D, et al. "Epithelial to mesenchymal transition predicts gefitinib resistance in cell lines of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung cancer". *Mol Cancer Ther*. 2007, 6(6): 1683-91.
80. Fuchs E, Weber K. "Intermediate filaments: structure, dynamics function, and disease". *Annu Rev Biochem*. 1994: 63: 345-82.

81. Gaiano N, Fishell G. "The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates". *Annu Rev Neurosci.* 2002; 25: 471-90.
82. Gaspar RH, De los Toyos JR, Marcos CA, Riera JR, Sampedro A. "Quantitative immunohistochemical analyses of the expression of E-cadherin, thrombomodulin, CD44H, and CD44v6 in primary tumours of pharynx/larynx squamous cell carcinoma and their lymph node metastases". *Analytical Cellular pathology.* 1999; 18(4): 183-90.
83. Ge MJ, Wu QC, Wang M, Li L, Zhao XL, et al. "Detection of circulating tumor cells(CTCs) in patients with lung carcinoma by real-time fluorescent quantitative-PCR approach before and after chemotherapy". *Health.* 2009, 1: 231-8.
84. Giangreco A, Groot KR, Janes SM. "Lung cancer and lung stem cells: strange bedfellows?" *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175: 547-53.
85. Gilles C, Polette M, Zahm JM, Tournier JM, Volders L, et al. "Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration". *J Cell Sci.* 1999; 112: 4615-25.
86. Grandbarbe L, Bouissac J, Rand M, Hrabé de Angelis M, Artavanis-Tsakonas S, et al. "Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process". *Development.* 2003; 130(7): 1391-402.
87. Gridley T. "Notch signaling in vertebrate development and disease". *Mol Cell Neurosci.* 1997; 9: 103-8.
88. Guarino M, Rubino B, Ballabio,G. "The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology". *Pathology.* 2007; 39: 305-18.
89. Guarino M. "Epithelial to mesenchymal change of differentiation. From embryogenetic mechanisms to pathological patterns". *Histol Pathol.* 1995; 10: 171-84.
90. Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. "Cancer stem cells: mirage or reality?" *Nat Med.* 2009; 15: 1010-12.
91. Hajra KM, Chen D Y-S, Fearon E R. "The slug zinc-finger protein represses E-Cadherin in breast cancer" *Cancer Res.* 2002; 62: 1613-18.
92. Halbleib JM, Nelson WJ. "Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis". *Genes and Development.* 2006; 20: 3199-214.
93. Haruna Y, Saito K, Spaulding S, Nalesnik MA, Gerber MA. "Identification of bipotential progenitor cells in human liver development". *Hepatology.* 1996; 23: 476-81.
94. Hatzfeld M, Weber K. "The coiled coil of in vitro assembled keratin filaments is a heterodimer of type I and II keratins: use of site-specific mutagenesis and recombinant protein expression". *J Cell Biol.* 1990; 110: 1199-210.
95. Hay ED. "An overview of epithelio-mesenchymal transformation". *Acta Anat (Basel).* 1995; 154: 8-20.

96. Hay ED. "Role of cell-matrix contacts in cell migration and epithelial-mesenchymal transformation". *Cell Differ.* 1990, 32: 367-75.
97. Hay ED. "The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it". *Dev Dyn.* 2005; 233: 706-20.
98. Hedley BD, Chambers AF. "Tumor dormancy and metastasis". *Adv Cancer Res.* 2009; 102: 67-101.
99. Hemavathy K, Ashraf S.I, Tony Y. "Snai/Slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer". *Gene.* 2000; 257: 1-12.
100. Hemavathy K, Guru S, Harris J, Chen J, Tony IP. "Human slug is a repressor that localizes to sites of active transcription". *MolCell Biol.* 2000; 26: 5087-95.
101. Hennesy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, et al. "Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-mesenchymal transition and stem cell characteristics". *Cancer Res.* 2009; 69(10): 4116-24.
102. Herrmann H, Strelkov SV, Burhard P, Aebi U. "Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity". *J Clin Invest.* 2009; 119: 1772-83.
103. Hesse M, Magin TM, Weber K. "Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18". *J Cell Sci.* 2001; 114: 2569-75.
104. Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. "Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells". *Cancer Res.* 2007, 67: 4827-33.
105. Hollier BG, Evans K, Mani SA. "The epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies". *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2009; 14: 29-43.
106. Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR, et al. "Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium". *Am J Pathol.* 2004; 164(2): 577-88.
107. Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR, et al. "In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations". *Am J Physiol lung Cell Mol Physiol.* 2004; 286(4): 643-9.
108. Hozt B, Arndt M, Dullat S, Bhargava S, Buhr HJ, et al. "Epithelial to Mesenchymal Transition: Expression of the regulators Snail, Slug, and Twist in Pancreatic cancer". *Clin Cancer Res.* 2007; 13 (16):4769-76.
109. Hu L, Lau SH, tzang CH, et al. "Association of Vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis". *Oncogene.* 2004; 23: 298-302.

110. Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, et al. "Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression". *J Cell Physiol.* 2007; 213: 374-83.
111. Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, et al "Systemic spread is an early step in breast cancer". *Cancer Cell.* 2008; 13(1): 58-68.
112. Inukai T, Inoue A, Kurosawa H, Goi K, Shinjyo T, et al."Slug, a *ces-1* related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein". *Mol Cell.* 1999; 4: 343-52.
113. Ito T, Udaka N, Yazawa T, Okudela K, Hayashi H, et al. "Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium". *Development.* 2000; 127: 3913-21.
114. Sriuranpong V, Borges MW, Ravi RK, Arnold DR, Nelkin BD, et al. "Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells". *Cancer Res.* 2001; 61(7): 3200-5.
115. Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. "Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration and signaling". *Exp Cell Res.* 2007, 313: 2050-62.
116. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, et al. "Epithelial. Mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance". *Cancer Sci.* 2010; 101(2): 293-99.
117. Jemal A, Thun MJ, Ries LA, Howe HL, Weir HK, et al. "Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control". *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100: 1672-94.
118. Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, et al. "Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer". *Mol Cancer Res.* 2009; 7: 330-38.
119. Jiang R, Lan Y, Norton CR, Sundberg JP, Gridley T. "The slug gene is not essential for mesoderm or neural crest development in mice". *Dev Biol.* 1998; 198(2): 277-85.
120. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. "Cancer stem cells". *N Engl J Med.* 2006; 355: 1253-61.
121. Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Yamashita M, Ino K, et al. "Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells". *Int J Oncol.* 2007; 31: 277-83.
122. Kalluri R, Neilson EG. "Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis". *J Clin Invest.* 2003; 112: 1776-84.
123. Kalluri R, Weinberg RA. "The basics of epithelial-mesenchymal transition". *J Clin Invest.* 2009; 119(6): 1420-7.

124. Kase S, Sigio K, Yamazaki K, Okamoto T, Yano T, et al. "Expression of E-cadherin and  $\beta$ -catenin in human non-small cell lung cancer and the clinical significance". *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 4789-96.
125. Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, et al. "Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix". *Proc Natl Aca Sci USA.* 2006, 103(35): 13180-85.
126. King N, Hittinger CT, Carroll SB. "Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins". *Science.* 2003; 301: 361-3.
127. Klein CA. "Parallel progression of primary tumours and metastases". *Nat Rev Cancer.* 2009; 9: 302-12.
128. Klymkowsky MW, Savagner P. "Epithelial-mesenchymal transition a cancer researcher's conceptual friend and foe". *Am J Pathol.* 2009; 174: 1588-93.
129. Knecht AK, Bronner-Fraser M. "Induction of the neural crest: a multigene process". *Nar Rev Genet.* 2002; 3: 453-61.
130. Kobiela A, Fuchs E. " $\alpha$ -Catenin. At the junction of intercellular adhesion and actin dynamics". *Cell Bio.* 2004, 5: 614-25.
131. Kopan R, Weintraub EH. "Mouse notch: expression in hair follicles correlates with cell fate determination". *J Cell Biol.* 1993; 121: 631-41.
132. Korsching E, Packeisen J, Liedtke C, hungermann D, Wülfing P, et al. "The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential?" *J Pathol.* 2005; 206(4): 451-7.
133. Kratz JR, Yagui-Beltrán A, Jablons DM. "Cancer stem cells in lung tumorigenesis". *Ann Thorac Surg.* 2010; 89: 2090-5.
134. Kurer R Muley T, Meister M, Ruschhaupt M, Buness A, et al "Global gene expression analysis reveals specific patterns of cell junctions in non-small cell lung cancer subtypes". *Lung Cancer* 2009; 63: 32-38.
135. Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar AV, Ghanate AD, Chaskar PD, et al. "Snail and Slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells". *Stem Cells.* 2009; 27: 2059-68.
136. Lazarides E. "Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space". *Nature.* 1980; 283: 249-56.
137. Leader M, Collins M, Patel J, Henry K. "Vimentin: an evaluation of its role as a tumour marker". *Histopathology.* 1987; 11: 63-72.

138. Leong KG, Niessen K, Kulic I, Raouf A, Eaves C, et al. "Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial to mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin". *J Exp Med*. 2007; 204: 2935-48.
139. Levina V, Marrangoni AM, De Marco R, Gorelik E, Lokshin AE. "Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties". *PLoS One*. 2008; 3:e3077.
140. Linnoila RI, Zhao B, De Mayo JL, Nelkin BD, Baylin SB, et al. "Constitutive achaete-scute homologue-1 promotes airway dysplasia and lung neuroendocrine tumors in transgenic mice". *Cancer Res*. 2000; 60: 4005-9.
141. Liu D, Huang CL, Kameyama K, Hayashi E, Yamauchi A, et al. "E-cadherin expression associated with differentiation and prognosis in patients with non-small cell lung cancer". *Ann Thorac Surg*. 2001; 71: 949-54.
142. López-Malpartida AV, Ludeña MD, Varela G, García Pichel J. "Differential ErbB receptor expression and intracellular signaling activity in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas". *Lung Cancer*. 2009; 65(1): 25-33.
143. Lowry WE, Richter L. "Signaling in adult stem cells". *Front Biosci*. 2007; 12: 3911-27.
144. Maeda J, Hiramoto T, Ogiwara A, Akimoto S, Kawakami T, et al. "Proteomic analysis of stage I primary lung adenocarcinoma aimed at individualization of postoperative therapy". *British J Cancer*. 2008; 98: 596-60.
145. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, et al. "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells". *Cell*. 2008; 133: 704-15.
146. Mavroudis D. "Circulating cancer cells". *Ann Oncol*. 2010; 7: 95-100.
147. McNroy L, Määttä A. "Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion". *Biochem and Biophys Res Comm*. 2007; 360: 109-14.
148. Miele L, Miao H, Nickoloff BJ. "Notch signaling as a novel cancer therapeutic target". *Curr Cancer Drug Targets*. 2006; 6: 313-23.
149. Miele L. "Notch signaling". *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 1074-9.
150. Milner LA, Kopan R, Martin DI, Bernstein ID. "A human homologue of the Drosophila developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors". *Blood*. 1994; 83: 2057-62.
151. Min C, Eddy SF, Sherr DH, Sonenshein GE. "NF- $\kappa$ B and epithelial to mesenchymal transition of cancer", *J Cell Biochem*. 2008; 104(3): 733-44.
152. Minin AA, Moldaver MV. "Intermediate Vimentin filaments and their role in intracellular organelle distribution". *Biochemistry*. 2008; 73(13): 1453-66.
153. Minna JD, Roth JA, Gazdar AF. "Focus on lung cancer". *Cancer Cell*. 2002; 1: 49-52.



154. Moohr OL. "Character changes caused by mutation of an entire region of a chromosome in *Drosophila*". *Genetics*. 1919, 4; 252.
155. Morel AP, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, et al. "Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition". *PLoS ONE*. 2008; 3(6): e2888.
156. Mumm JS, Kopan R. "Notch signaling: from the outside in". *Devlop Biol*. 2000; 228: 151-65.
157. Nawrocki B, Polette M, Maquoi E, Brembaut P. "Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during human placental development". *Trophoblast Res*. 1997; 10: 97-113.
158. Ngan CY, Yamamoto H, Seshimo I, Tsujino T, Man-i M, et al. "Quantitative evaluation of vimentin expression in tumour stroma of colorectal cancer". *British J Cancer*. 2007; 96: 986-92.
159. Nichols SA, Dirks W, Pearse JS, King N. "Early evolution of animal cell signaling and adhesion genes". *Proc Natl Acad Sci*. 2006; 103(33): 12451-6.
160. Nieminen M, Henttinen T, Merinen M, Marttila-Ichihara F, Eriksson JE, et al. "Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration". *Nat Cell Biol*. 2006, 8: 156-62.
161. Niessen K, Fu Y, Chang L, Hoodless PA, McFadden D, et al. "Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization". *J Cell Biol*. 2008; 182(2): 315-25.
162. Nieto MA. "The snail superfamily of zinc-finger transcriptions factors". *Nat rev Mol Cel Biol*. 2002; 3(3): 155-66.
163. Noren NK, Liu BP, Burrige K, Kreft B. "p120-catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases". *J Cell Biol*. 2000; 150: 567-80.
164. Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M. "Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems". *Cell*. 1998, 54: 993-1001.
165. Ohkubo T, Ozawa M. "The transcription factors Snail down regulates the tight junction components indepently of E-cadherin downregulation". *J Cell Sci*. 2004; 117: 1675-85.
166. Olmeda D, Montes A, Moreno-Bueno G, Flores JM, Portillo F, et al. "Snai1 and Snai2 colloborate on tumor growth and metastasis properties of mouse skin carcinoma cell lines". *Oncogene*. 2008; 27: 4690-701.
167. Ouyang G, Wang Z, Fang X, Liu J, Yang CJ. "Molecular signaling of the epithelial to mesenchymal transiton in generating and maintaining cancer stem cells". *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67: 2605-18.

168. Pantel K, Riethdorf S. "Pathology: are circulating tumor cells predictive of overall survival?" *Nat Rev Clin Oncol*. 2009; 6: 190-1.
169. Peacock CD, Watkins DN. "Cancer stem cells and the ontogeny of lung cancer". *J Clin Oncol*. 2008; 26(17): 2883-9.
170. Peinado H, Olmeda D, Cano A. "Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?" *Nat Rev Cancer*. 2007; 7: 415-28.
171. Peinado H, Portillo F, Cano A. "Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis". *Int J Dev Biol*. 2004; 48: 365-75.
172. Pelletier MP, Edwardes MD, Michel RP, Halwani F, Morin JE. "Prognostic markers in resectable non-small cell lung cancer: a multivariate analysis". *Can J Surg*. 2001; 44: 180-8.
173. Pérez-Losada J, Sánchez-Martín M, Pérez-Caro M, Pérez-Mancera PA, Sánchez-García I. "The radioresistance biological function of the SCF /kit signalling pathway is mediated by the zinc-finger transcription factor Slug". *Oncogene*. 2003; 22: 4205-11.
174. Pérez-Losada J, Sánchez-Martín M, Rodríguez-García A, Sánchez ML, Orfao A, et al "Zinc-finger transcription factor Slug contributes to the function of stem cell factor c-kit signaling pathway". *Blood*. 2002; 100: 1274-86.
175. Pérez-Mancera PA, González-Herrero I, Pérez-Caro M, Gutierrez-Cianc N, Florres T, et al " SLUG in cancer development" *Oncogene*. 2005; 24: 3073-82.
176. Polyak K, Weinberg RA. "Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cells traits". *Nat Rev Cancer*. 2009; 265: 265-73.
177. Poulson D. "Chromosomal deficiencies and embryonic development of *Drosophila melanogaster*". *Proc Natl Acad Sci USA*. 1937; 23: 133-37.
178. Prall F. "Tumour budding in colorectal carcinoma". *Histopathology*. 2007; 50: 151-62.
179. Prudkin L, Liu D, Ozburn NC, Sun M, Behrens C, et al. "Epithelial to mesenchymal transition in the development and progression of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung". *Modern Pathology*. 2009; 22: 668-78.
180. Ramaekers FC, Haag D, Kant A, Moesker O, Jap PHK, et al. "Coexpression of keratin and vimentin-intermediate filaments in human metastatic carcinoma cells". *Pro Nat Acad Sci USA*. 1983; 80: 2618-22.
181. Raptis L, Menard HA. "Quantitation and characterization of plasma DNA in normals and patients with systemic lupus erythematosus". *J Clin Invest*. 1980; 66(6): 1391-9.
182. Rawlins EL, Okkubo T, Que J, Xue Y, Clark C, et al. "Epithelial stem/progenitor cells in lung postnatal growth, maintenance, and repair". *Cold Sprig Harb Symp Quant Biol*. 2008; 73: 291-5.

183. Reedik M, Odorcic S, Zhang H, Chetty R, Tennert C, et al. "Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma". *Int J Oncol.* 2008; 33: 1223-29.
184. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. "Stem cells, cancer, and cancer stem cells". *Nature.* 2001; 414: 105-11.
185. Reynolds BA, Weiss S. "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system". *Science.* 1992; 255: 1707-10.
186. Reynolds SD, Hong KU, Giangreco A, Mango GW, Morimoto Y, et al. "Conditional Clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 278(6): 1256-63.
187. Richards E. "Inherited epigenetic variation-Revisiting soft inheritance". *Nat Rev Genet.* 2006; 7: 395-401.
188. Robson EJ, Khaled WT, Abell K, Watson CJ. "Epithelial-to-mesenchymal transition confers resistance to apoptosis in three murine mammary epithelial cell lines". *Differentiation.* 2006; 74(5): 254-64.
189. Ros MA, Sefton M, Nieto MA. "Slug, a zinc-finger gene previously implicated in the early patterning of the mesoderm and the neural crest, is also involved in chick limb development". *Development.* 1997; 124: 1821-9.
190. Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Jukien S, Prevost G, et al. "Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-mesenchymal transitions in epithelial cancers". *Drug Resist Updat.* 2008; 11: 123-51.
191. Sánchez Martín M, Rodríguez García A, Pérez Losada J, Sagrera A, Read AP, et al. "SLUG deletions in patients with Waardenburg disease". *Hum Mol Genet.* 2002; 11: 3231-36.
192. Santos L, León-Galván MF, Marino-Marmolejo EN. "Vía de señalización de Notch y nuevas estrategias para el tratamiento de cáncer". *Salud Pública Mex.* 2006; 48: 155-65.
193. Sarkar FH, Wang LZ, Kong D. "Pancreatic cancer stem cells and EMT in drug resistance and metastasis". *Minerva Chir.* 2009; 64: 489-500.
194. Sarraf C, El-Nasir L, Golding M, Anilkumar TV, Poulosom R, et al. "Cell behavior in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver: light and electron microscopic observations". *Am J Pathol.* 1994; 145: 1114-26.
195. Sauka-Spengler T, Bronner-Fraser M. "A gene regulatory network orchestrates neural crest formation". *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9: 557-68.
196. Savagner P, Boyer B, Vallés AM, Jouanneau J, Thiery JP. "Modulations of the epithelial phenotype during embryogenesis and cancer progression". In *Mammary Tumorigenesis and Malignant progression* (ed R. Dickson and M Lippman). 1999: 229-49.

197. Savagner P, Yamada KM, Thiery JP. "The zinc-finger protein Slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition". *J Cell Biol.* 1999; 137: 1403-19.
198. Savagner P. "Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition". *Bioessays.* 2001; 23: 912-23.
199. Schoch KG, Lori A, Burns KA, Eldred T, Olsen JC, et al. "A subset of mouse tracheal epithelial basal cells generates large colonies in vitro". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 286(4): L631-42.
200. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. "Molecular genetics of lung cancer". *Annu Rev Med.* 2003; 54: 73-87.
201. Serrano MJ, Sánchez-Rovira P, Delgado-Rodríguez M, Gaforio JJ. "Detection of circulating tumor cells in the context of treatment: prognostic value in breast cancer". *Cancer Biol Ther.* 2009; 8(8): 671-5.
202. Shah AN, Summy JM, Zhang J, Park SI, Parikh NU, et al. "Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells". *Ann Surg oncol.* 2007; 14: 3629-37.
203. Shan L, Aster JC, Sklar J, Sunday ME. "Notch1 regulates pulmonary neuroendocrine cell differentiation in celllines and in transgenic mice". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007; 292: 500-9.
204. Sher YP, Shih JY, Yang PC, Roffler SR, Chu YW, et al. "Prognosis of non-small cell lung cancer patients by detecting circulating cancer cells in the peripheral blood with multiple marker genes". *Clin Cancer Res.* 2005, 11: 173-9.
205. Shibamura H, Hirano T, Tsuji K, Wu Q, Shrestha B, et al. "Influence of E-cadherin dysfunction upon local invasion and metastasis in non-small cell lung cancer". *Lung Cancer.* 1998; 22: 85-95.
206. Shih JY, Tsai MF, Chang TH, Chang YL, Yuan A, et al. "Transcription repressor slug promotes carcinoma invasion and predicts outcome of patients with lung adenocarcinoma" *Clin Cancer Res.* 2005; 11(22): 8070-78.
207. Shmelkov SV, St Clair R, Lyden D, Rafii S. "AC133/CD133/Prominin-1". *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37(4): 715-9.
208. Singh S, Sadacharan S, Su S, Belldegrun A, Persad S, et al. "Overexpression of vimentin : role in the invasive phenotype in an androgen-independent model of prostate cancer". *Cancer Res.* 2003; 63: 2306-11
209. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, et al. "Identification of human brain tumour initiating cells". *Nature.* 2004; 432(7015): 396-401.

210. Sklar J, Churg A, Bench KG. "Oncocytic carcinoid tumor of the lung". *Am J Surg Pathol*. 1980; 4(3): 287-92.
211. Smythe WR, Williams JP, Wheelock MJ, Johnson KR, Kaiser LR, et al. "Cadherin and catenin expression in normal bronchial epithelium and non-small cell lung cancer". *Lung Cancer*. 1999; 24(3): 157-68.
212. Snyder JC, Teisanu RM, Stripp BR. "Endogenous lung stem cells and contribution to disease". *Journal of Pathology*. 2009; 217: 254-64.
213. Socinski MA, Crowell R, Hensing TE, Langer CJ, Lilenbaum R, et al. "Treatment of non-small cell lung cancer, stage IV. Diagnosis and management of lung cancer: evidence-based clinical practice guidelines" (2<sup>nd</sup> edition). *Chest*. 2007; 132: 277-89.
214. Soltermann A, Tischler V, Arbogast S, Braun J, Probst-Hensch N, et al. "Prognostic significance of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition protein expression in non-small cell lung cancer". *Clin Cancer Res*. 2008; 14(22): 7430-7.
215. Sommers CL, Heckford SE, Skerker JM, Worland P, Torri JA, et al. "Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin and vinblastina-resistant human breast cancer cell lines". *Cancer Res*. 1992; 52: 5190-97.
216. Sommers CL, Walker-Jones D, Heckford SE, Worland P, Valverius E, et al. "Vimentin rather than keratin expression in some hormone-independent breast cancer cell lines and in oncogene-transformed mammary epithelial cells". *Cancer Res*. 1989; 49: 4258-63.
217. Spritz RA. "Lack of apparent hematologic abnormalities in human patients with c-kit (stem cell factor receptor) gene mutations". *Blood*. 1992, 79: 2497-99.
218. Sriuranpong V, Borges MW, Ravi RK, Arnold DR, Nelkin BD, et al. "Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells". *Cancer Res*. 2001; 61(7): 3200-5.
219. Stemmler MP, Hecht A, Kemler R. "E-cadherin intron 2 contains cis-regulatory elements essential for gene expression". *Development*. 2005; 132: 965-76.
220. Storci G, Sansone P, Trere D, Tavolari S, Taffurelli M, et al. "The basal-like breast carcinoma phenotype is regulated by SLUG gene expression". *J Pathol*. 2008; 214: 25-37.
221. Strathdee G. "Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin". *Semin Cancer Biol*. 2002; 12: 373-79.
222. Strauss GM. "Prognostic markers in resectable non-small cell lung cancer". *Hematol Oncol Clin North Am*. 1997; 11(3): 409-34.
223. Stripp BR. "Hierarchical organization of lung progenitor cells: is there an adult lung tissue stem cell?" *ProcAm Thorac Soc*. 2008; 5: 695-8.

224. Sulzer MA, Leers MP, van Noord JA, Bollen EC, theunissen PH, et al. "Reduced E-cadherin expression is associated with increased lymph node metástasis and unfavorable prognosis in non-small cell lung cáncer". *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157: 1319-23.
225. SundarRaj N, Rizzo JD, Anderson S, Gesiotto JP. "Expression of vimentin by rabbit corneal keratinocytes during wound repair". *Cell Tissue Res*. 1992; 267: 347-356.
226. Swiatek PJ, Lindsell CE, del Amo FF, Weinmaster G, Gridley T. "Notch 1 is essential for postimplantation development in mice". *Genes Dev*. 1994; 8: 707-19.
227. Takeichi M. "Cadherins: A molecular family important in selective cell-cell adhesion". *Ann Rev Biochem*. 1990; 59: 237-52.
228. Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, Kondo N, Hashimoto M, et al. "Circulating tumor cell as a diagnostic marker in primary lung cancer". *Clin Cancer Res*. 2009; 15(22). 6980-6.
229. Taussing DC, Pearce DJ, Simpson C, Rothatiner AZ, Lister TA, et al. "Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia". *Blood*. 2005; 106(13): 4086-92.
230. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease". *Cell*. 2009; 139(25): 871-90.
231. Thiery JP, Sleeman JP. "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transition". *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7: 131-42.
232. Thiery JP. "Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies". *Curr Opin Cell Biol*. 2003; 15: 740-6.
233. Thompson EW, Nwegreen DF. "Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition?" *Cancer Res*. 2005; 65(14): 5991-5.
234. Thomson S, Buck E, Petti F, Griffin G, Brawn E, et al. "Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitive of non-small-cell lung carcinoma lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition". *Cancer Res*. 2005, 65(20): 9455-62.
235. Tiseo M, Bartolotti M, Gelsomino F, Ardizzoni A. "First-line treatment in advanced non-small-cell lung cancer: the emerging role of the histologic subtype". *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009; 9: 425-35.
236. Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, Ruijter ET, Jansen CF, et al. "Cadherin switching in human prostate cancer progression". *Cancer Res*. 2000; 60(13): 3650-4.
237. Tsarfaty I, Rong S, Resau JH, Rulong S, Silva PP, et al. "The met proto-oncogene mesenchymal to epithelial cell conversion". *Science*. 1994; 263: 98-101.

238. Tsukamoto H, Shibata K, HKajiyama H, Terauchi M, nawa A et al. "Irradiation-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) related to invasive potential in endometrial carcinoma cells". *Gynecol Oncol*. 2007; 107(3): 500-4.
239. Van der Pluijm G. "Epithelial plasticity, cancer stem cells and bone metastasis formation". *Bone*. 2010. Doi: 10.1016/j.bone.2010.07.023.
240. Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, et al. "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer". *Nature*. 2002, 415(6871): 530-6.
241. Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, He H, Auer H, et al. "Gene expression and functional evidence of epithelial to mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion". *PNAS*. 2007; 104: 2803-8.
242. Vicovac L, Apliln JD. "Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation". *Acta Anat (Basel)*. 1996; 156: 202-16.
243. Virchow R. "Die cellular pathologie in ihrer begruendung auf physiologische und pathologische gewebelebre". August Hirschwald. Berlin. Germany. 1858.
244. Wang Z, Banerjee S, Li Y, Rahman KM, Zhang Y, et al. "Down-regulation of Nocht1 inhibits invasion by activation of nuclear factor- $\kappa$ B, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in pancreatic cancer cells". *Cancer Res*. 2006; 66(5): 2778-84.
245. Wang Z, Li Y, Kong D, Banerjee S, Ahmad A, et al. "Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabina-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the Notch signaling pathway". *Cancer Res*. 2009; 69(6): 2400-7.
246. Wang Z, Li Y, Kong D, Sarkar FH. "The role of Notch signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition (EMT) during development and tumor aggressiveness". *Current Drug targets*. 2010; 11: 745-51.
247. Watabe M, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M. "Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line". *J Cell Biol*. 1994; 127(1): 247-56.
248. Welm AI, Kim S, Welm BE, Bishop JM. "MET and MYC cooperate in mammary tumorigenesis": *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(12): 4324-9.
249. Westhoff B, Colaluca IN, D'Ario G, Donzelli M, Tosoni D, et al. "Alterations of the Notch pathway in lung cancer". *PNAS*. 2009; 106(52): 22293-98.
250. Wharton KA, Johansen KM, Xu T, Artavanis-Tsakonas S. "Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats". *Cell*. 1985; 43: 567-81.

251. Wicha MS, Liu S, Dontu, G. "Cancer stem cells: an old idea-a paradigm shift". *Cancer Res.* 2006, feb 15; 66 (4): 1883-90, discussion 1995-6.
252. Wu Y, Zhou BP. "New insights of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis". *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008; 40: 643-50.
253. Yagi T, Takeichi M. "Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity". *Genes and Development.* 2000; 14: 1169-80.
254. Yang AD, Fan F, Camp ER, Van Buren G, Liu W, et al. "Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines". *Cin Cancer Res.* 2006; 12: 4147-53.
255. Yang J, Weinberg RA. "Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroad of development and tumor metastasis". *Dev Cell.* 2008; 14: 818-29.
256. Yauch RL, Januario T, Eberhard DA, Cavet G, Zhu W, et al. "Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients". *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 8686-98.
257. Yie SM, Lou B, Ye SR, He X, Cao M, et al. "Clinical significance of detecting surviving, expressing circulating cancer cells in patients with non-small cell lung cancer". *Lung Cancer.* 2009; 63: 284-90.
258. Yoon K, Gaiano N. "Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants". *Nat Neurosci.* 2005; 8: 709-15.
259. Yoshida C, Takeichi M. "Teratocarcinoma cell adhesion: identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation". *Cell.* 1982; 28: 217-24.
260. Yoshida H, Kobayashi S, Okada S, Hasumi T, Satoh N, et al. "Difference in expression of epithelial adhesion molecules between primary and metastatic lesion in small-cell lung cancer". *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi.* 1996; 34(10): 1077-83.
261. Zafrani B, Aubriot MH, Mouret E, De Crémoux P, De Rycke Y, et al. "High sensitivity and specificity of immunohistochemistry for the detection of hormone receptors in breast carcinomas: comparison with biochemical determination in a prospective study of 793 cases". *Histopathology.* 2000, 37(6): 536-45.
262. Zagouras P, Stifani S, Blaumueller CM, Carcangiu ML, Artavanis-Tsakonas S. "Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix". *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 6414-18.
263. Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, et al. "Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition". *J Biol Chem.* 2007; 282(32): 23337-47.



264. Zhang Y, Lin B, Ji ZZ, Zheng PS. "Notch1 regulates the growth of human colon cancers". *Cancer*. 2010; 116(22): 5207-18. Doi: 10.1002/cncr.25449.
265. Zhuo WI, Wang Y, Zhuo XL, Zhang YS, Chen ZT. "Short interfering RNA directed against TWIST, a novel zinc finger transcription factor, increases A549 cell sensitivity to cisplatin via MAPK/mitochondrial pathway". *BioChem Biophys Res Commun*. 2008; 369(4): 1098-102.